

BASINÇLI SU EKSTRAKSİYONUyla ELDE EDİLEN ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ EKSTRAKTININ POLİFENOL VE ORGANİK ASİT İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ¹

Emine NAKİLCİOĞLU TAŞ²

Semih ÖTLEŞ³

ÖZET

Bu çalışmada doğa dostu bir ekstraksiyon sistemi kullanılarak, şarap ve üzüm suyu sanayilerinin önemli atıklarından biri olan siyah üzüm çekirdeklerinden polifenol ve organik asit içeriği zengin bir ekstraktın elde edilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla pilot ölçekte basınçlı su ekstraksiyonu sistemi yardımıyla 50 bar basınç altında, 50°C sıcaklıkta, 90 dk'da elde edilen üzüm çekirdeği ekstraktının polifenol ve organik asit içeriği, kromatografik ve spektroskopik yöntemlerle belirlenmiştir. Üzüm çekirdeği ekstraktının toplam fenolik madde miktarı gallik asit eş değeri cinsinden %49.77 (w/w) ve DPPH yöntemiyle belirlenen antioksidan aktivitesi % inhibisyon cinsinden 90.90, antiradikal etkinliği ise %98.13 olarak tespit edilmiştir. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) analizi sonucunda organik asit olarak ekstrakt içerisinde sırasıyla tartarik, okzalik, L-malik ve fumarik asitlerin bulunduğu ve polifenol olarak hidroksitirosol ve (+)-kateşin'in olduğu tespit edilmiştir. Üzüm çekirdeği ekstraktı, piyasada ticari olarak satışı gerçekleşen bir üründür. Basınçlı su ekstraksiyonu yöntemiyle elde edilen ekstrakt, zengin polifenol içeriğinin yanı sıra yapısındaki organik asitlerin varlığıyla güçlü bir aromaya ve arzu edilen stabiliteye sahiptir. Böylece bu çalışmada kullanılan basınçlı su ekstraksiyon yönteminin de desteğiyle, daha kaliteli ve sağlık etkileri daha baskın üzüm çekirdeği ekstraktının piyasaya sunulmasının mümkün olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Basınçlı su ekstraksiyonu, organik asitler, polifenoller, üzüm çekirdeği

ABSTRACT

DETERMINATION OF ORGANIC ACID AND POLYPHENOL CONTENT IN GRAPE SEEDS OBTAINED WITH PRESSURIZED WATER EXTRACTION

In this study, using an eco-friendly extraction system, it is aimed to obtain extract with high polyphenol and organic acid content from black grape seeds which are one of the most important industrial waste for wine and grape juice. For this purpose grape seed extract was obtained by using pressurized water extractor on pilot scale at 50 bar, 50°C and 90 min and its polyphenol and organic acid content was determined by chromatographic and spectroscopic methods. Total phenolic content was found as 49.77% (w/w) in terms of gallic acid equivalent and antioxidant activity that was

¹ Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: Eylül 2016

² Araş. Gör., Dr., Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İZMİR

³ Prof. Dr., Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İZMİR

determined by DPPH method was 90.90% as inhibition, 98.13% as antiradical activity. As a result of high performance liquid chromatography (HPLC) analysis, tartaric, oxalic, L-malic acid and fumaric acid were found and the presence of hydroxytyrosol and (+)-catechin as polyphenol were revealed in extract. Grape seed extract is a commercially available product in the market. The extract obtained by the pressurized water extraction method, has a strong aroma and desirable stability with organic acids in the structure as well as the rich of polyphenols content. Thus, grape seed extract which is a higher quality and more prominent health effects will be possible to put on the market with the support of eco-friendly extraction method used.

Keywords: pressurized water extraction, organic acids, polyphenols, grape seed

GİRİŞ

Üzüm (*Vitis vinifera*) beyaz, kırmızı ve siyah renge sahip olabilen, üzümü meyveler sınıfında yer alan bir meyvedir. Kabuk, pulp ve çekirdek olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. Aroma, renk ve tat maddelerinin büyük bir kısmını ihtiva eden kabuk, olgun bir tanenin yaklaşık %5–12'sini oluşturmaktadır. Meyvenin üst kısmında bulunan bu ince ve mumsu tabakanın görevi, olgun taneyi su kaybına ve mekanik yaralanmalara karşı korumasıdır [1]. Tane ağırlığının %80–90'nı ise pulp kısmına aittir. Kabuk pulpa, sıkı bir şekilde yapışık durumdadır. Tane ağırlığının %0–5'ini oluşturan çekirdeklerin sayısı ise, tane içinde 0 ile 6 arasında değişiklik göstermektedir [1, 2].

