

## ÜZÜM ÇEKİRDEĞİNDEN FENOLİK BİLEŞEN EKSTRAKSİYONUNUN YÜZEY YANIT METODU İLE OPTİMİZASYONU

Ece Çağdaş\*, Atıf Can Seydim

Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta

Geliş tarihi / *Received*: 10.04.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / *Received in revised form*: 11.06.2016

Kabul tarihi / *Accepted*: 02.08.2016

### Özet

Üzümde bulunan fenolikler, antioksidan aktivite ve antimikrobiyel özellikleri sayesinde insan sağlığı üzerine olumlu etkileri olan ikincil metabolitlerdir. Bu nedenle fenoliklerin geri kazanımı için etkin ekstraksiyon teknikleri gereklidir. Bu çalışmada, üzüm sanayi yan ürünü olan üzüm çekirdeğinin fenolik bileşenleri su/etanol çözücü karışımı kullanılarak katı-sıvı ekstraksiyon işlemi ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon işlemi, etanol oranı (60-90 ml etanol/100 ml çözücü), üzüm çekirdeği konsantrasyonu (10-20 g/100 ml çözücü) ve işlem süresi (32-120 dk) olan bağımsız değişkenlerle gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon işlemi, toplam fenolik miktarı, antioksidan aktivite ve bazı fenolik bileşenlerin miktarı için yanıt-yüzey metodu (RSM) kullanılarak optimize edilmiştir. Optimum ekstraksiyon koşulları maksimum toplam fenolik (0.254 mg/g), gallik asit (0.143 mg/g), kateşin (0.058 mg/g), epikateşin (0.040 mg/g) ve antioksidan aktivite (67.90 µmol/ml) için 60 ml etanol/100 ml çözücü sistem (etanol+su); 20 g üzüm çekirdeği/100 ml çözücü; 109 dk ekstraksiyon süresi, şeklinde tanımlanmıştır. Genel olarak, konsantrasyon ve ekstraksiyon süresinin fenolik ekstraksiyonuna etki eden önemli parametreler olduğu belirlenmiştir ( $P<0.05$ ).

**Anahtar kelimeler:** : Üzüm çekirdeği, ekstraksiyon, yüzey-yanıt metodu, polifenoller, antioksidan

## OPTIMIZATION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM GRAPE SEED BY RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

### Abstract

Grape phenolics are secondary metabolites with potential beneficial effects on human health because of their antioxidant and antimicrobial activities. Thus, it is necessary to have efficient extraction techniques to achieve good recoveries of compounds. In this study, phenolic compounds of grape seeds which are byproducts of grape industry were extracted by solid-liquid extraction using water/ethanol solvent mixture. Extraction was carried out with independent variables which were solvent ratio (60-90 ml ethanol/100 ml solvent), grape seed concentration (10-20 g/100 ml solvent) and process time (32-120 min). Extraction process was optimized by using response surface methodology (RSM) for the total phenols, antioxidant and some phenolic compounds content of grape seeds. Optimal extraction conditions were identified as 60 ml ethanol/100 ml solvent (ethanol+water); 20 g grape seed/100 ml solvent; 109 min extraction time for maximum total phenols (0.254 mg/g), antioxidant activity (67.90 µmol/ml), gallic acid (0.143 mg/g), catechin (0.058 mg/g) and epicatechin (0.040 mg/g). Generally, solid concentration and extraction time were determined as the most important parameter on phenolic extraction ( $P<0.05$ ).

**Keywords:** Grape seed, extraction, response surface method, polyphenols, antioxidant

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ ececagdas@sdu.edu.tr,

☎ (+90) 246 211 16 68,

☎ (+90) 246 2111667

## GİRİŞ

Tüketicilerin gıdalarda kullanılan katkı maddeleri hakkında daha çok bilgi sahibi olması ve fonksiyonel gıdalara ilginin artması ile birlikte, gıdalarda kullanılacak alternatif doğal ve daha güvenli katkı maddeleri üzerine araştırmalar artış göstermiştir. Üzüm, dünyada en çok tüketilen meyvelerden biridir ve yaklaşık %75'i çekirdek ve kabuklarında olmak üzere fenolik bileşenler bakımından oldukça zengindir. Özellikle üzümde bulunan antosiyaninler, antiinflamatuar, antioksidan ve antimikrobiyel aktivite gibi güçlü biyolojik fonksiyonlar göstermektedir (1, 2). Üzümde en çok bulunan fenolikler antosiyaninler, hidroksibenzoik ve hidroksisünamik asit, flavan-3-ol, flavanoller ve stilbenler olarak tanımlanmıştır (3). Son yıllarda, şarap endüstrisi yan ürünlerinden ve atıklarından fenolik bileşenlerin geri kazanımında kullanılacak etkin alternatif yöntemler üzerine yapılan çalışmalar artış göstermiştir. Yu ve Ahmedna, (4), üzüm posasında bulunan fonksiyonel grupları onların kompozisyonu ve biyolojik aktivitelerini baz alarak özetlemiş, sonuç olarak üzümün sahip olduğu fenolik profilinin antioksidatif ve antimikrobiyel aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Fonksiyonel bileşenlerin bitkilerden ekstrakte edilmesi önemli bir proses olup bu alanda uygulanan pek çok yöntem bulunmaktadır. Ekstraksiyon, fenolik bileşenlerin izolasyonu, tanımlanması ve kullanımında önemli bir basamaktır (5). Üzümde bulunan fenolik bileşenlerin ekstraksiyonunda kullanılan en yaygın yöntem katı-sıvı ekstraksiyondur. Çözücü tipi, ekstraksiyon etkinliğini etkileyen en önemli parametredir. Şarap endüstrisi atıklarından ve diğer bitkilerden polifenollerin ekstraksiyonunu daha etkin hale getirmek için pek çok yöntem uygulanmıştır. Bu yöntemler genel olarak hidroalkolik çözücü sistemler üzerine yoğunlaşmaktadır (6-10). Polifenollerin polar doğası, bu bileşiklerin hidroalkolik çözücüler gibi polar protik ortamlarda daha kolay çözünmesini sağlar. Bazı çalışmalarda, kateşin ve prosiyanidinlerin ekstraksiyonunda, etanol/su karışımlarının aseton ya da metanol/su karışımlarına göre daha iyi sonuçlar verdiği gösterilirken (11) diğer araştırmacılar üzüm çekirdeğinden kateşin, epikateşin ve epigallokateşin ekstraksiyonunda metanolün daha iyi olduğunu belirtmişlerdir (12). Üzüm çekirdeği ve kabuğundan ya da diğer bitkilerden fenolik bileşenlerin konvansiyonel ekstraksiyon prosedürü kullanılarak ekstrakte edildiği ve yüksek verimliliğin elde edildiği çalışmalar bulunmaktadır (13-14). Ekstrakte edilen maddenin konsantrasyonu arttıkça ekstraksiyon etkinliği de doğru orantılı olarak artış gösterir. Ancak, yüksek ve düşük çözücü/katı oranları arasındaki denge, maliyet/çözücü-atık miktarı dengesi ve yoğunlaşma etkisinden kaçınma gibi hususlar, ekstrakte edilen bileşik için belirlenmelidir. Üzümde bulunan fenolik bileşenlerin yapı bakımından çeşitliliği (15), bu bileşenlerin ekstraksiyonunun optimize edilmesini gerektirmektedir. Ekstraksiyon metotları farklı parametrelerden etkilendiği ve bu parametreler

