

FINDIĞIN POLİFENOLİK MADDELERİNİN ADSORBAN ÖZELLİKTE KOLON DOLGU MADDESİ KULLANILARAK FRAKSİYONLARINA AYRILMASI VE ELDE EDİLEN FRAKSİYONLARIN KARAKTERİZASYONU

Ebru Pelvan*

TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, P.K. 21, 41470 Gebze, Kocaeli, Türkiye

Geliş / Received: 23.12.2019; Kabul / Accepted: 22.05.2020; Online baskı / Published online: 22.06.2020

Pelvan, E. (2020). Fındığın polifenolik maddelerinin adsorban özellikte kolon dolgu maddesi kullanılarak fraksiyonlarına ayrılması ve elde edilen fraksiyonların karakterizasyonu. *GIDA* (2020) 45(4) 613-622 doi: 10.15237/gida.GD20011

Pelvan, E. (2020). Fractionation of hazelnut polyphenolic compounds by using adsorbent featured column packing material and characterization of obtained fractions. GIDA (2020) 45(4) 613-622 doi: 10.15237/gida.GD20011

ÖZ

Bu çalışmanın amacı, fındığın içerdiği polifenolik maddelerin fraksiyonlarına ayrılması ve elde edilen fraksiyonların karakterizasyonlarının gerçekleştirilmesidir. Bu amaçla, fındığın fenolik maddeleri %80 (v/v) asetonla ekstrakte edilerek kolona verilmiştir. Düşük molekül ağırlıklı (LMW) polifenolik maddeler etanol, yüksek molekül ağırlıklı (HMW) polifenolik maddeler ise aseton kullanılarak fraksiyonlanmıştır. Ayrıca LMW fraksiyonu, UV'de (280 nm'de) verdiği pik noktalarına göre dört ayrı fraksiyona ayrılmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, tüm analizlerde en yüksek değerlere sahip olan Fraksiyon V'in toplam fenolik madde ve kondense tanen miktarları sırasıyla, 77.9 mg gallik asit eşdeğer (GAE)/g ekstre ve 227 mg kateşin eşdeğer (KE)/ g ekstre; antioksidan kapasite değerleri DPPH, ABTS ve FRAP yöntemleri için sırasıyla 0.047 mg/mL IC₅₀ değeri, 1.442 mmol Trolox Eşdeğer (TE)/ g ekstre, 307 mg FeSO₄.7H₂O/g ekstre olarak tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda, LMW fraksiyonlarının ayrı fraksiyonlar olarak toplanmasına gerek olmadığı, HMW fraksiyonundan ayrılmasının yeterli olduğu tespit edilmiştir. HMW fraksiyonu, yüksek tanen içeriğiyle polifenolik maddeler açısından önemli bir kaynak olarak değerlendirilebilir.

Anahtar kelimeler: Antioksidan kapasite, fındık, fraksiyonlama, kondense tanenler, toplam fenolik madde

FRACTIONATION OF HAZELNUT POLYPHENOLIC COMPOUNDS BY USING ADSORBENT FEATURED COLUMN PACKING MATERIAL AND CHARACTERIZATION OF OBTAINED FRACTIONS

ABSTRACT

The aim of this study is fractionation of hazelnut polyphenols and their characterization. For this aim, phenolic compounds were extracted with 80 % (v/v) acetone and loaded to column. Low molecular weight (LMW) and high molecular weight fractions (HMW) were fractionated with ethanol and acetone, respectively. Furthermore, LMW fraction was fractionated into four parts according to peaks observed at UV (280nm). FractionV had the highest contents/activities; total phenolics and condensed tannins contents were 77.9 mg gallic acid equivalent (GAE)/g extract and 227 mg catechin equivalent (CE)/ g extract, respectively. Antioxidant activities of FractionV were 0.047 mg/mL IC₅₀ value, 1.442 mmol Trolox equivalent (TE)/g extract, 307 mg FeSO₄.7H₂O/g extract for DPPH, ABTS and FRAP assays, respectively. As a result, it is seen that further fractionation of LMW is not needed and separation of LMW from HMW fraction is enough. HMW fraction could be utilized as a potential source of polyphenols.

Keywords: Antioxidant activity, hazelnut, fractionation, condensed tannins, total phenolics content

* Yazışmalardan sorumlu yazar /Corresponding author

✉ ebru.pelvan@tubitak.gov.tr

☎ (+90) 262 677 3262

☎ (+90) 262 641 2309

Ebru Pelvan; ORCID no: 0000-0002-3479-9514

GİRİŞ

Günümüzde beslenme modeli ile sağlık arasındaki yakın ilişki çeşitli bilimsel verilerle ortaya konmuş, yapılan çalışmalarla yaşam süresinin uzatılmasının yanı sıra sağlıklı yaşam ve yaşam kalitesinin yükseltilmesi hedeflenmiştir. Tüm dünyada sağlıklı gıda, fonksiyonel gıda, nütrosötikler (destekleyici besinler), medikal gıda, zenginleştirilmiş gıda, diyet gıda ve benzeri pek çok kavram gündeme gelmiş ve sağlığı koruyucu ve iyileştirici olarak nitelendirilen bu gıdaların üretimine hız verilmiştir (Alasalvar ve Pelvan, 2009). Bu kapsamda, tamamen doğal besinlerden elde edilen biyoaktif özellikteki maddelerin günlük yaşamda tükettiğimiz gıdalara eklenmesi ile ortaya çıkan ve sentetik özellik taşımayan fonksiyonel gıdalar pazarı hızla büyümektedir.