Üzüm çekirdeği ekstraktı, üzüm suyu veya şarap üretiminin atıklarından olan üzüm çekirdeğinin ekstraksiyonu, kurutulması ve saflaştırılması sonucunda elde edilen, polifenolik bileşiklerce zengin bir yan üründür [3, 4]. Üzüm çekirdeği ekstraktı, "Everything Added to Food in the United States (EAFUS)" de üzüm çekirdeği ekstresi ismiyle besin takviyesi olarak listelenerek piyasada satılmakta ve aynı zamanda Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından GRAS olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte birkaç çalışmada üzüm çekirdeği ekstraktının tek başına ya da diğer besin takviyeleriyle birlikte alındığında antitrombosit özellikler sergilediği, diğer ilaçlarla ya da takviyelerle interaksiyona girerek yan etkiler gösterdiği belirtilmektedir [3, 5, 6]. Üzüm çekirdeği ekstraktı gıda uygulamalarında (%0.01–1) olduğu gibi, oldukça düşük farmakolojik dozlarda (150–300 mg/gün) kullanıldığı zaman etkilidir [3, 7]. Ayrıca, sıçanlarda belirlenen yan etki göstermediği düzeyi (NOAEL) 1.78 g/kg vücut ağırlığı/gün olarak belirlenmiştir ve bu konsantrasyon,

normalde gıda uygulamalarında kullanılan daha yüksektir [3, 8]. Üzüm çekirdeğinin kırmızı rengi ve buruk tadı, yüksek konsantrasyonlarda kullanımı sonucunda gıda ürünlerinin renk ve duyu özelliklerini etkileyebilmektedir [3, 9, 10].

Üzüm çekirdeği ekstraktı, antioksidan ve anti-enflamatuar özellikler gösteren kompleks bir polifenolik karışımdır [11, 12, 13, 14]. Yapısında ağırlıklı olarak proantosiyanidinler, flavonoidler ve stilbenler bulunmaktadır [15, 16]. Üzüm çekirdeğinde flavonoidler oldukça yüksek miktarda bulunmaktadır ve çoğu monomerik kateşinler ile az miktarda kuersetin gibi flavonollerden oluşmaktadır [15, 17]. Üzüm çekirdeği ekstraktı da, proantosiyanidinlerin kateşin, epikateşin ve epikateşin–3–O–galat gibi monomerik fenolik bileşik formları ile dimerik, trimerik ve tetramerik prosiyanidin formları bakımından zengindir. Bunlar galik asit ile birleşerek galat esterlerini ve en sonunda glikozitleri oluşturmaktadır. [3, 10, 18]. Flavonoid olmayan yapılara ise üzüm kabuğunda sıklıkla rastlanılmaktadır. Bunlar, Fransız Paradoksunun temeli olan resveratrol gibi stilbenleri içermektedir [15, 19]. Üzüm çekirdeğinde bulunan proantosiyanidinler, hücre döngüsünü durdurma ve apoptozu başlatma yoluyla antineoplastik etki göstermektedir [15, 20]. Ayrıca üzümdeki polifenollerin kardiyovasküler hastalıklar, obezite, hipertansiyon ve dislipideminin görülme riskini azaltan yararlı sağlık etkilerinden de faydalanılmaktadır. Bunun yanı sıra üzüm çekirdeği polifenollerinin son yıllarda fast-food tarzı beslenmeyle ortaya çıkan obeziteyi, iskemi reperfüzyon hasarını önlediği ve AD transjenik fare modelinini içeren çeşitli deneylerde beyini koruduğu ortaya konulmuştur [11].

Üzüm, üzüm çekirdeği ekstresi ve şarabın organik asit kompozisyonu oldukça önemlidir. Çünkü ürünün organoleptik özellikleri (aroma, renk ve lezzet), stabilitesi ve mikrobiyal kontrolü üzerinde etkilidir. Tartarik asit ve malik asit üzüm suyunda bulunan baskın organik asitlerdir ve diğer yandan süksinik ve sitrik asitler ise düşük bir oranda bulunmaktadır [21, 22, 23]. Organik asit miktarındaki artışın sonucunda, asidik ve ekşi tatta artış meydana geldiği gözlemlenmektedir [24].

Bu çalışma ile özellikle şarap sanayisinin önemli atıklarından biri olan siyah üzüm çekirdeklerinin, doğa dostu bir ekstraksiyon sistemi olan basınçlı su ekstraksiyonu yardımıyla elde edilen ekstraktın organik asit ve polifenolik karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Böylece üzüm çekirdeği ekstresinin eldesinde, yaygın olarak kullanılan tekniklere alternatif doğa dostu bir yönteminin uygulanması ve fenolik bileşiklerce zengin bir ekstraktın eldesi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca üzüm çekirdeği ekstraktının organik asit içeriğinin belirlendiği bir çalışmaya henüz rastlanılmamış olması sebebiyle, üzüm çekirdeği ekstraktında fenolik bileşiklerin yanı sıra organik asitlerin de belirlenmesi temel alınmıştır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Çal karası cinsi üzüm çekirdekleri, Denizli'nin Çal ilçesinden 2013 yılı Ekim ayında kurutulmuş formda tedarik edilerek analiz için öğütülmüştür.

Metot

Ekstraksiyon

Öğütülmüş üzüm çekirdeklerinin ekstraksiyonu, Işıl Proje Ltd. Şti. tarafından geliştirilen "Pilot Ölçekte Basınçlı Su Ekstraktörü" kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sistem 5 lt'lik ekstraktör, iki adet pompa, su banyosu, azot tüpü, toplama kabı ve ekstraktör cidarından sıcaklık kontrolü amacıyla kullanılan multimetreden oluşmaktadır. Öğütülen örnek, ekstraksiyon haznesine doldurulmasından sonra ekstraksiyon haznesi, ekstraktöre yüklenmiştir.