birbirleri ile de etkileşimde olduğu için uygun bir optimizasyon modeli kullanılmalıdır. Yüzey yanıt metodu, deney sayısını azaltırken farklı test parametreleri arasındaki etkileşimlerle de ilgili istatistiksel modeller oluşturabilen matematiksel bir tekniktir (16).

Özet olarak, üzüm ve üzüm sanayi yan ürünlerinden fenolik bileşenlerin katı-sıvı ekstraksiyonu, optimize edilmesi gereken pek çok parametreye bağlı olarak değişim göstermektedir. Etanol/su çözücü karışımlarının, benzer ekstraksiyon etkinliklerine sahip olmaları, maliyetlerinin düşük olması ve sürdürülebilirliğinin yüksek olması nedeniyle kullanılması tercih edilmektedir. Bu çalışmanın amacı, çözücü karışım oranı, üzüm çekirdeği konsantrasyonu ve proses süresi gibi ekstraksiyon değişkenlerinin, maksimum toplam fenolik bileşen ve antioksidan aktivite değerlerinin elde edilmesi amacıyla yanıt-yüzey metodu kullanılarak optimize edilmesidir. Bu çalışmada, üzüm ve ürünleri sanayi yan ürünü olan üzüm çekirdeğinin fenolikleri su/etanol çözücü karışımı kullanılarak katı-sıvı ekstraksiyon işlemi ile ekstrakte edilmiştir. Optimizasyon için seçilen noktalarda ekstraktların fenolik bileşenleri sıvı kromatografik yöntemle saptanırken antioksidan aktiviteleri oksijen radikal absorpsiyon kapasitesi değerlerine göre belirlenmiştir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

Çalışmada kullanılan üzüm çekirdeği Denizli'deki yerel bir işletmeden temin edilmiştir. Hammaddeler kullanım ve analiz süresine kadar vakum paketlenmiş ve -18°C'de saklanmıştır. Ekstraksiyon için kullanılan etanol ve analizler için kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma Aldrich'ten (St. Louis, MO) temin edilmiştir. Kromatografik analiz için kalibrasyon eğrileri kateşin, epikateşin ve gallik asit (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) kullanılarak hazırlanmıştır.

### Ekstraksiyon işlemi

Ekstraksiyon için katı-sıvı ekstraksiyon tekniği kullanılmıştır. Belirlenen oranlarda öğütülmüş üzüm çekirdeği, farklı oranlarda karıştırılmış etanol:su çözücü sistemi ile muamele edilmiştir. Öğütülmüş üzüm çekirdeğinin ortalama partikül çapı yapılan elek analizi (Tyler elekleri, No 10-140) ile 490.5 µm olarak bulunmuştur. Çözücü ile karıştırılan üzüm çekirdeği tozu örnekleri manyetik karıştırıcı ile farklı sürelerde oda sıcaklığında (25°C) ekstrakte edilmiştir. Sıvı kısım karışımından vakum altında filtre edilerek ayrılmıştır. Etanol fazı vakum altında evaporatör kullanılarak uzaklaştırılmış kalan sulu kısım liyofilize edilerek kurutulmuştur. Elde edilen toz ekstrakt vakum paketlerde analiz anına kadar -18°C'de saklanmıştır.

### Toplam fenolik madde miktarının ve antioksidan aktivitenin belirlenmesi

Üzüm çekirdeği tozu örneklerinin su-etanol ekstraktlarının toplam fenol içeriği Folin-Ciocalteu metoduna göre spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (17). Ekstraktlardan uygun seyreltiler

alınarak 0.2 N 5 mL Folin-Ciocalteu ayracı ile karıştırılmıştır. 5 dakikanın sonunda 4 ml (75 g/L) doygun Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi ilave edilerek oda sıcaklığında 2 saat karanlıkta bekletildikten sonra oluşan mavi rengin absorbansı 765 nm dalga boyunda spektrofotometrik (Boeco S-20 Spectrophotometer, Germany) olarak ölçülmüştür. Standart eğri 0.125-2 mg/ml aralığındaki farklı konsantrasyonlara sahip gallik asit kullanılarak elde edilmiştir. Örneklerin toplam fenolik madde içeriği mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g olarak verilmiştir. Ekstraktların antioksidan kapasiteleri, oksijen-radikal absorbans kapasitesi (ORAC) testi kullanılarak belirlenmiştir (18). Peroksi radikal üretici olarak 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) kullanılmış ve antioksidan kapasite floresansın indirgenme grafiğinden elde edilen net değerler hesaplanmasıyla belirlenmiştir. Çalışma sonuçları troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametil-kromon-2-karboksilik asit) eşdeğeri olarak, 1 litre test edilen çözelti ile aynı antioksidan aktiviteye sahip µmol cinsinden troloks miktarı şeklinde verilmiştir.

#### Fenolik bileşenlerin belirlenmesi

Gallik asit, kateşin ve epikateşinin standart stok çözeltileri 5 mg standardın 10 ml saf suda çözündürülmesi ile hazırlanmıştır. Analiz edilecek farklı ekstraktlar analiz öncesi 1:10 kat seyreltme yapıldıktan sonra 0.45 µm membran filtre kullanılarak filtre edilmiştir. Kromatografik analiz için HPLC sistem LC Solution yazılımı ile ayırım modülü, pompa, vakum degaz ünitesi ve diode array detektörden (DAD) oluşmaktadır (Schimadzu, LC-20AD, Japan). Kromatografik ayırım RP-18 kolon (150mmx3mm, 5 µm, Phenomenex, Gemini 5u C18, USA) kullanılarak izokratik elüsyon ile gerçekleştirilmiştir. Mobil faz, asetonitril (%15, A) ve 50 mM O-fosforik asit-su (%85, B) karışımından oluşmaktadır. Enjeksiyon hacmi 25 µl ve kolon sıcaklığı 30°C'dir. Kromatografik pikler alıkonma zamanları baz alınarak tanımlanmıştır. Ekstraktlarda bulunan gallik asit, kateşin ve epikateşin

hesaplanan değerler ile nominal konsantrasyonlar arasındaki % fark karşılaştırılarak analiz doğruluğu hakkında bilgi edinilmiştir.

