

Öküzgözü Üzüm Çeşidine Ait Çekirdek ve Kabuklardaki Fenolik Bileşik İçeriklerinin Bölge Etkisi ile Değişimi

Gökhan Söylemezoğlu, Hande Tahmaz

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü 06110 Dışkapı, Ankara

e-posta: tahmazhande@gmail.com

Özet

Bitkilerin sekonder metabolizma ürünleri olarak tanımlanan fenolik bileşikler bitkilerde oldukça yaygın olup, günümüzde 8000'den fazla fenolik bileşiğin yapısı tanımlanmıştır ve bunlara devamlı olarak yeni tanımlanan fenolik bileşikler eklenmektedir. Üzüm ve şaraba duyuşal karakterizasyon katmalarının yanı sıra son yıllarda insan sağlığına olan yararlarının da anlaşılması ile birlikte fenolik bileşikler, üzerinde en yoğun çalışılan konulardan birisi olmuştur. Üzümlerin dokularındaki fenolik bileşik içeriklerinin iklim ve yetiştiricilik koşulları etkisi ile değişim gösterdiği bilinmektedir. Bu çalışmada bitkisel materyal olarak ülkemizin en çok şaraba işlenen kırmızı şaraplık üzüm çeşitlerinden biri olan Öküzgözü (*Vitis vinifera* L.) üzüm çeşidi Ankara, Denizli, Elazığ ve Tekirdağ illeri olmak üzere toplam dört bölgeden temin edilmiş ve bölgelerin fenolik bileşik içeriklerine olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Teknolojik olgunluk döneminde hasat edilmiş üzüm örnekleri çekirdek ve kabuklarına ayrılarak liyofilize edilmiş ve spektrofotometre cihazı ile toplam fenolik bileşik, toplam antosiyanin, antioksidan kapasite içerikleri ile HPLC-DAD cihazı ile fenolik bileşiklerden kateşin, epikateşin ve trans-resveratrol düzeyleri belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre çekirdek ve kabuklardaki fenolik bileşik içeriklerinin, Ankara ve Tekirdağ illerinden temin edilen üzümlere ait çekirdek ve kabuklarda diğer illere oranla daha yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Öküzgözü, fenolik bileşik, antioksidan aktivite, liyofilizasyon

Changes on Phenolic Compounds in Öküzgözü Grape Variety with Effect of Region in Seed and Skin

Abstract

Phenolic compounds defined as secondary metabolic products are quite common in plants, today more than 8,000 phenolic structures are defined and these phenolic compounds are continuously added to the newly ones. Phenolic compounds which gives sensory characterization to grapes and wine became one of the most intensive work after understanding of the benefits to human health. It's known that climate and cultivation conditions effect phenolic compounds changes of grapes. In this study we aimed to investigate the effects of regions to the phenolic compound content of Öküzgözü (*Vitis vinifera* L.) variety which is one of the most processed red wine grape varieties in Turkey. This variety was obtained from four regions including Ankara, Denizli, Elazığ and Tekirdağ. The grape examples were harvested when they reached technological maturity period and they divided into seed and skin, then lyophilized. Total phenolics, total anthocyanin and antioxidant capacity contents were determined with spectrophotometer and catechin, epicatechin and trans-resveratrol level determined with spectrophotometer HPLC-DAD. According to the results, grapes taken from Ankara and Tekirdağ regions have higher phenolic compounds in their seeds and skins than other regions.

Keywords: Öküzgözü, phenolic compound, antioxidant activity, lyophilization

Giriş

Fenolik bileşikler, aromatik halkasında bir veya daha fazla hidroksil (-OH) grubu içeren bileşiklerdir ve en basit fenolik bileşik bir adet hidroksil grubu içeren benzen diğer adıyla fenol (C_6H_5OH)'dür. Fenolik bileşikler en az bir adet olan aromatik halkalarına bağlı hidroksil gruplarına göre karakterize edilirler (Morton ve ark., 2000). Diğer karakteristik özellikleri ise şekerler ve proteinler gibi farklı moleküllerle yaptıkları bağlardır. Üzüm ve şaraplarda bulunan fenolik bileşiklerin yüksek kimyasal aktiviteye sahip olmaları, DNA, enzimler ve proteinlerle bağlanabilme özellikleri nedeniyle