Daha sonra uygun sıcaklığa ve basınca getirilen sub-kritik evredeki suyun ekstraksiyon haznesine giriş yapmasıyla birlikte, statik sistemde ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon süresinin sonunda ekstraksiyon haznesindeki ekstrakt, uygun akış hızında sistemden tahliye edilerek soğutulmuştur. Gerekli görüldüğü durumlarda ekstrakt, konsantrasyon ve temizleme işlemlerine tabi tutulmuştur. Ekstraksiyonda kullanılan suyun O₂'ni N₂ yardımıyla ortamdan uzaklaştırılmıştır.

Ekstraksiyon aşamasında, daha önce gerçekleştirilen bir çalışmada fenolik bileşiklerce zengin ekstrakt elde etmek amacıyla geliştirilen ekstraksiyon parametrelerinden yararlanılmıştır. Optimum sıcaklık, basınç ve süre değeri olarak 50°C–50 bar–90 dk kullanılmıştır [25]. Elde edilen su ekstraktı, polifenolik ve organik asit içeriği belirlenmek üzere analize alınmıştır.

Toplam fenolik madde miktarı tayini

Üzüm çekirdeği ekstraktının toplam fenolik madde miktarı, Singleton ve Rossi [26] tarafından geliştirilen, Li ve ark. [27] tarafından modifiye edilen yöntemle göre belirlenmiştir. Uygun oranda seyreltilen 0.5 ml ekstrakt üzerine 0.2 N 2.5 ml Folin–Ciocalteu reaktifi ve 2 ml %7.5 Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilerek karıştırılmıştır. 30 dk boyunca karışımlar, oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletilmelerinin ardından absorbans değerleri 760 nm'de tespit edilmiştir. Sonuç, galik asit eş değeri (GAE) cinsinden ifade edilmiştir.

DPPH yöntemi ile antioksidan aktivite tayini

Ekstraktın antioksidan kapasitesinin ölçümü, Singh ve ark. [28] tarafından kullanılan DPPH radikal indirgeme aktivitesi metodunun modifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 100 µl ekstrakt üzerine saf metanolde hazırlanan 0.1 mM DPPH radikalinden 3.9 ml ilave edilmiştir. Vortekslenen karışımlar, 20 dk süreyle karanlıkta oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol çözeltisinde, ekstrakt yerine 100 µl saf su ve kör çözelti olarak da saf metanol kullanılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda spektrofotometrede 515 nm'de absorbans değeri belirlenerek aşağıdaki formüller ışığında % inhibisyon ve % antiradikal aktivite değerleri belirlenmiştir.

$$\% \text{ Inhibisyon} = \frac{(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}})}{A_{\text{kontrol}}} \times 100$$

$$\text{Antiradikal aktivite} = A_{\text{kontrol}} - \left(\frac{A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \right) \times 100$$

Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile fenolik bileşiklerin tayini

Üzüm çekirdeği ekstraktının fenolik bileşikleri Nakilcioğlu-Taş [25] tarafından geliştirilen yöntemle, kalitatif ve kantitatif olarak Agilent 1200 model HPLC-DAD cihazı yardımıyla belirlenmiştir. C₁₈ kolon, 40°C kolon sıcaklığı, 20 µl enjeksiyon hacmi, 0.7 ml/dk akış hızı kullanılmıştır. Mobil faz olarak %2.5 asetik asit içeren sulu çözelti ve metanol'den faydalanılarak dereceli elüsyon sistemiyle çalışılmıştır. 190–400 nm dalga boyu aralığında standart olarak 11 farklı fenolik asit ve flavonoid (hidroksitirosol, (+)-kateşin, klorogenik asit, vanilik asit, şiringik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, luteolin-7-O-glukosid, oleuropein, apigenin-7-O-glukosid ve *trans*-sinamik asit) analize alınmıştır. Standart çözeltide yer alıp ekstraktta bulunan polifenoller belirlenmiştir. Saptanan fenolik bileşenlerin konsantrasyonları, dış standart metoduna göre hesaplanmıştır. Ayrıca laboratuvar içi metot validasyonu (LOD, LOQ, geri kazanım) gerçekleştirilmiştir.

Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile organik asitlerin tayini

Üzüm çekirdeği ekstraktının organik asitleri Alper ve ark. [29] tarafından kullanılan yöntemin modifikasyonu ile Agilent 1200 model HPLC-DAD cihazı kullanarak belirlenmiştir. 1:3 oranında KH₂PO₄ ile seyreltilen örnek, C₁₈ katı faz ekstraksiyon kartuşuyla temizlenmesinin ardından analize tabi tutulmuştur. C₁₈ kolon, 30°C kolon sıcaklığı, 20 µl enjeksiyon hacmi, 0.8 ml/dk akış hızı kullanılarak; pH'sı 2.4'e ayarlanmış 0.2 M KH₂PO₄ mobil fazla izokritik sistemle çalışılmıştır. 210 nm dalga boyunda okzalik, tartarik, kuinik, L-malik, maleik, L-askorbik, sitrik ve fumarik asit olmak üzere 8 adet organik asit standardı analize alınmıştır.

Ekstraktta bulunan organik asitler, kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmiştir. Saptanan organik asitlerin konsantrasyonları, dış standart metoduna göre hesaplanmıştır. Kullanılan yöntemin laboratuvar içi metot validasyonu (LOD, LOQ, geri kazanım) gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Bulgular

Üzüm çekirdeğinin ekstraksiyonu, 2 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir ve ekstraktta tüm analizler, 2 paralel 2 tekrar şeklinde uygulanmıştır.