#### Deneyel Tasarım ve Optimizasyon

Ekstraksiyon işleminde değişkenlerin, üzüm çekirdeği örneklerinin toplam fenolik madde miktarı, antioksidan aktivitesi ve bazı fenolik bileşenleri üzerine asıl etkileri "Yüzey-Yanıt Metodu" kullanılarak belirlenmiştir. Etanol miktarı (F1), katı/çözücü oranı (F2) ve ekstraksiyon süresi (F3) bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. Bu faktörler ve seviyeleri Çizelge 1'de gösterildiği gibidir. İşlem değişkenlerinin aralığı yapılan bazı çalışmalar incelenerek ve yapılan ön denemelerden elde edilen verilere bakılarak belirlenmiştir. Deneme tasarımı, 6 merkez noktası olan 2<sup>3</sup> tam faktöriyel tasarıma ekstenel ve faktöriyel noktalarda 2 tekrarlı ( $\alpha = \pm 1.68179$ ) olacak şekilde 34 nokta ile elde edilmiştir. Gözlenen sonuçlardaki açıklanamayan değişimlerin etkileri, deneysel verilerin sırası rastgele dağıtılarak minimize edilmiştir. Her bir cevap için matematik modeller çoklu regresyon analizi (Design Expert, Stat Ease Inc., Minneapolis, USA) ile hesaplanmış ve modelleme, lineer, karesi alınmış ve kesişim terimlerini içeren kuadratik model ile başlatılmıştır. Her bir cevap için önemli terimler varyans analizi kullanılarak belirlenmiştir. Bu çalışmada, bütün cevapları tek bir ölçüm ile kombine eden istenilen hedefe ulaşma fonksiyonu fenolik içeriğin ve antioksidan aktivite değerlerinin maksimum olduğu kriter için geliştirilmiştir. Ekstraksiyon prosesinin optimize edilmesinde ve elde edilen sonuçların modele uygunluğunun tespit edilmesinde Design Expert 10.0 (Stat Ease Inc., Minneapolis, USA) paket programı kullanılmıştır. Bu çalışmada, istenilen hedefe ulaşma fonksiyonu cevapların (toplam fenolik, antioksidan aktivite, bazı fenolik bileşenlerin miktarı) maksimum değerlerinin belirlenmesi üzerine kurulmuştur.

Çizelge 1. Bağımsız değişkenler ve faktöriyel tasarım için seviyeleri  
Table 1. Independent variables and levels for factorial design

Değişkenler Independent variables	Birim Unit	Değişken seviyeleri Factor level		
		-1	0	+1
F <sub>1</sub> etanol F <sub>1</sub> ethanol	ml/100 ml çözücü ml/100 ml solvent	60	75	90
F <sub>2</sub> üzüm çekirdeği oranı F <sub>2</sub> grape seed ratio	g/100 ml çözücü g/100 ml solvent	10	15	20
F <sub>3</sub> ekstraksiyon süresi F <sub>3</sub> extraction period	dakika minute	32	76	120

konsantrasyonu, ilgili çözelti için hazırlanmış standart eğri ile ekstraktlardaki entegre pik alanları karşılaştırılarak belirlenmiştir. Standartlar için kalibrasyon eğrileri farklı konsantrasyonlardaki standart örnek çözeltilerinin enjekte edilerek alanlarının belirlenmesi ve elde edilen alanların konsantrasyonlarına karşı grafiklerin oluşturulması ile elde edilmiştir. Oluşturulan grafiklerden yararlanılarak örnek ekstraktlardaki miktar belirlenmiştir. Metodun kesinliğini ölçmek için analizler aynı gün içerisinde 2 kere ve farklı 2 günde tekrarlanmıştır. Kalibrasyon eğrilerinden

#### SONUÇ VE TARTIŞMA

Çizelge 2'de her bir (çözücü sistem, üzüm çekirdeği tozu/çözücü (katı:çözücü) oranı, ekstraksiyon süresi) koşul için üzüm çekirdeği ekstraktlarının toplam fenol, gallik asit, kateşin ve epikateşin miktarları ile antioksidan aktivite değerleri gösterilmektedir. Toplam fenolik madde miktarı 0.066-0.309 mg/g değerleri arasında, gallik asit, kateşin ve epikateşin miktarları ise sırasıyla 0.006-0.140; 0.008-0.060; 0.0002-0.040 mg/g değerleri arasında bulunmuştur. Bunun yanı sıra

oksijen radikal absorpsiyon kapasitesine göre belirlenen antioksidan aktivite değerleri ise 15.06-75.72  $\mu\text{mol/ml}$  aralığındadır. Üzüm çekirdeği ekstraktlarında bulunan değerler Yılmaz ve ark. (19) ve Garcia-Jares ve ark. (20) tarafından yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Proses değişkenlerinin önemli etkilerini belirlemek için tek bir faktörün 2 seviyesinin, test edilen ve önerilen işlem sonuçlarının karşılaştırıldığı varyans analizi (ANOVA) ( $P<0.05$ ) gerçekleştirilmiş ve deneysel veriler için en uygun model belirlenmiştir. Önerilen modelin regresyon denklem katsayıları ve tüm ana etkilerin istatistiksel önem dereceleri her bir cevap için elde edilerek önemli olan ve olmayan etkiler model içerisinde belirlenmiştir. Analiz edilen değişkenlere ait varyans analizi sonuçları Çizelge 3 de gösterildiği gibidir. En küçük kareler yöntemi ile kuadratik denklik, tüm sonuçlar için (1-34) model verinin oluşturulmasında kullanılmıştır. Model denklikleri tüm faktör seviyeleri için üretilmiş ve her bir değişkenin üzüm çekirdeğinden fenolik madde ekstraksiyonu üzerine etki derecesi hesaplanmıştır. Bağımsız değişkenler arasındaki korelasyonlar polinomiyal denkliklerin birinci ve ikinci derece katsayıları yardımıyla hesaplanmış ve değerlendirilmiştir. Elde edilen modelin belirleme katsayıları ( $R^2$ ) toplam fenolik miktarı için 0.758; ORAC için 0.5128; gallik asit için 0.872; kateşin için 0.761 ve epikateşin miktarı için 0.788 olarak bulunmuştur. ORAC değerleri hariç diğer sonuçlar için  $R^2$  değerlerinin yüksek olması deneysel sonuçlar ile önerilen modelden elde edilen teorik sonuçlar arasında uygun bir korelasyon olduğunu gösterir. Proses değişkenleri ile toplam fenolik madde miktarı ( $Y_1$ ), antioksidan aktivite ( $Y_2$ ), gallik asit ( $Y_3$ ), kateşin ( $Y_4$ ) ve epikateşin ( $Y_5$ ) miktarları arasındaki ilişki kodlanmış değişkenlere bağlı olarak elde edilmiştir. A, etanol miktarı; B, katı/çözücü oranı ve C ekstraksiyon süresi olmak üzere kodlu değişkenlere bağlı olarak elde edilen denklikler (1-5) verildiği gibi olup önemli ( $P<0.05$ ) proses değişkenleri "\*" ile işaretlenmiştir.

