

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ÜZÜM CİBRESİNDEN FENOLİK BİLEŞENLERİN ENZİM-DESTEKLİ  
EKSTRAKSİYONUNUN OPTİMİZASYONU**

**Tuğçe CEYHAN**

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA  
2022**

**Her hakkı saklıdır**



## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### ÜZÜM CİBRESİNDEN FENOLİK BİLEŞENLERİN ENZİM-DESTEKLİ EKSTRAKSİYONUNUN OPTİMİZASYONU

Tuğçe CEYHAN

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. R. Ertan ANLI

Agro-endüstriyel yan ürünlerden biri olan üzüm cıbesi, yüksek antioksidan aktiviteleriyle yaygın olarak bilinen potansiyel fenolik bileşik kaynağı olarak bilinmektedir. Üzüm cıbesi ekstraktlarının; antioksidan ve serbest radikal temizleme aktivitesi, kardiyoprotektif etkileri, hepatoprotektif etkileri, antikanserojenik etkileri, antimikrobiyal ve antiviral etkileri, nöroprotektif ve antidiabetik etkileri bulunmaktadır. Üzüm cıbesinden biyoaktif bileşenlerin eldesi için farklı ekstraksiyon koşulları mevcuttur. ‘Enzim-Destekli Ekstraksiyon’ yöntemi de geliştirilen yeni alternatif yöntemlerden biridir. Bu çalışmada şaraphane atığı olan üzüm cıbesinin çevre kirliliği ve maliyet fazlalığını önlemek ve sağlığa faydaları olan üzüm polifenollerinin ve antioksidan maddelerin geri kazanımını sağlamak için pektinaz enzimleri kullanılarak enzim-destekli ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır. Enzim konsantrasyonu (%5-25 v/v), ekstraksiyon sıcaklığı (25-65°C), ekstraksiyon pH’sı (3-5) ve ekstraksiyon süresi (1-5 saat) proses değişkenlerinin; toplam fenolik madde (TFM) ve toplam antioksidan madde (TAM) miktarı üzerindeki temel etkisini araştırmak için 4 faktörlü 5 seviyeli Merkezi Kompozit Tasarım (Central Composite Design) kullanılarak yanıt yüzeyi metodolojisi (Response Surface Methodology-RSM) uygulanmıştır. Çalışmada 30 farklı deneysel tasarım noktasında gerçekleştirilen enzim destekli ekstraksiyonlar sonucunda TFM miktarı 113,96±7,34’ten 261,35±12,35 mg gallik asit /L üzüm cıbesi ekstraktı arasında ve TAM miktarı ise 131,21±11,69 ile 208,14±12,07 µg trolox/L üzüm cıbesi ekstraktı arasında değişiklik göstermiştir. Çalışmada uygulanan optimizasyon sonuçlarına göre en yüksek TFM ve TAM sonuçları sırasıyla 184,97±4,21 mg gallik asit /L üzüm cıbesi ekstraktı ve 195,16±7,21 µg trolox/L üzüm cıbesi ekstraktı olup bu sonuçlar 10 ml/100ml pektinaz konsantrasyonu, 55 °C sıcaklık, 3.5 pH ve 2 saatlik ekstraksiyon koşulları sonucunda elde edilmiştir.

**Şubat 2022, 71 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Üzüm cıbesi, Enzim-destekli ekstraksiyon, Fenolik bileşenler, Optimizasyon

## ABSTRACT

M.Sc. Thesis

### OPTIMIZATION OF ENZYME-ASSISTED EXTRACTION OF PHENOLIC COMPONENTS FROM GRAPE POMACE

Tuğçe CEYHAN

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Food Engineering Department

Supervisor: Prof. Dr. R. Ertan ANLI

Grape pomace, one of the agro-industrial by-products, is widely known as a potential source of phenolic compounds known for its high antioxidant activities. Grape pomace extracts have an antioxidant and free radical scavenging activity, cardioprotective effects, hepatoprotective effects, anticancerogenic effects, antimicrobial and antiviral effects, neuroprotective and anti-diabetic effects. Different extraction conditions are available for obtaining of bioactive components from grape pomace. The 'Enzyme-Assisted Extraction' method is one of the new alternative methods developed. In this study, we prevent environmental pollution and waste of winery residue of the grapes polyphenols and antioxidant substances in excess of cost and health benefits for the recycling of enzymes using pectinase enzyme-assisted extraction method was applied. In order to investigate the main effect of process variables as the enzyme concentration (5-25 %, v/v), extraction temperature (25-65°C), extraction pH (3-5) and extraction time (1-5 h) on the amount of total phenolic substance (TFM) and total antioxidant substance (TAM), a Response Surface Methodology (RSM) was applied using a 4-factor 5-level Central Composite Design (CCD). As a result of enzyme-assisted extractions carried out at 30 different experimental design points in the study, the amount of TFM ranged from 113.96±7.34 to 261.35±12.35 mg gallic acid /L grape pomace extract and the TAM amount ranged from 131.21±11.69 to 208.14±12.07 µg trolox/L grape pomace extract. According to the optimization results applied in the study, the highest TFM and TAM results were obtained as a result of 184.97±4.21 mg/L grape pomace extract and 195.16±7.21 µg/L grape pomace extract, respectively, 10 ml/100ml pectinase concentration, 55 °C temperature, 3.5 pH and 2-hour extraction conditions.

**February 2022, 71 pages**

**Key words:** Grape pomace, Enzyme-assisted extraction, Phenolic components, Optimization

## TEŐEKKÖRLER

Bu tezi hazırlamamda katkı ve desteklerinden dolayı danışmanım Prof. Dr. R. Ertan ANLI'ya (Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı), çalışmam boyunca herhangi bir desteğini, bilgisini ve emeğini benden esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Nilüfer VURAL'a (Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Tekstil Teknolojisi Anabilim Dalı, Gıda İşleme Bölümü) teşekkürlerimi borç bilirim.

Çalışmamda hammadde teminini sağlayan Doluca Şarapçılık A.Ş. ve enzim teminini sağlayan AB Enzymes'e teşekkürlerimi sunarım.

Her konuda destek, saygı ve sevgisini eksik etmeyen biricik babam Haydar CEYHAN, biricik annem Melek CEYHAN, biricik kardeşim Batuhan CEYHAN ve Emrullah VERMEZ'e teşekkür ederim.

Tuğçe CEYHAN

Ankara, Şubat 2022

## İÇİNDEKİLER

### TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZET.....	ii
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜRLER .....	iv
SİMGELER DİZİNİ .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
1. GİRİŞ .....	1
2.KAYNAK ÖZETLERİ .....	4
2.1 Üzüm ve Üzüm Cibresi Hakkında Genel Bilgiler .....	4
2.2 Üzüm Cibresinde Bulunan Fenolik Bileşenler .....	6
2.2.1 Basit fenoller .....	9
2.2.1.1 Hidroksisünamik asitler .....	9
2.2.1.2 Hidroksibenzoik asitler.....	10
2.2.2 Polifenoller .....	12
2.2.2.1 Flavonoidler .....	12
2.2.2.1.1 Flavonoller .....	13
2.2.2.1.2 Flavanoller (flavan-3-oller) .....	14
2.2.2.1.3 Antosiyaninler .....	15
2.2.2.2 Stilbenler .....	17
2.2.2.3 Tanenler .....	18
2.3 Ekstraksiyon .....	19
2.4 Enzimler ve Pektinazlar (Pektinolitik Enzimler) Hakkında Genel Bilgiler .....	21
2.5 Enzim Destekli Ekstraksiyon .....	24
2.6 Yanıt Yüzey Yöntemi ile Optimizasyon .....	31
3. MATERYAL VE METOT .....	32
3.1 Materyal .....	32
3.1.1 Üzüm cibresi .....	32
3.1.2 Enzim.....	32
3.2 Metot.....	32
3.2.1 Örnek hazırlama .....	32
3.2.2 Enzim-destekli ekstraksiyon .....	34

3.2.2.1 Yanıt yüzey metodolojisi kullanılarak ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi .....	34
3.2.2.2 Üzüm cibresindeki fenolik bileşenlerin enzim-destekli ekstraksiyonu .....	35
3.2.3 Analiz Metotları .....	36
3.2.3.1 Toplam fenolik madde tayini .....	36
3.2.3.2 DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal süpürme kapasitesi tayini.....	37
3.2.4 Optimizasyon.....	37
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	39
4.1 Modelin oluşturulması.....	39
4.2 Yanıt Yüzey Analizleri.....	44
4.2.1 Enzim konsantrasyonunun etkisi .....	44
4.2.2 Sıcaklığın etkisi.....	46
4.2.3 pH'nın etkisi .....	47
4.2.4 Sürenin etkisi .....	48
4.3 Optimizasyon ve Ekstraksiyon Metotlarının Karşılaştırılması .....	49
5. SONUÇ.....	53
KAYNAKLAR .....	56
ÖZGEÇMİŞ.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

## SİMGELER DİZİNİ

®	tescilli ticari marka sembolü
°C	celcius
β	beta
μ	mikro
±	artı-eksi
C	karbon
dk	dakika
H	hidrojen
MeOH	metanol
N	normalite
nm	nanometre
OCH <sub>3</sub>	metoksi grup
OH	hidroksil grubu
ppm	milyonda bir
rpm	dakikadaki devir sayısı
sa	saat
v	hacim

### Kısaltmalar

A.Ş.	Anonim Şirketi
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
ANOVA	Varyans Analizi
DPPH•	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EAE	Enzyme Assisted Extraction
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
RSM	Response Surface Methodology
M.Ö.	Milattan Önce
UV/Vis	Ultraviolet-Visible



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Üzüm cibresinin ana fraksiyonları ve bunlardan elde edilen bileşenler.....	5
Şekil 2.2 a) Benzen halkasının farklı görünüşleri, b) Hidroksibenzen (fenol halkası)....	6
Şekil 2.3 Kırmızı üzümde bulunan bazı fenolik bileşenler ve buldukları kısımlar.....	7
Şekil 2.4 Üzüm cibresinde bulunan ana fenolik bileşikler.....	9
Şekil 2.5 Üzüm cibresinde bulunan hidroksisinnamik asitler ve yapıları.....	10
Şekil 2.6 Üzüm cibresinde bulunan hidroksibenzoik asitler ve yapıları.....	11
Şekil 2.7 Flavonoidlerin genel yapısı .....	13
Şekil 2.8 Üzüm cibresinde bulunan flavonoller ve iskelet yapısı .....	14
Şekil 2.9 Yaygın olarak görülen bazı flavan-3-oller .....	15
Şekil 2.10 Antosiyanidinler ve antosiyanin pigmentlerinin yapısı.....	16
Şekil 2.11 Stilbenlerin kimyasal yapısı.....	17
Şekil 2.12 Proantosiyanidin olan prosiyanidin ve prodelphidinin iskelet yapısı .....	18
Şekil 2.13 Bitki hücre duvarlarının enzimatik bozulması ve biyoaktif bileşiklerin salınımı.....	24
Şekil 3.1 Üzüm cibresinden aktif bileşenlerin ekstraksiyonu akış şeması.....	33
Şekil 3.2. Gallik asit kalibrasyon eğrisi.....	36
Şekil 3.3 Trolox kalibrasyon eğrisi.....	37
Şekil 4.1a) TFM, b) TAM tahmin edilen değerler ve deneysel değerler. TFM, toplam fenolik madde; TAM toplam antioksidan madde.....	44
Şekil 4.2 (a) Enzim konsantrasyonu ve sıcaklığın, (b) enzim konsantrasyonu ve sürenin toplam fenolik madde üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri.....	48
Şekil 4.3 (a) Enzim konsantrasyonu ve sıcaklığın, (b) sıcaklık ve pH'nın, (c) enzim konsantrasyonu ve sürenin toplam antioksidan madde üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri.....	49
Şekil 4.4 Farklı çözücüler ile optimum koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyonlar sonucunda elde edilen TFM ve TAM miktarları arasındaki ilişki.....	52

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Üzüm cibresinde (üzüm tohumu, üzüm kabuğu ve üzüm posası) bulunan fenolik bileşen grupları .....	8
Çizelge 2.2 Pektinolitik enzimler için geniş bir sınıflandırma.....	23
Çizelge 3.1 Enzim destekli ekstraksiyon için üretilen beş seviyeli, dört faktörlü merkezi kompozit tasarım .....	35
Çizelge 4.1 Deneysel tasarım, bağımsız değişkenler, bağımlı değişkenler ve deneysel sonuçlar.....	40
Çizelge 4.2 Toplam fenolik madde ANOVA sonuçları.....	42
Çizelge 4.3 Toplam antioksidan madde ANOVA sonuçları.....	43
Çizelge 4.4 Karşılaştırmalı ekstraksiyonlar ve yanıtların deneysel değerleri.....	50

## 1. GİRİŞ

Üzüm üretimi günümüzde dünya çapında çok önemli bir tarımsal faaliyet olarak kabul edilmektedir. Uluslararası Bağ ve Şarap Örgütü verilerine göre 2018 yılında dünyada 77,8 milyon ton üzüm üretimi gerçekleşmiştir. 2018 Uluslararası Bağ ve Şarap Örgütü verilerine göre dünyada sırasıyla Çin, İtalya, Amerika Birleşik Devletleri, İspanya, Fransa ve Türkiye başlıca üzüm üretimi yapan ülkelerdir. Türkiye’de ise üzüm üretimi 2018 yılında 3,9 milyon tona ulaşmıştır (Roca 2019).

Üzüm cibresi şarap üretimi için ezilmiş üzüm ağırlığının yaklaşık %20-25’ini oluşturmaktadır ve kabuk, tohum, sap gibi kısımlardan oluşmaktadır (Yu ve Ahmedna 2013). Fenolik bileşikler genellikle üzüm meyvesinin kabuk, tohum ve kısa sap kısımlarında bulunmaktadır (Rodriguez vd. 2006, Poudel vd. 2008). İşleme sırasında açığa çıkan cibreden, yetiştiricilerin yeterince yararlanamaması sonucu üretim noktalarında önemli miktarlarda birikmesine ve değerlendirilemediği için atılmasına, bu bağlamda da dikkate değer boyutlarda çevre kirliliğine neden olabildiği görülmektedir (Sarıççek ve Kılıç 2002).

Üzüm cibresi, polifenolik maddelerce benzersiz çeşitliliği ve zenginliği nedeniyle büyük ilgi görmüştür (García-Lomillo ve González-SanJosé 2017). Flavonoidlerin çoğu üzüm meyvesi kabuğunun iç tabakasında, yani hipodermide bulunur. Bu bileşikler antioksidatif, antifungal, antimikrobiyal ve antienflamatuar özellikleri nedeniyle insan sağlığı üzerinde olumlu bir etkiye sahiptirler (Pinelo vd. 2006, Gollücke 2010).

Endüstriyel ölçekte hammaddesi üzüm olan proseslerde ürüne dönüşmeyen atık olan cibrede bulunan biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyon ile geri kazanımı ve bu bileşiklerin gıda endüstrisinde veya farklı sektörlerde tekrar işlenmesi veya ürünlere katılmasıyla üzümde elde edilecek verim maksimize edilebilir. Üzüm cibesinden biyoaktif bileşenlerin eldesi için farklı ekstraksiyon koşulları mevcuttur. Konvansiyonel çözücü ekstraksiyonu farklı fazlardaki bitki matrislerinden biyoaktif bileşikler elde etmek için endüstriyel ölçekte en yaygın uygulanan tekniktir. Konvansiyonel işlemlerin; düşük

verim, uzun ekstraksiyon süresi, yüksek işletme maliyeti gibi dezavantajlarının üstesinden gelmek, bileşiklerin bütünlüğünü korumak ve çevre dostu çözücüler kullanıp çevre dostu bir proses sağlamak amacıyla ekstraksiyonda farklı yeşil ekstraksiyon uygulamalara yönelim artmıştır. Yeşil ekstraksiyon şu şekilde tanımlanabilir; “Enerji tüketimini azaltacak, alternatif çözücülerin ve yenilenebilir doğal ürünlerin kullanılmasına izin verecek, güvenli ve kaliteli bir ekstrakt sağlayacak ekstraksiyon işlemlerinin keşfine ve tasarımına dayanan metotlardır” (Chemat vd. 2012). Özellikle işlenmiş bitki artıklarından flavonoidlerin ve fenolik asitler gibi biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonuna artan ilgi, hücre duvarını hidrolize eden enzimlerin çeşitli şaraphane yan ürünlerine uygulanması üzerine araştırmaları arttırmıştır ve alternatif çevreci metotlar araştırılmaya başlanmıştır (Meyer vd. 1998, Kammerer vd. 2005). Yeşil ekstraksiyon tekniklerinden biri de enzim destekli ekstraksiyon (enzyme-assisted extraction/ EAE) 'dur.

Enzimler, kimyasal katalizörlere göre birçok avantaj sağlayan, yüksek verimli biyolojik katalizörlerdir. Yenilenebilir ve biyolojik olarak parçalanabilir kaynaklardan elde edilirler; spesifik özellikte olmaları, çevre dostu bir süreçle substrat verimini artırır ve yan ürün üretimini azaltır (Cherry ve Fidantsef 2003). Düşük konsantrasyonlarda ve düzgün çalışma koşullarında kullanımları ve kontrolleri kolaydır; ayrıca enzimler sanayi sektörü tarafından güvenli olarak kabul edilen biyokatalizörlerdir (Simpson vd. 2012, Ackaah-Gyasi vd. 2015). Enzim-destekli ekstraksiyon tekniği; selülaz, hemiselülaz ve pektinaz gibi, karbonhidratları hidroliz eden enzimler tarafından hücre duvarının parçalanması esasına dayanmaktadır (Puri vd. 2012). Bu enzimler, hücre duvarı kompleksine ait polifenollerini serbest bırakmak ve hücre duvarı yapısı tarafından tutulan belirli besin maddelerinin salınmasını kolaylaştırmak için kullanılmıştır (Landbo ve Meyer 2001, Maier vd. 2008). Tüm endüstriyel enzimlerin neredeyse %75'i hidrolitik enzimlerdir. Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan hidrolitik enzimler; pektinazlar, glukozidazlar, amilazlar, glukoamilazlar, proteazlar, lipazlar, glukaazlar, hemiselülazlar ve oksidazlardır (Vijayaraghavan vd. 2016).

Pektinazlar, depolimerizasyon (hidrolazlar ve liyazlar) ve deesterifikasyon (esteraz) reaksiyonu yoluyla pektin maddelerinin parçalanmasını katalize eden enzim grubudur.

Ticari olarak temin edilebilen ve yaygın olarak kullanılan pektinazlar; pektin metilesteraz, pektin liyaz ve poligalakturonaz enzimleridir (Jayani vd. 2005, Biscaro Pedrolli vd. 2009).

Bu çalışmada şaraphane atığı olan üzüm cibresinin çevre kirliliği ve maliyet fazlalığını önlemek ve sağlığa faydaları olan üzüm polifenollerinin geri kazanımını sağlamak için pektinaz enzimleri kullanılarak enzim-destekli ekstraksiyon yöntemi uygulanacaktır. Çalışmada toplam fenolik madde ve toplam antioksidan madde analizleri de yapılacaktır. Deneysel tasarım, modelleme ve optimizasyon aşamaları sonucunda optimum ekstraksiyon koşulları belirlenecektir.



## 2.KAYNAK ÖZETLERİ

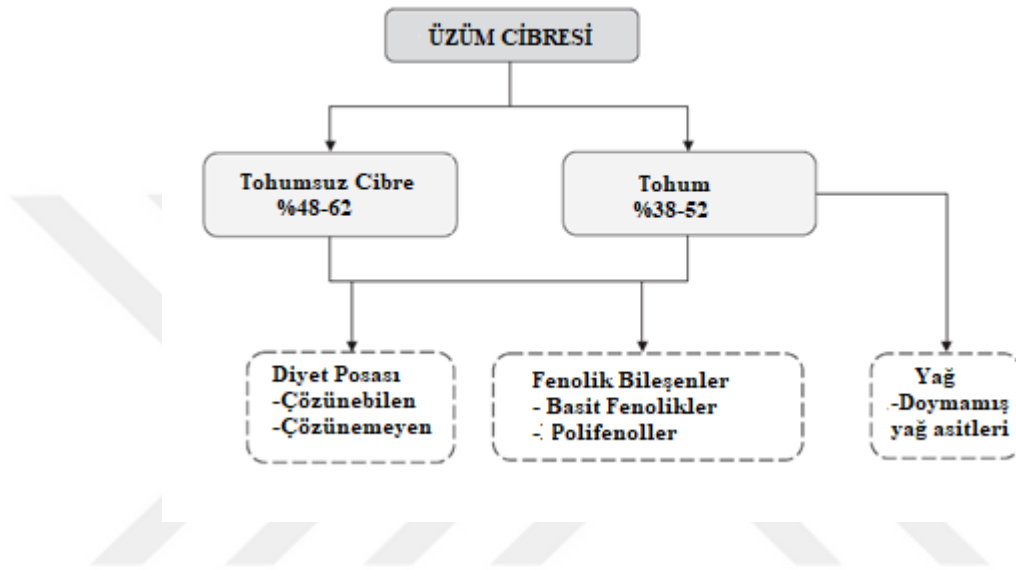
### 2.1 Üzüm ve Üzüm Cibresi Hakkında Genel Bilgiler

Üzüm, üzüm familyası olarak adlandırılan Vitaceae familyasının bir üyesidir. *Vitis* (V.) cinsi yaklaşık 60 türden ve ayrıca bazı doğal türlerarası hibritlerden oluşur (Wen, 2007). Meyve üretimi için yetiştirilen üzümlerin neredeyse tamamı *V. vinifera* veya üst soyları *V. vinifera* içeren hibritlerdir (Reisch vd. 2011).

Üzümler yaklaşık 6.000-10.000 yıl önce evcilleştirilmiştir (Zohary ve Hopf 2000). En eski kanıtların M.Ö. 5400 ve 5000 yıllarına dayandığı şarabın tarihi, uzun bir geçmişe dayanır (McGovern vd. 1996). Bazı araştırmacılar, şarabın keşfini ya da en azından gelişimsel sürecinin gerçekleştiği yerin Güney Kafkasya bölgesi olabileceğini ileri sürmektedir. Şarap üzümlerinin (*Vitis vinifera*) evcilleştirilmesinin başlangıcının bu alanda gerçekleştiği düşünülmektedir (Zohary ve Hopf 1988). Kafkasya bölgesinde başladığı kabul edilen üzüm yetiştiriciliği ve şarap yapımı bu bölgeden Filistin, Suriye, Mısır ve Mezopotamya'ya gitmiştir (Soleas vd. 1997). *Vitis* cinsi, Vitaceae ailesinde büyük agronomik öneme sahiptir. Bunlar arasında *Vitis vinifera*, küresel şarap endüstrisinde yaygın olarak kullanılan tek türdür (This vd. 2006). Üzüm cibresi, şarap imalathanelerinin presleme ve/veya fermantasyon süreçlerinde meydana gelen başlıca katı organik atıklarıdır ve dünyanın birçok yerinde büyük miktarlarda üretilir (Abarghvei vd. 2010, Christ ve Burrit 2013, Cuccia 2015).

Şarap yapımından elde edilen cibre miktarı; üzüm çeşidine, presleme işlemine ve fermantasyon aşamalarına bağlıdır. Çalışmalar, üzüm cibresinin, orijinal üzüm ağırlığının genellikle %20-30'unu temsil ettiğini göstermiştir. Kırmızı şarap prosesinde, üzümler tamamen fermantasyona katılır ve bu durumda meyve suyu ve cibre birlikte fermente edilir. Bu aşamada üzüm kabuğu varlığı, şarabın kırmızı rengini oluşturmak için gerekli olan antosiyaninler gibi pigmentleri ihtiva eder. Beyaz şarap prosesinde cibre, fermantasyona dahil değildir. Bu durumda, sadece meyve suyu preslendikten sonra fermente edilir (Dwyer vd. 2014). Bu nedenle, beyaz şarap prosesinden elde edilen cibre,

kırmızı şarap prosesinden elde edilen cibre ile karşılaştırıldığında daha fazla hamur ve artık şekere sahiptir (Mendes vd. 2013). Üzüm cibresi genellikle kabuk, kalıntı meyve ve tohumdan oluşmaktadır (Christ ve Burrit 2013, Brenes vd. 2016). Kuru şarap atığı olarak, üzüm cibresinin yaklaşık %38-52'sini tohum, %5-10'unu ise kabuk oluşturur (Brenes vd. 2016) (Şekil 2.1).



