

**NAR KABUĞU FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN ULTRASON-  
DESTEKLİ EKSTRAKSİYONU VE NAR KABUĞU-  
PROPOLİS EKSTRAKTLARI KARIŞIMININ  
BİYOERİŞİLEBİLİRLİĞİNİN İNCELENMESİ**

**ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF  
POMEGRANATE PEEL PHENOLIC COMPOUNDS AND  
INVESTIGATION OF BIOACCESSIBILITY OF  
POMEGRANATE PEEL-PROPOLIS EXTRACTS MIXTURE**

**NİDA NUR İNKAYA**

**Dr. Öğr. Üyesi Elif YOLAÇANER**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

olarak hazırlanmıştır.

2023

## ÖZET

### NAR KABUĞU FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN ULTRASON-DESTEKLİ EKSTRAKSİYONU VE NAR KABUĞU-PROPOLİS EKSTRAKTLARI KARIŞIMININ BİYOERİŞİLEBİLİRLİĞİNİN İNCELENMESİ

**Nida Nur İNKAYA**

**Yüksek Lisans, GIDA MÜHENDİSLİĞİ Bölümü**

**Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Elif YOLAÇANER**

**Aralık 2023, 99 Sayfa**

Bu tez çalışmasında amaçlanan, gıda endüstrisinde atık bir ürün olan ve tüketilmeyen nar kabuğundan fenolik bileşiklerin ekstrakte edilerek katma değer oluşturulması ve değerli bir gıda takviyesi olan propolis ekstraktları ile karışımlarının biyoerişilebilirliğinin incelenmesidir. Çalışmanın ilk kısmında nar kabuğundan fenolik bileşenlerin ekstraksiyonu için maserasyon ve ultrason-destekli ekstraksiyon yöntemleri denenmiştir. Her iki yöntemde de bağımsız değişkenler ekstraksiyon süresi (maserasyon için saat, ultrason-destekli ekstraksiyon için dakika), ekstraksiyon sıcaklığı (°C) ve örnek miktarı/çözücü hacmi (g/mL) iken, bağımlı değişkenler toplam fenolik madde miktarı (TFM) ile toplam antioksidan kapasite (TAK) olarak belirlenmiştir. İki yöntemde de yanıt yüzey metodolojisi ile optimizasyon uygulanmıştır. Buna göre, maserasyon için optimum koşullar, 3 saat ekstraksiyon süresi, 43 °C ekstraksiyon sıcaklığı ve 1/30 g/mL örnek miktarı/çözücü hacmi olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda elde edilen yanıtlar ise, 120,9 mg GAE/g kuru ağırlık (TFM), 60,6 mmol TE/kg kuru ağırlık (TAK<sub>DPPH</sub>) ve 1645,2 mmol TE/kg kuru ağırlık (TAK<sub>CUPRAC</sub>) olarak tespit edilmiştir. Ultrason-destekli ekstraksiyon yöntemi optimum koşulları 30 dakika ekstraksiyon süresi, 41 °C ekstraksiyon sıcaklığı ve 1/30 g/mL örnek miktarı/çözücü hacmi olarak belirlenmiştir. Bu koşullara göre elde edilen yanıtlar, 159,3 mg

GAE/g kuru ağırlık (TFM), 64,3 mmol TE/kg kuru ağırlık (TAK<sub>DPPH</sub>) ve 4149,5 mmol TE/kg kuru ağırlık (TAK<sub>CUPRAC</sub>) olarak tespit edilmiştir.

Optimizasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre, ultrason-destekli ekstraksiyon yöntemi özellikle süre ve antioksidan kapasite değerleri açısından maserasyondan daha iyi sonuçlar vermiştir. Bu nedenle, çalışmanın ikinci bölümü olan in-vitro sindirim uygulamasında ultrason-destekli ekstraksiyon yönteminden optimum şartlarda elde edilen nar kabuğu ekstraktı kullanılmıştır. Çalışmada, %10 ve %15 propolis ekstraktları (%70 v/v glikol) ile %20 ve %30 propolis ekstraktları (%70 v/v etanol) örneklerinin başlangıç ve gastrointestinal sindirimi sırasında elde edilen TFM ve TAK değerleri incelenmiş ve sonuçlara göre karışımlarda kullanılmak üzere %15 ve %30 propolis ekstraktları örnekleri seçilmiştir. Nar kabuğu ve propolis ekstraktları 1:1, 1:2 ve 2:1 (v/v) oranlarında karıştırılmıştır. Nar kabuğu ekstraktı, 2 adet propolis (glikolik ve etanolik) ekstraktı, 3 glikolik nar-propolis ekstrakt karışımı ve 3 etanolik nar-propolis ekstrakt karışımı olmak üzere 10 adet numunenin başlangıçta ve in-vitro sindirim sırasındaki TFM ve TAK değerleri tespit edilmiştir. Sonuçlar SPSS IBM-23 programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Genel olarak, in-vitro sindirimi yapılan çoğu örnekte mide fazından sonra elde edilen TFM ve TAK değerlerinin azaldığı, bağırsak fazından sonra iki değer de arttığı belirlenmiştir. Biyoerişilebilirlik çalışmasında, nar kabuğu ekstraktının propolis ekstraktı ile kullanılmasının biyoerişilebilirliği olumlu etkilediği ve nar kabuğu ekstrakt miktarı arttıkça karışımların biyoerişilebilirlik oranının attığı görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** maserasyon, ultrason-destekli ekstraksiyon, nar kabuğu ekstraktı, propolis ekstraktı, in-vitro sindirim, toplam fenolik madde, toplam antioksidan kapasite

## **ABSTRACT**

### **ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF POMEGRANATE PEEL PHENOLIC COMPOUNDS AND INVESTIGATION OF BIOACCESSIBILITY OF POMEGRANATE PEEL-PROPOLIS EXTRACTS MIXTURE**

**Nida Nur İNKAYA**

**Master of Science, Department of FOOD ENGINEERING**

**Supervisor: Asst. Prof. Elif YOLAÇANER**

**December 2023, 99 pages**

This thesis aims to create added value by extracting phenolic compounds from pomegranate peel, a non-consumed waste product of the food industry, and to examine the bioaccessibility of propolis extracts, a valuable food supplement, and their mixtures. In the first part of the study, maceration and ultrasound-assisted extraction methods were tested for the extraction of phenolic compounds from pomegranate peel. In both methods, the independent variables were extraction time (hours for maceration, minutes for ultrasound-assisted extraction), extraction temperature (°C) and sample quantity/solvent volume (g/mL), while the dependent variables were total phenolic content (TPC) and total antioxidant capacity (TAC). Response surface methodology was applied for optimization in both methods. The optimum conditions for maceration were determined as follows: extraction time 3 h, extraction temperature 43°C and sample amount/solvent volume 1/30 g/mL. The responses obtained at these optimum conditions were 120.9 mg GAE/g dry weight (TPC), 60.6 mmol TE/kg dry weight (TAC<sub>DPPH</sub>) and 1645.2 mmol TE/kg dry weight (TAC<sub>CUPRAC</sub>). The optimum conditions for the ultrasound-assisted extraction method were determined as follows: extraction time 30 min, extraction temperature 41°C and sample amount/solvent volume 1/30 g/mL. The responses obtained at these these optimum conditions were 159.3 mg GAE/g dry weight (TPC), 64.3 mmol TE/kg dry weight (TAC<sub>DPPH</sub>) and 4149.5 mmol TE/kg dry weight (TAC<sub>CUPRAC</sub>).

According to the results obtained from optimization studies, the ultrasound-assisted extraction method gave better results than maceration, especially in terms of duration and antioxidant capacity values. Therefore, in the second part of the study pomegranate peel extract obtained from ultrasound-assisted extraction method at optimum conditions was used in the in-vitro digestion application. TPC and TAC values obtained initial and during gastrointestinal digestion of 10% and 15% propolis extracts (70% v/v glycol) and 20% and 30% propolis extracts (70% v/v ethanol) samples were examined and 15% and 30% propolis extracts samples were selected to be used in mixtures according to the results. Pomegranate peel and propolis extracts were mixed in 1:1, 1:2 and 2:1 (v/v) ratios. TPC and TAC values of 10 samples, including pomegranate peel extract, 2 propolis (glycolic and ethanolic) extracts, 3 glycolic pomegranate-propolis extract mixtures, and 3 ethanolic pomegranate-propolis extract mixtures were determined initially and during in vitro digestion. The results were statistically evaluated using SPSS IBM-23. In general, it was determined that in most samples digested in-vitro, TPC and TAC values obtained after the stomach phase decreased, while both values increased after the intestinal phase. In the bioaccessibility study, it was observed that the use of pomegranate peel extract with propolis extract had a positive effect on bioaccessibility, and as the amount of pomegranate peel extract increased, the bioaccessibility of the mixtures increased.

