

T.C
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ ORTAK PROGRAMI

**KIRMIZI ÜZÜM PROSES ATIKLARINDAN POLİFENOLLERİN BASINÇLI SIVI
EKSTRAKSİYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÜLŞAH GÜLER

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. BERRİN BOZAN

BİLECİK 2021

10415097

T.C
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ ORTAK PROGRAMI

**KIRMIZI ÜZÜM PROSES ATIKLARINDAN POLİFENOLLERİN BASINÇLI SIVI
EKSTRAKSİYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÜLŞAH GÜLER

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. BERRİN BOZAN

BİLECİK 2021

10415097

BEYAN

“Kırmızı Üzüm Proses Atıklarından Polifenollerin Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu” adlı yüksek lisans tezinin hazırlık ve yazımı sırasında bilimsel ahlak kurallarına uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezin herhangi bir kısmının Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Bu çalışmam, Bilimsel Araştırmalar Projeleri (BAP), TÜBİTAK veya benzeri kuruluşlarca desteklenmesi durumunda; projenin ve destekleyen kurumun adı proje numarası ile birlikte beyan edilmelidir.			
DESTEK ALINMIŞTIR		DESTEK ALINMAMIŞTIR	
Destek alındı ise;			
Destekleyen Kurum:			
Desteğin Türü		Proje Numarası	
1- BAP (Bilimsel Araştırma Projesi)			
2- TÜBİTAK			
Diğer;			

Gülşah GÜLER

.....

Tarih

.....

İmza

.....

ÖN SÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca danışmanlığımı yapan, tez konusunun belirlenmesinden, tezin hazırlanmasına kadar her aşamada emeği geçen sayın hocam Prof. Dr. Berrin Bozan'a,

Yüksek Lisans eğitimimin her aşamasında benimle yakından ilgilenen ve hiçbir zaman desteğini eksik etmeyen sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Emir Zafer Hoşgün'e,

Hayatımın her döneminde maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, her zaman benim yanımda olan canım aileme ve kuzenim Gamze UYSAL SAPANCI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Gülşah GÜLER

.../.../2021

ÖZET

KIRMIZI ÜZÜM PROSES ATIKLARINDAN POLİFENOLLERİN BASINÇLI SIVI EKSTRAKSİYONU

Bu çalışmanın amacı, basınçlı solvent ekstraksiyon yöntemi ile kırmızı üzüm proses atıklarından polifenollerin geri kazanılmasıdır. Basınçlı sıvı ekstraksiyon parametrelerinin (Sıcaklık, ekstraksiyon süresi ve pH), polifenollerin kalitesi ve miktarı ile DPPH antiradikal süpürme aktivitesi üzerindeki etkisi, yanıt yüzeyi deneysel tasarımı kullanılarak araştırılmıştır. Çözücü olarak %50 etanol kullanılarak, 1700 psi basınçta, sıcaklık (50-120°C), ekstraksiyon süresi (20-40dk) ve pH (2,5-5) kullanılarak bir optimizasyon çalışması yapılmıştır. Ekstraksiyon parametrelerinin antioksidan kapasitesi (DPPH) ve ekstraktların kimyasal bileşimi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Sonuçlar ekstraksiyon veriminin %7-27.67, toplam fenol veriminin %1.07-11.31, toplam flavanol veriminin %0.76-5.90, toplam polimerik prosiyanidin veriminin %0.38-3.56 ve toplam antosiyanin veriminin 0.04-5,17 mg/100g arasında değiştiğini göstermiştir. 19.81 µg/ml (EC50) olarak en yüksek DPPH süpürme potansiyeli 120°C, pH 5 ve 20 dakikalık ekstraksiyon koşulunda elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Basınçlı sıvı ekstraksiyonu, Kırmızı üzüm proses atığı, Polifenol, Antioksidan aktivite

ABSTRACT

PRESSURIZED LIQUID EXTRACTION OF POLYPHENOLS FROM RED GRAPE POMACE

The objective of this study was to recover polyphenols from red grape process waste by pressurized solvent extraction method. Effect of pressurized liquid extraction parameters (Temperature, extraction time and pH) on the quality and quantity of polyphenols as well as DPPH antiradical scavenging activity was investigated using response surface experimental design. The response surface optimization of the extraction of polyphenols from solid winery waste (grape pomace), was studied using pressurized liquid extraction (PLE). An optimization study was performed using 50% ethanol as a solvent and with extraction pressure (1700 psi), temperature (50-120°C), extraction time (20-40 min) and pH (2,5-5) as independent variables. The influence of extraction parameters on the antioxidant capacity (DPPH) and chemical composition of the extract was evaluated. Results indicated that extraction yield changed between 7- 27.67%, total phenol yield between 1.07-11.31%, total flavanol yield 0.76-5.90%, total polymeric procyanidin yield 0.38-3.56%, and total anthocyanin yield 0.04-5,17 mg/100 g. The highest DPPH scavenging activity as 19.81 mg/ml (EC₅₀) was obtained at 120°C, pH 5 and for 20 min extraction condition. Extraction yields as well as total polyphenol yields increased with temperature increase, however, pH lower than 3,75 caused low polyphenol content and higher EC₅₀ values.

Keywords: Pressurized liquid extraction, Winery solid waste, Polyphenol, Antioxidant activity

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖN SÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
1.1. Üzüm ve Üzüm Cibresi	2
1.1.1. Üzüm	2
1.1.2. Üzüm Cibresi	3
1.1.3. Üzüm Cibresinin Değerlendirilmesi	4
1.1.4. Türkiye’de Üzümün Yeri	5
1.2. Üzümde Bulunan Fenolik Bileşikler	6
1.2.1. Fenolik Asitler	6
1.2.2. Flavonoidler	8
1.2.2.1. Antosiyanidinler.....	8
1.2.2.2. Flavonlar ve Flavonoller	9
1.2.2.3. Flavanonlar ve Flavanonoller	11
1.2.2.4. Flavanoller (Kateşinler ve Lökoantosiyanidinler).....	12
1.2.2.5. Proantosiyanidinler (Kondense Tanenler)	13
1.3. Üzüm Cibresi ile Yapılan Çalışmalar.....	17
2. EKSTRAKSİYON.....	19
2.1. Klasik Çözücü (Katı-Sıvı) Ekstraksiyonu	19

2.2. Enzimatik Çözücü Ekstraksiyon Yöntemi.....	21
2.3. Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu (Hızlandırılmış Sıvı Ekstraksiyonu-ASE)	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM	26
3.1. Hammadde.....	26
3.2. Öğütme	26
3.3. Üzüm Cibresiden Polifenolik Maddelerin Klasik Çözücü Ekstraksiyonu.....	26
3.4. Üzüm Cibresiden Polifenolik Maddelerin Enzimatik Çözücü Ekstraksiyonu ...	26
3.5. Üzüm Cibresinden Polifenolik Maddelerin Basınçlı sıvı Ekstraksiyonu	27
3.6. Cevap Yüzey Yöntemi ile Deney Tasarımı	27
3.7. Fenolik Bileşiklerin Miktarlarının Belirlenmesi	30
3.7.1. Toplam Fenolik (TP) Bileşen Tayini	30
3.7.2. Toplam Flavanol Miktarı	30
3.7.3. Toplam Polimerik Prosiyanidin (PP) Miktarı.....	31
3.7.4. Toplam Antosiyanin Tayini.....	32
3.7.5. Ortalama Polimerizasyon Derecesi	33
3.7.5.1. Vanilin-HCl-Metanol.....	33
3.7.5.2. Vanilin-HLC-Asetik Asit	33
3.7.6. DPPH Serbest Radikal Süpürücü Aktivite Tayini.....	34
4. DENEYSEL BULGULAR.....	37
4.1. Farklı Ekstraksiyon Tekniklerinin Karşılaştırılması	37
4.2. Cevap Yüzey Yöntemi Deney Tasarımı ile Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu	39
4.3. Basınçlı Sıvı Parametrelerinin Ekstre Verimi ve Toplam Fenolik Bileşik Miktarlarına Etkisi	40
4.3.1. Ekstre Verimine Etkisi	40
4.3.2. Toplam Fenolik Bileşen (TFB) Miktarına Etkisi	44
4.3.3. Toplam Flavanol (TFL) Miktarına Etkisi	50

4.3.4. Toplam Polimerik Proantosiyanidin (TPP) Miktarına Etkisi	56
4.3.5. Toplam Antosiyanın (TA) Miktarına Etkisi.....	61
4.3.6. DPPH Serbest Radikal Süpürücü Aktivite (EC ₅₀ , µg/ml)	67
4.3.7. Prosiyanidinlerin Ortalama Polimerizasyon Derecesi (MDP).....	69
5. TARTIŞMA VE YORUM	70
KAYNAKÇA.....	75



ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Türkiye’de Üzüm Tüketim Alanları	6
Şekil 1.2. Benzoik asit ve hidroksisinamik asit	7
Şekil 1.3. Flavonoidlerin kimyasal yapısı	8
Şekil 1.4. Antosiyanidin.....	9
Şekil 1.5. Flavonlar ve flavonollerin kimyasal yapısı.....	10
Şekil 1.6. Flavanonol ve flavanon kimyasal yapısı.....	11
Şekil 1.7. Flavanon ve dihidroksikalkon kimyasal yapısı.....	11
Şekil 1.8. Flavanol kimyasal yapısı	12
Şekil 1.9. Lökoantosiyandinlerin kimyasal yapısı	13
Şekil 1.10. Tanen ve flavan-3-ol alt birimlerinin genel yapısı (Appeldoorn,2009).....	14
Şekil 1.11. Proantosiyandin yapıları (Appeldoorn,2009)	15
Şekil 1.12. Proantosiyandin bağlanma tipleri (Appeldoorn,2009)	15
Şekil 1.13. Proantosiyandinlerin alt grupları	16
Şekil 2.1. Basınçlı sıvı ekstraksiyonunun şematik gösterimi (Handley, 1999).....	24
Şekil 3.1. Gallik asitin toplam fenol analizi kalibrasyon doğrusu	30
Şekil 3.2. Kateşinin flavanol analizi kalibrasyon doğrusu.....	31
Şekil 3.3. Prosiyanidin B2’nin BuOH-HCl analizi kalibrasyon doğrusu	32
Şekil 3.4. Vanilin-HCl-metanol analizi kalibrasyon doğrusu	33
Şekil 3.5. Vanilin-HCl-asetik analizi kalibrasyon doğrusu.....	34
Şekil 3.6. DPPH serbest radikalinin kimyasal yapısı.....	35
Şekil 3.7. DPPH konsantrasyon-absorbans kalibrasyon eğrisi	36
Şekil 4.1. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin toplam fenolik bileşen verimi (%) üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri.....	43
Şekil 4.2. BSE Parametrelerinin ekstredeki toplam fenolik bileşen içeriğine (mg GA/g ekstre) tekli ve ikili etkileri	47

Şekil 4.3. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin toplam fenolik bileşen verimi (%) üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri.....	49
Şekil 4.4. BSE Parametrelerinin ekstredeki toplam flavanol içeriğine (mg GA/g ekstre) tekli ve ikili etkileri	53
Şekil 4.5. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin toplam flavanol verimi (%) üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri	55
Şekil 4.6. BSE parametrelerinin ekstredeki toplam polimerik prosiyanidin içeriğine (mg PB2/g ekstre) tekli ve ikili etkileri	59
Şekil 4.7. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin toplam polimerik prosiyanidin verimi (%) üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri	61
Şekil 4.8. BSE parametrelerinin ekstredeki toplam antosiyanin içeriğine tekli ve ikili etkileri	64
Şekil 4.9. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin toplam antosiyanin verimi (%) üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri.....	66
Şekil 5.1. En düşük ve en yüksek EC ₅₀ değerlerine sahip ekstrelerin içeriklerinin karşılaştırılması	73

TABLÖLER LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1. Basınçlı sıvı ekstraktöründe çalışılan parametreler.....	27
Tablo 3.2. Ekstraksiyon çalışmasında incelenen parametreler ve seviyeleri	29
Tablo 3.3. Ekstraksiyon çalışmasında bağımsız değişkenlerin istatistiksel kombinasyonu....	29
Tablo 4.3. Basınçlı sıvı ekstraksiyon koşullarının ekstraksiyon verimine etkisi.....	41
Tablo 4.4. Ekstre verimi (% , kuru baz) için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi	42
Tablo 4.5. BSE koşullarının toplam fenolik bileşen miktarı üzerine etkisi.....	45
Tablo 4.6. Ekstredeki toplam fenolik bileşen TFB (mg gallik asit/g ekstre) için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi	46
Tablo 4.7. Toplam Fenolik bileşen verimi (g GA/100 g cibre) için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi	48
Tablo 4.8. BSE koşullarının toplam flavanol (TFL) miktarı üzerine etkisi	51
Tablo 4.11. BSE ekstraksiyon koşullarının toplam prosiyanidin (TPP) miktarı üzerine etkisi	57
Tablo 4.12. Ekstredeki toplam polimerik prosiyanidin (TPP) (mg PB2/g ekstre) için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi	58
Tablo 4.13. Toplam polimerik prosiyanidin verimi (TPP) (G PB2/100g ekstre) için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi	60
Tablo 4.14. BSE koşullarının toplam antosiyanin (TA) miktarı üzerine etkisi.....	62
Tablo 4.15. Ekstredeki toplam antosiyanin (TA) (mg Cyanidin/100 g ekstre) için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi	63
Tablo 4.17. BSE koşullarının DPPH serbest radikal süpürücü aktiviteleri üzerine etkisi.....	67
Tablo 4.18. DPPH serbest radikal süpürücü aktivite için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi	68

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

$(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$	:	Amonyum Demir (III) Sülfat
$^{\circ}\text{C}$	:	Celcius
μg	:	Mikrogram
$^1\text{O}_2$	:	Singlet Oksijen
Atm	:	Atmosfer Basınç
BHA	:	Bütillenmiş Hidroksianisol
BHT	:	Bütillenmiş Hidroksitoluen
BSE	:	Basıncılı Sıvı Ekstraksiyonunu
$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_5$	:	Propil Gallat
$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_5$	:	Oktil Gallat
$\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_5$	:	Dodesil Gallat
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$	:	Askorbik Asit (C Vitamini)
CO_2	:	Karbon Dioksit
Dk	:	Dakika
DPPH	:	2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil
EC_{50}	:	DPPH'nin %50'sini süpürücü ekstre konsantrasyonu
GA	:	Gallik Asit
G	:	Gram
H_2O_2	:	Hidrojen Peroksit
H_2SO_4	:	Sülfürik Asit

HCl	:	Hidroklorik Asit
HCOOH	:	Formik Asit
HNO₃	:	Nitrik Asit
HOCl	:	Hipoklorus Asit
KCl	:	Potasyum Klorür
L	:	Litre
BS	:	Basınçlı Sıvı
M	:	Molar Konsantrasyon
MeOH	:	Metanol
Mg	:	Miligram
ml	:	Mililitre
mm	:	Milimetre
mmHg	:	Milimetre Civa
MPa	:	Megapaskal
Na₂CO₃	:	Sodyum Karbonat
NaCH₃COO.3H₂O	:	Sodyum Asetat
Nm	:	Nanometre
ROS	:	Reaktif Oksijen Türleri
Sa	:	Saat
SC	:	Süper Kritik Akışkan
TA	:	Toplam Antosiyanin

TBHQ	:	Tersiyer Bütıl Hidrokinon
TFB	:	Toplam Fenolik Bileşen
TFL	:	Toplan Flavanol
TPP	:	Toplam Polimerik Prosiyanidin
Vd	:	Ve Diğerleri
A	:	Alfa
B	:	Beta
Γ	:	Gama
Δ	:	Delta

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Doğal ürünlerin sağlık üzerinde olumlu etkilerinin görülmesiyle bu ürünlere tüketici talebi artmış, talebe paralel olarak da doğal ürünlerin elde edilmesi, etkilerinin belirlenmesi, etkili bileşenlerin analizleri üzerine çalışmalarda artış gözlenmiştir. Bu ürünlerin başında özellikle sahip oldukları antioksidan özelliklerinden dolayı fenolik bileşikler (polifenoller) içeren doğal ürünler gelmektedir.

Üzüm fenolik bileşiklerce zengin bir meyvedir. *Vitis vinifera*, şarap endüstrisi için yetiştirilen ana türdür. Bütün üzümün meyve suyu veya şarap için preslenmesinden sonra elde edilen katı bir atık olan üzüm posası, kabukları, sapları ve tohumları içerir ve şarap üretimi için kullanılan toplam taze üzüm ağırlığının yaklaşık %20'sini (a/a) temsil eder (Xu vd., 2010:1157; Panouillé vd., 2007:417). Bu atıklarda önemli miktarda polifenol bulunmaktadır. Dünyada yılda yaklaşık dokuz milyon ton üzüm posası açığa çıkmaktadır. Şarap yapımından sonra temel yan ürün olan ve yaklaşık %20-26 oranında üzüm çekirdeği içeren üzüm posası, yağ ve protein ile birlikte polifenol kaynağı olarak kullanılmaktadır. İnsan sağlığına yararları nedeniyle, üzüm ekstraktları diyet takviyelerinin üretimi için hammadde olarak kullanılabilir (Mourtzinou ve Goula, 2019).

Polifenoller bitkisel kaynaklardan katı-sıvı ekstraksiyonu ile elde edilmektedir. Klasik katı-sıvı ekstraksiyon işlemi bazı dezavantajlara sahip olduğundan (uzun ekstraksiyon süresi, yoğun işçilik, büyük hacimlerde çözücü gerekliliği ve düşük ekstraksiyon verimleri) son yıllarda farklı ekstraksiyon teknikleri ortaya çıkmıştır.

Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu tekniği ile yüksek sıcaklık ve basınçta ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilir. Yüksek sıcaklık ve basınç çözünenin difüzyon hızını artırarak, kütle transferini hızlandırır. Ekstraksiyon sırasında yüksek sıcaklık ve basıncın kullanılması sadece ekstraksiyon verimini arttırmakla kalmaz, aynı zamanda ekstraksiyon süresini ve çözücü tüketimini de azaltır, ekstraksiyon daha kısa sürede gerçekleştirildiği için oksijeni ve ışığa duyarlı bileşiklerin bozulmasını önler.

Üzüm ve üzüm posasından polifenollerinin ekstraksiyonu ile ilgili literatürde çok fazla çalışma bulunmaktadır (Chena vd., 2020:104). Bu çalışmaların pek çoğu klasik ekstraksiyon tekniklerine aittir (Spigno vd., 2007:200; Karacabey ve Mazza, 2008:6318; Burin vd., 2014). Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonunda bazı çalışmalarda kritik altı su çözücü olarak kullanılmıştır (Monrad vd., 2010:2862). Şarap atığı olan posanın basınçlı sıvı ekstraksiyonu ile ilgili çalışmalar ise sınırlı sayıdadır (Pereira vd. 2019:105; Spigno vd., 2007:200). Yaptığımız

araştırmalarda üzüm posasında bulunan fenolik bileşiklerin basınç altında ekstraksiyonuna pH etkisi ise çalışılmadığı görülmüştür. Bu nedenle bu çalışmada farklı asidik pH değerlerinde, farklı sıcaklık ve ekstraksiyon zamanlarında şarap atığı olan üzüm posasının basınçlı sıvı ekstraksiyonu çalışılmış, ekstraksiyon parametrelerinin Cevap Yüzey Deney Tasarımı kullanarak üzüm posasında bulunan toplam fenolik bileşen, toplam flavan-3-ol, toplam procyanidin, toplam antosiyanin ve ekstrelerin DPPH serbest radikal süpürücü aktiviteleri üzerine etkileri incelenmiştir. Ayrıca, Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu ile karşılaştırma yapmak amacıyla üzüm posası (cibresi)'nin klasik katı-sıvı ekstraksiyonu ve enzimatik ekstraksiyonları gerçekleştirilmiştir. Kullanılan ekstraksiyon tekniklerinin ekstrede bulunan prosiyanidinlerin polimerizasyon derecesi üzerine etkileri de yapılan çalışmalar içindedir.

1.1.  z m ve  z m Cibresi

1.1.1.  z m

 z m, Viteceae familyasının *Vitis* cinsinden  i ekli bitki meyvesinin adıdır.  z m, iklim yönünden çok seçici bir bitki değildir, uzun süreli bitkidir ve çoğalma yöntemleri daha kolaydır bundan dolayı dünyada en yaygın yetiştiriciliği olan bitkilerden biridir. Dünyada  z m yetiştiriciliği, Kuzey Yarımkürede 20 -50 , Güney Yarımkürede ise 20 -40  enlemleri arasında iklim şartları uygun olan yerlerde yetiştirilmektedir.

Dünya  z m  retiminde İtalya, Fransa, Amerika Birleşik Devletleri, İspanya, Türkiye, başlıca ülkelerdir. 2002 yılı verilerine göre dünyada 7,4 milyon hektar alanda 61 milyon ton üzüm üretimi yapılmakta ve %24 ile İtalya ilk sırada, Türkiye ise %12 ile 5. sıradadır (Taşkaya, 2003:7).

Uygun iklim ve toprak özelliklerine sahip olması nedeniyle Türkiye,  z m yetiştiriciliği alanında dünyanın önemli ülkeleri arasında yer almaktadır. 600 bin hektarlık üzüm bağı alanına sahiptir. Üretilen  z m n yaklaşık %63'  çekirdekli %27'si ise  ekirdeksiz üzümdür.

 z m,  ekirdek, meyve eti ve tüm taneyi kaplayan kabuktan oluşmaktadır. Olgunlaşma sırasında oranlarda değişiklikler gözlenir.  z mler %4 ile %10 kabuk, %3 ile %4 çekirdek ve %3 ile %5 gövde ve çöp oluşur.  z m  ekirdeği %10 ile %20 yağ ve %5 ile %6 tanen içerir.  z mler sıkıldığında kalan üzüm suyu %25 civarındadır. Kırmızı  z m posası, üzüm fermentasyonu nedeniyle %2 ile %9 oranında şarap taşı içerir ve bu nedenle tartarik asit üretiminde kırmızı üzüm posası kullanılır. Üzümde, kabuğa yakın kısımlarda şeker oranı

yüksek, asitliği ise düşüktür. Bu nedenle presleme öncesi akan şıranın şeker oranı daha sonra akan şıradan daha yüksektir (Deryaoğlu ve Canbaş, 2004:105).

Etli kısım: Çekirdeği saran kısım daha sıkı ve etliken kabuğa yakın kısımlarda şıra daha fazla, doku daha yumuşaktır. Etli kısım fermentasyonda etkin olan şekeri içermesinden dolayı önemlidir. Üzümdeki şeker oranı, ekolojik koşullara, türüne, kültürel şartlara bağlı olarak farklılık göstermektedir. Şıra da asitler ve madensel maddeler de bulunmaktadır. Tanen miktarı çok azdır ve ham selüloz bulunmamaktadır.

Kabuk: Ham selüloz ve tanen içerir. Kuru maddede %3,7 ile %3,8 tanen vardır. Kabuk kısmında renk maddeleri bulunmaktadır.

Çekirdek: Her üzümde tane ağırlığının %3 ile %4'ünü oluşturan 2-4 adet tohum bulunur. Çekirdek %10 ile %20 yağ ve %4 tanen içerir.

Sap ve Çöp: Üzümün beslenmesinde taşıyıcı görevi görürler. Sapların ve çöplerin ağırlığı, olgunluğun başlamasıyla azalır. Üzüm salkımındaki yeşil sap ve çöp %70 ile %80 oranında su içerir, tanen, tartarik asit, malik asit bulunur. Kuru madde %6 ile %10 kül içerir.

Cibre: Sıkılarak suyu alınır, kalan cibrenin %50'si kabuk, %25'i tohum ve sap karışımından oluşur. Cibre, şarap taşı, yağ ve doğal boya elde etmek için kullanılır. Cibrede bulunan yaklaşık %20 şeker nedeniyle sirke ve alkollü içki üretiminde de kullanılır.

1.1.2. Üzüm Cibresi

Üzümün şarap ve meyve suyu üretiminde üzümün sulu kısmını ayırdıktan sonra geriye kalan çekirdeği, kabuğu ve çöpünden oluşan posa kısmına üzüm cibresi denir.

Şarap ve meyve suyu fabrikalarında yapılan üretimden sonra arta kalan cibre farklı ürünler elde eden firmalar tarafından satın alınmakta ve değerlendirilmektedir.

Şarapçılıkta kullanılan üzümlerin %30'dan fazlasının şaraphane yan ürünleri olduğu düşünüldüğünde, büyük miktarda atık su ve organik atık oluşmaktadır (Mateo ve Maicas, 2015:13). En büyük yan ürün, esas olarak preslenmiş kabuklar, tohumlar ve saplardan oluşan üzüm cibresidir (Ferri vd., 2016:338).

Üzüm cibresi, hem cibrenin fermentasyondan önce suyunun ayrıldığı beyaz şarap üretiminden hem de fermentasyon sonrası cibrenin ayrıldığı kırmızı şarap üretiminden kaynaklanmaktadır. Üzümün suyu çıkarıldıktan sonra, kabuk, saplar ve tohumlar atık hale gelir ve etkili bir şekilde kullanılmazsa çeşitli çevresel tehlikeler oluşturabilir. Kullanılmayan üzüm cibresi metan gazı üretir, sinekleri ve zararlıları çeker ve kötü kokular yayar ve sızıntı

suları oksijen tükenmesine, toprağın, yüzey ve yeraltı sularının kirlenmesine neden olabilir (Iora ve vd., 2014:62).

Üzüm cibresinde fenolik asitler, çeşitli flavonoidler, flavanoller (kateşin, epikateşin ve epigallokateşin) ve diğer fenolik bileşikler (proantosiyanidinler) gibi büyük miktarlarda biyoaktif madde kalır (Tournour vd., 2015:397). Üzüm cibresindeki bu bileşikler güçlü antioksidan bileşiklerdir. Üzümün içerdiği bu güçlü antioksidan özelliği sayesinde vücudumuzda kimyasal reaksiyonlar sonucu oluşan veya sigara, alkol, kirli hava ile vücudumuza alınan serbest radikalleri etkisiz hale getirir. Antioksidanlar yardımı ile hastalık oluşumu önlenabilir, yaşlanma süreci geciktirilebilir ve bağ dokusu güçlendirilebilir.

1.1.3. Üzüm Cibresinin Değerlendirilmesi

Dünya çapındaki üzüm üretiminin %80'nin şarap yapımında kullanıldığı düşünüldüğünde, açığa çıkan atıkların hacmi ciddi sorunlar oluşturmaktadır. Üzüm cibresi çok miktarda fenolik bileşiklerin yanı sıra, üzüm posası diyet lifi (vücut enzimleri tarafından sindirilemeyen karbonhidratlar) bakımından zengindir ve protein, çözünür şekerler, lipitler ve inorganik maddelerden oluşur (Fontana vd., 2013:8987).

Avrupa Konseyi Yönetmeliği (EC) 479/2008'e göre, üzüm posası ve tortuları şarap üretiminden sonra alkol damıtma tesislerine gönderilmelidir. Ancak, küçük şarap üreticileri genellikle bu yasaya uymamakta ve üzüm çekirdeği, üzüm sapı ve şarap tortusu ile birlikte organik atık oluşturmaktadır (Devesa-Rey vd., 2011:2327). Bu nedenle artan şarap üretimiyle birlikte, fazla miktardaki üzüm posasının giderilmesi zorunlu hale gelmiştir (Arvanitoyannis vd., 2006).

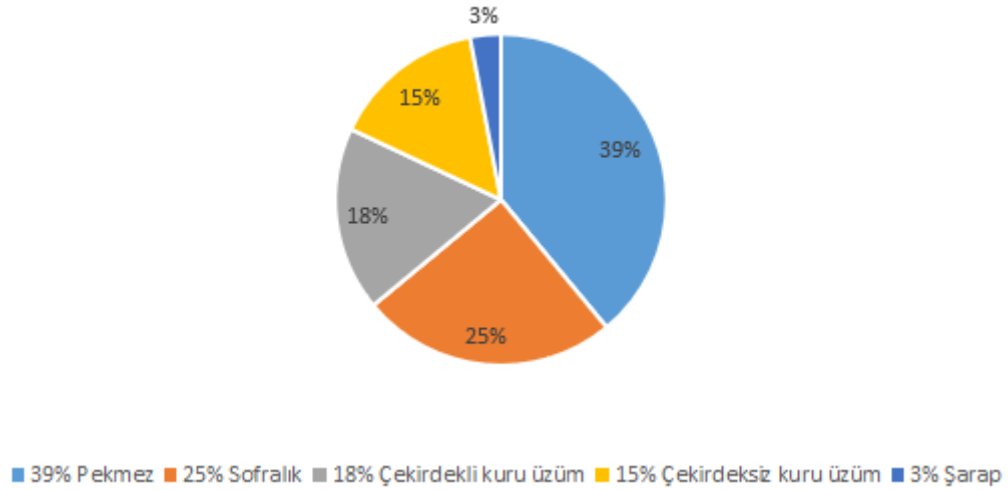
Üzüm cibresinin hayvan yemi olarak kullanılması, yüksek su içeriği veya yüksek seviyelerde fenolik bileşikler gibi fizibilitesini etkileyen bazı sorunları beraberinde getirir ve işlemeyi zorlaştırır. Ayrıca, bu tür atıkların analitik bileşimi yıl boyunca önemli ölçüde değişebilir ve sonuç olarak hayvan yemi üreticileri, bileşime bağlı olarak yem formülasyonlarını değiştirmek zorundadır. (San Martin vd., 2016:6874). Lignin gibi polimerik polifenollerin varlığı, selülitik ve proteolitik enzimlerin inhibisyonu ve rumen bakterilerinin büyümesi nedeniyle sindirilebilirliği azaltır, ancak tanenler gibi diğer bileşikler de hayvan intoleransı ile ilişkilendirilmiştir (Centeno vd., 2014:2176). Üretilen büyük miktardaki atığın yılın birkaç haftası gibi kısa bir sürede stoklandığı düşünüldüğünde bu sorunlar daha da büyümektedir (Kammerer vd., 2004:4360).

