

**ÜZÜM ÇEKİRDEĞİNDEN FENOLİK BİLEŞİKLERİN BASINÇLI SIVI
EKSTRAKSİYONU VE OPTİMİZASYONU**

Çiğdem ALTINAY

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Temmuz-2008

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Çiğdem Altınay'ın "**Üzüm Çekirdeğinden Fenolik Bileşiklerin Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu ve Optimizasyonu**" başlıklı **Kimya Mühendisliği** Anabilim Dalı'ndaki, Yüksek Lisans Tezi 27/06/2008 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Yard. Doç. Dr. BERRİN BOZAN

Üye : Prof. Dr. Ö.METE KOÇKAR

Üye :Yard. Doç Dr. ÇAĞLAYAN AÇIKGÖZ

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ÜZÜM ÇEKİRDEĞİNDEN FENOLİK BİLEŞİKLERİN BASINÇLI SIVI EKSTRAKSİYONU VE OPTİMİZASYONU

Çiğdem ALTINAY

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Yard. Doç. Dr. Berrin BOZAN

2008, 99 sayfa

Bu çalışmada, basınçlı sıvı ekstraksiyon parametrelerinin, kırmızı üzüm (*Vitis vinifera* L.) çekirdeğinden polifenolik maddelerin ekstraksiyonu üzerine etkileri incelenmiştir.

Bu amaçla, %70 lik aseton çözücüsü kullanılarak, önce tek faktör değiştirilip diğer faktörlerin sabit tutulmasıyla partikül boyutu, sıcaklık, zaman, katı-sıvı oranı ve döngü (kademe) sayısının, ham ekstre verimi, fenolik bileşen (toplam fenol ve toplam prosiyanidin) verimi ve ekstrelerin antioksidan aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında, partikül boyutu, sıcaklık ve zaman bağımsız değişkenleri kullanılarak 2³ düzeyinde Cevap Yüzey Yöntemi (RSM) kullanılarak deney tasarımı yapılmış ve çalışılan parametrelerin toplam fenolik bileşen ve toplam polimerik prosiyanidin verimi üzerine etkileri gözlenerek %95 güven aralığında ikinci derece model eşitlikleri geliştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Basınçlı sıvı ekstraksiyonu, üzüm çekirdeği, fenolik bileşen, polimerik prosiyanidin, cevap yüzey yöntemi

ABSTRACT

Master of Science Thesis

PRESSURIZED LIQUID EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM GRAPE SEED AND OPTIMIZATION

Çiğdem ALTINAY

Anadolu University
Graduate School of Sciences
Chemical Engineering Program

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Berrin BOZAN

2008, 99 pages

In this study, effects of pressurized liquid extraction parameters on the extraction of red grape (*Vitis vinifera* L.) seed polyphenolic compounds were investigated.

Therefore the effect of particle size, temperature, time, solid/liquid ratio and cycle on extraction yield, phenolic compound (total phenolic content and total procyanidin) yield and antioxidant activity of extracts were determined by changing one factor at a time (other factors are constant) using 70% acetone solvent.

In the second part of the study, Response Surface Method (RSM) was performed in the level of 2^3 using independent parameters; particle size, temperature and time. The effects of studied parameters on the total phenolic compound and total polymeric procyanidin yield were investigated and second order model equations in the confidence level of 95% were developed.

Keywords: Pressurized liquid extraction, grape seed, phenolic compounds, polymeric procyanidin, response surface methodology

TEŞEKKÜRLER

Çalıőmalarımın her aşamasında değerli bilgi ve önerileriyle beni yönlendiren, laboratuvar imkânlarını sağlayan, desteğini esirgemeyen sayın hocam Berrin BOZAN'a,

Çalıőmalarımın her aşamasında desteklerini gördüğüm arkadaşlarım Göksel Tosun, Derya Özcan ve Serkan Oban'a,

Hayatımda, destekleriyle beni daima yüreklendiren sevgili aileme,

Teőekkürlerimi sunarım.

Çiğdem ALTINAY

Temmuz 2008

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜRLER	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. ANTIOKSİDANLAR VE FENOLİK BİLEŞİKLER	3
2.1 Antioksidanlar	3
2.1.1. Gıdalardaki oksidatif bozulmalar	4
2.1.2. Antioksidan tipleri ve etki mekanizması.....	5
2.1.3. Antioksidan aktivite	6
2.1.4. Sentetik antioksidanlar	7
2.1.5. Doğal antioksidanlar	8
2.2 Fenolik Bileşikler	9
2.2.1. Tanenler	13
2.2.2. Fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu	15
2.2.3. Fenolik bileşiklerin analiz ve ölçüm metotları.....	17
2.3. Üzüm ve Üzüm Çekirdeği Fenolik Bileşikleri.....	18
2.3.1. Üzüm	18
2.3.2. Üzüm çekirdeğinde bulunan fenolik bileşikler	22
2.3.3. Üzüm çekirdeği ekstresinin sağlık etkileri.....	25

3. BASINÇLI ÇÖZÜCÜ EKSTRAKSİYONU	28
3.1. Bitkisel Materyallerin Klasik Çözücü (Katı-Sıvı) Ekstraksiyonu.....	28
3.1.1. Ekstraksiyona etki eden parametreler	29
3.1.2. Bitkisel materyallere laboratuvarında uygulanan ekstraksiyon teknikleri.....	31
3.2. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu (Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu - ASE).....	33
3.2.1. Analitik ölçekte basınçlı sıvı ekstraktörü.....	35
3.2.2. Basınçlandırılmış sıvı ekstraksiyonu metot geliştirme	38
3.2.3. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu parametreleri ve fenolik bileşiklerin BSE ekstraksiyonu	40
3.2.4. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu endüstriyel yaklaşımları	48
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	50
4.1. Üzüm Çekirdeğinden Polifenolik Maddelerin Basınçlı Çözücü Ekstraksiyonu.....	50
4.2. Üzüm Çekirdeğinden Polifenolik Maddelerin Klasik Çözücü Ekstraksiyonu.....	52
4.3. Cevap Yüzey Yöntemi ile Deney Tasarımı	53
4.4. Toplam Fenolik Bileşen, Toplam Flavanol ve Toplam Polimerik Prosiyanidin Tayini.....	54
4.4.1. Toplam fenolik (TP) bileşen tayini	54
4.4.2. Toplam flavanol miktarı.....	56
4.4.3. Toplam polimerik prosiyanidin (PP) miktarı	56
4.4.4. YBSK ile monomerik ve dimerik flavanol miktar tayini.....	57
4.4.5. DPPH serbest radikal süpürücü aktivite tayini.....	58
4.5. İstatistiksel Analiz.....	59

5. DENEYSEL BULGULAR	60
5.1. Ekstraksiyon çözücüsünün seçimi	60
5.2. Partikül boyutunun fenolik bileşen ekstraksiyonu üzerine etkisi.....	67
5.3. Sıcaklığın fenolik bileşen ekstraksiyonu üzerine etkisi	68
5.4. Ekstraksiyon zamanının fenolik bileşen ekstraksiyonu üzerine etkisi..	72
5.5. Katı:sıvı oranının fenolik bileşen ekstraksiyonu üzerine etkisi	73
5.6. Kademe (Cycle) fenolik bileşen ekstraksiyonu üzerine etkisi	75
5.7. Üzüm Çekirdeğinden Polifenolik Maddelerin Klasik Çözücü Ekstraksiyonu.....	77
5.8. Yüzey Yanıt Yöntemi ile Deneysel Tasarım	78
6. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	86
KAYNAKÇA	91

ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1	Yağ oksidasyonunun başlangıç ve çoğalma aşamaları	5
2.2	Flavonoitlerin basit monomerik yapısı	11
2.3.	C6-C3-C6 bileşiklerinin kimyasal yapısı	11
2.4	Kateşinlerin kimyasal yapıları.....	13
2.5	Prosiyanidin tipleri.....	15
2.6	Üzüm kabuk ve çekirdeklerinde bulunan fenolik asit, monomer ve dimer prosiyanidinlerin yapısı (Yılmaz, 2004).....	24
3.1	Basınçlı sıvı ekstraksiyonunun şematik gösterimi	36
4.1	Basınçlı sıvı ekstraksiyonu cihazı	51
4.2	Üzüm çekirdeği ekstresine ait örnek kromatogram (280 nm).....	58
5.1	Ekstraksiyon çözücüsünün ekstrede bulunan toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve toplam polimerik prosiyanidin miktarı (mg/g ekstre) üzerine etkisi	62
5.2	Ekstraksiyon çözücüsünün ham ekstre, toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve polimerik prosiyanidin verimi (g ekstre/100 g çekirdek) üzerine etkisi	63
5.3.	Ekstraksiyon çözücüsünün ekstrede bulunan gallik asit, monomerik ve dimerik flavanol miktarı (mg/g ekstre) üzerine etkisi.....	65
5.4	Ekstraksiyon çözücüsünün DPPH serbest radikali süpürücü etkisi	66
5.5	Partikül boyutunun ham ekstre, toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve polimerik prosiyanidin verimi (g ekstre/100 g çekirdek) üzerine etkisi	68
5.6	Sıcaklığın ekstrede bulunan toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve toplam polimerik prosiyanidin miktarı (mg/g ekstre) üzerine etkisi..	69
5.7	Sıcaklığın ekstrede bulunan toplam monomerik ve dimerik (YBSK) miktarı (mg/g ekstre) üzerine etkisi	70
5.8	Sıcaklığın ham ekstre, toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve polimerik prosiyanidin verimi (g ekstre/100g çekirdek) üzerine etkisi	71
5.9	Sıcaklığın DPPH serbest radikali süpürücü etkisi.....	72

5.10	Ekstraksiyon zamanının ham ekstre, toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve polimerik prosiyanidin verimi (g ekstre/100 g çekirdek) üzerine etkisi	73
5.11	Katı:sıvı oranının ham ekstre, toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve polimerik prosiyanidin verimi (g ekstre/100 g çekirdek) üzerine etkisi	75
5.12	Kademe sayısının ham ekstre, toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve polimerik prosiyanidin verimi (g ekstre/100 g çekirdek) üzerine etkisi	76
5.13	Basınçlı ve klasik çözücü ekstraksiyonu ham ekstre, toplam fenolik ve polimerik prosiyanidin yüzdelerinin karşılaştırılması.....	78
5.14	Üzüm çekirdeğinin ekstraksiyonu işleminde deneysel değerlere karşı modelin önerdiği değerler arasındaki doğrusal ilişki	83
5.15	Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin toplam fenolik bileşen verimi (%) ve birbirleri üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri.....	84
5.16	Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin polimerik prosiyanidin verimi (%) ve birbirleri üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri.....	85

ÇİZELGELER DİZİNİ

2.1	Ülkemizin 2006–2007 üzüm ihracat ve ithalat verileri.....	21
2.2	Vitis vinifera meyvesinde tanımlanmış başlıca fenolik bileşikler	23
4.1	Basınçlı sıvı ekstraktöründe çalışılan parametreler.....	52
4.2	Bağımsız değişkenlerin istatistiksel kombinasyonu	55
5.1	Ekstraksiyon çözücüsünün ekstrede bulunan toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve toplam polimerik prosiyanidin miktarı (mg/g ekstre) üzerine etkisi	61
5.2	Ekstraksiyon çözücüsünün ham ekstre, toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve polimerik prosiyanidin verimi (g ekstre/100 g çekirdek) üzerine etkisi	63
5.3	Ekstraksiyon çözücüsünün ekstrede bulunan gallik asit, monomerik ve dimerik flavanol miktarı (mg/g ekstre) üzerine etkisi.....	64
5.4	Ekstraksiyon çözücüsünün DPPH serbest radikali süpürücü aktivite üzerine etkisi	66
5.5	Partikül boyutunun ham ekstre, toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve polimerik prosiyanidin verimi (g ekstre/100 g çekirdek) üzerine etkisi	67
5.6	Sıcaklığın ekstrede bulunan toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve toplam polimerik prosiyanidin miktarı DPPH serbest radikali süpürücü aktivitesi üzerine etkisi.....	69
5.7	Sıcaklığın etkisi ile ekstrede bulunan toplam monomerik ve dimerik (YBSK) miktarları (mg/g ekstre)	70
5.8	Sıcaklık ile değişen ham ekstre, toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve polimerik prosiyanidin verimleri (g ekstre / 100 g çekirdek).....	71
5.9	Ekstraksiyon zamanının ham ekstre, toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve polimerik prosiyanidin verimi (g ekstre/100 g çekirdek) üzerine etkisi	73

5.10 Katı: sıvı oranının ham ekstre, toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve polimerik prosiyanidin verimi (g ekstre/100 g çekirdek) üzerine etkisi	74
5.11 Kademe sayısının ham ekstre, toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve polimerik prosiyanidin verimi (g ekstre/100 g çekirdek) üzerine etkisi	76
5.12 Klasik çözücü ekstraksiyonundan elde edilen ekstratların toplam fenolik, polimerik prosiyanidin miktarları	77
5.13 Cevap yüzey yöntemi ile oluşturulan deney tasarımı ve elde edilen deneysel cevaplar	79
5.14 Deneylemlerden elde edilen cevapların modelden elde edilen cevaplarla karşılaştırılması	82

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AOM	: Aktive oksijen metodu
AAPH	: 2,2'-azobis-(2-amidinopropan) dihidroklorür
ABTS.+	: 2,2'-azoino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfirik asit katyonu)
ASE/ BSE	: Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu/ Basınçlı sıvı ekstraksiyonu
BHT	: Bütillenmiş hidroksitoluol
BHA	: Bütillenmiş hidroksianisol
C	: Kateşin
EC ₅₀	: %50 DPPH radikalini süpüren
EC	: Epikateşin
ECG	: Epikateşin gallat
EGC	: Epigallokateşin
EGCG	: Epigallokateşin gallat
DG	: Dodesil gallat
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
FDA	: Gıda ve İlaç Dairesi
GRAS	: Genellikle güvenli olduğu kabul edilmiş
h _v	: Kimyasal enerji
HCl	: Hidroklorik asit
HNO ₃	: Nitrik asit
H ₂ SO ₄	: Sülfirik asit
L/S	: Sıvı/katı oranı
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
NDGA	: Nordihidroguairetik asit
ORAC	: Oksijen radikal absorban kapasitesi
PG	: Propil gallat
PP	: Polimerik prosiyanidin
PHWE	: Basınçlandırılmış sıcak su ekstraksiyonu
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RNS	: Reaktif azot türleri
SC	: Süperkritik

TBHQ	: Ter-bütihidrokinon
TEAC	: Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi
TFL	: Toplam flavanol miktarı
TP	: Toplam polifenolik bileşen
TUİK	: Türkiye İstatistik Krumu
UV-Vis	: Ultraviyole dalga boyu aralığında görünen
YBSK	:Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

1. GİRİŞ

Gıdaların sağlık amaçlı olarak çeşitli hastalıkların tedavisinde veya önlenmesinde kullanımı çok eskilere dayanmaktadır. Son yıllarda ise, tüketicinin hayat beklentisinin artması, sağlıklı beslenme bilincinin gelişmesi gibi nedenlerle tüketiciler gıdalardan beslenmenin de ötesinde, birtakım faydalar sağlamayı beklemektedir (Özçelik, 2003).

Oksidatif stres, insanlarda birçok hastalığın kaynağıdır. Antioksidanlar oksidatif hasarı ve zararlı etkilerini azaltmaktadır (Bjelakovic ve ark., 2007).

Son yıllarda araştırmacılar ve gıda üreticileri, fenolik bileşiklere artan bir ilgi duymaya başlamışlardır. Bu ilginin ana sebebi fenolik bileşiklerin gösterdikleri antioksidan özelliğidir, beslenmede önemi büyüktür ve oksidatif stres ile ilgili birçok hastalık; kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyucu rol oynamaktadır (Manach ve ark., 2004).

Fenolik bileşikler ve fenolik asitlerin gıdalarda bulunuşları bitkisel kökenlidir. Yapılan çalışmalar gıdalarda bulunan fenolik bileşiklerin antikanserojen, antioksidan potansiyel, antiviral (virüslere karşı), antimikrobiyal ve antimutajenik aktivite gibi birçok pozitif özelliği olduğunu göstermiştir (Lule ve ark., 2005).

Üzüm çekirdeği fenolik bileşiklerin önemli bir grubu olan monomerik (kateşin, epikateşin, gallokateşin, epigallokateşin, epikateşin-3-O-gallat) ve polimerik (prosiyanidin dimer, oligomer ve polimer) flavan-3-ol bileşiklerince zengindir. Bu bileşiklerin özellikle yaşlanmayı geciktirici, iltihap önleyici, anti kanserojen, anti-mutajenik ve düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunu engelleyici etkisi dolayısıyla, üzüm çekirdeği, gıda ve nütrosötik endüstrisinin ilgisini çekmiştir. Son yıllarda üzüm çekirdeği ekstresini veya fenolik bileşiklerince zenginleştirilmiş ürünlerini içeren çeşitli formlarda (toz, tablet, şurup) sağlık destekleyici ürünler nütrosötik ürün pazarında önemli ölçüde yer bulmakta, gıda maddelerine katılarak fonksiyonel gıda olarak tüketiciye sunulmaktadır (Shi ve ark., 2003).

Bitkilerden sađlık destekleyici nűtrasűtiklerin (besleyici farmasűtiklerin) elde edilmesinde gerek analitik, gerekse endűstriyel űlçekte kullanılan en yaygın ayırım iřlemi katı-sıvı ekstraksiyonudur. Endűstriyel űlçekte klasik çűzűcű ekstraksiyonunun yanında, son yıllarda sűperkritik akıřkan ekstraksiyonu nűtrasűtiklerin ekstraksiyonunda kullanım alanı bulmaktadır. Ultrases destekli ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon ve basınçlı sıvı (hızlandırılmıř sıvı) ekstraksiyonu gibi yeni teknikler ise henűz yaygın olarak analitik űlçekte kullanılmakta, endűstriyel űlçeęe uygulama çalıřmaları ise sűrmektedir. Bu yűntemlerin ekstraksiyon zamanını kısaltma, harcanan çűzűcű miktarını dűřűrme, ekstraksiyon verimini arttırma ve ekstre kalitesini arttırma űzellikleri bulunmaktadır (Wang ve Weller, 2006).

Basınçlı sıvı ekstraksiyonunda (BSE), yűksek sıcaklık ve basınç ekstraksiyonu hızlandırmak için kullanılmakta ve bitkilerden fenolik bileşiklerin hassas olduğu atmosfer ve ışık şartlarından koruyarak ekstraksiyonu gerçekleştirmektedir (Santos-Buelga ve ark., 2003). Yapılan çalışmalarda, basınçlı sıvı ekstraksiyonu çalışmaları genellikle klasik (tek zamanda tek değişken) ve istatistiksel olarak değişmeyen parametrelerle optimize edilmiştir. Fakat bu yűntem, parametreler arasındaki etkileşimleri ve en uygun ekstraksiyon koşullarını vermemektedir. Bűylece deney sayısı minimumda tutularak, etkili parametrelerin tayini için deney tasarımı kullanılmaktadır (Jiang ve ark., 2007).

Bu çalıřmada, *Vitis vifinera* L. (űzűm) ekirdeęi içerięindeki fenolik bileřikler basınçlı sıvı ekstraksiyonu teknięi kullanılarak ekstre edilmiř ve ekstraksiyon parametrelerinin (çűzűcű, sıcaklık, zaman, parçacık bűyűklűęű, katı-sıvı oranı ve kademe sayısı) ekstre verimi, fenolik bileřen miktarı ve antioksidan aktivitesi űzerine etkileri incelenmiř ve yűzey cevap metodu ile etkili parametrelerin fenolik bileřiklerin ekstraksiyonunun optimizasyonu çalıřmaları gerçekleřtirilmiřtir.

2. ANTIOKSİDANLAR VE FENOLİK BİLEŞİKLER

2.1 Antioksidanlar

Antioksidanlar, gıdalarda oksidatif bozulmayı önleyen veya geciktiren bileşikler olarak tanımlanmaktadır. Bu bileşikler oksidatif ve otooksidatif işlemlerin başlangıcında etki göstererek oksidasyonu ve buna bağlı olarak oluşan istenmeyen reaksiyon ürünlerinin (kötü koku ve lezzet) oluşumunu engelleyebilmektedirler. Pek çok gıda maddesinin bozulmasının önemli bir sebebinin oksijen olduğu bilinmektedir. İstenilmeyen lezzet ve koku oluşumlarına neden olan oksidatif acılaşma reaksiyonu nem, ısı, ışık, metaller, metal içeren bileşikler ve enzimler ile katalizlenebilmektedir. Gıdalara uygulanan hazırlama, paketlenme ve soğutma işlemleri acılaşmayı geciktirmekte ancak bunu engelleyememektedir. Antioksidanlar, gıdalara oksidasyonun başlangıcından önce ilave edildiklerinde reaksiyonu önleyebilmekte veya azaltabilmektedirler (Altuğ, 2006).

1930'ların başında kullanımına yasal olarak izin verilen antioksidan maddenin gam guagik olduğu ve bunun da özellikle hayvansal yağlarda ölçülebilir anti oksidatif etkisinin bulunduğu belirtilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde ise bu madde 1940 yılında et yağlarında kullanılmak üzere kabul edilmiştir. 1940'lı yılların başlarında ise gallik asidin alkil esterlerinin kullanımına izin verilmiş olup, 1942'de nordihidroguairetik asit (NDGA), 1948'de bütillendirilmiş hidroksianisol (BHA), 1954'de bütillendirilmiş hidroksitoluen (BHT) ve 1972'de tersiyer butilhidrokinon (TBHQ)'un gıdalarda kullanımına izin verilmiştir (Altuğ, 2006). Fenolik bileşiklerin ve bazı türevlerinin oksidasyona karşı kuvvetli birer koruyucu olmalarına rağmen, ancak pek azının gıda antioksidanı olarak kullanılmasına izin verilmektedir (Shahidi ve Naczki, 2003).

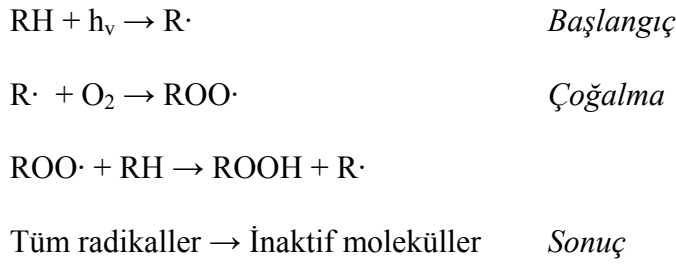
Oksidatif metabolizma, hücrelerin hayatta kalması için gereklidir. Bu bağlılığın bir yan etkisi de oksidatif değişikliklerine sebep olan, serbest radikal ve reaktif oksijen türleri oluşumudur. Gereğinden fazla serbest radikal oluşması, süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz gibi koruyucu enzimleri yenmekte ve zar lipidlerini, hücresel proteinleri, DNA ve enzimlerini oksitleyerek (böylece hücresel solunum bitmektedir) yıkıcı ve öldürücü etkiler oluşturmaktadır

(Antolovich ve ark, 2002). Aynı zamanda oksidatif stres süreci, temelde normal biyolojik reaksiyonlarda dahi sürekli oluşum içinde olan serbest radikallerle, bu moleküllerin etkilerini ortadan kaldırmaya çalışan antioksidan savunma sistemleri arasındaki dengenin bozulmasıyla oluşan bir durumdur. Son yıllarda sıklıkla duyduğumuz “serbest radikaller”, hem vücudun normal metabolik faaliyetleri sırasında, hem de kimyasal ajanlar, radyasyon, alkol, sigara, ağır metaller gibi pek çok dış kaynaklı etkenlerle oluşabilen moleküllerdir. Kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin değildirler. Serbest radikallerin yüksek oranda reaktif bileşikler olmaları, en dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektron içermeleri, kolayca diğer organik ve anorganik moleküllerle reaksiyona girmelerini sağlamaktadır. Antioksidanlar, serbest radikaller gibi kolay bir elektron hedefi oluşturur (Akbaba, 2005). Canlı bir organizma, serbest radikallerin sebep olduğu zarara karşı iki değişik mekanizma ile korunmaktadır; enzimatik (süperoksit dismutaz, glutathion peroksit ve katalaz) veya enzimatik olmayan (Vitamin E gibi antioksidanlar ve glutatol). Bir çeşit antioksidan içeren gıda ve gıda ürünleri enzimatik olmayan savunma isteminin ana elemanlarıdır (Yılmaz ve ark., 2004).

2.1.1 Gıdalardaki oksidatif bozulmalar

Oksidasyon gıdaların besin değerinde, rengine, kokusunda, yumuşaklığında bayatlama ve/veya bozulmanın temel nedenini oluşturmaktadır. Fazla oksitlenmelere karşı savunma mekanizması çeşitli antioksidanlarla sağlanmaktadır (Antolovich ve ark, 2002). Oksidasyon doymamış yağ oranı fazla olan ürünlerde daha hızlı meydana gelmektedir. Doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sırasında meydana gelen ilk ürünlerin doymamış hidroperoksitler olduğu bilinmektedir. Atmosferik oksijen ile yağların oksidasyon reaksiyonunu açıklayan en uygun teorinin, serbest radikal mekanizması ile oluşan zincir reaksiyonu olduğu bilinmektedir. Reaksiyonda serbest radikal oluşumunun başlangıcı, çoğalma ve zincirin son bulması (ikinci dereceden oksidasyon ürünlerinin oluşması) olarak üç aşama bulunmaktadır. Başlangıç aşamasında gerekli aktivasyon, ısı, ışık veya kimyasal enerji ($h\nu$) ile sağlanmaktadır. Bu aşamada doymamış lipit molekülü (RH), hidrojen ayrılması yolu ile serbest

radikal (R·) haline dönüşmektedir. Reaksiyon karbon-karbon çift bağının yanında bulunan metilen grubunda oluşmaktadır. Bu karbon merkezli radikal, moleküler oksijen ile lipit peroksit içermeyen serbest radikaller (ROO·) oluşturmak için oksijen ile reaksiyona girinceye kadar devam etmektedir. Peroksit içermeyen radikaller, bir başka yağ molekülünden (RH) bir hidrojen iyonu alarak hidroperoksit ve bir başka yağ içermeyen radikal oluşmasına neden olmakta ve çoğalma aşamasını başlatmaktadır. Sonuç aşamasında ise hidroperoksitler ısı ya da metal katalizörlerin etkisi ile aldehitler, ketonlar, esterler, alkoller, alkil radikaller ve kısa zincirli hidrokarbonları da içine alan ve acılaştırılmış yağlardaki tat ve lezzeti oluşturan sekonder ürünlere parçalanmaktadır (Altuğ, 2006). Bu aşamalar aşağıda Şekil 2.1’de gösterilmektedir:



Şekil 2.1 Yağ oksidasyonunun başlangıç ve çoğalma aşamaları (Altuğ, 2006)

2.1.2 Antioksidan tipleri ve etki mekanizması

Antioksidanlar etki şekillerine göre sınıflandırılabilir; serbest radikal sonlandırıcılar, metal iyon şelatları ve kapalı sistemlerde oksijenle reaksiyon veren oksijen süpürücüler. Birinci grup antioksidanlar yüksek enerjili lipit radikalleriyle reaksiyona girerek onları termodinamik olarak daha kararlı ürünlere dönüştürmektedir. Önleyici antioksidanlar olarak da bilinen ikinci grup antioksidanlar, hidroperoksitleri yıkararak zincir oluşumu hızını geciktirmektedir. Fenolik antioksidanlar, serbest radikal sonlandırıcılar kategorisine girmektedir (Shahidi ve Naczki, 2003).

Fenolik antioksidan (AH), lipit radikaline hızlıca hidrojen vererek lipit oksidasyonuna etki etmektedir (reaksiyon 1.1 ve 1.2). Diğer reaksiyonlar,

çoğaltma basamağındaki ve reaksiyon 1.5'teki zincir oluşumuna karşı koymaktadır (Shahidi ve Naczki, 2003).



Bütün bu reaksiyonlar doğada ekzotermik olarak gerçekleşmektedir. Aktivasyon enerjisi A-H ve R-H bağları kopma enerjisinin artmasıyla artmaktadır. Bundan dolayı antioksidan (AH) A-H bağı kuvvetinin azalmasıyla artmaktadır. Son fenoksi radikali yeni serbest radikal reaksiyonu veya zincir reaksiyonu ile hızlı oksidasyon başlatmamalıdır. Bu bağlamda fenolik antioksidanlar çok iyi birer elektron vericidir. Buna ek olarak, fenolik bileşiklerin radikalleri rezonans delokalizasyonu ve moleküler oksijenin saldırısına uygun bölgesi olmaması sebebiyle nispeten daha karardır (Shahidi ve Naczki, 2003).

Gıdalarda bulunan lipitler, özellikle doymamış lipitler çabuk okside olarak gıdaların bozulmasına sebep olmaktadır. Gıdalarda kullanılan antioksidanların amacı bu bozulmayı önlemek ve gıdanın raf ömrünü uzatmaktır (Göger, 2006).

2.1.3 Antioksidan aktivite

Bir antioksidanın aktivitesi, lipitlerin miktarsal tayini otooksidasyonun birincil ve ikincil ürünlerinin veya diğer değişkenlerin belirlenmesiyle tahmin edilebilmektedir. Genel olarak, hidroperoksit oluşumundaki veya otooksidasyonun ikincil kimyasallarının üretimindeki gecikmenin kimyasal yöntemlerle belirlenmesi yöntemleri kullanılır. Bu yöntemler bozulmamış gıdalara, onların ekstraktlarına ya da model sistemlere uygulanmaktadır. Gıdalardaki çalışmalar normal saklama koşullarında ya da aktive oksijen metodu (AOM), Schaal fırın testi, oksijen absorpsiyonu, ve oksijen bombası kalorimetresiyle veya tamamen otomatik oksidatif kararlılık cihazlarıyla (Ransimat

aparatu, oksigraf) hızlandırılmış oksidasyon koşullarında yapılmaktadır. Bir antioksidan ilavesinde, indüklenme zamanının uzaması kimi zaman antioksidan indeks veya koruma faktörü olarak da anılan antioksidan etkiyle ilişkilendirilmiştir. ORAC (oksijen radikal absorban kapasitesi) ve TEAC (troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi) testleri günümüz literatüründe kullanılmaktadır, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) gibi yapay radikaller de kullanılmaktadır. Tüm bu öneriler gıda fenoliklerinin ve diğer bileşenlerinin antioksidan aktivitesinin hesaplanabilmesi içindir (Shahidi ve Naczki, 2003).

ORAC testi, 2,2'-azobis-(2-amidinopropan) dihidroklorür (AAPH)'in 37°C'de peroksil radikalini 540 nm'den 565 nm dalga boyuna çıkan florasan yardımı ile indirgemesindeki süpürücü kapasiteyi ölçmektedir. Sonuçlar gram başına milimol Trolox (suda çözünen, α -tokoferol benzeri) eşdeğeri olarak hesaplanır ve ifade edilmektedir. TEAC tekniği, sıvı fazda flavonoidlerin hidrojen verme yetilerini, 2,2'-azobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfirik asit kasyonu (ABTS.+) süpürücü etkisini hesaplayarak ve 1 mM. deney bileşiği içeren çözeltinin aktivitesini, milimolar Troloks (TEAC=1) konsantrasyonu cinsinden ifade etmektedir (Shahidi ve Naczki, 2003; Heim, 2002).

Ek olarak, DPPH tekniği, radikal antioksidanlarla süpürülmesini, spektrofotometrik veya EPR (elektron paramagnetik rezonans) tekniklerle ölçmektedir (Shahidi ve Naczki, 2003).

2.1.4 Sentetik antioksidanlar

Yağların oksidasyon mekanizmalarının anlaşılması ile birlikte, oksidasyonu önlemek amacıyla antioksidan üretimi konusunda pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla tokoferoller ve askorbik asidin doğal özdeş formları veya türevleri laboratuvar ortamında sentezlendiği gibi doğal yapı ile ilgisi olmayan yapay antioksidanlar da üretilmiştir. 1940'lı yıllardan beri yüzlerce yapay antioksidan madde sentezlenmesine karşın, bunların ancak az bir kısmı günümüzde kullanılmaktadır (Altuğ, 2006).

Gıda maddelerine antioksidan ilavesi çeşitli yönetmelikler tarafından sınırlandırılmıştır. Gıda ürünlerinde kullanıma uygun antioksidanlar: bütillenmiş

hidroksitoluol (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA), gallatlar; propil gallat (PG), dodesil gallat (DG) ve ter-bütildidrokinon (TBHQ)'dur (Shahidi ve Nacz, 2003; Wettasinghe ve Shahidi, 1999).

Bütillenmiş hidroksianisol (BHT) ucuz olması, kararlı yapıda olmaları açısından en sık kullanılan sentetik antioksidanlardandır. BHT bitkisel yağlardan çok hayvansal yağlarda oksidasyonu önleme özelliğine sahiptir. Bütillenmiş Hidroksianisol (BHA), hayvansal ve bitkisel yağlarda çözünen, suda çözünmeyen mono hidrik fenolik antioksidandır. BHA kısmen kısa zincirli yağ asitlerinin (Hindistan cevizi ve hurma çekirdeği yağlarında bulunan) oksidasyonunu kontrol altına almak için kullanılır. Gallatlar, gallik asidin propanol esteridir. Fenolik bileşiklerdeki gibi antioksidan aktivitelerinde hidroksil grupları önemli rol oynamaktadır. Tersiyer bütildidrokinon (TBHQ), karakteristik kokusu olan bir maddedir (Bektaş, 2005).

