

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**DOMATESTEN LİKOPEN İZOLASYONUNA YÖNELİK
MONODİSPERS KROMATOĞRAFİK KOLON DOLGU
MADDELERİNİN SENTEZİ, LİKOPENİN
SAFLAŞTIRILMASI VE ENKAPSÜLASYONU**

**Hazırlayan
Seda ÖZGEN**

**Danışman
Prof. Dr. Kemal SARIOĞLU**

Doktora Tezi

**Nisan 2014
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**DOMATESTEN LİKOPEN İZOLASYONUNA YÖNELİK
MONODİSPERS KROMATOĞRAFİK KOLON DOLGU
MADDELERİNİN SENTEZİ, LİKOPENİN
SAFLAŞTIRILMASI VE ENKAPSÜLASYONU**

**Hazırlayan
Seda ÖZGEN**

**Danışman
Prof. Dr. Kemal SARIOĞLU**

Doktora Tezi

**Nisan 2014
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tez çalışmasındaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Seda ÖZGEN



YÖNERGEYE UYGUNLUK

“Domatesten Likopen İzolasyonuna Yönelik Monodispers Kromatografik Kolon Dolgu Maddelerinin Sentezi, Likopenin Saflaştırılması ve Enkapsülasyonu” adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Seda ÖZGEN

Danışman

Prof. Dr. Kemal SARIOĞLU

Gıda Mühendisliği ABD Başkanı

Prof. Dr. Mahmut DOĞAN

Prof. Dr. Kemal SARIOĞLU danışmanlığında **Seda ÖZGEN** tarafından hazırlanan “**Domatesten Likopen İzolasyonuna Yönelik Monodispers Kromatografik Kolon Dolgu Maddelerinin Sentezi, Likopenin Saflaştırılması ve Enkapsülasyonu**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ:

Başkan :Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ

Üye :Prof. Dr. Kemal SARIOĞLU

Üye :Prof. Dr. Mehmet HAYTA

Üye :Prof. Dr. Ahmed KAYACIER

Üye : Yrd. Doç. Dr. Nalan ÖZDEMİR

ONAY:

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulunun **29/04/2014** tarih ve **2014/20-19** sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Kâzım Keşlioğlu

TEŞEKKÜR

Tez konusunun belirlenmesi, planlanması ve bilimsel yetkinliği sayesinde çalışmanın yürütülmesinde sonsuz emeği geçen her zaman tecrübesinden ve bilgi birikiminden faydalandığım danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Kemal SARIOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tezin takibi kısmında emeği geçen ve değerli tavsiyeleriyle tezin yönlendirilmesinde katkıları olan tez izleme komitesi üyeleri Prof. Dr. Mehmet HAYTA ve Yrd. Doç. Dr. Nalan ÖZDEMİR hocalarıma da teşekkürü bir borç bilirim. Yrd. Doç. Dr. Rasim Alper ORAL hocama da desteğinden dolayı teşekkür ederim. Hiçbir konuda yardımlarını, emeklerini ve teşviklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Araş. Gör. Safa KARAMAN, Araş. Gör. Kevser KARAMAN ve Öğr. Gör. Ebubekir CENGİZ'e de sonsuz teşekkür ediyorum.

Her an yanımda olup sonsuz güvenleri ile bana güç veren, her türlü özverileri, karşılıksız sevgileri ve anlayışları ile beni her zaman destekleyen canım aileme...

Teşekkür ediyorum...

Seda ÖZGEN

Kayseri, Nisan 2014

**DOMATESTEN LİKOPEN İZOLASYONUNA YÖNELİK MONODİSPERS
KROMATOĞRAFİK KOLON DOLGU MADDELERİNİN SENTEZİ,
LİKOPENİN SAFLAŞTIRILMASI VE ENKAPSÜLASYONU**

Seda ÖZGEN
Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Doktora Tezi, Nisan 2014
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kemal SARIOĞLU

ÖZET

Yapılan çalışmanın amacı; preparatif sıvı kromatografisi ile domatesten likopen saflaştırılmasında kullanılmak üzere monodispers-gözenekli partikül formda polimer bazlı yeni kolon dolgu materyallerinin sentezlenmesi ve karakterizasyonudur.

Monodispers küresel formda ve yüksek çapraz bağlanma oranına sahip 6 µm çapında adsorbanlar tetrahidrofurfuril akrilat (THFA) ve divinilbenzen (DVB) kullanılarak “çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu” yöntemi ile sentezlenmiştir.

Polimerik adsorban sentezinde, çeşitli parametreler değiştirilerek farklı reçetelere sahip sentezler yapılmıştır. Polimerizasyon reçetesindeki parametrelerin partiküllerin fiziksel, kimyasal özellikleri ve kromatografik ayırma performansları üzerine etkileri incelenmiştir. Sentezlenen adsorbanların karakterizasyonunda; Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FTIR) spektrumları ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüleri kullanılmıştır. Sentezlenen farklı polariteye sahip partiküller yüksek basınç altında Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) kolonlarına doldurulmuş ve kolonların kromatografik davranışı likopen ve β-karotenin ayrılması işlemi ile test edilmiştir. Kromatografik çalışma kısmında kolonların performansı pik çözünürlüğü, teorik tabaka sayısı ve alıkonma faktörleri belirlenerek değerlendirilmiştir.

En iyi performans gösteren S-4 kodlu monodispers adsorban malzeme seçilmiş ve preparatif sıvı kromatografisi kolon sistemlerinde domates posasından likopen saflaştırılmasında kullanılmıştır. Çalışmanın bu kısmından %98.99 saflıkta likopen elde edilmiştir.

Saflaştırılan likopen, iyonik jelasyon yöntemi ile şırınga pompa-ekstrüzyon sistemi kullanılarak mikroenkapsüle edilmiştir. Kaplama maddesi olarak farklı oranlarda sodyum aljinat kullanılmış ve farklı akış hızları denenmiştir. Kapsüllerin optik mikroskop ve taramalı elektron mikroskobu görüntüleri ile şekilleri ve boy

dağılımları belirlenmiştir. Elde edilen mikrokapsüller model gıda olarak seçilen kek miksine katılmış ve üründe stabil oldukları belirlenmiştir. Daha sonraki aşamada mikrokapsüllerin yapay mide ve yapay bağırsak sıvısındaki kontrollü salım davranışları incelenmiştir. Mikroenkapsüle likopen, asidik mide ortamında 30 dakika içinde %40'tan daha az salınırken, yapay bağırsak ortamında ilk 10 dakika içinde %100 oranında salınmıştır.

Sonuç olarak sentezlenen monodispers kolon dolgu maddeleri ile mevcut ticari kolonlarla yarışabilir nitelikte kolonlar elde edilmiş ve elde edilen kolon dolgu malzemesi ile oldukça büyük bir ekonomik değere sahip olan likopen başarılı bir şekilde, saf olarak elde edilmiştir. Enkapsüle edilerek stabilizasyonu sağlanmış ve gıdalarda kullanılabilirliği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Monodispers kolon dolgu maddesi, tetrahidrofurfuril-co-divinilbenzen, saflaştırma, preparatif sıvı kromatografisi, saflaştırma, likopen, mikroenkapsülasyon

**THE SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF MONODISPERSE
CHROMATOGRAPHIC COLUMN PACKING MATERIALS FOR
ISOLATION LYCOPENE FROM TOMATOES, PURIFICATION AND
ENCAPSULATION OF LYCOPENE**

Seda ÖZGEN

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

Ph.D. Thesis, April 2014

Thesis Supervisor: Prof. Dr. Kemal SARIOĞLU

ABSTRACT

The aim of the study is to synthesize a new column packing materials in spherical form monodisperse porous particles by use for purifying lycopene from tomato with preparative liquid chromatography. Spherical form and cross-linked with 6 μm in size, were synthesized by “multi-stage microsuspension polymerization” using tetrahydrofurfuryl acrylate and divinylbenzene.

The polymeric adsorbents were synthesized by varying different parameters in the particle synthesis prescriptions. The effects of variable parameters on physical and chemical properties and the chromatographic separation performance of the particles were investigated. The physical characterization of particles was performed by FTIR spectra and scanning electron microscopy.

The particles synthesized were slurry packed into the stainless steel HPLC columns under high pressure. The chromatographic behaviour of the columns was investigated with the separation of lycopene and β -carotene. In chromatographic separation, the column performance is expressed in terms of resolution, theoretical plate number and retention factor.

The best performed monodispers adsorbent coded as S-4 were selected and used for the purification of lycopene by using preparative liquid chromatography column. In this part of the study, the 98.99% purity lycopene was obtained.

The purified lycopene, was microencapsulated by using syringe pump-extrusion system by means of ionic gelation technique. Sodium alginate was used as a coating material in different rates and variable pumping flow rates were tested.

Partical shapes and size distributions were determined by optical microscopy and scanning electron microscopy images of the capsules. The obtained microcapsules were added to cake mix as a selected model food and it was found that the encapsulated lycopene with alginate was stable in products.

In the later stage, controlled release behaviors of the microcapsules were investigated the simulated gastric and simulated intestinal fluid. In gastric media less than 40% of the lycopene was released after 30 min, but in intestinal media 100% lycopene were released within 10 minutes.

Consequently, the columns developed in this study exhibited chromatographic performances comparable to the commercial columns. By using the proposed technique, lycopene was obtained successfully as a pure which having a great commercial significance.

Key words: Monodisperse-porous particles, tetrahydrofurfuryl-*co*-divinylbenzene, preparative liquid chromatography, purification, lycopene, microencapsulation

İÇİNDEKİLER

MONODİSPERS KROMATOĞRAFİK KOLON DOLGU MADDELERİNİN DOMATESTEN LİKOPEN İZOLASYONUNA YÖNELİK SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	ii
KABUL ONAY	iii
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR ve SİMGELER	xv
TABLolar LİSTESİ.....	xvii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xix
GİRİŞ	1

1. BÖLÜM GENEL BİLGİLER

1.1 Kromatografi.....	5
1.1.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC).....	5
1.1.1.1. HPLC Sistemleri	6
1.1.1.2. Sürekli Faz.....	7
1.1.1.3. Sabit Faz	7
1.1.1.4. Pompa	8
1.1.1.5. Dedektör	8
1.1.1.6. Kolon.....	8
1.1.1.7. Kolon Dolgu Materyalleri	9
1.1.2. Ahkonma Parametreleri	9

1.1.3. Bant Genişliği.....	10
1.1.4. Kolon Verimliliği	10
1.1.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinin Kullanım Alanları.....	12
1.1.6. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinin Sınıflandırılması.....	13
1.2. Polimerik Kolon Dolgu Malzemelerinin Sentez Yöntemi.....	15
1.2.1. Dispersiyon Polimerizasyonu	15
1.2.2. Çok Basamaklı Mikrosüspanسیون Polimerizasyonu	17
1.3. Karotenoidler.....	18
1.3.1. Gıdalarda Yaygın Olarak Bulunan Karotenoidler	20
1.3.1.1 β -karoten ve α -karoten.....	20
1.3.1.2 Lutein ve zeaksantin.....	20
1.3.1.3 Likopen	21
1.3.1.3.1. Likopenin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	25
1.3.1.3.2. Likopenin Sağlık Üzerine Etkileri.....	28
1.3.1.3.3. Likopenin Elde Edildiği Yöntemler ile İlgili Çalışmalar.....	29
1.4. Enkapsülasyon Teknolojisi ve Özellikleri.....	34
1.4.1. Enkapsüle Edilen Bileşenler (Aktif Maddeler).....	36
1.4.2. Enkapsülasyonda Kullanılan Kaplama Materyalleri	37
1.4.2.1. Karbonhidratlar	38
1.4.2.2. Gamlar	41
1.4.2.3. Proteinler	44
1.4.3 Enkapsülasyon Metotları.....	46
1.4.3.1. Püskürtmeli Kurutma	46
1.4.3.2. Koaservasyon	48
1.4.3.3. Emülsiyon Oluşturma	49
1.4.3.4. Dondurarak Kurutma	50
1.4.3.5. Damlatma (iyonik jelasyon) Metodu.....	50
1.4.3.6. Kokristalizasyon	54
1.4.3.7. Lipozom Tutuklama	55
1.4.5. Likopenin Enkapsülasyonu ile İlgili Çalışmalar	57

2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Gereç.....	60
2.1.1. Likopen Kaynağı	60
2.1.2. Kolon Dolgu Materyali	61
2.1.3. Mobil fazlar, Çözgenler ve Enzimler	62
2.1.4. Standartlar	63
2.1.5. Enkapsülasyon	64
2.1.6. Alet-Ekipman ve Cihazlar	64
2.2. Yöntem	67
2.2.1.Çıkış Lateksinin Üretimi.....	70
2.2.1.1. Polimerizasyon Yöntemi	70
2.2.1.2. Çıkış Lateksinin Karakterizasyonu	71
2.2.2. Monodispers Gözenekli Partiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu ..	72
2.2.2.1 Çıkış Lateksinin Dilüent ve Monomer Fazı ile Şişirilmesi.....	72
2.2.2.2. Monomer Fazının Çıkış Partikülleri İçerisinde Polimerizasyonu	73
2.2.2.3 Monodispers Gözenekli Partiküllerin Yıkanması ve	
Ekstraksiyonu.....	75
2.3. Sentezlenen Monodispers Gözenekli Partiküllerin Karakterizasyonu	77
2.3.1. FTIR ile Karakterizasyon.....	78
2.3.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Karakterizasyon	79
2.4. Kromatografik Performans Testleri	80
2.4.1. Kromatografik Kolonların Doldurulması.....	80
2.4.2.Kromatografik Sistem.....	80
2.4.3. Kromatografik Parametrelerin Tayini.....	81
2.4.3.1. Stok Standart Çözeltilerin Hazırlanması	81
2.4.3.2. Kromatografik Performans Ölçütleri.....	82
2.5. Domatesten Likopen Saflaştırılması.....	84
2.5.1. Domatesten Posa ve Su eldesi	84
2.5.2. Domateste Yapılan Analizler.....	84
2.5.2.1. Kuru Madde Analizi.....	84
2.5.2.2. Organik Asit ve Şeker Analizi	86

2.5.3. Domates Posasından ve Suyundan Karotenoidlerin Ekstrakte Edilmesi.....	87
2.5.4. Preparatif Kolon Doldurulması	88
2.5.5. Preparatif Sıvı Kromatografisi ile Likopen Saflaştırılması	89
2.6. Saflaştırılan Likopenin Enkapsülasyonu	91
2.6.1. Aljinat Çözeltisinin Hazırlanması.....	91
2.6.2. Kalsiyum Klorür Çözeltisinin Hazırlanması	91
2.6.3. Jelleşme Ortamının Hazırlanması	91
2.6.4. Aljinat Membranlı ve Sıvı Lipofilik Madde Çekirdekli Mikrokapsül Üretimi.....	92
2.6.5. Kapsüllerin Dondurularak Kurutulması	93
2.6.6. Enkapsülasyon Verimi	94
2.6.7. Kapsüllerin Optik Analizi, Ortalama Çap ve Boyut Dağılımlarının Ölçümü... ..	94
2.6.8. Kapsüllerin Çekirdek Sızıntısı Ölçümü	94
2.6.9. Kapsüllerin in vitro Ortamda Kontrollü Salım Testleri.....	95
2.7. Enkapsüle Edilmiş Likopenin Model Gıda Uygulamaları	96
2.7.1. Model Ürün Analizleri	97
2.7.1.1 Renk Analizi.....	97
2.7.1.2. Antiradikal kapasite tayini	97
2.8. İstatistiksel analizler	97

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Monodispers ve Gözenekli Tetrahidrofurfuril akrilat-co-Divinilbenzen (THFA-co-DVB) Bazlı Polimerik Partiküllerin Üretimi.....	98
3.2. Polimerik Partiküllerin Karakterizasyonu.....	99
3.2.1. Polimer Örneklerinin Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntüleri ...	99
3.2.1.1. Çıkış Lateksinin Karakterizasyonu	99
3.2.1.2. Polimer Örneklerinin Boy Dağılımı.....	100
3.2.1.3. Polimer Örneklerinin Taramalı Elektron Mikroskobu Mikrografları.....	103

3.2.1.3.1. Çıkış Lateksi Miktarının Partikül Boyutları ve Partikül Yüzey Özellikleri Üzerine Etkisi.....	103
3.2.1.3.2. Monomer/Çapraz Bağlayıcı Oranının Partikül Boyutları ve Partikül Yüzey Özellikleri Üzerine Etkisi	105
3.2.1.3.3. Porojen/Çapraz Bağlayıcı Oranının Partikül Boyutları ve Partikül Yüzey Özellikleri Üzerine Etkisi	107
3.2.2. FTIR Spektroskopisi	109
3.2.3. Kromatografik performans testleri	111
3.2.3.1. Farklı (THFA-co-DVB) Kolonlarda Farklı Mobil Faz Derişimleri İle Elde Edilen Sıvı Kromatogramları.....	112
3.2.3.2. Farklı (THFA-co-DVB) Kolonlarda Farklı Mobil Faz Derişimleri ile Elde Edilen Kromatogramlardan Hesaplanan Likopen ve β -karoten İçin Pik Çözünürlüğü.....	126
3.2.3.3. Farklı (THFA-co-DVB) Kolonlarda Farklı Mobil Faz Derişimleri ile Elde Edilen Kromatogramlardan Hesaplanan Likopen ve β -karoten için Alıkonma Faktörü.....	128
3.2.3.4. Farklı (THFA-co-DVB) Kolonlarda Farklı Mobil Faz Derişimleri ile Elde Edilen Kromatogramlardan Hesaplanan Teorik Tabaka Sayısı Değerleri	130
3.2.3.5. Farklı (THFA-co-DVB) Kolonlarda Farklı Mobil Faz Derişimleri ile Elde Edilen Kromatogramlardan Hesaplanan Teorik Tabaka Yüksekliği Değerleri.....	131
3.3. Domatesten Likopen Saflaştırılması.....	133
3.3.1. Domateste Yapılan Analizler	133
3.3.1.1. Kuru Madde Analizi.....	133
3.3.1.2. Organik Asit ve Şeker Analizi	134
3.3.1.3. Domates Meyvesinde ve Ayrılan Fraksiyonlarında Likopen Analizi	136
3.3.2. Preparatif LC İle Likopenin Saflaştırılması	137
3.4. Likopenin Mikroenkapsülasyonu	140
3.4.1. Enkapsülasyon Verimi	141
3.4.2. Kapsüllerin Optik Analizi, Ortalama Çap ve Boyut Dağılımları	142

3.4.3. Kapsüllerin Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntüleri.....	152
3.4.4. Kapsüllerin Çekirdek Sızıntısı Ölçümü	154
3.4.5. Kapsüllerin in Vitro Ortamda Kontrollü Salm Testleri.....	154
3.4.6. Enkapsüle Edilmiş Likopenin Model Ürün Analizleri	156
3.4.6.1. Keklerin Mikroskop Görüntüleri.....	156
3.4.6.2. Renk Analizi	157
3.4.6.3. Keklerin Radikal Süpürücü Güçlerinin Belirlenmesi.....	158

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ VE ÖNERİLER

KAYNAKLAR	179
EKLER.....	196
ÖZGEÇMİŞ.....	206

KISALTMALAR ve SİMGELER

<u>Sembol</u>	<u>Anlamı</u>
°C	Santigrat derece
Å	Angström
AcN	Asetonitril
AIBN	2-2-azobisisobütironitril
BHT	Bütillenmiş hidroksi trosol
BPO	Benzilperoksit
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
CV	Değişim katsayısı
DE	Dekstroz eşdeğeri
DHA	Dokosaheksaenoik asit
D_n	Ortalama partikül çapı
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetre
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
DVB	Divinilbenzen
D_w	Ağırlıkça ortalama çap
Et-OH	Etil alkol
FDA	Gıda ve ilaç yönetmeliği
FTIR	Fourier transform infrared – fourier dönüşüm kızılötesi
G	Gram
GRAS	Generally recognized as safe - genellikle güvenilir kabul edilen
h	Teorik tabaka yüksekliği
H ₂ SO ₄	Sülfirik asit
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
k	Alıkonma faktörü
KFE	Katı faz ekstraksiyonu
LC	Sıvı kromatografisi (liquid chromatography)

LC-MS	Sıvı kromatografisi kütle spektrometresi
Me-OH	Metil alkol
Met-OH	Metoksi-etanol
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
N	Teorik tabaka sayısı
Na-Alj	Sodyum-aljinat
N_i	Partikül sayısı
NMR	Nükleer manyetik rezonans
PVA	Polivinilalkol
PVP	Polivinilprilidon
S	Stiren
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEM	Scanning electron microscopy - taramalı elektron mikroskobu
TBA	Tiyobarbitürik asit
THF	Tetrahidrofuran
THFA	Tetrahidrofurfuril akrilat
Tol	Toluen
t_R	Alıkonma süresi
UV	Ultra-viole
v_R	Pik taban genişliği

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Kolon tiplerine göre örnek enjeksiyon miktarı	15
Tablo 1.2. Çeşitli gıdaların likopen içeriği	23
Tablo 1.3. Domatesin bileşimi	23
Tablo 1.4. Likopenin çeşitli özellikleri	26
Tablo 1.5. Gıda bileşenlerinin enkapsülasyonunda kullanılan çeşitli kaplama materyalleri	38
Tablo 2.1. Likopen kaynağı olarak kullanılan hammaddeler.....	61
Tablo 2.2. Polimerik adsorban sentezinde kullanılan kimyasallar.....	61
Tablo 2.3. Kromatografik çalışmalar sırasında kullanılan kimyasallar	62
Tablo 2.4. Çalışmalarda kullanılan standart kimyasallar	63
Tablo 2.5. Saflaştırılan likopenin enkapsülasyonunda kullanılan materyaller	64
Tablo 2.6. Tez çalışmasında kullanılan alet ve ekipmanlar	65
Tablo 2.7. Monodispers formda polistiren çıkış lateksi sentezi için dispersiyon polimerizasyonu koşulları	71
Tablo 2.8. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi İçin Kolon Dolgu Malzemesi Sentez Planı	76
Tablo 2.9. Organik asit analizi sıvı kromatografisi şartları.....	86
Tablo 2.10. Eker analizi sıvı kromatografisi şartları	87
Tablo 2.11. Preparatif sıvı kromatografisi şartları	90
Tablo 2.12. Likopen Enkapsülasyon Parametreleri	93
Tablo 2.13. Kek üretiminde kullanılan bileşenler.....	96
Tablo 3.1. Sentezlenen partiküllerin ortalama boy, boy dağılımı	101
Tablo 3.2. Poli(DVB-THFA) polimerinin FTIR spektrumunda görülen karakteristik pikleri.....	111
Tablo 3.3. Kolon performans testleri için yapılan deney tasarımı	112
Tablo 3.4. Sentezlenen adsorbanlara ait alıkonma faktörü değerleri	129
Tablo 3.5. Sentezlenen adsorbanlara ait teorik tabaka yüksekliği değerleri.....	132
Tablo 3.6. Domates fraksiyonlarında kuru madde miktarı	134
Tablo 3.7. Domates meyvesinde organik asit miktarı.....	134
Tablo 3.8. Domates meyvesinde şeker miktarı	135
Tablo 3.9. Domateste ve fraksiyonlarında likopen miktarı.....	136

Tablo 3.10. Farklı sodyum aljinat konsantrasyonlarında mikroenkapsülasyon verimleri	141
Tablo 3.11. Mikroenkapsüllerde oluşan şekiller	142
Tablo 3.12. Enkapsüllerin % çekirdek sızıntısı.....	154
Tablo 3.13. Enkapsüllerin yapay mide ve bağırsak ortamındaki stabilitesi.....	155
Tablo 3.14. Keklerin renk değerleri	158
Tablo 3.15. Keklerin % antiradikal aktiviteleri.....	159

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Karışım halindeki bileşenlerin kolonda ilerleyişi ve ayrılması .	6
Şekil 1.2. HPLC kısımları	6
Şekil 1.3. Preparatif LC'nin temel bileşenleri.....	14
Şekil 1.4. Likopenin kimyasal yapısı	21
Şekil 1.5. Domatesteki karotenoid madde dağılımı	24
Şekil 1.6. Aljinatın yapısı	41
Şekil 1.7. Püskürtmeli kurutma sistemi	47
Şekil 1.8. Jelasyon; kalsiyum-aljinat çapraz bağlanma mekanizması.....	51
Şekil 1.9. Damlatma sistemi .	52
Şekil 1.10. Jelleşmede damlatma formlarının şematik gösterimi	53
Şekil 1.11. Damlatma ucunda oluşan kapsül şekilleri ve mesafe ilişkisi.....	53
Şekil 1.12. Literatürde kapsül şekillerini tanımlayan terimler	54
Şekil 2.1. Tez planı ve uygulama akım şeması	69
Şekil 2.2. Monodispers-gözenekli formda partiküllerin sentezi için kullanılan iki basamaklı şişirme işlemi.....	72
Şekil 2.3. İki basamaklı polimerizasyon işlemi	74
Şekil 2.4. Tetrahidrofurfuril akrilat ve divinilbenzenin kimyasal yapısı	79
Şekil 2.5. Kromatografik sistem	81
Şekil 2.6. Domatesten likopen izolasyonu akım şeması	85
Şekil 2.7. a) Liyofilize edilmiş domates posası örneği, b) Karotenoidlerin ekstraksiyonu sonrasında domates posası.....	87
Şekil 2.8. Kullanıma hazır halde doldurulmuş preparatif kolon	89
Şekil 2.9. Damlatma yöntemi deney düzeneği.....	92
Şekil 3.1. Polistiren çıkış lateksinin genel görüntüsü (büyütme oranı 20000X ve 10000X).....	100
Şekil 3.2. Farklı çıkış lateksi/monomer oranlarının partiküllerin boy dağılımı üzerine etkisi	102
Şekil 3.3. Farklı monomer/çapraz bağlayıcı oranlarının partiküllerin boy dağılımı üzerine etkisi.....	102
Şekil 3.4. Farklı porojen/çapraz bağlayıcı oranlarının partiküllerin boy dağılımı üzerine etkisi.....	102

Şekil 3.5. Farklı çıkış lateksi/monomer oranlarında sentezlenen adsorbanların genel görüntüleri (büyütme oranı 7000X).....	103
Şekil 3.6. Farklı çıkış lateksi/monomer oranlarında sentezlenen adsorbanların yüzey görüntüleri (büyütme oranı 40000X).....	104
Şekil 3.7. Farklı monomer/çapraz bağlayıcı oranlarında sentezlenen adsorbanların genel görüntüleri (büyütme oranı 7000X).....	106
Şekil 3.8. Farklı monomer/çapraz bağlayıcı oranlarında sentezlenen adsorbanların yüzey görüntüleri (büyütme oranı 40000X).....	106
Şekil 3.9. Farklı porojen/çapraz bağlayıcı oranlarında sentezlenen adsorbanların genel görüntüleri (büyütme oranı 7000X).....	107
Şekil 3.10. Farklı porojen/çapraz bağlayıcı oranlarında sentezlenen adsorbanların genel görüntüleri (büyütme oranı 40000X).....	108
Şekil 3.11. S-6 ve S-9 kodlu adsorbanların FTIR spektrumu	110
Şekil 3.12. S-2 kodlu kolon dolgu maddesine ait sıvı kromatogramları.....	113
Şekil 3.13. S-3 kodlu kolon dolgu maddesine ait sıvı kromatogramları.....	114
Şekil 3.14. S-4 kodlu kolon dolgu maddesine ait sıvı kromatogramları.....	115
Şekil 3.15. S-5 kodlu kolon dolgu maddesine ait sıvı kromatogramları.....	116
Şekil 3.16. S-6 kodlu kolon dolgu maddesine ait sıvı kromatogramları.....	117
Şekil 3.17. S-7 kodlu kolon dolgu maddesine ait sıvı kromatogramları.....	118
Şekil 3.18. S-8 kodlu kolon dolgu maddesine ait sıvı kromatogramları.....	119
Şekil 3.19. S-9 kodlu kolon dolgu maddesine ait sıvı kromatogramları.....	120
Şekil 3.20. S-10 kodlu kolon dolgu maddesine ait sıvı kromatogramları.....	121
Şekil 3.21. S-11 kodlu kolon dolgu maddesine ait sıvı kromatogramları.....	122
Şekil 3.22. S-12 kodlu kolon dolgu maddesine ait sıvı kromatogramları.....	123
Şekil 3.23. S-13 kodlu kolon dolgu maddesine ait sıvı kromatogramları.....	124
Şekil 3.24. S-14 kodlu kolon dolgu maddesine ait sıvı kromatogramları.....	125
Şekil 3.25. Mobil faz konsantrasyonunun pik çözünürlüğü üzerine etkisi	126
Şekil 3.26. Farklı çıkış lateksi/monomer oranlarının likopen ve β -karotenin ayrılma derecesi üzerine etkisi.....	127
Şekil 3.27. Farklı monomer/çapraz bağlayıcı oranlarının likopen ve β -karotenin ayrılma derecesi üzerine etkisi	127

Şekil 3.28. Farklı porojen/çapraz bağlayıcı oranlarının likopen ve β -karotenin ayrılma derecesi üzerine etkisi	128
Şekil 3.29. Farklı çıkış lateksi/monomer oranlarının kolonların teorik tabaka sayısı üzerine etkisi.....	130
Şekil 3.30. Farklı monomer/çapraz bağlayıcı oranlarının kolonların teorik tabaka sayısı üzerine etkisi.....	130
Şekil 3.31. Farklı porojen/çapraz bağlayıcı oranlarının kolonların teorik tabaka sayısı üzerine etkisi.....	131
Şekil 3.32. Domatese ait organik asit kromatogramı	135
Şekil 3.33. Domateste bulunan şekerlere ait sıvı kromatogramı.....	135
Şekil 3.34. Domates posası ekstraktına ait kromatogram	137
Şekil 3.35. Kolon çıkışı domates posası ekstraktına ait likopen kromatogramı	138
Şekil 3.36. Domates ekstraktı ve preparatif kolon çıkışının karşılaştırılması.....	138
Şekil 3.37. Preparatif kolonda saflaştırılan likopen kromatogramı	139
Şekil 3.38. Likopen standardına ait kromatogram	140
Şekil 3.39. %0.5 Sodyum aljinat konsantrasyonunda üretilen mikrokapsüllerin ışık mikroskobu görüntüleri	144
Şekil 3.40. %0.5 Sodyum aljinat konsantrasyonunda üretilen mikrokapsüllerin ortalama çap ve % değişim katsayıları	145
Şekil 3.41. Liyofilize mikrokapsül (%0.5 sodyum aljinat konsantrasyonu ve 1.5 ml/dk akış hızı)	145
Şekil 3.42. %1 Sodyum aljinat konsantrasyonunda üretilen mikrokapsüllerin ışık mikroskobu görüntüleri	146
Şekil 3.43. %1 Sodyum aljinat konsantrasyonunda üretilen mikrokapsüllerin ortalama çap ve % değişim katsayıları	147
Şekil 3.44. Liyofilize mikrokapsül (%1 sodyum aljinat konsantrasyonu ve 1.5 mL/dk akış hızı)	147
Şekil 3.45. %1.5 Sodyum aljinat konsantrasyonunda üretilen mikrokapsüllerin ışık mikroskobu görüntüleri	148
Şekil 3.46. %1.5 Sodyum aljinat konsantrasyonunda üretilen mikrokapsüllerin ortalama çap ve % değişim katsayıları	149

Şekil 3.47. Liyofilize mikrokapsül (%1.5 sodyum aljinat konsantrasyonu ve 1.5 mL/dk akış hızı).....	149
Şekil 3.48. %2 Sodyum aljinat konsantrasyonunda üretilen mikrokapsüllerin ışık mikroskobu görüntüleri	150
Şekil 3.49. %2 Sodyum aljinat konsantrasyonunda üretilen mikrokapsüllerin ortalama çap ve % değişim katsayıları	151
Şekil 3.50. Liyofilize mikrokapsül (%1.5 sodyum aljinat konsantrasyonu ve 1.5 mL/dk akış hızı).....	151
Şekil 3.51. Likopen yüklü sodyum aljinat kapsülün taramalı elektron mikroskobu mikrografi	152
Şekil 3.52. Boş aljinat kapsülün taramalı elektron mikroskobu mikrografi	153
Şekil 3.53. %2 sodyum aljinat içeren enkapsüllerin yapay mide ve bağırsak ortamındaki görüntüleri	156
Şekil 3.54. Enkapsüle likopen katkılı keklerin mikroskop görüntüleri.....	157

GİRİŞ

Boyut ve yüzey özellikleri kontrol edilebilen polimerik mikroküreler biyoteknoloji, biyomedikal mühendisliği, bilgi teknolojileri ve mikroelektronik gibi birçok farklı alanda kullanılmaktadır. Bu uygulamalardan birisi de Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi'nde (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) kolon dolgu materyali olarak kullanılmalarıdır. Kromatografik ayırma teknikleri arasında yaygın kullanım alanına sahip olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi, sıvı fazda çözünebilen analitlerin kolon materyaline olan ilgilerine göre kolon içerisinde değişik hızlarda ilerleyip kolonu farklı zamanlarda terk etmeleri prensibine dayalı bir tekniktir.

HPLC uygulamalarında ayırmanın gerçekleştirildiği kolonlarda dolgu materyali olarak silika jel veya polimerik yapıda hazırlanmış 5-20 µm çap aralığındaki mikropartiküller uzun süredir kullanılmaktadır. Son yıllarda özellikle polimerik yapıda hazırlanan HPLC kolon materyalleri üzerindeki araştırmalar yoğunlaşmıştır. Bir kromatografik sistemin performansı, kolonda gerçekleştirilen ayırma ile yani kolon dolgu maddesinin seçilmesi ve kullanılmasıyla tayin edilir. Küresel, gözenekli ve monodispers (eş boyutlu) formda sentezlenmesinin kolaylığı, türevlendirme proseslerinin daha çeşitli ve kolay olması, geniş pH aralığında yapısal kararlılık, HPLC kolon materyali olarak polimer bazlı yapıların tercih edilme nedenleri arasındadır.

Genellikle ticari HPLC kolonları polidispers (boy dağılımlı) partikül formunda dolgu materyalleri içermektedir. Monodispers formda dolgu materyali içeren HPLC kolonlarında ise düzenli akış profili nedeniyle daha iyi bir kromatografik ayırma davranışı, daha yüksek teorik tabaka sayısı değerleri ve daha düşük geri-basınç

değerleri elde edilmektedir. Bu tür yapılar genellikle “çok basamaklı polimerizasyon yöntemleri” ile üretilmektedir [1, 2, 3].

Preparatif sıvı kromatografisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisinin geliştirilmiş bir türüdür. Analitik sıvı kromatografisi bir karışım içerisindeki bileşenlerin kimliğinin ve karışımdaki bileşen sayısının belirlenmesi amacıyla kullanılırken, preparatif sıvı kromatografisi çeşitli bileşiklerin izolasyonu ve saflaştırılması için kullanılır.

Günümüzde saflaştırılmış bir bileşen ticari olarak oldukça büyük bir öneme sahip olmakla birlikte, saflaştırma ve tanımlama işlemi oldukça kompleks ve önemli bir işlemdir. İster katkı olarak kullanılsın ister klinik çalışmalarda doku ya da hayvan deneylerinde kullanılsın, mg boyutunda yüksek miktarlarda saf bileşene ihtiyaç duyulmaktadır. Saf biyoaktif bileşenlerin elde edilmesi tıp ve eczacılık endüstrisi başta olmak üzere, gıda, zirai kimyasallar ve kozmetik endüstrisi için oldukça önemlidir [4].

Son yüzyılda bireylerin yanlış beslenme alışkanlıkları maruz kalınan; radyasyon, gazlar, ağır metaller, herbisitler ve pestisitler gibi çevre kirleticileri ile tedavi amacıyla alınan birçok ilaç vücutta aktif oksijen oluşumuna neden olmaktadır. Vücutta artan aktif oksijen de başta kanser ve kardiyovasküler hastalıklar olmak üzere birçok hastalığa yol açmaktadır. Antioksidan maddeler aktif oksijen oluşumunu engelleyerek ya da oluşan aktif oksijenleri inhibe ederek bu hasarları hücresel bazda engellemekte, dolayısıyla dejeneratif hastalıkların oluşumunu kısmen durdurmaktadır [5].

Gıda ve beslenme bilimindeki son gelişmeler, gıdaların bireyin besin madde ihtiyacını karşılamasının yanı sıra çeşitli vücut fonksiyonlarının düzenlenmesinde, bazı hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde de etkili olduğunu göstermiştir, bu da tüketicilerin gıdalardan beklentilerinin artmasına sebep olmuş ve fonksiyonel gıdalara olan ilgiyi artırmıştır [4, 5]. Bu kapsamda sağlık açısından yararlı komponentler gıdaların doğal olarak yapısında bulunuyorsa düzeyi artırılarak, bulunmuyorsa da dışarıdan ilave edilerek gıdalara fizyolojik fonksiyon özelliği kazandırılabilir.

Likopen sebze ve meyvelerde doğal olarak bulunan karoten (karotenoid) grubuna ait bir pigmenttir. Likopen karpuz ve kırmızı greyfurt gibi gıdalarda da bulunur ancak likopen açısından en önemli gıda domates ve domates ürünleridir. Yapılan çalışmalar likopenin insan sağlığı açısından birçok faydalı özelliği olduğunu göstermiştir. Bu çalışmalarda likopenin öncelikle prostat [6-9], akciğer ve mide kanserlerine karşı önemli bir koruyucu etki gösterdiği bunun yanında pankreas, kolon, rektum, yemek borusu, ağız boşluğu, göğüs ve rahim kanserleriyle ilgili koruyucu etkisinin de olduğu belirlenmiştir [10]. Araştırmacılar yüksek miktarda likopen alımıyla düşük kalp hastalıkları arasında istatistiksel bir ilişkinin olduğunu belirlemişler, yaşlı bireylerde bağışıklık sistemini güçlendirdiğini, ultraviyole ışınlarına karşı koruma sağladığını aynı zamanda da kolesterol düşürücü (hipokolesterolemik) etki gösterdiğini belirtmişlerdir.

Bu fizyolojik etkilerinden dolayı, likopen günümüzde sadece renklendirici ve fonksiyonel katkı olarak değil, çeşitli vücut fonksiyonlarının düzenlenmesinde, bazı hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde de kullanılmak üzere; konsantre, toz, kapsül ya da preparatlar şeklinde saflaştırılıp tüketicilere sunulmaktadır. Ayrıca likopen son yıllarda artan kanser hastalıkları sebebiyle üzerinde yoğun olarak çalışılan ve ticari öneme sahip olan bir komponent haline gelmiştir. Önceki yıllarda yapılan çalışmalardaki ana hedef domatesin raf ömrünün uzatılmasına dayanmaktayken sağlık üzerindeki tüm bu olumlu etkileri nedeniyle son yıllarda pek çok çalışmada domatesteki antioksidan bileşen miktarlarını arttırmak, bu bileşenleri ayırmak ve saflaştırmak için yeni yöntemler denenmiştir.

Yapılan tez çalışmasında; sentezlenen monodispers makro gözenekli adsorbanlar kullanılarak domatesten likopen saflaştırılmasına yönelik yeni bir yöntem geliştirilmiş ve uygun adsorbanlar karakterize edilerek çeşitli biyoaktif bileşenlerin saflaştırılmasında kullanılmak üzere literatüre kazandırılmıştır. En iyi performans gösteren adsorban preparatif kolon dolgu materyali olarak kullanılmış ve domatesten likopen %98.99 oranında saflaştırılmıştır. Saflaştırılan likopen daha sonra sodyum aljinat kullanılarak iyonik jelyasyon tekniği ile enkapsüle edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında;

- Farklı yüzey polaritelerinde, eş boyutlu ve gözenekli formda farklı reçetelere sahip polimer bazlı preparatif HPLC kolon dolgu materyalleri “çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu” tekniği ile sentezlenmiştir.
- Tarafımızdan daha önce yapılan çalışmalara ve literatür incelemelerine dayanarak, çıkış lateksi konsantrasyonu, monomer/çapraz bağlayıcı oranı ve dilüent/çapraz bağlayıcı oranlarının, adsorban malzemelerin performansı üzerine kayda değer oranlarda etkisinin bulunduğu tespit edilmiştir ve bu parametreler göz önünde bulundurularak; tetrahidrofurfuril akrilat (THFA) ve divinilbenzen (DVB) monomerleri kullanılarak literatürde rastlanmayan eş boyutlu adsorbanlar sentezlenmiştir.
- Daha sonra elde edilen polimerik malzemelerin karakterizasyonuna yönelik çeşitli analizler yapılmış ve model sistemlerde test edilmiştir. Elde edilen kromatogramlardan ve performans testlerinden faydalanılarak, sentez parametrelerinin kromatografik ayırma yeteneği ve partiküllerin monodispersitesi üzerine etkileri belirlenmiştir.
- Sonraki aşamada seçilen polimerik adsorban preparatif kolon dolgu malzemesi olarak hazırlanmış ve domatesten likopen saflaştırmak için kullanılmıştır.
- Tez çalışmasının devamında ise çeşitli parametreler denenerek domatesten likopen saflaştırılmış; domates suyu ve posasındaki likopen miktarı belirlenmiştir. Ayrıca standart bileşik kromatogramları kullanılarak elde edilen likopenin saflık derecesi belirlenmiş ve DPPH radikal süpürme yöntemi ile antioksidan aktivitesi belirlenmiştir.
- Böylece; birçok uygulama alanı bulan mikroküreler, likopen saflaştırılmasında kullanılarak, biyoaktif bileşenlerin saflaştırılması konusuna farklı bir bakış açısı getirilmiş ve domatesin işlenmesi sırasında atık olarak uzaklaştırılan kısmın asıl likopen kaynağı olarak kullanılması gerektiği belirlenmiştir.
- Saflaştırılan likopenin stabilitesini artırmak amacıyla, kaplama materyali olarak direkt tüketime uygun doğal bir polisakkarit olan sodyum aljinat kullanılarak saf likopen enkapsüle edilmiştir. Farklı parametrelerde üretilen enkapsüller karakterize edilmiştir. En son aşamada ise kapsüller model gıda ürünüde denenmiş; uygulanabilirliği ve stabilitesi gösterilmiştir.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

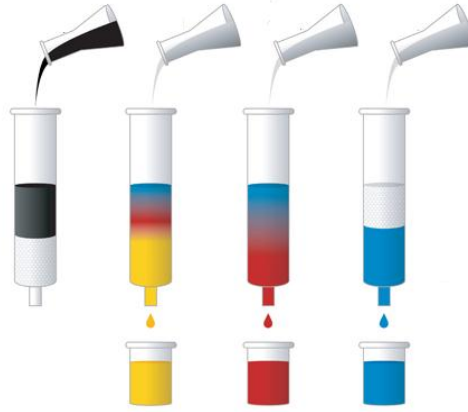
1.1. Kromatografi

Kromatografi, birbirine yakın özellikteki madde karışımlarını ayırmak için kullanılan güçlü bir ayırma ve saflaştırma yöntemidir. Gözenekli bir ortamda, hareketli bir çözücü etkisiyle, bir karışımın bileşenlerinin birbirinden ayrılması olgusuna dayanır. Hareket eden faza hareketli veya mobil faz, bahsedilen gözenekli ortama ise adsorban veya sabit faz denir. Hareketli faz sıvı veya gaz olabilirken, sabit faz bir katı ya da katı bir destek üzerine emdirilmiş bir sıvı fazdan oluşur. Eğer hareketli faz sıvı ise yöntem sıvı kromatografisi, gaz ise gaz kromatografisi olarak adlandırılır [11, 12].

1.1.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

Kromatografik yöntemler, sabit faz ve hareketli faz arasında olan kütle aktarımını içeren ayırma teknikleri olarak tanımlanabilir. Kromatografik yöntemlerden biri olan sıvı kromatografisi, 1900'lü yılların başlarında bulunmuş ve 1960'lı yıllardan itibaren sıvı kromatografisinin geliştirilmesi için geniş çapta araştırmalar yapılmaktadır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ise sıvı fazda çözünebilen bir kimyasal karışımın kolay ve hızlı bir şekilde bileşenlerine ayrılabilirdiği oldukça duyarlı bir yöntemdir. Uygun çözücü kullanılarak çözülen örnek karışımı yani analitler, yüksek basınç altında kromatografik kolondan geçirilir ve burada bileşenlerine ayrılır. Şekil 1.1 kolona yüklenen bileşenlerin kolondaki ilerleyişlerini ve birbirinden ayrılmasını göstermektedir. Bileşenlerin birbirinden ayrılması ve bunun derecesi, analitler ile sabit faz arasındaki etkileşime bağlıdır ve

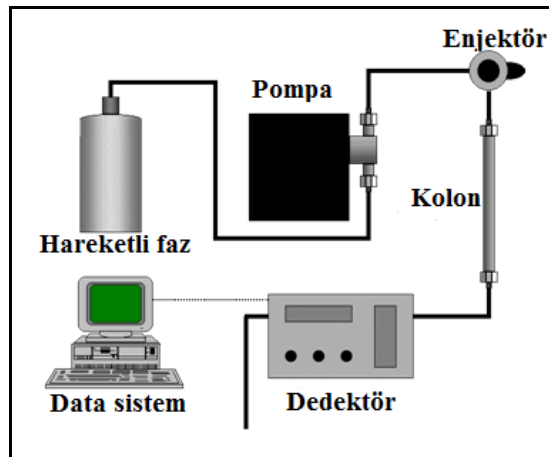
önemlidir. Sabit faz, kolon içerisindeki hareketsiz dolgu materyali olarak tanımlanır. Analitler ile sabit ve sürekli fazlar arasında istenilen etkileşim sürekli faz olarak kullanılan çözücülerin ve sabit fazın değiştirilmesi ile elde edilebilir [11-13].



Şekil 1.1. Karışım halindeki bileşenlerin kolonda ilerleyişi ve ayrılması [11].

1.1.1.1. HPLC Sistemleri

HPLC sistemi, Şekil 1.2’de görüldüğü gibi pompa, enjektör, kolon, dedektör ve bilgisayar birimlerinden oluşmaktadır. Kromatografik analiz süreci, çözücüde çözülmüş örneğin sisteme enjekte edilmesi ile başlar. Bu sistemin en önemli kısmı, ayırmanın gerçekleştiği kolondur. Hareketli faz ile birlikte kolona pompalanan örnek, kolon içinde bileşenlerine ayrılmaya başlar. Her bileşenin gönderdiği sinyaller dedektör tarafından kaydedilir. Dedektör tarafından kaydedilen ve bilgisayara aktarılan sinyallerin tamamı kromatogram olarak adlandırılır [11-13].



Şekil 1.2. HPLC kısımları [11].

1.1.1.2. Sürekli Faz

HPLC uygulamalarında sürekli faz türü ve bileşimi kromatografik performansı etkileyen faktörlerdendir. HPLC sistemlerinde birçok sürekli faz kullanılmasına rağmen, bazı ortak özellikler aranır. Yüksek derecede saflık, dedektör ile uyumluluk, düşük viskozite, örneği çözebilme, kimyasal açıdan inert olması ve fiyatının uygun olması aranan özelliklerdendir [12].

Her bir HPLC türünde kullanılan sürekli fazlar birbirinden farklıdır. Normal-faz sıvı kromatografisinde apolar, ters-faz sıvı kromatografisinde su ve asetonitril karışımı gibi polar çözücüler sürekli faz olarak kullanılır. Büyüklükçe ayırma kromatografisinde ise kullanılan çözücü örneği çözebilmeli ama dolgu materyali ile kimyasal etkileşime girmemelidir. Doğru molekül ağırlığı tayininde bu çok önemlidir [11-13].

HPLC’de kullanılan hareketli fazın polaritesi ayırma işleminde önemli rol oynar. İki farklı elüsyon tipi vardır.

İzokratik Elüsyon: Kolona sabit bileşimdeki hareketli faz pompalanır. Hareketli fazın polaritesi sabit olduğu için kolona çok fazla ilgi duyan bileşenleri kolondan atmak zorlaşır ve elüsyon süresi uzar. Maddelerin molekül büyüklüğüne göre tayini de bu elüsyon türü ile gerçekleşir.

Gradient Elüsyon: Hareketli faz bileşimi analiz boyunca doğrusal olarak değişir. Analiz örneğinin kolon dolgu maddesi yüzeyine afinitesi önemlidir. Ortamdaki elüentin polaritesi zamanla değiştirilerek örneklerin partikül yüzeyine afinitesi değiştirilir ve ayırma sağlanır [13].

1.1.1.3. Sabit Faz

HPLC uygulamalarındaki ayırma, yüzey etkileşimlerinden yararlanılarak yapılır ve adsorban çeşidine ve özelliklerine bağlıdır. Modern HPLC adsorbanları geniş yüzey alanına sahip, küçük, rijit yapıdaki partiküllerdir [11-13].

1.1.1.4. Pompa

HPLC’de pompanın fonksiyonu, hareketli fazı kolondan yarattığı basınç farkıyla kontrollü bir akış hızıyla geçirmektedir. Kolon dolgu materyali olarak üretilen partiküllerin kolon içerisine doldurulması işlemi ve uygun çözücüde çözünen örneğin bu sabit faz ve sürekli faz yatağıyla etkileşmesi için yüksek basınçlı pompalara ihtiyaç vardır. Kullanılan partiküllerin boyutu küçüldükçe uygulanan basıncın da artırılması gerekmektedir. Küçük partiküller yüksek çözünürlük, hızlı analiz ve yüksek örnek yükleme kapasitesi gibi bir takım avantajlara da sahiptir. Kararlı akış hızı pompalarda aranan önemli bir özelliktir. Pompanın performansı, analitik sonuçlardaki tekrarlanabilirliği, nicel değeri, gözlenebilme sınırı gibi değerleri büyük ölçüde etkiler [11-13].

1.1.1.5. Dedektör

Dedektörler kolondan çıkan örnek bileşenlerinin varlığını ve miktarını belirlemek için kullanılır. Günümüzde kromatografik sistemlerde yaygın olarak kullanılan dedektör tipi optik dedektörlerdir. Örnek bileşenleri dedektörden geçerken, UV absorpsiyonundaki, floresans emisyonundaki ya da kırılma indisindeki değişimden dolayı ışık şiddetindeki değişim belirlenir ve kaydedilir. Belirlenen bu değişimler ile kromatogramlar üzerinden alıkonma süreleri, pik alanları gibi değerler tayin edilerek, kolon performans parametreleri hesaplanır. Sıvı kromatografisinde en çok kullanılan dedektör tipi UV absorpsiyon dedektörleridir. Bu dedektörler ile 190 nm’den 460-600 nm’ye kadar olan dalga boylarında örneğin analizinin yapılması mümkün olmaktadır. Kullanılan diğer dedektör türleri içinde kırılma indisi, floresans, elektrokimyasal ve kütle spektrometrik dedektörler bulunmaktadır. Refraktif indeks dedektörü yaygın olarak kullanılan ancak düşük hassasiyete sahip dedektördür. Floresans ve elektrokimyasal dedektörler, refraktif indekse göre daha hassas, ancak daha seçici dedektörlerdir. Kütle spektrometrik dedektörleri ise çok hassas, güçlü ancak pahalı ve karmaşık sistemlerdir [11-13].

1.1.1.6. Kolon

Kolonlar kromatografinin en önemli parçasıdır. Analizin başarısı ya da başarısızlığı kolona ve uygun çalışma koşullarına bağlıdır. HPLC uygulamalarında genellikle

yüksek basınca ve kimyasal korozyona karşı dayanıklılığı nedeniyle paslanmaz çelikten yapılmış kolonlar kullanılır. Tipik HPLC kolonları 10, 15, 25 cm uzunluğunda, küçük boyutlu partikül içeren (3, 5 veya 10 µm) ve iç çapı 4, 4.6 ya da 7.8 mm olan yüksek basınca dayanıklı çelik kolonlardır. Bu boyutlar örnek kapasitesi, sürekli faz tüketimi, hız ve ayırıcılık açısından yüksek performans sağlayan değerlerdir. Kolonun küçük çaptaki partiküllerle doldurulması ve verimli bir şekilde çalıştırılması deneyim, beceri ve özel cihazlar gerektiren bir çalışmadır. Bu yüzden çoğu HPLC kullanıcısına hazır doldurulmuş kolonları kullanmaları önerilir [11-13].

1.1.1.7. Kolon Dolgu Materyalleri

Bir kromatografik sistemin performansı, kolonda gerçekleştirilen ayırma ile yani, kolon dolgu maddesinin seçilmesi ve kullanılmasıyla tayin edilir. İyi bir kolon dolgu maddesi kararlı olmalıdır ve hem hareketli faz çözücülerine hem de örnek çözeltilere karşı inert olmalıdır. Geniş yüzey alanına, düzgün olarak dağılmış ve hareketli faza kolay erişebilir açık yapısal yüzeye sahip olmalıdır. Yüksek basınç ve yüksek akış hızlarından etkilenmemelidir [11-15].

HPLC uygulamalarında ayırmanın gerçekleştiği kolonlarda dolgu materyali olarak silikajel ya da polimerik yapıdaki mikropartiküller kullanılmaktadır. Literatürde yapılan çalışmalarda genellikle silika bazlı kolon materyalleri tercih edilmiştir [16, 17]. Ancak son yıllarda özellikle polimerik yapıda olan HPLC kolon materyalleri üzerindeki araştırma çalışmaları yoğunlaşmıştır. Polimerik partiküllerin silika bazlı olanlara göre belirgin avantajlara sahip olduğu bilinmektedir. Küresel, gözenekli ve monodispers formda sentezlenme kolaylığı, partikülün türevlendirme proseslerinin daha çeşitli ve kolay olması, geniş pH aralığında stabil olabilme gibi avantajlara sahip olmasından dolayı araştırmalar polimerik partiküller üzerinde yoğunlaşmıştır [12, 13].

1.1.2. Alıkonma Parametreleri

Kromatografik alıkonmayı öğrenmenin en kolay yolu, örneğin kolona enjekte edildiği noktadan kolon boyunca ilerleyen bileşiğin dedektörde verdiği maksimum cevap arasındaki zamanı ölçmektir. Bu zamana alıkonma zamanı (retention time)

denir ve t_R ile sembolize edilir. Alıkonma zamanı sürekli faz akış hızı ile ters orantılıdır. Diğer bir parametre alıkonma hacmidir (V_R). Alıkonma hacmi, bir bileşenin kolondan çıkması için gerekli olan elüent miktarıdır. Alıkonma süresi ve sürekli faz akış hızının çarpımına eşittir. Akışkanın hızına bağlı değildir, ancak partiküllerin geometrik şekli yani gözenek büyüklüğüne bağlıdır [12, 13].

1.1.3. Bant Genişliği

Bir kromatografik analiz sırasında örneğin sisteme enjekte edilmesinden sonra kolon içindeki akışkanın hareketi sırasında kromatografik piklerin aralığı genişler. Daha büyük kolon bant genişliği, belli bir zaman aralığında daha az miktarda bileşenin ayrışması anlamına gelir. Başka bir deyişle piklerin keskinliği kolon veriminin ne kadar iyi olduğunu gösterir. Kolonda bant genişlemesi üç ana sebepten kaynaklanır.

- Kolon içinde ilerleyen bir bileşene ait molekül veya iyonların farklı yollar izlemesi: Bu parametre sürekli fazın akış hızından bağımsızdır. Kolon dolgu maddesinin çok küçük tanecikli olarak alınması bu parametrenin etkisini azaltabilir.
- Fazlar arasındaki kütle transferi etkisi: Bileşenlerin sabit faz ile hareketli faz arasında dağılma dengesine ulaşması için belirli bir süreye ihtiyaç vardır. Eğer akış hızı yüksekse ve örneğin kolona güçlü bir afinitesi varsa, hareketli fazdaki örnek sabit fazdaki örneğin önüne geçecektir. Bu da dengenin tam olarak kurulamamasına yani bant genişlemesine neden olacaktır. Hareketli faz viskozitesi düşürmek ve kolon sıcaklığını arttırmak bu terimin etkisini azaltabilir.
- Kolonda bileşenlerin yüksek derişimli bölgelerden düşük derişimli bölgelere doğru difüzyonla dağılması: Örnek konsantrasyonu kolon kenarlarında kolon merkezinde olduğundan daha düşüktür. Örnek kolon merkezinden dışarıya doğru difüzyonlanır. Bu etki düşük akış hızlarında daha da önem kazanır. Ayrıca bu parametre bileşenlerin hareketli faz içindeki difüzyon katsayılarının değerleri ile doğru orantılı olarak artar. Hareketli fazın akış hızını düşürmek örneğin kolonda daha fazla zaman harcamasına neden olur. Bu da difüzyonun artması demektir. Ayrıca sıcaklığın düşürülmesi de bu etkiyi azaltıcı yönde etki yapar [12, 13].

1.1.4. Kolon Verimliliği

Pik Çözünürlüğü (R)

Çözünürlük, kromatografide iki pikin birbirinden ayrılma derecesini göstermektedir. Elde edilen kromatogramlarda belirli bir bileşen için pik çözünürlüğü, eşitlik 1.1'e göre hesaplanmıştır. Burada $R_{(n+1/n)}$, seçilen pik (n+1) ile bir önceki pik (n) arasındaki çözünürlüğü ifade etmektedir. t_{n+1} ve t_n ise enjeksiyon noktasından itibaren, sırasıyla pik n+1 ve pik n için alıkonma sürelerini göstermektedir.

$$R(n+1|n) = 2(t_{n+1} - t_n) / (W_{n+1} + W_n) \quad (1.1)$$

W_{n+1} ve W_n ise sırasıyla pik n+1 ve pik n için taban genişliğini ifade etmektedir [12, 13].

Teorik tabaka sayısı (N)

Teorik tabaka sayısı; damıtma prosesindeki benzerlikten gelir. Kolonun hızlı çalışmasının önemli bir göstergesidir. Elde edilen kromatografik piklerin keskinliği bir kolonun verimini gösteriyorsa, bu verimin nicel ölçüsü de teorik tabaka sayısıdır. Teorik tabaka sayısı kolon ayırma verimini ifade eden ve en yaygın olarak kullanılan büyüklüklerden biridir. Bazı çalışmalarda ise kolon verimi yine teorik tabaka sayısı yardımıyla hesaplanan teorik tabaka yüksekliği ile ifade edilmektedir. Farklı polaritelere sahip kolonların ters faz sıvı kromatografisindeki analizleri izokratik modda yapılmış ve tüm analitlerin teorik tabaka sayısı değerleri hesaplanmıştır. Bu büyüklükler eşitlik 1.2 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$N = 5.54 \times \left(tr \left| W_{1/2} \right. \right)^2 \quad (1.2)$$

Burada t; bileşiğin alıkonma süresini, W; bileşik pikinin taban genişliğini ve $W_{1/2}$; pik yüksekliğinin yarısındaki taban genişliğini ifade etmektedir. Bir kolonda teorik tabaka sayısı ne kadar yüksekse kolonun verimi o kadar yüksek demektir. Kolon boyu arttıkça teorik tabaka sayısında da artış gözlenir [12, 13].

Teorik tabaka yüksekliği (h)

Teorik tabaka yüksekliği; h ile gösterilir. Kolonun ne kadar hızlı ve etkili çalıştığını gösterir. N ile ters orantılıdır. Bir kolonda N değeri ne kadar büyükse yani h değeri ne kadar küçükse kolonun verimi o kadar yüksektir. Daha düşük teorik tabaka yüksekliği ve daha fazla teorik tabaka sayısı kısa sürede kromatografik sonuçların elde edilmesi demektir. h değerini büyüten her etken kolon verimini düşürür ve pik

genişlemesine neden olur. h değeri eşitlik 1.3'teki gibi hesaplanır. Burada h ; teorik tabaka yüksekliği, L ; kolon boyudur [12, 13].

$$h = (L/N) \quad (1.3)$$

1.1.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinin Kullanım Alanları

Günümüzde yüksek performanslı sıvı kromatografisi, birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Başlıca kullanım amaçları kimyasal ayırma, saflaştırma, tanımlama ve derişim tayinidir [11-13].

- **Kimyasal Ayırma:** HPLC'de kimyasal ayırma işlemi, her maddenin belli bir sabit faz ve mobil faz bileşiminde farklı çıkış süresinin olmasından yararlanılarak yapılmaktadır. Yapılan kimyasal ayırmanın derecesi çoğunlukla sabit faz ve mobil faz seçimine bağlıdır.
- **Saflaştırma:** Saflaştırma hedeflenen bir maddenin diğer maddelerden ya da atıklardan ayrılması işlemidir. Her maddenin belli kromatografik koşullar altında karakteristik bir piki bulunur. Ayrılması istenen maddeye göre ve diğer maddelerle olan ilişkisine göre koşullar belirlenir. Kromatografik saflaştırma işleminde, istenilen madde kolon çıkışında toplanarak diğer fraksiyonlardan izole edilir, bu ise ancak doğru bir mobil faz seçimiyle mümkündür. İstenilen maddenin kolondan çıkış süresinin herhangi bir safsızlık veya istenmeyen bir maddenin karışmasını engelleyecek kadar kısa olması gereklidir.
- **Tanımlama:** Bir maddenin HPLC ile tanımlanması HPLC analizlerinin önemli bir parçasını oluşturur. HPLC'de madde tanımlaması, bilinmeyene ait olan pik alıkonma süresinin standarda ait alıkonma süresiyle karşılaştırılması ile yapılabilir. Herhangi bir maddenin HPLC ile tanımlanabilmesi için öncelikle detektörün doğru seçilmesi gerekir. Dedektör seçildikten ve optimum koşullarda ayarlandıktan sonra bir ayırma analizi yapılmalıdır. Tanımlanmaya çalışılan maddenin seçilen detektör ve analiz koşullarında kabul edilebilir bir çıkış süresi ve belirgin bir piki olmalıdır. Çıkış süresini kısaltmak için bazı ayarlamalar yapılabilir. Bunlardan ilki kolon seçimi, diğeri mobil faz seçimi ve son olarak da akış hızı seçimidir. Kesin bir tanımlama için bilinen bir örneğin kullanılması gerekir. Güvenilir bir tanımlama için birden çok metot kullanılmalıdır.

- Derişim Tayini: HPLC’de tanımlı bir maddenin, bir sıvı çözeltilisinde derişimi tayin edilebilir. Bu işlemle istenilen maddenin değişik konsantrasyonlarda HPLC’ye enjekte edilmesi işlemleriyle bilinen konsantrasyonlar da bir seri pik elde edilir. Bu piklerin altında kalan alanlar hesaplanarak derişime karşı grafiğe geçirilir ve kalibrasyon grafiği çizilir. Bilinmeyen derişime ait pik alanı saptanarak kalibrasyon eğrisi aracılığıyla bilinmeyen derişim bulunur [11, 13].

1.1.6. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinin Sınıflandırılması

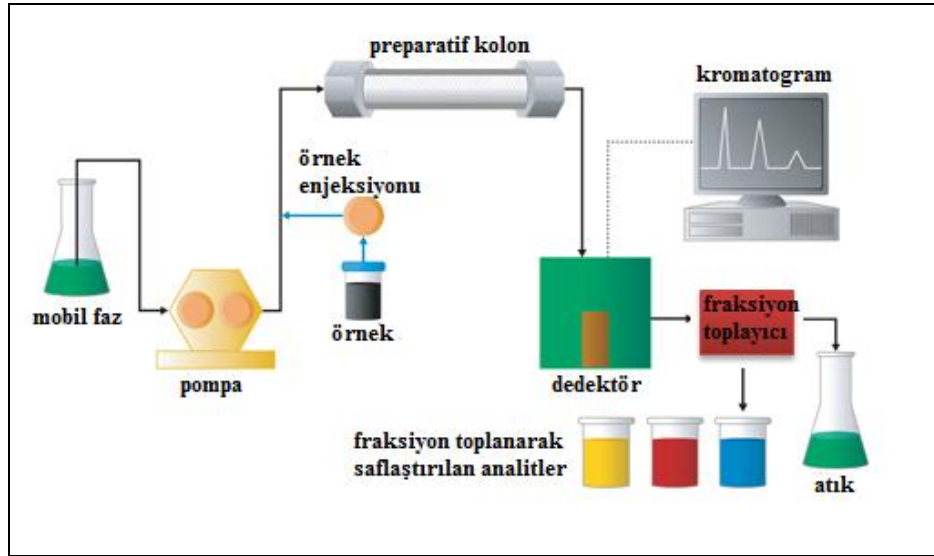
Sıvı kromatografisini sınıflandırmanın birçok yolu vardır. Sabit fazın yapısına göre, ayırma mekanizmasına göre ve kullanım amaçlarına göre çeşitli sınıflara ayrılır [11]. HPLC kullanım amaçlarına göre iki ana gruba ayrılır.

Analitik LC

Bir karışım içinde bileşenlerin konsantrasyonunun, kimliğinin ve karışımındaki bileşen sayısının belirlenmesi amacıyla genellikle analitik HPLC kullanılır.

Preparatif LC

Çeşitli bileşiklerin izolasyonu ve saflaştırılması için ise preparatif LC kullanılır. Günümüzde biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonu ve sonrasında saf bileşenlerin elde edilmesi tıp ve eczacılık endüstrisi başta olmak üzere, gıda, biyoteknoloji, zirai kimyasallar ve kozmetik endüstrisi için oldukça önemlidir [4]. Saflaştırılmış bir bileşen ticari olarak oldukça büyük bir öneme sahiptir. İster katkı olarak kullanılsın ister klinik çalışmalarda doku ya da hayvan deneylerinde kullanılsın mg boyutunda yüksek miktarlarda saf bileşene ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca bu bileşenler meyve sebzelerde düşük konsantrasyonlarda (<%2) bulunmaktadır ve saflaştırılarak kullanıma sunulmaları da ayrıca önem taşımaktadır. Bu yüzden saflaştırma ve tanımlama işlemi oldukça kompleks ve önemli bir işlemdir [4, 18]. Şekil 1.3 preparatif LC’ye ait temel bileşenleri şematize etmektedir. Analitik ve preparatif LC arasındaki en önemli farklar aşağıda maddelenerek açıklanmıştır.



Şekil 1.3. Preparatif LC'nin temel bileşenleri [19]

- Kullanım Amacı:

Analitik LC'de amaç örneğin nitelik ve niceliğinin belirlenmesi iken, preparatif LC'de numune bileşenlerinin izolasyonu veya saflaştırılması işlemi gerçekleştirilmektedir.

- Kolonun boyutları:

Analitik LC'de de kolon iç çapı 0.5-6 mm ve partikül çapı 3-20 μm iken preparatif LC'de kolon iç çapı 20-50 mm iken partikül çapı ise 20-100 μm 'dan büyük olabilmektedir.

- Numune enjeksiyon hacmi;

Örnek miktarı analitik LC'de 10 μg kadar iken bu preparatif LC'de 10 mg-100 mg'a kadar çıkabilmektedir. Tablo 1.1'de sıvı kromatografisinde kullanılan kolon tiplerine göre enjekte edilebilen örnek hacimleri verilmiştir [19, 20].

Tablo 1.1. Kolon tiplerine göre örnek enjeksiyon miktarı [19]

Kolon Tipi	Tipik Örnek Miktarı
Preparatif	>30 mg
Yarı Preparatif	5 mg
Konvansiyonel	100 µg
Yarı micro-LC	20 µg
Micro-LC	1 µg

1.2. Polimerik Kolon Dolgu Malzemelerinin Sentez Yöntemi

1.2.1. Dispersiyon Polimerizasyonu

Mikrometre boyutunda monodispers polimerik partiküllerin üretimi için kullanılan dispersiyon polimerizasyonu, monomerin organik bir dağıtma ortamı içerisinde çözünmesi ile yürütülen bir polimerizasyon yöntemidir [21]. Bu polimerizasyon yöntemi ile 1-10 µm aralığında monodispers polimerik partiküller elde edilmektedir. Başlangıçta tek fazlı olan polimerizasyon sistemi, katı partiküllerin oluşumuyla birlikte polimer ve dağıtma ortamını içeren iki fazlı yapıya ulaşmaktadır. Günümüze kadar değişik başlatıcılar, monomer ve dağıtma sistemleri kullanılarak dispersiyon polimerizasyonu uygulamaları yapılmıştır. Bu çalışmalar aşağıdaki faktörlerin partikül boy ve boy dağılımı, molekül ağırlığı ve monomer dönüşümü üzerinde etkili olduğunu göstermiştir [12, 21].

- Başlatıcı türü ve derişimi
- Dağıtma ortamı türü ve derişimi
- Stabilizör türü ve derişimi
- Monomer/dağıtma ortamı oranı
- Polimerizasyon sıcaklığı
- Karıştırma hızı ve türü

Dispersiyon polimerizasyonunda kullanılan başlatıcılar monomer fazında çözünebilmektedir. Polimerizasyon sisteminde başlatıcı miktarının artırılması ile elde edilen partiküllerin boy dağılımında bir genişleme ve reaksiyon hızında artış olduğu saptanmıştır. Başlatıcı derişiminin artırılması ile polimerizasyon hızında oluşan artış daha fazla serbest başlatıcı radikalinin oluşmasıyla açıklanmaktadır. Elde edilen polimerin moleköl ağırlığında ise artan başlatıcı miktarı ile belirgin bir azalma gözlenmiştir. Molekül ağırlığındaki bu azalma daha fazla serbest radikalın oluşması ile polimerizasyonun çok merkezli olarak başlaması ve ortalama zincir uzunluğunun kısılması ile açıklanmaktadır [14, 22].

Dispersiyon polimerizasyonunda ortalama boy ve boy dağılımı etkileyen bir diğer önemli parametre dağıtma ortamı türü ve bileşimidir. Dispersiyon polimerizasyonunda temel amaç, mümkün olduğunca dar bir boy dağılımına sahip partiküllerin sentezlenmesidir. Kullanılan dağıtma ortamının polaritesi ve dağıtma ortamındaki monomer çözünürlüğü sonuç partiküllerinin boyutunu ve boy dağılımını önemli ölçüde etkiler. İdeal olarak seçilen bir sistemde monomer çözünürlüğünün yüksek, oluşan polimer çözünürlüğünün ise düşük olması istenir. Artan monomer/dağıtma ortamı hacimsel oranı ile ortalama partiköl boyutu genelde artış gösterir. Ancak bu oranın aşırı artışı ile sonuç partiküllerde önemli oranda boy dağılımı meydana gelmektedir [12, 21, 23].

Dispersiyon polimerizasyonu yönteminde dağıtma ortamında çözülebilen ve genellikle polimerik yapıda olan stabilizörler kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda stabilizör derişiminin artırılması ile elde edilen polimerik partiküllerin boylarının azaldığı gözlenmiştir. Sıcaklığın etkisini araştırmak için yapılan çalışmalarda 55-80 °C aralığında artan polimerizasyon sıcaklığı ile ortalama partiköl boyutu ve boy dağılımında artış olduğu gözlenmiştir. Artan sıcaklık ile polimerin moleköl ağırlığında önemli bir azalmanın olduğu saptanmıştır.

Dispersiyon polimerizasyonu sistemlerinde genelde düşük karıştırma hızları ile çalışılmaktadır. Özellikle monodispers partiküllerin eldesine yönelik çalışmalarda karıştırma hızı, polimerizasyon ortamında homojen bir ısı transfer rejimi elde edilebilecek düzeyde tutulmaktadır. Yüksek karıştırma hızlarında oluşabilecek

şiddetli kayma gerilimi partiküllerde monodispers özelliğın bozulmasına ve boy dağılımının oluşmasına neden olmaktadır[12, 16, 21, 23].

1.2.2. Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu

HPLC uygulamalarında, ayırmanın gerçekleştirildiğı kolonlarda dolgu materyali olarak silika veya polimerik mikropartiküller kullanılmaktadır. Son yıllarda özellikle polimerik formdaki HPLC kolon materyalleri üzerindeki araştırmalar yoğunlaşmıştır. Bu partiküllerin silika bazlı olanlara göre belirgin avantajlara sahip olduğu bilinmektedir. Küresel, gözenekli ve monodispers (eş boyutlu) formda sentezlenmesinin silika bazlı materyallere göre kolay olması, partikülün türevlendirme işleminin daha kolay yapılabilmesi, geniş pH aralığında kimyasal kararlılık, afinite kromatografisi, büyüklükçe ayırma kromatografisi ve iyon değışim kromatografisi gibi uygulamalar için daha uygun yapıya sahip olması çalışmaların son yıllarda polimerik materyaller üzerinde yoğunlaşmasını sağlamıştır.

Genellikle ticari olarak üretilen HPLC kolonları belirli bir boy dağılımına sahip yani polidispers gözenekli partikülleri içermektedir. Polidispers partiküller ile hazırlanmış kolonlarda monodispers partiküller içeren kolonlara göre daha düşük çözünürlük değerleri ve teorik tabaka sayısı değerleri elde edilmiştir [16]. Özellikle 1990'lı yıllardan itibaren HPLC uygulamalarında “yeni nesil” kolon materyali olarak, monodispers yapıdaki gözenekli partiküllerin kullanımı gündeme gelmiştir. Monodispers gözenekli partiküller varlığında kolonda oluşan düzenli akış profili nedeniyle yüksek kromatografik ayırma yeteneğı elde edilebilmektedir.

Monodispers ve makro gözenekli formda partikül sentezine yönelik çok basamaklı polimerizasyon yönteminin ilk olarak Ugelstad tarafından önerildiğı aktarılmıştır. Daha sonra ise Cheng *et al.* tarafından ise modifiye edilerek geliştirilmiştir [24]. Bu yöntem dört temel basamaktan oluşmaktadır. Bunlar;

1. Dispersiyon veya emülsiyon polimerizasyonu ile çıkış lateksinin eldesi,
2. Çıkış lateksinin düşük molekül ağırlıklı organik ajan (aktive edici ajan) tarafından birinci basamak şişirilmesi,
3. Aktive edilmiş partikülün monomer fazı ile ikinci basamak şişirilmesi,
4. Stabilizör eşliğinde polimerizasyonun gerçekleştirilmesi [25].

1.3. Karotenoidler

İnsan vücudunun büyüyüp gelişmesi verimli çalışması ve hastalıklara karşı direnç gösterebilmesi için sağlıklı ve dengeli bir günlük diyetle beslenmesi gereklidir. Bu diyetle temel besin elementlerinin yanı sıra vitaminler, mineraller, antioksidanlar gibi mikro besin bileşenleri de yer alır [26].

Meyve ve sebzeler, sağlık için gerekli olan birçok vitamin ve minerallerin yanında; beslenmede önem taşıyan diğer gıda bileşenlerini ve fitokimyasalları da içermektedir. Bu fitokimyasallar arasında yer alan gruplardan birisi de karotenoidlerdir. Karotenoidler, ismini bu grubun ana temsilcisi olan β -karoten'den almıştır. β -karoten 1831 yılında Wachenroder tarafından havuçtan izole edilmiştir. Karotenoidler, tetraterponoid yapıda bitkilerde, diğer fotosentetik organizmalarda, bazı fotosentetik olmayan bakterilerde, mayalarda ve küflerde sentezlenebilen bileşiklerdir. Doğadaki karotenoidlerin 600'den fazlası bitkilerde, yosunlarda, bazı mantarlarda ve bakterilerde sentezlenebilmektedir. Ancak bunların 40-50 tanesi insan sağlığı üzerinde rol oynamaktadır [27-30].