Fonksiyonel gıdalar pazarında piyasaya sürülen ürünlerin ve hammaddelerin çeşitliliği de her geçen gün artmaktadır. Yapılan bilimsel çalışmalar sonucunda sağlığa yararlı bitkilerin etken maddelerinin saflaştırılmasıyla gıda, ilaç ve kozmetik sanayinde kullanımı yaygınlaşmıştır. Bitkilerde ikincil metabolitler olarak adlandırılan ve biyolojik aktivite gösteren bu fenolik maddeler pek çok farklı gruptan oluşmaktadır (Gini ve Jothi, 2018; Milevskaya vd., 2019). Fenolik maddelerin gösterdikleri kimyasal özelliklere göre ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri farklılık göstermektedir.

Fındık, flavan-3-ol, benzoik asit, flavonoller gibi fenolik maddeler açısından zengin bir kaynaktır (Taş ve Gökmen 2015; Ghirardello vd., 2016; Yuan vd., 2018; Lainas vd., 2016; Pelvan Pelitli vd., 2017; Armada vd., 2019; Taş vd., 2019). Fındığın bileşimindeki yağ, protein, karbonhidrat, diyet lif, vitaminler (vitamin E), mineraller, fitosteroller (özellikle β -sitosterol) ve antioksidan özellikteki fenolik maddelerin beslenme ve sağlıklı yaşam üzerinde önemli bir role sahip olduğu vurgulanmıştır (Yuan vd., 2018, Napolitano vd., 2018).

Kabuklu yemişlerin U.S. Food and Drug Administration (FDA- Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından kalp-dostu sağlıklı gıdalar olarak tanımlanmasının ardından kabuklu yemişlerin

karakterizasyonu, sağlık üzerine etkilerinin araştırılması kapsamındaki çalışmalar hız kazanmıştır (Alasalvar ve Bolling, 2015). Avrupa ve diğer batı ülkeleri değerlendirildiğinde fındık (*Corylus avellana* L.), kabuklu yemişler içerisinde en popüler beşinci kabuklu yemıştır (INC, 2019). Türkiye yıllık 287.500 ton üretimi ile toplam üretimin %63'ünü karşılamakta ve dünyada en büyük üretici konumundadır (INC, 2019). Türkiye'de 18 çeşit fındık yetiştirilmekte olup kalitelerine göre Giresun ve Levant olarak ayrılmaktadırlar. Tombul fındık bu türler arasında Giresun kalite olarak sınıflandırılmakta ve Türkiye fındık üretiminin %25-30'ini oluşturmaktadır (Pelvan vd., 2012; Taş ve Gökmen, 2015).

Fındık yan ürünlerinden (zarı, yeşil kabuğu gibi) elde edilen fraksiyonların antioksidan kapasiteleri ile ilgili yayınlar olmasına rağmen (Alasalvar vd., 2006; Shahidi vd., 2007; Barreira vd., 2008; Alasalvar vd., 2009; Pelvan vd., 2012) fındıktan elde edilen fraksiyonlar ile ilgili çalışma sayısı yok denecek kadar azdır. Fındıktan elde edilen ekstratlar ve bunların fraksiyonlarının nütrosötik, gıda takviyesi, ilaç ve kozmetik sektöründe kullanma potansiyeli oldukça yüksektir. Bu sebeple, bu çalışmanın amacı fındığın bileşimindeki polifenolik maddelerin adsorban kolon dolgu maddesi kullanılarak ayrılması ve elde edilen fraksiyonların karakterizasyonudur.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Birinci kalite Türk Tombul fındığı (*Corylus avellana* L.) Giresun'daki Fındık Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Güneş altında kurutulan (3 gün boyunca ~20-25 °C'de) kabuklu fındıklar kontrollü kabinlerde (5 °C sıcaklık ve %65-70 bağıl nemde) saklanmıştır. Analiz öncesi sert kabukları kırılan fındıklar zarları ile birlikte analiz edilmiştir. Tüm kimyasallar Sigma-Aldrich (Poznan, PL)'den temin edilmiştir.

Yağı alınmış örneklerin hazırlanması

Fındıkların yağını alma işlemi Pelvan Pelitli vd. (2017)'nin belirttiği yöntemde küçük değişikliklerle gerçekleştirilmiştir. Özetle, fındıklar kahve değirmeninde (Bosch, Ljubljana, Slovenya) 3 dakika boyunca öğütülmüş ve sonrasında

Soxhlet düzeneğinde hegzan ile yağı uzaklaştırılmıştır (katı:sıvı oranı 1:10, w/v, 3 kez 15 dakikalık işlem, 65 °C).

Ham ekstrelerin hazırlanması

Yağı alınmış fındık örneğindeki fenolik maddeler, katı: sıvı oranı 1:10 (w/v) olacak şekilde 80:20 (v/v) aseton/su karışımı kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Bu işlem için çalkalamalı su banyosu (Julabo SW 22, Seelbach, Almanya) 70 °C'de 15 dakika boyunca kullanılmıştır. Ekstrakte edilen kısım soğuduktan sonra dikkatli bir şekilde süzülüş ve aynı işlem iki kez daha tekrarlanmıştır. Ekstraksiyon işlemi sonrası toplanan sıvı kısımdaki çözgen döner buharlaştırıcıda (model Büchi Rotavapor R-200, Büchi Labortechnik AG, Flawil, İsviçre) vakum altında 40 °C'de uçurulmuştur. Kalan sulu kısım ise dondurmalı kurutucu (Freezone 6, 77530, Labconco Co., Kansas City, MO, ABD) kullanılarak (72 saat boyunca -48 °C ve 0.046 mbar'dan başlayarak) kurutulmuştur. Elde edilen toz ham ekstre analiz edilene kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Fenolik fraksiyonların hazırlanması