2.1.5 Doğal antioksidanlar

Sentetik antioksidanların gıdalarda kullanılması, bu tip maddelerin sağlığa zararları sebebiyle sıkı bir düzenleme altındadır. Bu durum, gıdalarda sentetik antioksidanlar yerine kullanılacak doğal oluşan antioksidanların daha ayrıntılı incelenmesini gerektirmiştir (Wettasinghe ve Shahidi, 1999).

Gıda endüstrisinde ve koruyucu ilaç geliştirilmesinde bitkiden elde edilen doğal antioksidanlara büyük ilgi duyulmaktadır. Bitki dokuları, α -tokoferol, askorbik asit, karotenoit ve fenolik bileşiklerin oldukça fazla çeşidini içermektedir. Flavonoitler ve diğer bitki fenoliklerinin, antioksidan aktivite, trombosit birikmesini engelleme ve anti mikrobiyel etkiler gibi biyolojik etkilerinin oldukça fazla olduğu belirlenmiştir (Kanner, 1994).

Bitki fenolikleri çok fonksiyonludur ve indirgeyici ajanlar (serbest radikal sonlandırıcılar), metal şelatları ve tek oksijen doyurucu olarak davranmaktadır. Ortak bitki fenolik antioksidanlarına örnek olarak, flavonoit bileşikler, sinamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller ve polifonksiyonel organik asitleri içermektedir (Shahidi ve Nacz, 2003).

2.2 Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler yapısal olarak, bir veya daha fazla hidroksil grubunun paylaşıldığı aromatik halkadan oluşmakta ve basit fenolik bileşiklerden polimerleşmiş bileşiklere kadar bünyesinde bulundurmaktadır. Bu yapısal farklılığa rağmen, bu grup bileşiklerden polifenoller olarak söz edilmektedir (Balasundram, 2006).

Polifenoller tüketici ve gıda üreticilerinin ilgi odağıdır. Epidemiyolojik çalışmalar, polifenol ağırlıklı besinlerin ve içeceklerin tüketilmesinin hastalıklara karşı koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir. Şarap tüketimi, koroner kalp rahatsızlığı önlemektedir. Çay tüketimi, kansere ve koroner kalp rahatsızlığına karşı koruyucu olurken, soya meme kanseri ve osteoporozu karşı koruyucu etki göstermektedir (Scalbert, 2000).

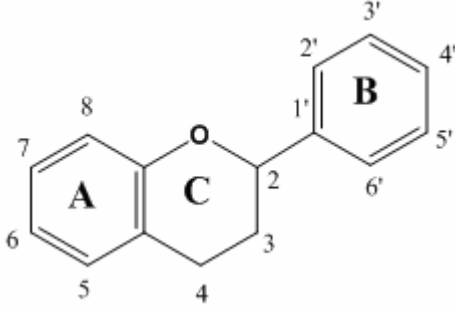
Bitki ve gıdalar; basit fenoller, fenilpropanoitler, benzoik asit türevleri, flavonoidler, stibenler, tanenler, lignanlar ve ligninler gibi geniş bir aralıkta fenolik türevlerini içermektedir (Shahidi ve Naczki, 2003).

Fenolik asitler iki alt gruptan oluşmaktadır; hidroksibenzoik asitler (C6-C1 yapısında) ve hidroksi sinamik asitler (C6-C3 yapısında) (Balasundram, 2006).

Serbest ya da esterleşmiş halde hidroksibenzoik asitler, insanların yediği sadece birkaç bitkide bulunduğu için önemli bir besin olarak sayılmadığından geniş olarak araştırılmamıştır. Hidroksinamik asitler, hidroksibenzoik asitlerden daha yaygındır. Bu asitler, donma, sterilizasyon veya fermantasyona maruz kalmadıkça serbest formda nadiren bulunurlar. Hem serbest hem esterleşmiş formda kafeik asit en çok bulunan fenolik asittir ve çoğu bitkideki hidroksinamik asit miktarının %75–100 arasını temsil etmektedir. Ferulik asit tahıl tanelerinde en çok bulunan fenolik asittir (Manach, 2004).

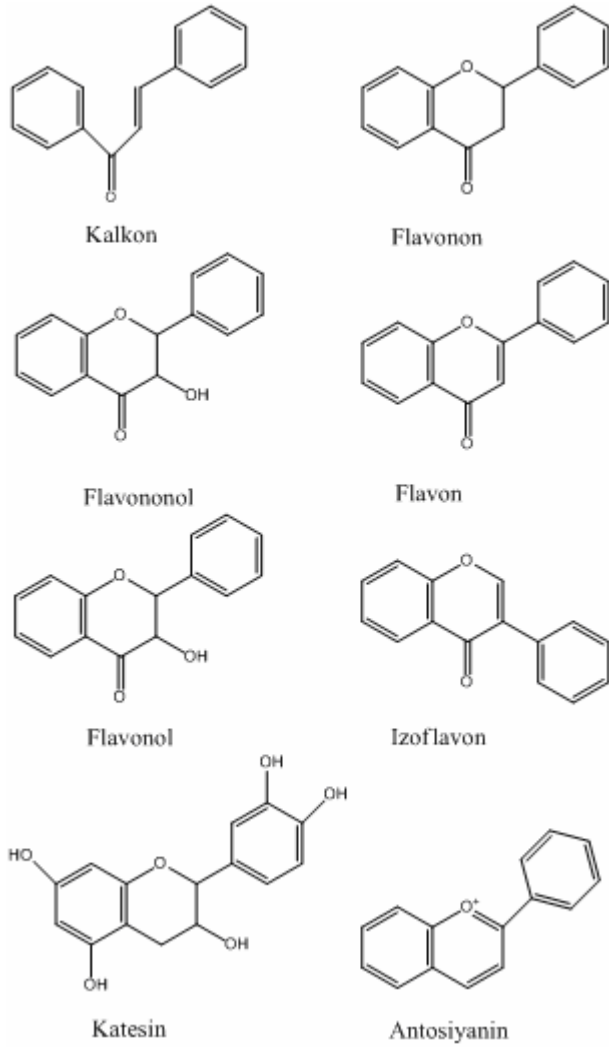
Flavonoidler, üç malonil-CoA ile sinamik asitten türemiş bir çeşit bitki ikincil metabolitidir. Renkli flavonoidler birçok meyve ve sebze rengini verse de doğada birçok renksiz flavonoid de bulunmaktadır. Kimyasal yapılarındaki küçük değişiklikler, flavonoidlerin UV spektrumunda birini diğerinden ayırmayı kolaylaştırır ve örnekteki tek bir bileşiğin konsantrasyonu ölçülebilmektedir. Flavonoidler Şekil 2.2’de gösterilen C halkasındaki oksidasyonun derecesine göre

başlıca flavonlar, flavonoller, izoflavonlar, antosiyaninler, flavanoller, proantosiyandinler ve flavanonlar olarak sınıflandırılabilir (Scalbert, 2000; Yılmaz, 2004)



Şekil 2.2 Flavonoitlerin basit monomerik yapısı (Yılmaz, 2004)

Şekil 2.3’de C6-C3-C6 bileşiklerinin kimyasal yapıları gösterilmiştir. Flavonlar ve flavonoller besinlerde aglikonları olarak bulunurlar, yaklaşık olarak 200 çeşit flavonol ve 100 çeşit flavon, bitkilerde tanımlanmıştır. Bu bileşiklerde C2-C3 arasında çift bağ bulunmaktadır. Flavonoller, flavonlardan 3-konumunda hidroksil grubu içermelerinden dolayı ayrılırlar ve 3-hidroksiflavonlar olarak da adlandırılırlar. Her sınıf içinde, her flavonoit hidroksil grupları dağılımına olduğuna kadar alkillenme veya glikozitleşme derecelerine göre çeşitlenmektedir. Flavonol ve flavon glikozitleri oluşumu ışığın durumuna bağlıdır, bu yüzden yapraklarda ve meyve kabuklarında çok olmasına karşın, toprak altında kalan bölümlerinde az miktarlarda bulunmaktadır. Flavonoller temel olarak mono-, di- ve triglikozitler olarak bulunurlar. Monoglikozitler çoğunlukla 3-0-glikozit olarak oluşurlar. Meyve ve sebzelerde flavonollerin 5, 7, 3’ ve 4’ pozisyonunda glikozitleşmesi nadirdir. Diglikozit durumunda, iki şeker yarımı aynı veya farklı iki karbona bağlanabilir. Bundan dolayı, 3-0-glikozitler ve 3,7-di-0-glikozit sıklıkla 3-rutinositler olarak bulunurlar. Rutin, meyve ve sebzelerde bulunan bir çeşit diglikozittir. Triglikozitler en az bulunan flavonol glikozitleridir. Flavanonlar aynı zamanda hidroksiflavon olarak da adlandırılır. Flavononoller flavononlardan 3-pozisyonunda hidroksil grubu içermelerinden dolayı ayrılmaktadır ve çoğunlukla dihidroflavonol olarak anılmaktadır (Shahidi ve Naczki, 2003).



Şekil 2.3 C6-C3-C6 bileşiklerinin kimyasal yapısı (Shahidi ve Naczki, 2003)

Flavonoidlerin reaktif oksijen türlerin (ROS) ve reaktif azot türlerine (RNS) karşı süpürücü etki ile antioksidan görevi yaptığı ve yapıya-bağlı olarak, bazı durumlarda ise geçiş metal iyonu şelatörü oldukları bildirilmiştir (Rice-Evans, 2001).

Flavonoidlerin son antioksidan potansiyeli ve in-vivo biyoyararlılığı, sindirimden sonra vücut tarafından absorbe edilmeleri, metabolizmaları, dağılımları ve atımlarına bağlıdır. Fenolik bileşikler ile proteinler arasında, fenolik bileşik boyutuna göre kovalent veya kovalent olmayan etkileşimler kurmak üzere kuvvetli bir afinite bulunmaktadır. Proteinler ve tanenler arasındaki

etkileşimler sonucunda çözünmeyen kompleksler oluşmakta ve bunlar sindirim sistemi boyunca kararlı olmaktadır (Laurent, 2007).

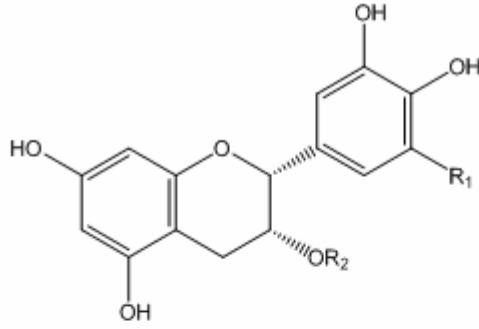
Flavonoller, gıdalarda en çok bulunan flavonoittir ve başlıca; kersetin ve kaempferoldür. Kırmızı şarap ve çay 45 mg/l flavonol içermektedir. Bu flavonoller dış kısımlarda (kabuk ve yaprak) birikmiştir çünkü biyosentezleri ışık ile artmaktadır (Manach, 2004).

Flavonlar, meyve ve sebzelerde flavonollerden daha az yaygındır. Flavonlar, başlıca luteolin ve apigenin glikozitleri olarak yer almaktadır. Flavonların günümüze kadar keşfedilmiş tek önemli besin kaynağı maydanoz ve kerevizdir (Manach, 2004).

İzoflavonların temel kaynağı soya ve kuru fasulyedir. Bu iki izoflavon, östrojen özelliği ve meme kanserine ve osteoporozu karşı gösterdiği koruma ile ilgi toplamaktadır. Kersetin ana bir flavonoldür ve birçok meyve ve sebze ve sularında bulunur. Flavonlar daha az yaygındır, tatlı kırmızıbiberde ve kerevizde bulunmuştur. Ana flavanoller kateşinlerdir, çayda yaygındır. Diğer bir kaynağı şarap ve çikolatadır (Scalbert, 2000).

Flavanoller monomerik (kateşin) veya polimerik (proantosiyanidin) formlarda bulunabilir. Kateşinler birçok meyve türünde yer almaktadır. Bir kilogram taze meyve başına; kayısıda yaklaşık 250 mg, kırmızı şarapta 300 mg, yeşil çayda (infüzyonla) 200 mg bulunmaktadır. Kateşin ve epikateşin meyvede bulunan başlıca flavanollerdir ve bunun yanında gallokateşin, epigallokateşin ve epigallokateşin gallat baklagillerin, üzümün çekirdeğinde ve en önemlisi çayın içinde bulunmaktadır (Manach, 2004).

Kateşinler (Şekil 2.4'de kimyasal yapıları gösterilmiştir) ortaklaşa flavanlar olarak bilinirler çünkü 3-pozisyonunda karbonil grupları eksiktir, önemli olarak; bu kategoriye flavan-3-ol'ler ve flavan-3,4-diol'ler dahildir (Shahidi ve Naczki, 2003).



Katesin	R ₁	R ₂
(-)- Epikatesin (EC)	H	H
(-)- Epikatesin gallat (ECG)	H	
(-)- Epigallokatesin (EGC)	OH	H
(-)- Epigallokatesin gallat (EGCG)	OH	

Şekil 2.4 Katesinlerin kimyasal yapıları (Shahidi ve Naczki, 2003)

Flavonoidler arasında, antosiyaninler, meyve ve sebzelerde bulunan antosiyanidinlerle glikozitlenmiş olarak bağlı bulunurlar. Kalkon ve flavonlar sarı iken, antosiyaninler meyve ve diğer besinlerin parlak kırmızı, mavi ve mor renginden dorumlu suda çözünür pigmentlerdir. Bitkilerde yaklaşık 200 değişik antosiyanin belirlenmiştir. Yeşil çayda, antosiyanidinlerle yapısı benzer katesin ve epikatesin çok bulunmaktadır fakat renksizdirler (Shahidi ve Naczki, 2003).

2.2.1 Tanenler

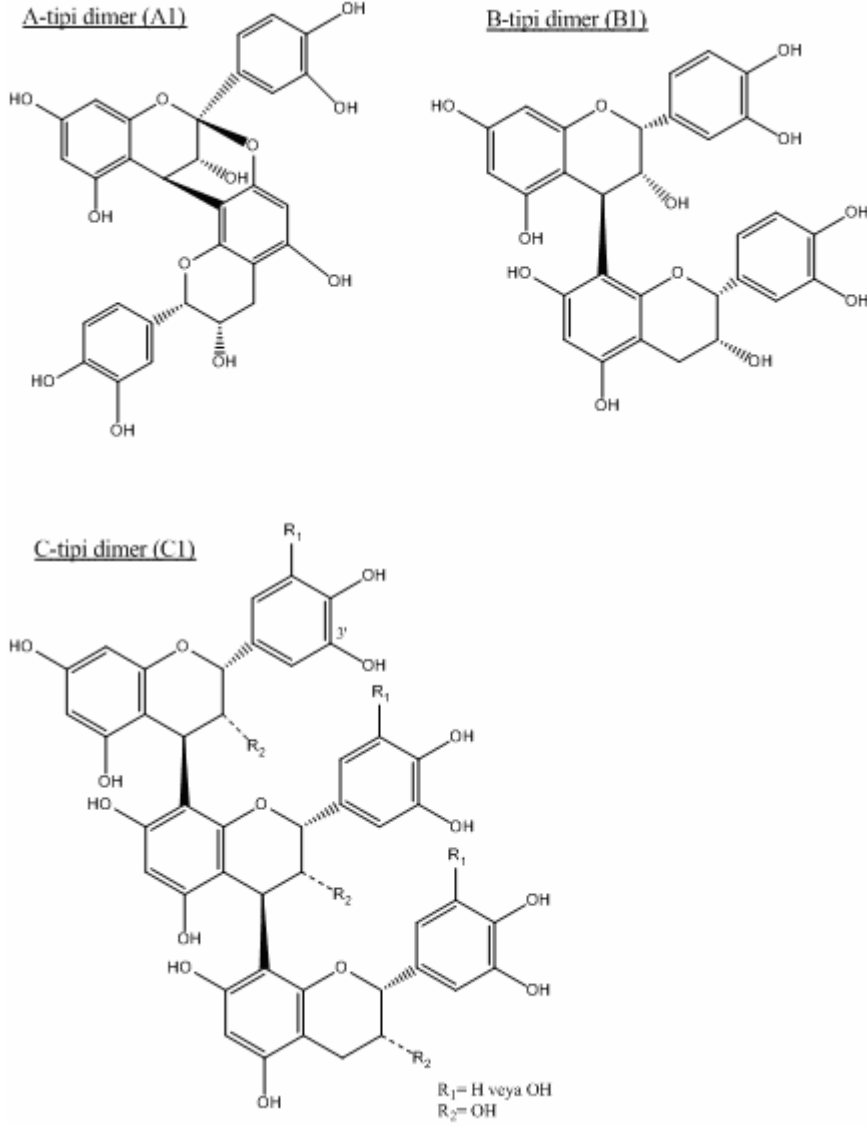
Tanenler, sulu çözeltilerde proteinleri çöktüren polifenollerdir ve bitkilerde oldukça yaygındır. Basit olarak tanımlanırsa, 500–3000 ile 3000 arasında molekül ağırlıklı, suda çözünebilen fenolik bileşiklerdir, fenollerle olağan reaksiyonları vermesinin yanı sıra alkoloidleri, jelatini ve diğer proteinleri çöktürme gibi özel kabiliyetleri de bulunmaktadır (Shahidi ve Naczki, 2003; Obradovic, 2006).

Yapılarına göre, tanenler hidrolizlenen veya kondanse (proantosiyanidin) olarak tanımlanırlar. Hidrolizlenen tanenler gallik asitlerin glikozitlenmiş halleridir.

Bu gallik asitlerin çoğu şeker moleküllerine bağlanmıştır. Hidrolizlenen tanenlerin molekül ağırlığı 500'den 2800'e kadar değişir. Hidroliz ürünlerine göre, hidrolizlenen tanenler gallotanen ve elagitanen olarak sınıflandırılmaktadır. Hidrolizlenen tanenler için ana yapıtaşı gallik asit ve türevleridir ve hidrolizlenen tanenlerin bir diğer içeriği ise gallik asidin esterleşme ile bağlanabildiği şekerlerdir. Bir glikoz birimi beş adet gallik asit ile esterleşebilmektedir. En basit hidrolizlenen tanen pentagalloyl glikozdur. (Shahidi ve Naczk, 2003; Obradovic, 2006).

Kondanse tanenler (proantosiyanidin=prosiyanidin) flavan-3-ol bileşiklerinin oligomer ve polimerleridir (Şekil 2.5). Polimerizasyon süreci düşük pH ile katalizlenir ve asetaldehit ile yükselmektedir. Yaklaşık olarak 50 prosiyanidinin dimerlerden heksamerlere kadar tanımlandığı bilinmektedir. Tanenler, aktif olmayan agresif enzimler olduklarından, mikroorganizma saldırılarına karşı da bitkiyi korumaktadır (Shahidi ve Naczk, 2003; Obradovic, 2006). Temel kaynakları elma, üzüm, armut, çay ve kırmızı şarap gibi içecekler ve çikolatadır (Scalbert, 2000).

Üç veya daha az monomerli tanenlerin baskın bir buruk tatları vardır ve tanen sertliğine katkıda bulunmaktadır. Üç veya daha fazla alt grup içeren tanenler baskın olarak buruktur ve esnekliğe katkıda bulunmaktadır. Polimerizasyon arttıkça olası bağlanmalar artar ki bunlarda burukluğu arttırmaktadır. Zincir uzunluğunun artması kuruluk, tozlaşma, yapışkanlaşma ve büzülme karakteristiklerini arttırmaktadır. Tanenlerin gallolaşması daha pürüzlü bir doku, kabalaşma, kuruluk ve tozlaşma hissedilmesini arttırmaktadır (Obradovic, 2006).



Şekil 2.5 Prosiyanidin tipleri

2.2.2 Fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu

Gıda fenoliklerinin yapısı gereği, gıda fenoliklerinin tüm sınıflarını veya sadece bir spesifik sınıfı izole edebilecek yeterli bir yöntem bulunmamaktadır. Bunlar fenolik asitler, fenilpropanoitler, antosiyaninler ve tanenlerin değişen miktarlarını içeren basitten polimerleşmiş maddelere kadar değişmektedir. Bazı yüksek molekül ağırlıklı fenolikler ve bunların kompleksleri tamamen çözünmez olduklarından, ekstratlar daima seçilen çözücü sisteminin çözdüğünden farklı bir

fenolik madde karışımını içerir. Genellikle, izole edileni saflaştırmak ve istenmeyen fenolik veya fenolik olmayan maddeleri uzaklaştırmak için ilave bir basamağa ihtiyaç vardır (Shahidi ve Nacz, 2003).

Antosiyaninler, asitlendirilmiş, organik çözücü; çoğu zaman metanol, ile ekstre edilebilmektedir. Bu çözücü sistemi hücre duvarını yıkar ve ardından antosiyaninleri çözmektedir (Shahidi ve Nacz, 2003).

Kondanse tanenlerin ekstraksiyonu için birtakım çözücü sistemleri kullanılmıştır. Saf metanol, etanol, asitlendirilmiş metanol, aseton, su ve bunların kombinasyonları en çok kullanılan çözücü sistemleridir. Örneğin %1 HCl içeren metanol, fasulye ve darıdan (sorgum) tanenlerin ekstre edilebilmesi için kullanılmaktadır. Kolza tohumu ve kanoladan tanenlerin ekstre edilebilmesi için en iyi çözücü sistemi aseton-sudur (70/30, v/v). Aseton-su (60/40, v/v) çözücüsü şaraplık elma ve üzüm kabuğundan tanenlerin ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Karanfil ve yenibahar tanenleri, aynı zamanda bu yöntem kolzada tohumunda da kullanılmıştır, 2 saat boyunca suda kaynatılarak ekstre edilmiştir (Shahidi ve Nacz, 2003).

Ekstraksiyon zamanı polifenol geri kazanımını etkileyen diğer bir faktördür. Ekstraksiyon zamanları 1 dakikadan 24 saate kadar değişmektedir. Uzun ekstraksiyon zamanları çözücü sistemine indirgeyici koyulmadığında, fenoliklerin oksitlenme olasılığını arttırmaktadır. Buna karşın kuru fasulye fenoliklerinin ekstraksiyonu için optimum zaman 50–60 dakikadır. Diğer taraftan %70 aseton (v/v) ile her dakika için 10,000rpm Polytron homojenleştirici ile yapılan iki kademeli ekstraksiyonun endüstriyel kanola tanenlerini almada yeterli olduğu bulunmuştur. Daha ileri ekstraksiyonlar (6 kademeye kadar), diğer fenolik maddelerin ekstraksiyon verimini sadece az oranda geliştirmektedir (Shahidi ve Nacz, 2003).

Polifenollerin gıda ürünlerinden geri kazanımı ayrıca örneğin çözücüye oranından (R) da etkilenmektedir. % 70 aseton kullanılarak R'yi 1/5'den 1/10'a arttırdıklarında, endüstriyel kanoladan kondanse tanenlerin ekstraksiyonunda, kondanse tanenin 257,3'den 321,3 mg/100 g madde'ye ve toplam fenolün 773,5'den 805,8 mg/100 g madde'ye arttığını bulunmuştur (Shahidi ve Nacz, 2003).

Kuru fasulyeden tanen geri kazanım veriminin partikül boyutu değişikliğinden etkilendiğini kanıtlanmıştır. Minimum boyutunun 820mm'den 250mm'ye düşmesi, tanenlerin %25'den %49'a kadar düştüğünü bulunmuştur (Shahidi ve Naczk, 2003).

Prosiyanidinlerin bitki materyalinden analitik ve preparatif amaçlarla ekstraksiyonunda metanol, etanol, aseton ve bunları sulu çözeltileri kullanılmıştır. Aseton-su karışımı kullanılması, prosiyanidinlerin ekstraksiyonunda bu amaçla kullanılan diğer çözücülere göre daha iyi verim vermektedir (Pekic, 1998)

Prosiyanidinlerin ekstraksiyonunda, metanol, etanol, asitlendirilmiş metanol, aseton, su ve bunların kombinasyonları kullanılmıştır. Aseton-su (70/30, v/v) sistemi prosiyanidinlerin kolza, kanoladan, bezelyeden ekstraksiyonu için en iyi çözücü olduğu kanıtlanmıştır. Üzüm kabuğu ve elmadan prosiyanidinlerin ekstraksiyonu için aseton-su (60/40, v/v) kullanılmıştır (Naczk, 2004).

2.2.3 Fenolik bileşiklerin analiz ve ölçüm metotları

Fenolik bileşikler için birçok yöntem geliştirilmiş ve fenolik bileşiklerin analizi üzerine bir takım incelemeler yayınlanmıştır. Bu yöntemler, toplam fenolik bileşen miktarının veya bir fenolik bileşiği veya grubu ölçmesine göre sınıflandırılmaktadır. Folin-Denis ve Prussian mavisi testleri toplam fenolik bileşiği belirlemek için kullanılır. Ancak seçilmiş koşullar altında ekstre edilebilen fenolik bileşikler bu bahsedilen metotlarla ölçülebilmektedir (Shahidi ve Naczk, 2003).

Folin-Ciocalteu tekniği genellikle gıda fenoliklerinin toplam kapasitesini belirlemede kullanılır. Folin-Ciocalteu reaktanı spesifik değildir, ekstre edilen maddedeki tüm fenolik grupları ve ekstre edilen proteinler de dahil olmak üzere belirlemektedir (Kahköhen ve ark., 1999; Shahidi ve Naczk, 2003).

Vanilin metodu, meyve ve tohumlardaki monomerik ve dimer flavan-3 ol'lerin miktarlarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılır. Asidik çözelti içinde prosiyanidinlerin vanilin reaktanı ile kondensasyonuna bağlıdır (Shahidi ve Naczk, 2003).

Toplam prosiyanidin miktarı bütanol-konsantre hidroklorik asit (95/5, v/v) ile gerçekleşmektedir. Asidik koşullarda, prosiyanidinler (kondanse tanenler), flavonoit antosiyaninlere dönüşmektedir. Bu karbo katyonların flavonoit içi bağlarının kırılarak oksidasyonundan oluşmaktadır (Naczki ve Shahidi, 2004).

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) teknikleri fenolik bileşikleri ayırma ve miktar tayini için yaygın olarak kullanılmaktadır. Antosiyanin, prosiyanidin, flavonon ve flavonol, flavan-3-ol, flavon ve fenolik asit analizleri için çeşitli kolonlar ve mobil fazlar kullanılabilir (Shahidi ve Naczki, 2003).

Bitki materyalinin analizi yapılırken, her bir bileşiğin detaylı özelliği bilinse de, bileşikler çoğu zaman maksimum absorbanslarına göre gruplanırlar; fenolik asit ve flavanoller (280nm), flavonoller (260 veya 365nm) ve antosiyaninler (520nm) (Shi ve ark., 2002).

Gıda fenolikleri çoğunlukla UV-Vis ve DAD dedektörleri ile belirlenir. (Shahidi ve Naczki) DAD dedektörü ile bileşiğin tüm UV-Vis spektrumu alınır ve standart bileşiklerin spektrumuyla eşleştirilir, böylece pik tanımlanması daha güvenilir olmaktadır (Shi ve ark., 2002). Fenolikleri belirlemek için kullanılan diğer dedektörler elektrokimyasal kolorimetrik dedektörü, florimetrik dedektördür (Shahidi ve Naczki, 2003).

Ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, kateşin ve oligomerik prosiyanidinlerin analizi için etkili ve doğru bir tekniktir (Peng ve ark., 2001).

2.3 Üzüm ve Üzüm Çekirdeği Fenolik Bileşikleri

2.3.1 Üzüm

Bağcılık ve üzümçülük en eski tarım faaliyetlerinin başındadır. Çeşitli şekillerde kullanım yeri bulan kültür üzümü, binlerce yıl süren tabii ve daha sonraları planlı bir seleksiyonla, yabani asmadan meydana gelmiştir. Üzüm sistematikte *Vitaceae* familyasından, *Vitis* cinsinin *Vitis vinifera L.* türüne girer. Kültür üzümü ise *Vitis vinifera sativa* olarak isimlendirilmektedir. Üzüm, çeşitli değerlendirme yöntemlerinin oluşu, iklim ve toprak yönünden çok seçici olmayışı,

çok yıllık olması ve çoğalma yöntemlerinin kolay oluşu gibi nedenlerle dünyada en yaygın yetiştiriciliği yapılan bitkilerden biridir. Kültür asması yeryüzünde kuzey yarı kürede 11°-52° enlem, güney yarı kürede de 20°-40° enlem arasında yayılmış olup, bu enlemler içinde kalan ülkelerde iklim şartları uygun olan yerlerde yetiştirilmektedir. Sıcaklık, bağıcılığın kuzeye doğru yayılmasını engelleyen en önemli faktördür (Anonim, 1977; Küvetin, 1990; Taşkaya, 2003).

Üzüm % 2–6 arasında sap, % 5–12 arasında kabuk, %80–90 arasında su ve % 0–5 arasında da çekirdekten oluşmaktadır. Üzüm çekirdeği, üzüm ağırlığı içinde küçük bir yüzdeye sahip olsa da üzümünden ekstre edilebilen fenolik bileşiklerin üçte ikisi burada yer almaktadır; fenolik bileşiklerin %5'i suyunda, %1'i kabuğunda ve %62'si ise çekirdeğindedir. Çekirdek en yüksek fenolik içeriğe sahiptir, ağırlıkça % 5–8 arasında fenolik (5000–8000 mg/polifenol) bileşik içermektedir ve özellikle tüm flavonoidleri içermektedir (Kar ve ark., 2006; Youssef ve ark., 2006).

Dünyada üzüm üretiminin yarısından fazlası Avrupa Kıtasında gerçekleşmektedir. Dünya yaş üzüm üretiminde İtalya, Fransa, ABD, İspanya, Türkiye, Bağımsız Devletler Topluluğu ve Portekiz başlıca ülkelerdir. 2002 yılı verilerine göre dünyada 7,4 milyon hektar alanda 61 milyon ton üzüm üretilmektedir. Dünya üzüm üretiminde %24 ile İtalya ilk sırada, Türkiye ise %12 ile 5. sırada yer almaktadır ve yaş üzüm üretiminde 6. sırada yer almaktadır. (Akgün ve ark., 2006; Taşkaya, 2003).

Uygun ekolojik ve iklim özelliklerine sahip olması nedeniyle ülkemiz, bağıcılık alanında dünyanın en önemli ülkelerinden biridir. 600 bin hektarlık bağ alanına sahip Türkiye'de üretilen üzümün yaklaşık %63'ü çekirdekli %27'si ise çekirdeksiz üzümünden oluşmaktadır. Bölgelerimize göre üretim incelendiğinde ise; Ege Bölgesinde çekirdeksiz kuru üzüm, Marmara Bölgesinde sofralık ve şaraplık, Akdeniz Bölgesinde ilk turfanda, Orta Anadolu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde şaraplık, şıralık, sofralık, çekirdekli kurutmalık üzüm yetiştiriciliği yönünden gelişme gösterdiği görülmektedir. Potansiyelin %35'i sofralık olarak tüketilmekte, %24'si kurutulmakta, %15'i üzüm suyu, pekmez ve pestil gibi çeşitli ürünlerin yapımında kullanılmakta olup %8'i şaraba işlenmektedir. Sofralık üzüm üretiminin küçük bir bölümü ihraç edilirken çok büyük bölümü de yurt

içinde tüketilmektedir. Çekirdeksiz kuru üzüm ise ülkemizin iç ve dış ticaretinde önemli bir yer tutmaktadır. Üretimin yaklaşık %90'ı ihraç edilirken %10'u yurt içinde tüketilmektedir. Toplam şarap üretim kapasitemiz 485 milyon l'ye ulaşmıştır. Bu üretim miktarı, 31 tesis tarafından sağlanmakta olup 25'i özel sektöre aittir. Şarap üretiminin en büyük kısmı; Marmara, Ege ve İç Anadolu Bölgesi'nin kuzey kesimlerinde gerçekleşmesine rağmen tüketimin en yoğun olduğu yerler ise İstanbul, Ankara, İzmir ve turistik kesimlerdir (Anonim, 2006). Akgün ve ark., 2006).

TUİK (Türk İstatistik Enstitüsü) verilerine göre (Çizelge 2.1), Türkiye'de 2006 yılı toplam meyve üretimi üzerinden üzümün payı %26,55; 2007 Ocak-Eylül döneminde ise toplam meyve üretimi üzerinden üzümün payı % 26,02 olmuştur. Türkiye'de üzüm üretiminde 2006 yılından 2007 yılı geçici verilerine geçildiğinde %1,9'luk bir azalma gözlenmektedir (Anonim, 2007).