$$Y_1=0.14+4.967x10^{-3}B+0.031C+0.040BC+0.023B^2 \quad (1)$$

$$Y_2=43.08-2.01A+2.84B+8.16C+5.51AB-1.97AC+3.83BC-7.34A^2-8.08B^2-1.48C^2 \quad (2)$$

$$Y_3=0.051-8.475x10^{-3}A+5.988x10^{-3}B+1.314x10^{-3}C-1.127x10^{-3}AB-2.973x10^{-3}AC-1.94x10^{-3}BC-7.381x10^{-3}A^2+0.023B^2+0.023C^{2**} \quad (3)$$

$$Y_4=0.024-3.591x10^{-3}A+3.025x10^{-3}B-3.042x10^{-3}C-7.834x10^{-4}BC+7.828x10^{-3}B^{2*}+9.373x10^{-3}C^{2*} \quad (4)$$

$$Y_5=8.592x10^{-3}+1.316x10^{-3}B-1.194x10^{-3}C-1.124x10^{-3}BC+7.099x10^{-3}B^{2*}+7.643x10^{-3}C^{2*} \quad (5)$$

Model deneysel verilere uygunluk göstermekte ve seçilen değişkenlerin istatistiksel olarak önemli olduğunu ortaya çıkarmaktadır. Etanol miktarı ekstraksiyon işleminin diğer bağımsız değişkenlerine nazaran daha az etki göstermiştir. Bu nedenle, yüzey-yanıt grafikleri, etanol miktarı 60 ml/100 ml çözücü olacak şekilde sabitlenerek elde edilmiştir. Şekil 1 ve 2, toplam fenolik, gallik asit, kateşin ve epikateşin miktarları ile antioksidan aktivite değerini ekstraksiyon süresi ve üzüm çekirdeği konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak göstermektedir. Toplam fenolik madde, gallik asit, kateşin ve epikateşin miktarı ile

antioksidan aktivite üzerinde istatistiksel olarak önemli doğrusal ve kuadratik etkilerin, üzüm çekirdeği konsantrasyonu ve süre olduğu belirlenmiştir. Üzüm çekirdeği konsantrasyonu ve ekstraksiyon süresindeki artış sonucu fenolik bileşen miktarındaki ve antioksidan aktivitedeki artış doğrusal olmayan bir davranışa sahiptir. Elde edilen yüzey grafiklerinin analizi, çözücü sistem, üzüm çekirdeği tozu/çözücü (katı/çözücü) oranı, ekstraksiyon süresi faktörlerinin üzüm çekirdeğinden fenolik bileşenlerin ekstrakte edilmesindeki önemli faktörler olduğunu göstermiştir. En yüksek toplam fenolik madde miktarı 50 ml etanol/100 ml çözücü (etanol+su) oranına sahip örneklerde gözlenirken, en düşük miktar 100 ml etanol ile ekstrakte edilen örneklerde gözlenmiştir. Benzer eğilim gallik asit, kateşin ve epikateşin miktarlarında da belirlenmiştir. En düşük antioksidan aktivite değerleri 50 ml etanol/100 ml çözücü (etanol+su) ile ekstrakte edilen örneklerde belirlenirken, en yüksek aktivite değerlerine 60 ml etanol/100 ml çözücü (etanol+su) ekstraktlarında ulaşılmıştır. Çözücü karışımda suyun miktarının artmasıyla üzüm çekirdeğinden ekstrakte edilen fenolik madde miktarında gözlenen artış antosiyanidinlerin doğada serbest halde değil şekerlerle glikozit yaparak bulunmasından da kaynaklanabilir. Etanol içerisine suyun eklenmesi ekstraksiyon hızını arttırmıştır ancak su miktarının daha fazla artırılması diğer bileşenlerin de ekstrakte edilmesine ve elde edilen ekstraktta fenolik bileşen oranının azalmasına neden olacaktır. Çözücü tipi, ekstraksiyonun verimine etki eden en önemli parametredir. Polifenollerin polar yapısı nedeniyle hidroalkolik çözeltiler gibi polar protik ortamlarda kolayca çözülebilmektedir. Fenolik fraksiyonlar, düşük polaritedeki çözeltilerin konsantrasyonunun artması ile karışımdaki alkol konsantrasyonu değiştirilerek daha kolay elde edilebilir (21). Ekstraksiyon çözeltisi olarak alkol kullanıldığı zaman, üzüm çekirdeklerinden fenolik madde salınımı ekstraksiyon süresinin bir fonksiyonu olarak

oldukça yüksek hızda gerçekleşmektedir. Ancak, bu durumda, su kullanıldığı zaman katı-sıvı temas süresi önemini yitirmektedir. Bunların yanı sıra farklı fenolik bileşenlerin elde edilmesi için farklı çözücü sistemleri kullanılabilir. Bazı araştırmacılar kateşin ve prosiyanidinlerin etanol/su karışımı çözücü sistemi kullanılarak daha kolay ekstrakte edildiğini bildirmişlerdir (11). Bazı araştırmacılar ise, kateşin, epigallokateşin ve epikateşinlerin üzüm çekirdeğinden metanol kullanılarak daha fazla ekstrakte edildiğini bildirmişlerdir (12). Bunun yanı sıra, düşük etanol miktarının kullanıldığı sulu ekstraksiyonlarda,

organik asitler kullanılarak elde edilen düşük pH değerlerinde üzüm çekirdeğinden etkin polifenol ekstraksiyonun gözlendiği çalışmalar bulunmaktadır (22-23). Üzüm çekirdeğinden elde edilen fenoliklerin karakterizasyonunda tek tek fenolik bileşenlerin ekstrakte edilme verimlerinin yanı sıra toplam fenolik madde ekstraksiyon veriminin elde edilmesi amaçlanmalıdır.