Karotenoidler, ikincil bitki pigmentleridir ve 40 karbonlu izoprenoid polien yapıdan oluşmaktadır. Karotenler, yapılarında karbon ve hidrojen içeren hidrokarbonlardır. Başlıca karotenler; β -karoten ve α -, γ - ve ξ - izomerleri ve likopendir. Buna karşın ksantofiller, yapılarında karbon ve hidrojene ek olarak oksijen de içeren karoten türevleridir. Bu gruba örnek olarak da; lutein, kapsantin ve zeaksantin verilebilir. Yapısında halka içermeyen likopen, karotenoid pigmentlerin prototipidir. Diğer karotenoidler; likopenin hidrojenasyonu, dehidrojenasyonu, halka oluşturması ve oksidasyonu sonucu meydana gelmektedir. Bunun yanı sıra, zincir yapıya karbon eklenmesi ya da çıkarılması sonucunda da farklı yapıda ksantofilik karotenoidler meydana gelmektedir [31-33].

Karotenoidlerin renkleri, molekülün yapısında bulunan çok sayıdaki konjuge C=C çift bağlardan kaynaklanır. Karotenoid bileşikte konjuge çift bağların sayısı arttıkça renk koyulaşır. Örneğin, yapısında 9 tane konjuge çift bağ içeren β -karoten'in rengi sarı turuncu iken, yapısında 11 tane konjuge çift bağ içeren likopenin rengi kırmızıdır [34]. Ksantofiller, yapılarında en az bir OH grubu içermekte ve karotenlerden daha

fazla polarite göstermektedir [35]. Karotenler; petrol eteri, hegzan ve toluende çözünürken, ksantofiller metanol ve etanolde daha iyi çözünmektedir [32].

Tüm karotenoidler, serbest radikalleri bağlayıcı özelliğe sahiptir, bu özellikleri, çiftlenmemiş oksijenlerle veya radikallerle reaksiyona girerek onları baskılamalarından ileri gelmektedir. Bu nedenle meyve ve sebzelerde bulunan antioksidan bileşenler arasında karotenoidlerin ilk sıralarda yer aldıkları [30, 36] aynı zamanda insan ve hayvanların karotenoid sentezleyememesine bağlı olarak diyetle alınan karotenoid miktarının önemli olduğu belirtilmiştir. Karotenoidler, provitamin A ve nonprovitamin A olarak sınıflandırılabilir. Provitamin A karotenoidler, insan vücudunda metabolize edilerek retinol ve A vitamini özelliği taşımayan non-provitamin bileşenlere dönüştürülür. Provitamin A özelliğindeki karotenoidler, α -, β -, karoten ve β -kriptoksantin gruplarını içerir. Non-provitamin A karotenoidler grubunda ise insan sağlığı üzerinde önemli etkileri olan lutein, zeaksantin ve likopen yer almaktadır [30].

Meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan karotenoidler, rengi sarıdan kırmızıya kadar değişen havuç, biber, domates, çiçekler ve bazı mikroorganizmalar gibi birçok doğal ürünün karakteristik rengin oluşmasında görevlidir [37, 38]. Genel olarak sarı renkli meyve ve sebzeler karotenoid maddeler içerirler, bunun yanında yeşil renkli olanlar ise hem klorofil ve hem de karotenoid içerirler. Olgunlaşma süresince meyvelerin klorofil değerleri azalırken içerdikleri karotenoidlerin miktarı artar. Klorofilin kaybolmasıyla karotenoidlerin rengi ortaya çıkar. Yeşil renkli sebzelerdeki karotenoidlerin rengi, klorofilin güçlü rengi tarafından maskelenmektedir [39].

Karotenoidler; bitkisel dokularda serbest halde (kristal veya amorf) veya yağlı ortamda çözülmüş olarak bulunurlar. Ayrıca yağ asitleriyle esterleşmiş halde veya şeker ve proteinlerle kompleks halde de bulunabilirler. Karotenoidler yaklaşık 430-480 nm dalga boylarında maksimum absorbanans göstermektedirler ve renk bu konjuge çift bağ sisteminin sonucudur [31, 32, 40].

Konjuge yapıda reaktif çift bağ içermeleri, karotenoid pigmentlere serbest radikallere etki etme ve dolayısıyla da antioksidan özelliği kazandırmaktadır. İnsan diyetinde yer alan bu temel bileşenler; özellikle kanser, kardiyovasküler rahatsızlıklar ve göz

hastalıkları gibi hastalıklara yakalanma riskini azaltmaktadır [40-42]. Hayvanlar karotenoid sentezleyemedikleri için diyet aracılığıyla aldıkları karotenoidleri modifiye ederek dokularında depolamaktadır [43].

1.3.1. Gıdalarda Yaygın Olarak Bulunan Karotenoidler

Karotenoidler sarı renkten koyu kırmızıya, viyoleye ve hatta siyaha kadar değişen farklı renkte maddelerdir. Bir meyve ve sebzede bulunan farklı karotenoidlerin oranı ona özgü bir renk tonunun oluşmasına neden olmaktadır. Meyve ve sebzelerde en yaygın bulunan karotenoidler arasında β -karoten, lutein, zeaksantin ve likopen yer almaktadır. α -kriptoksantin, β -kriptoksantin, neoksantin, violaksantin ve anteraksantin ise düşük miktarlarda bulunan karotenoidler arasındadır [31, 32].

1.3.1.1. β -karoten ve α -karoten

β -karoten, doğada en yaygın bulunan pigmentlerdendir. Üzerinde en fazla çalışılan karotenoidlerden birisi olan β -karoten, vücutta kan ve dokularda bulunan temel karotenoidler arasında yer almaktadır. β -karotenin en fazla böbrek üstü bezinde bulunduğu ve bunu sırasıyla testis, karaciğer, yumurtalık, meme, böbrek, pankreas, akciğer, deri ve kolonun takip ettiği aktarılmaktadır. β -karotenin en önemli özelliği A vitaminine metabolize olmasıdır. 50 farklı karotenoidten β -karotenin en yüksek provitamin A aktivitesine sahip olduğu bilinmektedir [35]. Bunun nedeni, diğer karotenoidlerden farklı olarak zincir yapısının her iki ucunda da β -iyonon halkasının bulunmasıdır. β -karotenin temel kaynağı havuçtur ve havuçta bulunan toplam karotenoid madde miktarının %44-79'unu oluşturmaktadır [27]. Havuç dışında β -karoteni içeren başlıca gıdalar arasında maydanoz, tatlı patates, hindiba, kırmızı biber, tatlı kabak, kıvırcık lahana, ıspanak, marul ve pazı gibi sebzeler sayılırken, mango ve kayısı gibi meyveler de β -karotenin diğer kaynakları arasında yer almaktadır. Provitamin A aktivitesi olan α -karoten ise en fazla havuç, domates ve kırmızı biberde bulunmaktadır [26, 31, 32]

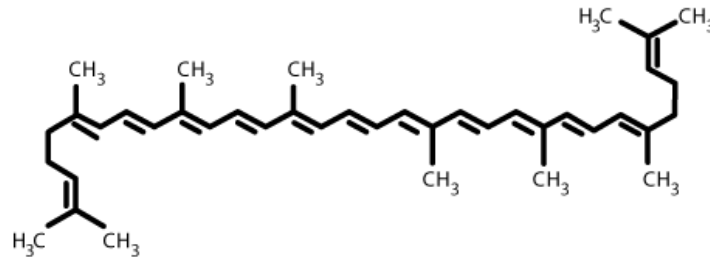
1.3.1.2. Lutein ve Zeaksantin

Lutein ve stereoizomeri zeaksantin, ksantofil ailesinin üyeleridir. Lutein, serumda en yaygın bulunan karotenoidlerden birisi olup lens ve sarı bölge gibi oküler dokuda

yoğun olarak bulunmaktadır [44, 45]. Lutein ve zeaksantin, retinada makular pigment olarak belirtilen sarı pigment oluşumundan sorumludurlar. Sarı pigmentler gözü ışıktan korumada etkin rol oynamakta ve retinal zararlanmayı engelleyebilmektedir [28]. Bu pigmentler, koyu yeşil yapraklı sebzelerde bulunmaktadır. Kıvırcık lahana, maydanoz, ıspanak, marul, brokoli, tatlı mısır, fasulye, yeşil biber, hindiba, kivi, avokado, erik, yaban mersini, ahududu, böğürtlen, siyah frenk üzümü lutein ve zeaksantin kaynakları arasında sayılmaktadır [31].

1.3.1.3. Likopen

Likopen, halka yapısı göstermeyen düz zincir yapıda bir hidrokarbon bileşiktir ve domates ürünlerinin karakteristik koyu-kırmızı renginin nedeni olan bir doğal pigmenttir. 1903 yılında, Schunck, domateslerde yoğun olarak bulunan bu pigmentin, havuçlarda bulunan karotenlerden farklı bir absorpsiyon spektrumuna sahip olduğunu göstermiş ve bu pigmente likopen adını vermiştir. Likopenin kimyasal yapısı Şekil 1.4'te verilmiştir [31, 32].



Şekil 1.4. Likopenin kimyasal yapısı [32]

Likopen; simetrik bir düzleme sahip olup, alifatik, yani düz zincirli, bir hidrokarbondur. Diğer karotenoidler gibi likopen; tetraterpen ($C_{40}H_{64}$) yapıda olup, 8 tane izopren (C_5H_8) ünitesinin birleşmesinden meydana gelmektedir. Likopen, yapısında 11 tane konjuge ve 2 tane konjuge olmayan toplam 13 tane çift bağ içermekte ve β -iyonon halkası içermemektedir.

Likopen; uzun zincir şeklindeki asiklik, aşırı hidrofobik yapısı ve içerdiği konjuge çift bağ nedeniyle antioksidan aktivite göstermektedir. Likopenin antioksidan etkisi; serbest radikalleri ($R\cdot$ ve $ROO\cdot$) ve oksijenin aktif formlarını (O_2^-) bağlamaları ile

açıklanmaktadır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, lipid peroksidasyonu sırasında likopen, α -karoten ve β -karotenin antioksidan aktiviteleri incelenmiş ve likopenin en yüksek antioksidan aktivite gösterdiği saptanmıştır [44]. Yapısında 11 tane konjuge çift bağ içeren likopen, 9 tane konjuge çift bağ içeren β -karotene göre aktif oksijen türlerini çok daha etkin tutabilmektedir.

Likopen, yalnızca bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenen doğal bir pigmenttir. Likopen ve diğer karotenoidlerin fonksiyonlarından biri, fotosentez sırasında ışığı absorbe etmek ve bu suretle, bitkileri fotoduyarlılık karşısında korumaktır. İnsanlar ve hayvanlar likopeni sentezleyemez, gıdalarla almaları gereklidir.

Bazı yeşil meyve ve sebzelerde likopenin parlak renkleri yeşil klorofilik pigmentler tarafından maskelenir. Bitkilerin olgunlaşması ile klorofil içeriği azalır, baskın duruma geçen likopen ve diğer karotenoidler çoğu meyve (portakal, limon greyfurt, çilek, domates, paprika, kuşburnu gibi) ve sebzelerin parlak renklere sahip olmasını sağlar. Domates ve domatesten elde edilen ürünler, likopen için temel kaynak durumundadırlar. Diğer likopen kaynakları, karpuz, guava, kuşburnu, papaya ve pembe greyfurttur [26, 31, 32]. Çeşitli gıdaların likopen içerikleri Tablo 1.2’de verilmiştir.

Kendine özgü tat ve aromasıyla dünyada ve ülkemizde en fazla tüketilen gıdalardan olan domates ve domatesten elde edilen ürünler diyetle önemli bir yere sahiptir. Anavatanı Meksika ve Peru olan domates, *Solanaceae* familyasına dahil olup *Lycopersicon esculentum* Mill. adı ile anılmaktadır ve 16. yüzyılın başlarında Avrupa’ya geçtiği bilinmektedir. Türkler’in domates ile tanışması I. Dünya Savaşı yıllarına dayanmaktadır. Türkiye’de yıllık 10 milyon tonun üzerinde olan domates üretiminin büyük bir kısmı taze olarak sofralık tüketime sunulmakta, üretimin %25-30’u ise endüstriyel işleme tabi tutulmaktadır [47]. Domates taze tüketimi yanında özel kullanım amaçlarıyla başta salça olmak üzere sos, ketçap, domates suyu, domates püresi, soyulmuş domates, dilimlenmiş domates, küp şeklinde doğranmış domates, domates konservesi gibi çok değişik şekillerde değerlendirilmektedir [31, 32].

Tablo 1.2. Çeşitli gıdaların likopen içeriği [46]

Gıda Maddeleri	Likopen İçeriği (mg/100g)
Taze domates	0.72-20.00
Domates suyu	5.00-11.60
Domates sosu	6.20
Domates salçası	5.40-150.00
Ketçap	9.90-13.44
Spagetti sosu	9.30-18.20
Pizza sosu	12.71
Barbekü sosu	9.30-18.20
Kavun	2.30-7.20
Pembe guava	5.23-5.50
Papaya	0.11-5.30
Havuç	0.65-0.78
Bal kabağı	0.38-0.46
Tatlı patates	0.02-0.11
Şeftali	0.01-0.05

Çeşitli kaynaklara göre kuru madde bazında domatesin bileşimi de Tablo 1.3'te gösterilmektedir [26, 31, 32].

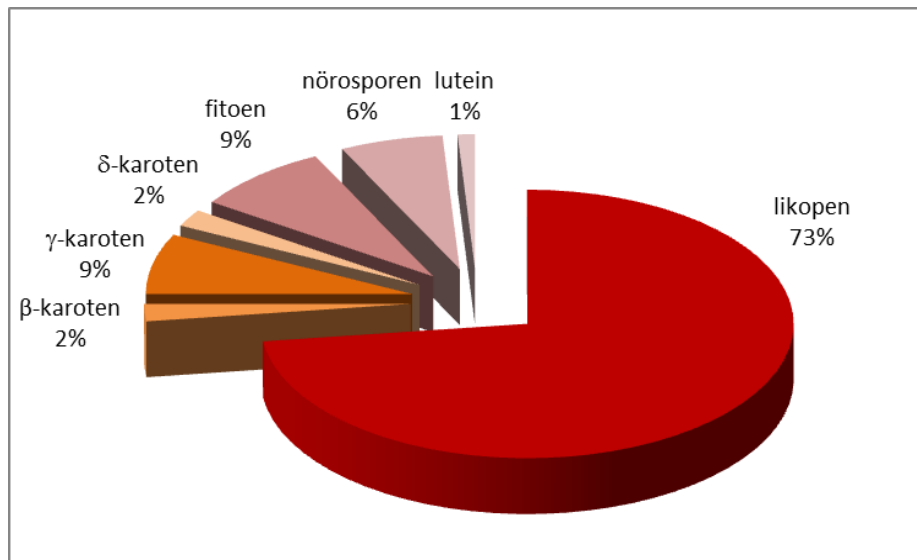
Tablo1.3. Domatesin bileşimi [26]

Bileşen	(%) Kuru madde
Glikoz	22
Fruktoz	25
Sakkaroz	1
Protein	8
Pektik maddeler	7
Selüloz	6
Mineraller	8
Malik asit	9
Sitrik asit	4
Renk Maddeleri	0.4
Diğer bileşenler	9.6

Likopen, gıda formülasyonlarında önemli bir doğal renk bileşenidir. Domates salçasının renk verici olarak geniş kullanımı, likopenin ticari olarak önemli bir doğal pigment olmasına neden olmaktadır. Ancak, likopen domatesin işlenmesi sırasında izomerizasyon ve oksidasyon ile degradasyona uğramaktadır ki bu işlem insan sağlığı ve gıda olarak duyu kalite açısından zorunludur. Likopen degradasyonu sadece ürünlerin duyu özellikleri açısından değil, ayrıca tüketici sağlığı açısından da önemli bir durumdur.

Likopen yağda çözünür bir karotenoid olup, β -karotenin belirtisidir ve β -karotenden en az iki kat daha fazla antioksidan kapasiteye sahiptir [48]. Çiftlenmemiş oksijen tutucu sabiti, β -karoteninkinden 2, α -tokoferolden 10 kat daha fazladır. Likopenin besin ögesi olarak değeri nedeni ile pek çok yetiştirici, üretim hatlarındaki ürünlerin likopen içeriğini arttırmak istemekte ve üreticiler buna yönelik metotlar geliştirmeye çalışmaktadır [49].

Likopen, olgunlaşmış domateste en yoğunlukta bulunan karotenoid olup, diğer toplam pigmentlerin %70-90'ı civarındadır. α -karoten, β -karoten, lutein ve β -kriptoksantin gibi diğer karotenoidler önemli olmayan miktarlardadır [50]. Bir domatesteki tipik karotenoid madde dağılımı Şekil 1.5'deki gibidir.



Şekil 1.5. Domatesteki karotenoid madde dağılımı [50]

Taze domatesteki likopen miktarı, çeşit, olgunluk ve olgunlaşmanın gerçekleştiği ortamdaki çevresel faktörlere göre değişir. Domatesin tümündeki likopen miktarı 9.27 mg/100 g olarak tespit edilmiş iken, bazı koyu kırmızı renge sahip çeşitlerde bu miktarın 15 mg/100 g'a çıktığı, ancak sarı çeşitlerde ise 0.5 mg/100 g'a indiği görülmüştür [39]. Araştırmacılar domateslerdeki likopen konsantrasyonunun, yazın daha yüksek (Haziran-Ağustos dönemi) ve kışın daha düşük (Ekim-Mart dönemi) olduğunu belirtmişlerdir. Yine, serada yazın veya kışın yetiştirilen domatesin ve yeşil olarak hasat edilip depolamada olgunlaştırılan domatesin de, dış ortamda yetiştirilen domatese göre daha az likopen içerdiğini belirlemişlerdir [26, 39].

McCullum 1995 yılında domateste likopen ve diğer karotenoidlerin dağılımı üzerine çalışmalar yapmış ve dış perikarpın likopen ve toplam karotenoidleri en fazla içeren bölge olduğunu tespit etmiştir [51]. Domates kabuğu 12 mg likopen/100 g kabuk (yaş bazda) içerirken, tüm ve olgun domateste 3.4 mg/100g seviyesinde likopen tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada ise domates kabuğunda likopen miktarı 53.9 mg/100g iken, domates pulpunda 11 mg/100g olduğu tespit edilmiştir. Domates yan ürünleri, domates işlemedeki artışa paralel olarak her geçen yıl artış göstermektedir. Avrupa'da 10 milyon ton domates işlenmekte dolayısıyla da yaklaşık 100 bin ton atık oluşmaktadır [52]. Domatesin atık kısmı; posa, meyvenin kurumuş ve ezilmiş kabuk ve çekirdek kısımlarından oluşur. Domates işleme sırasında oluşan kabukça zengin atık kısmında likopen miktarının yüksek oluşu sağladığı ekonomik değer açısından domates işleme atıklarının da değerlendirilebilir olduğunu göstermektedir [26].

1.3.1.3.1. Likopenin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Bir polien hidrokarbon olan likopen, 11'i konjuge 13 çift bağa sahip, asiklik, açık zincir yapıda doğrusal doymamış bir karotenoiddir. Likopen, 11 konjuge çift bağ bulundurduğu için antioksidan olarak görev yapabilmektedir [50]. Bu nedenle gıdalardaki likopenin stabilitesi daha büyük önem kazanmaktadır. *In-vitro* antioksidan incelemelerinde likopenin β -karotene göre 2 kattan fazla, α -tokoferole göre de 10 kattan fazla reaktivite gösterdiği ayrıca, likopenin, hidrojen peroksit ve nitrojen dioksit gibi reaktif oksijenlerle de etkileşime girdiği tespit edilmiştir [50]. Likopenin birtakım özellikleri Tablo 1.4'te verilmiştir.

Tablo 1.4. Likopenin çeşitli özellikleri [50]

Likopenin özelliği	Açıklama
Molekül formülü	$C_{40}H_{50}$
Molekül ağırlığı	536.85 da.
Erime noktası	172-175 °C
Kristal formu	Uzun, kırmızı, iğne yapraklı
Toz formu	Koyu kırmızı-kahverengi
Çözünürlük	Kloroform, hegzan, benzen, aseton, petrol eteri
Duyarlılık	Işık, oksijen, yüksek sıcaklık, asitle muamele

Likopen, parlak kırmızı rengini, konjuge polien yapısına borçludur. Doğada likopen hep trans formunda bulunur. Isı, ışık ve belirli kimyasal reaksiyonların etkisiyle trans form, mono veya poli-cis formuna izomerize olur. Likopen, β -iyonin halka yapısının yokluğu nedeni ile provitamin-A aktivitesine sahip değildir. Isı, ışık, oksijen ve asitler degradasyona uğramasına neden olur iken bazı metal iyonları da, Cu^{2+} , Fe^{3+} gibi, likopen oksidasyonunu katalizlerler [32, 50].

Likopen ve diğer karotenoidlerin antioksidan aktiviteleri, singlet-oksijen tutucu özellikleri ve peroksi radikalleri engelleme kabiliyetleri ile dikkat çekmektedir. Likopenin değişik geometrik izomerlerde, trans, mono-cis, poli-cis formları gibi, bulunduğu bilinmektedir. Bunlardan trans izomer form taze domatestede en baskın olanı ve yine termodinamik açıdan en stabil olanıdır. Ancak domatesin işlenmesi ve depolanması süresince likopen trans-cis isomerizmine uğrar [32, 50].

Likopen, gıda işleme yöntemlerinden etkilenmektedir. Bazı prosesler biyoyararlılığını arttırırken, bazı proseslerde ise kayıplar olmaktadır. Sıcaklığa, ışığa ve oksijene maruz kalma süreleri likopen kayıpları konusunda oldukça önemli parametreleri oluşturmaktadır [53]. Gıdaların likopen içeriklerini ve antioksidan kapasitelerini inceleyen bir araştırmada; domates ve domates ürünleri, ayrıca karpuz ve sebze suları analiz edilmiş, en yüksek likopen içeriğine domates konservesinin, en

yüksek antioksidan kapasitesine de domates çorbasının sahip olduğu saptanmıştır [22].

Oksijen geçirgenliğinin, ışığın ve bazı metallerin bulunmasının kurutma sırasında ve sonrasında likopenin izomerizasyonuna ve oksidasyonuna neden olduğu tespit edilmiştir. Depolama koşullarının; ürünün nemine, depolama süresine ve depolama sıcaklığına, hava ve ışık koşullarına göre optimize edilmesinin kayıpları önlemek açısından yararlı olabileceği belirtilmiştir [54].

Giovanelli *et al.* domateslerin işleme teknolojisine bağlı olarak maruz kaldıkları oksidasyon ve sıcaklık hasarının domateslerin antioksidan özelliklerine etkilerini belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada, domates pulpu, püresi, salçası ve kurutulmuş domatesleri materyal olarak kullanarak antioksidan içeriklerini (askorbik asit, likopen, polifenol) antioksidan aktivitelerini incelemişlerdir. Araştırmacılar en fazla askorbik asidin (C vitamini) domates pulpunda bulunduğunu, domates salçasının çok az askorbik asit içerdiğini, kurutulmuş domateslerde ise neredeyse tamamının (%92) yok olduğunu belirtmişlerdir [55]. Likopen içeriğinin kurutulmuş domateslerde diğerlerine göre çok olduğunu rapor etmişlerdir. 80°C gibi yüksek bir sıcaklıkta kurutulan domateslerde likopen kaybının %2-3 gibi önemsiz sayılabilecek oranda gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Ayrıca, antioksidan aktivitesinin kurutulmuş domateslerde salça ve diğer domates ürünlerine oranla daha yüksek olduğunu ifade etmişlerdir [55].

Lavelli *et al.* yarım domateslerin 80°C'de kurutulmasıyla %2 oranında likopen azalması belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar domates pulpunun 70°C'de kurutulmasıyla da toplam likopen miktarında %0.7 oranında azalma tespit etmişlerdir [56]. Shi *et al.*, domates ve ürünlerinde farklı kurutma metotlarının (ozmotik kurutma, vakum kurutma, hava akımı ile kurutma ve her üçünün kombinasyonu) ürünlerdeki likopen kaybını belirlemek ve prosesin optimizasyonunu gerçekleştirmek amacıyla çalışmışlardır. Çalışma sonucunda, uygulanan tüm kurutma yöntemlerinin hem likopen hem de besinsel değer ve aroma kaybına neden oldukları, ancak likopen kaybına en az vakum kurutma uygulamasının, en fazla ise geleneksel hava akımında kurutmanın sebep olduğunu belirlemişlerdir [39].

Zanoni *et al.* dilimler halinde 110°C’de 4 saat kurutulan domateslerde %10 likopen kaybı olduğunu tespit etmişler, 80°C’de 7 saat kurutulan domateslerde ise likopen kaybına rastlamamışlardır [57].

Likopenin parçalanmasında izomerizasyon ve otooksidasyon reaksiyonlarının birlikte etkili olduğunu belirlenmiştir. Bir çalışmada, -20 °C’de 30 gün depolama sonunda, likopen miktarında %10 kayıp gözlenmiş ve depolama sıcaklığı azaldıkça likopenin daha stabil olduğu görülmüştür [58].

Likopen kaybı üzerine, ışığın ve ışınlamanın da önemli etkisi bulunmaktadır. Nitekim likopen standardının 6 gün süre ile 25 °C’de 2000–3000 lux ışığına maruz bırakılması durumunda %94 düzeyinde likopen kaybı meydana gelmiştir [59].

1.3.1.3.2. Likopenin Sağlık Üzerine Etkileri

Likopenin biyolojik etkilerinden öncelikle antioksidan özellikleri sorumludur. Kanser ve kalp damar hastalıkları gibi oksidatif stresle ilişkili kronik hastalıklardan korunmada likopenin etkili olabileceği düşünülmekte ve son yıllarda bu konuyla ilgili araştırmalar yapılmaktadır. Çalışmalar da kronik hastalıklarda likopenin koruyucu rolünü gösteren bulguları doğrulamaktadır [60].

Birçok araştırma göstermiştir ki, likopen vücut tarafından absorbe edilen bir antioksidandır ve zarar görmüş hücreleri onarmaya yardımcı olur, prostat kanseri, sindirim sistemi, göğüs kanseri, akciğer kanseri ve yaşlılıktan dolayı oluşan kalp dejenerasyonunu ve koroner kalp hastalıklarını aktif olarak engelleyebilir. Aynı zamanda kolesterol düşürücü özelliğe de sahiptir. Kandaki likopen miktarı arttıkça, okside edilmiş bileşikler azalır [61].

Likopenin kilolu insanları kalp krizinden koruyabilen tek karotenoid olduğu ileri sürülmüştür ve zararlı oksijen radikallerini önlemede beta karotenden iki kat vitamin E’den ise 100 kat daha etkili olduğu belirtilmiştir. İnsan vücudunda sentezlenemediği için dışarıdan alınması gerekmekte ve etkisi doza bağlı olarak artmaktadır, ayrıca günlük diyetle en az 40 mg likopen alınması önerilmiştir [61, 62]. Likopen, tüm karotenoidler arasında en etkili singlet oksijen söndürücü ve antiradikal olup, insan vücudunda önemli bir savunma mekanizması sergilemektedir [61, 63].

Fornelli *et al* likopenin göğüs tümörü hücre serisi çoğalması üstündeki etkisini farklı zaman aralıklarında (24-72 saat) ve dozlarda (0.125 – 100 μ M) test etmişlerdir. Elde edilen veriler likopenin göğüs tümörü hücre serisi gelişimi üstündeki inhibisyon etkisini doğrulamıştır [64].

Epidemiyolojik çalışmalar, likopen diyetinin erkek ratlarda azoksimetan ile indüklenmiş kolon tümörlerini başlangıç ve gelişme aşamalarında durdurduğu sonucunu doğrulamıştır. Sonuçlar likopen alımı ve kolon kanseri ortaya çıkış oranı arasında ters bir orantı olduğunu göstermektedir [65].

Tang *et al.* tarafından İnsan prostat kanseri hücrelerinin büyüme oranına likopenin etkileri farelerde incelenmiş ve 100-300 mg/kg likopen uygulanan farelerde tümör büyümesinin kontrol grubuna göre %55.6 ve 75.8 oranında azaldığı gösterilmiştir [66].

E vitamini, selenyum ve likopen kombinasyonu içeren diyetle beslenmenin bu maddeleri ayrı ayrı almaya göre prostat kanseri ve karaciğer metastazını belirgin derecede düşürdüğü gözlenmiştir [67].

1.3.1.3.3. Likopenin Elde Edildiği Yöntemler ile İlgili Çalışmalar

Likopen genel olarak; kırmızı domatesten çözücü ekstraksiyonuyla ve sonrasında çözücünün uzaklaştırılması yöntemiyle elde edilmektedir [31]. Ekstraksiyon işlemi geleneksel ve yeni metotlar olmak üzere iki grupta incelenebilir. Sokselet ekstraksiyonu ve maserasyon işlemi geleneksel yöntemler arasında olup işlem süresi uzundur ve büyük miktarlarda çevreyi kirletici çözücüler gerektirmektedir. Süperkritik sıvı ekstraksiyonu, mikrodalga ekstraksiyonu katı faz ekstraksiyonu ise son yıllarda geliştirilen hızlı, etkin ve modern yöntemler arasındadır [31, 32].

Yakın zamanda, daha hızlı, verimli ve yeni teknikler geliştirilerek ekstraksiyon işlemi modernize edilmiş ve bu yöntemlerle desteklenmiştir. Bunlardan bazıları, mikrodalga uygulaması, ultrason uygulaması ve yüksek basınç uygulamalarıdır. Bu tekniklerde yüksek basınç ya da yüksek sıcaklıklarda çalışma imkanının olması ekstraksiyon süresini büyük oranda azaltmaktadır. Yeni yöntemler ekstraksiyon işlemini %98-99 verimli hale getirebilmiştir. Likopen ekstraksiyonunda klasik

solvent ekstraksiyonun yanı sıra %60'ın üzerinde verim sağladığı belirlenen süper kritik ekstraksiyon yöntemi de kullanılmaktadır [68].

Sheetal ve Ananthanarayan tarafından yapılan çalışmada selüloz ve pektinaz enzimleri kullanılarak domates dokusundan likopen elde edilmiştir. Örneklere selüloz enzimi uygulanmış sonra 55 °C'de 15 dakika, pektinaz enzimi uygulanmış ve sonrasında 60 °C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. Sonra süzölmüş, süzöntü ve kalıntıya aseton ve eter ile solvent ekstraksiyonu uygulanmıştır. Ekstraksiyon işlemi tekrarlanmış ve santrifjlenmiştir. Yapılan çalışmada domates atıklarından likopen eldesinde pektinaz ve selüloz enzimlerinin kullanımının verimi artırdığı görölmüştür [69].

Yapılan bir diğfer tez çalışmasında da diğfer çoğru çalışmalarda olduğı gibi likopen, solvent ekstraksiyonu ile pembe greyfurt suyu ile domates pulpundan elde edilmiş ve 80 °C, 95 °C ve 110 °C sıcaklıklardaki ısıl stabilitesi belirlenmiştir. Likopen yağda çözünen bir bileşen olduğı için çeşitli organik çözücüler; hegzan, aseton, etanol, benzen, kloroform ve petrol eteri kullanılmıştır. Çalışmada selüloz ve pektinaz enzimleri kullanılarak domates dokusundan likopen ve β-karoten elde edilmiştir. Her iki üründe de, likopen ve β-karotenin ısıl degradasyonunun birinci derece kinetik modele uyduğı saptanmıştır. Kinetik veriler, uygulanan sıcaklık arttıkça, her iki bileşenin degradasyon hızının arttığını göstermiştir [70].

Ma *et al.* tarafından yapılan çalışmada su ve yağ bazlı gıdalarda sıcaklık ve ışık uygulamalarının likopen stabilitesi üzerinde etkileri incelenmiştir. Yapılan çalışmada ekstraksiyon işlemi için 6 ml'lik aseton, etanol ve hegzan (1:1:1) karışımı çözen olarak kullanılmıştır [71]. Konuru ve Kuti ise, genotip ve yetiştirme ortamının domatesteki likopen üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, domates örneklerindeki likopen 10 mL hegzan, metanol, aseton (2:1:1) ve BHT 25 g/l çözültisi ile ekstrakte edilmiştir [72].

Dayanıklı karotenoidler elde etmek için süper kritik sıvı ekstraksiyonun kullanımı düşünölmüştür. Karbondioksit en çok kullanılan süper kritik sıvıdır, toksik olmayan, patlayıcı etkisi bulunmayan, saf bir solventtir. Uygun kritik sıcaklığı sayesinde sıcaklığa duyarlı bileşenlerin ekstraksiyonunda da kullanılabilir. Vagi yaptığı

çalışmada, %90.1 likopen ile en yüksek verimde karotenoid eldesi 460 bar, 80 °C de süper kritik CO₂ ekstraksiyonu ile gerçekleştirmiş, likopen verimi sıcaklık ve basınç artışıyla artmıştır. Derin dondurulmuş üründen yapılan ekstraksiyonla elde edilen likopen veriminin oda sıcaklığında depolanmış üründen yapılan ekstraksiyondan daha fazla olduğu bulunmuştur [73].

Chiu *et al.* yaptıkları bir çalışmada domates pulpu atıklarından süperkritik CO₂ ekstraksiyonu ile likopen ekstrete etmişler ve likopeni ekstraktını %4.5 jelatin, %10 poliglutamik asit ve %4.8 likopen ekstraktı olacak şekilde emülsiyon sistemiyle mikroenkapsüle etmişlerdir. Çalışmada kaplama materyalinin termal stabilitesini ve domates pulpu atığının iyi bir likopen kaynağı olduğunu ortaya koymuşlardır [74].

Domatesin epidermal bölgesi (kabuk ve dış perikarp doku) domateste bulunan likopenin yaklaşık %80-90'nını içermektedir. Bu oran, özellikle işlem sırasında atık olarak uzaklaştırılan bir kısımda bulunması nedeni ile dikkat çekici ve üzerinde çalışılması gereken bir konudur. Domatesin işlenmesi sırasında kalan çekirdek ve kabuklar likopen eldesi için iyi kaynaklardır [26].

Yapılan bir çalışmada da yine süper kritik karbon dioksit kullanılarak domates posasından da likopence zenginleştirilmiş fraksiyonun üretimi üzerine çalışılmıştır. Bu çalışmada, süper kritik akışkan teknolojisi ile kurutulmuş domates posası özütünden ayçiçek yağı ve etanol kullanılarak likopen elde edilmiştir [75]. Süper kritik akışkan ayrıştımdan sonra fraksiyonasyon bölgesinin 30, 60 ve 120. dakikalarında dört fraksiyon olarak likopen toplanmıştır. Likopen konsantrasyonu farklı basınçlarda; 10 ve 30 MPa ve farklı CO₂ akış oranlarında elde edilen farklı fraksiyonlarda incelenmiştir ve likopenin kantitatif belirlenmesi HPLC ile gerçekleştirilmiştir. Farklı ekstraksiyon parametrelerinin yanı sıra, onların etkileşimlerinin etkileri, üç faktöre ve iki düzey ile tam faktöriyel tasarım kullanılarak belirlenmiş ve optimum koşullar yanıt yüzey yöntemi ile hesaplanmıştır. Sonuçta dört fraksiyondan elde edilen örneklerde likopen içeriği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmiştir [75].

Yapılan bir diğer çalışmada domatesten likopen izolasyonu için yeni bir ekstraksiyon yöntemi önerilmiştir. Geleneksel solvent ekstraksiyonunu takip eden anti-solvent

çöktürme yöntemiyle likopeni geri kazanarak izole ettiklerini bildirmişlerdir. 100 gr toz halde liyofilize domates örneğinden karotenoidler hegzan, etil asetat ve etanol kullanılarak ekstrakte edilmiş ve daha sonra likopen dışındaki diğer tüm karotenoidler anti-solvent (metanol) kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Çöktürülmüş ve izole edilmiş likopen %77 oranında geri kazanılmıştır [76].

Weia *et al.* tarafından yüksek hızda karşı akım kromatografisiyle domates salçasından likopen saflaştırılmıştır. Preparatif karşı akım kromatografisinde n-hegzan-diklorometan ve asetonitrilden oluşan susuz solvent sistemi kullanılmıştır. Saflaştırılan likopen HPLC'de analiz edilmiş ve %98.5 saflıkta elde edilmiştir [77]. Xu ve Pan, kırmızı greyfurttan likopen ekstraksiyon verimi üzerine ultrason uygulamasının etkilerini araştırmışlardır. Ekstraksiyon verimi üzerine ekstraksiyon süresi, sıcaklık, çözücü/örnek oranı, uygulanan ultrason yoğunluğu ve ekstraksiyon döngüsünün etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Ultrason destekli ekstraksiyon geleneksel solvent ekstraksiyonuyla karşılaştırıldığında verimin belirgin oranda arttığı görülmüştür. Sıcaklığında ekstraksiyon verimi üzerine etki eden önemli bir parametre olduğu görülmüş ve optimum sıcaklık 30 °C olarak belirtilmiştir. Sürekli ultrason uygulamasıyla ekstraksiyon verimi artarken belirli bir noktadan sonra ultrason uygulamasının verimi azalttığı görülmüştür. Ayrıca uygun aralıklarla uygulanan darbeli ultrasonun sürekli uygulanan ultrasondan daha etkili olduğu bildirilmiş ve bu analizler sırasındaki likopen degradasyonu HPLC kullanılarak belirlenmiştir [78].

İran'da yapılan bir çalışmada araştırmacılar katılma kompleksi ekstraksiyonu yöntemiyle likopen saflaştırmışlardır. Katılma kompleksinin, organik kimyasalların ekstraksiyonu ve saflaştırılması için etkili bir yöntem olduğunu söylemişlerdir. Bu prosedürde iki ana bileşen vardır; likopen ve kapsayıcı ajan. Yöntemin temeli organik solventlerle alınan karotenoidlerden ursodeoksikolik asit ile likopenin çöktürülmesi esasına dayanmaktadır. Çalışmada sonuçlar HPLC, UV-Vis spektrofotometre ve NMR ile açıklanmış ve önerilen ayırma yönteminin likopen saflaştırmada kullanılabilir olduğunu gösterilmiştir [79].

Aghel *et al.* tarafından salçadan likopen ekstrakte edilip saflaştırılmıştır. Araştırmacılar önce salçayı metanol ile dehidre edip, sonra likopeni metanol-karbondiklorid

karışımı ile ekstrakte etmişlerdir. Elde edilen likopen ekstraktı, iki kez kristallendirme ile kaynayan metanol ilavesi ile elde edilmiştir. Daha sonraki saflaştırmada ise rekristalizasyon ve kolon kromatografisi işlemi uygulanmıştır. Elde ettikleri likopen yapılarını ise UV, IR, NMR ve kütle spektroskopisi kullanarak tanımlamışlardır. Ayırıştırılan saf likopen miktarı 100 gr domates salçası başına 2.3 mg olarak bulunmuştur. Fakat uygulanan kristalizasyon işlemi ancak başka bir ayırıştırma yönteminin kombinasyonu ile saf likopen kristalleri verebilmiştir [80].

Portekiz ve Brezilya’da insanlar üzerinde yapılan multidisipliner bir çalışmada likopen solvent ekstraksiyonu devamında ters faz sıvı kromatografisi ile elde edilmiş, LC-MS ile tanımlanmıştır. Toksikite testleri yapılmış ve veziküler nano taşıyıcılarla deriden difüzlenebilir üzere transferzom ve etozom adı verilen ilaç taşıyıcı sistemlere yüklenmiştir. Taşıyıcı sistemlerin deriden difüzlenebilir hızı ve vücutta alıkonma testleri yapılmıştır. Deriden difüzlenebilir likopenin kulak ödemi üzerine etkisi araştırılmıştır. Özet olarak kullanılabilir birçok antioksidan madde içerisinde likopenin deriden difüze olabilen çok güçlü bir antioksidan madde olduğu görülmüştür. Oldukça düşük maliyette ve ucuz bir hammaddeden likopen elde edilmiş ve vücutta deforme olabilen nano yağ kesecikleri içerisine hapsedilip deriden difüzyonu sağlanmıştır ve kulak şişme modelinde ödem oluşumunu inhibe ettiği kanıtlanmıştır [81].

Daniele Naviglio adlı bilim insanı kendi adını taşıyan ve patentli bir ekstraktör icat etmiş ve bu ekstraktörle saf likopen elde ettiğini belirtmiştir. “Extractor Naviglio” kullanılarak yüksek basınç altında domates atıklarından likopen fazının ayrılması için musluk suyu kullanılmıştır. Böylece sürecin maliyeti büyük ölçüde azaltılmıştır. Ekstraktörde diğer apolar bileşikler matriks içinde devam ederken likopen yüksek basınç etkisiyle moleküler agregatlar halinde suya transfer edilmiştir. Suda çözünür olmayan likopen, yarı-kristal katı formda geri kazanılmıştır. Daha sonraki aşamada ise küçük bir miktar organik çözücü kullanılarak katı faz ekstraksiyonu ile saflaştırılmış ve %98 kromatografik saflıkta likopen elde edilmiştir [18].

Bir grup Çinli araştırmacı tarafından ticari makro gözenekli adsorban reçineler kullanılarak domates dokusundan likopen saflaştırılmıştır. Araştırmacılar farklı gözenek yapısında, polaritede ve farklı boyutlarda 24 adet ticari adsorban

kullanmışlar ve bunların likopen ayırmadaki performanslarını değerlendirmişlerdir. Domates tozu 2 saat boyunca 45 °C'de su banyosu içinde 10 L etil asetat ile iki kez ekstrakte edilmiş ve sonrasında dönel buharlaştırıcı içerisinde düşük basınç altında etil asetat uzaklaştırılmıştır. Hazır kolonlar dinamik adsorpsiyon/desorpsiyon deneyleri ile optimize edilmiştir. Sonuçlar LX-68 kodlu apolar S-DVB reçinenin diğer reçinelere göre daha yüksek ayırma verimliliği olduğunu göstermiştir. Likopen %66.9 bir geri kazanım ile saflaştırılmıştır. Araştırmacılara göre, adsorban reçinelerin kullanılması büyük ölçekli üretim için üzerinde çalışılması ve geliştirilmesi gereken önemli bir yöntemdir [4].

Yapılan bir derleme çalışmasında ise geçmişten 2010 yılına kadar karotenoidlerin ekstraksiyonuna yönelik 29 adet uluslararası patent bulunduğu belirtilmiştir. Fiziksel, kimyasal, biyokimyasal ve enzimatik olarak ayrılan ve bütün ekstraksiyon yöntemlerinin değerlendirildiği patentler arasında gün geçtikçe dikkat çeken ve üzerindeki çalışmaların artarak devam ettiği yöntemin ise süperkritik akışkan ekstraksiyonu olduğu belirtilmiştir. Adsorban reçineler kullanılarak karotenoid ekstraksiyonuna yönelik ise 2001 yılında CA2404834 numaralı yalnızca 1 adet patent bulunmaktadır [82].

Adsorban reçineler ile bileşenlerin izolasyonu ve saflaştırılmasına yönelik literatürde bulunan az sayıdaki çalışmalar da genellikle 2010 yılı ve sonrasını kapsamaktadır. Bu da göstermektedir ki yöntem üzerinde çalışılması ve geliştirilmesi gereken oldukça yeni uygulanabilir ve son yıllarda dikkat çeken bir konudur.

1.4. Enkapsülasyon Teknolojisi ve Özellikleri

Enkapsülasyon katı, sıvı ve gaz malzemelerin kaplanarak kapsüller içinde tutulması ile çok küçük bir maddeyi veya tüm bileşeni koruyarak, belli bir zaman periyodunda kontrollü olarak belirli bir hızda serbest kalmasına olanak sağlayan teknolojidir. Mikrokapsül içerisinde yer alarak kaplanan madde veya karışım, “çekirdek”, “iç faz” veya “dolgu” olarak ifade edilirken dış kısımda yer alan duvar ise “kabuk”, “kaplama”, “duvar materyali” veya “membran” olarak isimlendirilmektedir [83]. Partikül boyutu 1 µm'nin altında olanlar "nano partikül", 3 µm-800 µm arasında

olanlar "mikro partikül" ve 1000 µm'den büyük olanlar ise "makro partikül" olarak sınıflandırılır [84, 85].

Enkapsülasyon; gıda, tıp, eczacılık, kimya, ziraat, yem, veterinerlik ve biyoteknoloji gibi farklı alanlarda uygulamaları olan ve hızla gelişen bir teknolojidir [86]. Mikroenkapsülasyon teknolojisinin gıda endüstrisinde kullanılması da oldukça eskiye dayanmaktadır. Özellikle son yıllarda fonksiyonel gıdaların öneminin giderek artması sonucunda mikroenkapsülasyon işlemi gıda sektörü için daha çok anlam kazanmıştır [87]. Mikroenkapsülasyon tekniği, gıda sektöründe genellikle, sıvı damlacıkların, katı partiküllerin veya gaz bileşenlerin gıda saflığında kaplama materyalleri ile kaplanması için kullanılmaktadır [88]. Gıda ürünleri içerisinde çoğunlukla katı ve sıvı yağlar, aroma bileşenleri, vitaminler, mineraller, renk bileşenleri ve enzimler mikroenkapsülenmişlerdir.

Mikroenkapsülasyon teknolojisinin gıda endüstrisinde kullanım amaçları kaplanacak maddenin dış etkenlere karşı korunması (ısı, nem, hava ve ışık gibi); buharlaşarak kaybolmasının önlenmesi, fiziksel özelliklerinin daha iyi korunması; maddenin kaplanmasıyla taşınmasının kolaylaştırılması; doğru yerde ve doğru zamanda çalışmasının sağlanması; kaplanacak maddenin tat ve kokusunun maskelenmesi; başka bileşenlerle reaksiyona girmesinin önlenmesi; küçük miktarlarda kullanımı istendiğinde seyreltilebilmesi ve seyreltmenin homojen bir halde sağlanması şeklinde sıralanabilir [89].

Enkapsülasyon teknolojilerinin temel prensipleri ikiye ayrılır: Aktif ingrediyen bir polimer çözeltisi içinde karıştırılır ve ince damlacıklar halinde dağılır, damlalar jelasyon, kurutma, soğutma, koaservasyon gibi tekniklerle katılaştırılır. Katı toz parçacıklar ise akışkan yatakta karıştırılır, kaplama çözeltisi püskürtülerek uygulanır, ya da kurutma veya soğutma ile katılaştırılır [90].

Enkapsülasyonda aktif bileşenin kaplanmasında çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Bu teknikler üç başlık altında incelenebilir:

1- Fiziksel prosesler: püskürtmeli kurutma, ekstrüzyon, akışkan yataklı kaplama ve püskürtmeli soğutma,

2- Fizikokimyasal prosesler: basit veya karmaşık koaservasyon ve lipozom içine hapsedme,

3- Kimyasal prosesler: Arayüz polimerizasyonu ve moleküler inklüzyon [90].

Enkapsülasyon ile depolama veya proses sırasında meydana gelen fonksiyonellik kaybı, aktif bileşen ve kabuk arasındaki uyumsuzluk, kötü aroma, koku oluşumu, yapı bozulması, enzim aktivitesi kaybı azaltılabilir veya engellenebilirken, nem kontrolü, oksidasyona karşı koruma, çoklu aktif ingrediyanların ardışık dağıtımı sağlanır ve biyoyararlılık artırılır [90].

1.4.1. Enkapsüle Edilen Bileşenler (Aktif Maddeler)

Enkapsülasyon teknolojisinde belirlenen amaç doğrultusunda pek çok aktif madde enkapsüle edilerek korunabilir. Enkapsülasyon uygulamalarında en çok kullanılan aktif bileşenler şöyledir [91]:

- Vitaminler ve mineraller
- Enzimler ve proteinler
- Organik asitler
- Probiyotikler ve prebiyotikler
- Esansiyel yağlar
- Tatlandırıcılar, koruyucular, renklendiriciler, aromalar
- Yağ asitleri (ω -3, konjuge linoleik asit)
- Karotenoidler (β -karoten, likopen)
- Antioksidanlar (tokoferol, flavonoidler, polifenoller)

Enkapsüle edilecek bileşene en uygun enkapsülasyon metodunun seçimi bileşen yapısına ve kullanım amacına uygun olarak ön denemeler yapılarak belirlenmelidir. Arzu edilen özellikler tüketici talepleri, besleyicilik değeri veya gıda işleme ve depolama stabilitesinde gelişme için yeni fikirlere dayanmalıdır. Diğer dikkat edilmesi gereken konu ise enkapsülasyon uygulamasının istenilen özelliği sağlayabilecek uygun yöntem olup olmadığının belirlenmesidir. Aktif materyalin uygun bir gıda matriksi yapısıyla taşınabilirliği sonucu fonksiyonel özelliklerinin korunmasında enkapsülasyon uygulaması iyi bir yöntemdir [91].

Arzu edilen özelliklerin kazanılmasında enkapsülasyon uygulaması seçildiğinde öncelikle yöntem tasarımı yapılmalıdır. Buna göre;

- Aktif materyalin fizikokimyasal özellikleri,
- Uygulanan gıda maddesinin üretimi ve işlenmesi sırasında hangi işlem koşullarının kullanılacağı,
- Enkapsüle edilecek materyal kullanımdan önce ne kadar saklanacağı,
- Tüketici kullanımı öncesinde enkapsüle materyal içeren gıda ürünlerinin depolama şartlarının ne olacağı,
- Hangi parçacık boyutu ve yoğunluğunda gıda ürünlerinin içerisinde bulunacağı,
- Toplam proses maliyetinin hesaplanması,
- Kaplama materyali seçimi,
- Kaplama yönteminin seçimi,
- Yasal düzenlemelere uygunluk,

dikkate alınarak kapsüle ürün elde edilmesi açısından tasarım tamamlanmış olmalıdır [91, 92].

1.4.2. Enkapsülasyonda Kullanılan Kaplama Materyalleri

Taşıyıcı sistemin kompozisyonu son ürünün fonksiyonel özelliklerini belirleyen ana faktördür. İdeal bir kaplama materyalinin sahip olması gereken özellikler şöyle sıralanabilir [93].

- Yüksek konsantrasyonda reolojik özellikleri iyi olmalı ve kapsülleme işlemi esnasında kolay işlenebilmelidir.
- İstenilen miktardaki fonksiyonel ajanı etkili bir şekilde enkapsüle edebilmeli ve onu hapsedebilmelidir.
- Çekirdek materyalinin aktif halde kalabilmesi için kimyasal bozulmalardan korumalıdır.
- Çekirdek materyalinin salımını kontrol edebilmelidir.
- Onu çevreleyen gıda veya içecek matriksi ile uyumlu olmalı, ürünün görünüşünde, reolojisinde, tadında ve raf ömründe olumsuz bir etkiye neden olmamalıdır.

- Üretim, depolama, taşıma ve işleme boyunca meydana gelebilecek çevresel etkilere karşı dirençli olabilmelidir.
- Gıdalara uygun istenilen çözgünde çözünebilmelidir ve maliyeti düşük olmalıdır.
- Enkapsüle materyalin biyoyararlılığına ters bir etki göstermemelidir [93].

Belirtilen bu özellikleri tek bir kaplama materyalinin sağlaması oldukça zordur. Bu nedenle farklı kaplama materyallerinin bir arada kullanılması önerilir. Bunun yanı sıra fiziksel ve mekaniksel özellikleri daha iyi olan modifiye kaplama materyalleri de (örnek; modifiye selüloz) mevcuttur [89]. Mikroenkapsülasyon işleminde genellikle nişasta, maltodekstrin, sakkaroz, maltoz gibi karbonhidratlar; jelatin, peynir altı suyu proteinleri, kazein ve kazeinatlar gibi proteinler ve gam arabik, karragenan gibi gamlar kaplama materyali olarak tercih edilmektedir. Bu kaplayıcı ajanlar Tablo 1.5'te gruplar halinde açıklanmıştır [94].

Tablo 1.5. Gıda bileşenlerinin enkapsülasyonunda kullanılan kaplama materyalleri [94]

Karbonhidratlar	Nişasta, maltodekstrinler, mısır şurubu, dekstran, sukroz, siklodekstrinler
Selülozlar	Karboksi metilselüloz, metilselüloz, etilselüloz, asetilselüloz, selüloz asetat-fitalat
Gamlar	Keçiboynuzu gamı, karragenan, aljinat
Proteinler	Gluten, kazein, jelatin, albümin, hemoglobin, peptidler
Yağlar/lipidler	Balmumu, parafilm, arı mumu, tristearik asit, digliserit, monogliserit, katı ve sıvı yağlar

1.4.2.1. Karbonhidratlar

Karbonhidratlar genellikle püskürtmeli kurutma yöntemi ile gerçekleştirilen mikroenkapsülasyon işleminde kaplama materyali veya taşıyıcı olarak kullanılmaktadır. Karbonhidratlar küresel ve pürüzsüz mikrokapsül oluşumuna sebep olmanın yanında kaplama materyali ile çekirdek materyalinin arasındaki yapışma kuvvetini artırır [95]. Mikroenkapsülasyon işleminde genellikle nişasta, malto-

dekstrin ve mısır şurubu tozu gibi karbonhidratlar tercih edilmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda bile düşük viskoziteye sahip olmaları ve çözünürlüklerinin iyi olması dolayısı ile bu materyaller iyi kaplama materyalleridir. Ayrıca ucuz olmaları ve gıdalarda yaygın bir şekilde kullanılmalarından ötürü de kaplama materyali olarak tercih edilirler. Fakat emülsifiye edici özelliklerinin olmaması veya düşük olması sebebi ile mikroenkapsülasyon işleminde tek başlarına kullanılmalarından ziyade proteinlerle birlikte kullanımları daha yaygındır [95].

Nişasta, düşük maliyeti, kullanım kolaylığı, biyobozunur ve biyouyumlu bir malzeme oluşu ve geniş uygulama alanı ile pek çok biyoaktif maddenin taşınması için kullanılan çok sayıda glikoz molekülünün glikozidik bağlarla bir araya gelmesiyle oluşan bir polisakkarittir. Amiloz ve amilopektinden oluşur. Amiloz α -(1-4) bağlarıyla bağlı D-glikopiranozdan oluşan lineer bir molekül olup pankreatik amilaz enzimine dirençli fakat kolondaki enzimler ile parçalanabilmektedir [97]. Amilopektin ise 1-4 glikozidik bağ ve 1-6 glikozidik bağlarla bağlanan dallı glikoz molekülüdür. Doğal nişasta biyoaktif bileşenlerin çok hızlı salımına yol açtığından dolayı kontrollü salımı için uygun bir taşıyıcı olmasa da modifiye nişasta bu amaç için kullanılabilir [83]. Nişasta eterifikasyon, esterifikasyon veya asidifikasyon gibi işlemlerle modifiye edilerek dirençli hale getirilebilmektedir [97]. Dirençli nişasta pankreatik enzimler ile ince bağırsakta parçalanamayan dolayısıyla sindirilemeyen nişastadır. Dirençli nişasta kolona ulaşarak burada fermente olur [98]. Probiyotiklerin kolona ulaşmasını hedefleyen taşıyıcı sistemlerde kullanıldığı belirtilmiştir [97]. Ayrıca uygun modifikasyon ile kolon kanserinin önlenmesinde, kolesterolü düşürmede ve kalp-damar hastalıklarını azaltmada etkili olabilmektedir [83]. Nişasta türevleri biyoaktif bileşenlerin kontrollü salımı amacıyla kullanılıyorsa, üst sindirim yolunda sindirilmeyen (asit ve enzim degradasyonuna dirençli) fakat kolonda fermente olacak şekilde tasarlanmalıdır [83].

Pullulan, kuvvetli film oluşturarak oksijen geçirgenliğini azaltmaktadır. Oksidasyona karşı duyarlı olan bileşiklerin mikroenkapsülasyonunda kaplama materyali olarak kullanılabilir. Pullulan birkaç çalışmada kaplama materyali olarak kullanılmıştır. Enkapsüle edilmiş safran karotenoidlerin bozunma kinetiğinin incelendiği bir çalışmada, pullulan kaplama materyallerinden biri olarak tercih edilmiştir [99].

Ayrıca, tek damla kurutma (single-droplet drying) metoduyla su/yağ/su tipi mikroenkapsüllerin hazırlanması ve hidrofilik materyallerin depolama sırasında enkapsülasyon verimindeki değişimin incelenmesi konulu bir çalışmada pullulan kaplama materyallerinden biri olarak tercih edilmiştir. Bu çalışmada, pullulanın sağladığı mikroenkapsülasyon veriminin ~%95 olduğu belirtilmiştir [100].

Sakkaroz, Maltoz, Glukoz, Laktoz, uçucu bileşiklerin kaplanmasında kullanılmaktadır. Oluşturdukları yüzey membranlarının geçirgenlikleri, düşük nem içeriklerinde çok azdır. Yani difüzyona karşı oldukça dirençlidirler. Laktozun kaplama materyali olarak tercih edildiği çalışmalar mevcuttur. Yapılan bir çalışmada, etil butirat ve etil kaprilat uçucu bileşiklerinin, peynir altı suyu proteini esaslı kaplama materyali ve laktoz karışımı kullanılarak püskürtmeli kurutma yöntemi ile mikroenkapsülasyonu incelenmiştir [101]. Bu çalışmada; uçucu bileşiklerin (etil butirat ve etil kaprilat) korunmasının, laktoz ve peynir altı suyu proteininin bir arada kullanıldığı mikroenkapsülasyon işleminde, peynir altı suyu proteininin tek başına kullanıldığı duruma göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Sumak aromasının püskürtmeli kurutma yöntemi ile mikroenkapsülasyonunda sakkaroz, glukoz ve nişasta kaplama materyali olarak tercih edilmiştir. Fakat, bu kaplama materyallerinin karamelizasyon özelliklerinden dolayı, elde edilen ürünün kurutucu yüzeyine yapıştığı, aynı zamanda püskürtme başlığında da tıkanmaya sebep olduğu belirtilmiştir [102]. Zeytinyağının dondurarak kurutma yöntemi ile mikroenkapsülasyonunda farklı homojenizasyon hızlarının etkisi incelenmiş, bu çalışmada; karbonhidratlar (maltoz, laktoz ve sakkaroz) ve jelatin kaplama materyali olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada, mikroenkapsülasyon veriminin en yüksek olduğu, bir başka deyişle, kaplanmamış zeytinyağı oranının en düşük olduğu mikroenkapsülasyon işlemi, ağırlıkça %20 laktoz ve %80 jelatinin kaplama materyali olarak kullanıldığı işlem olmuştur [103].

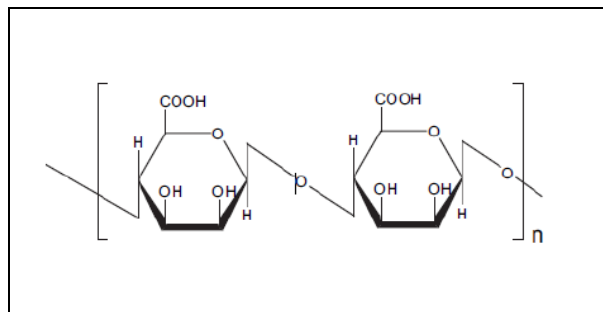
Maltodekstrin, mısır nişastasının asidik veya enzimatik yöntemle, kısmi hidrolizi sonucunda elde edilen ve dekstroz eşdeğer ağırlığı (dextrose equivalent: DE) 20 veya 20'den küçük olan bir maddedir [104]. Yüksek sıcaklıkta (100 °C) ve pH 4.0-5.0 koşullarında nişasta α -amilaz ile ünitelerine parçalanır ve işlemin sonucunda maltodekstrin ve mısır şurubu elde edilir. Düşük DE değerine sahip maltodekstrinler

bazı gıdalarda (dondurma gibi) yağ ikamesi olarak kullanılmaktadır. Maltodekstrinler yüzey aktif bileşikler olup çözeltileri düşük viskoziteye sahiptir. Fakat emülsifiye edici ajan olarak kullanılması önerilmemektedir. Maltodekstrinler katı ve sıvı yağların, vitaminlerin, minerallerin ve renk maddelerinin mikroenkapsülasyonu işleminde Maillard reaksiyonunun hızını düşürmektedir. Mikroenkapsülasyon işleminde maltodekstrinler emülsifiye edici özelliklerinin az olması sebebiyle genellikle yardımcı kaplama materyali olarak kullanılmaktadır [105, 106]. Maltodekstrinler mikroenkapsüle edilmiş yağlarda iyi bir oksidatif stabilite sağlamaktadırlar.

1.4.2.2. Gamlar

Gam ve kıvam artırıcılar her ne kadar tatsız olsalar da gıdaların tatlarına ve lezzetine doğrudan etki etmektedir. Genellikle hidrokolloidler viskozitelerinden ve difüzyonu engellemelerinden ötürü tatlılığın azalmasına sebep olurlar.

Aljinat, enkapsülasyon uygulamalarında en çok kullanılan kaplama materyallerinden biri olup *Laminaria hyperboreana*, *Ascophyllum nodosum* ve *Macrocystis pyrifera* gibi kahverengi yosunlardan elde edilir. Ticari aljinatlar çoğunlukla Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} ve Na^+ katyonlarının tuzları şeklinde bulunmaktadır [107]. Sodyum aljinat, α -L-guluronik asit ve β -D-mannuronik asit içeren lineer doğal bir polisakkarit olan ve suda çözünebilir aljinik asit tuzudur [108]. Sodyum aljinatın sulu ortamda Ca, Zn, Sr^{2+} ve Ba^{2+} gibi iki iyonlu katyonların varlığında jel ve jel kürecikleri oluşturduğu bilinmektedir [83, 107, 109]. Şekil 1.6'da aljinat molekülünün kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 1.6. Aljinatın yapısı [97]

Aljinatın fiziksel özellikleri kompozisyonuna, moleküler ağırlığına ve zincir uzunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Aljinat gıda sanayinde jel oluşturma kapasitesinin yanında kıvam verici, emülgatör ve stabilizatör olarak da kullanılmaktadır. Ayrıca FDA tarafından GRAS (generally regarded as safe) grubunda gösterilmiştir. Guluronik asit ve mannuronik asit oranı (G/M) türden türe değişkenlik göstermekte olup farklı mekanik stabilite sağlamaktadır [97]. G blokları buruşuk şekilde M-blokları ise geniş şerit gibi bir şekle sahiptir. İki G blok bölgesi yan yana sıralandığında kalsiyum iyonlarının bağlanabileceği boyutlarda ve yapıda kristal şekilde bir delik meydana gelmektedir [107].

Kalsiyum aljinat tanecikleri biyoaktif ilaçların, proteinlerin, enzimlerin v.s. kontrollü salımlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Aljinattaki gluronik asidin sodyum iyonları ile kalsiyum gibi çift iyonlu bir katyonun yer değiştirmesi sonucu çapraz bağlanma ile “yumurta kutusu” yapısındaki kalsiyum aljinat kürecikleri elde edilmektedir. Bu aljinat matriksi düşük pH’da stabil olup gastrik koşullara kısmen dayanıklıyken ince bağırsak gibi yüksek pH’lı bir ortamda şişip dağılmaktadır [110]. Probiyotik yoğurdun enkapsüle edilmiş demir ile zenginleştirme çalışmasında, seçilen demir (Fe^{+2}) sülfat, sodyum aljinat ile emülsifikasyon tekniği ile; *Lactobacillus acidophilus* bakterisi ise sodyum aljinat: nişasta (2:0.05) ekstrüzyon yöntemi ile enkapsüle edilmiştir. Demir ilaveleri, kapsüllenmiş-kapsüllenmemiş probiyotik bakteri içeren yoğurtlar olmak üzere 2 tip ürüne uygulanmıştır. Enkapsüle edilmemiş ve edilmiş probiyotik bakteri içeren yoğurtlara demir ilavesinin etkisi incelendiğinde, depolama boyunca probiyotik bakteri sayısına etkisi olmadığı görülmüştür. Kapsüle edilmemiş demir içeren örneklerin tiyobarbütirik asit (TBA) sayısının diğerine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir [111].

Gam arabik olarak da isimlendirilen akasya gamının, emülsifiye edici özelliğinin mükemmel olması sebebiyle kullanım alanı çok yaygındır. Gam arabik D-glukronik asit, L-ramnoz, D-galaktoz ve L-arabinoz ile yaklaşık olarak %2 protein içeren bir polimerdir. Gam arabığın emülsifiye edici özelliği yapısında bulunan proteinlerle ilişkilidir. Yüksek çözünürlüğü, düşük viskozitesi, emülsifiye edici olması ve uçucu bileşenlerin tutulumunu iyi bir şekilde sağlamasından dolayı mikroenkapsülasyon işleminde kaplama materyali olarak kullanımı yaygındır [112]. Kakule oleoresininin

enkapsülasyonunun gerçekleştirildiği bir çalışmada gam arabiğin maltodekstrine ve modifiye nişastaya göre daha iyi bir kaplama materyali olduğu belirtilmiştir [113]. Başka bir çalışmada ise kimyon oleoresininin püskürtmeli kurutma yöntemi ile enkapsülasyonu işleminde gam arabiğin iyi bir kaplama materyali özelliği sergilediği ortaya konmuştur [114]. Yağların enkapsülasyonunda gam arabiğin kullanımı çok yaygındır. Bunun sebebi, gam arabiğin geniş bir pH aralığında farklı birçok yağ ile stabil bir emülsiyon oluşturabilmesidir. Kullanılan gam arabiğin %50'si yerine glikozun kullanıldığı soya yağının mikroenkapsülasyonu işleminde, mikroenkapsülasyon verimi %74'den %92'ye çıkmıştır [115]. Fakat başka bir çalışmada ise 5 farklı monoterpenin (sital, linalol, limonen ve β -pinen) enkapsülasyonunda kaplama materyali olarak tercih edilen gam arabik etkin bir özellik gösterememiştir [116]. Gam arabik ile oluşan membranın yarı geçirgen oluşu oksidasyona karşı direnci ancak belirli bir ölçüde sınırlamaktadır. Dolayısıyla oksijen geçişi söz konusu olmakta ve çekirdek materyalin raf ömrü doğrudan olumsuz yönde etkilenmektedir. Ayrıca, fiyatının yüksek olması sebebiyle de gam arabiğin gıda endüstrisinde kullanımı sınırlanmaktadır. Bu sebeple, bu materyale alternatif olabilecek olan kaplama materyalleri için çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bunlardan bir tanesi olan Mesquite gam'ın çok iyi bir enkapsülasyon ajanı olduğu bildirilmiştir. Bir çalışmada %60 Gam arabik ve %40 Mesquite gam karışımının portakal kabuğu yağının %93.5'ini enkapsüle ettiği ortaya konmuştur. Daha yakın dönemde, gerçekleştirilen bir çalışmada %40 Mesquite gam ve %60 maltodekstrin karışımının kakule yağının %84,6'sını enkapsüle edebileceği gösterilmiştir. Kakule bazlı yağ mikrokapsüllerinin, Mesquite gam kullanılarak püskürtmeli kurutucuda başarıyla üretilmesi, bu materyalin önemli bir alternatif kaplama maddesi olduğunu ortaya koymuştur [117].

Kitosan, doğal lineer katyonik bir polisakkarit olup kabuklu deniz canlılarının kabuğundan, böceklerin kütiküllerinden ve belirli fungusların hücre duvarında bolca bulunan kitinin deasetilasyonu ile elde edilmektedir [118]. Kitosan, aljinatla birlikte biyoyuymululuk, düşük toksisite/toksik olmaması ve biyobozunurluk gibi özellikleri dolayısıyla gıda uygulamalarında ve ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan en iyi kaplama malzemelerinden biridir [119, 120]. N-asetil-D-glikozamin ve D-glikozamin oranları kitosanın özelliklerinin, biyobozunurluğunun ve biyolojik

rolünün belirlenmesinde kullanılır [107]. Kitosan katyonik yapısı sayesinde kolesterol düşürücü ve zayıflatıcı formülasyonlarda yağ bağlayıcı olarak da kullanılmaktadır [107]. Kitosan asidik pH'larda çözünebilirken yüksek pH'larda stabildir. pH'a duyarlı olarak şişme/büyüme mekanizması kitosanın düşük pH koşullarında amin gruplarının protonasyonunu içermektedir. Bu protonasyon zincir itme, proton difüzyonu ve karşıt yükün su ile birlikte jelin içine nüfuz etmesi ve ikincil yapının bozulmasına neden olmaktadır [107].

κ-karagenanlar, α -(1,3) ve β -(1,4) glikozidik bağlarıyla bağlı tekrarlı D-galaktoz ve 3,6-anhidrogalaktoz (3,6 AG) birimlerinden oluşan hem sülfatlanmış hemde sülfatlanmamış α -(1,3) ve β -(1,4) polisakkaritlerdir. Jelleşme özelliğinden dolayı sıcaklığa, iyonik güce ve biyopolimer konsantrasyonuna bağlı olarak koil formdan heliks forma geçebilir. Ayrıca kazein miselleri ile kompleks oluşturması gibi bazı süt proteinleri ile interaksiyon yapma özelliği taşımaktadır [121]. Probiyotik hücrelerin enkapsüle edilmesi için 40-50 °C'de hücreler polimer çözeltisine eklenir ve karışım oda sıcaklığına soğutularak jelasyon sağlanır [98].

Pektin, bitki orijinli lineer polimerler olup α -(1-4)-bağlı D-galakturonik asit ve 1,2-bağlı L-ramnoz birimlerinden oluşmaktadır. Karboksil gruplarının yüzdesi pektinin esterifikasyon derecesini belirtir. Düşük metoksilli pektinin esterifikasyon derecesi %50'den az olup kalsiyum ile jel oluşturabilmektedir. Mide ve ince bağırsakta bozulmadığından hedef taşıma sistemlerinde kullanımı uygundur. Suda çözünürlüğü yüksek olduğu için modifiye olmadan uygulanması kısıtlıdır. Bu nedenle çoğunlukla katyonlarla veya kitosan gibi polimerlerle kombine edilerek daha yavaş degrade olması sağlanır [97].

1.4.2.3. Proteinler

Proteinler sahip oldukları fonksiyonel özelliklerinden dolayı mikroenkapsülasyon işlemi için iyi kaplama materyalleridir. Proteinler özellikle lezzet bileşenlerinin bağlanmasında oldukça iyidirler. Genellikle mikroenkapsülasyon işleminde kaplama materyali olarak jelatin, peynir altı suyu proteinleri, kazein ve kazeinatlar protein olarak tercih edilmektedir.

Jelatin, iyi emülsiyon oluşturma özelliği ve film oluşturma etkisi göstermesi, suda çözünebilirliğinin yüksek ve yenilebilir olması sebebiyle püskürtmeli kurutma yöntemi ile mikroenkapsülasyon için iyi bir kaplama materyalidir. Jelatin mikropartiküllerinin yukarıda belirtilen özellikleri ve morfolojileri şeker alkolü olan mannitolun eklenmesiyle daha da geliştirilebilir [95]. Limonenin dondurarak kurutma yöntemi ile mikroenkapsülasyonunda [103], püskürtmeli kurutma yöntemi ile fosfolipid mikroenkapsülasyonunda [122], likopenin mikroenkapsülasyonunda [123] ve balık yağının mikroenkapsülasyonunda [124] jelatin kaplama materyali olarak tercih edilmiştir.

Peynir altı suyu proteinleri, süt serumu içerisinde, pek çok fraksiyondan oluşan ve süt proteinlerinin yaklaşık %20'lik bölümünü oluşturan serum proteinleridir. Yağsız süttten kazein herhangi bir yolla uzaklaştırıldığında, geriye kalan kısma süt serumu denir ve içerisinde %0.7 oranında protein bulunur. Peynir üretimi esnasında peynir suyunda kaldıkları için peynir altı suyu proteinleri adı verilir [125]. Peynir altı suyu proteinleri mükemmel bir emülsifiye edici ajandır [126]. Peynir altı suyu proteinlerinin enkapsülasyon işleminde kaplama materyali olarak kullanılması 1990'lı yıllara dayanmaktadır. Peynir altı suyu proteinleri bir çalışmada süt yağının enkapsülasyonunda kaplama materyali olarak tercih edilmiş olup yaklaşık olarak %90'lık enkapsülasyon verimi sağlamıştır. Aynı araştırmacılara göre, kaplama materyali olarak kullanılan peynir altı suyu proteinlerinin %50'si yerine laktoz kullanımı sonucunda mikroenkapsülasyon veriminin artacağı bildirilmiştir. Portakal yağının mikroenkapsülasyonunda kaplama materyali olarak tercih edilen peynir altı suyu proteinlerinin oksidasyona karşı mükemmel bir bariyer oluşturduğu tespit edilmiştir. Peynir altı suyu proteinlerinin enkapsüle etme özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada, soya yağının enkapsülasyonunda sodyum kazeinata göre daha düşük bir oranda enkapsülasyon sağladığı ortaya koyulmuştur. Peynir altı suyu proteinlerinin kaplama materyali olarak en büyük dezavantajı ısıl bozunmaya karşı çok duyarlı olmalarıdır [127].

Bazı *Lactobacillus plantarum* türlerinin (*L. plantarum* 299v, *L. plantarum* 800 ve *L. plantarum* CIP A159) mikroenkapsülasyonu ile ilgili yapılan bir çalışmada, kaplama etkinliğini geliştirmek amacıyla kaplama materyali olarak aljinat ile birlikte peynir

altı suyu proteinleri kullanılmıştır. Yapay mide ve bağırsak sıvısı ortamında yapılan inaktivasyon denemelerinde, dondurularak kurutulmuş küreciklerdeki çapraz bağların açılarak bakterilerin aljinat matriksinden salımı incelenmiştir. Kaplanmış *Lactobacillus plantarum* 299v (10,04 log kob/g), *L. plantarum* 800 (10.03 log kob/g) ve *L. plantarum* CIP A159 (10.12 log kob/g) yapay mide sıvısı içerisinde 37 °C’de 60 dakika inkübasyona bırakılmış ve bakterilerin en iyi canlı kalma oranının peyniraltı suyu proteinleri ve aljinat kullanılan küreciklerde olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde mikrokapsülleri yapay bağırsak sıvısında 37 °C’de 180 dakika inkübasyona bırakılmış ve sadece bir bakteri küreciğinde (Lp299v) 2,74 log kob/g canlı bakteri kaldığı bulunmuştur. Bu çalışma sonucunda araştırmacılar peynir altı suyu proteinlerinin bakteri içeren aljinat küreciklerinin kaplanması için uygun, ucuz ve verimli bir kaplama materyali olduğunu göstermişlerdir [128].