Türkiye'de 2006 yılında üzüm suyu (üzüm şırası dahil, konsante olmayan) üretimi yapan 1 özel iş yeri bulunmaktadır, 2007 yılı Ocak-Eylül döneminde ise üzüm suyu üretimi yapılmamıştır. Çekirdeksiz üzüm (kurutulmuş) üretimi 2006 yılında 17 özel işyerinde 171746 kg, 293.477.428 YTL üretim değeriyle üretilmiş ve 173.234 kg satışı yapılmıştır. 2007 yılı Ocak-Eylül döneminde ise 17 özel iş yerinde 72.980 kg, 117.0297.777 YTL' ye üretilmiş ve 75.811 ton satışı gerçekleşmiştir. Çekirdekli üzüm üretimi 2006 yılında 1 işyerinde yapılırken, 2007 Ocak-Eylül döneminde gerçekleşmemiştir. İçki imalinde kullanılan alkollü bileşik müstahzarları 2006 yılında, 4 işyerinde, 8.124.230 kg, 39.690.341 YTL' ye üretilmiş ve 33.205.36 kg satışı gerçekleşmiştir; 2007 yılı Ocak-Eylül döneminde ise 420.234 kg, 20.842.823 YTL' ye üretilmiş 3.875.973 kg satışı gerçekleşmiştir. Beyaz şarap üretimi 2006 yılında, 1 devlete bağlı işyerinde, 4.797 kg, 24.801 YTL' ye üretilmiş ve 7293 kg satışı gerçekleşmiştir; 2007 yılı Ocak-Eylül döneminde ise 2100 kg, 13.603 YTL' ye üretilmiş 2.100 kg satışı gerçekleşmiştir. Diğer şarap ve üzüm şıraları üretimi 2006 yılında, 8 özel işyerinde, 25.072.156 kg, 79.266.254 YTL' ye üretilmiş ve 20.848.513 kg satışı gerçekleşmiştir; 2007 yılı Ocak-Eylül döneminde ise 7 özel işyerinde, 10.979.239 kg, 40.077.383 YTL' ye üretilmiş 8.709.177 kg satışı gerçekleşmiştir. Vermut

(taze üzümden yapılan aromalı şarap) üretimi 2006 yılında 1 özel işyerinde yapılırken, 2007 Ocak-Eylül döneminde gerçekleşmemiştir (Anonim, 2007).

Çizelge 2.1 Ülkemizin 2006–2007 üzüm ihracat ve ithalat verileri

	Yıl	Üzüm çeşidi	Miktar (kg)	Dolar
İHRACAT	2006	Üzüm; sultani çekirdeksiz (taze) sofralık	132.908.310	74.225.325
		Üzüm; razakı (taze) sofralık	149.062	47.491
		Üzüm; Tarsus beyazı (taze) sofralık	144.280	44.385
		Üzüm; müşküle (taze) sofralık	467.655	113.735
		Üzüm; kardinal (taze) sofralık	441.004	306.518
		Üzüm; Perlet üzümü (taze) sofralık	4.661.059	3.046.657
		Üzüm; Süper çekirdeksiz üzümü (taze) sofralık	1.878	546
		Üzüm; Antep karası üzümü (taze) sofralık	4.004.662	1.704.866
		Üzüm; Hatun parmağı üzümü (taze) sofralık	1.173.530	401.489
		Üzüm; Yalova incisi üzümü (taze) sofralık	5.780.909	3.425.310
		Üzüm; diğerleri (taze) sofralık	1.384.352	767.978
		Üzüm; diğerleri; sofralık olmayan (taze)	19.149	8.612
		Üzüm; korint (kurutulmuş)	326.553	376.083
		Üzüm; sultani (kurutulmuş)	241.791.917	286.013.574
		Üzüm, diğerleri (kurutulmuş)	2.094.449	2.841.036
	Toplam	395.348.769	373.323.605	
	2007	Üzüm; Sultani çekirdeksiz (taze) sofralık	97.617.505	71.692.210
		Üzüm; Razakı (taze) sofralık	68.214	41.714
		Üzüm; Kardinal (taze) sofralık	349.553	286.838
		Üzüm; Perlet üzümü (taze) sofralık	2.416.494	2.317.137
		Üzüm; Antep karası üzümü (taze) sofralık	1.247.331	959.811
		Üzüm; Hatun parmağı üzümü (taze) sofralık	231.711	148.824
		Üzüm; Yalova incisi üzümü (taze) sofralık	7.795.726	6.853.861
		Üzüm; diğerleri (taze) sofralık	641.308	485.380
		Üzüm; sultani (kurutulmuş)	164.788.438	199.731.650
Üzüm, diğerleri (kurutulmuş)		289.858	419.216	
Toplam	275.446.138	282.936.641		
İTHALAT	2006	Üzüm; diğerleri (taze) sofralık	316.515	365.257
		Üzüm; korint (kurutulmuş)	4.711.614	2.241.993
		Üzüm; sultani (kurutulmuş)	535.476	1.015.025
		Toplam	5.563.605	3.622.275
	2007	Üzüm; diğerleri (taze) sofralık	378.183	499.748
		Üzüm; korint (kurutulmuş)	2.468.250	1.324.315
		Üzüm; sultani (kurutulmuş)	510.122	756.313
Toplam	3.356.555	2.580.376		

2.3.2 Üzüm çekirdeğinde bulunan fenolik bileşikler

Üzüm, sahip olduğu zengin fenolik bileşiklerinden ve antioksidan aktivitesinden dolayı nütrosötik ürün pazarında önemli bir yere sahiptir. Üzümün antioksidan aktivitesi, fenolik bileşiklerin konsantrasyonu ve kompozisyonu (antosiyenin, flavonoller, flavan-3-ol gibi) ile değişmektedir. Üzümlerde fenolik bileşiklerin miktarları, çeşitli genetik, çevresel ve kültürel faktörlere bağlıdır. Üzümün fenolik kompozisyonu, fenolik bileşiklerin glikozidaz ile glikozitlerin hidrolizi, fenol oksidaz ile fenollerin oksitlenmesi ve serbest fenollerin polimerleşmesi gibi kimyasal ve enzimatik değişikliklerinin gerçekleştiği, olgunlaşmanın farklı aşamalarına göre değişebilmektedir (Doshi ve ark., 2006).

Üzümde tanımlanmış fenolik bileşikler Çizelge 2.2.'de verilmiştir.

Üzümün diğer kısımları yanında, çekirdeğinin fenolik bileşiklerin önemli bir kısmını oluşturması (%60-70), son 10 yıldır bu konunun çalışılmasının sebebidir (Hadzidimitriou ve ark, 2007). Üzüm çekirdeğinin fenolik içeriği nerdeyse bütünüyle flavan-3-ol'lardan oluşmaktadır. Çekirdekdeki toplam flavonol konsantrasyonu, kabuktakinden fazladır. İklim faktörü, bu dağılımın ana nedenidir (Monteallegre ve ark., 2006).

Vitis vinifera meyvesinden ekstre edilen flavan-3-ol monomerlerinin ve prosiyanidinlerin miktarı ve karakterizasyonu, değişik oranlarda olgunlaşmaya ve içindeki su miktarına bağlıdır. Olgunlaşma ile meyve başına düşen fenolik bileşiklerin ekstraksiyon verimi düşmüştür. Flavan-3-ol monomerleri daha hızlı bir düşüş göstermiştir. Prosiyanidinlerin ortalama polimerizasyon dereceleri değişmemiş, tiolitik bozulması düşmüştür. Meyve olgunluğu arttıkça ekstre edilen prosiyanidinlerin, asit katalizli tiolize karşı dirençleri artmıştır. Sarmaşıktaki su oranı polifenol miktarlarını etkilemiş, kompozisyondaki etkinin kültürel olduğunu göstermiştir (Kennedy ve ark., 2000).

Çizelge 2.2 *Vitis vinifera* L. meyvesinde tanımlanmış başlıca fenolik bileşikler (Shahidi ve Nacz, 2003)

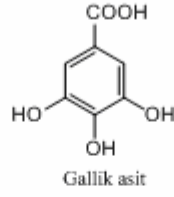
Fenolik Asitler	p-hidroksibenzoik, o-hidroksibenzoik, salisilik, gallik; sinamik, p-kumarolartarik, kafeoltartarik, ferulolartarik, p-kumarol glukoz, ferulolglukoz, koutarik asitin glukoz esteri
Antosiyaninler	Siyanidin 3-glikozit; Siyanidin 3-asetilglikozit; Siyanidin -3-p-kumarilglikozit; peonidin 3-glikozit; peonidin 3-asetilglikozit; peonidin 3-p-kumarilglikozit; peonidin 3-kafeilglikozit; delfinidin 3-glikozit; delfinidin-asetilglikozit; delfinidin 3-p-kumarilglikozit; petunidin 3-glikozit; petunidin 3-p kumarilglikozit; malvidin 3-glikozit; malvidin 3-asetilglikozit; malvidin 3-p-kumarilglikozit; malvidin 3-kafeglukozit; malvidin 3-glukozit; malvidin 3-asetilglikozit; malvidin 3-p-kumarilglikozit; malvidin 3-kafeilglikozit
Flavonoller	kamferol 3-glikozit, kersetin 3-glikozit
Flavan-3-oller ve tanenler	(+) kateşin; (-) epikateşin; (+) epigallokateşin; epikateşin-3-O-gallat; prosiyanidin B1, B2, B3, B4, C1, C2, kondanse tannenlerin polimerik formları
Flavanoller	Dihidrokersetin 3-rhamnosit; dihidrokaempferol 3-rhamnosit

Üzüm çekirdeği, flavan-3-ol oligomerleri olan, polifenol prosiyanidin (özellikle kateşin ve epikateşin) içermektedir. Dimerik prosiyanidinler en basit olanlarıdır ve 4→8 bağlı monomerlerdir. B₁, B₂, B₃ ve B₄ en yaygın prosiyanidin dimerleridir. Bunları daha az yaygın olan 4→6 bağlı B₅, B₆, B₇ ve B₈ izomerleri takip etmektedir. Prosiyanidinlerin trimerleri C₁ izomerleridir. Şekil 2.6'da üzüm kabuk ve çekirdeklerinde bulunan fenolik asit, monomerik ve dimerik proantosiyeninlerin yapısı verilmiştir (Yılmaz ve Toledo, 2004).

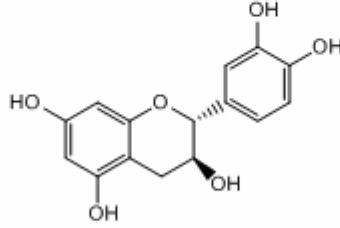
Icerik

Kimyasal yapı

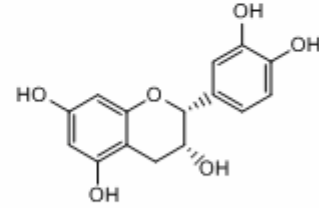
Fenolik asit



Monomerler

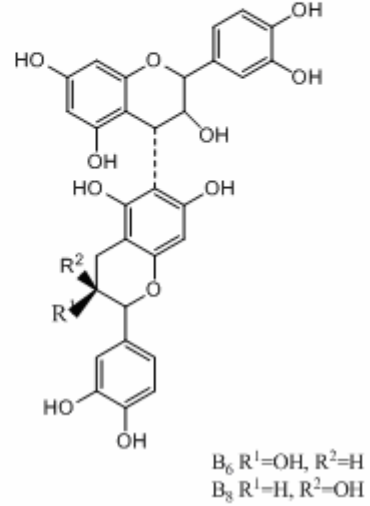
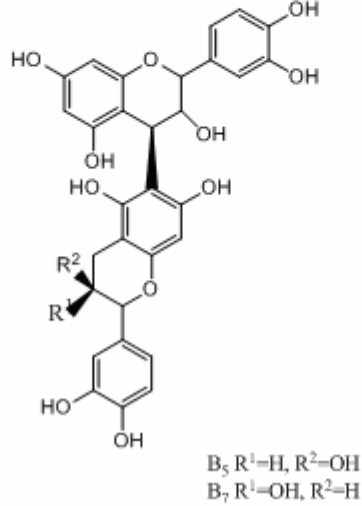
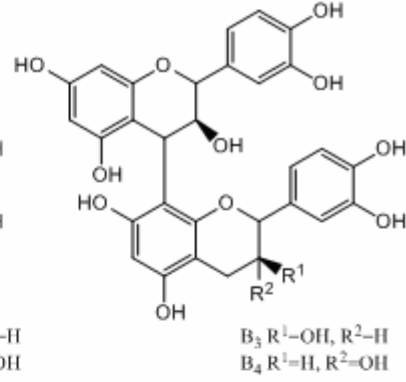
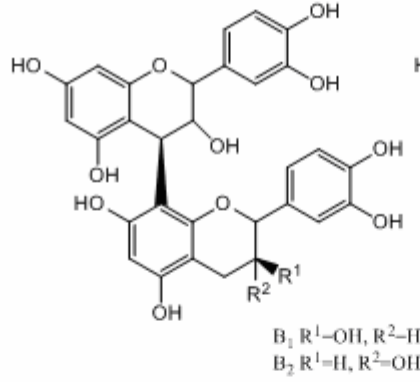


(+)- Katesin



(-)- Epikatesin

Prosiyanidin dimerleri



Şekil 2.6 Üzüm kabuk ve çekirdeklerinde bulunan fenolik asit, monomer ve dimer prosiyanidinlerin yapısı (Yılmaz ve Toledo, 2004)

2.3.3 Üzüm çekirdeği ekstresinin sağlık etkileri

V. vinifera L. üzümleri çekirdeği ekstresi yüksek veya düşük flavonol içerikleri ile farelerde ülserle karşı etki göstermiştir. Üzüm çekirdeği ekstresi ve gallik asit, normal veya programlı hücre ölümüne karşı etki göstermiştir. 5 mg/g trans-resveratrol içeren üzüm çekirdeği ekstresi, cilt yaralanmalarında ve cilt düzensizliklerine etki etmede kullanılmaktadır. Hayvan modelleri üzerinde, polimerik tanenlerin katkı olarak alınması, zararlı enzimlerin aktivitesini arttırmadan fermantasyonu gerçekleştirebilmektedir (Yılmaz ve Toledo, 2006).

Üzüm çekirdeği ekstresinin yüksek polimerik içerik gösterdikleri ve insanda bu polifenollerin absorblanabildiği, lipid (LDL) oksidasyonunu inhibe ettikleri ve yüksek kolesterollü popülasyonlarda kandaki kolesterol seviyesini önemli ölçüde düşürerek kalp ve damar hastalıklarına koruyucu etkisi olduğu ispatlanmıştır (Palomiro ve ark., 2000).

Üzümdeki resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben) varlığı, üzüm meyvesinin mantar enfeksiyonlarına ve çevresel strese karşı direnç sağlamasına yardım eder. Trans-resveratrol ilk defa *Vitis vinifera*'dan izole edilmiştir. Cis-resveratrol üzümde bulunmamış ama varlığı şarapta tespit edilmiştir. Resveratrol anti bakteriyel özellik taşır ve farelerde trombosit toplanması ile karaciğeri lipid peroksitletmesinden ve düşük yoğunluklu lipoprotein oksitlenmesinden korur (Palomiro ve ark., 2000).

Resveratrol, siyah üzümün soğuk hava koşulları, mantar enfeksiyonları gibi etkenlere bağlı olarak kendini korumak için ürettiği bir maddedir. Yapılan çalışmalardan elde edilen bulgulara göre üzümde yüksek konsantrasyonlarda tespit edilen resveratrolun vücuttaki absorpsiyonu sonucu insan sağlığı üzerine olumlu etkileri olduğu bulunmuştur. Bu etkileri şöyle sıralamak mümkündür:

- Koroner kalp rahatsızlığı riskini düşürmektedir,
- Sinir dokularını korur ve alzheimer'a karşı iyi bir koruyucudur,
- Hücre zarı için koruyucudur,
- Sinir hücrelerinin olgunlaşmasına yardımcı olmaktadır,

- Kanserin başlangıç, gelişme ve ilerleme olarak bilinen 3 aşamasında da etki göstererek insanda görülebilecek ağız, deri, kolon, böbrek, karaciğer, prostat ve meme kanseri gibi tüm kanser çeşitlerinde azalma sağlanmaktadır,
- Güçlü bir anti-enflamatuardır,
- LDL (düşük yoğunluktaki lipoprotein-kotu kolesterol) birikimini engellemekte ve kolesterolü düşürmektedir,
- Trombosit çökmesini engellemektedir,
- Yaşlanmayı düzenleyen genleri aktive etmektedir,
- Damarlardaki nitrik oksit sentezini arttırarak damarların genişlemesine yardımcı olup kan akımının rahatlamasını sağlamaktadır (Yıldız, 2007).

Üzümün çekirdeğinde bulunan diğer bir madde olan kersetin de:

- Kan yapım mekanizmasında yeri olan eritroprotein üretimini arttırarak kan yapımına katkıda bulunmaktadır,
- Tıpkı resveratrol gibi güçlü bir antioksidandır,
- Kolesterolü düşürmektedir
- Kalp hastalıkları riskini azaltmaktadır,
- Yaşlanmayı düzenleyen genlerdeki enzimleri harekete geçirerek hücre bozulmalarını yavaşlatmakta ve hücrelere kendilerini toparlamaları için zaman kazandırmaktadır,
- Serbest oksijen radikallerini temizlemektedir,
- Ksantin oksidazı ve in-vitro koşullarda lipit peroksidasyonunu inhibe etmektedir,
- Güçlü bir anti-enflamatuardır,
- Kersetin aldoz reduktaz enziminin (diabetik katarakt oluşumuna sebep verir) güçlü bir inhibitörüdür,
- İdrar kesesi tümörlerini azaltmaktadır,
- Meme, lösemi, kolon, ovaryum, mide, akciğer, andometrial kanserlerine karşı anti-kanserojen özelliğe sahiptir (Yıldız, 2007).

Katesin, kanserli dokuların gelişiminde ve büyümesinde etkin işlevi olan “ürokinaz” enzimini tutarak anti-kanserojen bir etki göstererek kanseri önlemekte,

kolesterolü düşürmektedir. Ayrıca antimikrobiyal bir madde olduğundan vücuda giren mikropları öldürme özelliğine de sahiptir.

Prosiyanidinler, damarları korumakta, yaraların iyileştirilmesinin kolaylaştırılmakta, cildi genç ve sağlıklı tutmakta; eklem, kas ve damar duvarları için çok önemli olan destek bağ dokusunun iki kritik proteini kollojen ve elastinin güçlenmesine destek sağlamaktadır (Yıldız, 2007; Aburjai ve Natsheh, 2003). Üzüm çekirdeği ekstresi yaşlanmaya karşı faydalıdır ve cildi parlatici kozmetiklerdir (Aburjai ve Natsheh, 2003).

Yapılan in-vivo çalışmalarda üzüm çekirdeği ekstresinde herhangi bir yan etki gözlenmemiştir ve üzüm çekirdeği ile geleneksel ilaçlar arasında etkileşim olduğunu gösteren bilimsel bir rapor da bulunmamaktadır. Üzüm çekirdeği ekstresi yıllardır Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da FDA (Food and Drug Administration)'nın GRAS (Generally Regarded As Safe) olarak değerlendirdiği kapsamında gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Tavsiye edilen dozajı günde 100–300 mg iken, hamile ve emziren bayanların üzüm çekirdeği ekstresinden uzak durmaları tavsiye edilmektedir (Kar ve ark., 2006).

3. BASINÇLI ÇÖZÜCÜ EKSTRAKSİYONU

Ekstraksiyon, çözeltilerden veya katı karışımlardan bir maddeyi, grubu veya istenmeyen safsızlıkları ayırmak için uygulanan bir işlemdir. Çözeltilerden ayrılması istenen madde veya grubun çözücü yardımı ile alınması sıvı-sıvı ekstraksiyonu, katı materyalden herhangi bir madde veya grubun uygun bir çözücü kullanılır ayrılması ise katı-sıvı ekstraksiyonu (*leaching*) olarak adlandırılır.

Sıvı-sıvı ekstraksiyonu karışmayan iki sıvıda çözünen bir maddenin bu iki fazdaki konsantrasyonları oranının belli bir sıcaklıkta sabit olması şeklinde tanımlanan dağılım kanunu temeline dayanır. Katı-sıvı ekstraksiyonunda ise, ayrılması istenen maddenin belirli sıcaklık ve basınçta iki fazdaki denge derişimlerinin farklı olmasından yararlanır.

Katı-sıvı ekstraksiyonunda kullanılan çözücü katı veya granül haldeki materyal ile temas ettiğinden hücrelerden içeri girerek, çözülebilir kısmı bünyesine alır ve difüzyon yoluyla hücreden dışarı çıkar.

3.1 Bitkisel Materyallerin Klasik Çözücü (Katı-Sıvı) Ekstraksiyonu

Katı-sıvı ekstraksiyonu çözünenin, katıdan onu çevreleyen sıvı çözücüye difüzyon ile transferine dayanmaktadır. Bu çoğu endüstriyel sürecin önemli bir kısmını oluşturmaktadır.

Katı materyalden istenilen bir maddeyi ayırmak için belli çözücüler kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemidir. Katı-sıvı ekstraksiyonunda katı içinde bulunan bir madde, bu maddeyi büyük ölçüde çözebilen bir sıvı yardımı ile alınır. Fazlar ayrıldıktan sonra herhangi bir yoldan uzaklaştırılması ile katı içindeki istenilen madde ekstre edilmiş olur.

Bitkisel materyalden etkili bileşiklerin katı-sıvı ekstraksiyonunda iki fiziksel proses aynı anda gerçekleşir:

- Boyut küçültme ile parçalanmış hücrelerin çözücü tarafından yıkanarak hücrelerdeki çözünebilir maddelerin kolayca çözeltilmeye geçmesi,

- Parçalanmayan hücrelerdeki çözünebilen maddelerin difüzyonla çözeltiliye geçmesi

Parçalanmış hücrelerin çözücü tarafından ekstre edilmesi oldukça hızlı olacağından ekstraksiyon süresi de oldukça kısadır. Fakat saflaştırma kademesinde zorluk çıkabilir. Parçalanmamış hücrelerin ekstraksiyonunda ise çözücü özellikle difüzyonla hücre içerisine girer, çözünebilen maddeleri çözer ve çözeltili içerisindeki çözünebilen maddeler yine difüzyonla dışarıya çıkar. Bu süreçte difüzyonla kütle transferi çok yavaş olduğundan ekstraksiyon hızı da oldukça yavaştır. Fakat istenmeyen maddelerin çözeltiliye geçmesi de bir önceki ekstraksiyon prosesine göre çok daha azdır.

Katı-sıvı ekstraksiyonunda itici güç, ekstraksiyon işlemine tabi tutulan maddenin içerisindeki ekstre edilecek madde konsantrasyonunun ile bu maddenin ekstre çözeltili içerisindeki konsantrasyonu arasındaki farktır. Bu fark ne kadar büyük olursa ekstraksiyon hızı da o kadar yüksek olur (List ve Schmidt, 2000; Kalender, 2002; Mc Cabe ve ark., 1993; Shing ve Rizvi, 1995; Wan ve Wakelyn, 1997).

3.1.1 Ekstraksiyona etki eden parametreler

Ekstraksiyon işlemine etki eden en önemli parametreler, çözücü seçimi, sıcaklık, parçacık boyutu, ekstraksiyon süresi

Ekstraksiyonda kullanılacak çözücülerde olması gereken özellikler şöyle sıralanabilir:

- Ekstre edilecek bileşenler için seçici olması,
- Doygunluk derişiminin yüksek olması,
- Viskozitenin ve yüzey geriliminin düşük olması,
- Kaynama noktasının düşük, donma noktasının 0°C'nin altında olması,
- Yoğunluğunun düşük olması,
- Enerji ekonomisi bakımından, spesifik ısısının düşük olması,
- Korozif, toksik ve patlayıcı olmaması,
- Taşınması, depolanması ve kullanılması kolay olmalıdır.

Su yukarıdaki özellikleri sağlayan ve en çok kullanılan çözücü olmakla birlikte, bazı bitkisel hammaddeler için etilalkol, aseton, petrol eteri, hekzan, kloroform gibi organik çözücüler de sık sık kullanılır.

Çözücünün en önemli özelliklerinden biri, çözücünün moleküler yapısına bağlı viskozitesidir. Derişimi hammaddenin derişiminden az olan her çözücü, ekstre edilecek maddenin hammaddeden difüzyonla alınmasında etkindir. Fakat belirli bir derişim üzerindeki çözeltinin tekrar çözücü olarak kullanılması uygun değildir. Çünkü çözelti ile ekstre edilecek madde derişimleri farkının azalması yanında çözücü viskozitesi artmış ve difüzyon katsayısı düşük bir değere inmiş olur.

Gerek ekonomik gerekse sağlık sebepleri nedeniyle çözücü, ekstrat ve rafinant fazdan arındırılmalıdır. Çözücüyü uçucu olmayan katılardan ve katı rafinanttan ayırmada tipik olarak buharlaştırma, kurutma işlemleri kullanılır. Ancak düşük buharlaştırma ısısı istenir. Çözücüyü uçucu karışımdan ayırmak için distilasyon uygulanır. Bu durumda çözücü azeotrop oluşturulmamalı ve ideal olarak en uçucu bileşenin ürün içindeki kütle fraksiyonu ve buharlaşma ısısı düşük olmalıdır.

Hammade ile çözücü temas ettirildiğinde çözücü ile hammaddenin ekstre edilecek madde cinsinden derişimleri farklı olduğundan ekstre edilecek madde bu derişim farkını giderecek yönde ortam değiştirir. Bu da bir difüzyon olayı olduğundan, küçük parçacık boyutlu hammaddeler ile çözücünün teması ekstraksiyonun ilk anlarında çabuk olacak ve kısa zaman aralığında çözünen madde miktarı fazla olacaktır.

Sıcaklık arttıkça ekstraksiyon verimi genellikle artar. Sıcaklığın artışı, ekstre edilecek madde ve çözücünün viskozitesini azaltıcı etkisinin yanında çözünürlüğün artmasına neden olur. Herhangi bir ekstraksiyon ortam sıcaklığının kullanılan çözücünün kaynama sıcaklığına bağımlı bir üst sınırı bulunmaktadır. Çünkü ekstraksiyon ortamının sıcaklığı, çözücünün kaynama sıcaklığına yaklaştıkça çözücü buharlaşması artacağından ekstraksiyon için yararlı çözücü miktarı azalır. Bunun için uygulamada ekstraksiyon ortamının sıcaklığı kullanılan çözücünün kaynama sıcaklığından 10–12°C daha düşük tutulur.

Nem, ekstraksiyon işleminin tamamında önemli bir faktördür. Nemin ekstraksiyon hızına etkisi henüz açıklığa ulaşmamış olmasına rağmen fazla nem proteinlerin fazla şişmesine bağlı olarak çözücünün difüzyon yollarının kapanmasına neden olabilir.

Ekstraksiyon sırasında kullanılacak çözücü/katı oranı çalışılan hammaddeye, hammaddenin işleme hazırlanma tekniğine ve kullanılan ekstraktör tipine göre farklılık gösterir. Yüksek çözücü/katı oranı, daha fazla maddeyi çözmesine rağmen son çözeltilinin düşük derişimlerde elde edilmesine neden olur. Bu ise çözücü geri kazanımı sırasında daha çok çözücünün buharlaştırılmasını ve daha fazla enerji kullanılmasını gerektirir.

Ekstraksiyon süresi hammaddenin çözücü ile temas ettikleri süredir. Partikül içindeki çözücü ile dışındaki çözücü dengeye ulaşması için partikül ile her bir kademedeki çözücü arasındaki yeterli temas süresi sağlanmalıdır (List ve Schmidt, 2000; Kalender, 2002; Mc Cabe ve ark., 1993; Shing ve Rizvi, 1995; Wan ve Wakelyn, 1997).

3.1.2 Bitkisel materyallere laboratuvarında uygulanan ekstraksiyon teknikleri

Geleneksel yöntemler maserasyon, kinetik maserasyon, perkolasyon, geri döngülü sürekli ekstraksiyon (Soxhlet) ve süperkritik akışkan ekstraksiyondur (Kauffman ve Christen, 2002).

Maserasyon; bitkisel materyalin bir süre uygun çözücü içinde statik bir işleme oda sıcaklığında bekletilmesidir. Kinetik maserasyon ise hammaddenin çözücü içinde karıştırılmasıyla yine oda sıcaklığında gerçekleşen bir ekstraksiyon işlemidir. Maserasyon çok yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (List ve Schmidt, 2000).

Perkolasyon; cam, porselen, bakır, paslanmaz çelik gibi maddelerden yapılmış perkolatör denen çeşitli büyüklükteki sütun veya tanklarda uygulanır. Hammaddenin içinden sürekli olarak çözücü geçirilmesi esasına dayanarak uygulanan ekstraksiyon yöntemidir (List ve Schmidt, 2000).

Geri döngülü devamlı ekstraksiyon Soxhlet uzun bir süredir kullanılan, standart bir tekniktir ve diğer katı-sıvı ekstraksiyon metotlarının performansını belirlemede referans olarak kullanılır (Wang, 2006). Döngüsel bir soxhlet sisteminde, bitki hazne içine yerleştirilir ve bir balona çözücü konur ve ısıtıcıya yerleştirilir. Kaynama başladığı zaman çözücü çıkış borusundan çözücü buharları yükselir, soğutucuda yoğunlaşarak hammadde üzerinde birikmeye başlar. Ekstraktördeki çözücü seviyesi sifon borusu seviyesine geldiği zaman sifon gerçekleşir ve ekstre balona döner. Bu şekilde işlem ekstraksiyon tamamlanıncaya kadar belli miktar çözücü ile devam eder distilasyon kolonundan gelen yoğunlaşmış taze çözücü ile doldurulur (Hasbay, 2006).

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu (SFE) bitkilerden uçucu bileşenlerin, esansiyel yağların ve hoş kokulu bileşiklerinin endüstriyel çapta ekstraksiyonunda yıllardır kullanılmaktadır (Huie, 2002).

Bir maddenin, basınç-sıcaklık faz diyagramında, gaz-sıvı denge eğrisi üzerinde ileriye doğru hareket edilecek olursa, sıcaklık ve basıncı artar. Isıl genleşmeler nedeniyle, sıvının yoğunluğu azalırken; basıncın artmasından dolayı gazın yoğunluğu artmaya başlar. Giderek iki fazın yoğunlukları birbirine yaklaşır, gaz ve sıvı arasındaki farklar kaybolur ve eğri bir kritik noktaya gelir. Bu noktada madde artık “akışkan” olarak adlandırılabilir. Böylece maddenin sıcaklığı kritik sıcaklığın (T_c), basıncı ise kritik basıncın (P_c) üzerine çıkarıldığında katı, sıvı ve gaz fazlarından daha farklı, yeni bir bölge ortaya çıkar ve bu bölgedeki akışkan “süperkritik akışkan (SC)” olarak tanımlanır. Süperkritik akışkanların yoğunlukları sıvıların, viskozite ve yayınlıkları ise gazlarınkine benzemektedir. Yoğunluğun artması ile süperkritik akışkanların çözme güçleri artmakta ve gazlara göre daha fazla madde çözebilmektedir. Yayınlığının artması ve viskozitenin azalması ile süperkritik akışkanlar, katı yapıdaki gözeneklerde gazlar gibi kolayca yayınlabilmekte ve çözme güçleri artmaktadır. Gıda ve ilaç endüstrisinde, değerli ve ortam koşullarına duyarlı hammaddelerin süperkritik akışkanlarla ekstraksiyon işleminde kullanılacak akışkanın seçimi son derece önemlidir. Bu seçimde, hammaddenin akışkan içinde çözünürlüğü; kimyasal kararlılığı; ekonomik ve kolay bulunabilen bir akışkan olması ve akışkanın toksik, patlayıcı ve yanıcı olmaması gibi güvenlik sorunları göz önünde tutulmalıdır

Süperkritik bir akışkanın çözme gücü o akışkanın yoğunluğuna bağlıdır. Süperkritik CO₂'in yoğunluğu, kritik sıcaklık ve basınç değerlerine yakın bölgede basınç ve sıcaklıkla belirgin bir şekilde değişmektedir: CO₂'in çözme gücünü etkileyen diğer bir parametre de polaritesidir. CO₂'in polar özeliği, zayıf polaritedeki çözücülerle benzemektedir ve bu nedenle apolar çözücüler grubunda yer alır; ancak karbonun dört kutuplu moleküler yapısı nedeniyle alkoller, esterler, aldehitler gibi organik polar maddeleri sınırlı oranda da olsa çözebilmektedir (Çalınlı, 2003).

3.2 Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu (Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu-ASE)

Basınçlı sıvı ekstraksiyonu (BSE), sıcaklığın artmasıyla çözünürlüğün artması ve sıvıların çeşitli matrislere yüksek basınçta olduklarında daha iyi penetre olması avantajına sahip, katılar ve yarı katı hammaddeler için geliştirilmiş bir ekstraksiyon tekniğidir. Basınç artışı çözücülerin atmosferik basınçtaki kaynama noktalarının üstündeki sıcaklıkların kullanımını sağlar. Bu teknik katıdan istenilen bileşiklerin, süperkritik koşullarda, yüksek sıcaklık (50 ve 200°C) ve basınçta (10–15MPa) organik çözücü sistemi ile ekstre edilmesi prensibine dayanır (Richter ve ark, 1998; Brachet ve ark, 2001; Majors, 2007).

BSE, mevcut ekstraksiyon tekniklerinden olan Soxhlet, maserasyon ve perkolasyona göre ekstraksiyon süresi, çözücü tüketimi, ekstraksiyon verimi ve tekrarlanabilirlik açısından daha avantajlı bir yöntemdir.

Çözücülerin kritik noktalarına ulaşmadan yüksek basınç ve yüksek sıcaklıkta ekstraksiyon işleminin gerçekleştirildiği bu teknik literatürde ;

- Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu ,
- Basınçlı çözücü ekstraksiyonu,
- Basınçlı akışkan ekstraksiyonu,
- Basınçlı sıcak çözücü ekstraksiyonu
- Yüksek hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu
- Yüksek basınç yüksek sıcaklıkta çözücü ekstraksiyonu
- Subkritik çözücü ekstraksiyonu

gibi isimlerle anılmaktadır. Bu teknikte çözücü olarak su kullanıldığı zaman ise;

- Subkritik su ekstraksiyonu,
- Sıcak su ekstraksiyonu,
- Basınçlı sıcak su ekstraksiyonu,
- Yüksek sıcaklıkta su ekstraksiyonu,
- Süperısıtılmış su ekstraksiyonu

gibi isimler almaktadır.