Kompostlama aynı zamanda şaraphane atıklarını işlemek için de bir olasılıktır. Karbon tutma avantajı ile değerli gübre üretebilen ucuz ve kullanışlı bir yöntemdir. Ancak bu olumlu noktalara rağmen, ağır metal birikimi, kök büyümesinin inhibisyonu olasılığı her zaman vardır. Kompostlama, anaerobik çürümeyi önlemek için büyük sıcaklık, nem ve havalandırma kontrolü gerektirir. (Zhang vd., 2017:173).

Üzüm cibresi hayvan yemi veya kompostlaştırmanın yanı sıra, etanol, tartratlar, malik ve sitrik asit gibi organik asitlerin geri kazanılması için de kullanılmaktadır. Üzüm cibresi aynı zamanda linolenik asit (~%12-20, w/w) bakımından zengin üzüm çekirdeği yağı içermektedir ve hidrokolloidler, antosiyaninler ve diyet lifi kaynağıdır (Kammerer vd., 2004:4360, Rondeau vd., 2013:1, Naziri vd., 2014:350). Ayrıca maya ile kolayca fermente edilebilen çözünür şekerlerdeki zenginliği nedeniyle çevre dostu oksijenli bir yakıt olan biyoetanol üretimi için de kullanılabilir (Zabed vd., 2017:475). İçermiş olduğu lifler gıdalarda doğal tekstür bileşeni olarak ve ilaç, gıda ve kozmetik endüstrisinde de fonksiyonel özelliklerinden kullanılabilir (Zhu vd., 2015:207). Şarap üretiminin diğer bir atığı olan şarap tortuları esas olarak maya hücreleri ve tartarik asitten oluşmaktadır ve bu maddeler de geri kazanılabilir (Naziri vd., 2014:350). Üzüm cibresinde bulunan polifenoller uygun maliyetli, sürdürülebilir ve yüksek değerli biyoaktif bileşen kaynağıdır. Son yıllarda nutrasötik ve antioksidan bileşiklere olan artan talep nedeniyle, üzüm cibresinden endüstriyel olarak polfenollerin ekstraksiyonu önem kazanmıştır (Jara-Palacios vd., 2015:78).

1.1.4. Türkiye’de Üzümün Yeri

Türkiye’de üretilen üzümün tüketim alanları (Şekil 1), %39’ı pekmez, %25’i sofralık, %18’i çekirdekli kuru üzüm, %15’i çekirdeksiz kuru üzüm ve %3’i şaraplık olarak kullanılmaktadır. Türkiye’de üzüm üretimi her yıl ortalama 4 milyon tona yakın olmaktadır. Üretilen üzümün yaklaşık %3’ü şaraplık olarak kullanılmaktadır. Üzüm işlendikten sonra %15-25 oranında cibre kısmı elde ediliyor ve üzüm cibresi üretimi büyük miktara sahiptir. Üzümün işlenmesi sonucu arta kalan cibrenin, %50’si kabuk, %25’i çekirdek, %25’i üzüm sapından oluşmaktadır. İşleme sonrasında oluşan cibreden, yeterince yararlanamaması sonucu çok fazla miktarda birikmesine ve değerlendirileme işlemi yapılmayıp atıldığı için çevre kirliliğine sebep olmaktadır (Sarıçiçek ve Kılıç, 2002:289).



Şekil 1.1. Türkiye’de Üzüm Tüketim Alanları

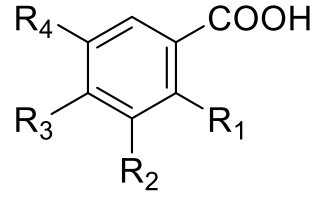
1.2. Üzümde Bulunan Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler, aromatik hidroksil çekirdeklerinden oluşan aynı genel yapıyı paylaşan bileşiklerdir (Karaman vd., 2009:1201). Fenolik bileşikler yapısal olarak, bir veya daha fazla hidroksil grubunun paylaşıldığı aromatik halkadan oluşan ve basit fenolik bileşiklerden polimerleşmiş bileşiklere kadar bünyesinde bulunduran bileşiklerdir (Balasundram, 2006:191). Doğada yaklaşık 8000 çeşit fenolik bileşik vardır (Karaman vd., 2009:1201).

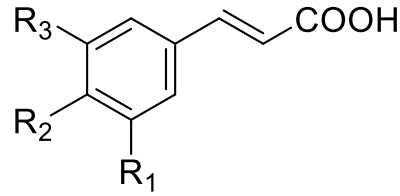
1.2.1. Fenolik Asitler

Hidroksi benzoik ve hidroksi sinamik asitleri içeren fenolik asitler hemen hemen tüm bitkilerde bulunurlar ve bitkilerin fenolik metabolizmasında önemli bir rol oynarlar. Bitkisel kökenli gıdaların içinde çok fazla miktarda bulunabilen yapılardır. Fenolik asitler ayrıca hidroksibenzoatlar olarak bilinir. Gallik, p-hidroksibenzoik, protokatekuik ve siringik asitler bu grubun üyeleridir. Hidroksibenzoik asitler C6-C1 (fenilmetan), hidroksisinnamik asitler C6-C3 (fenilpropan) yapısındadırlar. Genellikle serbest formda bulunmazlar, ligninler veya hidrolize edilebilir tanenler gibi kompleks yapıların bileşenleri olarak bulunurlar (Jaganath ve Crozier, 2010:1). Fenolik asitler, hidroksibenzoik asitler ve hidroksisinnamik asitler olarak iki gruba ayrılır. Bu gruplar arasındaki en büyük fark, aromatik halkalarının çeşitli hidroksilasyon ve metoksilasyon kalıplarıdır. Bir fenol üzerinde ikame edilmiş bir karbonil grubunun varlığı, hidroksibenzoik asitlerin bir özelliğidir. Gallik asit, p-hidroksibenzoik asit, protokatekuik asit, siringik asit ve vanillik asit bu grubun bazı örnekleridir. Kafeik asit, parakumarik asit, sinapik asit ve ferulik asit, hidroksisinnamik asitlerin örnekleridir. Hidroksisinnamik asitler genellikle

kinik asit, shikimik asit ve kafeik asit ve kinik asidin bir esteri olan klorojenik asit gibi tartarik asit esterleri olarak da bulunur (Vermerris ve Nicholson, 2008:193).



Benzoik Asit	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
p-hidrobenzoik asit	H	H	OH	H
Protoketeşik asit	H	OH	OH	H
Vanilik asit	H	OCH ₃	OH	H
Gallik asit	H	OH	OH	OH
Salisilik asit	OH	H	H	H
Gentisik asit	OH	H	H	OH



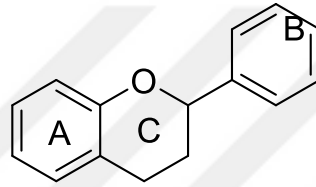
Hidroksisinamik asit	R ₁	R ₂	R ₃
p-kumarik asit	H	OH	H
Kafeik asit	OH	OH	H
Ferulik asit	OCH ₃	OH	H
Sinapik asit	OCH ₃	OH	OCH ₃

Şekil 1.2. Benzoik asit ve hidroksisinamik asit

1.2.2. Flavonoidler

Flavonoidlerin karbon iskeleti, bir propan zinciri ile birleştirilmiş ve 15 karbon atomu içeren iki fenil halkasından oluşan bir difenilpropan (C6-C3-C6) yapısından oluşur. Difenilpropan iskeletini içeren doğal bileşikler flavonoid (2-fenil-1,4-benzopiron yapısından türetilmiştir), izoflavonoid (3-fenil-1,4-benzopiron yapısından türetilmiştir), neoflavonoid (4-fenil)-1 fenil gruplarının propan zincirine bağlanma konumlarına göre. Üç ana gruba ayrılırlar: 2-benzopiron yapısından türetilenler. (Bilaloğlu ve Harmandar, 1996:353).

Flavonoidler, kimyasal yapısı Şekil 1.3'de verilen flavanların (2-fenil-benzo- γ -piran) türevleridir. Flavan yapısı, oksijen içeren piran halkasına (C) bağlı iki benzen halkasından (A ve B) oluşur (Frankel, 1999:450).



Şekil 1.3. Flavonoidlerin kimyasal yapısı

Flavonoidlerin alt grupları olan flavanoller, proantosiyanidinler, flavonlar, flavonoller ve flavanonlara bitki kaynaklı gıdalarda bulunmaktadır.

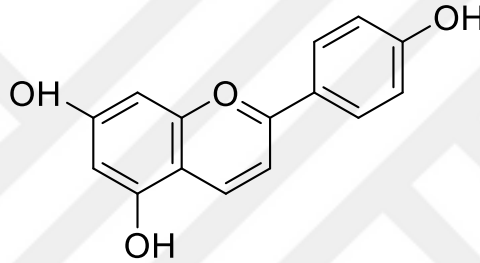
1.2.2.1. Antosiyanidinler

Doğada serbest halde bulunmazlar. Antosiyanidinler, geniş ve yaygın flavonoid grubunun bir parçasıdır ve genellikle glikosile veya asillenmiş formda bulunurlar. Birçok meyve, sebze ve tahıla kırmızı, mor ve mavi renkler veren suda çözünebilen renk pigmentleri antosiyanidinlerden tarafıdan gelmektedir (Nizamlioğlu ve Nas, 2010:20). Her antosiyanidin çeşitli şekerler ve asitlerle glikosile edilebildiğinden veya açillendiğinden, antosiyaninlerin sayısı antosiyanidinlerin sayısından daha fazladır. Doğada 6 antosiyanidin vardır. Siyanidin, delfinidin, perlargonidin, peonidin, malvidin ve petunidin glikozitleri olarak bulunur (Clifford, 2000:1063).

Her altı antosiyanidin, flavylium katyonunun temel yapısına sahiptir (Vermerris ve Nicholson, 2008:193). Flavylium katyonuna bağlı şekerlerin niteliği ve sayısı, antosiyaninlerin stabilitesi ve renkleri üzerinde etkilidir. Antosiyaninler bitkilere ve yiyeceklere renk katabilir ve bu, antosiyaninleri önemli bileşikler haline getirir. Yapraklarda antosiyaninler, UV radyasyonuna karşı bir ışık perdesi görevi görür. Antosiyaninin rengi,

pigmentin yapısına ve konsantrasyonuna, sıcaklığa, pH'a, sıcaklığa, kopigmentlerin varlığına, metalik iyonlara, enzimlere, oksijene, askorbik asitlere, şekerlere ve bunların parçalanma ürünlerine bağlıdır. Antosiyaninler, tüm bitkisel organların dokularında hemen hemen her hücre tipinin vakuollerinde bulunabilir. Hem yer altı hem de havadaki köklerde ve hipokotillerde, gövdelerde, yumrular ve yapraklarda bulunurlar (Hatier ve Gould, 2009:1). Antosiyaninler kırmızı meyveler, soğan, kırmızı lahana, patlıcan, üzüm, kuş üzümü gibi farklı meyve ve sebzelerde farklı miktarlarda bulunabilir (Clifford, 2000:1063).

Antosiyadinler şeker, fenolik ve minör organik asitlerden meydana gelir. Şeker olan kısmı ksiloz ramnoz, galaktoz ve arabinozdan oluşur. Kafeik, P-kumarik ve ferulik gibi asitlerle açillenmiş olabilir. Açillenmiş antosiyaninlerin, açillenmemiş olanlara göre daha stabil olduğu görülmüştür (Nizamlioğlu ve Nas, 2010:20).

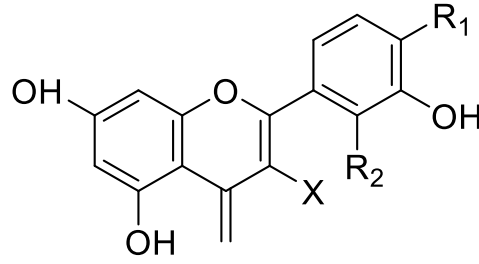


Antosiyanidin	R1	R2
Siyanidin	OH	H
Delfinidin	OH	OH
Peonidin	OCH ₃	H
Petunidin	OCH ₃	OH
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃

Şekil 1.4. Antosiyanidin

1.2.2.2. Flavonlar ve Flavonoller

Flavonlar ve Flavonoller açık sarı renkli bir bileşik olup hemen hemen her bitkide bulunurlar (Hollman ve Arts, 2000:1081). Flavon ile flavonollerin arasındaki fark orta halkanın C₃ atomunda flavonlarda (H), flavonollarda (OH) grubu bulunur (Makris ve Rossiter, 2002:125). Antosiyanidinler gibi flavonol grubu bileşikler de glikozit formda bulunurlar. Bunlar kemferol, mirsetin, izoramnetin ve kersetin'dir (Nizamlioğlu ve Nas, 2010:20).



Flavonlar (X=H)	R1	R2	Flavonoller (X=OH)	R1	R2
Apigenin	H	H	Kamferol	H	H
Luteolin	OH	H	Kuercetin	OH	H
Krisoeriol	OCH ₃	H	Mirisetin	OH	OH
Trisin	OCH ₃	OCH ₃	Isoramnetin	OCH ₃	H

Şekil 1.5. Flavonlar ve flavonollerin kimyasal yapısı

Flavonollar 3-hidroksiflavon; flavonlar 3-deoksiflavonollar olarak da isimlendirilmektedir. Flavonollar tüm bitkisel gıdalarda bulunur. Kuercetin (3',4' -di-OH), kamferol (4' - OH) ve mirisetin (3',4', 5' -tri-OH) en yaygın flavonollerdir.

Flavonoller, antosiyanidinler gibi şekerlerle glikozitler olarak birbirine bağlı olarak bulunur. Şekerler, bir oksijen köprüsü ile orta halkanın üçüncü karbon atomuna bağlanır. Glikoz, galaktoz, rutinoz ve daha az sıklıkla ramnoz, arabinoz, ksiloz ve glukonik asit gibi şekerler glikozidik bağlarla bağlanır (Cemeroğlu vd., 2001:328).

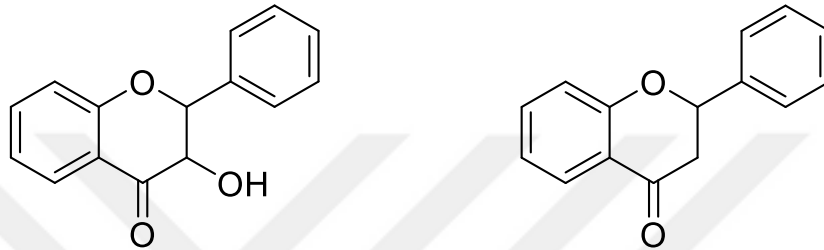
Flavonollere ek olarak, bitki materyallerinde yaklaşık 100 flavon tespit edilmiştir. Flavonlar, meyve ve sebzelerde flavonoller kadar yaygın değildir, ancak tahıllarda ve bitkilerde bulunur. Yaygın flavonlar apigenin ve luteolindir (Shahidi ve Naczki, 1995:97).

Flavonlar genellikle 7-O-glikozitler olarak bulunur. Meyvelerde p-kumarik, ferulik, kafeik, phidroksibenzoik ve gallik asit gibi fenolik asitlerle asillenmiş bir grup flavonol glikozit de vardır. Bunların en yaygını kamferol-3-(p-kumaroil) glikozittir. Flavonoller monoglikozitler, diglikozitler ve triglikozitler olarak bulunur. Monoglikozitlere çoğunlukla 3-O-glikozitler olarak rastlanır.

Üzüm çekirdeğinin özellikle flavanoller açısından zengin olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, üzüm kabuğu da flavanoller içerir. Ancak kabukta bulunan fenolik bileşiklerin ana grubu flavonollerdir. Üzüm kabuğunda başta kersetin olmak üzere flavonollerin miktarının yüksek olduğu ve kersetin, kaemferol ve bunların glikozitlerinin şaraplarda acılığa neden olduğu bilinmektedir.

1.2.2.3. Flavanonlar ve Flavanonoller

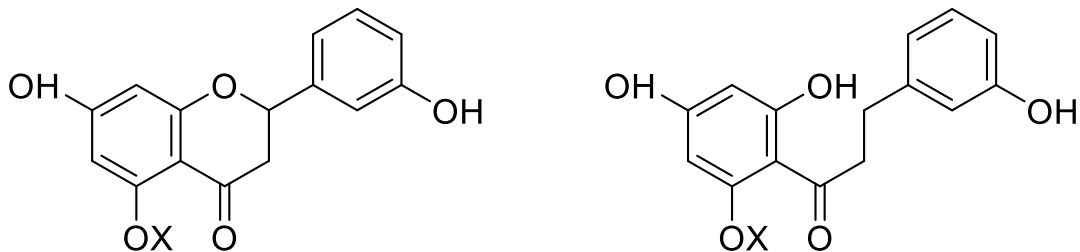
Flavonlar renksizdir ve flavonların aksine merkez zincirlerinde bir çift bağ eksiktir. Flavononlar ve flavanonoller, doymuş bir 3-karbon zincirine ve 4-konumunda bir oksijen atomuna sahip olmaları ile ayırt edilebilir. Flavononlara dihidroflavonlar da denir. Flavonoller ayrıca 3-hidrosiflavonoller veya dihidroflavonoller olarak da adlandırılır ve 3-konumunda bir hidroksi grubuna sahip olarak flavanonlardan ayırt edilebilir. Flavanonlar 2 konumunda tek asimetri merkezine sahipken, flavanonoller 3 konumunda ikinci bir asimetri merkezine sahiptir.



Şekil 1.6. Flavanonol ve flavanon kimyasal yapısı

Flavanonlar genellikle turunçgillerde glikozitler olarak bulunurken, diğer bitkilerde glikozidik formda bulunurlar. Dört aglikon flavanon, naringenin, eriodithiol, isosacuranetin ve hesperetin yaygındır. Glikozilasyon, rutinosis veya neohesperidoz ile 7-pozisyonunda meydana gelir, glikoz ve ramnoz molekülünün oluşturduğu disakkaritler sadece bağlantı tipinde farklılık gösterir (1→6 veya 1→2) (Rouseff, 1980:83, Albach ve Redman 1969:127).

Naringin, greyfurt meyvesinin acımtırak bir tat vermesine rağmen, naringinin naringindihidroalkona dönüşmesiyle oluşan bileşik tatlı bir yapıya sahiptir. Bu nedenle kalkon tatlandırıcı olarak kullanılır (Maier vd. 1990:230).

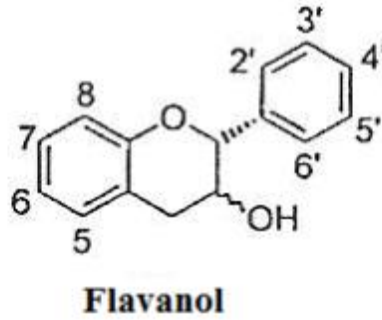


Şekil 1.7. Flavanon ve dihidroksikalkon kimyasal yapısı

1.2.2.4. Flavanoller (Kateşinler ve Lökoantosiyanidinler)

Üzüm gibi yüksek bitkilerde yaygın olarak bulunan Flavanol (Flavan-3-ol)'er üzüm üzüm kabukları ve çekirdeklerinden şıra fermentasyonu sırasında şaraba aktarılır ve şarabın burukluk, acılık ve renk stabilitesi gibi organoleptik özelliklerini belirler.

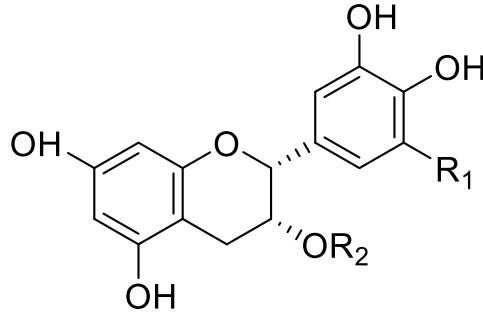
Kateşinler renksizdir ve çoğunlukla bitkilerde bulunan serbest flavonoidlerdir. Kimyasal yapılar flavan 3- ol olup en yaygın olanlar (+)-kateşin, (-)-epikateşin, (+)-gallokateşin, (-)- epigallokateşindir. Kateşinler iki asimetrik karbona ve dolayısıyla dört olası izomere sahiptir; C2 ve C3 atomlarına bağlanan hidrojenler trans (+)-kateşin ve (+)-gallokateşin ise, cis (-)-epikateşin ve (-)-epigallokateşin olarak adlandırılır. (Shahidi ve Nacz, 1995:97). Kateşinler, havadaki oksijen ile kolaylıkla reaksiyona girerek proantosiyanidinleri oluştururlar (Nizamlioğlu ve Nas, 2010:20). (+)-kateşinin üzüm ve kabuğunda bulunan en temel flavan 3-ol olduğu belirtilmiştir (Freitas ve Glories, 1999:1601).



Şekil 1.8. Flavanol kimyasal yapısı

Kateşinler çoğunlukla kabuk kısımlarda daha fazladır. Meyvenin kabuk kısmında meyvenin etli kısma oranına üç katı kadar bulunabilir. Kateşinler oksijen ile kolayca reaksiyona girer; kimyasal ve enzimatik olarak oligomer ve polimerlere yoğunlaşarak proantosiyanidinleri oluştururlar.

Lökosiyanidinler, flavan-3,4-diol formülünde olup iki adet OH- grubundan oluşurlar ve besinlerde serbest halde değildirler. Meyvelerde çok nadirdir (Saldamlı, 1998:437).

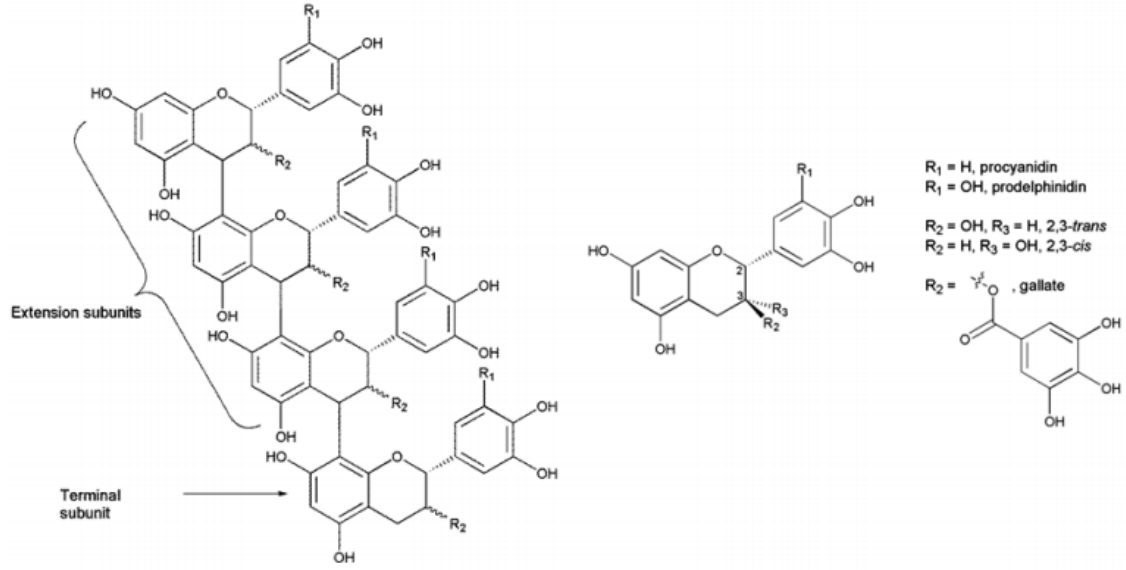


Şekil 1.9. Lökoantosiyandinlerin kimyasal yapısı

Polimerizasyon derecesine göre flavanoller monomerler, oligomerler ve polimerler olarak üç gruba ayrılır. Flavanoller enologlar tarafından daha sık olarak proantosiyandinler veya tanenler olarak da adlandırılır. Flavan-3-ol monomerlerin oligomerlerden daha acı olduğu bulunmuştur. Nispeten düşük polimerize flavan-3-oller (monomerler, dimerler, trimerler vb.) daha fazla asit tadındadır (Yan-Xia, vd., 2010:7763).

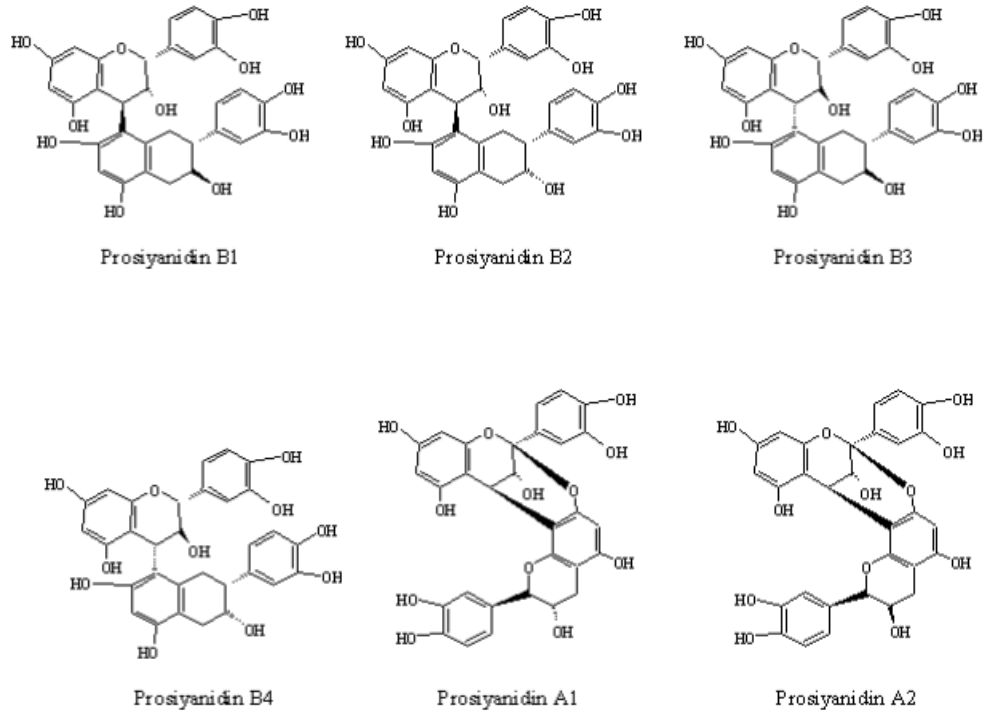
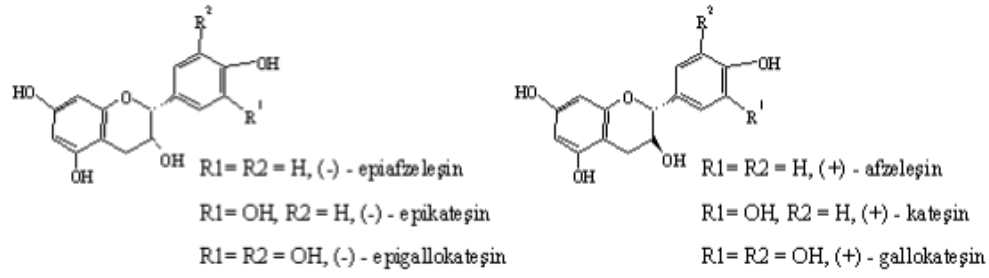
1.2.2.5. Proantosiyandinler (Kondense Tanenler)

Proantosiyandinler doğada yaygın olarak bulunan karmaşık fenolik bileşiklerdir. Proantosiyandinler meyvenin kabuk kısmında bulunurken, kısmen meyvenin etli kısmında da bulunurlar (Shahidi ve Nacz, 1995:97). Yoğunlaştırılmış tanenler veya proantosiyandinler (PA'lar), yapısal olarak benzer bir dizi flavan-3-ol alt biriminin polimerleridir (Şekil 1.10). Üzüm tanenleri, büyük oranda tri hidrosillenmiş (%Tri-OH, R1 = OH) veya prodelphinidin alt birimlerine sahip kabuktan elde edilen tanen ile üzüm kabuğu ve üzüm çekirdeği arasında bileşim bakımından farklılık gösterirken, prosiyanidin alt birimlerinde bu hidroksil gruplarından biri (R1 = H) yoktur. Tohumdan türetilen tanen genellikle daha yüksek bir gallik asit süstitüsyona sahiptir (R2'de), yüzde galoilasyon (%Gall) olarak adlandırılır ve ayrıca ortalama olarak polimer zinciri başına daha az alt birimden veya daha düşük bir ortalama polimerizasyon derecesinden (MDp) oluşur. Boyut, hidroksil gruplarının sayısı ve gallik asit süstitüsyonu ile birlikte, üzüm tanen bileşimi, kateşin bazlı alt birimler (2,3-trans stereokimya) ve epikateşin bazlı alt birimler (2,3-cis stereokimya) arasında alt birim stereokimyasında farklılık gösterebilir (Porter vd., 1986:223). Bitkisel besinlerde yaygın bulunan proantosiyandinler; (-)-epikateşin ve (+)-kateşin kombinasyonlarından oluşan dimerlerdir (Saldamlı, 1998:437).