antioksidan özellik göstermeleri (De Beer ve ark., 2005) günümüzde ekstraktlarının besin desteği olarak yoğun ilgi görmesini sağlamıştır (Waterhouse ve ark., 2000). Asmanın farklı dokularındaki ve şaraplardaki fenolik bileşik miktarları üzüm tür ve çeşidi, iklim, yetiştiricilik koşulları, stres faktörleri (Bavaresco ve ark., 2001, Prado ve ark., 2007) ve vinifikasyon teknikleri (Simón ve ark., 2003) ile değişiklik göstermektedir. Bu çalışmada Öküzgözü üzüm çeşidi 4 farklı elevasyondan temin edilerek çekirdek ve kabuklarındaki insan sağlığı açısından ön plana çıkmış fenolik bileşik düzeylerinin değişimi incelenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Bitkisel Materyal

Araştırmada ülkemizin en çok şaraba işlenen şaraplık çeşitlerinden Öküzgözü (*Vitis vinifera* L.) üzüm çeşidi bölgenin fenolik bileşiklere etkisinin incelenmesi amaçlı dört farklı ilden 2012 yılı hasat döneminde temin edilmiştir. Bu bölgeler 23 m yükseklikteki Tekirdağ, 729 m yükseklikteki Ankara, 842 m yükseklikteki Denizli ve 1078 m yükseklikteki Elazığ illeridir. Sağlıklı ve gelişme kuvveti iyi olan omcalar seçilerek teknolojik olgunluk döneminde her omcadan salkım örnekleri alınmıştır. Hasat edilen bitkisel materyal soğutucu kutulara konularak Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'ne ulaştırılmıştır. Her ilden temin edilen Öküzgözü çeşidine ait salkımlardan tesadüfen seçilen 5'er kg'lık üzüm örnekleri çekirdek ve kabuklarına ayrılarak fenolik bileşik analizlerine kadar -80°C' de dondurulmuştur.

Ekstraksiyon

Hasat günü dondurulan çekirdek, tane eti, kabuk, salkım iskeleti ve yapraklar Labconco Freezone freeze-drier kullanılarak -87°C'de 72 saat liyofilize edilmiştir. Ekstraksiyon Waterhouse ve ark., (2000)'e göre gerçekleştirilmiştir: 0.5 g örnek tartılarak her örnek 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınmış, üzerine 10 mL metanol ilave edilerek 3 dakika homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnek 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek supernatant rotary balonuna aktarılmış ve 40°C' lik vakum rotary evaporatoründe solvent uçurulmuştur. Daha sonra kuru ekstrakt ultrasonik banyoda saf su (0.01% HCl, v/v) ile alınarak son hacimleri 25 mL' ye tamamlanmış ve elde edilen ekstrakt spektrofotometrik analizlerde kullanılmıştır.

Örneklerin Saflaştırılması

Ekstraktlar HPLC analizleri için C₁₈ kartuş (Waters) kullanılarak vakum manifoldu (Agilent) ile saflaştırılmıştır. Ekstraktları yüklemeye önce kartuşlar 5 mL etil asetat ardından 5 mL metanol/HCl (99.99/0.01: v/v) ve 2 mL saf su/ HCl (99.99/0.01: v/v) ile aktive edilmişlerdir. Daha sonra 1 mL örnek kartuşa yüklenmiş ve 5 mL etil asetat ile kartuş yıkanmıştır. Etil asetat içeren ekstrakt azot gazı altında 40°C'de evapore edilerek ultrasonik banyoda 2 mL saf su ile (containing 0.01% HCl,

v/v) alınmıştır. Ardından ekstraktlar 0.45 µm PVDF filtreden geçirilerek amber viallere konulmuştur.