BSE tekniğinin geleneksel çözücü ekstraksiyon tekniklerine üstünlüğü; uygulanan basınç sayesinde çözücünün kaynama noktası sıcaklığı üzerinde de sıvı kalabilmesi ve yüksek sıcaklıklarda ekstraksiyon yapılabilmesidir. Yüksek sıcaklık ve basınç ile sağlanan bu koşullar ekstre edilecek bileşiklerin çözünürlük ve katı matristen desorpsiyon kinetiğini artırmaktadır. Bu özellik günümüzde, süperkritik koşulların altında çevre dostu çözücülerin (su, etanol gibi) kullanımının yaygınlaşmasına neden olmaktadır (Herrero ve ark, 2005).

Sıvı çözücünün yüksek sıcaklık ve basınçta kullanılarak, oda koşullarındaki veya atmosferik koşullara yakın ekstraksiyonlara oranla daha iyi sonuç vermesinin iki sebebi vardır:

- Çözünürlük ve kütle transferi etkileri
- Yüzey dengesinin dağılımı

Yüksek sıcaklık çözücülerin bileşikleri çözme kapasitesini arttırmaktadır. Buna ek olarak da, organik çözücülerde suyun çözünürlüğü sıcaklığın artmasıyla artmaktadır (Richter, 1996).

Yüksek sıcaklık, hücre duvarlarının daha geçirgen olması, ekstre edilecek bileşiklerin çözünürlük ve difüzyon katsayılarının artması ve katı matriks boyunca penetrasyonu sağlayacağı için çözücü viskozitesini düşürmesinden dolayı ekstraksiyon verimini arttırmaktadır. İdeal çözeltilerde, sıcaklığın 50°C'den 150°C'ye çıkması, çözünürlüğü 13 kat arttırmaktadır. Sıcaklığın 25°C'den 150°C'ye çıkması, difüzyon katsayılarında 2–10 kat arasında artmaya neden olmaktadır. Taze çözücü beslenmesi, hücre içindeki çözücü ile örnek matriks arasındaki konsantrasyon farkını artırır. Fick'in 1. difüzyon yasasına göre,

konsantrasyon farkının artması, kütle transfer hızını arttırmaktadır (Hasbay, 2006; Richter, 1996).

Yüksek sıcaklık Van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağları ve dipol-dipol etkileşimlerinden oluşan kuvvetli çözünen-matriks etkileşimlerine zarar vermektedir. Çünkü termal enerji çözünen madde ve matriksin aktif kısımları arasında ayrılma süreci için gerekli aktivasyon enerjisini düşürerek kohezyon (çözünen-çözünen) ve adhezyon (çözünen-matriks) etkileşimleri bitirmektedir. Yüksek sıcaklık, sıvı çözücülerin viskozitesini düşürerek matriksten daha iyi penetrasyonu sağlayarak ekstraksiyonu hızlandırır. Artan sıcaklık çözücünün yüzey gerilimini düşürmekte ve çözücünün örnek matriksini daha iyi ıslatmasını sağlamaktadır (Richter, 1996; Handley, 1999).

Ekstraksiyonlar, çözücünün sıvı formda kalması için basınç ve kaynama noktasının hemen altında sıcaklıklarda gerçekleştirilmektedir. Sıcaklığı kaynama noktası altında kullanabilmek için ekstraksiyon sırasında yeterince basınç uygulanmalıdır. Yüksek basınç kullanılması (yüksek sıcaklık ve düşük çözücü yüzey gerilimi ile), çözücü, katı içindeki ekstre edilecek bileşiğe temas etmek için, boşluklara doğru itmektir. Yüksek basınç, çözünme hızını arttırmaktadır. Bu basınç altında sıvının taşınabilmesi için sıkıştırılmış azot kullanılmaktadır (Zhang ve ark., 2007; Brachet ve ark., 2001; Richter, 1996).

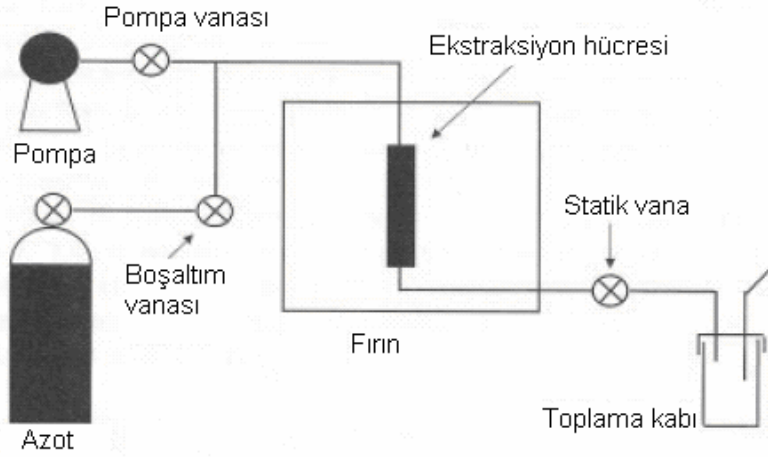
Basınçlı sıvı ekstraksiyonunda fenolik asitlerin çok hassas olduğu iki faktörden korunma mevcuttur; inert bir atmosferde ve ışıktan koruyarak ekstraksiyonlar gerçekleştirilmektedir (Santos-Buelga ve Williamson, 2003).

Örnekteki su veya hava, gözenekleri tıkayarak çözünene girişi engeller, böylece çözücü bu çözünene temas kuramaz ve ekstraksiyonu gerçekleştiremez (Hasbay, 2006).

3.2.1 Analitik ölçekte basınçlı sıvı ekstraktörü

Şekil 3.1'de BSE cihazının şematik bir gösterimi bulunmaktadır. BSE, ekstraksiyon prosedürü olarak; içinde örnek bulunan ısıtılmış bir ekstraksiyon hücresinden çözücünün statik ve dinamik akışın birlikte tatbikinden oluşmaktadır. Bu hücreler sistemin basınç gereksinimlerini karşılayacak yapıda, genellikle

paslanmaz çelikten yapılan, kapakları katı örneği içinde tutarken çözücünün de içinden geçmesine olanak sağlayan delikli bir yapıdadırlar. Bu delikler asla katı matriks parçacıklarının (tipik 5–10 µm) içinden geçmesine izin vermemelidir. Tek kullanımlık filtreler hücre çıkışlarında kullanılarak, çözücünün geçmesini sağlar ve ince taneciklerin delikleri tıkamasını engeller. Hücre, çözücü akış yolunun arasında bulunur, böylece çözücü hücreye dolabilmektedir. Çözücü ile katı matriks arasında iyi bir temas sağlanabilmesi için hücredeki boşlukların çözücüyle dolduğundan emin olmak ve yüksek sıcaklıklarda oksijenin varlığında oluşabilecek olası bileşiklerin oksidasyonundan da kaçınmak gereklidir (Handley, 1999).



Şekil 3.1 Basınçlı sıvı ekstraksiyonunun şematik gösterimi (Handley, 1999)

Hücre sabit bir ısı kaynağına olan temasla ısıtılmaktadır. Hücreyi çözücü geçmeden ısıtmak, uçucu bileşiklerde kayba sebep olur. Ekstraksiyon sıcaklığının etkisi doğru bir şekilde gözlenmek isteniyorsa, hücrenin içinin ısı kaynağı tarafından termal bir dengeye ulaştırılması gereklidir. Isıtma için geçen süre, ısı kaynağı ile hücrenin temas düzeyi, hücre duvarının ısı transfer karakteristikleri ve ayarlanmış sıcaklığa bağlıdır. 100°C’de bir ekstraksiyon için, 2mm çapında paslanmaz çelik bir hücre içindeki örneği ısıtmak için 5 dakika yeterlidir. Ekstraksiyon çözücüsünü kendi sıcaklığında tutabilmek için bir basınç kaynağı gereklidir. Basınç, set edilmiş sıcaklıkta çözücünün sıvı fazda kalması için gerekli

değer sınırları üstünde olmalı ve çözücüyü hücreden kabul edilebilir bir zamanda geçirmelidir. Bunun için, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) tipi, 1000–3000psi (6.9–20.7MPa) sabit akışkan basıncını sağlayan pompalar kullanılmaktadır. Sistem akışı üzerinde örnek içeren hücre yer alması ile bu sistemin temel konfigürasyonu YBSK sistemine benzemekte ve pompa kullanılarak sıvı çözücünün doldurulmuş bir yatak üzerinden (granüle örnek) hareket ettirilmesi sağlanmaktadır (Handley, 1999).

Isıtma işlemi, 500–3000psi arasında çözücünün genleşmesini sağlamak ve ekstraksiyon hücresi içinde basınç oluşturmaktadır. Hücredeki fazla basıncın önlenmesi için, hücre basıncı ayarlanan noktayı aştığında statik bir vana otomatik olarak açılır ve kapanır. Bu açma-kapama işleminden dolayı, hücreden kaçan çözücü bir kapta toplanır. 5–10 dakikalık bir statik ekstraksiyon basamağı ardından, örneği ve hatları yıkamak için taze çözücü basılmaktadır. Sistemdeki tüm çözücü genellikle azot olan sıkıştırılmış bir gaz ile boşaltılır, toplam çözücü hacmi (ekstre edilen ve yıkanan) bir kapta toplanır (Kaufmann ve Christen, 2002).

İşlemin son basamağında azotun ekstrenin üzerinden geçmesi ile çözücüde bir miktar uçuculaşma oluşabilir ve sistem bir bacadan dışarı veya gerekliyse başka bir cihaza salınabilir. Toplama kapları, uçucu organik analizler için uygun olan 40–60 ml boyutlarında, Teflon kaplama septa ile kapalıdır. Bir ısı kaynağı yanında potansiyel yanıcı çözücülerle çalışırken çözücü sızıntılarından kaçınmak için gerekli özen gösterilmeli ve basınç bağlantıları düzenli olarak kontrol edilmelidir. BSE, hücrenin tepesinden dibine doğru bir akışkan akışıyla gerçekleşmekte ve sıvıyı sıkıştırılmış gazla yıkama da aynı düzende olmaktadır, ancak akış yönü kritik bir parametre değildir. Sistem yüksek sıcaklıklarda çalıştığından, tutuşma sıcaklıkları düşük çözücülerden (CS₂) uzak durulmalıdır (Handley, 1999).

BSE’de kullanılan çözücüler çoğu zaman organik çözücülerdir. Basınçlı su veya süperkritik altı su aynı zamanda BSE düzeneğinde kullanılabilir ve sıcak su ekstraksiyonu veya süperkritik altı su ekstraksiyonu olarak adlandırılmaktadır (Wang ve ark., 2006).

CO₂ ve su gibi zehirli olmayan ekstraksiyon çözücülerini kullanımı ekonomik ve çevresel olarak da faydalıdır. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu,

nutrosötiklerin ekstraksiyonu için yeni çıkmış yararlı bir ekstraksiyon tekniğidir. Ancak polar maddeleri çözebilmek için, karbondioksite ilaveten önemli bir miktar polar değiştirici kullanılmalıdır. Basınçlandırılmış sıvı ekstraksiyonu, polar bileşikleri ekstre edebilmek için süperkritik ekstraksiyona alternatif bir teknik olarak çıkarılmıştır. Soxhlet ekstraksiyonu ile karşılaştırıldığında, BSE’de çözücü miktarında ve ekstraksiyon zamanında önemli bir düşme olmaktadır (Wang ve ark., 2006).

BSE genellikle yüksek sıcaklık ve basınçta çevresel ortamdaki kararlı organik kirleticilerin ekstraksiyonunda kullanılmaktadır. Nutrosötikler alanında yapılmış birkaç uygulama yayınlanmıştır (Wang ve ark., 2006).

Piņeiro ve ark. (2004) üzüm çekirdeği ve çay yapraklarındaki kateşin ve epikateşin ekstraksiyonu için basınçlı sıvı ekstraksiyon tekniğini kullanmıştır. Manyetik karşıtıcı, ultrases destekli ekstraksiyon ve basınçlandırılmış sıvılarla ekstraksiyondan elde edilen geri kazanımlar karşılaştırılmıştır. Tüm ekstraksiyon tiplerinde dört farklı çözücü sistemi (su, metanol, etanol ve etilasetat) kullanılmıştır. Metanol en iyi sonuçları vermiştir. Bu karşılaştırma için, yüksek sıcaklıklarda (100–200°C), basınçlandırılmış sıvılarla çalışırken kateşin kararlılığını kontrol eden bir ön basamak yer almıştır. 130°C ve üstünde iki bileşikten de geri kazanımlar %95’in altına düşmüştür. Metanol kullanılmış basınçlandırılmış sıvı ekstraksiyonundan geri kazanılmış kateşin ve epikateşin diğer ekstraksiyon çeşitlerinden geri kazanımlara göre fazladır.

3.2.2 Basınçlandırılmış sıvı ekstraksiyonu metot geliştirme

i. Örnek hazırlama

Örnek partiküllerinin etkileşimi verimli bir ekstraksiyonu engelleyebilmektedir. Bu gibi durumlarda, örneği inert bir malzemeye örneğin kum veya diatomik toprak ile dağıtmak, ekstraksiyona yardımcı olmaktadır. Dispersiyon aynı zamanda ekstraksiyon hücresi çıkışını tıkayabilecek örneklerle çalışırken de yardımcı olmaktadır. Bu örnekler çoğunlukla çok küçük tanecik

boyutlarına sahiplerdir ve yüksek basınç altında birbirlerine sıkıca yapışabilirler. BSE’nda deniz kumu dispersiyon edici olarak kullanılması tavsiye edilmez. Çünkü bu madde sistem tubinglerini tıkayabilecek küçüklükte partiküller içermektedir. Dispersiyon ajanı kullanılıyorsa, periyodik olarak kör ekstraksiyonlar yapmak malzemenin temizliğini sağlayacaktır (Handley, 1999).

ii. Öğütme

Ekstraksiyonun verimli olabilmesi çözücünün hedef bileşen/bileşen grupları ile temasının olmasını gerektirir. Bir örnekte yüzey alanının artmasıyla bu hızlanmaktadır. Büyük partikül boyutlu örnekler ekstraksiyondan önce öğütülmelidir. Örnek tipine göre minimum örnek boyutu değişmekte fakat çoğunlukla 1,00mm’nin altında olmalıdır. Öğütme geleneksel havanlarda, öğütücü veya değirmenlerde yapılabilmektedir. Öğütülmüş malzemenin taşınması güç olduğundan örneğin büyük bir kısmının öğütülmesi, öğütülmüş kısımdan tartılmış bir porsiyonu ekstraksiyonda kullanılmalıdır (Handley, 1999).

iii. Dispersiyon (Dağılma)

Örnek partiküllerinin etkileşimi verimli bir ekstraksiyonu engelleyebilmektedir. Bu gibi durumlarda, örneği inert bir malzemeyle örneğin kum veya diatomik toprak ile dağıtmak, ekstraksiyona yardımcı olmaktadır. Dispersiyon aynı zamanda ekstraksiyon hücresi çıkışını tıkayabilecek örneklerle çalışırken de yardımcı olmaktadır. Bu örnekler çoğunlukla çok küçük tanecik boyutlarına sahiplerdir ve yüksek basınç altında birbirlerine sıkıca yapışabilirler. BSE’nda deniz kumu dispersiyon edici olarak kullanılması tavsiye edilmez. Çünkü bu madde sistem borucukları tıkayabilecek küçüklükte partiküller içermektedir. Dispersiyon ajanı kullanılıyorsa, periyodik olarak kör ekstraksiyonlar yapmak malzemenin temizliğini sağlayacaktır (Handley, 1999).

iv. Kurutma

Birçok örnek su içermekte ve bu da organik çözücülerin katı matris içindeki ekstre edilecek bileşiklere ulaşımını engelleyebilecek bir alan oluşturmaktadır. Islak örneklerle ekstraksiyonu gerçekleştirmek için polar çözücüler (aseton, metanol gibi) veya çözücü karışımları (hekzan/aseton, metilklorit/aseton) kullanılabilir fakat en örneği ekstraksiyondan önce kurutmak en etkili yoldur. Kurutma normalde, doğrudan sodyum sülfat, diatome toprağı veya selüloz gibi materyaller eklenerek yapılmaktadır. Kurutma maddesinin seçimi doğrudan kullanıma bağlıdır. Sodyum sülfat toprak ve sedimentler için, peletlenmiş DE ıslak dokulu örnekler için iyi birer seçenektir. Selüloz meyve veya sebze gibi çok ıslak ve yumuşak matrislere uygulanabilir. Yüksek sıcaklıklarda erimesinden dolayı magnezyum sülfatın BSE’de kullanılması uygun değildir. Sodyum sülfat yüksek sıcaklıklarda çözüneceğinden etanol veya diğer polar çözücülerle kullanılmamalıdır. Fırında kurutma veya dondurarak kurutma ekstraksiyon öncesi örneklerin kurutulması için diğer uygun alternatiflerdir fakat bu prosedürlerde uçucuların geri kazanımı söz konusu olmaktadır (Handley, 1999).

3.2.3 Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu parametreleri ve fenolik bileşiklerin BSE ekstraksiyonu

i. Çözücü

Etkili bir ekstraksiyonun oluşabilmesi için; çözücü, örneği bozmadan hedef bileşeni çözebilmelidir. Ekstraksiyon çözücüsünün polaritesi hedef bileşenle büyük oranda uyuşmalıdır. Değişik polaritede çözücülerden oluşan karışımlar, geniş polarite aralığında bileşikleri ekstre etmekte kullanılmaktadır. Genellikle döngüsel prosedürde iyi çalışan bir çözücü, BSE’nda da iyi çalışır. Daha önce yapılan analitik ekstraksiyon tekniğine kıyasla ekstre konsantrasyonu (çözücü uçuculuğu) ve çözücü maliyeti dikkate alınmalıdır. Çoğu BSE metodu belirli bir sınıf bileşen için çözücü veya çözücü karışımlarını önerirken, belirli

laboratuvarların ihtiyaçlarına uygun alternatifler olabilir. evre koşullarında farklı davranan özücüler BSE koşullarında yeterli davranış sergileyebilmektedir. Su ve tampon sulu karışımları içeren çoğu sıvı özücü BSE de kullanılabilir. Kuvvetli asitlerin (HCl, HNO₃, H₂SO₄) kullanılması çoğu sistemde paslanmaz çelikle etkileşime girebileceği için tavsiye edilmemektedir. Asidik koşullar istendiğinde asetik, fosforik asit gibi kullanılmalı ve sulu ya da polar çözücülere %1–10 oranında eklenmelidir (Handley, 1999).

Chäfer ve ark. (2001) üzüm çekirdeğinde %40 fiber, %16 yağ, %11 protein ve %7 kompleks fenolik bileşikler ve ilaveten şekerler, mineral tuzları vs. yer aldığını göstermişlerdir. Bazı araştırmacılar üzüm çekirdeğinden yağın süperkritik ekstraksiyon ile elde edilmesini çalışmışlarsa da üzüm çekirdeği kompleks fenolik bileşikler için önemli bir kaynaktır. Çok çeşitli doğal fenolik bileşikleri içermekte ve bunlardan da önemli bir alt grubu prosiyanidinler oluşturmaktadır. Üzüm ekirdeđinden fenolik bileşiklerin izolasyonu için genel metot metanol, etanol ve aseton gibi organik çözücüleri kullanmaktır. Metanol-su ve aseton-su karışımları uygulandığında ekstraksiyon geri kazanımları çoğalmaktadır.

Ju ve Howard (2003) dondurulmuş bol pigmentli kırmızı şarap üzümün kabuğundan antosiyaninleri ekstre etmede BSE kullanmıştır. Altı adet çözücü; deiyonize suda % 0,1 HCl (asitlendirilmiş su, pH 2,3); % 60 etanolde % 0,1 HCl (asitlendirilmiş etanol, pH 2,2); % 60 metanolde % 0,1 HCl (asitlendirilmiş metanol, pH 2,3); 40:40:20 metanol/aseton/su çözücü karışımında % 0,1 HCl (pH 1,9); % 70 metanolde %7 asetik asit (pH 2,0) ve % 70 metanolde % 0,1 trifloroasetik asit (pH 2,1), 50°C'de, 10,1 MPa'da 3 x 5 dakika ekstraksiyon döngü ile kullanılmıştır. Sıcaklık 20°C'den 140°C'a 20°C artışlarla antosiyanin geri kazanımı üzerindeki etkisi ve ayrıca asitlendirilmiş su ve asitlendirilmiş % 60 metanolde geri kazanım araştırılmıştır. Asitlendirilmiş metanol, en yüksek monoglikozitler ile toplam antosiyanini, çözücü karışımı (40:40:20 metanol/aseton/su %0,1 HCl ile) en yüksek toplam fenol ve toplam açillenmiş antosiyanini ekstre etmiştir. Toplam antosiyanin ekstraksiyonu için optimum sıcaklık asitlendirilmiş su için 80–100°C, % 60 metanol için 60°C olarak

belirlenmiştir. Sonuç olarak, üzüm kabuğundan antosiyaninleri ekstre etmede yüksek sıcaklıkta BSE’de asitlendirilmiş su kullanmak verimlidir.

Prosiyanidinlerin bitki materyalinden analitik ve preparatif amaçlarla ekstraksiyonunda metanol, etanol, aseton ve bunların sulu çözeltileri kullanılmıştır. Aseton-su karışımı kullanılması, prosiyanidinlerin ekstraksiyonunda bu amaçla kullanılan diğer çözücülere göre daha iyi verim vermektedir (Pekic ve ark., 1998).

Prosiyanidinlerin ekstraksiyonunda, metanol, etanol, asitlendirilmiş metanol, aseton, su ve bunların kombinasyonları kullanılmıştır. Aseton-su (70/30, v/v) sistemi prosiyanidinlerin kolza, kanola ve bezelyeden ekstraksiyonu için en iyi çözücü olduğu kanıtlanmıştır. Üzüm kabuğu ve elmadan prosiyanidinlerin ekstraksiyonu için aseton-su (60/40, v/v) kullanılmıştır (Naczek ve Shahidi, 2004).

ii. Sıcaklık

Sıcaklık BSE’de kullanılan önemli bir parametredir. Yüksek sıcaklığın bileşenlerin çözünürlüğünü ve ekstraksiyon hızını arttırdığı, viskozite ve yüzey gerilimini düşürdüğü ve kütle transferini arttırdığı ifade edilmektedir (Bustamente ve ark., 2007). Bustamente ve ark. (2007) 40, 50, 60, 70 ve 80°C’de yapılan ekstraksiyonlar arasında önemli bir fark olmadığını gözlemlemiş ve vitaminlerin 50°C üzerinde kararsız olmalarını da göze alarak optimum sıcaklığı 50°C olarak belirlemiştir. Yeni bir metot geliştirirken 100°C’de başlanması tavsiye edilir veya hedef bileşenin bu bilinen bir bozulma noktası varsa bu seviyenin 20°C altında başlanmalıdır. Çoğu BSE uygulamaları 75–150°C aralığında çalışır. Sıcaklık artışı sadece bileşen geri kazanımını değil aynı zamanda tekrar üretilebilirliği de artırır. Ekstre edilecek bileşiğin veya matriks bozulma noktasına kadar sıcaklığın artmasının genellikle ekstraksiyon üzerinde olumlu bir etkisi vardır. Bu problemler genellikle BSE’nin normal çalışma aralıklarında gözlenmezler. Düşük sıcaklıklarda erimeye meyilli matrikslerde, ekstraksiyon hücresinin içine yükleme ve boşaltmayı kolaylaştırmak için selülozdan ekstraksiyon yüzükleri konulmaktadır (Handley, 1999).

Palma ve ark. (2001) BSE sırasında ekstraksiyon çözücüsü olarak değişik sıcaklıklarda (150°C'a kadar) metanol kullanarak, fenolik bileşiklerin kararlılıklarını çalışmayı amaçlamışlardır. Sonuçlar normal atmosfer koşullarında, 65°C'deki (metanolün kaynama noktası) kararlılıklarıyla karşılaştırılmıştır. Aynı ekstraksiyon koşulları üzüm çekirdeği ve kabuklarına da uygulanmıştır. Standartlar 40, 50, 100 ve 150 °C'de ekstre edilmiştir. 150°C'de kateşin ve epikateşin haricinde diğer ekstre bileşiklerde geri kazanım %90'ın üzerindedir. Burada kateşinlerin çok oksitlenebilen bileşikler olduğu not edilmelidir. Aynı fenolik bileşiklerin çözeltileri, metanolün kaynama sıcaklığı olan 65°C'de, ekstraksiyon zamanı boyunca (45 dakika) açık kaplarda bekletilmiştir. YBSK'de analizleri yapılmış, referanslarla karşılaştırılmıştır. Bazı fenolik bileşiklerin yüksek sıcaklıkta (65°C), açık havada kolayca bozuldukları kanıtlanmıştır. Ancak azot altında yüksek sıcaklık uygulandığında bozulma gerçekleşmemiştir. Standart fenolik bileşiklerin kararlılıkları çalışıldıktan sonra, gerçek örneklerle BSE uygulanmıştır. Ekstreler YBSK'de analiz edilmiştir ve çıkan tüm kromatogramlar, ekstraksiyon sonrası eklenmiş standartları kapsamaktadır. Üzüm çekirdeği için, 50, 100, 150 °C'lerde ekstre edilen fenolik bileşiklerin benzerliği ve geri kazanım hızları arasında büyük farklılık vardır. Ekstraksiyon sıcaklığı 50°C'den 150°C'ye çıktığında kateşin kazanımı %30, epikateşin %44 oranında artmaktadır. Ekstraksiyon sıcaklığı 150°C'de iken, 50°C'dekine oranla kateşin %32, epikateşin %99 oranında artmıştır. Aynı zamanda 50 ve 100°C'de belirlenemeyen fakat 150 °C'de tanımlanan bazı bileşikler de vardır. Yüksek sıcaklığın en önemli etkisi olan bileşenler ve matriks arasındaki bağların kırılmasıdır, görünüyor ki üzüm çekirdeğindeki bağlar üzüm kabuğundan daha kuvvetlidir. Yüksek sıcaklıklarda (100°C) BSE kullanılırken, fenolik bileşik tarafından maksimum bozulma derecesinin %10 (en çabuk oksitlenen maddenin) olduğu tartışılmalıdır. Ancak bazı örneklerde geri kazanımı arttırmak için yüksek sıcaklık gerekmektedir.

iii. Partikül boyutu

Ekstraksiyon verimi üzerinde partikül boyutunun etkisi, ekstraksiyon verimini kontrol eden parametrelere bağlıdır. Polimerik partiküllerde, BSE

ekstraksiyon hızı, ekstre edilecek bileşenlerin difüzyonu ile sınırlıdır ve ekstraksiyon hızı, partikül boyutunun azalmasıyla oldukça fazla artmaktadır (Xianwen ve ark., 1997).

Yapılan çalışmada kuru fasulyeden tanen geri kazanım veriminin örneğin partikül boyutu değişikliğinden etkilendiğini kanıtlamışlardır. Minimum boyutunun 820'den 250 μ 'a düşmesi, % 0,5 vanilin metoduyla algılanabilen tanenlerin %25'den %49'a kadar düştüğünü bulmuşlardır (Shahidi ve Naczka, 2003).

iv. Katı Sıvı Oranı

Üzüm çekirdekleri şarap ve içecek endüstrisinin yan ürünleridir ve fenolik bileşikler gibi fonksiyonel gruplar için iyi bir kaynaktır. Ekstraksiyon fenolik bileşiklerin sonraki kullanımları için çok önemli bir basamaktır. Bucic-Kojic ve ark. (2007), toplam fenolik bileşik verimi üzerinde katı-sıvı ekstraksiyonunun değişik sıcaklıkları ve katı-sıvı oranları ile %50 sulu etanol ile yapılan toplam fenol ekstraksiyon kinetiğine dört değişik partikül boyutunun etkilerini incelemişlerdir. Sıcaklık, katı-sıvı oranı ve öğütme derecesi ekstraksiyon hızı ve miktarı üzerinde pozitif etkiye sahiptir. 200 dakikada gram üzüm çekirdeği başına % 1,47–6,68 toplam fenol ekstre edilmiştir.

Üzüm çekirdeğinden fenoliklerin ekstraksiyonunda en etkili metotlar araştırmacıların derin ilgisini çekmiştir. Shi ve ark. (2003) çalışmalarında sulu etanol kullanmışlardır. Etanol konsantrasyonu, sıvı-katı oranı (L/S), ekstraksiyon zamanı ve ekstraksiyon sayısı gibi tek faktörlerin etkisi çalışılmıştır. Fenolik bileşik ekstre verimi, etanolün sudaki konsantrasyonundan, etanol-su karışımının kuru çekirdeğe oranından, ekstraksiyon sıcaklığından ve zamanından etkilenmektedir. Üzüm çekirdeğindeki fenolik bileşikler suda çözünür olsalar da, etanol eklenmesi ekstraksiyon verimini arttırmakta ve %50 etanol-su karışımında maksimum ekstre elde edilmektedir. Isıtma üzüm çekirdeğinden daha fazla toplam fenolik bileşik ekstre etmesinden dolayı, fenolik bileşik konsantrasyonunu etkilemektedir. Protein ve fenolik bileşikler arasındaki güçlü etkileşimden dolayı, enzim uygulanması ekstraksiyonun artmasında önemli bir değişiklik yapmamıştır.

1,5 saatten fazla ekstraksiyon zamanı, ekstraksiyon veriminin düşmesine sebep olmaktadır. L/S oranı 7,5/1'den fazla olursa, özellikle yüksek sıcaklıklarda ekstraksiyon verimi düşmektedir. Laboratuvar ölçeğinde optimum ekstraksiyon koşullarına 65°C'de, L(%50 etanol)/S oranı 7,5/1 iken ve iki kademeli (üzüm çekirdeğinden fenolik ekstraksiyonu, her bir kademe 1,5 saat iken en iyi bulunmuştur) ekstraksiyonla ulaşılmıştır.

Yapılan çalışmada, % 70 aseton kullanarak R'yi 1/5'den 1/10'a arttırdıklarında, endüstriyel kanoladan kondanse tanenlerin ekstraksiyonunda, kondanse tanenin 257,3'den 321,3mg/100g madde'ye ve toplam fenolün 773,5'den 805,8mg/100g madde'ye arttığını bulmuşlardır (Shahidi ve Naczki, 2003).

v. Basınç

Basıncın etkisi öncelikle atmosferik kaynama noktaları üstünde çözücülerini sıvı halde korumaktır; ikincil olarak, çözücünün sistem içinde seri hareket etmesini sağlamaktır. BSE'de kullanılan basınç çözücülerini sıvı halde tutabilecek eşik değerin üstündedir (1000–3000psi, 6,9–20,7MPa), böylece çözücü değişimi için düzenleme gerekmemektedir. Basıncın değişmesi bileşen geri kazanımında çok az bir etki yapmaktadır, ekstraksiyonda kritik bir parametre olarak alınmamaktadır. Çoğu BSE'ler 1500psi (10.3MPa) standart değer olmak üzere 1000–2000psi aralığında (6,9–13,8MPa) yapılmaktadır (Handley, 1999).

Xianwen ve ark. (1997) yaptıkları çalışmada, basıncın 100bar'dan 300bar'a çıkarılmasıyla ekstraksiyon veriminde değişiklik gözlemlenmemişlerdir.

vi. Kademe

BSE, statik, dinamik veya her ikisinin birleşimi bir metodla çalışabilmektedir. Statik BSE, çözücünün dışa akışı olmadan, yüksek sıcaklık ve basınçta gerçekleştirilmektedir. Ekstraksiyon dengeye ulaştığında, bileşenler, ekstraksiyon hücresinin çözücü ve inert gaz ile yıkanması ile alınmaktadır. Dinamik BSE'de, ekstraksiyon çözücüsü, ekstraksiyon hücresi boyunca

akmaktadır. Dinamik BSE'nin avantajı ekstraksiyon sırasında çözücüyü yenilemesidir. Bu teknik, statik BSE'den daha fazla çözücü hacmine ihtiyaç duyduğundan az miktarların analizi için uygun değildir. Uygulamadan en iyi seçim statik ve dinamik ekstraksiyonun birlikte kullanılmasıdır (Xianwen ve ark., 1997).

Ekstraksiyon süreci içinde statik döngü kullanılması, istenen ekstraksiyon dengesini sağlayan, taze çözücü göndermek amacıyla geliştirilmiştir. Bu, basınç elde etmek için gerekli zahmetli akış koşullarına ihtiyaç olmadan, dinamik ekstraksiyona etkili bir yaklaşım sağlamaktadır. Bir metotta birden fazla döngü kullanılıyorsa, yıkama hacmi o sayıyla bölünür. Birinci statik zaman bittiğinde, yıkama hacminin bölünmüş diğer kısmı hücreye verilir, kullanılmış çözücü toplama kabına alınır. Sistem daha sonra ikinci statik periyotta çözücü ve örneği tutar. Nitrojenle yıkama basamağı ancak son statik zamandan sonra yapılmaktadır. Orijinal yıkama hacmi sadece bölündüğü için, ekstraksiyona ilave çözücü alınmaz. Statik döngüler, bileşen konsantrasyonunun yoğun olduğu örneklerde veya matrislerine işleminin zor olduğu örneklerde fayda sağladığı kanıtlanmıştır. Statik zaman toplam ekstraksiyon zamanını minimize etmek için ayarlanabilir. Örneğin 3 kere 3 dakika statik döngü, 10 dakikalık bir statik basamak yerine kullanılabilir. Düşük sıcaklıklarda bir ekstraksiyon yapılıyorsa (<75 °C), normalde ısıtma basamağında (statik vana basıncı düzenlemek için çalışırken) verilen taze çözücünün yokluğunu kompanse etmek amacıyla çoklu statik zamanlar kullanılmalıdır (Handley, 1999).

vii. Zaman

Belirli örnek matrisleri gözenek veya diğer yapılar içinde tutulmuş yada hapsolmuş bileşen bağları içerebilirler. İstenilen sıcaklıklarda statik süreyi artırmak, bu bileşiklerin ekstraksiyonda kullanılan çözücüye difüzyonlarına olanak tanıyabilir. Statik sürenin etkisi; en etkin ve olası şekilde komple bir ekstraksiyon sağlamak için her zaman araştırılmalıdır (Handley, 1999).