Üzüm çekirdeği ekstraktının toplam polifenolik içeriği ve antioksidan aktivitesi Çizelge 1'de belirtildiği gibidir.

HPLC ile kalitatif ve kantitatif olarak belirlenen fenolik bileşikler ve yöntemin laboratuvar içi validasyonuna ait değerler Çizelge 2'de verilmektedir. HPLC analizi sonucunda üzüm çekirdeği ekstraktında, 280 nm dalga boyunda çalışılan 11 fenolik bileşik standardı arasından iki tanesi (hidroksitirosol ve (+)-kateşin) tespit edilmiştir (Şekil 1). 9 farklı konsantrasyonda çizdirilen ve R²'leri 0.99'un üzerinde olan kalibrasyon eğrileri kullanılarak fenolik bileşik miktarları hesaplanmıştır.

Çizelge 3'te, üzüm çekirdeği ekstraktında bulunan organik asitler, miktarları ve % geri kazanım değerleri gösterilmektedir. HPLC sisteminde gerçekleştirilen organik asit analizi sonuçlarına göre üzüm çekirdeği ekstraktında, çalışılan 8 organik asit standardı arasından dört tanesine (okzalik asit, tartarik asit, malik asit ve fumarik asit) rastlanılmıştır (Şekil 2). 5 farklı konsantrasyon kullanılarak çizilen ve R²'leri 0.99'un üzerinde olan kalibrasyon eğrileri yardımıyla organik asitlerin miktarları belirlenmiştir.

Çizelge 1. Üzüm çekirdeği ekstraktının toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivitesi

Table 1. Total phenolic content and antioxidant activity of grape seed extract

Üzüm çekirdeği ekstraktı / Grape seed extract	Miktar / Amount
Toplam fenolik madde miktarı (g/100 g GAE) / Total phenolic content (g/100 g GAE)	49.77 ± 0.03
Antiradikal aktivite (%)* / Antiradical activity (%)*	98.13 ± 0.79
Inhibisyon (%)* / Inhibition (%)*	90.90 ± 0.79

Değerler, ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

*Analiz sonuçları, DPPH radikal süpürme aktivitesi analizine göre verilmiştir.

Values are given as mean±standard deviation.

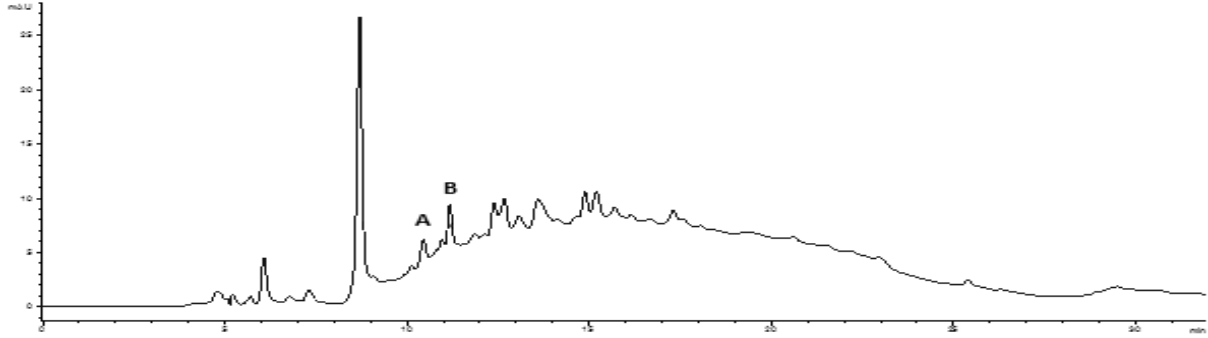
*Analysis results were determined according to DPPH radical scavenging activity analysis.

Çizelge 2. Üzüm çekirdeği ekstraktında belirlenen fenolik bileşiklerin alıkonma zamanları, miktarları ve % geri kazanım değerleri, yöntemin hassaslık parametreleri

Table 2. The retention time and amount of phenolic compounds identified in grape seed extract and its % recoveries, the sensitivity parameters of the method

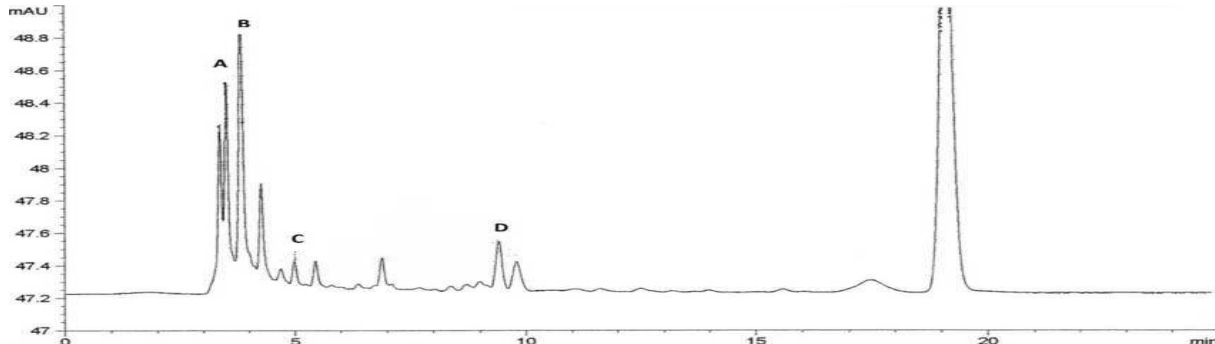
Fenolik bileşikler Phenolic compounds	Alıkonma zamanı Retention time	Miktar (mg/L) Amount	Geri kazanım (%) Recovery	Tespit limiti (LOD) (mg/L) Limit of detection	Tayin limiti (LOQ) (mg/L) Limit of quantification (LOQ)
Hidroksitirasol Hydroxytyrosol	10.457	13.40 ± 0.18	92.85	0.0860	0.2862
(+)-Kateşin (+)-Catechin	11.176	142.60 ± 0.19	94.42	0.2260	0.7534

Değerler, ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.
Values are given as mean±standard deviation.