Kazein ve kazeinatlar, doğada sadece sütte bulunan süt proteinlerinin en önemli fraksiyonu olup yaklaşık %80’ini oluşturur. Sodyum kazeinatın enkapsülasyon işleminde kaplama materyali olarak kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur. Kazein ve kazeinatlar, ısıya karşı peynir altı suyu proteinlerine göre daha duyarlıdır. Fakat yüksek yüzey aktif özelliğe sahip olmalarından ötürü püskürtmeli kurutma yöntemi de dahil olmak üzere birçok uygulamada emülsifiye edici ajan olarak kullanıldığı belirtilmektedir [128]. Soya yağının mikroenkapsülasyonunda sodyum kazeinatın, peynir altı suyu proteinlerinden daha iyi bir kaplama materyali olduğu, sağlamış olduğu yüksek mikroenkapsülasyon verimi ile gösterilmiştir [129].

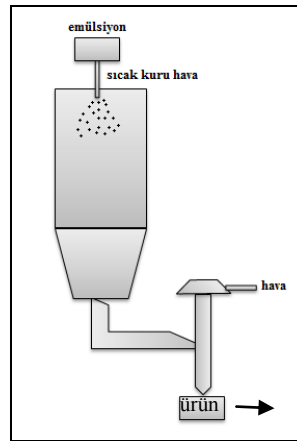
1.4.3 Enkapsülasyon Metotları

1.4.3.1. Püskürtmeli Kurutma

Püskürtmeli kurutma enkapsülasyon teknolojisinde kullanılan en eski ve en yaygın metottur. Bu yöntemin ekonomik, kullanışlı ve sürekli olması, işlem sonucunda iyi kalitede partiküller elde edilmesi nedeniyle gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Yöntemde nişasta, maltodekstrin ve gamlar taşıyıcı malzeme olarak kullanılır [130]. Aljinat, guar gum ve kitosan gibi polisakkaritler sodyum kazeinat, peynir altı suyu protein, soya protein gibi proteinler de püskürtmeli kurutma yönteminde kaplama materyali olarak kullanılabilir ancak suda çözünürlüklerinin

düşük olması ve pahalı olmaları bu yöntem için dezavantajdır [131]. Kaplanacak materyal taşıyıcı sistem ile homojenize edildikten sonra püskürtmeli kurutucuya verilir ve atomize döner başlığı sıcak hava ile temas eden su buharlaşırken, kapsüller kurutulur. Şekil 1.7’de püskürtmeli kurutucu sistemi gösterilmiştir. Elde edilen kapsüllerin boyutu 10 -100 mikrometre aralığındadır. Bu yöntemin dezavantajları ise kullanılan suda çözünebilir kaplama malzemesi çeşitliliğinin kısıtlı olması, ayrıca ısıya duyarlı biyoaktif maddelerin yüksek sıcaklıkta kolaylıkla bozulmasına sebep olmasıdır [130].

Püskürtmeli kurutma kaplanacak aktif maddeyi içeren çözelti veya dispersiyonun atomizasyon prosesi ile sıcak-soğuk hava akışı ile temas eden damlacıkların kurutulması temeline dayanır. Elde edilen parçacıklar genellikle küresel olup topolojisi kullanılan polimere bağlıdır. Molekülün tutulması ve salım profilleri polimerin uzunluğu ve tipi modifiye edilerek optimize edilebilir [132].



Şekil 1.7. Püskürtmeli kurutma sistemi [91].

Her ne kadar püskürtmeli kurutma yönteminin ısıya duyarlı biyoaktif maddeler için (yağlar v.s.) uygun olmadığını belirten çalışmalar olsa da kurutucudaki temas süresinin kısa olması bu etkiyi minimuma indirmektedir [133]. Atomize edilen damlacıkların boyutu sıvının yüzey gerilimine ve viskozitesine, enjektördeki basınç düşmesine ve püskürtmenin hızına bağlıdır. Taşıyıcı olarak kullanılan malzeme, aktif materyali koruyabilmeli, suda çözünürlüğü yüksek olmalı, moleküler ağırlık, camsı geçiş, kristalinite, difüzyon gücü, iyi film oluşturma kapasitesi, iyi emülsiyon oluşturma özelliği, düşük maliyetli olmalıdır [91].

1.4.3.2. Koaservasyon

Koaservasyon metodu bir veya daha fazla hidrokolloidin başlangıç çözeltisinden faz ayrımı ve yeni oluşan koaservat fazın aktif ingrediyen etrafında aynı reaksiyon ortamında süspanse veya emülsifiye olmasıdır. Bu yöntemde basitçe sadece bir kolloid (jelatin gibi) madde kullanılabileceği gibi daha kompleks proseslerde jelatin ve gam arabik kombinasyonu da kullanılabilir [130]. Gam arabik yerine karboksimetil selüloz, pektin, karagenan, aljinat veya polifosfat gibi negatif yüklü moleküller, jelatin yerine ise süt proteinleri kullanılabilir [91]. Koaservasyon pahalı bir enkapsülasyon yöntemi olsa da polifenoller gibi dayanıksız fakat yüksek değerli biyoaktif maddelerin enkapsülasyonunda kullanılabilir [130]. Koaservasyon genellikle aroma yağlarının enkapsülasyonunda kullanılırken, balık yağı, vitaminler, koruyucular ve enzimler için de kullanışlı bir metottur. Bu yöntemin diğer enkapsülasyon metotlarına göre avantajlı yönlerinin olmasının yanında ticarileştirilmesinin pahalı olması, karmaşık bir proses olması ve ikincil kabuk materyali olarak pek çok ülkenin yasal düzenlemesinde kullanımı kısıtlı olan glutraldehit kullanımı gerektirmesi gibi bazı problemler vardır [131].

Basit koaservasyonda sadece tek tip polimer kullanılırken kompleks koaservasyonda iki veya zıt yüklü birden fazla polimer kullanılır. Koaservasyon; polimerlerin çözünürlüğünü etkileyen ısı, tuz ilavesi veya zıt yüklü polimerler kullanımı gibi çevresel faktörler aracılığıyla başlatılmaktadır [132]. Kompleks koaservasyon çeşitli oranda jelatin ve gam arabik içeren yağ/su emülsiyonu ve her bir polimerin %2-4'ü karışır durumdaki kapta 35 °C'de pH'ın 7'den 4'e ayarlanması ile su fazında çözünür duruma gelmesi ile elde edilir. Böylece birbiriyle karışmayan üç fazlı (yağlı faz, polimerce zengin faz ve polimerce fakir faz) bir sistem elde edilir. Kompleks koaservasyon pH ayarlanmasına alternatif olarak yağın jelatin çözeltisinde emülsifiye edilmesi ve karışıma gam arabik eklenmesinin ardından suyla seyreltme şeklinde dilüsyon yöntemiyle de yapılabilmektedir. Sıcaklığın düşürülmesiyle jelatin katılaşıp kabuk oluşturur. Polimer konsantrasyonu, pH, sistemin türbülansı, emülsiyon büyüklüğü, iyonik güç ve sıcaklık koaservasyon hazırlık prosesini etkileyen faktörlerdir [91]. Bu yöntemin enkapsülasyon etkinliği %60 ve kaplanan kapsüllerin boyutu 30–100 nm aralığındadır [134].

1.4.3.3. Emülsiyon Oluşturma

Emülsiyon kinetik olarak stabil ve birbiriyle karışmayan iki fazın (yağ ve su), sıvılardan birinin diğeri içinde çok küçük damlacıklar halinde dağıtılması ile elde edilir.

Yüksek hızlı karıştırıcı ve homojenizatör emülsiyon oluşturmada kullanılan cihazlardır. Suda çözünür ingrediyenler su/yağ emülsiyonları veya su/yağ/su gibi çift emülsiyonlar ile enkapsüle edilebilir. Yağ/su emülsiyonları sulu fazın hacmini ve böylece sudaki tat moleküllerinin konsantrasyonunu değiştirerek tadı etkilemektedir. Likopen, beta karoten, steroller ve yağda çözünen vitaminler yağ/su emülsiyonları oluşturularak veya püskürtmeli kurutma, dondurarak kurutma yöntemleri ile kurutularak toz formda gıdalara katılabilmektedir. Ayrıca emülsiyon oluşturma ekstrüzyon ve koaservasyon gibi diğerk enkapsülasyon yöntemlerinin bir parçası olarak da karşımıza çıkmaktadır [91].

Elde edilen damlacıkların çapı genellikle 0.1-100µm aralığındadır. Yağ damlacıklarının sulu fazda dağıtıldığı sistemler suda yağ (yağ/su) emülsiyon, su damlacıklarının yağ fazında dağıtıldığı sistemler ise yağda su (su/yağ) emülsiyonu olarak adlandırılmaktadır. Bunların yanı sıra çok katmanlı emülsiyonlarda elde etmek mümkündür. Ayrıca emülsiyonların stabilitesini arttırmak için bazı emülgatörler de kullanılabilir [130].

Başlangıç damlacık konsantrasyonu ve büyüklük dağılımı damlacıkları stabilize etmede kullanılan emülgatöre bağlıdır. Emülgatör seçimi, yük, kalınlık, reoloji ve çevresel tepkiler (pH, iyonik güç, sıcaklık, enzim aktivitesi v.s.) arayüz özelliklerini kontrol etmek açısından önemlidir. Klasik emülsiyonların damlacık çapı 100 nm-100 µm aralığındayken, nanoemülsiyonlar 10 nm-100 nm aralığında değişmektedir. Nanoemülsiyonlar klasik olanlara göre daha stabil ve görünüş olarak transparan-berrak ve aktif maddeyi salım hızları daha yüksekken yüzey alanları daha geniş olduğu için kimyasal reaksiyonlara girme hızı yüksektir. Bu nedenle nanoemülsiyonların biyoyararlılıklarının daha yüksek olduğu belirtilmiştir [93].

1.4.3.4. Dondurarak Kurutma

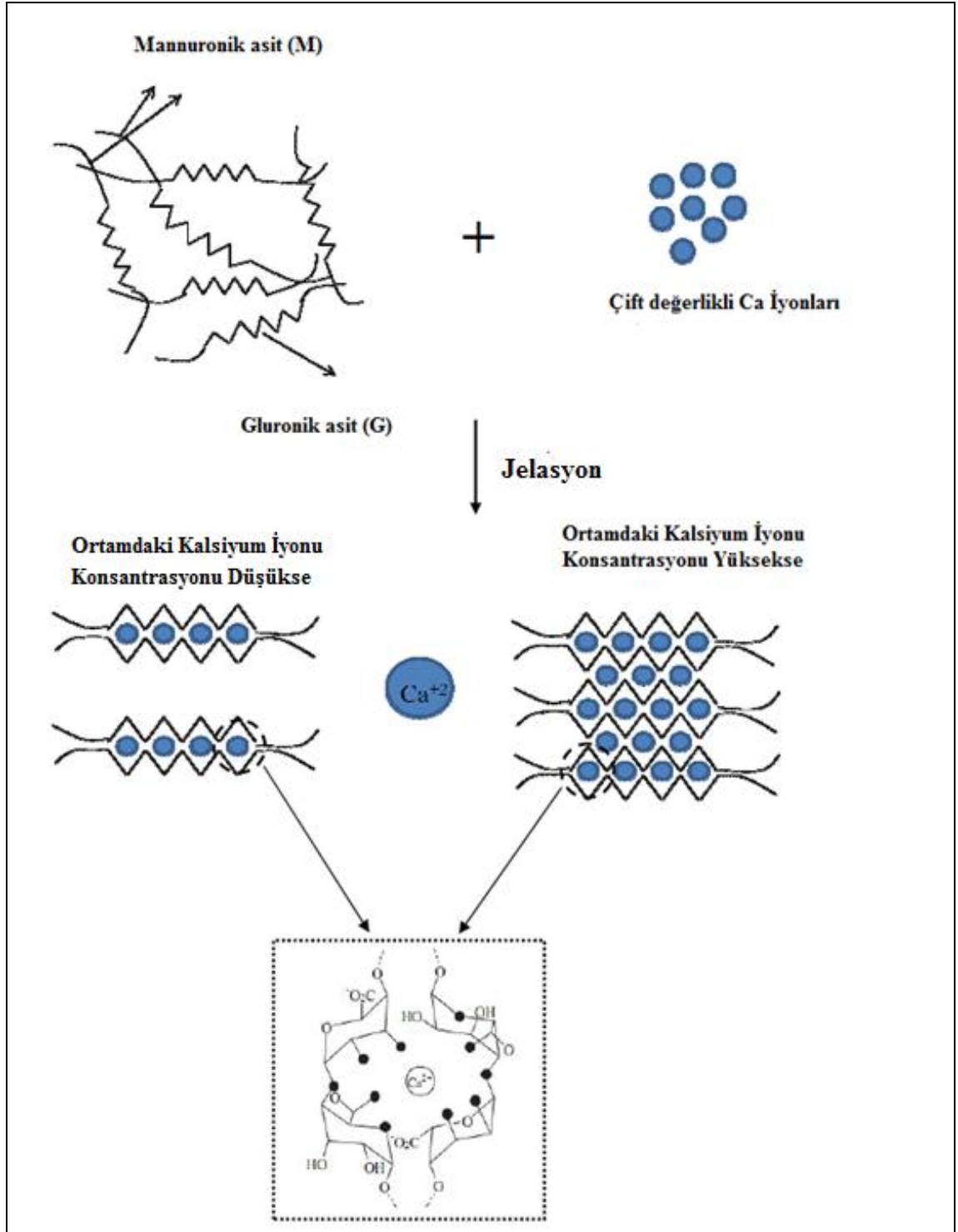
Dondurarak kurutma aynı zamanda liyofilizasyon olarak da bilinen ısıya duyarlı bileşenlerin ve aromaların dehidrasyonunda kullanılan bir metottur. Numune -90 ile -40 °C'ye dondurulur ve düşük basınç ile düşük sıcaklık altında süblimleşme yoluyla kurutulur. Bu yöntemde aktif bileşen ve taşıyıcı malzeme suda çözünür ve porlu yapıda dondurarak kurutulmuş ürünler elde edilir. Dondurarak kurutmanın dezavantajları yüksek enerji kullanımı ve uzun işlem süresi gerektirmesi, göreceli olarak pahalı bir yöntem olması ve açık delikli yapıda kapsüller elde edilmesi sebebiyle iyi bariyer özellikleri taşıyamamasıdır [91]. Ancak suda çözünen bileşenler, doğal aromalar ve ilaçların enkapsülasyonu için basit bir teknik olması ve ısıya duyarlı biyoaktif maddeler için avantajlı olması nedeniyle tercih edilmektedir [130].

1.4.3.5. Damlatma (iyonik jelasyon) Metodu

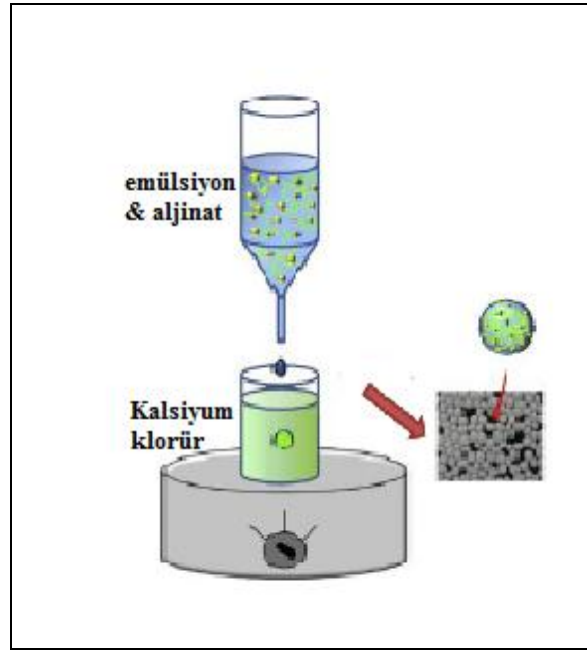
Damlatma veya iyonik jelasyon metodu pratik ve ekonomik bir yöntem olup çok miktarda ürün üretimine elverişli olmadığı için daha çok laboratuvar uygulamalarında tercih edilmektedir. Bu metotta, polimer çözeltisi ile aktif madde homojenize edilerek şırınga vasıtasıyla küresel jel partikülleri elde etmek amacıyla dağıtıcı faza (CaCl_2 gibi) damlatılır.

Damlatma metodu kalsiyum - aljinat taneciklerinin elde edilmesinde kullanılan metot olup, çapraz bağlanma CaCl_2 molekülündeki kalsiyum ile sodyum aljinat molekülündeki sodyumun yer değiştirmesi prensibine dayanır. Şekil 1.8'de kalsiyum ve sodyum iyonları arasındaki çapraz bağlanma mekanizması gösterilmiştir.

Biyopolimer çözeltisinin başka bir çözeltiliye damlatılmasıyla jelasyon oluşumu gözlenir. Aljinatın yanı sıra pektin çözeltisinin kalsiyum çözeltisine damlatılması (iyonik jelasyon), kitosan çözeltisinin tripolifosfat çözeltisine damlatılması (iyonik jelasyon), peynir altı suyu proteininin sıcak sıvıya damlatılması (sıcak jelasyon) veya jelatin çözeltisinin soğuk sıvıya damlatılması (soğuk jelasyon) ile de mikrotanecikler elde edilebilmektedir [136]. Damlatma sistemine ait görsel Şekil 1.9'da gösterilmektedir.



Şekil 1.8. Jelasyon; kalsiyum-aljinat çapraz bağlanma mekanizması [135].



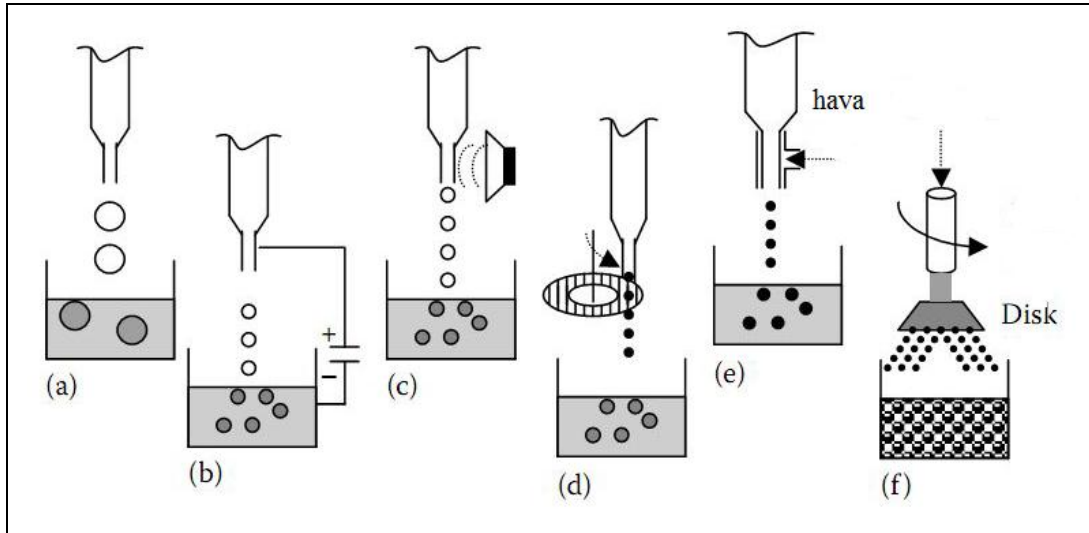
Şekil 1.9. Damlatma sistemi [137].

Bu yöntem laboratuvar ölçekte üretiminin çok kolay olması, hidrofilik veya hidrofobik, ısıya duyarlı, akışkan veya viskoz, katı veya sıvı hemen hemen tüm ingrediyenlerin bu metotla enkapsüle edilebilmesi gibi olumlu özelliklerinden dolayı sıklıkla tercih edilmektedir. Bu avantajlarının yanında küçük miktarda kapsül elde edilmesi ne kadar kolay olsa da prosesin büyütülmesi zor ve maliyetlidir. Ayrıca elde edilen kapsüller çok gözenekli olduğundan aljinat matriksinden suyun veya başka bir sıvının giriş çıkışı yoluyla difüzyonuna çok müsaittir [131]. Negatif yüklü aljinat ile zıt yüklü kitosan yarı geçirgen bir membran oluşturarak kapsül yüzeyinin daha düzgün ve suda çözünür molekülleri daha az geçiren bir yapı oluşturmaktadır [138].

Son yıllarda geliştirilen şırınga-ekstrüzyon sistemi (hava jeti, elektriksel, potansiyel ve titreşimli üniteler ile aljinat akışını sağlayan) gibi bazı teknolojiler sayesinde yüksek miktarda aljinat tanecikleri üretilerek enkapsüle gıda ingrediyenini içeren aljinat taneciklerin ticarileştirilmesinin mümkün olabileceği belirtilmiştir. Şekil 1.10 kullanılan çeşitli damlatma formlarını göstermektedir [138].

Basit damlatma teknikleri ile boyutları kontrol edilemeyen küresel olmayan ve polidispers küreler oluşmaktadır. Fakat şekil 1.10'daki damlatma teknikleri uygulanarak monodispers ve küresel mikroküreler elde edilebilmektedir.

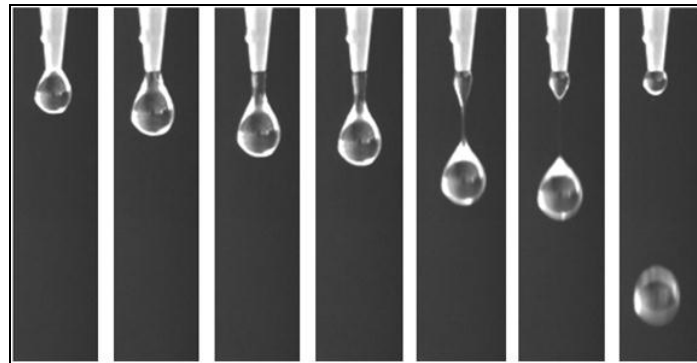
Bu dezavantajına rağmen basit damlatma teknolojisi kolay uygulanması açısından genellikle tercih edilmektedir.



Şekil 1.10. Jelleşmede damlatma formlarının şematik gösterimi [138]

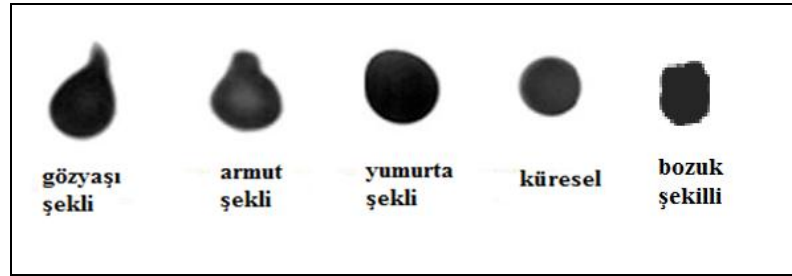
a) damlacık ekstrüzyon b) elektrostatik damlatma c) laminar jet dağıtma d) jet kesme e) jet nebulizer
f) disk nebulizer

Kalsiyum-aljinat taneciklerinin üretilmesinde tercih edilen aljinat konsantrasyonu %0.6-3 aralığındayken kalsiyum klorür çözeltisi 0.05-1.5 M olarak kullanılmaktadır. Üretilen kapsüllerin büyüklüğü ve şekli şırınga çapına, titreşim sistemine, aljinat çözeltisinin viskozitesine ve kalsiyum klorür çözeltisi ile şırınga arasındaki mesafeye bağlıdır. Damlatma ucu mesafesi ile partikül şekli arasındaki ilişki Şekil 1.11’de gösterilmektedir. Şekil 1.12 ise literatürde tanımlanan kapsül şekillerini şematize etmektedir [138].



Şekil 1.11. Damlatma ucunda oluşan kapsül şekilleri ve mesafe ilişkisi [138]

Sistemde bulunan kalsiyum miktarına bağı olarak zincirler (bağlar) arasındaki ilişki kalıcı veya geçici olabilir. Kalsiyum miktarı düşük olduğunda bağlanma geçici olurken yüksek viskozitede tiksotropik (akışkanlığı hıza bağlı artan) çözeltiler elde edilmektedir. Daha yüksek kalsiyum seviyelerinde ağların kalıcı olması nedeniyle çökeltme veya jelasyon oluşumu gözlenmektedir. Kimyasal yapı, moleküler büyüklük, jel oluşturma kinetiği ve katyon gözeneklilik, şişme davranışı, stabilite, biyobozunurluk, jel oluşturma kapasitesi ve biyoyumluluk gibi fonksiyonel özellikler üzerinde önemli derecede etkilidir [107].



Şekil 1.12. Literatürde kapsül şekillerini tanımlayan terimler [138]

Aljınatın iyonik jelasyonda tek başına kullanımı ile gözenekli, açık kafes yapısında tanecikler elde edildiğinden, düşük molekül ağırlıklı ve suda çözünebilir ilaçların enkapsülasyonunda düşük tutulma kapasitesine sebep olmaktadır [108]. Bu taneciklerin kitosan gibi başka polimerlerle kaplanması raf ömrü boyunca stabilitelerinin ve biyolojik sıvılarda yarı ömürlerinin iyileştirilmesinde rol oynamıştır. Katyonik kitosan molekülündeki amin grupları ile anyonik aljınat molekülündeki karboksil grupları arasındaki etkileşim ile iyonik jelasyon aracılığıyla aljınat-kitosan kompleksleri oluşturulabilmektedir [139]. Bu kompleks kapsül içindeki aktif maddeyi koruyup salımını kısıtlayarak aljınat veya kitosanın tek başına kullanıldığı sistemlere kıyasla çok daha etkili olmaktadır. Aljınat-kitosan kaplı tanecikler ilaçların, oligonükleotidlerin, proteinlerin ve hücrelerin enkapsülasyonunda kullanılmıştır [139].

1.4.3.6. Kokristalizasyon

Kokristalizasyon, sakkaroz matrisi ile çekirdek materyalin birleşmesi sonucu ortaya çıkan yeni bir kaplama yöntemidir. Sakkaroz şurubu süper doygun hale gelecek

şekilde konsantre edilir ve sıcaklık kristalizasyonu önleyecek şekilde ayarlanır. Önceden belirlenen miktar kadar çekirdek materyal kuvvetli bir şekilde karıştırılan konsantre şurup içerisine ilave edilir. Karıştırma işleminin yardımıyla sakkaroz ve çekirdek materyal iç içe geçerek kapsülleme işlemi meydana gelir. Beristain *et al.* portakal kabuğu yağını kokristalizasyon yöntemi ile enkapsüle etmişlerdir. Bu çalışmada, kokristalizasyon yöntemi ile elde edilen ürünlerdeki uçucu yağların tutulumunun püskürtmeli kurutma ve ekstrüzyon yöntemi ile elde edilenlerden daha fazla olduğuna dikkat çekilmiştir [140].

1.4.3.7. Lipozom Tutuklama

Lipozom veya vezikül olarak isimlendirilen biyomoleküler lipid tabakaları fosfolipidlerin sulu ortamlarda dağılmaları sonucu oluşmaktadır. Lipozomlar doğal bir membran gibi iyonlara karşı seçici geçirgen özelliktedirler [141]. Çok kesecikli, tek kesecikli ve makro kesecikli olmak üzere yapısal olarak üç tip lipozom bulunmaktadır. Lipozom tutuklama yöntemi ile mikroenkapsülasyon işlemi gıda endüstrisinden ziyade daha yaygın olarak eczacılık ve kozmetik endüstrisinde kullanılmaktadır. Fakat teknolojinin gelişmesiyle birlikte gıda endüstrisinde kullanımı uygun hale gelmiştir. Lipozomlar, peynirin olgunlaştırma hızını artırmak amacı ile kullanılan enzim sistemlerinin enkapsülasyonunda başarıyla kullanılmıştır. Bir çalışmada C vitamini raf ömrünü artırmak amacı ile enkapsülasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Saf askorbik asidin yarı ömrü 4 °C depolamada 18 gün iken bu süre lipozom kapsülasyonu ile 100 güne çıkarılmıştır [142]. Lipozomlar süt ürünlerinin besin değerini artırmak amacıyla da kullanılmaktadır. Krema ve peynire enkapsüle D vitamini ilavesinde, lipozom işleminin vitamini bozulmadan koruduğu bildirilmiştir [143]. Demir sülfat lipozomları süte ilave edildiklerinde depolama süresince acılaşıma, metalik tat oluşumunu geciktirdiği bildirilmiştir [144].

Bir çalışmada, β -laktoglobulinin pozitif yüklü olduğu izoelektrik pH'nın altında ortama negatif yüklü pektin ilave ederek çözünür ve stabil negatif yüklü nanokompleksler elde edilmiş ve DHA'nın (dokosaheksaenoik asit) kapsüllenmesinde bu komplekslerden faydalanılmıştır. DHA molekülünü kapsüle eden β -laktoglobulin-pektin elektrostatik nanokomplekslerinin oldukça iyi kolloidal

stabilite gösterdiği ve partikül boyutlarının yaklaşık 100 nm olduğu saptanmıştır [145].

Yapılan bir çalışmada, mikroemülsiyon bileşiminin, polimer konsantrasyonunun ve kompleks koaservasyon koşullarının nanokapsüllerin özellikleri üzerine etkisini incelenmiştir. Su içinde yağ mikroemülsiyonunu kullanarak gam arabik ve jelatin kompleks koaservasyonu ile suda çözünürlüğü olmayan β -cypermethrin pestisiti içeren ve boyutları 100 nm'nin altında olan nanokapsüller elde edilmiştir. Bu çalışmada enkapsülasyon verimliliği yaklaşık olarak %60 olarak saptanmıştır [146].

Başka bir çalışmada, sodyum karboksimetil guar gam ve jelatin kompleks koaservasyonu ile pH 2.5-4.0 aralığında karanfil yağı ve sülfametaksazolu enkapsüle edilmiştir [147].

Saravanan ve Rao yaptıkları çalışmada, sudaki çözünürlükleri farklı olan ilaçların enkapsülasyonunda pektin-jelatin ve aljinat-jelatin koaservasyon sistemlerinin verimliliğini karşılaştırmışlardır. İki sistem enkapsülasyon verimi, boyut dağılımı, şekil, son ürünün aglomerasyonu ve *in vitro* ilaç salınımı bakımından karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada sudaki çözünürlükleri farklı olan 3 ilaç kullanılmıştır; metronidazol hidroklorid suda çözünen ve asidik pH'da çözünürlüğü iyi olan, diklofenak sodyum bazik ortamda çözünen asidik pH'da çözünür olmayan, indometazin ise suda çözünür olmayan bir ilaçtır. Pektin-jelatin ve aljinat-jelatin kompleks koaservasyonu pH'ya bağlı olarak 3.5-4 civarında gerçekleşmiştir. Gastrik ortamda pektin-jelatin ve aljinat-pektin mikrokapsüllerinden ilaç salınımının oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. İlaç salınımı bağırsak pH'ında başlamış ve 16 saat sürmüştür. Bu çalışma, koaservasyon ile elde edilen mikrokapsüllerin bağırsak hedefli ilaçların eldesinde kullanılabileceğini göstermiştir [148].

Kara havuçta antosiyanin ekstraktının püskürtmeli kurutma yöntemi ile mikroenkapsülasyonu üzerine yapılan bir çalışmada; taze havuç örnekleri rendeleme, antosiyanin ekstraksiyonu, ekstraktın vakum altında kurutulması, saf su içerisinde çözdürülme, %6 kurumaddeye ayarlanma, maltodekstrin eklenme, ve %20 kuru maddeye ayarlanma aşamalarından sonra püskürtmeli kurutma yöntemi ile mikrokapsüle toz ürün elde edilmiştir. Kapsüle toz ürünlerin stabilitesi ve renk (L, a,

b) değerleri artmıştır. Kapsüle toz ürün, yoğurda ve reçele katılarak renk oluşumu başarıyla gerçekleştirilmiştir [86].

Balık yağının enkapsülasyonunda yüzey aktif biyopolimerle beraber maltodekstrini 3:1 oranında kaplama materyali olarak kullanılmıştır. Çalışmada mikrofluidizasyonun yüzeyde en az miktarda kapsüle olmamış yağ içeren enkapsüle balık yağı eldesinde etkili bir emülsifikasyon tekniği olduğu saptanmıştır. Bunun nedeni mikrofluidizasyonun nano boyutta emülsiyonlar oluşturabilmesi olarak açıklanmıştır. Mikrofluidizasyonu ultrason tekniği izlemiş, emülsiyon oluşumunda en verimsiz teknik ise Silverson rotor-stator emülsifikasyonu olarak belirlenmiştir [149].

1.4.5. Likopenin Enkapsülasyonu ile İlgili Çalışmalar

Yapılan literatür incelemelerinde likopenin enkapsülasyonu ile ilgili oldukça sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Bunlarla ilgili özet bilgi aşağıda verilmiştir.

Bir çalışmada domates pulpu atıklarından süperkritik CO₂ ekstraksiyonu ile likopen ekstrakte edilmiş ve likopen ekstraktını %4.5 jelatin, %10 poliglutamik asit ve %4.8 likopen ekstraktı olacak şekilde emülsiyon sistemiyle mikroenkapsüle edilmiştir. Elde edilen kapsüller dondurularak kurutulmuştur. DSC ile kaplama materyalinin ısıl stabilitesi belirlenmiştir. 38.7µm ortalama partikül boyutunda kapsüllerin 120 °C'ye kadar stabil olduğu belirlenmiştir. %76 likopen içeren mikrokapsül dondurarak kurutma sırasında %23 ağırlık kaybına uğramıştır. Toz haldeki mikrokapsüllerin depolanması sırasında sıcaklık ve sürenin artışıyla likopen kaybında da artış yaşanmıştır. pH 5.5 ve 7'de likopen salımı çok hızlı iken pH 2 ve 3.5'de likopen salımı olmamıştır. Çalışmada kaplama materyalinin termal stabilitesinin iyi olduğunu ve domates pulpu atığının iyi bir likopen kaynağı olduğunu ortaya koymuşlardır [74].

Likopenin enkapsülasyonuna yönelik bir diğer çalışmada maksimum enkapsülasyon verimi için optimum çalışma koşulları belirlenmiştir. Kurutma prosesi için pilot ölçekli bir sprey kurutucu kullanmışlardır. Tasarımda yapılan özgün değişiklik; püskürtmeli kurutucunun hava girişine adsorpsiyon hava kurutucusunun bağlanmasıdır. Farklı dekstroz eşdeğerindeki maltodekstrin, besleme sıcaklığı, giriş

hava sıcaklığı, hava akış hızı ve basınçlı hava akış hızı ile duvar malzemesi oranı kapsülleme verimi açısından incelenen parametrelerdir. Elde edilen mikrokapsüller; nem içeriği, kütle yoğunluğu, rehidrasyon yeteneği ve depolama stabilitesi testlerine tabi tutulmuştur. Besleme sıcaklığı 52 °C, giriş hava sıcaklığı 147 °C ve çekirdek duvar kalınlığı oranının 1:3:3 olduğu koşullarda maksimum enkapsülasyon verimi %93 olarak bulunmuştur. Uygulanan yöntemin enkapsülasyon verimini artırdığını belirtmişlerdir [150].

Silva *et al.* tarafından, likopeni enkapsüle etmek, kapsülleri karakterize etmek ve serbest likopenle enkapsüle likopeni karşılaştırmak üzere bir çalışma yapılmıştır. Yağ ile dispersiyon haldeki likopen jelatin ve pektin kullanılarak kompleks koaservasyon yöntemiyle kapsüllemiştir. Örnekler %25-50 ve 100 oranlarında çekirdek içecek şekilde hazırlanmış ve pH 3, 3.5, 4 ve 4.5'te analiz edilmiştir. Nem, su aktivitesi, çözünürlük, higroskopisite ve kapsülleme etkinliği belirlenmiştir. Stabilite testleri ise 10 ve 25 °C'de çalışılarak belirlenmiştir. Mikrokapsül içindeki likopen miktarının, su aktivitesi, higroskopik özellikleri ve mikrokapsülasyon verimi üzerine etkisi bulunmamıştır. Stabilite testlerinde ise, likopen lineer olarak haftada %14 kayba uğramıştır. Başarılı bir enkapsülasyon ve yüksek enkapsülasyon verimi elde edilmesine rağmen çalışmada kullanılan duvar malzemesi depolama sırasında likopen degradasyonunu istenilen düzeyde önleyememiştir [151].

Mikroenkapsülasyonun likopenin stabilitesini korumak için iyi bir yöntem olduğu düşünülerek modifiye nişastanın kaplama materyali olarak kullanıldığı sprey kurutma yöntemi ile likopen enkapsüle edilmiştir. Elde edilen enkapsüller keke katılarak kapsüllerin işlevselliği değerlendirilmiştir. %30 katı solüsyonun %5-10 ve 15'i likopen olacak şekilde mikrokapsüller hazırlanmıştır. Mikrokapsüllerin enkapsülasyon verimi morfolojisi ve keklerdeki stabilitesi test edilmiştir. Enkapsülasyon verimi %21 ve 29 arasında bulunmuştur. Stabilite testleri ve renk değerleri göstermiştir ki, enkapsülasyon serbest formdaki likopene göre stabilitesini korumuştur [152].

Blanch *et al.* domatesten elde edilen likopenin stabilitesini korumak için α , β ve γ siklodekstrinler kullanmışlardır. Geleneksel ve süperkritik akışkan ekstraksiyonu olmak üzere 2 farklı enkapsülasyon işlemi kullanmışlardır. Optimizasyon prosesinde

siklodekstrin/likopen oranı yanısıra siklodekstrinlerin mol oranları göz önüne alınmıştır. Enkapsülasyon raman spektroskopisi kullanılarak belirlenmiştir. Kullanılan tüm likopen süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile %90-95 saflıkta elde edilmiştir. Siklodekstrin likopen oranı 1/0.0026 mol olan oran %93 ile en iyi verim elde edilen oran olarak seçilmiştir. İki yöntem karşılaştırıldığında geleneksel yöntemde daha iyi kapsülleme verimi elde edilmiştir. Ancak süperkritik akışkan ekstraksiyonu tek bir adımda likopen ekstraksiyonu, fraksiyonlama ve kapsülleme imkanı sağladığı için işlem süresi kısalmış ve örnek kullanımı en aza indirilmiştir [153].

Shu *et al.*, %52-75 ve 90 saflıkta ticari likopen standardı kullanarak likopeni jelatin sükroz karışımı ile püskürtmeli kurutucu kullanarak enkapsüle etmişlerdir. Çalışmada giriş sıcaklığı ve besleme sıcaklığının kapsülleme verimi üzerine etkisini incelemişlerdir. 3/7 jelatin-sükroz oranında, 55 °C besleme sıcaklığının, 190 °C giriş sıcaklığı ve 40 MPa homojenleştirme basıncının kapsülleme verimi bakımından en iyi sonucu verdiğini belirtmişlerdir [154].

2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

Tez kapsamında yapılan çalışmaların birinci kısmı, farklı polaritede ve gözenek yapısında, eş boyutlu yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) kolon dolgu materyallerinin sentezini, karakterizasyonunu, kromatografik performanslarının test edilmesini içermektedir. Sonraki aşama, en iyi performans gösteren kolon dolgu malzemesinin likopen izolasyon ve saflaştırılmasında kullanımını içermektedir. Tezin son kısmında ise saflaştırılan likopen enkapsüle edilmiş, enkapsüllerin özellikleri incelenmiş ve seçilen model bir gıdadaki uygulanabilirliği çalışılmıştır.

Çalışmanın bu bölümünde farklı reçetelere sahip polimerik adsorbanların sentez parametreleri, karakterizasyonunda kullanılan metodlar ve yöntemler, kromatografik performans testleri, domatesten likopen saflaştırılması aşamaları, saf likopenin enkapsülasyonu ve prosesi etkileyen parametreler son olarak da enkapsüllerin model gıdadaki uygulanabilirliği ve davranışı ayrıntılı olarak açıklanmaktadır.

2.1. Gereç

2.1.1. Likopen Kaynağı

Likopen saflaştırmak için kullanılan domates örnekleri mevsiminde (Temmuz 2013) Kayseri piyasasından temin edilmiştir ve Tablo 2.1’de gösterilmiştir. Alınan örnekler yıkanıp temizlendikten sonra -22°C’de derin dondurucuda analiz edilinceye kadar muhafaza edilmiştir. Kolon performans testlerinde ise likopen kaynağı olarak ticari domates salçası kullanılmıştır.

Tablo 2.1. Likopen kaynağı olarak kullanılan hammaddeler

Likopen Kaynağı	Marka
Domates	Yerel Piyasa
Domates salçası	Tat Domates Salçası (katkısız)

2.1.2. Kolon Dolgu Materyali

Kolon dolgu malzemelerinin sentez aşamasında kullanılan çeşitli kimyasallar Tablo 2.2’de verilmiştir. Çıkış lateksinin sentezinde monomer olarak stiren, başlatıcı olarak etil alkolden kristalize edilen 2-2’-azobisizobütironitril kullanılmıştır. Sterik stabilizör olarak ise polivinilpirolidon seçilmiş ve dağıtma ortamı bileşenleri olarak mutlak etil alkol ve 2-metoksietanol kullanılmıştır.

Tablo 2.2. Polimerik adsorban sentezinde kullanılan kimyasallar

Kullanılan Kimyasal	Marka
Mutlak Etil Alkol (C₂H₅OH)	Merck, A. G.,Almanya
2-Metoksietanol (Met-OH)	Aldrich Chemical Co., Amerika
2-2’-azobisizobütironitril	BDH Chemicals, İngiltere
Polivinilprolidon (PVP K-30)	Sigma Amerika
Stiren (S)	Merck, A. G., Almanya
Toluen (Tol)	J.T. Baker, Amerika
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma Almanya
Tetrahidrofurfuril Akriyat (THFA)	Merck, Almanya
Divinilbenzen (DVB)	Merck, A. G., Almanya
Polivinilalkol (PVA)	Aldrich Amerika
Benzoil Peroksit (BPO)	Aldrich Chemical Co., Amerika
Tetrahidrofuran (THF)	Merck, A. G., Almanya

Çapraz bağlayıcı monomer olarak kullanılan divinilbenzenin esas kullanım amacı polimer yapısında bulunan düz zincirleri birbirine bağlamaktır. Ayrıca divinilbenzen polimer yapıya mekanik dayanıklılık sağlamaktadır. Divinilbenzen hidrofobik bir monomerdur ve suda çözünmez. Bu nedenle su esaslı dağıtma fazlarında süspansiyon

polimerizasyonu için uygun bir monomerdur. Katkı monomeri olarak da yapıya fonksiyonellik kazandırmak amacıyla tetrahidrofurfuril akrilat kullanılmıştır.

Monodispers gözenekli partiküllerin üretiminde organik ajan yani dilüent olarak kullanılan toluen, elde edilen çapraz bağlı polimer içerisinde poröz yapı oluşturmak ve suda çözünürlüğü olan katkı monomerlerinin polimer yapıya daha fazla oranda katılmasını sağlamaktadır. Dilüent polimerizasyon reaksiyonuna girmez ve polimerleşme işleminden sonra yapılan yıkama-temizleme işlemleriyle yapıdan uzaklaştırılır [12]. Polimerizasyon işleminde polimerleşmenin başlaması için termal olarak radikal oluşturan çeşitli organik peroksitler ve azo bileşikleri kullanılmaktadır. BPO, termal bozunma sonucu serbest radikal oluşturan başlatıcı olarak çalışma kapsamında kullanılmıştır ve kullanılmadan önce kurutulmuştur. Polimerizasyonda anyonik emülsiyon yapıcı madde olarak sodyum dodesil sülfat ve stabilizör olarak da PVA kullanılmıştır. Sentezlenen adsorbanların kullanılmadan önce bir dizi temizleme ve ekstraksiyon işleminden geçmesi gerekmektedir. Temizleme ve ekstraksiyon işlemlerinde saf su, etanol ve tetrahidrofuran kullanılmıştır. Bütün deneylerde distile-deiyonize su kullanılmıştır ve kimyasalların tamamı HPLC saflığındadır [12].

2.1.3. Mobil fazlar, Çözgenler ve Enzimler

Tablo 2.3 kromatografik çalışmalarda kullanılan kimyasalları ve temin edildikleri firmaları göstermektedir.

Tablo 2.3. Kromatografik çalışmalar sırasında kullanılan kimyasallar

Kullanılan Kimyasal	Marka
Asetonitril (AcN)	Riedel de Haen, Almanya
Mutlak Etanol (Et-OH)	Merck, A. G., Almanya
Metanol (Me-OH)	Merck, A.G., Almanya
Sülfirik asit (H₂SO₄)	Merck, A.G., Almanya
Kloroform	Merck, A.G., Almanya
Pectinex® MASH	Novozyme A/S, Danimarka
Pectinex® ULTRA SPL	Novozyme A/S, Danimarka

Analitik sıvı kromatografisi performans testlerinde, preparatif sıvı kromatografisi çalışmalarında ve şeker analizinde mobil faz olarak asetonitril mutlak etanol ve metanol kullanılmıştır. Organik asit analizinde ise mobil faz olarak H₂SO₄ çözeltisi kullanılmıştır. Domatesten karotenoidlerin ekstraksiyonunda ise çözgen olarak kloroform kullanılmıştır. Enzimler ise domatesin parçalanması sırasında verimi artırmak amacıyla kullanılmıştır.

2.1.4. Standartlar

Yapılan kromatografik çalışmalarda bileşenlerin tanılanması için likopen ve β -karoten standardı kullanılmıştır. Şeker ve organik asit analizinde ise glukoz, fruktoz, sitrik, malik, askorbik oksalik ve asetik asit standart bileşikleri kullanılmıştır. Kontrollü salım testlerinde tampon çözeltilerin hazırlanmasında sitrik asit ve disodyum hidrojen fosfat kullanılmıştır. Model gıda antioksidan aktivite tayininde ise DPPH kullanılmıştır ve bütün standart kimyasallar Tablo 2.4'te listelenmiştir.

Tablo 2.4. Çalışmalarda kullanılan standart kimyasallar

Standartlar	Marka
Likopen	Sigma St. Louis, MO, Amerika
β-karoten	Fluka, Almanya
Glukoz	Sigma St. Louis, MO, Amerika
Fruktoz	Sigma St. Louis, MO, Amerika
Malik asit	Sigma St. Louis, MO, Amerika
Sitrik asit	Merck, A.G., Almanya
Askorbik asit	Merck, A.G., Almanya
Oksalik asit	Merck, A.G., Almanya
Asetik asit	Merck, A.G., Almanya
Disodyum hidrojen fosfat	Merck, A.G., Almanya
2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)	Sigma St. Louis, MO, Amerika

2.1.5. Enkapsülasyon

Çalışmanın enkapsülasyon aşamasında kullanılan kimyasallar Tablo 2.5'te liste halinde verilmiştir. Saflaştırılan likopenin enkapsülasyonu için sodyum aljinat ve kalsiyum klorür kullanılmıştır. Likopen ise zeytinyağı içinde çözülüp emülsiyeye edilmiştir. Sodyum aljinat, aljinik asidin tuzu olup direkt tüketime uygun doğal polisakkarittir. Kalsiyum tuzları ile aljinat çözeltisi likopen yüklü kapsüller elde etmek için kullanılmıştır.

Tablo 2.5. Saflaştırılan likopenin enkapsülasyonunda kullanılan materyaller

Materyal	Marka
Likopen	Saflaştırılan Likopen
Sodyum aljinat	Safc, Almanya
Kalsiyum klorür	CaCl ₂ , Fluka, Almanya
Zeytinyağı	Komili Riviera

2.1.6. Alet-Ekipman ve Cihazlar

Sunulan tez çalışmasının deneysel aşamasında kullanılan makine ve teçhizat Tablo 2.6'da verilmiş olup; cihazlar kullanım amaçları ve aşamaları aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmaktadır.

Shimadzu HPLC: Tez çalışmasında, sentezlenen polimerik kolon dolgu materyallerinin kromatografik performanslarının test edilmesinde, preparatif sıvı kromatografisiyle likopen saflaştırılmasında, domatesteki organik asit profilinin belirlenmesinde ve mikroenkapsüllerin kontrollü salım testlerindeki likopen analizlerinde kullanılmıştır.

Agilent HPLC: Domates serum suyunda yapılan şeker analizinde kullanılmıştır.

FTIR: Polimerik adsorbanların kimyasal yapısının karşılaştırmalı olarak incelenmesinde kullanılmıştır.

Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM): Monodispers polimerik kolon dolgu maddelerinin ve mikroenkapsüle likopenlerin yüzey özelliklerinin incelenmesinde ve boy dağılımlarının belirlenmesinde kullanılmıştır.

Tablo 2.6. Tez çalışmasında kullanılan alet ve ekipmanlar

Cihaz	Marka
Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi	Shimadzu Prominence, Japonya
Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi	Agilent 1100, Amerika
Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi	Perkin Elmer Spectrum 400 USA
Taramalı Elektron Mikroskobu	SEM, LEO 440, Amerika
Preparatif LC Kolon	Restek, Amerika
Spektrofotometre	Agilent, Amerika
Şırınga Pompa	Goldman, Syringe Pump Ar01, Türkiye
Sirkülasyonlu Su Banyosu	Haake, DC 10, Almanya
Ultrasonik Su Banyosu	Bandelin Sonorex, RK100H, Almanya
Manyetik Karıştırıcı	Stuart, CC 162, İngiltere
Santrifüj Cihazı	Hettich-320, Almanya
Dönel Evaporatör	Buchi, Almanya
Liyofilizatör	Labconco, Amerika
Dijital Kameralı Optik Mikroskop	Leica EC3, Almanya
Etüv	Memmert, Almanya
Çalkalamalı Su Banyosu	Memmert, WNB14, Almanya
Renk Ölçüm Cihazı	Konica-Minolta, CR400, Japonya
Hassas Terazı	AND, GR210, Japonya
Homojenizatör (ultra-turaks)	IKA, T25, Almanya
pH metre	WTW, Inolab, Almanya
Fırın	Kenwood, NW796, Çin

Preparatif LC kolon: Domatesten likopen saflaştırılmasında kullanılmıştır.

Spektrofotometre: Bütün örneklerin antiradikal aktivitelerinin belirlenmesinde UV-Visible spektrofotometre kullanılmıştır.

Şırınga Pompa: Şırınga pompa enkapsülasyon işlemi sırasında likopen-aljinat çözeltisinin damlatma sisteminden belirlenen sabit akış hızında geçirilmesinde kullanılmıştır.

Sirkülasyonlu su banyosu: Sirkülasyonlu su banyosu polimerizasyon ortamının sabit sıcaklıkta tutulması için kullanılmıştır. Kullanılan termal başlatıcı için uygun kullanım sıcaklığı 60-80 °C olduğu için polimerizasyon ortamının kontrollü bir şekilde ısıtılması gerekmektedir.

Ultrasonik su banyosu: Ultrasonik su banyosu, polimer sentezi sırasında dilüent ve monomer-başlatıcı karışımının homojenizasyonunda kullanılmıştır.

Manyetik karıştırıcı: Polimerizasyon işleminde monomer fazının sürekli faz içinde dağıtılması gerekmektedir. Manyetik karıştırıcı reaksiyon ortamının karıştırılması ve reaktör iç sıcaklığının tek düze artması için gereklidir. Ayrıca polimerizasyon ortamının uygun bir hızda karıştırılması damlacıklar halinde dağılan monomer fazının polimerleşme esnasında bloklanmasını da engellemektedir. Mikroenkapsülasyon işlemi sırasında da kalsiyum klorür damlatma çözeltisinin karıştırılmasında kullanılmıştır.

Santrifüj Cihazı: Soğutmalı santrifüj genel olarak polimer malzemelerin temizleme aşamasında kullanılmıştır. Ayrıca domatesin çeşitli fazlarının ve elde edilen ekstraktların bulanıklık öğelerinden arındırılmasında da kullanılmıştır.

Dönel evaporatör: Domatesin çeşitli fazlarından ekstrakt elde edilmesi sırasında çözücünün ortamdaki uzaklaştırılması esnasında kullanılmıştır.

Dondurarak kurutucu (Liyofilizatör): Enkapsüle likopen içeren emülsiyonların vakum altında dondurularak kurutulmasında kullanılmıştır.

Çalkalamalı su banyosu: Kontrollü salım testlerinde inkübasyon sıcaklığının sağlanmasında çalkalamalı su banyosu kullanılmıştır.

Dijital kameralı optik mikroskop: Mikroenkapsüle likopenin renkli mikroskop görüntülerinin alınmasında ve boy dağılımlarının hesaplanmasında kullanılmıştır.

Yüksek hızlı homojenizatör: Likopen-zeytinyağı karışımının mikroenkapsüle edilmesinde etkin bir karıştırma işlemi için ultra-turrax homojenizatör kullanılmıştır.

Renk ölçüm cihazı: Mikroenkapsüllerin model uygulama alanı olarak seçilen kek örneklerinin renk ölçümlerinde kullanılmıştır.

pH metre: Kontrollü salım testlerinde pH 2.0 ve pH 7.0 tampon çözeltilerin pH ayarlamasında kullanılmıştır.

Etiv: Liyofilize enkapsüllerde yapılan çekirdek sızıntısı analizinde ve çeşitli aşamalarda kuru madde analizinde kullanılmıştır.

Fırın: Enkapsüle likopen katkılı keklerin pişirilmesi için kullanılmıştır.

Hassas Terazî: Tüm tartım işlemlerinde hassas terazî kullanılmıştır. Domatesin fazlarına ayrılmasında ve verim hesaplarında, standart çözeltilerin hazırlanmasında, monomer karışımlarının hazırlanmasında, enkapsülasyon verimlerinin ve kontrollü salım testlerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

Sunulan tez çalışması 6 aşama olarak planlanmıştır. Şekil 2.1 tez çalışmasının basamaklarını akım şeması halinde şematize etmektedir.

1. Aşama: Polimer esaslı monodispers gözenekli adsorban malzemelerin sentezlenmesi ve sentez parametrelerinin kromatografik ayırma yeteneği üzerine etkilerinin incelenmesi tezin ilk aşamasını oluşturmaktadır. Polimerik adsorbanların sentez parametreleri, adsorbanın fiziksel ve kimyasal özelliklerini etkilemektedir. Bu aşamada farklı üretim şartlarında adsorban malzemeler üretilmiştir ve dolgu HPLC kolon sistemlerinde likopen ve β - karotenin analit olduğu durumlarda test edilmiştir.

2. Aşama: Çok basamaklı mikrosüspanسیون yöntemi ile sentezlenen monodispers polimerik adsorbanların fiziksel ve kimyasal özelliklerinin tanımlanması tezin ikinci aşamasında yapılmıştır. Yüzey görüntülerinin incelenmesi ve boy dağılımlarının hesaplanması amacıyla taramalı elektron mikroskopu mikrografları, partiküllerin kimyasal yapılarını belirlemek amacıyla da FTIR spektrumları incelenmiş ve adsorbanlar karakterize edilmiştir.

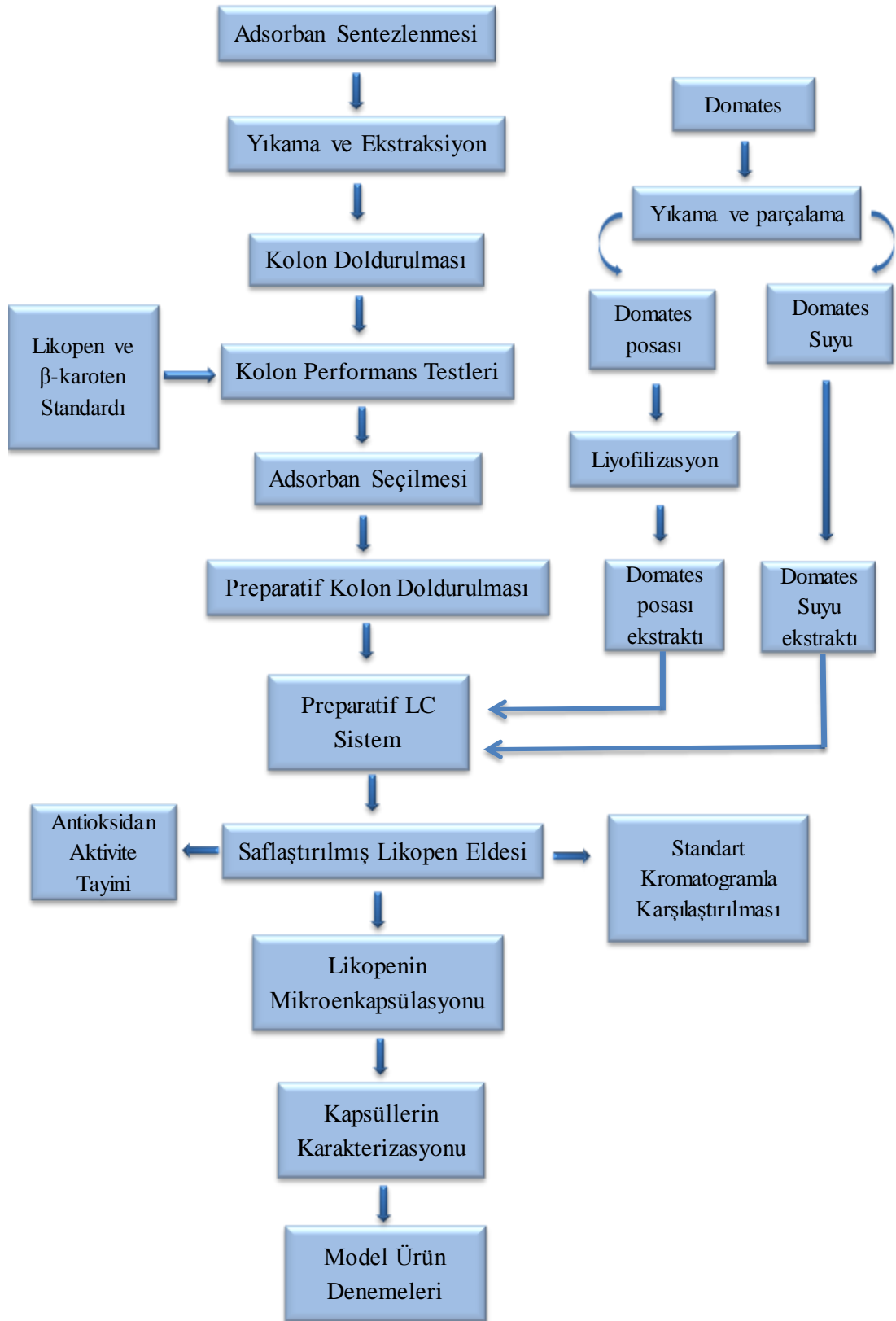
3. Aşama: Belirlenen adsorban malzemelerle preparatif LC kolon sistemlerinin hazırlanarak domatesten likopen saflaştırılması, tanımlanması ve saflık derecesinin belirlenmesi tezin devam eden aşamasıdır.

4. Aşama: Çalışmanın bu kısmında saflaştırılan likopenin çevresel etmenlerden korunması ve kontrollü salınımın sağlanması için farklı üretim parametrelerinde sodyum aljinat kaplı mikrokapsüller üretilmiştir. %0.5, 1, 1.5 ve 2 oranlarında sodyum aljinat konsantrasyonları denenmiş ve her bir konsantrasyonda 6 farklı akış hızında sodyum aljinat çözeltisinin ekstrüzyonu çalışılmıştır.

5. Aşama: Elde edilen mikrokapsüllerin karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Karakterizasyon işleminde optik mikroskop görüntülerinin ve SEM görüntülerinin incelenmesi ile enkapsüllerin şekilleri ve boy dağılımları üzerine etki eden parametreler belirlenmiştir. Enkapsülasyon verimi hesaplanmış ve *in vitro* koşullarda yapay mide ve bağırsak ortamında enkapsüllerin salım çalışmaları yapılmıştır.

6. Üretilen ve karakterize edilen kapsüllerin seçilen bir model üründe uygulanabilirliği ve stabilizasyonunun gösterilmesi tez çalışmasının altıncı ve son aşamasını oluşturmuştur. Enkapsüle likopen, kek miksine katılmış ve keklerde renk ile antiradikal aktivite tayini yapılmıştır. Kapsüllerin ısıl dirençleri ve enkapsüle likopenin radikal süpürücü gücü tartışılmıştır.

Aşağıda verilen Şekil 2.1'de, genel olarak tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmaların bölümleri ve bu bölümleri oluşturan proseslerin akım şemaları gösterilmektedir.



Şekil 2.1. Tez planı ve uygulama akım şeması

2.2. Basamaklı Polimerizasyon Yöntemi ile Monodispers ve Gözenekli THFA-DVB Bazlı Partiküllerin Üretimi

Partikül sentezinin ilk basamağında polistiren çıkış lateksi, dispersiyon polimerizasyonu yöntemiyle üretilmiştir. Daha sonra bu partiküller, eş boyutlu ve gözenekli yapı elde etmek amacıyla şişirme işlemine tabi tutulmuştur. Şişme işleminde, polistiren partiküller, düşük molekül ağırlığına sahip bir organik ajan, yüzey gerilimini azaltan bir polar ajan ve monomer, çapraz bağlayıcı ve başlatıcıyı içeren monomer fazı ile şişirilmiştir. Şişme basamağından sonra monomer fazının partikül içerisinde polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Kolon dolgu malzemesi sentez planı yapılırken, yapılan literatür incelemesinde THFA kopolimeriyle ilgili sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır. THFA ve DVB kullanılarak sentezlenen bir kolon dolgu malzemesine ise rastlanmamıştır. Bu incelemeler doğrultusunda Çalışma kapsamında katkı monomeri olarak tetrahidrofurfuril akrilat, çapraz bağlayıcı olarak da divinilbenzen seçilmiştir. Polimerizasyon sonrası partiküllerin ekstraksiyonu ile monodispers yapıda gözenekli poli(THFA-co-DVB) partiküller elde edilmiştir [12, 14. 22].

2.2.1.Çıkış Lateksinin Üretimi

2.2.1.1. Polimerizasyon Yöntemi

Monodispers gözenekli partiküllerin üretiminin ilk basamağında monodispers formda çıkış lateksi sentezlenmiştir. Sentez koşulları Tablo 2.7’de verilmiş ve stiren monomerinin dispersiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılarak polimerleştirilmesi sonucunda 2,32 µm boyutunda monodispers çıkış lateksi elde edilmiştir. Sentezlerde kullanılan çıkış lateksinin sentez koşulları Çizelge 1’de verilmektedir. Yöntemde öncelikle dispersiyon polimerizasyonu dağıtma ortamı hazırlanmıştır. Bu amaçla tipik bir sentezde, 2.1 g PVP K-30, 69 mL Et-OH, 48mL Met-OH ve 3 mL su içeren dağıtma ortamında çözülmüştür.

Bu işlem sırasında ortam 500 mL hacme sahip ağzı sızdırmaz şekilde kapatılan bir cam reaktörde bulunmaktadır. Elde edilen dağıtma ortamına 20 mL stiren monomeri ve 0.44 g AIBN eklenmiş ve sonuç ortam AIBN’nin tam çözünmesini sağlayabilmek amacıyla yaklaşık 5 dakika süreyle ultrason uygulanmıştır.

Ağız kapatılmış durumdaki cam reaktör çalkalamalı bir su banyosuna yerleştirilmiş ve 100 cpm çalkalama hızı ile polimerizasyon sıcaklığı olan 70 °C'ye ısıtılmıştır [12, 14, 22].

Tablo 2.7. Monodispers formda polistiren çıkış lateksi sentezi için dispersiyon polimerizasyonu koşulları

Kullanılan Kimyasallar	Miktarlar
Etanol (mL)	69
2-metoksietanol (mL)	48
PVP K-30 (g)	2.1
Stiren (mL)	20
AIBN (g)	0.44
Su (ml)	3
Polimerizasyon Koşulları	
Sıcaklık (°C)	70
Polimerizasyon Süresi (saat)	24

Polimerizasyon işlemi 24 saat ile belirtilen sıcaklık ve çalkalama hızında yapılmıştır. Polimerizasyon sonrasında reaktör içeriği oda sıcaklığına soğuduktan sonra 5000 rpm'de yaklaşık 5 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası sıvı kısım atılmış ve 50 mL'lik santrifüj tüplerinde çöken partiküllerin üzerine distile deiyonize su eklenerek, partiküller bir baget yardımıyla sulu ortamda dispers edilmiştir. Elde edilen yeni dispersiyonla santrifüjleme-dekantasyon işlemi 3 kez tekrarlanmış ve son santrifüj basamağında çöken partiküller yaklaşık 100 mL su içerisinde, cam baget ile karıştırma ve takiben 1-2 dk sonikasyon ile dispers edilmiştir. Bu işlem ile ortalama partikül boyutu yaklaşık 2.32 µm olan monodispers polistiren çıkış lateks partikülleri elde edilmiştir [12, 22].

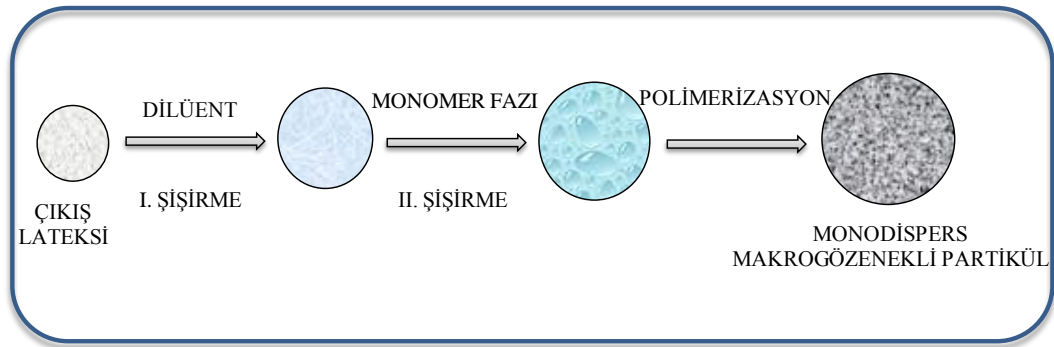
2.2.1.2. Çıkış Lateksinin Karakterizasyonu

Çıkış lateksinin ortalama boy dağılımının hesaplanması amacıyla Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM, LEO 440) ile elde edilen mikrograflar kullanılmıştır. Sulu ortamda bulunan polistiren partiküller, etüvde 70°C'de 24 saat kurutulmuş ve alınan

belirli hacimdeki dispersiyonun katı partikül içeriği gravimetrik olarak belirlenmiştir [12, 13].

2.2.2. Monodispers Gözenekli Partiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu

Poli(THFA-DVB) monodispers ve gözenekli partiküllerin sentezi için “Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu” yöntemi kullanılmış ve Şekil 2.2.’de gösterilen bu yöntem ayrıntıları ile açıklanmıştır.



Şekil 2.2. Monodispers-gözenekli formda partiküllerin sentezi için kullanılan iki basamaklı şişirme işlemi

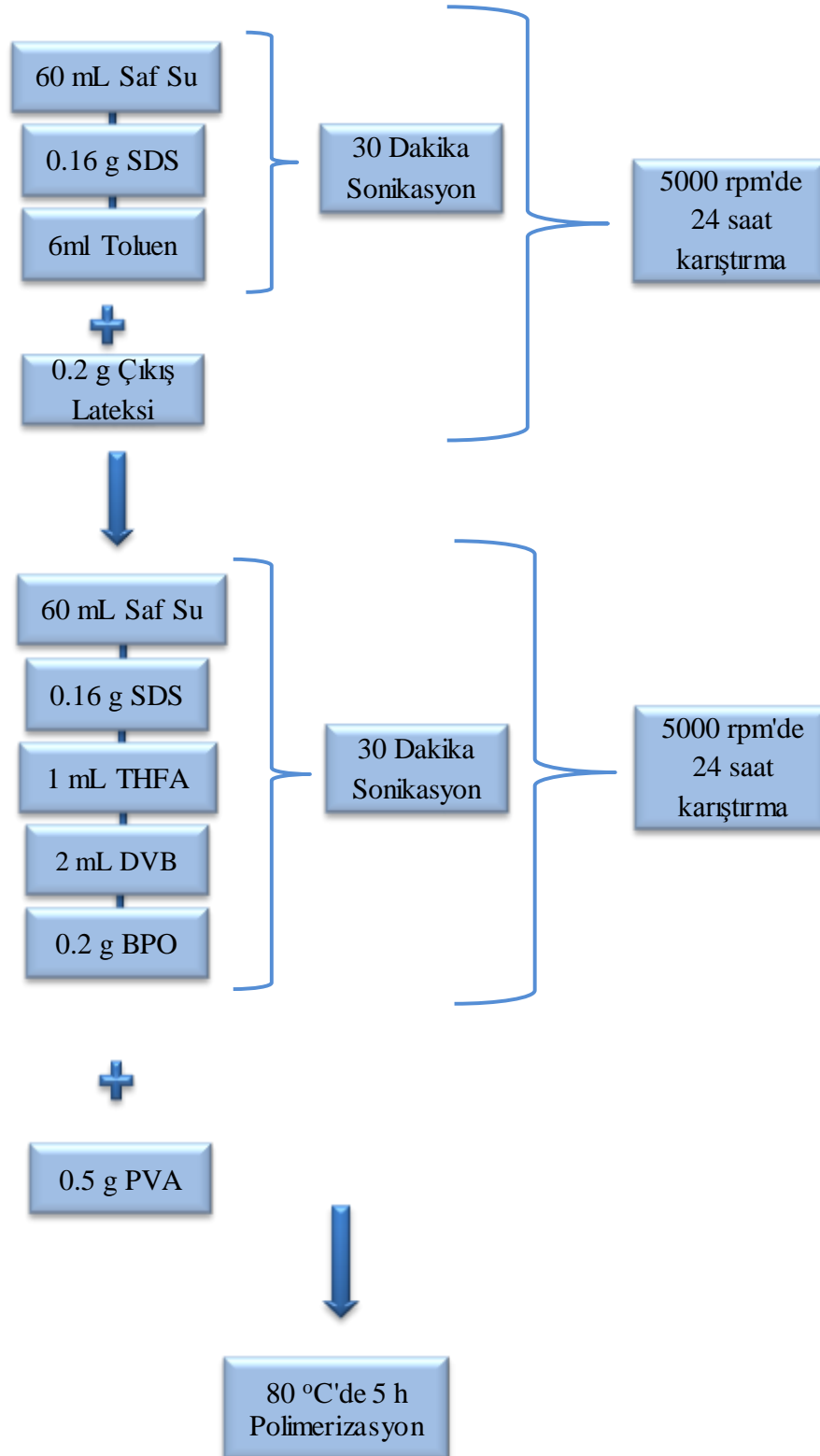
2.2.2.1 Çıkış Lateksinin Dilüent ve Monomer Fazı ile Şişirilmesi

Monodispers formdaki çıkış partiküllerinin gözenekli olabilmesi yapısına gözenek oluşturucu ajanların eklenmesi ile mümkün olmaktadır. Bu amaçla polistiren çıkış partiküllerinin içine düşük molekül ağırlığına sahip organik bir ajan olan toluen eklenmiştir. Toluene, polistiren partiküllerin içine girerek zincirlerin gevşemesine kısmen de olsa çözünmelerine yani partiküllerin şişmesine neden olmaktadır. Ancak polistiren partiküllerin organik ajanla şişirilmesi sırasında monodispersitenin korunması gerekmektedir. Bu nedenle şişirme işlemi sırasında toluene, sodyum dodesil sülfat (SDS) varlığında sulu emülsiyon ortamında çıkış lateksi ile etkileştirilmiştir. Burada SDS misel yapısı oluşturarak, toluene emülsiyon ortamı içerisinde homojen olarak dağılmasını sağlamaktadır. Böylece partiküllerin aynı oranda şişmeleri yani monodispersitenin korunması sağlanmaktadır. Tipik bir basamaklı polimerizasyon yöntemi aşağıda örneklendirilmiştir. Sulu emülsiyon için, sürekli faz 0.3 g SDS'nin 120 mL distile su içerisinde çözünmesiyle elde edilmiştir. Aynı sulu emülsiyon ortamına, düşük molekül ağırlığına sahip organik bir ajan

olarak değişen miktarlarda toluen eklenmiştir. Bu karışım, 30 dakika boyunca ultrasonikasyona tabi tutularak dispers edilmiştir. Elde edilen sonuç emülsiyonuna değişen oranlarda polistiren çıkış partikülü eklenmiş ve karışımın bulunduğu sızdırmaz reaktör bir manyetik karıştırıcıya alınmıştır. Karıştırma işlemi oda sıcaklığında 500 rpm’de 24 saat yapılmış ve dilüent karışımının çıkış partiküllerine transferi sağlanmıştır. 24 saat süren karıştırma işleminin ardından reaktördeki bu karışıma, 30 dakika boyunca SDS ve 50 mL su içinde ultrasonikasyona tabi tutulan, çapraz bağlayıcı başlatıcı ve monomer fazı eklenmiştir. Eklenen monomer fazı değişen miktarlarda THFA, 2 mL DVB ve 0.1 g BPO’dan oluşmaktadır. Monomer fazı eklendikten sonra 24 saat ikinci şişirme işlemine tabi tutulmuştur. Karışım kesintisiz olarak manyetik karıştırıcıda 24 saat daha karıştırılmıştır ve bu aşamada da monomer fazın çıkış partiküllerine transferi sağlanmıştır. Şişirme işlemi 2 basamaklı olarak sonlandırılmış ve polimerizasyon işlemine geçilmiştir. İkinci şişirme işlemini takiben ortama 1 mL su içerisinde çözülmüş 0.5 g PVA eklenmiştir. Burada polivinil alkol sterik stabilizör olarak kullanılmakta ve polimerizasyon sırasında partikül-su ara yüzeyine yerleşerek, sonuç partikül yüzeyinde koruyucu bir tabaka oluşturmaktadır. İşlemler Tuncel ve arkadaşları tarafından kullanılan yöntemle birtakım modifikasyonlar uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 2.3 yapılan sentezlere ait tipik bir iki basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu işlemini ve kullanılan kimyasal malzemeleri akım şeması şeklinde göstermektedir. [12-14, 22].

2.2.2.2. Monomer Fazının Çıkış Partikülleri İçerisinde Polimerizasyonu

Elde edilen dispersiyon, sızdırmaz özellikteki cam reaktöre aktarılmıştır. Ağız sıkıca kapatılan pyrex cam reaktör, manyetik karıştırıcılı sirkülatörlü su banyosuna alınmıştır. Bu reaktörde polimerizasyon işlemi 80°C’de 5 saat yürütülmüştür. Bu sürenin sonunda çalkalamalı su banyosundan alınan partiküller oda sıcaklığına soğutulmuştur [12-14, 22]. Oda sıcaklığına soğutulduktan sonra yıkama ve temizleme işlemlerine kadar ağız kapalı cam reaktörlerde oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.