Toz ham ekstreyi fraksiyonlarına ayırmak için Pelvan Pelitli vd. (2017)'nin belirttiği yöntem küçük değişikliklerle kullanılmıştır. Özetle, %95 etanolde (v/v) çözünen ham ekstre Sephadex LH-20 gel ile doldurulmuş (5x40 cm) ve %95'lik etanol geçirilmiş kolona dikkatlice verilmiştir. Düşük molekül ağırlıklı fenolik bileşenleri uzaklaştırmak için 1 L etanol akışı verilmiştir. Elde edilen elüsyonlar fraksiyon toplayıcıda (RediFrac, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, İsveç) 4 mL hacimlerde ayrı tüplere toplanmıştır. Her bir tüpün absorbanansı 280 nm'de ölçülmüştür. Elde edilen absorbanans değerlerine göre tüpler dört farklı fraksiyon olacak şekilde bir araya getirilmiştir. Sonrasında kolonda kalan yüksek molekül ağırlıklı fenolik bileşenleri (tanen fraksiyonu) uzaklaştırmak için 600 mL %50 aseton (v/v) akışı verilmiştir. Elde edilen toplamda 5 fraksiyon, döner buharlaştırıcıda (model Büchi Rotavapor R-200, Büchi Labortechnik AG, Flawil, İsviçre) vakum altında 40 °C'de çözgenlerinden uzaklaştırılmıştır.

Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi

Fraksiyonların toplam fenolik madde miktarları, Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak Pelvan vd. (2012)'nin belirttiği üzere analiz edilmiştir. Fraksiyonlar metanolde çözülmüş ve sonuçlar mg gallik asit eşdeğer (GAE)/g ekstre olarak verilmiştir.

Kondense tanen miktarının belirlenmesi

Fraksiyonların kondense tanen miktarları, vanillin metodunun modifiye hali kullanılarak Price vd. (1978)'nin belirttiği üzere analiz edilmiştir. Fraksiyonlar metanolde çözülmüş ve sonuçlar mg kateşin eşdeğer (KE)/g ekstre olarak verilmiştir.

Antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal süpürme kapasitesi

Fraksiyonların antioksidan kapasiteleri, DPPH radikali kullanılarak Amarowicz vd. (2009)'nin belirttiği üzere analiz edilmiştir. Fraksiyonlar metanolde çözülmüş ve sonuçlar başlangıçtaki DPPH radikalinin %50'sini inaktive etmek için mL'de olması gereken ekstre miktarı olan IC₅₀ değeri olarak verilmiştir.

ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonik asit) radikal süpürme kapasitesi

Fraksiyonların antioksidan kapasiteleri, ABTS radikali kullanılarak Koroleva vd. (2014)'nin belirttiği üzere analiz edilmiştir. Fraksiyonlar metanolde çözülmüş ve sonuçlar Trolox eşdeğer (TE)/g ekstre olarak verilmiştir.

FRAP (Demir iyon indirgeyici antioksidan kapasitesi)

Fraksiyonların antioksidan kapasiteleri, FRAP yöntemi kullanılarak Benzie ve Strain (1999)'nin belirttiği üzere analiz edilmiştir. Fraksiyonlar metanolde çözülmüş ve sonuçlar mg FeSO₄.7H₂O/g ekstre olarak verilmiştir.

İstatistiksel analiz. Tüm analizler üç paralel olacak şekilde çalışılmış olup sonuçlar üç paralelin ortalaması ± standart sapma olarak verilmiştir. Şekil olarak verilen sonuçlarda standart sapma bar özelliği kullanılarak verilmiştir. Örnekler arasında istatistiksel açıdan farklılık olup olmadığının

tespiti SPSS 22 versiyon (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kullanılarak analiz edilmiştir. Farklılıkların tespiti için ANOVA ve Student's t-test kullanılmıştır.

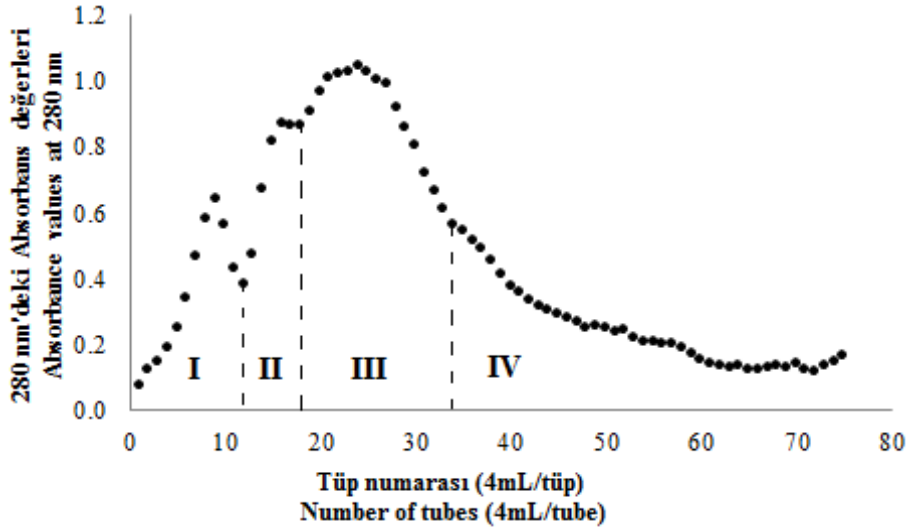
SONUÇ VE TARTIŞMA

Ham ekstrelerin hazırlanması ve fenolik fraksiyonların ayrılması

Fındıktan ham ekstrenin elde edilmesi için %80 aseton/su (v/v) çözeltisi kullanılmıştır. Literatürde de belirtildiği üzere fındıktaki toplam fenolik madde miktarının %60-65'ini oluşturan kondense tanenleri (Contini vd., 2008) ekstrakte etmekte en etkin çözelti olan %80 aseton/su çözeltisi hem yüksek molekül ağırlıklı hem de düşük molekül ağırlıklı fenolik maddelerin ekstraksiyonunda kullanılmaktadır [fındık yeşil kabuğundan ekstraksiyon (Alasalvar vd., 2006); kabuklu yemişlerden ekstraksiyon (Karamać vd., 2007); diğer bitkilerden toplam fenolik madde ekstraksiyonu (Naczek ve Shahidi, 2004; Alasalvar vd., 2009; Monagas vd., 2009)]. Elde edilen ekstrenin verimi 4.27 g/100 g fındık olarak hesaplanmıştır. Karamać vd. (2007)'nin %80 aseton kullanarak yaptıkları çalışmada ham ekstre verimini 8.48 g/100 g fındık, Pelvan Pelitli vd. (2017) ise 5.15 g/100 g fındık olarak belirtmiştir.

