



ARAŞTIRMA MAKALESİ /RESEARCH ARTICLE

KIRMIZI ÜZÜM EKSTRELERİNİN LİPİD PEROKSİDASYONUNU ÖNLEYİCİ ETKİLERİ

Berrin Bozan¹

ÖZ

Sofralık kırmızı üzüm fenolik bileşiklerinin gıdalarda doğal antioksidan olarak kullanılabilirliğini araştırmak üzere, üzüm çekirdek ve kabukları aseton, etil asetat ve etil alkol ile ekstre edilmiş ve ekstrelerin antioksidan etkileri zeytin yağının peroksit sayısının ölçümüne dayalı lipit peroksidasyonunu inhibisyon metodu ile belirlenmiştir. Çekirdeklerden elde edilen tüm ekstreler ve kabuktan elde edilen aseton ekstresi antioksidan aktivite göstermiştir. Üzüm kabuğunun aseton ekstresinin ve çekirdek alkol ekstresinin antioksidan aktivitelerinin BHT nin antioksidan aktivitesinden çok yüksek olduğu gözlenmiş ve bu ekstrelerin gıdalarda koruyucu olarak kullanılacakları belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler : Üzüm kabuğu ve çekirdeği, Toplam fenol, Antioksidan aktivite, Peroksit değeri

PROTECTIVE EFFECT OF RED GRAPE EXTRACTS ON LIPID PEROXIDATION

ABSTRACT

Table red grape skin and seeds were extracted with acetone, ethyl acetate and ethyl alcohol in order to obtain phenolic compounds with a view to their use as food lipid antioxidants, and the antioxidant activities of extracts were evaluated by lipid peroxidation method measuring peroxide values of olive oil. All extracts from grape seed and acetone extract from grape skin showed antioxidant activity. Antioxidant activity of acetone extract from grape skin and ethyl alcohol extract from grape seed was higher than that of BHT, and they might be used for the preservation of food products.

Keywords: Grape skin and seed, Total phenolic compounds, Antioxidant activity, Peroxide value

¹ Anadolu Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü.
Tel: (222)3350580-6509, e-posta: bbozan@anadolu.edu.tr

1. GİRİŞ

Gıdalar, üretim, proses, depolama ve tüketiciye ulaştırılması sırasında kimyasal veya biyolojik olarak bozunmaya uğrarlar. Özellikle bileşiminde bulunan yağların oksidasyonu nedeniyle fiziksel özellikleri, besin değerleri, görünüşleri değişir, istenmeyen koku ve tat oluşur (Yagi, 1987; Halliwell, 1997; Jacob, 1994). Bozunmayı önlemek için üretim ve kullanım aşamasında oksijenle temasının kesilmesi bir yol olmasına rağmen pratikte bu pek mümkün değildir ve antioksidan denilen koruyucu katkı maddeleri ilave edilir. Ucuz ve stabil olmaları bakımından Bütillenmiş Hidroksi Toluen (BHT) ve Bütillenmiş Hidroksi Anisol (BHA) ve Propil Gallat (PG) en sık kullanılan sentetik antioksidanlardır. Ancak son yıllarda yapılan araştırmalarda sentetik antioksidanların yan etkilerinin ortaya çıkması ve özellikle kanser hastalığına yol açabileceğine dair şüpheler üzerine gelişmiş ülkelerde, özellikle Japonya'da, bu maddelerin kullanılmasına kısıtlamalar getirilmiştir (Branen, 1975; Takajashi ve Hiraga, 1978). Yine son yıllarda tüketici bilincinin de artmasıyla sentetik bileşikler yerine doğal bileşiklerin kullanımına yönelik büyük bir talep doğmuştur. Bu nedenlerle sentetik antioksidanların yerine gıdalarda kullanılacak aynı etkiye sahip doğal bileşikler üzerine araştırmalar hız kazanmıştır (Prat, 1992, Pokorny, 1991).

Doğal antioksidan maddelerin önemli bir kaynağını meyve ve sebzeler, baharatlar, bitkisel çaylar ve yağlı tohumlar oluşturmaktadır. Vitamin E (tokoferol), Vitamin C (askorbik asit) gibi bileşiklerin yanı sıra bitkilerde büyük bir kimyasal grubu oluşturan fenolik bileşikler genellikle antioksidan etkiden sorumlu bileşikler olarak bilinmektedir (Shahidi ve Naczk, 2004).