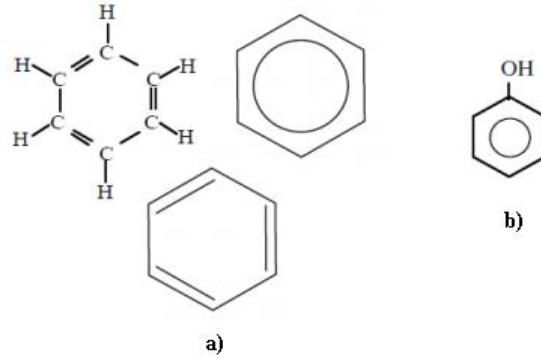
Şekil 2.1 Üzüm cibresinin ana fraksiyonları ve bunlardan elde edilen bileşenler (Beres vd. 2017)

Araştırmacılar ve gıda üreticileri, güçlü antioksidan özellikleri, diyetle bolluğu ve çeşitli oksidatif stresle ilişkili hastalıkları önleme yeteneği nedeniyle bu biyoaktif sınıfa özel ilgi duymaktadır (Marathe vd. 2017). Doğal sentetik bileşiklerin kullanımını için artan tüketici talebi ve tarımsal uygulamaların sürdürülebilirliğine olan ilginin artması nedeniyle; fonksiyonel gıda (diyet lifi ve polifenoller), gıda işleme (biyosülfaktanlar), kozmetik (üzüm çekirdeği yağı ve antioksidanlar), farmasötik ve katkı maddeleri (üzüm cibresi tozu) gibi üzüm cibresinin farklı sektörlerde geniş çapta kullanım alanları geliştirilmiştir (Rózek vd. 2010, Dwyer vd. 2014, Shinagawa vd. 2015).

Üzüm cibresi ekstraktlarının; antioksidan ve serbest radikal temizleme aktivitesi (Facino vd. 1998, Jayaprakasha vd. 2003), kardiyoprotektif etkileri (Tebib vd. 1994, Cui vd. 2002, Auger vd. 2004), hepatoprotektif etkileri (Ray vd. 1999, Dulundu vd. 2007, Şehirli vd. 2008), antikanserojenik etkileri (Bomser vd. 1999, Zhao vd. 1999, Barthomeuf vd. 2006), antimikrobiyal ve antiviral etkileri (Ahn ve Mustapha 2004, Rhodes vd. 2006), nöroprotektif etkileri (Hwang vd. 2004, Feng vd. 2005, Balu vd. 2006) ve antidiabetik etkileri (Li vd. 2008) bulunmaktadır.

## 2.2 Üzüm Cibresinde Bulunan Fenolik Bileşenler

Aromatik hidrokarbonlar, yapısında benzen halkası bulunduran organik hidrokarbonlardır. Aromatik hidrokarbonların temel üyesi benzendir. Molekül formülü  $C_6H_6$ 'dır. Benzen halkasına OH grubunun eklenmesi ile hidroksibenzen (fenol) oluşur (Şekil 2.2). Polifenollerin, kimyasal açıdan bir veya daha fazla benzen tipi halka mevcudiyeti ile karakterize edilen başlıca kaynağı olan bitkilerin sekonder metabolit olarak ürettiği bileşiklerdir (Harborne 1989).

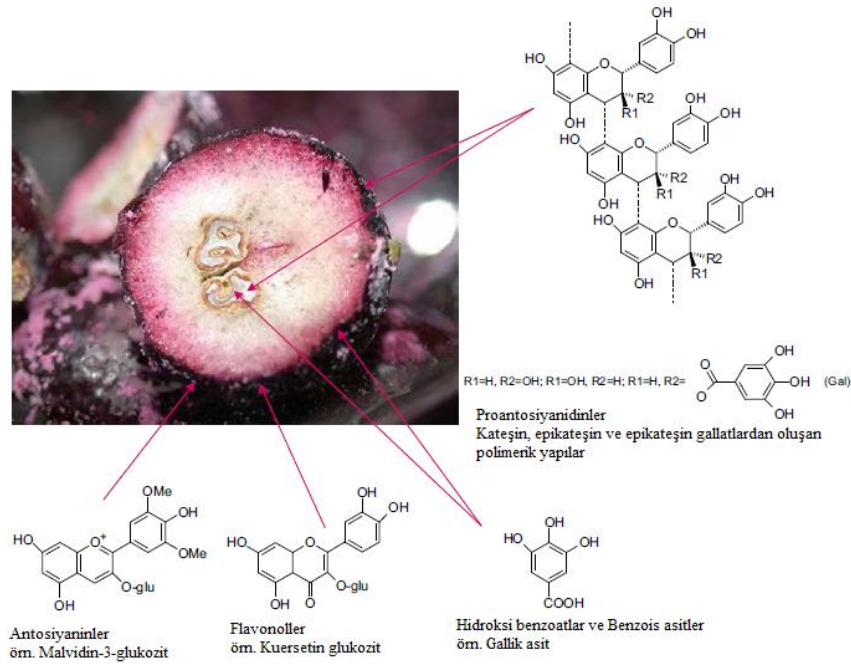


Şekil 2.2 a) Benzen halkasının farklı görünüşleri, b) Hidroksibenzen (fenol halkası) (D'Archivio vd. 2007)

Doğada bulunan bütün bitkiler, dış etkenlere karşı korunmak için birçok fenolik bileşiği farklı nitelik ve konsantrasyonlarda üretirler (Atak vd. 2017). Miktarları üretilen bitkiye göre farklılık gösterebilen bu bileşikler, bitkilerde en bol bulunan sekonder metabolitlerdir



(Dai ve Mumper 2010). 8000'den fazla fenolik yapı bilinmektedir ve bunların arasında 4000'den fazla flavonoid tanımlanmıştır (Bravo 1998, Harborne ve Williams 2000, Cheynier 2005). Şekil 2.3'te kırmızı üzümde bulunan fenolik bileşikler ve buldukları kısımlar gösterilmektedir.



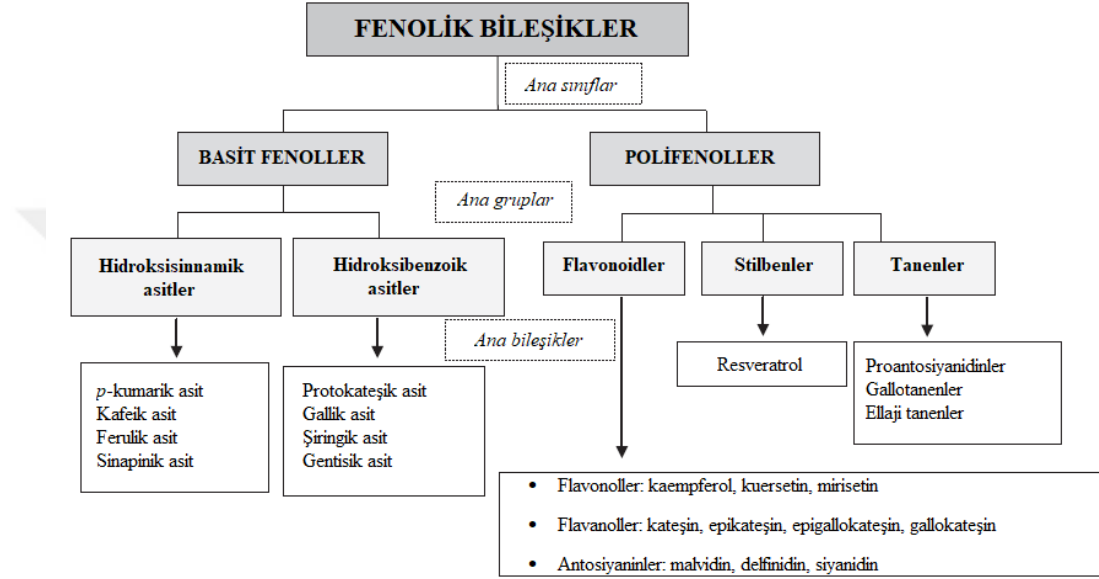
Şekil 2.3 Kırmızı üzümde bulunan bazı fenolik bileşenler ve buldukları kısımlar (Pinelo vd. 2006)

Polifenoller, lezzet ve besin değeri gibi yiyeceklerin bazı özellikleri ile doğrudan ilgilidir ve kırmızı şarapların özellikleri ve kalitesi için özel bir öneme sahiptir. Kırmızı şarap, üzümlerden kaynaklanan özellikle fenolik bileşenlerin yanı sıra, şarabın vinifikasyonu sırasında çıkan kabuklardan kaynaklanan, büyük miktarlarda fenolik bileşenlerin yanı sıra, ahşap ve maya kaynaklı fenolikler içerir (López-Vélez vd. 2003). Bununla birlikte, şarabın fenolik profili, taze üzümlerinkiyle aynı değildir, çünkü fenolik bileşimdeki önemli değişiklikler, şarap yapımında hem üzüm ezme aşamasında hem de şarap fermantasyonunda ve yaşlanmasında meydana gelir (Meyer vd. 1997). Çizelge 2.1'de üzüm cibresinde (üzüm tohumu, üzüm kabuğu ve üzüm meyvesi) bulunan fenolik bileşen grupları verilmiştir.

Çizelge 2.1 Üzüm cibresinde (üzüm tohumu, üzüm kabuğu ve üzüm meyvesi) bulunan fenolik bileşen grupları (Pantelić vd. 2016)

<b>Fenolik Bileşen Grupları</b>	<b>Fenolik Bileşikler</b>	<b>Üzüm Tohumu</b>	<b>Üzüm Kabuğu</b>	<b>Üzüm Meyvesi</b>
<i>Hidroksibenzoik asitler</i>	Gallik asit	+	+	+
	Protokateşik asit	+	+	+
	p-Hidroksibenzoik asit	+	+	+
	Gentisik asit	+	+	+
	Elajik asit	+	+	+
<i>Hidroksisinnamik asitler</i>	Klorojenik asit	+	+	+
	p-Kumarik asit	-	+	-
	Kafeik asit	+	+	+
	Ferulic asit	+	+	+
<i>Flavan-3-oller</i>	Epigallokateşin	+	+	+
	Kateşin	+	+	-
	Epikateşin	+	+	-
	Gallokateşin	-	+	-
	Gallokateşin gallat	+	+	+
	Kateşin 3-gallat	+	+	-
	Epigallokateşin gallat	+	+	+
<i>Flavonoller</i>	Kaempferol	+	+	-
	Kuersetin	+	+	-
	Rutin	+	+	+
	Mirisetin	+	+	-
	Morin	-	+	-
<i>Flavonlar</i>	Apigenin	+	+	-
<i>Flavanonlar</i>	Narinjin	+	+	-
	Hesperetin	+	+	+

Üzüm meyvesinde fenolik asitler, üzüm kabuğunda antosiyaninler, pulpta hidroksisinnamik asitler, tohumda ise flavan-3-oller, kateşinler ve epikateşinler bulunmaktadır (Di Lecce vd. 2014). Polifenoller, içerdikleri fenol halkalarının sayısına ve bu halkaları birbirine bağlayan yapı elemanlarına göre birkaç sınıfa ayrılır (D' Archivio vd. 2007) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Üzüm cibresinde bulunan ana fenolik bileşikler ve buldukları gruplar (Beres vd. 2017)

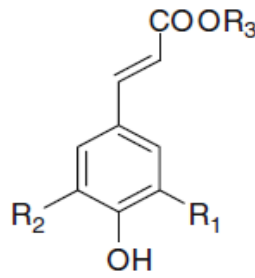
## 2.2.1 Basit fenoller

Basit fenoller, hidroksisinnamik asitler ve hidroksibenzoik asitler olmak üzere 2 gruba ayrılır.

### 2.2.1.1 Hidroksisinnamik asitler

Hidroksisinnamik asitler bir C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> iskeletine sahiptir ve resmen fenilpropanoid grubuna aittir. Şarapta bulunan farklı bileşikler temel olarak hidroksisinnamik asitler, kafeik asit, pumumik asit, ferulik asit ve sinapik asitten türetilir. Hidroksisinnamik asit türevlerinin

şaraptaki konsantrasyonu üzüm çeşiti, büyüme koşulları ve iklim gibi farklı koşullara göre değişebilir. Şekil 2.5'te üzüm cibresinde bulunan hidroksisinnamik asitler ve yapıları verilmiştir. Kırmızı şarabın rengi ayrıca, hidroksisinnamik asitlerin mevcudiyetinden de güçlü bir şekilde etkilenir. Antosiyanin çözeltilerinin diğer fenolik bileşiklerin varlığıyla renk yoğunlaşmasını tanımlayan kopigmentasyon olgusunda önemli bir rol oynarlar (Miniati vd. 1992, Baranac vd. 1996, Darias-Martin vd. 2002, Dimitric Markovic vd. 2000, Dimitric Markovic vd. 2005).



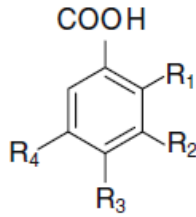
Hidroksisinnamik asitler	R1	R2	R3
Kafeik asit	OH	H	H
Kaftarik asit	OH	H	Tartarik asit
p-Kumarik asit	H	H	H
p-Kutarik asit	H	H	Tartarik asit
Ferulik asit	OCH <sub>3</sub>	H	H
Fertarik asit	OCH <sub>3</sub>	H	Tartarik asit
Sinapik asit	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H

Şekil 2.5 Üzüm cibresinde bulunan hidroksisinnamik asitler ve yapıları (Fontana vd. 2013)

### 2.2.1.2 Hidroksibenzoik asitler

Benzoik asitten türetilen hidroksibenzoik asitler, C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> iskeleti ile karakterize edilir. Şarapta bulunan en yaygın türevler gallik asit, gentsik asit, p-hidroksibenzoik asit,

protokateşik asit, şiringik asit, salisilik asit ve vanillik asittir. Şarapta farklı hidroksibenzoik asitler esas olarak serbest formlarında bulunabilir (Salagoity-Auguste ve Bertrand 1984, Güntert vd. 1986, Fernandez de Simon vd. 1992, Garcia-Viguera ve Bridle 1995, Pena-Neira vd. 2000, Vanhoenacker vd. 2001, Pozo-Bayón vd. 2003, Monagas vd. 2005a, b). Şekil 2.6'da üzüm cibresinde bulunan hidroksibenzoik asitler ve yapıları verilmiştir. Galik asit, şarapta en yüksek konsantrasyonlara sahip hidroksibenzoik asitten biridir. Sadece üzümün kendisinden kaynaklanmaz, aynı zamanda hidrolizlenebilir ve kondense tanenlerin, gallik asit esterlerinin hidrolizi ile de oluşturulur. Hidroksibenzoik asit seviyeleri, üzüm çeşidine ve yetiştirme koşullarına bağlı olarak büyük değişkenlik gösterir (Vermerris ve Nicholson 2006). Pozo-Bayón vd. (2003), beyaz ve kırmızı üzümlerden elde edilen İspanyol köpüklü şaraplarında gallik asit için sırasıyla 0.3 ile 1.3 mg/L arasındaki değerleri bildirmiştir. Protokateşik asit için değerler 0.5 ile 0.93 mg/L arasıdayken, p-hidroksisünamik asit konsantrasyonları 0-0.22 mg/L arasında olduğunu saptamıştır.



<b>Hidroksibenzoik asitler</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>
Gallik asit	H	OH	OH	OH
p-Hidroksibenzoik asit	H	H	OH	H
Protokateşik asit	H	OH	OH	H
Şiringik asit	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>

Şekil 2.6 Üzüm cibresinde bulunan hidroksibenzoik asitler ve yapıları (Rentzsch vd. 2009, Fontana vd. 2013)

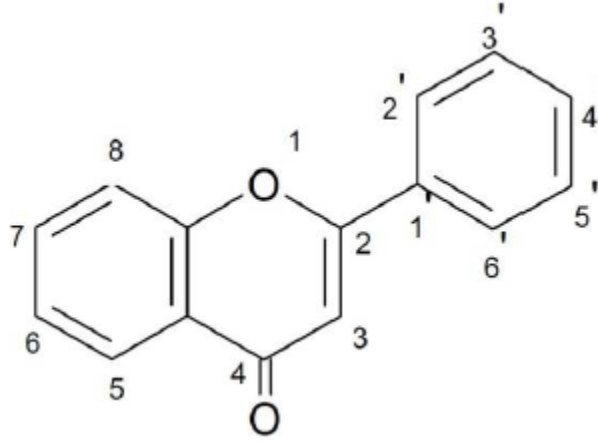
## 2.2.2 Polifenoller

Üzüm cibresinde bulunan polifenoller; flavonoidler, stilbenler ve tanenler olmak üzere 3 farklı gruba ayrılırlar. Flavonoidler ise kendi arasında; flavonoller, flavanoller ve antosiyaninler olmak üzere 3'e ayrılırlar.

### 2.2.2.1 Flavonoidler

Flavonoidler, doğrusal 1-3 karbon ( $C_3-C_1$ ) zinciri ile birleştirilen iki benzen halkası olan difenil propanların ortak bir karbon iskeletini paylaşan düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Şekil 2.7'de flavonoidlerin genel yapısı verilmiştir. Merkezi üç karbon zinciri, benzen halkalarından biri ile kapalı bir piran halkası oluşturabilir (D'Archivio vd. 2007). Bu polifenoller bitkilerde genellikle glikozit formları halinde bulunur. Flavonoidlerin yapısında bulunan OH gruplarının reaktif özelliklerinden dolayı kolaylıkla glikozitlenir (Ribéreau-Gayon vd. 2000, Nizamlıoğlu ve Nas 2010). Flavonoidler, üzümlerde çözünür fenoliklerin büyük bir kısmını oluşturur ve üzüm meyvelerinde en konsantre doğal antioksidanları temsil ederler (Conde vd. 2007). Flavonoid içeren gıdalar insanlar tarafından düzenli kullanıldığında kanser ve kalp hastalıkları gibi hatalıkların yayılmasında bir azalma olduğu gözlemlenmiştir (Ignat vd. 2011). Heterosiklik halka şeklinde olan C halkasında meydana gelen değişmeler flavonoidleri; flavonoller, flavonlar, flavanonlar, flavanoller (veya kateşinler), izoflavon, flavanonoller ve antosiyanidinler olarak ana bileşik gruplarına ayırmaktadır (Harborne vd. 1999, Tsao ve Yang 2003, D'Archivio vd. 2007, Yağcı vd. 2008). Her ana bileşik grubundaki bireysel farklılıklar, hidroksil gruplarının sayısındaki ve düzenindeki değişikliklerden ve bunların alkilasyon ve/veya glikosilasyon derecelerinden kaynaklanmaktadır (Spencer vd. 2008). Flavonoidler esas olarak üzüm çekirdeklerinden, kabuktan ve üzümlerin saplarından elde edilmektedir. Antosiyaninler ve flavonoller esas olarak kabuklardan, kateşinler ve lökoantosiyaninler çekirdeklerden ve gövdelerden ekstrakte edilmektedir (Zoecklein vd. 1990). Anatomik bir bakış açısından, üzüm flavonoidleri, hem meyvenin perikarp kısmında (kabuk) bulunan periferik katmanlarda hem de tohum kabuğunun (testa) bazı katmanlarında spesifik olarak lokalize olur.

Meyvenin mezokarpı (posa/meyve kısmı), özellikle beyaz üzüm çeşitlerinde yaygın olan fenolik hidroksisinnamatlar ve ihmal edilebilir miktarda flavonoid içermektedir (Adams 2006, Castellarin vd. 2006, Conde vd. 2007)

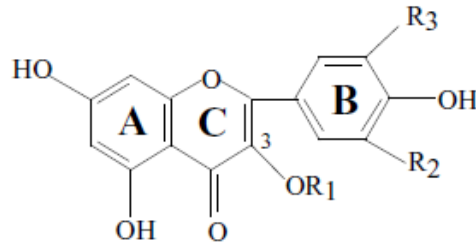


Şekil 2.7 Flavonoidlerin genel yapısı (Fraga 2010)

Flavonoidler kendi arasında; flavonoller, flavanoller ve antosiyaninler olmak üzere 3'e ayrılırlar.

#### 2.2.2.1.1 Flavonoller

Flavonoller, C<sub>2</sub> ve C<sub>3</sub> arasında, C<sub>3</sub>-pozisyonunda bir OH ile çift bağa sahiptir. Flavonol grubu bileşikler gıdalarda yaygın olarak glikozid formunda bulunmaktadır. Başlıca flavonoller; kaempferol, kuersetin, mirisetin ve izoramnetin'dir (Aherne ve O'Brien 2002). Flavonoller, üzümde antosiyaninler ve kondense tanenler üreten, ko-pigmentasyon ile ilişkili olan, antosiyaninlerin renk yoğunluğunu değiştirerek veya artırarak renk formuna stabilite sağlarlar ve antosiyaninlerle aynı biyosentetik yolla meydana gelirler. Kaempferol, kuersetin, mirisetin ve isoramnetin ana temsilcileridir ve çoğunlukla üzüm kabuğunda bulunurlar (Pantelić vd. 2016). Kuersetin, flavonol fraksiyonunun çoğunluğunu oluşturur. Üzüm kabuğuna temas etmeden üretilen şaraplarda, flavonollerin sıfır veya sadece iz konsantrasyonlarında rapor edilmiştir (Zoecklein vd. 1990). Şekil 2.8'de üzüm cibresinde bulunan flavonoller ve iskelet yapısı verilmiştir.