Şekil 1. Üzüm çekirdeği ekstraktında bulunan fenolik bileşiklerin kromatogramı (A: Hidroksitirosol, B: (+)-Kateşin)

Figure 1. The chromatogram of phenolic compounds in grape seed extract (A: Hydroxytyrosol, B: (+)-Catechin)



Şekil 2. Üzüm çekirdeği ekstraktında bulunan organik asitlerin kromatogramı (A: Okzalik asit, B: Tartarik asit, C: L-malik asit, D: Fumarik asit)

Figure 2. The chromatogram of organic acids in grape seed extract (A: Oxalic acid, B: Tartaric acid, C: L-malic acid, D: Fumaric acid)

Çizelge 3. Üzüm çekirdeği ekstraktında tespit edilen organik asitlerin alıkonma zamanları, miktarları ve % geri kazanım değerleri

Table 3. The retention time and amount of organic acids identified in grape seed extract and its % recoveries

Organik asitler / Organic acids	Alıkonma zamanı / Retention time	Miktar (mg/L) / Amount	Geri kazanım (%) / Recovery (%)
Okzalik asit / Oxalic acid	3.499	114.40 ± 5.52	101.02
Tartarik asit / Tartaric acid	3.817	1115.98 ± 17.52	103.85
L-malik Asit / L-malic acid	4.978	207.41 ± 13.01	99.78
Fumarik asit / Fumaric acid	9.400	3.64 ± 0.06	99.55

Değerler, ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.
Values are given as mean±standard deviation.

TARTIŞMA

Üzüm çekirdeği ekstraktında gerçekleştirilen analizlere ait sonuçlar incelendiğinde, ekstraktın toplam fenolik madde miktarının %49.77 gallik asit eş değeri (w/w), DPPH yöntemiyle belirlenen antiradikal aktivitesinin %98.13 ve inhibisyon değerinin %90.90 olarak saptandığı görülmektedir. Üzüm çekirdeğinin toplam polifenol içeriğinin Mandic ve ark. [30] tarafından belirlenen değerden (%81.6–82.2 gallik asit eş değeri (w/w)) düşük; fakat Jayaprakasha ve ark. [31]'nin saptadığı değerler (kateşin eş değeri cinsinden %46±1.6 (w/w) (aseton:su:asetik asit (90:9.5:0.5)) ve %38±1.4 (w/w) (metanol:su:asetik asit (90:9.5:0.5)) ile Shiyaji [32] tarafından belirlenen sonuçlarla (%43–48 gallik asit eş değeri) benzerlik gösterdiği dikkati çekmektedir.

DPPH yöntemiyle belirlenen antioksidan aktiviteyi belirtirken, kullanılan pek çok ifade şekli bulunmaktadır. Sonuçlar EC50 cinsinden, Trolox eş değeri cinsinden, antiradikal aktivite ya da % inhibisyon olarak verilebilmektedir. Literatürdeki üzüm çekirdeği ekstraktının antioksidan aktivitesini belirleyen çalışmalara bakıldığında da, analiz sonucunun bahsedilen formların tümünde verildiği görülmektedir. Bu çalışmalar arasında Baydar ve ark.'nın [33] gerçekleştirdikleri çalışmaya bakıldığında, üzüm çekirdeği ekstraktının antiradikal aktivite değeri %92.29–%92.90 aralığında bulunmuştur. Bu çalışmada ise, antiradikal aktivitesi daha yüksek bir üzüm çekirdeği ekstraktının elde edildiği gözlemlenmektedir.

Üzüm çekirdeği ekstraktının fenolik bileşiklerine bakıldığında, yapıda ağırlıklı olarak kateşinlerin bulunması beklenilmektedir. Baydar ve ark. [33] yürüttükleri çalışmada siyah üzüm çeşitlerinden olan Cabernet Sauvignon ve Kalecik Karası'nın çekirdeklerinde sırasıyla (+)–kateşin (970.70 ve 517.13 mg/100 g), (–)–epikateşin, gallik asit, kuersetin ve o–kumarik asitin varlığına rastlanılmıştır. Farhadi ve ark. [34] 6 üzüm çeşidinde gerçekleştirdikleri çalışmada, üzüm çekirdeklerinde sırasıyla kateşin (124–156 µg/g), (–)–epikateşin, gallik asit, kuersetin ve rutin bulunduğunu belirlemişlerdir. Üzümün dış kabuğu, pulpu, sapı ve yaprağı gibi diğer kısımlarında olmasına rağmen, çekirdeğinde resveratrolün

bulunmadığını belirlemişlerdir. Bu çalışmada ise, literatüre benzer biçimde, (+)–kateşin'in yüksek oranda (142.60 mg/L) bulunduğu ve miktarının Baydar ve ark.'nın [33] elde ettiği sonuçlardan düşük; ama Farhadi ve ark.'nın kine [34] yakın olduğu gözlemlenmektedir.