Fenolik bileşikler, basit molekül yapısına sahip olan fenolik asitlerden, flavonoidlere ve daha büyük molekülü polifenollere (tanen) kadar geniş bir kimyasal yapıya sahip, bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan sekonder metabolitlerdir (Rice-Evans, 2001). Gıda bitkileri içinde özellikle meyve ve sebzelerde yüksek miktarda bulunurlar (Kaur ve Kapoor, 2001). Bu bileşikler içeren gıdaların tüketildiklerinde canlı organizmada özellikle reaktif oksijen radikallerini süpürücü ve lipid oksidasyonunu engelleyici etkilerinden dolayı yaşlanma, kalp hastalıkları ve kanser gibi dejeneratif hastalıklar üzerine olumlu etkilerinin görülmesi üzerine fenolik bileşiklere olan ilgi oldukça artmış ve bu maddeler son yıllarda özellikle gelişmiş ülkelerde bitkilerden izole edilerek fonksiyonel gıda ve nutrosötiklerin bileşimlerine girerek ticari ürünler halinde tüketiciye sunulmuştur (Andry vd., 1998; Dell'Agli, 2004; Philpott ve Lynnette, 2004).

Üzüm meyvesi, fenolik asitlerden, polimerik yapıda proantosiyaniinlere kadar çok farklı yapılarda fenolik bileşenlere sahip kompleks bir yapıya sahiptir (Yılmaz ve Toledo, 2004). Üzüm çekirdeği flavan-3-ol (kateşin)'lerin polimerleri olarak bilinen prosiyanidinlerce zengindir. Üzüm kabuğu ve suyu ise renginden sorumlu antosiyaniin ve fenolik asitleri içer-

mektedir. Bu bileşenlerin bulunma oranları üzüm çeşidine, yetiştirilme şartlarına ve toplanma zamanına bağlıdır. Bu parametrelere ilave olarak üzümde elde edilen ürünlerde (şarap, üzüm suyu, üzüm kabuğu ve çekirdeği ekstresi, vb.) proses edilme şartları, saklanma koşulları, gıdalara katılması sırasındaki işlem basamakları, polifenolik bileşenlere ve dolayısı ile antioksidan aktivitesine etki eden diğer parametrelerdir. Bu prosesler sırasında polifenoller sıcaklık, pH, oksidasyon (enzimatik veya kimyasal) gibi kimyasal ve fiziksel etkilerle yapılarını değiştirebilir ve aktivitelerini yitirebilirler (Bonilla vd., 1999; Pinelo vd., 2005; Nicoli vd., 2000). Yapılan araştırmalarda üzümdeki ve kırmızı şaraptaki fenolik bileşiklerin lipid oksidasyonunu (LDL) inhibe ettiği ve kalp ve damar hastalıklarının koruyucu etkilerinin görüldüğü bildirilmiştir (Xia, vd. 1998; van de Wiel, vd. 2001). Polifenollerin göstermiş oldukları sağlık üzerine yararları üzümde elde edilen bu bileşiklerin diet destekleyici olarak değerlendirilmesine yol açmıştır. Bu nedenle de son yıllarda yüksek antioksidan etkiye sahip polifenollerin elde edilmesine yönelik araştırmalarda hızlı bir artış gözlenmiştir.

Bu çalışmada sofralık kırmızı üzüm çekirdeği ve kabuğundan elde edilen ekstraktların önemli bir gıda bileşeni olan zeytinyağının bozunması üzerine etkileri incelenmiş ve ekstraksiyonda kullanılan çözücülerin toplam fenol ve lipid peroksidasyonunu önleyici etkileri araştırılmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

Mevsiminde alınıp dondurulan sofralık kırmızı üzümler, kabuk, etli kısımlar ve çekirdekleri olmak üzere elle ayrılmıştır. Daha sonra vakumlu etüvde 50°C de kurutulmuş, havanda dövülerek toz edilmiş ve ekstraksiyon işlemi için hazır hale getirilmiştir. Üzüm çekirdek ve kabuklarının içermiş oldukları nem 110°C de gravimetrik olarak tayin edilmiştir. Üzüm çekirdeği ve kabuğu Soxhlet cihazında petrol eteri ile 6 saat ekstre edilerek yağlarından uzaklaştırılmış, yağı alınmış materyaller polifenollerin ekstraksiyonunda kullanılmıştır.