Flavonoller	R1	R2	R3
Kaempferol	OH	H	H
Kuersetin	OH	OH	H
Izoramnetin 3-O-glukozit	OH	OCH <sub>3</sub>	Glukoz
Kaempferol 3-O-glukozit	OH	H	Glukoz
Kuersetin 3-O-glukozit	OH	OH	Glukoz
Kuersetin 3-O-galaktozit	OH	OH	Galaktoz
Kuersetin 3-O-glukuronid	OH	OH	Glukoronik asit
Kuersetin 3-O-ramnozid	OH	OH	Ramnoz
Rutin	OH	OH	Rutinoz

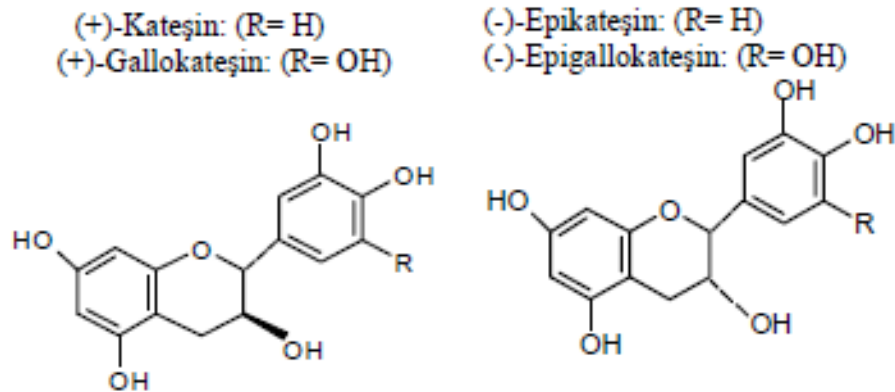
Şekil 2.8 Üzüm cibresinde bulunan flavonoller ve iskelet yapısı (Zou vd 2002, Fontana vd. 2013)

#### 2.2.2.1.2 Flavanoller (flavan-3-oller)

Flavanoller (flavan-3-oller) molekülde C<sub>3</sub> atomunda bir OH grubu bağlanması ile oluşur (Aron ve Kennedy 2008). Flavan-3-ol flavonoidler esas olarak (+) -kateşin ve (-)-epikateşindir. Flavonoidlerin çoğundan farklı olarak, C<sub>2</sub> ve C<sub>3</sub> arasında çift bağ yoktur ve flavanollerin C halkasında C<sub>4</sub> karbonil yoktur. Şekil 2.9’da yaygın olarak görülen bazı flavan-3-oller verilmiştir. Kateşin, trans konfigürasyonlu; epikateşin ise cis konfigürasyonlu izomerdir (Tsao 2010). Gıdalarda en yaygın olarak bulunan flavonoid grubunu oluşturan, hemen hemen her meyvede bulunan kateşinler renksiz bileşiklerdir. Kateşinler kimyasal ve enzimatik olarak havadaki oksijen ile kolaylıkla reaksiyona girebilirler, reaksiyon sonunda oligomer ve polimerlere kondense olarak proantosiyanidinleri oluştururlar (Zoecklein vd. 1990). Flavanoller, vinifikasyon işlemi



sırasında üzümlerden ekstrakte edilirler ve şarabın duyuşsal özelliklerine büyük ölçüde katkıda bulunurlar. Ancak şarap yapımında arta kalan üzüm cibresinde büyük miktarda kalıntı olarak bulunurlar. Bu bileşikler üzüm kabuğunda da bulunurlar fakat yüksek konsantrasyonlarda tohumda bulunurlar. Bununla birlikte, tohum ve deride kateşinler, gallokateşinler ve proantosiyanidinler olmak üzere farklı flavan-3-ol bileşimlerine sahipken, tohumlar sadece kateşinler ve prosiyanidinleri içerir (González-Manzano vd. 2004). Üzüm çekirdeği ekstraktları, çoğu gallat esterleri veya glikozitler şeklinde (+) - kateşin ve (-) - epikateşin gibi polihidroksi flavan-3-ollerin oligomerleri ve polimerleri olan büyük bir proantosiyanidin kaynağı olarak bildirilmiştir (Brannan 2008). Bazı kaynaklarda proantosiyanidinler bu grup altına dahil ederlerken (González-Manzano vd. 2004), fakat bazı kaynaklar tarafından proantosiyanidinler tanenler grubuna dahil edilirler (Beres vd. 2017).



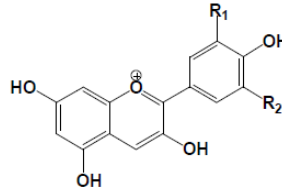
Şekil 2.9 Yaygın olarak görülen bazı flavan-3-oller (Shahidi ve Nacz 1995)

### 2.2.2.1.3 Antosiyaninler

Antosiyaninler bir aglikon (antosiyanidin), şeker ve bazen fenolik ve minör organik asitlerden oluşur (MacDougall 2002). Bitkilerdeki antosiyanidinler, çoğunlukla, antosiyaninler olarak glikosidik formlarda bulunur (Tsao 2010). Şekil 2.10'da antosiyanidinler ve antosiyanin pigmentlerinin yapısı verilmiştir. Antosiyaninler bağlanan şekerlere ve bağlanma pozisyonuna göre adlandırılırlar (Shahidi ve Nacz 1995). Şeker kısmı genellikle ramnoz, galaktoz, ksiloz ve arabinozdan meydana gelir.

Ayrıca *p*-kumarik, kafeik ve ferrulik asit gibi asitlerle de açillenmiş olabilir (Fennema 1985, Shahidi ve Nacz 1995, Kurilich vd. 2005).

Kırmızı üzümlerin rengi büyük bir bitki pigmenti grubunun, antosiyaninlerin varlığına bağlanır. Şekil 2.10'da belirtilen antosiyanidinler arasında malvidin (3-glukozit olarak) *V. vinifera* çeşitlerinde bulunan en yaygın pigmenttir (Zoecklein vd. 1990). Antosiyaninlerin rengi pH'ye bağlıdır, yani asidik olarak kırmızı ve bazik koşullarda mavidir. Antosiyaninler asidik çözeltilerde kimyasal olarak karardır (Tsao 2010). Üzüm derisinde bulunan ana antosiyaninler; malvidin, petunidin, siyanidin, peonidin ve delfinidin'in 3-o-glikozitleridir. Ancak çeşitlilik, olgunluk ve iklim gibi faktörler bu bileşiklerin varlığını değiştirebilir (Souza vd. 2014, Xu vd. 2015).

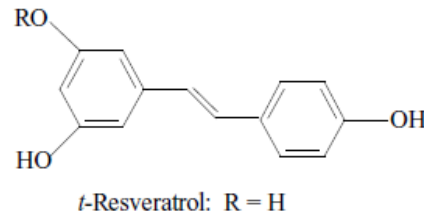


Antosiyanidin	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Renk
Siyanidin	OH	H	Kırmızı
Delfinidin	OH	OH	Mavi-menekşe
Pelargonidin	H	H	Turuncu- kırmızı
Malvinidin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Mor
Peonidin	OCH <sub>3</sub>	H	Pembe- kırmızı
Petunidin	OH	OCH <sub>3</sub>	Mavi- mor

Şekil 2.10 Antosiyanidinler ve antosiyanin pigmentlerinin yapısı (Tsao 2010)

### 2.2.2.2 Stilbenler

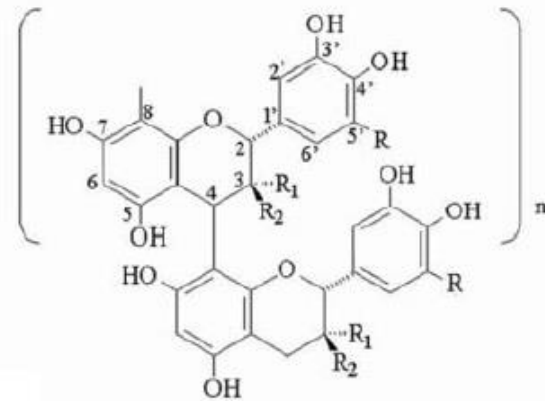
Stilbenler, iki karbonlu metilen köprüsüyle birbirine bağlanmış iki fenil parçası içerir. İnsan diyetinde stilbenlerin görülmesi oldukça düşüktür. Bitkilerdeki çoğu stilben antifungal fitoaleksinler (sadece enfeksiyon veya yaralanmaya yanıt olarak sentezlenen bileşikler) gibi davranırlar (Pandey ve Rizvi 2009). Şekil 2.11’de stilbenlerin kimyasal yapısı verilmiştir. Resveratrol (3,4',5-trihidroksistilben), stilbenler arasında en çok bilinenidir. Siyah üzümün soğuk hava koşulları, mantar enfeksiyonları gibi etkenlere bağlı olarak kendini korumak için ürettiği resveratrol maddesi, insanlarda faydalı etkilere sahiptir. Şarapta stilbenlerin içeriği önemli ölçüde değişir ve iklim, üzüm çeşitliliği, mantar enfeksiyonları (Jeandet vd. 1995, Perrone vd. 2007), UV ışığı, ağır metal iyonları (Püssa vd. 2006) ve enolojik yöntemler (Cantos vd. 2003, Gambuti vd. 2004) gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Resveratrol yaygın olarak antioksidan olarak bilinir, yetmişden fazla bitki türünde bulunur ve kırmızı şarapta, üzümelerde ve yer fıstığında yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Resveratrolün üzüm meyveleri içindeki sentezi esas olarak kabuk hücrelerinde bulunur (50-100 g/kg net ağırlık) ve meyve etinde yoktur veya oranları çok düşüktür (Baliga vd. 2015). Kırmızı üzümün kabuğu özellikle resveratrol açısından zengindir (Bertelli vd. 1998, Bhat ve Pezzuto 2002). Nörodejeneratif hastalıklara, kanser ve kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkileri vardır (Bhat ve Pezzuto 2002, Schrauwen ve Timmers 2014) Antioksidan, antikarsinojenik ve antimutagenik etkilerinden dolayı stilbenlerin insan diyetinde merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir (Buiarelli vd. 2007).



Şekil 2.11 Stilbenlerin kimyasal yapısı (Zou vd. 2002)

### 2.2.2.3 Tanenler

Tanenler moleküler yapılarına göre; hidrolize olmayan tanenler (proantosiyanidinler ve kondense tanenler) ve hidrolize olabilen tanenler olarak iki gruba ayrılırlar (Aydın ve Üstün 2007). Hidrolize olabilir tanenler *V. vinifera*'da bulunmazlar, meşeden gelirler. Hidrolize tanenler iki gruba ayrılırlar; gallotanninler (gallik asit türevi olan tanenler) ve elajitanninler (elajik asit türevi olan tanenler) (Pocock vd. 1994). Proantosiyanidinler kolayca hidroliz ile ayrışmazlar. Asitte ısıtma gibi sert koşullar altında hidroliz, antosiyanidinler verir (Vermerris ve Nicholson 2006). Kateşinlerden veya löykoantosiyanidinlerden oluşan polimerik yapılara denir. Şekil 2.12'de görüldüğü gibi sadece epikateşin/kateşin kondensasyonu ile oluşuyorsa prosiyanidin, kateşin/gallokateşin kondensasyonu ile oluşuyorsa prodelfinidin denir (Shahidi ve Nacz 1995). Polimerik flavan-3-ol (kondense) tanenler genel olarak çekirdeklerde bulunur, saplarda ve kabuklarda daha az miktarda bulunur. Kantz ve Singleton (1991) tarafından dört çeşit için belirlenen değerlere göre, yoğunlaştırılmış tanenlerin %58,5' inin çekirdeklerde, %21' inin saplarda, %16,5' inin yapraklarda ve %4' ünün üzüm kabuklarında olduğunu göstermektedir. Ayrıca tanenler fiziksel stabilitede rol oynarlar (Zoecklein vd. 1990).



**Prosiyanidin:** R=H

**Prodelfinidin:** R=OH

Şekil 2.12 Proantosiyanidin olan prosiyanidin ve prodelfinidin iskelet yapısı (Dai ve Mumper 2010)

### 2.3 Ekstraksiyon

Fenolik bileşenleri diyet takviyeleri veya nutrasötikler, gıda maddeleri, farmasötik ve kozmetik ürünlerin hazırlanması için kullanmak için, hammaddelerden verimli bir şekilde ekstrakte edilmeleri gerekir (Marathe vd. 2017).

Ekstraksiyon, çözünürlük farkına bağlı olan bir ayırma işlemi olarak tanımlanabilir. Ekstraksiyon, bir veya daha fazla bileşenin sıvı veya katı bir karışımdan seçici olarak ayrıldığı, sıvı karışmayan bir çözücü vasıtasıyla beslemenin olduğu bir işlemdir. Ekstraksiyon basamağının sonucunda iki faz oluşur: biri ayrıştırılan bileşenlerin bulunduğu ekstrakt fazı, diğeri ise rafinattır. Ayrılması istenen karışım sıvı bileşenlerden oluşuyorsa sıvı-sıvı ekstraksiyon; katı bir malzemedeki bir madde veya grup ayrılacaksa bu işleme katı-sıvı ekstraksiyon denir (Jain vd. 2012).

Polifenollerin fenolik yapıları onları nispeten hidrofilik yapar, böylece aglikonlar, glikozitler ve oligomerler dahil serbest polifenoller su, metanol, etanol, asetonitril ve aseton gibi polar organik çözücüler veya bunların su karışımı kullanılarak ekstrakte edilir. Polifenoller için çoğu ekstraksiyon asidik koşullar altında gerçekleştirilir, çünkü bunlar genellikle düşük pH'da daha stabildirler ve asidik ortam polifenollerin nötr kalmasına yardımcı olur, böylece kolayca organik çözücülere ekstrakte edilir. Bu, zayıf asit veya düşük konsantrasyonlarda güçlü bir asit kullanılarak yapılır. Yüksek asit konsantrasyonu glikozitlerin veya asetilglikozitlerin (asetillenmiş şekerlere bağlı glikozit) hidrolizine neden olabilir ve bu nedenle doğal polifenol profillerinin farklı fragmanları oluşabilir. Öte yandan, tüm polifenoller serbest biçimde mevcut değildir. Ferulik asit ve tahıllardaki liganlar gibi fenolik asitler genellikle yapısal malzemelere bağlanır (D'Archivio vd. 2007).

Farklı materyallerden farklı bileşikler elde etmek için farklı ekstraksiyon yöntemleri uygulanmalıdır. Fenolik bileşikler için tek veya standart bir ekstraksiyon yöntemi yoktur. Elde edilmek istenilen aktif maddeye göre yöntemler ve çözücüler değişiklik gösterir (Ignat vd. 2011). Fenolik bileşiklerin çözünürlükleri çözüldükleri maddenin

polaritesinden etkilenir. Bu nedenle tüm bitki bileşikleri için tek bir prosedürün uygulanması çok muhtemel değildir (Garcia-Salas vd. 2010).

Geleneksel ekstraksiyon metotlarından biri olan maserasyon yönteminde; örnek, küçük boyutlar haline getirilerek çözücü içerisinde çoğunlukla oda sıcaklığında belli bir süre bekletilerek ekstrakte edilmektedir. Maserasyon işlemi oldukça kolay ve ekonomik bir yöntemdir fakat ürün verimi oldukça düşüktür (Cannell 1998). Bir diğer geleneksel ekstraksiyon metodu olan perkolasyon yönteminde; örnek perkolatöre konular ve belli zamanlarda kullanılan çözücü yenilenecek ekstraksiyon gerçekleştirilmektedir (Kayahan ve Tekin 2006). Perkolasyon sonucunda elde edilen ürün kalitesi çok yüksektir fakat uzun ekstraksiyon süresi ve sürekli değiştirilen çözücünden dolayı yüksek miktarlarda çözücü kullanılması bu yöntemin önemli dezavantajlarından biridir (Handa vd. 2008). Soxhlet yöntemi olarak da bilinen sürekli ayırma yöntemi Soxhlet düzeneğinde gerçekleştirilir. Öncelikle örnek ortada bulunan örnek kısmına koyulur, ardından çözücü kısmına kullanılacak çözücü koyulur ve çözücü kaynama sıcaklığının üzerindeki derecelere kadar ısıtılır ve oluşan buharı sağ taraftaki borudan yoğunlaşmanın olduğu kondensatöre ulaşır ve yoğunlaşmaya başlar, örneğe doğru damlar. Çözücü örneği ıslatır ve daha sonra çözücü seviyesi sifonun tepesine ulaşır ulaşmaz, çözücü tüm örnek bölmesini boşaltarak, çözücü şişesine geri damlamaya başlar. Böylece sıcak çözücü birkaç kere örnek içerisinde sirküle olur. Yani örneğin sürekli çözücüyle teması sağlanır (Büyüktuncel 2012). Maliyet düşüklüğü, kullanım açısından, eş zamanlı birden fazla ve yüksek miktarda ekstrakt eldesi gibi avantajları vardır. Uzun işlem süresi, yüksek miktarda hammadde ihtiyacı ve olumsuz çevresel etkileri de en önemli dezavantajlarından biridir (Kutlu vd. 2017).

Uygulanacak ekstraksiyon metotlarında optimum ekstraksiyon verimi için birçok parametre göz önünde bulundurulmalıdır. Ekstraksiyon metodu, çözücü tipi (çözücü tipi çevreye zararlı olmamalıdır), çözücü miktarı, ekstraksiyon sıcaklığı, hammaddelerde istenen bileşiğin ekstresi, matris parametreleri ve doğru kombinasyonları ekstraksiyon verimini etkileyen en önemli parametrelerdir. Yukarıda belirtilen parametreler dikkate alındığında farklı ekstraksiyon metodları kullanılmaktadır. En yaygın olarak; çözücü (geleneksel) ekstraksiyonu, mikrodalga destekli ekstraksiyon, ultrason destekli ekstraksiyon, süperkritik sıvı ekstraksiyonu, subkritik su ekstraksiyonu ve basınçlı sıvı

ekstraksiyonu (hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu) kullanılmaktadır (Dai ve Mumper 2010).

Enzim destekli ekstraksiyon, geleneksel yöntemlerin sınırlamalarının üstesinden gelmek için bir alternatif olarak düşünülebilir. Bu yöntem yeşil bir yaklaşımdır ve çevresel sorunları azaltmaya yardımcı olur. Biyoaktif maddelerin ekstraksiyonu için en sık kullanılan enzimler selülozlar, hemiselülozlar ve pektinazlardır. Enzimlerin ana kaynakları bakteri ve mantarlardır, ancak hayvan organlarından ve/veya sebze/meyve ekstraktlarından da elde edilebilir (Marathe vd. 2017). Bu yöntem, enzimlerin istenen ürünlerin degradasyonuna yol açabilecek güçlü koşullar altında çalışmadan belirli bir şekilde reaksiyona girmesi nedeniyle yenilikçi ve kullanışlıdır. Ek olarak selülozlar, hemiselülozlar ve pektinazlar gibi proteinler, hücre duvarını, bileşenlerinin hidrolizi ile büyük bir geçirgenliğe yol açmakta ve metabolitlerin bitkilerden daha kolay salınmasına izin vermektedir. Lipazlar, proteazlar, fosfolipazlar gibi enzimlerin uygulanması, ekstraksiyon için çözücü kullanımını azaltmaya izin verir. Bu proteinler mantarlardan, bakterilerden, hayvanlardan ve sebzelerden veya genetik mühendislik yöntemlerinden elde edilebilir ve seçici katalizleri sayesinde, yüksek bir verimde ve "yeşil" bir yaklaşımla çok fazla enerji harcamadan belirli bir biyoaktif bileşiği geri kazanmak için kullanılabilirler (Puri vd. 2012).

#### **2.4 Enzimler ve Pektinazlar (Pektinolitik Enzimler) Hakkında Genel Bilgiler**

Enzimler, kimyasal katalizörlere göre birçok avantaj sunan yüksek verimli ve spesifik biyolojik katalizörlerdir. Yenilenebilir ve biyolojik olarak parçalanabilir kaynaklardan gelirler; özgüllükleri, çevre dostu bir işleme substrat verimini artırır ve yan ürün üretimini azaltır (Cherry ve Fidantsef 2003). Düzgün çalışma koşulları altında düşük konsantrasyonlarda kullanımından dolayı kontrol edilmesi kolaydır ve ek olarak enzimler sanayi sektörü tarafından güvenli ve kabul edilir (Simpson vd. 2012, Ackaah-Gyasi vd. 2015). Tüm endüstriyel enzimlerin yaklaşık %75'i hidrolitik enzimlerdir. Gıda endüstrisinde uygulanan en yaygın kullanılan enzimatik faaliyetler, diğerlerinin yanı sıra

glukosidazlar, pektinazlar, amilazlar, glukoamilazlar, proteazlar, lipazlar, glukanazlar, hemiselülazlar ve oksidazlardır (Vijayaraghavan vd. 2016).

Bitki hücre duvarları selüloz, hemiselüloz ve pektin gibi lignin (aromatik polimerler) ve proteinler yapılı bir dizi karmaşık polisakkaritten oluşur. Bu yapılar, hücrelere hücre içi bileşenlerin ekstraksiyonunda stabilite ve direnç kazandırır. Bu nedenle, spesifik hidrolitik özelliklere sahip enzimler, sitosolik boşluklardan ve hatta hücre duvarlarına bağlı olan biyoaktif bileşenlere erişmek yani bu matrisi parçalamak için kullanılır (Panja 2017, Garcia 2018, Gligor vd. 2019).

Pektinazlar kriterlere göre üç başlık altında sınıflandırılır: tercih edilen substrat pektin, pektik asit veya oligo-d-galakturonat olup olmadığı, bölünmenin rastgele olup olmadığı (endo-, depolimerize edici enzimlerin sınıflandırılması) veya pektinazların trans eliminasyon veya hidroliz ile hareket edip etmediği (ekzo- veya sakkarifiye edici enzimler) (Whitaker 1990, Blanco vd.1999). Pektinazlar, depolimerizasyon (hidrolazlar ve liyazlar) ve deesterifikasyon (pektinesterazlar) reaksiyonları yoluyla pektik madde bozulmasını katalize eden bir enzim grubudur (Pedrolli vd. 2009). Çizelge 2.2’de pektinolitik enzimler için geniş bir sınıflandırma verilmiştir.

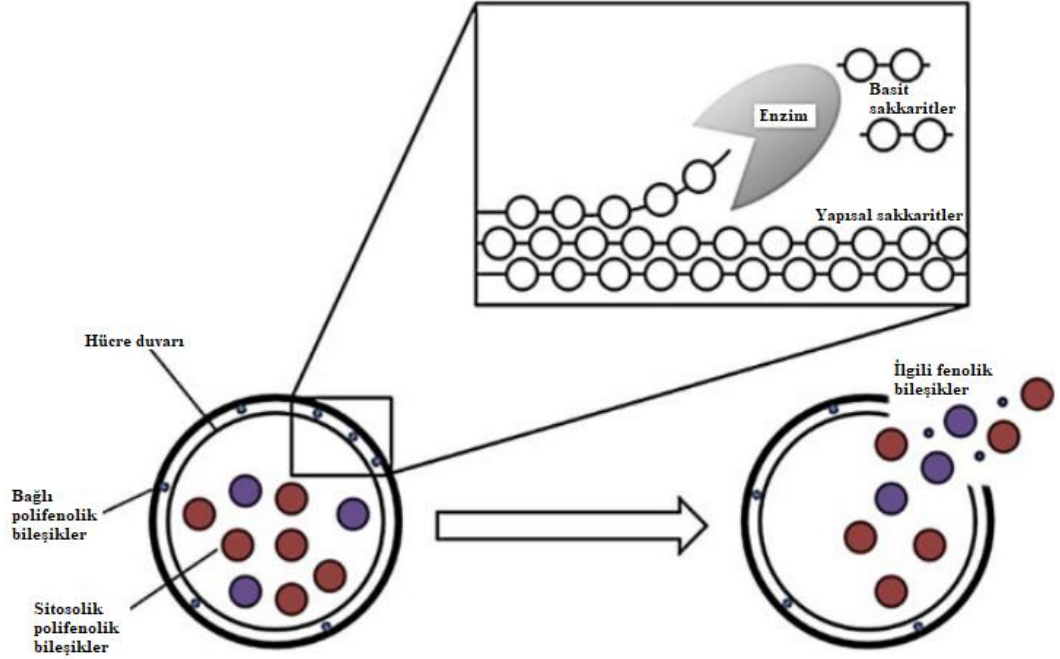
Bitki hücre duvarları, selüloz, hemiselüloz ve pektin gibi kompleks yapısal polisakkaritlerin yanı sıra lignin (aromatik bir polimer) ve hatta proteinlerden oluşur. Bunlar, hücrelere hücre içi bileşenlerin ekstraksiyonuna karşı stabilite ve direnç kazandıran yapılardır. Bu nedenle spesifik hidrolitik özelliklere sahip enzimler, sitosolik boşluklardan ve hatta hücre duvarlarına bağlı olanlardan biyoaktif bileşenlere erişmek için bu matrisi parçalamak için kullanılır (Panja 2017, Garcia 2018).

Selülazlar, hemiselülazlar ve pektinazlar ve bitki hücresi polisakkaritlerindeki bağların hidrolizini katalize edebilen diğer enzimler, hücre duvarı yapısının farklı katmanlarındaki yapısal polisakkaritleri parçalamak için kullanılabilir (Pinelo ve Meyer 2008). Şekil 2.13’te bitki hücre duvarlarının enzimatik bozulması ve biyoaktif bileşiklerin salınımı verilmiştir.