**Keywords:** maceration, ultrasound-assisted extraction, pomegranate peel extract, propolis extract, in-vitro digestion, total phenolics, total antioxidant capacity

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca tecrübesiyle beni yönlendiren ve desteğini eksik etmeyen kıymetli tez danışmanım **Dr. Öğretim Üyesi Elif YOLAÇANER**'e

Tez çalışmama bilgi ve tecrübesiyle katkı sağlayan değerli hocam **Dr. Öğretim Üyesi Aytül HAMZALIOĞLU**'na,

Desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve tez çalışmama katkısı olan Giresun Üniversitesi Öğr. Üyesi değerli hocam **Prof. Dr. Hüseyin ŞAHİN**'e

Tez çalışmam boyunca teorik ve pratik bilgilerini paylaşan kıymetli hocam **Arş. Gör. Büşra AKDENİZ**'e,

Değerli katkıları için Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğr. Üyesi **Prof. Dr. Nurhayat BARLAS**'a

Deney çalışmalarımda bana yardımcı olan, tecrübelerini paylaşan bölümümüzün kıymetli uzmanları **Yelda ZENCİR** ve **Selin HEYBELİ**'ye,

Propolis ekstraktlarını tedarik ettiğimiz ve çalışmama destek olan BEE'O firması Genel Müdürü **Dr. Aslı Elif TANUĞUR SAMANCI** ve Ar-Ge Direktörü **Elif YORULMAZ ÖNDER**'e,

Nar kabuklarını tedarik ettiğimiz ve desteklerini esirgemeyen TASARGEM firmasından **Numan GÖBEKLİ** ve **Haluk ÇAĞLAR**'a,

Yüksek lisans tez çalışmamda maddi destek sağlayan **Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi**'ne (Proje No: FBA-2022-20116),

Eğitim hayatım boyunca gösterdikleri gayret, sevgi ve güven için annem **Vildan İNKAYA** ve babam **Muharrem İNKAYA**'ya, tez çalışmama verdiği destek ve yardımları için canım ablam **Eda Nur İNKAYA**'ya,

Eğitim hayatımdaki maddi manevi destekleri için anneannem **Mükerrem DOĞDUBAY** ve dedem **Hüseyin DOĞDUBAY**'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

**Nida Nur İNKAYA**

**Aralık 2023, Ankara**

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Fenolik Bileşikler.....	4
2.1.1. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması .....	4
2.1.2. Fenolik Asitler .....	6
2.1.3. Flavonoidler.....	8
2.1.4. Ellagitanninler .....	8
2.2. Geleneksel Ekstraksiyon Teknolojileri.....	9
2.3. Yeşil Ekstraksiyon Yöntemleri .....	10
2.3.1. Ultrason Destekli Ekstraksiyon (UDE) .....	11
2.4. Yanıt Yüzey Yöntemi .....	12
2.5. In-vitro Gastrointestinal Sindirim.....	13
2.6. Nar Kabuğu.....	15
2.7. Propolis .....	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. Nar Kabuğu .....	20

3.1.2.	Propolis Ekstraktı .....	20
3.2.	Nar kabuğu fenolik bileşiklerinin ekstraksiyonu .....	20
3.2.1.	Maserasyon yöntemiyle ekstraksiyon.....	20
3.2.2.	Ultrason destekli ekstraksiyon.....	21
3.3.	Ekstraksiyon koşullarının deney tasarımı ve optimizasyonu.....	21
3.4.	Fenolik bileşiklerin tozunun hazırlanması .....	25
3.5.	Toplam fenolik madde ve toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi .....	25
3.5.1.	Toplam fenolik madde (TFM) tayini.....	25
3.5.2.	CUPRAC yöntemiyle antioksidan kapasite belirlenmesi (TAK <sub>CUPRAC</sub> ) .....	26
3.5.3.	DPPH yöntemiyle antioksidan kapasite belirlenmesi (TAK <sub>DPPH</sub> ).....	27
3.6.	Örneklerin hazırlanması.....	28
3.7.	In-vitro sindirim .....	28
3.8.	İstatistiksel analiz.....	30
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	31
4.1.	Nar kabuğunun konvansiyonel ekstraksiyonunda bağımlı değişkenlerin yanıt yüzey yöntemi ile modellenmesi.....	31
4.2.	Nar kabuğunun ultrason destekli ekstraksiyonunda bağımlı değişkenlerin yanıt yüzey yöntemi ile modellenmesi .....	50
4.3.	Ekstraksiyon yöntemlerinin optimizasyonu.....	70
4.4.	Toplam fenolik madde miktarı (TFM).....	73
4.5.	Toplam antioksidan kapasite .....	74
4.5.1.	CUPRAC metodu ile antioksidan kapasite tayini.....	75
4.5.2.	DPPH metodu ile antioksidan kapasite tayini .....	75
4.6.	In-vitro sindirim .....	81
4.6.1.	Nar kabuğu ekstraktlarının biyoerişilebilirliği .....	81
4.6.2.	Propolis ekstraktlarının biyoerişilebilirliği .....	81
4.6.3.	Ekstrakt karışımlarının biyoerişilebilirliği.....	83
5.	SONUÇ.....	87



6. KAYNAKLAR.....	89
EKLER .....	97
ÖZGEÇMİŞ.....	99

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Gıdalardaki polifenolik bileşiklerin kimyasal yapıları ve temel yapı formları .....	5
Şekil 2.2	Hidroksibenzoik asitler (a), hidroksisinnamik asitler (b).....	7
Şekil 2.3	<i>p</i> -hidroksibenzoik asit (a), gallik asit (b), protokatekuik asit (c) .....	7
Şekil 2.4	Temel karbon iskeleti C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> olan flavonoidlerin yapısı. ....	8
Şekil 2.5	ultrasonik banyo (a), ultrasonik prob (b) .....	11
Şekil 2.6	Simüle in vitro sindirim akış diyagramı.....	14
Şekil 2.7	Ellagik asit, Punikalın ve Punikalagin bileşiklerinin kimyasal yapısı .....	16
Şekil 2.8	Propoliste bulunan başlıca polifenollerin kimyasal yapıları .....	19
Şekil 4.1	Ekstraksiyon süresi (X <sub>1</sub> ) ve ekstraksiyon sıcaklığı (X <sub>2</sub> ) değişimlerinin TFM (A1) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri (X <sub>3</sub> =1:20 g/mL) .....	35
Şekil 4.2	Süre (X <sub>1</sub> ) ve örnek miktarı / çözücü hacmi (X <sub>3</sub> ) değişimlerinin TFM (A1) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri (X <sub>2</sub> =40 °C) .....	37
Şekil 4.3	Sıcaklık (X <sub>2</sub> ) ve örnek miktarı / çözücü hacmi (X <sub>3</sub> ) değişimlerinin TFM (A1) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri (X <sub>1</sub> = 2 saat) ....	38
Şekil 4.4	Toplam fenolik madde miktarının (A1) deneysel sonuçları ile Eşitlik 4.1 ile hesaplanan tahminsel sonuçlarının karşılaştırılması (R <sup>2</sup> =1,0000).....	39
Şekil 4.5	Ekstraksiyon süresi (X <sub>1</sub> ) ve ekstraksiyon sıcaklığı (X <sub>2</sub> ) değişimlerinin TAK <sub>DPPH</sub> (A2) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri (X <sub>3</sub> =1:20 g/mL) .....	41
Şekil 4.6	Süre (X <sub>1</sub> ) ve örnek miktarı / çözücü hacmi (X <sub>3</sub> ) değişimlerinin TAK <sub>DPPH</sub> (A2) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri (X <sub>2</sub> =40°C) .....	42
Şekil 4.7	Sıcaklık (X <sub>2</sub> ) ve örnek miktarı / çözücü hacmi (X <sub>3</sub> ) değişimlerinin TAK <sub>DPPH</sub> (A2) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri (X <sub>1</sub> = 2 saat) .....	43
Şekil 4.8	DPPH yöntemiyle belirlenen toplam antioksidan kapasitesinin (A2) deneysel sonuçları ile Eşitlik 4.2 ile hesaplanan tahminsel sonuçlarının karşılaştırılması (R <sup>2</sup> =0,9989) .....	44

<b>Şekil 4.9</b> Ekstraksiyon süresi ( $X_1$ ) ve ekstraksiyon sıcaklığı ( $X_2$ ) değişimlerinin $TAK_{CUPRAC}$ ( $A_3$ ) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri ( $X_3=1:20$ g/mL) .....	46
<b>Şekil 4.10</b> Süre ( $X_1$ ) ve örnek miktarı / çözücü hacmi ( $X_3$ ) değişimlerinin $TAK_{CUPRAC}$ ( $A_3$ ) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri ( $X_2=40^\circ C$ ) .....	48
<b>Şekil 4.11</b> Sıcaklık ( $X_2$ ) ve örnek miktarı / çözücü hacmi ( $X_3$ ) değişimlerinin $TAK_{CUPRAC}$ ( $A_3$ ) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri ( $X_1=2$ saat).....	49
<b>Şekil 4.12</b> CUPRAC yöntemiyle belirlenen toplam antioksidan kapasitesinin ( $A_3$ ) deneysel sonuçları ile Eşitlik 4.3 ile hesaplanan tahminsel sonuçlarının karşılaştırılması ( $R^2=0,9997$ ) .....	50
<b>Şekil 4.13</b> Ekstraksiyon süresi ( $Y_1$ ) ve ekstraksiyon sıcaklığı ( $Y_2$ ) değişimlerinin TFM ( $B_1$ ) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri ( $Y_3=1:20$ g/mL) .....	54
<b>Şekil 4.14</b> Ekstraksiyon süresi ( $Y_1$ ) ve örnek miktarı / çözücü hacmi ( $Y_3$ ) değişimlerinin TFM ( $B_1$ ) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri ( $Y_2=40^\circ C$ ).....	56
<b>Şekil 4.15</b> Sıcaklık ( $Y_2$ ) ve örnek miktarı / çözücü hacmi ( $Y_3$ ) değişimlerinin TFM ( $B_1$ ) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri ( $X_1=60$ dakika) .....	57
<b>Şekil 4.16</b> Toplam fenolik madde miktarının ( $B_1$ ) deneysel sonuçları ile Eşitlik 4.4 ile hesaplanan tahminsel sonuçlarının karşılaştırılması ( $R^2 = 0,9995$ ).....	58
<b>Şekil 4.17</b> Ekstraksiyon süresi ( $Y_1$ ) ve ekstraksiyon sıcaklığı ( $Y_2$ ) değişimlerinin $TAK_{DPPH}$ ( $B_2$ ) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri ( $Y_3=1:20$ g/mL) .....	60
<b>Şekil 4.18</b> Süre ( $Y_1$ ) ve örnek miktarı / çözücü hacmi ( $Y_3$ ) değişimlerinin $TAK_{DPPH}$ ( $B_2$ ) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri ( $Y_2=40^\circ C$ ) .....	62
<b>Şekil 4.19</b> Sıcaklık ( $Y_2$ ) ve örnek miktarı / çözücü hacmi ( $Y_3$ ) değişimlerinin $TAK_{DPPH}$ ( $B_2$ ) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri ( $Y_1=60$ dakika) .....	63