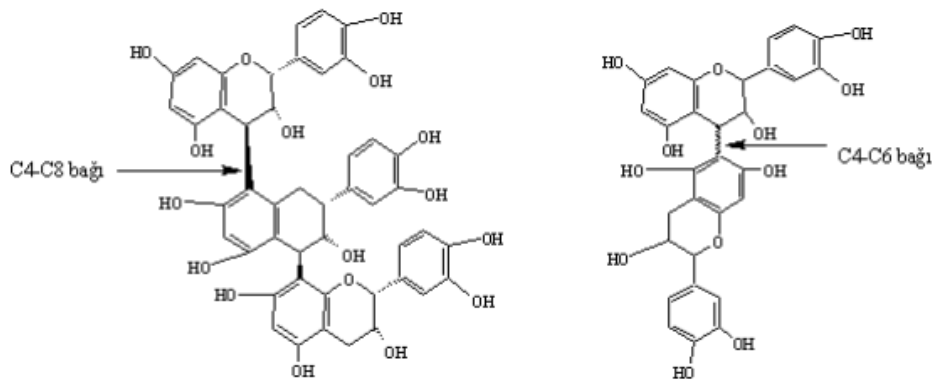


Şekil 1.10. Tanen ve flavan-3-ol alt birimlerinin genel yapısı (Appeldoorn,2009)

Saf kateşin/epikateşin kondensatlarına prosiyanidinler, kateşin/gallokateşinden türetilen kondensatlara prodelphinidinler denir. Dimerden heksamere kadar izole edilen ve tanımlanan yaklaşık 50 prosiyanidin genellikle ya kateşin ya da epikateşin birimlerinde sonlanır. Meyvelerde bulunan dört önemli dimerik prosiyanidin B1 (epikateşin-(4 β →8)-kateşin); B2 (epikateşin-(4 β →8)-epikateşin); B3 (kateşin-(4 β →8)-kateşin); B4 (kateşin-(4 β →8)-epikateşin)'dir (Maier vd., 1990:230).



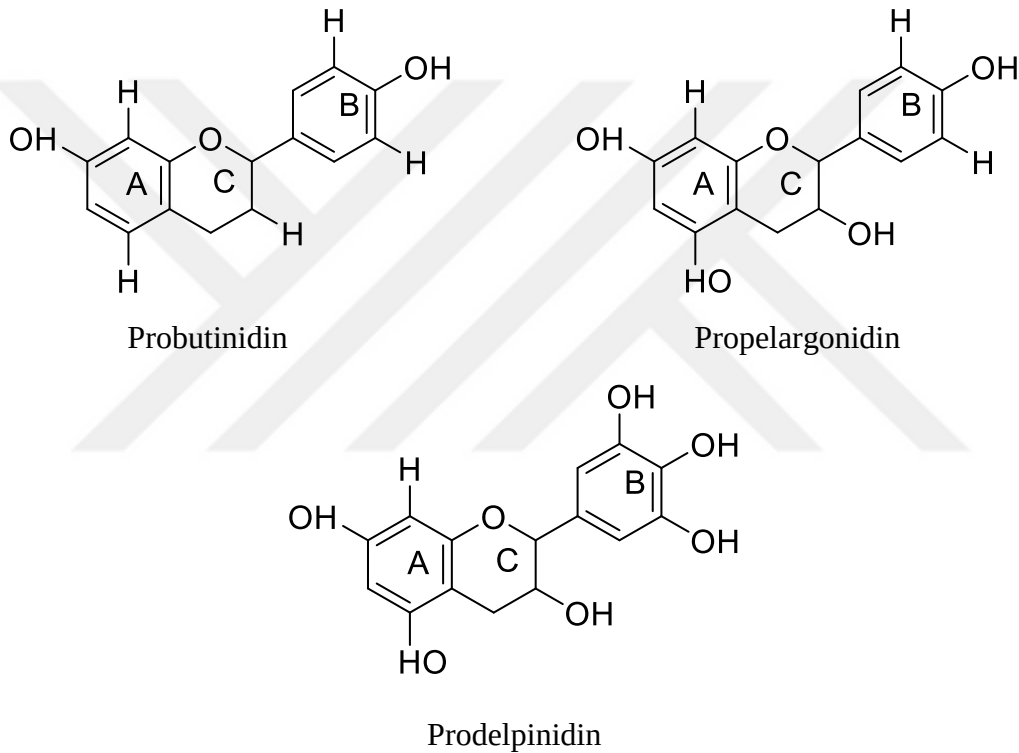
Şekil 1.11. Proantosiyanidin yapıları (Appeldoorn,2009)



Şekil 1.12. Proantosiyanidin bağlanma tipleri (Appeldoorn,2009)

Molekül ağırlığı arttıkça acılık azalır, bunun yanı sıra burukluk artar. Monomer yapıdaki proantosiyantinler de acılık daha baskınken, trimer yapılarda burukluk daha baskındır. Prosiyanidinler; meyve suyu ve meyve suyu konsantrelerinde bulanıklık oluşumunda da etkili olmaktadır (Peleg vd., 1999:1123).

Proantosiyantinler birkaç alt gruba ayrılır. Bunlar; prosiyanidin, profisetinin, propelargonidin, prodelfinin, proguibourtinidin, proapigeninin, prorobinetinin, proteracacidin (sadece sentetik), promelacacidin ve proluteolinidin denir. Bu gruplara ek olarak procassinidin, protricetinin, prodisteninin, propeltogyninin ve promopanidin alt grupları da bulunmaktadır (Xie vd., 2005:2441).



Şekil 1.13. Proantosiyantinlerin alt grupları

Prosiyanidinler serbest radikallerle reaksiyona girerek, serbest yağ asitlerinin oksidasyonuna sebep olan zincir reaksiyonlarına girmesini engeller (Xie vd., 2005:2441).

Prosiyanidinlerin antioksidan aktiviteleri kompozisyonlarına ve molekül ağırlıklarına göre değişmektedir. En çok antioksidan aktiviteyi polimerik prosiyanidinler ve oligomerik prosiyanidinler göstermektedir (Spranger vd., 2008:519).

Prosiyanidinlerin polimerik formları gıdalarda, oligomerik formlarından çok daha fazla miktarda bulunmaktadır (Gu, 2002:4852). Üzümde çeşide bağlı olarak kabukta %91–99, çekirdekte %77–85 oranında bulunmaktadır (Hammerstone vd., 1999:490). Üzüm

çekirdeklerinde oligomerik prosiyanidinlerin polimerizasyon derecesi 2 ile 18 arasında olup, polimerik prosiyanidinlerin polimerizasyon derecesi 12 ile 37 arasında değişmektedir (Spranger vd., 2008:519).

Yapılan çalışmalar sonucunda proantosiyandinlerin güçlü antioksidan özelliklerinden dolayı kalp hastalıkları, kanser, yüksek tansiyon ve kolesterol gibi hastalıklara karşı önemli bir koruyucu etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

1.3. Üzüm Cibresi ile Yapılan Çalışmalar

Negro vd., (Negro vd.2003), kırmızı üzüm posasında (cibre) fenolik bileşikleri ve ethanolic ekstrakt miktarı üzerine yaptıkları bir araştırmada; üzüm posasının polifenol bileşikleri açısından zengin olduğunu çok düşük konsantrasyonda bile (20 ppm) ortalama %43'ten daha yüksek bir antioksidan aktivite sahip olduğunu belirlemişlerdir

Yassa vd., (Yassa vd. 2008), shahani siyah üzüm meyvelerinin üzüm cibresi ve çekirdeğinin antioksidan aktivitesini yaptıkları çalışmada değerlendirmişlerdir. Üzüm cibresi ve çekirdeğinin antioksidan aktivitesi ve lipid peroksidasyon inhibisyon aktivitesi araştırmışlardır. Üzüm çekirdeğinin çok yüksek olduğu, cibresinin orta düzeyde olduğu ve şıranın daha az aktiviteye sahip olduğu sonucuna varmışlardır.

Peker (Peker, 1994), endüstriyel bir atık olan üzüm posası içerisindeki tartarik asit ve tanen miktarlarını belirlemiştir. Cibrelerde bulunan tanen ve tartarik asit miktarları, şarapta bulunan miktarlarla karşılaştırmıştır. Tanen miktarı kırmızı üzüm cibresinde %3,01-6,65 iken beyaz üzüm cibresinde %1,00-2,28 olarak bulmuştur. Kırmızı üzüm cibresinde %9,16 oranında tartarik asit bulunurken, kırmızı şarapta 1,19 g/lt olarak belirlemiştir.

Gagne vd., (Gagne S., Saucier C. & Geny, L. 2006) cabernet sauvignon üzümlerinin kabuğundaki prosiyanidinlerin 2 yıl üst üste olgunlaşmalarına bağlı olarak değişimini inceledikleri çalışmalarında, tanenlerin en çok kabuğun iç hücrelerinde bulunduğunu, olgunlaşmaya bağlı olarak polimerizasyon derecesinin arttığını ve epikateşinin en önemli madde olduğunu belirtmişlerdir.

Yavuz (Yavuz,2018), yaptığı çalışmada üzüm posasından farklı maya suşları kullanılarak kesikli sistemle biyoetanol üretimi incelemiş, üzüm atıklarının bazı özelliklerinin belirlenmesi, üzüm posasının hidrolizi ile indirgen şeker içeriği yüksek hidrolizat eldesi ve fermantasyonla biyoetanol üretimi olmak üzere üç aşamada gerçekleştirmiştir. Üzüm posasının yaklaşık olarak %46 oranında holoselüloz (selüloz+hemiselüloz) içerdiğini belirlenmiştir.

Nakilcioğlu ve Ötleş (Nakilcioğlu ve Ötleş,2016), şarap ve üzüm suyu endüstrilerinin önemli atıklarından biri olan siyah üzümlerden basınçlı sıvı ekstraksiyon sistemi kullanılarak polifenol ve organik asit içeriği zengin bir ekstrakt elde edilmesini amaçlanmışlar, elde edilen üzüm çekirdeği ekstresinin polifenol ve organik asit içeriği kromatografik ve spektroskopik yöntemlerle belirlemişlerdir. Üzüm çekirdeği ekstraktının toplam fenolik içeriği gallik asit eşdeğerinde %49,77 (w/w) ve DPPH yöntemi ile belirlenen antioksidan aktivite %90,90 inhibisyon ve %98,13 antiradikal aktivite olarak belirlenmişlerdir.

Iora vd. (Iora Sandra R. F. vd. 2014). Yaptığı çalışmada, üç çeşit üzüm cibresi değerlendirilmiş. Antioksidan aktivite, DPPH, ABTS ve demir iyon deneyleri olmak üzere üç farklı yöntemle belirlemişlerdir. Yağ asitleri ve fenolik bileşikler sırasıyla gaz ve sıvı kromatografisi ile tanımlamışlar. Sonuçlar, üzüm cibresinin zengin bir çoklu doymamış yağ asitleri ve fenolik bileşikler kaynağı olduğunu göstermiştir. Cabernet Sauvignon posası, analiz edilen örnekler arasında daha yüksek toplam fenolik bileşikler, toplam flavonoidler ve toplam monomerik antosiyanin değerleri ortaya çıkarmış ve en düşük EC₅₀ değerini ve dolayısıyla daha yüksek bir antioksidan aktivite olarak belirlemişlerdir.

2. EKSTRAKSİYON

2.1. Klasik Çözücü (Katı-Sıvı) Ekstraksiyonu

Katı-sıvı ekstraksiyon, çözünen maddenin katıdan çevreleyen sıvı çözücüye difüzyon yoluyla aktarılması işlemidir. Endüstriyel sürecin önemli bir bölümünü oluşturur.

İstenilen maddenin katı maddeden ayrıştırılması için belirli çözücüler yardımı ile yapılan ekstraksiyon işlemidir. Bu ekstraksiyon işleminde katı içindeki bir madde büyük ölçüde çözünebilen bir sıvı yardımı ile alınır ve fazlar ayrıldıktan sonra katı içerisindeki istenen madde herhangi bir şekilde uzaklaştırılarak ekstrakte edilir.

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

- Boyutu küçülterek parçalanmış hücrelerin çözücü ile yıkanarak hücrelerdeki çözünebilen maddelerin çözeltiye geçmesi,
- Parçalanmayan hücrelerdeki çözünebilen maddelerin difüzyon yardımıyla çözeltiye geçmesi

Çözücü ile parçalanmış hücreleri ekstrakte etmek hızlı olacağından ekstraksiyon süresi de çok kısadır. Kırılmamış hücrelerin ekstraksiyonunda çözücü hücreye difüzyon yardımı ile girer, çözünen maddeleri çözer ve difüzyon yardımı ile çözünen maddeler çıkar. Bu süreçte difüzyonla kütle transferi çok yavaş olduğundan, ekstraksiyon hızı da çok yavaştır.

Katı-sıvı ekstraksiyonundaki itici güç, ekstrakte edilecek maddede ekstrakte edilecek maddenin konsantrasyonu ile ekstrakte edilen solüsyondaki bu maddenin konsantrasyonu arasındaki farktır. Bu fark ne kadar büyükse, ekstraksiyon oranı o kadar yüksek olur.

Ekstraksiyona etki eden parametreler; ekstraksiyon işlemine etki eden en önemli parametreler, çözücü seçimi, sıcaklık, parçacık boyutu ve ekstraksiyon süresidir.

Ekstraksiyon işleminde kullanılacak çözücülerde olması gereken özellikler şu şekilde sıralanabilir:

- Ekstrakte edilecek içerik maddelerinin seçici olması,
- Yüksek doygunluk konsantrasyonu olması,
- Düşük viskozite ve düşük yüzey gerilimi olması,
- Kaynama noktası düşük ve donma noktası 0 ° C'nin altında olması,
- Yoğunluğunun düşük olması,

- Enerji ekonomisi açısından özgül sıcaklığı düşük olması,
- Aşındırıcı, zehirli ve patlayıcı olmaması,
- Taşınması, depolanması ve kullanılması kolay olmalıdır.

Yukarıdaki özellikleri sağlayan en çok kullanılan çözücü sudur. Etil alkol, kloroform, aseton, hekzan, petrol eteri gibi organik çözücüler de bazı bitkisel hammaddeler için kullanılmaktadır.

Çözücünün moleküler yapısı nedeniyle viskozitesi, çözücünün önemli özelliklerinden biridir. Çözücü konsantrasyonu hammadde konsantrasyonundan az ise hammaddeden ekstrakte edilecek maddenin difüzyon ile absorbe edilmesinde etkilidir. Belirli bir konsantrasyonun üzerindeki bir çözeltinin tekrar çözücü olarak kullanılması uygun değildir. Çözelti yardımı ile ekstrakte edilecek maddenin konsantrasyonundaki fark azaldığı için çözücü viskozitesi artmış ve difüzyon katsayısı düşük bir değere sahip olacaktır.

Ekonomik ve sağlık nedenleriyle solvent, özüt ve rafineri fazdan arındırılmalıdır. Buharlaştırma ve kurutma işlemleri tipik olarak çözücüyü uçucu olmayan katılardan ve katı rafineriden ayırmak için kullanılır. Çözücüyü uçucu karışımdan ayırmak için damıtma işlemi kullanılır. Çözücü azeotrop olmamalıdır, ideal olarak ürünlerdeki en uçucu bileşenin kütle fraksiyonu ve buharlaşma sıcaklığı düşük olmalıdır.

Hammadde solvent ile temas ettiğinde, solvent ve hammadde konsantrasyonları ekstrakte edilecek maddeye göre farklı olduğu için ekstrakte edilecek madde bu konsantrasyon farkını ortadan kaldıracak şekilde ortamı değiştirir. Bu bir difüzyon olayı olduğu için, küçük partikül boyutlu hammaddelerin çözücü ile teması, ekstraksiyonun ilk anlarında hızlı olacak ve kısa sürede çözünen madde miktarı yüksek olacaktır.

Sıcaklık ne kadar yüksek olursa, genel olarak ekstraksiyon verimliliği o kadar yüksek olur. Sıcaklıktaki artış, özütlenecek maddenin ve solventin viskozitesinin azalmasının yanı sıra çözünürlüğün artmasına da neden olur. Herhangi bir ekstraksiyon ortam sıcaklığı, kullanılan solventin kaynama sıcaklığına bağlı olarak bir üst sınıra sahiptir. Ekstraksiyon sıcaklığı solventin kaynama sıcaklığına yaklaştıkça solvent buharlaşmaya başlar ve ekstraksiyon için faydalı solvent miktarı azalır. Bu nedenle, ekstraksiyon ortamının sıcaklığı, kullanılan solventin kaynama sıcaklığından 10 ile 12°C daha düşük olmalıdır.

Nem, ekstraksiyon işleminde önemli bir faktördür. Ekstraksiyondaki aşırı nem, proteinlerin aşırı şişmesi nedeniyle çözücünün difüzyon yollarının tıkanmasına neden olabilir.

Ekstraksiyon sırasında kullanılacak çözücü/madde oranı, çalışılan hammaddeye, hammaddenin hazırlanma sürecine ve kullanılacak ekstraktör tipine göre değişmektedir. Yüksek çözücü / madde oranı, daha fazla maddeyi çözmesine rağmen nihai çözeltinin düşük konsantrasyonlarda olmasına neden olur. Bu, daha fazla çözücünün buharlaşmasını ve çözücü geri kazanım işleminde daha fazla enerji kullanımını gerektirir.

Ekstraksiyon süresi, ham maddenin çözücü ile muamele edildiği süredir. Parçacık içindeki çözücü ve dışarıdaki çözücü denge düzeyine ulaşmak için her aşamada parçacık ile çözücü arasında yeterli temas süresi sağlanmalıdır (Altınay,2008).

2.2. Enzimatik Çözücü Ekstraksiyon Yöntemi

Bitki matrisindeki bazı fitokimyasallar hücre sitoplazmasında dağılır ve bazı bileşikler polisakkarit-lignin ağında hidrojen bağları veya rutin bir ekstraksiyon işleminde bir çözücüye erişilemeyen hidrofobik bağlar ile tutulur. Enzimatik ön işlem, bağlı bileşikleri serbest bırakmanın veya verimi artırmanın etkili bir yolu olarak görülmektedir (Azmir vd., 2013:426) Ekstraksiyon mekanizmasının temeli, hücre duvarının tahrip edilmesi ve protein ve yağın salınması olduğundan, ekstraksiyonlarının aynı anda gerçekleştirilmesi gerekir. Ekstraksiyonu etkileyen değişkenler (enzim bileşimi, ortam pH, parçacık boyutu, sıcaklık, karıştırma hızı, süre ve katı-sıvı oranı) yağ ve protein ekstraksiyon verimlerini belirler. Selüloz ve pektinaz gibi enzimler kotiledon hücre duvarlarını yıkarken, proteaz yağlı membran yüzeylerini bozar. Proteolitik enzimler, yağ bileşenlerini çevreleyen fibrofilik proteinler olan oleozinleri hidrolize ederek, oleozinlerin yüzey aktivitelerini ve yağ ayrışmasını azaltır (Moura, 2008:985).

- Selüloz enzimi

Endüstride yaygın olarak kullanılan selüloz enzimi, önemli bir yere sahiptir. Selüloz enzimleri alkol üretiminde, deterjan endüstrisinde, tekstil ve kağıt endüstrisinde, sebze ve meyve sularının berraklaştırılması, bira fermantasyonu ve şarap üretimi gibi sektörlerde kullanılmaktadır (Özşahin, 2006).

- Pektinaz enzimi

Bitki hücre duvarındaki pektini parçalayan, bitki dokularının bütünlüğünü sağlayan bir enzimdir. Meyve sularının arıtılmasında ve konsantre edilmesinde, şarapların arıtılmasında ve keten için selüloz liflerinin hazırlanmasında kullanılır (Kaymak ve Aksöz, 2005).

2.3. Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu (Hızlandırılmış Sıvı Ekstraksiyonu-ASE)

Basınçlı sıvı ekstraksiyonu, artan sıcaklıkla çözünürlüğü artırma ve sıvıların yüksek basınçta çeşitli matrislere daha iyi nüfuz etme avantajı ile katılar ve yarı katı ham maddeler için geliştirilmiş bir ekstraksiyondur. Basınçtaki artış, atmosfer basıncında çözücülerin kaynama noktasının üzerindeki sıcaklıkların kullanılmasını kolaylaştırır. Katıdan elde edilmesi istenen bileşiklerin süperkritik koşullar, yüksek sıcaklık (50 ve 200°C) ve basınç (10-15 MPa) altında organik çözücü ile ekstraksiyonuna dayanmaktadır (Brachet vd., 2001:865; Majors, 2007:76)

Basınçlı sıvı ekstraksiyon, Soxhlet, maserasyon ve perkolasyon ile karşılaştırıldığında ekstraksiyon süresi, solvent kullanımı, ekstraksiyon verimliliği ve tekrarlanabilirlik açısından avantajlı bir ekstraksiyon yöntemidir.

Literatürde çözücüler kritik noktalara gelmeden önce yüksek sıcaklık ve yüksek basınçta ekstraksiyonun yapıldığı bu işlem;

- Hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu,
- Basınçlı solvent ekstraksiyonu,
- Basınçlı sıvı ekstraksiyonu,
- Basınçlı sıcak çözücü ekstraksiyonu
- Son derece hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu
- Yüksek basınçlı yüksek sıcaklıkta çözücü ekstraksiyonu
- Subkritik çözücü ekstraksiyonu gibi isimler verilmektedir.

Bu işlemde çözücü olarak su kullanıldığında;

- Subkritik su ekstraksiyonu,
- Sıcak su ekstraksiyonu,
- Basınçlı sıcak su ekstraksiyonu,
- Yüksek sıcaklıkta su ekstraksiyonu,
- Kızgın su ekstraksiyonu gibi isimler verilmektedir.

Basınçlı sıvı ekstraksiyonu, geleneksel solvent ekstraksiyonlarından daha üstündür; uygulanan basınç ve yüksek sıcaklıklarda ekstraksiyon işlemi ile çözücünün kaynama noktasının üzerinde sıvı kalma kabiliyetidir. Yüksek sıcaklık ve basınç ile ortaya çıkan bu koşullar, katı matristen ekstrakte edilecek bileşiklerin çözünürlük ve desorpsiyon kinetiklerini artırır. Günümüzde süper kritik koşullar altında çevre dostu çözücülerin (su, etanol gibi) yaygın kullanımını sağlamaktadır (Herrero vd., 2005:417).

Sıvı çözücünün yüksek sıcaklık ve basınçta uygulanabilmesinin, oda koşullarında veya atmosferik koşullara yakın koşullarda ekstraksiyondan daha iyi sonuçlar vermesinin iki nedeni vardır:

- Çözünürlük ve kütle aktarımı etkileri
- Yüzey dengesinin dağılımı

Yüksek sıcaklık, çözücülerin bileşikleri çözme kabiliyetini artırır. Ayrıca organik çözücülerdeki suyun çözünürlüğü artan sıcaklıkla artar (Richter, 1996:1033).

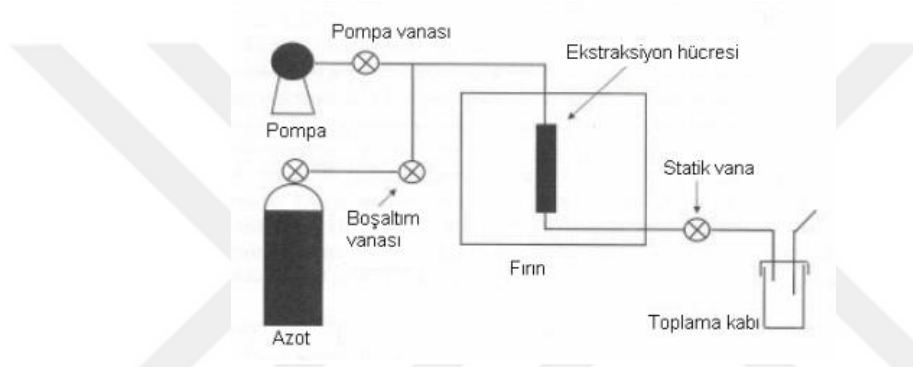
Yüksek sıcaklık, hücre duvarlarının daha geçirgen olması, ekstrakte edilecek bileşiklerin çözünürlük ve difüzyon katsayılarının artması nedeniyle ekstraksiyon verimini artırır, katı matris içerisinden hücreye girmesine izin vereceği için solvent viskozitesini düşürür. Çözeltilerde sıcaklığın 50°C'den 150°C'ye yükseltilmesi çözünürlüğü 13 kat artırır. Sıcaklığın 25°C'den 150°C'ye yükselmesi difüzyon katsayılarında 2 ile 10 kat arasında bir artışa neden olur. Çözücü besleme, hücredeki çözücü ile numune matrisi arasındaki konsantrasyon farkını artırır. Fick'in 1. difüzyon yasasına göre konsantrasyon farkının artması kütle aktarım hızını artırır (Hasbay, 2006).

Yüksek sıcaklık van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağları ve dipol-dipol etkileşimlerinden kaynaklanan güçlü çözünen-matris etkileşimlerine zarar verir. Çünkü termal enerji, matrisin çözünen ve aktif kısımları arasındaki ayırma işlemi için gereken aktivasyon enerjisini azaltarak kohezyon (çözünen-çözünen) ve yapışma (çözünen-matris) etkileşimlerini sonlandırır. Yüksek sıcaklık, sıvı çözücülerin viskozitesini düşürerek matris boyunca daha iyi nüfuz ederek ekstraksiyonu hızlandırır. Artan sıcaklık, çözücünün yüzey gerilimini düşürerek çözücünün numune matrisini daha iyi ıslatmasına izin verir (Richter, 1996:1033; Handley, 1999:146).

Çözücüü sıvı halde tutmak için kaynama noktasının hemen altındaki sıcaklıklarda ve basınçta ekstraksiyon yapılır. Ekstraksiyon sırasında yeterli basınç uygulanarak sıcaklık kaynama noktasının altında kullanılabilir. Yüksek basıncın kullanılması, çözücüü, katı içinde ekstrakte edilecek bileşiğe nüfuz etmek için boşluklardan gönderir. Yüksek basınç çözünme oranını artırır. Basınç altında sıvıyı hareket ettirmek için sıkıştırılmış nitrojen kullanılır (Brachet vd., 2001:865).

Basıncılı sıvı ekstraksiyonunda fenolik asitler çok hassas olduğundan ekstraksiyon işlemi onu ışıktan koruyarak gerçekleştirilir (Santos-Buelga ve Williamson, 2003:1).

Şekil 2.1’de, basınçlı sıvı ekstraksiyon cihazının şematığı gösterilmektedir. Bir ekstraksiyon prosedürü olarak basınçlı sıvı ekstraksiyonu; Çözücünün, içinde bir numune bulunan ısıyla uygulanan bir ekstraksiyon hücresinden statik ve dinamik akışından oluşur. Bu hücreler, sistemin basıncına uyum sağlamak için genellikle paslanmaz çelikten yapılmış delikli bir yapıya sahiptir ve kapakları katı numunenin içeride kalmasına ve çözücünün geçmesine izin verir. Kapak içerisinde tek kullanımlık filtreler kullanarak çözücünün deliklerden tıkanmadan geçmesini sağlar. Çözücü ile katı numune arasında teması sağlamak için hücre içindeki boşlukların çözücü ile doldurulmasını sağlamak ve yüksek sıcaklıklarda oksijen varlığında oluşabilecek olası bileşiklerin oksidasyonundan kaçınmak gerekir (Handley, 1999:146) .



Şekil 2.1. Basınçlı sıvı ekstraksiyonunun şematik gösterimi (Handley, 1999)

Hücre, sabit bir ısı kaynağıyla ısıtılır. Solvent geçmeden hücrenin ısıtılması, uçucu bileşiklerin kaybına neden olur. Isı kaynağı ile hücrenin içini ısıtma dengeye getirerek, ekstraksiyon sıcaklığının etkisi doğru bir şekilde gözlemlenebilir. Isıtma için geçen süre, ısı kaynağı ile hücre arasındaki temas seviyesine, hücre duvarının ısı transfer özelliklerine ve ayarlanan sıcaklığa bağlıdır. 100°C’de bir ekstraksiyon işlemi için, 2 mm çaplı hücrenin içindeki numuneyi ısıtmak için 5 dakikalık bir süre yeterlidir. Ekstraksiyon çözücüsünü kendi sıcaklığında tutmak için bir basınç kaynağı gereklidir.