Çizelge 2.2 Pektinolitik enzimler için geniş bir sınıflandırma (Jayani vd. 2005)

Enzim	Etki Mekanizması	Birincil substrat
Esteraz		
1. Pektin metil esteraz	Hidroliz	Pektin
Depolimerize edici enzimler		
a. Hidrolazlar		
1. Protopektinazlar	Hidroliz	Protopektin
2. Endopoligalakturonaz	Hidroliz	Pektik asit
3. Ekzopoligalakturonaz	Hidroliz	Pektik asit
4. Ekzopolygalacturonan-digalacturono hidrolaz	Hidroliz	Pektik asit
5. Oligogalakturonat hidrolaz	Hidroliz	Trigalakturonat
6. $\Delta 4:5$ doymamış oligogalakturonat hidrolazlar	Hidroliz	$\Delta 4:5(\text{Galakturonat})_n$
7. Endopolimetil-galakturonazlar	Hidroliz	Yüksek esterleştirilmiş pektin
8. Endopolimetil-galakturonazlar	Hidroliz	Yüksek esterleştirilmiş pektin
b. Liyazlar		
1. Endopoligalakturonaz liyaz	Trans-eliminasyon	Pektik asit
2. Eksopoligalakturonaz liyaz	Trans-eliminasyon	Pektik asit
3. Oligo-D-galaktosiduronat liyaz	Trans-eliminasyon	Doymamış digalakturonatlar
4. Endopolimetil-D-galaktosiduronat liyaz	Trans-eliminasyon	Doymamış poli-(metil-D-digalakturonatlar)
5. Ekzopolimetil-D-galaktosiduronat liyaz	Trans-eliminasyon	Doymamış poli-(metil-D-digalakturonatlar)



Şekil 2.13 Bitki hücre duvarlarının enzimatik bozulması ve biyoaktif bileşiklerin salınımı (Gligor vd. 2019)

## 2.5 Enzim Destekli Ekstraksiyon

Enzim destekli ekstraksiyon esas olarak enzimlerin hücre duvarı bileşenlerini hidrolize etme ve hücre duvarının yapısal karmaşıklığını bozma kabiliyetine bağlıdır. Bu işlemler, ilgili bileşiğinin kolayca serbest bırakılmasını sağlar (Gardossi vd. 2010). Bu ekstraksiyon sistemi, ham malzemenin karmaşık yapısını parçalayarak daha yüksek verim sağlar, hammaddenin istenmeyen bileşenlerini seçici olarak ortadan kaldırır, yüksek katalitik verimlilik gösterir ve doğal ürünlerin orijinal etkinliğini korur, ekstraksiyon süresini ve kullanılan çözücünün hacmini azaltır (Marathe vd. 2017).

Enzimlerin hücre duvarının bozulması üzerindeki etkisini doğrudan belirleyen çeşitli faktörler vardır ve hedeflenen fenollerin salınımı en uygun koşullar bulunarak değiştirilebilir. Enzimatik karışımlar, bileşimleri, bileşenlerinin enzimatik aktivite türleri ve ilgili oranları nedeniyle hidrolitik özellikler üzerinde önemli bir etkiye sahiptir.

Hücresel duvarların tam parçalanmasını sağlamak için, seçilen enzimlerin tamamlayıcı aktiviteler sunması gerekir (Muniglia vd. 2014, Sánchez-Madrigal vd. 2018). Uygun enzim kompleksinin kullanılması, hücre duvarındaki yapıyı bozar ve sulu ortamdaki ilgi bileşimini serbest bırakır ve bu da ürünün kalitesini artırır (Marathe vd. 2017). Fenolik antioksidanların hücre duvarı matrislerinden kantitatif salınımını etkilemenin yanı sıra, karışık enzim preparatları ile farklı enzim uygulamalarının fenollerin antioksidan gücünü farklı şekilde etkilediği gösterilmiştir (Landbo ve Meyer 2001).

Ekstraksiyon sıcaklığı, çözünmüş biyoaktif bileşiklerin enzimatik aktivitesi ve reolojik özellikleri üzerindeki etkisi ile enzim destekli ekstraksiyonu etkileyen başka bir parametredir. Genel olarak, enzimatik aktivite termal değerlerle orantılı olarak artar. Ayrıca, ekstraksiyon ortamlarının viskozitesi sıcaklık artışı ile azalır ve biyoaktif bileşikler böylece daha kolay çözülür. Bununla birlikte, aşırı derecede artan termal değerler, üç boyutlu enzimatik konfigürasyonların değişimini, hidroliz işlemlerinin durdurulmasını ve biyoaktif bileşiklerin parçalanmasını belirleyebilir (Muniglia vd. 2014).

Ekstraksiyon süresinin, enzimatik konsantrasyon ile önemli bir ilişkisi vardır. Mesela ekstraksiyon süresi iki kat arttırılırsa, birincisi başlangıç değerinin yarısına kadar azaltılabilir. Bununla birlikte, ekstraksiyon süresi engelleyici bir faktör olabilir, çünkü uzun süreler genellikle yüksek sıcaklıklarda veya oksidasyon süreçlerinde uzun süre maruz kalma nedeniyle biyoaktif bileşiklerin parçalanmasına neden olur (Muniglia vd. 2014).

pH, bitki hücre duvarları üzerindeki etkisi ve enzimatik etkinliği nedeniyle önemli bir enzim destekli ekstraksiyon parametresini temsil eder. Asidik bir ekstraksiyon ortamı, hidrojen bağlarının istikrarsızlaşmasına yol açar ve bu da hücresel duvar plastisitesinin artmasına neden olur. Ek olarak, asidik pH, enzimlerin genellikle asidik pH değerleri gerektirdiğinden dolayı, protein konfigürasyonlarını ve substratlara daha fazla bağlanma kapasitesini değiştirerek katalitik aktiviteyi etkiler (Muniglia vd. 2014). Enzimatik hidrolizde kullanılacak olan her enzimin farklı bir optimum çalışma pH aralığı bulunmaktadır (Talley ve Alexov 2010).

Nicolini ve Mattiyi (1977)'nin yaptığı çalışmada Marzemino, Schiava, Sangiovese, Corvina ve Rondinella kültür çeşitlerinin kırmızı şarap yapımı üzümlerinden elde edilen şaraplardan fenolik bileşenlerin enzim destekli ekstraksiyonu yarı endüstriyel ölçekte (70 kg üzüm/parti) gerçekleştirilmiştir. 5g/L konsantrasyonda eklenen pektinaz enziminin eklenmesiyle, antosiyaninlerin ve tanenlerin ekstraksiyonu daha hızlı gerçekleşmiştir ve ekstraksiyon verimi artmıştır.

Munoz vd. (2004)'nin yaptığı çalışmada, Cabernet Sauvignon, Ribier ve Carmenere olmak üzere 3 farklı üzüm çeşitinden antosiyanin bakımından zengin ekstraktlar elde etmek için farklı enzim preparatlarının kullanımı incelenmiştir. Çalışmada farklı enzim preparatları olarak; Pektinex BE3-L (*Aspergillus niger*'den elde edilen pektinesteraz, pektinliyaz, hemiselülaz ve selülaz), Vinozim EC (*A. niger* ve *Trichoderma longibrachiatum*'dan elde edilen pektinaz ve selülaz) ve Vinozim G (*A. niger*'den elde edilen pektinliyaz, poligalakturonaz, hemiselülaz ve selülaz) kullanılmıştır. Ribier üzüm derisinin Vinozyme EC ile 2 saat ekstraksiyonun ardından optimum ekstraksiyon sonuçları elde edilmiştir.

Kammerer vd. (2005)'in yaptıkları bir çalışmada, şaraphane atıklarında bulunan fenolik bileşenlerin enzim destekli ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Üzüm kabuğunun enzimatik hidrolizinin optimizasyonu, yani pektinolitik ve selüloolitik enzimlerin seçimi, enzim-substrat oranı ve enzim etkisinin zaman-sıcaklık rejimi incelenmiştir. Enzimatik aktivite, üzüm cibresinin viskozitesinin ölçülmesi ve hücre duvarından salınan oligomerik pektin ve selüloz bozunma ürünlerinin ölçülmesi ile izlenmiştir. 50°C'de pektinolitik enzim preparatı için 2500 ppm ve selüloolitik enzim preparatı için 5000 ppm (kuru madde bazında) oranında enzim kullanarak optimum koşullar elde edilmiştir. Üzüm cibresinin sıcak su ile ön ekstraksiyon ardından hücre duvarını parçalayan enzimlerle muamele edilmesi, fenolik bileşiklerin geri kazanım oranını arttırmıştır. Üzüm cibresinden enzim destekli ekstraksiyon ile fenolik bileşenlerin geri kazanım oranı, endüstride önemli olduğu düşünülen sülfite uygulaması ile geri kazanım oranı açısından karşılaştırılabilir olup, önemli bir alternatif olarak uygulanabileceği belirtilmiştir.

Maier vd. (2008)'nin yaptığı çalışmada, üzüm cibresinden fenolik bileşenlerin enzim destekli ekstraksiyonu ve optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Öncelikle sulu ortamda ön-ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir ardından cibreye enzimatik işlem uygulanmıştır. Optimizasyonun ardından; 4.0 pH, 40° C sıcaklıkta, pektinolitik ve selüloolitik enzimler (2:1) ile hazırlanan enzim karışımı (4.500 mg/kg kuru madde dozaj oranı) ile 2 saatlik ekstraksiyonun ardından maksimum miktarda fenolik bileşen elde edilmiştir. Gerçekleştirilen enzimatik ekstraksiyon; fenolik asitler, antosiyanin olmayan flavonoidler ve antosiyaninler için sırasıyla %91.9, %92.4 ve %63.6'ya ulaşan ekstraksiyon veriminde önemli bir iyileşme sağlanmıştır. Elde edilen verimler sülfite destekli ekstraksiyondan elde edilenlerle karşılaştırılmış olup, enzim destekli ekstraksiyon uygulaması sülfite uygulamasına uygun bir alternatif olabileceği vurgulanmıştır.

Costoya vd. (2010)'nin yaptıkları çalışmada, 2 farklı üzüm cibresinden (Cabernet-Sauvignon ve Garnatxa) elde edilen fenolik ve antioksidan bileşiklere 3 farklı enzim preparatının (Cellubrix®, Neutrase®, Viscozyme®) etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda enzimlerin tek başına kullanıldığı ekstraksiyonlar sonucunda elde edilen bileşiklerin, kontrol (enzim ilavesiz) örneğine kıyasla daha az miktarda elde edildiği görülmektedir. Fakat farklı enzim kombinasyonları denendiğinde toplam fenolik bileşen miktarında yaklaşık %25 ile %65 arasında bir artışın olduğu belirtilmiştir. Aynı şekilde enzimlerin bireysel kullanımı yerine karışım şeklinde kullanılmasının antioksidan aktiviteyi de arttırdığı belirtilmiştir. Sonuç olarak üzüm cibresinden biyoaktif bileşen eldesinde enzimlerin sinerjistik etkisinin olduğu vurgulanmıştır.

Laroze vd. (2010)'nin yaptığı çalışmada, ahududu katı atıklarında enzimatik uygulamanın fenolik antioksidan ekstraksiyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Ahududu lifi bileşimi, selüloz, hemiselüloz ve pektinaz aktivitelerine sahip biyokatalizörlerin enzimatik olarak yardımcı bir antioksidan ekstraksiyonu gerçekleştirmek için yararlı olacağını göstermiştir. Enzim kullanılan ve kullanmayan ekstraksiyonlardan elde edilen ekstraktların toplam fenol içeriği ve antioksidan aktivite ölçümleri karşılaştırılmıştır. Kullanılan biyokatalizörler arasında fenolik bileşenlerin en iyi kazanımı Grindamyl (pektinaz) ve Maxoliva (pektinaz) enzimleri ile sağlanmıştır. 50°C'de 18 saat boyunca

hidro-etanolik karışım (75:25, v/v) ile enzim destekli ekstraksiyon, fenolik içeriği %35'e kadar arttırmıştır ve antioksidan kapasiteyi ise DPPH• yöntemi ile ölçüm yapıldığında %50, ABTS yöntemi ile yapıldığında %15 ve FRAP yöntemi ile ölçüm yapıldığında %30 oranında arttırdığı saptanmıştır. Daha yüksek bir enzim konsantrasyonunun kullanılması ile fenolik antioksidanların ekstraksiyonu önemli ölçüde iyileştireceği vurgulanmıştır.

Chamorro vd. (2012)'nin yaptığı çalışmada, üzüm cibresinde bulunan fenolik bileşenlerin enzim destekli ekstraksiyonunu gerçekleştirilmiştir ve antioksidan kapasite ölçümü yapılmıştır. Ekstraksiyon; selülaz, pektinaz ve tannaz enzimleri kullanılarak 35°C'de 24 saat boyunca 5.5 pH'da gerçekleştirilmiştir. Üzüm cibresinde tannaz ve pektinaz kullanımı kateşinin galloillendirilmiş formunu serbest formuna dönüştürerek gallik asidi serbest bırakmıştır ve antioksidan aktiviteyi arttırmıştır. Sadece selülaz kullanılması elde edilen fenolik bileşen miktarı ve antioksidan aktivite için etkili olmadığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar pektinaz, tannaz ve enzim kombinasyonlarının üzüm yan ürünlerinden polifenollerinde edilmesi, antioksidan kapasitenin ve besin değerinin iyileştirilmesi potansiyeli hakkında ilgili veriler sağlamaktadır.

Gómez-García vd. (2012)'nin yaptığı çalışmada, üzüm atıklarından fenolik bileşikleri serbest bırakmak için Celluclast® 1.5 L, Pectinex Ultra® ve Novoferm® gibi farklı ticari enzimler kullanılmıştır. Hidrolizatlarda, toplam fenolik madde tayini ve antioksidan aktivite ölçümü sırasıyla Folin–Ciocalteu testi ve DPPH• radikal süpürücü testi ile analiz edilmiştir. Antioksidan aktivite ile salınan fenolikler arasında iyi bir korelasyon elde edilmiştir. Kaydedilen en yüksek antioksidan aktivite sırasıyla Celluclast® 1.5 L, Pectinex Ultra® ve Novoferm® için 12 saatte  $86.8 \pm 0.81$ ,  $82.9 \pm 0.31$  ve  $90 \pm 0.37$  olarak bulunmuştur. Novoferm®, üzüm atıklarından fenolik bileşen eldesi için en güçlü etkiye sahip olarak bulunmuştur. Ayrıca yüksek performanslı sıvı kromatografisi-elektrospray-kütle spektrometresi, antioksidan aktivitenin artışının o-kumarik asit salınımı ile ilişkili olduğunu açıkça ortaya koymuştur.

Fernández vd. (2015)'nin yaptığı bir çalışmada, País üzümünün kabuklarından ve tohumlarından proantosiyandinler elde etmek için pektinaz, selülaz ve tannaz enzimlerinin kullanıldığı enzim destekli ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Üzüm

kabuğunda pektinaz kullanımı, toplam fenollerin salınımında 0.01 g/ml katı/sıvı ve %1 enzim/substrat üzerinde en etkili etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Üzüm çekirdeğinde ise, bu üç enzimin fenolik ekstraksiyonu arttırmada istatistiksel olarak anlamlı bir etkide bulunduğu gösterilmiştir ( $p < 0.05$ ).

Tomaz vd. (2015)'nin yaptığı çalışmada, üzüm kabuğundan flavonoidlerin enzim destekli ekstraksiyonu ve optimizasyonu çalışılmıştır. Üzüm kabuğu çok sayıda farklı flavonoid içerdiği için, bu bileşiklerin ekstrakte edilmesinde hammadde olarak kullanılabilmesi belirtilmiştir. Optimizasyonda; enzim tipi, enzim dozajı, sıcaklık, ekstraksiyon süresi ve pH gibi parametreler dikkate alınmıştır. Optimum flavonoid ekstraksiyonu, Lallzyme EX-V enzimi kullanılarak, 45°C sıcaklıkta, 3 saat süre boyunca, pH 2.0 ve 10.52 mg/g enzim dozu kullanılarak elde edilmiştir. Geleneksel yöntemlere değerli bir alternatif sağlayan, çevre dostu ekstraksiyon çözücüsü kullanılan enzim destekli ekstraksiyon yönteminin, basit flavonoidlerin geri kazanımı için daha ucuz, basit, doğru ve seçici bir yöntem olabileceği vurgulanmıştır.

Martins vd. (2016)'nin yaptığı çalışmada, tannaz, pektinaz+selülaz veya bu enzimlerin karışımından oluşan enzim preparatlarının fenolik bileşen bakımından zengin olan kırmızı, beyaz veya kırmızı+beyaz üzümlerden arta kalan üzüm cibresinde bulunan fenolik bileşenlerin ekstraksiyonuna etkisi incelenmiştir. Tannaz enzimi kullanının; gallik asit, kafeik asit, kuersetin ve trans-resveratrolü serbest bırakarak üzüm cibresindeki toplam fenolik bileşiklerin artmasında en güçlü etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Fakat pektinaz+selülaz enzim karışımının toplam fenolik madde üzerinde kontrol örneğine kıyasla herhangi bir anlamlı etkisi olduğu gözlenmemiştir. Pektinaz+selülaz enzim karışımı, kondense tannin üzerinde negatif bir etkisi olduğu gözlenirken hidrolize edilebilir tanninler için istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi bulunmamıştır. Pektinaz+selülaz enzim preparatı kırmızı üzüm cibresindeki kateşin içeriğini arttırmıştır, bütün enzimleri içeren preparat kullanımı ise beyaz üzüm cibresinden prosiyanidin B2 eldesini arttırmıştır. Tannaz enzimi, üzüm cibresinin antioksidan aktivitesini arttırmada kullanılan enzim preparatları arasında en etkili enzim olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, enzim destekli ekstraksiyon, özellikle tannaz enzim ile, üzüm cibresinin polifenolik içeriğini ve antioksidan aktivitesini arttırdığı görülmüştür.

Ştambuk vd. (2016)'nin yaptığı çalışmada, enzimler alternatif çözücüler olarak kullanarak ve daha az enerji harcayarak doğal üründen elde edilen yüksek kaliteli bir ekstrakt sağlamak için bir yeşil ekstraksiyon yöntemi olan enzim destekli ekstraksiyon ile üzüm çekirdeğinden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bu yöntem, üzüm çekirdeklerinden fenolik bileşiklerin maksimum geri kazanımını sağlamak için hangi koşulların mümkün olan en iyi sonuçları sağladığını göstermek için optimize edilmiştir. Optimizasyonda enzim dozajı, enzim tipi, sıcaklık, ekstraksiyon süresi ve pH değeri gibi parametreler dikkate alınmıştır. Çalışmada optimum polifenolik bileşen ekstraksiyonu; Lallzyme EX-V enzimi kullanılarak, 48° C sıcaklıkta, 2 saat ve 43 dakika ekstraksiyon süresi boyunca, pH 3.5 ve 20.00 mg/g enzim dozu ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda ise optimize edilmiş ekstraksiyon yönteminin, basit fenollerin (monomerik ve dimerik formların) geri kazanımı için daha ucuz, basit, hızlı, hassas ve çevre dostu ekstraksiyon çözücüsü kullanılmasından dolayı, geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine değerli bir alternatif sunabileceği vurgulanmıştır.

Alberici vd. (2020)'nin yaptıkları çalışmada üzüm cibresi dahil 3 farklı meyve cibresine enzim muamelesi uygulanmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen bulgulara göre, toplam fenolik ve antioksidan madde oranı meyve çeşidine göre büyük oranda farklılık gösterdiği belirtilmiştir. Enzim mualesinin elma kabuğundan fenolik ve antioksidan bileşik eldesini arttırdığı, frenk üzümünden fenolik ve antioksidan eldesi üzerine anlamlı bir etkisi olmadığı ve üzüm kabuğundan ise fenolik ve antioksidan bileşik eldesini azalttığı belirtilmiştir. Bunun nedeninin farklı hücre duvarı kompozisyonlarının, hedef enzim seçiminde gerektirdiği farklılıktan dolayı olduğu düşünülmektedir. Üzüm kabuğuna %10 enzim ilavesi sonucunda kontrol örneğine (enzim ilavesiz) göre selüloz ve hemiselüloz miktarından anlamlı bir artış görülürken, toplam fenolik maddede istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür. Bunun nedeninin ilave edilen enzimdeki bazı yan esterez aktivitesi sonucunda veya enzimatik muamele sonucunda fenolik bileşenlerin kısmi bozulması veya üzüm cibresinde bulunan kalıntı polifenoloksidazlara bağlı olabileceği belirtilmiştir.



## 2.6 Yanıt Yüzey Yöntemi ile Optimizasyon

Optimizasyon; bir sistemden, bir süreçten veya bir üründen maksimum fayda elde etmek için performansın iyileştirilmesini ifade eder. Optimizasyon terimi, mümkün olan en iyi yanıtı veren bir prosedürün uygulanacağı koşulları keşfetmenin bir aracı olarak yaygın olarak kullanılmıştır (Araujo ve Brereton 1996).

Yanıt yüzey metodolojisi (response surface methodology-RSM), ilgili bir yanıtın çeşitli değişkenlerden etkilendiği ve amacın bu yanıtı optimize etmek olduğu problemlerin modellenmesi ve analizi için yararlı olan matematiksel ve istatistiksel tekniklerin bir koleksiyonudur. Yanıt yüzey metodolojisi temel olarak 4 gruba ayrılabilir: (1) Box-Behnken Tasarımı; (2) Merkezi Kompozit Tasarım; (3) Dohlert Tasarımı; (4) Karışım Yanıt Yüzey Metodolojisi (Olawoye, 2016). En çok kullanılan iki tasarım yöntemi ise “Merkezi Kompozit” ve “Box-Behnken” dizaynlardır (Baş 2010). Merkezi Kompozit Tasarım, 3 seviye faktörüne ek olarak aksel veya yıldız noktasına sahip olan yanıt yüzeyi tasarımıdır. Aksel veya yıldız noktası, mevcut seviye sayısını 5 seviyeye çıkararak deneysel tasarıma esneklik kazandırır. Süreci etkileyen parametrelerin doğrusal ve kuadratik etkileşim etkilerinin yüksek kaliteli tahminlerini sağlaması diğer avantajlarından biridir (Olawoye 2016).

RSM'nin aşamaları şu şekildedir; (1) literatür araştırması/çalışması sonucunda deneysel bölgenin sınırlandırılması yoluyla sistem üzerindeki ana bağımsız değişkenlerinin seçimi; (2) deneysel tasarımın seçimi ve seçilen deneysel matrise göre deneylerin yapılması; (3) elde edilen deneysel verilerin bir polinomial fonksiyonunun uyumu ile matematiksel-istatistiksel olarak işlenmesi; (4) modelin uygunluğunun değerlendirilmesi; (5) optimal bölgeye doğru yer değiştirme gerekliliğinin ve olasılığının doğrulanması; (6) çalışılan her değişken için optimum değerlerin elde edilmesi (Bezerra vd. 2008).

### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3.1 Materyal**

##### **3.1.1 Üzüm cibresi**

Çalışmada kullanılan üzüm cibresi Merlot üzüm çeşidinden elde edilmiş olup Doluca Bağcılık ve Şarapçılık A.Ş. tarafından tedarik edilmiştir. Taze preslenmiş cibre örnekleri ilk hasattan sonra toplanan üzümlerden elde edilmiştir ve laboratuvara, ağzı kilitli propilen torbalarda -24°C'de muhafaza edilerek ulaştırılmıştır.