etkilerinin incelendiği bu çalışmada çözgen konsantrasyonu ve ekstraksiyon süresinin fenolik madde ekstraksiyonuna etki eden önemli parametreler olduğu belirlenmiştir. Özet olarak, üzüm çekirdeğinden fenolik madde ekstraksiyonu optimize edilmesi gereken pek çok faktöre bağlı olarak değişmektedir. Üzüm çekirdeğinden fenoliklerin ekstraksiyonunda kullanılabilecek

Çizelge 2. Yüzey-yanıt metodu için üç faktörlü merkezi kompozit dizayn  
Table 2. Three-factor central composite design for response surface method

Std	Sıra	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Yanıt 1	Yanıt 2	Yanıt 3	Yanıt 4	Yanıt 5
Std	Run	A:Etanol (ml/100 ml çözücü) Factor 1 A:Ethanol (ml/100 ml solvent)	B:kati:çözücü (g/100 ml çözücü) Factor 2 B:solid:solvent (g/100 ml solvent)	C:süre (dk) Factor 3 C:time (min)	Toplam fenolik (mg/g) Response 1 Total phenolic (mg/g)	ORAC (µmol/ml) Response 2 ORAC (µmol/ml)	Gallik asit (mg/g) Response 3 Gallic acid (mg/g)	Kateşin (mg/g) Response 4 Catechin (mg/g)	Epikateşin (mg/g) Response 5 Epicatechin (mg/g)
11	1	90 <sup>a</sup> (+1) <sup>b</sup>	10 (-1)	120 (+1)	0.116	20.278	0.118	0.053	0.024
4	2	90 (+1)	10 (-1)	32 (-1)	0.151	35.486	0.115	0.053	0.025
27	3	75 (0)	15 (0)	150 (+1.68)	0.215	75.719	0.134	0.055	0.035
1	4	60 (-1)	10 (-1)	32 (-1)	0.174	41.350	0.140	0.058	0.038
18	5	50 (-1.68)	15 (0)	76 (0)	0.107	27.791	0.012	0.014	0.000
15	6	90 (+1)	20 (+1)	120 (+1)	0.252	72.557	0.023	0.013	0.003
29	7	75 (0)	15 (0)	76 (0)	0.121	71.449	0.045	0.028	0.008
9	8	60 (-1)	10 (-1)	120 (+1)	0.269	27.088	0.063	0.033	0.019
21	9	75 (0)	6.6 (-1.68)	76 (0)	0.228	17.780	0.034	0.017	0.003
8	10	90 (+1)	20 (+1)	32 (-1)	0.067	3.707	0.115	0.037	0.024
12	11	90 (+1)	10 (-1)	120 (+1)	0.072	8.118	0.057	0.029	0.013
2	12	60 (-1)	10 (-1)	32 (-1)	0.120	18.283	0.123	0.056	0.035
5	13	60 (-1)	20 (+1)	32 (-1)	0.130	25.858	0.121	0.055	0.039
13	14	60 (-1)	20 (+1)	120 (+1)	0.309	15.061	0.109	0.044	0.026
25	15	75 (0)	15 (0)	2 (-1.68)	0.066	7.600	0.006	0.008	0.004
31	16	75 (0)	15 (0)	76 (0)	0.116	20.278	0.118	0.053	0.024
28	17	75 (0)	15 (0)	150 (+1.68)	0.151	35.486	0.115	0.053	0.025
10	18	60 (-1)	10 (-1)	120 (+1)	0.215	75.719	0.134	0.055	0.035
14	19	60 (-1)	20 (+1)	120 (+1)	0.174	41.350	0.140	0.058	0.038
20	20	100 (+1.68)	15 (0)	76 (0)	0.107	27.791	0.012	0.014	0.000
32	21	75 (0)	15 (0)	76 (0)	0.252	72.557	0.023	0.013	0.003
34	22	75 (0)	15 (0)	76 (0)	0.121	71.449	0.045	0.028	0.008
3	23	90 (+1)	10 (-1)	32 (-1)	0.269	27.088	0.063	0.033	0.019
30	24	75 (0)	15 (0)	76 (0)	0.228	17.780	0.034	0.017	0.003
24	25	75 (0)	23.4 (+1.68)	76 (0)	0.067	3.707	0.115	0.037	0.024
33	26	75 (0)	15 (0)	76 (0)	0.072	8.118	0.057	0.029	0.013
26	27	75 (0)	15 (0)	2 (-1.68)	0.120	18.283	0.123	0.056	0.035
7	28	90 (+1)	20 (+1)	32 (-1)	0.130	25.858	0.121	0.055	0.039
16	29	90 (+1)	20 (+1)	120 (+1)	0.309	15.061	0.109	0.044	0.026
17	30	50 (-1.68)	15 (0)	76 (0)	0.066	7.600	0.006	0.008	0.004
6	31	60 (0)	20 (+1)	32 (-1)	0.120	18.283	0.123	0.056	0.035
22	32	75 (0)	6.6 (-1.68)	76 (0)	0.130	25.858	0.121	0.055	0.039
23	33	75 (0)	23.4 (+1.68)	76 (0)	0.309	15.061	0.109	0.044	0.026
19	34	100 (+1.68)	15 (0)	76 (0)	0.066	7.600	0.006	0.008	0.004

Gerçek değer<sup>a</sup> (kodlanmış değer)<sup>b</sup> Real values<sup>a</sup> (coded values)<sup>b</sup>

Ekstraksiyon prosesinde artan çözücü/kati oranlarının ekstraksiyon verimini olumlu yönde etkilediği belirtilmektedir (5). Ancak, yüksek ve düşük kati oranlarının kullanımı, çözücü atığı ile maliyet ve doyunluk etkileri arasındaki dengenin işlem öncesinde belirlenmesi gerekmektedir. Kullanılan ekstraksiyon süresi işlem için gerekli enerji miktarını ve yüksek oranda bileşen geri eldesini optimize etmek için belirlenmesi gereken en önemli faktördür. Bu çalışmada, artan ekstraksiyon süreleri üzüm çekirdeğinden fenolik madde ekstraksiyonunu olumlu yönde etkilemiştir. Üzüm çekirdeğinden fenolik madde ekstraksiyonu üzerine çözücü sistemin, üzüm çekirdeği tozu konsantrasyonunun ve ekstraksiyon süresinin

en uygun çözücülerin etanol, metanol ve aseton içeren sulu karışımlar olduğu belirtilmektedir. Bu çözücüler içlerinden etanol hem polifenollerin ekstraksiyonunda yüksek verim göstermesi hem de güvenli olması nedeniyle en çok tercih edilen çözücüdür. Aynı zamanda, kullanılan kati miktarın artırılması ekstraksiyon verimini arttıracaktır ancak yüksek konsantrasyonlar ekstraksiyon verimini düşürebilmektedir.