Şekil 2.3. İki basamaklı polimerizasyon işlemi

2.2.2.3. Monodispers Gözenekli Partiküllerin Yıkınması ve Ekstraksiyonu

Polimerizasyon sonucunda ana ürün olarak elde edilen monodispers gözenekli partiküllerin dağıtma ortamından ve polimerizasyon yan ürünlerinden ayrılması gerekmektedir. Partiküllerin ortamda bulunan ve sürekli fazda oluşan daha küçük partikül boyutuna sahip yan ürünlerden ayrılması amacıyla bir seri santrifüjleme dekantasyon işlemi uygulanmıştır. Santrifüjleme işlemi önce distile su ardından da etanol ile yapılmıştır. Polimerizasyon sonrasında reaktörlerden alınan dispersiyon, 50 mL hacmindeki santrifüj tüplerine konulmuş 4000 rpm'de 1 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonucunda monodispers makro gözenekli partiküller çökmüş ve supernatantın dekantasyonu ile ortamdan uzaklaştırılmıştır. Santrifüjleme-dekantasyon işlemine optik mikroskop ile yapılan gözlemlerle küçük partikül fraksiyonları ortamdan tamamen uzaklaşana kadar devam edilmiştir. Daha sonra elde edilen eş boyutlu gözenekli partiküller etanol ortamında dispers edilmiş ve 4000 rpm'de 3 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Etanol ile kısmen temizlenen polimerler daha sonra partiküller içinde kalan organik ajanın ve lineer polistirenin ortamdan uzaklaştırılması için tetrahidrofur (THF) ile ekstrakte edilmiştir. Partiküller, yaklaşık 50 mL THF içerisinde manyetik karıştırıcılı su banyosunda 60 °C'de 30 dk ekstrakte edilmiş ve ardından santrifüjlenerek THF ortamdan ayrılmıştır. Bu ekstraksiyon işlemi 3 kez tekrarlanmıştır. Böylece polimer yapısından bulunma ihtimali olan dilüent, monomer ve oligomerler temizlenmiştir. Ekstraksiyon bitiminde partiküller oda sıcaklığına soğutulmuş ve alkol ortamına alınmıştır [12, 14, 22].

2.2.2.4. Kolon Dolgu Materyallerinin Sentez Deney Planı

Çok basamaklı mikrosüspansiyon tekniği kullanılarak hazırlanan monodispers kolon materyalleri sentez planı, kolonun ayırma performansı üzerine etki eden önemli parametreleri inceleme imkanı vermiştir.

Sentez aşamasının ilk bölümünde sabit çapraz bağlayıcı (DVB) ve porojen oranına karşı artan oranlarda çıkış lateksi eklenerek kullanılacak çıkış lateksi miktarı optimize edilmiştir. Daha sonra sentezlenen yıkanan ve ekstrakte edilen poli(THFA-DVB) kolon dolgu maddeleri 4.6 mm iç çapa ve 15 cm uzunluğa sahip çelik HPLC

kolonlarına doldurularak; likopen ve β -karotenin analit olarak kullanıldığı durumda, farklı mobil faz asetonitril besleme derişimleri için izokratik modda ayırma davranışları incelenmiştir. Literatür ışığında iki farklı mobil faz konsantrasyonunda çalışılarak elde edilen sıvı kromatogramlarından alıkonma süresi, taban genişliği, pik yüksekliği, pik alanı ve pik yarı yüksekindeki taban genişliği belirlenip; teorik tabaka katsayısı, alıkonma faktörü pik çözünürlüğü ve indirgenmiş plaka yüksekliği hesaplanmıştır. Hesaplanan bu veriler değerlendirilerek artan çıkış lateksi miktarının kromatografik ayırma performansı üzerine etkisi incelenmiştir. Kromatografik performans testleri Bölüm 2.4'te ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Sentezin ikinci aşamasında, en iyi ayırma performansına ve en yüksek teorik tabaka katsayısına sahip olan dolgu malzemesindeki çıkış lateksi oranı dikkate alınarak farklı monomer/çapraz bağlayıcı oranlarında adsorban malzemeler sentezlenmiştir. Eş zamanlı yürütülen performans testleriyle en iyi monomer/çapraz bağlayıcı oranı da optimize edilmiştir.

Dolgu malzemesi sentezinin üçüncü ve son kısmında ise en iyi monomer/çapraz bağlayıcı oranı seçilerek farklı dilüent/çapraz bağlayıcı oranlarında adsorban malzemeler sentezlenmiştir ve performans testleriyle birlikte bu kısımdaki parametreler de optimize edilmiştir. Tüm sentez planındaki parametreler ve sonuçlar birlikte değerlendirilerek en iyi performans gösteren monodispers kolon dolgu malzemesi seçilmiş ve preparatif LC kısmında kullanılmak üzere alkol ortamında oda sıcaklığında saklanmıştır. Çalışma süresince sentezlenen polimerlerin reçeteleri Tablo 2.8'de verilmektedir.

Tablo 2.8. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi için kolon dolgu malzemesi sentez planı

No	Su (mL)	Çıkış lateksi (g)	TOL (mL)	SDS (g)	THFA (mL)	DVB (mL)	BPO (g)
S-1	120	0.1	6	0.32	1	4	0.1
S-2	120	0.2	6	0.32	1	4	0.1
S-3	120	0.3	6	0.32	1	4	0.1
S-4	120	0.4	6	0.32	1	4	0.1
S-5	120	0.5	6	0.32	1	4	0.1
S-6	120	0.4	6	0.32	0	4	0.1
S-7	120	0.4	6	0.32	0,5	4	0.1
S-8	120	0.4	6	0.32	1	4	0.1
S-9	120	0.4	6	0.32	2	4	0.1
S-10	120	0.4	2	0.32	1	4	0.1
S-11	120	0.4	4	0.32	1	4	0.1
S-12	120	0.4	6	0.32	1	4	0.1
S-13	120	0.4	10	0.32	1	4	0.1
S-14	120	0.4	12	0.32	1	4	0.1

2.3. Sentezlenen Monodispers Gözenekli Partiküllerin Karakterizasyonu

Bu aşamada sentezlenen monodispers gözenekli polimerik partiküllerin kimyasal ve fiziksel özelliklerinin tanımlanması amaçlanmış ve üretim parametrelerinin hazırlanan adsorban malzemelerin çeşitli özelliklerini nasıl etkilediği belirlenmiştir. Bu amaçla hazırlanan malzemelerin FTIR ile yapı analizleri yapılmış, taramalı elektron mikroskobu ile boy dağılımları ve yüzey özellikleri incelenerek karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

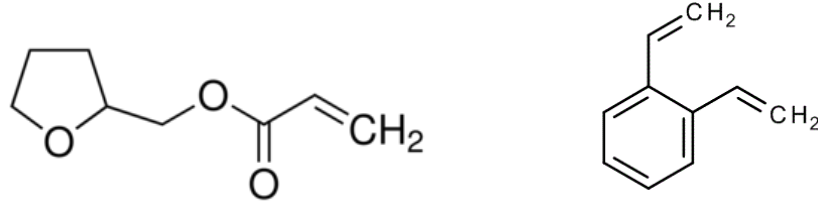
2.3.1. Fourier Transform İnfrared Spektrometresi ile Karakterizasyon

IR spektroskopisi polimer malzemelerin kimyasal yapılarının karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır. IR spektroskopisi, temel olarak sentezlenen polimer yapıdaki fonksiyonel grupların tanımlanarak genel kimyasal yapısı hakkında yorum yapılabilmesini sağlamaktadır [11, 155]. Tez kapsamında yapılan çalışmalarda sentezlenen polimer esaslı adsorban malzemelerin kimyasal yapılarının incelenmesinde IR spektroskopisinin özel bir uygulaması olan “Fourier Transform İnfrared Spektrometresi” (FTIR, Perkin Elmer) kullanılmıştır. IR spektroskopinin bir alt dalı olup elektromanyetik ışımının infrared bölgesini kullanır. İnfrared bölgesi, spektrumun $13000 - 33 \text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı kısmını kapsar. IR spektroskopisi, absorpsiyon spektroskopisi ile beraber birkaç farklı tekniği bünyesinde barındırmaktadır. İzomerler dışında hiçbir bileşiğin IR spektrumu birbirinin eşdeğeri değildir [155].

İNfrared radyasyon molekül ya da molekül içerisindeki fonksiyonel grupların değişmesiyle farklı frekanslarda titreşim veya dönme uyarılmalarına sebep olur. Titreşim frekansları farklı olan molekül ya da fonksiyonel gruplar içerisinde infrared ışınlar geçirilirse, kendi frekanslarına uygun monokromatik ışınları soğururlar. Bunun sonucunda da, infrared bölgede çeşitli dalga sayısındaki ışınların örnek içerisinde geçirilmesi sonucunda, farklı frekanslarda absorpsiyon pikleri gösteren özel spektrumlar elde edilir. Molekül gruplarının infrared frekansları ve infrared enerjiyi en iyi absorbe ettikleri dalga sayıları tayin edilmiş ve çizelgeler halinde verilmiştir. Bu çizelgelerden ve spektrumlardan yararlanılarak maddenin moleküler yapısı aydınlatılabilmektedir [155-157].

Tezin bu aşamasında hiç katkı monomeri içermeyen ve en fazla miktarda katkı monomeri içeren iki adsorban malzemenin FTIR spektrumları karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve yorumlanmıştır. Sadece DVB içeren S-6 kodlu ve 1/2 oranında THFA/DVB içeren S-9 kodlu polimerler incelenmiştir. Sentez aşamasında kullanılan katkı monomerlerinin polimer yapısına girip girmediği veya ne ölçüde girdiği FTIR analiziyle belirlenebilmektedir. Sentezlenmiş olan partiküller etüvde kurutulduktan sonra KBr ile (ağırlıkça %10 olacak şekilde) karıştırılarak disk haline getirilmiş ve FTIR spektrumları oda sıcaklığında alınmıştır. Her iki örneğin spektrumları

karşılaştırmalı olarak incelenerek yorumlanmıştır. Şekil 2.4 tetrahidrofurfuril akrilatın ve divinilbenzenin kimyasal yapısını göstermektedir. Yapılan literatür incelemesinde hangi dalga sayısı (cm^{-1}) aralığında hangi fonksiyonel grupların pik verdiği belirlenmiştir ve tabloda gösterilmiştir.



Tetrahidrofurfuril akrilat ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_3$)

Divinilbenzen ($\text{C}_{10}\text{H}_{10}$)

Şekil 2.4 Tetrahidrofurfuril akrilat ve divinilbenzenin kimyasal yapısı

2.3.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Karakterizasyon

Monodispers ve gözenekli partiküllerin monodispersite özelliklerinin belirlenmesi amacıyla “Taramalı Elektron Mikroskobu” (SEM, Scanning Electron Microscope, LEO 440) ile elde edilen mikrograflar kullanılmıştır. Bu amaçla polimer örnekleri çift taraflı bant kullanılarak örnek haznesine yerleştirilmişlerdir. Ardından iletken olmayan polimer numuneler vakum altında altın-paladyum ile sıçratma kaplama yöntemiyle kaplanmıştır ve her bir kolon dolgu malzemesi için 2000, 7000 ve 40000 büyütmede 3 görüntü alınmıştır. Bu mikrograflar yardımıyla partikül çapları ölçülmüş ve ortalama boy dağılımları hesaplanmıştır.

Aynı şekilde partikül yüzeyindeki gözenek yapısının görüntülenmesinde de SEM fotoğrafları kullanılmıştır. Boy dağılımı hesaplanırken eşitlik 2.1, 2.2 ve 2.3'ten faydalanılmıştır [12, 14, 156].

$$D_n = \frac{\sum N_i D_i}{\sum N_i} \quad (2.1)$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum N_i (D_i - D_n)^2}{(\sum N_i - 1)}} \quad (2.2)$$

$$CV = SD/D_n \quad (2.3)$$

Burada; D_n ; sayıca ortalama partikül çapı, SD; standart sapma, CV; değişim katsayısı (coefficient of variation, CV), N_i ; partikül sayısı, D_i ise partikül çapını (μm) göstermektedir.

2.4. Kromatografik Performans Testleri

2.4.1. Kromatografik Kolonların Hazırlanması

Monodispers gözenekli partikül örnekleri, alkol ortamında ve oda sıcaklığında saklanmıştır. Üretilen partiküller kromatografik analiz için 4.6 mm iç çapa ve 15 cm uzunluğa sahip çelik kolonlara doldurulmuştur. Dolum işlemi için kolonun bir ucuna çelik firit yerleştirildikten sonra, açık olan diğer uçtan bir pipet yardımıyla alkol içerisindeki partikül süspansiyonu kolona doldurulmuştur. Dolum işlemine kolonun üst kısmında hiç boşluk kalmayınca kadar devam edilmiştir. Kolon daha sonra HPLC cihazına bağlanarak, kolondan basınç altında etanol geçirilmiştir. 10 dakikalık periyotlar halinde kolon sökülerek üst kısmında çökme olup olmadığı kontrol edilmiş ve çökme varsa partikül ilavesine devam edilmiştir. Kolonun %100 etanol ile basılması işlemine kolonun üst kısmında yatak boyu azalması gözlenmeyinceye dek devam edilmiştir. Daha sonra, kolondan sırasıyla 15'er dakikalık sürelerle mobil faz geçirilmiş, böylece partiküllerin kolonda tamamen yerleşmesi sağlanmıştır. Bu işlemler sonrasında kolonun üst kısmında boşluk oluşması halinde partikül eklemesi yapılarak aynı işlemler yinelenmiştir.

Son basamakta kolon HPLC cihazına ters yönden bağlanarak akış yönü terse çevrilmiş, maksimum 100 atm basınçta 20 dakika boyunca mobil faz geçişi sağlanmıştır. Böylece her iki yönden de yüksek basınca maruz bırakılan partiküllerin stabil bir yatak oluşturması sağlanmıştır [12, 14].

2.4.2. Kromatografik Sistem

Kromatografik performans deneylerinde kullanılan HPLC sistemi bir otosampler enjeksiyon ünitesi, bir gradyent pompa, bir kolon fırını, degazer ve bir UV-Vis detektör içermektedir ve sistem Şekil 2.5'te gösterilmektedir.



Şekil 2.5 Kromatografik sistem

2.4.3. Kromatografik Parametrelerin Tayini

Bu kısımda yapılan kromatografik performans testlerinde domates salçasından ekstrakte edilen likopen (Sigma) ve β -karoten (Fluka) standardı kullanılmıştır. Ters faz sıvı kromatografisinde izokratik koşullarda gerçekleştirilen deneylerde mobil faz olarak farklı derişimlerde asetonitril-etanol karışımları kullanılmıştır. Hazırlanan standartların farklı yüzey polaritelerine sahip partiküllerle doldurulmuş kolonlarda likopen ve β -karotenin ayrılma performansı incelenmiştir.

2.4.3.1. Stok Standart Çözeltilerin Hazırlanması:

Stok β -karoten Hazırlanması: Toz haldeki standart β -karoten 0.0066 g tartılmış ve 5 mL kloroform içerisinde çözülerek analiz için $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de stok çözelti olarak saklanmıştır.

Stok Likopen Ekstraktı Hazırlanması: 1 g salça örneği 10 mL saf suda çözülmüştür ve faz ayırımından sonra 3 basamakta 10'ar mL kloroform eklenerek vortekslenip, ultrasonik su banyosunda homojenize edilmiştir. Daha sonra çözgen dönel evaporatörde uzaklaştırılmıştır. Elde edilen ekstrakt 5 mL kloroform içerisinde alınıp, analiz için $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de stok çözelti olarak saklanmıştır.

Kolon enjeksiyonu için β -karoten ve likopen standardı hazırlanması:

β -karoten: Kloroform içindeki 20 μL stok standart β -karoten çözeltisi azot akımında kurutulup üzerine 1.5 mL mutlak Et-OH eklenmiş, enjeksiyon öncesi vortekslenip, ultrasonik su banyosunda homojenize edilmiştir.

Likopen: 20 μL stok ekstraktan kloroform azot akımı ile uzaklaştırılmıştır. Üzerine 1.5 mL mutlak Et-OH eklenmiştir. Ekstrakt vortekslenip, ultrasonik su banyosunda homojenize edilip santrifüjledikten sonra üst faz enjeksiyon için kullanılmıştır.

2.4.3.2. Kromatografik Performans Ölçütleri

Bu gruptaki kromatografik deneyler de farklı reçetelerde sentezlenen kolon dolgu materyalleri ve asetonitril başlangıç derişimi değişken olarak kullanılmıştır. S-1den S-14'e kadar 14 adet kolon dolgu maddesi ve 2 farklı mobil faz bileşimi; %80 AcN-%20 Et-OH ve %20 AcN-%80 Et-OH kullanılan değişken parametrelerdir.

Dolum ve yıkama işlemi tamamlanan analitik test kolonu, HPLC'de izokratik çalışmanın başlatılacağı asetonitril ve etanol derişimlerine sahip mobil faz ile 1 mL/dk akış hızı kullanılarak koşullandırılmıştır. Bu işleme 450 nm'de çalıştırılan UV dedektörden alınan temel-çizgi (base-line) sinyali tamamıyla sabit kalıncaya dek devam edilmiştir. Koşullandırmayı takiben 20 µL hacme sahip örnek sisteme enjekte edilmiştir. Standart örnek 450 nm'de çalıştırılan bir UV-Vis dedektör yardımıyla gözlenmiştir. Her analizden sonra, kolon bir sonraki analizde kullanılacak mobil faz ile uygun zaman içinde yıkanıp yeni analize hazır hale getirilmiştir. Elde edilen kromatogramlardan kolon performansını belirleyici parametreler hesaplanmıştır ve likopen ve β-karoten kromatogramları üst üste çakıştırılarak piklerin ayrılma derecesi belirlenmiştir.

Her analizde sisteme enjekte edilen örnekteki bileşen için;

- alıkonma süresi,
- taban genişliği,
- pik yüksekliği,
- pik alanı,
- pik yarı yüksekindeki taban genişliği,

ölçülerek bu veriler kolon performansını belirleyici parametreler olan teorik tabaka sayısı ve yüksekliğinin hesaplanmasında kullanılmıştır. Aşağıda bu büyüklüklerin tanımı ve performans ölçütlerinin hesaplama yöntemleri verilmektedir.

Alıkonma Faktörü (k)

Alıkonma faktörü kolon içerisinde yer alan partikül ile mobil faz içindeki analit arasındaki etkileşimin ölçüsüdür. Alıkonma faktörü eşitlik 2.4'teki ifadeler yardımıyla tanımlanmıştır.

$$k = (t_r - t_0)/t_0 \quad (2.4)$$

Yukarıdaki eşitlikte t_r , herhangi bir bileşenin herhangi bir asetonytril (AcN) derişiminde kaydedilen alıkonma süresi, t_0 ise kolonla etkileşmeyen inert bir referans materyal için alıkonma süresidir.

Pik Çözünürlüğü (R)

Çözünürlük kromatografide iki pikin birbirinden ayrılma derecesini göstermektedir. Elde edilen kromatogramlarda belirli bir bileşen için pik çözünürlüğü, denklem 2.5'e göre hesaplanmıştır.

$$R(n+1|n) = 2(t_{n+1} - t_n)/(W_{n+1} + W_n) \quad (2.5)$$

Burada $R(n+1|n)$, seçilen pik (n+1) ile bir önceki pik (n) arasındaki çözünürlüğü ifade etmektedir. t_{n+1} ve t_n ise enjeksiyon noktasından itibaren, sırasıyla pik n+1 ve pik n için alıkonma sürelerini göstermektedir. W_{n+1} ve W_n ise sırasıyla pik n+1 ve pik n için taban genişliğini ifade etmektedir.

Teorik tabaka sayısı (N)

Kolonun hızlı çalışmasının önemli bir göstergesidir. Elde edilen kromatografik piklerin keskinliği bir kolonun verimini gösteriyorsa, bu verimin nicel ölçüsü de teorik tabaka sayısıdır. Bu büyüklükler eşitlik 2.6'daki ifadeler yardımı ile bulunmuştur.

$$N = 5.54 \times \left(t \left| W_{1/2} \right. \right)^2 \quad (2.6)$$

Burada t ; bileşiğin alıkonma süresini, W ; bileşik pikinin taban genişliğini ve $W_{1/2}$; pik yüksekliğinin yarısındaki taban genişliğini ifade etmektedir.

Teorik tabaka yüksekliği (h)

Kolonun ne kadar hızlı ve etkili çalıştığını gösterir. N ile ters orantılıdır. h değeri eşitlik 2.7 yardımıyla hesaplanmaktadır. Burada h; teorik tabaka yüksekliği, L; kolon boyudur [12-14].

$$h = (L|N) \quad (2.7)$$

2.5. Domatesten Likopen Saflaştırılması

Tez çalışmasının preparatif LC kısmında; analitik kolon kullanılarak performansları belirlenen ve karakterize edilen kolon dolgu materyallerinden en iyi performans gösteren kolon dolgu malzemesi seçilerek domatesten likopenin saflaştırılması kısmında kullanılmıştır.

2.5.1. Domatesten Posa ve Su Eldesi

Çalışmada kullanılan domatesler mevsiminde Kayseri piyasasından temin edilmiştir. Yıkayıp temizlenen domatesler kullanılabileceği kadar -22 °C'de dondurularak depolanmıştır. Parçalanmak istenen domatesler yarı buzlu halde laboratuvar tipi katı meyve öğütücüsünden geçirilerek parçalanmıştır. Parçalanmış meyve dokusunun üzerine mayşenin pres verimini arttırmak için Pectinex® MASH ve Pectinex® ULTRA SP-L ticari enzim preparatlarından 1mL/kg olacak şekilde eklenmiştir. Enzim eklenen mayşe 45 °C'de 3 saat süreyle kapalı bir kap içinde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda sıvılaştıran mayşe paket preslerden geçirilmiştir. Posa ve su birbirinden ayrılmıştır. Elde edilen domates suyu 4100 rpm hızında 20 dakika 4 °C'de soğutmalı santrifüj ile santrifüjlenmiş ve bulanıklık öğeleri çöktürülerek uzaklaştırılmıştır. Domatesten likopen izolasyonu aşamaları Şekil 2.6'da gösterilmektedir.

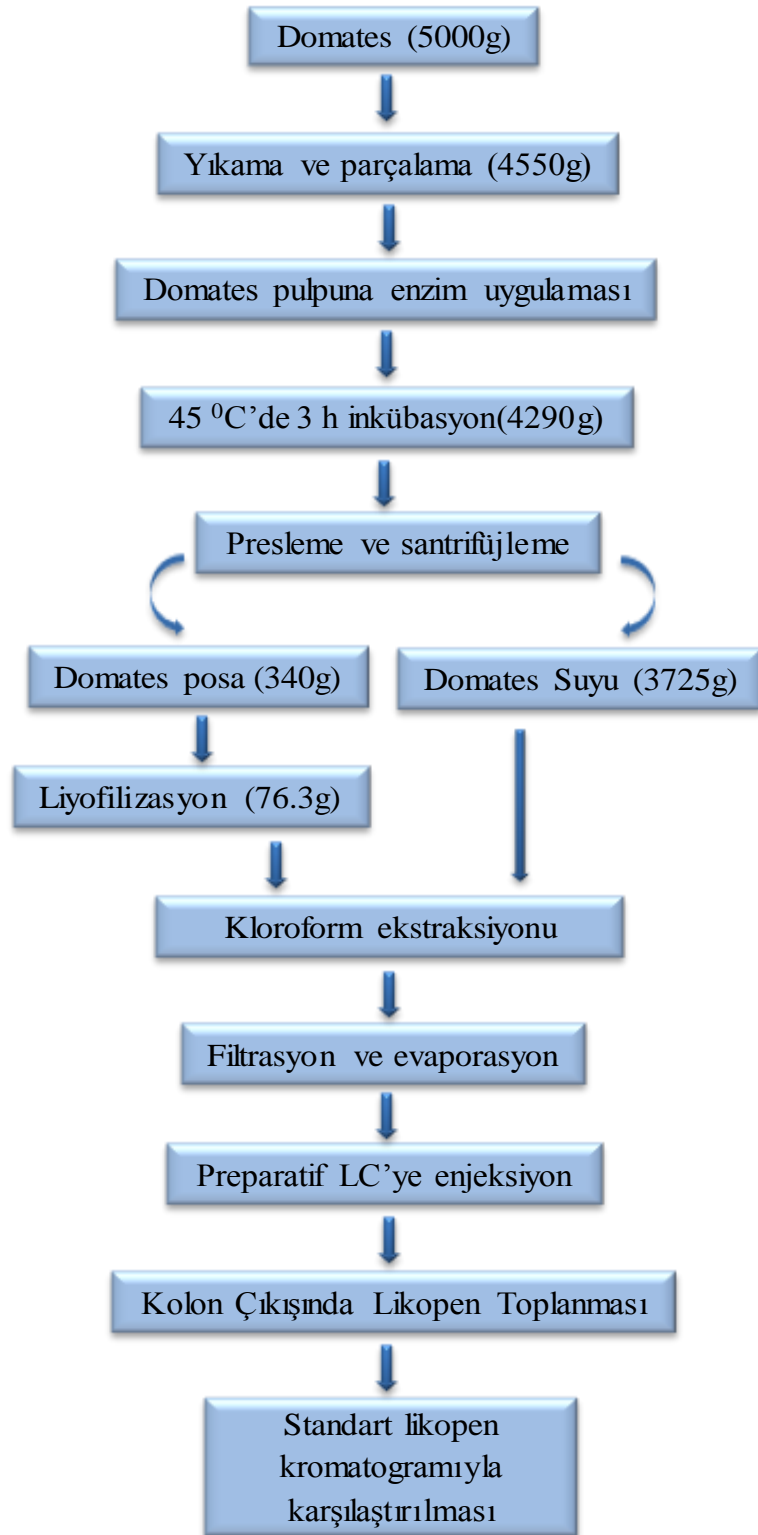
2.5.2. Domateste Yapılan Analizler

2.5.2.1. Kuru Madde Analizi

Çalışmanın çeşitli aşamalarında tüm domateste, domates posasında, posadan arta kalan serum suyunda ve elde edilen ekstraktlarda kuru madde analizi yapılmıştır. Bu amaçla sabit tartıma getirilen ve daraları alınmış kurutma kaplarına 1-3 g örnek tartılmış ve 105 °C'deki etüvde örnekler sabit tartıma gelene kadar kurutulmuştur. İşlem sonrasında örnekler desikatöre alınarak, oda sıcaklığına kadar soğutulmuş ve kütleleri gravimetrik olarak belirlenmiş, eşitlik 2.8'deki formül yardımıyla % kuru madde miktarları belirlenmiştir [33].

$$\%KM = [(G_2/G_1) \times 100] \quad (2.8)$$

%KM: Örneğin kuru madde yüzdesi, G₁: Örnek ve G₂: Kurutma sonrası kuru örnek



Şekil 2.6. Domatesten likopen izolasyonu akım şeması

2.5.2.2. Organik Asit ve Şeker Analizi

Domatesin posası alındıktan sonra kalan domates suyunda yani serum fazında; organik asit ve şeker analizi yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kullanılarak yapılmıştır.

Domateste organik asit analizi için; 1 mL domates serum suyu santrifüjlenmiş, filtrelenmiş ve şartlandırılmış Oasis HLB katı faz ekstraksiyon kartuşundan geçirilmiştir. Kartuşun şartlandırma işlemi; kartuştan sırasıyla 1 mL metanol ve 1 mL saf su geçirilerek yapılmıştır. 1 mL örnek kartuşa yüklenmiş ve kartuş çıkışı vialle toplanarak HPLC' ye enjeksiyon yapılmıştır. Analiz için kullanılan sıvı kromatografisi sistemi ve şartları Tablo 2.9'da listelenmiştir. Elde edilen kromatogram standart bileşik kromatogramlarından faydalanılarak yorumlanmış ve domatesteki organik asit türleri ve miktarları hesaplanmıştır [158].

Tablo 2.9. Organik asit analizi sıvı kromatografisi şartları

Organik Asit Analizi	
Sistem	Shimadzu LC10
Dedektör	UV-Vis detektör (SPD-20A)
Kolon	HICHRON ODS-C18 250x4.6 mm 5µm
Kolon Sıcaklığı	20 °C
Mobil Faz	H ₂ SO ₄ çözeltisi (pH 2.2)
Mobil Faz Akış hızı	0.7 mL/dk
Dalga boyu	215 nm

Domateste şeker analizi için ise; 1 ml domates serum suyu alınmıştır. Üzerine 0.1 mL carez I ve carez II çözeltisi eklenmiştir. Örnek santrifüjlendikten sonra 0.45 µm membran filtreden geçirilmiştir. Elde edilen filtrattan 20 µL enjeksiyon yapılmıştır ve koşullar Tablo 2.10'da verilmiştir. Standart bileşik kromatogramlarından faydalanılarak örnekte bulunan şekerler ve miktarları hesaplanmıştır [159]. Bu bölümle ilgili sonuçlar ve literatür değerleriyle karşılaştırılması Bölüm 3.3.1.2'de verilmiştir.

Tablo 2.10. Şeker analizi sıvı kromatografisi şartları

Şeker Analizi	
Sistem	Agilent 1100
Dedektör	Refraktif İndeks Detektör (RID)
Kolon	Agilent Carbohydrate 4.6 x 150mm 5µm
Kolon Sıcaklığı	25 °C
Mobil Faz	%80 Asetonitril-%20 Su
Mobil Faz Akış hızı	1.4 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	20 µL

2.5.3. Domates Posasından ve Suyundan Karotenoidlerin Ekstrakte Edilmesi

Domates posasından karotenoidlerin ekstraksiyonu için, domates pulpundan ayrılan domates posası 24 saat liyofilize edilmiş ve içerisindeki su tamamen uzaklaştırılmıştır. Şekil 2.7.a) domates posasının liyofilizasyondan sonraki görüntüsüne aittir.



Şekil 2.7. a) Liyofilize edilmiş domates posası örneği, b) Karotenoidlerin ekstraksiyonu sonrasında domates posası

Daha sonraki aşamada liyofilize edilmiş 30 g domates posası ezilerek toz haline getirilmiştir. Literatür ışığında örnekten karotenoid pigmentlerinin ekstraksiyonu için çözügen olarak kloroform kullanılmıştır. Toz haldeki domates posası üzerine 100 mL kloroform eklenerek manyetik karıştırıcı ile 30 dk karıştırılmıştır. Daha sonra örnek ultrasonik su banyosuna alınmıştır. 10 dk süreyle daha ekstraksiyona devam edilmiş ve örnekler öncelikle kaba filtre kağıdından sonrada Whatman No 2'den süzülmüştür [32, 36, 37].

Kalan posa üzerine tekrar 100 mL çözen ilave edilmiş ve bu işlemler 3 kez tekrarlanmıştır. Böylelikle domates posasından karotenoidlerin izolasyonu ultrason destekli olarak kademeli ekstraksiyonla gerçekleştirilmiştir. Şekil 2.7.b) ise karotenoidlerin ekstraksiyonu sonrasındaki domates posasına aittir. Bütün aşamalarda filtratlar birleştirildikten sonra çözen dönel evaporatörde tamamen uzaklaştırılmıştır. Daha sonra elde edilen ekstrakt liyofilize edilmiş ve içerisindeki çözücü tamamen uzaklaştırılmış ardından kuru ekstrakt tartılmıştır. En son elde edilen karotenoid ekstraktı 5 mL kloroform içerisinde alınmış ve likopen kaynağı olarak kullanılmıştır. Aynı işlemler domates suyu içinde tekrarlanmıştır.

2.5.4. Preparatif Kolon Hazırlanması

Monodispers gözenekli partikül örnekleri, alkol ortamda ve oda sıcaklığında saklanmıştır. Üretilen partiküllerden en iyi performans gösteren eş boyutlu S-4 kodlu kolon dolgu materyali, preparatif LC analizi için 2.12 cm iç çapa ve 10 cm uzunluğa sahip paslanmaz çelik preparatif kolona (Restek) doldurulmuştur.

Preparatif kolonun doldurulması işlemi Bölüm 2.4.1’de kromatografik performans testlerinde doldurulan kolonlar ile aynı teknik kullanılarak doldurulmuştur. Dolum işlemi için kolonun bir ucuna çelik firit yerleştirildikten sonra, açık olan diğer uçtan bir pipet yardımıyla partiküller kolona doldurulmuştur. Dolum işlemine kolonun üst kısmında hiç boşluk kalmayınca kadar devam edilmiştir. Kolon daha sonra HPLC cihazına bağlanarak, kolondan basınç altında etanol geçirilmiştir. 10 dk’lık periyotlar halinde kolon sökülerek üst kısmında çökme olup olmadığı kontrol edilmiş ve çökme varsa partikül ilavesine devam edilmiştir. Kolonun %100 etanol ile basılması işlemine kolonun üst kısmında yatak boyu azalması gözlenmeyinceye dek devam edilmiştir. Daha sonra, kolondan sırasıyla 15’er dk’lık sürelerle mobil faz geçirilmiş, böylece partiküllerin kolonda tamamen yerleşmesi sağlanmıştır. Bu işlemler sonrasında kolonun üst kısmında boşluk oluşması halinde partikül eklenmesi yapılarak aynı işlemler yinelenmiştir. Böylece kolon kullanıma hazır hale getirilmiştir. Likopen saflaştırılması için kullanıma hazır, doldurulmuş ve şartlanmış kolon Şekil 2.8’de verilmiştir.



Şekil 2.8. Kullanıma hazır halde doldurulmuş preparatif kolon

2.5.5. Preparatif Sıvı Kromatografisi ile Likopen Saflaştırılması

Preparatif sıvı kromatografisi ile likopen saflaştırmak için, domatesten elde edilen karotenoid ekstraktı kullanılmıştır. 2 farklı mobil faz konsantrasyonu denenmiş ve likopenin diğer bileşenlerden en iyi şekilde ayrılmasına çalışılmıştır. Bu işlemler sırasında likopen ve β -karoten standart kromatogramları kullanılarak çalışmalar test edilmiştir.

Önce preparatif çalışmalarda %80 mutlak etanol-%20 asetonitril konsantrasyonu denenmiştir. Daha sonra %30 asetonitril-%70 metanol mobil faz konsantrasyonları denenmiştir. Ancak çalışmada kolondan öncelikle Me-OH geçirildikten sonra kloroform ile elüsyonun daha etkin olduğu belirlenmiştir. Çalışmalara ait kromatogramlar ve domates ekstraktının kolona enjeksiyon şartları aşağıda verilmiştir.

Preparatif kolon enjeksiyonu için 0.053 g/mL kuru madde içeriğindeki domates posasından elde edilen ekstrakt kullanılmıştır. 25 mL kloroform içerisindeki domates

ekstraktından 1 mL alınmış ve içerisindeki çözünen azot akımıyla uzaklaştırılmıştır. Daha sonra örnek 5 mL metanol içerisinde alınmış ve preparatif kolona sahip sıvı kromatografisine 1.5 mL enjeksiyon yapılmıştır. Ardından kolondan 25 mL %100 metanol geçirilerek yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra kloroform ile elüsyon gerçekleştirilmiştir. Daha önceki analitik kolon çalışmaları ve yapılan spektrum taraması sonucunda likopenin alıkonma süresi göz önünde bulundurularak UV dedektörde 450 nm'de likopen pikinin görülmeye başladığı anda kolon çıkışından örnek toplanmıştır. Kolon çıkışından toplanan örnekten mobil faz önce dönel evaporatör ile daha sonrada liyofilize edilerek uzaklaştırılmış ve böylelikle domatesten saflaştırılmış likopen elde edilmiştir. Preparatif sıvı kromatografisine ait koşullar Tablo 2.11'de ayrıntılı olarak verilmektedir.

Daha sonraki aşamada ise saflaştırılan likopen, HPLC-UV'de analitik C18 kolon kullanılarak test edilmiştir. Analiz 1mL/dk akış hızında, %30 AcN-%70 Me-OH mobil faz konsantrasyonunda, 10 µL örnek hacminde ve 450 nm'de gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kromatogram ticari likopen standardı kromatogramı ile karşılaştırılmış; saflık derecesi ile domates posası ve suyundaki likopen miktarı belirlenmiştir.

Tablo 2.11. Preparatif sıvı kromatografisi şartları

Preparatif Sıvı Kromatografisi Koşulları	
Sistem	Shimadzu LC10
Dedektör	UV-Vis detektör (SPD-20A)
Kolon	Restek Preparatif Kolon (10 cm x 2.12 cm)
Pompa	Gradient pompa (LC-20 AT)
Mobil Faz	25 dakika %100 Me-OH
Elüsyon	2 mL kloroform
Mobil Faz Akış hızı	2 ml/dk
Enjeksiyon Hacmi	1.5 mL
Dalga Boyu	450 nm

2.6. Saflaştırılan Likopenin Enkapsülasyonu

Çalışmanın bu aşamasında saflaştırılan likopen sodyum aljinat kaplı tanecikler halinde “invers jelleşme (damlatma) yöntemi” kullanılarak enkapsüle edilmiştir. Kalsiyum tuzları ile aljinat çözeltisinden mikroküreler elde etme ve ekstrüzyon uygulaması yaygın olarak kullanılan yöntem olup mikro ve makro boyutunda partiküller elde edilir. Emülsifikasyon metodu, biyoaktif maddelerin daha küçük partiküller içinde enkapsüle edilme olanağı sağlar. Emülsifikasyon metodu, sulu aljinat çözeltisinin iğne ile kalsiyum klorür çözeltisi içerisine damlatılması veya ekstrüde edilmesi ile yapılır. Kalsiyum iyonu varlığında aljinatta çapraz bağ oluşumu artar, aljinatın pıhtılaşmasına ve kapsül oluşturmaya neden olur. Bu amaçla, yapılan literatür incelemelerine dayanarak optimum enkapsülasyon koşullarının belirlenmesi için çeşitli parametreler denenmiştir. Enkapsülasyon yönteminin en önemli faktörleri, enkapsüle edilmek istenen bileşenin ne kadarının kapsül içine hapsedildiği, kapsüllerin boyutları ve ürünlerdeki stabilitelere dir.

2.6.1. Aljinat Çözeltisinin Hazırlanması

Belirlenen derişimlerde sodyum aljinat çözeltileri hazırlamak için gerekli miktardaki toz sodyum aljinat distile suda 500 rpm’de 2 saat karıştırılarak çözülmüştür. Ardından aljinat tamamen çözüldükten sonra içerisindeki gaz kabarcıklarının uzaklaştırılması için 1 saat su banyosunda düşük hızda karıştırılmıştır ve kullanılmadan önce +4 °C’de 12 saat dinlendirilmiştir. Kullanılan aljinat konsantrasyonları %0.5, 1, 1.5, 2 olarak belirlenmiştir.

2.6.2. Kalsiyum Klorür Çözeltisinin Hazırlanması

Aljinat kapsüllerin hazırlanmasında çapraz bağlayıcı olarak %1 oranında kalsiyum klorür çözeltisi kullanılmıştır. 1 g CaCl₂ 100 mL saf suda çözülmüştür ve deney çalışmaları boyunca kalsiyum klorür miktarı değiştirilmemiş, sabit konsantrasyonda çalışılmıştır.

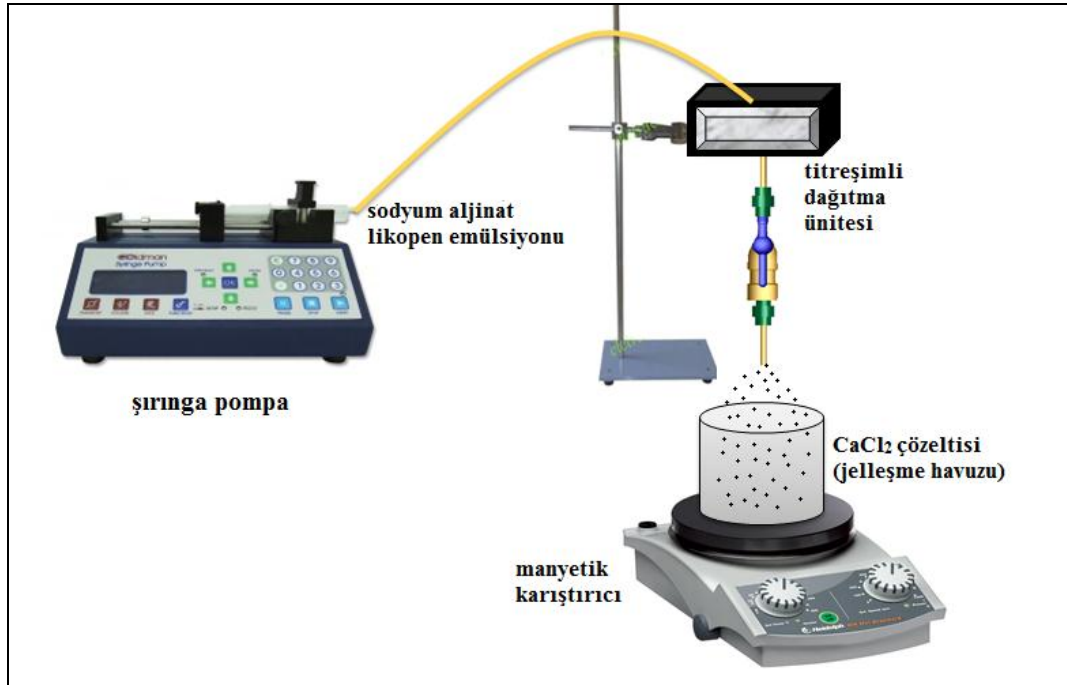
2.6.3. Jelleşme Ortamının Hazırlanması

Emülsiyon ortamının hazırlanmasında bitkisel yağ olarak ticari zeytinyağı kullanılmıştır. 0.5 mg likopen 1 mL zeytinyağında çözülmüştür. Jelleşme için,

zeytinyağı içerisinde çözülmüş likopen sodyum aljinat çözeltisi içerisinde 1:20 oranında dağıtılarak emülsiyon oluşturulmuştur. Yağ emülsiyonu oluşturmak için çözelti ultra turrax karıştırıcı ile 12000 rpm’de 30 sn karıştırılmıştır. Stabil emülsiyon oluştuktan sonra kapsül üretiminde kullanılmıştır.

2.6.4. Aljinat Membranlı ve Sıvı Lipofilik Madde Çekirdekli Mikrokapsül Üretimi

Çalışmada yağ emülsiyonu damlacıklarını aljinat-kalsiyum jelle kaplamak için invers jelleşme metodu kullanılmıştır. İstenilen özelliklerde kapsül oluşturmak için 50 Hz sabit frekansta çalışan titreşim ünitesi kullanılmıştır. Bu sistem tez çalışmasının enkapsülasyon kısmı için özel olarak tasarlanmış olup Şekil 2.9’da gösterilmiştir. Deneysel koşullarında uygulanmış ve likopen-aljinat emülsiyonu programlanabilir şırınga pompa ile titreşimli dağıtılarak damlatılmıştır. Damlatma çözeltisi olan CaCl_2 çözeltisi (%1) ise 500 rpm’de manyetik karıştırıcı ile sürekli karıştırılmıştır. Damlacıkların, küresel şekil alabilmesi için, damlama ucu ile CaCl_2 yüzeyi arasında 10 cm’lik mesafe bırakılmıştır.



Şekil 2.9. Damlatma yöntemi deney düzeneği

Her bir numune için damlatma hacmi 10 mL sodyum aljinat çözeltisi-likopen emülsiyonu olarak belirlenmiştir. Aktarma işlemi tamamlandıktan ve jeller

oluştuktan sonra kürelerin stabilizasyonu için manyetik karıştırma işlemine 30 dk süreyle devam edilmiştir. Süre sonunda oluşan kapsüller bir süzgeç ile süzölmüş ve kurutuluncaya kadar CaCl_2 çözeltisi içinde $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de depolanmıştır.

Bu şekilde elde edilen aljinat mikrokapsüllerin karakterizasyonu amacıyla, aljinat jeli konsantrasyonu ve şırınga pompadan emülsiyonun akış hızı değiştirilerek işlemler tekrarlanmış ve bu parametrelerin aljinat mikrokapsüllerin boyutları, şekilleri ve stabiliteeleri üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Uygulanan yöntemde optimum aljinat konsantrasyonu ve optimum akış hızı belirlendiğinde uygulanan sabit frekanstaki titreşim ile partikül boyutunun küçülmesi ve monodispers kapsüllerin elde edilmesi planlanmıştır.

Aljinat mikrokapsüllerinin karakterizasyonu amacıyla işlem parametrelerinde yapılan değişiklikler Tablo 2.12'de verilmiştir. CaCl_2 konsantrasyonu %1 olacak şekilde sabit tutulmuştur. Toplamda farklı parametrelerde üretilmiş "24 adet enkapsüle likopen" elde edilmiştir ve Tablo 2.12'de isimlendirilmiştir.

Tablo 2.12. Likopen enkapsülasyon parametreleri

Aljinat Konsantrasyonu (g/100 mL)	Akış Hızı					
	0.5 mL/dk	1 mLdk	1.5 mL/dk	2 mL/dk	2,5 mL/dk	3 mL/dk
0.5	EL1	EL2	EL3	EL4	EL5	EL6
1	EL7	EL8	EL9	EL10	EL11	EL12
1.5	EL13	EL14	EL15	EL16	EL17	EL18
2	EL19	EL20	EL21	EL22	EL23	EL24

2.6.5. Kapsüllerin Dondurularak Kurutulması

Dondurarak kurutma işlemi ürünün dondurulması ve buz kristallerinin süblimasyonla üründen uzaklaştırılması temeline dayanmaktadır. Likopen örnekleri liyofilizatör yardımıyla 24 saat dondurularak kurutulmuştur. Dondurarak kurutma üç aşamada gerçekleşmektedir; dondurma, temel kurutma aşaması ve ikinci kurutma aşaması. Dondurma aşamasında; şoklama veya derin dondurucuda gıdadaki suyun buz kristalleri haline dönüştürülmesi, temel kurutma aşamasında; buz kristallerinin

süblimasyonla üründen uzaklaştırılması, ikinci kurutma aşamasında ise gıdada bulunan bağlı suyun uzaklaştırılması sağlanır [160].

2.6.6. Enkapsülasyon Verimi

Enkapsüllerin veriminin hesaplanması için 0.5 g örnek tartılmış ve liyofilize edilmiştir. Liyofilize örneklerdeki likopen kloroform ile ekstrakte edilmiş ve elde edilen ekstraktta likopen miktarı HPLC ile belirlenmiştir. Enkapsüle edilmek üzere reçeteye eklenen likopen miktarı ile enkapsülasyon sonunda kapsüllerden ekstrakte edilen likopen miktarı karşılaştırılmış ve eşitlik 2.9'dan faydalanılarak % olarak verim hesaplanmıştır [74, 160].

$$\text{Enkapsülasyon verimi (\%)} = \frac{\text{enkapsüle likopen}}{\text{toplam likopen}} * 100 \quad (2.9)$$

2.6.7. Kapsüllerin Optik Analizi, Ortalama Çap ve Boyut Dağılımlarının Ölçümü

Üretilen liyofilize ve ıslak kapsüllerin optik analizi, Leica EC3 model dijital kameralı optik mikroskop kamerasıyla çekilen görüntülerin LAS EZ yazılım programında işlenmesiyle yapılmıştır. Etiketlenmiş, filtrelenmiş ve boyutlandırılmış görüntüler yardımıyla partiküllerin şekilleri, boyutları, küresellikleri incelenmiş, ortalama çapları ve boy dağılım değişim katsayıları Bölüm 2.3.2'de anlatıldığı şekilde hesaplanarak yorumlanmıştır.

Aynı şekilde enkapsüle partikül yüzey yapısının görüntülenmesinde de taramalı elektron mikroskobu görüntüleri kullanılmıştır. Model olarak seçilen likopen yüklenmiş küreler ve boş aljinat kürelerin yapısı incelenmiştir.

2.6.8. Kapsüllerin Çekirdek Sızıntısı Ölçümü

Kapsüllerin çekirdek sızıntısı ölçümü için 4 farklı konsantrasyonda (%0.5, 1, 1.5, 2) sodyum aljinat kaplama materyali kullanılarak 1.5 mL/dk akış hızında enkapsüller üretilmiştir. Elde edilen kapsüller 24 saat süreyle dondurularak kurutulmuştur. Çalışmanın bu kısmında kapsül çekirdek sızıntısı ölçümü, Lopez *et al.* tarafından kullanılan yöntemde modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır. Liyofilize kuru kapsüllerden, eşit miktarlar alınarak (0.05 g) sabit tartıma getirilmiş petri kaplarına aktarılmıştır. Petri kapları önce 1 saat 40 °C'de ardından 1 saat 50 °C'de ve son 1

saatte 60 °C’de etüvde tutulmuştur. Süre sonunda kapsüller etüvden çıkarılmış ve başka bir kaba aktarılmıştır. Petri kap üzerinde kalan yağ, aseton ve etanol ile yıkanmış sonra petri kaplar kurutulmuştur. Daha sonra kapsüller petri kaplara geri aktarılıp tartım yapılmıştır. Alınan ölçümlerdeki kapsül ağırlığındaki azalma gravimetrik olarak kapsül çekirdek sızıntı miktarını vermektedir [160, 161].

2.6.9. Kapsüllerin *in vitro* Ortamda Kontrollü Salım Testleri

Çalışmada üretilen enkapsüllerin kontrollü salım testlerinin yapılması amacıyla yapay mide ve yapay bağırsak ortamı hazırlanmıştır.

Yapay Mide Ortamı, pH 2: Yapay mide ortamının hazırlanması için pH 2’de sitrat tampon çözeltisi kullanılmıştır.

Yapay Bağırsak Ortamı, pH 7: Yapay bağırsak ortamının hazırlanması için pH 7’de sitrat tampon çözeltisi kullanılmıştır.

Tampon çözeltiler için 0.1 M sitrik asit çözeltisi ve 0.2 M di sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) çözeltisi hazırlanmıştır.

pH 2 için 99:1 oranında sitrik asit/ Na_2HPO_4 çözeltisi karıştırılmış ve pH değeri derişik hidroklorik asit ve 4 N sodyum hidroksit ile 2’ye ayarlanmıştır.

pH 7 için 18:82 oranında sitrik asit/ Na_2HPO_4 çözeltisi karıştırılmış ve pH değeri derişik hidroklorik asit ve 4 N sodyum hidroksit ile 7’ye ayarlanmıştır.

Enkapsüle likopen örneklerinin yapay mide ve bağırsak ortamındaki stabilitelerini belirlemek ve salım testlerini yapmak üzere farklı sodyum aljinat oranlarında (0.5, 1, 1.5, ve 2) ve 1.5 mL/dk akış hızında üretilen enkapsüller kullanılmıştır. 0.5 g ıslak halde enkapsül örnekleri hassas terazi ile tartılmış ve 100 mL’lik sızdırmaz kapaklı cam reaktörlere alınmıştır. Reaktörlere alınan örneklerin üzerine 25 mL pH 2 tampon çözeltisi eklenmiştir. Aynı şekilde diğer reaktörlerdeki enkapsüllerin üzerine de 25 mL pH 7 tampon çözelti eklenmiştir. Hazırlanan örnekler 37 °C’de çalkalamalı su banyosunda 120 rpm’de 30 dakika bekletilmiştir. 30 dk sonunda su banyosundan alınan yapay mide ve bağırsak ortamları içerisindeki kapsüller süzölmüş ve saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra enkapsüller likopen analizi için kloroform ile ekstrakte edilmiş ve içerisindeki likopen miktarı belirlenmiştir. Başlangıçta içerisindeki likopen miktarı bilinen örneklerden yapay mide ve bağırsak ortamında içerdikleri

likopenin ne kadarının salındığı % olarak hesaplanmış ve kapsüllerin bu ortamlardaki stabiliteleri belirlenmiştir [74, 160, 161].

2.7. Enkapsüle Edilmiş Likopenin Model Gıda Uygulamaları

Enkapsüle likopen içeren kek üretimi Rocha *et al.* tarafından kullanılan formülasyon modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir [152]. Öncelikle yumurta ve şeker mikserde 300 rpm'de 1 dakika karıştırıldıktan sonra süt ve yağ ilave edilip yine 300 rpm'de 1 dakika daha karıştırılmıştır. Karışıma son olarak un ve kabartma tozu eklenmiş krem haline gelene kadar karıştırılmıştır. Enkapsüller bu aşamada ilave edilmiştir ve kek hamuru eşit miktarda 10 adet yuvası bulunan muffin kapsüllerine aktarılıp 180 °C'de 25 dk fırınlanarak pişirilmiştir. Tablo 2.13 kek miksinde kullanılan malzemeleri ve miktarlarını listelemektedir.

Enkapsüle likopen katkılı kek üretimi için 4 farklı konsantrasyonda (%0.5, 1, 1.5, 2) sodyum aljinat kaplama materyali kullanılarak 1.5 mL/dk akış hızında üretilen kapsüller kullanılmıştır. Üretim 2 paralelli olarak çalışılmıştır. 50 g kek miksinde 0.5 mg likopen içerecek şekilde enkapsüller eklenmiş ve pişirme kalıplarına aktarılmıştır. Fırınlama işleminin ardından kekler 1 saat oda sıcaklığında bekletilerek soğumaları sağlanmıştır ve analizleri yapılmıştır.

Tablo 2.13. Kek üretiminde kullanılan bileşenler

Bileşenler	Miktar
Un	240 g
Şeker	240 g
Yumurta	2 adet
Yağ	150 g
Süt	240 mL
Kabartma tozu	10 g

2.7.1. Model Ürün Analizleri

2.7.1.1 Renk Analizi

Renk ölçüm cihazı, standart kalibrasyon skalası ile kalibre edildikten sonra örnekler üzerinden okuma yapılmış ve L^* , a^* ve b^* değerleri kaydedilmiştir. Renk tayininde kullanılan

Hunter sistemine göre; L^* değeri rengin parlaklığını, a^* değeri kırmızılığını, b^* değeri ise; sarılığı ifade etmektedir [152].

2.7.1.2. Antiradikal Kapasite Tayini

Kek örneklerinin serbest radikal süpürücü gücünün belirlenmesi için öncelikle ekstraksiyon işlemi yapılmıştır. 2 g örnek 10 mL %80 aseton/su karışımında 1 saat çalkalanmaya bırakılmıştır. Süre sonunda örnekler 4100 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip Whatman No 1'den süzümüştür ve elde edilen ekstrakt antiradikal aktivitenin belirlenmesinde kullanılmıştır. DPPH radikal solüsyonu; 5 mg DPPH'in 200 mL %80 metanolde çözündürülmesiyle hazırlanmıştır. 3.5 mL metanol DPPH solüsyonu üzerine 500 µL kek ekstraktı eklenip vorteks ile karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında karanlıkta 1 saat bekletildikten sonra spektrofotometrede 517 nm'de ölçüm yapılmıştır. Sonuçlar eşitlik 2.10 yardımıyla hesaplanmış; kontrol ve likopen katkılı kek örneklerinin antiradikal aktiviteleri % inhibisyon olarak karşılaştırılmıştır [162, 163].

$$\% \text{İnhibisyon} = (K - Ö) / K \times 100 \quad (2.10)$$

K: Kontrolün 517 nm deki absorbans değeri

Ö: Örneğin 517 nm deki absorbans değeri

2.8. İstatistiksel Analizler

Araştırma sonuçlarının değerlendirilmesinde bağımsız değişkenlerin, bağımlı değişkenler üzerindeki etkisinin önemli olup olmadığını belirlemek amacıyla ANOVA testi uygulanmıştır. Gruplar arasındaki farklılıklar ise Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizlerde anlamlılık düzeyi olarak 0.05 seçilmiştir ve SAS 8.0 istatistik programından faydalanılmıştır.

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Monodispers ve Gözenekli Tetrahidrofurfuril Akrilat-co-Divinilbenzen (THFA-co-DVB) Bazlı Polimerik Partiküllerin Üretimi

Tez kapsamında ters faz sıvı kromatografisine yönelik monodispers gözenekli THFA-co-DVB bazlı yeni sabit fazlar çok basamaklı mikrosüspansiyon tekniği kullanılarak polimerleştirilmiştir. Genel olarak bu yöntemde 2.3 µm boyutunda dispersiyon polimerizasyonu ile sentezlenen monodispers polistiren partiküller, monodispers makrogözenekli partiküllerin eldesi amacıyla çıkış materyali olarak kullanılmıştır.

Birinci basamakta çıkış lateksi, toluen içeren organik faz ile sulu emülsiyon ortamında şişirilmiştir. İkinci basamak şişirmede, yine sulu organik faz içinde tetrahidrofurfuril akrilat ve divinilbenzen kullanılmıştır. Ayrıca benzil peroksit de bu organik fazda çözülerek, polimerizasyonda başlatıcı olarak kullanılmıştır. Oda sıcaklığında ve çalkalamalı sistemde gerçekleştirilen organik faz ile şişirme işlemi polimerizasyon işlemi takip etmiştir. Polimerizasyon işlemi 80°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Monodispers polimerik partiküller, tetrahidrofuran ile ekstrakte edilerek gözenekli formda elde edilmiştir.

Farklı üretim parametreleri denenerek farklı yapılarda adsorbanlar sentezlenmiştir. Bu üretim parametrelerinin boy dağılımı, yüzey özellikleri ve kromatografik performansları üzerine etkilerini incelemek üzere değişen miktarlarda çıkış lateksi kullanılmış, farklı monomer/çapraz bağlayıcı ile farklı porojen/çapraz bağlayıcı oranlarında sentezler yapılmış ve sonuçlar yorumlanmıştır.

3.2. Polimerik Partiküllerin Karakterizasyonu

Çalışmanın bu aşamasında sentezlenen monodispers polimerik malzemelerin tanımlanmasına yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ayrıca elde edilen verilerden üretim parametrelerinin adsorbanların çeşitli özelliklerini nasıl etkilediği belirlenmiştir.

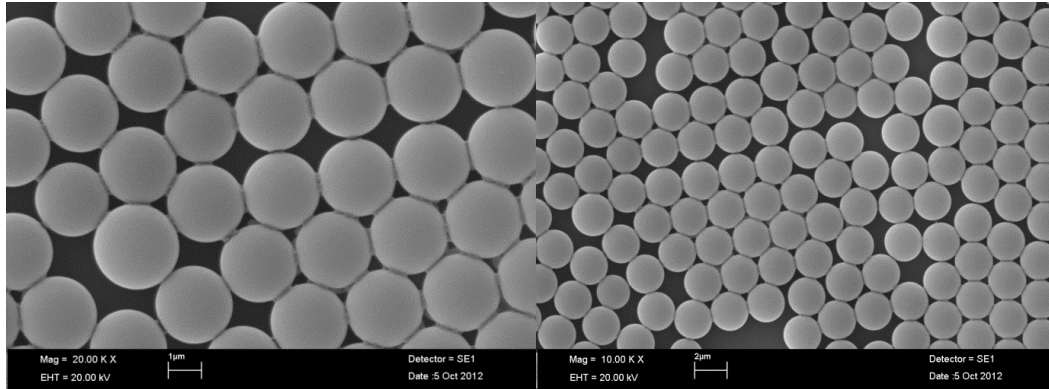
Yapılan testlerle, sentezlenen kolonların ayırma yeteneği teorik kademe sayısı, teorik kademe yüksekliği, pik çözünürlükleri ve alıkonma faktörlerinin tayini ile belirlenmiştir.

3.2.1. Polimer Örneklerinin Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntüleri

Çalışma kapsamında monodispers gözenekli partiküllerin üretiminin ilk basamağında monodispers formda çıkış lateksi sentezlenmiştir. Polistiren yapıdaki çıkış lateksi ve üç farklı parametrede sentezlenen 14 adet polimerik adsorbanın taramalı elektron mikroskobu kullanılarak farklı büyütme oranlarında (2000X, 7000X ve 40000X) görüntüleri alınmıştır. Böylece malzemelerin üretim parametrelerinin partikül şekli ve gözenek yapısı üzerine etkisi incelenmiştir ayrıca çıkış lateksinin ve sentezlenen adsorbanların ortalama partikül çapları hesaplanmıştır.

3.2.1.1. Çıkış Lateksinin Karakterizasyonu

Sulu ortamda bulunan polistiren partiküller, etüvde 70°C'de 24 saat boyunca kurutulmuş ve alınan belirli hacimdeki dispersiyonun katı partikül içeriği gravimetrik olarak 0.164 g/mL kuru madde olarak hesaplanmış ve reçetelere bu sonuca göre dahil edilmiştir. Çıkış lateksinin ortalama boy ve boy dağılımının hesaplanması amacıyla taramalı elektron mikroskobu ile elde edilen mikrograflar kullanılmıştır ve ortalama partikül boyutu yaklaşık 2.32 ± 0.064 µm olarak hesaplanmıştır. Şekil 3.1'de polistiren yapıda çıkış lateksine ait SEM görüntüleri verilmektedir. Yorumlanan görüntüler yüzey morfolojisi oldukça düzgün ve eş boyutlu çıkış lateksi elde edildiğini göstermektedir.



Şekil 3.1. Polistiren çıkış lateksinin genel görüntüsü (büyütme oranı 20000X, 10000X)

3.2.1.2. Polimer Örneklerinin Boy Dağılımı

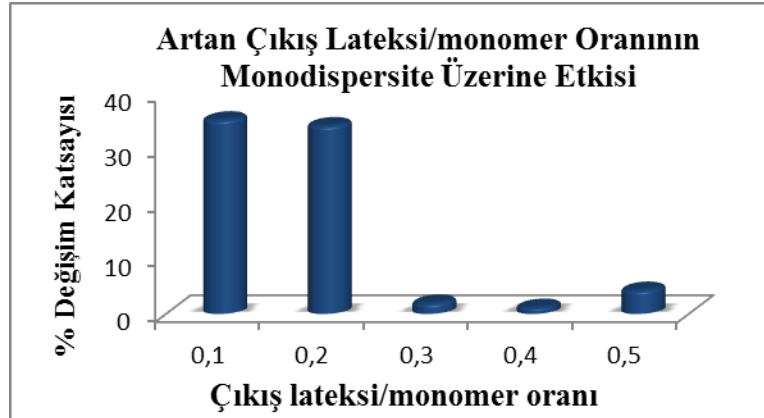
Sentezlenen monodispers makro gözenekli partiküllerin monodispersitesini ölçmek için taramalı elektron mikroskobu ile elde edilen mikrograflardan partikül çapları ölçülerek faydalanılmıştır. Bu fotoğraflar kullanılarak hesaplanan ortalama çap ve boy dağılımı değişim katsayıları Tablo 3.1’de verilmiştir. Tablodan ve şekillerden (Şekil 3.2, Şekil 3.3 ve Şekil 3.4) de görüldüğü gibi değişken parametreler sentezlenen partiküllerin monodispersitesini istatistiksel olarak etkilemişlerdir ($p < 0.05$). Elde edilen sonuçlara göre monodispersite üzerine en etkili parametre çıkış lateksi miktarıdır. Şekil 3.2’ye bakılacak olursa, çıkış lateksi/monomer oranının 0.1 ve 0.2 olduğu durumlarda ortamdaki monomer ve porojen miktarının tamamıyla etkileyecek kadar çıkış lateksi ortamda olmadığı için monodispersite korunamamıştır. Çıkış lateksi/monomer oranı 0.3, 0.4 ve 0.5 olduğu durumda % değişim katsayısı çok küçük monodispers partiküller sentezlenmiştir. Tablo 3.1’den ortalama partikül çapı değerlerine bakıldığında, çıkış lateksi/monomer oranı arttırıldığında partikül çapında küçülme gözlenmiştir. Bu da aynı miktarda monomerin daha fazla miktarda çıkış lateksine nüfus etmesinin doğal bir sonucudur. Tüm partikül reçetesine bakıldığında ise genel olarak ortalama partikül çapı 6 µm olan adsorbanlar sentezlenmiştir. Sonuçlardan da görüldüğü üzere partikül boy dağılımı oldukça dar bir aralıktadır ve istenen düzeyde monodispersiteye ulaşılmıştır.

Boy dağılımları ile birlikte yürütülen kolon performansı testleri de göz önünde bulundurularak, çıkış lateksi/monomer oranı 0.4 g olarak optimize edildikten sonra

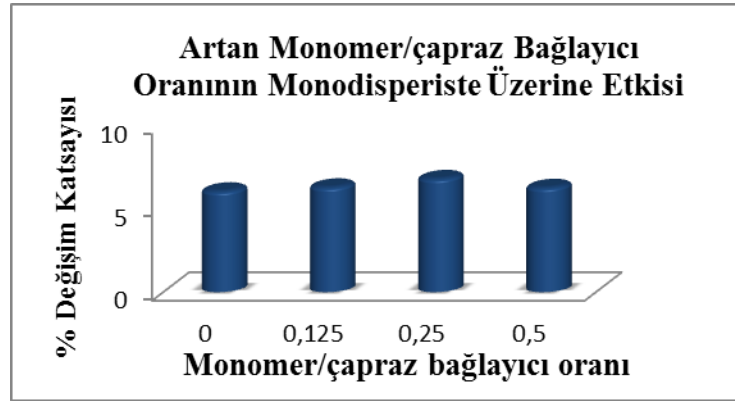
monomer/çapraz bağlayıcı oranına geçilmiştir. Şekil 3.3’de monomer/çapraz bağlayıcı oranının değişmesinin partikül çapları üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0.05$). Bu kısımda da değişim katsayılarının küçük oluşu yine monodispersiteyi doğrulamaktadır. Porojen/çapraz bağlayıcı oranının boy dağılımına etkisi ise Şekil 3.4’teki grafikte gösterilmiştir. Porojen/çapraz bağlayıcı oranının en düşük ve en büyük tutulduğu durumlarda değişim katsayıları diğer oranlardan daha yüksek bulunmuştur. Porojen/çapraz bağlayıcı oranının 1.2 olduğu koşulda % değişim katsayısı 1.48 olarak bulunmuş, monodispersite en iyi bu oranda korunmuş ve optimizasyon sağlanmıştır. Porojen/çapraz bağlayıcı oranının da boy dağılımı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

Tablo 3.1. Sentezlenen partiküllerin ortalama partikül çapı ve boy dağılımları

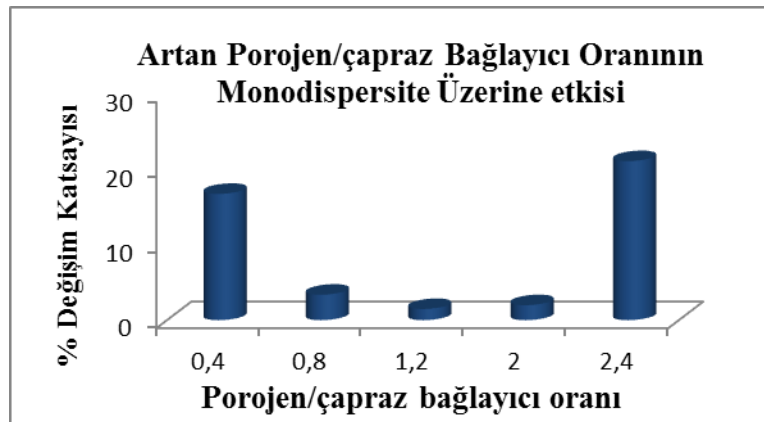
Polimer Kodu	Ortalama	Boy Dağılımı
	Partikül Çapı (μm)	Değişim Katsayısı % (CV)
S-1	6.61	35.31
S-2	6.65	34.25
S-3	6.55	1.97
S-4	6.02	1.18
S-5	5.80	4.32
S-6	6.14	6.03
S-7	5.99	6.27
S-8	6.42	6.77
S-9	6.01	6.24
S-10	5.2	16.76
S-11	5.66	3.37
S-12	5.84	1.48
S-13	6.1	1.99
S-14	5.86	21.10



Şekil 3.2. Farklı çıkış lateksi/monomer oranlarının partiküllerin boy dağılımı üzerine etkisi



Şekil 3.3. Farklı monomer/çapraz bağlayıcı oranlarının partiküllerin boy dağılımı üzerine etkisi

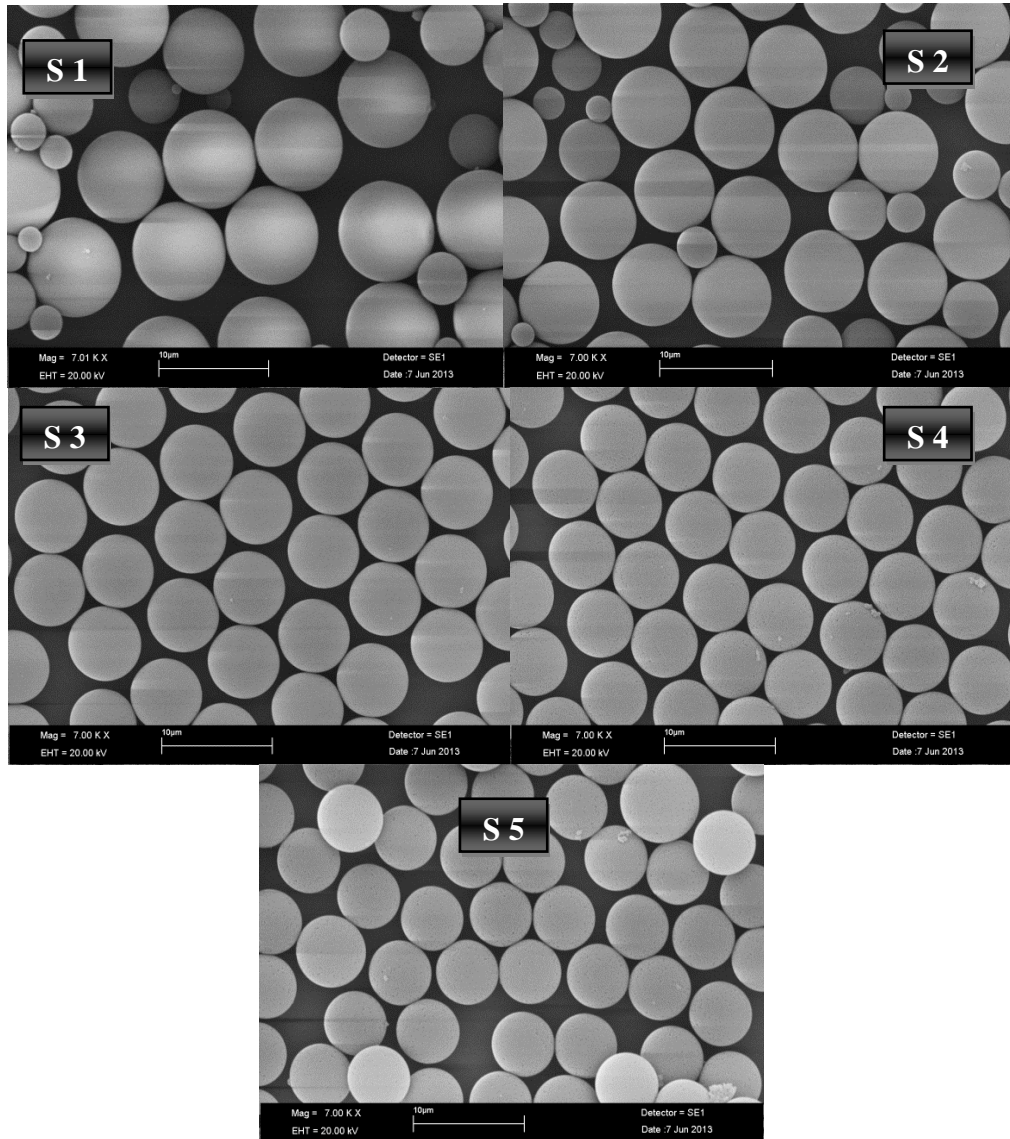


Şekil 3.4. Farklı porojen/çapraz bağlayıcı oranlarının partiküllerin boy dağılımı üzerine etkisi

3.2.1.3. Polimer Örneklerinin Taramalı Elektron Mikroskobu Mikrografları

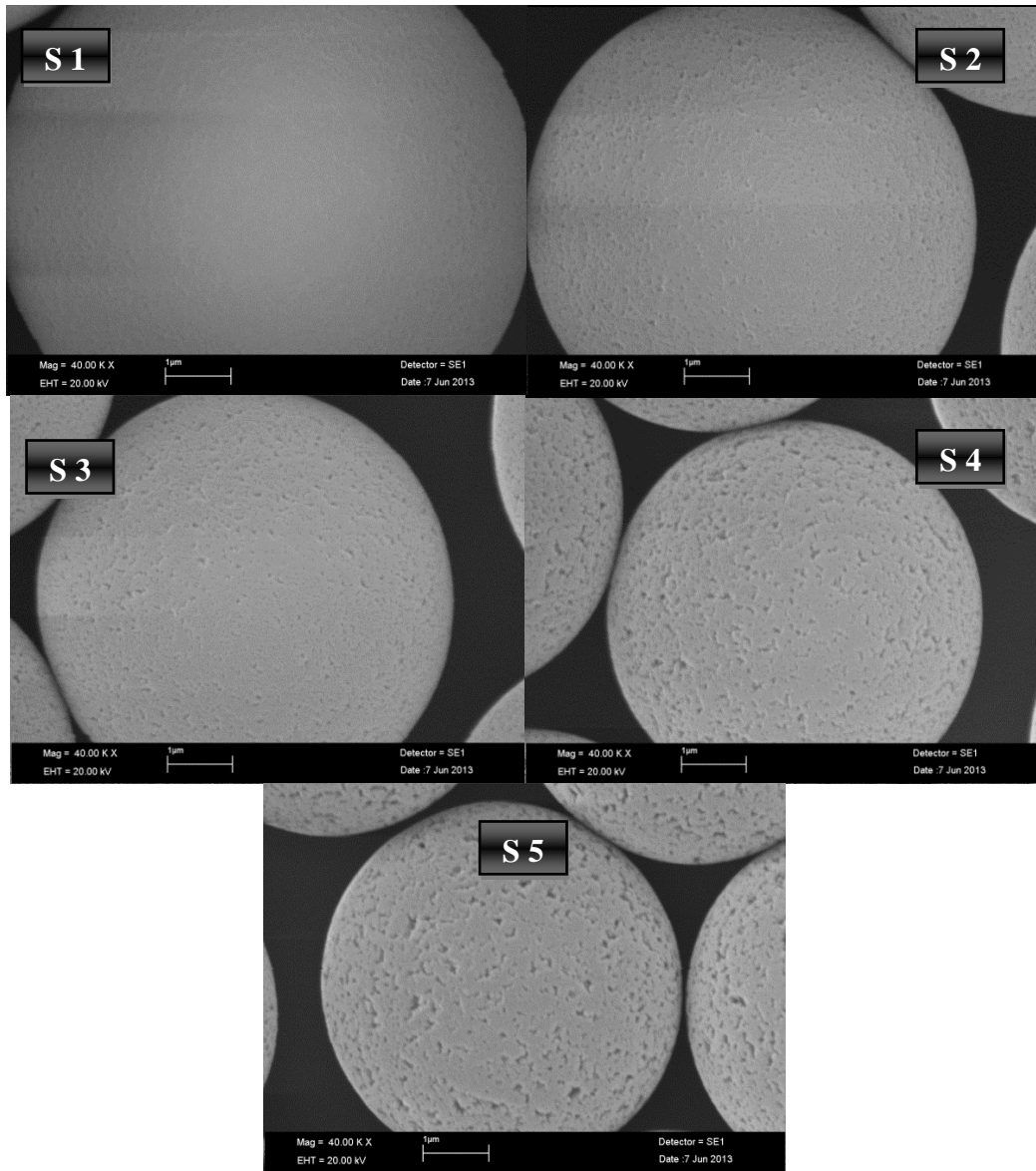
3.2.1.3.1. Çıkış Lateksi Miktarının Partikül Boyutları ve Partikül Yüzey Özellikleri Üzerine Etkisi

Şekil 3.5 ve 3.6'da sabit monomer/çapraz bağlayıcı ve sabit porojen/çapraz bağlayıcı oranına karşın artan miktarlarda çıkış lateksi eklenerek sentezlenen adsorbanların genel ve yüzey görüntüleri verilmektedir. Artan oranlarda çıkış lateksi/monomer oranının etkilerine bakılmak üzere S-1, S-2, S-3, S-4 ve S-5 kodlu kolon dolgu malzemeleri karşılaştırılmış ve 2 farklı büyütmadaki SEM görüntüleri verilmiştir.