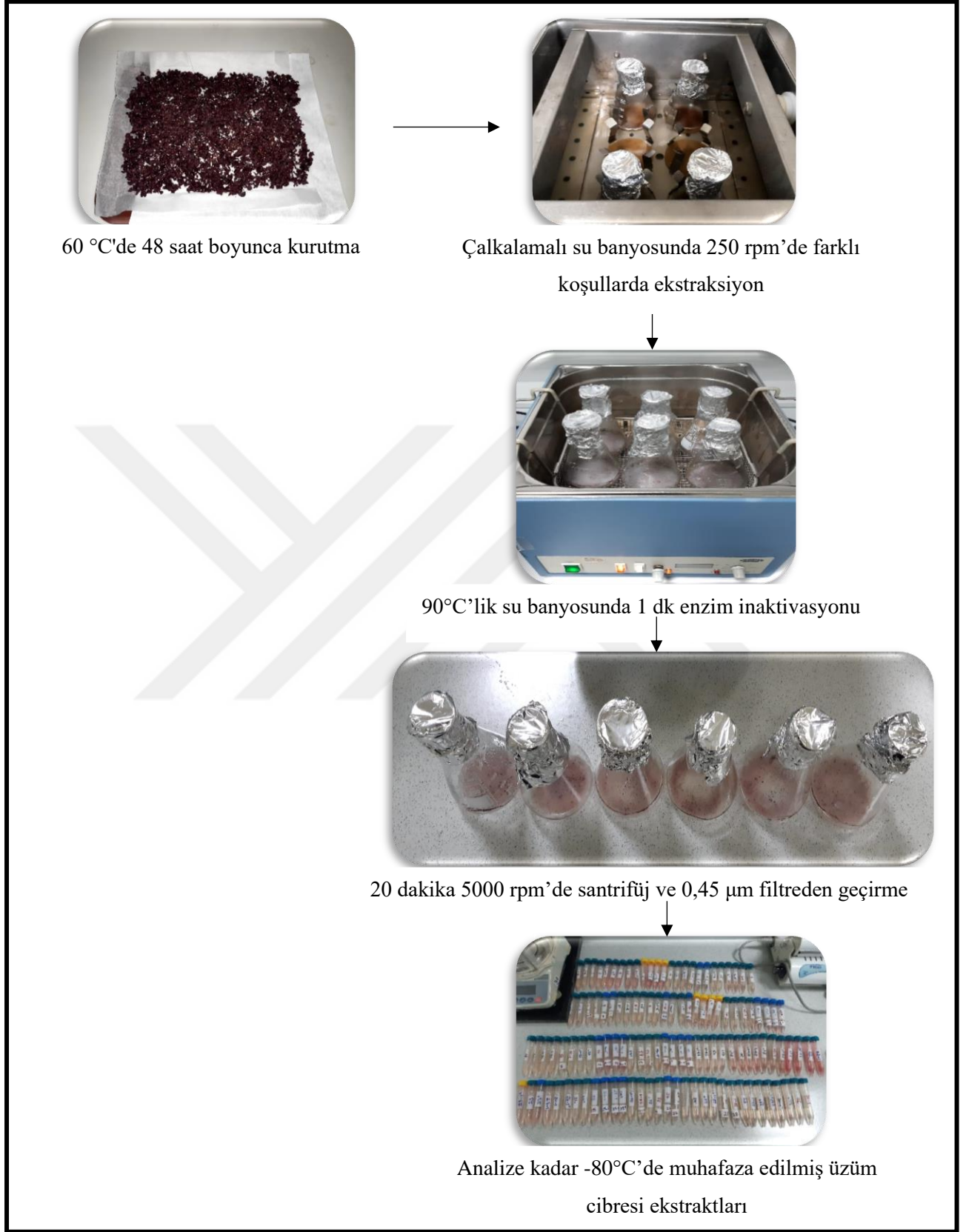
##### **3.1.2 Enzim**

Çalışmada kullanılan pektinaz enzimi (ROHAPECT® MA Plus, minimum aktivite 150.000 PGU/mg) AB Enzymes Rohapect® firmasından tedarik edilmiştir. Pektinaz enzimi analize kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir ve deneysel tasarım için hazırlanan enzim solüsyonları günlük olarak hazırlanmıştır.

#### **3.2 Metot**

##### **3.2.1 Örnek hazırlama**

Örnek hazırlama işlemi Botella vd. (2005)'ye göre minör modifikasyonla yapılmıştır. Üzüm cibresi örnekleri bir etüvde 48 saat boyunca 60 °C'de kurutulmuştur. Kurutma işlemi tamamlandıktan sonra elde edilen örnekler ticari bir blendardan geçirilmiş, ardından da kullanılıncaya kadar -80°C'de kriyojenik buzdolabında muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1 Üzüm cibresinden aktif bileşenlerin ekstraksiyonu akış şeması

### 3.2.2 Enzim-destekli ekstraksiyon

#### 3.2.2.1 Yanıt yüzey metodolojisi kullanılarak ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi

Enzim konsantrasyonu ( $X_1$ ), ekstraksiyon sıcaklığı ( $X_2$ ), ekstraksiyon pH'sı ( $X_3$ ) ve ekstraksiyon süresi ( $X_4$ ) bağımsız proses değişkenlerinin; toplam fenolik madde ( $Y_1$ ) ve toplam antioksidan madde ( $Y_2$ ) gibi bağımlı değişkenler üzerindeki temel etkisini araştırmak için 4 faktörlü 5 seviyeli Merkezi Kompozit Tasarım kullanılarak yanıt yüzeyi metodolojisi (Response Surface Methodology-RSM) uygulanmıştır. Bağımsız değişkenlerin kodlanmış ve gerçek seviyeleri ve deneysel tasarım çizelge 3.1'de verilmiştir. Çalışmada uygulanan deneysel tasarım yöntemi, merkezi noktada 6 replikasyona sahip 30 deneysel çalışma ile Stat-Ease Design Expert 11.0.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Enzim destekli ekstraksiyon işleminde reaksiyon sıcaklığı, reaksiyon süresi, sistemin pH'sı ve enzim konsantrasyonunun önemli etkileri bulunmaktadır (Meyer vd. 1998, Roselló-Soto vd. 2016, Marathe vd. 2017, Poojary vd. 2017). Bağımsız değişkenlerin aralık ve merkez noktası değerleri seçimi literatür bilgisi dahilinde gerçekleştirilmiştir (Maier vd. 2008, Gómez-García vd. 2012, Tomaz vd. 2015, Ştambuk vd. 2016).

Modelin uygunluğu, varyans analizinden elde edilen Fisher test değeri (F değeri), regresyon katsayısı ( $R^2$ ), düzeltilmiş regresyon katsayısı ( $R^2_{\text{düzeltilmiş}}$ ) ve uyum eksikliği değerleri (lack of fit value) değerlendirilerek belirlenmiştir. Anlamlılık seviyeleri %95 güven aralığında değerlendirilmiştir. P (probability; olasılık) değeri 0,05'ten küçük olduğundan istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunduğunu ifade etmektedir. Model uygunluğunu sağlama aşamasında anlamsız terimler ( $p>0,05$ ) geriye doğru eliminasyon regresyonu (Backward Elimination) ile modelden çıkarılmış olup, elde edilen modeller optimum ekstraksiyon koşulları için öngörülen yanıtları tahmin etmek için kullanılmıştır (Denklem 1).

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum \sum_{i<j} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \epsilon \quad (1)$$

Burada; y yanıt değişkenini,  $\beta_0$  model katsayısını,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  ve  $\beta_{ij}$  sırasıyla doğrusal, ikinci dereceden ve etkileşimli katsayıları,  $x_i$  ve  $x_j$  bağımsız değişkenleri temsil etmektedir.

Çizelge 3.1 Enzim destekli ekstraksiyon için üretilen beş seviyeli, dört faktörlü merkezi kompozit tasarım

Faktörler	Faktör Seviyeleri				
Proses Parametreleri	-2	-1	0	1	2
X <sub>1</sub> : Enzim Konsantrasyonu (%)	5	10	15	20	25
X <sub>2</sub> : Sıcaklık (°C)	25	35	45	55	65
X <sub>3</sub> : pH	3	3,5	4	4,5	5
X <sub>4</sub> : Süre (sa)	1	2	3	4	5

### 3.2.2.2 Üzüm cibresindeki fenolik bileşenlerin enzim-destekli ekstraksiyonu

Ekstraksiyon işlemi, Şekil 3.1'deki aşamalar izlenerek gerçekteştirilmiştir. Ön hazırlıkları tamamlanmış 0.1 g üzüm cibresi örnekleri, çizelge 3.1'de belirlenmiş olan enzim/çözücü oranına (v/v) ve pH' ya göre belirli tampon çözeltilerde çözülmüş belirli konsantrasyonlardaki (% v/v) 10 mL pektinaz enzimi ilavesi ile çalkalamalı su banyosunda 250 rpm'de belirli sıcaklık (°C) ve süre (sa) boyunca karıştırılmıştır. Enzim inaktivasyonu için çözeltiler 1 dakika boyunca 90 °C'lik sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Santrifüj işlemi Tomaz vd. (2015)'e göre gerçekteştirilmiş olup, ekstraktlar oda sıcaklığında 20 dakika boyunca 5000 rpm'de santrifüje tabi tutulmuştur. 0.45µm filtreden geçirilen sıvı ekstraktlar analize kadar -80°C'de kriyojenik buzdolabında muhafaza edilmiştir. Çalışmalar 4 paralelli gerçekteştirilmiştir.

### 3.2.3 Analiz Metotları

#### 3.2.3.1 Toplam fenolik madde tayini

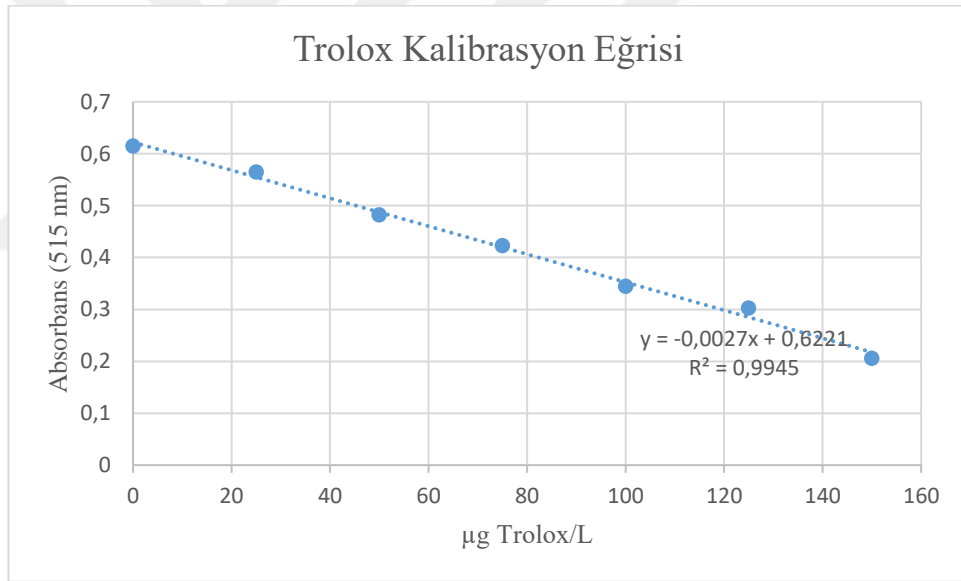
Toplam fenolik madde Singleton ve Rossi (1965)'ye minör modifikasyon uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Fenollerin kolorimetrik oksidasyon/redüksiyon reaksiyonuna dayanarak Folin® Ciocalteu metodu ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. 0.1 mL ekstrakta 0.9 mL saf su ve 4 mL 0.2 N Folin Ciocalteu reaktifi ilave edilmiş ve vortekslenerek 2 dakika bekletilmiştir. Ardından 5 mL sodyum karbonat çözeltisi (75 g/L) eklenip vortekslenmiş ve çözelti karanlık bir ortamda 2 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Kontrol numunesi olarak distile su kullanılmıştır. Absorbans, 756 nm'de bir UV/Vis spektrofotometre (PG UV-Vis Spektrofotometre) ile ölçülmüştür. 500 mg/L gallik asit stok çözeltisinden hazırlanan 50-500 mg/L aralığındaki 8 farklı konsantrasyon çözeltisi ile bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir ( $R^2 = 0.9992$ ;  $y = 0.0012x + 0.0141$ ) (Şekil 3.2). Kontrol numunesi olarak metanol kullanılmıştır. Sonuçlar, grafikten elde edilen regresyon eşitliği yardımıyla hesaplanmıştır ve mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/L cibre ekstraktı olarak ifade edilmiştir.



Şekil 3.2. Gallik asit kalibrasyon eğrisi

### 3.2.3.2 DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal süpürme kapasitesi tayini

DPPH• yöntemi ile toplam antioksidan madde miktarı tayini Brand-Williams vd. (1995)'e göre yapılmıştır. 100 µL fenolik ekstraktların metanolik çözeltisine 3,9 mL  $6 \times 10^{-5}$  M (2,4 mg DPPH•/1000 mL MeOH) DPPH• çözeltisi ilave edilmiştir. 515 nm'de absorbanstaki azalma, 30 dk ardından spektrofotometrede kaydedilmiştir. Kontrol olarak ekstreler yerine MeOH, kör olarak sadece MeOH kullanılmıştır. 1 mg/L trolox stok çözeltisinden hazırlanan 0,025-0,15 mg/L aralığındaki 7 farklı konsantrasyon çözeltisi ile bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir ( $R^2 = 0,9945$ ;  $y = -0,0027x + 0,6221$ ) (Şekil 3.3). Sonuçlar, grafikten elde edilen regresyon eşitliği yardımıyla hesaplanmıştır ve µg Trolox/L cibre ekstraktı olarak ifade edilmiştir



Şekil 3.3 Trolox kalibrasyon eğrisi

### 3.2.4 Optimizasyon

Deneysel çalışmada kullanılan modellerin Varyans analizi (ANOVA), sadece anlamlı terimler için ( $p < 0,05$ ) tahmin edilen modelin yeterliliği açısından değerlendirilmiştir. Aynı şekilde ekstraksiyonda kullanılan bağımlı değişkenler Stat-Ease Design Expert

11.0.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, ABD) yazılımı kullanılarak arzu edilebilirlik fonksiyonunun yanıt yüzeyi ile optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışmasında  $Y_1$  (TFM (mgGAE/L cibre ekstraktı)) ve  $Y_2$  (TAM ( $\mu$ gTrolox/L cibre ekstraktı)) cevaplarını maksimize eden bir metodoloji kullanılmıştır. Bağımsız değişkenler çalışmada elde edilen minimum ve maksimum değer aralıklarında tutulmuştur. Ekstraksiyonlardan elde edilen sonuçların ortalamaları Minitab (Minitab Inc., State College, PA, USA) kullanılarak Tukey testi (%95 anlamlılık seviyesinde) ile karşılaştırılmıştır.





## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1 Modelin oluşturulması

Bağımsız proses değişkenleri olan  $X_1$ ; enzim konsantrasyonu (mL/g),  $X_2$ ; sıcaklık (°C),  $X_3$ ; pH,  $X_4$ ; süre (sa) ve bağımlı değişkenlerin  $Y_1$ ; TFM (mg GAE/L) ve  $Y_2$ ; TAM ( $\mu\text{g}$ Trolox/L) deneysel sonuçları çizelge 4.1’de verilmiştir. Üzüm cibresinden enzim destekli ekstraksiyon sonucunda elde edilen TFM mg GAE/L cibre ekstraktı miktarları  $113,96 \pm 7,34$ ’ten  $261,35 \pm 12,35$ ’e kadar, TAM miktarları ise  $131,21 \pm 11,69$  ile  $208,14 \pm 12,07$   $\mu\text{g}$  Trolox/L cibre ekstraktı değerleri arasında değişiklik göstermektedir. TFM ve TAM ANOVA analiz sonuçları çizelge 4.2’de verilmiştir. Analizler sonucunda elde edilen deneysel veriler doğrusal polinomal modelleri oluşturmak için kullanılmıştır ve iki bağımsız değişken için de en küçük kareler metodu ile matematiksel modeller oluşturulmuştur (Denklem 2 ve 3).

$$Y_1: 177,381 + 7,08189X_1 + 28,3709X_2 + -13,8455X_3 + 8,52865X_4 + 14,2361X_1X_2 + 8,15972X_1X_4 + -7,46121X_2^2 + 8,67377X_3^2 \quad (2)$$

$$Y_2: 148,47 + -11,5302X_1 + 10,4263X_2 + 2,1258X_3 + -1,63338X_4 + -5,57843X_1X_2 + 4,55978X_1X_3 + 8,16608X_1X_4 + 7,52882X_2X_3 + 8,25811X_3^2 + 3,62833X_4^2 \quad (3)$$

Her iki model de kuadratik model olarak tanımlanmış ve kuadratik tanımlama, değişkenleri tanımlamak için en iyi model metodu olarak belirlenmiştir ( $p < .0001$ ). Sisteme etkisi az olan, anlamlı olmayan terimlerin eliminasyonu için geriye doğru eliminasyon regresyonu uygulanmıştır ve p değeri 0.05’in altında olan terimler modelden çıkarılmıştır (model hiyerarşisini sağlamak için hiyerarşik terimler modele tekrar eklenmiştir). Yüksek bir  $R^2$  değeri arzu edilmektedir ve  $R^2$  düzeltilmiş ile arasında uygun seviyede bir uyum olması gerekmektedir (Ghafari vd. 2009). Elde edilen TFM ve TAM

modellerinin sırasıyla  $R^2$  değerleri 0.90 ve 0.86,  $R^2_{\text{düzeltilmiş}}$  değerleri sırasıyla 0.86 ve 0.79 iken  $R^2_{\text{tahmin}}$  değerleri sırasıyla, 0.72 ve 0.59'dur. Ayrıca modellerin  $R^2_{\text{düzeltilmiş}}$  ve  $R^2_{\text{tahmin}}$  değerleri arasındaki fark 0.2'den küçük veya eşit olduğundan dolayı kabul edilebilir bir model olduğu anlaşılmaktadır. Uyum eksikliğinin anlamsızlığı, modelin verilere iyi uymadığının bir göstergesidir. Modelin verileri iyi açıklayamadığı durumda uyum eksikliği anlamlı olmaktadır (Trinh ve Kang 2010). TFM ve TAM modellerinin uyum eksikliği sırasıyla 0.109 ve 0.246 olarak istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tahmin edilen değerler ve deneysel değerleri içeren diyagnostik planlar, değerler arasında uygun bir anlaşma olup olmadığı anlamamıza, dolayısıyla modelin uygun olup olmadığını değerlendirmemizde yardımcı olmaktadır (Zainal-Abideen vd. 2012). Şekil 4.1'de görüldüğü üzere tahmin edilen ve deneysel değerler arasında bir uyum söz konusudur. Yani elde edilen modellerin verileri iyi bir şekilde açıklayabildiği görülmektedir.

Çizelge 4.1 Deneysel tasarım, bağımsız değişkenler, bağımlı değişkenler ve deneysel sonuçlar

Deneysel No	Bağımsız Değişkenler				Bağımlı Değişkenler			
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	TFM Y <sub>1</sub> (mg GAE/L cibre ekstraktı)		TAM Y <sub>2</sub> (µg Trolox/L cibre ekstraktı)	
					Deneysel Değerler	Tahmin Değerleri	Deneysel Değerler	Tahmin Değerleri
1	15	45	4	1	157,45±11,89	160,32	170,60±22,41	166,25
2	10	35	3,5	4	155,10±26,69	171,59	159,94±16,26	156,05
3	10	35	3,5	2	162,40±23,03	170,85	167,01±36,79	175,64
4	15	45	4	3	178,02±8,67	177,38	145,92±18,90	148,47
5	20	35	4,5	2	117,08±6,45	112,53	136,65±8,52	136,60
6	15	45	4	3	174,55±14,18	177,38	151,60±13,18	148,47
7	10	55	4,5	2	177,50±14,99	171,43	208,14±12,07	202,79
8	20	35	4,5	4	133,92±10,54	145,91	150,32±22,16	149,67
9	15	45	4	3	191,56±14,32	177,38	147,20±2,29	148,47
10	10	35	4,5	2	147,55±29,13	143,16	158,55±10,35	155,72

Çizelge 4.1 Deneysel tasarım, bağımsız değişkenler, bağımlı değişkenler ve deneysel sonuçlar (devam)

Deneysel No	Bağımsız Değişkenler				Bağımlı Değişkenler			
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	TFM Y <sub>1</sub> (mg GAE/L cibre ekstraktı)		TAM Y <sub>2</sub> (µg Trolox/L cibre ekstraktı)	
					Deneysel Değerler	Tahmin Değerleri	Deneysel Değerler	Tahmin Değerleri
11	20	35	3,5	4	163,18±13,51	173,60	140,47±6,61	151,35
12	15	45	4	3	169,95±5,79	177,38	149,16±6,15	148,47
13	10	55	3,5	4	193,13±12,04	199,86	173,61±5,79	173,00
14	25	45	4	3	190,78±3,55	191,54	131,21±11,69	125,41
15	20	55	4,5	4	233,75±10,78	231,13	194,08±24,84	174,42
16	10	55	3,5	2	184,97±4,21	199,12	195,16±7,21	192,60
17	15	45	4	3	172,81±7,86	177,38	130,51±0,33	148,47
18	20	55	3,5	2	225,68±25,09	225,44	135,38±17,06	132,93
19	15	25	4	3	113,96±7,34	90,79	142,44±10,26	127,62
20	20	35	3,5	2	137,14±10,77	140,23	139,90±22,24	138,29
21	5	45	4	3	182,88±7,32	163,22	168,28±20,84	171,53
22	15	45	3	3	261,35±12,35	239,77	185,28±8,60	177,25
23	15	65	4	3	197,12±27,01	204,28	168,28±24,27	169,32
24	15	45	4	5	219,69±12,63	194,44	151,48±31,21	159,72
25	20	55	3,5	4	258,75±41,58	258,82	142,21±25,22	145,99
26	20	55	4,5	2	204,32±9,64	197,75	150,32±25,61	161,36
27	10	35	4,5	4	123,07±6,88	143,90	138,51±6,19	136,12
28	10	55	4,5	4	175,94±7,70	172,17	190,99±14,00	183,19
29	15	45	5	3	178,80±6,44	184,38	173,84±7,13	185,75
30	15	45	4	3	168,13±5,16	177,38	142,33±4,49	148,47

\*Deneysel sonuçlar 4 paralelin ortalaması±standart sapması şeklinde ifade edilmiştir. X<sub>1</sub>: enzim konsantrasyonu (% , v/v), X<sub>2</sub>: sıcaklık (°C), X<sub>3</sub>: pH, X<sub>4</sub>: süre (sa), TFM: toplam fenolik madde, TAM: toplam antioksidan madde

Çizelge 4.2 Toplam fenolik madde için ANOVA sonuçları

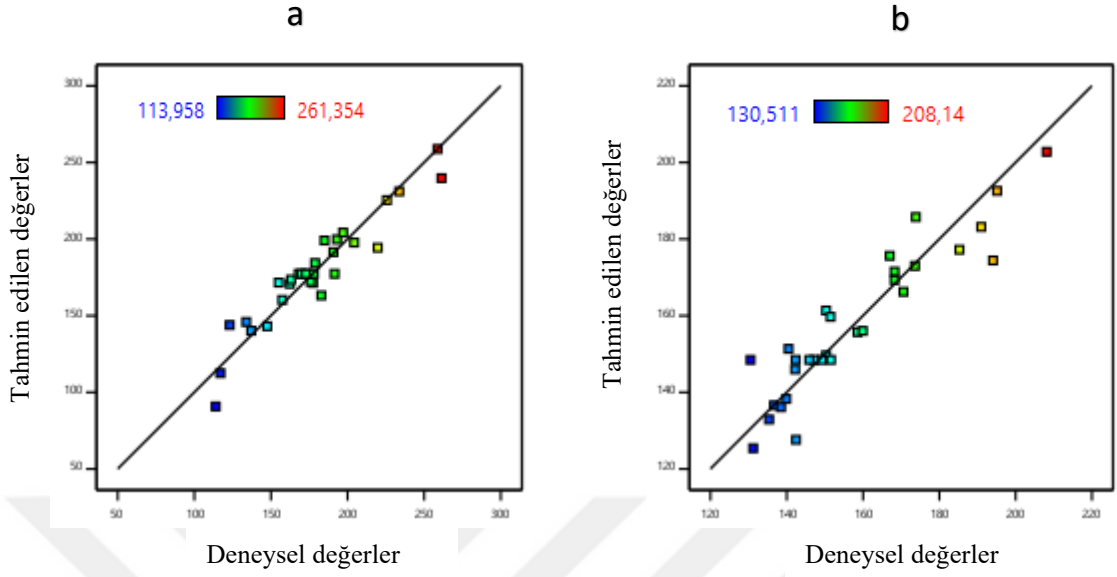
<b>Toplam Fenolik Madde (Y<sub>1</sub>) (mg GAE/L cibre ekstraktı)</b>					
	Katsayılar	KT	SD	F-değeri	p-değeri
Model	+177,38	35360,17	8	4420,02	< .0001
X <sub>1</sub>	+7,08	1203,67	1	6,46	.0190
X <sub>2</sub>	+28,37	19317,86	1	103,61	< .0001
X <sub>3</sub>	-13,85	4600,74	1	24,68	< .0001
X <sub>4</sub>	+8,53	1745,71	1	9,36	.0059
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	+14,24	3242,67	1	17,39	.0004
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	+8,16	1065,30	1	5,71	.0263
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	-7,46	1583,49	1	8,49	.0083
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	+8,67	2140,00	1	11,48	.0028
AK		3915,46	21		
UE		3558,44	16	3,11	.1070
H		357,02	5		
DT		39275,63	29		
R <sup>2</sup>				0.9003	
R <sup>2</sup> <sub>düzeltilmiş</sub>				0.8623	
AMT		X <sub>1</sub> , X <sub>2</sub> , X <sub>3</sub> , X <sub>4</sub> , X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> , X <sub>1</sub> X <sub>4</sub> , X <sub>2</sub> <sup>2</sup> , X <sub>3</sub> <sup>2</sup>			
Model denklemi	$Y_1: 177,381 + 7,08189X_1 + 28,3709X_2 + -13,8455X_3 + 8,52865X_4 + 14,2361X_1X_2 + 8,15972X_1X_4 + -7,46121X_2^2 + 8,67377X_3^2$				