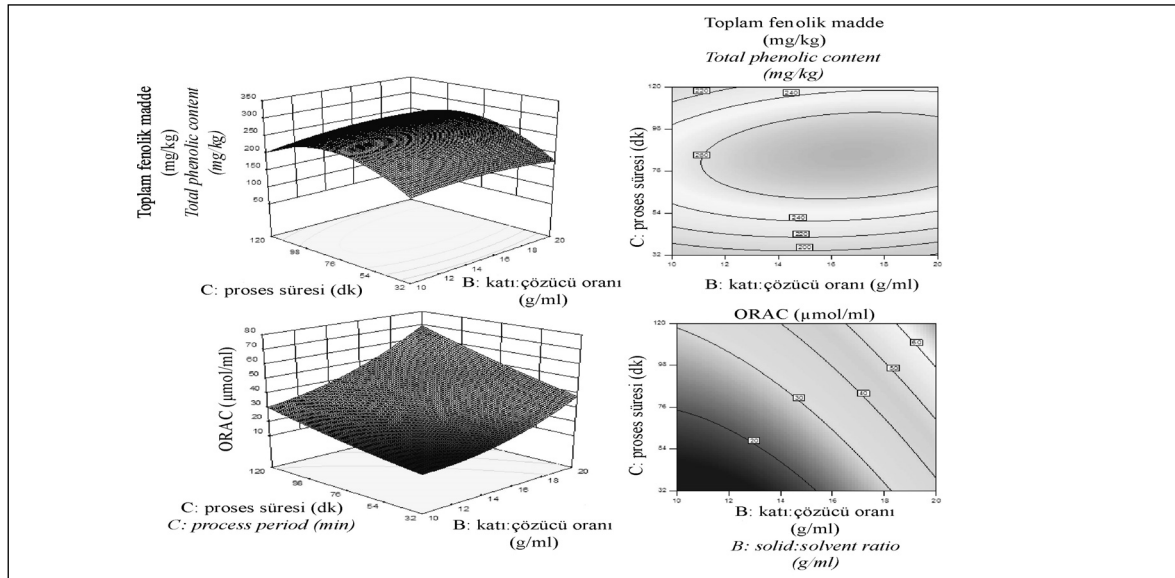
#### Ekstraksiyon yönteminin optimizasyonu

Üzüm çekirdeğinden fenolik madde ekstraksiyonu için optimum koşullar, maksimum toplam fenolik madde miktarı, antioksidan aktivite değerleri ve fenolik bileşen miktarı kriterlerini elde edebilecek şekilde belirlenmiştir. Üzüm çekirdeğinden fenolik

Çizelge 3. Fenolik bileşenlerin üzüm çekirdeğinden ekstraksiyonuna ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları  
 Table 3. Analysis of variance (ANOVA) results for the extraction of phenolic compounds from grape seed

Kaynak Source	DF* DF*	Kareler toplamı Sum of squares	Kareler ortalaması Mean square	F değeri F value	p değeri p-value
<b>Toplam fenolik Total phenolic</b>					
Model	4	0.067	0.017	3.58	0.0173 <sup>a</sup>
Lack of fit	10	0.047	4.73x10 <sup>-3</sup>	1.02	0.4649 <sup>b</sup>
Pure error	19	0.088	4.64x10 <sup>-3</sup>		
Total error	33	0.20			
<b>ORAC</b>					
Model	9	5116.05	568.45	1.14	0.3721 <sup>b</sup>
Lack of fit	5	1864.22	372.84	0.70	0.6273 <sup>b</sup>
Pure error	19	10060.52	529.50		
Total error	33	17040.80			
<b>Gallik asit Gallic acid</b>					
Model	9	0.030	3.31x10 <sup>-3</sup>	1.77	0.1262 <sup>b</sup>
Lack of fit	5	0.018	3.61x10 <sup>-3</sup>	2.57	0.0616 <sup>b</sup>
Pure error	19	0.027	1.41x10 <sup>-3</sup>		
Total error	33	0.075			
<b>Kateşin Catechin</b>					
Model	6	3.38x10 <sup>-3</sup>	5.63x10 <sup>-4</sup>	2.09	0.0873 <sup>b</sup>
Lack of fit	8	2.88x10 <sup>-3</sup>	3.60x10 <sup>-4</sup>	1.56	0.2023 <sup>b</sup>
Pure error	19	4.38x10 <sup>-3</sup>	2.31x10 <sup>-4</sup>		
Total error	33	0.011			
<b>Epikateşin Epicatechin</b>					
Model	5	2.30x10 <sup>-3</sup>	4.60x10 <sup>-4</sup>	3.33	0.0174 <sup>a</sup>
Lack of fit	9	1.70x10 <sup>-3</sup>	1.89x10 <sup>-4</sup>	1.66	0.1679 <sup>b</sup>
Pure error	19	2.16x10 <sup>-3</sup>	1.14x10 <sup>-4</sup>		
Total error	33	6.16x10 <sup>-3</sup>			

\*Serbestlik derecesi; <sup>a</sup> önemli; <sup>b</sup> önemsiz \*Degrees of freedom; <sup>a</sup> Significant; <sup>b</sup> non-significant