Şekil 3.5. Farklı çıkış lateksi/monomer oranlarında sentezlenen adsorbanların genel görüntüleri (büyüme oranı 7000X)

Şekil 3.5'teki 7000X büyütmedeki fotoğraflarda S-1 ve S-2 kodlu kolon dolgu malzemelerinin polidispers özellikle boy dağılımı sergilediği görülmektedir. Her iki malzeme reçetesinde de çıkış lateksi miktarı en az oranda olduğu için, ortamdaki monomer ve porojen miktarının tamamıyla etkileşecek kadar çıkış lateksi reaksiyon ortamında bulunmamaktadır ve bu yüzden monodispersite korunamamıştır. Şekil 3.5 ve 3.6'daki SEM fotoğrafları, S-3, S-4 ve S-5 kodlu kolon dolgu malzemelerinin yeterli ve artan miktarlarda çıkış lateksi içerdiklerinden dolayı, morfolojisi çok düzgün küreler halinde monodispers olarak sentezlendiğini göstermektedir. Sentezlenen adsorban kürelerin hiçbirinde çatlama ve kırılmalar gözlenmemiştir.



Şekil 3.6. Farklı çıkış lateksi/monomer oranlarında sentezlenen adsorbanların yüzey görüntüleri (büyüme oranı 40000X)

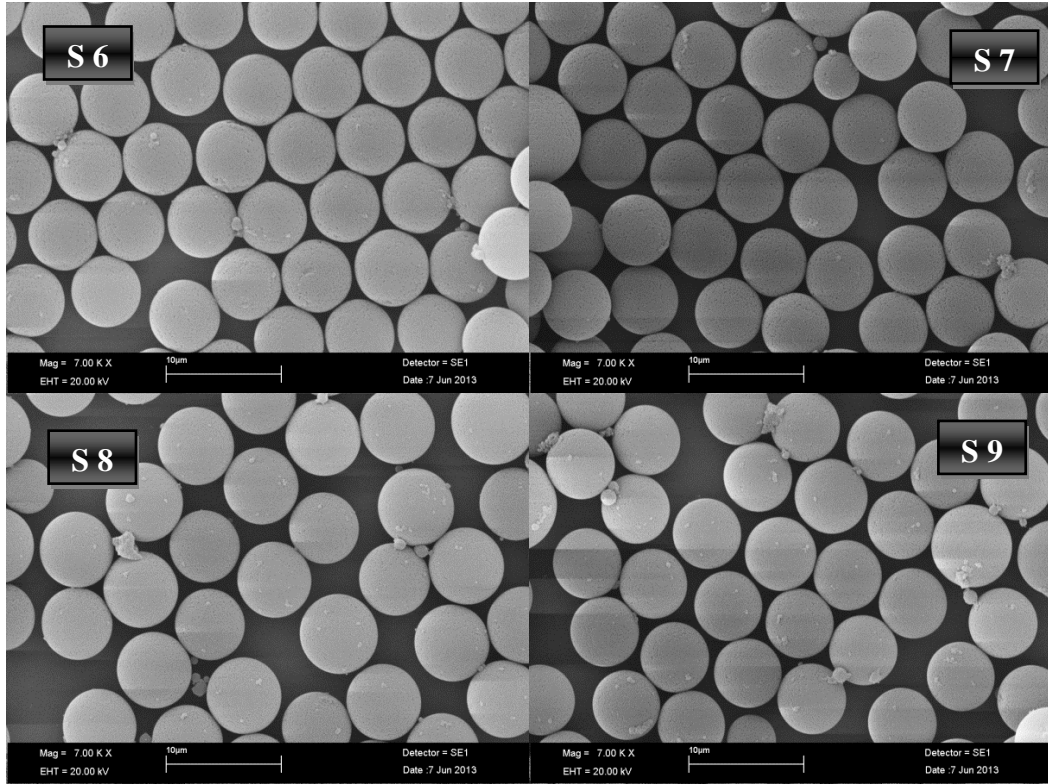
Literatür bilgisinde de belirtildiği üzere partikül yapısındaki por yapısı üçe ayrılmaktadır. Bunlar sırasıyla makro, mezo ve mikro porozitedir. Makro porozite, gözenek çapı 500 Å'dan büyük olan porozite türüdür. Mezo por yapısı da 2-50 Å aralığındaki por yapısıdır. Mikro porozite ise gözenek çapı 2 Å'dan küçük olan porozite çeşididir [156].

Partiküllerin yüzey gözenek yapısını gösteren örnek SEM fotoğrafları Şekil 3.6'da yer almaktadır ve makro gözenekli partiküller elde edildiği görülmektedir. Artan oranlardaki çıkış lateksi miktarı partiküllerin boy dağılımına etki ettiği gibi, yüzey gözenek yapısına da etki etmiştir. Yüzey görüntüleri incelenecek olursa S-1'den S-5'e doğru artan çıkış lateksi/monomer oranıyla yüzeydeki por yapısının değiştiği gözlenmektedir. S-5 kodlu adsorban yüzeyinde, S-1 kodlu adsorbanın yüzeyinden daha geniş por çapına sahip gözenekler oluşmuştur. Çıkış lateksi/ monomer oranı arttırıldığında partikül içi ortam viskozitesinin artması sonucu faz ayrılması sırasında büyük agregasyonların büyük gözenekler oluşturmasıyla açıklanabilir.

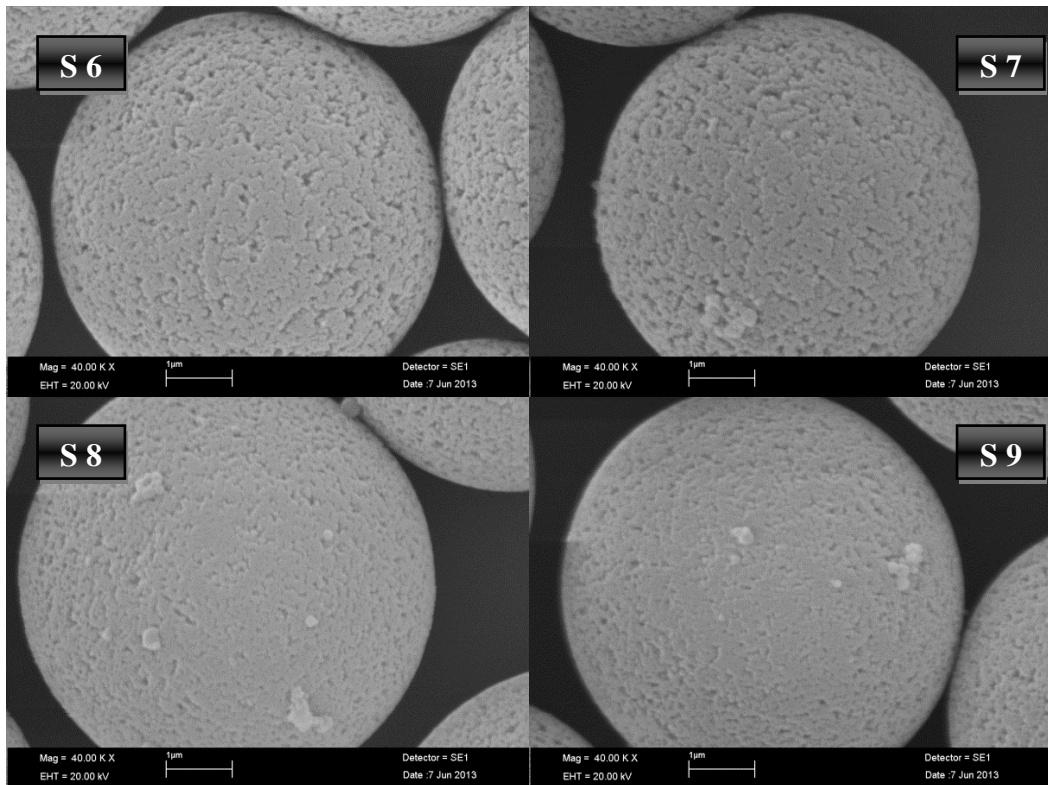
3.2.1.3.2. Monomer/Çapraz Bağlayıcı Oranının Partikül Boyutları ve Partikül Yüzey Özellikleri Üzerine Etkisi

Polimer sentez reçetesindeki artan miktarlardaki monomer/çapraz bağlayıcı miktarı adsorbanların boy dağılımını istatistiksel olarak önemli ölçüde değiştirmemiştir. Bu da bu gruptaki reçetelerde kullanılan monomer ve başlatıcı miktarının partiküllerin yüzeyini tamamen kaplayacak şekilde reaksiyon ortamında yeterli miktarda bulunduğunu göstermektedir.

Şekil 3.7'de görüldüğü gibi bu grup sentezlerde de yüzey morfolojileri oldukça düzgün monodispers mikroküreler sentezlenmiştir. Şekil 3.8'deki 40000X büyütmedeki SEM fotoğrafında ise partikül yüzeyi detaylı olarak görüntülenmektedir. Buradan da partikül yüzeylerinin süngerimsi gözenekli yapıya sahip olduğu açık olarak görülmektedir.



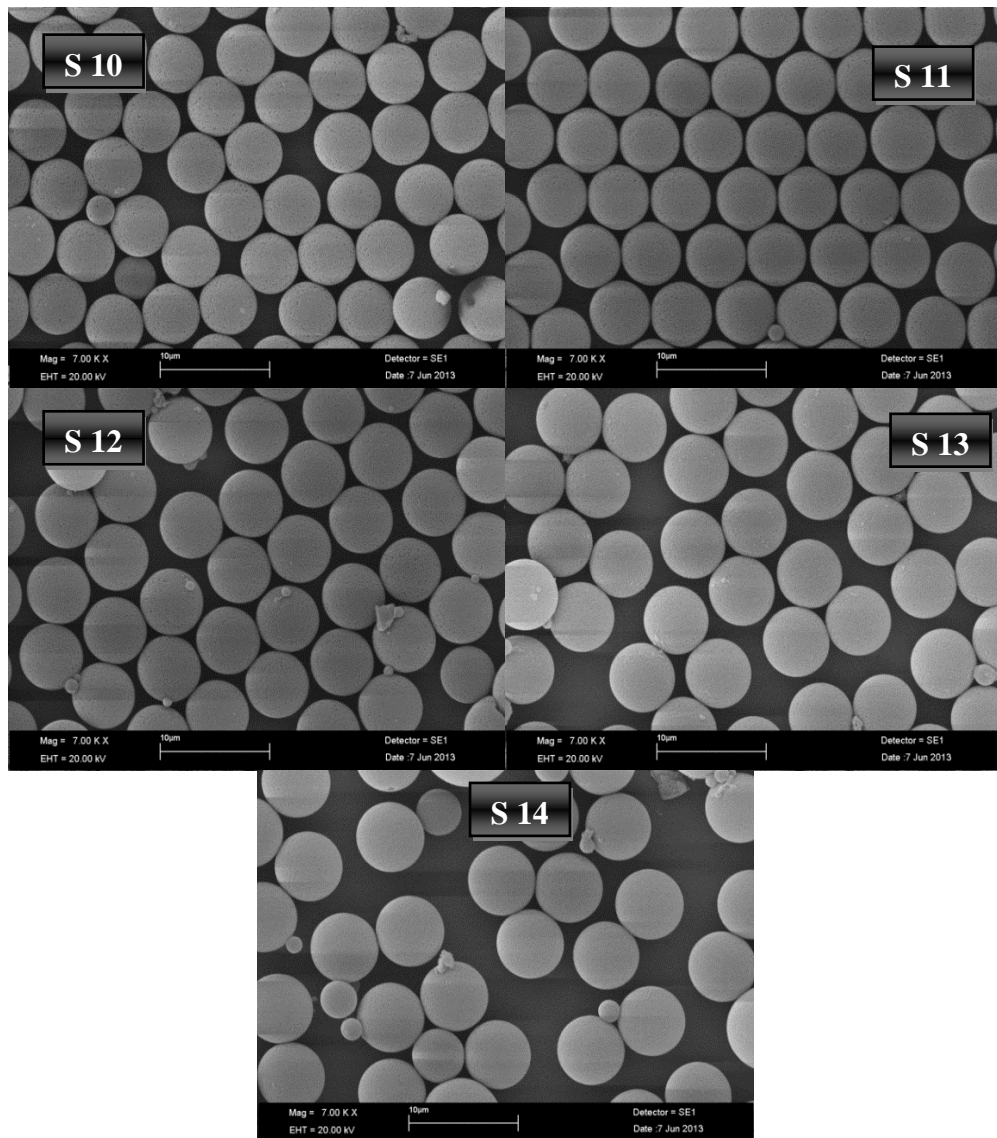
Şekil 3.7. Farklı monomer/çapraz bağlayıcı oranlarında sentezlenen adsorbanların genel görüntüleri (büyüme oranı 7000X)



Şekil 3.8. Farklı monomer/çapraz bağlayıcı oranlarında sentezlenen adsorbanların yüzey görüntüleri (büyüme oranı 40000X)

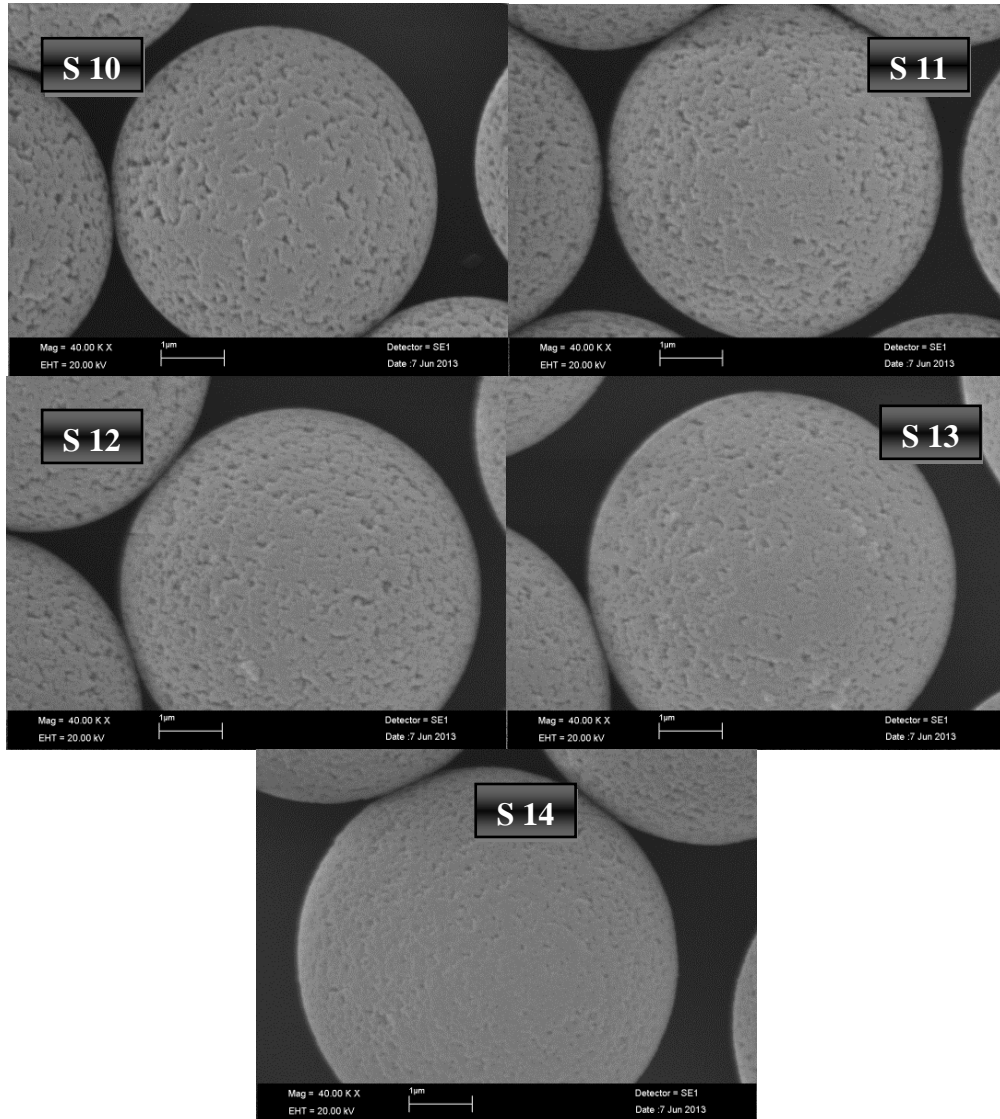
3.2.1.3.3. Porojen/Çapraz Bağlayıcı Oranının Partikül Boyutları ve Partikül Yüzey Özellikleri Üzerine Etkisi

Şekil 3.9’da partikül sentez reçetesinde artan porojen/çapraz bağlayıcı oranlarında sentezlenen S-10, S-11, S-12, S-13 ve S-14 kodlu adsorbanların genel görüntüleri verilmektedir. Boy dağılımı istatistiksel sonuçlarına göre porojen/çapraz bağlayıcı oranı partiküllerin monodispersitesi ve morfolojik yapısı üzerine etkili bir parametredir.



Şekil 3.9. Farklı porojen/çapraz bağlayıcı oranlarında sentezlenen adsorbanların genel görüntüleri (büyüme oranı 7000X)

Porojen/çapraz bağlayıcı oranının 0.4 ve 2.4 olduğu S-10 ve S-14 kodlu adsorbanlarda monodispersite için % değişim katsayısı diğer oranlara göre daha fazla bulunmuştur. Buna karşın porojen/çapraz bağlayıcı oranlarının ortalama değerlerde olduğu S-11, S-12 ve S-13 kodlu adsorbanlarda monodispersite korunmuş ve genel görüntüleri oldukça düzgün mikroküreler sentezlenmiştir.



Şekil 3.10. Farklı porojen/çapraz bağlayıcı oranlarında sentezlenen adsorbanların genel görüntüleri (büyüme oranı 40000X)

Şekil 3.10'daki yüzey görüntülerinden de THFA-co-DVB bazlı partiküllerin yüzeyinde makro gözenek içeren, süngerimsi ve krater tipi bir gözenek yapısının oluştuğu gözlenmiştir. Bu durum partikül üretimi için dilüent kullanımına bağlı bir sonuçtur. Polimerizasyon basamağında, gözenek yapısının oluşumunu sağlayan faz

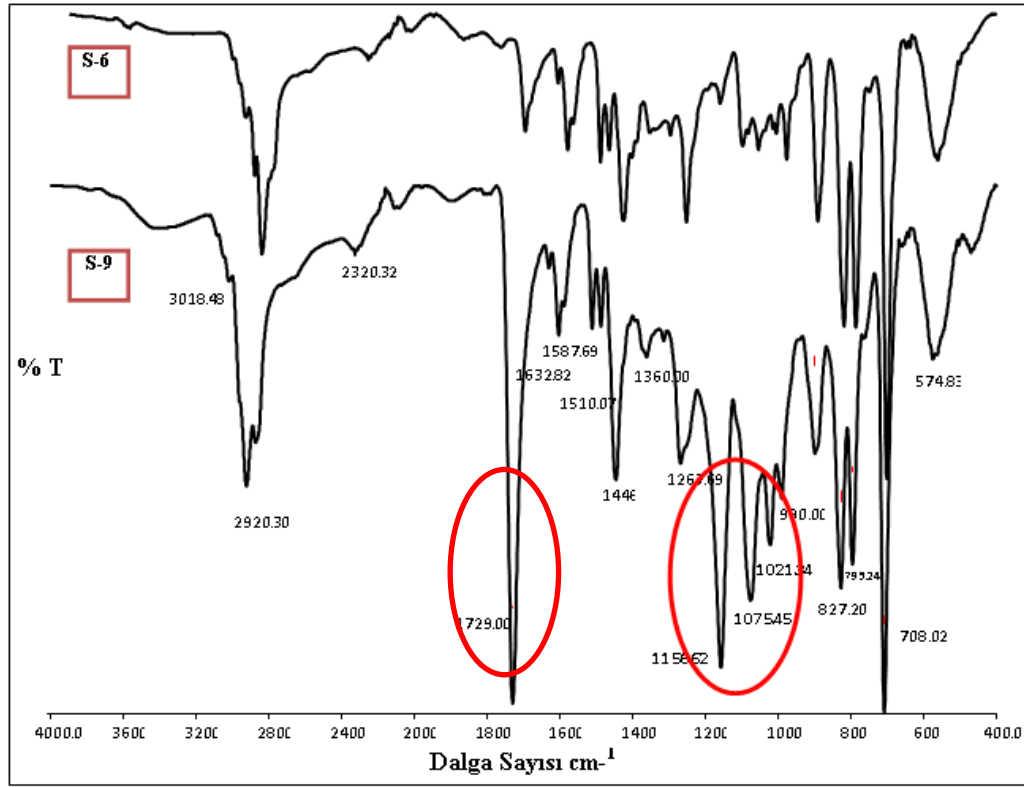
ayrımı, partiküllerin içerisinde çapraz bağlayıcı ve dilüent bulunmasından kaynaklanmaktadır. Bu proseste, dilüent oluşan polimer fazına çapraz bağlanarak içerisinde çözünmez forma gelmekte daha sonra ekstraksiyonla homojen partikül yapısı içerisinde ayrılmakta ve bu durum süngerimsi ve krater tipi gözenek yapısının oluşumunu sağlamaktadır. Şekil 3.10'da görüldüğü gibi, partikül yapısındaki dilüent miktarı arttıkça daha küçük gözenekli partiküller elde edilmektedir. Bu da dilüent miktarı arttıkça partikül içi ortam viskozitesinin düşmesinden kaynaklanan ve beklenen bir sonuçtur. Bu durum faz ayrılması sırasında küçük agregasyonların küçük gözenekler oluşturmasına neden olmaktadır.

3.2.2. FTIR Spektroskopisi

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda sentezlenen polimer esaslı adsorban malzemelerin kimyasal yapılarının incelenmesinde IR spektroskopisinin özel bir uygulaması olan Fourier Transform İnfrared Spektrometresi (FTIR) kullanılmıştır. Çalışma kapsamında sentezlenen polimerik adsorban reçine iki bileşenden oluşmaktadır. Polimer yapısında çapraz bağlayıcı olarak divinilbenzen (DVB), yapıya fonksiyonel özellik kazandırmak için de tetrahidrofurfuril akrilat (THFA) kullanılmıştır. Polimerizasyon işlemi sırasında katkı monomeri olarak kullanılan tetrahidrofurfuril akrilatın polimer yapısına katıldığı FTIR spektrumları aracılığıyla belirlenmiştir.

Tezin bu aşamasında hiç katkı monomeri içermeyen ve en fazla miktarda katkı monomeri içeren iki adsorban malzemenin yani; sadece DVB içeren (S-6 kodlu) ve 2/2 THFA/DVB (S-9 kodlu) oranına sahip polimer malzemelerin FTIR spektrumları alınmış ve her iki örneğin spektrumları karşılaştırmalı olarak incelenerek yorumlanmıştır (Şekil 3.11).

Yapılan literatür incelemesinde hangi dalga sayısı (cm^{-1}) aralığında hangi fonksiyonel grupların pik verdiği belirlenmiştir ve Tablo 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.11. S-6 ve S-9 kodlu adsorbanların FTIR spektrumu

Bölüm 2.3.1’de verilen divinilbenzen ve tetrahidrofurfuril akrilatın kimyasal formüllerine bakıldığında; tetrahidrofurfuril akrilatın yapısında farklı olarak oksijen varlığı görülmektedir. Bunun içinde spektrumda $700-1500\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığındaki parmak izi bölgesine bakıldığında C-O-C gerilme titreşimleri açık bir şekilde görülmektedir. 1156.62 , 1075.45 ve 1021.31 dalga sayısındaki keskin pikler tetrahidrofurfuril akrilatın yapısındaki oksijen gerilmelerine aittir. Aromatik yapılara ait olan C=C için absorpsiyon bantları $1575-1600$ ve $1450-1500\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralıklarında bulunmakta olup her aralık için iki adet pikin olduğu yapılan literatür incelemesinde belirlenmiştir. Şekil 3.11 incelendiğinde 1602 ve 1446 cm^{-1} bantları aromatik yapı içinde bulunan C-C gerilmesine karşılık gelmektedir. 2920 cm^{-1} bantı aromatik bileşikler için karakteristik olan C-H gerilmesine karşılık gelmektedir [155]. Sonuç olarak THFA-DVB ve DVB kullanılarak hazırlanan polimerlere ait IR spektrumları karşılaştırmalı olarak incelendiğinde THFA monomerinin polimer yapı içerisinde yer aldığı açıkça görülmektedir.

Tablo 3.2. Poli(DVB/THFA) polimerinin FTIR spektrumunda görülen karakteristik pikleri

Dalga Sayısı, cm-1	Fonksiyonel Grup
3018	-OH gerilmesi
2920	-CH gerilmesi
1729	C=C gerilmesi, C=O gerilmesi
1632	C=C gerilmesi
1602	C=C gerilmesi
1587	C=C aromatik benzen halkası
1486	C=C gerilmesi, NH deformasyonu
1446	C-C gerilmesi
1360	CH ₃ deformasyonu
1156	-C-O-C- düzlem içi eğilmesi
1075	-C-O-C- düzlem içi eğilmesi
1021	-C-O-C- düzlem içi eğilmesi
990	Ana zincirde C-C gerilmesi
898	Ana zincirde C-C gerilmesi
708	CH eğilmesi
574	C=O düzlem dışı eğilmeleri

3.2.3. Kromatografik performans testleri

Yapılan tez çalışmasının bu kısmında farklı reçetelerde sentezlenen 14 adet kolon dolgu maddesi analitik HPLC kolonuna doldurularak kromatografik performans testlerine tabi tutulmuştur. Poli(THFA-co-DVB) kolonları için likopen ve β -karotenin analit olarak kullanıldığı durumda, farklı mobil faz asetonitril besleme derişimleri için izokratik modda ayırma davranışları incelenmiştir. Her bir kolon dolgu materyalinin; %80 asetonitril-%20 etanol ve %20 asetonitril-%80 etanol mobil faz konsantrasyonlarında likopen ve β -karotenin analit olduğu durumda sıvı kromatogramları elde edilmiştir. Elde edilen bu kromatogramlardan alıkonma süresi, taban genişliği, pik yüksekliği, pik alanı ve pik yarı yüksekliğindeki taban genişliği belirlenip; teorik tabaka katsayısı, alıkonma faktörü, pik çözünürlüğü ve indirgenmiş plaka yüksekliği değerleri hesaplanmıştır.

3.2.3.1. Farklı (THFA-co-DVB) Kolonlarda Farklı Mobil Faz Derişimleri İle Elde Edilen Sıvı Kromatogramları

Her bir doldurulan kolon için 2 analit ve 2 mobil faz olmak üzere 4 enjeksiyon yapılmıştır. Tablo 3.3 kolon performansı testleri için yapılan deney tasarımı göstermektedir. S-1 kodlu polimerik adsorban, uygulanan reçetedeki sentez koşullarında tam olarak polimerleşmemiş ve polidispers bir boy dağılımı sergilemiştir. Bu yüzden S-1 kodlu kolon dolgu materyalinin kromatografik performans testlerine tabi tutulmasına gerek duyulmamıştır. Yapılan bu enjeksiyonlardan elde edilen kromatogramlar karşılaştırmalı olarak çalışmanın bu kısmında verilmiştir.

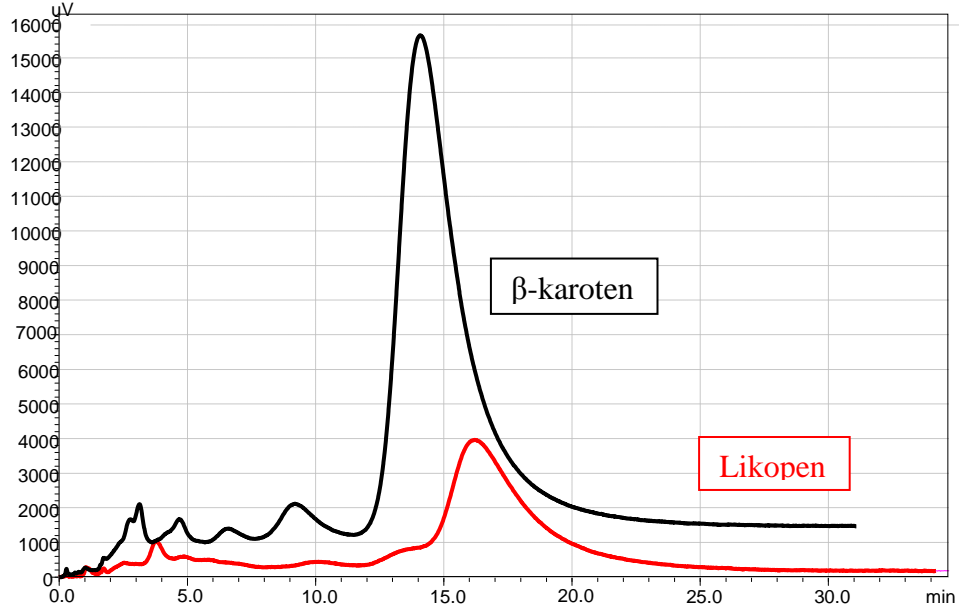
Tablo 3.3. Kolon performansı testleri için yapılan deney tasarımı

	Likopen	%80 asetonytril-%20 etanol
Doldurulmuş	β -karoten	%80 asetonytril-%20 etanol
Kolon	Likopen	%20 asetonytril- %80 etanol
	β -karoten	%20 asetonytril- %80 etanol

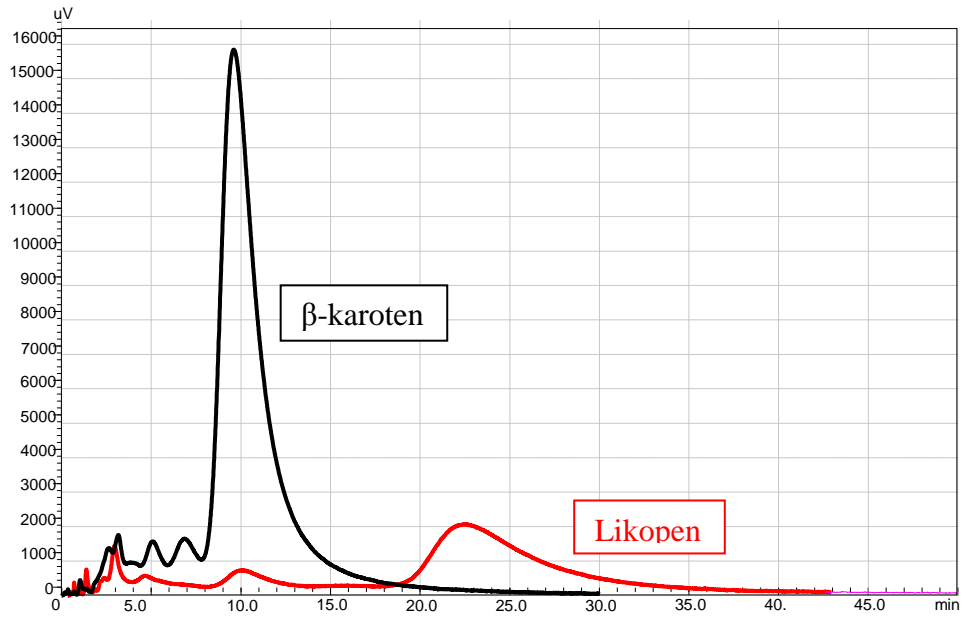
Yapılan çalışmaların kromatografik performanslarının belirlenmesine yönelik testlerde literatür ışığında iki farklı mobil faz derişiminde çalışılmıştır. Sentezlenen 14 adet kolon dolgu maddesi ile doldurulan kolonların tamamının %80AcN-%20 Et-OH mobil faz derişiminde likopen ve β -karoteni ayırmada başarısız olduğu görülmektedir. Şekil 3.12'den Şekil 3.24'e kadar olan sıvı kromatogramları incelendiğinde %80AcN-%20 Et-OH mobil faz derişiminde likopen ve β -karoten piklerinin neredeyse tamamıyla çakışık olduğu ve birbirinden ayrılmadığı açık bir şekilde görülmektedir. Fakat %20AcN-%80 Et-OH mobil faz derişimi kullanılması ile kolonların büyük bir kısmında likopen ve β -karotenin başarılı bir şekilde birbirinden ayrıldığı görülmektedir. Sıvı kromatogramlarından açıkça görülmekte olan bu durum daha bir sonraki bölümde hesaplanan pik çözünürlük değerleri ile desteklenmiştir. Çalışma kapsamında, bütün performans testleri ve kolon dolgu maddelerinin morfolojik yapıları hep birlikte değerlendirilerek optimum koşullarda maksimum performans gösteren kolon dolgu maddesi seçimine gidilmiştir.

- S-2 kodlu kolon için ayırma davranışı

- a) Mobil faz %80AcN-%20 Et-OH, akış hızı 1 mL/dk
dalga boyu 450 nm, basınç 19 bar



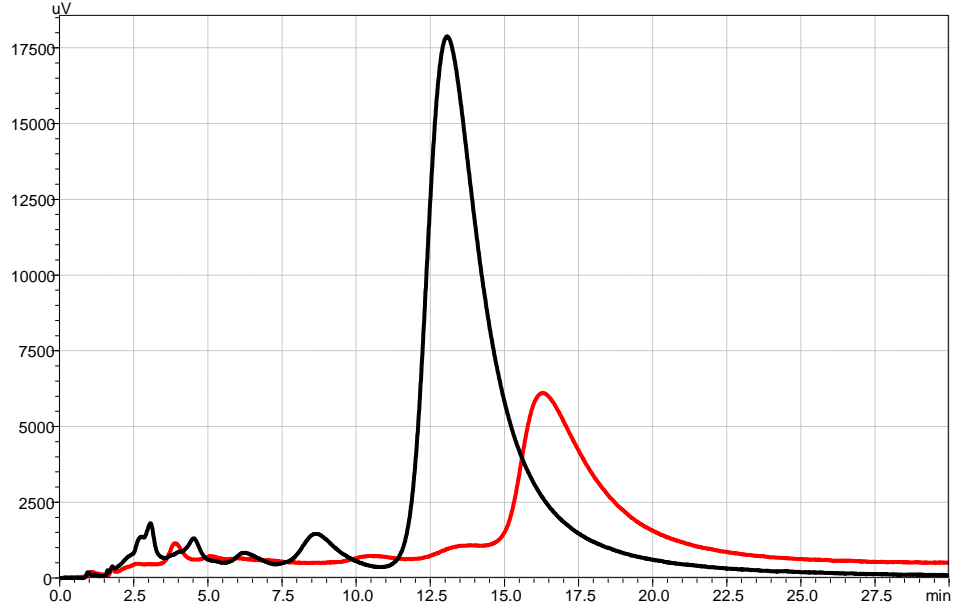
- b) Mobil faz %20AcN-%80 Et-OH, akış hızı 1 mL/dk
dalga boyu 450 nm, basınç 35 bar



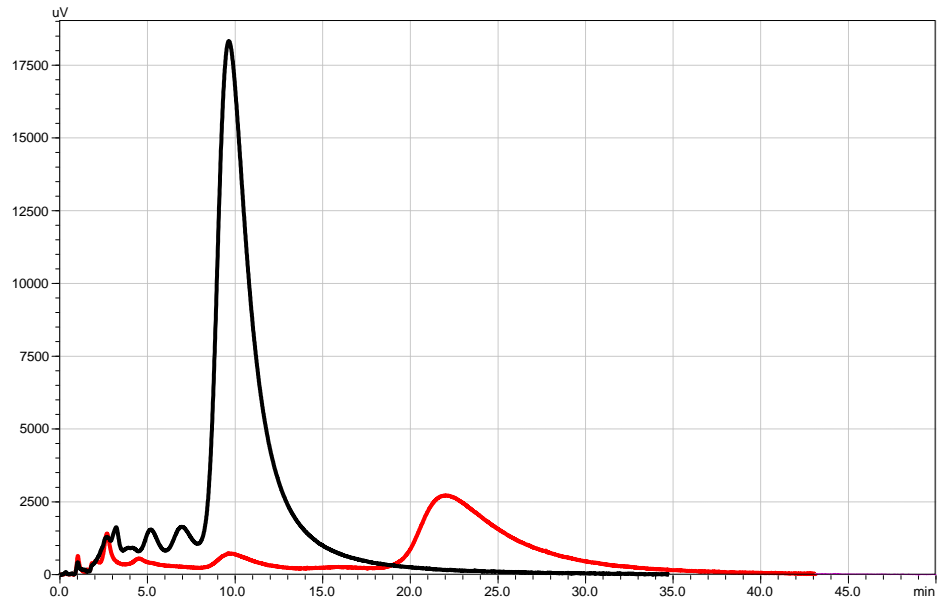
Şekil 3.12. S-2 kodlu kolon dolgu maddesine ait sıvı kromatogramları

- **S-3 kodlu kolon için ayırma davranışı;**

a) Mobil faz %80AcN-%20 Et-OH, akış hızı 1 mL/dk
dalga boyu 450 nm, basınç 28 bar



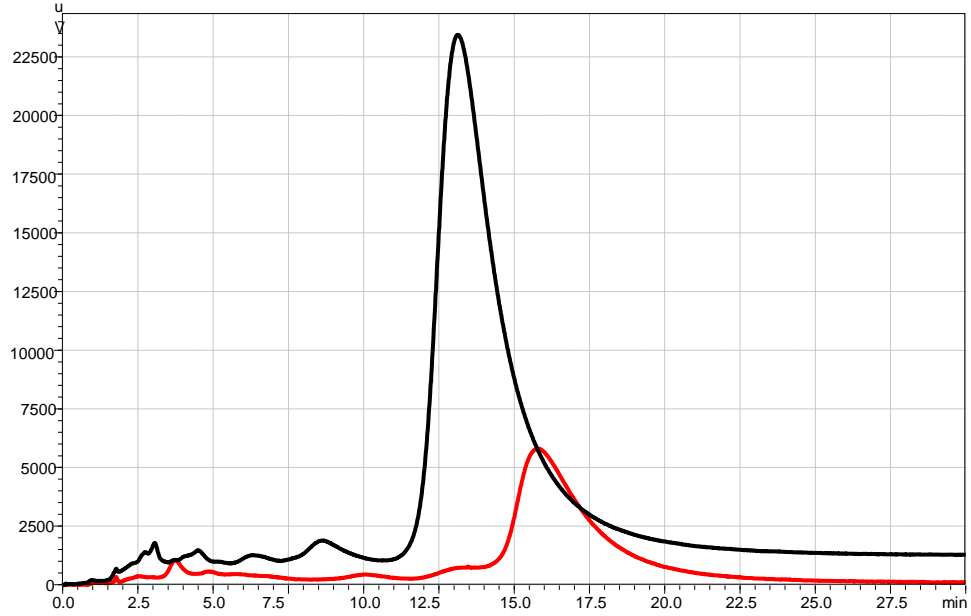
b) Mobil faz %20AcN-%80 Et-OH, akış hızı 1 mL/dk
dalga boyu 450 nm, basınç 46 bar



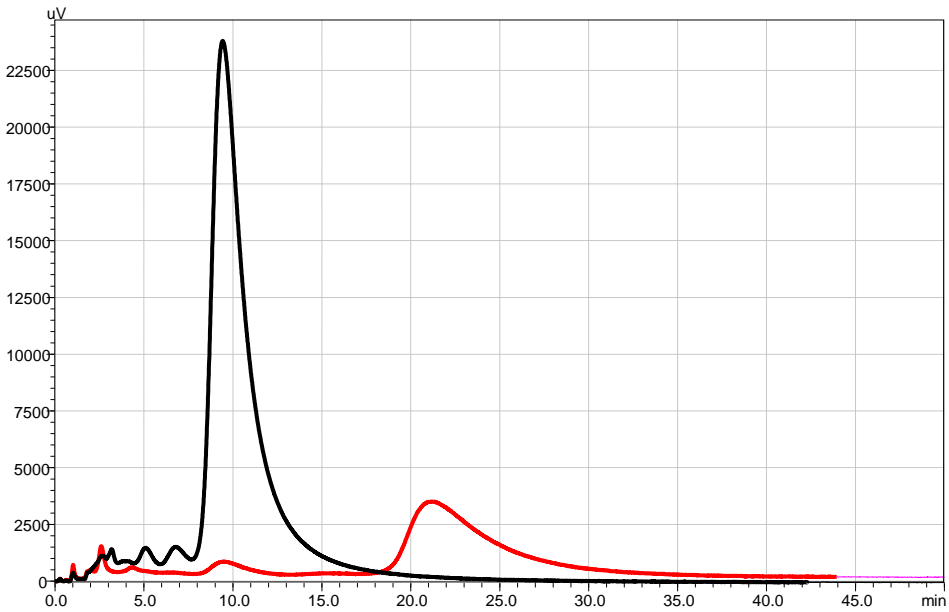
Şekil 3.13. S-3 kodlu kolon dolgu maddesine ait sıvı kromatogramları

- **S-4 kodlu kolon için ayırma davranışı;**

a) Mobil faz %80AcN-%20 Et-OH, akış hızı 1 mL/dk
dalga boyu 450 nm, basınç 17 bar



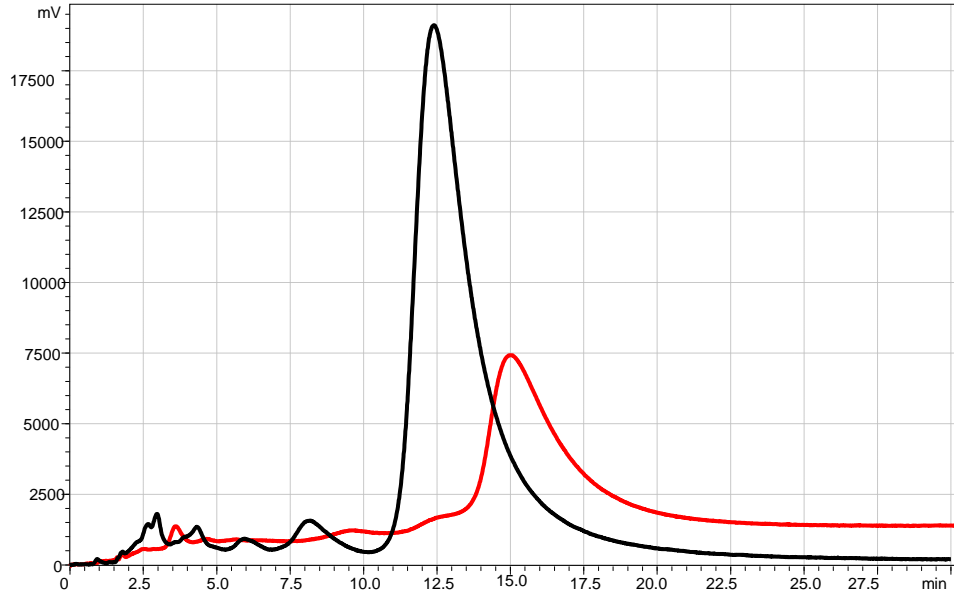
b) Mobil faz %20AcN-%80 Et-OH, akış hızı 1 mL/dk
dalga boyu 450 nm, basınç 34 bar



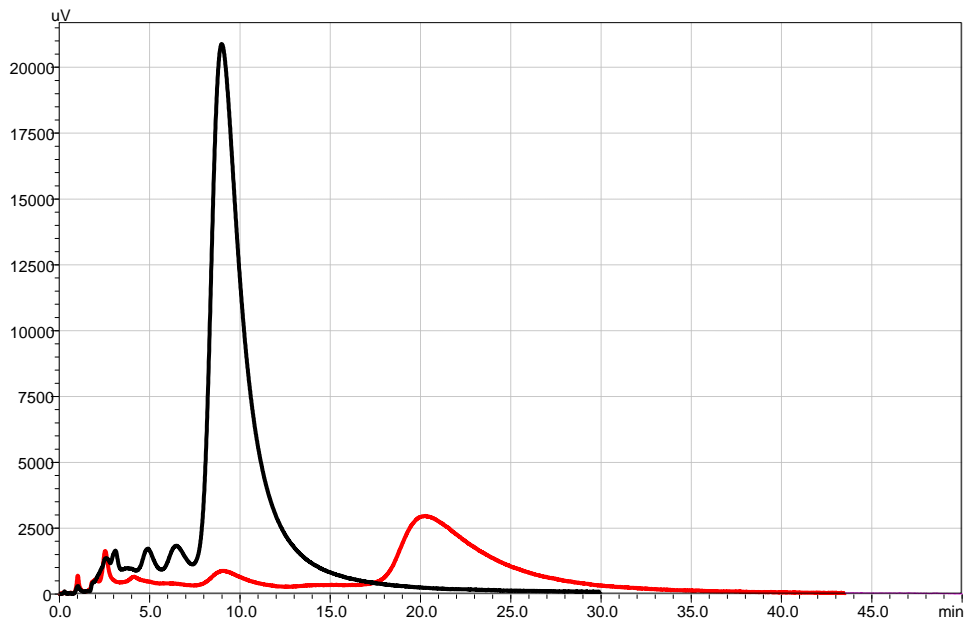
Şekil 3.14. S-4 kodlu kolon dolgu maddesine ait sıvı kromatogramları

- **S-5 kodlu kolon için ayırma davranışı;**

a) Mobil faz %80AcN-%20 Et-OH, akış hızı 1 mL/dk
dalga boyu 450 nm, basınç 23 bar



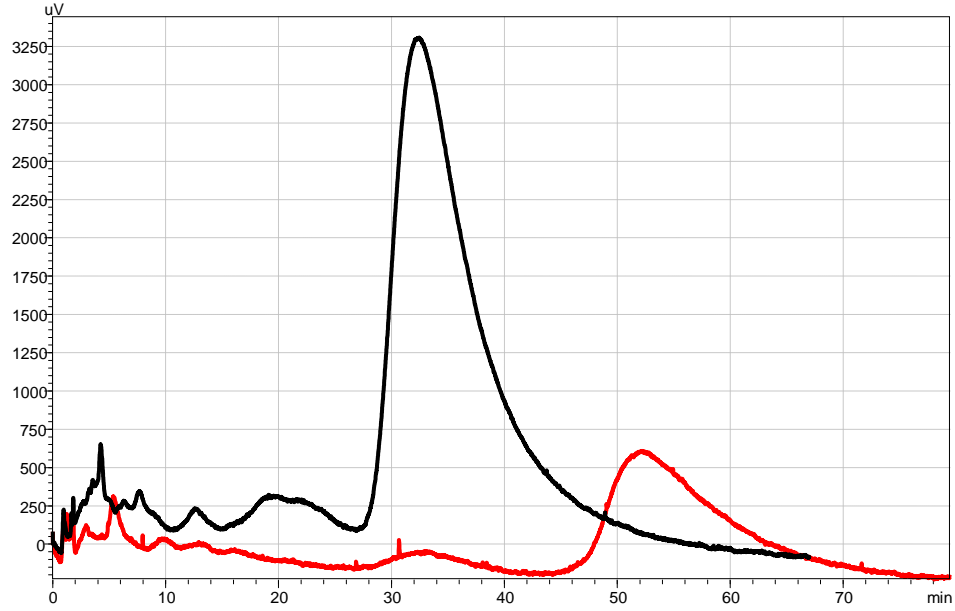
b) Mobil faz %20AcN-%80 Et-OH, akış hızı 1 mL/dk
dalga boyu 450 nm, basınç 43 bar



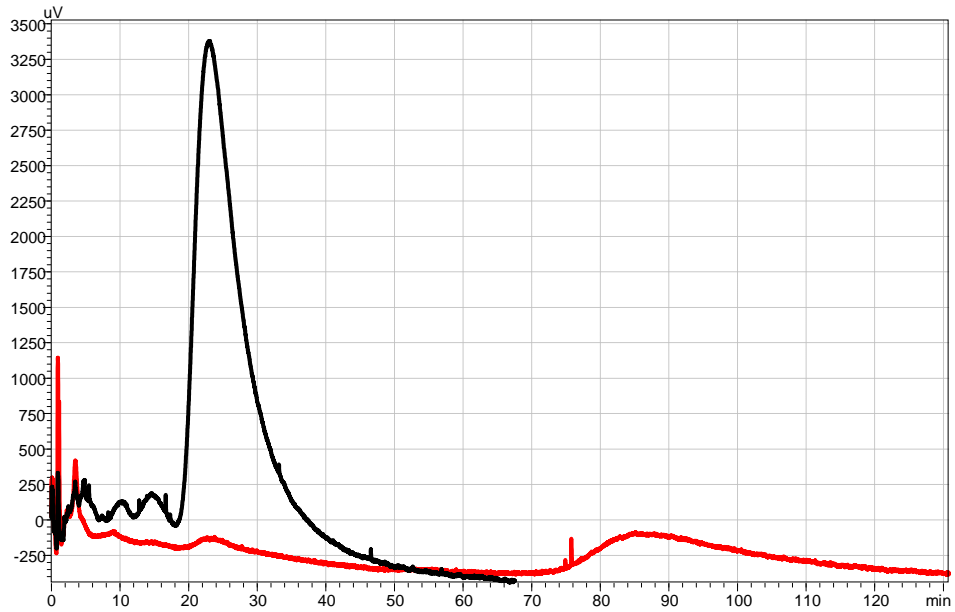
Şekil 3.15. S-5 kodlu kolon dolgu maddesine ait sıvı kromatogramları

- S-6 kodlu kolon için ayırma davranışı;

a) Mobil faz %80AcN-%20 Et-OH, akış hızı 1 mL/dk
dalga boyu 450 nm, basınç 78 bar



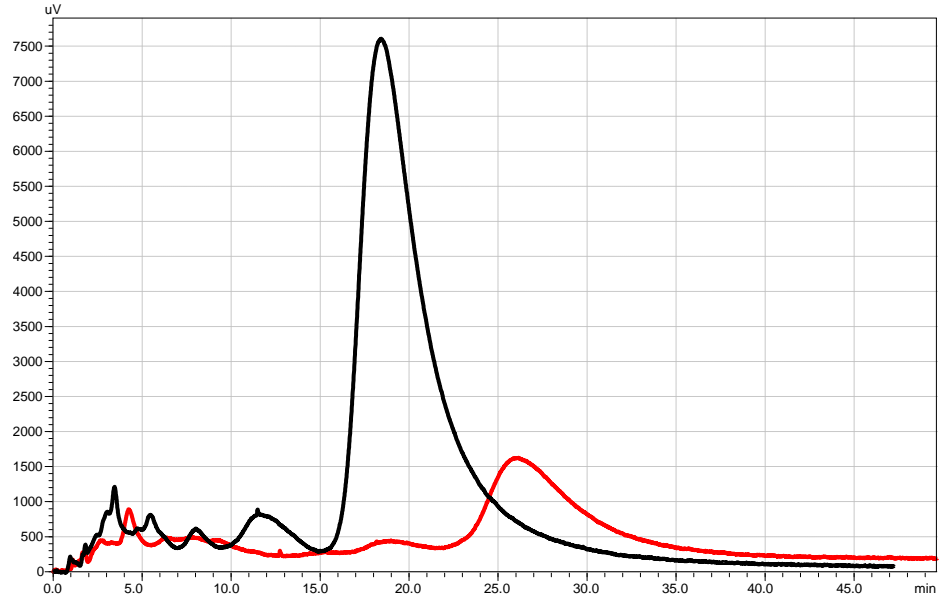
b) Mobil faz %20AcN-%80 Et-OH, akış hızı 1 mL/dk
dalga boyu 450 nm, basınç 100 bar



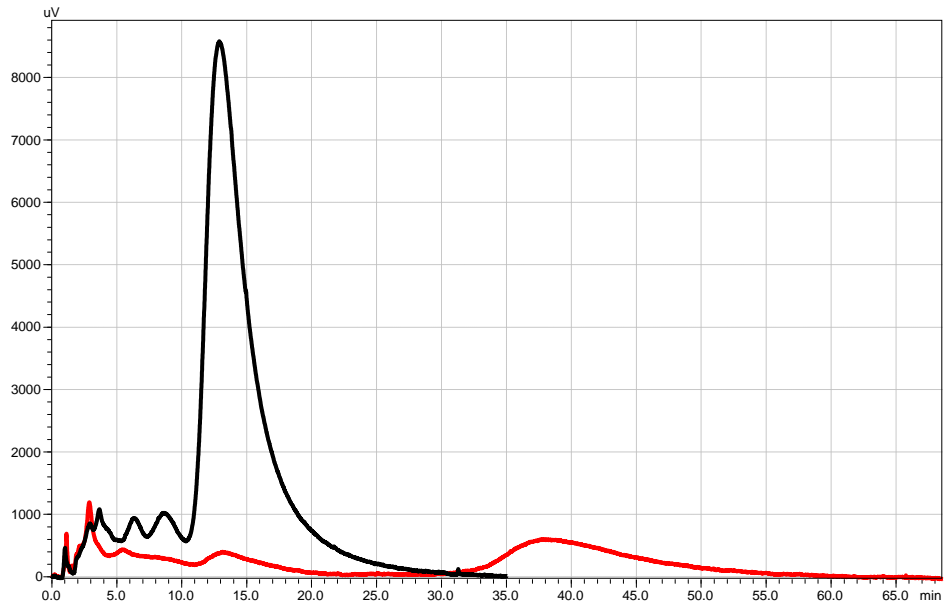
Şekil 3.16. S-6 kodlu kolon dolgu maddesine ait sıvı kromatogramları

- S-7 kodlu kolon için ayırma davranışı;

a) Mobil faz %80AcN-%20 Et-OH, akış hızı 1 mL/dk
dalga boyu 450 nm, basınç 80 bar



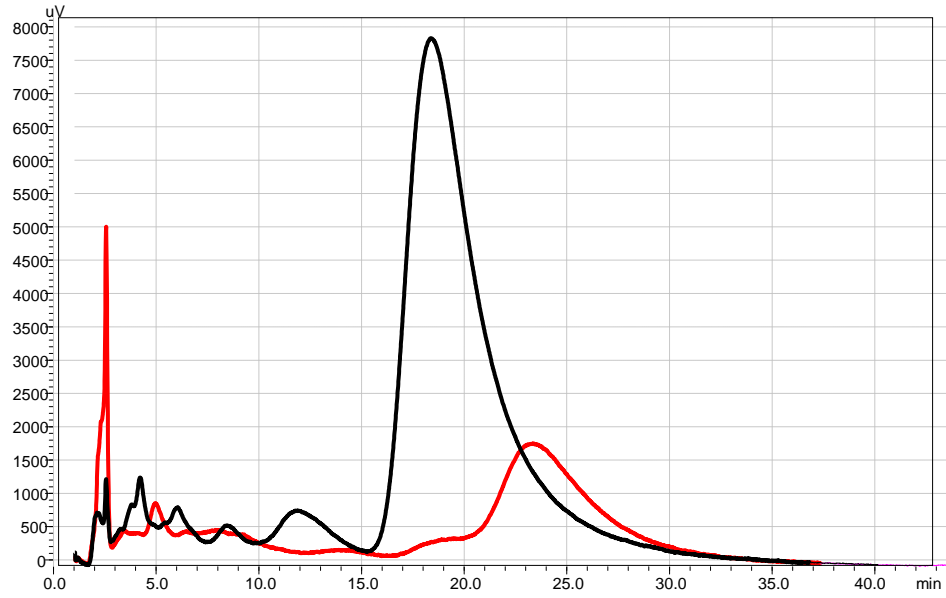
b) Mobil faz %20AcN-%80 Et-OH, akış hızı 1 mL/dk
dalga boyu 450 nm, basınç 120 bar



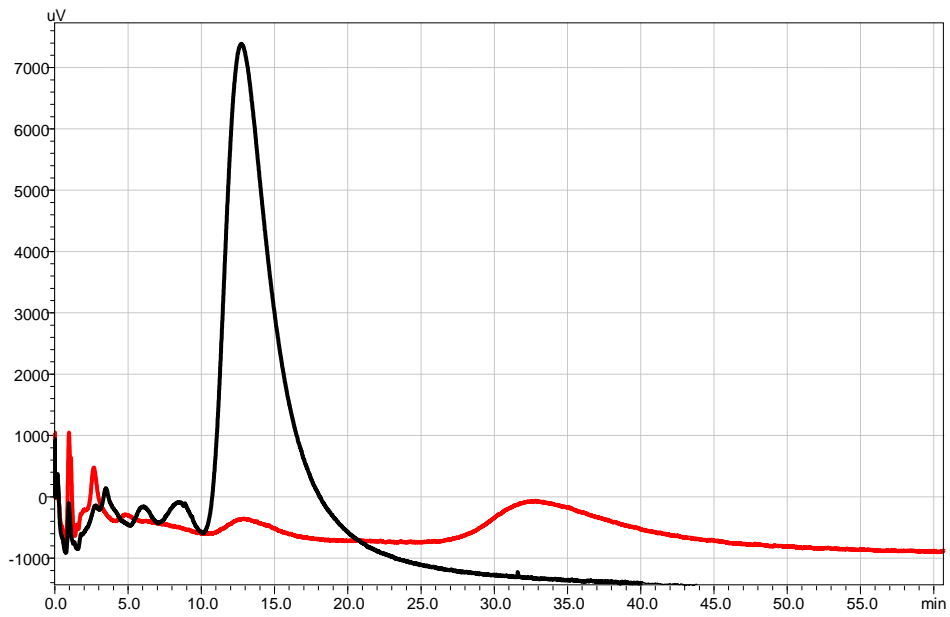
Şekil 3.17. S-7 kodlu kolon dolgu maddesine ait sıvı kromatogramları

- S-8 kodlu kolon için ayırma davranışı;

a) Mobil faz %80AcN-%20 Et-OH, akış hızı 1 mL/dk
dalga boyu 450 nm, basınç 82 bar



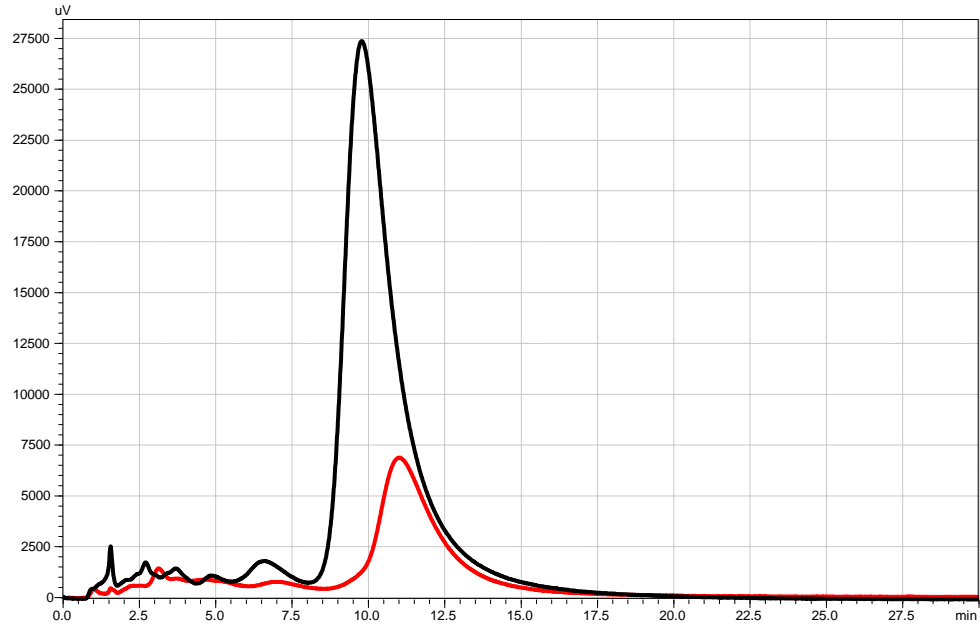
b) Mobil faz %20AcN-%80 Et-OH, akış hızı 1 mL/dk
dalga boyu 450 nm, basınç 110 bar



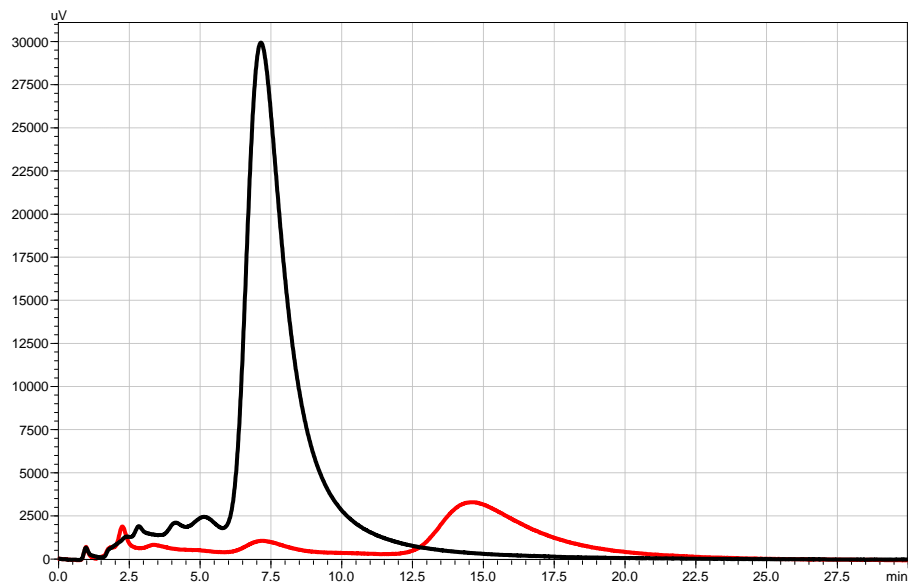
Şekil 3.18. S-8 kodlu kolon dolgu maddesine ait sıvı kromatogramları

- S-9 kodlu kolon için ayırma davranışı;

a) Mobil faz %80AcN-%20 Et-OH, akış hızı 1 mL/dk
dalga boyu 450 nm, basınç 34 bar



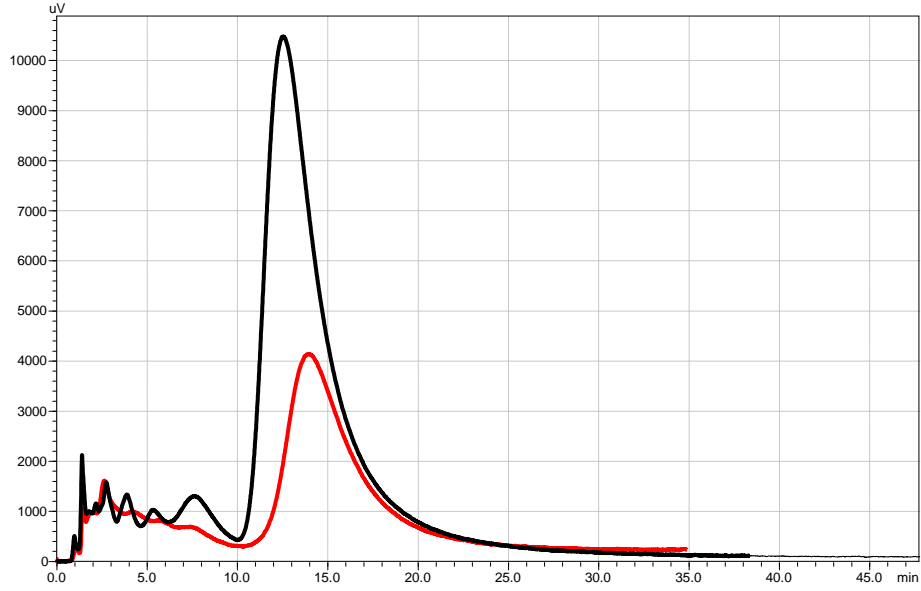
b) Mobil faz %20AcN-%80 Et-OH, akış hızı 1 mL/dk
dalga boyu 450 nm, basınç 59 bar



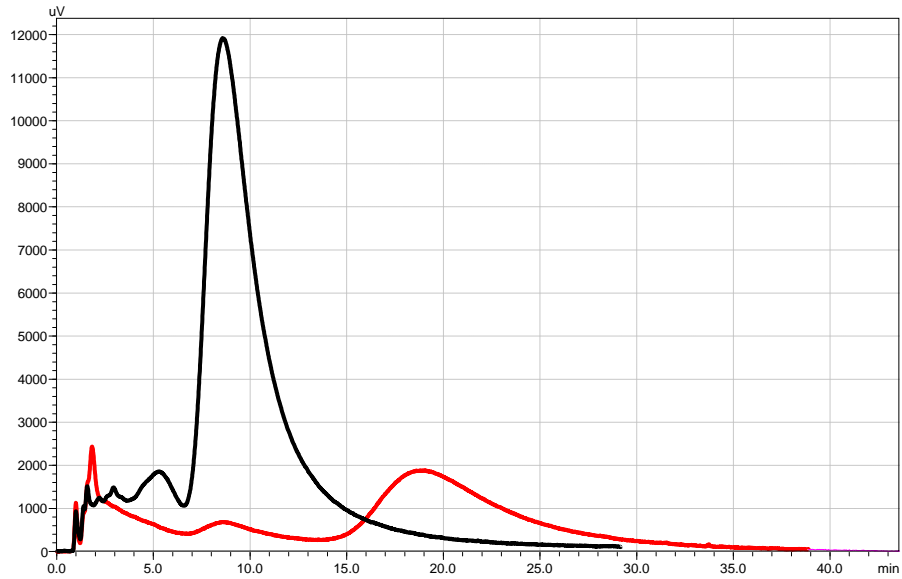
Şekil 3.19. S-9 kodlu kolon dolgu maddesine ait sıvı kromatogramları

- S-10 kodlu kolon için ayırma davranışı;

a) Mobil faz %80AcN-%20 Et-OH, akış hızı 1 mL/dk
dalga boyu 450 nm, basınç 90 bar



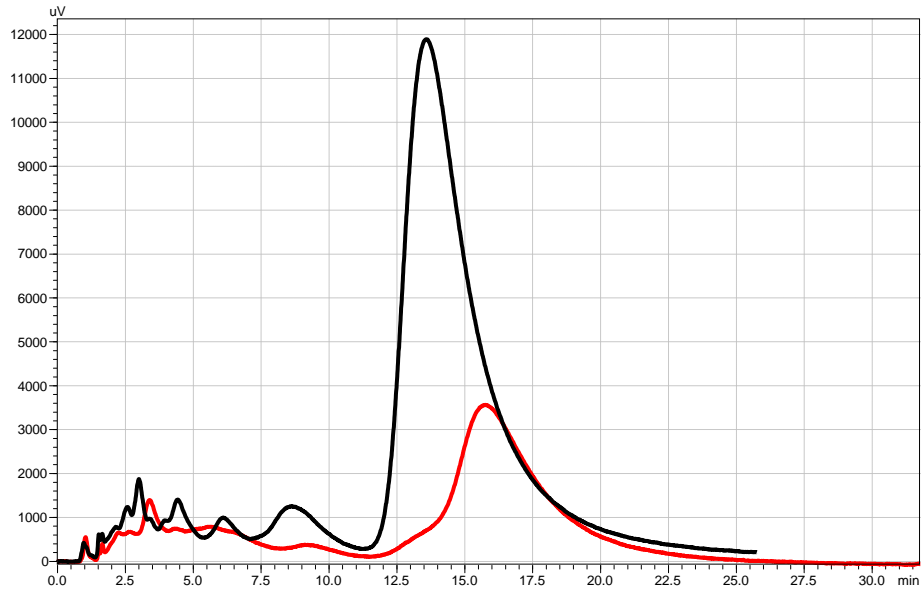
b) Mobil faz %20AcN-%80 Et-OH, akış hızı 1 mL/dk
dalga boyu 450 nm, basınç 132 bar



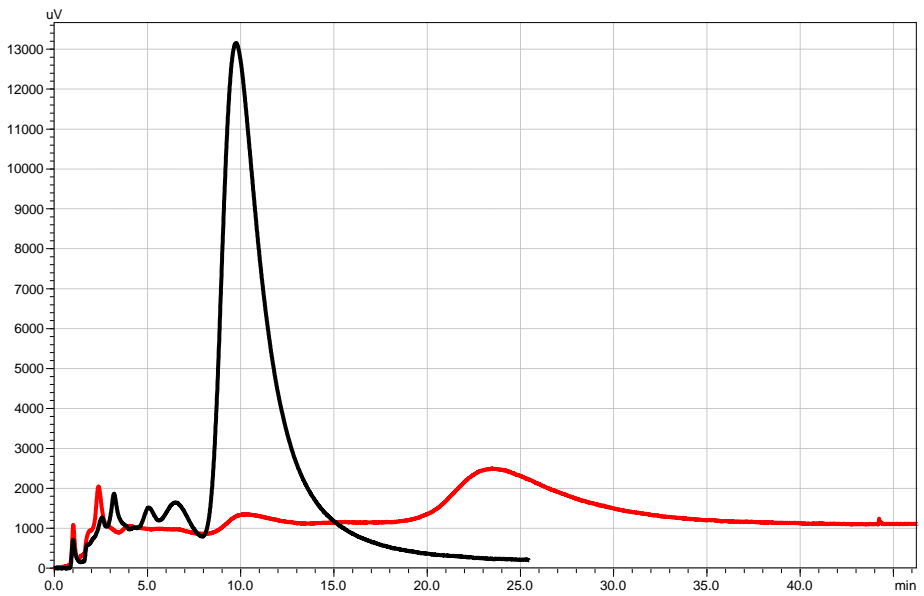
Şekil 3.20. S-10 kodlu kolon dolgu maddesine ait sıvı kromatogramları

- S-11 kodlu kolon için ayırma davranışı;

a) Mobil faz %80AcN-%20 Et-OH, akış hızı 1 mL/dk
dalga boyu 450 nm, basınç 100 bar



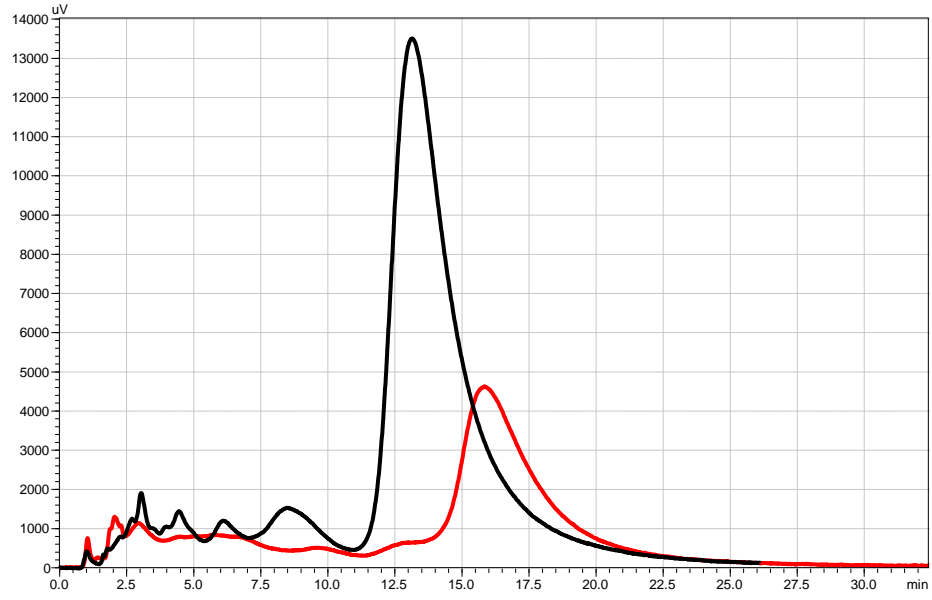
b) Mobil faz %20AcN-%80 Et-OH, akış hızı 1 mL/dk
dalga boyu 450 nm, basınç 119 bar



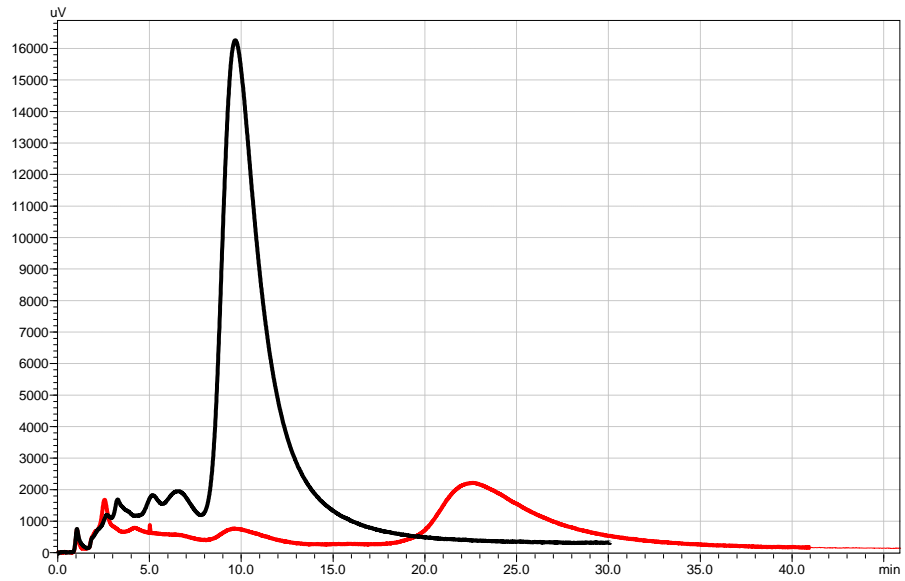
Şekil 3.21. S-11 kodlu kolon dolgu maddesine ait sıvı kromatogramları

- S-12 kodlu kolon için ayırma davranışı;

a) Mobil faz %80AcN-%20 Et-OH, akış hızı 1 mL/dk
dalga boyu 450 nm, basınç 84 bar