Literatürde basınçlı su ekstraksiyonu sistemi kullanılarak üzüm çekirdeğinden polifenolik bileşiklerin elde edilmesi ile ilgili gerçekleştirilen herhangi bir araştırmaya rastlanılamamaktadır. Basınçlı çözgen ekstraksiyonu sisteminin üzüm çekirdeğinden antioksidan madde ekstraksiyonunda kullanımı ile ilgili ise, sadece iki araştırma bulunmaktadır. Bunlardan ilki Curko ve ark. [35] tarafından gerçekleştirilmiş ve toplam fenolik madde miktarı Plavac mali çeşidi üzüm çekirdeğinde 16.8 g/100 g ve Babić çeşidi üzüm çekirdeğinde 21.4 g/100 g olarak tespit edilmiştir. Bu araştırmayla kıyaslandığında, gerçekleştirilen çalışmada toplam fenolik madde miktarı daha yüksek bir üzüm çekirdeği ekstraktının üretildiği görülmektedir. Diğer araştırmada ise, Rockenbach ve ark. [36] üzüm çekirdeğinin flavan–3–ollerini kalitatif olarak karakterize etmişlerdir. Saptadıkları flavonoidler arasında (+)–kateşin'in var olması da, bu çalışmayla benzerlik göstermesine yol açmaktadır. Bunların dışında bu çalışmada elde edilen tüm sonuçların, literatüre benzerlik ya da literatüre üstünlük gösterdiği gözlemlenmektedir. Literatürdeki çalışmalarda üzüm çekirdeği ekstraktının elde edilmesi aşamasında katı–sıvı ekstraksiyonu, süperkritik CO₂ ekstraksiyonu, ultrasonik ekstraksiyon gibi geleneksel yöntemlerin kullanıldığı dikkati çekmektedir. Dolayısıyla bu çalışmada elde edilen sonuçlarla, basınçlı su ekstraksiyonu sisteminin en az diğer geleneksel yöntemler kadar zengin fenolik içeriğe sahip ekstrakt elde etmeyi mümkün kıldığı dikkatleri çekmektedir. Fakat ekstraksiyonun su ile gerçekleştirilmesi, atık, ekstraksiyon maliyeti ve toksik çözgenlere maruz kalma vs. konularında diğer ekstraksiyon sistemlerine kıyasla basınçlı su ekstraksiyonunun daha üstün olmasını sağlamaktadır. Ayrıca elde edilen ekstraktın polifenolik içeriği, maliyetinin ucuz olması ve toksik çözgen kullanılmadan elde edilmesi göz önüne alındığında ürünün, gıda katkısı/ekstresi olarak kullanımı bakımından avantajlı olduğu ön plana çıkmaktadır.

Bitkilerde yaygın olarak bulunan organik asitler, okzalik asit, tartarik asit, L-askorbik asit, sitrik asit ve L-malik asit olarak sıralanabilmektedir. Basınçlı su ekstraksiyonu yöntemi ile elde edilen üzüm çekirdeği ekstraktında, bunlardan üçünün (okzalik asit, tartarik asit, L-malik asit) yanı sıra fumarik asidin varlığına da rastlanılmıştır. Şarap asidi olarak da adlandırılan tartarik asidin, ekstraktta yüksek oranda tespiti beklenen bir olgudur. Tartarik asidi sırasıyla, L-malik asit, okzalik asit ve fumarik asidin takip ettiği görülmektedir. Üzüm çekirdeği ekstraktının organik asit profilinin belirlendiği herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanılamaması sebebiyle, çalışmanın sonuçları üzümün organik asit içeriği ile kıyaslanmıştır. Bu konuda da yine var olan sınırlı çalışmalardan biri, Silva ve Queiroz [21] tarafından ortaya konulmuştur. Touriga Nacional, Tinta Roriz ve Syrah üzüm çeşitlerinde okzalik asidin, Alfrocheiro cinsinde ise malik asitin baskın organik asit olduğu ifade etmişlerdir. Ayrıca çalışmada, bu çalışmanın sonuçlarını destekler nitelikte, üzüm ve şaraptaki baskın organik asitlerin tartarik ve malik asit olduğu ve bunların miktarının, şarabın kimyasal ve biyolojik stabilitesini etkilediği, üzümde ise hasat zamanının belirlenmesinde sıklıkla kullanıldığı belirtilmiştir.