Shahidi vd. (2007)'nin %80 etanol kullanarak yaptıkları çalışmada ham ekstre verimini 2.26g/100 g fındık olarak vermiştir. Çalışmalar arasındaki farklılıkların sebebi kullanılan fındığın cinsi, hasat yılındaki iklim koşulları ve kullanılan çözgenin farklı olması olabilir.

Elde edilen ham ekstrenin Sephadex LH-20 gel ile doldurulmuş kolona (5x40 cm) uygulanmasıyla elde edilen etanol elüsyonlarından toplanan 4 mL'lik hacimdeki her tüpün 280 nm'deki absorbans değeri okunmuştur. Elde edilen absorbans değerlerinden oluşturulan grafik yardımıyla ayrı tepe (pik) oluşturan her tüp grubu ayrı bir fraksiyon olarak toplanmıştır. Şekil 1'den görüleceği üzere toplamda dört (4) farklı fraksiyon elde edilmiştir. Etanol elüsyonu sonrası kolonda kalan yüksek molekül ağırlıklı fenolik bileşenleri (tanen fraksiyonu) uzaklaştırmak için kolona verilen aseton elüsyonu ise ayrı bir fraksiyon olarak toplanmıştır. Kolon kromatografisi yöntemi kullanılarak yapılan bu çalışmada toplamda beş (5) fraksiyon elde edilmiş olup verimleri Çizelge 1'de verilmektedir. En düşük verim 0.62 g/100 g fındık ile Fraksiyon I'de elde edilirken en yüksek verim ise 1.97 g/100 g fındık ile Fraksiyon V'te elde edilmiştir.



Şekil 1. Sephadex LH-20 dolgulı kolondan elde edilen etanol elüsyonlarının 280 nm'deki absorbans değerleri

Figure 1. Absorbance values of ethanolic elutions observed from Sephadex LH-20 packed column at 280 nm

Çizelge 1. Elde edilen fraksiyonların verimleri, toplam fenolik madde ve kondense tanen miktarları
 Table 1. Contents of yield, total phenolics, and condensed tannins in fractions

Fraksiyon Fraction	Verim (g/100 g fındık) Yield (g/100 g hazelnut)	Toplam Fenolik Madde (mg GAE /g ekstre) Total Phenolics (mg GAE/ g extract)	Kondense Tanen (mg KE/g ekstre) Condensed Tannins (mg CE/g extract)
Fraksiyon I	0.62 ± 0.03 ^a	3.7 ± 0.1 ^b	0.9 ± 0.2 ^a
Fraksiyon II	0.57 ± 0.04 ^a	2.4 ± 0.0 ^a	n.d.
Fraksiyon III	0.79 ± 0.06 ^b	11.2 ± 0.2 ^c	n.d.
Fraksiyon IV	0.55 ± 0.02 ^a	10.9 ± 0.1 ^c	2.8 ± 0.2 ^b
Fraksiyon V	1.97 ± 0.08 ^c	77.9 ± 1.2 ^d	227 ± 1.3 ^c

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir ($n = 3$).

Aynı sütunda verilen farklı harfler istatistiksel açıdan fark olduğunu göstermektedir ($P < 0.05$).

Kısaltmalar: GAE, Gallik Asit Eşdeğer; KE, Kateşin Eşdeğer.

Data are expressed as means ± the standard deviation ($n = 3$).

Different letters given within a column, shows significant difference ($P < 0.05$).

Abbreviations: GAE, Gallic Acid Equivalent; CE, Catechin Equivalent.

Daha önce Pelvan Pelitli vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada, düşük molekül ağırlıklı (LMW), ileri saflaştırılmış düşük molekül ağırlıklı (LMW-FP) ve yüksek molekül ağırlıklı (HMW) fraksiyonlarına ayrılan fındığın verimi sırasıyla 4.40, 0.54 ve 0.65 mg/100 g fındık olarak raporlanmıştır. Daha önce yapılan çalışmada düşük molekül ağırlığına (LMW) sahip bileşikler tek bir fraksiyon olarak elde edilmişken, bu çalışmada öncekinden farklı olarak, LMW fraksiyonu UV'de verdiği absorpsiyon değerlerine göre ayrılarak toplamda dört ayrı fraksiyon olarak elde edilmiştir.

Toplam fenolik madde miktarları

Elde edilen fraksiyonların toplam fenolik madde miktarları Çizelge 1'de verilmektedir. En düşük fenolik madde miktarı 2.4 mg GAE/g ekstre ile Fraksiyon II ve en yüksek değer 77.9 mg GAE/g ekstre ile Fraksiyon V'te tespit edilmiştir. İstatistiksel açıdan fark tespit edilen ($P < 0.05$) numuneler toplam fenolik madde miktarına göre şu şekilde sıralanmaktadır: Fraksiyon V > Fraksiyon III > Fraksiyon IV > Fraksiyon I > Fraksiyon II.