Basınç, çözücünün sıvı fazda ayarlanan sıcaklıkta kalması ve çözücüyü zamanla hücreden geçirmesi için gereken değer sınırlarının üzerinde olmalıdır. Bunun için 1000 ve 3000 psi (6,9–20,7 MPa) arasında sabit sıvı basıncına ulaşan yüksek basınçlı sıvı kromatografi tipi pompalar kullanılır. Bu sistemin temel konfigürasyonu, sistemin akışında numuneyi içeren hücre ile yüksek basınçlı sıvı kromatografi sistemine benzer ve sıvı çözücü bir pompa kullanılarak dolu bir yatak üzerinde hareket ettirilir (Handley, 1999:146).

Isıl işlem prosesi, 500 ila 3000 psi solvent genişmesi arasında gerçekleşir ve ekstraksiyon hücresi içinde basınç sağlar. Hücredeki aşırı basıncı önlemek ve hücre basıncını ayarlamak için statik valf yardımı ile otomatik olarak açılıp kapanır. Açma-kapama işlemi nedeniyle, hücreden kaçan çözücü bir kapta toplanır. 5-10 dakikalık bir ekstraksiyon adımıdan sonra, numuneyi ve hatları yıkamak için hatlardan taze solvent basılır. Sistemdeki tüm çözücü, nitrojen olan sıkıştırılmış bir gazla boşaltılır ve toplam çözücü hacmi bir kapta toplanır (Kaufmann ve Christen, 2002:105).

İşlemin son bölümünde, azot ekstraktın üzerinden geçerken ve sistem bir bacadan salınırken çözücünün bir miktar uçuculuğu meydana gelebilir. Toplama kapları, uçucu organik analize uygun, 40 ila 60 ml boyutlarında Teflon kaplı septa ile kapatılır. Isı kaynağının yakınında yanıcı çözücülerle çalışırken, çözücü sızıntılarını önlemek için özen gösterilmeli ve basınç bağlantıları sürekli kontrol edilmelidir. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu, hücrenin üstünden aşağıya doğru bir sıvı ile gerçekleşir ve basınçlı gaz yıkama bölümünde sıvı aynı sıradadır ancak akış yönü kritik bir parametre değildir. Sistem yüksek sıcaklıklarda çalıştığı için tutuşma yanıcılığı yüksek solventlerden kaçınılmalıdır.

Basınçlı sıvı ekstraksiyonunda kullanılan çözücüler genellikle organik çözücülerdir. Basınçlı sıvı ekstraksiyonunda basınçlı su veya süper kritik alt su da kullanılabilir (Wang vd., 2006:300).

CO₂ ve su gibi toksik olmayan çözücülerin kullanımı hem ekonomik hem de çevre açısından faydalıdır. Süper kritik sıvı ekstraksiyonu, nutrasötiklerin ekstraksiyonu için yararlı bir ekstraksiyon tekniğidir. Ancak polar maddeleri çözmek için bazı polar değiştiriciler karbondioksit ile birlikte kullanılmalıdır. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu, polar bileşikleri ekstrakte etmek için süper kritik ekstraksiyona alternatif bir teknik olarak ekstrakte edilmiştir. Soxhlet ekstraksiyonu ile karşılaştırıldığında, basınçlı sıvı ekstraksiyonunda hem solvent miktarında hem de ekstraksiyon süresinde önemli bir azalma vardır (Wang vd, 2006:300).

Basınçlı sıvı ekstraksiyonu genellikle yüksek sıcaklık ve basınçta çevre ortamında stabil organik kirleticilerin ekstraksiyonunda kullanılır. Nutrasötikler alanında birkaç uygulama yayınlanmıştır (Wang vd, 2006:300).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Basınçlı sıvı ekstraksiyonu tekniği ile üzüm (*Vitis vinifera* L.) meyvesi cibresinden polifenolik maddelerin ekstraksiyonun çalışmasında, %50 etanol kullanılarak, sıcaklık (°C), zaman (dk) ve pH bağımsız değişkenleri kullanılarak deney tasarımı yapılmış ve bu faktörlerin ekstraksiyon verimi, polifenolik madde miktarı ve verimi, ekstrelerin antioksidan aktivitesi (DPPH serbest radikal süpürücü etki) üzerine etkisi incelenmiştir.

3.1. Hammadde

Çalışmada Tekirdağ bölgesinde bulunan Merlot üzümü işleyen bir şarap fabrikası atığı üzüm cibresi hammadde olarak kullanılmıştır. Fabrikadan gelen cibre açık havada kurutulmuş kullanıma hazırlanmadan önce -20°C'de dondurucuda saklanmıştır. Kurutulan hammaddenin nemi %5 olarak ölçülmüştür. Cibrenin çekirdek içeriği ortalama %47,4 (a/a) bulunmuştur. Ekstraksiyon işleminden önce hammaddenin boyutu öğütme işlemi ile küçültülmüştür.

3.2. Öğütme

Üzüm cibresi kahve öğütücüsü ile öğütülmüş ve elek serisi kullanılarak elenmiştir. Yapılan çalışmada 0,600 mm'den geçen, 0,425 mm elek üstünde kalan kısım kullanılmıştır.

3.3. Üzüm Cibresiden Polifenolik Maddelerin Klasik Çözücü Ekstraksiyonu

Basınçlı sıvı ekstraksiyonu yöntemi ve klasik çözücü ekstraksiyonu yöntemini karşılaştırmak amacı ile 5 g üzüm cibresi 50 mL %50 etanol çözeltisi ile 2 saat 50°C'de çalkalamalı su banyosunda 100 rpm de ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Süzgeç kağıdından süzülerek katısından ayrılan ekstre içindeki etanol döner buharlaştırıcıda (Buchi vacuum pump V-300) 40°C'de uzaklaştırılmış ve sulu faz liyofilize edilerek kurutulmuştur. Ekstre verimi, ekstredeki fenolik bileşen (toplam fenolik bileşen, toplam prosiyanidin, toplam flavanol, toplam antosiyanin, polimerizasyon derecesi) ve DPPH serbest radikal süpürücü aktiviteleri belirlenmiştir. Analizler üçer tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.4. Üzüm Cibresiden Polifenolik Maddelerin Enzimatik Çözücü Ekstraksiyonu

Cibre ekstraksiyonuna enzim etkisini araştırmak üzere, 5 g cibre, pH 4,8'de selüloz (1 ml), pektinaz (25 mg), selüloz ve pektinaz enzimi karışımı (1mL+25 mg) içeren 50 mL çözücü (%50 etil alkol) ile 50°C'de 2, 4 ve 6 saat sürelerde çalkalamalı su banyosunda ekstre edilmiştir. Filtrasyonla katısından ayrılan ekstre içindeki etanol döner buharlaştırıcıda (Buchi vacuum pump V-300) 40°C'de uzaklaştırılmış ve sulu faz liyofilize edilerek kurutulmuştur. Ekstre verimi, ekstredeki fenolik bileşen (toplam fenolik bileşen, toplam prosiyanidin, toplam

flavanol, toplam antosiyanin, polimerizasyon derecesi) ve DPPH serbest radikal süpürücü aktiviteleri belirlenmiştir.

3.5. Üzüm Cibresinden Polifenolik Maddelerin Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu

Dionex ASE 350® basınçlı sıvı ekstraksiyon sistemi ile yapılan çalışmalarda, 2,5 g hammadde 22 mL'lik ekstraksiyon hücresinde ekstre edilmiştir. Hammadde ekstraksiyon hücresine yerleştirildikten sonra boş kısım cam bilyelerle doldurulmuştur. Tablo 3.1'de verilen ekstraksiyon parametreleri kullanılarak ekstraksiyonlar yapılmıştır. pH etkisini karşılaştırmak amacıyla, sadece %50 etil alkol ile de 50°C de 10 dk ekstraksiyon işlemi de yapılmıştır. Ekstre çözeltilerinden organik çözücüler 40°C'de vakum altında döner buharlaştırıcıda (Buchi vacuum pump V-300) uzaklaştırılmış, sulu kısım dondurulduktan sonra sonra liyofilizatörde (Christ Alpha 2-4 LD) kurutulup ham ekstre elde edilmiştir. Ham ekstraktelerde toplam fenolik bileşen, toplam flavanol, toplam prosiyanidin ve antioksidan aktivite (DPPH) tayinleri gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1. Basınçlı sıvı ekstraktöründe çalışılan parametreler

pH: 1,65- 5,85 (Formik asit)
Sıcaklık: 26-144°C
Ekstraksiyon zamanı: 13-47 dk
Uygulanan basınç: 1700 psi, sabit
Kullanılan çözücü: Etanol:Su (50:50)
Cycle (kademe) sayısı: 1
Yıkama çözeltilisi: Ekstraktör hacminin %100'ü.
Kullanılan çözücü: 25-30 ml (Yıkama çözücüsü dahil)
Hammadde miktarı: 2,5 g

3.6. Cevap Yüzey Yöntemi ile Deney Tasarımı

Üzüm cibresinin Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonunda kullanılan parametrelerin birbirleri üzerindeki etkileşimi görebilmek ve maksimum cevabı bulabilmek için Cevap Yüzey Yöntemi (Response Surface Methodology-RSM) yöntemi kullanılarak deney tasarımı yapılmıştır.

Cevap yüzey yöntemi, ilgilenilen cevabın birkaç parametre tarafından etkilendiği problemlerin modellenmesi ve analizi için kullanılan matematik ve istatistik tekniklerinin

birleşimidir ve amacı cevabı optimize edebilecek modeli geliştirebilmektir. Yöntemin temeli, çok sayıda bağımsız değişken ve bunlara bağlı bir ya da birkaç ölçülen cevap (bağımlı değişken) arasındaki ilişkinin belirlenmesi ve uygun bir fonksiyon yaklaşımı ile geliştirilen modelde optimum işletme koşullarını belirlemektir.

$X_1, X_2, \dots, X_n$ ölçülebilir, sürekli ve kontrol edilebilir parametreleri ve Y cevap değişkenini göstermek üzere cevap yüzeyi şu şekilde ifade edilebilir (Montgomery, 2000:985)

$$Y = f(X_1, X_2, \dots, X_n) \quad (3.1)$$

Bu denklemdeki f ile ifade edilen cevap yüzeyi fonksiyonu birinci derece veya ikinci derece bir fonksiyon olabilir.

Örneğin fonksiyon yaklaşımı ikinci derece polinom alınır;

$$y = \beta_0 + \beta_i X_i + \beta_{ii} X_i^2 + \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (3.2)$$

eşitliği kullanılır.

ε , y cevabında gözlenen gürültü veya hatadır (Montgomery, 2000:985).

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

Eğer cevap, bağımsız değişkenlerin lineer bir fonksiyonu ile iyi modelleniyorsa, yaklaşım fonksiyonu birinci derecedir;

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \varepsilon \quad (3.3)$$

Eğer sistemde bir eğim açısı varsa, yüksek dereceli bir polinom kullanılmalıdır, örneğin ikinci derece model;

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i \neq j} \sum \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (3.4)$$

Bu çalışmada, deney planı Cevap Yüzey Yöntemi kullanılarak “Merkezi Bileşen” (Central Composite) yöntemi ile oluşturulmuştur. Tasarım, değişken sayısı (n)=3 olmak üzere, 8 faktöriyel nokta (2^n), 6 eksenel nokta (2^n) ve merkez noktada 6 tekrar deneyi ile toplam 20 deneyden oluşmaktadır. Çözücü karışımı olarak %50 Etanol’ün kullanıldığı ve tek kademede gerçekleştirilen deneylerde incelenen sıcaklık (T , °C), Zaman (Z , dk) ve pH parametrelerin seviyeleri Tablo 3.2’de, bağımsız değişkenlerin istatistiksel kombinasyonu Tablo 3.3’de gösterilmiştir. Bağımsız değişkenlerin regresyon analizi, ana ve ikili etkilerinin

belirlenmesi, kontur yüzeylerin çizimi için paket program MINITAB 17.00 sürümü kullanılmıştır.

Tablo 3.2. Ekstraksiyon çalışmasında incelenen parametreler ve seviyeleri

Faktörler	Seviyeler		
	-1	0	1
X ₁ : Sıcaklık(°C)	50	85	120
X ₂ : Zaman (dk)	20	30	40
X ₃ : pH	2,5	3,75	5

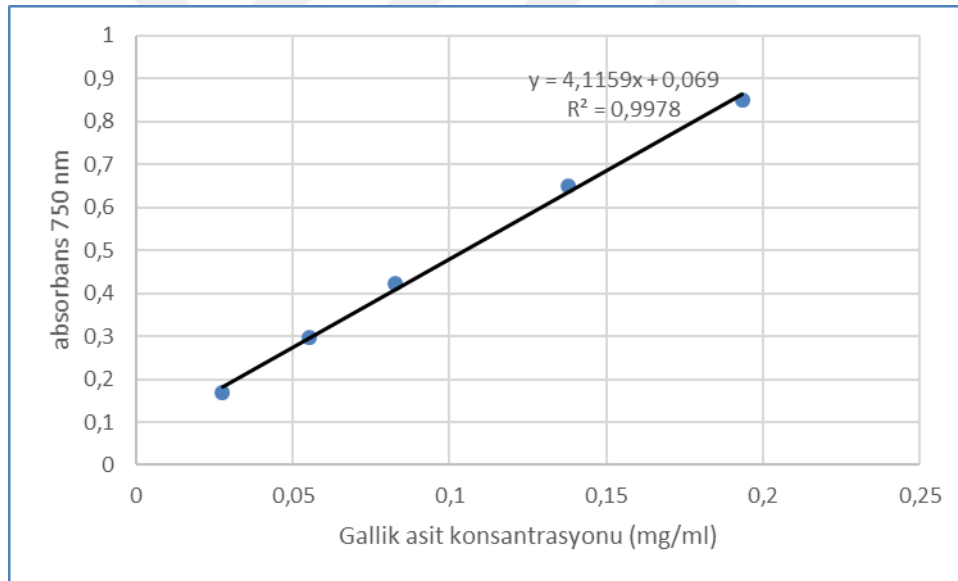
Tablo 3.3. Ekstraksiyon çalışmasında bağımsız değişkenlerin istatistiksel kombinasyonu

Deney No	T (°C)	Zaman (dk)	pH
1	50	40	2,5
2	85	30	3,75
3	85	47	3,75
4	85	30	3,75
5	120	20	2,50
6	85	30	1,65
7	85	30	3,75
8	85	30	3,75
9	120	20	5
10	144	30	3,75
11	50	20	2,50
12	26	30	3,75
13	50	20	5
14	85	30	3,75
15	85	30	3,75
16	50	40	5
17	85	13	3,75
18	85	30	5,85
19	120	40	2,50
20	120	40	5

3.7. Fenolik Bileşiklerin Miktarlarının Belirlenmesi

3.7.1. Toplam Fenolik (TP) Bileşen Tayini

Ekstrelerin içermiş olduğu toplam fenolik madde miktarları Folin Ciocalteu yöntemi ile spektrofotometrik olarak gallik asit (GA) eşdeğeri üzerinden (g GAE/L) tayin edilmiştir. Kullanılan bu metod organik çözücülerde çözünmüş olan fenolik bileşiklerin folin reaktifi ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması temeline dayanır. Liyofilize edilmiş numunelerden (mg/ml) 0,1 mL örnek çözeltisi, 0,5 mL Folin-Ciocalteu (%10) çözeltisi ve 1,5 mL Na₂CO₃ (%20) çözeltisi vortex ile karıştırıldıktan sonra 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiş ve UV-Vis spektrofotometrede (SP-3000 Plus Model 50-60 Hz, Optima) 750 nm’de absorbans değerleri okunmuş, kör olarak distile su kullanılmıştır. Sonuçlar gallik asit kalibrasyon doğrusu kullanılarak ($r^2 = 0,998$) gallik asit eşdeğeri olarak mg GAE/g ekstre olarak hesaplanmıştır.

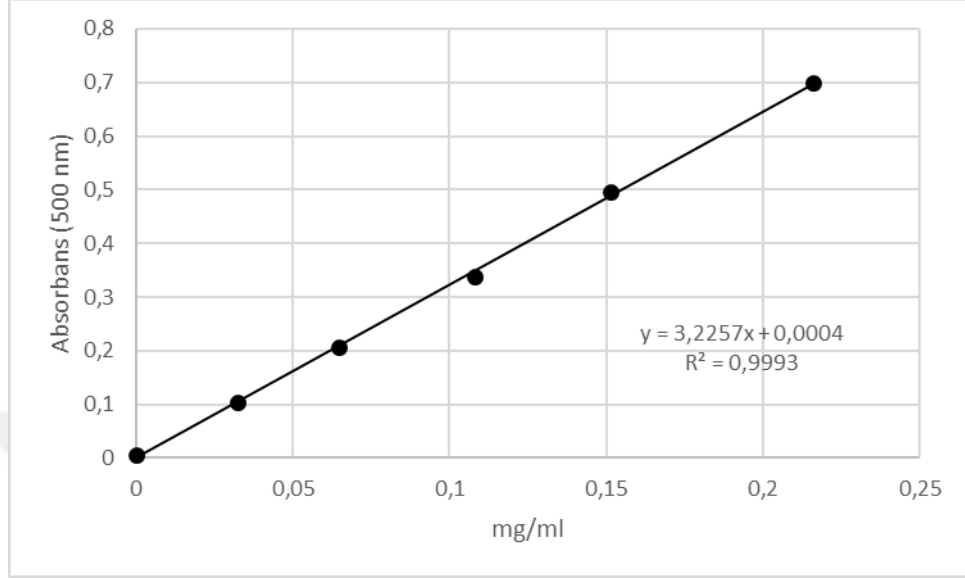


Şekil 3.1. Gallik asitin toplam fenol analizi kalibrasyon doğrusu

3.7.2. Toplam Flavanol Miktarı

Liyofilize edilen numuneler (yaklaşık 5 mg) deney tüplerine alınmış metanol ile çözülmüştür. Deney tüpüne 0,1 ml numunelerden alınmış üzerine 0,15 ml metanol ve hazırlanmış 1,5 ml %4'lük vanilin çözeltisinden, 0,7 ml konsantre HCl eklenmiştir. Vortex yardımı ile karıştırıldıktan sonra su banyosunda 30°C’de 20 dakika bekletilmiş ve 500 nm’de absorbans değerleri okunmuştur. Kör olarak distile su kullanılmıştır. Toplam flavanol miktarı

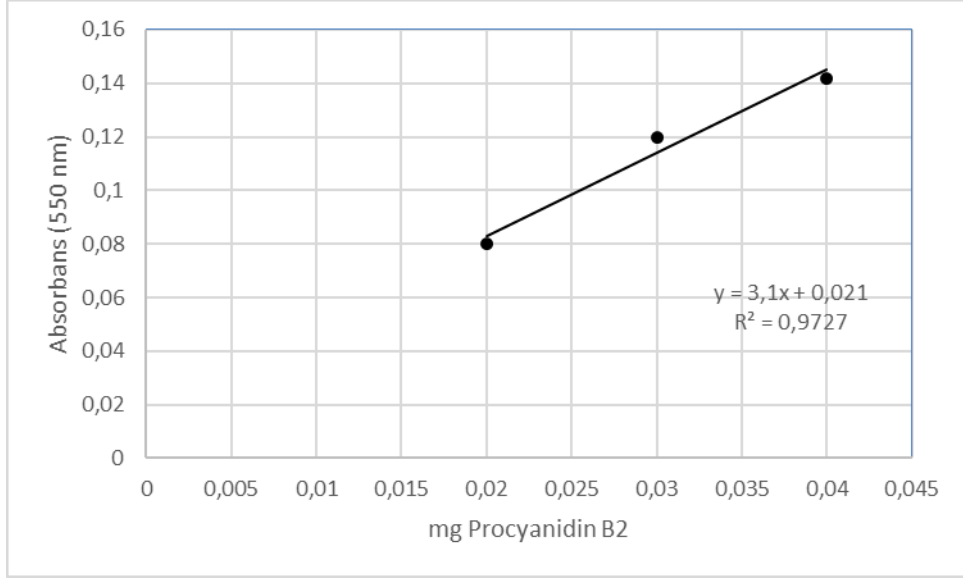
kateşin kalibrasyon eğrisi kullanılarak kateşin eşdeğeri üzerinden hesaplanmıştır (Nakamura vd., 2003).



Şekil 3.2. Kateşinin flavanol analizi kalibrasyon doğrusu

3.7.3. Toplam Polimerik Prosiyanidin (PP) Miktarı

0,1 mL örnek çözeltisi (mg ekstre/ml MeOH) alınmış daha sonra metanol uzaklaştırılmıştır. Çözücüsü uzaklaştırılmış ekstreye 2,5 mL Butanol-12 N HCl (95:5) eklenerek çözülmüş ve 0,1 mL %2'lik $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ çözeltisi (2 g $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ / 100 ml 2N HCl) eklenerek 95°C'de her 10 dk bir vortex ile karıştırılarak 1 saat bekletilmiştir. 1 saat sonunda oda sıcaklığına soğutulduktan sonra numuneler 550 nm de UV spektrofotometrede absorbansları okunmuştur. Kör olarak metanol kullanılmıştır. Sonuçlar prosiyanidin B1 kalibrasyon doğrusu kullanılarak ($r^2=0,973$) mg eşdeğer prosiyanidin B1/g ekstre olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.3. Prosiyanidin B2'nin BuOH-HCl analizi kalibrasyon doğrusu

3.7.4. Toplam Antosiyanin Tayini

Liyofilize edilmiş numunelerden 5 mg deney tüplerine alınmış üzerine 0,5 mL distile su ve 0,5 mL etanol koyulup çözülmüştür. Hazırlanan numunelerden paralelli olacak şekilde 0,2 mL alınmıştır. Örneklerden bir çiftin üzerine 1,3 mL pH = 1 tamponu (0,025M KCl) diğerine 1,3 mL pH = 4,5 tamponu (0,4M NaCH₃COO.3H₂O) eklenmiş ve 45 dk oda sıcaklığında, karanlık bir yerde bekletilmiştir. Spektrofotometrede her bir çözeltinin önce 520 nm'de sonrada 700 nm'de absorbans değeri okunmuştur. Kör olarak distile su kullanılmıştır. Hesaplamalarda aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır.

$$\Delta \text{Absorbans} = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) \text{ pH } 1,0 - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) \text{ pH } 4,5$$

$$\text{Toplam antosiyanin (mg/L)} = (\Delta A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000) / (\epsilon \times 1) \quad (3.5)$$

MW: Siyanidin-3-O-glu molekül ağırlığı (449,5 g/gmol)

DF: Seyreltme faktörü

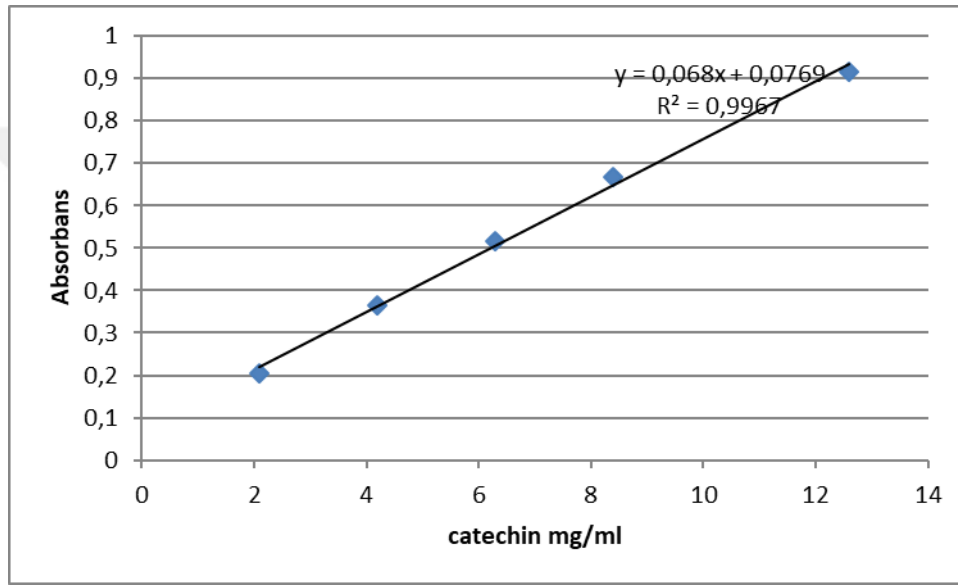
ΔA : Absorbans farkı (uygulanan yöntemle göre pH =1 ve pH =4,5 değerlerinde ölçülen absorbans farkı)

ϵ : molar absorbans (26900)

3.7.5. Ortalama Polimerizasyon Derecesi

3.7.5.1. Vanilin-HCl-Metanol

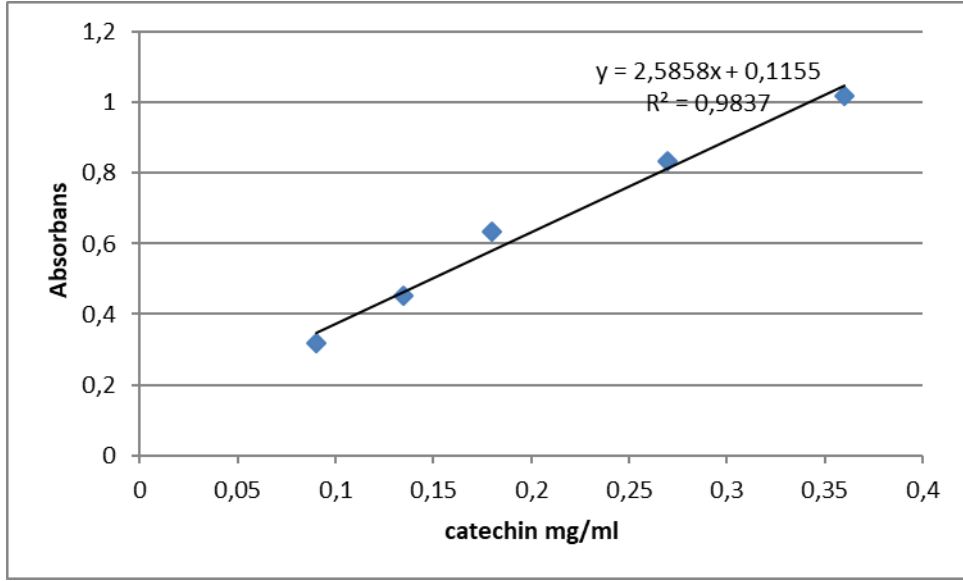
100 mL metanolde olacak şekilde 0,5 g vanilin 4 mL konsantre HCl ilave edilmiş ve karıştırılmıştır. (5 mg ekstre / ml MeOH) 100 mikrolitre ekstre + 2,5 mL vanilin-HCl-metanol çözeltisi eklenerek vortekste 10 saniye karıştırılmıştır. 30°C su banyosunda 20 dk bekletilmiş daha sonra çeşme altında oda sıcaklığına getirilmiştir. 500 ve 510 nm’de absorbans değeri ölçülmüştür. Kör olarak 100 mikrolitre metanol + 2,5 Vanilin HCl Metanol çözeltisi kullanılmıştır.



Şekil 3.4. Vanilin-HCl-metanol analizi kalibrasyon doğrusu

3.7.5.2. Vanilin-HLC-Asetik Asit

0,5 g vanilin 4 mL konsantre HCl ilave edilmiş ve glasiyel asetik asit ile 100 mL’ye tamamlanmıştır. (5 mg ekstre / mL MeOH) 100 mikrolitre ekstre çözeltisi + 2,5 mL vanilin-HCl-asetik asit çözeltisi eklenerek vorteks yardımı ile 10 saniye karıştırılmıştır. 30°C su banyosunda 5 dk bekletilmiş daha sonra hemen soğutulmuştur. 500 ve 510 nm’de absorbans değeri ölçülmüştür. Kör olarak 100 mikrolitre metanol + 2,5 mL Vanilin HCl Asetik asit çözeltisi kullanılmıştır.



Şekil 3.5. Vanilin-HCl-asetik analizi kalibrasyon doğrusu

Proantosiyanidinlerin ortalama polimerizasyon derecesi (mDp) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$mDp = \frac{m}{M \times n} \quad (3.6)$$

m: proantosiyanidinlerin kütle konsantrasyonudur, µg/ml;

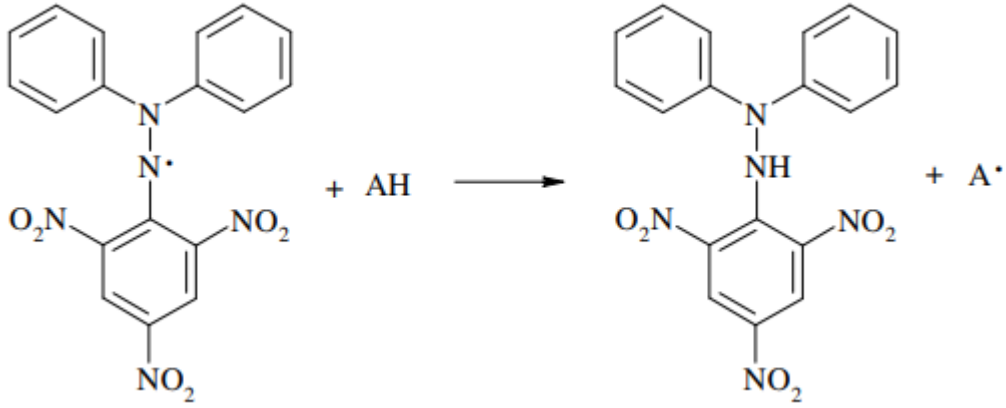
n: proantosiyanidinlerin molar konsantrasyonudur, µmol/ml;

M: monomerik kateşin moleküler ağırlığı, 290,27.