X<sub>1</sub>: enzim konsantrasyonu (% , v/v), X<sub>2</sub>: sıcaklık (°C), X<sub>3</sub>: pH, X<sub>4</sub>: süre (sa), KT: kareler toplamı, SD: serbestlik derecesi, AK: arta kalan (residual), UE: uyum eksikliği (lack of fit), H: hata (pure error), DT: düzeltilmiş toplam (core total), AMT: anlamlı model terimleri

Çizelge 4.3 Toplam antioksidan madde için ANOVA sonuçları

<b>Toplam Antioksidan Madde Y<sub>2</sub> (µg Trolox/L cibre ekstraktı)</b>					
	Katsayılar	KT	SD	F-değeri	p-değeri
Model	+148,47	10928,03	10	11,62	< .0001
X <sub>1</sub> enzim	-11,53	3190,69	1	33,93	< .0001
X <sub>2</sub> sıcaklık	+10,43	2608,96	1	27,74	< .0001
X <sub>3</sub> pH	+2,13	108,46	1	1,15	.2963
X <sub>4</sub> süre	-1,63	64,03	1	0,6809	.4195
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	-5,58	497,90	1	5,29	.0329
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	+4,56	332,67	1	3,54	.0754
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	+8,17	1066,96	1	11,35	.0032
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	+7,53	906,93	1	9,64	.0058
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	+8,26	1939,81	1	20,63	.0002
X <sub>4</sub> <sup>2</sup>	+3,63	374,46	1	3,98	.0605
AK		1786,64	19		
UE		1504,81	14	1,91	.2459
H		281,83	5		
DT		12714,68	29		
R <sup>2</sup>				0.8595	
R <sup>2</sup> düzeltilmiş				0.7855	
AMT		X <sub>1</sub> , X <sub>2</sub> , X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> , X <sub>1</sub> X <sub>4</sub> , X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> , X <sub>3</sub> <sup>2</sup>			
Model denklemi	$Y_2: 148,47 + -11,5302X_1 + 10,4263X_2 + 2,1258X_3 +$ $-1,63338X_4 + -5,57843X_1X_2 + 4,55978X_1X_3 + 8,16608X_1X_4$ $+ 7,52882X_2X_3 + 8,25811X_3^2 + 3,62833X_4^2$				

X<sub>1</sub>: enzim konsantrasyonu (% , v/v), X<sub>2</sub>: sıcaklık (°C), X<sub>3</sub>: pH, X<sub>4</sub>: süre (sa), KT: kareler toplamı, SD: serbestlik derecesi, AK: arta kalan (residual), UE: uyum eksikliği (lack of fit), H: hata (pure error), DT: düzeltilmiş toplam (core total), AMT: anlamlı model terimleri



Şekil 4.1 a) TFM, b) TAM tahmin edilen değerler ve deneysel değerler. TFM: toplam fenolik madde, TAM: toplam antioksidan madde

## 4.2 Yanıt Yüzey Analizleri

Enzim destekli ekstraksiyonda optimum koşulları belirlemek için bağımsız değişkenler olan ekstraksiyon sıcaklığı, süre, pH ve enzim konsantrasyonu parametreleri RSM ile değerlendirilmiştir. Bir değişkenin merkez noktada tutulması ile sıcaklık, süre, pH ve enzim konsantrasyonunun ikili kombinasyonlarına dayalı 3 boyutlu yanıt yüzey grafikleri elde edilmiştir.

### 4.2.1 Enzim konsantrasyonunun etkisi

Enzimatik aktivite, hücre duvarının tahribatına yol açtığı için, bağlı fenolik bileşiklerin salınmasına katkıda bulunmaktadır (Zhou vd. 2017). Pektinaz enzimi, hücre duvarının penetrasyon oranını artırır, çünkü hücre duvarında bulunan pektinlere etki eder (Fernández vd. 2015), dolayısıyla fenolik bileşenler daha kolay açığa çıkar ve biyoaktif

bileşenlerin ekstraksiyon verimi artar (Miron vd. 2013). Enzimlerin diğer bir etki mekanizması ise fenoller ve bitki hücre duvarı polimerleri arasındaki esterlerin veya eterlerin bağlantılarını parçalaması ile biyoaktif bileşen salınımını kolaylaştırmasıdır (Pinelo vd. 2008). Enzim konsantrasyonunun artması ile enzim-substrat arasında daha iyi bir etkileşimin olmasını, dolayısıyla da hücre duvarı çözünürlüğünü daha çok arttırmaktadır (Zhang vd. 2007). Enzim konsantrasyonunun, TFM ( $p=.0190$ ) ve TAM ( $p<.0001$ ) üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Enzim konsantrasyonunun artması TFM'nin artmasını sağlarken, TAM'yi azaltmıştır. Literatürdeki bazı çalışmalar enzim ilavesinin antioksidan aktiviteyi arttırdığını göstermektedir (Chamorro vd. 2012, Ghandahari vd. 2018). Fakat bazı kaynaklar bazı koşullar altında gerçekleştirilen ekstraksiyonlarda yüksek miktarda enzim kullanılmasının nihai ürün inhibisyonuna yol açtığını belirtmektedir (Nadar ve Rathod 2017). Enzim konsantrasyonunun artması ile fenolik bileşen olmayan ve antioksidan özellik gösteren bileşenlerin inhibisyonundan dolayı antioksidan aktivitede azalma söz konusu olabilir. Enzim konsantrasyonu ile sıcaklığın ikili etkileşimi TFM'yi ( $p=.0004$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde pozitif etkilemiştir (Şekil 4.2a). Fakat enzim konsantrasyonu ile sıcaklığın etkileşimi TAM'yi ( $p=.0329$ ) negatif yönde etkilemiştir (Şekil 4.3a). Yani artan sıcaklıklarla birlikte enzim konsantrasyonundaki artış, antioksidan aktiviteyi düşürmüştür. Çalışmada kullanılan üzüm cibresinin içerisinde hem üzüm çekirdeği hem üzüm kabuğu hem üzüm sapı hem de üzüm meyvesi bulunmaktadır. Üzüm çekirdeği, primer ve sekonder hücre duvarlarına sahiptir (Hanlin vd. 2010). Polifenoller çekirdeğin iç kısmında bulunmaktadır, bundan dolayı ekstraksiyon çözücüsünün çekirdeğin içine nüfuz etmesi daha uzun sürmektedir (Ştambuk vd. 2016). Kullanılan pektinazın hücre duvarının yapısal polisakkaritlerini hızlı bir şekilde parçalamasına yardımcı olması dolayısıyla fenolik bileşen miktarının artmasını sağlamıştır. Fakat pektinazın üzüm çekirdeğine etkisi üzüm cibresinin diğer kısımlarına etkisinden daha uzun sürede gerçekleşeceği için, hızlı bir şekilde salınan antioksidan özellik gösteren bazı bileşiklerin uzun süre yüksek sıcaklıklara gerçekleştirilen ekstraksiyona maruz kalmasından dolayı degrade olabileceği düşünülmektedir.

#### 4.2.2 Sıcaklığın etkisi

Ekstraksiyon sıcaklığı, enzimatik aktivite ve çözülmüş biyoaktif bileşiklerin özellikleri üzerindeki etkisi ile enzim destekli ekstraksiyonu etkileyen bir parametredir. Genel olarak, enzimatik aktivite termal değerlerle orantılı olarak artış göstermektedir (Gligor 2014, Muniglia vd. 2014). Enzim destekli ekstraksiyonun sıcaklığı, enzimatik katalizörler nedeniyle dikkat edilmesi gereken önemli bir değişkendir (Soto-Maldonado ve Zúñiga-Hansen 2017). Sıcaklık, TFM ( $p < .0001$ ) ve TAM ( $p < .0001$ ) üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Sıcaklığın pH ( $p = .0058$ ) ile interaksiyonunun TAM'yi anlamlı bir şekilde arttırdığı gözlenmiştir (Şekil 4.3b). Sıcaklığın, pH ile olan ve sıcaklığın süre ile olan interaksiyonunun TFM üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi bulunmamıştır. Sıcaklık ile enzim konsantrasyonu etkileşiminin TFM ( $p = .0004$ ) üzerinde anlamlı bir pozitif etkisi olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2a). Artan sıcaklık seviyelerinde, çözünen maddenin çözünürlüğünün artması ve difüzyon katsayısının artması nedeniyle ekstraksiyona olumlu etkisi bulunmaktadır (Pinelo vd. 2005). Enzimatik reaksiyonlar genellikle  $15^{\circ}\text{C}$  ila  $45^{\circ}\text{C}$  olan ve düşük sıcaklık olarak nitelendirilebileceğimiz sıcaklıklarda gerçekleştirilmektedir, bu sıcaklık aralıklarında gerçekleştirilen enzimatik reaksiyonlar, termolabil (ısı tarafından kolayca tahrip edilebilen) bileşiklerin ekstraksiyonunda olumlu etkide bulunabilmektedir (Sowbhagya ve Chitra 2010). Sıcaklığın, enzim konsantrasyonu ( $p = .0329$ ) ile interaksiyonunun TAM'yi anlamlı bir şekilde azalttığı görülmüştür (Şekil 4.3a). Yüksek sıcaklıkların ekstraksiyona olumlu etkilerine rağmen sıcaklık sürekli arttırılmaz çünkü,  $50^{\circ}\text{C}$ 'den yüksek sıcaklıklara uzun süre maruz kalan hücre membranlarının denatürasyonu ve fenolik bileşenlerin stabilitesinin azalması gibi durumlar söz konusu olabilmektedir (Cacace vd. 2003, Schwartzberg ve Chao 2010). Uygun sıcaklık derecelerinde antioksidanların hareketinin artması sonucunda bu bileşiklerin eşzamanlı ayrışmasının olabileceği fakat çok düşük veya çok yüksek sıcaklıklarda ise polifenolik bileşiklerin ekstraksiyonu üzerinde anlamlı derecede negatif bir etkisi olduğu ortaya sunulmuştur (Landbo ve Meyer 2001, Pinelo vd. 2006). Yapılan bir çalışmada *Prunus nepalensis* L. meyvelerinden ekstrakte edilen antosiyaninlerin sıcaklık ile kütle transfer hızlarının dolayısıyla çözünürlüklerinin arttığı fakat daha fazla sıcaklık artışının enzim denatürasyonuna sebep olduğu bildirilmiştir (Swier vd. 2018). Ayrıca  $60^{\circ}\text{C}$ 'lik sıcaklığın



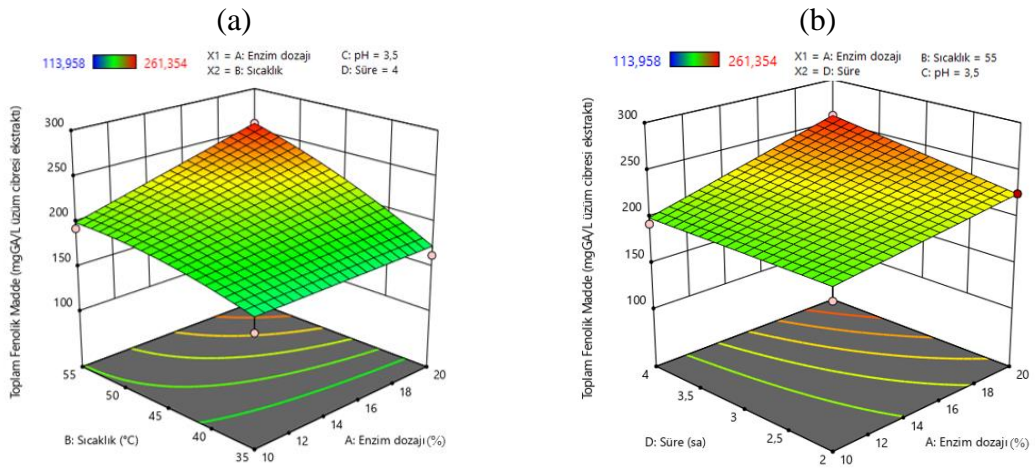
üzerinde gerçekleştirilen enzimatik tepkime, enzim moleküllerini geri dönüşümsüz olarak değiştirebilir, bu da enzim aktivitesini düşürmektedir (Schwartzberg ve Chao 2010). Çalışmamızda kullanılan 25-65°C sıcaklık değerleri arasından arzu edilebilirlik fonksiyonu ile optimum sıcaklık 55°C bulunmuştur. Çalışmadaki veriler literatürü destekler niteliktedir.

### 4.2.3 pH'nın etkisi

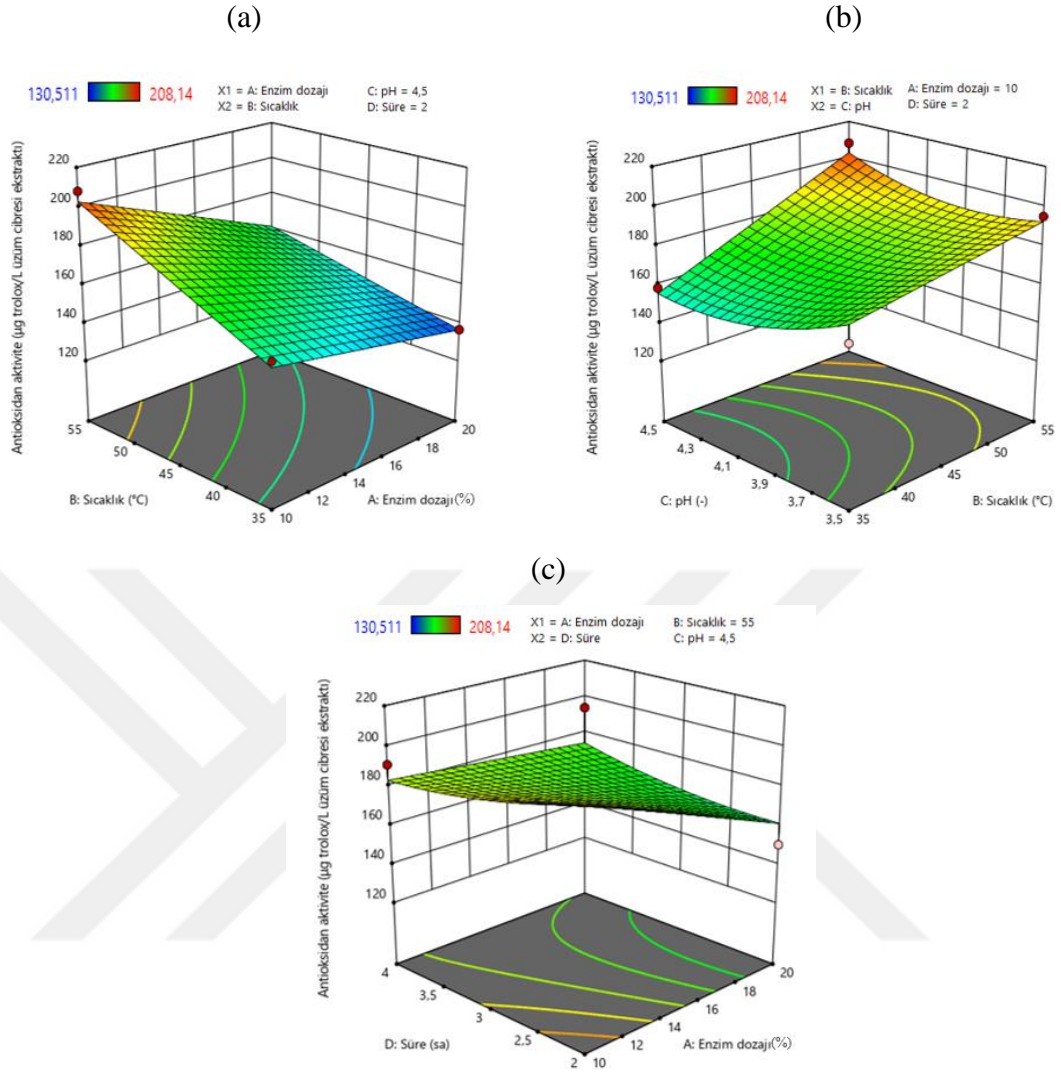
pH parametresinin, gıdanın hücre duvarına etkisi ve enzimatik aktivitedeki önemi sayesinde enzim destekli ekstraksiyon için gözardı edilmemesi gerekir. Hidrojen bağlarının dengesizleşmesine neden olduğu için asidik ekstraksiyon ortamı, hücrenin duvar plastisitesinin artmasına yol açar. Enzim aktivitesi asidik pH gerektirdiğinden dolayı, katalitik aktivite pH tarafından etkilenmektedir (Muniglia vd. 2014). Her enzim için gerekli olan optimum pH farklılık göstermektedir. Birçok enzimin optimum aktiviteye sahip olduğu pH, proteinlerinin izoelektrik pH'sı aralığındadır (Talley ve Alexov 2010). Tomaz vd. (2015)'nin yaptıkları çalışmada düşük pH değerlerinde antosiyanin, flavan-3-ol ve flavonol glikozit miktarları daha yüksek bulunmuştur. Bunun nedeninin pektinazların aktivitesi ve fenolik bileşiklerin stabilitesinin olduğu, antosiyaninlerin düşük pH'da en stabil hallerinde oldukları belirtilmiştir (Skrede 2002). pH'nın TFM ( $p < .0001$ ) üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi bulunmuştur. Aynı şekilde pH'nın kuadratik efekti de TFM ( $p = .0027$ ) üzerine istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. pH'nın düşmesi TFM'yi arttırmıştır. pH'nın TAM üzerine lineer etkisinin ( $p = .2963$ ) ve enzim konsantrasyonu ile olan ikili etkileşiminin ( $p = .0754$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi bulunmamıştır.

#### 4.2.4 Sürenin etkisi

Üzüm cibresinin büyük bir kısmını üzüm çekirdeği oluşturmaktadır ve literatürdeki çalışmalara (Barba vd. 2016, Pasini Deolindo vd. 2019) bakılacak olursa üzüm çekirdeğinde, diğer kısımlara nazaran daha fazla fenolik bileşen bulunmaktadır. Çalışmada kullanılan üzüm cibresinin içerisinde üzüm çekirdeği, üzüm kabuğu, üzüm sapı ve üzüm meyvesi bulunmaktadır. Üzüm çekirdeği, primer ve sekonder hücre duvarlarına sahiptir (Hanlin vd. 2010). Üzüm çekirdeği hücre duvarı sert ve kimyasal/biyolojik bozunmaya karşı çok dirençlidir (Düsterhöft vd. 1993, Xu vd. 2010a, Xu vd. 2010b). Polifenoller çekirdeğin iç kısmında bulunmaktadır, bundan dolayı ekstraksiyon çözücüsünün çekirdeğin içine nüfuz etmesi daha uzun sürmektedir (Ştambuk vd. 2016). Çalışmada, sürenin TFM'ye ( $p=.0059$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif etkisi olduğu gözlenirken TAM ( $p=.4195$ ) üzerine herhangi bir anlamlı etkisi bulunmamıştır. Literatürdeki çoğu çalışma ekstraksiyon süresinin TFM'yi arttırdığını söylese de uzun ekstraksiyon sürelerinin biyoaktif bileşenlerin miktarını azalttığı da bilinmektedir (Xu vd. 2014). Fakat çalışmada kullanılan süre aralığı geleneksel yöntemlere kıyasla uzun bir inkübasyon süresi sayılmadığı için, sürenin TFA miktarını arttırması literatürdeki çalışmalarla örtüşmektedir. Sürenin enzim konsantrasyonu ile interaksiyonunun TFM ( $p=.0263$ ) üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde pozitif etkisi olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2b).



Şekil 4.2 (a) Enzim konsantrasyonu ve sıcaklığın, (b) Enzim konsantrasyonu ve sürenin toplam fenolik madde üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri



Şekil 4.3 (a) Enzim konsantrasyonu ve sıcaklığın, (b) sıcaklık ve pH'nın, (c) enzim konsantrasyonu ve sürenin toplam antioksidan madde üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri

### 4.3 Optimizasyon ve Ekstraksiyon Metotlarının Karşılaştırılması

TFM ( $Y_1$ ) ve TAM ( $Y_2$ ) model denklemlerinin optimum yanıt değerleri için uygunluğu, optimizasyon sonucunda seçilen optimal koşullar kullanılarak test edilmiştir. TFM ve TAM yanıtlarını optimize etmek için arzu edilebilirlik fonksiyonu kullanılmıştır ve 0.68 arzu edilebilirlik değeri elde edilmiştir. Buna göre elde edilen optimum TFM ve TAM yanıt değerleri için ekstraksiyondaki optimum koşullar; 10ml/100ml pektinaz

konsantrasyonu, 55°C sıcaklık, 3.5 pH ve 2 saat olarak bulunmuştur. Optimum olarak bulunan koşullar deneysel tasarım noktalarından biridir (Çizelge 4.1, deney no:16). Optimum koşullar altında gerçekleştirilen enzim destekli ekstraksiyon için TFM ve TAM miktarları sırasıyla 184,97±4,21 mg GAE/L üzüm cibresi ekstraktı ve 195,16±7,21 µg Trolox/L üzüm cibresi ekstraktı olarak bulunmuştur. Farklı çözücüler kullanılarak optimum koşullarda gerçekleştirilen 4 farklı ekstraksiyon ile üzüm cibresinden elde edilen TFM ve TAM değerleri enzim destekli ekstraksiyon ile kıyaslanmıştır. Ekstraksiyonlar 100 mg üzüm kuru üzüm cibresi örneği kullanılarak 55 °C’de, 2 saat, 4 farklı kombinasyonda ekstraksiyon çözücüsü (10 mL (saf su, etanol, metanol, etanol/su (1:1, v/v))) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.4’te karşılaştırmalı ekstraksiyon koşulları ve TFM (g GAE/100 g üzüm cibresi) ile TAM (mg Trolox/100g üzüm cibresi) sonuçları bulunmaktadır. Analizler 4 paralelli olarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.4 Karşılaştırmalı ekstraksiyonlar ve yanıtların deneysel değerleri

Ekstraksiyon Koşulları			Deneysel Sonuçlar	
Sıcaklık (°C)	Süre (sa)	Çözücü (10 mL)	TFM (g GAE/100g üzüm cibresi)	TAM (mg Trolox/100g üzüm cibresi)
		Pektinaz enzimi	1,47±0,04 <sup>c</sup>	1,56±0,06 <sup>d</sup>
		Saf su	1,60±0,12 <sup>c</sup>	3,50±0,22 <sup>c</sup>
55 °C	2 saat	Etanol	2,65±0,11 <sup>b</sup>	5,49±0,15 <sup>b</sup>
		Metanol	2,92±0,11 <sup>b</sup>	5,57±0,13 <sup>b</sup>
		Etanol/Su (1:1)	4,26±0,05 <sup>a</sup>	7,42±0,38 <sup>a</sup>

\*Analizler 4 paralelli gerçekleştirilmiş olup sonuçlar ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir. Aynı sütunda aynı üstsimge harfine sahip veriler Tukey’in testine göre anlamlı fark göstermemektedir (p<0.05).