Literatürde yer alan çalışmalar değerlendirildiğinde; Pelvan Pelitli vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada LMW olarak adlandırılan düşük molekül ağırlığına sahip bileşikler 8 mg GAE/g ekstre ile en düşük değere

sahipken HMW olarak adlandırılan yüksek molekül ağırlığına sahip bileşikler 219 mg GAE/g ekstre ile en yüksek değere sahiptirler. Şeker ve organik asitlerin uzaklaştırıldığı LMW-FP fraksiyonun toplam fenolik madde miktarı ise 47 mg GAE/g ekstre olarak verilmiştir. Pelvan vd. (2012)'nin farklı fındık türlerinde yaptığı çalışmada toplam fenolik madde miktarı 178 mg GAE/100 g fındık ile 727 mg GAE/100 g fındık arasında olduğu belirtilmiştir. Alasalvar vd. (2006)'nin fındık zarından %80 aseton (v/v) ve %80 metanol (v/v) kullanarak elde ettiği fraksiyonlardaki toplam fenolik madde miktarı şu şekildedir: Tanen fraksiyonu (Fr.II) için asetonla ekstraksiyonda 697 mg KE/g ekstre; metanolla ekstraksiyonda 746 mg KE/ g ekstre. Düşük molekül ağırlıklı fenolik maddeler fraksiyonu (Fr. I) 441 mg KE/g ekstre (asetonla ekstraksiyon) ve 442 mg KE/g ekstre (metanolla ekstraksiyon) ile en düşük değerlere sahip olmuştur. Amarowicz vd. (2005)'nin badem ile yaptıkları çalışmada, fenolik madde ham ekstresi, düşük molekül ağırlıklı fenolik maddeler fraksiyonu (Fr. I) ve tanen fraksiyonunun (Fr.II) toplam fenolik madde miktarları sırasıyla 16.1 mg KE/ g ekstre, 7.14 mg KE/ g ekstre ve 80.4 mg KE/ g ekstre olarak verilmiştir.

Kondense tanen miktarları

Elde edilen fraksiyonların kondense tanen miktarları Çizelge 1'de verilmektedir. Fraksiyon II ve

Fraksiyon III'te kondense tanen tespit edilmezken Fraksiyon V 227 mg KE/g ekstre ile en yüksek değere sahiptir. Numuneler arasında istatistiksel açıdan fark tespit edilmiştir ($P < 0.05$).

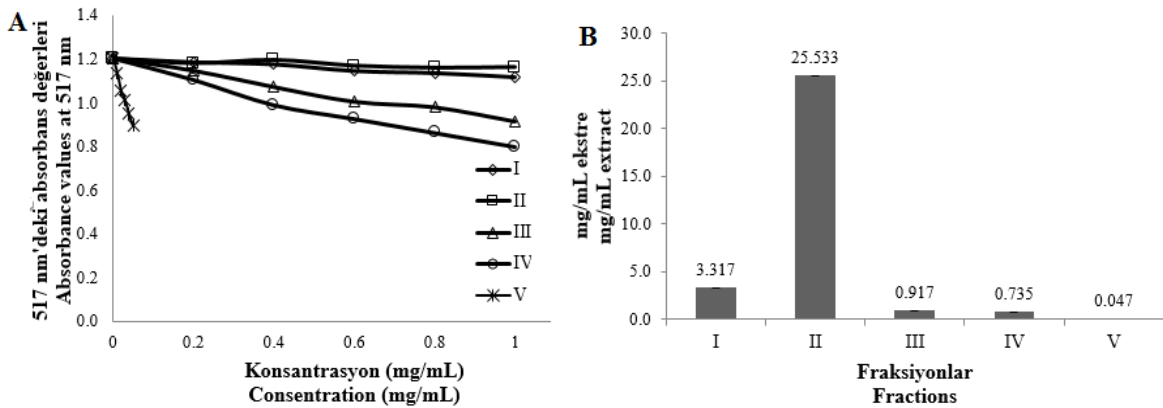
Aseton çözeltilerinin yüksek tanen içeren bitkilerdeki fenolik maddeleri ekstrakte etmede en etkin çözeltili olduğu vurgulanırken (Mueller-Harvey, 2001; Alasalvar vd., 2006; de la Rosa vd., 2011), metanolün ise daha çok düşük molekül ağırlıklı ve yüksek enzim içeriği olan matriksler için uygun olduğu belirtilmektedir (Arapitsas, 2012). Asetonun diğer çözüngenlerden daha etkin olmasının sebebi; kondense tanenlerin yüksek molekül ağırlığına sahip olması ve asetonun polaritesinin de bu maddeler için uygun olmasıdır (Alasalvar vd., 2009).

Pelvan Pelitli vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada LMW olarak adlandırılan düşük molekül ağırlığına sahip bileşikler 5 mg KE/g ekstre ile en düşük değere sahipken HMW olarak adlandırılan yüksek molekül ağırlığına sahip bileşikler 1001 mg KE/g ekstre ile en yüksek değere sahiptir ve tamamının tanenlerden oluştuğu söylenebilir. Şeker ve organik asitlerin uzaklaştırıldığı LMW-FP fraksiyonun kondense tanen miktarı ise 24 mg KE/g ekstre olarak verilmiştir. Pelvan vd. (2012)'nin farklı fındık

türlerinde yaptığı çalışmada kondense tanen miktarları 941 mg KE/100 g fındık ile 1826 mg KE/100 g fındık arasında olduğu belirtilmiştir. Monagas vd. (2009)'nin fıstık, fındık ve badem ekstraktlarını karşılaştırdığı çalışmasında; fındığın ham ekstresi ve yüksek molekül ağırlığına sahip ekstresindeki kondense tanen miktarları badem ve fıstıginkilerden daha yüksek değerlere sahipken, düşük molekül ağırlıklı ekstresindeki değerler badem ve fıstık ile neredeyse benzer değerlerdedir. Kabuklu yemişlerde yapılan kondense tanen çalışmalarında fındık en yüksek kondense tanen miktarına sahipken sıralama şu şekilde verilmiştir: fındık, badem, kaju, kestane, pıkan cevizi ve antep fıstığı (Gu vd., 2004; USDA, 2011).

Antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi **DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal süpürme kapasitesi**

Antioksidan kapasitenin belirlenmesinde en çok kullanılan yöntemlerden biri DPPH radikal süpürme kapasitesi yöntemidir (Locatelli vd., 2010). Yapılan çalışmada, Fraksiyon II 25.533 mg/mL ekstre IC_{50} değeri ile en düşük antioksidan kapasiteye sahipken Fraksiyon V 0.047 mg/mL ekstre ile en yüksek antioksidan kapasiteye sahiptir (Şekil 2).



Şekil 2. DPPH yöntemine göre fraksiyonların antioksidan kapasiteleri (A, farklı konsantrasyondaki fraksiyonların 517 nm'deki absorban değerleri; B, fraksiyonların IC_{50} değerleri – DPPH radikalini %50 düşürmek için gerekli mg ekstre/mL)

Figure 2. Antioxidant capacities of fractions according to DPPH assay (A, Absorbance values of fractions with different concentrations at 517 nm; B, IC_{50} values (the amount of extract required to scavenge the initial DPPH radical by 50% and expressed as mg of fraction/mL of sample solution)

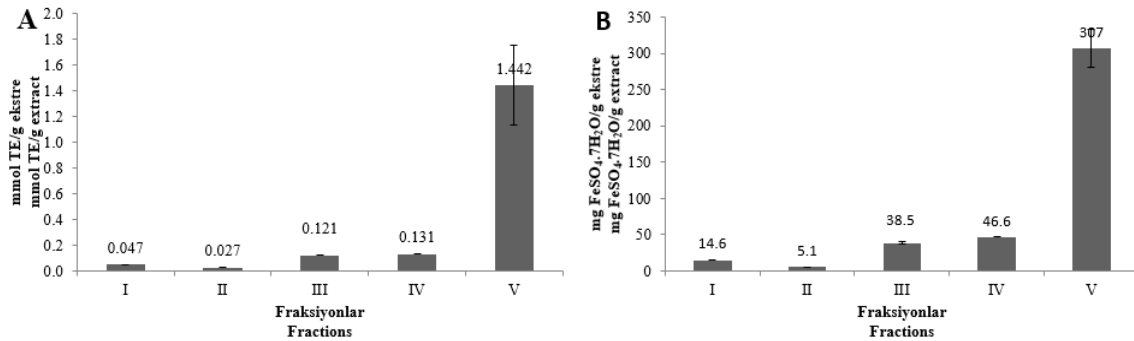
Alasalvar vd. (2006)'nin fındık ve fındığın yeşil kabuğunda iki farklı çözügen ile yaptığı çalışmada %80 aseton kullanarak ekstrakte ettiği fındığın ham ekstresinde IC₅₀ değerini 0.098 olarak bulmuştur. Alasalvar vd. (2009) tarafından yapılan başka bir çalışmada fındık zarı ham ekstresi ve fraksiyonlarının EC₅₀ değerleri sırasıyla ham ekstre 0.026, Fraksiyon I 0.027 ve Fraksiyon II 0.027 olarak belirtilmiştir. Delgado vd. (2010)'nin yaptığı çalışmada aseton ile elde edilen ekstraktın en yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğunu belirtmiş ve farklı kabuklu yemişlerin DPPH yöntemi ile analiz edilen antioksidan kapasitelerini şu şekilde sıralamıştır: ceviz > fındık > çam fıstığı > fıstık > badem. Monagas vd. (2009)'nin yaptığı çalışmada ise fıstık, fındık ve bademin zarlarından elde edilen ham ekstre, düşük molekül ağırlıklı fraksiyon ve yüksek molekül ağırlıklı fraksiyonlardan en yüksek antioksidan kapasiteye sahip olanı her bir kabuklu yemiş için yüksek molekül ağırlıklı fraksiyondur ve birbirine yakın değerlere sahiptir. Ham ekstre ve düşük molekül

ağırlıklı fraksiyonlar değerlendirildiğinde fındık, fıstık ve bademe göre daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip çıkmıştır.

Pelvan Pelitli vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada, elde edilen fraksiyonların DPPH yöntemine göre analiz edilen antioksidan kapasitelerinin sıralaması şu şekildedir: LMW < LMW-FP < HMW. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar daha önce yapılan çalışmalarla uyum göstermektedir.

ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonik asit) radikal süpürme kapasitesi

Antioksidan kapasitenin belirlenmesinde en çok kullanılan yöntemlerden biri de ABTS radikal süpürme kapasitesi yöntemidir. Yapılan çalışmada, Fraksiyon II 0.027 mmol TE/ g ekstre ile en düşük antioksidan kapasiteye sahipken Fraksiyon V 1.442 mmol TE/ g ekstre ile en yüksek antioksidan kapasiteye sahiptir (Şekil 3).



Şekil 3. Fraksiyonların antioksidan kapasiteleri (A, ABTS yöntemine göre; B, FRAP yöntemine göre)
Figure 3. Antioxidant capacities of fractions (A, according to ABTS assay; B, according to FRAP assay)

Shahidi vd. (2007)'nin %80 etanol (v/v) ile yaptığı çalışmada fındığın çekirdek kısmının diğer kısımlarına göre daha düşük antioksidan kapasiteye sahip olduğunu belirtmiştir (29.0 µmol TE/ g ekstre). Monagas vd. (2009)'nin fındık, fıstık ve bademden elde ettiği fraksiyonların antioksidan kapasitelerini ABTS yöntemi ile değerlendirdiği çalışmasında üründen bağımsız olarak sıralamayı şu şekilde vermiştir: HMW > ham ekstre > LMW.