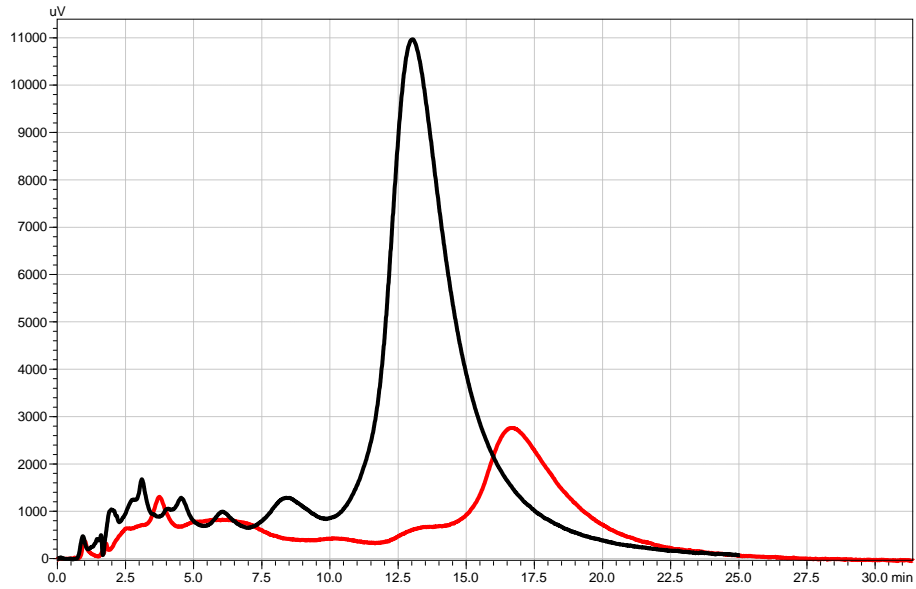
b) Mobil faz %20AcN-%80 Et-OH, akış hızı 1 mL/dk
dalga boyu 450 nm, basınç 102 bar



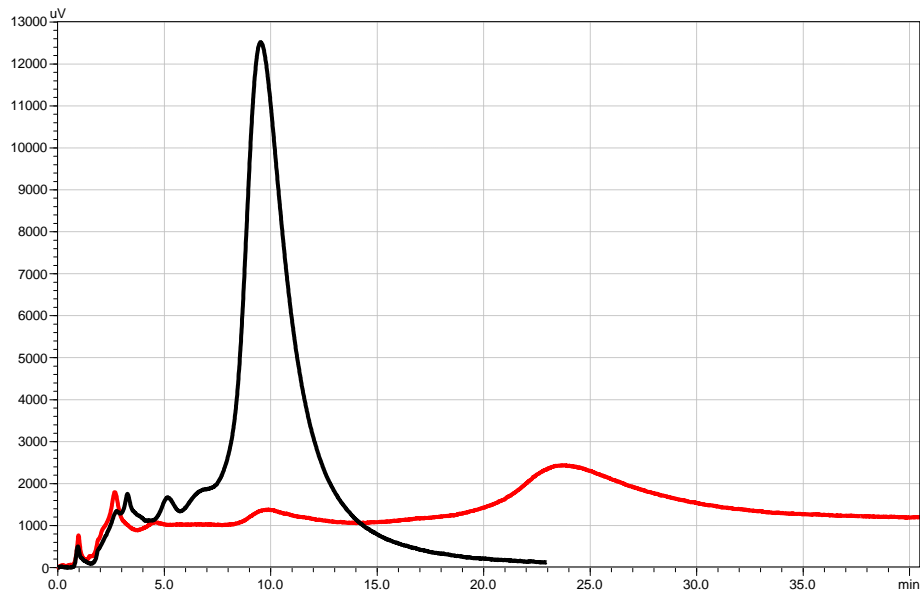
Şekil 3.22. S-12 kodlu kolon dolgu maddesine ait sıvı kromatogramları

- S-13 kodlu kolon için ayırma davranışı;

a) Mobil faz %80AcN-%20 Et-OH, akış hızı 1 mL/dk
dalga boyu 450 nm, basınç 55 bar



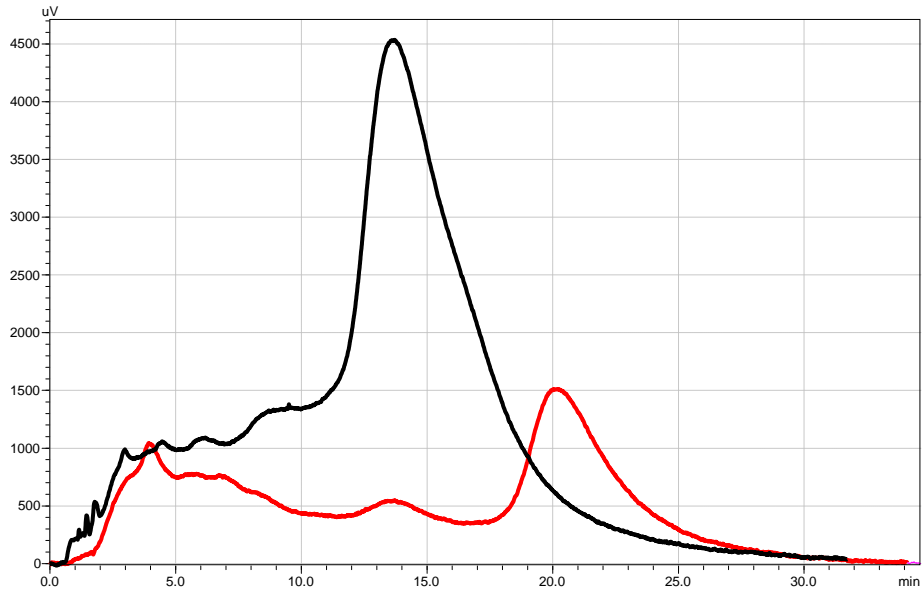
b) Mobil faz %20AcN-%80 Et-OH, akış hızı 1 mL/dk
dalga boyu 450 nm, basınç 76 bar



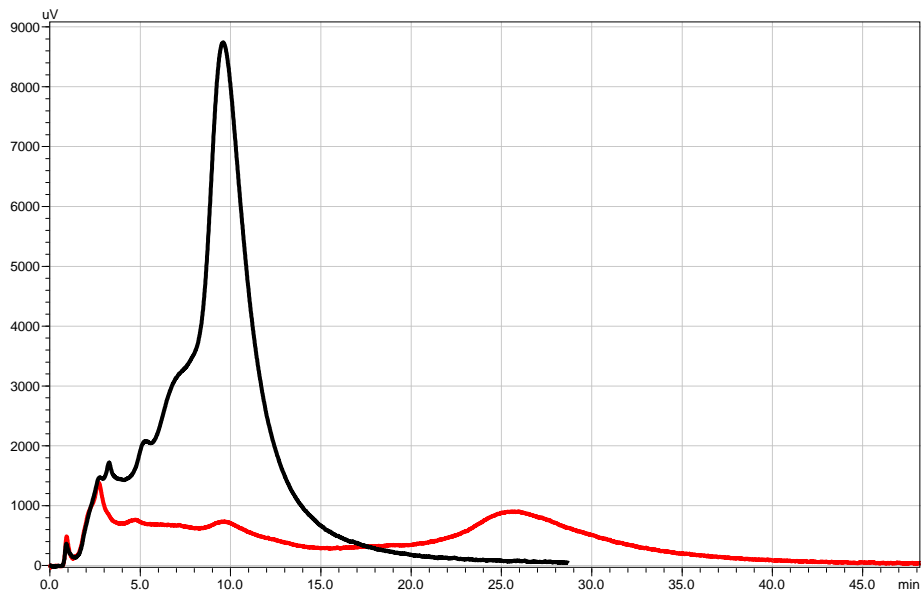
Şekil 3.23. S-13 kodlu kolon dolgu maddesine ait sıvı kromatogramları

- **S-14 kodlu kolon için ayırma davranışı;**

a) Mobil faz %80AcN-%20 Et-OH, akış hızı 1 mL/dk
dalga boyu 450 nm, basınç 74 bar



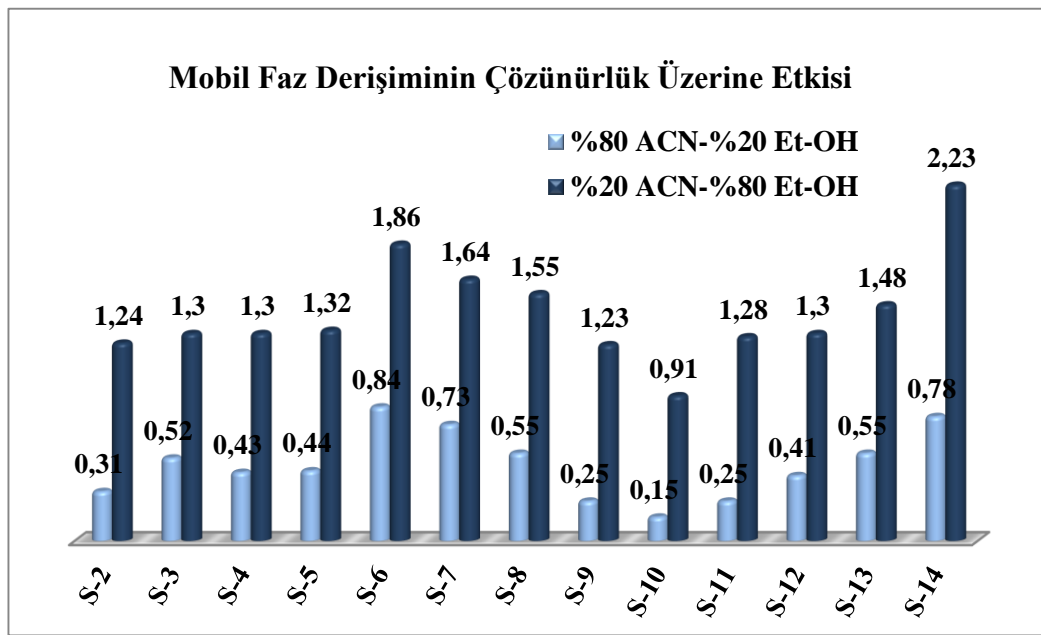
b) Mobil faz %20AcN-%80 Et-OH, akış hızı 1 mL/dk
dalga boyu 450 nm, basınç 118 bar



Şekil 3.24. S-14 kodlu kolon dolgu maddesine ait sıvı kromatogramları

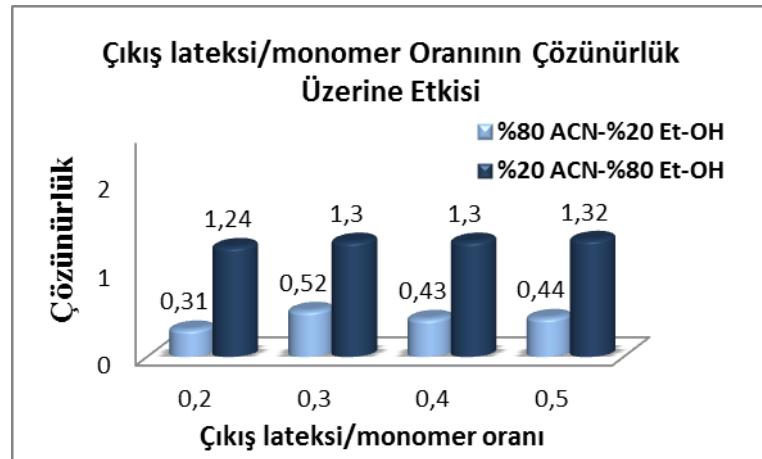
3.2.3.2. Farklı (THFA-co-DVB) Kolonlarda Farklı Mobil Faz Değişimleri ile Elde Edilen Kromatogramlardan Hesaplanan Likopen ve β -karoten İçin Pik Çözünürlüğü

Kromatografik çalışmaların bu kısmında, sentezlenen THFA-DVB bazlı kolonların, sabit akış hızında (1 mL/dk) farklı polariteye sahip 2 farklı mobil faz konsantrasyonunda ayırma performansları izokratik modda incelenmiştir. Uygulanan performans testlerinde mobil faz olarak asetonitril-etanol karışımı kullanılmıştır.



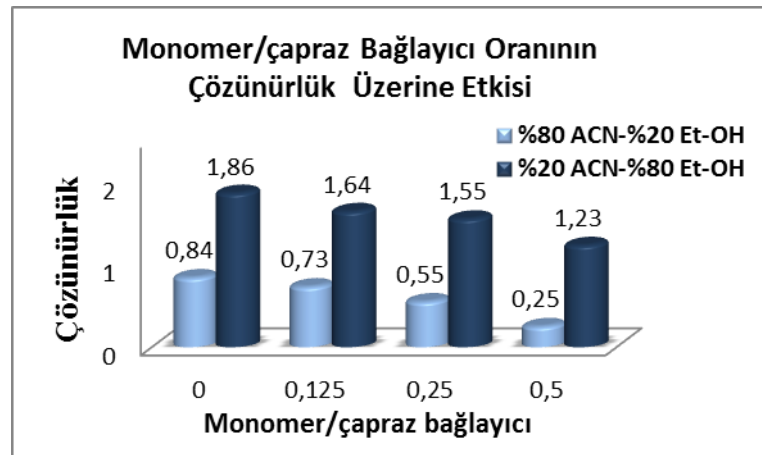
Şekil 3.25. Mobil faz konsantrasyonunun pik çözünürlüğü üzerine etkisi

Şekil 3.25'teki grafiğe bakıldığında çıkış lateksi miktarı, monomer miktarı, porojen miktarı ne olursa olsun %20 AcN-%80 Et-OH mobil faz kullanımının, kromatografide iki pikin birbirinden ayrılma derecesi olan çözünürlük bakımından daha iyi sonuçlar verdiği görülmektedir. Karşılaştırmalı kromatogramlar ve çözünürlük değerleri göz önüne alındığında pikler için ayrılma sınırı olan $R \geq 1$ 'in bütün %20 AcN-%80 Et-OH mobil fazın kullanıldığı durumlarda sağlandığı ve likopen ile β -karotenin başarılı bir şekilde ayrıldığı görülmektedir. Bütün kolon dolgu malzemeleri içinde mobil faz konsantrasyonunun çözünürlük üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$).



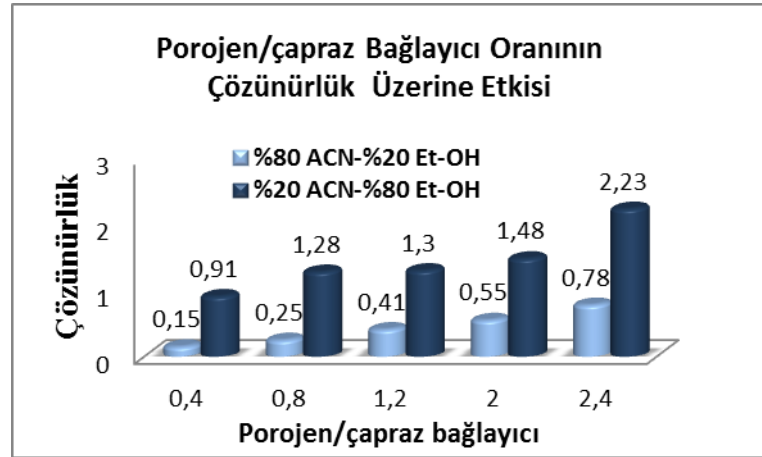
Şekil 3.26. Farklı çıkış lateksi/monomer oranlarının likopen ve β -karotenin ayrılma derecesi üzerine etkisi

Farklı çıkış lateksi/monomer oranlarında sentezlenen kolon dolgu maddeleri (S-2, S-3, S-4 ve S-5) için likopen ve β -karotenin ayrılma derecesi üzerine etkisi Şekil 3.26'da gösterilmektedir. Artan miktarlarda çıkış lateksinin piklerin çözünürlüğü üzerine etkisi, mobil faz konsantrasyonunun %80 AcN-%20 Et-OH olduğu koşulda istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). Fakat mobil faz konsantrasyonunun %20 AcN-%80 Et-OH olduğu durumda örnekler arası farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p > 0.05$). Farklı monomer/çapraz bağlayıcı oranlarında ise her iki mobil faz konsantrasyonunda gruplar arası farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Artan monomer miktarı piklerin çözünürlük değerlerini değiştirmiştir. Her iki mobil faz konsantrasyonunda da bu grup adsorbanlar (S-6, S-7, S-8 ve S-9) için piklerin birbirinden ayrılma derecesi azalmıştır.



Şekil 3.27. Farklı monomer/çapraz bağlayıcı oranlarının likopen ve β -karotenin ayrılma derecesi üzerine etkisi

Polimer reçetesindeki porojen/çapraz bağlayıcı oranının çözünürlük üzerine etkisi incelenecek olursa (Şekil 3.28), kolonun ayırma performansının her iki mobil faz derişimi içinde değiştiği görölmektedir. Porojen miktarı arttıkça çözünürlükte istatistiksel olarak önemli ölçüde artmıştır ($p < 0.05$).



Şekil 3.28. Farklı porojen/çapraz bağlayıcı oranlarının likopen ve β -karotenin ayrılma derecesi üzerine etkisi

3.2.3.3. Farklı (THFA-co-DVB) Kolonlarda Farklı Mobil Faz Derişimleri ile Elde Edilen Kromatogramlardan Hesaplanan Likopen ve β -karoten için Alıkonma Faktörü

Alıkonma faktörü akış hızından bağımsız olarak analitin kolonda alıkonma süresini tanımlayan bir büyüklüktür ve kolon içerisinde yer alan partikül ile mobil faz içindeki analitin etkileşiminin ölçüsüdür. Alıkonma faktörü kolonların polarite analizinde literatürde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Tablo 3.4 incelenecek olursa; artan miktarlarda çıkış lateksi/monomer oranı da artan miktarlarda porojen/çapraz bağlayıcı oranı da her iki mobil faz ve her iki analit içinde bileşenlerin alıkonma faktörünü etkilememiştir ($p > 0.05$). Sadece değişen monomer/çapraz bağlayıcı oranlarının alıkonma faktörü üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p > 0.05$). Reçetedeki monomer miktarı arttıkça bileşenlerin kolonda tutulma süreleri kısalmıştır. Bu da artan miktarlarda monomer miktarının kolon dolgu maddesinin polaritesini değiştirdiğinin bir göstergesidir. DVB apolar karakterli, THFA ise polar karakterli bir monomerdır.

Polimer reçetesindeki THFA miktarı arttıkça kolonun polaritesi de artmıştır ve apolar karakterli likopen ve β -karotenin kolonda tutulma süreleri de istatistiksel olarak önemli ölçüde azalmıştır.

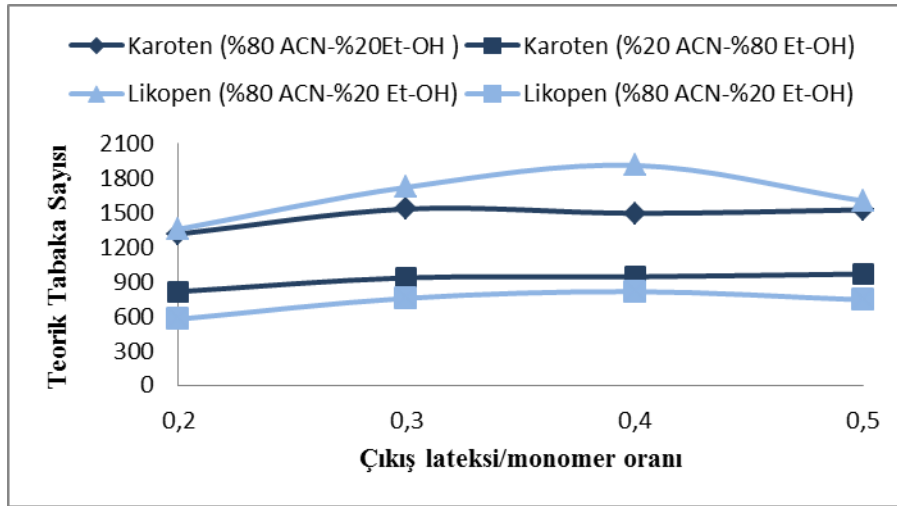
Tablo 3.4. Sentezlenen adsorbanlara ait alıkonma faktörü değerleri

		<i>β-karoten</i>		<i>Likopen</i>	
		Alıkonma Faktörü		Alıkonma Faktörü	
		%80 ACN– %20 Et-OH	%20 ACN– %80 Et-OH	%80 ACN– %20 Et-OH	%20 ACN– %80 Et-OH
	S-1	-	-	-	-
Farklı çıkış lateksi/monomer oranları	S-2	14.077 ^A	9.590 ^A	16.205 ^A	22.099 ^A
	S-3	13.062 ^A	9.652 ^A	16.272 ^A	21.968 ^A
	S-4	13.113 ^A	9.419 ^A	15.793 ^A	21.158 ^A
	S-5	12.395 ^A	8.985 ^A	14.995 ^A	20.262 ^A
	S-6	32.461 ^A	23.090 ^A	52.185 ^A	85.109 ^A
Farklı monomer /çapraz bağlayıcı oranları	S-7	18.425 ^B	12.892 ^{AB}	26.137 ^B	37.772 ^B
	S-8	17.747 ^B	12.712 ^{AB}	22.876 ^B	32.821 ^B
	S-9	9.774 ^B	7.139 ^B	11.020 ^C	14.634 ^C
	S-10	12.511 ^A	8.592 ^A	13.936 ^A	18.923 ^A
Farklı porojen /çapraz bağlayıcı oranları	S-11	13.574 ^A	9.762 ^A	15.745 ^A	23.448 ^A
	S-12	13.138 ^A	9.661 ^A	15.833 ^A	22.629 ^A
	S-13	13.036 ^A	9.513 ^A	16.717 ^A	23.807 ^A
	S-14	13.717 ^A	9.590 ^A	20.017 ^A	25.714 ^A

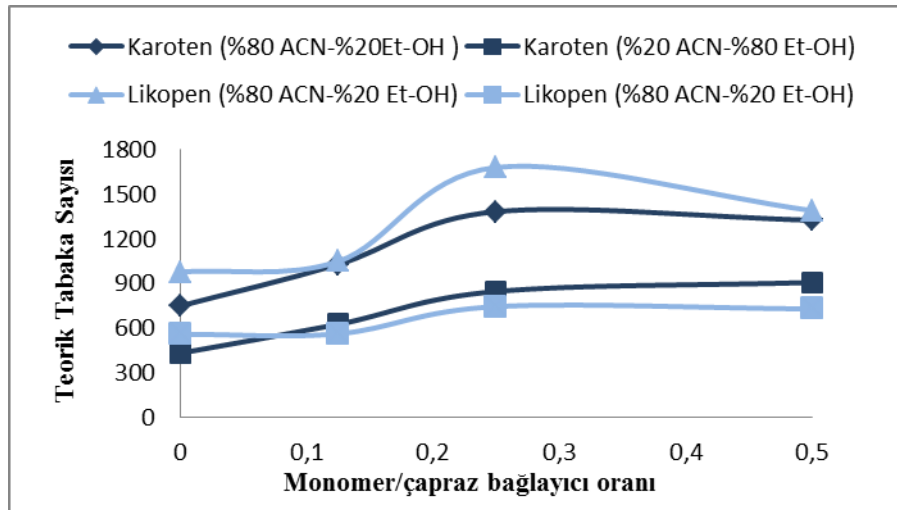
A-D: Aynı sütundaki birbirinden farklı harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P < 0.05$) olduğunu göstermektedir.

3.2.3.4. Farklı (THFA-co-DVB) Kolonlarda Farklı Mobil Faz Derişimleri ile Elde Edilen Kromatogramlardan Hesaplanan Teorik Tabaka Sayısı Değerleri

Yapılan çalışmada, farklı AcN derişimlerinde teorik tabaka sayısı 1000-2000 civarında değişen kolonlar elde edilmiştir. Düşük solvent derişimi ile yüksek ayırma veriminin elde edilebildiği başarılı kolon dolgu maddeleri sentezlenmiştir.



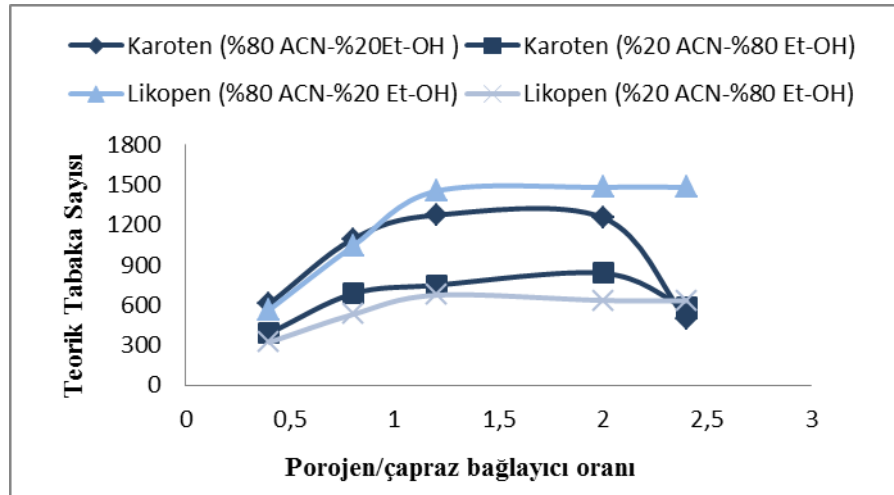
Şekil 3.29. Farklı çıkış lateksi/monomer oranlarının kolonların teorik tabaka sayısı üzerine etkisi



Şekil 3.30. Farklı monomer/çapraz bağlayıcı oranlarının kolonların teorik tabaka sayısı üzerine etkisi

Şekil 3.29, Şekil 3.30 ve Şekil 3.31 farklı reçetelerdeki sentez parametrelerinin kolon dolgu maddelerinin teorik tabaka sayısı üzerlerine etkilerini göstermektedir. Tez

çalışması boyunca kullanılan her iki mobil faz konsantrasyonunda ve her iki analit kullanımında da çıkış lateksi/monomer oranının teorik tabaka sayısı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Aynı şekilde değişen monomer/çapraz bağlayıcı oranının ve değişen porojen/çapraz bağlayıcı oranının da kolonların teorik tabaka sayısı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). En yüksek teorik tabaka sayısı değerleri çıkış lateksi/monomer oranının 0.4 olduğu, monomer/çapraz bağlayıcı oranının 0.4 olduğu ve porojen/çapraz bağlayıcı oranının da 2 olduğu koşullarda elde edilmiştir. Fakat en iyi özellikteki kolon dolgu malzemesi seçimi için bütün test parametreleri, kolon dolgu maddelerinin monodispersitesi ve morfolojik özellikleri hep birlikte değerlendirilmiştir.



Şekil 3.31. Farklı çıkış porojen/çapraz bağlayıcı oranlarının kolonların teorik tabaka sayısı üzerine etkisi

3.2.3.5. Farklı (THFA-co-DVB) Kolonlarda Farklı Mobil Faz Değişimleri ile Elde Edilen Kromatogramlardan Hesaplanan Teorik Tabaka Yüksekliği Değerleri

Teorik tabaka yüksekliği bir kolonun ne kadar hızlı ve etkin çalıştığının bir göstergesidir. Teorik tabaka yüksekliği teorik tabaka sayısı ile ters orantılıdır. Bir kolonun iyi performans gösterebilmesi için teorik tabaka katsayısının yüksek olması istenirken teorik tabaka yüksekliğinin de düşük olması istenir. Likopen ve β -karotenin analit olarak kullanıldığı durumda her iki mobil faz konsantrasyonunda da, kolonların teorik tabaka yüksekliği üzerine değişen çıkış lateksi/monomer oranının

monomer/çapraz bağlayıcı oranının ve değişen porojen/çapraz bağlayıcı oranının da etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$)

Tablo 3.5. Sentezlenen adsorbanlara ait teorik tabaka yüksekliği değerleri

Mobil faz	<i>β-karoten</i>		<i>Likopen</i>	
	Teorik Tabaka Yüksekliği		Teorik Tabaka Yüksekliği	
	%80 ACN– %20 Et-OH	%20 ACN– %80 Et-OH	%80 ACN– %20 Et-OH	%20 ACN– %80 Et-OH
S-1	-	-	-	-
S-2	0.077	0.122	0.073	0.173
S-3	0.065	0.107	0.058	0.132
S-4	0.066	0.106	0.052	0.122
S-5	0.065	0.062	0.103	0.134
S-6	0.133	0.232	0.102	0.179
S-7	0.097	0.095	0.160	0.178
S-8	0.072	0.118	0.059	0.114
S-9	0.075	0.110	0.071	0.137
S-10	0.164	0.256	0.176	0.310
S-11	0.091	0.145	0.097	0.188
S-12	0.078	0.133	0.068	0.148
S-13	0.079	0.067	0.119	0.157
S-14	0.201	0.172	0.067	0.158

3.3. Domatesten Likopen Saflaştırılması

3.3.1. Domateste Yapılan Analizler

Domates meyvesinin önemli bir kısmı sudan oluşmaktadır. Geriye kalan kısmında ise karbonhidratlar, organik asitler, aminoasitler, vitaminler, pigmentler, fenolik bileşikler ve çeşitli mineral maddeleri bulunmaktadır. Meyvenin gelişimi ve olgunlaşması sırasında bu bileşenlerde önemli değişimler meydana gelmektedir. Belli başlı değişimler; nişastanın parçalanması, glikoz ve fruktozun sentezlenmesi, klorofilin parçalanması, karoten ve likopenin sentezlenmesi, aroma bileşenlerinin meydana gelmesi şeklinde sıralanabilir. Meyvenin büyüme ve olgunlaşmasına paralel olarak meydana gelen bu olaylar meyvenin renginde, tat ve tekstüründe değişimlere neden olurlar [62, 159].

Yapılan tez çalışmasında domates meyvesi tüm halde parçalanmış ve domates pulpu elde edilmiştir. Elde edilen pulp paket preslerden geçirilmiş ve 5000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Böylece parçalanan domates, posa ve serum suyu olmak üzere iki forma ayrılmıştır. Ayrılan bu formlardan domates serum suyunda organik asit ve şeker analizi yapılmıştır. Posa ve suda ise toplam likopen analizi yapılmıştır ve posadan likopen saflaştırılmıştır.

3.3.1.1. Kuru Madde Analizi

Domateste meyve kalitesini etkileyen en önemli faktörlerden birisi de kuru madde içeriğidir. Olgun bir domates meyvesinin kuru madde içeriği toplam ağırlığın %5-7'sini oluşturmaktadır. Toplam kuru madde suda çözünebilen ve suda çözünemeyen olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. İndirgen şekerler ve organik asitler suda çözünebilen kısmı oluşturmakta iken, proteinler, pektinler, selüloz ve polisakkaritler çözünemeyen kısımda yer almaktadır [62, 159]. Çalışmada kullanılan domates meyvesine ve ayrılan fraksiyonlarına ait kuru madde içerikleri literatürde belirtilen değerlere eşdeğer bulunmuş ve Tablo 3.6'da verilerek ayrılan domates fraksiyonlarında likopen miktarının hesaplanması aşamasında gerekli hesaplamalarda kullanılmıştır.

Tablo 3.6. Domates fraksiyonlarında kuru madde miktarı

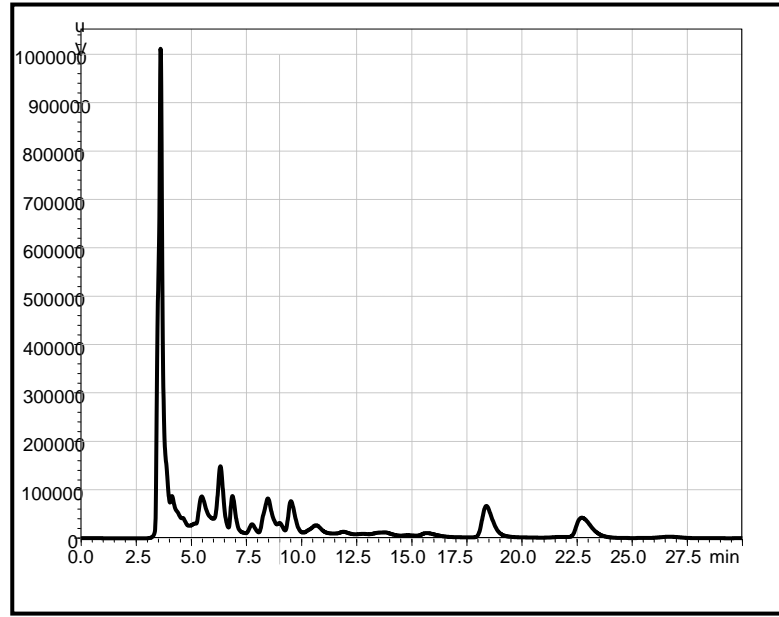
Ürün	Kuru Madde (%)
Domates Pulp	6.39±0.24
Domates Serum Suyu	4.68±0.56
Domates Posası	20.32±1.03

3.3.1.2. Organik Asit ve Şeker Analizi

Meyve ve sebzelerde bulunan organik asitler, şekerlerle birlikte meyvenin karakteristik tadını oluşturması bakımından oldukça önemlidir. Organik asitler taze domateste kuru maddenin yaklaşık %10-20'lik kısmını oluşturmaktadır. Şekerler ise olgun ve taze bir domatesin kuru maddesinin yaklaşık %50-60'ını oluşturmaktadır. Domateste bulunan şekerler glikoz ve fruktoz başta olmak üzere çok az miktarda da sakkarozdan oluşmaktadır. Organik asitler ise; malik, sitrik asit ve askorbik asit başta olmak üzere çok az miktarda formik ve oksalik asitten oluşmaktadır [62]. Yapılan çalışmada domates serum suyunda organik asit ve şeker analizi yapılmıştır. Sonuçlar literatüre benzer bulunmuştur. Domates meyvesine ait organik asit kromatogramı Şekil 3.32'de gösterilmektedir. Tablo 3.7 domates meyvesinde bulunan organik asitlerin konsantrasyonları ppm olarak göstermektedir. Organik asit standart karışımına ait kromatogramı Ek-7'de verilmiştir. Toplam organik asit miktarı 4208.08 mg/kg olarak hesaplanmıştır. Bu da toplam kuru maddenin %6.5'lik kısmına karşılık gelmektedir.

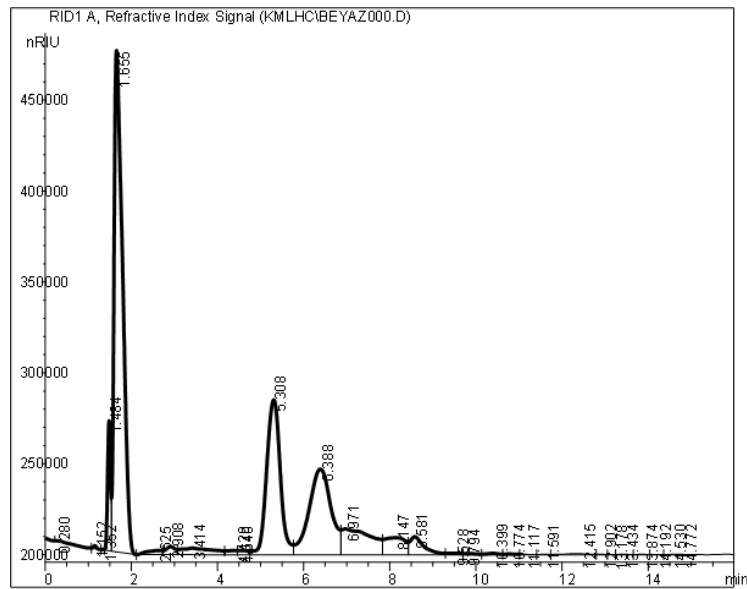
Tablo 3.7. Domates meyvesinde organik asit miktarı

Organik asit	Miktar (ppm)
Malik Asit	1149.13
Sitrik Asit	464.57
Askorbik asit	88.11
Oksalik asit	1121.89
Asetik asit	1384.37
Toplam	4208.08



Şekil 3.32. Domatese ait organik asit kromatogramı

Domates meyvesinde bulunan şekerlere ait kromatogram da Şekil 3.33’de gösterilmektedir. Tablo 3.8 domates meyvesinde bulunan glikoz ve fruktozun konsantrasyonunu ppm olarak göstermektedir. Yapılan analizde toplam şeker miktarı 37156.8 mg/kg domates olarak bulunmuştur ve bu da toplam kuru maddenin %58’ine karşılık gelmektedir ve literatür bilgisi ile benzerlik göstermektedir [159].



Şekil 3.33. Domatesteki bulunan şekerlere ait sıvı kromatogramı

Tablo 3.8. Domates meyvesinde şeker miktarı

Şeker	Miktar (ppm)
Glukoz	19417.6
Fruktoz	17739.2
Toplam	37156.8

Hesaplamalarda kullanılan organik asitlere ve şekerlere ait kalibrasyon doğruları da ekler kısmında (Ek 6-7-8) verilmektedir.

3.3.1.3. Domates Meyvesinde ve Ayrılan Fraksiyonlarında Likopen Analizi

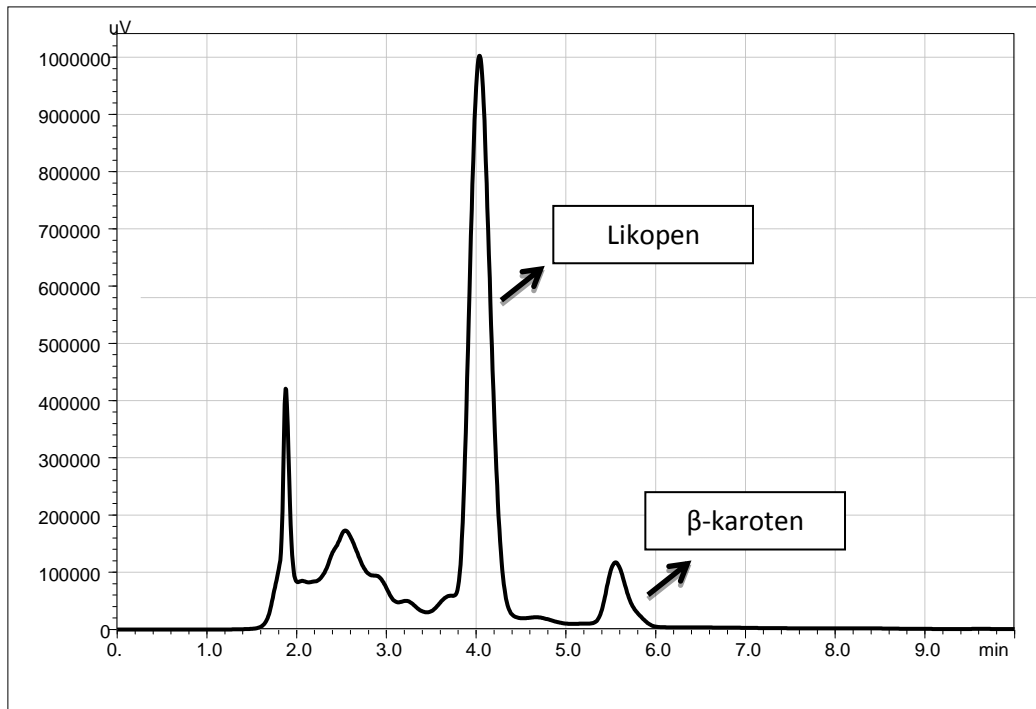
Yapılan çalışmalar sonucunda; domates meyvesinde, domates posasında ve kalan domates suyunda bulunan likopen miktarları belirlenmiştir. Taze domates meyvesi tüm halde ezilerek pulp haline getirilmiş ve içeriğindeki likopen miktarı 331.6 mg/kg taze domates ve β -karoten miktarı ise 30.35 mg/kg taze domates olarak hesaplanmıştır. Domates suyunun preslenerek ve santrifüjlenerek ayrılmasından sonra elde edilen domates posasındaki likopen miktarı 2036.6 mg/kg posa ve β -karoten miktarı 186.74 mg/kg posa olarak hesaplanmıştır. Posası alındıktan sonra kalan domates suyunda ise likopen ve β -karoten miktarı çok düşük bulunmuştur. Likopen miktarı 1.47 mg/kg su ve β -karoten miktarı 0.063 mg/kg su olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar göstermektedir ki; likopen ve β - domates suyuna geçmemekte ve büyük bir kısmı domates endüstrisinde atık olarak uzaklaştırılan posa kısmında bulunmaktadır. Sonuçlar Tablo 3.9’da listelenmiştir.

Tablo 3.9. Domateste ve fraksiyonlarında likopen miktarı

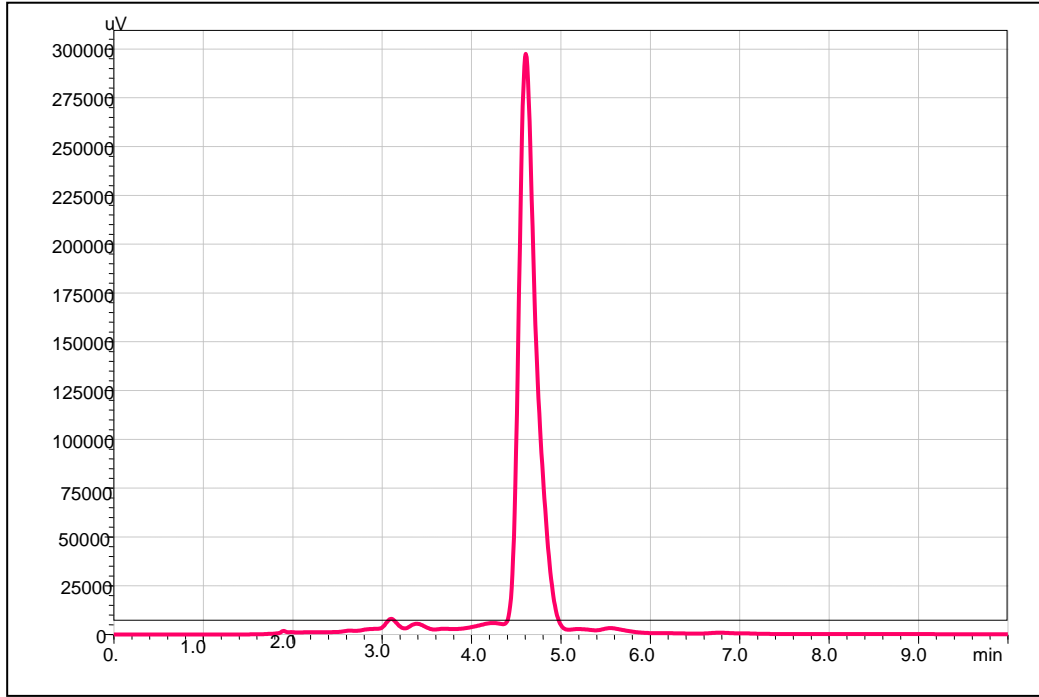
Ürün	Likopen Miktarı (ppm)	β-karoten miktarı (ppm)
Domates pulpu (tüm domates)	331.61	30.35
Domates posası	2036.60	186.74
Domates suyu	1.47	0.06

3.3.2. Preparatif LC İle Likopenin Saflaştırılması

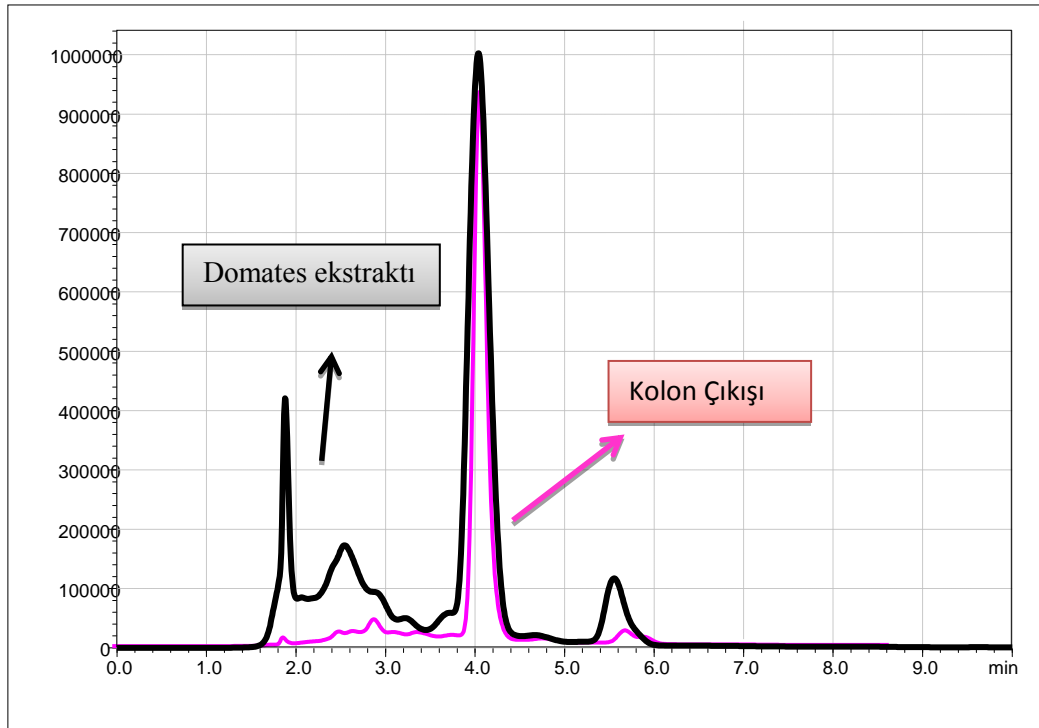
Tez çalışmasının önceki basamaklarında açıklandığı şekilde sentezlenen ve karakterize edilen kolon dolgu maddelerinden S-4 kodlu adsorban preparatif LC çalışmalarında kullanılmıştır. En iyi performans gösteren eş boyutlu S-4 kodlu kolon dolgu materyali, preparatif LC analizi için 2.12 cm iç çapa ve 10 cm uzunluğa sahip paslanmaz çelik preparatif kolona doldurulmuştur. Kullanıma hazır preparatif kolon şartlandırılmış ve çeşitli mobil faz konsantrasyonları denenerek likopenin diğer bileşenlerden en iyi şekilde ayrılmasına çalışılmıştır. Bölüm 3.3.1.3'deki sonuçlar doğrultusunda domates posasından ultrason destekli ve basamaklı kloroform ekstraksiyonu ile elde edilen ekstrakt saflaştırılmak üzere stok likopen çözeltisi olarak kullanılmıştır. Saflaştırma işlemi Bölüm 2.5.5'de ayrıntılı olarak anlatıldığı şekilde uygulanmıştır. Domates posası ekstraktından saflaştırılan likopen %95 saflıkta Sigma likopen standardı ile karşılaştırılmış ve saflık derecesi belirlenmiştir. Domates ekstraktına, preparatif kolonda saflaştırılan likopene ve bunların karşılaştırmalı olarak çakıştırıldığı kromatogramlar Şekil 3.34, 3.35 ve 3.36'da verilmiştir.



Şekil 3.34. Domates posası ekstraktına ait kromatogram (450 nm)



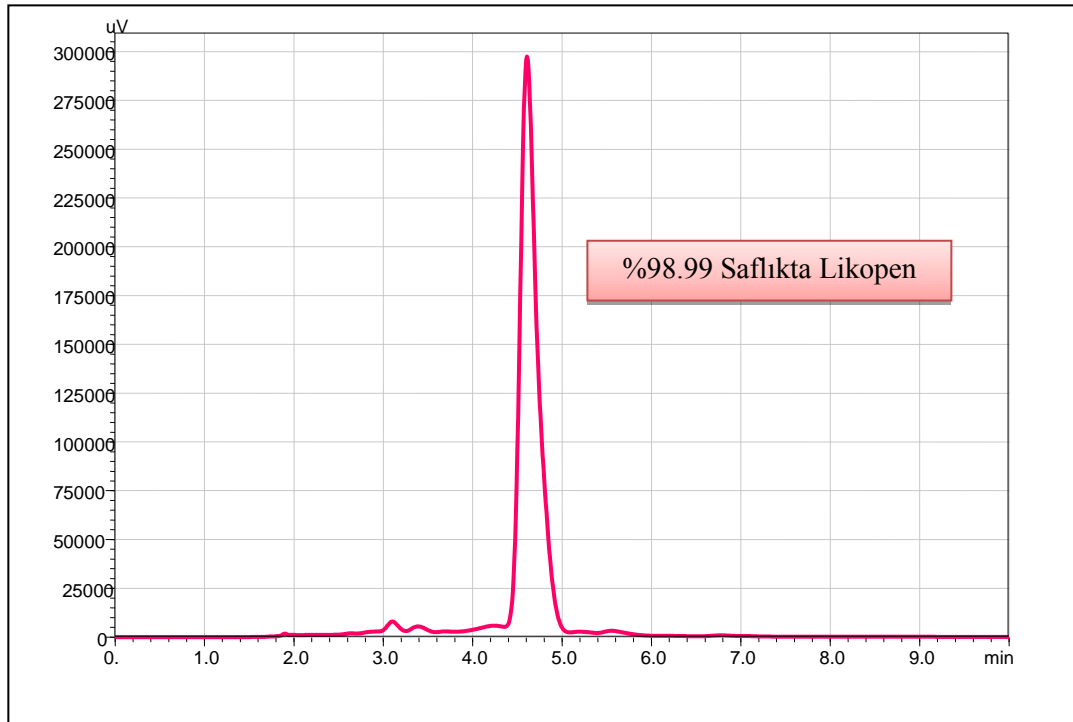
Şekil 3.35. Kolon çıkışı domates posası ekstraktına ait likopen kromatogramı (450 nm)



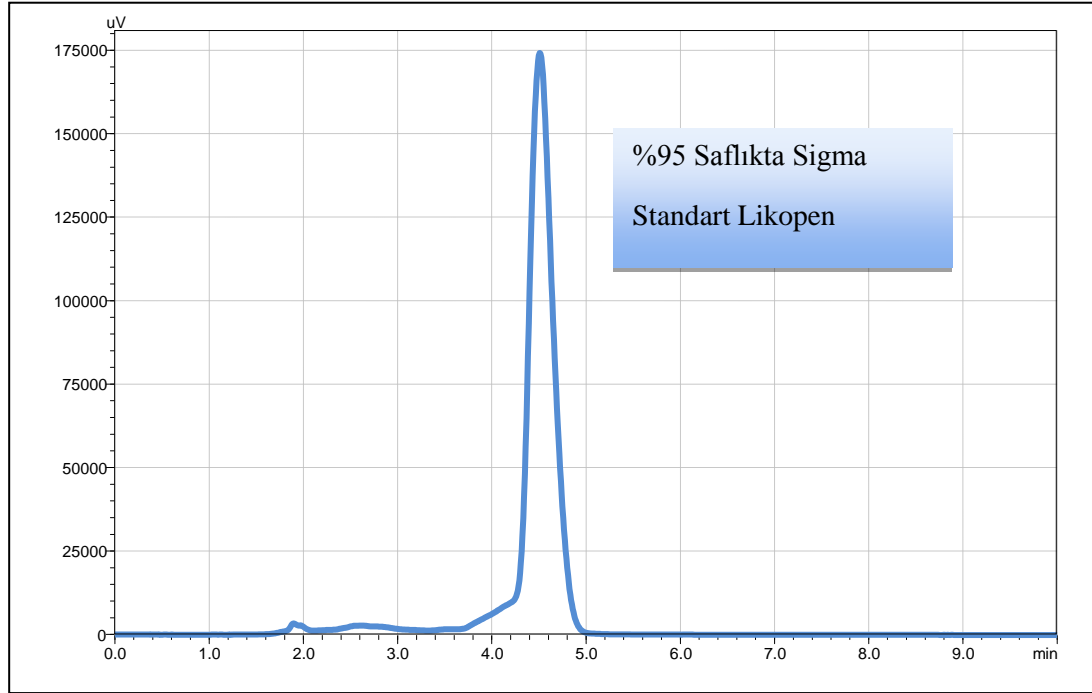
Şekil 3.36. Domates ekstraktı ve preparatif kolon çıkışının karşılaştırılması (450 nm)

Şekil 3.37’de görülen likopen birçok kombinasyon denenerek en saf halde metanol yıkaması ile elde edilebilmiştir. Şekil 3.38 ise % 95 saflıkta Sigma ticari likopen standardına aittir. Saflaştırılan likopenin farklı dalga boylarında da taramaları yapılmıştır. Organik asit taraması için 200 nm’de enjeksiyon yapılmıştır. 200 nm’de sadece kloroform enjeksiyonu ve kloroform içerisinde çözülmüş likopen enjeksiyonu yapılmış ve karşılaştırılmıştır. 200 nm taramasında çözen olarak kullanılan kloroform ve likopen dışında hiçbir pike rastlanmamıştır. Karşılaştırmalı yorumlar göstermektedir ki, saflaştırılan ürün likopen dışında hiçbir bileşen içermemektedir. Farklı dalga boylarındaki taramalara ait kromatogramlar ekler bölümünde (Ek-10, Ek-11) verilmektedir.

Sonuç olarak 0.053 g/mL kuru madde içeriğindeki domates posası ekstraktından %56.25 verimle %98.99 saflıkta likopen elde edilmiştir.



Şekil 3.37. Preparatif kolonda saflaştırılan likopen kromatogramı (450 nm)



Şekil 3.38. Likopen standardına ait kromatogram (450 nm)

3.4. Likopenin Enkapsülasyonu

Genel olarak bir kapsülün performansı, zarın kalınlığı, zar porozitesi ve mekanik özellikleriyle beraber yüzey alanı ve kapsül boyut dağılımıyla ifade edilmektedir. Örneğin zar kalınlığı arttıkça çevrelediği matriks daha iyi korunacaktır, kapsül küçüldükçe radyal kütle transferi hızlanacaktır. Bu amaçla kapsül boyutunu kontrol etmek ve daha spesifik olarak belirli bir boyuta küçültmek için; geliştirilen titreşimli dağıtma sistemi kullanılmıştır. Deney düzeneğindeki titreşim ünitesiyle uygulanan sabit titreşimin, pompalanan emülsiyonu küçük sıvı damlacıkları halinde dağıtması prensibinden faydalanılmıştır.

Yapılan araştırmanın mikroenkapsülasyon kısmında literatür incelemeleri sırasında likopenin sodyum aljinat kullanılarak kapsüllendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla enkapsülasyon çalışmaları kaplama materyali olarak sodyum aljinat kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışma kapsamında elde edilen aljinat-likopen mikroküre oluşum koşullarının belirlenmesi ile düzgün homojen ve küresel yapıya sahip olmalarında, aljinat konsantrasyonunun etkisini belirlemek amacıyla çalışmada 4 farklı sodyum aljinat konsantrasyonu (%0.5, 1, 1.5, 2) ile çalışılmıştır. Ayrıca partikül çapları ve şekilleri üzerine akış hızının etkisinin belirlenmesi amacıyla da her bir sodyum aljinat konsantrasyonunda 6 farklı pompalama akış hızı (0.5 mL/dk, 1 mL/dk, 1.5 mL/dk, 2 mL/dk, 2.5 mL/dk, 3 mL/dk) ile çalışılmıştır.

Daha sonra elde edilen kapsüller dondurularak kurutulmuştur. Dondurarak kurutma yönteminin en büyük avantajları, kaybın çok düşük olması, elde edilen ürünün rekonstitüsyon özelliklerinin çok iyi olması, çözünen maddelerin gıda içerisindeki hareketi dolayısıyla kayıpların minimum olmasıdır.

3.4.1. Enkapsülasyon Verimi

Enkapsülasyon veriminin hesaplanmasında 4 farklı sodyum aljinat konsantrasyonunda 1.5 mL/dk akış hızında üretilen likopen yüklü mikrokapsüller kullanılmıştır. Tablo 3.10 artan yüzdelerde sodyum aljinat içeren partiküllerin enkapsülasyon verimlerini göstermektedir. İnvers jelleşme yönteminde damlatma metoduyla %60-70 aralığında değişen verimle enkapsüller elde edilmiştir.

Tablo 3.10. Farklı sodyum aljinat konsantrasyonlarında enkapsülasyon verimi

Örnek	% Verim
%0.5 sodyum aljinat-likopen enkapsülü	67.4±0.02 ^B
%1 sodyum aljinat-likopen enkapsülü	69.3±0.11 ^A
%1.5 sodyum aljinat-likopen enkapsülü	60.2±0.17 ^D
%2 sodyum aljinat-likopen enkapsülü	66.1±0.84 ^C

A-D: Aynı sütundaki birbirinden farklı harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir.

3.4.2. Kapsüllerin Optik Analizi, Ortalama Çap ve Boyut Dağılımları

Kapsüllerin optik analizi Bölüm 2.7.7’de anlatıldığı şekilde optik mikroskop kameradan alınan görüntülerin işlenmesi yoluyla yapılmıştır.

Bu bölümde farklı membran kompozisyonlarında ve farklı akış hızlarında üretilen ıslak kapsüllerin ortalama çapları, boy dağılımı değişim katsayıları ve literatürde karşılık gelen partikül şekilleri verilmektedir. Damlatma yönteminde elde edilen emülsiyon damlacıkları, membran polimeri çözelti yüzeyinden geçerken birtakım şekil bozukluklarına uğramakta veya dağılmaktadır. Bu durum, jelleşme havuzundaki çözeltinin viskozitesinin, emülsiyon içerisindeki membran çözeltisinin viskozitesine oranı ile ilgilidir. Bu yüzden, membran çözeltisinde kullanılan polimer derişimi kapsül membranının fiziksel özellikleri bakımından oldukça etkili bir parametredir. Tablo 3.11’de farklı sodyum aljinat konsantrasyonlarında ve akış hızlarında kapsüllenen partiküllere literatürde karşılık gelen enkapsül morfolojileri verilmiştir. Tablo 3.11 incelenecek olursa, enkapsülasyonda kullanılan sodyum aljinat oranının partikül şekilleri üzerine en etkili parametre olduğu söylenebilir.

Çalışılan 4 farklı sodyum aljinat konsantrasyonuna ait farklı pompalama akış hızlarında üretilen kapsüllere ait görüntüler teker teker ele alınarak incelenmiştir. Sodyum aljinat konsantrasyonunun ve akış hızının ortalama partikül çapını nasıl değiştirdiği grafiklerle açıklanmıştır.

Kameralı optik mikroskop görüntüleri üzerinden ölçülen partikül çaplarından hesaplanan % değişim katsayıları yine grafiklerle açıklanmış ve tartışılarak karşılaştırılmıştır.

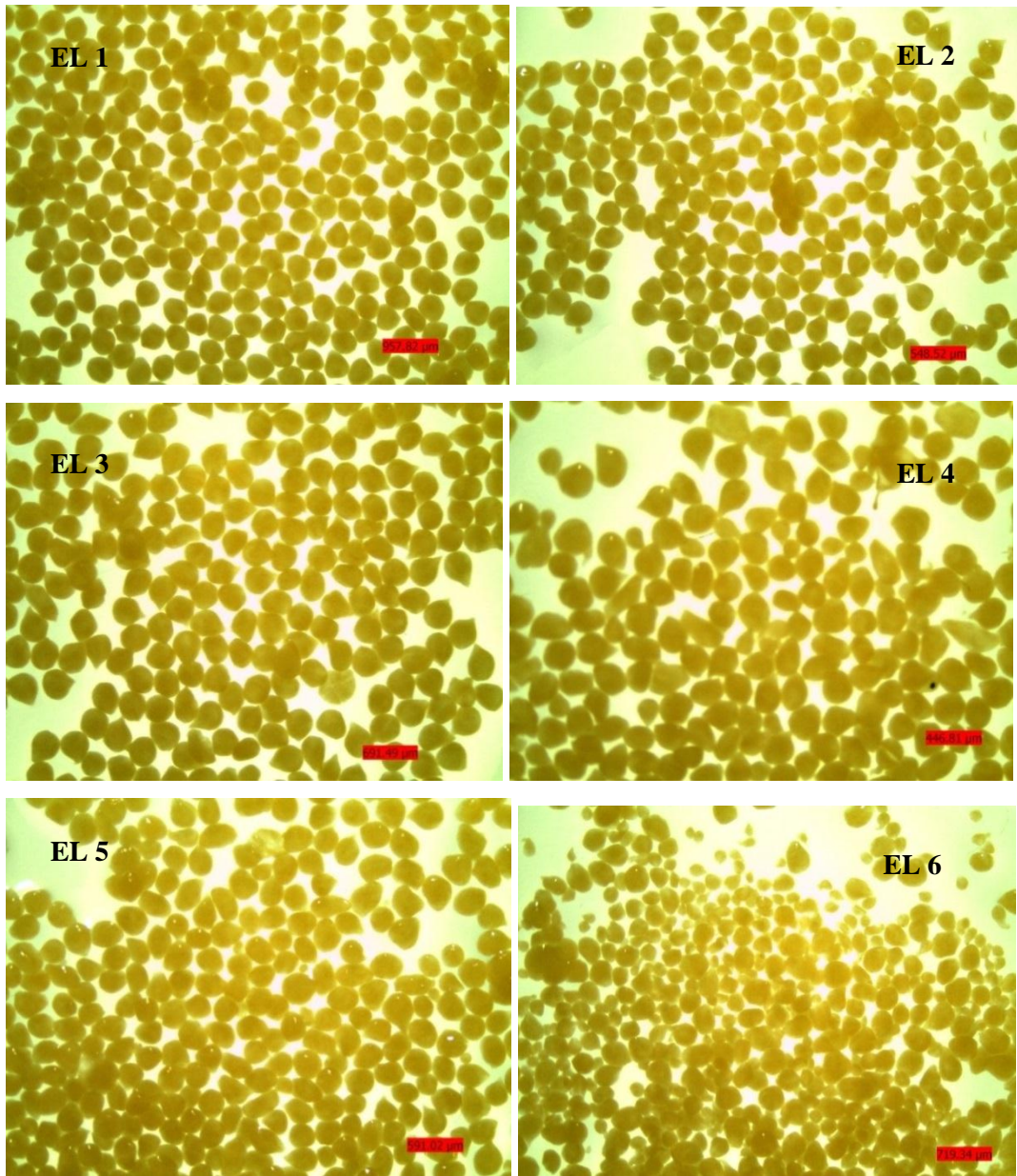
Sodyum aljinat konsantrasyonu ve akış hızı etkileşiminin ıslak halde bulunan ve dondurularak kurutulmuş kapsüllerin şekilleri üzerine etkisi tek tek ele alınarak şekillerle açıklanmıştır.

Tablo 3.11. Mikroenkapsüllerde oluşan şekiller

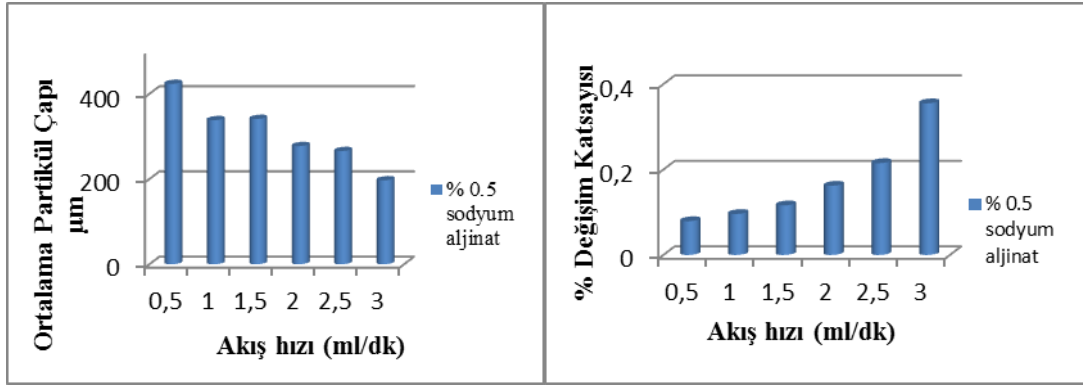
Sodyum aljinat oranı (%)	Akış hızı (mL/dk)	Oluşan Partikül Şekli [138]
0.5	0.5	
0.5	1	
0.5	1.5	
0.5	2	
0.5	2.5	
0.5	3	
1	0.5	
1	1	
1	1.5	
1	2	
1	2.5	
1	3	
1.5	0.5	
1.5	1	
1.5	1.5	
1.5	2	
1.5	2.5	
1.5	3	
2	0.5	
2	1	
2	1.5	
2	2	
2	2.5	
2	3	

• **%0.5 Sodyum Aljinat Konsantrasyonunda Üretilen Mikrokapsüller**

Sodyum aljinat konsantrasyonunun %0.5 olduğu durumda pompalama akış hızı 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 ve 3 mL/dk olan mikrokapsüllerin ışık mikroskobu görüntüleri sırasıyla Şekil 3.41’de verilmektedir. Mikroskop görüntülerinden de görüldüğü üzere akış hızına bağlı olmaksızın düzgün ve küresel formda kapsüller elde edilememiş, gözyaşı şeklinde, kuyruklu, yamuk ve stabilitesi zayıf küreler elde edilmiştir. Akış hızının artmasıyla partikül şekillerinde bozulmanın arttığı görülmüştür.

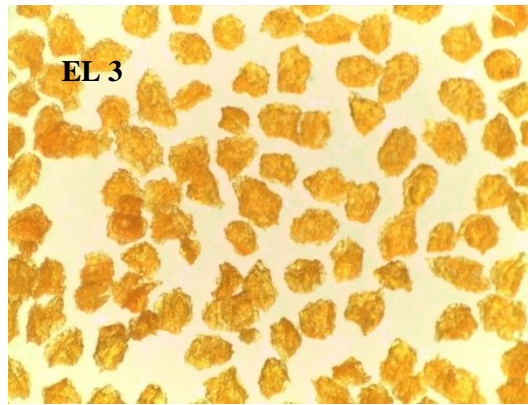


Şekil 3.39. %0.5 Sodyum aljinat konsantrasyonunda üretilen mikrokapsüllerin ışık mikroskobu görüntüleri (8 X)



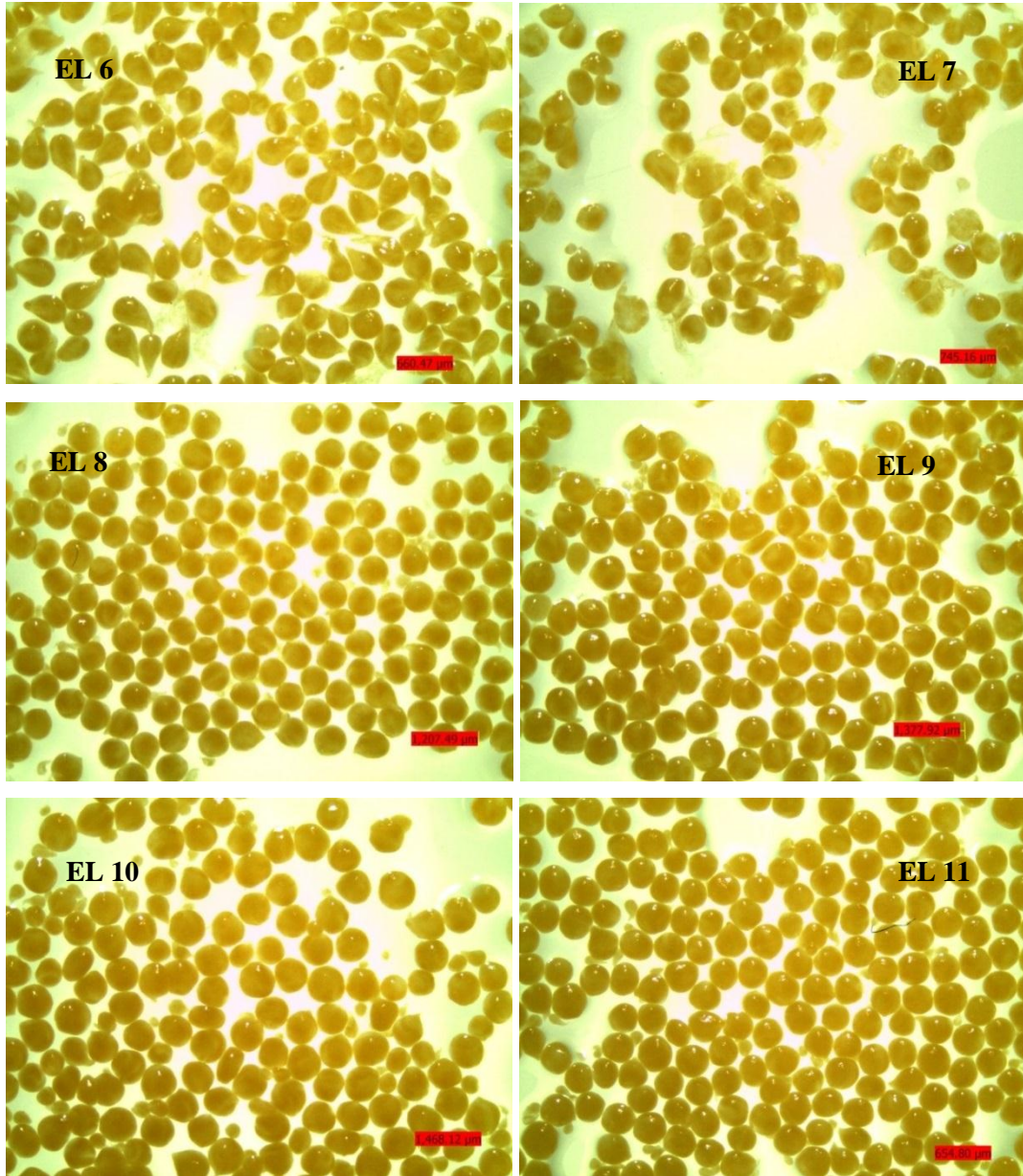
Şekil 3.40. %0.5 Sodyum aljinat konsantrasyonunda üretilen mikrokapsüllerin ortalama çap ve % değişim katsayıları

Şekil 3.39' dan görüldüğü üzere %0.5 sodyum aljinat konsantrasyonunda ıslak halde 200-400 µm aralığında mikropartiküller elde edilmiştir. Grafik ve mikroskop görüntüleri incelendiği takdirde akış hızının artmasıyla ortalama partikül çapının azaldığı ve % değişim katsayısının arttığı görülmektedir ($p < 0.05$). % değişim katsayısının artması polidispersitenin arttığı ve partikül şekillerinin tutarsız olduğu anlamına gelmektedir. Şekil 3.41 ise 1.5 mL/dk akış hızındaki enkapsüllerin liyofilize edildikten sonraki görüntüsüne aittir. Şekilden de görüldüğü üzere serbest ve dağınık şekilli düşük stabilitede liyofilize enkapsüller elde edilmiştir.



Şekil 3.41. Liyofilize mikrokapsül (%0.5 sodyum aljinat konsantrasyonu ve 1.5 mL/dk akış hızı)

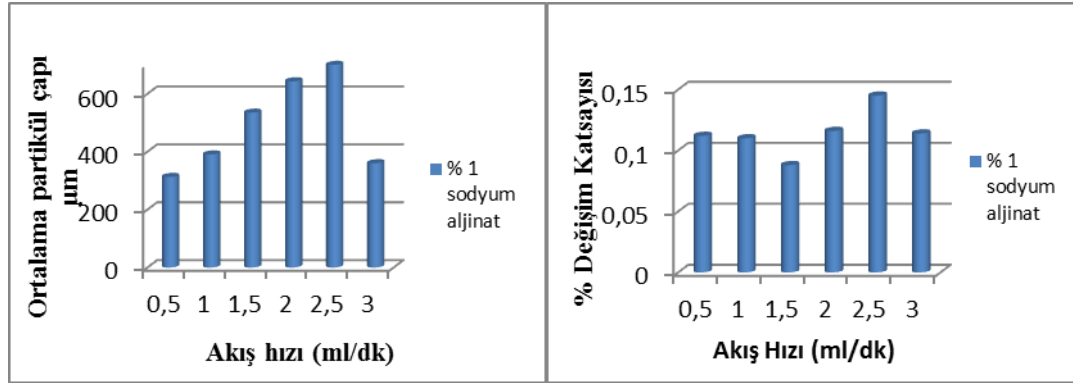
• *%1 Sodyum Aljinat Konsantrasyonunda Üretilen Mikroksüller*



Şekil 3.42. %1 Sodyum aljinat konsantrasyonunda üretilen mikroksüllerin ışık mikroskobu görüntüleri (8 X)

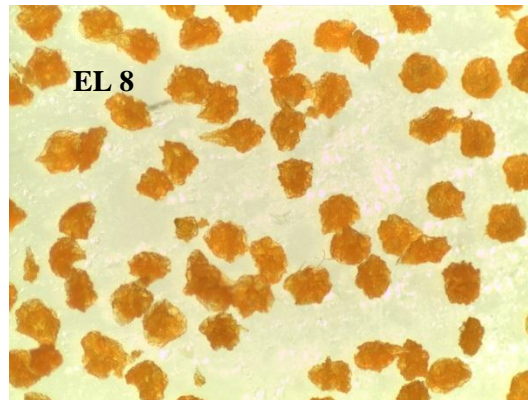
Sodyum aljinat konsantrasyonunun %1 olduğu durumda pompalama akış hızı 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 ve 3 mL/dk olan mikroksüllerin ışık mikroskobu görüntüleri sırasıyla Şekil 3.42’de verilmektedir. Mikroskop görüntülerinden de görüldüğü üzere akış hızının 0.5 ve 1 mL olduğu koşullarda morfolojisi düzgün olmayan gözyaşı damlaları şeklinde enkapsüller elde edilmiştir. Ayrıca gözyaşı şeklindeki kapsüllerde küreselleşme bozuk olduğu için, homojen olmayan bir matriks gözlemlenmiştir. Akış

hızının 1.5 ile 3 mL/dk aralığında olduğu denemelerde ise kısmen daha düzgün fakat boy dağılımı daha dar bir aralıkta olan küreler elde edilmiştir. Aljinat konsantrasyonunun %0.5 olduğu duruma göre daha büyük partikül çapına sahip küreler elde edilmiş ve akış hızının artmasıyla 3 mL/dk'ya kadar, ortalama partikül çapında da artış gözlemlenmiştir. Ortalama 600 μm çapındaki partiküllerin çapları ve çapların % değişim katsayıları Şekil 3.43'te görülmektedir.