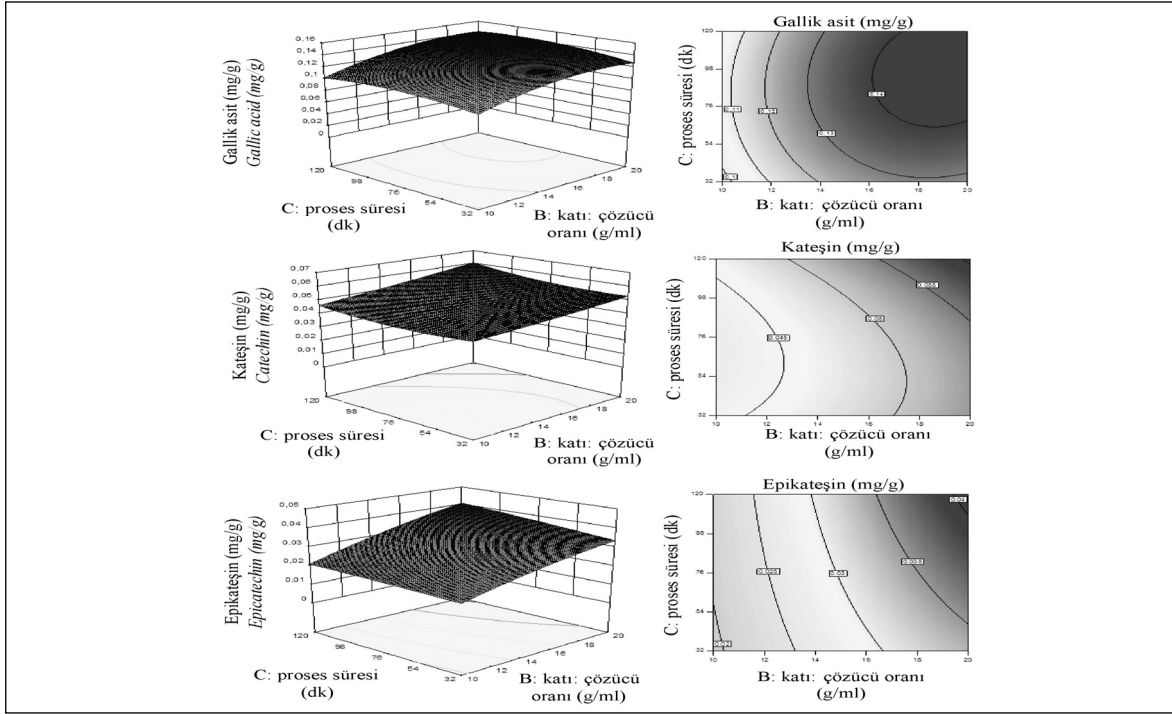


Şekil 1. Sabit etanol miktarında (60 ml/ 100 ml çözücü) konsantrasyon ve ekstraksiyon süresinin toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite miktarına etkileri için yanıt-yüzey ve kontur grafikleri

Figure 1. Response surface and contour plots for the effects of concentration and extraction time at a constant ethanol content (60 ml/ 100 ml solvent) on total phenolic compound and antioxidant activity

bileşen ekstraksiyonu için optimize koşullar Çizelge 4 de gösterildiği gibidir. Bu çalışmada, belirlenen aralık içinde elde edilen optimum ekstraksiyon parametreleri: 60 ml etanol/100 ml çözücü sistem (etanol+su); 20 g üzüm çekirdeği/

100 ml çözücü; 109 dk ekstraksiyon süresi şeklindedir. Elde edilen değerler genelde birbirlerine yakın bulunmuştur. Optimum koşullar için elde edilen toplam fenolik madde miktarı, gallik asit, kateşin, epikateşin miktarları ve antioksidan aktivite



Şekil 2. Sabit etanol miktarında (60 ml/ 100 ml çözücü) konsantrasyon ve ekstraksiyon süresinin gallik asit, kateşin ve epikateşin miktarlarına etkileri için yanıt-yüzey ve kontur grafikleri

Figure 2. Response surface and contour plots for the effects of concentration and extraction time at a constant ethanol content (60 ml/ 100 ml solvent) on total gallic acid, catechin and epicatechin compound

değerleri sırasıyla 0.254 mg/g, 0.143 mg/g, 0.058 mg/g, 0.040 mg/g ve 67.90  $\mu\text{mol/ml}$ 'dir. Bu sonuçlar istenilen hedefe ulaşma fonksiyonu 0.855 olan koşullar seçilerek verilmiştir. Elde edilen sonuçlar Casazza vd. (24)'nin üzüm çekirdeklerinden etanol:su karışımı kullanarak yaptığı çalışmadaki değerlerden ( $55.98 \pm 0.58$  mg GAE/g, toplam fenolik) yüksek bulunmuştur. Medouni-Adrar vd. (25) ise %65 etanol içeren sulu ekstraksiyonda üzüm çekirdeğinin toplam fenolik miktarını 87.99-95.97 mg GAE/g aralığında belirlemiştir. Krishnaswamy vd. (26), üzüm çekirdeğinden %30 etanol içeren sulu ekstraksiyonda toplam fenolik miktarının  $13.5 \pm 0.48$  mg GAE/g olduğunu rapor etmişlerdir.

## SONUÇ

Katı-sıvı ekstraksiyon yönteminde ekstraksiyon etkinliğine etki eden pek çok faktör bulunmaktadır. Bu faktörlerin iyi bir şekilde belirlenmesi ve uygun deneysel tasarımın oluşturulması için yüzey-yanıt yöntemi etkin bir şekilde kullanılabilir. Bu

çalışmada, üzüm çekirdeğinden fenolik madde ekstraksiyonu üzerine çözücü sistemin, üzüm çekirdeği tozu konsantrasyonunun ve ekstraksiyon süresinin etkileri ile bu parametrelerin etkileşimleri incelenmiştir. Genel olarak, çözgen konsantrasyonu ve ekstraksiyon süresinin fenolik madde ekstraksiyonuna etki eden en önemli parametreler olduğu belirlenmiştir. Fenolik madde ekstraksiyonunun optimizasyonunda belirlenen istatistiksel modelde kullanılan bağımsız değişkenlerin, üzüm çekirdeği tozundan aktif bileşenlerin geri kazanımı ve değerlerinin belirlenmesi için yeterli olduğu belirlenmiştir. Bu model için belirlenen optimum koşullar, 60 ml etanol/100 ml çözücü sistem (etanol+su); 20 g üzüm çekirdeği/100 ml çözücü; 109 dk ekstraksiyon süresi şeklindedir. Optimum koşullar için elde edilen toplam fenolik madde miktarı, gallik asit, kateşin, epikateşin miktarları ve antioksidan aktivite değerleri sırasıyla 0.254 mg/g, 0.143 mg/g, 0.058 mg/g, 0.040 mg/g ve 67.90  $\mu\text{mol/ml}$ 'dir.