2.1 Polifenollerin Ekstraksiyonu

Yağlarından uzaklaştırılmış 15'er gram üzüm kabuğu ve çekirdeği aseton, etilalkol ve etilasetat ile Soxhlet cihazında 6 saat ekstre edilmiş elde edilen ekstraktların çözücülerini 40°C da vakumlu döner buharlaştırıcı kullanılarak uzaklaştırılarak ekstre verimleri hesaplanmıştır. Ekstraksiyon işlemleri paralel olarak yapılmış ve sonuçların ortalaması kullanılmıştır.

2.2 Toplam Fenol Miktarı

Ekstrelerin içerdiği toplam fenol miktarı Folin-Ciocalteu yöntemine göre yapılmıştır (Hoff ve Singleton, 1977.). Bütün örnekler ve standart olarak kullanılan gallik asid %50 lik metanolde çözülmüştür. 0.1 ml örnek, 0.5 ml Folin-Ciocalteu reaktifi (%10'luk, h/h, suda) ve 1.5 ml sodyum karbonat çözeltisi

tisi (%20'lik, a/h, suda) deney tüpüne karıştırılarak 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda çözeltilerin absorpsanları 750 nm de spektrofotometrede okunmuştur. Toplam fenol miktarı gram ekstrede mg gallik asite eşdeğer olacak şekilde hesaplanmıştır. Toplam fenol miktarı tayini her bir numune için üçer kez tekrarlanmış ve sonuçların ortalaması kullanılmıştır.

2.3 Lipid Peroksidasyonu Önleyici Etkinin Belirlenmesi

10 gram ham zeytin (ilave sentetik antioksidan içermeyen) 100 mg ekstre 50°C deki etüv içinde 8 gün süre ile bekletilmiştir. 0., 2., 4. ve 8. günlerde yağlardaki bozunma dereceleri peroksit sayısının tayin edilmesi ile belirlenmiştir. Peroksit sayısı için 2g numune 25 ml kloroform-asetik asit çözeltisi içinde çözülmüş, 1 ml doymuş potasyum iyodür çözeltisi eklenen numuneler, karanlıkta 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra karışım üzerine 75 ml saf su ve 1 ml nişasta çözeltisi ilave edilmiştir. Rengi mora dönüştükten sonra 0.005N lik sodyum tiyosülfat çözeltisi ile titre edilmiştir. Çözeltinin sarıya dönüştüğü andaki harcanan sodyum tiyosülfat hacmi kaydedilerek peroksit sayısı tespit edilmiştir. Kontrol grubu olarak ekstre içermeyen yağ numunesi kullanılmıştır. Aynı işlemler sentetik BHT kullanılarak da tekrarlanmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Peroksit sayısının küçük olması yağdaki bozunmanın az olması dolayısı ile ilave edilen ekstrelerin lipid peroksidasyonunu inhibe edici etkisinin fazla olduğunu göstermektedir.

3. SONUÇ VE TARTIŞMA

3.1 Ekstraksiyonda Kullanılan Çözücülerin Ekstraksiyon Verimine Etkisi

Ekstraksiyonda kullanılan kabuk ve çekirdeklerin içermiş oldukları nem miktarları sırasıyla %6.4 ve %7.4 olarak bulunmuştur. Aseton, etilasetat ve etil alkolün kuru baz üzerinden elde edilen ekstre verimleri Tablo 1 de verilmiştir. Bu sonuçlara göre üzüm kabuğu için en yüksek verim %75.34 ile çözücü olarak asetonun kullanıldığı ekstraksiyondan elde edilmiştir. Etil alkol ve etilasetat ile yapılan ekstraksiyon sonucu ekstre verim değerlerinin çok yakın olduğu gözlenmiştir (sırasıyla %7.35 ve 7.52).