3.7.6. DPPH Serbest Radikal Süpürücü Aktivite Tayini

Kararlı bir organik azot radikal bileşiği olan 2,2-difenilpikrilhidrazil radikali (DPPH), antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılmaktadır. Bu yöntem, DPPH'in metanol yardımı ile hazırlanan çözeltilerinin bir hidrojen verici antioksidan madde varlığında radikal olmayan DPPH-H'a dönüşümünün spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır.





Şekil 3.6. DPPH serbest radikalinin kimyasal yapısı

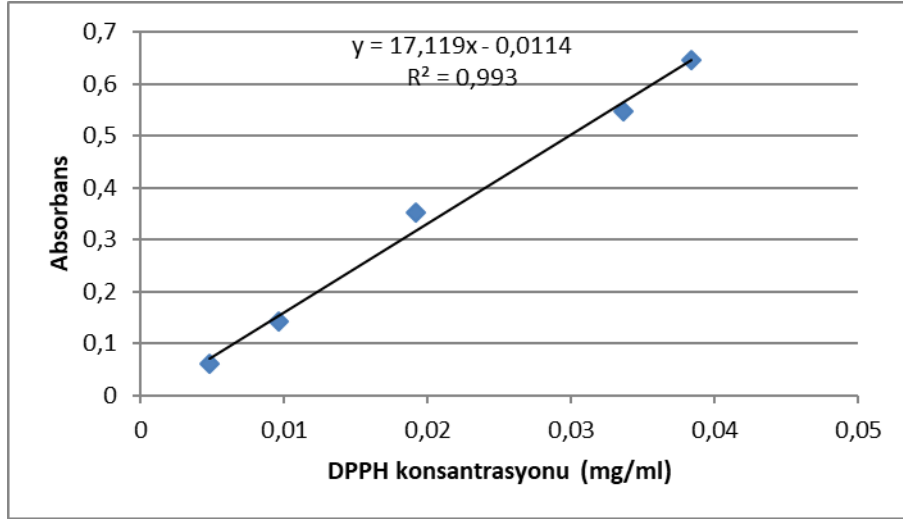
Metanol içerisinde hazırlanmış örnek çözeltisi (reaksiyon ortamındaki örnek konsantrasyonu 4×10^{-3} mg/ml) üzerine DPPH (2×10^{-2} g/L) çözeltisi ilave edilerek vorteks yardımı ile oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika bekletildikten sonra 517 nm’de absorbans değeri okunmuştur. Kör olarak MeOH kullanılmıştır. 1×10^{-3} ve 2×10^{-2} g/L konsantrasyon aralığında DPPH standartı kullanılarak hazırlanmış olan aşağıdaki kalibrasyon denklemi kullanılarak (Şekil 3.3) reaksiyon ortamındaki DPPH konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$) hesaplanmıştır.

$$A_{517\text{nm}} = 17.119 (\text{DPPH})_t + 0,01 (R^2 = 0,996) \quad (3.8)$$

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

$$\% \text{ DPPH}_{\text{kalan}} = (\text{DPPH})_{t=30} / (\text{DPPH})_{t=0} \times 100 \quad (3.9)$$

Sonuçlar DPPH’ın %50’sinin süpürüldüğü (inhibe edildiği) konsantrasyon (EC_{50} $\mu\text{g/ml}$) cinsinden değerlendirilmiştir.



Şekil 3.7. DPPH konsantrasyon-absorbans kalibrasyon eğrisi

4. DENEYSEL BULGULAR

Çalışmada, basınçlı sıvı ekstraksiyonu tekniği ile şarap atığı üzüm cibresinden fenolik bileşenlerin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Cevap Yüzey Yöntemi Deney Tasarımı kullanılarak ekstraksiyon parametrelerinin (sıcaklık, pH, zaman), ekstraksiyon verimi, fenolik bileşen verimi ve antioksidan aktivitesi (DPPH) üzerine etkileri araştırılmıştır.

4.1. Farklı Ekstraksiyon Tekniklerinin Karşılaştırılması

Üzüm cibreleri Bölüm 3’de anlatıldığı gibi ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuş ve elde edilen fenolik bileşen verimleri Tablo 4.1 de fenolik bileşen miktarları ise Tablo 4.2 de verilmiştir.

Biyokimyasal olarak, bitki hücre duvarları çoğunlukla, hücre içi maddelerin salınımı için bir bariyer oluşturan nişasta, selüloz, hemi-selüloz (ksiloglukanlar) ve pektin gibi birbirine bağlanan çoklu polisakkaritlerden oluşur. Birçok fenolik hidroksil grubu, polisakkarit kompleksleri içinde hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimler tutulan flavonoidler içerir. Selülaz, hemiselülaz ve pektinaz gibi karbonhidrat hidrolize edici enzimlerin karışımı, hücre duvarı yapısını yeterince bozmak, karmaşık iç depolama malzemelerini parçalamak ve böylece serbest polifenollerin salınımını kolaylaştırabilir (Nadar vd., 2018:309).

Ekstraksiyon verimleri kuru baz üzerinden %6 ile %19 arasında verilmiştir. Enzim ilave edilmiş ekstre verimleri klasik ekstraksiyon verimine göre yaklaşık 2-3 kat artmıştır. Bir gram ekstrede bulunan toplam fenolik bileşen (TFB) miktarlarının, klasik ekstraksiyon ve %50 Etanol ile yapılan BSE ile kıyaslandığında enzimatik ekstraksiyonunda arttığı görülmüştür. Bu artış pektinaz ilavesi ile %100 e ulaşmıştır. Toplam polimerik prosiyanidin miktarları ise enzim ilaveli ekstraksiyonda diğer ekstraksiyon tekniklerine göre bir azalma görülmüştür. En yüksek DPPH aktivitesine ise pektinaz ilaveli ekstrelerin sahip olduğu (12-13 µg/ml) görülmüştür.

Tablo 4.1. Farklı ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen fenolik bileşe ekstraksiyon verimleri

	TFB (% g/100 g cibre $\pm$ STD)	TFL (g Kat/100 g cibre) $\pm$ STD	TPP(g PB2/100 g cibre) $\pm$ STD	TA(mg siyanidin 3-glu / 100g cibre) $\pm$ STD	Verim(% kurubaz)
Klasik Ekstraksiyon 50°C, 2sa					
EtOH:Su (50:50)	0,95 $\pm$ 0,06	2,24 $\pm$ 0,09	1,16 $\pm$ 0,07	1,96 $\pm$ 0,02	6,06 $\pm$ 0,52
Enzimatik					
Selüla, 2 sa	3,00 $\pm$ 0,36	3,70 $\pm$ 0,37	0,77 $\pm$ 0,05	2,70 $\pm$ 0,01	19,02 $\pm$ 0,96
Selüla, 4 sa	3,27 $\pm$ 0,93	3,85 $\pm$ 0,93	0,96 $\pm$ 0,08	3,15 $\pm$ 0,38	17,80 $\pm$ 0,04
Selüla, 6 sa	3,23 $\pm$ 0,94	3,27 $\pm$ 0,94	0,90 $\pm$ 0,06	3,21 $\pm$ 0,02	17,11 $\pm$ 2,14
Selüla+Pektinaz,2 sa	2,46 $\pm$ 0,59	3,01 $\pm$ 0,59	0,60 $\pm$ 0,02	3,30 $\pm$ 0,06	15,08 $\pm$ 0,84
Selüla+Pektinaz,4 sa	2,87 $\pm$ 0,03	3,20 $\pm$ 0,03	0,87 $\pm$ 0,02	2,65 $\pm$ 0,05	15,84 $\pm$ 0,83
Selüla+Pektinaz, 6 sa	2,98 $\pm$ 0,26	3,08 $\pm$ 0,26	0,81 $\pm$ 0,18	4,28 $\pm$ 0,16	15,65 $\pm$ 0,23
Pektinaz, 2 sa	2,43 $\pm$ 0,06	2,97 $\pm$ 0,06	1,08 $\pm$ 0,15	3,44 $\pm$ 0,11	8,99 $\pm$ 0,06
Pektinaz,, 4 sa	2,99 $\pm$ 0,21	2,95 $\pm$ 0,21	1,13 $\pm$ 0,09	3,86 $\pm$ 0,32	9,36 $\pm$ 0,48
Pektinaz, 6 sa	4,06 $\pm$ 0,29	3,33 $\pm$ 0,29	1,31 $\pm$ 0,02	6,26 $\pm$ 0,12	10,31 $\pm$ 0,15
Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu, 50°C, 10 dk					
EtOH:Su (50:50)	0,72 $\pm$ 0,05	2,18 $\pm$ 0,02	1,22 $\pm$ 0,02	2,85 $\pm$ 0,01	8,08 $\pm$ 0,95

Tablo 4.2. Farklı ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen ekstrelerde bulunan fenolik bileşen miktarları

	TFB(mg GA/gekstre) ±STD	TFL(mg Kat/gekstre) ±STD	TPP(mg PB2/gekstre ±STD	TA(mg siyanidin 3-glu/100 g ekstr) ±STD	EC ₅₀ ±STD (µg/ml)
Klasik Ekstraksiyon					
EtOH:Su (50:50), 2 sa	157,11±10,5	369,36±14,08	190,71±11,36	32,61±3,87	29,74±3,34
Enzimatik					
Selüloz, 2 sa	158,00±19,20	194,75±7,58	40,48±2,66	14,23±1,68	30,80±0,49
Selüloz, 4 sa	183,50±52,21	216,27±11,08	53,75±4,44	17,72±0,95	28,25±1,89
Selüloz, 6 sa	188,54±54,75	191,03±12,13	52,38±0,90	17,74±0,80	28,91±0,07
Selüloz+Pektinaz, 2 sa	162,83±39,27	199,91±3,77	39,92±1,54	21,89±0,85	30,90±1,36
Selüloz+Pektinaz, 4 sa	181,09±1,83	202,09±10,96	55,01±1,37	16,70±0,72	29,78±0,87
Selüloz+Pektinaz, 6 sa	190,52±16,81	196,56±12,80	61,02±3,66	27,38±0,70	17,25±0,84
Pektinaz, 2sa	270,12±6,72	330,51±53,51	120,60±17,03	28,23±1,87	14,21±0,31
Pektinaz, 4sa	319,17±2,99	314,86±33,01	120,34±9,14	41,20±0,80	12,50±0,24
Pektinaz, 6 sa	393,29±28,11	323,21±11,89	126,63±1,30	60,74±0,78	13,29±1,41
Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu					
EtOH:su (50:50)	89,36±6,26	270,11±2,12	150,81±16,83	35,59±1,18	26,17±4,12

4.2. Cevap Yüzey Yöntemi Deney Tasarımı ile Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu

Deneyisel çalışmanın ikinci aşamasında da BSE parametrelerinin ekstre edilen toplam fenolik bileşen ve DPPH aktivitesi ve en yüksek verimin ve antioksidan aktivitenin elde edildiği koşulları belirlemek için gerekli deney planının oluşturulması amacıyla Yanıt Yüzey Yöntemi (RSM) uygulanmıştır. Bölüm 3.6’da açıklandığı gibi parametrelerin alt ve üst değerleri, sıcaklık için 50-120°C ve zaman için de 20–400dk ve pH için 2,5-5,0 seçilmiştir. Bağımsız değişkenlerin değerlerinin ve bu noktalarda yapılan deneylerden elde edilen elde edilen cevapların (ekstre verimi (%), toplam fenolik bileşen (TFB), Toplam flavanol (TFL), Toplam polimerik prosiyanidin (TPP), Toplam antosiyanin verimleri ve DPPH aktivite) ikinci derece polinom modeline uygunluğu ve parametrelerin tekli ve çoklu etkileri %5 ($\alpha=0,05$) anlamlılık seviyesinde varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir.

4.3. Basınçlı Sıvı Parametrelerinin Ekstre Verimi ve Toplam Fenolik Bileşik Miktarlarına Etkisi

4.3.1. Ekstre Verimine Etkisi

BSE ekstraksiyonundan elde edilen ekstre verimleri Bölüm 4.3’de verilen birinci ve ikinci derece polinom yaklaşımına uygulanmıştır. Ekstre verimleri için yapılan varyans analizi sonucunda F testinin %5 önem derecesinde, sıcaklık (X1) ve Zaman (X2)’ın toplam ekstre verimi üzerine doğrusal etkilerinin anlamlı olduğu ($p<0,05$), zaman ve pH’ın ikinci derece polinom etkisi olduğu ve üç faktörün ikili etkilerinin anlamlı olduğu ($p<0,05$) bulunmuş ve toplam ekstre verimi için ikinci derece polinom eşitliği aşağıda verilmiştir.

$$\begin{aligned} \text{Ekstre verimi (\%)} = & 19,75 - 0,3100T(^{\circ}\text{C}) + 0,176Z(\text{dk}) - 3,573\text{pH} + 0,001211T(^{\circ}\text{C}) * T(^{\circ}\text{C}) \\ & + 0,00208Z(\text{dk}) * Z(\text{dk}) + 0,5429\text{pH} * \text{pH} + 0,004559T(^{\circ}\text{C}) * Z(\text{dk}) + 0,03674T(^{\circ}\text{C}) * \text{pH} \\ & - 0,1226Z(\text{dk}) * \text{pH} \end{aligned}$$

Modelden elde edilen toplam ekstre verimleri ile deneysel olarak elde edilen verimler arasındaki lineer ilişki katsayısı (R^2) 0,9950 olarak bulunmuştur. Bu değer; yüzey merkezli model ile deneysel verilerin %99,50 doğrulukta açıklanabileceğini ifade etmektedir.

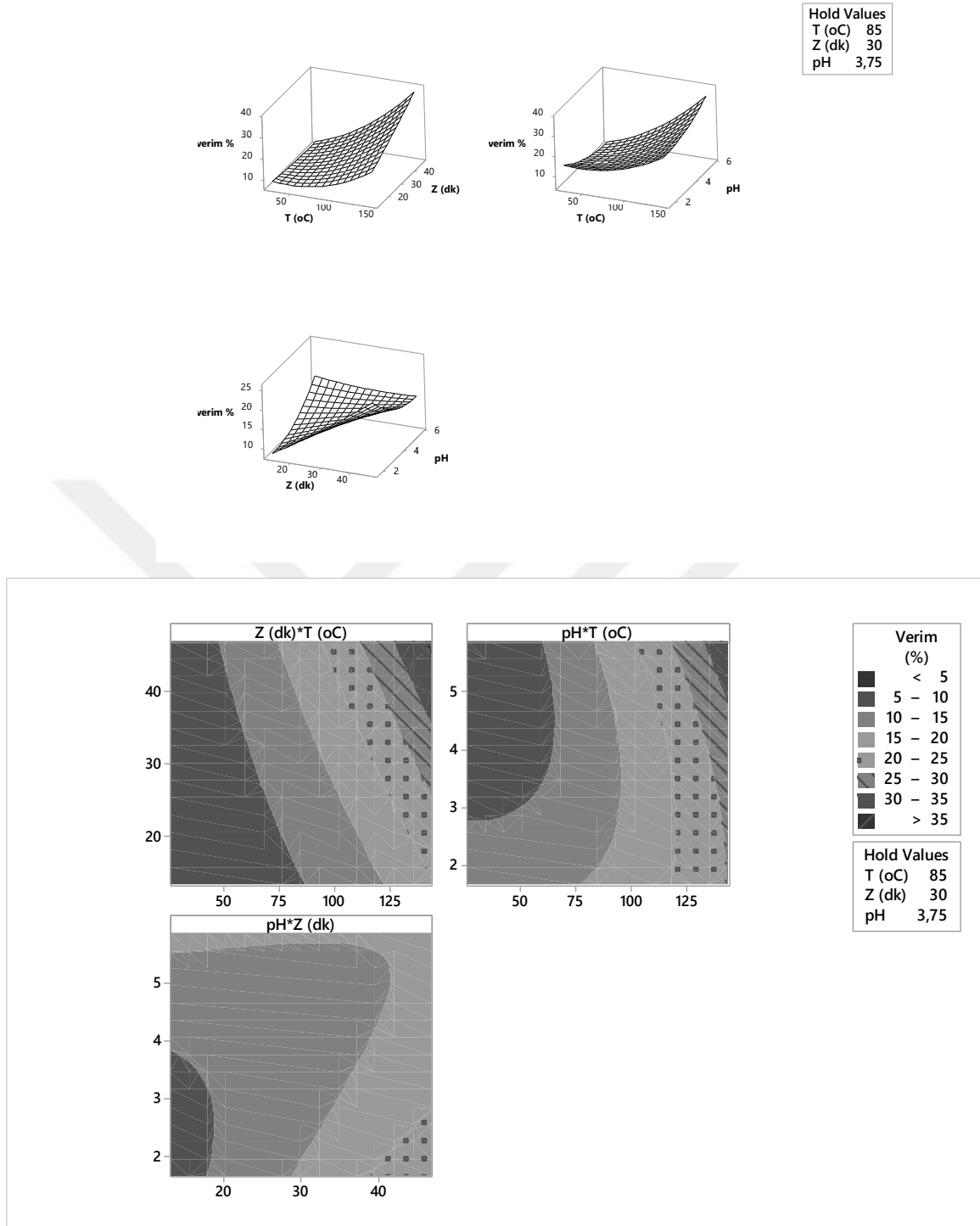
Tablo 4.1. Basınçlı sıvı ekstraksiyon koşullarının ekstraksiyon verimine etkisi

	T (°C)	Zaman (dk)	pH	Verim (% Kuru baz)
1	50	40	2,5	13,37
2	85	30	3,75	13,01
3	85	47	3,75	17,17
4	85	30	3,75	12,80
5	120	20	2,5	13,86
6	85	30	1,65	15,53
7	85	30	3,75	13,20
8	85	30	3,75	12,94
9	120	20	5	20,85
10	144	30	3,75	27,67
11	50	20	2,50	9,56
12	26,14	30	3,75	7,00
13	50	20	5	8,19
14	85	30	3,75	13,00
15	85	30	3,75	13,48
16	50	40	5	7,81
17	85	13	3,75	10,29
18	85	30	5,85	15,55
19	120	40	2,50	25,99
20	120	40	5	24,92

Tablo 4.2. Ekstre verimi (% kuru baz) için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi

Analysis of Variance					
Model	9	655,912	72,879	233,52	0,000
Linear	3	557,226	185,742	595,15	0,000
T (°C)	1	485,946	485,946	1557,06	0,000
Z (dk)	1	71,213	71,213	228,18	0,000
pH	1	0,067	0,067	0,21	0,654
Square	3	38,873	12,958	41,52	0,000
T (°C)*T (°C)	1	31,722	31,722	101,64	0,000
Z (dk)*Z (dk)	1	0,623	0,623	2,00	0,188
pH*pH	1	10,369	10,369	33,22	0,000
2-Way Interaction	3	59,813	19,938	63,88	0,000
T (°C)*Z (dk)	1	20,369	20,369	65,27	0,000
T (°C)*pH	1	20,668	20,668	66,22	0,000
Z (dk)*pH	1	18,776	18,776	60,16	0,000
Error	10	3,121	0,312		
Lack-of-Fit	5	2,835	0,567	9,92	0,012
Pure Error	5	0,286	0,057		
Total	19	659,033			
Regresyon katsayıları					
S	R-sq	R-sq (adj)	R-sq (pred)		
0,558653	99,53%	99,10%	96,23%		

Ekstre verimleri için yüzey ve kontur grafikleri Şekil 4.1’de verilmiştir. Ekstre verimleri kullanılan parametrelere bağlı olarak %7-27 arasında değişmiştir. Beklendiği üzere sıcaklık ve zamanın ekstre verimi üzerine doğrusal etkisi görülmüş ve bu değerler arttıkça verimin de arttığı görülmüştür. En yüksek verim (%27,27) 144°C, 30 dk ve pH 3,75’de, en düşük verim ise 26°C, 30 dk ve pH 3,75 de elde edilmiştir. Görüldüğü üzere sıcaklık ekstraksiyon verimi üzerine en etkili parametredir. Hem düşük hem de yüksek sıcaklıklarda zamanın ekstraksiyon verimi üzerine pozitif bir etkisi olmuştur. pH etkisi ise pH ın sıcaklık ve zamanla olan ikili ilişkisi ile değişiklik göstermiştir. Yüksek sıcaklıklarda pH artarken ekstre verimi artmış, düşük sıcaklıklarda ise azalmıştır. Düşük zamanlarda ise pH arttıkça ekstre verimi artarken, zaman arttıkça ekstre verimi daha asidik pH değerlerinde artış göstermiştir.



Şekil 4.1. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin toplam fenolik bileşen verimi (%) üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri

Her bir ekstraksiyonun farklı şartlarda yapıldığı düşünüldüğünde karşılaştırmak güç olsa da, sabit sıcaklıkta (50°C) farklı pH larda yapılan BSE ekstraksiyon verimleri yine 50°C’de klasik, enzimatik ve nötr ortamda gerçekleştirilen (Tablo 4.1) BSE ekstraksiyon verimlerini ile karşılaştırıldığında, pH’ın 50°C’de ekstre verimi üzerine fazla etkisinin olmadığı görülmektedir. Nötr ortamda 10 dk yapılan BSE den elde edilen verim %8 iken, farklı pH ve zamanlarda 50°C’de yapılan ekstraksiyonlarda elde edilen ekstre verimlerinin %7,81 (pH 5, 40dk)-%13,37 (pH 2,5, 40 dk) arasında değiştiği, 50°C, 20 dk’da pH 2,5’da verimin %9,56, pH 5’de ise %8,19 olduğu görülmüştür. BSE ile elde edilen ekstre verimlerinin klasik ekstraksiyon (50°C, 2 sa) ile elde edilen ekstre verimine (%6) nazaran yüksek olduğu gözlenmiştir.

4.3.2. Toplam Fenolik Bileşen (TFB) Miktarına Etkisi

Toplam Fenolik Bileşen (TFB) için elde edilen sonuçlar Tablo 4.5’de verilmiştir. En yüksek TFB verimi (g GAE/100 g cibre) 20 numaralı çalışmada (120°C, 40 dk ve pH 5), %11,31 olarak bulunmuştur. En düşük TFB verim ise 11 numaralı çalışmada (50°C, 20 dk ve pH 2,5) %1,07 olarak bulunmuştur. TFB verimleri toplam ekstre verimleri ile paralellik gösterse de ekstrelerin içermiş oldukları fenolik bileşen miktarlarının verim üzerine önemli etkisi olmuştur. Dolayısı ile verim kadar ekstre içeriği de önemlidir. Bir gram ekstrede TFB miktarları 105,35 mg GAE/g (50°C, 40 dk ve pH 2,5)-453,58 mg GAE/g (120°C, 40 dk, pH 5) arasında değişmiştir. Ekstrenin içinde bulunan TFB miktarı (g GAE/g ekstre) ekstrenin fenolik bileşen bakımından ne kadar zengin olduğunu göstermektedir.

TFB miktarları (mg GAE/g ekstre) için yapılan varyans analizi sonucunda (Tablo 4.6) sıcaklık (X1) ve pH’ın TFB (mg gallik asit/g ekstre) miktarı üzerine doğrusal ve T*pH ikili etkilerinin olduğu ($P<0,05$) görülmüştür (Şekil 4.2).

Sıcaklık ve pH arttıkça ekstredeki TFB miktarının arttığı görülmektedir. Parametrelerin orta noktalarında (85°C, 30 dk, pH 3,75) sıcaklığın iki kat artmasıyla TFB miktarları yaklaşık 1,5 kat artmıştır. Aynı etki pH artışında da görülmüştür. Ekstraksiyon zamanındaki değişimle ekstredeki TFB miktarının değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,187$).

Toplam fenolik bileşen verimleri (g TFB/100 g cibre, %) ekstre verimlerine paralel bir sonuç göstermiştir. Ekstraksiyon parametrelerinin TFB (%) verimleri üzerine etkisini gösteren üç boyutlu grafikleri Şekil 4.3’de verilmiştir. Buradan tüm parametrelerdeki artış TFB veriminin (%) de anlamlı bir şekilde ($p<0,05$) artmasına neden olmuştur (Tablo 4.7).

Ekstredeki TFB ve TFB verimi için varyans analizi sonucu elde edilen ikinci derece polinom eşitlikleri aşağıda verilmiştir.

$$\text{TFB (mg GAE/g ekstre)} = 76 + 3,47T(^{\circ}\text{C}) + 11,86Z(\text{dk}) + 100,7\text{pH} + 0,00631T(^{\circ}\text{C}) * T(^{\circ}\text{C}) + 0,1675Z(\text{dk}) * Z(\text{dk}) + 4,16\text{pH} * \text{pH} + 0,0337T(^{\circ}\text{C}) * Z(\text{dk}) - 0,992T(^{\circ}\text{C}) * \text{pH} + 0,10Z(\text{dk}) * \text{pH}$$

$$\begin{aligned} \text{TFB (\%)} = & 8,01 - 0,1295 T (^{\circ}\text{C}) - 0,262 Z (\text{dk}) - 0,72 \text{pH} + 0,000644 T (^{\circ}\text{C}) * T (^{\circ}\text{C}) \\ & + 0,00388 Z (\text{dk}) * Z (\text{dk}) + 0,248 \text{pH} * \text{pH} + 0,002803 T (^{\circ}\text{C}) * Z (\text{dk}) + 0,00528 T (^{\circ}\text{C}) * \text{pH} \\ & + 0,0295 Z (\text{dk}) * \text{pH} \end{aligned}$$

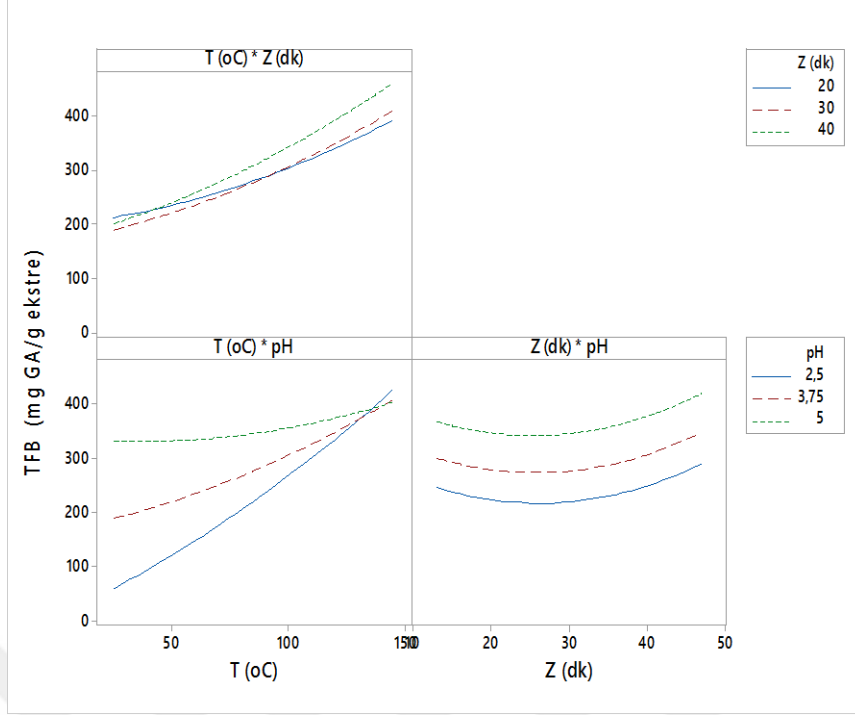
Modelin her iki cevap için de olabilirlik değeri $p < 0,05$ bulunmuştur. Her iki cevap için de model eşitliği cevapları %90,79 (TFB mg GAE/g) ve %97,25 (%TFB) oranında açıklamaktadır. Ancak modelden sapma (lack of fit) değerlerinin önemli olduğu görülmüştür ($p > 0,05$).