<b>Şekil 4.20</b> DPPH yöntemiyle belirlenen toplam antioksidan kapasitesinin (B2) deneysel sonuçları ile Eşitlik 4.5 ile hesaplanan tahminsel sonuçlarının karşılaştırılması ( $R^2=1,0000$ ) .....	64
<b>Şekil 4.21</b> Ekstraksiyon süresi ( $Y_1$ ) ve ekstraksiyon sıcaklığı ( $Y_2$ ) değişimlerinin $TAK_{CUPRAC}$ (B3) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri ( $Y_3=1:20$ g/mL) .....	66
<b>Şekil 4.22</b> Süre ( $Y_1$ ) ve örnek miktarı / çözücü hacmi ( $Y_3$ ) değişimlerinin $TAK_{CUPRAC}$ (B3) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri ( $Y_2=40^\circ C$ ) .....	68
<b>Şekil 4.23</b> Sıcaklık ( $Y_2$ ) ve örnek miktarı / çözücü hacmi ( $Y_3$ ) değişimlerinin $TAK_{CUPRAC}$ (B3) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri ( $Y_1=60$ dakika) .....	69
<b>Şekil 4.24</b> CUPRAC yöntemiyle belirlenen toplam antioksidan kapasitesinin (B3) deneysel sonuçları ile Eşitlik 4.6 ile hesaplanan tahminsel sonuçlarının karşılaştırılması ( $R^2=0,9534$ ) .....	70

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1</b> Fenolik Bileşiklerin Karbon Sayısına Göre Sınıflandırılması .....	6
<b>Çizelge 3.1</b> Konvansiyonel ekstraksiyon yönteminde kullanılacak bağımsız değişkenlerin kodlanmış ve gerçek değerleri.....	22
<b>Çizelge 3.2</b> Ultrason destekli ekstraksiyon yönteminde kullanılacak bağımsız değişkenlerin kodlanmış ve gerçek değerleri.....	22
<b>Çizelge 3.3</b> Box-Behnken deneysel tasarımına göre konvansiyonel ekstraksiyonda kodlanmış olarak gerçekleştirilen deneyler .....	23
<b>Çizelge 3.4</b> Box-Behnken deneysel tasarımına göre ultrason destekli ekstraksiyonda kodlanmış olarak gerçekleştirilen deneyler .....	24
<b>Çizelge 3.5</b> In-vitro gastrointestinal sindirim çalışmada kullanılan örnekler .....	28
<b>Çizelge 3.6</b> Simüle gastrointestinal sıvılarının formülasyonları .....	29
<b>Çizelge 4.1</b> Konvansiyonel ekstraksiyon deneylerinde elde edilen yanıtlar .....	32
<b>Çizelge 4.2</b> $X_1$ , $X_2$ ve $X_3$ bağımsız değişkenlerinin TFM (A1) üzerindeki etkisinin ANOVA sonuçları .....	34
<b>Çizelge 4.3</b> $X_1$ , $X_2$ ve $X_3$ bağımsız değişkenlerinin $TAK_{DPPH}$ (A2) üzerindeki etkisinin ANOVA sonuçları .....	40
<b>Çizelge 4.4</b> $X_1$ , $X_2$ ve $X_3$ bağımsız değişkenlerinin $TAK_{CUPRAC}$ (A3) üzerindeki etkisinin ANOVA sonuçları .....	45
<b>Çizelge 4.5</b> Ultrason destekli ekstraksiyon deneylerinde elde edilen yanıtlar .....	51
<b>Çizelge 4.6</b> $Y_1$ , $Y_2$ ve $Y_3$ bağımsız değişkenlerinin TFM (B1) üzerindeki etkisinin ANOVA sonuçları .....	53
<b>Çizelge 4.7</b> $Y_1$ , $Y_2$ ve $Y_3$ bağımsız değişkenlerinin $TAK_{DPPH}$ (B2) üzerindeki etkisinin ANOVA sonuçları .....	59
<b>Çizelge 4.8</b> $Y_1$ , $Y_2$ ve $Y_3$ bağımsız değişkenlerinin $TAK_{CUPRAC}$ (B3) üzerindeki etkisinin ANOVA sonuçları .....	65
<b>Çizelge 4.9</b> Konvansiyonel ve ultrason destekli ekstraksiyon yöntemlerinde yanıt yüzey yöntemine göre belirlenen optimum koşullar.....	71
<b>Çizelge 4.10</b> Konvansiyonel ve ultrason destekli ekstraksiyon yöntemlerinde optimum koşullarda elde edilen yanıtlar.....	72
<b>Çizelge 4.11</b> Propolis örneklerinin başlangıç ve in-vitro sindirim sonuçları .....	78

<b>Çizelge 4.12</b> Örneklerin başlangıç ve in-vitro sindirimi sırasında elde edilen TFM (mg GAE/mL) değerleri.....	79
<b>Çizelge 4.13</b> Örneklerin başlangıç ve in-vitro sindirimi sonucunda DPPH ve CUPRAC yöntemleriyle elde edilen TAK değerleri .....	80
<b>Çizelge 4.14</b> In-vitro sindirim sonrasında TFM ve TAK % biyoerişilebilirlik değerleri....	86

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

(w/v)	(kütle/hacim)
(v/v)	(hacim/hacim)
g	gram
mL	mililitre

### Kısaltmalar

KE	Klasik ekstraksiyon
UDE	Ultrason destekli ekstraksiyon
CAPE	Kafeik asit fenetil ester
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
CUPRAC	CUPric Reducing Antioxidant Capacity
GAE	Gallik asit eşdeğeri
TE	Troloks eşdeğeri
TFM	Toplam fenolik madde
TAK	Toplam antioksidan kapasite
YYM	Yanıt yüzey metodolojisi

# 1. GİRİŞ

Beslenme alışkanlıkları insan sağlığı için hayati önem taşımaktadır. Sanayileşme ve küreselleşmenin bu kadar hızlı yaşandığı bir dünyada tüketici ihtiyaçları da günden güne değişiklik göstermektedir. Günümüzde serbest radikallerin oluşumu ve maruziyetinin artması nedeniyle oluşan oksidatif stres insan sağlığını en çok tehdit eden unsurlardan biridir. Kronik, dejeneratif ve otoimmün hastalıkların artması bu durumun en belirgin sonucudur [1, 2]. Çağdaş toplumda sağlığın geliştirilmesi ve yaşam kaynağı olarak gıda, ortak bir kültür olarak meşrulaştırılmakta ve geliştirilmektedir. Bireylerin sağlığın geliştirilmesine yönelik artan talebi sonucunda, bu talebi karşılamak için sağlıkla ilgili çeşitli tüketici ürünleri geliştirilmiştir. Gıda takviyeleri bu amaçla geliştirilmiş ürünlerdir. Son 20 yılda birçok ülkede gıda takviyelerinin kullanımı artmıştır [3, 4].

Fenolik bileşikler (polifenoller), anti-inflamatuar, antiproliferatif, antidiyabetik, nöroprotektif ve kardiyoprotektif özellik göstermelerinin yanı sıra doğal antioksidan oldukları için büyük öneme sahiptir [5, 6]. İnsan sağlığı üzerindeki korucu etkisine yönelik kanıtların artmasıyla tüketicilerin bu bileşiklere yönelik ilgisi de önemli ölçüde artmıştır. Sonuç olarak endüstri fenolik bileşiklere dayalı yeni gıda takviyeleri geliştirmeye her zamankinden daha fazla odaklanmıştır [7, 8].

Nar (*Punica granatum* L.), birçok ülkede yaygın olarak yetiştirilen en eski yenilebilir meyvelerden biridir. İnsan beslenmesinde büyük fayda sağlayan fonksiyonel bir ürün olduğu düşünöldüğu için bu meyveye olan ilgi giderek artmaktadır. Nar, meyve şekliyle tüketilebildiği gibi gıda endüstrisinde reçel, jöle, içecek ve meyve suyu gibi ürünlere işlenerek de tüketilebilmektedir. Narın işlenmesiyle birlikte kabuk, küspe gibi büyük miktarda yan ürünler ortaya çıkmaktadır [9]. Nar kabuğu, çoğunlukla nar suyu üretiminde elde edilen bir yan üründür. Nar kabuğu, meyvenin toplam ağırlığının yaklaşık %40-50'sini oluşturmaktadır. Nar yan ürünleri atık olarak kabul edilmesine rağmen yenilebilir meyve kısmına kıyasla daha yüksek miktarlarda biyoaktif bileşen içermektedir. Son yıllarda, nar kabuğunda bulunan fenolik bileşikler, birçok yönden sağlığa yararları nedeniyle dikkat çekmektedir. Bazı biyolojik aktivitelere sahip olması nedeniyle gıda endüstrisinde kullanılan biyoaktif bileşikler için potansiyel bir kaynaktır. Nar kabuğu gallik asit, ellagik asit, kafeik



asit, kateşin, epikateşin, gallokateşin, punikalajin gibi polifenoller bakımından zengindir. Birçok in vivo ve in vitro çalışmada bu fenolik bileşiklerin etkileri araştırılmış ve bileşiklerin varlığı ile antioksidan, antienflamatuar, antimutajenik, antikarsinojenik, antihipertansif gibi çok çeşitli biyolojik aktivite ilişkilendirilmiştir [10-12].