Pelvan Pelitli vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada, elde edilen fraksiyonların ABTS

yöntemine göre analiz edilen antioksidan kapasitelerinin sıralaması şu şekildedir: LMW < LMW-FP < HMW. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar daha önce yapılan çalışmalarla ve diğer antioksidan kapasite analiz yöntemleriyle elde edilen sonuçlarla uyum göstermektedir.

FRAP (Demir iyon indirgeyici antioksidan kapasitesi)

Elde edilen fraksiyonların antioksidan kapasiteleri FRAP yöntemi ile de analiz edilmiştir (Şekil 3). Elde edilen sonuçlar diğer antioksidan kapasite

yöntemleriyle elde edilen sonuçlarla benzer sıralamaya sahiptir.

Pelvan Pelitli vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada, elde edilen fraksiyonların FRAP yöntemine göre analiz edilen antioksidan kapasitelerinin sıralaması şu şekildedir: LMW < LMW-FP < HMW. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar daha önce yapılan çalışmalarla ve diğer antioksidan kapasite analiz yöntemleriyle elde edilen sonuçlarla uyum göstermektedir. Kamiloğlu vd. (2014)'nin kurutulmuş meyve ve kabuklu yemişlerde yaptıkları çalışmada % 0.1 formik asit içeren %75 metanol çözeltisi ile ekstrakte edilen fındığın antioksidan kapasitesi 201 mg TE/100 g fındık olarak raporlanırken bademin antioksidan kapasitesi 20 mg TE/100 g badem ve cevizinki de 1694 mg TE/100 g olarak verilmiştir. Kullanılan farklı çözümler ve farklı birimler sebebiyle mevcut çalışma ve literatür değerleri arasında direkt karşılaştırma yapılması mümkün değildir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, fındığın Sephadex LH-20 gel kolon dolgu maddesi kullanılarak polifenolik fraksiyonlarına ayrılmasıyla elde edilen fraksiyonlardan aseton elüenti ile gelen fraksiyon hem antioksidan kapasite açısından yüksek aktiviteye sahiptir hem de kondense tanenler açısından zengindir. Tanenler sağlık üzerine ve gıda kalitesi üzerine olumlu etkileri olan ve yüksek antioksidan kapasiteye sahip maddelerdir. Bu sebeple fındık, yüksek tanen içeriği sebebiyle sağlık açısından önemli bir kaynak olarak değerlendirilebilir. Bu çalışma sonucunda, düşük molekül ağırlığına sahip fraksiyonların düşük toplam fenolik madde, kondense tanen miktarları ve antioksidan kapasiteleri sebebiyle ayrı ayrı fraksiyonlar olarak elde edilmesine gerek olmadığı, yüksek molekül ağırlıklı fraksiyondan ayrılmasının yeterli olduğu tespit edilmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Avrupa Birliği FP7-NutraHEALTH projesi (Grant no: 316012) tarafından desteklenmiştir. Prof. Dr. Ryszard Amarowicz, Doç. Dr. Cesarettin Alaşalvar ve Dr. Michał

Adam Janiak'a desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

KAYNAKLAR

Alasalvar C., Bolling B.W. (2015). Review of nut phytochemicals, fat-soluble bioactives, antioxidant components and health effects. *Br J Nutr*, 113: 68-78, doi: 10.1017/S0007114514003729.

Alasalvar C., Karamac' M., Amarowicz R., Shahidi F. (2006). Antioxidant and antiradical activities in extracts of hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut green leafy cover. *J Agric Food Chem*, 54: 4826-4832, doi: <https://doi.org/10.1021/jf0601259>.

Alasalvar C., Karamac', M., Kosińska A., Rybarczyk A., Shahidi F., Amarowicz, R. (2009). Antioxidant activity of hazelnut skin phenolics. *J Agric Food Chem*, 57: 4645-4650, doi: <https://doi.org/10.1021/jf900489d>.

Alaşalvar C., Pelvan E. (2009). Günümüzün ve geleceğin gıdaları fonksiyonel gıdalar. *Bilim ve Teknik*, 501: 26-29.

Amarowicz R., Estrella I., Hernández T., Dueñas M., Troszyńska, A., Kosińska A., et al. (2009). Antioxidant activity of a red lentil extract and its fractions. *Int J Mol Sci*, 10: 5513-5527, doi: 10.3390/ijms10125513.

Amarowicz R., Troszyńska A., Shahidi F. (2005). Antioxidant activity of almond seed extract and its fractions. *J Food Lipids*, 12: 344-358, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4522.2005.00029.x>.

Arapitsas P. (2012). Hydrolyzable tannin analysis in food. *Food Chem*, 135: 1708-1717, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.096>.

Armada P.L., Rivas S., Gonzalez B., Moure A. (2019). Extraction of phenolic compounds from hazelnut shells by green processes. *J Food Eng*, 255: 1-8, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.03.008>.

Barreira J.C.M., Ferreira I.C.F.R., Oliveira M.B.P.P., Pereira J.A. (2008). Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower,