Toplam Fenolik Bileşik Analizi

Çekirdek ve kabuklardaki toplam fenolik bileşik düzeyi Folin-Ciocalteu yöntemi ile (Singleton ve Rossi, 1965) UV-VIS spektrofotometre (Analitik Jena-Specord 200) kullanılarak belirlenmiştir. Ölçümler 765 nm'de gerçekleştirilmiş ve sonuçlar mg kg⁻¹ gallic acid KA olarak verilmiştir.

Toplam Antosiyanin Analizi

Kabukların toplam antosiyanin miktarları pH diferansiyel metodu (Giusti ve Worlsted, 2001) ile UV-VIS spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir. Ölçümler 520 nm ve 700 nm'de gerçekleştirilmiş ve sonuçlar malvidin-3-glucoside cinsinden mg·kg⁻¹KA olarak verilmiştir.

Antioksidan Kapasite (TEAC)

Çekirdek ve kabuklarda antioksidan kapasite tayini ABTS yöntemi (Re ve ark., 1999) ile belirlenmiştir. Ölçümler UV-VIS spektrofotometre ile 734 nm'de gerçekleştirilmiş ve sonuçlar µM trolox/g KA olarak ifade edilmiştir.

HPLC Analizleri

Çekirdek ve kabuklardaki kateşin, epikateşin ve trans resveratrol miktarlarının belirlenmesi için "Shimadzu" marka "LC 10 AT VP" model HPLC cihazı ve "DAD SPD M10 AVP" dedektör kullanılmıştır. Fenolik bileşiklerin tanısı kullanılan standart maddelerin alıkonma zamanları ve spektrumlarından yararlanılarak yapılmıştır. Çizelge 1'de HPLC cihazının çalışma koşulları ve Çizelge 2'de fenolik bileşik miktarlarının belirlenmesinde kullanılan kalibrasyon parametreleri verilmiştir.

İstatistiksel Analiz

Elde edilen sonuçlar ANOVA ile değerlendirilmiş ve önemli bulunan farklılıklar için Duncan testi yapılmıştır. Araştırmada her analiz 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak ifade edilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Tekirdağ, Ankara, Denizli ve Elazığ olmak üzere 4 farklı ilde yetiştirilen Öküzgözü çeşidine ait kabuklardaki fenolik bileşik içeriklerine ait sonuçlar Çizelge 3'te,

çekirdeklerdeki fenolik bileşik içeriklerine ait sonuçlar ise Çizelge 4'te verilmiştir. Kabuklardaki fenolik bileşik içerik düzeyleri incelendiğinde toplam fenolik bileşik içeriklerinin 37850 ile 18075 mg/kg KA, antioksidan kapasitenin 353 ile 155 $\mu\text{mol/g}$ KA troluks, toplam antosiyanin içeriklerinin 20147 ile 9184 mg/kg KA, kateşin içeriklerinin 384 ile 0 mg/kg KA, epikateşin içeriklerinin tüm illerde 0 mg/kg KA ve trans resveratrol içeriklerinin 45.5 ile 2.2 mg/kg KA arasında değişen miktarlarda olduğu görülmektedir (Çizelge 3). Çekirdeklerdeki fenolik bileşik içerik düzeyleri incelendiğinde ise, toplam fenolik bileşik içeriklerinin 107350 ile 95150 mg/kg KA, antioksidan kapasitenin 1134 ile 634 $\mu\text{mol/g}$ KA troluks, kateşin içeriklerinin 38222 ile 25665 mg/kg KA, epikateşin içeriklerinin 2925 ile 1270 mg/kg KA ve trans resveratrol içeriklerinin 22.6 ile 0 mg/kg KA arasında değişen miktarlarda olduğu görülmektedir (Çizelge 4). Araştırma sonucunda fenolik bileşik içeriklerinin çekirdek dokusunda kabuğa göre daha fazla olduğu anlaşılmıştır. Araştırmamızın bitkisel materyali liyofilize edilerek analizler gerçekleştirilmiştir ve liyofilize örneklerle yapılan mevcut çalışmalar sınırlıdır. Bozan ve ark., (2008) 11 farklı üzüm çeşidine ait liyofilize çekirdeklerdeki fenolik bileşik içeriklerini belirlemişler ve toplam fenolik bileşik içeriklerini Kalecik Karası çeşidinde 136.2 mg/kg GAE, Boğazkere çeşidinde ise 94.2 mg/kg GAE KA olarak ölçmüşlerdir. Kateşin içeriği Kalecik Karası çeşidinde 23800 mg/kg KA, Boğazkere çeşidinde ise 4710 mg/kg KA; epikateşin içeriği ise Kalecik Karası çeşidinde 7760 mg/kg KA, Boğazkere çeşidinde ise 2490 mg/kg KA olarak ölçülmüştür. Xu ve ark. (2010) ise, 18 üzüm çeşidine ait liyofilize edilmiş kabuk ve çekirdeklerde toplam fenolik bileşik içeriğini çekirdekte en yüksek Cabernet Sauvignon çeşidinde 99280 mg GAE /kg KA, kabukta en yüksek Sangve çeşidinde 41210 mg GAE/kg KA; toplam antosiyanin düzeyini en yüksek 23050 mg/kg KA; antioksidan aktiviteyi çekirdekte en yüksek Cabernet Sauvignon çeşidinde 649.85 $\mu\text{mol TE/g}$ KA, kabukta en yüksek Black Pearl çeşidinde 368.67 $\mu\text{mol TE/g}$ KA olarak bulmuşlardır.