Propolis, bal arıları (*Apis mellifera* L.) tarafından çiçeklerin tomurcuk ve yapraklarının reçinelerini toplayarak kovana getirip kendi salgıları ve balmumu ile karıştırarak ürettikleri doğal bir maddedir. Arılar propolisi peteklerdeki çatlak ve yarıkların onarılması, kovanın mikrobiyal kontaminasyona karşı korunması ve kovan sıcaklığının dengelenmesi için kullanmaktadır [13-15]. Propolisin toplumda kullanımı antik çağlara dayanmaktadır. Milattan önce 300'lere uzanan bir tarihi olan propolis dahili ve harici olarak tıpta ilaç olarak kullanılmıştır. Mısırlılar, Romalılar ve Yunanlar propolisin genel iyileştirici etkileri nedeniyle, ciltteki lezyonları ve yaraları tedavi etmesi için kullandığını bildirmişlerdir. Propolisin kimyasal bileşimi, coğrafi koşullara, iklim faktörlerine ve kovanlarının çevresindeki bitki örtüsüne bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Propolis genel olarak %50 reçine ve bitkisel balsam, %30 balmumu, %10 esansiyel ve aromatik yağlar, %5 polen ve %5 organik bileşiklerden oluşmaktadır. [16, 17]. Propolis antimikrobiyal, antioksidan, antikanser, antiülser, antidiyabetik, antienflamatuar, antijenotoksik ve antiviral gibi birçok biyolojik ve farmakolojik aktivite göstermektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda propoliste 300'den fazla farklı bileşik tespit edilmiştir. Bu bileşenlerin çoğunluğu fenolik asitler ve flavonoidlerdir. Propolis, insan sağlığına olan faydaları nedeniyle 2000'li yıllarda dünya çapında popüler hale gelmiş ve yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle 2020 yılında meydana gelen COVID-19 pandemisinde koronavirüs üzerinde etkili olduğu birçok bilim insanı tarafından tespit edilmiştir. Bu nedenle insanların propolise olan ilgisi daha çok artmıştır [18].

Tez çalışmasında, endüstride atık bir ürün olan ve tüketilmeyen nar kabuğundan fenolik bileşiklerin ekstrakte edilerek katma değer oluşturulması ve yaygın kullanılan, değerli bir gıda takviyesi olan propolis ekstraktları ile kullanımı incelenmiştir. Nar kabuğundan fenolik bileşiklerin üç bağımsız değişken (süre, sıcaklık, örnek miktarı/çözücü hacmi) kullanılarak konvansiyonel ve ultrason-destekli etanolik ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon uygulamalarında çözücü olarak %70 etanol (v/v) kullanılmıştır. Elde edilen ekstraktlarda toplam fenolik madde miktarı (TFM), CUPRAC ve DPPH metotları kullanılarak toplam antioksidan kapasite ( $TAK_{CUPRAC}$  ve  $TAK_{DPPH}$ ) değerleri ölçülmüştür. Ekstraksiyon

yöntemlerinde yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyon gerçekleştirilmiş ve yöntemler karşılaştırılmıştır. Daha yüksek değerler veren yöntemden elde edilen ekstrakt ile çalışılmaya devam edilmiştir. Elde edilen ekstrakt örneğinin etanol çözücüsü uzaklaştırılarak örneğe dondurarak kurutma işlemi uygulanmıştır. Elde edilen toz ekstrakt propilen glikol (glikol) ile seyreltilmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında nar kabuğu ekstraktı 1:1, 2:1 ve 1:2 oranlarında (v/v) propolis etanolik ekstraktı ile karıştırılmıştır. Glikol ile seyreltilmiş toz ekstrakt, 1:1, 2:1 ve 1:2 oranlarında (v/v) propolis glikolik ekstraktı ile karıştırılmıştır. Tüm ekstrakt, propolis ve karışım örneklerinde in-vitro gastrointestinal sindirim uygulanmış ve başlangıç (sindirime uğramamış), mide fazı ve bağırsak fazı için TFM, TAK<sub>CUPRAC</sub> ve TAK<sub>DPPH</sub> değerleri tespit edilmiştir. Bunlara bağlı olarak biyoerişebilirlik değerlerine ulaşılmıştır. Tüm sonuçlar, istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Bu kısımda tez çalışmasında ele alınan konulara ilişkin temel literatür bilgisi verilmiştir. Bu kapsamda ele alınan temel konu; gıda endüstrisinde bir atık olan nar kabuğunun değerlendirilmesi, yüksek biyoaktif bileşikler içeren ve oldukça değerli bir arı ürünü olan propolis ve nar kabuğu fenolik ekstraktlarının çeşitli oranlarda karışımlarının çalışılmasıdır. Genel olarak fenolik bileşikler, ekstraksiyon, biyoerişilebilirlik, nar kabuğu ve propolis hakkında güncel literatür bilgisi verilmiştir.

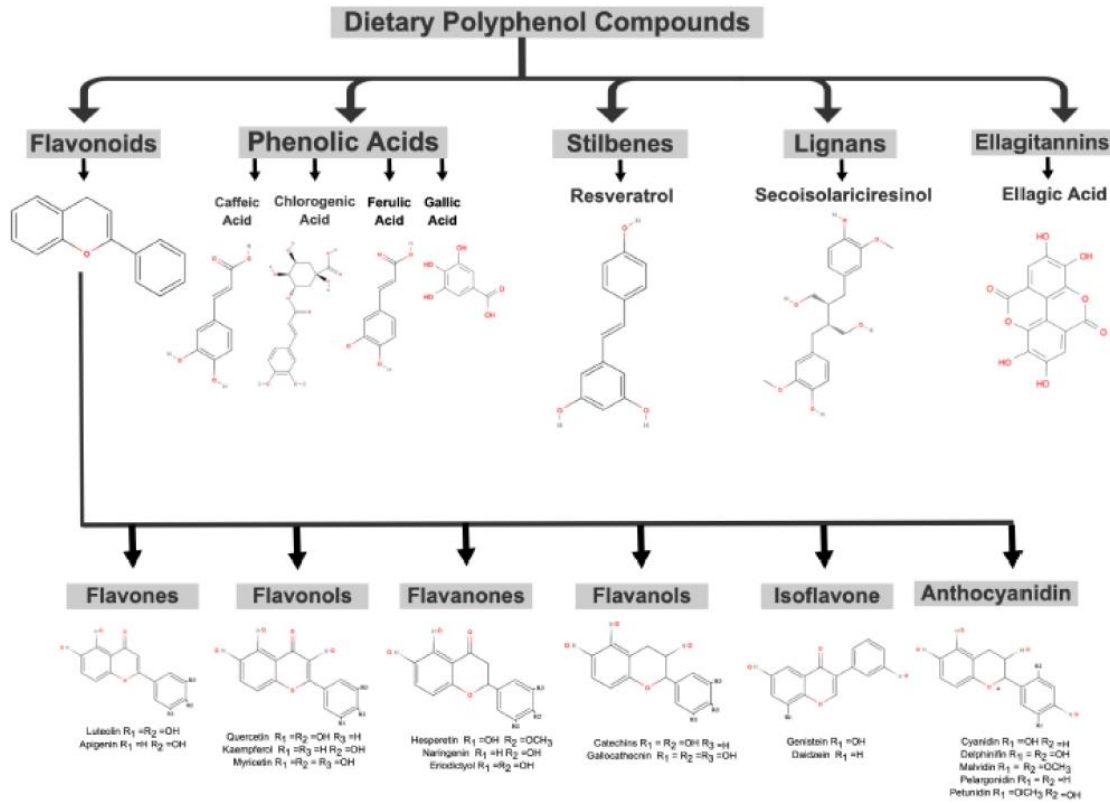
### 2.1. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler, fenoller veya polifenoller, hidroksil grupları ile en az bir aromatik halkanın ortak varlığına sahip bitkilerden elde edilen ikincil metabolitler olarak tanımlanmaktadır. Fenolik bileşikler, şu anda bilinen 8000'den fazla fenolik yapı ile bitkiler alemindeki en çok sayıda ve yaygın olarak dağılmış madde gruplarından birini oluşturmaktadır. Bu ikincil metabolitler yüksek ilgi gören bileşiklerdir. Ekstraksiyonları ve analitik miktar tayinleri büyük önem taşımaktadır. Her bitkisel gıdanın kendine özgü karakteristik fenolik profili bulunmaktadır. Doğal polifenoller, fenolik asitler gibi basit moleküllerden yüksek oranda polimerize olmuş bileşiklere kadar çeşitlilik gösterebilmektedir. Fenolik bileşikler, doğrudan aromatik halkaya bağlı en az bir hidroksil grubuna sahiptirler. Hidroksil gruplarındaki hidrojen atomu değişkendir, genellikle ester veya glikozit yapıda bulunurlar [19, 20]. Biyoaktif bileşiklerin en büyük sınıfını oluştururlar ve önemli biyolojik işlevlere sahiptirler [21]. Polifenoller çeşitli meyve, sebze, tahıl, baklagil, bitki ve baharat türlerinin taze veya atık formlarından elde edilebilmektedir. Polifenollerin bileşimleri tarım-iklim koşulları, hasat zamanı, yetiştirme yöntemleri ve materyalin kökenine bağlı olarak değişiklik göstermektedir [22].