SONUÇ

Bu çalışmada, ekstraksiyonda çevre dostu ve güncel eğilimlerden biri olan basınçlı su ekstraksiyonunun pilot ölçekte üzüm çekirdeğine uygulanması sonucunda elde edilen ekstraktın, fenolik karakterizasyonunun ve organik asit bileşiminin belirlenmesi üzerine odaklanılmıştır. Üzüm çekirdeği ekstraktı, sıvı ya da kapsül formunda ticari olarak satışı gerçekleştirilen bir besin desteğidir. Uygun dozlarda tüketimi, sağlık üzerine pek çok olumlu etkiyi beraberinde getirmektedir. Fakat ürünlerin standardize olması gerekmektedir ve bünyesindeki aktif bileşiklerin olabildiğince yüksek oranlarda ekstrakte edilerek depolama boyunca stabiliteyi koruması kaydıyla bu durum geçerlidir. Çalışmada kullanılan basınçlı su ekstraksiyonu ile aktif bileşiklerin minimum kayıpla ekstraksiyonları gerçekleştirilmiş ve çözgen olarak suyun

kullanımı ile hem maliyet azaltılmış hem de toksik çözgenlerin neden olduğu sağlık ve atık konusundaki problemler ortadan kaldırılmıştır. Suyun mükemmel çözücü kabiliyeti, basınç ve sıcaklık artırımıyla desteklenince, ortaya fenolik ve organik asit içeriği bakımından literatürdekine benzer hatta daha iyi bir ekstraktın eldesi mümkün olmuştur. Böylece piyasadaki ekstrelelere alternatif bir üzüm çekirdeği ekstraktının üretimi gerçekleştirilmiştir. Maliyeti daha düşük, sanayi ölçekli üretime uygun, toksik çözgenlerden faydalanmaksızın biyoaktif bileşiklerce zengin bir üzüm çekirdeği ekstraktının eldesi mümkün kılınmıştır. Yapılan çalışmanın sonuçları, hem literatüre hem de sanayiye katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Dönmez, A., 2015. Denizli Bölgesinde Yetiştirilen Bazı Üzüm Çeşitlerinin Resveratrol ve Suda Çözünen Vitaminlerinin Kuruma Kinetiği (Yüksek Lisans Tezi). *Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Denizli, 105s.*
2. Otağ, M. R., 2015. Denizli Çal Yöresinde Yetişen Bazı Üzüm Çeşitlerinin Farklı Olgunlaşma Evreleri ve Kurutulması Sonrasında Bazı Özellikleri ile Resveratrol İçeriğinin Belirlenmesi (Doktora Tezi). *Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Denizli, 165s.*
3. Perumalla, A. V. S. and N. S. Hettiarachchy, 2011. Green Tea and Grape Seed Extracts Potential Applications in Food Safety and Quality. *Food Research International 44:827-839.*
4. Lau, D. W. and A. J. King, 2003. Pre and Post-Mortem Use of Grape Seed Extract in Dark Poultry Meat to Inhibit Development of Thiobarbituric Acid Reactive Substances. *Journal of Agricultural and Food Chemistry 51:1602-1607.*
5. Rein, D., T. G., Paglieroni, D. A., Pearson, T., Wun, H. H., Schmitz, R., Gosselin and C. L., Keen, 2000, Cocoa and Wine Polyphenols Modulate Platelet Activation and Function. *The Journal of Nutrition 130:2120-2126.*
6. Shanmuganayagam, D., M. R., Beahm, H. E., Osman, C. G., Krueger, J. D., Reed and J. D. Folts, 2002, Grape Seed and Grape Skin Extracts Elicit a Greater Antiplatelet Effect