Ekstraksiyon zamanı fenolik bileşik geri kazanımını etkileyen diğer bir faktördür. Buna rağmen, uzun ekstraksiyon zamanları çözücü sistemine

indirgeyici koyulmadığında, fenoliklerin oksitlenme olasılığını arttırmaktadır (Shahidi ve Naczki, 2003).

viii. Metot validasyonu

BSE için bir metot geliştirirken aşağıdaki yaklaşımın faydalı olduğu görülür. İstenilen örnek boyutuyla en çok uyum içinde olan bir ekstraksiyon hücresi boyutu seçilir. Bu ekstraksiyon hücresi tamamen doldurulmak zorunda değildir, buna karşın tamamen dolu bir hücre kısmen doldurulan hücreye göre ekstraksiyon esnasında daha az çözücü kullanacaktır. Ekstraksiyonda kullanılan çözücü yukarıda belirtilen koşullar dikkate alınarak seçilmelidir, bununla birlikte normalde bilinen sıvı ekstraksiyonlarında kullanılan çözücü veya çözücü karışımı kullanılır. Örnek; aşağıdaki gibi standart BSE koşullarıyla başlanarak ekstre edilir: basınç, 1500psi(10.3MPa); sıcaklık, 100°C; statik süre 5dk; yıkanma hacmi, hücre hacminin %60'ı; temizleme süresi, 60 sn; döngü sayısı 1 (Handley, 1999).

ix. Seçicilik

Bir kez ekstraksiyon metodu geliştirildiğinde ve hedef bileşiklerin yeterli şekilde geri kazanıldığı gösterildiğinde, seçicilik optimize edilebilir. Ekstraksiyonda seçicilik; diğer bileşenleri geride bırakırken sadece istenilen bileşiklerin ekstre edilmesi olarak tanımlanabilir. Komple seçicilik ve sadece hedef bileşenlerin ekstraksiyonu; örnek matrikste bileşiklerin birbirlerine yakın çözünürlük karakteristiklerine bağlı olarak normalde gerçekleştirilmesi zor durumlardır. Buna karşın örnek matriksinin ve buna ait içeriklerin bilgisi dahilinde bir dereceye kadar seçicilik yakalanabilir. Ekstraksiyonda seçiciliği en çok etkileyen BSE ekstraksiyon parametreleri; çözücü seçimi ve ekstraksiyon sıcaklığıdır. Eğer verilen koşullarda hedef bileşenler, beraber-ekstre edilebilir materyallerin yüksek mertebesinde geri kazanılırsa çözücü polaritesinde bir kayma veya ekstraksiyon sıcaklığında bir azalma, kirletici materyalde azalmayla kendini gösterir. Ayrıca ekstrakt akışında istenmeyen bileşenleri tutmak için

ekstraksiyon hücresine seçici emme materyalleri eklemek de mümkündür. Bu gibi durumlarda emicinin etkisi; hedef materyallerin tutulması için test edilmelidir ve ekstre edilecek bileşen/beraber-ekstre edilebilir materyal/çözücü sistemine özgü olacaktır. Bazı durumlarda hedef bileşenlerin polaritesi ve çözünürlükleri, ekstraksiyon basamağında seçici bir izolasyon sağlamak adına beraber-ekstre edilebilir materyallerle yakından ilişkili olabilir (Handley, 1999).

Piñeiro ve ark. (2006) üzümde BSE ile trans-resveratrol ekstraksiyonunu çalışmışlardır. Bunun için, ilk aşama ekstraksiyon sırasında, bu maddenin kararlılığı 150°C'ye kadar değişik sıcaklıklarda (50, 100 ve 150°C) miktarsal belirlenmelidir. Katı-faz ekstraksiyonu ile bu maddeyi tutmak ve üzümdeki diğer karışan maddelerden ayırmak mümkündür. Geliştirilmiş metot, ekstraksiyon çemberi içinde polistren-divinilbenzen bazlı sorbente adsorblanmış örneğin (0,5gr) art arda ekstraksiyonlarından ilk 40°C' de su ile 40atm basınçta (5dakikalık 3 döngü), daha sonra 150°C'de 40atm basınçta (5 dakikalık 3 döngü) oluşur. Bu metot ile ekstraksiyon basamağı için gereken süre 40 dakikaya düşürülmüştür. Metanol ekstresinin trans-resveratrol içeriği için monolitik kolonda, floransan belirleme ile hızlı (5 dakika) sıvı kromatografisi geliştirilmiştir.

3.2.4 Basınçlı sıvı ekstraksiyonu endüstriyel yaklaşımları

BSE çeşitli matrislerden tarım kimyasalları, bir takım kirleticileri, farmasötikleri ve yağları ekstre etmekte kullanılmıştır (Benthin ve ark., 1998).

Gıda ve biyolojik numunelerin analizinde BSE tekniği iki amaç için kullanılır:

- Kontaminantların ekstraksiyonu
- Ortamdaki bileşenlerin izolasyonu (Çam, 2006).

Eskilonn ve ark (2004) çekirdek tanesi üretiminden kalan kirli tozdan böcek öldürücüleri ekstre etmede basınçlandırılmış sıcak su ve buhar kullanmışlardır. Sıcaklığın ekstraksiyon verimini ve hızını etkileyen en önemli parametre olduğu, basıncın ise çok büyük bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir.

Basınçlandırılmış sıcak su ekstraksiyonu (PHWE) sonuçları ile süperkritik akışkan ekstraksiyonu (SFE) sonuçları karşılaştırılmış ve PHWE'nin polar bileşikler için avantajlı olduğu ve bileşenin suda çözünürlüğü yeterli olduğunda düşük sıcaklıklarda da kullanılabileceği açıklanmıştır. Polar olmayan bileşikler için bileşenin ısıl karalılığı yüksek ise karbondioksit temelli ekstraksiyon tercih edildiği belirtilmiştir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

Basınçlı sıvı ekstraksiyonu tekniği ile üzüm (*Vitis vinifera* L.) meyvesi çekirdeğinden polifenolik maddelerin ekstraksiyonunun incelendiği çalışmanın ilk aşamasında çözücü, partikül boyutu, sıcaklık, zaman, katı-sıvı oranı ve döngü (kademe) sayısının ekstraksiyon verimi, fenolik bileşen (toplam fenol ve toplam prosiyanidin) verimi ve ekstrelerin antioksidan aktivitesi (DPPH serbest radikal süpürücü etki) üzerine etkisi incelenmiştir. Uygun çözücü seçimi çalışmalarından sonra, partikül boyutu (mm), sıcaklık (°C) ve zaman (dk) bağımsız değişkenleri kullanılarak 2³ düzeyinde deney tasarımı yapılmış ve bu değişkenlerin polifenolik madde saflığı ve verimi üzerine etkileri cevap yüzey yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

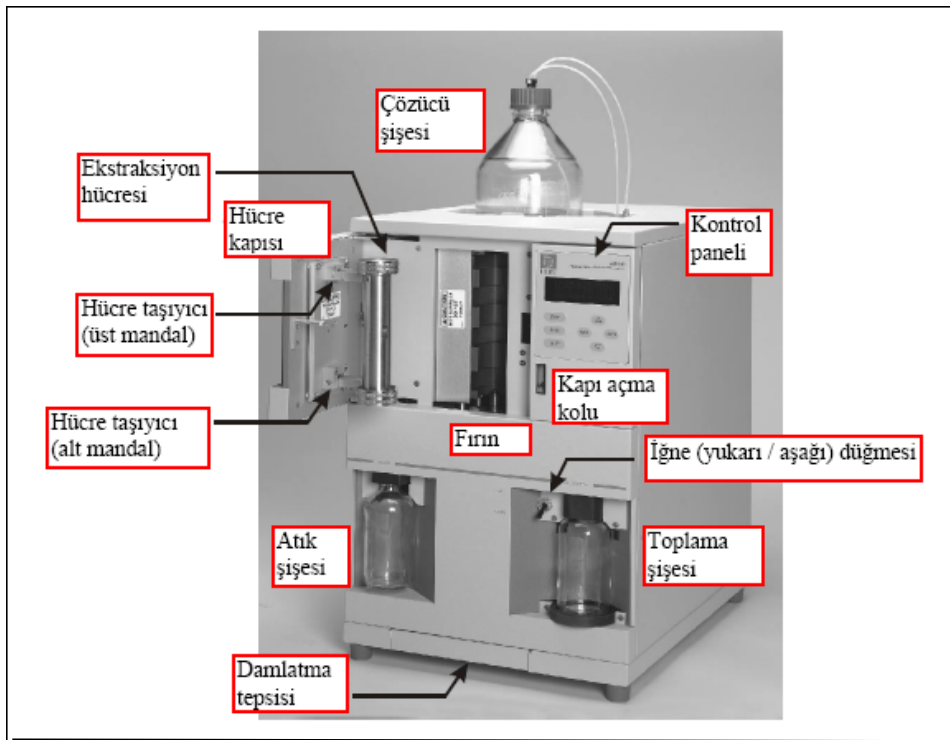
Çalışmada Asya Meyve Suyu ve Gıda A.Ş.'den sağlanan siyah üzüm çekirdeği suyu konsantresi üretimden elde edilen atık üzüm çekirdeği kullanılmıştır. Çöplerinden temizlenen çekirdekler İKA tezgah üstü öğütücü kullanılarak öğütülmüş ve Reschth elek setinde elenerek çeşitli partikül boyutuna sahip fraksiyonlarına ayrılmıştır.

Ekstraksiyon verimleri kuru temel üzerinden belirleneceğinden, çekirdeklerin nem miktarını belirlemek amacıyla, sabit tartıma getirilmiş petri kabına 2 g madde yerleştirilmiş ve sabit tartıma gelene kadar 110°C sıcaklıktaki etüvde bekletilmiş ve nem içeriği hesaplanmıştır.

4.1 Üzüm Çekirdeğinden Polifenolik Maddelerin Basınçlı Çözücü Ekstraksiyonu

Dionex ASE 100[®] basınçlı çözücü ekstraksiyon sistemi (Şekil 4.1) ile gerçekleştirilen çalışmalarda, hammadde miktarına göre 100 ml'lik ekstraksiyon hücresi kullanılmış ve hammadde ekstraksiyon hücresine yerleştirildikten sonra boş kısım cam bilyelerle doldurulmuştur. Ekstraksiyon işlemi tamamlandıktan sonra hammadde ekstraktör hacminin %60'ı olacak şekilde ekstraksiyon çözücüsü ile yıkanmıştır. Ekstre çözeltilerinden organik çözücüler 40°C'da vakum altında

döner buharlaştırıcıda (Heidolph Laborota 4000) uzaklaştırılmış, sulu kısım n-hekzan ile 3 kez sıvı-sıvı ekstraksiyonuna tabi tutularak yağdan uzaklaştırılmış ve kalan sulu faz liyofilizatörde (Christ Alpha 2) dondurarak kurutulduktan sonra ham ekstre elde edilmiştir. Ham ekstrelerde toplam fenolik bileşen, toplam flavanol, toplam prosiyanidin, ve antioksidan aktivite (DPPH) tayinleri gerçekleştirilmiştir. Her bir ekstraksiyonun iki kez tekrarlandığı çalışmada verimler kuru baz üzerinden hesaplanmış ve ortalama değerleri kullanılmıştır. Çalışılan parametreler ve ekstraksiyon koşulları Çizelge 4.1 de verilmiştir.



Şekil 4.1 Basınçlı sıvı ekstraksiyonu cihazı (Dionex ASE 100®)

Çizelge 4.1 Basınçlı sıvı ekstraktöründe çalışılan parametreler

Basınç	Sabit 1700 psi
Yıkama çözeltisi	Sabit. Ekstraktör hacminin %60'ı
Çözücü/çözücü karışımları (h/h) (80°C, 1:15 katı:sıvı oranı, 10 dk, tek kademe, 0,425-0,600 mm partikül boyutu)	Aseton Etil asetat Etanol Aseton: su (50:50 ve 70:30) Metanol:su (50:50 ve 70:30) Etil Asetat:su (50:50 ve 70:30) Etanol: su (50:50 ve 70:30)
Partikül boyutu (mm) (%70 Aseton, 80°C, 1:15 katı:sıvı oranı, 10 dk, tek kademe)	0,224–0,425 0,425–0,600 0,600–0,850 0,850–1,250 1,250–1,800
Sıcaklık (°C) (%70 Aseton, 1:15 katı:sıvı oranı, 10 dk, 0,85-1,25 mm partikül boyutu, tek kademe)	50, 80, 120
Zaman (dk) (%70 Aseton, 80°C, 1:15 katı:sıvı oranı, 0,425-0,600 mm partikül boyutu, tek kademe)	10, 20, 30
Katı:sıvı oranı (%70 Aseton, 80°C, 0,425–0,600 mm partikül boyutu, 10 dk, tek kademe)	1:3, 1:6,5, 1:10
Kedeme sayısı (%70 Aseton, 80°C, 1:15 katı:sıvı oranı, 0,425-0,600 mm partikül boyutu, 10 dk)	1, 2, 3, 4, 5

4.2 Üzüm Çekirdeğinden Polifenolik Maddelerin Klasik Çözücü Ekstraksiyonu

Basınçlı sıvı ekstraksiyonu yöntemi ile klasik çözücü ekstraksiyonunu karşılaştırmak amacıyla, n-hekzan çözücüsü ile Soxhlet cihazında yağı alınmış üzüm çekirdekleri %70 aseton ile 6 saat 50°C de termostatlı su banyosunda 1/10 katı sıvı oranında 200rpm de karıştırmalı ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Filtrasyonla katısından ayrılan ekstre içindeki aseton vakum altında 40°C de uzaklaştırılmış ve sulu faz liyofilize edilerek kurutulmuştur. Ekstre verimi,

ekstredeki fenolik bileşen (toplam fenolik bileşen, toplam prosiyanidin) ve DPPH serbest radikal süpürücü aktiviteleri belirlenmiştir.

4.3 Cevap Yüzey Yöntemi ile Deney Tasarımı

Deneysel çalışmaların birinci aşamasında, geleneksel yaklaşım olarak diğer faktörlerin sabit tutulup tek faktörün değiştirilmesi ile ekstraksiyon ve toplam fenolik bileşen verimi üzerine etkisi incelenmesi hedeflenmişti. Ancak bu yaklaşım parametreler arasındaki etkileşimi açıklamamakta ve parametreler arasındaki etkileşimlerden dolayı gerçek optimum değere ulaşamamaktadır. Optimum koşulların bulunabilmesi için, tek değişken tek zaman süreci doğru optimum yakaladığına emin olunana kadar her basamakta tekrarlanmaktadır. Bu özellikle optimize edilmesi gereken birçok değişken olduğunda, birçok peş peşe deney, süre tüketimi ve etkin olmayan bir strateji doğurmaktadır (Anderson ve Whitcomb, 1996; Vogel ve Todaro, 1997).

Bu nedenle incelenen parametrelerin birbirleri üzerindeki etkileşimi görebilmek ve optimum cevabı bulabilmek için Cevap Yüzey Yöntemi (Response Surface Methodology-RSM) kullanılarak deney tasarımı yapılmıştır.

Cevap yüzey yöntemi, ilgilenilen cevabın birkaç parametre tarafından etkilendiği problemlerin modellenmesi ve analizi için kullanılan matematik ve istatistik tekniklerinin birleşimidir ve amacı cevabı optimize edebilecek modeli geliştirebilmektir. Yöntemin temeli, çok sayıda bağımsız değişken ve bunlara bağlı bir ya da birkaç ölçülen cevap (bağımlı değişken) arasındaki ilişkinin belirlenmesi ve uygun bir fonksiyon yaklaşımı ile geliştirilen modelde optimum işletme koşullarını belirlemektir.

Fonksiyon yaklaşımı doğrusal (1. dereceden) alınırsa;

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \varepsilon \quad (1)$$

Eğer sistemde bir eğim açısı varsa, yüksek dereceli bir polinom kullanılmalıdır. Örneğin fonksiyon yaklaşımı ikinci derece polinom alınırsa;

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i \neq j} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (2)$$

eşitlikleri kullanılır.

ε , y cevabında gözlenen gürültü veya hatadır. Eğer beklenen cevap $E(y) = f(x_1, x_2) = \eta$ ile gösterilirse, yüzey $\eta = f(x_1, x_2)$ olarak ifade edilir ve cevap yüzeyi olarak adlandırılır (Monthomery, 2000).

Bu eşitliklerde β değeri öngörülen modelde bulunan regresyon katsayıları X_i kullanılan faktörlerdir (parametreler).

Bu çalışmada, deney planı Cevap Yüzey Yöntemi kullanılarak “Merkezi Bileşen” (Central Composite) yöntemi ile oluşturulmuştur. Tasarım, değişken sayısı (n) =3 olmak üzere, 8 faktöriyel nokta (2^n), 6 aksenal nokta ($2n$) ve merkez noktada 3 tekrar deneyi ile toplam 17 deneyden oluşmaktadır. Çözücü karışımı olarak %70 Aseton’un kullanıldığı, 1:15 katı:sıvı oranı ve tek kademedeki ikişer kez tekrarlanan deneylerden elde edilen verimlerin ortalama değerleri kullanılmıştır. Bağımsız değişken olarak sıcaklık (50-120°C), ortalama partikül boyutu (0,324–1,126 mm) ve zaman (10–30 dk) faktörleri seçilmiş ve bu faktörlerin ham ekstre verimi ve toplam fenolik bileşen verimi üzerine etkileri incelenmiştir. Bağımsız değişkenlerin değerleri, merkezden uzaklıklarına göre Çizelge 4.2’de verilmiştir. Deneyler tabloda verilen düzende değil gelişigüzel sıra ile yapılmıştır. 11. deneyde partikül boyutunun çok küçük olması nedeniyle ekstraktör yatağında kanallaşma ve kekleşme görüldüğünden bu noktada veri alınamamış ve model bu deney tasarımıdan çıkartılarak geliştirilmiştir.

4.4 Toplam Fenolik Bileşen, Toplam Flavanol ve Toplam Polimerik Prosiyanidin Tayini

4.4.1 Toplam fenolik (TP) bileşen tayini

Ham ekstre ve zenginleştirilmiş ürünlerde toplam fenolik bileşen miktarı Folin-Ciocaltaeu spektrofotometrik yöntem ile belirlenmiştir (Nack ve Shadhidi, 2004) 0.5 ml (1 mg/ml etanol) örnek çözeltisi 2,5 ml Folin-Ciocaltaeu reaktifi ve

7,5 ml %20'lik sodyum karbonat çözeltisi ile karıştırılmıştır. İki saat oda sıcaklığında bekletilen örneklerin absorbans değerleri 750nm de ölçülmüş ve sonuçlar gallik asit kalibrasyon doğrusu kullanılarak ($r^2=0.998$) gallik asit eşdeğeri olarak mg GAE/g ekstre olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.2 Bağımsız değişkenlerin istatistiksel kombinasyonu

Deney no	X1	X2	X3	T(°C)	Dp (mm)	Z (dk)
1	-1,00	-1,00	-1,00	50,00	0,324	10,00
2	1,00	-1,00	-1,00	120,00	0,324	10,00
3	-1,00	1,00	-1,00	50,00	1,126	10,00
4	1,00	1,00	-1,00	120,00	1,126	10,00
5	-1,00	-1,00	1,00	50,00	0,324	30,00
6	1,00	-1,00	1,00	120,00	0,324	30,00
7	-1,00	1,00	1,00	50,00	1,126	30,00
8	1,00	1,00	1,00	120,00	1,126	30,00
9	-1,68	0,00	0,00	26,14	0,725	20,00
10	1,68	0,00	0,00	143,86	0,725	20,00
11*	0,00	-1,68	0,00	85,00	0,0765	20,00
12	0,00	1,68	0,00	85,00	1,399	20,00
13	0,00	0,00	-1,68	85,00	0,725	3,18
14	0,00	0,00	1,68	85,00	0,725	36,82
15	0,00	0,00	0,00	85,00	0,725	20,00
16	0,00	0,00	0,00	85,00	0,725	20,00
17	0,00	0,00	0,00	85,00	0,725	20,00

*Partikül boyutunun çok küçük olması nedeniyle bu noktada veri alınamamış ve bu nokta deney tasarımıdan çıkartılmıştır.

4.4.2. Toplam flavanol miktarı

Toplam flavanol miktarı (TFL) Vanilin-HCl metodu ile spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (Price ve ark., 1978). 100µl örnek çözeltisi (5 mg/ml) 1,5 ml %1'lik vanillin çözeltisi ve 0,75 ml %4'lük HCl çözeltisi ile karıştırılmış, karışım 30°C da su banyosunda 20dk bekletilmiş ve daha sonra çözeltilerin 500nm de absorbansları okunmuştur. Toplam flavanol miktarları (+)-kateşin kalibrasyon doğrusu kullanılarak ($r^2=0,986$) mg kateşin/g ekstre olarak hesaplanmıştır.

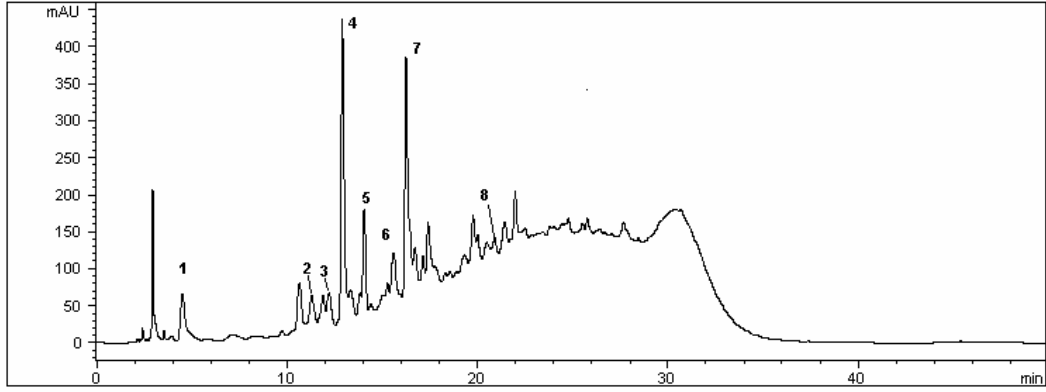
4.4.3. Toplam polimerik prosiyanidin (PP) miktarı

Gerek toplam fenol (Folin Chicalceu) gerekse kondense tanen yöntemi (Vanilin-HCL) ile yapılan tayinler polimerik yapıdaki prosiyanidinlerin miktarlarını belirlemede spesifik olmadığından, polimerik grupların hidroliz ürünleri olan antosiyaninlerin spektrofotometrik olarak absorbanslarının ölçümüne dayanan BuOH-HCl yöntemi ile prosiyanidinlerin miktarları aşağıdaki prosedür uygulanarak belirlenmiştir (Dalzell ve Kerven,1998; Cheynier ve ark., 2001).

20 µl örnek çözeltisi (1mg ekstre / 1 ml MeOH) alınarak azot gazı ile metanol uzaklaştırılmıştır. Çözücüsü uzaklaştırılmış ekstreye(0,02mg) 2,5 ml Butanol-12 N HCl (95:5) eklenerek çözülmüş ve 100 µl % 2'lik $(NH_4)Fe(SO_4)_2$ çözeltisi (2g $(NH_4)Fe(SO_4)_2$ / 100 ml 2N HCl) eklenerek 95°C'de 10dk bir karıştırma yapılarak 1 saat bekletilmiştir. 1 saat sonra oda sıcaklığına soğutulan numunelerin 550nm de UV spektrofotometrede absorbansları okunmuştur. Sonuçlar prosiyanidin B₁ kalibrasyon doğrusu kullanılarak ($r^2=0,988$) mg eşdeğer prosiyanidin B₁ / g ekstre olarak hesaplanmıştır.

4.4.4. YBSK ile monomerik ve dimerik flavanol miktar tayini

Monomerik ve dimerik yapıdaki flavanol bileşiklerinin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi yöntemi ile miktarlarının belirlenmesi çalışmalarında dörtlü pompa, Diode Array Dedektör (DAD), otomatik enjeksiyon ünitesi ve kolon fırınından oluşan Agilent 1100 serisi YBSK sistemi kullanılmıştır. Ayırımılar 30°C de ters faz kolonda [250x4,6 mm i.d., 5-µm, Kromsil C₁₈ (Technocroma)] gradient çözücü sistemi ile gerçekleştirilmiş, kromatogramlar 280nm'de değerlendirilmiştir. 1ml/dk akış hızında, (A) asetik asit: su (2:98) (h/h) ve (B) asetonitril:su:asetik asit (80:18:2) (h/h/h) hareketli faz olarak kullanılmıştır. Gradient programı 0 dan %2 B ye 2 dakikada, 2den %10 B ye 5 dakikada, 10 dan %30 B ye 25 dakikada, 30 dan %50 B ye 35 dakikada, 50 den % 60 B ye 40 dakikada, 60 dan % 90 B ye 45 dakikada artırılmış ve 2 dakikada başlangıç konsantrasyonuna dönmüştür. Miktar tayinleri ticari olarak sağlanan standart monomerik ve dimerik flavanol bileşiklerinin [prosiyanidin B₁, epigallokateşin (EGC), kateşin, prosiyanidin B₂, epigallokateşin gallat (EGCG); epikateşin (-EC); epikateşin gallat (ECG)] kalibrasyon doğruları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örnekler kolona verilmeden önce Nylon membran (40µm) filtrelerden süzölmüş ve iki enjeksiyonun ortalama değerleri kullanılarak miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir. Kromatogramda alınan piklerin saflıkları PDA dedektörden (280-650nm) alınan spektral değerleri ve standart bileşiklerin alıkonma zamanları (t_R) ve spektral değerleri ile karşılaştırılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.2 Üzüm çekirdeği ekstresine ait örnek kromatogram (280 nm).

1, gallik asit (GA); 2, prosiyanidin B1 (PB1), 3, epigallokateşin, [(-) EGC], 4, kateşin (C), 5, prosiyanidin B2 (PB2), 6, epigallokateşin gallat [(-) ECG], 7, epikateşin [(-) EC]; 8, epikateşin gallat [(-) ECG]

4.4.5. DPPH serbest radikal süpürücü aktivite tayini

Örneklerin 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) üzerindeki serbest radikal süpürücü etkileri Sanchez-Moreno metoduna (1998) göre yapılmıştır. 0,5 ml MeOH içerisinde hazırlanmış örnek çözeltisi (reaksiyon ortamındaki örnek konsantrasyonu 4×10^{-3} mg/ml) üzerine 3 ml metanolde hazırlanmış DPPH (2×10^{-2} g/L) çözeltisi ilave edilerek karıştırılmış ve oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika bekletildikten sonra 517nm de spektrofotometrede absorbanası okunmuştur. $1,08 \times 10^{-3} - 2,16 \times 10^{-2}$ g/L konsantrasyon aralığında DPPH standardı kullanılarak hazırlanmış olan aşağıdaki kalibrasyon denklemi kullanılarak reaksiyon ortamındaki DPPH konsantrasyonu (mg/ml) hesaplanmıştır.

$$A_{517nm} = 23,79(DPPH)_t + 0,009 \quad (R^2 = 0,996)$$

30 dakika sonucunda reaksiyon ortamında kalan DPPH miktarı ise aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% DPPH_{kalan} = (DPPH)_{t=30} / (DPPH)_{t=0} \times 100$$

Sonuçlar DPPH'ın %50'sinin süpürüldüğü (inhibe edildiği) konsantrasyon (EC_{50} µg/ml) cinsinden dört paralel analizin ortalaması alınarak değerlendirilmiştir.

4.5 İstatistiksel Analiz

Ekstraksiyonlar iki kez tekrarlanmış, yapılan analizlerin sonuçları da ilgili tablo ve grafiklerde aksi belirtilmediği sürece üç deneyin ortalaması±standart sapma değerleri olarak verilmiştir. Cevap Yüzey Yöntemi ve uygulanan proseslerin karşılaştırılmasında alınan veriler MINITAB 14.0 istatistik programı kullanılarak tekyönlü ANOVA testine tabi tutulmuş ve gruplar arasındaki farklılıkların anlamlılık testleri, $\alpha=0,95$ güven aralığında en küçük anlamlı fark (Least Significant Differences) testi uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

5. DENEYSEL BULGULAR

Çalışmanın ilk aşamasında, ekstraksiyon çözücüsü, partikül boyutu, sıcaklık, zaman, katı-sıvı oranı ve döngü (kademe) sayısının ekstraksiyon verimi, fenolik bileşen (toplam fenol ve toplam prosiyanidin) verimi ve ekstrelerin antioksidan aktivitesi (DPPH serbest radikal süpürücü etki) üzerine etkisi incelenmiştir. Ekstraksiyon verimlerini kuru baz üzerinden hesaplamak için yapılan nem tayini sonucunda nem içeriğinin %7,13 olduğu görülmüştür.

5.1 Ekstraksiyon Çözücüsünün Seçimi

Üzüm çekirdeğinden fenolik bileşenlerin ekstraksiyonunda en önemli parametrelerden birisi uygun çözücü/çözücü karışımının belirlenmesidir. Bu çalışmada sıcaklık (80°C), partikül boyutu (ort. 0,5125 mm), katı: sıvı oranı (1:15) ve kademe (1 kademe), zaman (10dk) parametreleri sabit tutularak, aseton, etilasetat, metanol ve etanol çözücülerini ve bu çözücülerin 50:50 (h/h) ve 70:30 (h/h) oranındaki sulu karışımlarının ham ekstre ve fenolik bileşen (toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve toplam polimerik prosiyanidin) verimi (Çizelge 5.1), fenolik bileşenlerin ham ekstredeki saflığı (Çizelge 5.2) ve DPPH serbest radikal süpürücü aktiviteleri üzerine etkisi (Çizelge 5.4) incelenmiştir.

Kullanılan çözücülerin ekstredeki fenolik bileşen miktarları üzerine etkisi Şekil 5.1 de gösterilmiştir. Gram ekstredeki toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve polimerik prosiyanidin miktarları en düşük etil asetat çözücüsü ile gerçekleştirilen ekstraksiyon işleminden elde edilmiştir. Saf aseton, etanol ve %70 aseton ve %50 metanol ile elde edilen ekstrlerdeki toplam fenolik bileşen miktarları (534–565 mg GAE/g ekstre) arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

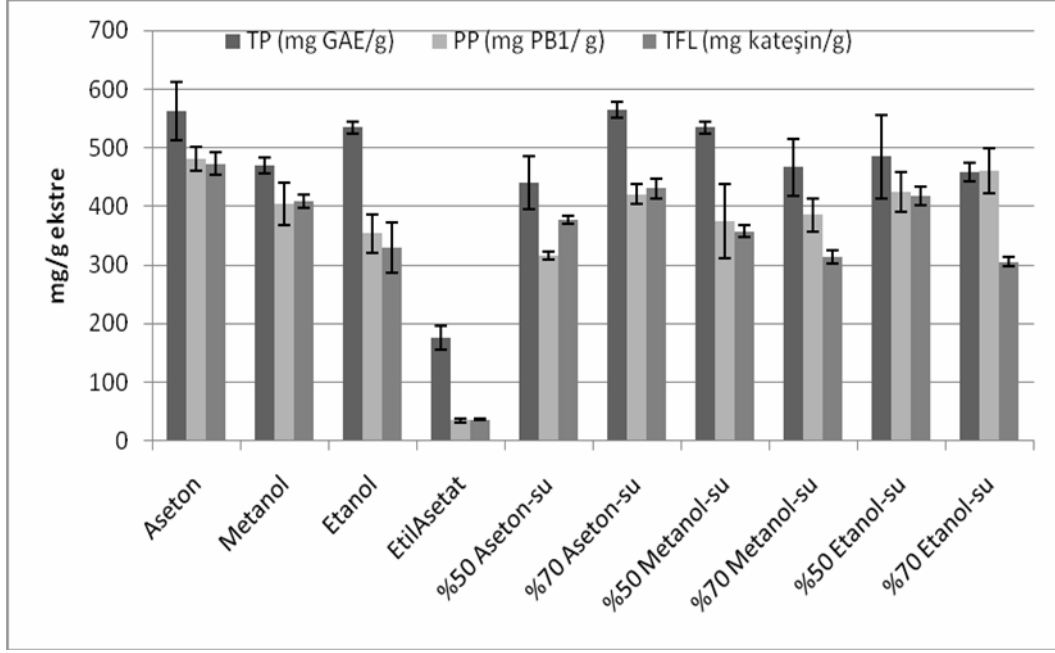
Daha çok monomerik, dimerik ve oligomerik yapıdaki kondense tanen (prosiyanidin) miktarlarının belirlendiği toplam flavanol miktarı (431,01–472,86 mg kateşin/g ekstre) ise aseton ve sulu çözeltileri ile elde edilen ekstrlerde

anamlı bir şekilde yüksek bulunmuş ($p>0,05$), bu çözücüleri ise %50 etanol ve saf metanol (sırasıyla 417,95 ve 408,07 mg kateşin/g ekstre) takip etmiştir.