#### 2.1.1. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması

Fenolikler, oldukça geniş ve çeşitli bir kimyasal bileşik grubunu kapsamaktadır. Bu bileşikler çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir. Bu bileşiklerin moleküldeki karbon sayısına göre sınıflandırılması Çizelge 2.1'de [23] gösterilmiştir. Gıdalarda, diyet takviyelerinde ve farmasötik ürünlerde bulunan polifenolik bileşikler, sağlık üzerindeki yararlı etkileri ve bulaşıcı olmayan kronik hastalıklara yakalanma riskini azaltmaları

nedeniyle giderek daha fazla ilgi çekmektedir. Bitkilerin ikincil metabolizmasından türetilen bu doğal bileşikler çok çeşitli bitki türlerinde bulunmakta ve esas olarak antioksidan özellikleri nedeniyle düzenli tüketimleri teşvik edilmektedir. Polifenolik bileşiklerin gıda endüstrisi atıklarından ve yan ürünlerinden ekstraksiyonu, çevresel olumsuz etkiyi en aza indirmek için uygun bir seçenek olarak görülmektedir. Ayrıca, doğal antioksidanların fonksiyonel gıdalara dahil edilmesi ve diyet takviyelerinin geliştirilmesi bir halk sağlığı yöntemidir [24]. Şekil 2.1'de [24] gıdalarda bulunan polifenolik bileşiklerin kimyasal yapıları ve temel yapı formaları gösterilmiştir. Şekil 2.1'de flavonoidler, fenolik asitler, stilbenler, lignanlar ve ellagitannin ve bunların alt sınıfları olarak sınıflandırılmıştır.



**Şekil 2.1** Gıdalardaki polifenolik bileşiklerin kimyasal yapıları ve temel yapı formları

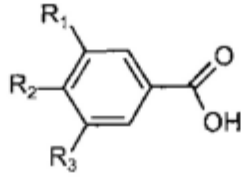
**Çizelge 2.1** Fenolik Bileşiklerin Karbon Sayısına Göre Sınıflandırılması

<b>Yapı</b>	<b>Sınıf</b>
C <sub>6</sub>	basit fenolikler
C <sub>6</sub> - C <sub>1</sub>	fenolik asitler ve ilgili bileşikler
C <sub>6</sub> - C <sub>2</sub>	asetofenonlar ve fenilasetik asitler
C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub>	sinnamik asitler, sinnamil aldehytler, sinnamil alkoller
C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub>	kumarinler, izokumarinler ve kromonlar
C <sub>15</sub>	kalkonlar, auronlar, dihidrokalkonlar
C <sub>15</sub>	flavanlar
C <sub>15</sub>	flavonlar
C <sub>15</sub>	flavanonlar
C <sub>15</sub>	flavanonoller
C <sub>15</sub>	antosiyanidinler
C <sub>15</sub>	antosiyaninler
C <sub>30</sub>	biflavoniller
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub> , C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	benzofenonlar, ksantonlar, stilbenler
C <sub>6</sub> , C <sub>10</sub> , C <sub>14</sub>	kinonlar
C <sub>18</sub>	betasiyaninler
Lignanlar, neolignanlar	dimerler veya oligomerler
Lignin	polimerler
Tanninler	oligomerler veya polimerler
Flobafenler	polimerler

### 2.1.2. Fenolik Asitler

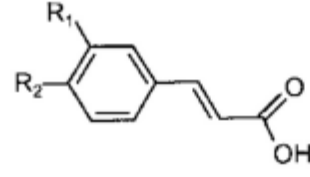
Fenolik asitler, yedi karbon atomu (C<sub>6</sub> - C<sub>1</sub>) içeren benzoik asit türevleri ve dokuz karbon atomu (C<sub>6</sub> - C<sub>3</sub>) içeren sinnamik asit türevleri olarak hidroksibenzoik asitler (Şekil 2.2.a) ve hidroksisinnamik asitler (Şekil 2.2.b) [25] olarak iki temel gruba ayrılmaktadır.

### Hidroksibenzoik asitler



$R_1 = R_2 = OH, R_3 = H$  : Protokatekuik asit  
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$  : Gallik asit

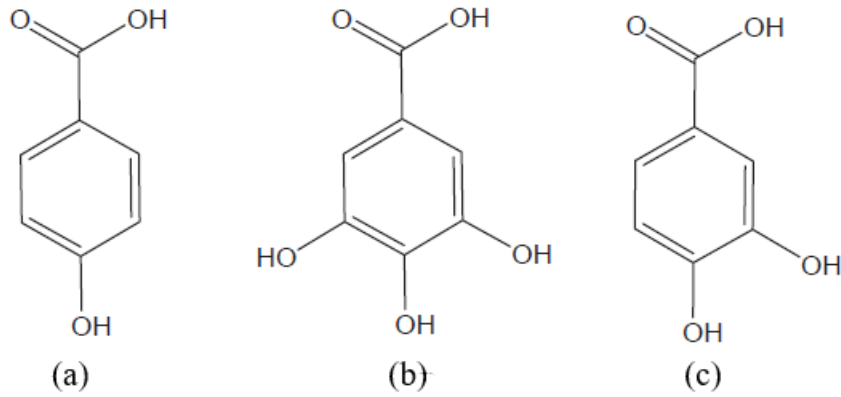
### Hidroksisinnamik asitler



$R_1 = OH$  : Kumarik asit  
 $R_1 = R_2 = OH$  : Kafeik asit  
 $R_1 = OCH_3, R_2 = OH$  : Ferulik asit

**Şekil 2.2** Hidroksibenzoik asitler (a), hidroksisinnamik asitler (b)

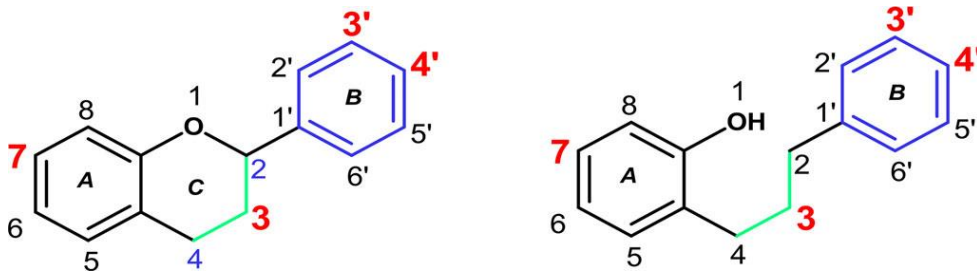
Hidroksibenzoik asitler, bir fenol ile yer değiştirmiş bir karboksil grubunun varlığı ile karakterize edilir, *p*-hidroksibenzoik asit (Şekil 2.3.a), gallik asit (Şekil 2.3.b) ve protokatekuik asit (Şekil 2.3.c) örnek olarak verilebilir. Vanilin gibi hidroksibenzoik aldehytler, bir karboksil grubu yerine bir aldehyt grubuna sahiptir [23, 25, 26]. Hidroksisinnamik asitler kinik asitler, şikimik ve tartarik asit ile basit esterler veya glikosile türevler olarak görünmektedir.  $C_6 - C_3$  yapısına sahip altı yaygın sinnamik asit bulunmaktadır. Bunlar; sinnamik asit, *p*-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit, 5-hidroksiferulik asit ve sinapik asittir. Bitkilerin tamamı çoğunlukla bu bileşiklerden en az üçünü içermektedir [23].



**Şekil 2.3** *p*-hidroksibenzoik asit (a), gallik asit (b), protokatekuik asit (c)

### 2.1.3. Flavonoidler

Flavonoidler, polifenolik bileşiklerin önemli bitki metaboliti grubudur. 15 C atomundan oluşan yapısal bileşimi, 3 karbon atomlu bir zincirle bağlanmış ve 2 aromatik halkadan oluşmaktadır ( $C_6-C_3-C_6$ ) [20, 22]. Şekil 2.4'te [27] flavonoidlerin yapısı gösterilmiştir. Flavonoidler insan beslenmesinde baskın polifenol gruplarından ve gıdalarda en fazla bulunan polifenoller olarak kabul edilir. Flavonoidler 6 alt sınıfa ayrılır. Bunlar: flavonoller, flavonlar, flavanonlar, flavanoller, izoflavonlar ve antosiyanidinlerdir [24]. Doğal bir pigment olan flavonoidler, kimyasal yapıları nedeniyle insanlar ve hayvanlar için birçok önemli fizyolojik faydaya sahiptir. Antioksidan, antibakteriyel, anti-enflamatuar, antiviral, antikanser, anti-aging, serbest radikal süpürücü, bağışıklık artırıcı gibi birçok önemli biyolojik aktiviteye sahiptir [27].



Şekil 2.4 Temel karbon iskeleti  $C_6-C_3-C_6$  olan flavonoidlerin yapısı.