Tablo 1. Üzüm çekirdeği ve kabuğunun ekstraksiyon verimleri

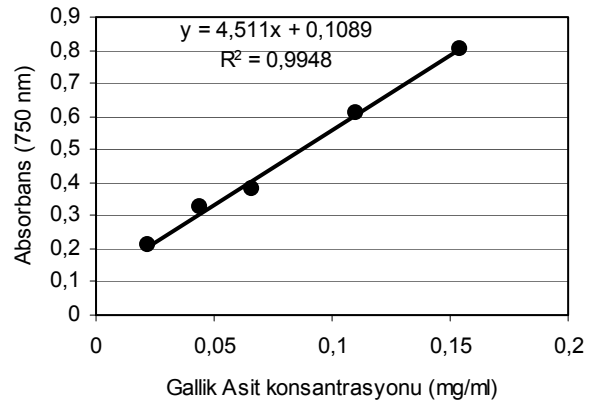
Materyal	Çözücü	Ekstre Kodu	Verim (%)*
Kabuk	etil alkol	ÜKEAL	7.35
	aseton	ÜKASE	75.34
	etilasetat	ÜKEAT	7.52
Çekirdek	etil alkol	ÜÇEAL	8.85
	aseton	ÜÇASE	24.50
	etilasetat	ÜÇEAT	21.70

* Kuru baz üzerinden hesaplanmıştır.

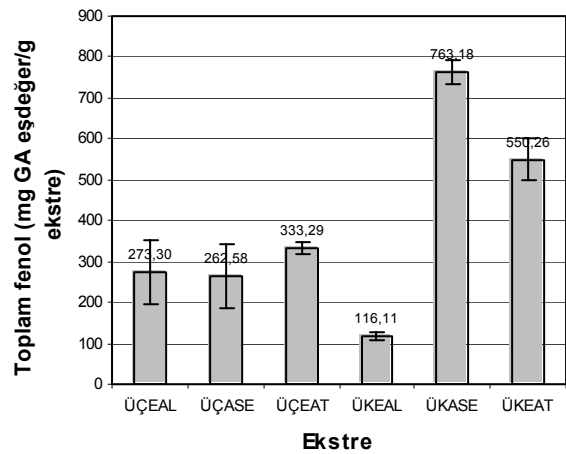
Üzüm çekirdeği içinde aseton ile ekstraksiyon veriminin yüksek (%24.5) olduğu görülürken, bu değeri sırasıyla etilasetat (%21.7) ve etil alkol (%8.85) takip etmiştir.

3.2 Toplam Fenol Miktarı

Folin-Ciocalteu yöntemi ile tayin edilen ekstrelerin içermiş olduğu toplam fenol miktarları gallik asit eşdeğeri üzerinden hesaplanmıştır. Gallik asitin $2.2 \cdot 10^{-2}$ ve $1.54 \cdot 10^{-2}$ mg/ml konsantrasyon aralığındaki absorpsan değerleri okunarak konsantrasyon (mg/ml)-absorpsan çalışma doğrusu hazırlanmıştır (Şekil 1). Bu çalışma doğrusu kullanılarak ekstrelerdeki toplam fenol miktarı gallik asit eşdeğeri cinsinden (mg toplam fenol/g ekstre olarak) hesaplanmıştır. Ekstrelerin içermiş olduğu toplam fenol miktarları Şekil 2 de gösterilmiştir. En yüksek toplam fenol miktarı kabuklardan elde edilen aseton ekstresinde (763 mg GA/g ekstre) gözlenmiştir. Bu değeri 550 mg GA/g ekstre ile etilasetat ekstresi izlemiştir. Çekirdekte ise toplam fenolün en yüksek olduğu değer 333 mg GA/g ekstre ile etilasetat ekstresinden elde edilmiştir.



Şekil 1. Toplam fenol miktar tayininde kullanılan gallik asidin konsantrasyon-absorpsan çalışma eğrisi



Şekil 2. Üzüm çekirdeği ve kabuklarında toplam fenol miktarları (ÜÇ: üzüm çekirdeği, ÜK: üzüm kabuğu, ASE: aseton, EAT: etilasetat, EAL: etil alkol)

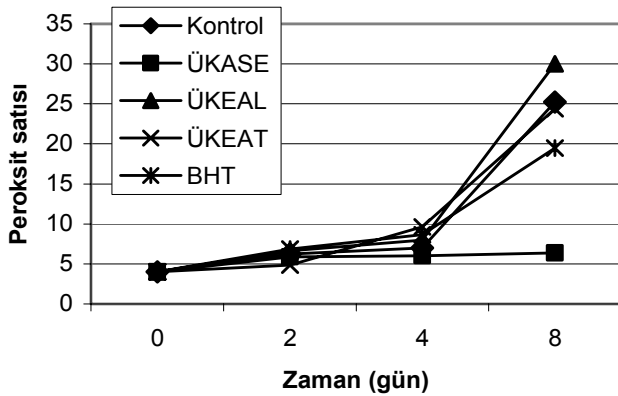
3.3 Ekstrelerin Lipid Peroksidasyonunu İnhibe Edici Etkileri