Tablo 4.3. BSE koşullarının toplam fenolik bileşen miktarı üzerine etkisi

	T (°C)	Zaman (dk)	pH	Toplam fenol (mg gallik asit/g ekstre)	Toplam fenol verimi (g gallik asit/100 g cibre)
1	50	40	2,50	105,35	1,41
2	85	30	3,75	279,90	3,64
3	85	47	3,75	353,17	6,06
4	85	30	3,75	276,40	3,54
5	120	20	2,50	351,06	4,87
6	85	30	1,65	207,72	3,23
7	85	30	3,75	286,43	3,78
8	85	30	3,75	268,64	3,47
9	120	20	5	408,46	8,52
10	144	30	3,75	345,16	9,55
11	50	20	2,50	112,20	1,07
12	26	30	3,75	237,08	1,66
13	50	20	5	346,15	2,84
14	85	30	3,75	276,01	3,59
15	85	30	3,75	276,72	3,73
16	50	40	5	341,12	2,66
17	85	13	3,75	280,11	2,88
18	85	30	5,85	367,57	5,72
19	120	40	2,50	388,32	10,09
20	120	40	5	453,58	11,31

Tablo 4.4. Ekstredeki toplam fenolik bileşen TFB (mg gallik asit/g ekstre) için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi

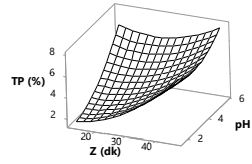
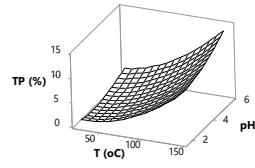
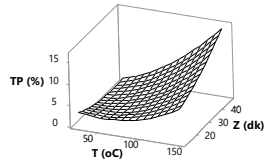
Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	134568	14952,0	10,96	0,000
Linear	3	113544	37848,1	27,74	0,000
T (°C)	1	56494	56494,4	41,41	0,000
Z (dk)	1	2738	2738,0	2,01	0,187
pH	1	54312	54311,8	39,81	0,000
Square	3	4845	1615,1	1,18	0,365
T (°C)*T (°C)	1	860	859,8	0,63	0,446
Z (dk)*Z (dk)	1	4041	4041,0	2,96	0,116
pH*pH	1	608	607,9	0,45	0,520
2-Way Interaction	3	16179	5392,9	3,95	0,043
T (°C)*Z (dk)	1	1111	1111,0	0,81	0,388
T (°C)*pH	1	15056	15056,1	11,04	0,008
Z (dk)*pH	1	12	11,7	0,01	0,928
Error	10	13643	1364,3		
Lack-of-Fit	5	13475	2695,1	80,24	0,000
Pure Error	5	168	33,6		
Total	19	148212			
S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)		
36,9370	90,79%	82,51%	30,78%		



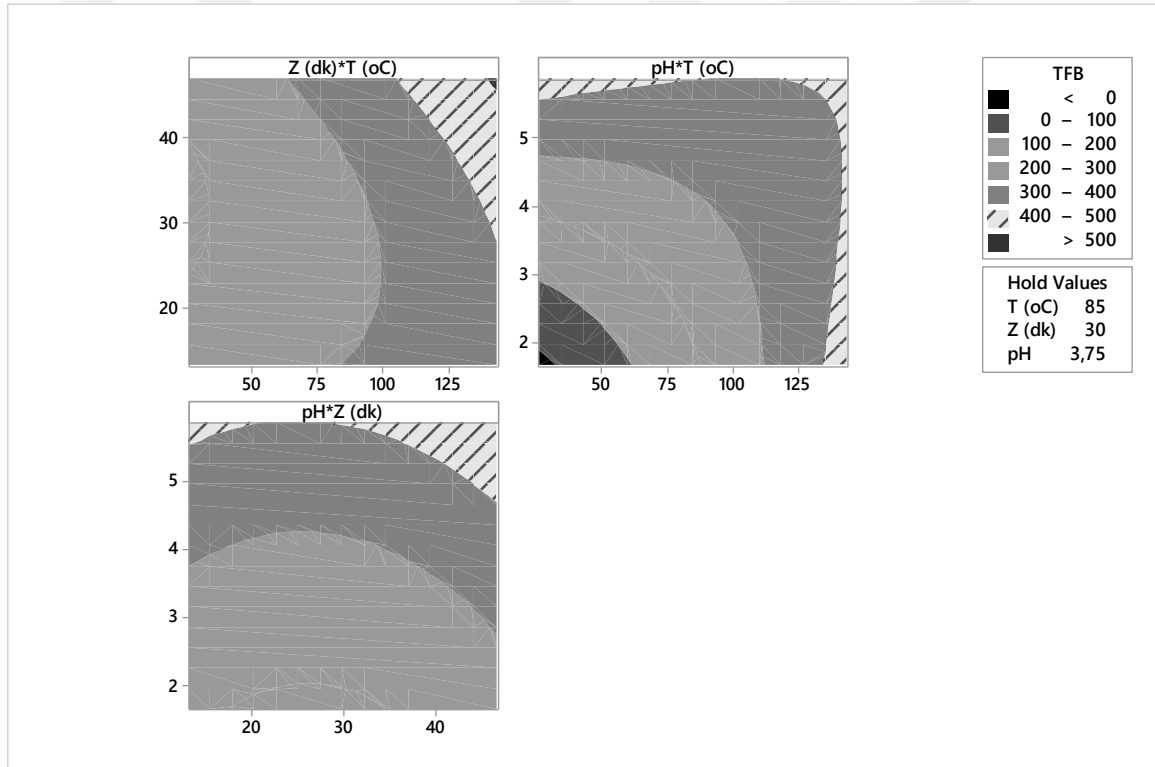
Şekil 4.2. BSE Parametrelerinin ekstredeki toplam fenolik bileşen içeriğine (mg GA/g ekstre) tekli ve ikili etkileri

Tablo 4.5. Toplam Fenolik bileşen verimi (g GA/100 g cibre) için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	162,391	18,043	38,74	0,000
Linear	3	141,651	47,217	101,38	0,000
T (°C)	1	117,585	117,585	252,47	0,000
Z (dk)	1	13,391	13,391	28,75	0,000
pH	1	10,675	10,675	22,92	0,001
Square	3	11,527	3,842	8,25	0,005
T (°C)*T (°C)	1	8,968	8,968	19,25	0,001
Z (dk)*Z (dk)	1	2,172	2,172	4,66	0,056
pH*pH	1	2,166	2,166	4,65	0,056
2-Way Interaction	3	9,212	3,071	6,59	0,010
T (°C)*Z (dk)	1	7,699	7,699	16,53	0,002
T (°C)*pH	1	0,427	0,427	0,92	0,361
Z (dk)*pH	1	1,086	1,086	2,33	0,158
Error	10	4,657	0,466		
Lack-of-Fit	5	4,590	0,918	68,53	0,000
Pure Error	5	0,067	0,013		
Total	19	167,048			
Model Summary					
S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)		
0,682453	97,21%	94,70%	78,64%		



Hold Values
T (°C) 85
Z (dk) 30
pH 3,75



Şekil 4.3. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin toplam fenolik bileşen verimi (%) üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri

4.3.3. Toplam Flavanol (TFL) Miktarına Etkisi

Farklı BSE koşullarında kateşin eşdeğeri olarak hesaplanan Toplam Flavanol miktarı (mg kateşin/g ekstre) ve Toplam Flavanol verimi (g Kateşin asit/100 g cibre) Tablo 4.8’de verilmiştir. Bir gram ekstredeki en düşük flavanol miktarı 73,81 mg Kateşin/g ekstre olarak 50°C, 40 dk ve pH 2,5 de elde edilirken, en yüksek TFL 236,57 mg kateşin/g ekstre ile 120°C, 40 dk ve pH 5’de elde edilmiştir. Ekstre verimlerine bağlı olarak TFL verimleri (%) 0,76 (26°C, 30 dk, pH 3,75)-5,90 (120°C, 40 dk, pH 5) arasında değişmiştir. Ekstrelerin TFL içeriğine etki fazla etki eden parametrenin pH olduğu görülmüştür. Sıcaklığın da TFL miktarı üzerine pozitif etkisi vardır. pH değeri attıkça ekstredeki mg TFL artmıştır (Şekil 4.4). 50°C’de yapılan klasik ekstraksiyonda TFL miktarı 369 mg Kat/g ekstre, nötr ortamda BSE ekstraksiyonundan elde edilen ekstredeki TFL miktarı da 270 mg Kat/g ekstre bulunmuştur. Bu değerler de pH arttıkça (pH 2,5-7) TFL miktarının arttığını göstermektedir. Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu ile elde edilen ekstrelerdeki TFL miktarları klasik ekstraksiyona göre yaklaşık %30 daha azdır.

Verilerin Varyans analizleri sonucunda (Tablo 4.9) toplam flavanol miktarını (mg kat/g ekstre) ifade edebilecek aşağıdaki model elde edilmiştir:

$$\begin{aligned} \text{TFL (mg Kateşin/g ekstre)} = & 473 - 1,95 T (^{\circ}\text{C}) - 10,54 Z (\text{dk}) - 101,8 \text{ pH} + 0,01213 T \\ & (^{\circ}\text{C})*T (^{\circ}\text{C}) + 0,0742 Z (\text{dk})*Z (\text{dk}) + 14,12 \text{ pH}*\text{pH} + 0,0233 T (^{\circ}\text{C})*Z (\text{dk}) - 0,070 T \\ & (^{\circ}\text{C})*\text{pH} + 0,919 Z (\text{dk})*\text{pH} \end{aligned}$$

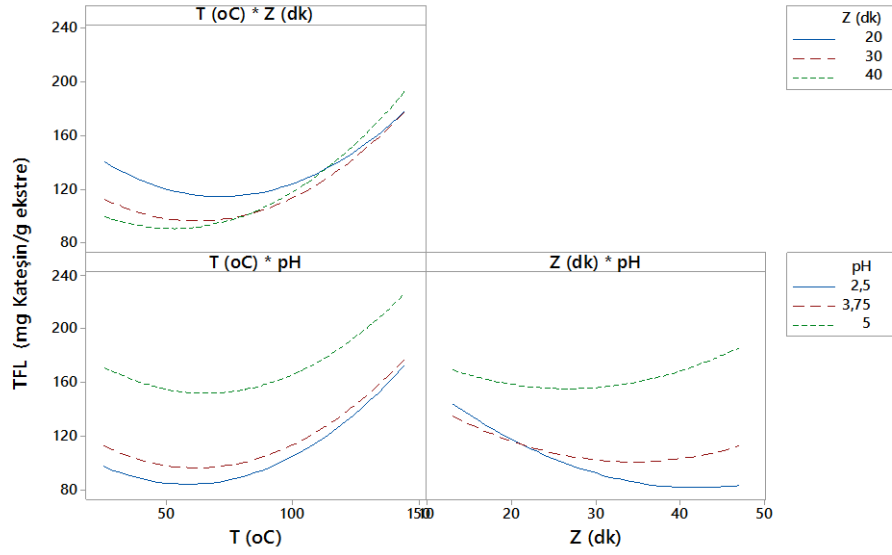
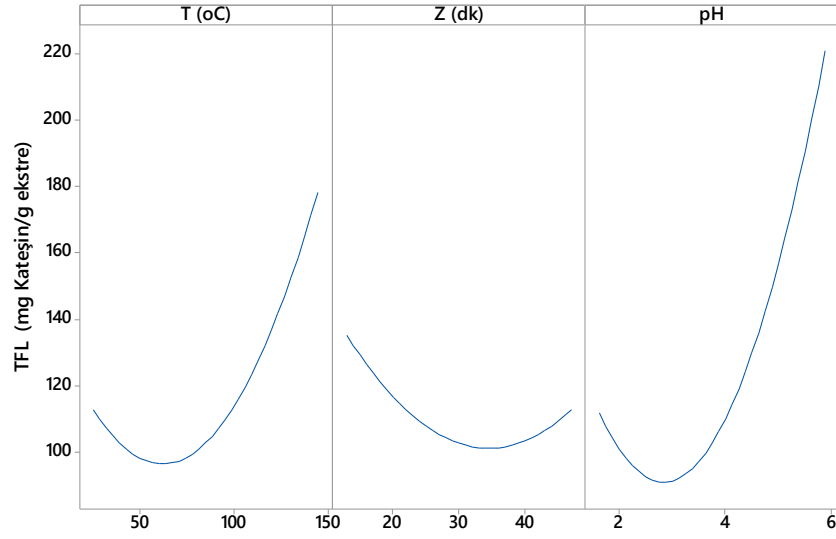
Model eşitlikten elde edilen verilerle ve deneysel veriler arasındaki lineer ilişki katsayısı (R^2) 0,8532 olarak bulunmuştur. Bu değer; yüzey merkezli model ile deneysel verilerin %85,32 doğrulukta açıklanabileceğini ifade etmektedir.

Tablo 4.6. BSE koşullarının toplam flavanol (TFL) miktarı üzerine etkisi

	T (°C)	Zaman (dk)	pH	Toplam flavanol (mg Kateşin/g ekstre)	Toplam flavanol verimi (g Kateşin/100 g cibre)
1	50	40	2,50	73,81	0,99
2	85	30	3,75	102,61	1,34
3	85	47	3,75	115,71	1,99
4	85	30	3,75	98,20	1,26
5	120	20	2,5	173,52	2,40
6	85	30	1,65	116,28	1,81
7	85	30	3,75	109,24	1,44
8	85	30	3,75	105,29	1,36
9	120	20	5	190,13	3,97
10	144	30	3,75	157,71	4,36
11	50	20	2,50	105,95	1,01
12	26	30	3,75	109,11	0,76
13	50	20	5	199,81	1,64
14	85	30	3,75	104,96	1,36
15	85	30	3,75	98,35	1,33
16	50	40	5	148,58	1,16
17	85	13	3,75	108,99	1,12
18	85	30	5,85	191,25	2,97
19	120	40	2,50	108,99	2,83
20	120	40	5	236,57	5,90

Tablo 4.9. Ekstredeki toplam flavanol TFL (mg kateşin /g ekstre) için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	31016,3	3446,3	6,48	0,004
Linear	3	19757,3	6585,8	12,39	0,001
T (°C)	1	5056,9	5056,9	9,51	0,012
Z (dk)	1	595,3	595,3	1,12	0,315
pH	1	14105,2	14105,2	26,53	0,000
Square	3	9596,7	3198,9	6,02	0,013
T (°C)*T (°C)	1	3183,9	3183,9	5,99	0,034
Z (dk)*Z (dk)	1	793,1	793,1	1,49	0,250
pH*pH	1	7014,4	7014,4	13,20	0,005
2-Way Interaction	3	1662,3	554,1	1,04	0,416
T (°C)*Z (dk)	1	532,8	532,8	1,00	0,340
T (°C)*pH	1	74,6	74,6	0,14	0,716
Z (dk)*pH	1	1054,9	1054,9	1,98	0,189
Error	10	5315,8	531,6		
Lack-of-Fit	5	5223,1	1044,6	56,34	0,000
Pure Error	5	92,7	18,5		
Total	19	36332,2			
Model Summary					
S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)		
23,0561	85,37%	72,20%	0,00%		



Şekil 4.4. BSE Parametrelerinin ekstredeki toplam flavanol içeriğine (mg GA/g ekstre) tekli ve ikili etkileri

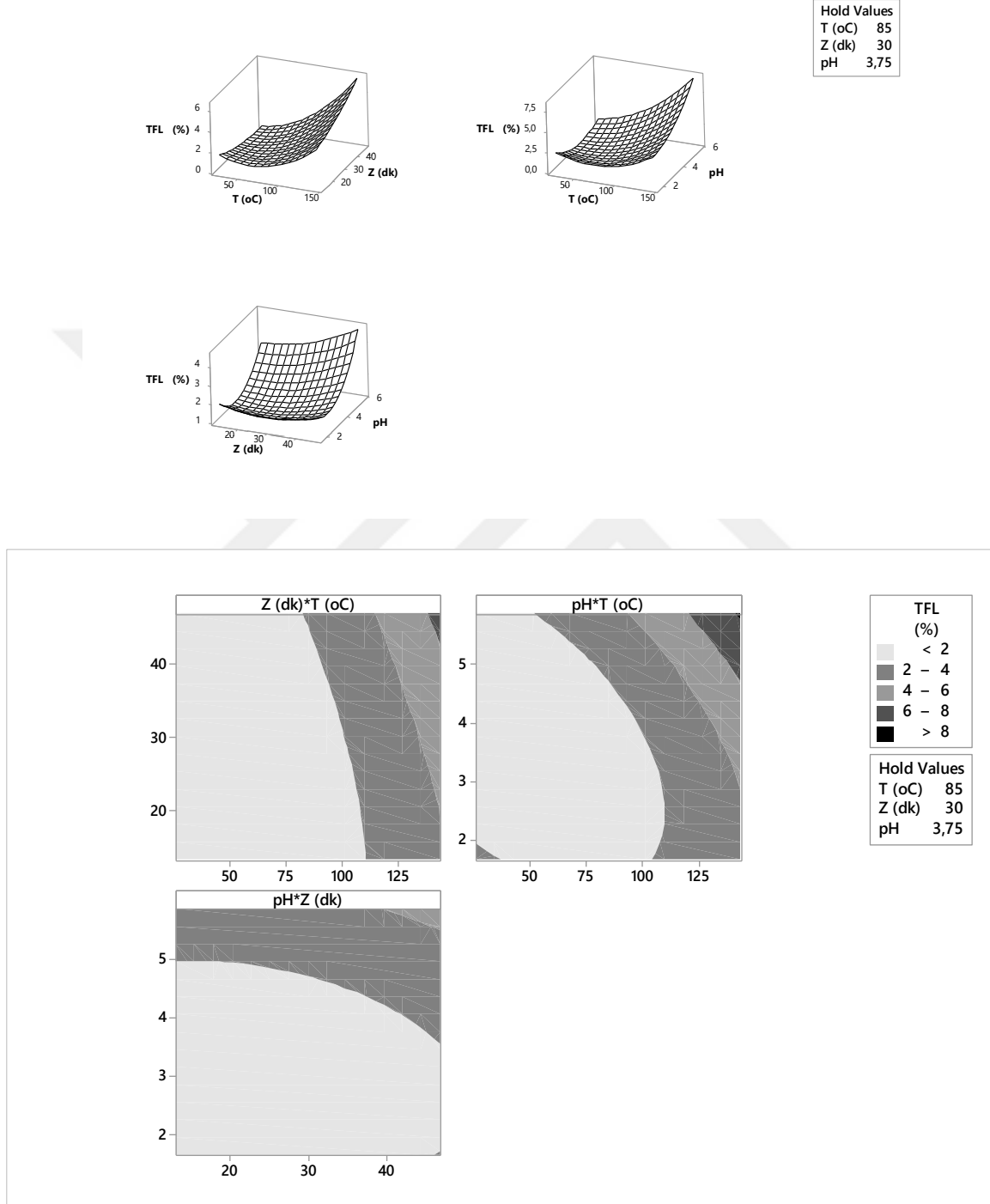
Kuru temel üzerinden elde edilen ekstre verimlerine paralel olarak Toplam Flavanol verimi (% , g kateşin/ 100 g cibre) üzerine çalışılan tüm parametrelerin birinci derece lineer ve ikinci derece polinom etkileri olduğu ($p<0,05$) görülmüştür (Tablo 4.10). Ekstraksiyon zamanı hariç sıcaklık ve pH ın ikili etkileri de bulunmaktadır. Yapılan regresyon çalışmasında elde edilen R^2 değeri (0,9635), elde edilen verilerin doğruluğunu ve incelenen parametrelerin yeterliliğini ortaya koymuştur. Toplam flavanol verimi (% , g kateşin /100 g ekstre) için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi aşağıdaki gibidir:

$$\begin{aligned} \text{TFL}(\%, \text{ g kateşin/100 g cibre}) = & 11,21 - 0,1049 T (^{\circ}\text{C}) - 0,1797 Z (\text{dk}) - 2,852 \text{ pH} \\ & + 0,000397 T (^{\circ}\text{C}) * T (^{\circ}\text{C}) + 0,001294 Z (\text{dk}) * Z (\text{dk}) + 0,2720 \text{ pH} * \text{pH} \\ & + 0,001022 T (^{\circ}\text{C}) * Z (\text{dk}) + 0,01093 T (^{\circ}\text{C}) * \text{pH} + 0,01053 Z (\text{dk}) * \text{pH} \end{aligned}$$

Tablo 4.10. Toplam flavanol verimi (% , g kateşin /100 g ekstre) için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	32,8910	3,6546	29,37	0,000
Linear	3	24,3903	8,1301	65,34	0,000
T ($^{\circ}\text{C}$)	1	19,5923	19,5923	157,46	0,000
Z (dk)	1	0,8023	0,8023	6,45	0,029
pH	1	3,9958	3,9958	32,11	0,000
Square	3	5,5088	1,8363	14,76	0,001
T ($^{\circ}\text{C}$) * T ($^{\circ}\text{C}$)	1	3,4112	3,4112	27,41	0,000
Z (dk) * Z (dk)	1	0,2413	0,2413	1,94	0,194
pH * pH	1	2,6029	2,6029	20,92	0,001
2-Way Interaction	3	2,9919	0,9973	8,01	0,005
T ($^{\circ}\text{C}$) * Z (dk)	1	1,0229	1,0229	8,22	0,017
T ($^{\circ}\text{C}$) * pH	1	1,8304	1,8304	14,71	0,003
Z (dk) * pH	1	0,1385	0,1385	1,11	0,316
Error	10	1,2443	0,1244		
Lack-of-Fit	5	1,2262	0,2452	67,92	0,000
Pure Error	5	0,0181	0,0036		
Total	19	34,1353			
Model Summary					
S	R-sq	R-sq (adj)	R-sq (pred)		
0,352745	96,35%	93,07%	70,47%		

Elde edilen model ile sağlanan cevap yüzey grafiklerinde sıcaklık ve pH arttıkça toplam flavanol veriminin arttığı görülmektedir (Şekil 4.5). Ekstraksiyon süresi ise kısmi bir verim artışı gerçekleştirmiştir.



Şekil 4.5. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin toplam flavanol verimi (%) üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri

4.3.4. Toplam Polimerik Proantosiyanidin (TPP) Miktarına Etkisi

Üzüm cibresinin Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonunda farklı ekstraksiyon koşullarında elde edilen ekstredeki Prosiyanidin B2 cinsinden Toplam Polimerik Prosiyanidin miktarı (TPP, mg PB2/g ekstre) ve 100 g kuru cibredeki TPP miktarları (TPP, %) Tablo 4.11’de verilmiştir. Ekstrelerdeki TPP miktarları 43,82-135,83 mg TPP/g ekstre olarak bulunmuştur. 50°C’de asidik ortamda gerçekleştirilen BSE ekstrelerinde bulunan TPP miktarları klasik (190,70 mg PB2/g ekstre) ve nötr ortamdaki (150,81 mg PB2/g ekstre) BSE ekstrelerinde bulunandan en az 2-3 katı daha düşük (37-118 mg PB2/g ekstre) bulunmuştur. 50°C’de gerçekleştirilen klasik (1,16 g PB2/100 g cibre) ve nötr (1,22 g PB2/100 g cibre) BSE TPP verimleri de göre asidik ortamda daha düşük TPP verimleri (0,38-0,97 g PB2/100 g cibre) elde edilmiştir.

Toplam polimerik prosiyanidin (mg Prociyanidin B2/g ekstre) için ikinci dereceden model denkleminin varyans analizi sonucunda (Tablo 4.12) p değerinin 0,05’den küçük olduğu durumda parametrelerin anlamlı derecede etkisi olduğu belirlenmiştir. Toplam polimerik prosiyanidin verimi (mg Prociyanidin B2/g ekstre) için regresyon denklemi aşağıda verilmiştir.

$$\begin{aligned} \text{TPP (mg PB2 / g ekstre)} = & -13,9 + 1,560 T (^{\circ}\text{C}) - 0,99 Z (\text{dk}) - 7,4 \text{ pH} - 0,00054 T \\ & (^{\circ}\text{C})*T (^{\circ}\text{C}) + 0,0121 Z (\text{dk})*Z (\text{dk}) + 1,05 \text{ pH}*\text{pH} - 0,0213 T (^{\circ}\text{C})*Z (\text{dk}) - 0,099 T (^{\circ}\text{C})*\text{pH} \\ & + 0,749 Z (\text{dk})*\text{pH} \end{aligned}$$

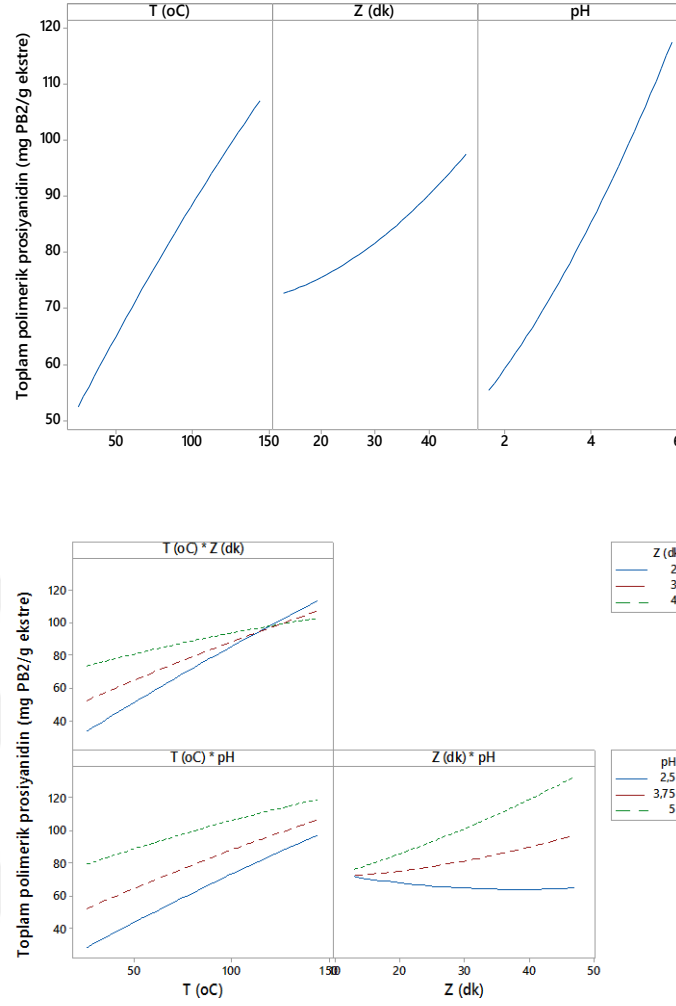
Ekstraksiyon parametrelerinin ekstredeki toplam polimerik prosiyanidin içeriğine (mg PB2/g ekstre) tekli ve ikili etkilerini incelediğimizde (Şekil 4.6) sıcaklık ve pH arttıkça TPP miktarlarının arttığını görmekteyiz. Ekstraksiyon zamanı ise yüksek pH larda etkisini göstermiştir.

Tablo 4.7. BSE ekstraksiyon koşullarının toplam prosiyanidin (TPP) miktarı üzerine etkisi

	T (°C)	Zaman (dk)	pH	Toplam polimerik prosiyanidin (mg Prociyanidin B2/g ekstre)	Toplam polimerik prosiyanidin verimi (g Prociyanidin B2 /100 g cibre)
1	50	40	2,5	43,82	0,62
2	85	30	3,75	81,86	1,12
3	85	47	3,75	98,64	1,78
4	85	30	3,75	84,97	1,15
5	120	20	2,50	102,31	1,49
6	85	30	1,65	63,76	1,04
7	85	30	3,75	79,70	1,11
8	85	30	3,75	78,71	1,07
9	120	20	5	121,86	2,68
10	144	30	3,75	91,84	2,68
11	50	20	2,50	37,50	0,38
12	26	30	3,75	52,67	0,39
13	50	20	5	80,09	0,69
14	85	30	3,75	86,51	1,18
15	85	30	3,75	80,42	1,14
16	50	40	5	118,09	0,97
17	85	13	3,75	56,45	0,61
18	85	30	5,85	93,83	1,54
19	120	40	2,50	73,03	2,00
20	120	40	5	135,83	3,56

Tablo 4.8. Ekstredeki toplam polimerik prosiyanidin (TPP) (mg PB2/g ekstre) için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	10187,5	1131,95	5,90	0,005
Linear	3	8825,3	2941,75	15,33	0,000
T (°C)	1	3525,0	3524,96	18,36	0,002
Z (dk)	1	731,5	731,50	3,81	0,079
pH	1	4568,8	4568,79	23,80	0,001
Square	3	67,4	22,46	0,12	0,948
T (°C)*T (°C)	1	6,4	6,38	0,03	0,859
Z (dk)*Z (dk)	1	20,9	20,94	0,11	0,748
pH*pH	1	39,1	39,08	0,20	0,661
2-Way Interaction	3	1294,9	431,63	2,25	0,145
T (°C)*Z (dk)	1	444,5	444,47	2,32	0,159
T (°C)*pH	1	148,8	148,77	0,78	0,399
Z (dk)*pH	1	701,7	701,65	3,66	0,085
Error	10	1919,5	191,95		
Lack-of-Fit	5	1871,6	374,33	39,12	0,001
Pure Error	5	47,8	9,57		
Total	19	12107,0			
Model Summary					
S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)		
13,8545	84,15%	69,88%	0,00%		



Şekil 4.6. BSE parametrelerinin ekstredeki toplam polimerik prosiyanidin içeriğine (mg PB2/g ekstre) tekli ve ikili etkileri

Toplam polimerik prosiyanidin verimi (TPP) (g PB2/100g cibre) genelde ham ekstre verimlerine paralel olarak değişmiş ve parametrelerin lineer etkileri gözlenmiştir (Tablo 4.13).