- leaf, skins and fruit. *Food Chem*, 107: 1106–1113, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.030>.
- Benzie I.F.F., Strain J.J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol*, 299: 15-27, doi: 10.1016/s0076-6879(99)99005-5.
- Contini M, Baccelloni S, Massantini R, Anelli G. (2008). Extraction of natural antioxidants from hazelnuts (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature. *Food Chem*, 110: 659-669, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.060>.
- de la Rosa L.A., Alvarez-Parrilla E, Shahidi F. (2011). Phenolic compounds and antioxidant activity of kernels and shells of Mexican pecan (*Carya illinoensis*). *J Agric Food Chem*, 59: 152-62, doi: 10.1021/jf1034306.
- Delgado T., Malheiro R., Pereira J.A., Ramalhosa, E. (2010). Hazelnut (*Corylus avellana* L.) kernels as a source of antioxidants and their potential in relation to other nuts. *Ind Crops Prod*, 32: 621–626, doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.07.019>.
- Ghirardello D., Bertolino M., Belviso S., Belloa B.D., Giordano M., Rolle L., Gerbi V., Antonucci M., Spigolon N., Zeppa G. (2016). Phenolic composition, antioxidant capacity and hexanal content of hazelnuts (*Corylus avellana* L.) as affected by different storage conditions. *Postharvest Biol Tech*, 112: 95-104, doi: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.09.039>.
- Gini T.G., Jothi G.J. (2018). Column chromatography and HPLC analysis of phenolic compounds in the fractions of *Salvinia molesta* Mitchell. *Egypt J Basic Appl Sci*, 5: 197–203, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejbas.2018.05.010>.
- Gu L, Kelm M.A., Hammerstone J.F., Beecher G., Holden J., Haytowitz D., Gebhardt S., Prior R.L. (2004). Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J Nutr*, 134: 613–617, doi: 10.1093/jn/134.3.613.
- International Nut & Dried Fruit Council Foundation (INC), International Nut & Dried Fruits Statistical Year Book 2018/2019, https://www.nutfruit.org/files/tech/1553521370_INC_Statistical_Yearbook_2018.pdf. (Erişim tarihi: 01 Temmuz 2019).
- Kamiloglu S., Pasli A.A., Ozcelik B., Capanoglu E. (2014). Evaluating the in vitro bioaccessibility of phenolics and antioxidant activity during consumption of dried fruits with nuts. *LWT - Food Sci Technol*, 56: 284-289, doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.11.040>.
- Karamać M., Kosińska A., Rybarczyk A., Amarowicz R. (2007). Extraction and chromatographic separation of tannin fractions from tannin-rich plant material. *Pol J Food Nutr Sci*, 57: 471-474.
- Koroleva O., Torkova A., Nikolaev I., Khrameeva E., Fedorova T., Tsentlovich M., et al. (2014). Evaluation of the antiradical properties of phenolic acids. *Int J Mol Sci*, 15: 16351-16380, doi: 10.3390/ijms150916351.
- Lainas K., Alasalvar C., Bolling B.W. (2016). Effects of roasting on proanthocyanidin contents of Turkish Tombul hazelnut and its skin. *J Funct Foods*, 23: 647-653, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.03.029>.
- Locatelli M., Travaglia F., Coisson J.D., Martelli A., Stévigny C., Arlorio M. (2010). Total antioxidant activity of hazelnut skin (Nocciola Piemonte PGI): Impact of different roasting conditions. *Food Chem*, 119: 1647-1655, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.048>.
- Milevskaya V.V., Prasad S., Temerdashev Z.A. (2019). Extraction and chromatographic determination of phenolic compounds from medicinal herbs in the Lamiaceae and Hypericaceae families: A review. *Microchem J*, 145: 1036–1049, doi: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.11.041>.
- Monagas M., Garrido I., Lebron-Aguilar R., Gomez-Cordoves M.C., Rybarczyk A.,

- Amarowicz R., et al. (2009). Comparative flavan-3-ol profile and antioxidant capacity of roasted peanut, hazelnut, and almond skins. *J Agric Food Chem*, 57: 10590-10599, doi: 10.1021/jf901391a.
- Mueller-Harvey I. (2001). Analysis of hydrolysable tannins. *Anim Feed Sci Technol*, 91: 3-20, doi: [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00227-9](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00227-9).
- Naczki M., Shahidi F. (2004). Extraction and Analysis of Phenolics in Food. *J Chromatogr*, 1054: 95-111, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.059>.
- Napolitano A., Cerulli A., Pizza C., Piacente S. (2018). Multi-class polar lipid profiling in fresh and roasted hazelnut (*Corylus avellana* cultivar "Tonda di Giffoni") by LC-ESI/LTQOrbitrap/MS/MSⁿ. *Food Chem*, 269: 125-135, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.06.121.
- Pelvan E., Alasalvar C., Uzman S. (2012). Effects of roasting on the antioxidant status and phenolic profiles of commercial Turkish hazelnut varieties (*Corylus avellana* L.). *J Agric Food Chem*, 60: 1218-1223, doi: 10.1021/jf204893x.
- Pelvan Pelitli E., Janiak M.A., Amarowicz R., Alasalvar C. (2017). Protein precipitating capacity and antioxidant activity of Turkish Tombul hazelnut phenolic extract and its fractions. *Food Chem*, 218: 584-590, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.070>.
- Price M.L., Scoyoc S.V., Butler L.G. (1978). A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J Agric Food Chem*, 26: 1214-1218, doi: <https://doi.org/10.1021/jf60219a031>.
- Shahidi F., Alasalvar C., Liyana-Pathirana C.M. (2007). Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut byproducts. *J Agric Food Chem*, 55: 1212-1220, doi: <https://doi.org/10.1021/jf062472o>.
- Taş N.G., Gökmen V. (2015). Bioactive compounds in different hazelnut varieties and their skins. *J Food Comp Anal*, 43: 203-208, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.07.003>.
- Taş N.G., Yılmaz C., Gökmen V. (2019). Investigation of serotonin, free and protein-bound tryptophan in Turkish hazelnut varieties and effect of roasting on serotonin content. *Food Res Int*, 120: 865-871, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.051>.
- United States Department of Agriculture (USDA). Database for the Proanthocyanidin Content of Selected Foods, <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>. (Erişim tarihi: 15 Aralık 2011).
- Yuan B., Lu M., Eskridge K.M., Isom L.D., Hanna M.A. (2018). Extraction, identification, and quantification of antioxidant phenolics from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shells. *Food Chem*, 244: 7-15, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.116>