Şekil 3.43. %1 Sodyum aljinat konsantrasyonunda üretilen mikrokapsüllerin ortalama çap ve % değişim katsayıları

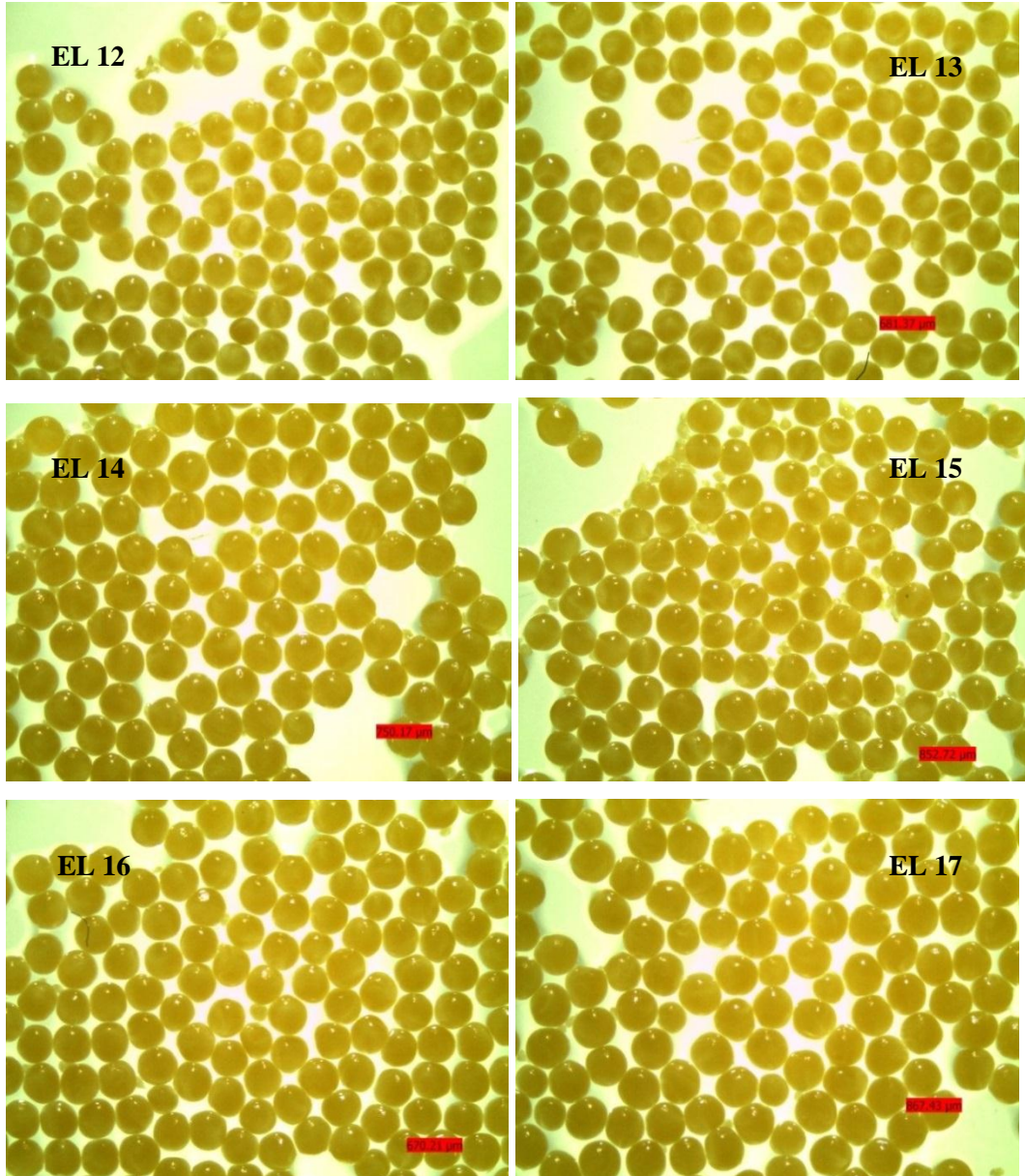
Şekil 3.44 ise 1.5 mL/dk akış hızındaki enkapsüllerin liyofilize edildikten sonraki görüntüsüne aittir. %1 sodyum aljinat konsantrasyonunda tam küresel olmayan partiküller liyofilize edildikten sonra şekillerinde bir miktar daha bozulmalar gözlemlenmiştir.



Şekil 3.44. Liyofilize mikrokapsül (%1 sodyum aljinat konsantrasyonu ve 1.5 mL/dk akış hızı)

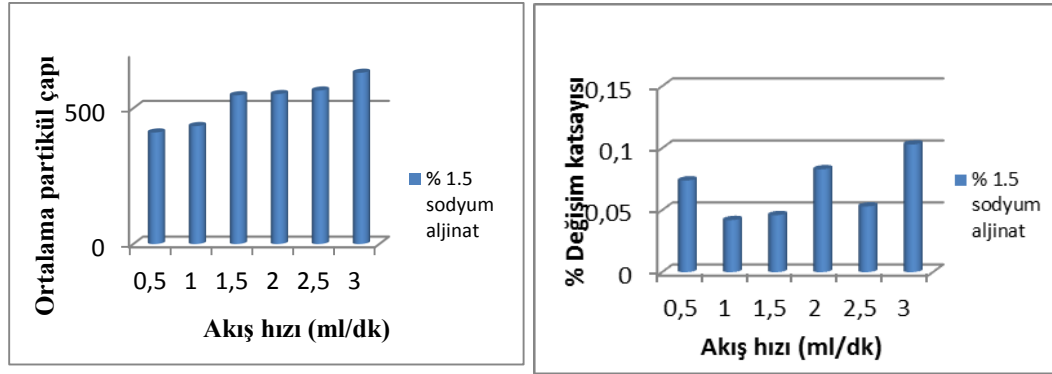
• **%1.5 Sodyum Aljinat Konsantrasyonunda Üretilen Mikrokapsüller**

Şekil 3.45 sodyum aljinat konsantrasyonunun %1.5 olduğu durumda pompalama akış hızı 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 ve 3 mL/dk olan mikrokapsüllere ait ışık mikroskobu görüntülerini göstermektedir. Sodyum aljinat konsantrasyonunun %1.5 olduğu durumdaki deney grubunda morfolojisi oldukça düzgün, homojen ve % değişim katsayısı düşük, stabil mikrokapsüller elde edilmiştir.



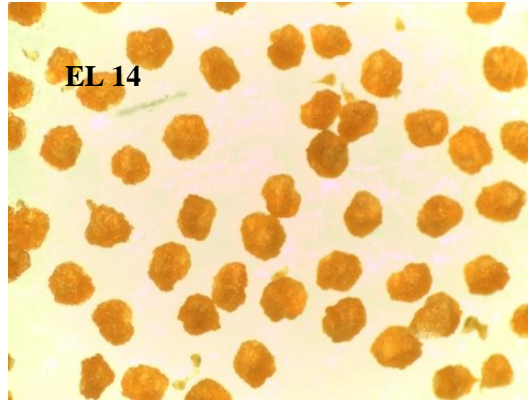
Şekil 3.45. %1.5 Sodyum aljinat konsantrasyonunda üretilen mikrokapsüllerin ışık mikroskobu görüntüleri (8 X)

Şekil 3.46 incelendiğinde sodyum aljinat konsantrasyonunun %1.5'e çıkarıldığında partiküllerin ortalama çapında da bir artış görülmektedir. Ortalama partikül çapları 400-600 µm aralığında küreler elde edilmiştir ve kürelerin çapları pompalama akış hızının artmasıyla artmıştır.



Şekil 3.46. %1.5 Sodyum aljinat konsantrasyonunda üretilen mikrokapsüllerin ortalama çap ve % değişim katsayıları

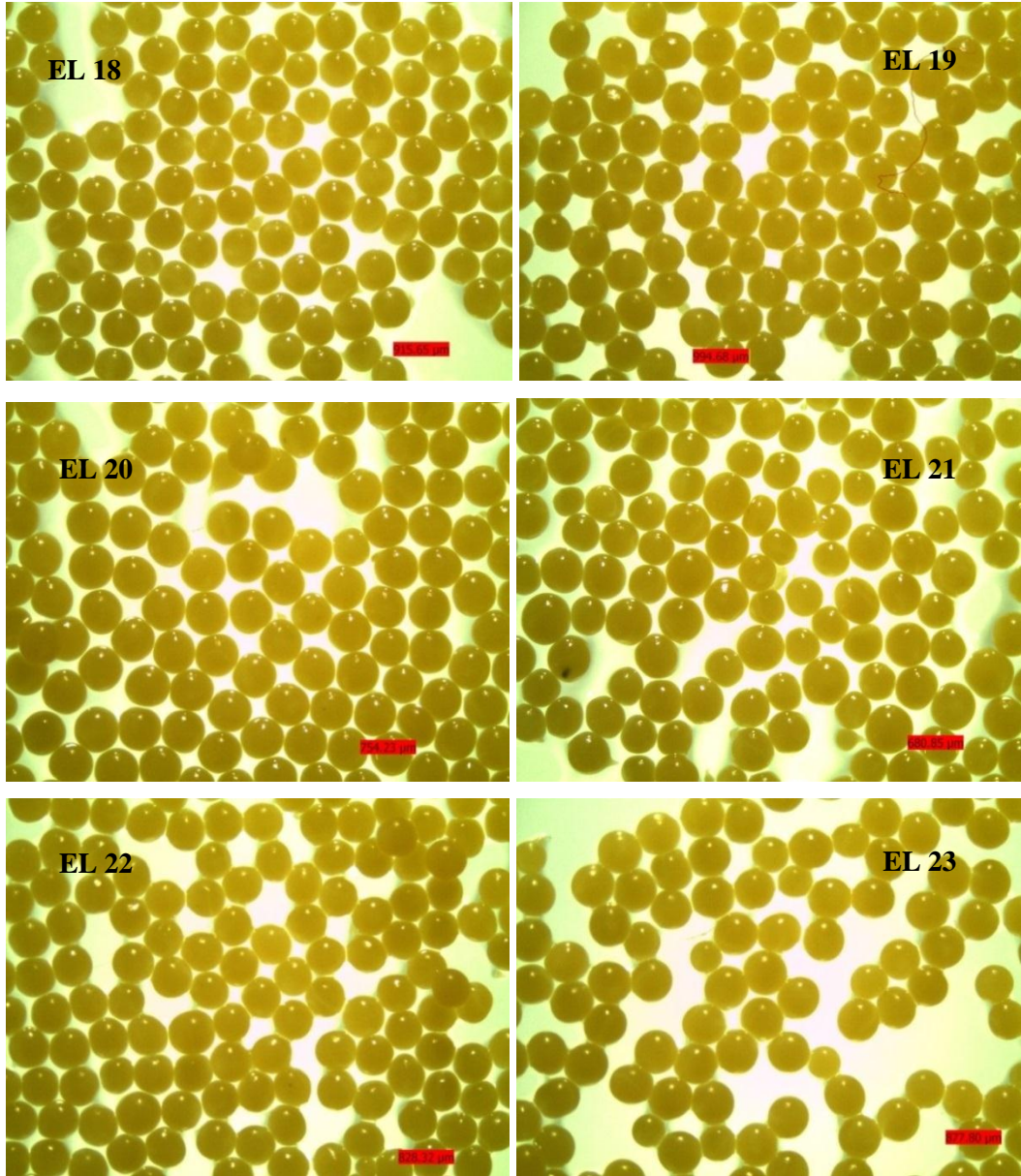
Şekil 3.47 1.5 ml/dk akış hızındaki enkapsüllerin liyofilize edildikten sonraki görüntüsüne aittir. Partiküller dondurularak kurutulduktan sonra da küresel formlarını koruyabilmişlerdir.



Şekil 3.47. Liyofilize mikrokapsül (%1.5 sodyum aljinat konsantrasyonu ve 1.5 mL/dk akış hızı)

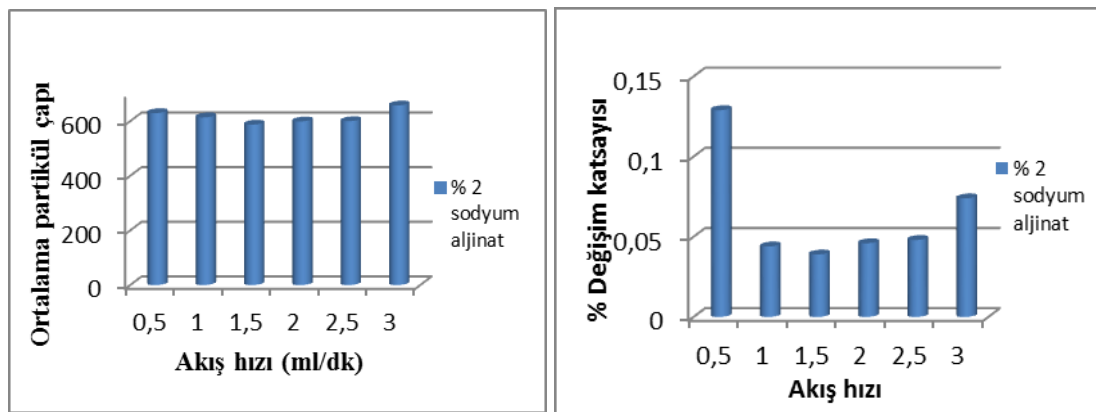
• ***%2 Sodyum Aljinat Konsantrasyonunda Üretilen Mikrokapsüller***

Yapılan literatür incelemeleri doğrultusunda pek çok çalışmada olduğu gibi, %2 sodyum aljinat konsantrasyonu istenilen özelliklerde mikrokapsül elde edilmesine olanak sağlamaktadır. Çalışmanın enkapsülasyon kısmı bütünüyle incelendiği takdirde en iyi performans gösteren ve en üst düzey kalitede kapsüllerin, %2 sodyum aljinat konsantrasyonunda elde edildiği Şekil 3.48'den görülmektedir.



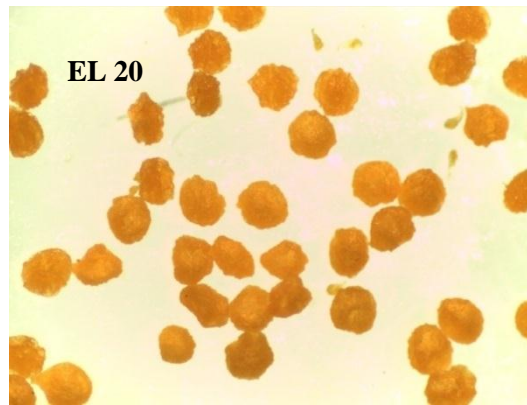
Şekil 3.48. %2 Sodyum aljinat konsantrasyonunda üretilen mikrokapsüllerin ışık mikroskobu görüntüleri (8 X)

Tüm çalışma boyunca aljinat konsantrasyonunun artışına bağlı olarak, küre yüzeyleri daha düzgün, tam küresel, kaplama kalitesi oldukça iyi ve daha şeffaf, parlak eş boyutlu kapsüller elde edilmiştir. Ayrıca artan sodyum aljinat oranı, kapsüllerin ortalama partikül çaplarında da artışa sebep olmuştur. %2 sodyum aljinat konsantrasyonunda ortalama 620-650 μm çapında % değişim katsayısı çok küçük monodispers mikrokapsüller elde edilmiştir. Akış hızının 0.5 mL/dk olduğu durumda düzgün bir akış profili sağlanamamış ve % değişim katsayısında yaklaşık 3 kat artışa sebep olmuştur (Şekil 3.49).



Şekil 3.49. %2 Sodyum aljinat konsantrasyonunda üretilen mikrokapsüllerin ortalama çap ve % değişim katsayıları

Şekil 3.50 %2 sodyum aljinat konsantrasyonunda üretilen örneklerin dondurularak kurutulmuş görüntülerine aittir. Sonuç olarak, %1.5 ve %2 sodyum aljinat konsantrasyonunda küreler liyofilize edildikten sonra da tam küreselliğini, stabilitesini ve yapısını koruyabilmişlerdir.

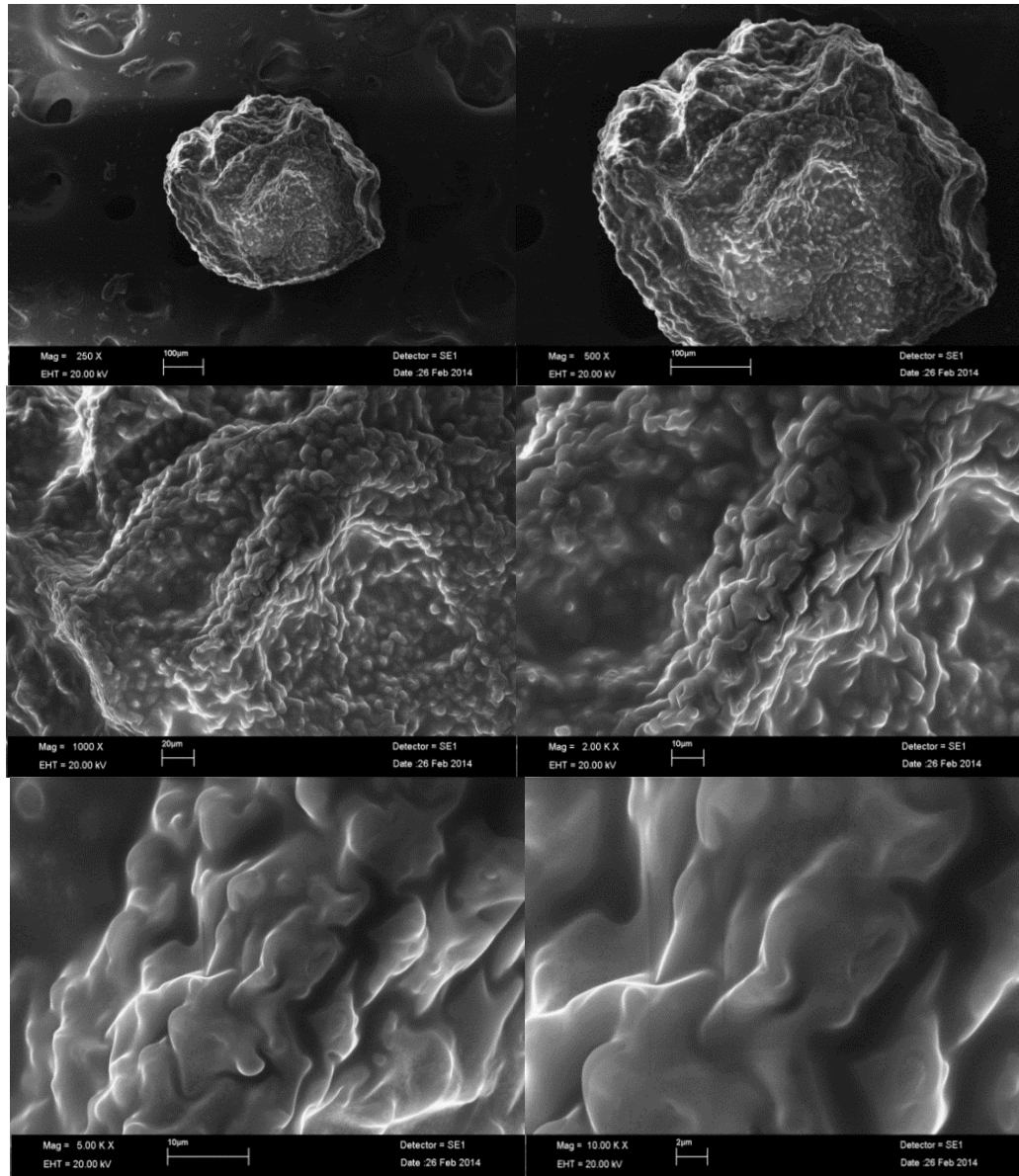


Şekil 3.50. Liyofilize mikrokapsül (%1.5 sodyum aljinat konsantrasyonu ve 1.5 mL/dk akış hızı)

3.4.3. Kapsüllerin Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntüleri

Seçilen mikrokapsüllerin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri örnekler liyofilize edildikten sonra Bölüm 2.3.2’de anlatıldığı şekilde alınmıştır. Farklı büyütmelerdeki likopen yüklenmiş ve boş aljinat kürelerin mikrografları Şekil 3.51 ve 3.52’de verilmiştir. Çalışmanın bu kısmında, %1.5 Sodyum aljinat konsantrasyonda ve 1.5 mL/dk akış hızında üretilen (EL 14) mikrokapsüllere ait görüntüler verilmektedir.

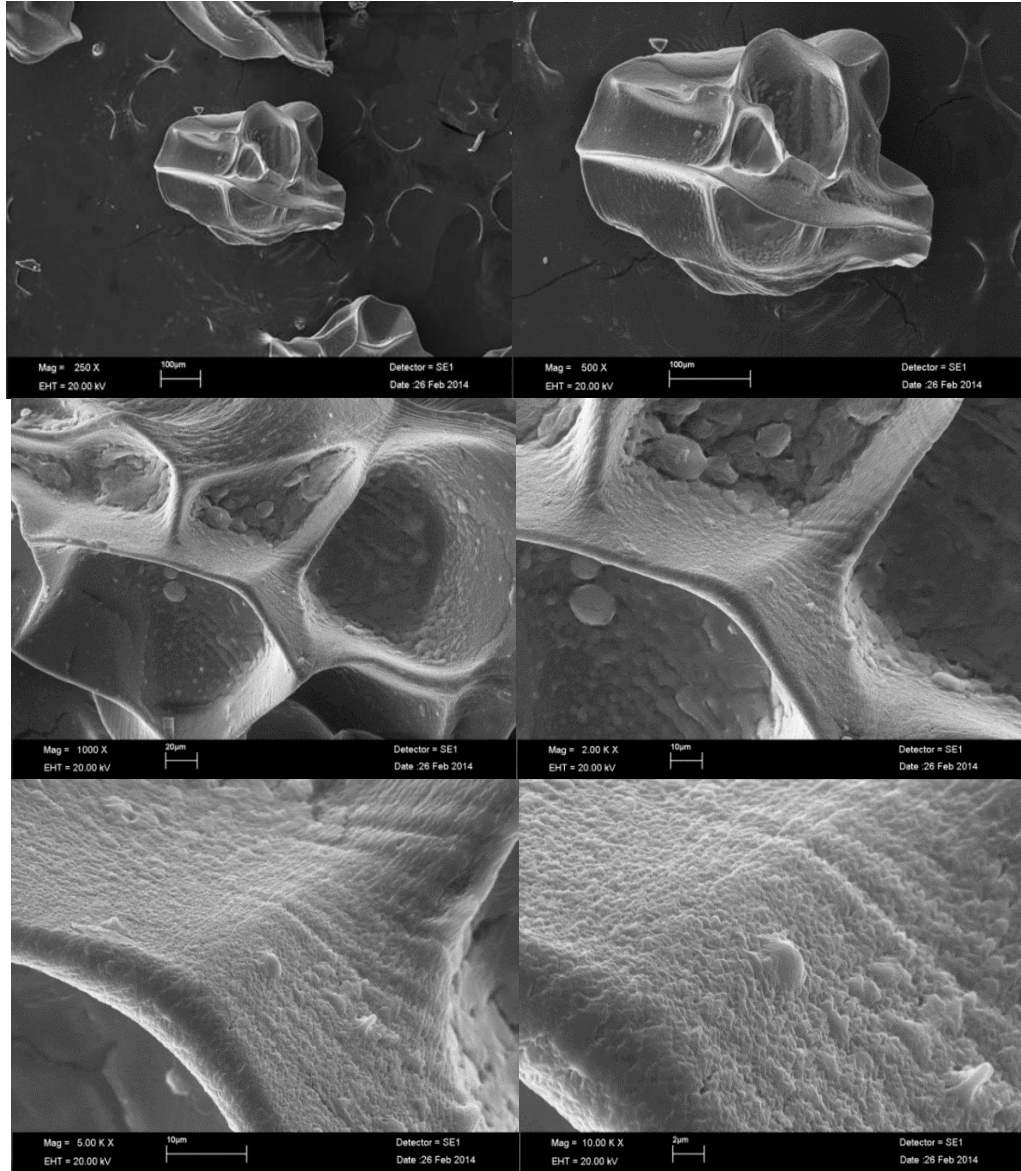
- **Likopen Yüklü Sodyum Aljinat Kapsül**



Şekil 3.51. Likopen yüklü sodyum aljinat kapsülün SEM mikrografı

- **Boş Sodyum Aljinat Kapsül**

%1.5 Sodyum Aljinat Konsantrasyonu ve 1.5 mL/dk akış hızında üretilen likopen yüklenmemiş kapsüle ait görüntüler verilmektedir.



Şekil 3.52. Boş aljinat kapsülün SEM mikrografı

Yapılan çalışmada enkapsüle likopen içeren toz preparatların SEM görüntülerinde partiküllerin morfolojisinde az da olsa bozulmalar gözlenmiştir. Bu bozulmanın da dondurarak kurutma işleminden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Dondurma işlemi esnasında oluşan buz kristalleri yağ damlacıklarının içine nüfuz ederek partikül ara yüzeylerine zarar vermektedir. Liyofilize edilen partiküllerde kurutma

sırasında ortamdan uzaklaşan su, ıslak partiküllere oranla partikül çapında yaklaşık 100 µm'lik bir azalmaya sebep olmuştur. Likopen yüklü aljinat kapsülün yüzeyi oldukça gözenekli bir yapıya sahiptir ve dolayısı ile oldukça geniş bir yüzey alanına sahiptir. Ayrıca sadece sodyum aljinattan oluşan boş mikroenkapsülün yüzeyinde dondurarak kurutma sırasında oluşan vakumdan dolayı partiküllerin küreselliğinde bozulma, büzülme ve çökmeler gözlemlenmiştir.

3.4.4. Kapsüllerin Çekirdek Sızıntısı Ölçümü

1.5 mL/dk akış hızında üretilen liyofilize enkapsüllerin, ortam sıcaklığı kontrollü olarak artırılarak kuru ağırlık bazında çekirdek sızıntısı değerleri hesaplanmıştır. %0.5 sodyum aljinat konsantrasyonunda toplam enkapsül ağırlığının %3'ü kadar çekirdekten matriks sızıntısı saptanmıştır. Bu da membranın zayıflığından ve gözenekli yapısından kaynaklanmaktadır. Fakat %1, %1.5 ve %2 oranlarında aljinat-Ca jel yapısındaki membranın uygulanan sıcaklık değerlerinde çekirdek içeriğini oldukça iyi oranda hapsettiği ve görülmektedir.

Tablo 3.12. Enkapsüllerin % çekirdek sızıntısı

Örnek	(%) Çekirdek Sızıntısı
%0.5 sodyum aljinat-likopen enkapsülü	3.0±0.3 ^B
%1 sodyum aljinat-likopen enkapsülü	1.2±0.6 ^{AB}
%1.5 sodyum aljinat-likopen enkapsülü	1.0±0.2 ^A
%2 sodyum aljinat-likopen enkapsülü	1.0±0.1 ^A

A-B: Aynı sütundaki birbirinden farklı harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir. Ortalama ± standart sapma

3.4.5. Kapsüllerin *in Vitro* Ortamda Kontrollü Salım Testleri

Enkapsüle edilen maddeleri hedeflendirmenin ya da kontrollü salımın amacı; gözlenen olumsuzlukları elimine etmek ya da en aza indirmek, hücresel düzeylere taşınmayı arttırmak, bu maddelerin dolaşımında ya da diğer biyolojik sıvılardaki konsantrasyonunu ve salım kinetiklerini optimize etmek, maddelerin stabilitesini

arttırmak ve vücudun diğer bölgelerinde istenmeyen etkileşime neden olmadan hedef bölgede istenilen düzeyde farmakolojik yanıt elde etmektir.

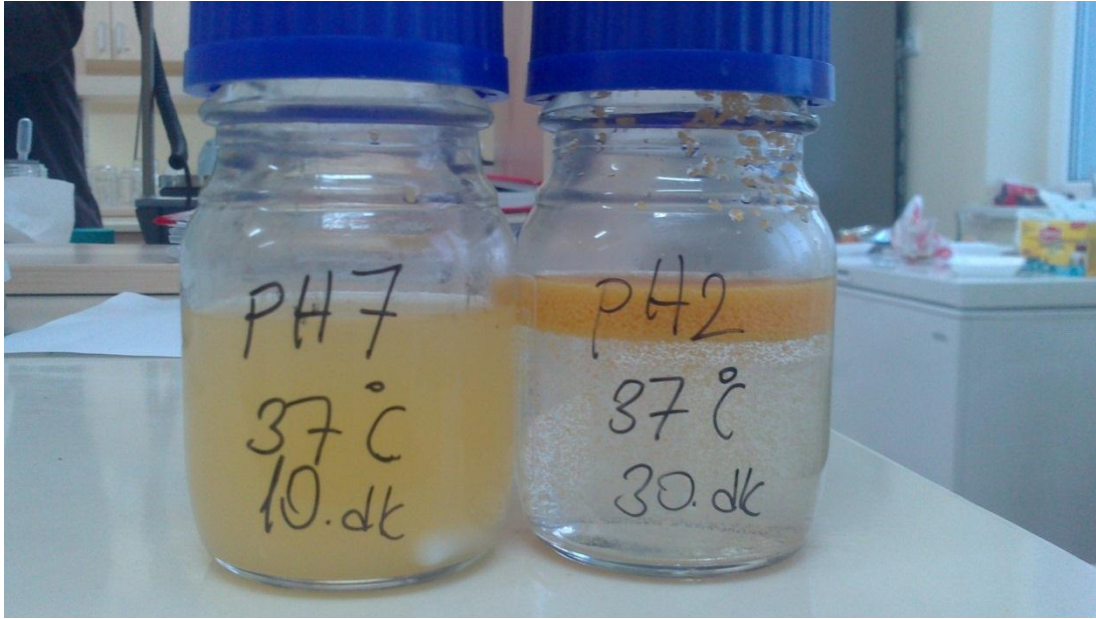
Tablo 3.13. Enkapsüllerin yapay mide ve bağırsak ortamındaki stabilitesi

Örnek	% Salım (30 dakika)	
	pH 2	pH 7
%0.5 sodyum aljinat-likopen enkapsülü	86±1.4 ^A	100 ^A
%1 sodyum aljinat-likopen enkapsülü	61±2.2 ^B	100 ^A
%1.5 sodyum aljinat-likopen enkapsülü	43±0.8 ^C	100 ^A
%2 sodyum aljinat-likopen enkapsülü	41±1.6 ^D	100 ^A

A-D: Aynı sütundaki birbirinden farklı harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir. Ortalama ± standart sapma

Tablo 3.13 üretilen mikroenkapsüllerin yapay mide ve bağırsak ortamındaki stabilitesini ve likopenin % salım değerlerini göstermektedir. Tabloda enkapsüllerin yapay mide ortamında (pH 2) yapay bağırsak (pH 7) ortamına göre daha stabil oldukları görülmektedir. Yapıdaki sodyum aljinat oranı arttıkça enkapsüllerin midedeki salımı da azalmaktadır. Yapay bağırsak ortamında ise ilk 10 dakika içerisinde tüm enkapsüller açılmış ve kapsüllerin içindeki likopen tamamen ortama salınmıştır.

İlk 30 dakikalık sürede %0.5 sodyum aljinat içeren kapsüller içerdikleri likopenin %86'sını asidik mide ortamına bırakmıştır. Kapsül membranındaki sodyum aljinat konsantrasyonu arttıkça asidik ortama salınan likopen de azalmış ve kapsüllerin dayanıklılığı artmıştır. %1.5 ve %2 sodyum aljinat oranında literatürde belirtilen değerlere ulaşılmış ve içeriğindeki likopen belirli oranda korunabilmiştir. Yapay bağırsak ortamında, yani nötr pH değerinde sodyum aljinat konsantrasyonu fark etmeksizin ilk 10 dakika içerisinde kapsüllerdeki likopen tamamen ortam sıvısına salınmıştır. Şekil 3.53 %2 sodyum aljinat içeren mikrokapsüllerin yapay mide sıvısındaki 30. dakika örneğine ve yapay bağırsak sıvısı içerisindeki 10.dakika örneğine aittir. Şekilden de her iki reaktördeki stabilitesini koruyan ve tamamen dağılan kapsüller açıkça görülmektedir.

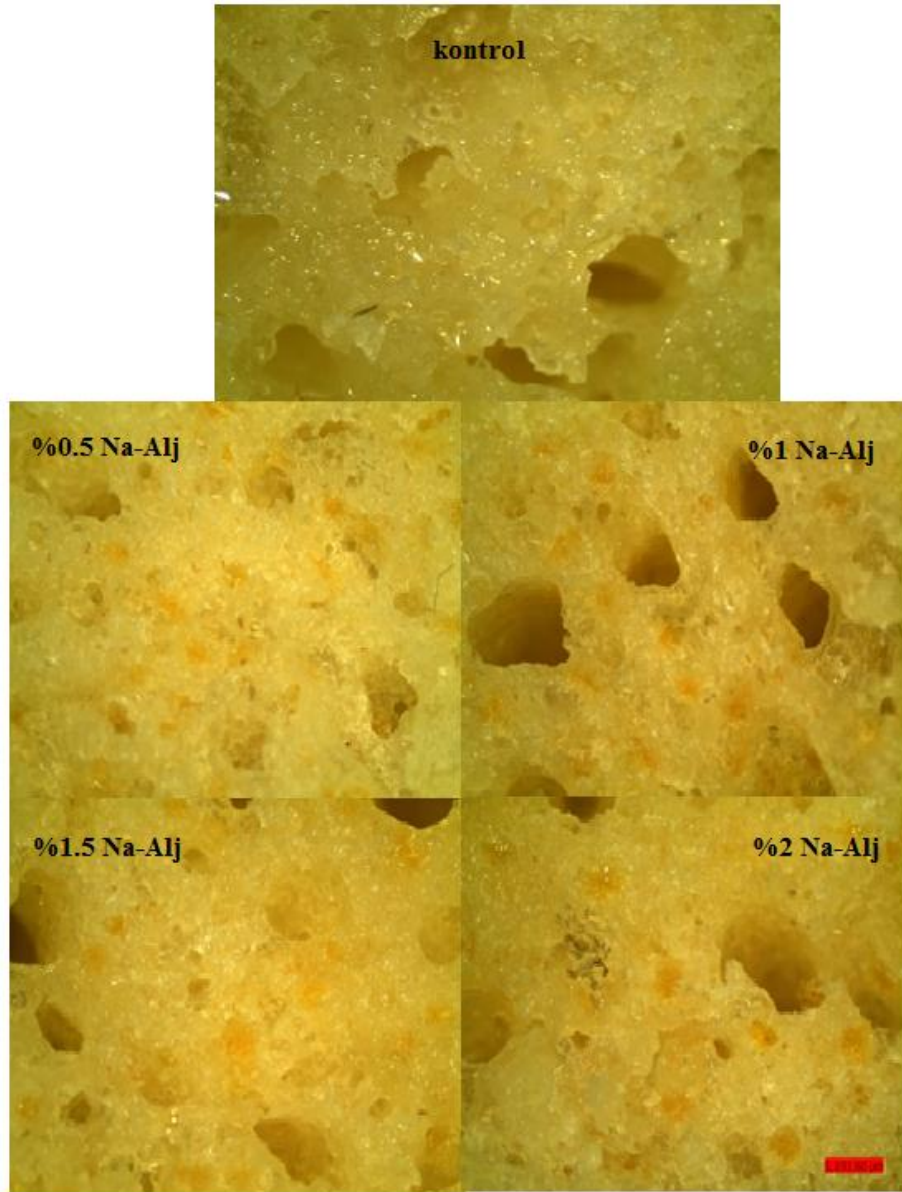


Şekil 3.53. %2 sodyum aljinat içeren enkapsüllerin yapay mide ve bağırsak ortamındaki görüntüleri

3.4.6. Enkapsüle Edilmiş Likopenin Model Ürün Analizleri

3.4.6.2. Keklerin Mikroskop Görüntüleri

Çalışmanın enkapsülasyon kısmında likopenin seçilen bir model üründe uygulanması amacıyla kek model gıda olarak seçilmiştir. Aynı miktarda likopen içeren farklı sodyum aljinat oranlarındaki örneklerden 1.5 mL/dk akış hızında elde edilen enkapsüller kek üretiminde kullanılmıştır. Kekler 180 °C sıcaklıkta pişirilmiştir ve uygulanan bu sıcaklıkta enkapsülle likopenlerin keklerin içinde salınmadan kaldıkları mikroskop görüntülerinden açıkça görülmektedir. Şekil 3.54 enkapsüle likopen katkılı kek örneklerinin mikroskop görüntülerine aittir. Ayrıca şekilden de görüldüğü üzere sarı-turuncu renkli likopen enkapsülleri yapı içerisinde net bir şekilde görülebilmektedir.



Şekil 3.54. Enkapsüle likopen katkılı keklerin optik mikroskop görüntüleri

3.4.6.2. Renk Analizi

Enkapsüle likopen katkılı keklerin renk değerleri Tablo 3.14’te verilmektedir. Aynı miktarda likopen içeren ve farklı sodyum aljinat konsantrasyonlarındaki enkapsül katkılı keklerin, L^* , a^* ve b^* değerleri üzerine sodyum aljinat oranının etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Kırmızılığın bir göstergesi olan a^* değerine bakıldığında kontrol grubuna göre oldukça önemli farklılık belirlenmiştir ($p < 0.05$). Ayrıca sodyum aljinat oranının artmasıyla a^* değerinde lineer bir artış gözlemlenmiştir. Enkapsül yapısındaki sodyum aljinat konsantrasyonu arttıkça daha

stabil, kaliteli, yüzeyi ve morfolojisi düzgün partiküller elde edilmiştir. Bu da kek içerisindeki yüksek sodyum aljinat konsantrasyonundaki kapsülün likopeni daha iyi koruduğunu göstermektedir. Kontrol grubuna göre diğer örneklerin L^* , a^* ve b^* değerlerinde artış belirlenmiştir. Hafif sarı renkte olan, parlak ve likopen yüklü kapsül ilavesi keklerin parlaklık, kırmızılık ve sarılık değerlerinde artışa neden olmuştur.

Tablo 3.14. Keklerin renk değerleri

Örnek	L^*	a^*	b^*
Kontrol	51.17±2.44 ^A	0.84±0.66 ^A	21.65±1.33 ^A
%0.5 sodyum aljinat-likopen enkapsülü katkıli kek	53.27±1.63 ^B	2.76±0.21 ^B	23.12±0.18 ^B
%1 sodyum aljinat-likopen enkapsülü katkıli kek	56.57±1.59 ^C	2.96±0.15 ^B	23.06±0.52 ^B
%1.5 sodyum aljinat-likopen enkapsülü katkıli kek	54.24±2.22 ^{BC}	3.33±0.13 ^C	23.90±0.11 ^{BC}
%2 sodyum aljinat-likopen enkapsülü katkıli kek	51.51±1.26 ^A	4.35±0.34 ^D	25.67±0.85 ^C

A-D: Aynı sütundaki birbirinden farklı harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir.

Ortalama ± standart sapma

3.4.6.3. Keklerin Radikal Süpürücü Güçlerinin Belirlenmesi

Enkapsüle likopen katkıli keklerin kontrol grubuna göre % antiradikal aktiviteleri Tablo 3.15’de verilmektedir. Farklı sodyum aljinat konsantrasyonlarındaki enkapsül katkıli keklerin, radikal süpürücü güçleri üzerine sodyum aljinat oranının etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Tablodaki değerler incelendiği takdirde, aynı miktarda likopen içeren enkapsül içeriğindeki sodyum aljinat oranı arttıkça belirlenen radikal süpürücü güçte bir azalma tespit edilmiştir. Bu durum kek örneklerinden ekstrakt elde edilirken sodyum aljinat konsantrasyonu fazla olan kapsüllerden likopenin tamamen ekstrakte edilememesiyle açıklanabilir.

Tablo 3.15. Keklerin % antiradikal aktiviteleri

Örnek	Antiradikal Aktivite (%)
Kontrol	15.30±0.59 ^A
%0.5 sodyum aljinat-likopen enkapsülü katkıli kek	41.55±1.10 ^D
%1 sodyum aljinat-likopen enkapsülü katkıli kek	42.13±0.63 ^D
%1.5 sodyum aljinat-likopen enkapsülü katkıli kek	39.30±0.97 ^C
%2 sodyum aljinat-likopen enkapsülü katkıli kek	34.12±0.41 ^B

A-D: Aynı sütundaki birbirinden farklı harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir.

Ortalama ± standart sapma

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan tez çalışmasında; sentezlenen küresel formda polimer esaslı monodispers makro gözenekli adsorbanlar kullanılarak domatesten likopen saflaştırılmasına yönelik yeni bir yöntem geliştirilmiş ve uygun adsorbanlar sentezlenmiştir. Sentezlenen monodispers adsorbanlar karakterize edilerek çeşitli biyoaktif bileşenlerin saflaştırılmasında kullanılmak üzere literatüre kazandırılmıştır. Polimerik adsorbanların sentez parametrelerinin, adsorbanın çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklerini etkilediği gözlenmiştir. Sentez aşamasında, malzemelerin kromatografik performansları, monodispersitesi, gözenekliliği, ve morfolojisi üzerine etki eden parametreler belirlenmiştir.

Bu amaçla da partikül sentez reçetesinde farklı çıkış lateksi/monomer, monomer/çapraz bağlayıcı ve porojen/çapraz bağlayıcı oranlarında sentezler gerçekleştirilmiştir. Polimer yapısında çapraz bağlayıcı olarak divinilbenzen (DVB), yapıya fonksiyonel özellik kazandırmak için de tetrahidrofurfuril akrilat (THFA) kullanılmıştır. Farklı üretim parametrelerinin, kromatografik ayırma performansları üzerine etkileri incelenmiş, taramalı elektron mikroskobu ile boy dağılımı, ortalama partikül çapı, yüzey özellikleri belirlenmiş ve FTIR spektroskopisi ile yapı analizleri yapılarak polimerik sorbentler karakterize edilmiştir.

Bütün parametreler birlikte değerlendirilerek en iyi özellikleri sağlayan ve maksimum performans gösteren monodispers adsorban seçilmiş ve dolgulu kolon uygulamaları için kullanılmıştır. Daha sonra bu adsorban malzeme ile hazırlanan preparatif LC dolgulu kolon sistemlerinde domatesten likopen saflaştırılması, tanımlanması ve saflık derecesinin belirlenmesi çalışmanın devam eden kısmını

oluşturmuştur. Daha sonra saflaştırılan likopen farklı üretim parametrelerinde sodyum aljinat kaplı mikrokapsüller haline getirilmiştir. Elde edilen mikrokapsüllerin de karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Karakterizasyon işleminde optik mikroskop görüntülerinin ve SEM görüntülerinin incelenmesi ile enkapsüllerin şekilleri ve boy dağılımları üzerine etki eden parametreler belirlenmiştir. Enkapsülasyon verimi hesaplanmış ve *in vitro* koşullarda yapay mide ve bağırsak ortamında enkapsüllerin salım çalışmaları yapılmıştır. Daha sonra üretilen ve karakterize edilen enkapsüller model ürün olarak seçilen kek miksinde katılmış ve keklerde renk ile antiradikal aktivite tayini yapılmıştır. Enkapsüllerin ısıl dirençleri ve enkapsüle likopen katkılı keklerin antiradikal aktivitesi tartışılmıştır.

Monodispers Gözenekli poli(THFA-DVB) Adsorban Sentezi

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi uygulamalarında ayırmanın gerçekleştirildiği kolonlarda dolgu maddesi olarak silika ya da polimerik partiküller kullanılmaktadır. Polimerik partiküller silika bazlı partiküllere göre belirgin avantajlara sahiptir, daha çok uygulama alanı bulabilmiştir ve üzerindeki araştırmalar her geçen gün artarak devam etmektedir. Polimerik partiküller adsorbsiyon, iyon değişim, büyüklükçe ayırma ve affinite kromatografisinde başarılı uygulama alanları bulmuştur. Geniş pH aralığında kararlı olması, küresel ve monodispers formda sentezlenmesi daha kolaydır ayrıca türevlendirme ve yapıya çeşitli grupların bağlanmasıyla fonksiyonel özellikler kazandırılabilir.

Belirli bir boy dağılımına sahip (polidispers) kolon doğu maddeleri ile hazırlanmış kolonlarda kolon performansları daha düşük olmaktadır. Fakat monodispers gözenekli partiküller varlığında hazırlanan kolonlarda daha düzenli bir akış profili elde edilmektedir. Daha düzenli bir akış profili ile de iyi bir ayırma performansı, daha yüksek çözünürlük değerleri ve daha yüksek teorik tabaka sayısı değerleri elde edilmektedir. Bu sebeple son yıllarda monodispers kolon dolgu malzemeleri üzerine çalışmalar yoğunlaşmış bu tez kapsamında da avantajlarından dolayı monodispers kolon dolgu malzemesi üretimine gidilmiştir.

Yapılan tez çalışmasında da “çok basamaklı mikrosüspansiyon yöntemi” kullanılarak monodispers makrogözenekli adsorbanların sentezlenmesi gerçekleştirilmiştir.

Partikül sentezinin ilk basamağında polistiren çıkış lateksi, dispersiyon polimerizasyonu yöntemiyle üretilmiştir. Alınan SEM mikrografları temelinde çıkış lateksi ortalama partikül boyutu 2.32 μm , olarak hesaplanmış ve yüzey morfolojisi oldukça düzgün istenilen partikül çapına sahip küreler elde edilmiştir. Çünkü sonuç partiküllerin monodispers olabilmeleri için kullanılacak çıkış partiküllerinin de monodispers özellikte olması gerekmektedir.

Daha sonra bu partiküller, eş boyutlu ve gözenekli yapı elde etmek amacıyla şişirme işlemine tabi tutulmuştur. İlk basamakta su bazlı emülsiyon ortamında porojen ile şişirilmiştir. İkinci basamakta ise monomer fazı şişmiş partiküller içerisinde polimerize edilerek monodispersite korunmuş ve poli(THFA-DVB) partiküller ters faz sıvı kromatografisi kolon dolgu maddelerine dönüştürülmüştür.

Çalışma kapsamında önce sabit monomer/çapraz bağlayıcı ve porojen/çapraz bağlayıcı oranlarında polimer reçetesine artan miktarda çıkış lateksi (seed) eklenerek sentezler gerçekleştirilmiştir. Bu sentezler sırasında en yüksek teorik tabaka katsayısı değerine çıkış lateksi/monomer oranının 0.4 olduğu durumda elde edilmiştir ve porojen/çapraz bağlayıcı optimizasyonuna geçilmiştir. Sabit çıkış lateksi/monomer oranında artan monomer miktarıyla yapılan sentezlerde de en iyi sonuç monomer/çapraz bağlayıcı oranının 0.4 olduğu malzemede alınmıştır. Her iki grup parametre de denendikten sonra aynı şartlar altında porojen miktarı optimizasyonuna geçilmiştir ve en yüksek teorik tabaka sayısına porojen/çapraz bağlayıcı oranının 2 olduğu durumda ulaşılmıştır. Monodispers partiküllerin eldesine yönelik çalışmalarda karıştırma hızı, polimerizasyon ortamında homojen bir ısı transfer rejimi elde edilebilecek düzeyde tutulmaktadır. Yüksek karıştırma hızlarında oluşabilecek şiddetli kayma gerilimi partiküllerde monodispers özelliğin bozulmasına ve boy dağılımının oluşmasına neden olmaktadır. Bütün grup sentezlerde reaktör karıştırma hızı sabit ve 400 rpm'de tutulmuştur.

Yapılan bir başka çalışmada çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu yöntemi ile monodispers makrogözenekli ve fonksiyonel gruplar taşıyan partiküller üretilmiştir. Bu yöntemde lineer polistiren dispersiyon polimerizasyonu yöntemiyle üretilmiştir. Monodispers özellikteki çıkış fonksiyonel lateksi fonksiyonel

komonomer, monomer ve başlatıcı içeren bir organik faz ile oda sıcaklığında ve emülsiyon ortamında şişirilmiştir. İkinci basamakta şişmiş durumda olan çıkış partiküllerinin içerisinde fonksiyonel gruba sahip komonomerin polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon sırasında fonksiyonel gruba sahip monomerin mikroküre yapısına girdiği saptanmıştır. Burada kullanılan fonksiyonel monomerin su içindeki çözünürlüğü azaldıkça elde edilen partiküllerin gözenek boyutunda da bir azalma olduğu gözlenmiştir [23].

Bir çalışmada 8-12 µm boyut aralığındaki monodispers ve gözenekli partikülleri tek basamaklı şişme ve polimerizasyon yöntemiyle sentezlenmiştir [107].

Boy Dağılımı, Partikül Şekli ve Gözenek Yapısı

Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonunda temel amaç, mümkün olduğunca dar bir boy dağılımına sahip partiküllerin sentezlenmesidir. Kullanılan dağıtma ortamının polaritesi ve dağıtma ortamındaki monomer çözünürlüğü sonuç partiküllerinin boyutunu ve boy dağılımını önemli ölçüde etkiler. İdeal olarak seçilen bir sistemde monomer çözünürlüğünün yüksek, oluşan polimer çözünürlüğünün ise düşük olması istenir.

Partiküllerin boy dağılımı ve morfolojisi SEM görüntülerinden faydalanılarak incelenmiştir. Partikül sentez reçetesindeki değişen parametreler, sentezlenen mikropartiküllerin monodispersitesini, şekillerini ve porozitesini önemli ölçüde etkilemiştir. Yapılan literatür incelemeleri ve tarafımızdan yapılan çalışmalar da göstermektedir ki, adsorbanın monodispersitesi ve porozitesi kolon performansı açısından iki önemli faktördür. Elde edilen SEM görüntülerinden sentezlenen polimerik mikro kürelerin monodispers yapıda ve tam küresel olduğu görülmektedir.

Polimerik mikro küre boyutları yaklaşık ortalama 6µm olarak belirlenmiştir. Polimerik mikro kürelerin boyutu HPLC de kullanılabilirliği açısından büyük avantaj sağlamaktadır. Ayrıca elde edilen SEM görüntülerinden polimerik mikro kürelerin makro-gözenekli yapısı da açıkça görülmektedir. Mikron boyuttaki polimerik küreler makro gözenekleri sayesinde oldukça yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahip olabilmektedirler.

Sentez parametreleri incelenecek olursa, çıkış lateksi/monomer oranının 0.1 ve 0.2 olduğu durumlarda ortamdaki monomer ve porojenin tamamı ile etkileşime girecek kadar çıkış lateksi polimerizasyon ortamında olmadığı içi değişim katsayısı çok yüksek ve polidispers partiküller elde edilmiştir. Bu oran etkileşim için yeterli miktarda artırıldığında monodispersite sağlanmıştır. Ayrıca çıkış lateksi/monomer oranı artırıldığında sonuç partiküllerin ortalama çapında da bir azalma gözlenmiştir. Bu durumda aynı miktardaki monomerin daha fazla çıkış partikülü ile etkileşmesinden kaynaklanmaktadır. Elde edilen bulgular literatür ile benzerlik göstermektedir [12, 14]. Bölüm 3.2.1.3'te bulunan SEM mikrografları incelendiğinde monodispersitenin korunduğu çıkış lateksi oranlarında morfolojisi düzgün küreler halinde ve makrogözenekli kolon dolgu maddelerinin elde edildiği görülmektedir. Polimerizasyon basamağında, gözenek yapısının oluşumunu sağlayan faz ayrımı, partiküllerin içerisinde dilüent ve çapraz bağlayıcı bulunmasından kaynaklanmaktadır.

Polimerizasyon ortamında sabit oranda çıkış lateksi ve porojen bulunurken ortama artan oranlarda monomer/çapraz bağlayıcı eklenmesinin partiküllerin yapısı ve monodispersitesi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Bu grup sentezlerde de morfolojisi düzgün monodispers makrogözenekli küreler hedeflendiği şekilde sentezlenmiştir. Ayrıca hiçbir grup sentezde partikül yapısında kırılmalar ve çatlamlar gözlenmemiştir.

Son grup sentez aşamasında ise polimerizasyon ortamında sabit oranda çıkış lateksi ve monomer bulunurken ortama artan oranlarda porojen/çapraz bağlayıcı eklenmesinin partiküllerin boy dağılımı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. İki basamaklı şişirme işleminin birinci basamağında porojen (dilüent) ile şişirme yapıldığı için porojen artırıldığı durumda partiküllerin ortalama çapında da artış gözlenmiştir, yine bu grup deneylerde de monodispersite korunmuştur % değişim katsayısı düşük partiküller üretilmiştir.

Şekil 3.10'daki partikül yüzey mikrografları incelendiğinde, partikül yapısındaki dilüent miktarı arttıkça daha küçük gözenekli partiküller elde edilmektedir. Bu da dilüent miktarı arttıkça partikül içi ortam viskozitesinin düşmesinden kaynaklanan ve

beklenen bir sonuçtur. Bu durum faz ayrılması sırasında küçük agregasyonların küçük gözenekler oluşturmalarına neden olmaktadır.

FTIR Kullanılarak Kimyasal Yapının Belirlenmesi

İnfrared spektroskopisi polimer malzemelerin kimyasal yapılarının karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. FTIR spektroskopisinde, örnek materyaldeki kimyasal bağların titreme, eğilme, bükülme, sallanma gibi hareketleri için gerekli olan enerji kızılötesi ışınların elektromanyetik enerjisinden absorplanır. Piklerin bulunduğu yere, yapılarına ve şekillerine göre inceleme yapılarak materyaldeki bağlar tayin edilir. Spektrum yorumlanması ise pik karşılaştırılması, pik boyu ve pik alanı ölçülmesi veya standart karşılaştırılması ile yapılabilir [156].

Çalışma kapsamında sentezlenen monodispers üç boyutlu polimerik kolon dolgu materyali iki bileşenden oluşmaktadır. Polimer yapısında çapraz bağlayıcı olarak divinilbenzen (DVB), yapıya fonksiyonel özellik kazandırmak için de tetrahidrofurfuril akrilat (THFA) kullanılmıştır. Polimerizasyon işlemi sırasında tetrahidrofurfuril akrilatın polimer yapısına hangi oranda katıldığı FTIR spektrumları aracılığıyla hiç katkı monomeri içermeyen ve en fazla oranda katkı monomeri içeren iki adsorbanın spektrum karşılaştırılmasıyla yapılmıştır.

Sadece DVB içeren (S-6 kodlu) ve THFA/DVB oranı 2 olan (S-9 kodlu) polimer malzemelerin FTIR spektrumları karşılaştırmalı olarak incelendiğinde S-9 kodlu adsorbanın spektrumundan 1156.62, 1075.45 ve 1021.31 dalga sayısındaki keskin piklerin tetrahidrofurfuril akrilatın yapısındaki oksijen gerilmelerine ait olduğu görülmektedir. 1729.00 dalga sayısındaki pikteki artış da yine yapıdaki oksijen gerilmelerinden kaynaklanmaktadır. Sonuç olarak, THFA monomerinin polimer yapı içinde yer aldığı açıkça görülmektedir.

Kromatografik Performans Testleri

Yapılan tez çalışmasının bu bölümünde formülasyonu Tablo 2.8.'de verilen farklı reçetelerde sentezlenen 14 adet kolon dolgu maddesi analitik HPLC kolonuna doldurularak kromatografik performans testlerine tabi tutulmuştur. Ters faz

poli(THFA-co-DVB) kolonlarını kromatografik performansını belirleyici parametrelerin tayininde likopen ve β -karoten analit olarak kullanılmıştır. İki farklı mobil faz asetonitril besleme derişimi için izokratik modda ayırma davranışları incelenmiştir. Her bir kolon dolgu materyalinin; %80 asetonitril-%20 etanol ve %20 asetonitril-%80 etanol mobil faz konsantrasyonlarında sıvı kromatogramları elde edilmiştir. Aynı şartlardaki kromatogramlar üst üste karşılaştırılmıştır. Elde edilen bu kromatogramlardan alıkonma süresi, taban genişliği, pik yüksekliği, pik alanı, pik yarı yüksekliğindeki taban genişliği ve kuyruklanma faktörü belirlenip; teorik tabaka katsayısı, alıkonma faktörü pik çözünürlüğü ve indirgenmiş plaka yüksekliği değerleri hesaplanmıştır.

Pik Çözünürlükleri

Pik çözünürlüğü ardışık iki pikin birbirinden ayrılma derecesinin bir ölçüsüdür. Bölüm 3.2.3.1'deki sıvı kromatogramları incelendiğinde; sentezlenen bütün kolon dolgu maddelerinde; %80 asetonitril-%20 etanol mobil faz derişiminde likopen ve β -karotenin birbirinden ayrılamadığı açıkça görülmektedir. Fakat %20 asetonitril-%80 etanol mobil faz konsantrasyonunda ise analitlerin istenilen düzeyde birbirinden ayrıldığı ve ayrılma sınırı olan 1'den büyük çözünürlük değerlerine ulaşıldığı tespit edilmiştir. Bu durum kullanılan mobil fazın polaritesi ile ilgilidir. Adsorbanın bağlama kuvveti ile çözücünün polaritesi arasındaki denge maddelerin adsorbandan ve dolayısıyla kolondan ayrılma hızını kontrol eder. %20 asetonitril-%80 etanol mobil faz derişiminde likopen kolondan daha geç çıkmış ve β -karotenden ayrılmıştır. Ayrıca bütün kolon dolgu maddelerinde %20 asetonitril-%80 etanol mobil faz derişimi kullanımında diğer mobil faz derişimine göre daha yüksek basınç değerleri elde edilmiştir.

Kolon sentez parametrelerinin çözünürlük üzerine etkileri incelenecek olursa, piklerin ayrıldığı %20 asetonitril-%80 etanol mobil faz derişiminde, çıkış lateksi/monomer oranının değişimi çözünürlüğü istatistiksel olarak etkilememiştir. Fakat sentez reçetesine artan miktarlarda monomer eklendiği durumda her iki mobil faz derişiminde de çözünürlük değerleri azalmıştır. Polar bir monomer olan tetrahidrofurfuril akrilatın yapıda artmasıyla dolgu maddesinin polaritesi artmıştır, apolaritesi azalmıştır. Bu durumda piklerin çözünürlük değerini düşürmüştür. Sentez

reçetesindeki sabit monomere karşın artan miktarlarda porojen eklenmesi durumunda ise çözünürlük değerlerinde artış olduğu görülmüştür.

Alıkonma Faktörü

Alıkonma faktörü kolon sabit fazı ile mobil faz içerisindeki analitin etkileşiminin bir ölçüsüdür. Alıkonma faktörü literatürde yaygın olarak kolonların polarite analizinde kullanılmaktadır. Çözünürlük kısmında açıklandığı üzere kolon dolgu maddesinin polaritesi reçeteye artan miktarlarda monomer eklenmesi koşuluyla değiştirilmektedir. Alıkonma faktörü de kolon polaritesiyle değiştiği için, sadece monomer/çapraz bağlayıcı oranının değişmesi koşulunda alıkonma faktörü üzerinde istatistiksel olarak önemli bir fark elde edilmiştir. %20 asetonitril–%80 etanol mobil faz derişiminde diğer durumlarda β -karoten 9. dakikada, likopen de 21. dakikada kolonu terk ederken, reçetedeki monomer miktarı minimum değerdeyken β -karotenin 23. dakikada, likopen de 85. dakikada kolonu terk ettiği görülmüştür. Polimer reçetesindeki THFA miktarı arttıkça kolonun polaritesi de artmıştır ve apolar karakterli likopen ve β -karotenin kolonda tutulma süreleri de istatistiksel olarak önemli ölçüde azalmıştır.

Teorik Tabaka Sayısı ve Yüksekliği

Teorik tabaka sayısı; kolonun hızlı çalışmasının önemli bir göstergesidir. Elde edilen kromatografik piklerin keskinliği bir kolonun verimini gösteriyorsa, bu verimin nicel ölçüsü de teorik tabaka sayısıdır. Teorik tabaka sayısı kolon ayırma verimini ifade eden ve en yaygın olarak kullanılan büyüklüklerden biridir. Bazı çalışmalarda ise kolon verimi yine teorik tabaka sayısı yardımıyla hesaplanan teorik tabaka yüksekliği ile ifade edilmektedir.

Çalışma kapsamında sentezlenen partiküllerde ulaşılmak istenen hedef monodispersitenin korunarak, ayrılma sınırı üzerinde bir çözünürlük değeriyle, en yüksek teorik tabaka katsayısına ulaşmaktır. Bölüm 3.2.3.3 sentez parametrelerinin teorik tabaka sayısı üzerine etkisinin sonuçlarını grafiklerle açıklamaktadır.

Tez çalışması boyunca kullanılan her iki mobil faz konsantrasyonunda ve likopen ve β -karotenin analit olarak kullanıldığı durumda çıkış lateksi/monomer oranının teorik tabaka sayısı üzerine etkisi önemli bulunmuştur. Aynı şekilde değişen

monomer/çapraz bağlayıcı oranının ve değişen porojen/çapraz bağlayıcı oranının da kolonların teorik tabaka sayısı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. En yüksek teorik tabaka sayısı değerleri çıkış lateksi/monomer oranının 0.4 olduğu, monomer/çapraz bağlayıcı oranının 0.4 olduğu ve porojen/çapraz bağlayıcı oranının da 2 olduğu koşullarda elde edilmiştir.

Teorik tabaka yüksekliği de teorik tabaka sayısı ile ters orantılıdır ve kolon boyuna oranlanması ile elde edilir. Bir kolonun iyi performans gösterebilmesi için teorik tabaka katsayısının yüksek olması istenirken teorik tabaka yüksekliğinin de düşük olması istenir. Dolayısıyla elde edilen sonuçlar teorik tabaka sayıları ile paralel bulunmuştur.

Domateste Yapılan Analizler

Domates meyvesinin büyük bir kısmı sudan oluşmaktadır. Geriye kalan kısmında ise karbonhidratlar, organik asitler, aminoasitler, vitaminler, renk pigmentleri, fenolik bileşikler ve çeşitli mineral maddeleri bulunmaktadır.

Toplam çözünür katı madde miktarı gelişimin hızlı olduğu aşamadaki nişasta birikimine bağlıdır. Domatesin kuru maddesi ortalama %5-10 arasında olmakla birlikte bu kuru maddenin %75'i suda çözünebilir yapıdadır. Ayrıca domates, % 1-3 arasında kabuk ve çekirdek içerir [164]. Toplam kuru maddenin yaklaşık yarısını şekerler, yaklaşık %10'unu sitrik ve malik asit olmak üzere organik asitler oluşturur. Yapılan çalışmalarda, domatesin kimyasal bileşiminin; çeşit, olgunluk ve yetiştiği yöredeki çevresel faktörlere bağlı olduğu vurgulanmıştır. Bu yüzden de yapılan literatür incelemesinde kimyasal bileşim ve oranları hakkında birbirinden oldukça farklı sonuçlara ulaşıldığı görülmüştür [62, 165].

Yapılan tez çalışmasında domates meyvesi tüm halde parçalanmış ve domates pulpu elde edilmiştir. Elde edilen pulp, domates posası ve domates serum suyu olmak üzere iki forma ayrılmıştır. Elde edilen domates pulpundan %7.5 oranında posa ve %92.5 oranında serum suyu elde edilmiştir. Bu fraksiyonlarda yapılan kuru madde analizinde literatüre benzer sonuçlar elde edilmiştir [62, 165]. Ayrılan bu formlardan domates serum suyunda organik asit ve şeker analizi yapılmıştır. Toplam kuru

maddenin %58'i şeker %6.5'i de organik asit olarak hesaplanmıştır. Domates pulpunda, posa ve suda ise toplam likopen analizi yapılmıştır ve posadan likopen saflaştırılmıştır.

- Taze domates pulpunda likopen miktarı 331.6 mg/kg taze domates
- Taze domates pulpunda β -karoten miktarı 30.35 mg/kg taze domates
- Domates posasındaki likopen miktarı 2036.6 mg/kg posa
- Domates posasındaki β -karoten miktarı 186.74 mg/kg posa
- Domates serum suyunda likopen 1.47 mg/kg su
- Domates serum suyunda β -karoten 0.063 mg/kg su olarak hesaplanmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre; likopen ve β -karoten domates suyuna geçmemekte ve büyük bir kısmı domates endüstrisinde atık olarak uzaklaştırılan posa kısmında kaldığı görülmektedir [164, 166].

Domates yan ürünleri, domates işlemedeki artışa paralel olarak her geçen yıl artış göstermektedir. Avrupa'da 10 milyon ton domatesin işlendiği dolayısıyla da 100 bin ton atık olduğu tahmin edilmektedir. Atıklar %10-40 oranında kabuk ve çekirdek ağırlıklıdır. Salça üretim endüstrisinde oluşan atık büyük oranda palperden geçirme kısmında oluşmaktadır. Kuru atıkta %44 çekirdek, %56 pulp ve kabuk bulunur. Çekirdekler yağ içeriği, posada protein içeriği bakımından zengin olduğundan bu kısım genellikle hayvan yemi olarak değerlendirilmektedir [164]. Fakat bu atığın değerlendirilmesinde kar marjı en yüksek yaklaşım, likopen kaynağı olarak kullanılmalıdır [166, 167].

Yapılan başka bir çalışmada likopenin ağırlıklı olarak suda çözünmeyen fraksiyonda ve kabukta bulunduğu tespit edilmiştir, Posadan ekstrakte edilen likopenin yaklaşık %72-92'si kabuk fraksiyonundadır. Bu miktarlar değerlendirmeye değer düzeyde olup domates atığının çok önemli bir likopen kaynağı olduğunu göstermektedir [166, 167].

Bir çalışmada da yüksek basınç uygulamasının domates işleme atıklarından likopen ekstraksiyonuna etkisi araştırılmıştır. Çalışmada %74.5 \pm 3 kabuk, %25.5 \pm 2.2 çekirdek içeren domates işleme atığının likopen içeriği 500 MPa basınç uygulamasıyla 1 dakika süreyle yapılan ekstraksiyon işlemiyle 41.73 mg/100 g, 30

dakikalık klasik ekstraksiyon uygulamasıyla ise 35.61 mg/100 gr olarak bulunmuştur [164].

Hegzan:aseton:etanol (2:1:1) kombinasyonunu domates atığından ve pembe greyfurt suyundan karotenoid ekstraksiyonu için kullanılmıştır ve likopen içeriğini domates atığı için 15.8 mg/100 g, pembe greyfurt içinse 3.32 mg/ 100 g olarak bildirilmiştir. Hegzan:aseton:metanol solvent bileşimiyle ekstrakte edilen domates posasında 14.1 mg/100 g domates pulpunda ise 6.94 mg/100 g likopen olduğunu bulunmuştur [168].

Bir diğer çalışmada solvent olarak farklı miktarlarda metanol ve etanol kullanarak likopen içeriğini 2.55 ve 9.85 mg/100 g aralığında hesaplanmıştır [164].

Kaur *et al.* tarafından da solvent olarak hegzan:aseton:etanol (2:1:1) kombinasyonu kullanıldığında domates örneklerindeki likopen miktarı 0.639-0.98 mg/100 g aralığında bulunmuştur [167].

Literatür karşılaştırması sonucunda kullanılan domates örneklerinin solvent kompozisyonunun ve ekstraksiyon koşullarının bulunan likopen miktarları açısından oldukça önemli olduğu ve değişkenlik gösterdiği söylenebilir.

Likopen Saflaştırılması

Yapılan çalışmada sentez deney planı teorik plaka katsayısına göre yapılırken malzeme performansı bütün kromatografik parametreler göz önüne alınarak değerlendirilmiştir. Tez kapsamında pik çözünürlüğü ve monodispersite bu parametreler içerisinde en önemlileridir. Çözünürlük değeri ve SEM görüntüleri incelendiğinde tezin devamındaki kolon dolgu malzemesi olarak ve likopenin büyük ölçekte saflaştırılması için en iyi performans gösteren “S-4 kodlu monodispers kolon dolgu materyalinin” seçilerek devam edilmesine karar verilmiştir.

S-4 kodlu kolon dolgu materyali, preparatif LC çalışmaları için 2.12 cm iç çapa ve 10 cm uzunluğa sahip paslanmaz çelik preparatif kolona doldurularak çalışılmıştır. Metanol temizlenmesi ile beraber kloroform ile kademeli elüsyon yapılarak domates ekstraktından likopenin saf olarak elde edilmesine çalışılmıştır. Sonuç olarak tez çalışmasının preparatif LC kısmında, elde edilen domates posası ekstraktından %56.25 verimle %98.99 saflıkta likopen elde edilmiştir.

Literatürde bulunan sınırlı sayıdaki likopen saflaştırılması üzerine yapılan çalışmaya ait yöntemler ve saflık değerleri aşağıdaki paragrafta kısaca açıklanarak karşılaştırma imkanı sağlamaktadır.

Yüksek hızda karşı akım kromatografisiyle domates salçasından likopen saflaştırılmıştır. Preparatif karşı akım kromatografisinde n-hegzan-diklorometan ve asetonitrilden oluşan susuz solvent sistemi kullanılmıştır ve likopen %98.5 saflıkta elde edilmiştir [77].

2013 yılında yapılan bir çalışmada araştırmacılar katılma kompleksi ekstraksiyonu yöntemiyle likopen saflaştırmışlardır. Yöntemin temeli organik solventlerle alınan karotenoidlerden ursodeoksikolik asit ile likopenin çöktürülmesi esasına dayanmaktadır [79].

2011 yılında Aghel *et al.* tarafından salçadan likopen ekstrakte edilip saflaştırılmıştır. Araştırmacılar önce salçayı metanol ile dehidre edip, sonra likopeni metanol-karbondiklorid karışımı ile ekstrakte etmişlerdir. Kristalize ettikleri ekstrakta daha sonraki saflaştırmada rekrystalizasyon ve kolon kromatografisi işlemi uygulanmıştır. Ayırıştırılan saf likopen miktarı 100 g domates salçası başına 2.3 mg olarak bulunmuştur [80].

2013 yılında Portekiz ve Brezilya'da insanlar üzerinde yapılan multidisipliner bir çalışmada likopen solvent ekstraksiyonu devamında ters faz sıvı kromatografisi ile saflaştırılıp insan denemelerinde kullanılmıştır [81].

Daniele Naviglio ise patentli bir ekstraktör icat etmiş ve bu ekstraktörle saf likopen elde ettiğini belirtmiştir. Yüksek basınç altında domates atıklarından likopen fazının ayrılmasında su kullanılmıştır. Suda çözünür olmayan likopeni, yarı-kristal katı formda geri kazanılmıştır. Daha sonraki aşamada ise küçük bir miktar organik çözücü kullanılarak katı faz ekstraksiyonu ile saflaştırılmış ve %98.0 kromatografik saflıkta likopen elde edilmiştir [18].

2010 yılında bir grup Çinli araştırmacı tarafından ticari makro gözenekli adsorban reçineler kullanılarak domates dokusundan %66.9 bir geri kazanım ile likopen

saflaştırmışlardır [4]. Yapılan bu tez çalışmasında ise % 98.99 saflıkta likopen elde edilmiş ve bu değer literatürle karşılaştırıldığında uygulanan yöntemin likopen saflaştırılması için uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Saflaştırılan Likopenin Enkapsülasyonu

Enkapsülasyon katı, sıvı ya da gaz haldeki malzemelerin kaplanarak kapsüller içinde tutulması ile tüm bileşeni koruyarak, belli bir zaman periyodunda kontrollü olarak belirli bir hızda serbest kalmasına olanak sağlayan ve her geçen gün gelişen bir teknolojidir [90].

Çalışmada preparatif sıvı kromatografisi ile saflaştırılan likopenin olumsuz çevresel koşullardan etkilenmesini minimize etmek için enkapsüle edilmesi planlanmıştır. Likopen ısı işlemlere karşı dirençli fakat ışık ve oksijene duyarlı bir aktif maddedir. Çalışmada likopen invers jelleşme metodu kullanılarak damlatma yöntemiyle enkapsüle edilmiştir. Temelde bir arayüz polimerizasyon metodu olan invers jelleşme yöntemi yani damlatma, uygulanma koşulları esnek ve pratik bir mikroenkapsülasyon yöntemidir. Bu yöntemde birbirine karışmayan iki faz bulunmaktadır. Çekirdek maddesi olması istenen ve içerisinde bir polimer çözeltisi taşıyan emülsiyon, jelleştirici bir çözelti içerisine damlatılır. Jelleştirici bileşen, emülsiyondan polimer çözeltisine doğru hareket ederken faz arayüzünde gerçekleşen hızlı polimerizasyon reaksiyonu sonucu kapsül zarı oluşur ve içi lipofilik sıvı çekirdekli kapsüller oluşur. Bu yöntemde yüksek verimlilikte, sıvı çekirdekli, küre şeklinde ve boy dağılım grafiği dar mikrokapsüller oluşturulabilmektedir. Bu metodun oda koşullarında uygulanabilir olması, organik solvent kullanımı gerektirmemesi, parçacık boyutu kontrolünün pH veya sıcaklık kontrolü gerektirmemesi gıda alanında uygulanabilirliği en önemli avantajlarından [86, 90, 138].

Çalışmada likopenin enkapsülasyonu için sodyum aljinat kullanılmıştır. Enkapsülasyon matriksinin seçimi, sağlık açısından önem taşıyan likopen gibi bir bileşenin biyoyararlılığı ve vücutta hedef bölgede salınımları açısından önem taşımaktadır. Aljnat; mukozaya yapışan, biyoyumlu, biyobozunur, toksik olmayan,

farmasötik ve biyomedikal uygulamalarda kullanılma potansiyeli olan, FDA tarafından oral kullanıma izin verilen hidrofilik bir biyopolimerdir [169].

Çalışmada kullanılan damlatma yönteminde kapsül boyutunu kontrol etmek ve daha spesifik olarak belirli bir boyuta küçültmek için; şırınga pompa düzeneği deney için özel olarak tasarlanan titreşimli dağıtma sistemi ile kombine olarak kullanılmıştır. Geliştirilen şırınga pompa-ekstrüzyon sistemi ile, titreşim ünitesiyle uygulanan sabit titreşimin pompalanan emülsiyonu küçük sıvı damlacıkları halinde dağıtılması prensibinden faydalanılmıştır. Bu yöntem pratik ve ekonomik bir yöntem olup, literatürde eş boyutlu kapsüller oluşturulmasında kullanılan birkaç yöntemden biridir.

Literatürde renk pigmentlerinin enkapsülasyonu ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bir çalışmada domates pulpu atıklarından süperkritik CO₂ ekstraksiyonu ile likopen ekstrakte edilmiş ve likopen ekstraktı %4.5 jelatin, %10 poliglutamik asit ve %4.8 likopen ekstraktı olacak şekilde emülsiyon sistemiyle mikroenkapsüle edilmiştir [74]. Farklı dekstroz eşdeğerindeki maltodekstrinler kullanarak sprey kurutucu ile likopeni enkapsüle edilmiştir [150]. Diğer bir çalışmada da modifiye nişastanın kaplama materyali olarak kullanıldığı sprey kurutma yöntemi ile likopen enkapsüle edilmiştir [151].

Ticari likopen standardı, jelatin sükroz karışımı ile püskürtmeli kurutucu kullanarak enkapsüle edilirken [152], bir diğer çalışmada 3 farklı siklodekstrin kullanılmıştır [153].

2013 yılında yapılan bir çalışmada dut suyu antosiyaninleri aljinat ve kitosan kullanılarak iyonik jelasyon tekniğiyle kapsüllenmiştir ve proses koşulları cevap yüzey metodu kullanılarak optimize edilmiştir [90].