Toplam polimerik prosiyanidin verimi (TPP) (g PB2/100g ekstre) için regresyon denklemi;

$$\begin{aligned} \text{TPP}(\%) = & 3,12 - 0,0343 T (\text{°C}) - 0,0534 Z (\text{dk}) - 0,855 \text{ pH} + 0,000150 T (\text{°C}) * T (\text{°C}) + \\ & 0,000656 Z (\text{dk}) * Z (\text{dk}) + 0,0628 \text{ pH} * \text{pH} + 0,000312 T (\text{°C}) * Z (\text{dk}) + 0,00595 T (\text{°C}) * \text{pH} + \\ & 0,00424 Z (\text{dk}) * \text{pH} \end{aligned}$$

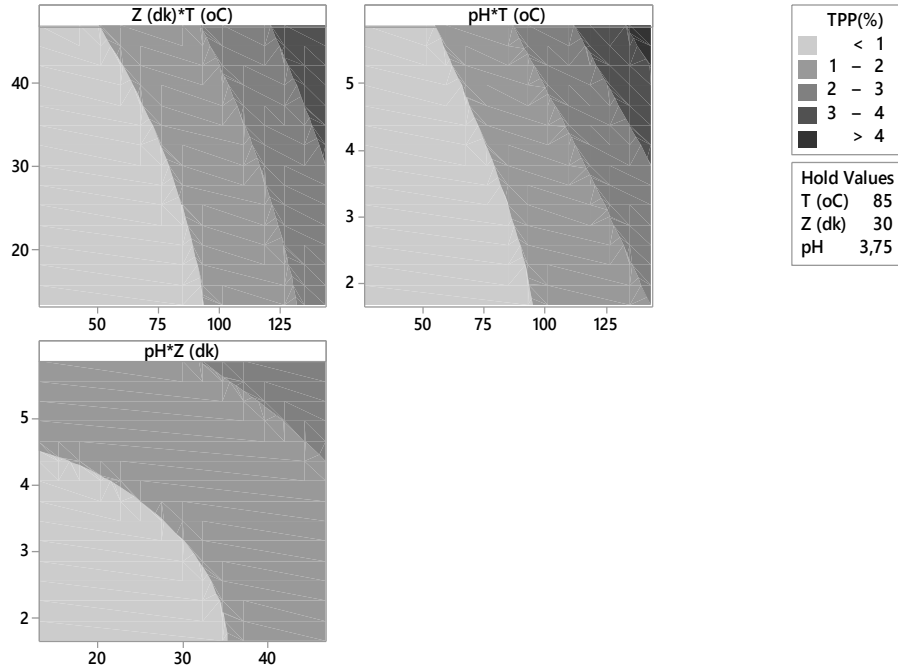
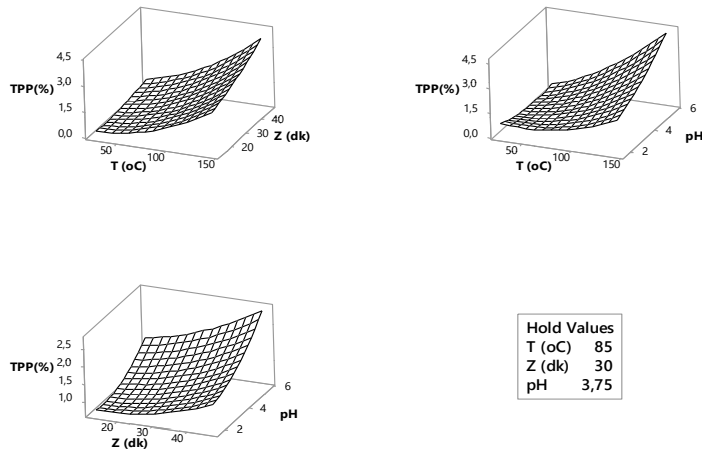
olarak elde edilmiştir.

Model eşitliğinin deneysel verileri %95,52 oranında açıkladığı görülmüştür. Ancak modelden sapma (lack of fit) değerlerinin de önemli olduğu görülmektedir ($p > 0,05$).

TPP (%) verimlerinin sıcaklık, ekstraksiyon zamanı ve pH'nın artmasıyla arttığı üç boyutlu grafiklerden de görülmektedir (Şekil 4.7). Artış hızının parametrelerin yüksek değerlerinde daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4.9. Toplam polimerik prosiyanidin verimi (TPP) (G PB2/100g ekstre) için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	12,4194	1,37993	23,70	0,000
Linear	3	11,1557	3,71858	63,87	0,000
T (°C)	1	8,7321	8,73209	149,98	0,000
Z (dk)	1	1,1033	1,10331	18,95	0,001
pH	1	1,3204	1,32035	22,68	0,001
Square	3	0,6042	0,20139	3,46	0,059
T (°C)*T (°C)	1	0,4876	0,48759	8,37	0,016
Z (dk)*Z (dk)	1	0,0620	0,06202	1,07	0,326
pH*pH	1	0,1389	0,13891	2,39	0,153
2-Way Interaction	3	0,6595	0,21982	3,78	0,048
T (°C)*Z (dk)	1	0,0955	0,09549	1,64	0,229
T (°C)*pH	1	0,5415	0,54152	9,30	0,012
Z (dk)*pH	1	0,0224	0,02245	0,39	0,549
Error	10	0,5822	0,05822		
Lack-of-Fit	5	0,5750	0,11500	79,68	0,000
Pure Error	5	0,0072	0,00144		
Total	19	13,0016			
Model Summary					
S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)		
0,241293	95,52%	91,49%	66,19%		



Şekil 4.7. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin toplam polimerik prosiyanidin verimi (%) üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri

4.3.5. Toplam Antosiyanin (TA) Miktarına Etkisi

Farklı BSE koşullarında siyanidin 3-glukozit eşdeğeri olarak hesaplanan Toplam Antosiyanin (TA) miktarı (mg siyanidin 3-glu /100 g ekstre) ve Toplam Antosiyanin verimi (g syn-3-glu /100 g cibre) Tablo 4.14’de verilmiştir. 100 g ekstredeki antosiyanin miktarları 0,29-43,57 mg/100 g olarak geniş bir aralıkta değişmiştir. Klasik (38,85 mg/g ekstre) ve nötr

BS (42,40 mg/g ekstre) ekstrelerindeki TA miktarlarına göre 50°C asidik BS ekstrelerinde daha düşük miktarlarda TA elde edilmiştir.

Tablo 4.10. BSE koşullarının toplam antosiyanin (TA) miktarı üzerine etkisi

	T (°C)	Zaman (dk)	pH	Toplam antosiyanin (mg siyanidin 3-glu /100 g ekstre)	Toplam antosiyanin verimi (mg siyanidin 3-glu /100 g cibre)
1	50	40	2,5	10,82	1,45
2	85	30	3,75	26,79	3,49
3	85	47	3,75	35,47	6,09
4	85	30	3,75	23,14	2,96
5	120	20	2,50	1,19	0,17
6	85	30	1,65	4,41	0,69
7	85	30	3,75	22,09	2,92
8	85	30	3,75	20,26	2,62
9	120	20	5	14,86	3,10
10	144	30	3,75	8,59	2,38
11	50	20	2,50	25,84	2,47
12	26	30	3,75	56,05	3,92
13	50	20	5	4,73	0,39
14	85	30	3,75	26,79	3,48
15	85	30	3,75	27,60	3,72
16	50	40	5	15,09	1,18
17	85	13	3,75	7,43	0,76
18	85	30	5,85	0,24	0,04
19	120	40	2,50	19,88	5,17
20	120	40	5	16,37	4,08

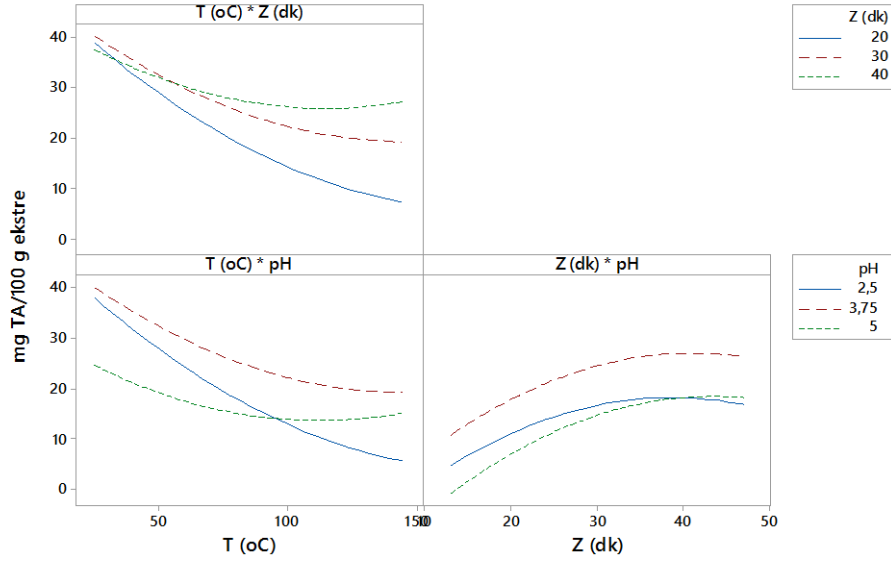
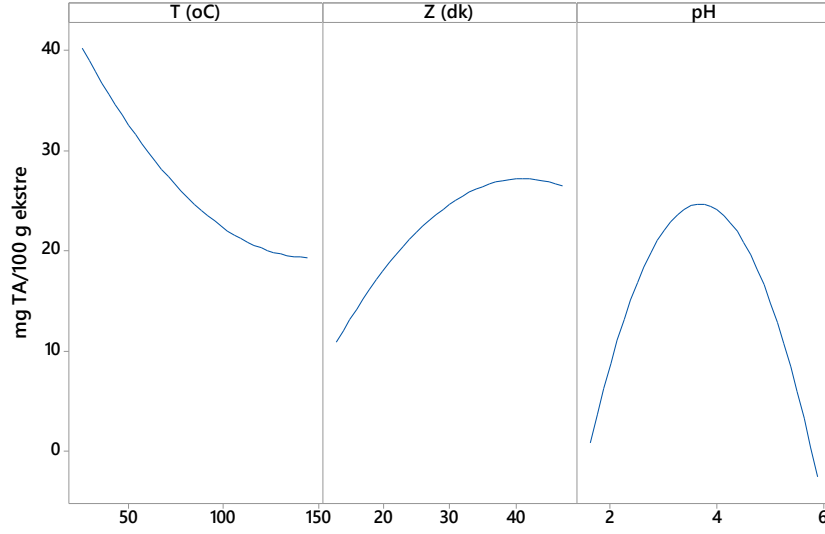
Toplam antisiyanin (TA) (mg cyanidin/100 g ekstre) için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi yapıldığında ekstredeki toplam antosiyanin miktarları üzerine en etkili parametrenin pH ($p<0,05$) olduğu görülmüştür (Şekil 4.8). Düşük pH ($pH < 2$) ve yüksek pH ($pH > 5$) değerlerinde ekstredeki TA değerleri en düşük iken maksimum TA değeri pH 3,75 de elde edilmiştir. Sıcaklık arttıkça ekstredeki TA değeri azalmış, ekstraksiyon zamanı ile artmıştır.

Cevap Yüzey Tasarımı sonucunda elde edilen ikinci derece model denklemi aşağıda verilmiştir. Ancak model eşitliği ekstredeki TA miktarını ancak %67,32 oranında açıklayabilmektedir.

$$\begin{aligned} \text{mg TA/100 g ekstre} = & -2,2 - 0,979 T (^{\circ}\text{C}) + 0,63 Z (\text{dk}) + 32,5 \text{ pH} \\ & + 0,00145 T (^{\circ}\text{C}) * T (^{\circ}\text{C}) - 0,0206 Z (\text{dk}) * Z (\text{dk}) - 5,65 \text{ pH} * \text{pH} \\ & + 0,0089 T (^{\circ}\text{C}) * Z (\text{dk}) + 0,0771 T (^{\circ}\text{C}) * \text{pH} + 0,082 Z (\text{dk}) * \text{pH} \end{aligned}$$

Tablo 4.11. Ekstredeki toplam antosiyanin (TA) (mg Cyanidin/100 g ekstre) için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	2249,38	249,93	2,29	0,107
Linear	3	818,34	272,78	2,50	0,119
T (oC)	1	516,70	516,70	4,73	0,055
Z (dk)	1	287,86	287,86	2,64	0,135
pH	1	13,78	13,78	0,13	0,730
Square	3	1254,31	418,10	3,83	0,046
T (oC) * T (oC)	1	45,73	45,73	0,42	0,532
Z (dk) * Z (dk)	1	61,25	61,25	0,56	0,471
pH * pH	1	1121,71	1121,71	10,27	0,009
2-Way Interaction	3	176,73	58,91	0,54	0,666
T (oC) * Z (dk)	1	77,29	77,29	0,71	0,420
T (oC) * pH	1	91,07	91,07	0,83	0,383
Z (dk) * pH	1	8,38	8,38	0,08	0,787
Error	10	1091,77	109,18		
Lack-of-Fit	5	1046,03	209,21	22,87	0,002
Model Summary					
S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)		
10,4488	67,32%	37,91%	0,00%		



Şekil 4.8. BSE parametrelerinin ekstredeki toplam antosiyanin içeriğine tekli ve ikili etkileri

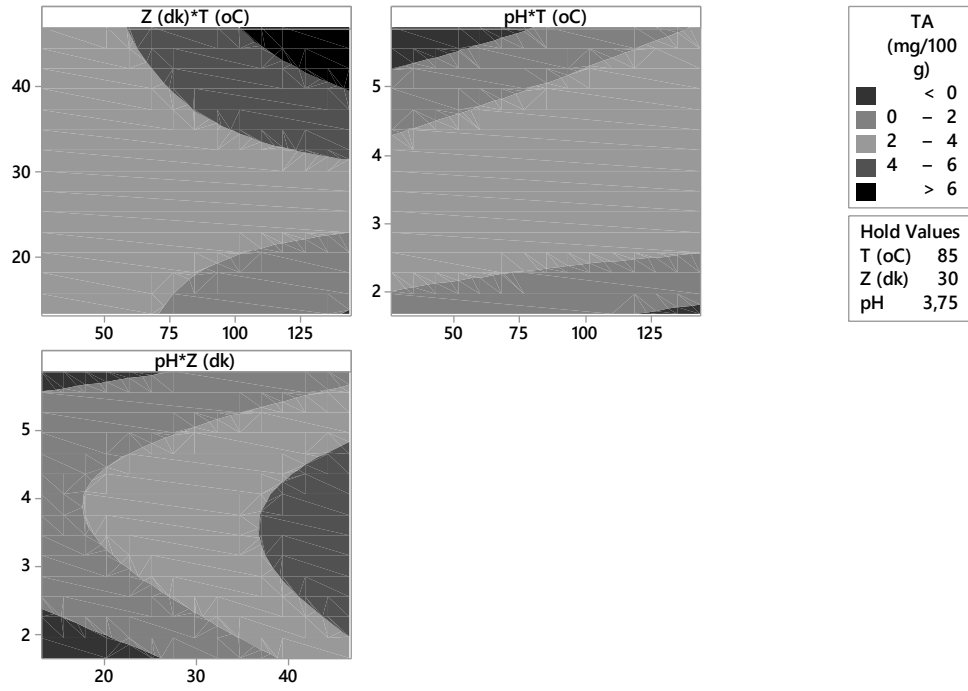
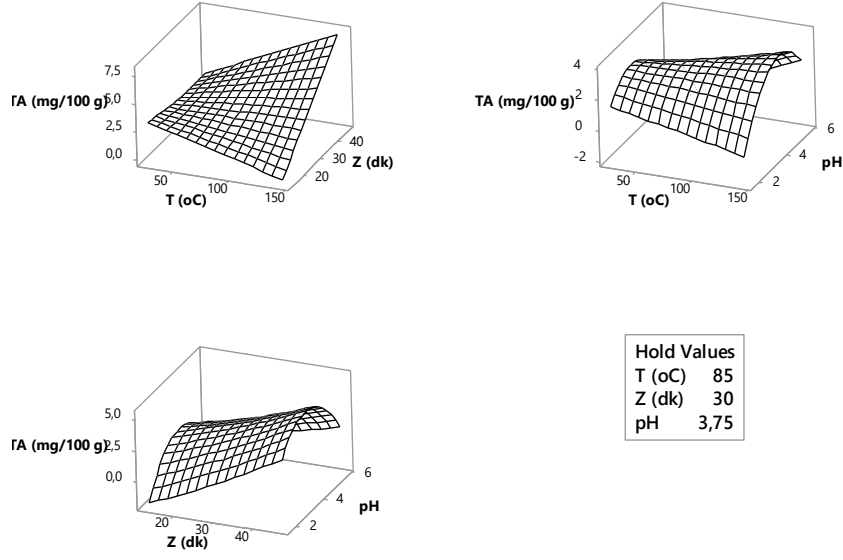
TA verimi (mg TA/100 g cibre) üzerine ekstraksiyon zamanı lineer, pH da ikinci derece polinom ile anlamlı düzeyde ($p < 0,05$) etki etmiştir. Toplam antisiyanin verimi için regresyon denklemi;

$$\begin{aligned} \text{TA (\%)} = & 0,0148 - 0,001322 \text{ T (}^{\circ}\text{C)} + 0,00029 \text{ Z (dk)} + 0,0360 \text{ pH} + 0,000002 \text{ T} \\ & (\text{}^{\circ}\text{C}) * \text{T (}^{\circ}\text{C)} - 0,000017 \text{ Z (dk)} * \text{Z (dk)} - 0,00641 \text{ pH} * \text{pH} + 0,000011 \text{ T (}^{\circ}\text{C)} * \text{Z (dk)} + 0,000096 \\ & \text{T (}^{\circ}\text{C)} * \text{pH} + 0,000098 \text{ Z (dk)} * \text{pH} \end{aligned}$$

olarak bulunmuştur. Model denklemi deneysel verileri %74,67 oranında açıklayabilmiştir (Tablo 4.16). Üç boyutlu grafiklerden de görülebileceği üzere sıcaklıkla TA verimi düşmüş, zamanla artmıştır. Ekstredeki TA miktarı (mg TA/g ekstre) gibi TA (mg TA/100 g cibre) verimi de düşük ve yüksek pH değerlerinde minimum değer göstermiştir.

Tablo 4.16. Toplam antosiyanin verimi için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	40,1747	4,4639	3,28	0,039
Linear	3	17,4532	5,8177	4,27	0,035
T (oC)	1	1,4332	1,4332	1,05	0,329
Z (dk)	1	15,8335	15,8335	11,62	0,007
pH	1	0,1865	0,1865	0,14	0,719
Square	3	15,0830	5,0277	3,69	0,051
T (oC) * T (oC)	1	0,0051	0,0051	0,00	0,952
Z (dk) * Z (dk)	1	0,0892	0,0892	0,07	0,803
pH * pH	1	14,5577	14,5577	10,68	0,008
2-Way Interaction	3	7,6384	2,5461	1,87	0,199
T (oC) * Z (dk)	1	4,8280	4,8280	3,54	0,089
T (oC) * pH	1	2,2008	2,2008	1,62	0,233
Z (dk) * pH	1	0,6096	0,6096	0,45	0,519
Error	10	13,6260	1,3626		
Lack-of-Fit	5	12,7190	2,5438	14,02	0,006
Pure Error	5	0,9069	0,1814		
Total	19	53,8006			
Model Summary					
S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)		
1,16730	74,67%	51,88%	0,00%		



Şekil 4.9. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin toplam antosiyanin verimi (%) üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri

4.3.6. DPPH Serbest Radikal Süpürücü Aktivite (EC₅₀, µg/ml)

Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonundan elde edilen ekstrelerin DPPH radikal süpürücü aktiviteleri DPPH'nin %50 sini inhibe edici ekstre konsantrasyonu yani EC₅₀ (µg/ml) olarak Tablo 4.17'de verilmiştir. EC₅₀ değerinin düşük olması DPPH aktivitesinin fazla olmasını göstermektedir. Yani daha az ekstre konsantrasyonu ile aktivite sağlanmaktadır. Ekstrelerin EC₅₀ değerleri 19,81-56,66 µg/ml arasında değişmektedir. Klasik çözücü ve nötr ortamda yapılan BS ekstraksiyonundan elde edilen DPPH aktivitesi sırası ile 29,74 µg/ml ve 26,17 µg/ml olarak bulunmuştur. Sonuçların varyans analizlerine bakıldığında DPPH aktivitesi üzerine en fazla etkiyi pH göstermiştir. pH'ı sıcaklık ve zaman izlemektedir. En düşük EC₅₀ konsantrasyonları yüksek pH larda elde edilmiştir (Şekil 4.11)

Tablo 4.12. BSE koşullarının DPPH serbest radikal süpürücü aktiviteleri üzerine etkisi

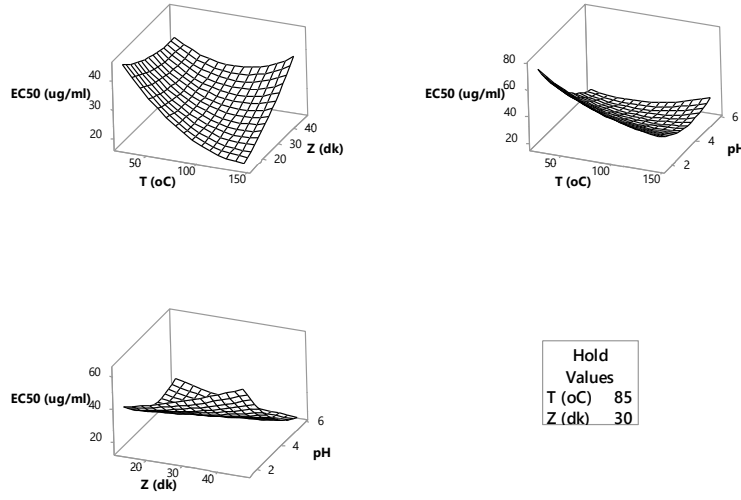
	T (°C)	Zaman (dk)	pH	EC ₅₀ (µg/ml)
1	50	40	2,5	56,66
2	85	30	3,75	26,86
3	85	47	3,75	23,81
4	85	30	3,75	23,58
5	120	20	2,50	27,20
6	85	30	1,65	39,31
7	85	30	3,75	26,26
8	85	30	3,75	25,56
9	120	20	5	19,81
10	144	30	3,75	23,53
11	50	20	2,50	53,00
12	26	30	3,75	33,76
13	50	20	5	22,73
14	85	30	3,75	25,33
15	85	30	3,75	24,77
16	50	40	5	21,32
17	85	13	3,75	24,77
18	85	30	5,85	22,75
19	120	40	2,50	47,59
20	120	40	5	20,83

Tablo 4.13. DPPH serbest radikal süpürücü aktivite için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	1899,43	211,05	5,82	0,005
Linear	3	1452,91	484,30	13,36	0,001
T (°C)	1	225,23	225,23	6,21	0,032
Z (dk)	1	35,55	35,55	0,98	0,345
pH	1	1192,13	1192,13	32,89	0,000
Square	3	202,38	67,46	1,86	0,200
T (°C)*T (°C)	1	76,89	76,89	2,12	0,176
Z (dk)*Z (dk)	1	8,55	8,55	0,24	0,638
pH*pH	1	143,23	143,23	3,95	0,075
2-Way Interaction	3	244,14	81,38	2,25	0,146
T (°C)*Z (dk)	1	45,85	45,85	1,27	0,287
T (°C)*pH	1	123,72	123,72	3,41	0,094
Z (dk)*pH	1	74,58	74,58	2,06	0,182
Error	10	362,42	36,24		
Lack-of-Fit	5	355,82	71,16	53,90	0,000
Pure Error	5	6,60	1,32		
Total	19	2261,85			
Model Summary					
S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)		
6,02014	83,98%	69,56%	0,00%		

Ekstredeki DPPH serbest radikal süpürücü aktiviteleri için regresyon denklemi;

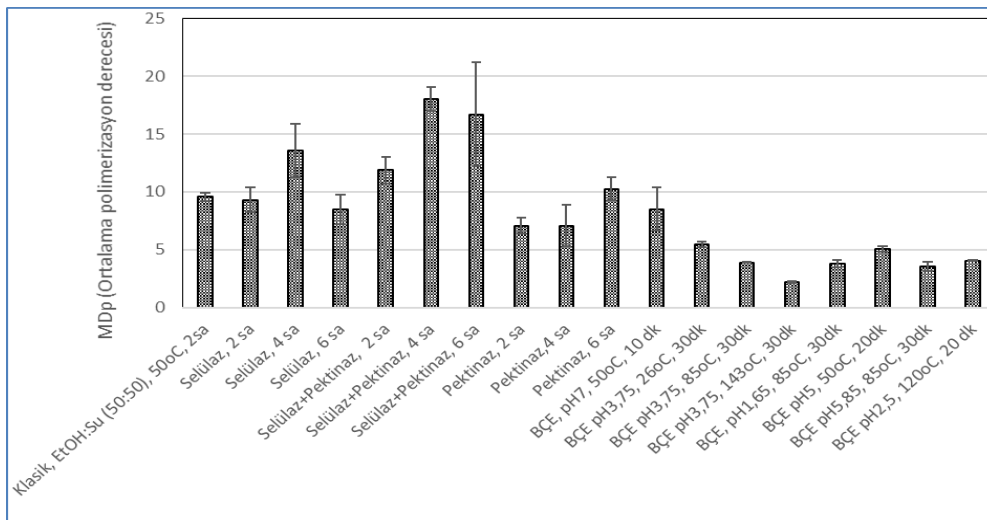
$$\begin{aligned}
 EC_{50}(\text{ug/ml}) = & 125,8 - 0,979 T (\text{°C}) + 0,03 Z (\text{dk}) - 22,9 \text{ pH} + 0,00189 T (\text{°C}) * T (\text{°C}) \\
 & + 0,0077 Z (\text{dk}) * Z (\text{dk}) + 2,02 \text{ pH} * \text{pH} + 0,00684 T (\text{°C}) * Z (\text{dk}) + 0,0899 T (\text{°C}) * \text{pH} \\
 & - 0,244 Z (\text{dk}) * \text{pH}
 \end{aligned}$$



Şekil 4.10. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin DPPH serbest radikal süpürücü aktivite üzerine etkisini gösteren üç boyutlu grafikler

4.3.7. Prosiyanidinlerin Ortalama Polimerizasyon Derecesi (MDP)

Ekstrelerdeki Prosiyanidinlerin ortalama polimerizasyon dereceleri Şekil 4.10’da verilmiştir. Klasik ve nötr BSE ekstralarında prosiyanidinlerin ortalama polimerizasyon dereceleri 9-10 olarak bulunmuştur. Bu değerler selüloz ve pektinaz enzimli ektrelerde artmıştır. Asidik ortamda farklı sıcaklık ve pH değerlerinde gerçekleştirilen deneylerden elde edilen ekstralarda ise polimerizasyon derecesi 2-11 arasında değişmiştir.



Şekil 4.11. Ekstraksiyon yönteminin ortalama polimerizasyon derecesi (MDP) üzerine etkisi

5. TARTIŞMA VE YORUM

Polifenoller bitkilerde yaygın olarak bulunan sekonder metabolitlerdir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bitkilerde yaygın olarak bulunan polifenollerini içeren gıdaların tüketildiklerinde sağlık üzerinde olumlu etkilerinin olduğu gözlenmesiyle birlikte bu bileşikler üzerine bilimsel çalışmalarda hızlı bir artış görülmüş ve bu bileşiklerin sahip oldukları antioksidan özelliklerinden dolayı pek çok dejeneratif ve yaslanmaya bağlı hastalıkları koruyucu veya tedavi edici etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Bu hastalıklar içinde kanser ve kalp-damar hastalıkları basta gelmektedir Polifenoller kimyasal yapılarında bulunan hidroksil iyonunun sayısı ve pozisyonu ile polimerleşme derecesine göre basit fenolik bileşiklerden flavonoidlere ve kompleks prosiyanidinlere kadar çok geniş bir kimyasal grubu içermektedir.

Üzüm meyvesi, fenolik asitlerden, polimerik yapıda proantosiyaniinlere kadar çok farklı yapılarda fenolik bileşenlere sahip kompleks bir yapıya sahiptir). Üzüm çekirdeği flavan-3-ol (katesin)'lerin polimerleri olarak bilinen prosiyanidinlerce zengindir. Dünyada üretilen üzümün yaklaşık %60'ı şarap yapımında kullanılmakta ve bu üretimden yaklaşık yılda dokuz milyon ton üzüm posası (cibresi) açığa çıkmaktadır. Bu da şarap üretimi için kullanılan toplam üzümün yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır. Dolayısı ile üzüm cibresi dünyadaki en yüksek hacimli polifenol içeren bir hammaddedir.