Araştırma sonucunda toplam fenolik bileşik içeriği kabuk ve çekirdeklerde en yüksek Ankara ve Tekirdağ illerinde, antioksidan

aktivite en yüksek kabukta Tekirdağ, çekirdekte Ankara ilinde, toplam antosiyanin en yüksek Ankara ilinde, kateşin en fazla kabukta Ankara, çekirdekte Tekirdağ illerinde, epikateşin içeriğine tüm illerde kabukta rastlanamazken, çekirdekte en yüksek Denizli ilinde, trans resveratrol içeriği ise en yüksek kabukta Denizli, çekirdekte Ankara ilinde belirlenmiştir (Çizelge 3 ve 4). Fenolik bileşik düzeyleri dokular bazında incelendiğinde Ankara ve Tekirdağ illeri fenolik bileşik içerikleri ile göze çarpmaktadır (Şekil 1). Tomano ve ark. (1979) Kyoho üzüm çeşidinde antosiyanin içeriğinin sıcaklık artışı ile paralel olarak düşüş gösterdiğini, Cabernet Sauvignon çeşidinde ise sıcaklığın 25°C' ye kadar olan yükselişi ile antosiyanin içeriğinin arttığını, daha fazla sıcaklıklara olan yükselişlerde azaldığını belirtmişlerdir. Mateus ve ark. (2015) iki farklı Fransız üzüm çeşidini iki farklı yükseklikteki bölgeden almışlar ve yükseklik artışı ile toplam antosiyanin içeriklerinde yükseliş, kateşin içeriğinde ise düşüş saptamışlardır. Denizli ve Elazığ illerinden sağlanan Öküzgözü çeşidinin antosiyanin içeriklerinin incelendiği bir diğer çalışmada ise bölgenin antosiyanin değişiminde önemli bir etkisinin olmadığı saptanmıştır (Kelebek, 2009).

Sonuç

Araştırma sonucunda elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde fenolik bileşik içeriklerinin bölge ve yetiştiricilik koşulları ile değişiklik gösterdiği anlaşılmıştır. Gerçekleştirilen diğer araştırmaların sonuçları ile karşılaştırıldığında fenolik bileşiklerin miktarlarının yükseklik, toprak, iklim, yetiştiricilik faktörleri gibi birçok faktörün kombinasyonları sonucu değişime uğradıkları sonucuna varılmıştır.

Teşekkür

Araştırmanın gerçekleştirilmesine olanak sağlayan "11B4347003" kod numaralı ve " Ülkemizde Yetiştirilen Asma Tür ve Çeşitlerinde Antioksidan, Resveratrol ve Diğer Fenolik Bileşiklerinin Belirlenmesi Üzerinde Bir Araştırma" konulu projeye sağladıkları destek için Ankara Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü'ne şükranlarımızı sunarız.