Gıdalarda flavonoid bileşimi meyvenin gelişim aşamalarına ve meyve-sebze türlerine göre değişiklik göstermektedir. Bugüne kadar gıdalarda oldukça fazla çeşitte flavonoid tanımlanmıştır, bu nedenle flavonoidler biyolojik olarak aktif ana bileşenlerinden kabul edilir [28, 29].

### 2.1.4. Ellagitanninler

Ellagitanninler karmaşık bir kimyasal yapıya sahip polifenolik bileşiklerdir. Spontane bir şekilde laktonizasyona uğrayarak heksahidroksidifenoik asit açığa çıkarılır ve bu da ellagik aside dönüştürülebilir. Ellagitanninlerin çeşitli biyolojik aktivite mekanizmaları bulunmaktadır. Birçok çalışmada, antioksidan, antimikrobiyal, anti-enflamatuar ve antikanser özellik gösterdiği kanıtlanmıştır. Ellagitanninler açısından zengin gıdaların tüketilmesi sağlığı iyileştirmekte ve kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar

ve kanser gibi kronik durumları önleyebilmektedir. Ellagitanninlerin ve metabolitlerinin antikanser aktivitesi, serbest radikal yakalama özelliği ile ilişkilidir [30]. Ellagitanninler dışındaki bazı hammaddeler birbiriyle ilişkisi olmayan ellagik asit molekülleri içerebilir. Serbest ellagik asit içermeyen bitkiler söz konusu olduğunda, gastrointestinal sistemde bulunan herhangi bir ellagik asit partikülü, ellagitanninin hidrolizinin ürünüdür. Bu nedenle ellagik asit, bitkisel gıdalarda hidrolize edilebilir tanenlerin varlığının kimyasal bir göstergesi ve diyet ellagitanninlerin biyoyararlanımının biyo belirteci olarak kullanılabilir [31]. Punikalagin özellikle nar (*Punica granatum*) kabuğunda bulunan bir ellagitannindir. Belirli koşullar altında punikalagin punikallin ve ellagik aside hidrolize ve punicallin daha sonra ellagik aside hidrolize edilebilmektedir. punikalagin punikallin ve ellagik asit nar kabuğunun antioksidan aktivitesinde önemlidir [32].

## **2.2. Geleneksel Ekstraksiyon Teknolojileri**

Fenolik bileşikler onlarca yıldır Soxhlet, maserasyon gibi geleneksel yöntemler kullanılarak ekstrakte edilmektedir. Geleneksel ekstraksiyon yöntemi genellikle alternatif ekstraksiyon yöntemleri ile karşılaştırma yapmak için model olarak kullanılmaktadır. Maserasyon yönteminde, ham madde belirli bir süre boyunca belirli bir çözücü içinde ekstrakte edilmektedir. Maserasyon, çalkalama veya çalkalama olmadan gerçekleştirilebilir. Düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilebilmesi, gerekli ekipmanların karmaşık olmaması ve böylece ucuz olması maserasyon yönteminin avantajlarından. Maserasyonun daha düşük verime sahip olması ve ekstraksiyon sürelerinin uzun olması ise yöntemin önemli dezavantajlarıdır [33]. Soxhlet yöntemi farklı kaynaklardan fenolik bileşikler başta olmak üzere doğal biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonu için hala yaygın olarak kullanılmaktadır. Yöntemde numune, solventle doldurulmuş yuvarlak tabanlı bir ekstraksiyon şişesine ve bir Soxhlet aparatının yoğunlaştırıcısına bağlı bir düzenek içine yerleştirilir. Yöntem, solventin ısıtılması, buharının kondansatöre iletilmesi burada yoğunlaşması ile örnek bölmesine gelmesi, solventin örnek içerisinde birkaç defa sirküle olması prensibine dayanmaktadır. En önemli dezavantajları uzun zaman gerektirmesi ve yüksek miktarda organik çözücü kullanılmasıdır [34, 35].



### 2.3. Yeşil Ekstraksiyon Yöntemleri

Sentetik kimyasallar ve ürünler üretmek için fosil kaynakların yoğun kullanımı nedeniyle çeşitli çevresel sorunlar ortaya çıkmaktadır. Döngüsel sürdürülebilir bir biyoekonomi modeli ile oluşan bu sorunlar iyileştirilebilmektedir. Günümüz tarımsal-endüstriyel süreçler, hava, toprak ve su kirliliği de dahil olmak üzere çevresel sıkıntılara yol açan, depolama sahalarında veya açık tarım alanlarında toplanan büyük miktarda çeşitli yan ürünler üretmektedir. Atık kalıntılarında bulunan organik içerik; anti-inflamatuar, antioksidan, kardiyo-koruyucu, antikanser potansiyeli ve diğer birçok önemli faydaları olan biyoaktif fenolik bileşikler açısından önemli bir kaynaktır [36, 37]. Yararlı fenoliklerin üretimi, ekonomiye geri dönüşüm yoluyla gerçekleştirilebilir. Tarım ve gıda sektörlerinden elde edilen yan ürünler ve atıklar, döngüsel biyoekonomi için umut verici kaynaklar olarak değerlendirilebilir. Bu perspektifte, fenoliklerin biyoerişilebilirliğine ilişkin sürdürülebilir ve yeşil ekstraksiyon teknolojileri önem kazanmaktadır [37].

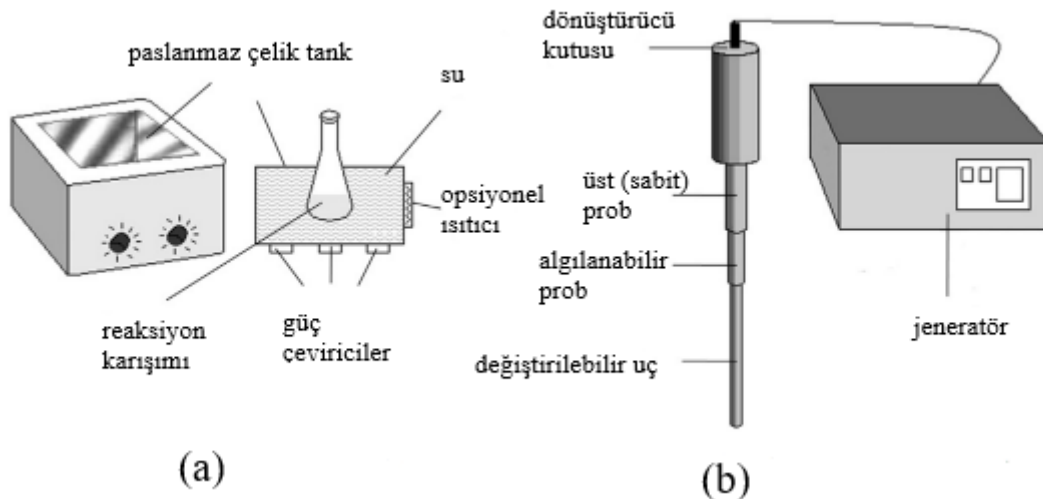
Yeşil teknoloji kavramı, toplumda çevre bilincinin gittikçe artmasıyla önem kazanmıştır. Geleneksel ekstraksiyon prosedürlerine çevre dostu alternatifler olarak çok sayıda ekstraksiyon tekniği ortaya çıkmıştır. Yeşil ekstraksiyon yaklaşımları, güvenli ve yüksek kaliteli ürünlerin elde edilmesinde enerji tüketimini azaltma ve alternatif çözücülerin kullanımına dayalı olarak tasarlanmıştır. Yeşil ekstraksiyon yöntemlerinin kullanılması bitkilerden katma değerli ürünler elde etmek için gelecek vadeden bir seçenektir. Yeşil ekstraksiyon yöntemlerine ultrason destekli ekstraksiyon (UDE), mikrodalga destekli ekstraksiyon (MDE) ve süperkritik akışkan ekstraksiyon örnek olarak verilebilir [38-40].

Fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda çevre dostu, yeni bir çözücü sınıfı olan derin ötektik çözücü sınıfı son yıllarda oluşturulmuştur. Derin ötektik çözücüler biri hidrojen bağı alıcısı (HBA), diğeri hidrojen bağı donörü (HBD) olan ve en az iki bileşenden oluşan karışımlardır. Karışımın bileşenleri, her bir bileşenin kaynama noktasından daha düşük olan kaynama noktasında karakterize edilen yeni bir ötektik faz oluşturmak amacıyla hidrojen bağı ile birbirleriyle etkileşime girebilir. Örnek olarak; HBA özellikteki kolin klorürün erime noktası 302 °C, HBD özellikte olan ürenin erime noktası ise 133 °C'dir. Bu bileşikler ile oluşturulan derin ötektik çözücünün (mol oranı 1:2 mol kolin klorür:üre) erime noktası 12 °C'dir. Ötektik çözeltilerin çoğunun oda sıcaklığında sıvı olması, bu sıcaklıkta kullanılmasına imkân sağlar. Ekstraksiyon işlemlerinde derin ötektik çözeltilerin

kullanılma sebepleri yüksek çözücü özellikte olmaları, vizkozitelerinin ve polaritelerinin ayarlanabilmesi ve kolay bir şekilde hidrojen bağı oluşturabilmeleridir [37, 41, 42].