Saf aseton çözücüsü yüksek molekül ağırlığına sahip polimerik yapıdaki prosiyanidinler için de en uygun çözücü olarak gözlenmiş (480,99 mg PB1/g ekstre) bu çözücü metanol ve etanol takip etmiştir. Çözücü karışımlarındaki organik çözücü (aseton, metanol ve etanol) miktarı arttıkça ekstre içindeki polimerik prosiyanidin miktarının da arttığı görülmüştür (Çizelge 5.1 ve Şekil 5.1).

Çizelge 5.1 Ekstraksiyon çözücüsünün ekstrede bulunan toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve toplam polimerik prosiyanidin miktarı (mg/g ekstre) üzerine etkisi

Çözücü	TP (mg GAE/g ekstre)	PP (mg PB1/ g ekstre)	TFL (mg kateşin/g ekstre)
Aseton	562,62 ± 49,27	480,99 ± 19,68	472,86 ± 19,68
Metanol	469,53 ± 13,81	404,04 ± 37,05	408,07 ± 11,72
Etanol	534,54 ± 9,98	353,59 ± 33,38	329,69 ± 43,02
Etil Asetat	175,41 ± 19,94	35,32 ± 3,22	36,76 ± 2,07
%50 Aseton-su	439,76 ± 45,01	316,27 ± 6,38	376,41 ± 6,38
%70 Aseton-su	565,56 ± 13,60	420,65 ± 16,89	431,01 ± 16,89
%50 Metanol-su	534,54 ± 9,98	374,07 ± 63,39	357,47 ± 9,80
%70 Metanol-su	466,62 ± 48,11	385,21 ± 27,85	313,72 ± 12,04
%50 Etanol-su	485,04 ± 71,11	424,70 ± 34,29	417,95 ± 16,56
%70 Etanol-su	457,71 ± 16,17	460,47 ± 37,94	304,81 ± 7,89



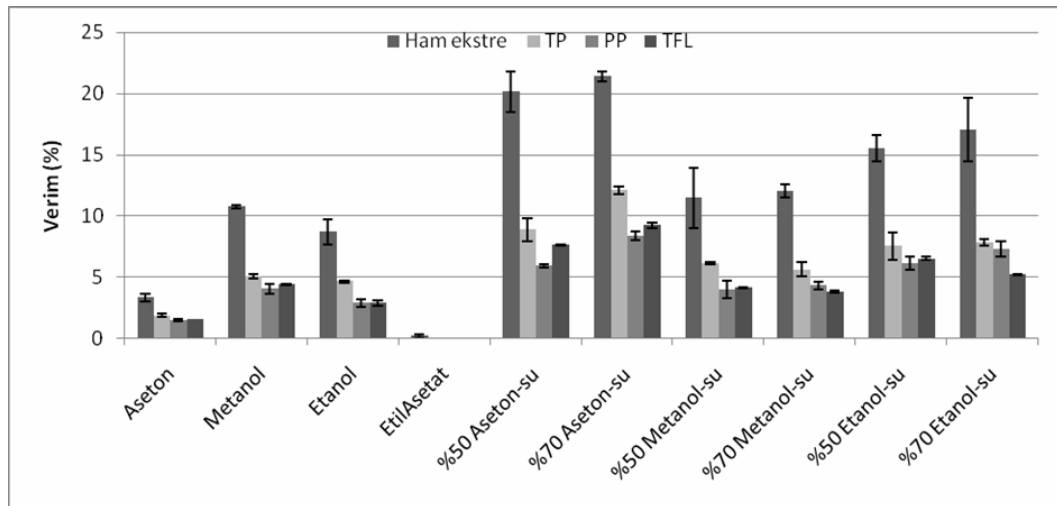
Şekil 5.1 Ekstraksiyon çözücüsünün ekstrede bulunan toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve toplam polimerik prosiyanidin miktarı (mg/g ekstre) üzerine etkisi

Uygun çözücü seçiminde elde edilen ekstraktların fenolik bileşen bakımından zengin olması önemli olmasına rağmen çekirdekten ekstre edilebilme verimleri (g ekstre/100 g çekirdek) de önemlidir. Burada amaç çekirdekten en yüksek verimde, fenolik bileşence zengin ekstraktlar elde edebilmektir. Bu nedenle ekstraksiyon verimlerinin (ham ekstre, toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve polimerik prosiyanidin) bilinmesi de önem taşımaktadır. Çizelge 5.2 ve Şekil 5.2’de kuru baz üzerinden ham ekstre ve fenolik bileşen (TP, TFL, PP) verimleri gösterilmiştir. Şekilden de görülebileceği üzere kullanılan saf organik çözücülerle yapılan ekstraksiyonlarda elde edilen verimler oldukça düşüktür (%3,3–10,3). Dolayısı ile ekstre edilebilen toplam fenolik bileşen verimleri de düşüktür. Organik çözücülerdeki su miktarı ekstraksiyon verimi üzerine etkili olmuştur. Bu etki daha çok aseton ve etanolde gözlenmiştir. Örneğin saf aseton kullanıldığında elde edilen ekstraksiyon verimi %3,3 iken, sırasıyla %50’lik ve %70’lik aseton çözücülerini ile elde edilen ekstraksiyon verimleri %20,1 ve %21,2 bulunmuştur (yaklaşık 6 kat). Bu artış etanolde de gözlenmiştir (yaklaşık 2 kat). Ancak metanol ile ekstraksiyonda su oranının önemli bir etkisi görülmemiştir (yaklaşık 1,12 kat).

Bunun nedeni karışımların polaritesi ile izah edilebilir. Suyun polaritesine en yakın polariteye sahip metanol çözücüsüdür, bunu etanol ve aseton takip etmektedir. Toplam fenolik bileşen, flavanol ve polimerik prosiyanidin verimleri de ham ekstre verimleri ile paralellik göstermiş, en yüksek fenolik bileşen verim değerlerine %70'lik asetonun çözücü olarak kullanıldığı ekstraksiyonlardan elde edilmiştir.

Çizelge 5.2 Ekstraksiyon çözücüsünün ham ekstre, toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve polimerik prosiyanidin verimi (g ekstre/100 g çekirdek) üzerine etkisi

Çözücü	Ham ekstre verimi (%)	TP verimi (%)	PP verimi (%)	TFL verimi (%)
Aseton	3,31 ± 0,29	1,86 ± 0,16	1,48 ± 0,07	1,56 ± 0,04
Metanol	10,74 ± 0,11	5,04 ± 0,15	4,03 ± 0,40	4,38 ± 0,06
Etanol	8,68 ± 1,00	4,64 ± 0,09	2,85 ± 0,29	2,86 ± 0,20
Etil Asetat	0,15 ± 0,11	0,03 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00
%50 Aseton-su	20,15 ± 1,67	8,86 ± 0,91	5,92 ± 0,13	7,58 ± 0,06
%70 Aseton-su	21,37 ± 0,38	12,09 ± 0,29	8,35 ± 0,36	9,21 ± 0,20
%50 Metanol-su	11,44 ± 2,48	6,11 ± 0,11	3,97 ± 0,72	4,09 ± 0,06
%70 Metanol-su	12,04 ± 0,53	5,62 ± 0,58	4,31 ± 0,34	3,78 ± 0,07
%50 Etanol-su	15,53 ± 1,09	7,53 ± 1,10	6,12 ± 0,53	6,49 ± 0,12
%70 Etanol-su	17,01 ± 2,58	7,79 ± 0,28	7,28 ± 0,65	5,19 ± 0,06



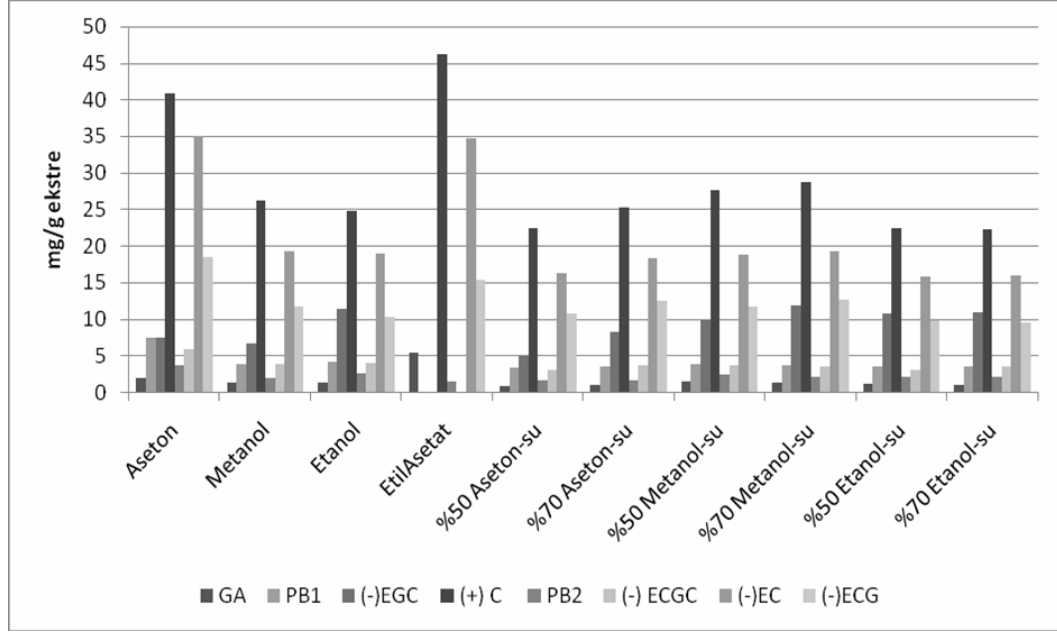
Şekil 5.2 Ekstraksiyon çözücüsünün ham ekstre, toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve polimerik prosiyanidin verimi (g ekstre/100 g çekirdek) üzerine etkisi

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi yöntemi ile üzüm çekirdeği ekstresinde bulunan gallik asit, monomerik ve dimerik flavanol bileşiklerinin miktarları Çizelge 5.3 ve Şekil 5.3’de verilmiştir. Ekstrelerde monomerik flavanol bileşiklerinden kateşinin ana bileşen olduğu, bu bileşeni epikateşinin izlediği görülmüştür. En yüksek kateşin ve epikateşin miktarları etil asetat ekstresinde görülmesine rağmen, saf aseton çözücüsünün tüm bileşenleri ekstre ettiği gözlenmiştir.

Çizelge 5.3 Ekstraksiyon çözücüsünün ekstrede bulunan gallik asit, monomerik ve dimerik flavanol miktarı (mg/g ekstre) üzerine etkisi

Çözücü	GA	PB1	(-)EGC	(+) C	PB2	(-) ECGC	(-)EC	(-) ECG
Aseton	1,93	7,35	7,41	40,93	3,68	5,82	35,07	18,43
Metanol	1,29	3,85	6,62	26,17	1,97	3,71	19,22	11,60
Etanol	1,29	4,06	11,29	24,78	2,51	3,88	18,90	10,31
EtilAsetat	5,33	0,00	0,00	46,14	1,35	0,00	34,66	15,32
%50 Aseton-su	0,82	3,30	4,95	22,44	1,61	3,04	16,24	10,71
%70 Aseton-su	0,97	3,40	8,17	25,26	1,64	3,57	18,29	12,43
%50 Metanol-su	1,35	3,84	9,72	27,56	2,32	3,60	18,82	11,60
%70 Metanol-su	1,24	3,68	11,90	28,78	2,04	3,50	19,17	12,63
%50 Etanol-su	1,04	3,43	10,72	22,39	1,99	2,96	15,76	9,77
%70 Etanol-su	1,01	3,44	10,92	22,26	2,11	3,54	15,85	9,51

(GA: gallik asit, PB1: prosiyanidin B1, (-) EGC: epigallokateşin, C: kateşin, PB2: prosiyanidin B2 (PB2), (-) ECGC: epigallokateşin gallat, (-) EC: epikateşin; (-) ECG: epikateşin gallat)



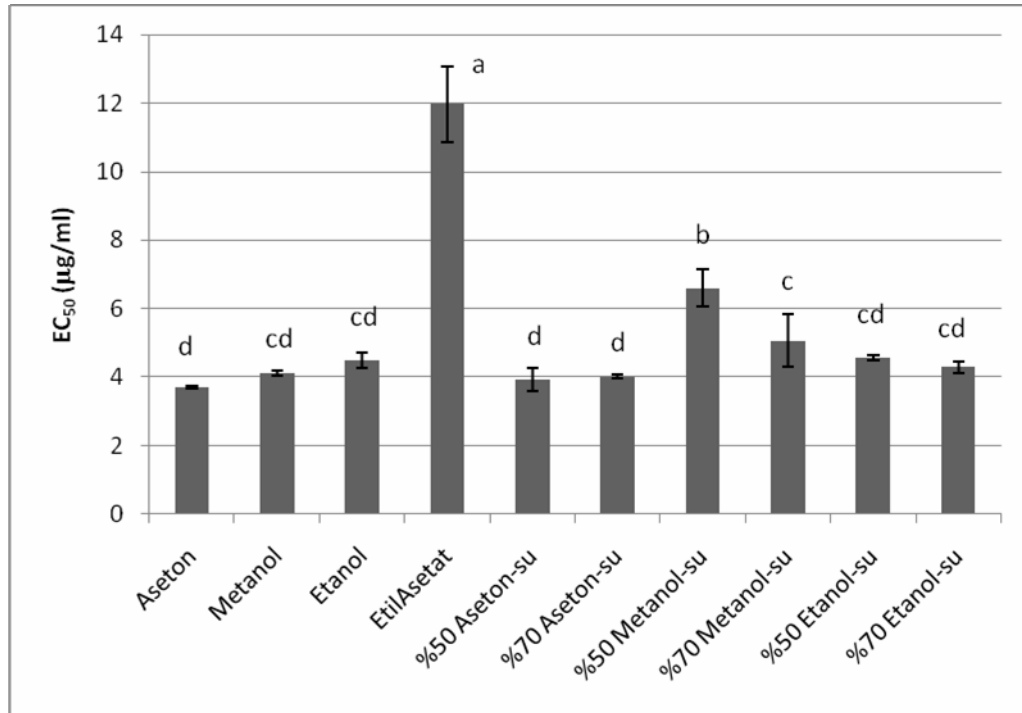
Şekil 5.3 Ekstraksiyon çözücüsünün ekstrede bulunan gallik asit, monomerik ve dimerik flavanol miktarı (mg/g ekstre) üzerine etkisi [GA: gallik asit, PB1: prosiyanidin B1, (-) EGC: epigallokateşin, C: kateşin, PB2: prosiyanidin B2 (PB2), (-) ECGC: epigallokateşin gallat, (-) EC: epikateşin; (-) ECG: epikateşin gallat]

Uygun çözücü/çözücü karışımlarının belirlenmesinde diğer önemli bir faktör de ekstraların antioksidan aktivitesidir. Üzüm çekirdeği ekstresinin antioksidan aktivitesi içermiş olduğu fenolik bileşiklerinden ileri gelmektedir. Ancak farklı çözücüler farklı yapıda fenolik bileşenleri ekstre edebilir bu da ekstranın antioksidan aktivitesini değiştirebilir. Bu nedenle, bu çalışmada ekstraların antioksidan aktiviteleri üzerine fikir sahibi olabilmek amacıyla, sentetik bir serbest radikal olan DPPH süpürücü aktiviteleri ölçülmüş ve DPPH radikalinin %50 sini süpürücü konsantrasyonları belirlenmiştir (Çizelge 5.4 ve Şekil 5.4). EC_{50} değerlerinin düşük olması antioksidan aktivitesinin yüksek olduğunu göstermektedir. Şekilden de görülebileceği üzere EC_{50} değerleri 3,69 $\mu\text{g/ml}$ –11,96 $\mu\text{g/ml}$ arasında çıkmıştır. Etil asetat ekstresinin en düşük aktiviteye (11,96 $\mu\text{g/ml}$) sahip olduğu görülmektedir. Aseton ve sulu çözeltileri ile elde edilen ekstraların en yüksek aktiviteye (3,69–4,00 $\mu\text{g/ml}$) sahip olduğu görülmüş ve saf aseton ve sulu çözeltilerinden elde edilen EC_{50} değerleri arasındaki fark istatistiki açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Kateşin ve epikateşin

bileşiklerince zengin etil asetat ekstresinin DPPH antioksidan aktivitesinin düşük görülmesi, antioksidan aktiviteye gerçek etkinin polimerik prosiyanidin içeriğinden geldiğini göstermektedir.

Çizelge 5.4 Ekstraksiyon çözücüsünün DPPH serbest radikali süpürücü aktivite üzerine etkisi

Çözücü	EC ₅₀ (µg/ml)
Aseton	3,70 ± 0,03
Metanol	4,11 ± 0,09
Etanol	4,49 ± 0,22
Etil Asetat	11,96 ± 1,10
%50 Aseton-su	3,93 ± 0,32
%70 Aseton-su	4,00 ± 0,06
%50 Metanol-su	6,60 ± 0,55
%70 Metanol-su	5,06 ± 0,77
%50 Etanol-su	4,57 ± 0,08
%70 Etanol-su	4,29 ± 0,18



*EC₅₀ değerlerinin düşük olması antioksidan aktivitesinin yüksek olduğunu göstermektedir.

*Değerler üzerindeki harfler (a-d) p<0,05 anlamlılık düzeyindeki değerlerin farklı olduğunu göstermektedir.

Şekil 5.4 Ekstraksiyon çözücüsünün DPPH serbest radikali süpürücü etkisi

Sonuç olarak ekstrelerin fenolik bileşiklerce saflıkları, ekstre edilebilir fenolik bileşen verimleri ve DPPH antioksidan aktiviteleri birlikte değerlendirildiğinde en uygun çözücünün %70'lik aseton olduğu görülmüştür. Bundan sonra yapılacak ekstraksiyon parametrelerinin incelenmesi çalışmaları da %70'lik aseton ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılmıştır.

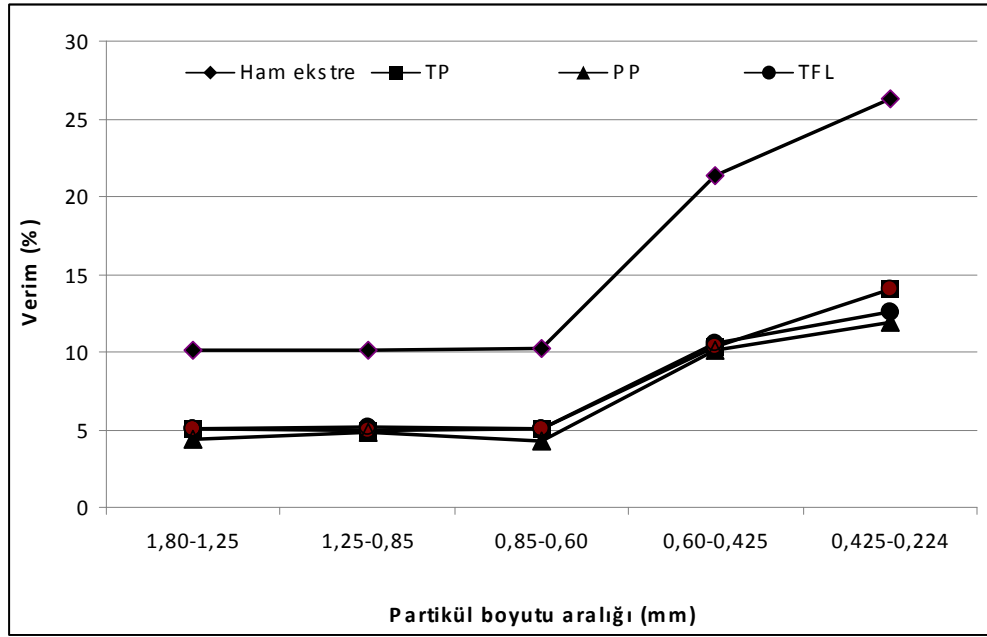
5.2 Partikül Boyutunun Fenolik Bileşen Ekstraksiyonu Üzerine Etkisi

Çözücü ekstraksiyonu işlemlerinde hammaddenin partikül boyutu küçüldükçe ekstraksiyon veriminin arttığı bir gerçektir. Çalışmanın bu bölümünde, %70 Aseton, 80°C, 1:15 katı:sıvı oranı, 10dk, tek kademe de gerçekleştirilen basınçlı çözücü ekstraksiyonunda partikül boyutundaki değişimin ham ekstre, toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve toplam polimerik prosiyanidin verimleri üzerine etkisi incelenmiş sonuçlar Çizelge 5.5 ve Şekil 5.5'de verilmiştir.

Ham ekstre verimi ortalama partikül boyutu 0,725–1,525 mm aralığında değişmemiş (yaklaşık ort. %10,12), daha küçük partikül boyutlarında ise hızla artmıştır. Bu artışın ort. partikül boyutu 0,5125 mm de yaklaşık iki kat, 0,324 de ise yaklaşık 2,6 kat olduğu gözlenmiştir. Ortalama 0,324 mm nin altındaki (0,168 mm) partikül büyüklüğü ile yapılan çalışmada ise kanallaşma ve hammaddenin kekleşmesi sonucu ekstraksiyon işlemi gerçekleşmemiştir. Toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve polimerik prosiyanidin verimlerinin de partikül boyutu ile ham ekstre verimi gibi aynı paralellikte değiştiği gözlenmiştir.

Çizelge 5.5 Partikül boyutunun ham ekstre, toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve polimerik prosiyanidin verimi (g ekstre/100 g çekirdek) üzerine etkisi

Partikül boyutu (mm)	Ham ekstre verimi (%)	TP verimi (%)	PP (%)	TFL verimi (%)
1,80-1,25	10,06	5,09	4,38	5,02
1,25-0,85	10,12	4,98	4,83	5,16
0,85-0,60	10,19	5,03	4,27	5,06
0,60-0,425	21,37	10,36	10,09	10,59
0,425-0,224	26,32	14,01	11,87	12,54



Şekil 5.5 Partikül boyutunun ham ekstre, toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve polimerik prosiyanidin verimi (g ekstre/100 g çekirdek) üzerine etkisi

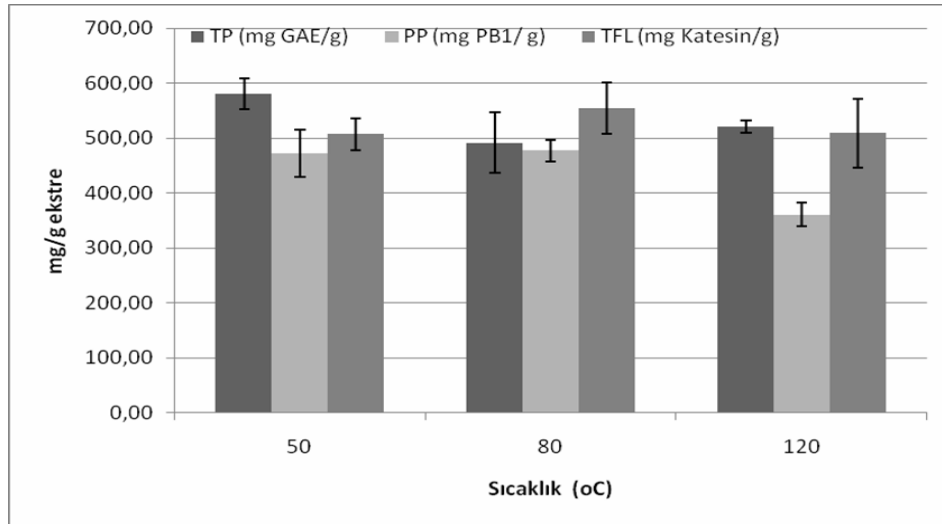
5.3 Sıcaklığın Fenolik Bileşen Ekstraksiyonu Üzerine Etkisi

Çözücü ekstraksiyonunda sıcaklık arttıkça ham maddeden ekstre edilebilen madde miktarı artmaktadır. Ancak sıcaklığın ekstre edilecek organik yapıdaki bileşenlerin yapısını değiştirip, ekstredeki saflıklarını etkileme riski bulunmaktadır. Fenolik bileşiklerin yapısının da sıcaklıkla değişebileceği ve dolayısı ile antioksidan aktiviteyi etkileyebileceği düşüncesiyle %70 aseton, 1:15 katı:sıvı oranı, 10 dk, 1,05 mm ortalama partikül boyutu, tek kademedeki yapılan çalışmalarda, sıcaklığın (50, 80 ve 120°C) üzüm çekirdeğinden elde edilen fenolik bileşen miktarının, veriminin ve DPPH antioksidan aktivitesinin değişimi gözlenmiştir. Ekstrede bulunan toplam fenolik bileşik miktarları (TP, TFL ve PP), monomerik ve dimerik flavanol bileşikleri (YBSK), toplam fenolik bileşenlerin verimleri ve DPPH antioksidan aktivitelerinin sıcaklıkla değişimleri Çizelge 5.6–5.8’de ve Şekil 5.6–5.9’da verilmiştir.

Sıcaklıkla ekstradaki toplam fenolik bileşen miktarı azalmış, flavanol miktarında ise bir değişme gözlenmemiştir. Toplam fenolik bileşen miktarındaki bu azalış, polimerik prosiyanidin miktarındaki azalış ile izah edilebilir. Bu çalışmada 120°C da polimerik prosiyanidin miktarında 50 ve 80°C de elde edilen verilere göre yaklaşık olarak %24'lük bir azalış görülmüştür (Çizelge 5.6 ve Şekil 5.6). Bu azalış polimerik yapıdaki yüksek molekül ağırlıklı bileşenlerin, basınç altında ve yüksek sıcaklıkta daha küçük moleküllere parçalandığı ve toplam fenolik bileşen miktarındaki azalış da parçalanmış bu moleküllerin fenolik yapıdan uzaklaştığı sonucu ile izah edilebilir.

Çizelge 5.6 Sıcaklığın ekstrada bulunan toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve toplam polimerik prosiyanidin miktarı DPPH serbest radikali süpürücü aktivitesi üzerine etkisi

Sıcaklık (°C)	TP (mg GAE/g ekstre)	PP (mg PB1/ g ekstre)	TFL (mg kateşin/g ekstre)	EC ₅₀ (µg/ml)
50	580,13 ± 27,94	472,16 ± 42,85	506,92 ± 28,68	2,90 ± 0,24
80	491,62 ± 54,94	477,40 ± 19,91	554,33 ± 47,54	2,73 ± 0,19
120	521,61 ± 11,25	361,11 ± 22,03	508,76 ± 63,08	3,03 ± 0,11

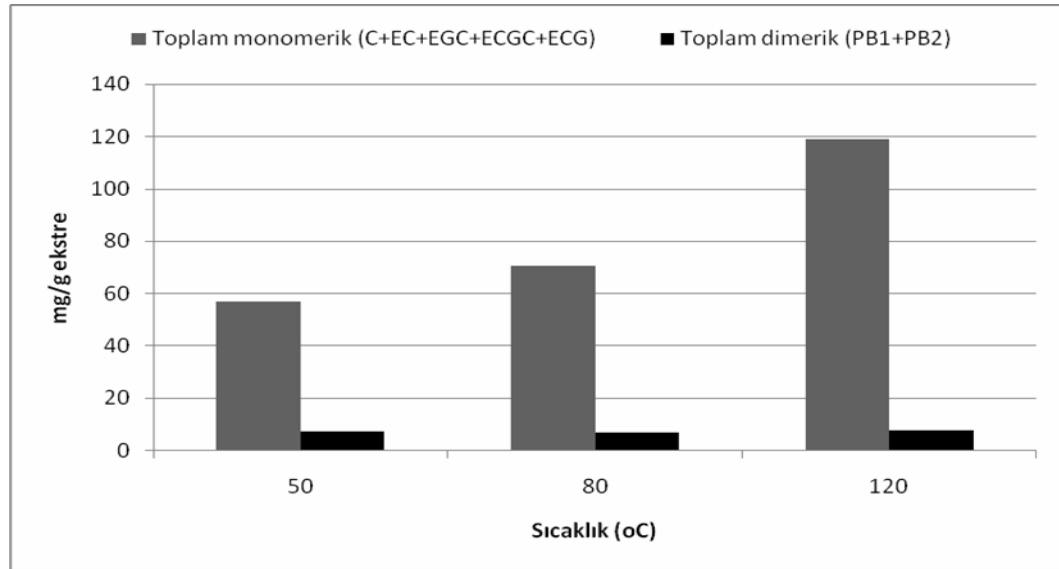


Şekil 5.6 Sıcaklığın ekstrada bulunan toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve toplam polimerik prosiyanidin miktarı (mg/g ekstre) üzerine etkisi

YBSK ile ölçülen toplam monomerik (C+EC+EGC+ECGC+ECG) bileşen miktarı (mg/g ekstre) sıcaklıkla artarken, dimerik (PB₁+PB₂) prosiyanidin miktarı değişmemiştir (Çizelge 5.7 ve Şekil 5.7).

Çizelge 5.7 Sıcaklığın etkisi ile ekstrede bulunan toplam monomerik ve dimerik (YBSK) miktarları (mg/g ekstre)

Sıcaklık (°C)	Toplam monomerik (C+EC+EGC+ECGC+ECG)	Toplam dimerik (PB ₁ +PB ₂)
50	56,85	7,54
80	70,70	6,83
120	118,85	7,80

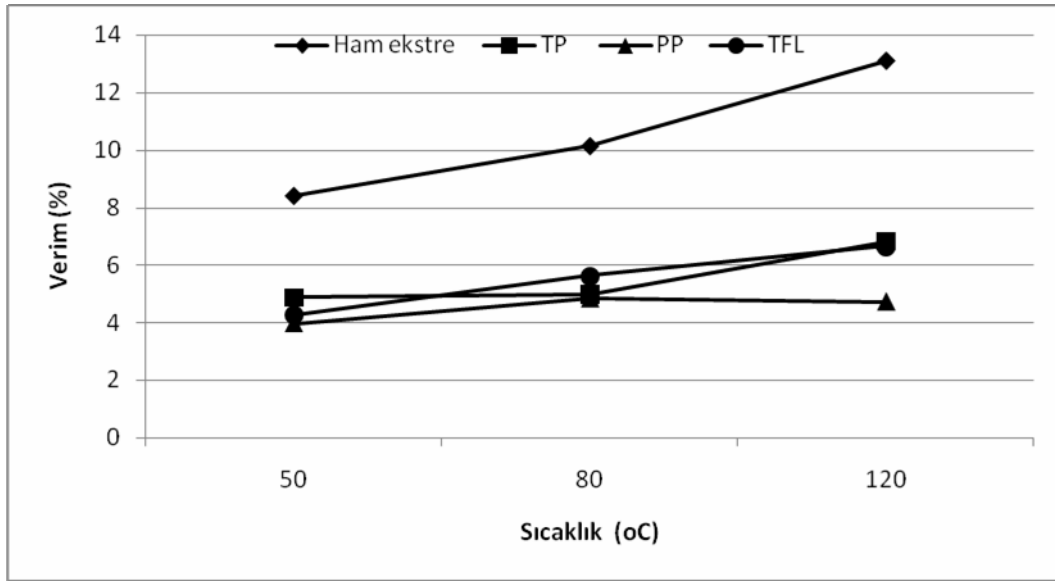


Şekil 5.7 Sıcaklığın ekstrede bulunan toplam monomerik ve dimerik (YBSK) miktarı (mg/g ekstre) üzerine etkisi

Üzüm çekirdeğinden beklendiği üzere ham ekstre verimi sıcaklıkla artmıştır (Çizelge 5.8 ve Şekil 5.8). 50°C de %8,4 olan ekstre verimi 120°C da %13,1 e ulaşmış ve yaklaşık %54 bir artış gözlenmiştir. Sıcaklık fenolik bileşen verimine aynı ölçüde etki etmemiştir. Toplam fenolik bileşen verimi 120°C de 50°C ye göre yaklaşık %40, toplam flavanol verimi %56 artarken, polimerik prosiyanidin verimindeki artış ise %20 olarak gözlenmiştir.