Üzüm çekirdeği ve kabuğunun çeşitli çözücüler kullanılarak elde edilen ekstralarının ve BHT nin zeytin yağının 50°C de bozunmasını inhibe edici etkileri peroksit sayılarının belirlenmesi ile incelenmiş ve zamanla zeytin yağının peroksit sayılarının değişimi Şekil 3 ve Şekil 4, sekizinci gündeki % inhibisyon ise Tablo 2 de verilmiştir. Kontrol grubu olarak ekstre veya BHT içermeyen ham zeytin yağı kullanılmıştır. Peroksit sayısının düşük olması lipid peroksidasyonunu inhibe edici antioksidan aktivitenin büyük olduğunu göstermektedir.

Tablo 2. Üzüm çekirdeği ve kabuğundan elde edilen ekstraların 8. gün sonunda ham zeytin yağının bozunmasını inhibe edici etkileri

	Ekstre	8. gün sonunda kontrol grubuna göre % inhibisyon
Çekirdek	Aseton	26.73±4.20
	Etil alkol	69.07±5.24
	Etil asetat	49.50±5.60
Kabuk	Aseton	74.73±0.70
	Etil alkol	0.00±0.00
	Etil asetat	3.44±0.70
	BHT	22.78±2.10

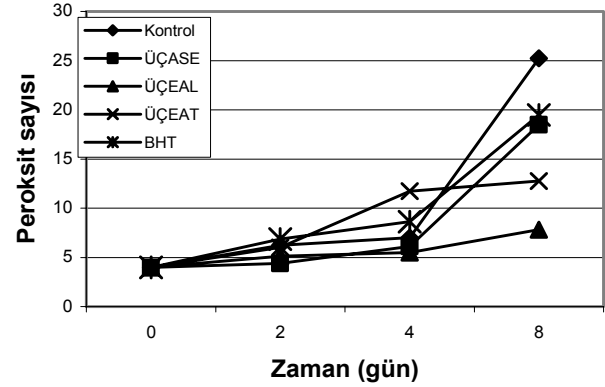
Şekil 3 ve 4 den de görülebileceği gibi, zeytin yağı 4. güne kadar daha yavaş bozunmuş, 4. günden sonra ise hızla bozunmaya başlamıştır.



Şekil 3. Üzüm kabuğu ekstralarının zamanla zeytin yağının peroksidasyonunu inhibe edici etkileri (ÜÇ: üzüm çekirdeği, ÜK: üzüm kabuğu, ASE: aseton, EAT: etil asetat, EAL: etil alkol)

Sekizinci gün bozunmalar göz önüne alındığında (Şekil 3, 4 ve Tablo 2) ise kontrol grubuna göre üzüm çekirdeği elde edilen ekstraların lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği görülmüştür. Bu yöntemle ölçülen antioksidan aktivitelerin gıdalarda ve kozmetikte kullanıldığı bilinen sentetik antioksidan olan BHT nin aktivitesinden yüksek olduğu gözlen-

miştir. Üzüm çekirdeğinde en yüksek aktivite etil alkol ekstresinde (%69.07) gözlenmiştir. Bu değeri sırasıyla etil asetat (%49.50) ve aseton (%26.73) izlemektedir.



Şekil 4. Üzüm çekirdeği ekstralarının zamanla zeytin yağının peroksidasyonunu inhibe edici etkileri (ÜÇ: üzüm çekirdeği, ÜK: üzüm kabuğu, ASE: aseton, EAT: etil asetat, EAL: etil alkol)

Üzüm kabuğunda ise aseton ekstresi en yüksek aktivite gösterirken (%74.73), etil alkol ve etil asetat ekstresi aktivitesi yok denecek kadar azdır. Hatta etil alkol ekstresi ilavesinin yağın bozunmasını hızlandırdığı belirlenmiştir. Bunun nedenin de bu ekstrenin içermiş olduğu bileşen/bileşenlerin prooksidan etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Üzüm ekstralarının antioksidan etkileri içermiş oldukları fenolik bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Ancak toplam fenol miktarları ve aktiviteler arasında bir korelasyon görülmemiştir. Bunun nedeni ekstraların içermiş oldukları fenolik bileşiklerin farklı yapıda olmalarından kaynaklanmaktadır.