Kaynaklar

Bavaresco, L., Fregoni, C., 2001. Physiological role and molecular aspects of grapevine stilbenic compounds. In: Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine, 153-182 Netherlands.

- De Beer, D., Joubert, E., Gelderblom, W.C.A., Manley, M., 2005. Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines and selected phenolic compounds: in vitro inhibition of microsomal lipid peroxidation. *Food Chemistry*, 90: 569–577.
- Giusti, M., Wrolstad, R., 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F1.2.1-F1.2.13.
- Kelebek, H., 2009. Değişik bölgelerde yetiştirilen Öküzgözü, Boğazkere ve Kalecik karası üzümlerinin ve bu üzümlerden elde edilen şarapların fenol bileşikleri profili üzerinde araştırmalar. Doktora Tezi. Ç.Ü., Fen Bil. Ens., Gıda Mühendisliği ABD, 278s, Adana.
- Mateus, N., Proença, S., Riberio, P., Machado, J.M., De Freitas, V., 2001. Grape and wine polyphenolic composition of red vitis vini fera varieties concerning vineyard altitude. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 3(2):102-110.
- Morton, L.W., Cacceta, R.A.A., Puddey, I.B., Croft, K.D., 2000. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: Relevance to cardiovascular disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 27(3):152-159.
- Prado, A.R., Rojas, Y.M., Sort X., Lacueva, A.C., Torres, M., Raventós, L.M.R., 2007. Effect of soil type on wines produced from *Vitis vinifera* L. Cv. Grenache in commercial vineyards. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 779-786.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Biology and Medicine*, 26:1231–1237.
- Simon, B.F., Hernandez, T., Cadahia, E., Duenas, M., Estrella, I., 2003. Phenolic compounds in a Spanish red wine aged in barrels made of Spanish, French and American oak wood. *Eur. Food Res. Tech.*, 216: 150–156.
- Singleton, V.L., Rossi, J.J.A., 1965. Colorimetric of totalphenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. and Vitic.*, 16(3): 144–158.
- Tomana, T., Utsunomiya, N., Kataoka, I., 1979. The effect of temperatures around whole vines and clusters on the colouration of Kyoho grapes. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 48:261-266.
- Waterhouse, A.L., Ignelzi, E., Shirley, J.R., 2000. A comparison of methods for quantifying oligomeric proanthocyanidins from rape seed extracts. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 51: 383–389.
- Xu, C., Zhang, Y., Cao, L., Lu, J., 2010. Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. *Food Chemistry*, 119:1557-1565.

Çizelge 1. HPLC cihazının çalışma koşulları

HPLC kolonu	Phenomenex Gemini 260x4.60 mm C ₁₈	
Enjeksiyon hacmi	30 µL	
Taşıyıcı faz	A = Su/ Formik asit (99/1: h/h) B= Asetonitril (100/100: h/h)	
Akış hızı	0.7 mL/dakika	
Kolon sıcaklığı	20°C	
Elüsyon süresi	85 dakika	
Elüsyon profili	Zaman	% A
	0.00	97.5
	45.00	75.0
	50.00	50.0
	55.00	00.0
	68.00	00.0
	70.00	20.0
	85.00	97.5

Çizelge 2. Fenolik bileşik miktarlarının belirlenmesinde kullanılan kalibrasyon parametreleri

Fenolik bileşikler	Alıkonma zamanı (Dakika)	λ vis nm	Kalibrasyon denklemi	
Kateşin	28.6	280	$y=15323x-160,89$	
Epikateşin	33.7	280	$y=33977x-7173$	
Trans resveratrol	54.9	306	$y=403404x-78716$	
Fenolik bileşikler	R ² değeri	Dedeksiyon limiti	Kuantifikasyon limiti	Geri kazanım oranı (%)
Kateşin	0.9997	0.96	2.91	89.76
Epikateşin	0.9999	0.69	2.09	88.81
Trans resveratrol	0.9998	0.28	0.86	89.72