Kapsüllerin Ortalama Çap ve Şekilleri

Çalışma kapsamında elde edilen aljinat-likopen mikro kürelerinin optimum oluşum koşullarının belirlenmesi için çeşitli parametreler denenmiştir. Düzgün homojen ve küresel yapıya sahip olmalarında, aljinat konsantrasyonunun etkisini belirlemek amacıyla çalışmada 4 farklı sodyum aljinat konsantrasyonu ile çalışılmıştır. Ayrıca partikül çapları ve şekilleri üzerine akış hızının etkisinin belirlenmesi amacıyla da

her bir sodyum aljinat konsantrasyonunda 6 farklı pompalama hızı ile çalışılmıştır. Likopen ortalama %60-70 enkapsülasyon verimi ile kapsüllenmiştir. Elde edilen bulgulara göre sodyum aljinat konsantrasyonunun %0.5 ve %1 olduğu durumlarda gözyaşı şeklinde ve tam küresel olmayan mikrokapsüller elde edilmiştir. Sodyum aljinat konsantrasyonunun % 2 olduğu durumda bütün akış hızlarında tam küresel homojen parlak ve stabil mikrokapsüller başarıyla elde edilmiştir. Fakat sodyum aljinat konsantrasyonunun %1.5 olduğu koşulda akış hızının 1.5 ve daha yüksek olduğu koşullarda tam küresel mikrokapsüller elde edilmiştir. Mikrokapsüllere ait optik mikroskop görüntüleri Bölüm 3.4.2’de verilmiştir.

Örnekler daha sonra liyofilize edilerek kurutulmuştur ve liyofilizasyon sonrasında da küreselliklerini koruyabilmişlerdir. Liyofilize edilen partiküllerde kurutma sırasında ortamdan uzaklaşan su, ıslak partiküllere oranla partikül çapında yaklaşık 100 µm’lik bir azalmaya sebep olmuştur. Taramalı elektron mikroskobu görüntülerinde, likopen yüklü aljinat kapsülünün yüzeyi oldukça gözenekli bir yapıya sahip, dolayısı ile de kapsülün oldukça geniş bir yüzey alanına olduğu gözlemlenmiştir. Sodyum aljinattan oluşan likopen yüklenmemiş mikroenkapsülün yüzeyinde dondurarak kurutma sırasında oluşan vakumdan dolayı küreselliğinde kısmen bozulma, büzülme ve çökmeler gözlemlenmiştir.

Kapsüllerin Çekirdek sızıntısı

Çekirdek sızıntısı testinde 1.5 mL/dk akış hızında üretilen ve liyofilize edilen enkapsüller kullanılmıştır. Ortam sıcaklığı kontrollü olarak artırılmış ve kuru ağırlık bazında çekirdek sızıntısı değerleri hesaplanmıştır. Kapsül membranındaki sodyum aljinat konsantrasyonu arttıkça çekirdekten matriks sızıntısı azalmıştır. Bu da membran zar yapısının kuvvetlenmesinden ve stabilitesinin artmasından kaynaklanmaktadır. % 1, % 1.5 ve % 2 oranlarındaki membranın uygulanan sıcaklık değerlerinde çekirdek içeriğini oldukça iyi oranda hapsettiği ve başarılı kapsüller olduğu tespit edilmiştir.

Esansiyel yağların sodyum aljinat ve kitosan ile enkapsüle edildiği bir çalışmada sadece aljinat kaplı kapsüllerden çekirdek sızıntısının daha fazla olduğu, aljinatın

üzeri kitosanla kaplandığı takdirde çekirdek sızıntısında azalma gözlemlenmiştir [161].

Kapsüllerin Kontrollü Salım Testleri

Vücuda giren maddelerin mide-bağırsak sistemindeki enzimlerden etkilenip yıkıma uğraması veya vücudun doğal savunma sistemi tarafından yabancı bir madde olarak algılanıp karaciğer, dalak ve kemik iliği tarafından absorplanıp istenilen bölgeye gitmemesi riski vardır.

Enkapsüle edilen maddelerin kontrollü salımının ya da hedeflendirmenin amacı, hücresel düzeylere taşınmayı arttırmak, enkapsüle bileşenin stabilitesini arttırmak ve vücudun diğer bölgelerinde istenmeyen etkileşime neden olmadan hedef bölgede istenilen düzeyde yanıt elde etmektir yani düşük dozlarda maksimum etki yaratmaktır.

Elde edilen bulgular, üretilen kapsüllerin yapay mide ortamında (pH 2) yapay bağırsak (pH 7) ortamına göre daha stabil oldukları göstermektedir. 4 farklı sodyum aljinat oranında da kapsüllerin yapay bağırsak sıvısında 10 dakika içerisinde tamamen açıldığı ve içindeki likopenin tamamen ortama salındığı belirlenmiştir. Fakat enkapsül membranındaki sodyum aljinat oranı arttıkça kapsüllerin midedeki salımında azalma belirlenmiştir. Sonuç olarak yüksek sodyum aljinat konsantrasyonunda kapsüllenen likopenin büyük bir bölümü, mide ortamında zarara uğramadan geçerek direkt ince bağırsakta salınmaktadır. Daha sonra da direkt kapsüllerle ya da besinlerle alınan likopen, ince bağırsaktaki lipid miselleri içine geçmekte ve bağırsaktaki besinsel lipidler hidrofobik yapıdaki likopenin çözünmesine sonra da pasif transport ile intestinal mukoza hücrelerine geçmesine yardımcı olmaktadır.

Elde edilen bulgulara benzerlik gösteren bir çalışmada Chiu *et al.* domates posasından elde ettikleri likopen ekstraktını glutamik asit ve jelatinle enkapsüle etmişler ve pH 2.0 ve 3.5'ta likopen salımı olmadığını pH 5.5 ve 7.0'de likopen salımının daha hızlı olduğunu bildirmişlerdir [74]. Domates oleoresinlerinin mısır zeini ile enkapsüle edildiği diğer bir çalışmada pH 3.5 model sindirim sistemi değeri

olarak seçilmiş ve kapsüllerin içeriği 2 saat boyunca monitorize edilmiştir. 2 saat sonunda oleoresinlerin %30'unun salındığını bildirmişlerdir [116].

Model Gıda Uygulamaları

Çalışmanın enkapsülasyon kısmında likopenin seçilen bir model gıdada uygulanması amacıyla kek model ürün olarak seçilmiştir. Aynı miktarda likopen içeren fakat oranlarda sodyum aljinat ile kapsüllenen likopen katkılı keklerin radikal süpürücü güçlerinde kontrol grubuna göre yaklaşık %30'luk bir artış belirlenmiştir. Kekler 180 °C sıcaklıkta fırınlanmıştır ve uygulanan bu sıcaklıkta enkapsüle likopenlerin keklerin içinde salınmadan kaldıkları Bölüm 3.4.6.1'deki mikroskop görüntülerinden de açıkça görülmektedir.

Ayrıca kontrol grubuna göre diğer örneklerin L^* , a^* ve b^* değerlerinde artış belirlenmiştir. Hafif sarı renkte olan, parlak ve likopen yüklü kapsül ilavesi keklerin parlaklık, kırmızılık ve sarılık değerlerinde artışa neden olmuştur.

Rocha *et al.* enkapsüle ettikleri ticari likopen standardını kek örneklerine ilave etmişlerdir. Kontrol grubu, serbest likopen katkılı ve enkapsüle likopen katkılı keklerin renk değerleri karşılaştırılmış, keklerin a^* değerlerini en çok serbest likopen katkılı kekte, sonra enkapsüle likopen katkılı kekte kontrol grubuna göre fazla bulmuşlardır [152].

Çalışmadan Elde Edilen Çıkarımlar ve Özgün Değer

- Öncelikle elde edilen bulgular; sunulan tez önerisi kapsamında, uygulanan yöntemlerin ve geliştirilen sentez stratejisinin oldukça iyi bir kromatografik davranış eldesini sağladığını ve çalışmanın ana hedefine başarılı bir şekilde ulaşıldığını göstermektedir.
- Çalışmanın temelini oluşturan monodispers kolon dolgu maddelerinin sentezlenmesi kısmında, ters faz modunda, ayırma sınırının üzerinde pik çözünürlüğü ve yeterli oranda teorik kademe sayılarına sahip, ticari ters faz modunda ayırım yapan kolonlar ile yarışabilecek polar kolonlar sentezlenmiştir.
- Yapılan literatür incelemesinde “tetrahidrofurfuril akrilat” bazlı kolon dolgu malzemesinin sentezlendiği sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Tetrahidrofurfuril

akrilat ve divinilbenzen kullanılarak kolon dolgu malzemesi sentezlenen bir çalışmaya ise rastlanmamıştır.

- Çalışmalarda sentezlenen THFA-co-DVB polimerik adsorbanlar 6 µ çapında, monodispers ve küresel formda sentezlenmiştir.
- Likopenin saflaştırılmasıyla ilgili sınırlı sayıda bulunan araştırmalar içerisinde çalışma kapsamında geliştirilen teknikle likopen saflaştırılmasına yönelik bir yaklaşıma rastlanmamıştır.
- Ülkemizde likopenin saf olarak elde edildiği yayınlanmış bir çalışmaya da rastlanmamıştır.
- Günümüzde izole edilmiş ve saflaştırılmış bir bileşen ticari olarak oldukça büyük bir öneme sahip olmakla birlikte, saflaştırma ve tanımlama işlemi oldukça kompleks ve önemli bir işlemdir ve son yıllarda araştırma alanı bulmuştur. İster endüstride katkı maddesi olarak kullanılsın ister klinik çalışmalarda kullanılsın mg boyutunda yüksek miktarlarda saf bileşene ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bileşenlerin de pahalı olması karşılaşılan en büyük problemlerden birisidir. Preparatif sıvı kromatografisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisinin geliştirilmiş bir türüdür ve çeşitli bileşiklerin izolasyonu ve saflaştırılması için kullanılmaktadır. Literatürde dolgu preparatif kolon kullanılarak likopenin saflaştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.
- Likopenin saflaştırıldığı diğer çalışmalarda %98.99 saflıkta likopen elde edilememiştir.
- Likopen domatese renk vermenin yanında ayrıca birçok fonksiyonel özelliğe sahiptir. Çok güçlü bir antioksidandır ve likopenin kansere, kalp hastalıklarına ve bazı kronik rahatsızlıklara iyi geldiği çeşitli çalışmalarla desteklenmiştir.
- Domates endüstrisi atıkları özellikle kabuğunu içeren kısım iyi bir likopen kaynağıdır. Hayvan yemi olarak değerlendirilen bu kısım çok önemli bir biyoaktif bileşenin saflaştırılması için en ekonomik hammadde kaynağıdır.
- Likopen eldesi işlemleri sırasında çevre koşulları, oksidatif bozulmayı ve izomerizasyonu engellemek için kontrol altında tutulmalıdır. Hammadde kaynakları ve standartlar özenle korunmalı ve işlemler hızlı bir şekilde gerçekleştirilmelidir.

- Gıda endüstrisinde son yıllarda üzerinde önemle çalışılan konulardan birisi de istenilen gıda bileşeninin vücudun istenilen bölgesinde salınımını sağlayarak biyoyararlılığı arttırmaktır ve bunu yaparken de eklenen biyoaktifin gıdanın duyuşal özelliklerini olumsuz etkilememesini sağlamaktır. Bu doğrultuda, saflaştırılan likopen iyonik jelasyon yöntemiyle sodyum aljinat kullanılarak mikrokapsüllenmiştir. Enkapsülasyonda kullanılan düzenek tez çalışması için özel olarak tasarlanmış olup şırınga pompa-ekstrüzyon sistemi oldukça pratik ve ekonomik olmakla birlikte eş boyutlu, küresel ve stabil kapsüller elde edilebilmesine olanak sağlamıştır.
- Literatürde saf likopenin sodyum aljinat ile enkapsüle edildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Kullanılan kaplama materyali likopenin yapay mide sıvısında salınımını engellemede etkili olmuşken, kapsül içerisindeki likopen yapay bağırsak sıvısında tamamen açığa çıkabilmiştir.
- Elde edilen enkapsüller seçilen model gıdada stabilitesini korumuş ve likopenin radikal süpürücü gücü üründe de korunmuştur. Model gıdada uygulanabilirliği diğer gıdalarda da kullanılabilirliğini göstermiştir.
- Mikroenkapsülasyonun likopenin stabilitesini korumak için iyi bir yöntem olduğu görülmüştür.
- Sunulan tez çalışmasının amacı her ne kadar literatüre katkıda bulunmak ise de; bunun yanısıra son yıllarda özellikle gıda endüstrisinde artan saflaştırılmış biyoaktif bileşen talebini düşük maliyette karşılayabilmek; endüstriyel ölçekte üretilebilecek alternatif bir saflaştırma yöntemi önermek; bunun için gerekli kolon dolgu maddeleri sentezlemek, uluslararası kabulü için gerekli çalışmaları başlatmak ve ihraç edilebilir duruma getirmek; belirli saflık derecesindeki standartların ithalatını azaltmak böylece yeni bir gelir kaynağı yaratarak ülke ekonomisine katkıda bulunmak hedeflenmiştir. Bu kapsamda sonuçlandırılan tez çalışması bu nihai hedefleri karşılayacak niteliktedir.

KAYNAKLAR

1. Vissers, J. P. C., Claessens, H. A., Cramers, C. A., 1997. Microcolumn liquid chromatography: instrumentation, detection and applications. **Journal of Chromatography A**, (779): 1-28.
2. Zotou, A., 2012. An overview of recent advances in HPLC instrumentation. **Central European Journal of Chemistry**, 10 (3): 554-569.
3. Hossoya K., Teremachi M., Tanaka N., Kobayashi A., Kanda T., Ohtsu Y., 2001. Preparation strategy for uniformly sized, polymer-beads hplc packing materials having practically acceptable column efficiency, 1. Copolymerization technique. **Analytical Chemistry**, 73 (24): 5852-7.
4. Li, J., Chen, Z.B., Di, D.L. 2012., Preparative separation and purification of rebaudioside a from steviosides crude extracts by mixed bed of macroporous adsorption resins. **Food Chemistry**, 132 (1): 268-276.
5. Korhonen H., 2002. Technology options for new nutritional concept. **International Journal of Dairy Tecnology**, 55 (2): 79-87.
6. Stacewicz-Sapuntzakis, M., Bowen, P. E., 2005. Role of lycopene and tomato products in prostate health. **Biochimica et Biophysica Acta**, 40 (17): 202-205.
7. Norrish, A.E., Jackson, R.T., Sharpe, S.J., Skeaff, C.M., 2000. Prostate cancer and dietary carotenoids. **American Journal of Epidemiology**, (151): 119–123.
8. Rao, A.V. and Agarwal, S., 1999. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review. **Nutritional Research**, (19); 305-323.
9. Wertz, K., Siler, U., Goralczyk, R., 2004. Lycopene: modes of action to promote prostate health. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, (430): 127–134.
10. Levy, J., Bosin, E., Feldman, B., 1995. Lycopene is a more potent inhibitory of human cancer cell proliferation than either alpha-carotene or beta-carotene, **Nutritional Cancer**, (24): 257–266.
11. Hışıl, Y., 2010. “*Enstrümental Gıda Analizleri*”, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 544 s.

12. Ünsal, E., 2006. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İçin Farklı Polaritelere Sahip, Fonksiyonel Gruplu Kolon Dolgu Materyallerinin Sentezi ve Kromatografik Karakterizasyonu, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 208 s.
13. Maraş, B., 2011. Hidrojel Formunda Reaktif Monodispers-Makrogözenekli Partiküllerin Sentezi ve Kromatografik Sabit Faz Olarak Kullanımı, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 114 s.
14. Camli S. T., Unsal E., Senel S., Tuncel A., 2004. Chromatographic performance of monodisperse macroporous particles produced by modified seeded polymerization. II. The effect of the diluent/seed-latex ratio. **Journal of Applied Polymer Science**, **92 (6)**: 3685-3696.
15. Çağlayan, B., Unsal, E., Çamli, T., Tuncel, M., Tuncel, A., 2006. Monodisperse porous poly(vinyl acetate-codivinylbenzene) particles by single-stage seeded polymerization: HPLC A packing material for reversed phase. **Journal of Separation Science**, **29 (7)**: 36-44.
16. Olsen, B.A., 2001. Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities. **Journal of Chromatography**, **(913)**: 113-122.
17. McCalley, D.V., 2008. Evaluation of the properties of a superficially porous silica stationary phase in hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Chromatography**, **11 (93)**: 85-91.
18. Naviglio, D., Caruso, T., Iannece, P., Aragon, A. and Santini, A., 2008. Characterization of high purity lycopene from tomato wastes using a new pressurized extraction approach. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, **56 (15)**: 27-31.
19. Wellings D.A., 2006. *A Practical Handbook of Preparative HPLC*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 193 s.
20. Bidlingmeyer B.A., 1991. *Preparative Liquid Chromatography*. Elsevier Science Publishing Company Inc., New York, U.S.A., 341 s.

21. Özlü, V., 2004. Emülsiyon Polimerizasyon Yöntemini Kullanarak Sıcaklığa Duyarlı DEG Bazlı Polimerik Partiküllerinin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 78 s.
22. Tuncel A., Kahraman, R., Piskin, E.,1994. Monosize polystyrene latices carrying functional groups on their surfaces. **Journal of Applied Polymer Science**, (51): 1485-1498.
23. Çamlı T., Tuncel M., Senel S., Tuncel A., 2002. Functional, uniform and macroporous latex particles: preparation, electron microscopic characterization and nonspecific protein adsorption properties. **Journal of Applied Polymer Science**, 2 (84),414-429.
24. Cheng C. M., Micale J., Vanderhoff W., El-Aasser M.S.,1992. Monodisperse porous particles: Formation of the porous structure, **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**, (30): 235-244.
25. Cheng C. M., Vanderhoff W., El-Aasser M.S., 1992. Synthesis and Characterization of Monodisperse Porous Polymer Particles. **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**, 2 (30): 245-256.
26. Shi, J., Le Maguer, M., 2000. Lycopene in Tomatoes: Chemical and Physical Properties Affected by Food Processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 40 (1): 1–42.
27. Woutersen, R.A., Wolterbeek, A.P.M., Appel, M.J., Van der Berg, H., Goldbohm, R.A. and Feron, V.J., 1999. Safety evaluation of synthetic β -carotene. **Critical Review Toxicology**, (29): 515-542.
28. Kopsell, D.A. and Kopsell, D.E., 2006. Accumulation and bioavailability of dietary carotenoids in vegetable crops. **Trends Plant Science**, (11); 499-507.
29. Estrella, A., Lopez,-Ortiz, J.F., Cabri, W., Rodriguez-Otero, C., Fraile, N., Erbez, A.J., Espartero, J.L., Carmona,-Cuenca, I., Chaves, E., Munoz-Ruiz, A., 2004. Natural lycopene from *Blakeslea trispora*: All trans lycopene thermochemical and structural properties. **Thermochimica Acta**, (417): 157-161.

30. Bohn, T., 2008. Bioavailability of non-provitamin A carotenoids. **Current Nutrition & Food Science**, (4) 4: 240-258.
31. Erge,H.S., 2007. Domateste (Lycopersicum Esculentum) Karatenoid Madde Dağılımı Ve Antioksidan Aktivite, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Ankara, 91 s.
32. Konar N., 2008. Domates Karotenoidlerinden Likopenin Doğal Renklendirici ve Antioksidan Olarak Fonksiyonel Gıda Üretiminde Kullanımı., Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara 74 s.
33. Cemeroglu, B., 2004. *Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi*, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Ankara, 728 s.
34. Özkan, M. ve Cemeroglu, B., 2005. Isıl işlem sırasında gıda bileşenlerinin parçalanma kinetiği, Gıda Mühendisliğinde Temel İşlemler. Başkent Klîşe Matbaacılık, Ankara, 435-490 s.
35. Krinsky, N.I. and Johnson, E.J. 2005. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**. (26); 459-516.
36. Shi J., Qu Q., LeMaguer M., Kakuda Y., Yeung D., Jiang Y., 2004. Stability and synergistic effect of antioxidative properties of lycopene and other active components. **Critical Research of Food Science and Nutrition**, (44) 7-8: 559-573 s.
37. Shi, J., Qu, Q., Kakuda, Y., Xue, S. J., Jiang, Y., Koided, S., Shim, Y., 2007. Investigation of the antioxidant and synergistic activity of lycopene and other natural antioxidants using LAME and AMVN model systems. **Journal of Food Composition and Analysis**, (20) 7: 603–608.
38. Stahl, W. and Sies, H., 2005. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, (2) 1740: 101.
39. Giovannucci, E., Ascherio, A., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Willett, W.C., 1995. Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. **Journal of National Cancer Institue**, (87) 23: 1767–1776.
40. Olson, J.A. and Krinsky, N.I., 1995. Introduction: The colorful, fascinating world of the carotenoids: important physiologic modulators. **FASEB Journal**, (9) 15: 47-50.

41. Shi, J., Le Maguer, M., 2000. Lycopene in tomatoes: Chemical and physical properties affected by food processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, **40** (1):1-42.
42. Küçük, V., Ballıkaya, S., 2003. Meyve Sebzelerden Elde Edilen Doğal Renk Maddelerinin Üretimi ve Gıda Sanayiinde Kullanım Alanları, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Bitirme Ödevi, İzmir, 54 s.
43. Velioglu, S., 2000. Doğal antioksidanların insan sağlığına etkileri. **Gıda**, **25** (3): 167-176.
44. Landrum, J.T., Bone, R.A., 2001. Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **(385)** 1: 28-40.
45. Garcia-Casal, M.N., 2006. Carotenoids increase iron absorption from cereal-based food in the human. **Nutritional Research**, **(26)** 7: 340-344
46. Omoni, A.O., Aluko, R.E., 2005. The anticarcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: a review. **Trends in Food Science and Technology**, **(16)** 8: 344-350.
47. Düzyaman, E., Duman, İ., 2003. Dried tomato as a new potential in export and domestic market diversification in Turkey. Proceedings of the 8. International ISHS Symposium on the Proceeding Tomato, **Acta Horticulturae**, **(613)**: 433- 436.
48. Davis, A.R., Fish, W.W., Perkins-Veazie, P., 2003. A rapid spectrophotometric method for analyzing lycopene content in tomato and tomato products. **Postharvest Biology and Technology**, **(28)** 3: 425-430.
49. Vasapollo, G., Lango, L., Rescio, L., Ciurlia, L., 2004. Innovative supercritical CO₂ extraction of lycopene from tomato in the presence of vegetable oil as co-solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, **(29)** 1-2, 87-96.
50. Roldan-Gutierrez JM, de Castro MDL., 2007. Lycopene: the need for better methods for characterization and determination. **Trends in Analytical Chemistry**. **(26)** 2: 163–170.
51. McCollum, J.P., 1995. Distribution of carotenoids in the tomato. **Food Research**, **(20)** 1: 55-59.
52. Khachik F., Carvalho L., Bernstein PS., Muir GJ., Zhao DY., Katz NB., 2002. Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their

- impact on human health. **Experimental Biology and Medicine**, **227 (10)**:845-51.
53. Georgé, S., Tourniaire, F., Gautier, H., Goupy, P., Rock, E., Veyrat, C. C., 2010. Changes in the contents of carotenoids, phenolic compounds and vitamin C during technical processing and lyophilisation of red and yellow tomatoes. **Food Chemistry**, **227 (10)**: 1603–1611.
 54. Toor, R. K. and Savage, G. P., 2006. Effect of semi-drying on the antioxidant components of tomatoes. **Food Chemistry**, **94, (1)**; 90-97.
 55. Giovanelli, G and Paradiso A, 2002. Stability of dried and intermediate moisture tomato pulp during storage. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, **(50)**: 7277-7281.
 56. Lavelli, V., 2001. Properties of tomatoe powders as additives for food fortification and stabilization. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, **49 (4)**: 2037-2042.
 57. Zanoni, A., Peri, C., Nani, R., Lavelli, V., 1999. Oxidative heat damage of tomato halves as affected by drying. **Food Research International**, **31(5)**, 395-401.
 58. Fish, W. W., Perkins-Veazie, P. and Collins, J. K., 2002. A Quantitative assay for lycopene that utilizes reduced volumes of organic solvents. **Journal of Food Composition and Analysis**, **(15) 3**: 309–317.
 59. Lee M.T., Chen, B.H., 2002. Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. **Food Chemistry**, **78 (4)**: 425-432.
 60. Liu A., Pajkovic N., Pang Y., 2006. Absorption and subcellular localization of lycopene in human prostate cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics** **5**: 2879-2885.
 61. Hekimoğlu A., 2010. Likopenin antikarsinojenik mekanizması. **Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi**, **25 (1)**: 57-62.
 62. Çapanoğlu, E., Boyacıoğlu, D., 2010. Domatesin gelişimi sırasında antioksidan bileşiklerinde meydana gelen değişimler. **Akademik Gıda**, **8 (1)** 44-48.
 63. Shixian Q., Dai Y., Kakuda Y., Shi Y., Mittal G., Young D., Jiang Y., 2005. Synergistic anti-oxidative effects of lycopene with other bioactive compounds. **Food Reviews International**, **(21) 7**: 295-311.

64. Fornelli F., Leone A., Verdesca I., Minervini F., Zacheo G., 2007. The influence of lycopene on the proliferation of human breast cell line (MCF-7). **Toxicology in Vitro**, 21: 217–223.
65. Martinez-Ferrera M., Verghese M., Walker L.T., Shackelford L., Chawan C.B., Jhala N., 2006. Lycopene reduces azoxymethane-induced colon tumors in fisher 344 rats. **Nutrition Research**, 26: 84– 91.
66. Venkateswaran V, Klotz LH, Ramani M, 2009. A combination of micronutrients is beneficial in reducing the incidence of prostate cancer and increasing survival in the lady transgenic model. **Cancer Prevention Research**, (2) 5: 473-483.
67. Tang L, Jin T, Zeng X, Wang JS., 2005. Lycopene inhibits the growth of human androgen-independent prostate cancer cells in vitro and in BALB/c nude mice. **Journal of Nutrition**; 135: 287-290.
68. Wang, L. and Weller, C. L., 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**, (17) 6: , 300-312.
69. Choudhari, S.M., Ananthanarayan, L., 2007. Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues . **University Institute of Chemical Technology**, (102) 1: 77-81.
70. Sevindik H., 2007. Pembe Greyfurt Suyu ve Domates Pulpunda Likopen Ve β Karotenin Isıl Stabilitesi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 79 s.
71. Ma, Y., Ye, X., Hao, Y., Xu, G., Xu, G. and Liu, D., 2008. Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel. **Ultrasonics Sonochemistry**, 15(3), 27-32.
72. Kuti, J. O. and Konuru, H. B., 2005. Effects of genotype and cultivation environment on lycopene content in red ripe tomatoes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, (85) 12: 2021–2026.
73. Vagi, E., Simandi B., Vasarhelyine, KP., Daood, H., Kery, A., Doleschall, F., Nagy, B., 2007. Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids, tocopherols and sitosterols from industrial tomato by products. **The Journal of Supercritical Fluid**, 40 (2): 218-226.

74. Chiu, Y.T.& Chiu, C.P.& Chien, J.T.& Ho, G.H.& Yang, J.& Chen, B.H., 2007. Encapsulation of lycopene extract from tomato pulp waste with gelatin and poly (γ -glutamic acid) as carrier. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, (55): 5123-5130.
75. Perretti, G.; Troilo, A.; Bravi, E.; Marconi, O.; Galgano, F.; Fantozzi, P., 2013. Production of a lycopene-enriched fraction from tomato pomace using supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, (82) 2: 177-182.
76. Roh, M.K., Jeon, M.H., Moon, J.N., W.S., Parkand, S.M., Choi, J.S., 2013. Simple method for the isolation of lycopene from lycopersicon esculentum. **Botanical sciences**, 91 (2): 187-192.
77. Weia, Y., Zhanga, T., Xua, G., Itob, Y., 2001. Application of analytical and preparative high-speed counter-current chromatography for separation of lycopene from crude extract of tomato paste. **Journal of Chromatography A**, (929): 169–173.
78. Xu,Y., Pan S., 2013. Effects of various factors of ultrasonic treatment on the extraction yield of all-trans-lycopene from red grapefruit. **Ultrasonics Sonochemistry**, (20) 4: 1026–1032.
79. Seifi, M., Seifi, P., Hadizadeh, F., Mohajeri, S.A., 2013. Extraction of lycopene from tomato paste by ursodeoxycholic acid using the selective inclusion complex method. **Journal of Food Science**, (78) 11: 1680-1685.
80. Aghel, N., Ramezani, Z., Amirfakhrian, S., 2011. Isolation and quantification of lycopene from tomato cultivated in Dezfoul, Iran, Jundishapur. **Journal of Natural Pharmaceutical Products**, (1) 6: 9-15.
81. Ascenso A., Pinho S., Eleutério C., Praça F., Bentley M., Oliveira H., 2013. Lycopene from tomatoes: vesicular nanocarrier formulations for dermal delivery. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, (30): 61, 7284–7293.
82. Ezio, R., 2010. Recent patents on the extraction of carotenoids. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, (2): 75-82.
83. Wang, X., Li, X., Chen, L., Xie, F., Yu, L. ve Li, B., 2011. Preparation and characterisation of octenyl succinate starch as a delivery carrier for bioactive food components. **Food Chemistry**, (126) 1218-1225.

84. Jyothi, N. V. N., Prasanna, P. M., Sakarkar, S. N., Prabha, K. S., Ramaiah, P. S., Srawan, G. Y., 2010. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. **Journal of Microencapsulation**, (27) 3: 187-197.
85. Abbas, S., Da Wei, C., Hayat, K., Zhang, X. M., 2012. Ascorbic acid: microencapsulation techniques and trends-a review. **Food Reviews International**, (28) 4: 343-374.
86. Ersus, S., Yurdagel, U., 2007. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. **Journal of Food Engineering**, (80): 805–812.
87. Kunz, B., Krückeberg, S., Weissbrodt, J., 2003. Chancen und grenzen der mikroverkapselung in der modernen lebensmittelverarbeitung. **Chemie Ingenieur Technik**, (75): 1733-1740.
88. Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R., 2007, Application of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, (40) 5: 1107–1121.
89. Desai, K.G.H., Park, H.J., 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, (23) 8: 1361–1394
90. Çoruhli T., 2013. Kara Dut Antosiyaninlerinin İyonik Jelasyon Yöntemi İle Enkapsülasyonu Ve Enkapsülasyon Parametrelerinin Tepki Yüzeyi Metodu İle Optimize Edilmesi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 90 s.
91. Zuidam, N.J., Shimoni, E., 2010. *Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them*. In: *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. Springer, London, 7-29 s.
92. Rao, J., McClements, D.J., 2011. Food-grade microemulsions, nanoemulsions and emulsions: Fabrication from sucrose monopalmitate. **Food Hydrocolloids**, (25) 4: 1413-1423.
93. McClements, D.J., 2009. Structural design principles for improved food performance: nanolaminated biopolymer structures in foods. In: micro/nanoencapsulation of active food ingredients, **American Chemical Society**, (1): 4-7.

94. Shahidi, F., Han, X.Q., 1993. Encapsulation of food ingredients. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, (33): 501–547.
95. Bruschi, M.L., Cardoso, M.L.C., Lucchesi, M.B., Gremiao, M. P.D., 2003. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, (264) 6: 45–55.
96. Koç, M., 2009. Pastörize Sıvı Yumurmanın Püskürtmeli Kurutma Yöntemi ile Optimum Kurutma Koşullarının Belirlenmesi ve Mikroenkapsülasyonu Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 255 s.
97. Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., Sikkema, J., 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, (20) 292-302.
98. Selim, K., Tsimidou, M., Biliaderis, C.G., 2000. Kinetic studies of degradation of saffron carotenoids encapsulated in amorphous polymer matrices. **Food Chemistry**, (71):3 199-206.
99. Adachi, S., Imaoka, H., Hasegawa, Y., Matsuno, R., 2003. Preparation of a water-in-oil-in-water (w/o/w) type microcapsules by a single-droplet-drying method and change in encapsulation efficiency of a hydrophilic substance during storage. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, (67): 1376-1381.
100. Bayram, O.A., Bayram, M., Tekin, A.R., 2005. Spray drying of sumac flavour using sodium chloride, sucrose, glucose and starch as carriers, **Journal of Food Engineering**, 69: 253–269.
101. Kaushik, V., Roos, Y.H., 2005. *Effects of different homogenisation processes on olive oil encapsulation in freeze dried sugar/gelatin matrices*. 15th International Symposium on Microencapsulation, Parma, Italy.
102. Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., Desobry, S., 2006. Flavour encapsulation and controlled release – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, 41: 1–21.
103. Christensen, K.L., Pedersen, G.P., Kristensen, H.G., 2001. Preparation of redispersible dry emulsions by spray drying. **International Journal of Pharmaceutical Sciences**, (212): 187–197.

104. Hogan, S.A., McNamee, B.F., O’Riordan, E.D., O’Sullivan, M., 2001. Emulsification and microencapsulation properties of sodium caseinate/carbohydrate blends. **International Dairy Journal**, (11) 9: 137–144.
105. George, M., Abraham, T.E., 2006. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. **Journal of Controlled Release**, 114, 1–14.
106. Wong, T.W., Chan, L.W., Kho, S.B., Heng, P.W.S., 2002. Design of controlled-release solid dosage forms of alginate and chitosan using microwave. **Journal of Controlled Release**, **84**, 99–114.
107. Gong, R., Li, C., Zhu, S., Zhang, Y., Du, Y., Jiang, J., 2011. A novel pH-sensitive hydrogel based on dual crosslinked alginate/N-a-glutaric acid chitosan for oral delivery of protein. **Carbohydrate Polymers**, (**85**), 869–874.
108. Yoo, S-H., Song, Y-B., Chang, P-S., Lee, H., G., 2006. Microencapsulation of α -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, **38**, (1), 25–30.
109. Jayalalitha, V., Balasundaram, B., Palanidorai, B., Naresh Kumar, C., 2012. Fortification of encapsulated iron in probiotic yoghurt. **International Journal of Agriculture**, **2** (2), 80-84.
110. Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., Desobry, S., 2006. Flavour encapsulation and controlled release – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, **41**: 1–21.
111. Krishnan, S., Bhosale, R., Singhal, R.S. 2005. Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. **Carbohydrate Polymers**, **61**: 95–102.
112. Kanakdande, D., Bhosale, R., Singhal, R.S., 2007. Stability of cumin oleoresin microencapsulated in different combination of gum arabic, maltodextrin and modified starch. **Carbohydrate Polymers**, **67**: 536–541.
113. McNamee, B.F., O’Riordan, E.D., O’Sullivan, M., 1998. Emulsification and Microencapsulation properties of gum Arabic. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 46: 4551–4555.

114. Bertolini, A.C., Siani, A.C., Grosso, C.R.F., 2001. Stability of monoterpenes encapsulated in gum arabic by spray-drying. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, **49**: 780–785.
115. Beristain, C.I., Garcia, H.S., Vernon-Carter, E.J., 2001. Spray-dried encapsulation of cardamom (*Elettaria cardamomum*) essential oil with mesquite (*Prosopis juliflora*) gum. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, **34**: 398–401.
116. Luo, Y., Zhang, B., Whent, M., Yu, L. Wang, Q., 2011. Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of α -tocopherol, and its in vitro controlled release study. **Colloids and Surfaces Biointerfaces**, **85**, 145–152.
117. Abreu, F.O.M.S., Bianchini, C., Forte, M.M.C., Kist, T.B.L., 2008. Influence of the composition and preparation method on the morphology and swelling behavior of alginate–chitosan hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, (**74**), 283–289.
118. Lee, P.S., Yim, S.G., Choi, Y., Van Anh Ha, T., Ko, S., 2012. Physiochemical properties and prolonged release behaviours of chitosan-denatured β -lactoglobulin microcapsules for potential food applications. **Food Chemistry**, (**2**) 34: 92-98.
119. Perrechil, F.A., Sato, A.C.K., Cunha, R.L., 2011. κ -Carrageenan - sodium caseinate microgel production by atomization: Critical analysis of the experimental procedure. **Journal of Food Engineering**, (**104**), 123-133.
120. Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., Scher, J. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, **104** (4), 467–483.
121. Caiyuan Y., Wei W., Hui Y., Hongjing L., 2007. preparation of phospholipid microcapsule by spray drying. **Drying Technology**, **25**: 695–702.
122. Chiu, Y.T., Chui ,C.P., Chien, J.T., Ho, G.H., Yang, J., Chen, B.H., 2007. Encapsulation of lycopene extract from tomato pulp waste with gelatin and poly(γ -glutamic acid) as carrier. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, (**55**): 5123-5130.

123. Curtis, J.M., Berrigan, N., Dauphinee, P., 2008. The determination of omega-3 fatty acid levels in food products containing microencapsulated fish oil using the one-step extraction method. part 1: measurement in the raw ingredient and in dry powdered foods. **Journal of the American Oil Chemists Society**, (85) 5: 297–305.
124. Üçüncü, M., 2004, A'dan Z'ye peynir teknolojisi. Cilt 1 ve 2. Meta basım, Bornova, İzmir 1230 s.
125. Keogh, M.K., O'Kennedy, B.T., Kelly, J., Auty, M.A., Kelly, P.M., Fureby, A., and Haahr, A.M., 2001. Stability to oxidation of spray-dried fish oil powder microencapsulated using milk ingredients. **Journal of Food Science**, (66) 9: 217-224.
126. Sliwinski, E.L., Lavrijsen, B.W.M., Vollenbroek, J.M., Van der Stege, H.J., Van Boekel, M.A.J.S., Wouters, J.T.M., 2003. Effects of spray drying on physicochemical properties of milk proteinstabilised emulsions. **Colloids and Surfaces B**, (31): 219–229.
127. Gbassi, G.K., Vandamme, T., Ennahar, S., Marchioni, E. 2009. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum spp* in an alginate matrix coated with whey proteins. **International Journal of Food Microbiology**, 1, (29): 103–105.
128. Faldt, P., Bergenstahl, B., 1996. Spray-dried whey protein/lactose/soy-bean oil emulsions. 1. Surface composition and particle structure. **Food Hydrocolloids**, 10: 421–429.
129. Fang, Z., Bhandari, B., 2010. Encapsulation of polyphenols- a review. **Trends in Food Science and Technology**, 21: 510-523.
130. Guin, S., 2004. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science and Technology**, 15: 330-347.
131. Zuidam, N.J., Nedovic, V.A., 2010. *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. Springer, London, 7-29.
132. Gonnet, M., Lethuaut, L., Boury, F., 2010. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. **Journal of Controlled Release**, 146, 276-290.

133. Lakshmi V., Sudha T., Dandona R., Teja V.D., Kumar G.A., Dandona L., 2009. Application of human immunodeficiency virus type 1 BED enzyme immunoassay on dried blood spots in India. **Journal of Medical Microbiology**, (58) 312–317
134. Çilek B., Microencapsulation Of Phenolic Compounds Extracted From Sour Cherry (*Prunus Cerasus* L.) Pomace, 2012. Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 168 s.
135. Acosta, E., Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery 2009. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, (14), 3–15.
136. Shi, P., He, P., Teh, T.K.H., Morsi, Y.S., Goh, J.C.H., 2011. Parametric analysis of shape changes of alginate beads. **Powder Technology**, 210, 60–66.
137. Matalanis, A., Jones, O.G., McClements, D.J., 2011. Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. **Food Hydrocolloids**, 25, 1865–1880.
138. Davarcı F., 2012. Effects of Some Physical Parameters On Penetration, Size And Shape In Alginate Gel Microencapsulation, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 72 s.
139. Gazori, T., Khoshayand, M.R., Azizi, E., Yazdizade, P., Nomani, A., Haririan, I., 2009. Evaluation of Alginate/Chitosan nanoparticles as antisense delivery vector: Formulation, optimization and in vitro characterization. **Carbohydrate Polymers**, 77, 599–606.
140. Beristain, C.I., Vazquez, A., Garcia, H.S., Vernon-Carter, E.J., 1996. Encapsulation of orange peel oil by cocrystallization. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, 29: 645–647.
141. Jakson, L.S., Lee, K., 1991. Microencapsulation and food industry. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, 24: 289–297.
142. Schrooyen, P. M. M., Van der Meer, R., De Kruif, C. G., 2001. Microencapsulation: its application in nutrition. **Proceedings of the Nutrition Society**, (60) 4: 475–479.

143. Banville, C., Vuillemand, J. C., Lacroix, C., 2000. Comparison of different methods for fortifying Cheddar cheese with vitamin D. **International Dairy Journal**, **56** (10), 375-382.
144. Abbasi, S., Azari, S., 2011. Efficiency of novel iron microencapsulation techniques: fortification of milk. **International Journal of Food Science and Technology**, **9** (46), 1927-1933.
145. Zimet, P., Livney, Y.D., 2009. Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for ω -3 polyunsaturated fatty acids. **Food Hydrocolloids**, **(23)**:1120-1126.
146. Zhu, Y., An, X., Li, S., Yu, S., 2009. Nanoencapsulation of β -Cypermethrin by Complex Coacervation in a Microemulsion. **Journal of Surfactant and Detergents**, **(12)**: 305-311.
147. De Kruijff, C.G., Weinbreck, F., De Vries R., 2004. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, **(9)** 9:340-349.
148. Saravanan, M., Panduranga Rao, K., 2010. Pectin-gelatin and alginate- gelatin complex coacervation for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, **80**: 808–816.
149. Japari, S.M., Assadpoor, E., Bhandari, B., 2008. Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying. **Food Research International**, **(41)**, 172–183.
150. Goula, M. A., Adamopoulos G., K., 2012. A new technique for spray dried encapsulation of lycopene. **Drying Technology**, **(30)**: 641–652.
151. Silva, D.F., Favaro-Trindade, C.S., Rocha, G.A., Thomazini, M., Microencapsulation of lycopene by gelatin–pectin complex coacervation. **Journal of Food Processing and Preservation**, **(36)** 2: 185-190.
152. Rocha, G.A., Favaro-Trindade, C.S., Raimundo, C., Grossoa F., 2012. Microencapsulation of lycopene by spray drying: characterization, stability and application of microcapsules. **Food and Bioproducts Processing**, **(9)**: 37–42.

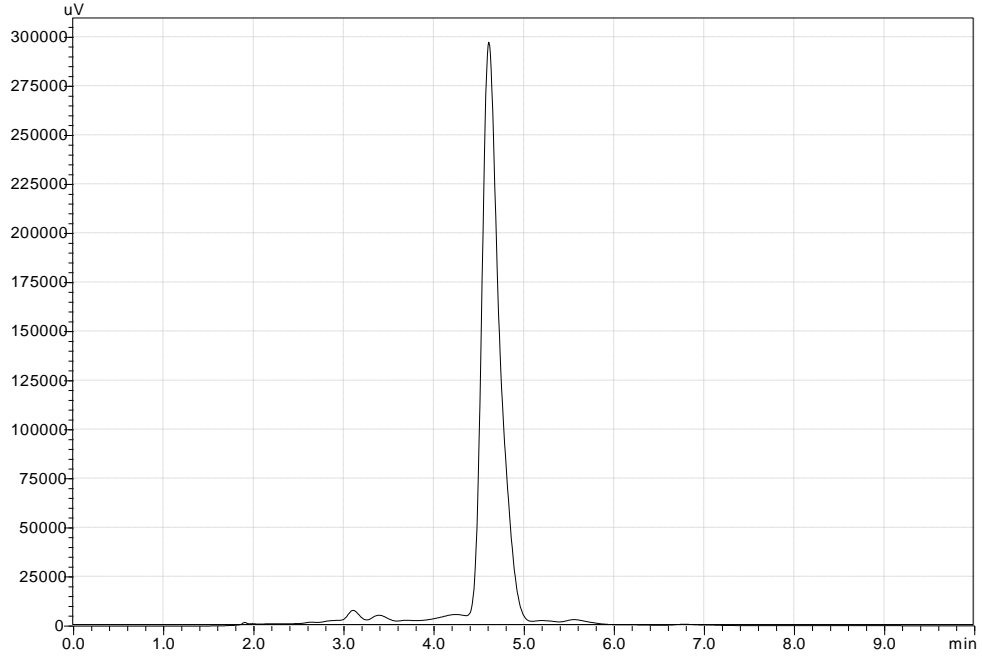
153. G. P. Blanch, M. L. Ruiz del Castillo, M. M. Caja, M. Perez-Mendez and S. Sanchez-Cortes, 2007. Stabilization of all-trans-lycopene from tomato by encapsulation using cyclodextrins. **Food Chemistry**, (105) 4: 1335-1341.
154. Shu, B., Yu, W., Zhao, Y., Liu, X., 2006. Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. **Journal of Food Engineering**, (76) 4: 666-669.
155. Yıldız A., Genç Ö., Bektaş S., 1997. *Enstrümantal Analiz Yöntemleri*, Hacettepe Üniversitesi Yayını, A-64, Ankara, 189-190 s.
156. Özgen S., 2010. Çilek Meyvesinden Doğal Aroma Bileşenlerinin Katı Faz Ekstraksiyon Sistemleriyle Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 100 s.
157. Ozgen S., Sarıoğlu K., 2013. Synthesis and characterization of acrylonitrile-co divinylbenzene (AN/DVB) polymeric resins for the isolation of aroma compounds and anthocyanins from strawberry. **Food and Bioprocess Technology**, (6): 2884–2894.
158. Nisperos-Carriedo, M., Buslig, B.S., Shaw, P.E., 1992. Simultaneous detection of dehydroascorbic, ascorbic, and some organic acids in fruits and vegetables by hplc. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, (40): 1127–1130.
159. Hernandez Suarez, M., Rodriguez Rodriguez E.M., Diaz Romero C., 2008. Chemical composition of tomato (*Lycopersicon esculentum*) from Tenerife, the Canary Islands. **Food Chemistry**, (40): 1046–1056.
160. Karaoğlu, E., 2011. Lipofilik Maddelerin Aljinat Kitosan Membranlı Sıvı Çekirdekli Enkapsülasyonu, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 90 s.
161. Lopez M.D., Pascual-Villalobos M.J., Poncelet D., 2010. *Controlled-release of linalool through calcium alginate capsules*. XVIII International Conference on Bioencapsulation - Porto, Portugal, 1-2, P-003.
162. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, (28): 25–30.

163. Rodriguez, M.V., Medina, L.M., Jordano, R., 2002. Prolongation of shelf life of sponge cakes using modified atmosphere packaging. **Acta Alimentaria**, **31**:191-196.
164. Yılmaz, T., 2011. Domates İşleme Atıklarından Ultrason Destekli Likopen Ekstraksiyonu İşleminin Optimizasyonu Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir, 105 s.
165. Ercan, N., 2003. Domates Meyvesinin Büyüme ve Olgunlaşması Sırasında Bileşiminde Meydana Gelen Değişimler. **Narenciye ve Seracılık Araştırma Enstitüsü Yayını (1)**: 1-14.
166. Kaur, D., Sogi, D.S., Garg, S.K., Bawa, A.S., 2005. Flotation-cum-sedimentation system for skin and seed separation from tomato pomace. **Journal of Food Engineering**, (4) 71: 341-349.
167. Kaur, D., Wani, A. A., Oberoi, D.P.S., Sogi, D.S., 2008. Effect of extraction conditions on lycopene extractions from tomato processing waste skin using response surface methodology. **Food Chemistry**, **108** (2), 711-719.
168. Sadler, G., Davis, J., Dezman, D., 1990. Rapid extraction of lycopene and β -carotene from reconstituted tomato paste and pink grapefruit homogenates. **Journal of Food Science**, (55), 1460-1469.
169. Günay F., 2010. Emülsiyonlaşma-İyonotropik Jelleşme Tekniğiyle Etodolak Yüklü Aljinat Mikrokürelerden Hazırlanması. Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 80s.

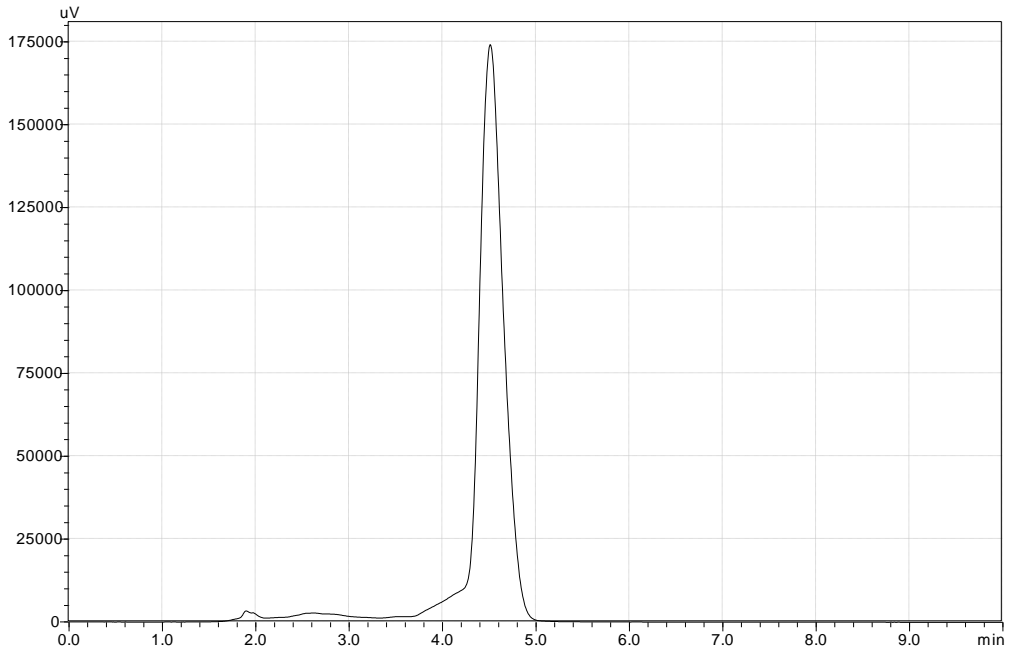
EKLER

Ek-1. Kolonların pik çözünürlüğü değerleri

		Likopen ve β -karoten için Pik Çözünürlüğü Değerleri (R)	
		Mobil faz Kolon	
		%80 ACN– %20 Et-OH	%20 ACN– %80 Et-OH
Farklı çıkış lateksi/ monomer oranları	S-1	-	-
	S-2	0.31 ^B	1.24 ^A
	S-3	0.52 ^{BA}	1.3 ^A
	S-4	0.43 ^A	1.3 ^A
	S-5	0.44 ^{BA}	1.32 ^A
Farklı monomer/çapraz bağlayıcı oranları	S-6	0.84 ^A	1.86 ^A
	S-7	0.73 ^A	1.64 ^B
	S-8	0.55 ^B	1.55 ^B
	S-9	0.25 ^C	1.23 ^C
Farklı projen /çapraz bağlayıcı oranları	S-10	0.15 ^A	0.91 ^A
	S-11	0.25 ^B	1.28 ^B
	S-12	0.41 ^{BC}	1.3 ^B
	S-13	0.55 ^{CD}	1.48 ^C
	S-14	0.78 ^D	2.23 ^D

Ek-2. Likopen Saflaştırılması Kromatogramlar

450 nm Saflaştırılmış Likopen



Likopen Standardı

Ek-3. Kolonların teorik tabak sayısı değerleri

		<i>β-karoten</i>		<i>Likopen</i>	
		Teorik Tabaka Katsayısı		Teorik Tabaka Katsayısı	
		%80 ACN– %20 Et- OH	%20 ACN– %80 Et- OH	%80 ACN– %20 Et- OH	%20 ACN– %80 Et- OH
Farklı çıkış lateksi/ monomer oranları	S-1	-	-	-	-
	S-2	1315 ^A	815 ^A	1357 ^A	575 ^A
	S-3	1533 ^B	935 ^B	1722 ^B	757 ^B
	S-4	1495 ^C	944 ^{BC}	1912 ^C	815 ^C
	S-5	1525 ^{BC}	968 ^C	1603 ^D	743 ^B
Farklı monomer/ çapraz bağlayıcı oranları	S-6	748 ^A	431 ^A	979 ^A	559 ^A
	S-7	1029 ^B	625 ^B	1049 ^B	561 ^A
	S-8	1384 ^C	847 ^C	1682 ^C	745 ^B
	S-9	1326 ^D	907 ^D	1391 ^D	729 ^B
Farklı porojen /çapraz bağlayıcı oranları	S-10	609 ^A	390 ^A	565 ^A	322 ^A
	S-11	1093 ^B	685 ^B	1041 ^B	530 ^B
	S-12	1273 ^C	749 ^C	1452 ^C	674 ^C
	S-13	1253 ^C	837 ^D	1481 ^C	635 ^D
	S-14	495 ^D	578 ^E	1481 ^C	633 ^D

A-D: Aynı sütündeki birbirinden farklı harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P < 0.05$) olduğunu göstermektedir.

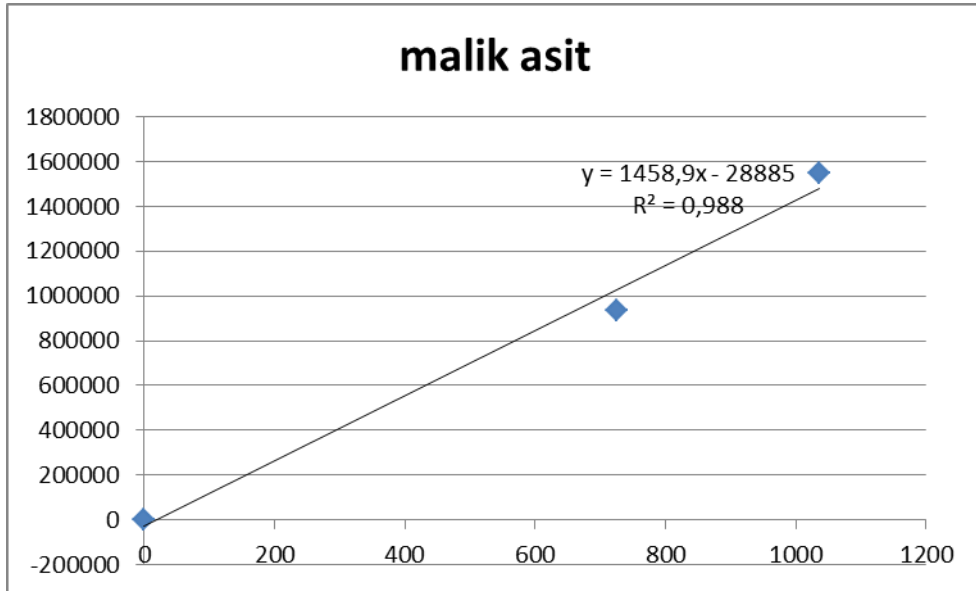
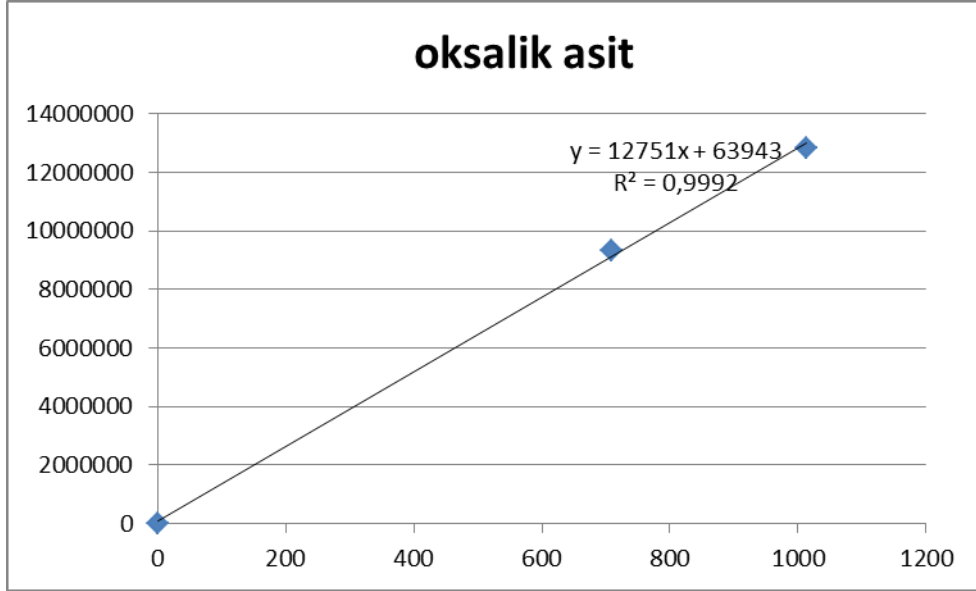
Ek-4. Kolonların teorik tabaka yüksekliği değerleri

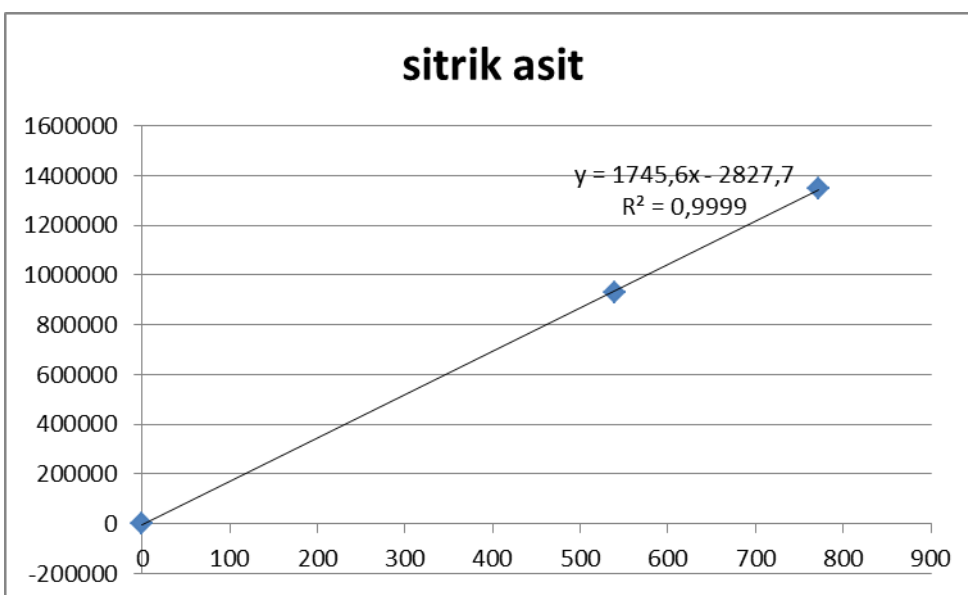
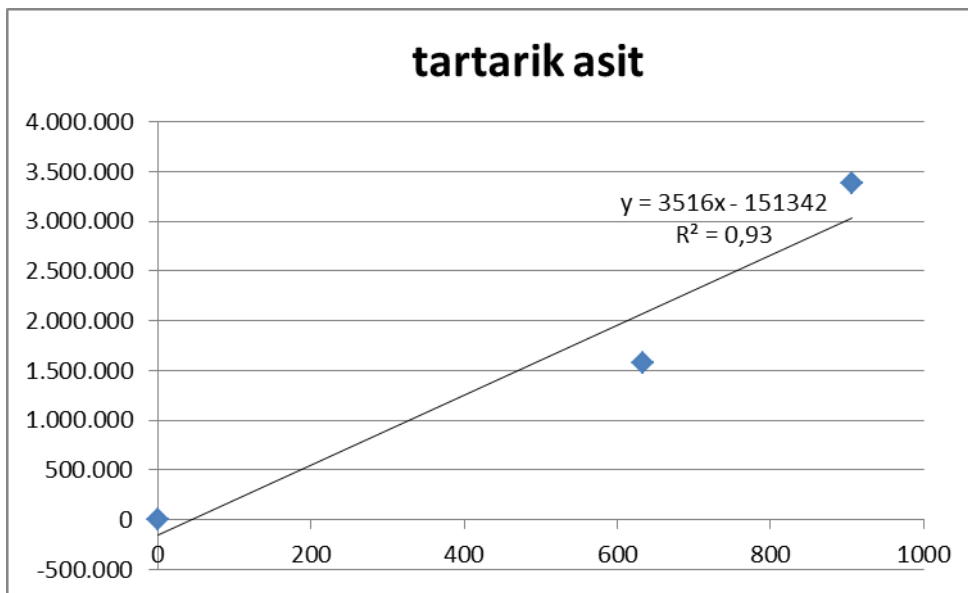
		<i>β-karoten</i>		<i>Likopen</i>	
		Teorik Tabaka Yüksekliği		Teorik Tabaka Yüksekliği	
		%80 ACN– %20 Et-OH	%20 ACN– %80 Et-OH	%80 ACN–%20 Et-OH	%20 ACN– %80 Et-OH
Farklı çıkış lateksi/ monomer oranları	S-1	-	-	-	-
	S-2	0.077 ^A	0.122 ^A	0.073 ^A	0.173 ^A
	S-3	0.065 ^B	0.107 ^B	0.058 ^B	0.132 ^B
	S-4	0.066 ^C	0.106 ^{BC}	0.052 ^C	0.122 ^C
	S-5	0.065 ^{BC}	0.062 ^C	0.103 ^D	0.134 ^B
Farklı monomer/ çapraz bağlayıcı oranları	S-6	0.133 ^A	0.232 ^A	0.102 ^A	0.179 ^A
	S-7	0.097 ^B	0.095 ^B	0.160 ^B	0.178 ^A
	S-8	0.072 ^C	0.118 ^C	0.059 ^C	0.114 ^B
	S-9	0.075 ^D	0.110 ^D	0.071 ^D	0.137 ^B
Farklı porojen /çapraz bağlayıcı oranları	S-10	0.164 ^A	0.256 ^A	0.176 ^A	0.310 ^A
	S-11	0.091 ^B	0.145 ^B	0.097 ^B	0.188 ^B
	S-12	0.078 ^C	0.133 ^C	0.068 ^C	0.148 ^C
	S-13	0.079 ^C	0.067 ^C	0.119 ^C	0.157 ^D
	S-14	0.201 ^D	0.172 ^C	0.067 ^C	0.158 ^D

A-D: Aynı sütundaki birbirinden farklı harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P < 0.05$) olduğunu göstermektedir.

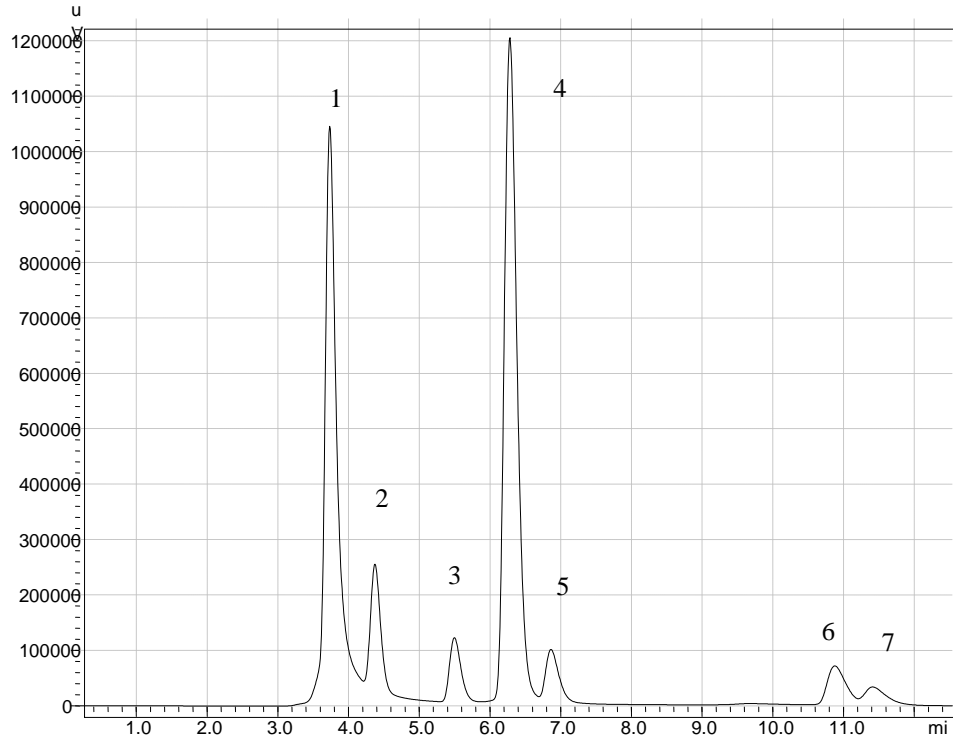
Ek-5. Keklerin renk değerleri

Örnek	L^*	a^*	b^*
Kontrol	49.73	0.81	22.56
	49.90	0.78	21.33
	49.2	0.94	22.51
	49.7	0.87	22.80
	53.45	0.85	20.31
	55.02	0.80	20.39
% 0.5 Na-Alg- Likopen İçeren Örnek	53.05	2.56	22.38
	53.17	2.56	22.36
	53.24	2.58	22.35
	54.67	2.98	23.45
	55.07	2.88	23.78
	50.43	2.98	24.40
%1 Na-Alg- Likopen İçeren Örnek	55.54	2.98	23.21
	55.79	2.99	23.29
	55.92	2.99	23.27
	56.13	2.97	23.29
	56.23	2.96	23.30
	59.78	2.87	21.99
%1.5 Na-Alg- Likopen İçeren Örnek	53.06	3.39	24.01
	53.21	3.38	24.01
	53.37	3.39	23.8
	53.46	3.37	23.95
	53.57	3.36	23.92
	58.75	3.06	23.73
%2 Na-Alg- Likopen İçeren Örnek	50.98	4.36	25.60
	50.94	4.54	26.11
	50.98	4.51	26.11
	51.00	4.52	26.11
	51.05	4.50	26.12
	54.08	3.68	23.98

Ek-6. Organik asitlerin kalibrasyon grafikleri

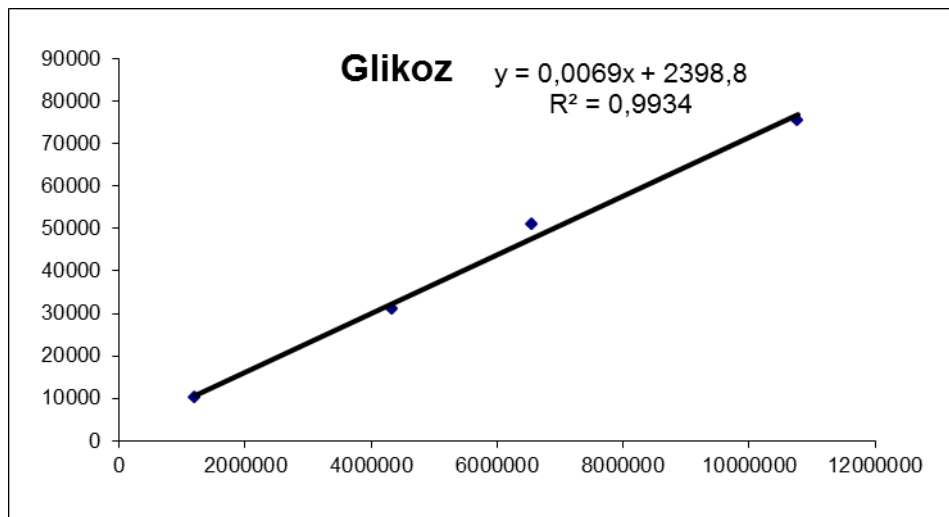


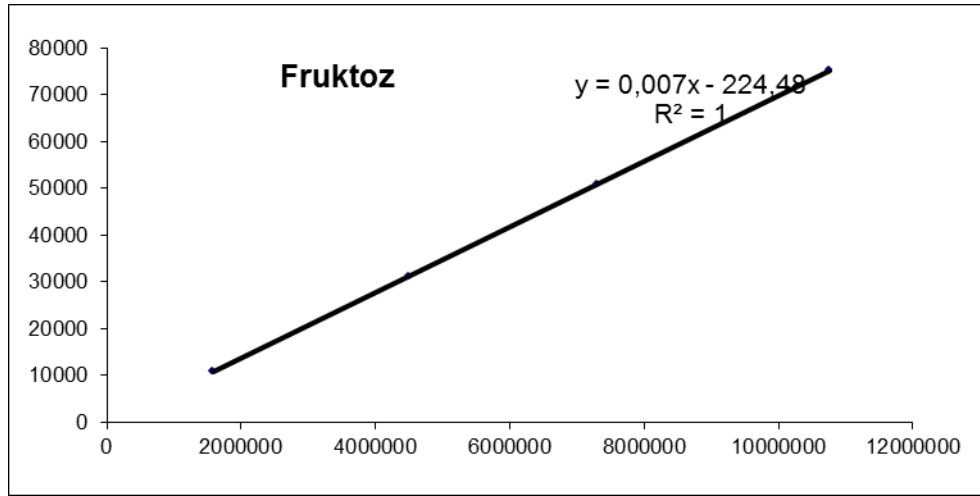
Ek-7. Organik asitlerin standart karışım kromatogramı



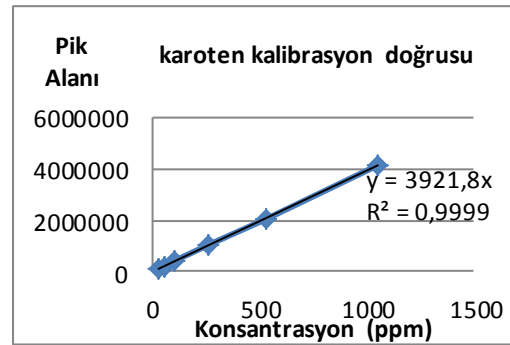
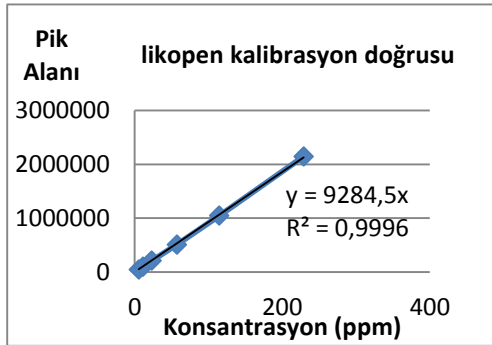
Organik asit standartları 215 nm; 1: oksalik asit, 2: tartarik asit, 3: malik asit, 4: askorbik asit, 5: asetik asit, 6: sitrik asit, 7: süksunik asit.

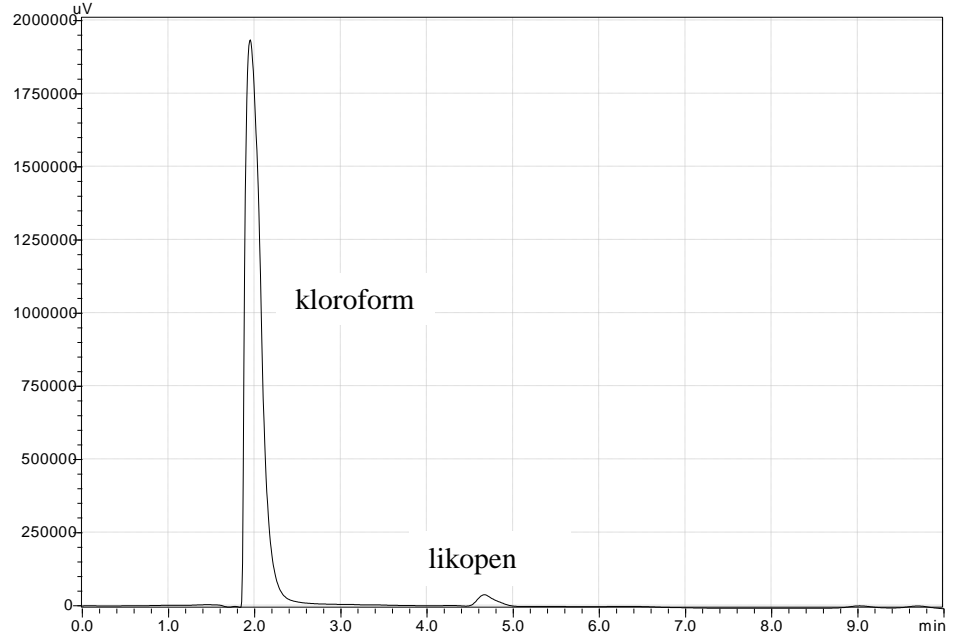
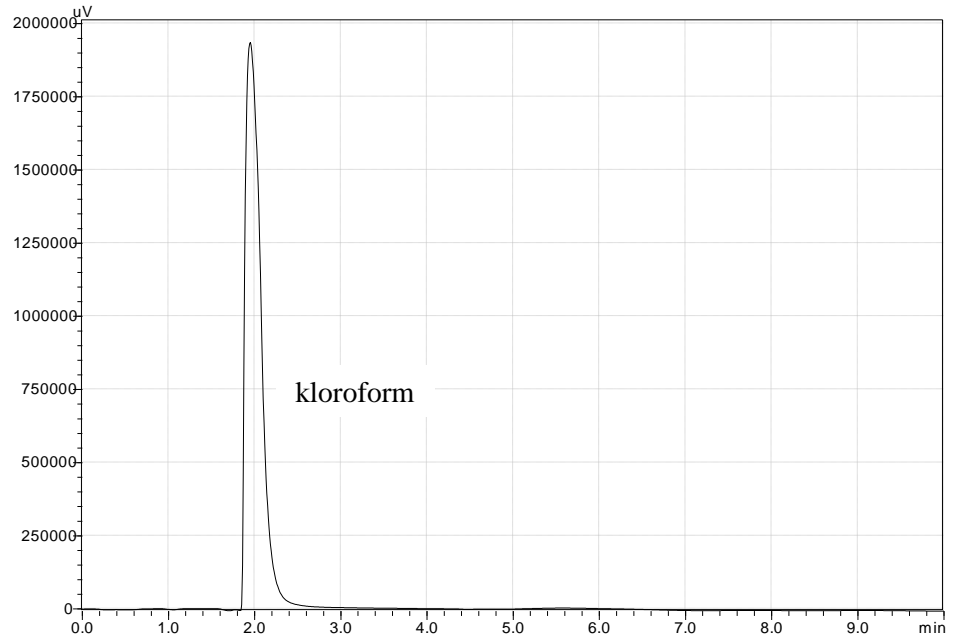
Ek-8. Şekerlere ait kalibrasyon grafikleri





Ek-9. Likopen ve β -karoten için standart kalibrasyon doğruları



Ek-10. 200 nm'de saflaştırılmış likopen (kloroform içinde) kromatogramı**Ek-11. 200 nm kloroform kromatogramı**

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı-Soyadı: Seda ÖZGEN

Uyruğu: Türkiye TC

Doğum Tarihi ve Yeri: 03/11/1985, Kayseri

E-mail: seda_ozgen04@hotmail.com

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği
Bölümü Talas, 38039, Kayseri

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Gıda Müh. Bölümü	2010
Lisans	Mersin Üniversitesi Gıda Müh. Bölümü	2008

YAYINLAR

SCI, SSCI, AHCI İndekslerine Giren Dergilerde Yayınlanan Makaleler

A1. Ozgen S., Sarioglu K., **2013**. Synthesis and Characterization of Acrylonitrile-co-Divinylbenzene (AN/DVB) Polymeric resins for the Isolation of Aroma Compounds and Anthocyanins from Strawberry: Food and Bioprocess Technology, 6:2884-2894.

A2. Goksel, M., Dogan,M., Toker, O.S., Ozgen,S., Sarioglu, K., Oral, R.A. 2013. The effect of starch concentration and temperature on grape molasses: Rheological and Textural properties. Food and Bioprocess Technology, vol.6, pp.259-271.

A3. Erdem T., Sarioglu K., Ozgen S., 2013. Development And Characterization of Lipophilic Polymeric Adsorbents For Isolation of Anthocyanins From Black Carrot, Food Analytical Methods, vol.6, pp.1621-1628.