### 2.3.1. Ultrason Destekli Ekstraksiyon (UDE)

Yeşil ekstraksiyon yöntemlerinden ultrason destekli ekstraksiyon (UDE), laboratuvar ve endüstriyel ölçekte oldukça kullanışlı olması nedeniyle biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunda önemli rol almaktadır. Doğal ürünlerde klasik olarak katı-sıvı ekstraksiyon yöntemleriyle gerçekleştirilen ekstraksiyon yöntemleri birkaç saat veya gün sürebilirken UDE ile dakikalar içinde başarılı bir ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilebilmektedir. Ultrasonik sistemler laboratuvarda yaygın olarak ultrasonik banyo ve prob olarak iki şekilde bulunabilmektedir. Ultrasonik sistemler gereksinimlerine göre farklı hacim (L) ve farklı güç (W) aralıklarında üretilmektedir [43]. Genel olarak, bu sistemlerde ultrason kaynağı olarak mekanik veya elektrik enerjisini ultrasonik enerjiye dönüştüren elektromekanik transdüserler kullanılmaktadır [44]. Yöntem, 20 kHz-5 MHz frekans arasında olan (ekstraksiyon işlemi için genelde 40-45 kHz) ultrasonik dalgaların etkisiyle oluşan kavitasyon sürecine dayanmaktadır. Kavitasyon ile partiküller arası çarpışmalar oluşur. Kavitasyon kabarcıkları bitki numunesi hücre duvarında hasara neden olur, fenolik bileşikler hücrel membran boyunca çözücüye olan kütle transferi artırılır [45, 46]. Laboratuvar ölçekli kullanılan ultrason sistemlerinin şematik diyagramı Şekil 2.5'te [44] gösterilmiştir.



Şekil 2.5 ultrasonik banyo (a), ultrasonik prob (b)

Probu sistemler direkt sonikasyon olarak bilinirken, banyolu sistemler dolaylı sonikasyon olarak bilinmektedir. Ekstraksiyon çalışmalarında problu sonikatörler daha yüksek enerji iletimi sağladığı için daha etkili ekstraksiyon işlemi gerçekleştiği kabul edilse de problu sonikatörlerin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bu nedenle ekstraksiyon amacıyla ultrasonik banyolar daha yaygın olarak kullanılır. Çoğunlukla tek seferde bir numune çalışılması nedeniyle problu sistemlerin verimi daha düşüktür. Isı üretilmesi nedeniyle ortamın ısınmasına neden olur, ortam özelliklerinin değişmesiyle kavitasyon oluşur. Biyoaktif bileşiklerde bozulma meydana gelme olasılığı dikkate alındığında problu sonikasyon işlem koşullarının kontrolü sağlanmalıdır. Ultrasonik problemler ile çapraz kontaminasyon riski daha yüksektir. Bu nedenle yüksek güce sahip dolaylı yöntem ile ekstraksiyon işlemi, ultrason destekli ekstraksiyonda yüksek verim alınmasını sağlayabilmektedir [44].

#### **2.4. Yanıt Yüzey Yöntemi**

Yanıt yüzeyi metodolojisi,  $y$  yanıtı ile  $x_1, x_2, \dots, x_k$  ile gösterilen bir dizi ilişkili kontrol değişkeni arasında yeterli bir fonksiyonel ilişkinin geliştirilmesinde kullanılan bir grup matematiksel ve istatistiksel teknikten oluşmaktadır [47]. Yanıt yüzey yöntemi yeni ürünlerin tasarımı, geliştirilmesi ve formülasyonunda ve mevcut ürün tasarımının iyileştirilmesinde kullanılan önemli bir yöntemdir [48]. Yanıt yüzey metodolojisini uygulamadan önce deneyleri tanımlayacak tasarımın oluşturulması gerekmektedir. Bu amaçla bazı deney matrisleri bulunmaktadır. Birinci dereceden modeller için Plackett-Burman ve  $2^k$  faktöriyel tasarımı gibi tasarımlar kullanılırken, doğrusal fonksiyonlarla tanımlanamayan (ikinci dereceden) deneysel veriler için Box-Behnken,, merkezi karma ve üç-seviyeli ( $3^k$ ) faktöriyel tasarımı gibi tasarımlar kullanılmalıdır [47, 49]. Yanıt yüzey yöntemi uygulanarak optimizasyon yapılmasında uygulanması gereken aşamalar bulunmaktadır. İlk olarak çalışmanın amacı ve araştırmacının deneyimine göre tarama çalışmaları yapılır, yanıtlara önemli etkileri olan bağımsız değişkenler seçilir. Bağımsız değişkenler seçildikten sonra deneysel tasarım seçilir ve seçilen deney tasarım matrisine uygun olarak deneyler gerçekleştirilir.

Elde edilen deneysel verilerin matematiksel ve istatistiksel olarak incelemesi yapılır ve modelin uygunluğu değerlendirilir ve çalışılan her yanıt için optimum değerler elde edilir [48]. Bulunan modelin deneysel çalışmayı güvenilir bir şekilde temsil edip etmediğinin

anlaşılması varyans analizi (ANOVA) yapılmaktadır. ANOVA’da değişkenlerin kombinasyonlarının değişiminden kaynaklanan varyasyon ile elde edilen yanıtların ölçümlerindeki hatalardan kaynaklanan varyasyon karşılaştırılmaktadır. Bu karşılaştırma ile deneysel varyans kaynakları dikkate alınarak yanıtları öngörmek için kullanılan regresyonun anlamlılığını değerlendirilmektedir [49].

Yanıt yüzey yönteminde bağımlı değişken (yanıt) ile bağımsız değişkenler arasındaki lineer ilişki Eşitlik 2.1’de gösterilmiştir.

$$y = \beta_0 \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon \quad (2.1)$$

Eşitlik 2.1’de  $k$  değişken sayısını,  $\beta_0$  sabit sayıyı,  $\beta_i$  lineer parametrelerin katsayısını,  $x_i$  bağımsız değişkenleri,  $\varepsilon$  istatistiksel olarak hatayı ifade etmektedir [49].

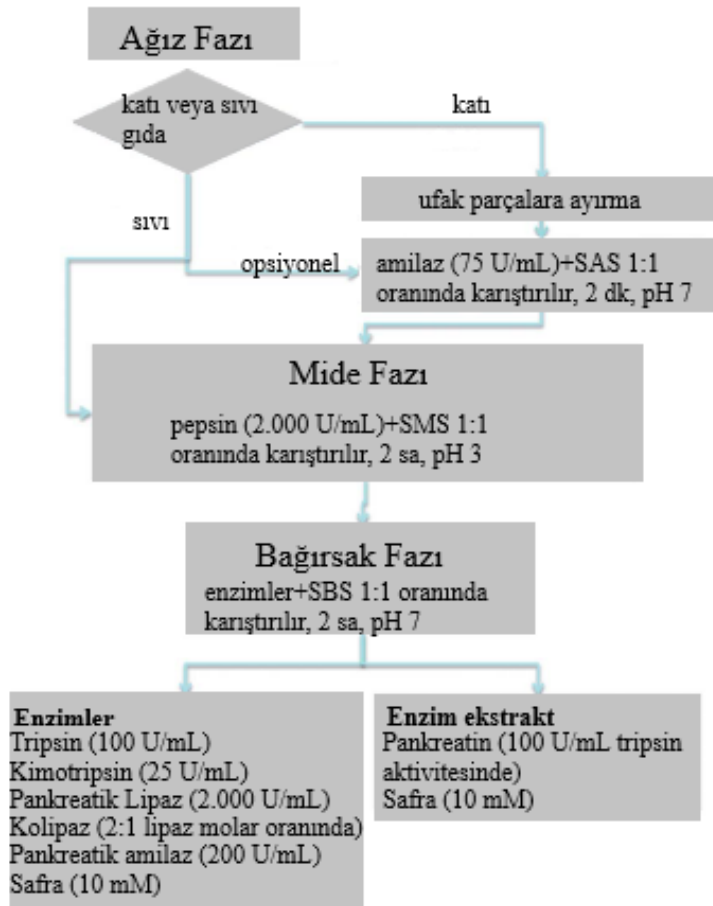
## 2.5. In-vitro Gastrointestinal Sindirim

Fenolik bileşiklerin faydalı etkileri temel olarak antioksidan aktiviteleri ile ilgilidir. Antioksidanlar obezite, diyabet, kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli kronik durumlar üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir. Bu bileşiklerin sağlığa fayda sağlaması için gıda matrisinden salınması ve gastrointestinal sistemde biyolojik olarak erişilebilir hale gelmesi, sindirilen bileşiklerin metabolizması sonucunda etkisi hedeflenen dokuya ulaşması gerekmektedir [50, 51].