Çizelge 3. Öküzgözü çeşidine ait kabuklardaki fenolik bileşik içerikleri

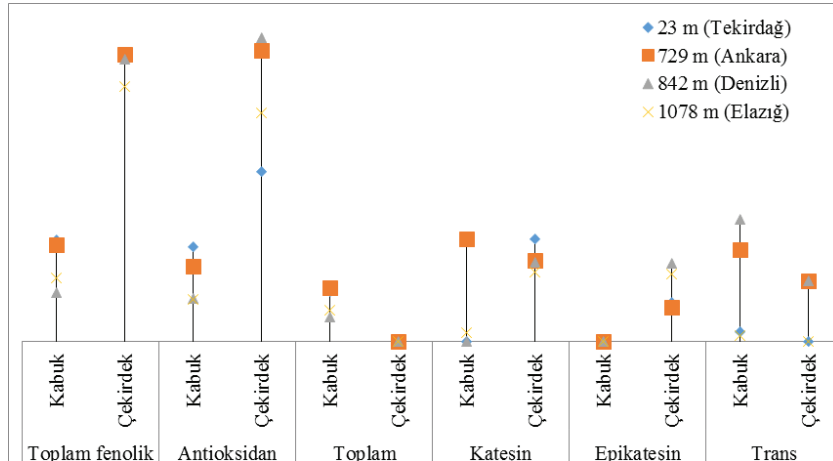
	Toplam fenolik bileşik (mg/kg KA)	Antioksidan kapasite (μ mol/g troloks)	Toplam antosiyanin (mg/kg KA)	Kateşin (mg/kg KA)	Epikateşin (mg/kg KA)	Trans resveratrol (mg/kg KA)
Elazığ	23750 $\pm$ 125.0B	155 $\pm$ 2.932C	11635 $\pm$ 55.519C	30.9 $\pm$ 0.136B	0.0 $\pm$ 0.0	2.2 $\pm$ 0.00C
Denizli	18075 $\pm$ 0.0C	161 $\pm$ 7.272C	9184 $\pm$ 0.0D	0.0 $\pm$ 0.0C	0.0 $\pm$ 0.0	45.5 $\pm$ 1.195A
Ankara	35925 $\pm$ 1500.0A	280 $\pm$ 15.173B	20147 $\pm$ 12.338A	383.6 $\pm$ 12.473A	0.0 $\pm$ 0.0	34.0 $\pm$ 0.304B
Tekirdağ	37850 $\pm$ 25.0A	353 $\pm$ 6.090A	18580 $\pm$ 49.350B	0.0 $\pm$ 0.0C	0.0 $\pm$ 0.0	36.1 $\pm$ 0.726B

$P<0.05$: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan testine göre önemlidir.

Çizelge 4. Öküzgözü çeşidine ait çekirdeklerdeki fenolik bileşik içerikleri

	Toplam fenolik bileşik (mg/kg KA)	Antioksidan kapasite (μ mol/g KA troloks)	Kateşin (mg/kg KA)	Epikateşin (mg/kg KA)	Trans resveratrol (mg/kg KA)
Elazığ	95150.0 $\pm$ 100.0B	854.93 $\pm$ 6.849B	25665.0 $\pm$ 311.882C	2498.9 $\pm$ 55.5B	0.0 $\pm$ 0.0C
Denizli	105350.0 $\pm$ 1600.0A	1133.85 $\pm$ 34.405A	29652.0 $\pm$ 195.152B	2925.1 $\pm$ 42.050A	22.4 $\pm$ 0.043B
Ankara	107350.0 $\pm$ 800.0A	1086.12 $\pm$ 22.37A	30069.1 $\pm$ 1245.786B	1269.8 $\pm$ 30.512C	22.6 $\pm$ 0.014A
Tekirdağ	105950.0 $\pm$ 200.0A	634.16 $\pm$ 2.960C	38222.4 $\pm$ 540.686A	1435.3 $\pm$ 75.447C	0.0 $\pm$ 0.0C

$P<0.05$: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan testine göre önemlidir.



Şekil 1. Kabuk ve çekirdeklerde yükseklik etkisi ile fenolik bileşiklerin değişimi