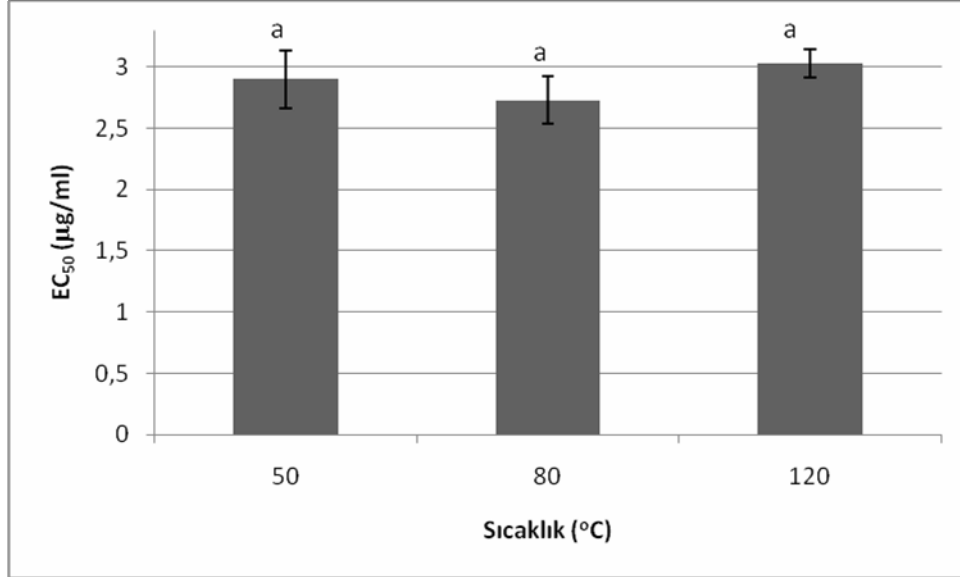
Çizelge 5.8 Sıcaklık ile değişen ham ekstre, toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve polimerik prosiyanidin verimleri (g ekstre/100 g çekirdek)

Sıcaklık (°C)	Ham ekstre verimi (%)	TP verimi (%)	PP verimi (%)	TFL verimi (%)
50	8,40	4,87	3,97	4,26
80	10,12	4,98	4,83	5,61
120	13,08	6,82	4,72	6,66



Şekil 5.8 Sıcaklığın ham ekstre, toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve polimerik prosiyanidin verimi (g ekstre/100 g çekirdek) üzerine etkisi

Ekstredeki polimerik yapıdaki prosiyanidin ve toplam fenolik bileşen miktarındaki azalışa rağmen DPPH serbest radikal süpürücü aktivitelerinde anlamlı düzeyde bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 5.9). Bu sonuç çok karmaşık bir fenolik bileşen yapısına sahip üzüm çekirdeği ekstresinde bulunan bileşenlerin yapılarını değiştirseler de oluşan yeni bileşiklerin de antioksidan aktiviteye sahip olabilecekleri ile izah edilebilir.



*EC₅₀ değerlerinin düşük olması antioksidan aktivitesinin yüksek olduğunu göstermektedir.

*Değerler üzerindeki harfler (a-d) p<0,05 anlamlılık düzeyindeki değerlerin farklı olduğunu göstermektedir.

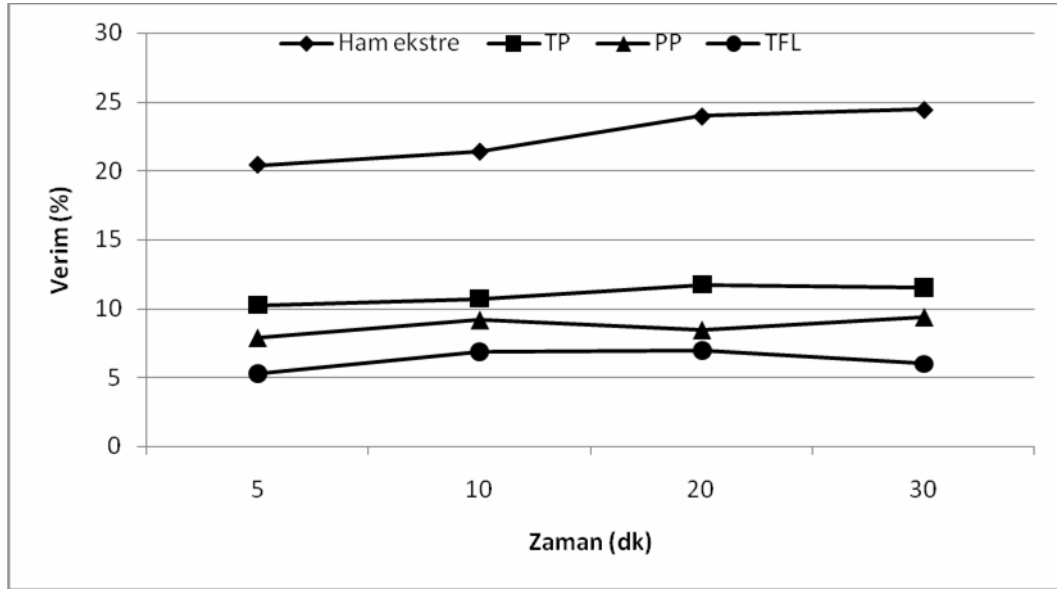
Şekil 5.9 Sıcaklığın DPPH serbest radikali süpürücü etkisi

5.4 Ekstraksiyon Zamanının Fenolik Bileşen Ekstraksiyonu Üzerine Etkisi

Ekstraksiyonda katıdan ekstre edilecek bileşiklerin çözücü ile temas sürelerinin belirlenmesi, ekstraksiyonun verimliliği için önemli bir parametredir. Basınçlı sıvı ekstraksiyon tekniğini klasik çözücü ekstraksiyonundan ayıran en önemli özellik, ekstraksiyonun yüksek basınçlarda gerçekleşmesi ile çözücünün katı partikül içine ve ekstre edilecek bileşenin de çözücüye difüzyonunun artması ve bunun sonucu olarak da daha kısa sürelerde daha yüksek verimlere ulaşılmasıdır. Ekstraksiyon süresinin verim üzerine diğer parametreler sabit tutularak (%70 Aseton, 80°C, 1:15 katı:sıvı oranı, 0,5125 mm partikül boyutu, tek kademe) gerçekleştirilen çalışmalarda ekstraksiyon zamanının 5dk dan 20dk ya çıkması ile ham ekstre veriminde yaklaşık %20 bir artış gözlenmesine rağmen bu artış, 20dk ile 30dk arasında azalmıştır (yaklaşık %2). 5. ve 30.dk'larda toplam fenolik bileşen verimlerinde yaklaşık %12, polimerik prosiyanidin veriminde yaklaşık %19 ve toplam flavanol veriminde ise yaklaşık %13'lük bir artış görülmüştür (Çizelge 5.9 ve Şekil 5.10).

Çizelge 5.9 Ekstraksiyon zamanının ham ekstre, toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve polimerik prosiyanidin verimi (g ekstre/100 g çekirdek) üzerine etkisi

Zaman (dk)	Ham ekstre (%)	TP (%)	PP (%)	TFL (%)
5	20,40	10,26	7,91	5,29
10	21,37	10,74	9,19	6,89
20	23,96	11,76	8,47	6,95
30	24,44	11,54	9,40	5,98



Şekil 5.10 Ekstraksiyon zamanının ham ekstre, toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve polimerik prosiyanidin verimi (g ekstre/100 g çekirdek) üzerine etkisi

5.5 Katı-sıvı Oranının Fenolik Bileşen Ekstraksiyonu Üzerine Etkisi

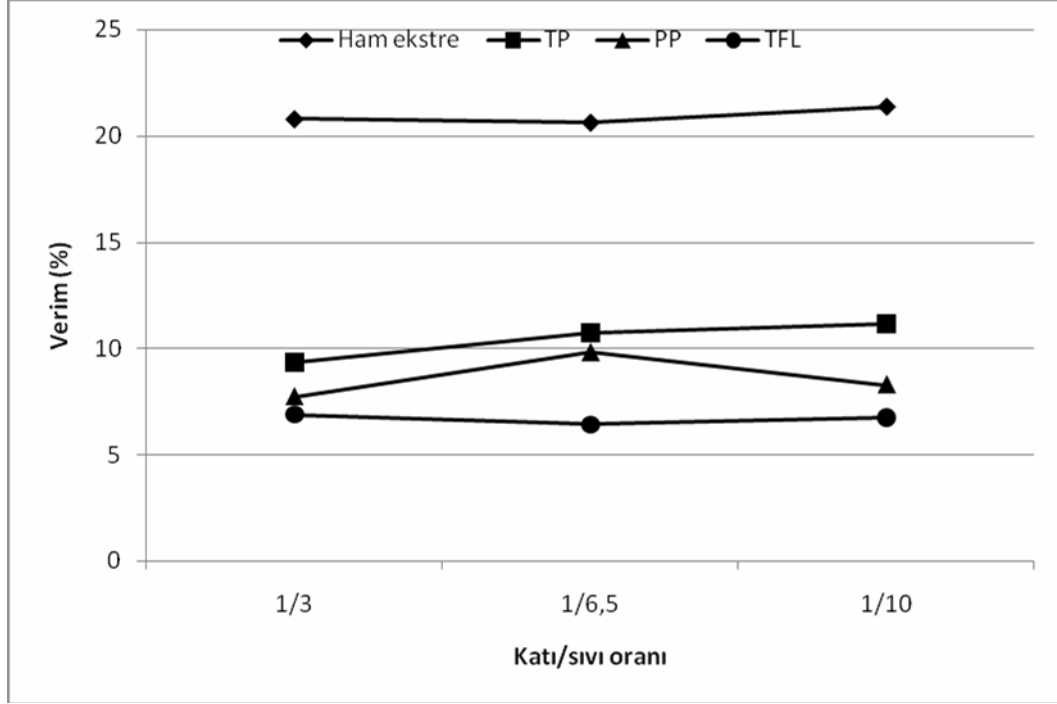
Çözücü ekstraksiyonunda önemli diğer bir parametre de birim hammadde ekstraksiyonu için kullanılacak çözücü/çözücü karışımı yani katı: sıvı oranıdır. Katı: sıvı oranı hem kullanılan çözücü sarfiyatını hem de çözücünün geri kazanılması sırasında gerekli enerji miktarını, dolayısı ile de ekstraksiyon işleminin maliyetini etkileyen bir parametredir. Diğer parametre incelemelerinde

1:15 katı sıvı oranı kullanılmasına rağmen, gerçekte 15 kat çözücü kullanımının basınçlı sıvı ekstraksiyonunda gerekli olup olmadığı sorusuna cevap için diğer ekstraksiyon parametreleri sabit tutularak (%70 Aseton, 80°C, 0,425–0,600 mm partikül boyutu, tek kademe, 10dk), yaklaşık olarak katı: sıvı oranının 1:3, 1:6,5 ve 1:10 değerleri kullanılarak katı: sıvı oranının ham ekstre ve fenolik bileşen verimi üzerine etkisi incelenmiştir (Çizelge 5.10 ve Şekil 5.11).

Şekilden de görüldüğü gibi katı: sıvı oranı ham ekstre verimini anlamlı düzeyde ($p>0,05$) etkilememiştir. Katı sıvı oranının yaklaşık üç kat artması ile ham ekstre veriminde sadece yaklaşık %2'lik bir artış gözlenmiştir. Toplam ekstre edilebilen fenolik bileşen miktarı yaklaşık %20 artmış yani bir gram ekstredeki fenolik bileşen miktarında belirgin bir artış gözlenmiştir. Toplam flavanol ve polimerik prosiyanidin miktarında ise anlamlı bir farklılık ($p>0,05$) görülmemiştir.

Çizelge 5.10 Katı: sıvı oranının ham ekstre, toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve polimerik prosiyanidin verimi (g ekstre/100 g çekirdek) üzerine etkisi

Katı/Sıvı	Ham ekstre	TP	PP	TFL
1/3	20,78	9,34	7,73	6,89
1/6,5	20,62	10,74	9,83	6,43
1/10	21,37	11,18	8,30	6,76



Şekil 5.11 Katı: sıvı oranının ham ekstre, toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve polimerik prosiyanidin verimi (g ekstre/100 g çekirdek) üzerine etkisi

5.6 Kademe (Cycle) Fenolik Bileşen Ekstraksiyonu Üzerine Etkisi

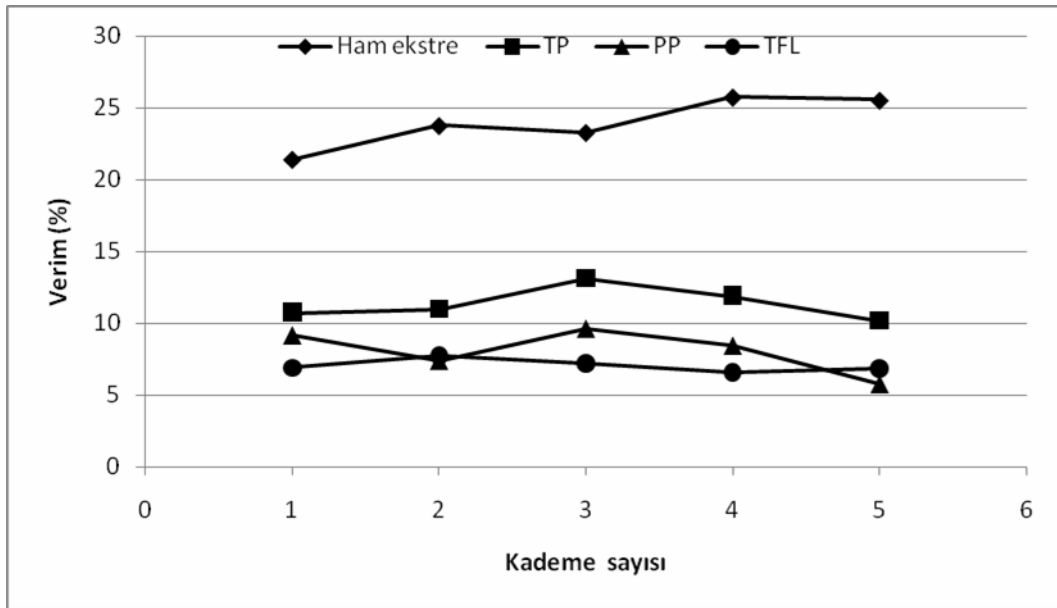
Çalışmalarda kullanılan basınçlı çözücü ekstraksiyonu sisteminde (ASE 100), ekstraktör yatağında bulunan hammaddenin her seferinde taze çözücü kullanılarak ekstraksiyonunu gerçekleştirmek mümkündür. Sistemde döngü (cycle) sayısı olarak ifade edilen bu işlem tarafımızca katı beslemenin sabit kaldığı ancak her seferinde taze çözücünün kullanıldığı bir kademe olarak değerlendirilmiştir. Dolayısı ile döngü yerine kademe ifadesi kullanılmıştır. Bu çalışmada diğer parametreler sabit tutularak (%70 Aseton, 80°C, 1:15 katı: sıvı oranı, 0,5125 mm partikül boyutu) ve her kademedeki ekstraksiyon süresi 10dk kullanılarak, 1,2,3,4 ve 5 kademelerin ekstraksiyon verimine etkisi gözlenmiştir (Çizelge 5.11 ve Şekil 5.12).

Kademe sayısı arttıkça ham ekstre verimi yaklaşık %20 (1–5 kademeler) artmıştır. Ancak toplam fenolik bileşen ve flavanol miktarlarında anlamlı bir

değişme gözlenmezken ($p>0,05$), polimerik prosiyanidin veriminde 5. kademede düşüş gözlenmiştir.

Çizelge 5.11 Kademe sayısının ham ekstre, toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve polimerik prosiyanidin verimi (g ekstre/100 g çekirdek) üzerine etkisi

Kademe sayısı	Ham ekstre	TP verimi	PP verimi	TFL verimi
1	21,37	10,74	9,19	6,89
2	23,74	10,96	7,42	7,73
3	23,26	13,13	9,65	7,22
4	25,73	11,92	8,47	6,57
5	25,52	10,18	5,79	6,87



Şekil 5.12 Kademe sayısının ham ekstre, toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve polimerik prosiyanidin verimi (g ekstre/100 g çekirdek) üzerine etkisi

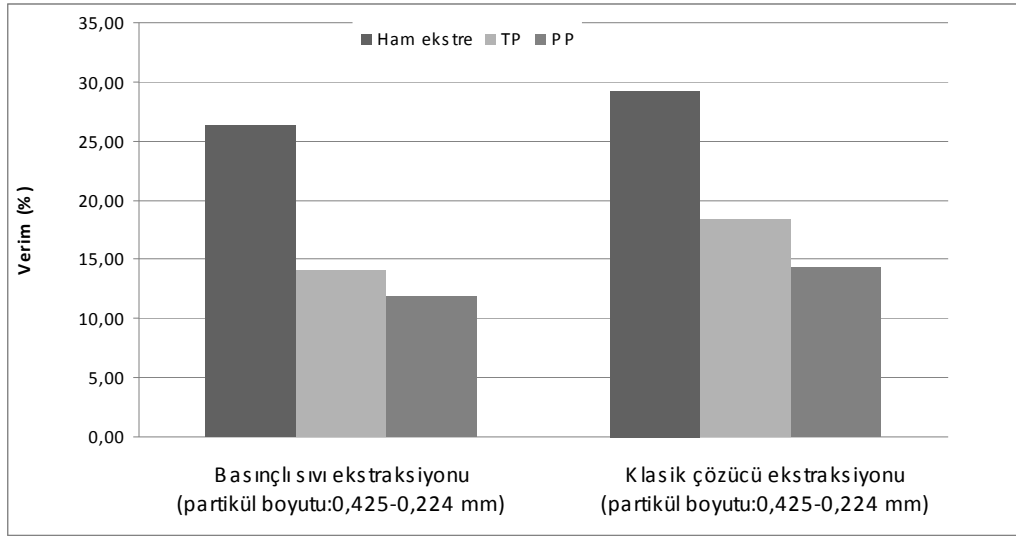
5.7 Üzüm Çekirdeğinden Polifenolik Maddelerin Klasik Çözücü Ekstraksiyonu

Üzüm çekirdekleri %70 aseton çözücüsü ile 6 saat 50°C de termostatlı su banyosunda 1:10 katı sıvı oranında 200rpm de karıştırılmalı ekstraksiyona tabi tutulmuş ve toplam fenolik bileşen ve toplam prosiyanidin miktarları ile DPPH serbest radikal süpürücü aktiviteleri Çizelge 5.12.'de verilmiştir.

Çizelge 5.12 Klasik çözücü ekstraksiyonundan elde edilen ekstrelerin toplam fenolik, polimerik prosiyanidin miktarları

Toplam fenolik bileşen (mg GAE/g ekstre)/	626,9±12,3
Toplam polimerik prosiyanidin (mg PB1/g ekstre)	488,9±76,0

Klasik çözücü ekstraksiyonu ile partikül boyutu 0,425–0,224 mm arasında olan çekirdeklerin 6 saatte ham ekstre veriminin %29,2, toplam fenolik bileşen veriminin %18,3 ve toplam polimerik prosiyanidin verimini ise %14,3 olduğu görülmüştür. 6 saat 50°C de gerçekleştirilen klasik çözücü ekstraksiyonunda elde edilen ekstraksiyon veriminin, 10 dk, 80°C de gerçekleştirilen basınçlı sıvı ekstraksiyon veriminden %10, fenolik bileşen veriminin yaklaşık %24; polimerik prosiyanidin veriminin yaklaşık %15 fazla olduğu görülmüştür.



Şekil 5.13 Basıncılı (10 dk) ve klasik çözücü (6 sa) ekstraksiyonu ham ekstre, toplam fenolik ve polimerik prosiyanidin verimleri

5.8 Cevap Yüzey Yöntemi ile Deneysel Tasarım

Deneysel çalışmaların birinci aşamasında, geleneksel yaklaşım olarak diğer faktörlerin sabit tutulup tek faktörün değiştirilmesi ile üzüm çekirdeğinin %70'lik aseton ile ekstraksiyonunu etkileyen en önemli parametrelerin partikül boyutu, sıcaklık ve zaman olduğu görülmüştür. Deneysel çalışmanın ikinci aşamasında da parametrelerin ekstre edilen toplam fenolik bileşen ve toplam polimerik prosiyanidin verimine ve birbirleri üzerine etkileri incelemek ve en yüksek verimin elde edildiği koşulları belirlemek için gerekli deney planının oluşturulması amacıyla Yanıt Yüzey Yöntemi (RSM) uygulanmıştır. Bölüm 4.3' de açıklandığı gibi parametrelerin alt ve üst değerleri, ortalama partikül boyutu için 0,324–1,126 mm; sıcaklık için 50-120°C ve zaman için de 10–30dk seçilmiştir. Bağımsız değişkenlerin değerleri ve bu noktalarda yapılan deneylerden elde edilen elde edilen cevaplar [toplam fenolik bileşen (TP) ve polimerik prosiyanidin (PP) verimleri] Çizelge 5.2 de verilmiştir.

Çizelge 5.13 Cevap yüzey yöntemi ile oluşturulan deney tasarımı ve elde edilen deneysel cevaplar

T (°C)	P (mm)	Z (dk)	TP (%)	PP (%)
50	0,324	10	16,25	12,02
120	0,324	10	17,64	12,91
50	1,126	10	5,25	3,97
120	1,126	10	7,35	4,88
50	0,324	30	19,75	13,58
120	0,324	30	21,66	14,16
50	1,126	30	7,79	4,83
120	1,126	30	8,79	5,47
26,14	0,725	20	4,64	3,65
143,86	0,725	20	9,45	4,58
85	1,399	20	7,39	5,02
85	0,725	3,18	5,42	4,08
85	0,725	36,82	7,76	4,61
85	0,725	20	6,39	5,25
85	0,725	20	5,53	4,68
85	0,725	20	5,09	4,71

Deney cevapları Bölüm 4.3 de verilen birinci ve ikinci derece polinom yaklaşımlarına uygulanmış ve ikinci dereceden polinomun uygun olduğu görülmüştür. Cevap ile parametreler arasındaki ampirik ilişki Eşitlik (3) ve (4) de verilmiştir.

Toplam fenolik bileşen verimi (%) için;

$$\begin{aligned} \% TP = & 34,9 - 0,0904 T - 59,2 P - 0,089 Z + 31,7 P*P + 0,000742 T*T \\ & + 0,00747 Z*Z - 0,0018 T*P - 0,00020 T*Z - 0,110 P*Z \end{aligned} \quad (3)$$

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	34,919	6,763	5,16	0,002
T	-0,09039	0,09221	-0,98	0,365
P	-59,165	8,401	-7,04	0,000
Z	-0,0885	0,2980	-0,30	0,776
P*P	31,739	4,173	7,61	0,000
T*T	0,0007420	0,0004505	1,65	0,151
Z*Z	0,007466	0,005519	1,35	0,225
T*P	-0,00183	0,04568	-0,04	0,969
T*Z	-0,000204	0,001832	-0,11	0,915
P*Z	-0,1100	0,1599	-0,69	0,517

S = 1,81339 R-Sq = 95,9% R-Sq(adj) = 89,8%

Toplam polimerik prosiyanidin verimi (%) için;

$$\% PP = 22,5 + 0,0045 T - 41,1 P + 0,029 Z + 21,1 P*P + 0,000052 T*T + 0,00145 Z*Z + 0,0008 T*P - 0,00021 T*Z - 0,043 P*Z \quad (4)$$

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	22,518	4,906	4,59	0,004
T	0,00448	0,06688	0,07	0,949
P	-41,082	6,094	-6,74	0,001
Z	0,0288	0,2162	0,13	0,898
P*P	21,058	3,027	6,96	0,000
T*T	0,0000518	0,0003268	0,16	0,879
Z*Z	0,001451	0,004003	0,36	0,729
T*P	0,00078	0,03314	0,02	0,982
T*Z	-0,000212	0,001329	-0,16	0,879
P*Z	-0,0428	0,1160	-0,37	0,725

S = 1,31539 R-Sq = 95,4% R-Sq(adj) = 88,4%

%95 güven aralığında (p=0,05) her iki modelde de bulunan modele ait olabilirlik (Probability) değeri p<0,05 den küçük bulunmuştur (sırasıyla 0,002 ve 0,004). Modelin bu hali ile uygunluğu regresyon katsayısı ile ifade edilmektedir. Her iki cevap için de r² değerleri (0,955 ve 0,954) 0,95 den büyük bulunmasına rağmen model %89,8 ve %88,4 ünü açıklayabilmektedir. Ancak bazı parametrelerin etkilerinin olabilirlik değerleri p>0,05 bulunmuştur. Dolayısı ile bu parametrelerin cevap üzerinde bir etkisi yoktur ve etkili olmayan parametrelerin modelden çıkartılması uygun görülmüştür.

Toplam fenolik bileşen (%) :

$$\%TP = 27,1 + 0,0282 T - 53,4 P + 0,105 Z + 26,7 P*P \quad (5)$$

Estimated Regression Coefficients for % TP						
Term	Coef	SE Coef	T	P		
Constant	29,9215	2,74990	10,881	0,000		
T	0,0303	0,01333	2,276	0,044		
p	-60,4206	6,37304	-9,481	0,000		
z	0,1130	0,04666	2,422	0,034		
p*p	30,6950	3,93092	7,809	0,000		
S = 1,724 R-Sq = 93,2% R-Sq(adj) = 90,8%						
Analysis of Variance for % TP						
Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	4	449,872	449,872	112,468	37,82	0,000
Linear	3	268,564	300,112	100,037	33,64	0,000
Square	1	181,308	181,308	181,308	60,97	0,000
Residual Error	11	32,709	32,709	2,974		
Lack-of-Fit	9	31,831	31,831	3,537	8,06	0,115
Pure Error	2	0,877	0,877	0,439		
Total	15	482,580				

Toplam polimerik prosiyanidin (%)

$$\%PP = 22,7 + 0,00962 T - 41,7 P + 0,0378 Z + 20,9 P*P \quad (6)$$

Estimated Regression Coefficients for % PP						
Term	Coef	SE Coef	T	P		
Constant	22,6592	1,58691	14,279	0,000		
T	0,0096	0,00769	1,251	0,237		
p	-41,7332	3,67775	-11,347	0,000		
z	0,0378	0,02693	1,405	0,188		
p*p	20,9268	2,26846	9,225	0,000		
S = 0,9951 R-Sq = 95,1% R-Sq(adj) = 93,4%						
Analysis of Variance for % PP						
Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	4	212,652	212,652	53,1630	53,69	0,000
Linear	3	128,379	131,014	43,6713	44,10	0,000
Square	1	84,273	84,273	84,2725	85,10	0,000
Residual Error	11	10,893	10,893	0,9902		
Lack-of-Fit	9	10,685	10,685	1,1872	11,41	0,083
Pure Error	2	0,208	0,208	0,1040		
Total	15	223,545				

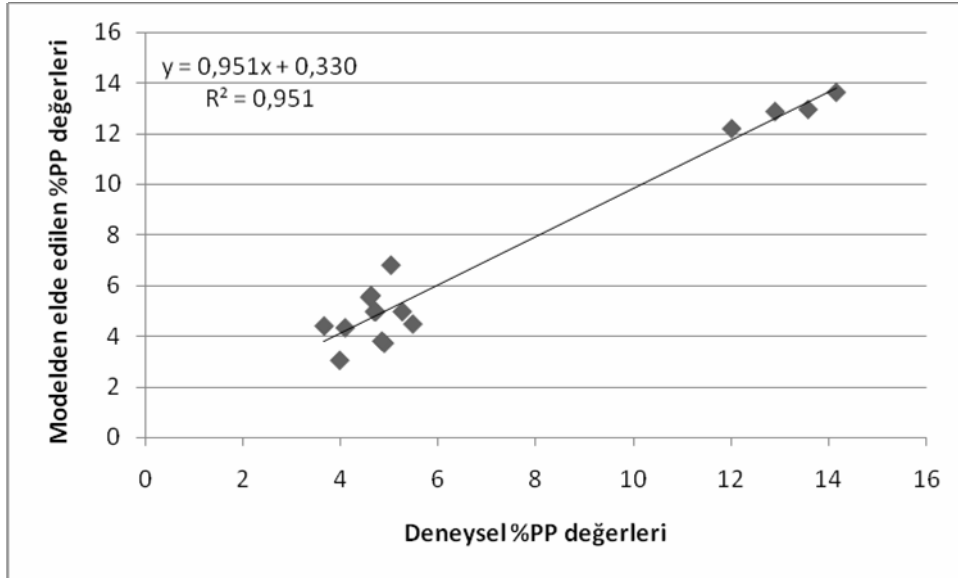
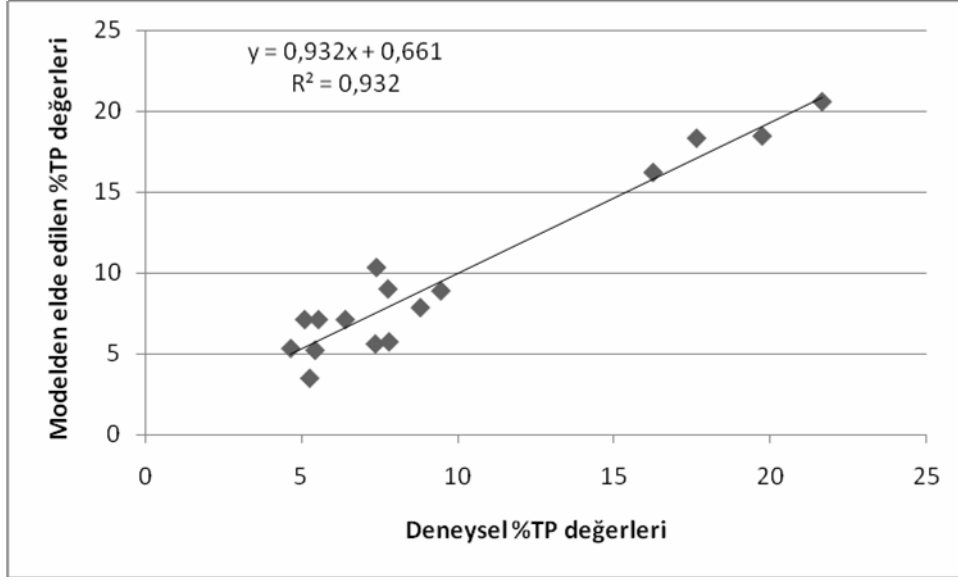
Etkili olmayan parametrelerin modelden çıkartılmasıyla oluşturulan yeni model eşitliklerinde (eşitlik 5 ve 6), %TP ve %PP cevaplarının sıcaklık, zaman ile doğrusal, partikül boyutunun da doğrusala ilaveten karesi (ikinci dereceden

polinom) oranında etkilendiği görülmüştür. Modelin her iki cevap için de olabilirlik değeri $p < 0,0001$ bulunmuştur. Her iki cevap için de model eşitliği cevapları %90 (TF) ve %93,3 (PP) oranında açıklamaktadır ve modelden sapma (lack of fit) değerlerinin de $p > 0,05$ olduğu yani sapmanın önemsiz olduğu görülmektedir.

Yapılan deneylerin sonuçları ve (5) ve (6). eşitlikte öngörülen modelden elde edilen verilerin karşılaştırılması Çizelge 5.3 de verilmiştir. Bu verilerin regresyon analizleri sonucunda (Şekil 5.14) regresyon katsayılarının $r^2 = 0,932$ (%TP) ve $r^2 = 0,951$ (%PP) olduğu görülmüştür.