Çizelge 4. Üç faktörlü kompozit dizayn modelinde belirlenen optimum koşullarda elde edilen değerler

Table 4. Estimated values of three-factor design model at optimum conditions

Çözüm no Solution number	Etanol (ml/100 ml) Ethanol (ml/100ml)	Üzüm çekirdeği konsantrasyonu (g/100 ml) Grape seed concentration (g/100ml)	Ekstraksiyon süresi (dakika) Extraction period (minute)	Toplam fenolik (mg/g) Total phenolic (mg/g)	ORAC ( $\mu\text{mol/ml}$ ) ORAC ( $\mu\text{mol/ml}$ )	Gallik asit (mg/g) Gallic acid (mg/g)	Kateşin (mg/g) Catechin (mg/g)	Epikateşin (mg/g) Epicatechin (mg/g)
1 (D=0.855)*	60	20	109	0.254	64.90	0.143	0.058	0.040

\*İstenilen hedefe ulaşma fonksiyonu \*Desirability function

**KAYNAKLAR**

1. Vatai T, Skerget M, Knez Z, Kareth S, Wehowski M, Weidner E. 2008. Extraction and formulation of anthocyanin-concentrates from grape residues. *J Supercrit Fluids*, 45(1): 32-36.
2. Ghafoor K, Park J, Choi YH. 2010. Optimization of supercritical fluid extraction of bioactive compounds from grape (*Vitis labrusca B.*) peel by using response surface methodology. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 11: 485-490.
3. Lu Y, Foo LY. 1995. The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chem*, 65: 1-8.
4. Yu J, Ahmedna M. 2013. Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. *Int J Food Sci Technol*, 48: 221-237.
5. Fortana AR, Antonioli A, Bottini R. 2013. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics. *J Agric Food Chem*, 61: 8987-9003.
6. Boussetta N, Vorobiev E, Le LH, Cordin-Falcimaigne A, Lanoiselle JL. 2012. Application of Electrical Treatments in Alcoholic Solvent for Polyphenols Extraction From Grape Seeds. *Food Sci Technol (N Y)*, 4: 127-134.
7. Bucic-Kojic A, Planinic M, Tomas S, Bilic M, Velic D. 2007. Study of Solid-Liquid Extraction Kinetics of Total Polyphenols From Grape Seeds. *J Food Eng*, 81: 236-242.
8. Carrera C, Ruiz-Rodriguez A, Palma M, Barroso CG. 2012. Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds From Grapes. *Anal Chim Acta*, 732: 100-104.
9. Makris DP, Boskou G, Chiou A, Andrikopoulos NK. 2008. An Investigation on Factors Affecting Recovery of Antioxidant Phenolics and Anthocyanins From Red Grape (*Vitis vinifera*) Pomace Employing Water/Ethanol-Based Solutions. *Am J Food Technol*, 3: 164-173.
10. Jeganathan PM, Venkatachalam S, Karichappan T, Ramasamy S. 2014. Model Development and Process Optimization for Solvent Extraction of Polyphenols From Red Grapes Using Box Behnken Design. *Prep Biochem Biotechnol*, 44: 56-67.
11. Torres JL, Varela B, Garcia MT, Carilla J, Matito C, Centelles JJ, Cascante M, Sort X, Bobet R. 2002. Valorization of grape (*Vitis vinifera*) by products. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. *J Agric Food Chem*, 50: 7548-7555.
12. Kallithraka S, Garcia-Viguera C, Bridle P, Bakker J. 1995. Survey of solvents for the extraction of grape seed phenolics. *Phytochem Anal*, 6: 265-267.
13. Bordiga M, Travaglia F, Locatelli M, Coisson JD, Marco Arlorio M. 2011. Characterization of polymeric skin and seed proanthocyanidins during ripening in six *Vitis Vinifera L.* CV. *Food Chem*, 127: 180-187.
14. Katalinic V, Mozina SS, Skroza D, Generalic I, Abramovic H, Milos M, Ljubenkovic I, Piskernik S, Pezo I, Terpinic P, Boban M. 2010. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chem*, 119: 715-723.
15. Rivera-Dominguez M, Yahia EM, Wlodarchak N, Kushad M. 2010. Identification and quantification of phenolic compounds in grapes. *Acta Hort*, 877: 1233-1240.
16. Dahmoune F, Spigno G, Moussi K, Remini H, Cherbal A, Madani K. 2014. Pistacia lentiscus leaves as a source of phenolic compounds: microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Ind Crops Prod*, 61: 31-40.
17. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 299: 152-178.
18. Sanchez-Moreno C. 2002. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Sci Technol Int*, 8(3): 121-137.
19. Yılmaz Y, Göksel Z, Erdoğan SS, Öztürk A, Atak A, Özer C. 2015. Antioxidant Activity and Phenolic Content of Seed, Skin and Pulp Parts of 22 Grape (*Vitis vinifera L.*) Cultivars (4 Common and 18 Registered or Candidate for Registration). *J Food Process Pres*, 39(6): 1682-1691.
20. Garcia-Jares C, Vazquez A, Lamas JP, Pajaro M, Alvarez-Casas M, Lores M. 2015. Antioxidant White Grape Seed Phenolics: Pressurized Liquid Extracts from Different Varieties. *Antioxidants*, 4(4): 737-749.
21. Galanakis CM. 2012. Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends Food Sci Technol*, 26: 68-87.
22. Libran CM, Mayor L, Garcia-Castello EM, Vidal-Brotons D. 2013. Polyphenol Extraction From Grape Wastes: Solvent and pH Effect. *Agric Sci*, 4: 56.
23. Makris DP, Passalidi V, Kallithraka S, Mourtzinis I. 2016. Optimization of polyphenol extraction from red grape pomace using aqueous glycerol/tartaric acid mixtures and response surface methodology. *Prep Biochem Biotechnol*, 46(2): 176-182.
24. Casazza AA, Aliakbarian B, Mantegna S, Cravotto G, Perego P. 2010. Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques. *J Food Eng*, 100: 50-55.
25. Medouni-Adrar S, Boulekbache-Makhlouf L, Cadot Y, Medouni-Haroune L, Dahmoune F, Makhoukhe A, Madani K. 2015. Optimization of the recovery of phenolic compounds from Algerian grape by-products. *Ind Crop Prod*, 77: 123-132.
26. Krishnaswamy K, Orsat V, Gariépy Y, Thangavel K. 2013. Optimization of microwave-assisted extraction of phenolic antioxidants from grape seeds (*Vitis vinifera*). *Food Bioprocess Technol*, 6(2): 441-455.