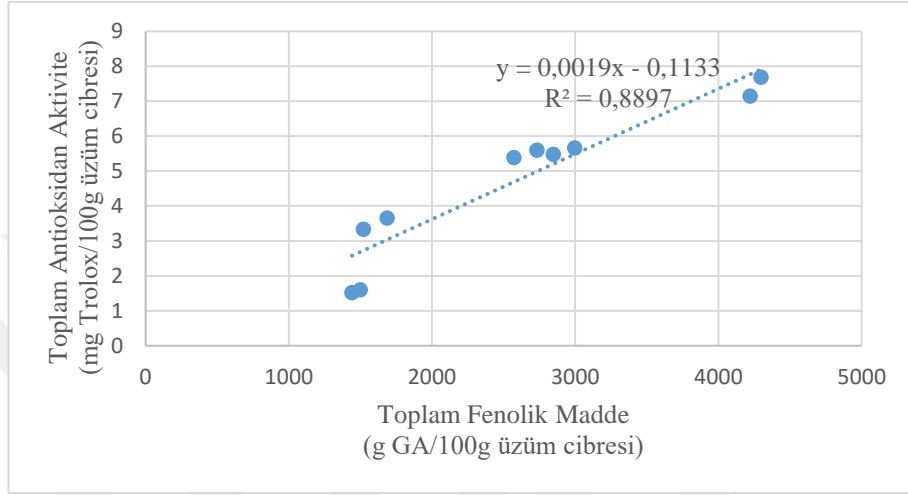
Çizelge 4.4'te farklı çözücüler ile aynı koşullar altında gerçekleştirilen ekstraksiyonların TMF (g GAE/100g üzüm cibresi) ve TAM (mg Trolox/100g üzüm cibresi) sonuçları bulunmaktadır. TMF ve TAM için en yüksek miktarlar etanol/su (1:1, v/v) çözücüsü kullanıldığında elde edilmiştir. TFM miktarları için etanol ve metanol arasında aynı şekilde pektinaz ve su ekstraksiyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. TAM miktarları için etanol ve metanol ekstraksiyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmezken, pektinaz ve su ekstraksiyonları sonucunda TAM miktarlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür.

Çözücü tipi ekstraksiyon verimliliğini etkileyen en önemli parametrelerden biridir. Üzüm cibresinden spesifik bileşenler elde edilmek isteniyorsa farklı çözücüler tercih edilmelidir. Polifenolik bileşikler polar yapıları sayesinde hidroalkolik çözeltiler gibi polar protik çözücüler içerisinde kolaylıkla çözünmektedirler (Fontana vd. 2013). Yapılan bir çalışmada (Torres vd. 2002) üzüm yan ürünlerinden kateşinlerin ve prosiyanidinlerin ekstraksiyonunda etanol/su karışımının daha iyi olduğu bildirilmişken, diğer bir çalışmada (Kallithraka vd. 1995) ise üzüm çekirdeğinden kateşinler, epikateşinler ve epigallokateşinlerin ekstraksiyonu için metanolün daha iyi bir çözücü olduğu bildirilmiştir. Üzüm cibresinden biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunda saf çözücüler yerine su/etanol karışımının kullanılması sonucunda daha iyi sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (Alonso vd. 1991, Canals vd. 2005, Lapornik vd. 2005, Pinelo vd. 2005, Yilmaza ve Toledo, 2006, Spigno vd. 2007, Spigno ve De Faver 2007).

Ekstraksiyon çözeltilisinde suyun varlığı, hücre dokusunun geçirgenliğini arttırıp moleküler difüzyon ile daha iyi bir kütle transferi sonucunda suda çözünen bileşiklerin eldesini sağlamaktadır (Jayaprakasha vd. 2001, Cheng vd. 2012). Fakat ekstrakte edilmek istenen her bir fenol grubu için farklı oranlarda etanol/su karışımı kullanılması önerilmektedir (Cacace ve Mazza 2003).

Üzüm cibresi ekstraktlarının TFM ve TAM miktarlarının korelasyon grafiği Şekil 4.4'te verilmiştir. Aynı koşullar altında gerçekleşen farklı çözücülerle ekstrakte edilen üzüm cibresinden elde edilen bulgulara göre TFM ve TAM arasında güçlü bir korelasyon ( $R^2=0.8897$ ) gözlenmiştir. Toplam fenolik madde ile toplam fenolik madde miktarı arasında

iyi bir korelasyon olduğu bilinmektedir (Xu vd. 2010a, Xu vd. 2014). Fakat çalışmamızda gerçekleştirilen enzim destekli ekstraksiyon sonucunda TFM ve TAM değerleri arasında herhangi bir korelasyon gözlenmemiştir. Bunun nedeninin, farklı ekstraksiyon koşullarının (sıcaklık, süre ve pH) ekstraksiyon ortamında bulunan enzimlerin aktivitelerinde değişikliklere sebebiyet vermesinden dolayı olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.4 Farklı çözücüler ile optimum koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyonlar sonucunda elde edilen TFM ve TAM miktarları arasındaki ilişki

## 5. SONUÇ

Bu çalışmada şaraphane atığı olan üzüm cibresinin çevre kirliliği ve maliyet fazlalığını önlemek ve sağlığa faydaları olan üzüm polifenollerinin ve antioksidan maddelerin geri kazanımını sağlamak için pektinaz enzimleri kullanılarak enzim-destekli ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır. Enzim konsantrasyonu, ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon pH'sı ve ekstraksiyon süresi gibi proses değişkenlerinin; toplam fenolik madde (TFM) ve toplam antioksidan madde (TAM) miktarı üzerindeki temel etkisini araştırmak için 4 faktörlü 5 seviyeli Merkezi Kompozit Tasarım kullanılarak yanıt yüzeyi metodolojisi (Response Surface Methodology- RSM) uygulanmıştır.

Üzüm cibresinden enzim destekli ekstraksiyon sonucunda elde edilen TFM miktarları  $113,96 \pm 7,34$  ile  $261,35 \pm 12,35$  mg GAE/L cibre ekstraktı arasında, TAM miktarları ise  $131,21 \pm 11,69$  ile  $208,14 \pm 12,07$  µg Trolox/L cibre ekstraktı değerleri arasında değişiklik göstermektedir. Elde edilen TFM ve TAM modellerinin sırasıyla  $R^2$  değerleri 0.90 ve 0.86,  $R^2$  düzeltilmiş değerleri ise sırasıyla 0.86 ve 0.79'dur. Elde edilen modellerin verileri iyi bir şekilde açıklayabildiği görülmektedir.

Enzim konsantrasyonunun, TFM ( $p=.0190$ ) ve TAM ( $p<.0001$ ) üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Enzim konsantrasyonunun artması TFM'nin artmasını sağlarken, TAM'yı azaltmıştır. Enzim konsantrasyonu ile sıcaklığın ikili etkileşimi TFM'yi ( $p=.0004$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde pozitif etkilemiştir. Fakat enzim konsantrasyonu ile sıcaklığın etkileşimi TAM'yi ( $p=.0329$ ) negatif yönde etkilemiştir. Yani artan sıcaklıklarla birlikte enzim konsantrasyonundaki artış, antioksidan madde miktarını düşürmüştür.

Sıcaklık, TFM ( $p<.0001$ ) ve TAM ( $p<.0001$ ) üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Sıcaklığın pH ( $p=.0058$ ) ile interaksyonunun TAM'yi anlamlı bir şekilde arttırdığı gözlenmiştir. Sıcaklığın, pH ile olan ve sıcaklığın süre ile olan interaksyonunun TFM üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi bulunmamıştır. Sıcaklık ile enzim konsantrasyonu etkileşiminin TFM ( $p=.0004$ ) üzerinde

anlamli bir pozitif etkisi olduğu gözlenmiştir. Sıcaklığın, enzim konsantrasyonu (p=.0329) ile interaksyonunun TAM'yi anlamli bir şekilde azalttığı görülmüştür.

Sürenin TFM'ye (p=.0059) istatistiksel olarak anlamli bir pozitif etkisi olduğu gözlenirken TAM (p=.4195) üzerine herhangi bir anlamli etkisi bulunmamıştır. Sürenin enzim konsantrasyonu ile interaksyonunun TFM (p=.0263) üzerinde istatistiksel olarak anlamli bir şekilde pozitif etkisi olduğu gözlenmiştir.

pH'nın TFM (p<.0001) üzerinde istatistiksel olarak anlamli bir etkisi bulunmuştur. Aynı şekilde pH'nın kuadratik efekti de TFM (p=.0027) üzerine istatistiksel olarak anlamli bulunmuştur. pH'nın düşmesi TFM'yi arttırmıştır. pH'nın TAM üzerine lineer etkisinin (p=.2963) ve enzim konsantrasyonu ile olan ikili etkileşiminin (p=.0754) istatistiksel olarak anlamli bir etkisi bulunmamıştır.

Çalışmada uygulanan optimizasyon sonuçlarına göre en yüksek TFM ve TAM sonuçları sırasıyla 184,97±4,21 mg GAE/L üzüm cibresi ekstraktı ve 195,16±7,21 µg Trolox/L üzüm cibresi ekstraktı olup bu sonuçlar 10ml/100ml pektinaz konsantrasyonu, 55 °C sıcaklık, 3.5 pH ve 2 saatlik ekstraksiyon koşulları sonucunda elde edilmiştir.

Karşılaştırmalı ekstraksiyonlarda, TFM ve TAM için en yüksek miktarlar etanol/su (1:1, v/v) çözücüsü kullanıldığında elde edilmiştir. TFM miktarları için etanol ve metanol arasında aynı şekilde pektinaz ve su ekstraksiyonları arasında istatistiksel olarak anlamli bir fark görülmemiştir. TAM miktarları için etanol ve metanol ekstraksiyonları arasında istatistiksel olarak anlamli bir fark gözlenmezken, pektinaz ve su ekstraksiyonları sonucunda TAM miktarlarında istatistiksel olarak anlamli bir fark görülmüştür.

Aynı koşullar altında gerçekleşen farklı çözücülerle ekstrakte edilen üzüm cibrelerinden elde edilen bulgulara göre TFM ve TAM arasında güçlü bir korelasyon ( $R^2=0.8897$ ) gözlenmiştir. Fakat çalışmamızda gerçekleştirilen enzim destekli ekstraksiyon sonucunda TFM ve TAM değerleri arasında herhangi bir korelasyon gözlenmemiştir. Bunun nedeninin, farklı ekstraksiyon koşullarının (sıcaklık, süre ve pH) ekstraksiyon ortamında



bulunan enzimlerin aktivitelerinde değişikliklere sebebiyet vermesinden dolayı olduğu düşünölmektedir.

Agro-endüstriyel yan ürünlerden biri olan üzüm cibresi, yüksek antioksidan aktiviteleriyle yaygın olarak bilinen potansiyel fenolik bileşik kaynağı olarak bilinmektedir. Ekstrakte edilecek bileşiklerin bozulmasını önleyecek sıcaklıklarda, çevre dostu ve düşük maliyetli çözücüler kullanılarak, maksimum verimin elde edildiği en uygun ekstraksiyon metodunu belirleme ilk adım olmalıdır. Ekstraksiyon yöntemi; aktif bileşenin elde edileceği hammaddeye, hammaddenin hasat yılına, hammaddenin cinsine, partüköl boyutuna, ekstraksiyon sıcaklığına, süresine, ortamın pH'sına, çözücü çeşitine, çözücü miktarına, ön işlemler gibi birçok parametreye bağlı olarak değişebilmektedir. Enzim destekli ekstraksiyon, geleneksel yöntemlerin sınırlamalarının üstesinden gelmek için alternatif bir yöntem olarak düşünölmektedir.

Bitki hücresi polisakkaritlerindeki bağların hidrolizini katalize edebilen enzimler, hücre duvarı yapısının farklı katmanlarındaki yapısal polisakkaritleri parçalamak için kullanılabilir. Pektinazlar, hücre duvarının penetrasyon oranını artırır çünkü hücre duvarında bulunan pektinlere etki eder, dolayısıyla fenolik bileşenler daha kolay açığa çıkar ve biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyon verimi artmaktadır. Fakat seçilen enzimin hammadde ile uyumu ekstraksiyon verimi için oldukça önemlidir. Enzimlerin bireysel kullanımı veya birlikte kullanılmaları sonucunda oluşan sinerjistik etkileri dikkate alınarak seçimleri yapılmalıdır.

Çalışmanın sonucunda; enzim destekli ekstraksiyonun fenolik ve antioksidan bileşen ekstraksiyonunda alternatif bir yöntem olabileceği, belirli parametreler altında gerçekleştirilen enzim destekli ekstraksiyonda optimum koşulların belirlenmesi ve bu koşullar altında elde edilen fenolik ve antioksidan bileşenlerin miktarlarının model yardımıyla belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Enzim kullanımı fenolik ve antioksidan salınımına yardım etmiştir fakat tek başına kullanıldığında geleneksel çözücülere kıyasla daha düşük fenolik ve antioksidan verimi elde edildiği bulgusuna ulaşılmıştır.

## KAYNAKLAR

- Abarghuei, M. J., Rouzbehan, Y., ve Alipour, D. 2010. The influence of the grape pomace on the ruminal parameters of sheep. *Livestock Science*, 132(1-3), 73-79.
- Ackaah-Gyasi, N. A., Patel, P., Zhang, Y., ve Simpson, B. K. 2015. Current and future uses of enzymes in food processing. In: *Improving and Tailoring Enzymes for Food Quality and Functionality*. Yada, R. (ed.), 103-122, Woodhead Publishing.
- Adams, D. O. 2006. Phenolics and ripening in grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 573, 249-256.
- Aherne, S. A., ve O'Brien, N. M. 2002. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 18(1), 75-81.
- Ahn, J., Grün, I. U., ve Mustapha, A. 2004. Antimicrobial and antioxidant activities of natural extracts in vitro and in ground beef. *Journal of Food Protection*, 67(1), 148-155.
- Alberici, N., Fiorentini, C., House, A., Dordoni, R., Bassani, A., ve Spigno, G. 2020. Enzymatic Pre-treatment of Fruit Pomace for Fibre Hydrolysis and Antioxidants Release. *Chemical Engineering Transactions*, 79, 175-180.
- Alonso, E., Bourzeix, M., ve Revilla, E. 1991. Suitability of water/ethanol mixtures for the extraction of catechins and proanthocyanidins from *Vitis vinifera* seeds contained in a winery by-product. *Seed Science and Technology*, 19(3), 545-552.
- Araujo, P. W., ve Brereton, R. G. 1996. Experimental design III. Quantification. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 15(3), 156-163.
- Aron, P. M., ve Kennedy, J. A. 2008. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(1), 79-104.
- Atak, E., Yıldız, E., ve Uslu, M. E. 2017. Fenolik bileşiklerin enkapsülasyonu. *Soma Meslek Yüksekokulu Teknik Bilimler Dergisi*, 2(24), 82-92.
- Auger, C., Gérain, P., Laurent-Bichon, F., Portet, K., Bornet, A., Caporiccio, B., Cros, G., Teissédre, P. L., ve Rouanet, J. M. 2004. Phenolics from commercialized grape extracts prevent early atherosclerotic lesions in hamsters by mechanisms other than antioxidant effect. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16), 5297-5302.
- Aydın, S., ve Üstün, F. 2007. Tanenler 1 Kimyasal yapıları, farmakolojik etkileri, analiz yöntemleri. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 33(1), 21-31.
- Baliga, M. S., Meleth, S., ve Katiyar, S. K. 2005. Growth inhibitory and antimetastatic effect of green tea polyphenols on metastasis-specific mouse mammary carcinoma

- 4T1 cells in vitro and in vivo systems. *Clinical Cancer Research*, 11(5), 1918-1927.
- Balu, M., Sangeetha, P., Murali, G., ve Panneerselvam, C. 2006. Modulatory role of grape seed extract on age-related oxidative DNA damage in central nervous system of rats. *Brain research bulletin*, 68(6), 469-473.
- Baranac, J. M., Petranović, N. A., ve Dimitrić-Marković, J. M. 1996. Spectrophotometric study of anthocyan copigmentation reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(5), 1333-1336.
- Barba, F. J., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant'Ana, A. S., ve Orlien, V. 2016. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 49, 96-109.
- Barthomeuf, C., Lamy, S., Blanchette, M., Boivin, D., Gingras, D., ve Béliveau, R. 2006. Inhibition of sphingosine-1-phosphate-and vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell chemotaxis by red grape skin polyphenols correlates with a decrease in early platelet-activating factor synthesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(4), 581-590.
- Baş, C. 2010. Cevap yüzeyi tasarımları ve sinir ağları yaklaşımı. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Beres, C., Costa, G. N., Cabezudo, I., da Silva-James, N. K., Teles, A. S., Cruz, A. P., Mellinger-Silva, C., Tonon, R. V., Cabral, L. M. C., ve Freitas, S. P. 2017. Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Management*, 68, 581-594.
- Bertelli, A., Bertelli, A. A., Gozzini, A., ve Giovannini, L. 1998. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs Under Experimental and Clinical Research*, 24(3), 133.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., ve Escaleira, L. A. 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-977.
- Bhat, K. P., ve Pezzuto, J. M. 2002. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957(1), 210-229.
- Blanco, P., Sieiro, C., ve Villa, T. G. 1999. Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 175(1), 1-9.
- Bomser, J. A., Singletary, K. W., Wallig, M. A., ve Smith, M. A. L. 1999. Inhibition of TPA-induced tumor promotion in CD-1 mouse epidermis by a polyphenolic fraction from grape seeds. *Cancer Letters*, 135(2), 151-157.

- Botella, C., De Ory, I., Webb, C., Cantero, D., ve Blandino, A. 2005. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochemical Engineering Journal*, 26(2-3), 100-106.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., ve Berset, C. L. W. T. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-333.
- Brenes, A., Viveros, A., Chamorro, S., ve Arija, I. 2016. Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. A review. *Animal Feed Science and Technology*, 211, 1-17.
- Buiarelli, F., Coccioli, F., Jasionowska, R., Merolle, M., ve Terracciano, A. 2007. Analysis of some stilbenes in Italian wines by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, 21(18), 2955-2964.
- Büyüktünel, E. 2012. Gelişmiş ekstraksiyon teknikleri I. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 32(2), 209-242.
- Canals, R., Llaudy, M. C., Valls, J., Canals, J. M., ve Zamora, F. 2005. Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skin and seeds of Tempranillo grapes at different stages of ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4019-4025.
- Cannell, R. J. 1998. How to approach the isolation of a natural product. In: *Natural Products Isolation*, 4, 1-51, Humana Press.
- Cantos, E., Espín, J. C., Fernández, M. J., Oliva, J., ve Tomás-Barberán, F. A. 2003. Postharvest UV-C-irradiated grapes as a potential source for producing stilbene-enriched red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1208-1214.
- Castellarin, S. D., Di Gaspero, G., Marconi, R., Nonis, A., Peterlunger, E., Paillard, S., Adam-Blondon, A. F., ve Testolin, R. 2006. Colour variation in red grapevines (*Vitis vinifera* L.): genomic organisation, expression of flavonoid 3'-hydroxylase, flavonoid 3', 5'-hydroxylase genes and related metabolite profiling of red cyanidin-/blue delphinidin-based anthocyanins in berry skin. *Bmc Genomics*, 7(1), 1-17.
- Chamorro, S., Viveros, A., Alvarez, I., Vega, E., ve Brenes, A. 2012. Changes in polyphenol and polysaccharide content of grape seed extract and grape pomace after enzymatic treatment. *Food Chemistry*, 133(2), 308-314.

- Chemat, F., Vian, M. A., ve Cravotto, G. 2012. Green extraction of natural products: concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8615-8627.
- Cheng, V. J., Bekhit, A. E. D. A., McConnell, M., Mros, S., ve Zhao, J. 2012. Effect of extraction solvent, waste fraction and grape variety on the antimicrobial and antioxidant activities of extracts from wine residue from cool climate. *Food Chemistry*, 134(1), 474-482.
- Cherry, J. R., ve Fidantsef, A. L. 2003. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current opinion in biotechnology*, 14(4), 438-443.
- Cheyrier, V. 2005. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 223S-229S.
- Christ, K. L., ve Burritt, R. L. 2013. Critical environmental concerns in wine production: an integrative review. *Journal of Cleaner Production*, 53, 232-242.
- Christ, K. L., ve Burritt, R. L. 2013. Critical environmental concerns in wine production: an integrative review. *Journal of Cleaner Production*, 53, 232-242.
- Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A. C. P., Tavares, R. M., Sousa, M. J., Agasse, A., Delrot, S. ve Gerós, H. 2007. Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food*, 1(1), 1-22.
- Costoya, N., Sineiro, J., Pinelo, M., Rubilar, M., ve Nuñez, M. J. 2010. Enzyme-aided extraction of polyphenols from grape pomace. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 9(4), 696-705.
- Cuccia, P. 2015. Ethics+ economy+ environment= sustainability: Gambero Rosso on the front lines with a new concept of sustainability. *Wine Economics and Policy*, 4(1), 69-70.
- Cui, J., Cordis, G. A., Tosaki, A., Maulik, N., ve Das, D. K. 2002. Reduction of myocardial ischemia reperfusion injury with regular consumption of grapes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957(1), 302-307.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., ve Masella, R. 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-Istituto Superiore di Sanita*, 43(4), 348.
- Dai, J., ve Mumper, R. J. 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
- Darias-Martín, J., Martín-Luis, B., Carrillo-López, M., Lamuela-Raventós, R., Díaz-Romero, C., ve Boulton, R. 2002. Effect of caffeic acid on the color of red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 2062-2067.
- de Souza, V. B., Fujita, A., Thomazini, M., da Silva, E. R., Lucon Jr, J. F., Genovese, M. I., ve Favaro-Trindade, C. S. 2014. Functional properties and stability of spray-

- dried pigments from Bordo grape (*Vitis labrusca*) winemaking pomace. *Food Chemistry*, 164, 380-386.
- Di Lecce, G., Arranz, S., Jáuregui, O., Tresserra-Rimbau, A., Quifer-Rada, P., ve Lamuela-Raventós, R. M. 2014. Phenolic profiling of the skin, pulp and seeds of Albariño grapes using hybrid quadrupole time-of-flight and triple-quadrupole mass spectrometry. *Food Chemistry*, 145, 874-882.
- Dulundu, E., Ozel, Y., Topaloglu, U., Toklu, H., Ercan, F., Gedik, N., ve Şener, G. 2007. Grape seed extract reduces oxidative stress and fibrosis in experimental biliary obstruction. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 22(6), 885-892.
- Düsterhölt, E. M., Engels, F. M., ve Voragen, A. G. 1993. Parameters affecting the enzymic hydrolysis of oil-seed meals, lignocellulosic by-products of the food industry. *Bioresource Technology*, 44(1), 39-46.
- Dwyer, K., Hosseinian, F., ve Rod, M. R. 2014. The market potential of grape waste alternatives. *Journal of Food Research*, 3(2), 91-91.
- Facino, R. M., Carini, M., Aldini, G., Calloni, M. T., Bombardelli, E., ve Morazzoni, P. 1998. Sparing effect of procyanidins from *Vitis vinifera* on vitamin E: in vitro studies. *Planta Medica*, 64(04), 343-347.
- Feng, Y., Liu, Y. M., Fratkins, J. D., ve LeBlanc, M. H. 2005. Grape seed extract suppresses lipid peroxidation and reduces hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Research Bulletin*, 66(2), 120-127.
- Fennema, O. R. 1985. *Food Chemistry*. In: *Pigment and Other Colorants*, 545-584.
- Fernandez de Simon, B., Perez-Illarbe, J., Hernandez, T., Gomez-Cordoves, C., ve Estrella, I. 1992. Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(9), 1531-1535.
- Fernández, K., Vega, M., ve Aspé, E. 2015. An enzymatic extraction of proanthocyanidins from País grape seeds and skins. *Food Chemistry*, 168, 7-13.
- Fontana, A. R., Antonioli, A., ve 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(38), 8987-9003.
- Fontana, A. R., Antonioli, A., ve 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(38), 8987-9003.
- Gambutì, A., Strollo, D., Ugliano, M., Lecce, L., ve Moio, L. 2004. trans-resveratrol, quercetin,(+)-catechin, and (-)-epicatechin content in south Italian monovarietal wines: relationship with maceration time and marc pressing during winemaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(18), 5747-5751.