Sonuç olarak, üzüm kabuğundan elde edilen aseton ve çekirdeğinden elde edilen etil alkol ekstralarının, gıdaların bozunmasında kullanılan sentetik antioksidan olan BHT nin lipid peroksidasyonunu inhibe etme etkisinden yaklaşık üç kat daha etkili olduğu görülmüştür. Yapılan bu ön çalışma ile ekstraların gıdalarda BHT yerine doğal antioksidan olarak kullanılabilirlikleri görülmektedir. Ancak antioksidan bileşiklerin buldukları ortamdaki diğer bileşiklerle etkileşimleri ve gıdaların farklı proses koşullarında üretilmeleri ve saklanmaları sırasında yapılarının değişebileceğinin de göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Andry, M.C., Vezin, H., Dumistracel, I., Bernier, J. L. ve Lévy, M.C. (1998). Proanthocyanidin microcapsules: preparation, properties and free radical scavenging activity. *Int. J. Pharmaceutics*. 171(2), 217-226.
- Bonilla, F., Mayen, J., Merida, J. ve Medina, M.(1999). Extraction of phenolic compounds

- from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chem.* 66, 209–215.
- Branen, A.-L (1975). Toxicology and biochemistry of buthylated hydroxyanisole and buthylated hydroxytoluene. *J.Am.Oil and Chem. Soc.* 52, 59-63.
- Dell'Agli, M., Busciala, A. ve Bosisio, E. (2004). Vascular effects of wine polyphenols *Cardiovascular Research* 63(4), 593-602.
- Halliwell, B. (1997). Antioxidants and human disease: A general introduction. *Nutr. Rev.* 55, 544-552.
- Hoff, J.F. and Singleton T.J. 1977. A method for determination of tannin in foods by means of immobilized enzymes. *Journal of Food Science*, 42, 1956-1958.
- Jacob, R.-A. (1994), Nutrition, health and antioxidants, *INFORM 5*, 1271-1275.
- Kaur, C. ve Kapoor, H.C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables : The millennium's health. *Int. J. Food Sci. and Tech.* 36, 703-725.
- Nicoli, M.C., Manzocco, L. ve Calligaris, S. (2000). Effect of enzymatic and chemical oxidation on the antioxidant capacity of catechin model systems and apple derivatives. *J. Agri. and Food Chem.* 48, 4576–4580.
- Philpott, M. Ve Ferguson, L.R. (2004). Immunonutrition and cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 551(1-2), 29-42.
- Pinelo, M. Del Fabbro, P., Manzocco, L., Nunez, M.J. ve Nicoli, M.C. (2005). Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts, *Food Chem.* 92(1), 109-117.
- Pokorny, J. (1991). Natural antioxidants for food use. *Trends Food Sci. Technol.* 2, 223-227.
- Prat, D.-E. (1992). Natural antioxidants from plant material. In Phenolic compounds in food and their effects on health II, Huang, M.-T, Ho, C.-T. and Lee, C.-Y. Eds., American Chemical Society, Washington, DC, 55-71.
- Rice-Evans, C. (2001). Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry* 8, 797-807.
- Shahidi, F. ve Naczki, M. (2004). *Phenolics in Food and Nutraceuticals.* CRC Pres, 558 s., Florida.
- Takajashi, O. ve Hiraga, K. (1978). Effects of low levels of BHT on the prothrombin index of male rats. *Food & Cosmet. Toxicol.* 16(5), 475-477.
- van de Wiel, A., van Golde, P.H.M. ve Hart, H. Ch. (2001). Blessings of the grape. *European Journal of Internal Medicine* 12 (6), 484-489.
- Xia, J., Allenbrand, B. ve Grace Y. Sun (1998). Dietary supplementation of grape polyphenols and chronic ethanol administration on LDL oxidation and platelet function in rats. *Life Sciences* 63 (5), 383-390.
- Yagi, K. (1987). Lipid peroxides and human disease. *Chem.Phys.Lipids* 45, 337-341.
- Yılmaz, Y. ve Toledo, R.T. (2004). Major flavonoids in grape seeds and skins: Antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *J. Agricultural and Food Chem.* 52, 255–260.



Berrin BOZAN, Anadolu Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Kimya Mühendisliği bölümünden 1985 yılında mezun oldu. Halen Aynı bölümde Yardımcı Doçent olarak görevini sürdürmektedir.