- when Used in Combination than when Used Individually in Dogs and Humans. *The Journal of Nutrition* 132(12):3592–3598.
7. Clouatre, D. L. and C. Kandaswami, 2005. Grape Seed Extract. In Encyclopedia of Dietary Supplements (Eds. P. Coates, M. Blackman and G. Cragg). *New York, NY: Marcel Dekker, ABD. pp: 309–325.*
 8. Bentivegna, S. S. and K. M. Whitney, 2002, Subchronic 3–Month Oral Toxicity Study of Grape Seed and Grape Skin Extracts. *Food and Chemical Toxicology* 40(12):1731–1743.
 9. Monteleone, E., N. Condelli, C. Dinnella and M. Bertuccioli, 2004, Prediction of Perceived Astringency Induced by Phenolic Compounds. *Food Quality and Preference* 15:761–769.
 10. Weber, H. A., A. E. Hodges, J. R. Guthrie, B. M. O'Brien, D. Robaugh, A. P. Clark, R. K. Harris, J. W. Algaier and C. S. Smith, 2007. Comparison of Proanthocyanidins in Commercial Antioxidants: Grape Seed and Pine Bark Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(1):148–156.
 11. Mahmoudi, M., K. Charradi, F. Limam and E. Aouania, 2016. Grape Seed and Skin Extract as Adjuvant to Xenical Therapy Reduces obesity, Brain Lipotoxicity and Oxidative stress in High Fat Diet Fed Rats. *Obesity Research & Clinical Practice DOI: 10.1016/j.orcp.2016.04.006.*
 12. Ferruzzi, M. G., J. K. Lobo, E. M. Janle, B. Cooper, J. E. Simon, Q. L. Wu, C. Welch, L. Ho, C. Weaver and G. M. Pasinetti, 2009. Bioavailability of Gallic Acid and Catechins from Grape Seed Polyphenol Extract is improved by Repeated Dosing Inrats: Implications for Treatment in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 18(1):113–124.
 13. Du Y., H., Guo and H., Lou, 2007. Grape Seed Polyphenols Protect Cardiac cells from Apoptosis via Induction of Endogenous Antioxidant Enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(5):1695–1701.
 14. Bagchi, D., M., Bagchi, S.J., Stohs, D.K., Das, S.D., Ray, C.A., Kuszynski, S.S., Joshi and H.G., Pruess, 2000. Free Radicals and Grape Seed Proanthocyanidin Extract: Importance in Human Health and Disease prevention. *Toxicology* 148(2–3):187–197.
 15. Khazri, O., K., Charradi, F., Limam, M. V., El Mayc and E., Aouania, 2016. Grape Seed and Skin Extract Protects Against Bleomycin–Induced Oxidative Stress in Rat Lung. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 81:242–249.
 16. Khanal, R.C., L.R. Howard and R.L. Prior, 2009. Procyanidin Content of Grape Seed and Pomace, and Total Anthocyanin Content of Grape Pomace as Affected by Extrusion Processing. *Journal of Food Science* 74:174–182.
 17. Casazza, A.A., B. Aliakbarian and P. Perego, 2011. Recovery of Phenolic Compounds from Grape Seeds: Effect of Extraction Time and Solid–Liquid Ratio. *Natural Product Research* 25:1751–1761.
 18. Negro, C., L., Tommasi and A., Miceli, 2003. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity from Red Grape Marc Extracts. *Bioresource Technology* 87(1):41–44.
 19. Renaud, S., M. de Lorgeril, 1992. Wine, Alcohol, Platelets, and the French Paradox for Coronary Heart Disease. *Lancet* 339:1523–1526.
 20. Kaur, M., R., Mandair, R., Agarwal and C., Agarwal, 2008, Grape Seed Extract Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Colon Carcinoma Cells. *Nutrition and Cancer* 60:2–11.
 21. Silva, L.R. and M. Queiroz, 2016, Bioactive Compounds of Red Grapes from Dão Region (Portugal): Evaluation of Phenolic and Organic Profile. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6(4):315–321.
 22. Dopico–García, M.S., A., Figue, L., Guerra, J.M., Afonso, O., Pereira, P., Valentão, P.B., Andrade and R.M., Seabra, 2008, Principal Components of Phenolics to Characterize Red Vinho Verde Grapes: Anthocyanins or Non–Coloured Compounds? *Talanta* 75:1190–202.
 23. Mato, I., S., Suárez–Luque and J.F., Huidobro, 2007, Simple Determination of Main Organic Acids in Grape Juice and Wine by Using Capillary Zone Electrophoresis with Direct UV Detection. *Food Chemistry* 102:104–12.
 24. Fennema, O.R., 1985. Food Chemistry. *Marcel Dekker Inc., New York, ABD. pp:991.*
 25. Nakilcioğlu–Taş, E., 2016, Zeytin Çekirdeğinin Pilot Ölçekte Basınçlı Su Ekstraktörü Kullanılarak Su Ekstraktının Eldesi ve Mikroenkapsülasyonu (Doktora Tezi). *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, İzmir, 242s.*
 26. Singleton, V. L. and J. A., Rossi, 1965, Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic–Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16:144–153.

27. Li, Y., C., Guo, J., Yang, J., Wei, J., Xu and S., Cheng, 2006, Evaluation of Antioxidant Properties of Pomegranate Peel Extract in Comparison with Pomegranate Pulp Extract. *Food Chemistry* 96:254–260.
28. Singh, R.P., K.N.C., Murthy and G.K., Jayaprakasha, 2002, Studies of the Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel and Seed Extracts Using in vitro Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:81–86.
29. Alper, N., P., Onsekizoğlu and J., Acar, 2011, Effects of Various Clarification Treatments on Phenolic Compounds and Organic Acid Compositions of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Juice. *Journal of Food Processing and Preservation* 35:313–319.
30. Mandić, A. I., S. M. Djilas, J. M. Čanadanović–Brunet, G. S. Četković and J. J. Vulić, 2009. Antioxidant Activity of White Grape Seed Extracts on DPPH Radicals. *Acta Periodica Technologica* 40:53–61.
31. Jayaprakasha, G. K., T. Selvi and K. K. Sakariah, 2003. Antibacterial and Antioxidant Activities of Grape (*Vitis vinifera*) Seed Extracts. *Food Research International* 36:117–122.
32. Shiyaji, J., 2007. Determination of Antioxidant Activity of Polyphenol Extract from Grape Seeds (Master Thesis). *San Jose State University The Faculty of the Department of Nutrition and Food Science, California*, pp:49.
33. Baydar, N. G., Z. Babalık, F. H. Türk and E. S. Çetin, 2011. Phenolic Composition and Antioxidant Activities of Wines and Extracts of Some Grape Varieties Grown in Turkey. *Journal of Agricultural Sciences* 17:67–76.
34. Farhadi, K., F. Esmailzadeh, M. Hatami, M. Forough and R. Molaie, 2016. Determination of Phenolic Compounds Content and Antioxidant Activity in Skin, Pulp, Seed, Cane and Leaf of Five Native Grape Cultivars in West Azerbaijan Province, Iran. *Food Chemistry* 199:847–855.
35. Curko, N., K. Kovacevic–Ganic, L. Gracin, M. Đapic, M. Jourdes and P. L. Teissedre, 2014. Characterization of Seed and Skin Polyphenolic Extracts of Two Red Grape Cultivars Grown in Croatia and Their Sensory Perception in a Wine Model Medium. *Food Chemistry* 145:15–22.
36. Rockenbach, I. I., E. Jungfer, C. Ritter, B. Santiago–Schübel, B. Thiele, R. Fett and R. Galensa, Characterization of Flavan–3–ols in Seeds of Grape Pomace by CE, HPLC–DAD–MSn and LC–ESI–FTICR–MS. *Food Research International* 48:848–855.