Polifenoller üzüm cibresinden katı-sıvı ekstraksiyonu ile geri kazanılmaktadır. Gelişen teknoloji ile son yıllarda klasik çözücü ekstraksiyon tekniğine alternatif olarak kullanılan basınçlı sıvı ekstraksiyonu ile daha kısa sürede ve daha yüksek verimde ekstraksiyon gerçekleştirmek mümkündür. Polifenollerin Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu daha önce yapılmış olmasına rağmen üzüm cibresinin özellikle asidik ortamda ekstraksiyonuna ve çalışılan parametrelerin farklı fenolik bileşen grupları üzerine etkileri üzerine kapsamlı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada Tekirdağ bölgesinde bulunan kırmızı şarap atığı olan üzüm cibresi kullanılarak, BS ekstraksiyonunda Cevap Yüzey Yöntemi Deney tasarımı kullanılarak sıcaklık, ekstraksiyon zamanı ve pH'ın ekstraksiyon verimi, içerdiği polifenoller ve ekstraktların antioksidan aktiviteleri üzerine etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar klasik, nötr pH'da BSE ve enzimatik ekstraksiyon sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

BSE ekstraksiyonunda ham ekstre verimleri kullanılan parametrelere bağlı olarak %7-27 arasında değişmiştir. En yüksek verim (%27,27) 144°C, 30 dk ve pH 3,75'de, en düşük

verim ise 26°C, 30 dk ve pH 3,75’de elde edilmiştir. Ekstraksiyon verimine en etkili parametrenin sıcaklık olduğu görülmüştür. Sıcaklık beklendiği gibi ekstraksiyon verimi üzerine en etkili parametredir. pH nın etkisi ise iki yönlü olmuştur. Yüksek sıcaklıklarda pH artarken ekstre verimi artmış, düşük sıcaklıklarda ise azalmıştır.

Bir gram ekstrede TFB miktarları 105,35 mg GAE/g (50°C, 40 dk ve pH 2,5)-453,58 mg GAE/g (120°C, 40 dk, pH 5) arasında değişmiştir. Ekstrenin içinde bulunan TFB miktarı (g GAE/g ekstre) ekstrenin fenolik bileşen bakımından ne kadar zengin olduğunu göstermektedir. Sıcaklık ve pH arttıkça ekstredeki TFB miktarının arttığı görülmektedir. Sıcaklığın artması ile fenolik bileşiklerin sudaki çözünürlüğü artmakta ve katı yapıya bağlı fenolik bileşiklerin serbest formu için gerekli aktivasyon enerjisi daha hızlı sağlanmaktadır. Sıcaklığın bir başka etkisi de difüzyon hızını artırarak çözücünün bileşenleri çözme kapasitesini artırmadır. Sıcaklık artışına bağlı olarak viskozite ve yüzey gerilimi değerleri düşer. Buna göre numunelerin çözücü ile daha iyi teması sağlanmakta ve ekstraksiyon verimi arttırılmaktadır (Kawamura vd., 1999:244.).

En yüksek TFL 246,57 mg kateşin/g ekstre ile 120°C, 40 dk ve pH 5’de elde edilmiştir. Ekstre verimlerine bağlı olarak TFL verimleri (%) 0,76 (26°C, 30 dk, pH 3,75)-5,90 (120°C, 40 dk, pH 5) arasında değişmiştir. Ekstrelerin TFL içeriğine etki fazla etki eden parametrenin pH olduğu görülmüştür. Sıcaklığın da TFL miktarı üzerine pozitif etkisi vardır. pH değeri attıkça ekstredeki mg TFL artmıştır (Şekil 4.4).

Ekstrelerdeki TPP miktarları 43,82-135,83 mg TPP/g ekstre olarak bulunmuştur. TFL de olduğu gibi sıcaklık ve pH arttıkça TPP miktarları artmıştır (Şekil 4.6).

100 g ekstredeki antosiyanin miktarları 0,29-43,57 mg/100 g olarak geniş bir aralıkta değişmiştir. Toplam antosiyanin miktarları üzerine en etkili parametrenin pH ($p<0,05$) olduğu görülmüştür (Şekil 4.8).

Ekstrelerin EC_{50} değerleri 19,81-56,66 µg/ml arasında değişmiştir. Sonuçların varyans analizlerine bakıldığında DPPH aktivitesi üzerine en fazla etkiyi pH göstermiştir. pH’ı sıcaklık ve zaman izlemektedir. En düşük EC_{50} konsantrasyonları yüksek pH’larda elde edilmiştir (Şekil 4.11)

BSE ile elde edilen ekstre verimlerinin klasik ekstraksiyon (50°C, 2 sa) ile elde edilen ekstre verimine (%6) nazaran yüksek olduğu gözlenmiştir.

Klasik ekstraksiyon verimi 50°C’de 2sa ekstraksiyon sonunda %6 olarak bulunmuştur. Bir gram ekstrenin fenolik bileşen içeriği, 157 mg TFB, 369 mg TFL, 192 mg TPP ve 33 mg

TA/100 g ekstre olarak bulunmuştur. Bu değerler aynı sıcaklıkta düşük pH larda yapılan BSE değerlerinden yüksek bulunmuştur. Fenolik bileşen miktarına paralel olarak klasik ekstraksiyon ile elde edilen ekstrenin DPPH aktivitesi aynı sıcaklıkta asidik ortamda yapılan BS ekstraktlarına göre de yüksek bulunmuştur. Klasik (38,85 mg/g ekstre) ve nötr BS (42,40 mg/g ekstre) ekstraktlarındaki TA miktarlarına göre 50°C asidik BS ekstraktlarında daha düşük miktarlarda TA elde edilmiştir. Basıncılı Sıvı Ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktlardaki TFL miktarları klasik ekstraksiyona göre yaklaşık %30 daha azdır. Bunun nedeninin BSE de uygulanan basıncın fenolik bileşen, dolayısıyla da TFL nin yanında farklı bileşiklerin de (monomerik oligomerik sakkaritler, lignin, selüloz vb) zorlanmış difüzyonla ekstre edilmesini sağladığından olduğu düşünülmektedir.

Enzim ilave edilmiş ekstre verimleri klasik ekstraksiyon verimine göre yaklaşık 2-3 kat artmıştır. Bunun nedeni, parçalanmış hücrelerdeki bağlı flavonoidlerle birlikte diğer bileşenlerin (polisakkaritler) de ekstre çözeltisine geçmesiyle açıklanabilir. Bir gram ekstrede bulunan toplam fenolik bileşen (TFB) miktarlarının, klasik ekstraksiyon ve %50 Etanol ile yapılan BSE ile kıyaslandığında enzimatik ekstraksiyonda arttığı görülmüştür. Bu artış pektinaz ilavesi ile %100'e ulaşmıştır. Toplam polimerik prosiyanidin miktarları ise enzim ilaveli ekstraksiyonda diğer ekstraksiyon tekniklerine göre bir azalma görülmüştür. En yüksek DPPH aktivitesine ise pektinaz ilaveli ekstraktların sahip olduğu (12-13 µg/ml) görülmüştür.

Cevap Yüzey Deney Tasarım modeli kullanılarak elde edilen deneysel verileri %90 nın üzerinde açıklayan ekstre verimi, TFB, TFL ve TPB için bulunan aşağıdaki Model eşitlikleri (Lack of fit değerlerinin anlamlı olmasına rağmen) ekstraksiyon prosesinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

$$\text{TFB (mg GAE/g ekstre)} = 76 + 3,47T(^{\circ}\text{C}) + 11,86Z(\text{dk}) + 100,7\text{pH} + 0,00631T(^{\circ}\text{C}) * T(^{\circ}\text{C}) + 0,1675Z(\text{dk}) * Z(\text{dk}) + 4,16\text{pH} * \text{pH} + 0,0337T(^{\circ}\text{C}) * Z(\text{dk}) - 0,992T(^{\circ}\text{C}) * \text{pH} + 0,10Z(\text{dk}) * \text{pH}$$

$$\begin{aligned} \text{TFB (\%)} &= 8,01 - 0,1295 T (^{\circ}\text{C}) - 0,262 Z (\text{dk}) - 0,72 \text{pH} + 0,000644 T (^{\circ}\text{C}) * T (^{\circ}\text{C}) \\ &+ 0,00388 Z (\text{dk}) * Z (\text{dk}) + 0,248 \text{pH} * \text{pH} + 0,002803 T (^{\circ}\text{C}) * Z (\text{dk}) + 0,00528 T (^{\circ}\text{C}) * \text{pH} \\ &+ 0,0295 Z (\text{dk}) * \text{pH} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{TFL (\%, g kateşin/100 g cibre)} &= 11,21 - 0,1049 T (^{\circ}\text{C}) - 0,1797 Z (\text{dk}) - 2,852 \text{pH} \\ &+ 0,000397 T (^{\circ}\text{C}) * T (^{\circ}\text{C}) + 0,001294 Z (\text{dk}) * Z (\text{dk}) + 0,2720 \text{pH} * \text{pH} \\ &+ 0,001022 T (^{\circ}\text{C}) * Z (\text{dk}) + 0,01093 T (^{\circ}\text{C}) * \text{pH} + 0,01053 Z (\text{dk}) * \text{pH} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{TPP (\%)} = & 3,12 - 0,0343 \text{ T (}^{\circ}\text{C)} - 0,0534 \text{ Z (dk)} - 0,855 \text{ pH} + 0,000150 \text{ T (}^{\circ}\text{C)} * \text{T} \\ & (\text{}^{\circ}\text{C)} + 0,000656 \text{ Z (dk)} * \text{Z (dk)} + 0,0628 \text{ pH} * \text{pH} + 0,000312 \text{ T (}^{\circ}\text{C)} * \text{Z (dk)} + 0,00595 \text{ T} \\ & (\text{}^{\circ}\text{C)} * \text{pH} + 0,00424 \text{ Z (dk)} * \text{pH} \end{aligned}$$

DPPH serbest radikal süpürücü etki dikkate alındığında en düşük ve yüksek EC₅₀ değerine sahip ekstraların kompozisyonları karşılaştırıldığında (Tablo 5.1) ekstre içindeki toplam fenolik bileşenlerle DPPH aktiviteleri arasında bir korelasyon görülmemiştir. Ancak özellikle düşük pH değerlerinde (pH 1,65 ve pH 2,5), sıcaklık ve ekstraksiyon zamanından bağımsız olarak EC₅₀ değerlerinin arttığı görülmektedir. Bu ekstraların göreceli olarak toplam polifenol miktarları da pH 3,5 ve pH 5 değerlerine nazaran daha düşük olduğu görülmektedir. Buradan düşük pH değerlerinin ekstraların hem polifenol hem de DPPH üzerindeki aktivitelerini negatif yönde etkilediği sonucu çıkarılabilir.

Şekil 5.1. En düşük ve en yüksek EC₅₀ değerlerine sahip ekstraların içeriklerinin karşılaştırılması

	TFB(mg GA/gekstre) ±STD	TFL(mg Kat/gekstre) ±STD	TPP(mg PB2/gekstre ±STD	TA(mg siyanidin 3-glu/100 g ekstre) ±STD	EC ₅₀ ±STD (µg/ml)
Klasik Ekstraksiyon					
EtOH:Su (50:50), 2 sa	157,11	369,36	190,71	32,61	29,74
Enzimatik Ekstraksiyon					
Selülaz, 4 sa	183,50	216,27	53,75	17,72	28,25
Selülaz+Pektinaz, 6 sa	190,5	196,56	61,02	27,38	17,25
Pektinaz, 4sa	319,17	314,86	120,34	41,20	12,50
Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu					
50°C, pH 7, 10 dk	89,36	270,11	150,81	35,59	26,17
50°C, pH 2,5, 40 dk	105,35	73,81	43,82	10,82	56,66
50°C, pH 2,5, 20 dk	112,20	105,95	37,50	25,84	53,00
85°C, pH 1,65, 30 dk	207,72	116,28	63,76	4,41	39,31
144°C, pH 3,75, 30 dk	345,16	157,71	91,84	8,59	23,53
120°C, pH 5, 20 dk	408,46	190,13	121,86	14,86	19,81
120°C, pH 5, 40 dk	453,58	236,57	135,83	16,37	20,83
120°C, pH 2,5, 40 dk	388,32	108,99	73,03	19,88	47,59

Bu çalışmada gerçekleştirilen şarap fabrikası atığı üzüm cibresinden polifenollerin Basınçlı sıvı ekstraksiyonunda, düşük pH değerlerinde ($\text{pH} < 3,75$) ekstrelerde bulunan toplam polifenol miktarlarındaki bağıl azalma ile birlikte serbest radikal süpürücü aktivitelerinin de azaldığı, uygulanan yüksek basınç (1700 psi) ve sıcaklık ($>100^{\circ}\text{C}$) ile klasik çözücü ekstraksiyonuna göre daha çok daha kısa zamanda ve yüksek verimde ekstrelerin elde edildiği, çalışılan parametreler içinde pH'nın 5 olduğu 120°C sıcaklıkta 20 dk ekstraksiyon işlemi ile yapılan ekstraksiyon işleminde yüksek DPPH aktiviteli ekstreler elde edilebileceği sonucuna varılmıştır. Ancak Basınçlı sıvı Ekstraksiyonunun endüstriyel ölçekte kullanılabilmesi için bu parametrelere ilave olarak ekstraksiyon prosesinin teknolojik ve ekonomik olarak da tasarlanması ve parametrelerin tekrar değerlendirilmesi gerekmektedir.



KAYNAKÇA

andBN 978-0-

Albach, R. F. & Redman, G. H. (1969). Composition and Inheritance of Flavonoids in Citrus Fruit. *Phytochemistry*, 8, 127-143.

Altınay, Ç. (2008). *Üzüm Çekirdeğinden Fenolik Bileşiklerin Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu ve Optimizasyonu*. (Yüksek Lisans Tezi). Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

Appeldoorn, Maaike M. (2009). *Dietary A- and B-type Procyanidins Characterization and Biofunctional Potential of an Abundant and Diverse Group of Phenolics*. (PhD Thesis). Wageningen University, The Netherlands.

Aryanitoyannis, I. S., Ladas, D. & Mavromatis, A. (2006). Wine Waste Treatment Methodology, *International Journal of Food Science & Technology*, 41, 1117-1151.

Azmir, J. vd. (2013). Techniques for Extraction of Bioactive Compounds From Plant Materials: A Review. *J. Food Eng.*, 117(4), 426-436.

Balasundram, N., Sundram, K. & Saman, S. (2006). Phenolic Compunds in Plants and Agri-İndustrial By-Products: Antioxidan Activity, Orrurance and Potential Uses, *Food Chemistry*, 99, 191-203.

Bilaloğlu, G.V. & Harmandar, M. (1996). Flavonoidler; Molekül Yapıları, Kimyasal Özellikleri, Belirleme Teknikleri, Biyolojik Aktiviteleri. Aktif Yayınevi, İstanbul, 353.

Brachet, A., Rudaz, S., Mateus, L., Christen, P. & Veuthey J-L. (2001). Optimisation of Accelerated Solvent Extraction of Cocaine and Benzoylcegonine from Coco Leaves, *J.Sep.Sci.*, 24, 865-873.

Burin, V. M., Ferreira-Lima, N. E., Panceri, C. P., & Bordignon-Luiz, M. T. (2014). Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Vitis Vinifera and Vitis Labrusca Grapes: Evaluation of Different Extraction Methods. *Microchemical Journal*.

Cemeroğlu, B., Yemencioğlu, A. & Özkan, M. (2001). Meyve ve Sebzelerin Bileşimi Soğukta Depolanmaları. *Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları*, 494, 328.

Centeno, M. R., Knoerzer, K., Sabarez, H., Simal, S., Rosselló, C. & Femenia, A. (2014). Effect of Acoustic Frequency and Power Density on the Aqueous Ultrasonic-Assisted Extraction of Grape Pomace (Vitis Vinifera L.) – A Response Surface Approach. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21, 2176-2184.

Clifford M.N. (2009). Anthocyanins-Nature, Occurrence and Dietary Burden. *J.Sci.Food Agric.*, 80, 1063-1072.

Deryaoğlu, A., & Canbaş, A. (2004). Elazığ Yöresi Boğazkere Üzümlerinde Olgunlaşma Sırasında Meydana Gelen Fiziksel ve Kimyasal Değişmeler. *Gıda*, 29(1), 105- 114.

Devesa-Rey, R., Vecino, X., Varela-Alende, J. L., Barral, M. T., Cruz, J. M. & Moldes, A. B. (2011). Valorization of Winery Waste vs. the Costs of Not Recycling, *Waste Management*, 31, 2327-2335.

Ferri, M. vd. (2016). Recovery of Polyphenols from Red Grape Pomace and Assessment of Their Antioxidant and Anti-Cholesterol Activities, *New Biotechnology*, 33, 338-344.

Fontana, A. R., Antoniolli, A. & Bottini, R. (2013). Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 8987-9003.

Frankel, E.N. 1999. Food Antioxidants and Phytochemicals: Present and Future Perspectives. *Fett/Lipid*, 101(12), 450-455

Freitas, V.A.P. & Glories, Y. (1999). Concentration and Compositional Changes of Procyanidins in Grape Seeds and Skin of White Vitis Vinifera Varieties. *J. Sci. Food agric.*, 79, 1601-1606.

Gagne S., Saucier C. & Geny, L. (2006). Composition and Cellular Localization of Tannins in Cabernet Sauvignon Skins During Growth, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(25),9465-9471.

Gu, L. vd. (2002). Fractionation of Polymeric Procyanidins from Lowbush Blueberry and Quantification of Procyanidins in Selected Foods with an Optimized Normal-Phase HPLC-MS Fluorescent Detection Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4852-4860.

Hammerstone, J.F., Lazarus, S.A., Mitchell, A.E., Rucker, R. & Schmitz, H.H. (1999). Identification of Procyanidins in Cocoa (Theobroma cacao) and Chocolate Using High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47, 490-496.

Handley, A.J. (1999). Extraction Methods in Organic Analysis. *Sheffield Academic Pres*, 146–163.

Hasbay, A. İ. (2006). *Pressurized Liquid Extraction of Phenolic Compunds from Fruit Pomaces*. (Doktora Tezi). Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Hatier, J.H.B. & Gould, K.S. (2009). Anthocyanin Function in Vegetative Organs, 1–19.

Herrero, M., Martin-Álvarez, P.J., Señoráns, F.J., Cifuentes, A. & Ibáñez, E. (2005). Optimization of Accelerated Solvent Extraction of Antioxidants from *Spirulina Platensis* Microdalg. *Food Chemistry*, 93, 417-423.

Hollman PCH. & Arts ICV. (2000). Flavonols, Flavones and Flavanols-Nature, Occurrence and Dietary Burden. *J Scien Food Agric* 80, 1081–1093.

Iora Sandra R. F. vd. (2014). Evaluation of the Bioactive Compounds and The Antioxidant Capacity of Grape Pomace, *International Journal of Food Science and Technology*, 50, 62–69.

Jaganath, I.B. & Crozier A. (2010). Dietary Flavonoids and Phenolic Compounds C.G. Fraga, *Plant Phenolics and Human Health*, 1-49.

Jara-Palacios, M. J. vd. (2015). Assessment of White Grape Pomace from Winemaking as Source of Bioactive Compounds and its Antiproliferative Activity. *Food Chemistry*, 183, 78-82.

Kammerer, D., Claus, A., Carle, R. & Schieber, A. (2004). Polyphenol Screening of Pomace from Red and White Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4360-4367.

Karacabey, E., ve Mazza, G. (2008). Optimization of Solid– Liquid extraction of resveratrol and other phenolic compounds from milled grape canes (*Vitis vinifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6318–6325.

Karaman, Ş., Tütem, E., Başkan, K. S. &Apak, R. (2009). Comparison of Total Antioxidant Capacity and Phenolic Composition of Some Apple Juices with Combined HPLC–CUPRAC Assay, *Food Chem* 120, 1201–1209.

Kaufmann, B. & Christen, P. (2002). Recent Extraction Techniques for Natural Products: Microwave-Assisted Extraction and Pressurized Solvent Extraction. *Phytochemical Analysis*, 13, 105–113.

- Kawamura, F., Kikuchi, Y., Ohira, T. & Yatagai, M.** (1999). Accelerated Solvent extraction of Paclitaxel and Related Compounds from the Bark of *Taxus Cuspidata*. *Journal of Natural Products*, 62(2), 244-247.
- Kaymak, B. Ü. & Aksöz, N.** (2005). *Aspergillus Niger*'den Pektinaz Eldesi, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 6, 8.
- Maier, G., Mayer, P., Dietrich, H. and Wucherpfennig, K.** (1990). Polyphenoloxidasen und ihre Anwendung bei der Stabisierung von Fruchtsaften, *Flüssiges Obst*, 57(4), 230-239.
- Majors, R.E.** (2007). Modern Techniques for the Extraction of Solid Materials. *LG-GC Europe*, 76.
- Makris, D. P., Boskou, G. & Andrikopoulos, N. K.** (2007). Polyphenolic Content and in Vitro Antioxidant Characteristics of Wine Industry and Other Agri-Food Solid Waste Extracts, *J. Food Compos. Anal.*, 20, 125.
- Mateo, J. J. & Maicas, S.** (2015). Valorization of Winery and Oil Mill Wastes by Microbial Technologies, *Food Research International*, 73, 13-25.
- Monrad, J.K. Howard, L.R., King, J.W., Srinivas, K. & Mauromoustakos, A.** (2010). Subcritical Solvent Extraction of Anthocyanins from Dried Red Grape Pomace. *J. Agric. Food Chem.*, 58(5), 2862–2868.
- Montgomery D.C.** (2010). Design and Analysis of Experiments, *Wiley Publisher*, A.B.D.
- Moura, J. M. vd.** (2008). Enzyme-Assisted Aqueous Extraction of Oil and Protein from Soybeans and Cream De-emulsification, *J Am Oil Chem Soc.*, 85, 985–995.
- Mourtzinis, I & Goula, A.** (2019). Polyphenols in Agricultural Byproducts and Food Waste” in Polyphenols in Plants. Isolation, Purification and Extract Preparation. *Edited by Ronald Ross Watson, Second Ed., Academic Press*, London.
- Nadar, S. S., Rao, P. & Rathod, V. K.** (2018). Enzyme Assisted Extraction of Biomolecules as an Approach to Novel Extraction Technology: A Review. *Food Research International*, 108, 309–330.
- Nakilcioğlu Taş, E. & Ötleş S.** (2016). Basınçlı Su Ekstraksiyonuyla Elde Edilen Üzüm Çekirdeği Ekstraktının Polifenol ve Organik Asit İçeriğinin Belirlenmesi. *Bahçe*, 45(2), 67–75.

- Naziri, E., Nenadis, N., Mantzouridou, F. T. & Tsimidou, M. Z.** (2014). Valorization of the Major Agrifood Industrial By-Products and Waste from Central Macedonia (Greece) for the Recovery of Compounds for Food Applications. *Food Research International*, 65, C, 350-358.
- Negro, C., Tommasi, L. & Micel, A.** (2003). Phenolic Compounds and Antioxidant Activity from Red Grape Marc Extracts, *Bioresourcetechnology*, 87(1), 41-44.
- Nizamlioğlu, M.N. & Nas, S.** (2010). Meyve ve Sebzelerde Bulunan Fenolik Bileşikler; Yapıları ve Önemleri, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 1(5), 20-35.
- Özşahin, A. D.** (2006). *Kahramanmaraş İli Kâğıt Fabrikaları Çevresinden İzolasyonu Yapılan Bacillus SP. Suşlarından Elde Edilen Selüloz Enziminin Karakterizasyonu ve Biyoteknolojide Kullanılabilirliğinin Araştırılması*. (Yüksek Lisans Tezi). Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Panouillé, M. vd.,** (2007). Recovery and Reuse of Trimmings and Pulps from Fruit and Vegetable Processing. In Handbook of Waste Management and Co-Product Recovery in Food Processing. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, 417–447.
- Peker, İ .** (1994). Üzüm Cibresinden Tartarik Asit Eldesi ve Tanen Tayini, *Gıda*, 19(1).
- Peleg, H., Gacon, K., Schlich, P. & Noble, A.C.** (1999). Bitterness and Astringency of Flavan-3-ol Monomers, Dimers And Trimers, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 1123- 1128.
- Pereira, D. T. V. vd.** (2019). Pressurized Liquid Extraction of Bioactive Compounds from Grape Marc. *Journal of Food Engineering*, 240, 105–113.
- Porter, L. J., Hrstich, L. N. & Chan, B. G.** (1986). The Conversion of Procyanidins and Prodelphinidins to Cyanidin and Delphinidin. *Phytochemistry*, 25(1), 223–230.
- Richter, B.E., Jones, B.A., Ezzell, J.L. & Porter, N.L.** (1996). Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. *Anal. Chem*, 68, 1033–1039.
- Rondeau G. R.** (2014). Delayed and Time-Cumulative Toxicity of Imidacloprid in Bees, Ants and Termites. *Sci. Rep.*, 4, 1-8.
- Rouseff, R. L.** (1980) Attaway (Eds.), Citrus Nutrition and Quality. *ACS Symposium Series*. Washington DC, American Chemical Society, 83-108.
- Saldamlı.** (1998). Gıda Kimyası, *Hacettepe Üniversitesi Basımevi, Ankara*, 437-441.

- San Martin, D., Ramos, S. & Zufia, J.** (2016). Valorisation of Food Waste to Produce New Raw Materials for Animal Feed, *Food Chemistry*, 198, 68-74.
- Santos-Buelga, C. & Williamson, G.** (2003). Polyphenol Extraction from Foods, Methods in Polyphenol Analysis. *Royal Society of Chemistry*, 1–12.
- Sarıççek, B.Z. & Ü. Kılıç.** (2002). Üzüm Cıbresinin in-situ Rumen Parçalanabilirliğinin Belirlenmesi. *Atat. Üniv. Zir Fak. Dergisi*, 33(3), 289-292.
- Shahidi, F. & Naczki, M.** (1995). Phenolic Compounds in Fruits and Vegetables, *Food Phenolics*, Technomic Publishing Company, 97-98.
- Spigno, G., Tramelli, L. & De Faveri, D. M.** (2007). Effects of Extraction Time, Temperature and Solvent on Concentration and Antioxidant Activity of Grape Marc Phenolics, *Journal Of Food Engineering*, 81(1), 200-208.
- Spranger, I. vd.** (2008). Chemical Characterization and Polymeric Procyanidin Fractions from Grape Seeds, *Journal of Food Chemistry*, 108, 519-532.
- Taşkaya, B.** (2003). Kuru üzüm. *Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü-Bakış*, 3, 7.
- Tavman, Ş., Kumcuoğlu, S., Akkaya, Z.,** (2009). Bitkisel Ürünlerin Atıklarından Antioksidan Maddelerin Ultrason Destekli Ekstraksiyonu. *Gıda Dergisi*, 34(3).
- Tournour, H. H. vd.** (2015). Valorization of Grape Pomace: Extraction of Bioactive Phenolics with Antioxidant Properties, *Industrial Crops and Products*, 74, 397-406.
- Vermerris W. & Nicholson, R.** (2008). Phenolic Compound Biochemistry, Springer Science+Business Media B.V. 193-204.
- Wang, L. & Weller, C.L.** (2006). Recent Advances in Extraction of Nutraceuticals from Plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 300–312.
- Xie, Ling, Z.Q., B.J. & Yang, E.L.** (2005). Isolation, Characterization and Determination of Antioxidative Activity of Oligomeric Procyanidins from the Seedpod of Nelumbo Nucifera Gaertn, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2441-2445.
- Xu, C., Zhang, Y., Cao, L. & Lu, J.** (2010). Çin'de Yetiştirilen Farklı Üzüm Çeşitlerinin Fenolik Bileşikleri ve Antioksidan Özellikleri. *Gıda Kimyası*, 119(4), 1557-1565.
- Yan C. vd.** (2020). Effective Utilization of Food Wastes: Bioactivity of Grape Seed Extraction and its Application in Foodindustry. *Journal of Functional Foods*, 73, 104-113.

Yan-Xia, L. vd. (2010). Changes of Flavan-3-ols with Different Degrees of Polymerization in Seeds of ‘Shiraz’, ‘Cabernet Sauvignon’ and ‘Marselan’ Grapes after Veraison, *Molecules*, 15, 7763-7774.

Yassa, N., Beni, R.H. & Hadjiakhoondi, A. (2008). Free Radical Scavenging and Lipid Peroxidation Activity of the Shahani Black Grape, *Journal Of Biological Sciences*, 21, 2516-2516.

Yavuz T. (2018). *Üzüm Posasından Biyoetanol Üretiminin Araştırılması* (Yüksek Lisans Tezi). Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.

Zabed, H. vd. (2017). Bioethanol Production from Renewable Sources: Current Perspectives and Technological Progress, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71, 475-501.

Zhang, N., Hoadley, A., Patel, J., Lim, S. & Li, C. E. (2017). Sustainable Options for the Utilization of Solid Residues from Wine Production. *Waste Management*, 60, 173-183.

Zhu, F., Du, B., Zheng, L. & Li, J. (2015). Advance on the Bioactivity and Potential Applications of Dietary Fibre from Grape Pomace, *Food Chemistry*, 186, 207-212.