Çizelge 5.14 Deneylerden elde edilen cevapların modelden elde edilen cevaplarla karşılaştırılması

% TP	Modelden elde edilen değer (%)	Fark	% PP	Modelden elde edilen değer (%)	Fark
16,25	16,21	0,04	12,02	12,19	-0,18
17,64	18,34	-0,69	12,91	12,87	0,04
5,25	3,45	1,80	3,97	3,06	0,91
7,35	5,58	1,77	4,88	3,73	1,15
19,75	18,47	1,27	13,58	12,95	0,63
21,66	20,60	1,07	14,16	13,62	0,54
7,79	5,71	2,08	4,83	3,82	1,01
8,79	7,84	0,96	5,47	4,49	0,98
4,64	5,30	-0,66	3,65	4,41	-0,76
9,45	8,88	0,58	4,58	5,54	-0,96
7,39	10,32	-2,93	5,02	6,81	-1,80
5,42	5,19	0,23	4,08	4,34	-0,26
7,76	8,99	-1,23	4,61	5,61	-1,00
6,39	7,09	-0,70	5,25	4,98	0,27
5,53	7,09	-1,56	4,68	4,98	-0,30
5,09	7,09	-2,00	4,71	4,98	-0,27

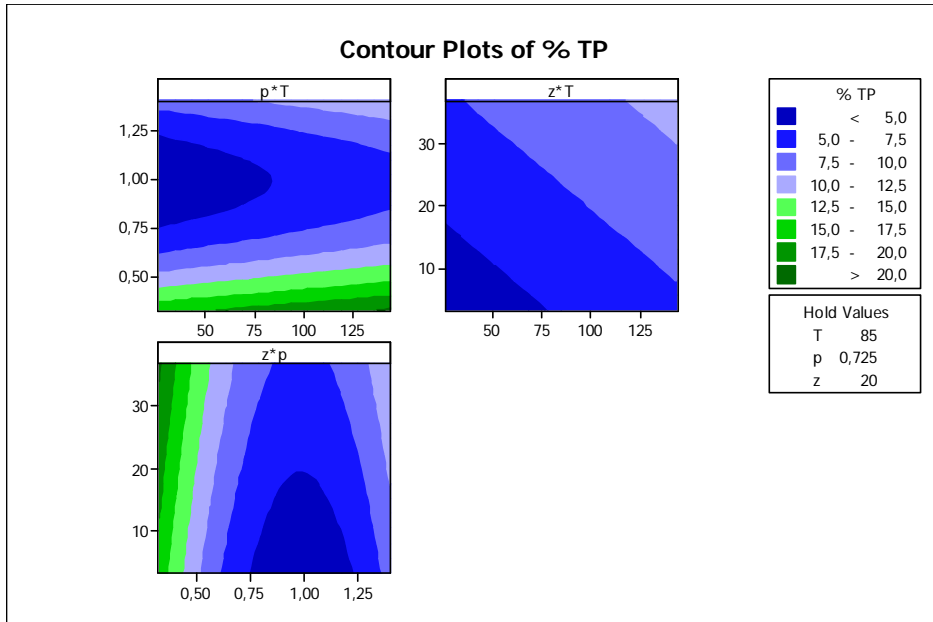
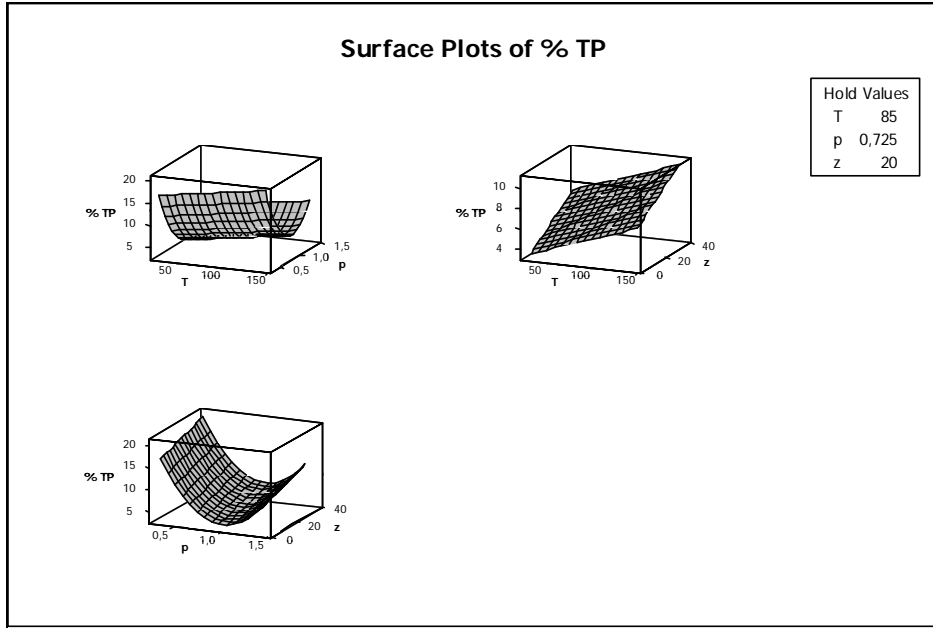


Şekil 5.14 Üzüm çekirdeğinin ekstraksiyonu işleminde deneysel değerlere karşı modelin önerdiği değerler arasındaki doğrusal ilişki

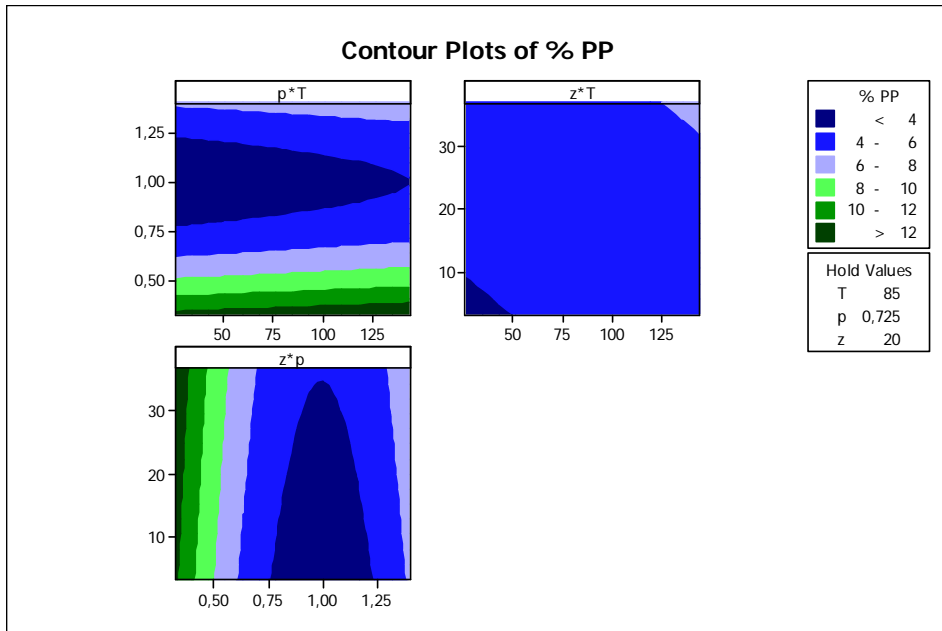
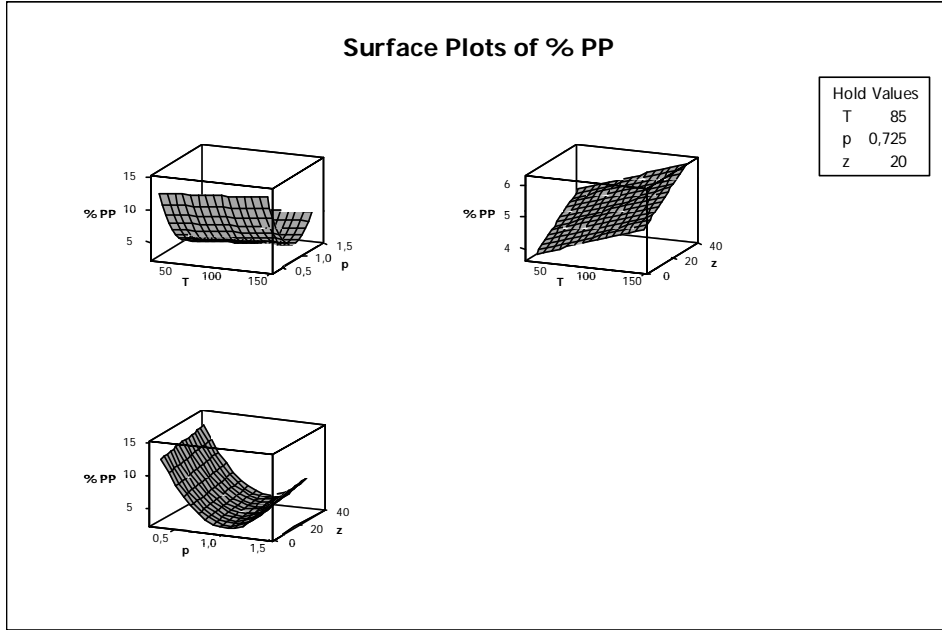
Çalışılan parametrelerin uygulanan modele göre toplam fenolik bileşen verimi (%), polimerik prosiyanidin verimi (%) ve birbirleri üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri Şekil 5.14 ve 5.15 de verilmiştir.

Üç boyutlu grafiklerden de görülebileceği gibi, sıcaklığın ve zamanın artması ve partikül boyutunun küçülmesiyle %TP ve %PP değerleri artmaktadır. Kontur grafiklerinden de (Şekil 5.14 ve 5.15) çizimin gerçekleştiği sabit ortalama

partikül boyutu (0,725 mm) değerinde sıcaklık ve zaman ne kadar artarsa artsın en yüksek (%20 TP ve %12 PP) verim değerlerine ulaşamamaktadır. Bununla beraber, ortalama sıcaklık (85°C) ve zaman (20dk) değerlerinde partikül boyutunun etkisinin görüldüğü kontur grafiklerinde ise ortalama değerlerden düşük sıcaklık değerlerinde dahi yüksek verimlere çıkılabilmektedir.



Şekil 5.15 Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin toplam fenolik bileşen verimi (%) ve birbirleri üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri



Şekil 5.16 Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin polimerik prosiyanidin verimi (%) ve birbirleri üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri

6. SONUÇ VE TARTIŞMA

Son yıllarda doğal ürünlerin sağlık üzerinde olumlu etkilerinin görülmesiyle bu ürünlere tüketici talebi artmış, talebe paralel olarak da doğal ürünlerin elde edilmesi, etkilerinin belirlenmesi, etkili bileşenlerin analizleri üzerine çalışmalarda artış gözlenmiştir. Bu ürünlerin başında fenolik bileşikler içeren doğal ürünler gelmektedir. Üzüm çekirdeği fenolik bileşiklerin önemli bir grubu olan monomerik (kateşin, epikateşin, gallokateşin, epigallokateşin, epikateşin-3-0-gallat) ve polimerik (prosiyanidin dimer, oligomer ve polimer) flavan-3-ol bileşiklerince zengindir. Bu bileşiklerin özellikle yaşlanmayı geciktirici, iltihap önleyici, anti kanserojen, anti-mutajenik ve düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunu engelleyici etkisi dolayısıyla, üzüm çekirdeği, gıda ve nütrosötik endüstrisinin ilgisini çekmiştir.

Fenolik bileşikler doğal ürünlerden klasik katı-sıvı ekstraksiyonu ile elde edilmektedirler. Fenolik bileşiklerin yapısı ve antioksidan aktivitesi uygulanan ekstraksiyon yönteminden etkilenmektedir. Özellikle ekstraksiyonda kullanılan çözücü, sıcaklık ve partikül boyutu elde edilen ekstrede fenolik bileşiklerin miktarları ve aktivitesi üzerine etkili parametrelerdir.

Ülkemiz üzüm meyvesi bakımından oldukça önemli bir potansiyele sahiptir. Üzüm, ülkemizde özellikle şarap üretiminin en önemli hammaddeleri arasındadır. Üzüm meyvesi ayrıca meyve suyu üretiminde, kurutulmuş üzüm ve sofralık üzüm olarak kullanım alanlarına da sahiptir. Bu kullanım alanlarına ilave olarak ülkemizde henüz bir uygulaması bulunmayan nütrosötik ürün pazarının da önemli girdilerinden birisi olarak düşünülmektedir.

Meyve suyu üretimi sonucu kalan posada bulunan üzüm çekirdeğinden polimerik prosiyanidinlerce zengin üzüm ekstresinin elde edilmesine yönelik yapılan bu çalışmada, klasik katı-sıvı ekstraksiyonuna alternatif olarak geliştirilen basınçlı sıvı ekstraksiyonu parametrelerinin ekstre verimi, fenolik bileşen verimi ve antioksidan aktivitesi üzerine etkisi incelenmiş ve sıcaklık, zaman ve partikül boyutu parametreleri kullanılarak deney tasarım model eşitlikleri geliştirilmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında, diğer parametrelerin sabit tutulup tek bir parametrenin değiştirilerek ekstraksiyon ve fenolik bileşen verimine etkisi incelenmiştir.

Elde edilen sonuçlardan en uygun ekstraksiyon çözücüsünün etanol-su ve aseton-su karışımları olduğu görülmüştür. Ancak gerek toplam fenolik bileşen gerekse polimerik prosiyanidin verimi bakımından %70 lik asetonun en uygun çözücü olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 5.2).

Uygun çözücü/çözücü karışımlarının belirlenmesinde diğer önemli bir faktör de ekstrelerin antioksidan aktivitesidir. Ekstrelerin sentetik bir serbest radikal olan DPPH süpürücü aktiviteleri ölçülmüş ve DPPH radikalinin %50 sini süpürücü konsantrasyonları belirlenmiştir (Şekil 5.4). EC_{50} değerleri 3,69 $\mu\text{g/ml}$ –11,96 $\mu\text{g/ml}$ arasında değişmiştir. Etil asetat ekstresinin en düşük aktiviteye (11,96 $\mu\text{g/ml}$) sahip olduğu görülmektedir. Aseton ve sulu çözeltileri ile elde edilen ekstrelerin en yüksek aktiviteye (3,69–4,00 $\mu\text{g/ml}$) sahip olduğu görülmüştür. Kateşin ve epikateşin bileşiklerince zengin etil asetat ekstresinin DPPH antioksidan aktivitesinin düşük görülmesi, antioksidan aktiviteye gerçek etkinin polimerik prosiyanidin içeriğinden geldiğini göstermektedir.

Fenolik bileşen verimini etkileyen ikinci önemli parametre olan partikül boyutunun etkisi incelendiğinde, ham ekstre verimi ortalama partikül boyutu 0,725–1,525 mm aralığında değişmemiş (yaklaşık ort. %10,12), daha küçük partikül boyutlarında ise hızla artmıştır. Bu artışın ort. partikül boyutu 0,5125 mm de yaklaşık iki kat, 0,324 de ise yaklaşık 2,6 kat olduğu gözlenmiştir. Ortalama 0,324 mm nin altındaki (0,168 mm) partikül büyüklüğü ile yapılan çalışmada ise kanallaşma ve hammaddenin kekleşmesi sonucu ekstraksiyon işlemi gerçekleşmemiştir. Toplam fenolik bileşen, toplam flavanol ve polimerik prosiyanidin verimlerinin de partikül boyutu ile ham ekstre verimi gibi aynı paralellikte değiştiği gözlenmiştir.

Üzüm çekirdeğinden beklendiği üzere ham ekstre verimi sıcaklıkla artmıştır (Şekil 5.8). 50°C de %8,4 olan ekstre verimi 120°C da %13,1 e ulaşmış ve yaklaşık %54 bir artış gözlenmiştir. Sıcaklık fenolik bileşen verimine aynı ölçüde etki etmemiştir. Toplam fenolik bileşen verimi 120°C de 50°C ye göre

yaklaşık %40, toplam flavanol verimi %56 artarken, polimerik prosiyanidin verimindeki artış ise %20 olarak gözlenmiştir.

Sıcaklıkla ekstredeki toplam fenolik bileşen miktarı (mg TP/g ekstre) azalmış, flavanol miktarında ise bir değişme gözlenmemiştir. Toplam fenolik bileşen miktarındaki bu azalış, polimerik prosiyanidin miktarındaki azalış ile izah edilebilir. Bu çalışmada 120°C da polimerik prosiyanidin miktarında 50 ve 80°C de elde edilen verilere göre yaklaşık olarak %24'lük bir azalış görülmüştür. Bu azalış polimerik yapıdaki yüksek molekül ağırlıklı bileşenlerin, basınç altında ve yüksek sıcaklıkta daha küçük moleküllere parçalandığı ve toplam fenolik bileşen miktarındaki azalış da parçalanan bu moleküllerin fenolik yapıdan uzaklaştığı sonucu ile izah edilebilir. Ekstredeki polimerik yapıdaki prosiyanidin ve toplam fenolik bileşen miktarındaki azalışa rağmen DPPH serbest radikal süpürücü aktivitelerinde anlamlı düzeyde bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 5.9). Bu sonuç çok karmaşık bir fenolik bileşen yapısına sahip üzüm çekirdeği ekstresinde bulunan bileşenlerin yapılarını değiştirirler de oluşan yeni bileşiklerin de antioksidan aktiviteye sahip olabilecekleri ile izah edilebilir.

Ekstraksiyon zamanının 5dk dan 20dk ya çıkması ile ham ekstre veriminde yaklaşık %20 bir artış gözlenmesine rağmen bu artış 20dk ile 30dk arasında azalmıştır (yaklaşık %2). 5. ve 30.dk'larda toplam fenolik bileşen verimlerinde yaklaşık %12, polimerik prosiyanidin veriminde yaklaşık %19 ve toplam flavanol veriminde ise yaklaşık %13'lük bir artış görülmüştür (Şekil 5.10).

Katı:sıvı oranı ham ekstre verimini anlamlı düzeyde ($p>0,05$) etkilememiştir. Katı sıvı oranının yaklaşık üç kat artması ile ham ekstre veriminde sadece yaklaşık %2'lik bir artış gözlenmiştir. Toplam ekstre edilebilen fenolik bileşen miktarı yaklaşık %20 artmış yani bir gram ekstredeki fenolik bileşen miktarında belirgin bir artış gözlenmiştir. Toplam flavanol ve polimerik prosiyanidin miktarında ise anlamlı bir farklılık ($p>0,05$) görülmemiştir (Şekil 5.11).

Kademe sayısı arttıkça ham ekstre verimi yaklaşık %20 (1-5 kademeler) artmıştır. Ancak toplam fenolik bileşen ve flavanol miktarlarında anlamlı bir değişme gözlenmemiştir ($p>0,05$).

Klasik çözücü ekstraksiyonu ile, partikül boyutu 0,425–0,224 mm arasında olan çekirdeklerin 6 saatte ham ekstre veriminin %29,2, toplam fenolik bileşen veriminin %18,3 ve toplam polimerik prosiyanidin verimini ise %14,3 olduğu görülmüştür. Bu değerler 80°C, 1:15 katı:sıvı oranında, 10dk ekstraksiyon süresinde aynı partikül boyutu ile çalışılan basınçlı sıvı ekstraksiyonu sonuçları ile karşılaştırıldığında (Şekil 5.13), klasik çözücü ekstraksiyonunda elde edilen ekstraksiyon veriminin yaklaşık %10; toplam fenolik bileşen veriminin yaklaşık %24; polimerik prosiyanidin veriminin yaklaşık %15 fazla olduğu görülmüştür.

DeneySEL çalışmanın ikinci aşamasında da parametrelerin (partikül boyutu, sıcaklık ve ekstraksiyon süresi) ekstre edilen toplam fenolik bileşen ve toplam polimerik prosiyanidin verimine ve birbirleri üzerine etkileri incelemek ve en yüksek verimin elde edildiği koşulları belirlemek için gerekli deney planının oluşturulması amacıyla Cevap Yüzey Yöntemi (RSM) uygulanmıştır.

Etkili olmayan parametrelerin modelden çıkartılmasıyla oluşturulan yeni model eşitliklerinde (eşitlik 5 ve 6), %TP ve %PP cevaplarının sıcaklık, zaman ile doğrusal, partikül boyutunun da doğrusala ilaveten karesi (ikinci dereceden polinom) oranında etkilendiği görülmüştür. Modelin her iki cevap için de olabilirlik değeri $p < 0,0001$ bulunmuştur. Her iki cevap için de model eşitliği cevapları %90 (TF) ve %93,3 (PP) oranında açıklamaktadır ve modelden sapma (lack of fit) değerlerinin de $p > 0,05$ olduğu yani sapmanın önemsiz olduğu görülmektedir.

Toplam fenolik bileşen (%) :

$$\%TP = 27,1 + 0,0282 T - 53,4 P + 0,105 Z + 26,7 P*P \quad (5)$$

Toplam polimerik prosiyanidin (%)

$$\%PP = 22,7 + 0,00962 T - 41,7 P + 0,0378 Z + 20,9 P*P \quad (6)$$

Model kullanılarak çizilen üç boyutlu grafiklerden görülebileceği gibi sıcaklığın ve zamanın artması ve partikül boyutunun küçülmesiyle %TP ve %PP değerleri artmaktadır. Kontur grafiklerinden de (Şekil 5.14 ve 5.15) çizimin gerçekleştiği sabit ortalama partikül boyutu (0,725 mm) değerinde sıcaklık ve zaman ne kadar artarsa artsın en yüksek (%20 TP ve %12 PP) verim değerlerine

ulaşılamamaktadır. Bununla beraber, ortalama sıcaklık (85°C) ve zaman (20dk) değerlerinde partikül boyutunun etkisinin görüldüğü kontur grafiklerinde ise ortalama değerlerden düşük sıcaklık değerlerinde dahi yüksek verimlere çıkılabilmektedir.

Sonuç olarak, üzüm çekirdeğinden fenolik bileşenlerin basınçlı sıvı ekstraksiyonunun incelendiği çalışmada, uygulanan yüksek basınçın (1700 psi) klasik çözücü ekstraksiyonuna göre ekstraksiyon ve fenolik bileşen verimini artırdığı, ekstraksiyon süresini çok önemli bir oranda azalttığı (klasik ekstraksiyon 24sa, basınçlı sıvı ekstraksiyonu 5-20dk) görülmektedir. Sıcaklıkla ekstraksiyon veriminin artmasına rağmen yüksek sıcaklıkta (120°C) ekstredeki fenolik bileşen miktarının düşmesinden dolayı çalışılan parametrelerden en uygun sıcaklığın 80°C olduğu sonucuna varılabilir.

Endüstriyel boyutta bitkilerden fenolik bileşiklerin basınçlı sıvı ekstraksiyonuna ait bir uygulamaya rastlanmamıştır. Uygulanan yüksek basınçtan dolayı kurulacak tesisin başlangıç maliyetinin yüksek olması, bu yöntemin endüstriyel boyutta uygulanmasını zorlaştırmaktadır. Ancak artık günümüzde süperkritik akışkan ekstraksiyonunun bitkilerden endüstriyel boyutta ekstre/etken madde üretiminde kullanıldığı göz önüne alındığında, basınçlı sıvı ekstraksiyon yönteminin de ileride bu amaçla kullanılması söz konusu olabilir.

Basınçlı sıvı ekstraksiyonunun henüz endüstriyel boyutta uygulaması olmamasına rağmen, laboratuvar boyutta da üzüm çekirdeğinden fenolik bileşiklerin basınçlı sıvı ekstraksiyonuna yönelik yapılan çalışmalar sınırlıdır. Bu nedenle, bu çalışmadan elde edilen bulguların, laboratuvar boyutta fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu, miktar tayini ve analizlerinde ve ileride muhtemel endüstriyel boyutta bir üretime yönelik yapılacak çalışmalarda uygulanabilecek bulgulara sahip olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Aburjai, T. ve Natsheh, F.M. (2003), "Plants used in cosmetics," *Phytotherapy Research*, **17**, 987–1000.

Akbaba, G. (2005), "Serbest radikallere karşı antioksidan savunma," *Bilim ve Teknik*, **453**,28–29.

Akgün, N. ve Akgün, M. (2006), "Extraction of grape seed by supercritical carbondioxide," *Journal of Engineering and Natural Sciences*, **4**, 49–58.

Altuğ, T. (2006), *Gıda Katkı Maddeleri*, Uğurer Tarım Kitapları, İzmir.

Anderson, M.J. ve Whitcomb, P.J. (1996), "Optimize your process-optimization efforts," *Chem. Eng Progress*, 51–60.

Anonim (1977), "Türkiye’de ve Dünyada Sofralık Üzüm Üretim ve Ticareti ile Yurdumuzun İhraç İmkânlarının Geliştirilmesi," *İhracatı Geliştirme Etüd Merkezi*, Ankara.

Anonim (2006), *2006/2007 Ege Bölgesi Sumaklık Üzüm Pazarlama Dönemi Değerlendirmesi*.

http://www.tzob.org.tr/tzob_web/tbmm_iletillenler/Uzum_2006.doc

Anonim (2007), *Seçilmiş maddelerin 2006 (ocak-aralık) ve 2007 (ocak-eylül) yılları ithalat ve ihracat bilgileri ve seçilmiş imalat sanayi maddelerinin yıllık üretim ve satış bilgileri*, TUIK, Ankara.

Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S. ve Robards, K. (2002), "Methods for testing antioxidant activity," *Analyst*, **127**, 183-198.

Balasundram, N., Sundram, K. ve Saman, S. (2006), "Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses," *Food Chemistry*, **99**, 191-203.

Bektaş, N. (2005), *Bazı fenolik asitler ve kombinasyonlarının antioksidan aktivitelerinin değerlendirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

Benthin, B., Danz, H. ve Hamburger, M. (1999), "Pressurized extraction of medicinal plants," *Journal of Chromatography A.*, **873**, 211-219.

Bjelakovic, G., Nikolova, D., Gluud L., Simonetti, R., ve Gluud, C. (2007), "Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention," *American Medical Association*, **8**, 842-857.

Brachet, A., Rudaz, S., Mateus, L., Christen, P. ve Veuthey J-L. (2001), "Optimisation of accelerated solvent extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves," *J.Sep.Sci.*, **24**, 865-873.

Bozan, B. (2006), "Kırmızı üzüm ekstraktlarının lipid peroksidasyonunu önleyici etkileri," *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, **2**, 337-341.

Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M. ve Velić, D. (2007), "Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seed," *Journal of Food Engineering*, **81**, 236-242.

Bustamante-Rangel, M., Delgado-Zamarreno, M.M., Sanchez-Perez, A. ve Carabias-Martinez, R. (2007), "Determination of tocopherols and tocotrienols in cereals by pressurized liquid extraction-liquid chromatography-mass spectrometry," *Analytica Chimica Acta*, **587**, 216-221.

Chafer, A., Berna, A., Monton, J.B. ve Munoz, R. (2002), "High-pressure data of system ethanol (1) + epicatechin (2) + CO₂ (3)," *Journal of Supercritical Fluids*, **24**, 103-109.

Cheyrier, V., Laberne, B. ve Moutounet, M. (2001), "Estimation of procyanidin chain length," *Methods in Enzymology*, **335**, 82-97.

Çam, M. ve Hışıl, Y. (2006), "Basınçlı solvent ekstraksiyonu ve uygulamaları," *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, **3**, 79-86.

Çalımlı, A. (2003), *Kayısı ve vişne suyu üretimindeki atıkların değerlendirilmesi*, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu, No: 20010705046, Ankara.

Darzell, S. ve Kerven, G.L. (1998), "A rapid method for the measurement of leucaena spp proanthocyanidins by the proanthocyanidin (BuOH/HCl) assay," *J. Sci. Food Agric.*, **78**, 405-416.

Doshi, P., Adsule, P. ve Banerjee, K. (2006), "Phenolic composition and antioxidant activity in grapevine parts and berries (vitis vinifera L.) cv. kishmish chorny (shared seedless) during maturation," *Internal Journal of Food Science and Technology*, **41**, 1-9.

Eskilsson, C.S., Hartonen, K., Mathiasson, L. ve Riekkola, M. (2004), "Pressurized hot water extraction of insecticides from process dust-comparison with supercritical fluid extraction," *J.Sep.Sci.*, **27**, 59-64.

Göger, G. (2006), *Salvia virgata jacq. ve salvia halophila hedge'nin antioksidan etkilerinin ve bileşimlerinin belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

Handley, A.J. (1999), "Extraction methods in organic analysis," *Sheffield Academic Pres*, England, 146–163.

Hasbay, A. İ. (2006), *Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from fruit pomaces*, Doktora Tezi, Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R. ve Bobilya, D.J. (2002), "Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships," *Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**, 572-584.

Herrero, M., Martin-Álvarez, P.J., Señoráns, F.J., Cifuentes, A. ve Ibáñez, E. (2005), "Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from spirulina platensis microalga," *Food Chemistry*, **93**, 417-423.

Jiang, Y., Li, P., Li, S.P., Wang, Y.T. ve Tu, P.F. (2007), "Optimization of pressurized liquid extraction of five major flavonoids from lysimachia clethroides", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **43**, 341-345.

Ju, Z.Y. ve Howard, L.R. (2003), "Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 5207–5213.

Kalender, Ö.B. (2002), *Haşhaş (Papaver Somniferum L.) Tohum Yağı Ekstraksiyonu ve Yağın Kompozisyonunun Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bilimleri Ana Bilim Dalı

Kar, P., Laight, D., Shaw, K.M. ve Cummings, M.H. (2006), "Flavonoid-rich grapeseed extracts: A new approach in high cardiovascular risk patients," *Int Clin Pract*, **60**, 11, 1458-1492.

Kaufmann, B. ve Christen, P. (2002), "Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction," *Phytochemical Analysis*, **13**, 105–113.

Kanner, J., Frankel, E., Granit, R., German, B. ve Kinsella, J.E. (1994), "Natural antioxidants in grapes and wines," *J. Agric Food Chem.*, **42**, 64-69.

Kennedy, J., Matthews, M. ve Waterhouse, A.L. (2000), "Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening," *Pyhtochemistry*, **55**, 77-85.

Kähkönen, M.P., Hpia, A.I., Heikki, J.V., Rauha, J., Pijlaja, K., Kujala, T.S ve Heinonen, M. (1999), "Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds," *J. Agric Food Chem.*, **47**, 3954-3962.

Küvetin, Z. (1990), "Meyvecilik: Genel meyve Tarımı Prensipleri ve Pratik Meyvecilik Yöntemleri," *Bağcılık*, İnkilap Yayınevi, İstanbul, 167–169.

Laurent, C., Besancon, P. ve Caporicco, B. (2007), "Flavonoids from a grape seed extract interact with digesitve sections and inststinal cells as assessed in an in-vitro digestion/ caco-2 cell culture model," *Food Chemistry*, **100**, 1704-1712.

List, P. H. ve Schmidt, P.C. (2000), *Phytopharmaceutical technology*, CRC Press, Florida, USA.

Lule, S.U. ve Wenshui, X. (2005), "Food phenolics, pros and cons: A review," *Food Reviews International*, **21**, 367–388.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. ve Jimnez, L. (2004), "Polyphenols: Food sources and bioavailability," *The American Journal of Clinical Nutrititon*, **79**, 727-747.

Majors, R.E. (2007), "Modern techniques for the extraction of solid materials," *LG-GC Europe*, Feb 07, 76.

McCabe, L.W., Smith, J.C. ve Harriot, P. (1993), *Unit Operation of Chemical Engineering*, 614-632, New York, USA.

Monteallegre, R.R., Peces, R.R., Chacón, J.L., Vozmediano, C., Gasgüeña, J.M. ve Romero, E.G. (2006), "Phenolic compound in skins and seeds of ten grape vitis vinifera varieties grown in warm climate," *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**, 687-693.

Montgomery, D.C. (2001), *Design and Analysis of Experiments*, John Wiley & Sons, New York, USA.

Naczki, M. ve Shahidi, F. (2004), "Extraction and analysis of phenolics in food," *Journal of Chromatography*, **1054**, 95-111.

Obradovic, D. (2006), "Grape-derived tannins and their application," *Asvo Proceeding*, 509a, 66-73.

Özçelik, B. (2003), *Fonksiyonel Gıdalar ve Sağlık: Yeni Ürün Geliştirme*.
http://www.food.itu.edu.tr/Fonksiyonel_gida_BO.pdf

Palma, M., Piñero, Z. ve Barroso, C. (2001), "Stability of phenolic compound during extraction with superheated solvents," *Journal of Chromatography*, **91**, 169-174.

Peng, Z., Hayasaka, Y., Iland, P.G., Sefton, M., Hoj, P. ve Waters, E.J. (2001), "Quantitative analysis of polymeric procyanidins (tannins) from grape (vitis vinifera) seeds by reverse phase high-performance liquid chromatography," *J.Agric Food Chem.*, **49**, 26-31.

Pekić, B., Kovać, V., Alanso, E. ve Revilla, E. (1998), "Study of the extraction of proanthocyanidins from grape seed," *Food Chemistry*, **61**, 201-206.

Piñero, Z., Palma, M. ve Barroso, C. (2004), "Determination of catechins by means of extraction with pressurized liquids," *Journal of Chromatography*, **1026**, 19-23.

Piñero, Z., Palma, M., ve Barroso, C. (2006), "Determination of trans-resveratrol in grapes by pressurized liquid extraction and fast high-performance liquid chromatography," *Journal of Chromatography*, **1110**, 61-65.

Price, M.L., Scoyoc, S.V.ve Butler, L.G. (1978), "A Critical evaluation of the vanilin reaction as an assay for tannin in sorghum grain," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **26**, 1214-1218.

Rice-Evans, C. (2001), "Flavonoid antioxidants", *Current Medicinal Chemistry*, **8**, 797-807.

Richter, B.E., Jones, B.A., Ezzell, J.L. ve Porter, N.L. (1996), "Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation," *Anal. Chem*, **68**, 1033-1039.

Richter, B.E., Pohl, A.C., Porter, N.L., Jones, B.A., Ezel, J.L ve Avdalovic, N. (1998), *Accelerated solvent extraction method*, A.B.D. Patent No: 5843311.

Santos-Buelga, C. ve Williamson, G. (2003), "*Polyphenol Extraction From Foods*," *Methods in Polyphenol Analysis* (Ed: Escribano-Bailon, M.T. ve Santos-Buelga, C.), Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1-12.

Scalbert, A. ve Williamson, G. (2000), "Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols," *Journal of Nutrition*, **130**, 2073S-2085S.

Shahidi, F., Naczk, M. (2003), *Phenolics in Food and Nutraceuticals*, CRC Press LLC, ABD, 1-14.

Shi, J., Mazza, G. ve Maguer, M.L. (2002), *Functional Foods Biochemical and Processing Aspects Volume2* (Ed: Skrede G. ve Wrolstad R.E), CRC Press, Florida, USA,73-74.

Shi, J., Yu, J., Pohorly, J., Young, C., Bryan, M. ve Wu, Y. (2003), "Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution," *Food, Agriculture & Environment*, **1**, 2, 42-47.

Shing, R.K, Rivzi, S.H. (1995), "Bioseparation process in foods," Basic Symposium Series, Marcel Dekker, Inc.

Taşkaya, B. (2003), "Kuru üzüm," *Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü-Bakış*, **3**, 7.

Vogel, H.C. ve Todaro, C.L. (1997), "Statistical Methods for Fermentation Optimization", *Fermentation and Biochemical Engineering Handbook*, (Ed: Geiger, E.O.), Noyes Publications, New Jersey, A.B.D., 161-180.

Wang, L. ve Weller, C.L. (2006), "Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants," *Trends in Food Science & Technology*, **17**, 300–312.

Wettasinghe, M. ve Shahidi, F. (1999), "Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*borago officinalis* L.) Seeds," *Food Chem.*, **67**, 399-414.

Wan, P.J., Wakelyn, P.J. (1997), *Technology and Solvents for Extracting Oilseed and Nonpetroleum Oils*, AOCS Pres.

Xianwen, L., Janssen, H. ve Cramers, C.A. (1997), "Parameters Affecting the Accelerated Solvent Extraction of Polymeric Samples," *Ana. Chem.*, **69**, 1598-1603.

Yılmaz, Y. ve Toledo, R.T. (2004), "Health aspects of functional grape seed constituents," *Trends in Food Science & Technology*, **15**, 422–433.

Yılmaz, Y. ve Toledo, R.T. (2006), "Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed poyphenols," *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**, 41–48.

Yıldız, S.D.D. (2007), "Enoant ve Sağlık Üzerine Etkileri," *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, **1**, 65–70.

Youssef, D. Ve El-Adawi, H. (2006), "Study of grape seeds extraction and optimization: An approach," *Journal of Applied Science*, **6**, 2944–2947.

Zhang, Y., Li, S. ve Wu, X. (2007), "Pressurized Liquid Extraction of Flanonoids from Houttuynia Cordata Thunb.," *Separation and Purification Technology*, 10.1016, 14.