- Garcia, C.Á. 2018. Application of enzymes for fruit juice processing. In G. Rajauria, ve B. K. Tiwari (Eds.). *Fruitjuices: Extraction, composition, quality and analysis*, 201-216, Academic Press.
- García-Lomillo, J., ve González-SanJosé, M. L. 2017. Applications of wine pomace in the food industry: Approaches and functions. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1), 3-22.
- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., ve Fernández-Gutiérrez, A. 2010. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, 15(12), 8813-8826
- Garcia-Viguera, C., ve Bridle, P. 1995. Analysis of non-coloured phenolic compounds in red wines. A comparison of high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis. *Food Chemistry*, 54(4), 349-352.
- Gardossi, L., Poulsen, P. B., Ballesteros, A., Hult, K., Švedas, V. K., Vasić-Rački, Đ., Carrea, G., Magnusson, A., Schmid, A., Wohlgemuth, R., ve Halling, P. J. 2010. Guidelines for reporting of biocatalytic reactions. *Trends in Biotechnology*, 28(4), 171-180.
- Ghafari, S., Aziz, H. A., Isa, M. H., ve Zinatizadeh, A. A. 2009. Application of response surface methodology (RSM) to optimize coagulation-flocculation treatment of leachate using poly-aluminum chloride (PAC) and alum. *Journal of Hazardous Materials*, 163(2-3), 650-656.
- Ghandahari Yazdi, A. P., Barzegar, M., Sahari, M. A., ve Ahmadi Gavlighi, H. 2019. Optimization of the enzyme-assisted aqueous extraction of phenolic compounds from pistachio green hull. *Food Science & Nutrition*, 7(1), 356-366.
- Gligor, O., Mocan, A., Moldovan, C., Locatelli, M., Crişan, G., ve Ferreira, I. C. F. R. 2019. Enzyme-assisted extractions of polyphenols - A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 302-315.
- Gollücke, A. P. B. 2010. Recent applications of grape polyphenols in foods, beverages and supplements. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 2(2), 105-109.
- Gómez-García, R., Martínez-Ávila, G. C., ve Aguilar, C. N. 2012. Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenolics from grape (*Vitis vinifera* L.) residues. *3 Biotech*, 2(4), 297-300.
- González-Manzano, S., Rivas-Gonzalo, J. C., ve Santos-Buelga, C. 2004. Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 283-289.
- Güntert, M., Rapp, A., Takeoka, G. R., ve Jennings, W. 1986. HRGC and HRGC-MS applied to wine constituents of lower volatility. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 182(3), 200-204.

- Handa, S.S., Khanuja, S.P.S., Longo, G., Rakesh, D.D. 2008. Extraction technologies for medicinal and aromatic plants, International Centre For Science and High Technology, 266.
- Harborne, J. B. 1989. General procedures and measurement of total phenolics. *Methods in Plant Biochemistry*, 1, 1-28.
- Harborne, J. B., ve Williams, C. A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.
- Hwang, I. K., Yoo, K. Y., Kim, D. S., Jeong, Y. K., Dai Kim, J., Shin, H. K., Lim, S.S., Yoo, I.D., Kang, T.C., Kim, D.W., Moon, W.K., ve Won, M. H. 2004. Neuroprotective effects of grape seed extract on neuronal injury by inhibiting DNA damage in the gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia. *Life Sciences*, 75(16), 1989-2001.
- Ignat, I., Volf, I., ve Popa, V. I. 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), 1821-1835.
- Jain, R., Urban, L., Balbach, H., ve Webb, M. D. 2012. Contemporary Issues in Environmental Assessment. In *Handbook of Environmental Engineering Assessment*, 361-447.
- Jayani, R. S., Saxena, S., ve Gupta, R. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 40(9), 2931-2944.
- Jayaprakasha, G. K., Selvi, T., ve Sakariah, K. K. 2003. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Research International*, 36(2), 117-122.
- Jayaprakasha, G. K., Singh, R. P., ve Sakariah, K. K. 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry*, 73(3), 285-290.
- Jeandet, P., Bessis, R., Sbaghi, M., Meunier, P., ve Trollat, P. 1995. Resveratrol content of wines of different ages: relationship with fungal disease pressure in the vineyard. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(1), 1-4.
- Kallithraka, S., Garcia-Viguera, C., Bridle, P., ve Bakker, J. 1995. Survey of solvents for the extraction of grape seed phenolics. *Phytochemical Analysis*, 6(5), 265-267.
- Kammerer, D., Claus, A., Schieber, A., ve Carle, R. 2005. A novel process for the recovery of polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. *Journal of Food Science*, 70(2), C157-C163.
- Kantz, K., ve Singleton, V. L. 1991. Isolation and determination of polymeric polyphenols in wines using Sephadex LH-20. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42(4), 309-316.



- Kayahan, M., ve Tekin, A. 2006. Zeytinyağı Üretim Teknolojisi, TMMOB Gıda Mühendisleri Odası Kitaplar Serisi: 15, Filiz Matbaacılık San. Tic. Ltd, Ankara.
- Kurilich, A. C., Clevidence, B. A., Britz, S. J., Simon, P. W., ve Novotny, J. A. 2005. Plasma and urine responses are lower for acylated vs nonacylated anthocyanins from raw and cooked purple carrots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(16), 6537-6542.
- Kutlu, N., Yeşilören, G., İşci, A., ve Şakıyan, Ö. 2017. Konvansiyonel ekstraksiyona alternatif: Yeşil teknolojiler. *Gıda*, 42(5), 514-526.
- Landbo, A. K., ve Meyer, A. S. 2001. Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenols from black currant juice press residues (*Ribes nigrum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3169-3177.
- Lapornik, B., Prošek, M., ve Wondra, A. G. 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71(2), 214-222.
- Laroze, L., Soto, C., ve Zúñiga, M. E. 2010. Phenolic antioxidants extraction from raspberry wastes assisted by-enzymes. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(6), 11-12.
- Li, B. Y., Cheng, M., Gao, H. Q., Ma, Y. B., Xu, L., Li, X. H., Li, X. L., ve You, B. A. 2008. Back-regulation of six oxidative stress proteins with grape seed proanthocyanidin extracts in rat diabetic nephropathy. *Journal of Cellular Biochemistry*, 104(2), 668-679.
- López-Vélez, M., Martínez-Martínez, F., ve Valle-Ribes, C. D. 2003. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(2), 233-244.
- MacDougall, D. 2002. *Colour in food: improving quality*, 388, Woodhead Publishing.
- Maier, T., Göppert, A., Kammerer, D. R., Schieber, A., ve Carle, R. 2008. Optimization of a process for enzyme-assisted pigment extraction from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. *European Food Research and Technology*, 227(1), 267-275.
- Marathe, S. J., Jadhav, S. B., Bankar, S. B., ve Singhal, R. S. 2017. Enzyme-assisted extraction of bioactives. In: *Food Bioactives*, 171-201. Springer, Cham.
- Marković, D., Petranović, N. A., ve Baranac, J. M. 2000. A spectrophotometric study of the copigmentation of malvin with caffeic and ferulic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5530-5536.
- Marković, J. M. D., Petranović, N. A., ve Baranac, J. M. 2005. The copigmentation effect of sinapic acid on malvin: A spectroscopic investigation on colour enhancement. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 78(3), 223-228.

- Martins, I. M., Roberto, B. S., Blumberg, J. B., Chen, C. Y. O., ve Macedo, G. A. 2016. Enzymatic biotransformation of polyphenolics increases antioxidant activity of red and white grape pomace. *Food Research International*, 89, 533-539.
- McGovern, P. E., Glusker, D. L., Exner, L. J., ve Voigt, M. M. 1996. Neolithic resinated wine. *Nature*, 381(6582), 480-481.
- Mendes, J. A., Xavier, A. M., Evtuguin, D. V., ve Lopes, L. P. 2013. Integrated utilization of grape skins from white grape pomaces. *Industrial Crops and Products*, 49, 286-291.
- Meyer, A. S., Jepsen, S. M., ve Sørensen, N. S. 1998. Enzymatic release of antioxidants for human low-density lipoprotein from grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7), 2439-2446.
- Meyer, A. S., Yi, O. S., Pearson, D. A., Waterhouse, A. L., ve Frankel, E. N. 1997. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(5), 1638-1643.
- Miniati, E., Damiani, P., ve Mazza, G. 1992. Copigmentation and self-association of anthocyanins in food model systems. *Italian Journal of Food Science*, 4, 109-116.
- Miron, T. L., Herrero, M., ve Ibáñez, E. 2013. Enrichment of antioxidant compounds from lemon balm (*Melissa officinalis*) by pressurized liquid extraction and enzyme-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 1288, 1-9.
- Monagas, M., Bartolomé, B., ve Gómez-Cordovés, C. 2005. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(2), 85-118.
- Monagas, M., Suárez, R., Gómez-Cordovés, C., ve Bartolomé, B. 2005. Simultaneous determination of nonanthocyanin phenolic compounds in red wines by HPLC-DAD/ESI-MS. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(2), 139-147.
- Moran, J., ve Shapiro, H. N. 2006. *Fundamentals of engineering thermodynamics*. (5th ed). West Sussex: John Wiley & Sons Ltd. England.
- Muniglia, L., Claisse, N., Baudalet, P. H., ve Ricochon, G. 2014. Enzymatic aqueous extraction (EAE). In: *Alternative solvents for natural products extraction*, 167-204, Springer, Berlin, Heidelberg.
- Munoz, O., Sepulveda, M., ve Schwartz, M. 2004. Effects of enzymatic treatment on anthocyanic pigments from grapes skin from Chilean wine. *Food Chemistry*, 87(4), 487-490.
- Nadar, S. S., ve Rathod, V. K. 2017. Facile synthesis of glucoamylase embedded metal-organic frameworks (glucoamylase-MOF) with enhanced stability. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 511-519.

- Nicolini, G., ve Mattivi, F. 1997. Red grapes vinification with exogenous pectolytic enzymes. *Enotechnico*, 33(3), 65-71.
- Nizamlioğlu, N. M., ve Nas, S. 2010. Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler, yapıları ve önemleri. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5(1), 20-35.
- Olawoye, B. 2016. A comprehensive handout ON central composite design (CCD). NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods.
- Pandey, K. B., ve Rizvi, S. I. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270-278.
- Panja, P. 2017. Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. *Current Opinion in Food Science*, 17, 1-10.
- Pantelić, M. M., Zagorac, D. Č. D., Davidović, S. M., Todić, S. R., Bešlić, Z. S., Gašić, U. M., Tešić, Ž. Lj., Natić, M.M., ve Natić, M. M. 2016. Identification and quantification of phenolic compounds in berry skin, pulp, and seeds in 13 grapevine varieties grown in Serbia. *Food Chemistry*, 211, 243-252.
- Pedrolli, D. B., Monteiro, A. C., Gomes, E., ve Carmona, E. C. 2009. Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. *Open Biotechnology Journal*, 9-18.
- Pena-Neira, A., Hernández, T., García-Vallejo, C., Estrella, I., ve Suarez, J. A. 2000. A survey of phenolic compounds in Spanish wines of different geographical origin. *European Food Research and Technology*, 210(6), 445-448.
- Perrone, G., Nicoletti, I., Pascale, M., De Rossi, A., De Girolamo, A., ve Visconti, A. 2007. Positive correlation between high levels of ochratoxin A and resveratrol-related compounds in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6807-6812.
- Pinelo, M., ve Meyer, A. S. 2008. Enzyme-assisted extraction of antioxidants: Release of phenols from vegetal matrixes. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 7, 3217-3220.
- Pinelo, M., Arnous, A., ve Meyer, A. S. 2006. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology*, 17(11), 579-590.
- Pinelo, M., Del Fabbro, P., Manzocco, L., Nuñez, M. J., ve Nicoli, M. C. (2005). Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chemistry*, 92(1), 109-117.
- Pinelo, M., Zornoza, B., ve Meyer, A. S. 2008. Selective release of phenols from apple skin: Mass transfer kinetics during solvent and enzyme-assisted extraction. *Separation and Purification Technology*, 63, 620-627.

- Pocock, K. F., Sefton, M. A., ve Williams, P. J. 1994. Taste thresholds of phenolic extracts of French and American oakwood: the influence of oak phenols on wine flavor. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45(4), 429-434.
- Poojary, M. M., Orlien, V., Passamonti, P., ve Olsen, K. 2017. Enzyme-assisted extraction enhancing the umami taste amino acids recovery from several cultivated mushrooms. *Food Chemistry*, 234, 236-244.
- Poudel, P. R., Tamura, H., Kataoka, I. ve Mochioka, R. 2008. Phenolic compounds and antioxidant activities of skins and seeds of five wild grapes and two hybrids native to Japan. *Journal of Food Composition Analysis*, 21, 622-625.
- Pozo-Bayón, M. Á., Hernández, M. T., Martín-Álvarez, P. J., ve Polo, M. C. 2003. Study of low molecular weight phenolic compounds during the aging of sparkling wines manufactured with red and white grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(7), 2089-2095.
- Puri, M., Sharma, D., ve Barrow, C. J. 2012. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*, 30(1), 37-44.
- Püssa, T., Floren, J., Kuldkepp, P., ve Raal, A. 2006. Survey of grapevine *Vitis vinifera* stem polyphenols by liquid chromatography-diode array detection-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7488-7494.
- Ray, S. D., Kumar, M. A., ve Bagchi, D. 1999. A novel proanthocyanidin IH636 grape seed extract increases in vivo Bcl-XL expression and prevents acetaminophen-induced programmed and unprogrammed cell death in mouse liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 369(1), 42-58.
- Reisch, B. I., Owens, C. L., ve Cousins, P. S. 2012. Grape. In: *Fruit breeding*. Badenes, M. L., ve Byrne, D. H. (eds.), 225-262, Springer, Boston.
- Rentzsch, M., Wilkens, A., ve Winterhalter, P. 2009. Non-flavonoid phenolic compounds. In: *Wine chemistry and biochemistry*. Moreno-Arribas, M. V., ve Polo, M. C. (eds.), 509-527, Springer, New York.
- Rhodes, P. L., Mitchell, J. W., Wilson, M. W., ve Melton, L. D. 2006. Antilisterial activity of grape juice and grape extracts derived from *Vitis vinifera* variety Ribier. *International Journal of Food Microbiology*, 107(3), 281-286.
- Roca, P. 2019. *Statistical Report on World Vitiviniculture*. International Organisation of Vine and Wine Intergovernmental Organisation: Paris, France.
- Rodriguez, M. R., Romero Peces, R., Chacon Vozmediano, J. L., Martinez Gascuena, J. ve Garcia Romero, E. 2006. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition Analysis*, 19, 687-693.
- Roselló-Soto, E., Parniakov, O., Deng, Q., Patras, A., Koubaa, M., Grimi, N., Boussetta, N., B. K., Tiwari, Vorobiev, E., Lebovka, N., ve Barba, F. J. 2016. Application of

- non-conventional extraction methods: Toward a sustainable and green production of valuable compounds from mushrooms. *Food Engineering Reviews*, 8(2), 214-234.
- Rózek, A., Achaerandio, I., Güell, C., López, F., ve Ferrando, M. 2010. Use of commercial grape phenolic extracts to supplement solid foodstuff. *LWT-Food Science and Technology*, 43(4), 623-631.
- Salagoity-Auguste, M. H., ve Bertrand, A. 1984. Wine phenolics-analysis of low molecular weight components by high performance liquid chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35(11), 1241-1247.
- Sánchez-Madriral, M. Á., Viesca-Nevárez, S. L., Quintero-Ramos, A., Amaya-Guerra, C. A., Meléndez-Pizarro, C. O., Contreras-Esquivel, J. C., ve Talamás-Abbud, R. 2018. Optimization of the enzyme-assisted extraction of fructans from the wild soto plant (*Dasyilirion wheeleri*). *Food Bioscience*, 22, 59-68.
- Sarıçiçek, B. Z., ve Kılıç, Ü. 2002. Üzüm cibresinin in situ rumen parçalanabilirliğinin belirlenmesi. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 33(3), 289-292.
- Schrauwen, P., ve Timmers, S. 2014. Can resveratrol help to maintain metabolic health?. *Proceedings of the Nutrition Society*, 73(2), 271-277.
- Shahidi, F., ve Naczk, M., 1995. *Food Phenolics, Sources, Chemistry, Effects, Applications*. Technomic Publishing Company Book, 199-225, Lanchester, USA.
- Shinagawa, F. B., Santana, F. C. D., Torres, L. R. O., ve Mancini-Filho, J. 2015. Grape seed oil: a potential functional food. *Food Science and Technology*, 35(3), 399-406
- Simpson, B., Rui, X., Klomklo, S. 2012. Enzymes in food processing. In: Simpson (Ed.), *Food Biochemistry and Food Processing*. Wiley-Blackwell, 181-206.
- Singleton, V. L., ve Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Soleas, G. J., Diamandis, E. P., ve Goldberg, D. M. 1997. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 11(5), 287-313.
- Spencer, J. P., Abd El Mohsen, M. M., Minihaane, A. M., ve Mathers, J. C. 2008. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *British Journal of Nutrition*, 99(1), 12-22.
- Spigno, G., ve De Faveri, D. M. 2007. Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 793-801.

- Spigno, G., Tramelli, L., ve 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.
- Štambuk, P., Tomašković, D., Tomaz, I., Maslov, L., Stupić, D., ve Karoglan Kontić, J. 2016. Application of pectinases for recovery of grape seeds phenolics. *3 Biotech*, 6(2).
- Swier, T. L., Mukhim, C., Bashir, K., ve Chauhan, K. 2018. Optimization of enzyme aided extraction of anthocyanins from *Prunus nepalensis* L.. *Food Science and Technology*, 91, 382-390.
- Şehirli, Ö., Ozel, Y., Dulundu, E., Topaloglu, U., Ercan, F., ve Şener, G. 2008. Grape seed extract treatment reduces hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Phytotherapy Research*, 22(1), 43-48.
- Talley, K., ve Alexov, E. 2010. On the pH-optimum of activity and stability of proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 78(12), 2699-2706.
- Tebib, K., Besançon, P., ve Rouanet, J. M. 1994. Dietary grape seed tannins affect lipoproteins, lipoprotein lipases and tissue lipids in rats fed hypercholesterolemic diets. *The Journal of Nutrition*, 124(12), 2451-2457.
- This, P., Lacombe, T., ve Thomas, M. R. 2006. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics*, 22(9), 511-519.
- Tomaz, I., Maslov, L., Stupić, D., Preiner, D., Ašperger, D., ve Kontić, J. K. 2015. Recovery of flavonoids from grape skins by enzyme-assisted extraction. *Separation Science and Technology*, 51(2), 255-268.
- Torres, J. L., Varela, B., García, M. T., Carilla, J., Matito, C., Centelles, J. J., Cascante, M., Sort, X., ve Bobet, R. 2002. Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(26), 7548-7555.
- Tsao, R. 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.
- Tsao, R., ve Yang, R. 2003. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1018(1), 29-40.
- Vanhoenacker, G., De Villiers, A., Lazou, K., De Keukeleire, D., ve Sandra, P. 2001. Comparison of high-performance liquid chromatography - mass spectroscopy and capillary electrophoresis - mass spectroscopy for the analysis of phenolic compounds in diethyl ether extracts of red wines. *Chromatographia*, 54, 309-315.

- Vermeris, W., ve Nicholson, R. 2006. Families of Phenolic Compounds and Means of Classification. In: Phenolic Compound Biochemistry. Vermeris, W., ve Nicholson, R. (eds). 1-34, Springer, Netherlands.
- Vijayaraghavan, P., Raj, S., ve Vincent, S., 2016. Industrial enzymes: recovery and purification challenges. In: Dhillon, Kaur (Eds.), Agroindustrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production, Apply and Exploit the Emerging and Valuable Use Options of Waste Biomass, 95-110, Elsevier Inc, Academic Press.
- Wen, J. 2007. Vitaceae. In: K. Kubitzki (Ed.). The Families and Genera of Vascular Plants. Volume IX: Flowering Plants-Eudicots, 467-479, Springer-Verlag, Berlin.
- Whitaker, J. R. 1990. Microbial pectolytic enzymes. In: Microbial enzymes and biotechnology. Fogarty, W.M., Kelly, C.T. (eds), 133-176, Springer, Dordrecht.
- Xu, C., Zhang, Y., Cao, L., ve Lu, J. 2010a. Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. Food Chemistry, 119(4), 1557-1565.
- Xu, C., Zhang, Y., Wang, J., ve Lu, J. 2010b. Extraction, distribution and characterisation of phenolic compounds and oil in grapeseeds. Food Chemistry, 122(3), 688-694.
- Xu, H., Liu, X., Yan, Q., Yuan, F., ve Gao, Y. 2015. A novel copigment of quercetagenin for stabilization of grape skin anthocyanins. Food Chemistry, 166, 50-55.
- Yağcı, C., Toker, M. C., ve Toker, G. 2008. Bitki doku kültürü yoluyla üretilen flavonoidler. Turkish Journal of Scientific Reviews, 1(1), 47-58.
- Yilmaz, Y., ve Toledo, R. T. 2006. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. Journal of Food Composition and Analysis, 19(1), 41-48.
- Yu, J., ve Ahmedna, M. 2012. Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. International Journal of Food Science & Technology, 48(2), 221-237.
- Zainal-Abideen, M., Aris, A., Yusof, F., Abdul-Majid, Z., Selamat, A., ve Omar, S. I. 2012. Optimizing the coagulation process in a drinking water treatment plant-comparison between traditional and statistical experimental design jar tests. Water Science and Technology, 65(3), 496-503.
- Zhang, S. B., Wang, Z., ve Xu, S. Y. 2007. Optimization of the aqueous enzymatic extraction of rapeseed oil and protein hydrolysates. Journal of the American Oil Chemists' Society, 84(1), 97-105.
- Zhao, J., Wang, J., Chen, Y., ve Agarwal, R. 1999. Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two-stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B5-3'-gallate as the most effective antioxidant constituent. Carcinogenesis, 20(9), 1737-1745.

- Zhou, Z., Shao, H., Han, X., Wang, K., Gong, C., ve Yang, X. 2017. The extraction efficiency enhancement of polyphenols from *Ulmus pumila* L. barks by trienzyme-assisted extraction. *Industrial Crops and Products*, 97, 401-408.
- Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., ve Nury, F. S. 1990. Phenolic Compounds and Wine Color. In: *Production Wine Analysis*, 129-168, Springer, US.
- Zohary, D., ve Hopf, M. 1988. *Domestication of Plants in the Old World*. Oxford University Press, Oxford.
- Zohary, D., ve Hopf, M. 2000. *Domestication of plants in the Old World: The origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe and the Nile Valley*. Oxford University Press, Oxford.
- Zou, H., Kilmartin, P. A., Inglis, M. J., ve Frost, A. 2002. Extraction of phenolic compounds during vinification of Pinot Noir wine examined by HPLC and cyclic voltammetry. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 8(3), 163-174.