İn-vitro sindirim modelleri, simüle edilmiş gastrointestinal koşullar altında gıda bileşenlerinin yapısal değişikliklerini, sindirilebilirliğini ve salınımını incelemek için gıda ve beslenme bilimlerinin birçok alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Simüle edilmiş sindirim yöntemleri oral, gastrik ve ince bağırsak aşamalarını, bazen de kalın bağırsak aşamasını içermektedir. Gastrointestinal sindirim yöntemleri diğer faktörlerin yanı sıra sindirim enzimlerinin varlığı, konsantrasyonları, pH, sindirim süresi ve tuz konsantrasyonlarını dikkate alarak in vivo fizyolojik koşulları taklit ederek in vitro koşullarda gerçekleştirmeye çalışmaktadır [52-55]

Meyve türlerinde bulunan biyolojik olarak aktif fitokimyasallardan olan fenolik bileşiklerin, özellikle antioksidan aktiviteleri sayesinde insan vücuduna sayısız faydalı etkileri olduğu

bilinmektedir [56]. Fenolik bileşiklerin biyoerişilebilirliği, bileşiklerin gıda matrisinden salınması ve gastrointestinal sistemdeki stabilitesi ile sağlanmaktadır. Bu bileşikler emilimin gerçekleştiği organizma için biyolojik olarak önemlidir [57, 58]. Fenolik bileşiklerin sindirimini simüle edilmesi için çeşitli in vitro yöntemler bulunmaktadır. Günümüzde statik, yarı dinamik ve dinamik yöntemler kullanılmaktadır. Statik modeller, gastrointestinal sindirimde biyokimyasal süreçleri in vitro olarak simüle etmek için en yaygın kullanılan protokoldür. Protokolde sırasıyla oral, gastrik ve bağırsak adımları yer almaktadır [59-61]. Statik in vitro sindirim protokolü Şekil 2.6'da [52] özetlenmiştir. Şekil 2.6'da SAS, SMS ve SBS sırasıyla Simüle Ağız Sıvısı, Simüle Mide Sıvısı ve Simüle Bağırsak Sıvısıdır. Enzim aktiviteleri, karşılık gelen her bir sindirim aşamasında nihai sindirim karışımının mL'si başına birim cinsindedir. Protokolde in vitro sindirim parametreleri, kimyasalların seçimi, konsantrasyonu, belirli adımların dahil edilmesi veya edilmemesi gerekçeler ile değişebilmektedir [52].



Şekil 2.6 Simüle in vitro sindirim akış diyagramı

Sindirim, katı gıdaların ağızda çiğneme ve tükürük sıvısı ile mekanik olarak parçalanmasıyla başlamaktadır. Ağız fazında öğütülmüş katı gıdalar tükürük sıvısını simüle eden sıvılarla karıştırılır. Çiğneme koşullarının sağlanması için 2 dakika homojenize edilir. Simüle edilen tükürük sıvısında, su,  $\alpha$ -amilaz ve elektrolit çözeltiler bulunmaktadır. Sıvı gıdalar için ağız fazı uygulanması opsiyoneldir. Özellikle sıvı gıdanın nişasta içermesi durumunda ağız fazı dahil edilebilir. Ağız fazında homojenize edilerek yüzey alanı arttırılmış gıdaya mide fazı uygulanır [52].

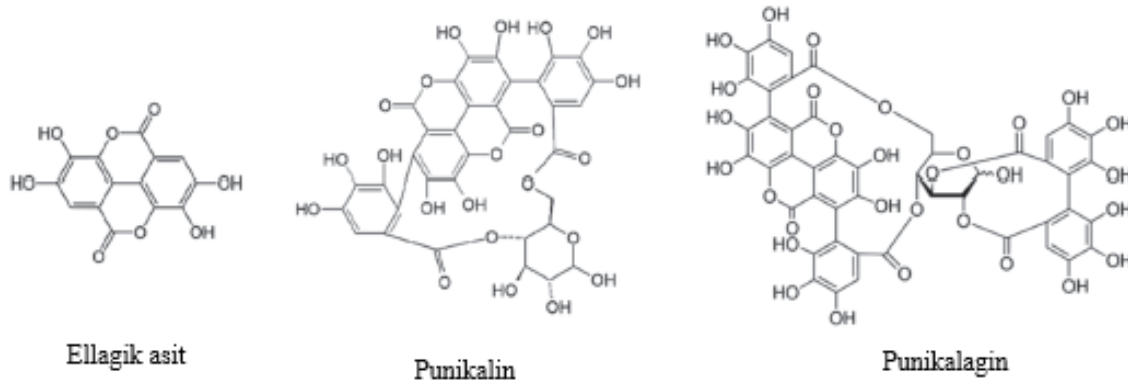
Midenin başlıca işlevi bağırsaktaki sindirimin optimize edilmesi için bağırsağa iletilecek gıdayı sindirime hazırlamak ve kademeli olarak bağırsağa iletmektir. Mide fazında uygulanan tüm protokollerde pepsin enzimi kullanılmaktadır. Lipitlerin sindirimi çalışmalarında mide fazına gastrik lipaz eklenmesi önerilmektedir. Gıda bileşenleri pepsin enzimi ve hidroklorik asit içeren mide sıvısı ortamında çözünür ve seyreltilir. Yöntemlere göre inkübasyon süresi 1-2 saat arasında, pH değeri 1,2-3,0 arasında ve çalkalama hızı 50-260 rpm arasında değişebilmektedir. Mide fazında gıda bileşenleri sürekli olarak karışma işlemine maruz kalır [52, 53, 62].

Gıda, simüle edilmiş mide fazından geçtikten sonra simüle edilmiş ince bağırsak fazına aktarılır. İnce bağırsak fazında sindirimin en önemli bileşenleri pankreatik enzimler ve safradır. Pankreatin kullanımına alternatif olarak tripsin, kimotripsin, pankreatik lipaz, kolipaz, pankreatik amilaz gibi enzimler ayrı ayrı da kullanılabilir. Hangi enzimlerin, ne kadar ilave edileceği gıda türüne ve seçilen sindirim yöntemine göre değişiklik göstermektedir. Bağırsak fazında peristaltik hareketlerin simüle edilmesi amacıyla 45-260 rpm aralığında çalkalama işlemi yapılmaktadır. İnkübasyon süresi 30 dakika-3 saat arasında değişebilmektedir. Bazı protokollerde bağırsak fazında bağırsak bariyerini ve burada gerçekleşen emilimi simüle etmek için diyaliz membranı kullanılmaktadır [52, 63].

## **2.6. Nar Kabuğu**

Nar (*Punica granatum* L.) yüksek oranda fenolik ve antioksidan bileşikler içermektedir. Üretimine yoğun olduğu ülkelerde çoğunlukla nar suyuna işlenmektedir. Kabukları ise endüstriyel atık olarak görülmektedir. Ancak nar kabuğu narın yenilebilir kısımlarına ve diğer meyvelere kıyasla daha yüksek miktarda biyoaktif bileşikler içerir [64]. Yapılan bir çalışmada nar suyunda fenolik madde miktarı 2369  $\mu\text{g}/\text{mL}$  iken nar yan ürünlerinde 18100

$\mu\text{g/mL}$  olarak tespit edilmiştir [10]. Nar kabuğu ve nar kabuğu ekstraktının antioksidan, antimikrobiyal ve antimutajenik özelliklere sahip olduğu ve bazı hastalıklara karşı iyileştirici etkiler gösterdiği raporlanmıştır. Yapılan çalışmalarda nar kabuğunda 48 tane fenolik bileşik olduğu tespit edilmiştir. Nar kabuğu özellikle ellagik asit türevleri ve punikalagin izomerleri gibi büyük polifenolik bileşikler bakımından zengindir. Nar kabuğundaki hidrolize edilebilir fenolik maddelerin, özellikle de ellagitanninlerin, içerdiği tanenler arasında en aktif antioksidanlar olduğuna dair kanıtlar giderek artmaktadır. Bu bileşiklerin (ellagik asit, punikalagin, punikalın ve gallagik asit) yüksek antioksidan ve biyolojik aktivitelere sahip olduğu ve özellikle birlikte sinerjik olarak hareket ettiği gösterilmiştir [65]. Şekil 2.7’de [32] nar kabuğunda bulunan başlıca polifenollerden ellagik asit, punikalın ve punikalagin kimyasal yapısı gösterilmiştir.



**Şekil 2.7** Ellagik asit, Punikalın ve Punikalagin bileşiklerinin kimyasal yapısı

Fenolik maddelerin ekstraksiyonu analizlerin ilk ve en önemli adımındır. Ekstraksiyon teknolojisi tarımsal gıda endüstrisinin sürdürülebilir gelişim göstermesi için çok önemlidir. Bununla birlikte yapılacak kalitatif veya kantitatif çalışmada ekstraksiyon yöntem ve çözücüsünün optimizasyonu sonuçların doğruluğunu belirleyen önemli bir unsurdur. Su, metanol, etanol ve bunların karışımları nar kabuğunda fenolik ekstraksiyonu için yaygın kullanılan çözücülerdir. Genel olarak kullanılan su/etanol çözücüsü nar kabuğu dahi çok çeşitli bitki yan ürünlerinden polifenollerin yeşil ekstraksiyonunda başarıyla test edilmiştir [66, 67]. Nar kabuğunun etanol:su %50 (v/v) çözücüsü kullanılarak konvansiyonel yöntem ile gerçekleştirilen fenolik madde ekstraksiyonunda nar kabuğundaki toplam fenolik madde miktarı  $3019 \pm 26$  mg GAE/L olarak tespit edilirken nar suyunda bu değer  $2703 \pm 18$  mg GAE/L olarak tespit edilmiştir [68]. Nar kabuklarının mikrodalga destekli ve ultrason

destekli ekstraksiyonlarında sırasıyla 4 dakika ve 6,2 dakika ekstraksiyon sürelerinde elde edilen toplam fenolik madde miktarı 199,4 mg GAE/g ve 42,2 mg GAE/g olarak raporlanmıştır [69, 70]. Hindistan'da nar kabuğunun toplam fenolik miktarı, bilinen diğer meyve kabukları arasında en yüksek değerde (1639,7 mg GAE/100 g) bulunmuştur [71]. Türkiye'de narın dört genotipinde yapılan bir araştırmada nar kabuğu ekstraktında bulunan toplam fenolik madde miktarının nar çekirdeği ve suyunda bulunan miktardan sırasıyla 3,8 ve 5,9 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir [72].

## 2.7. Propolis

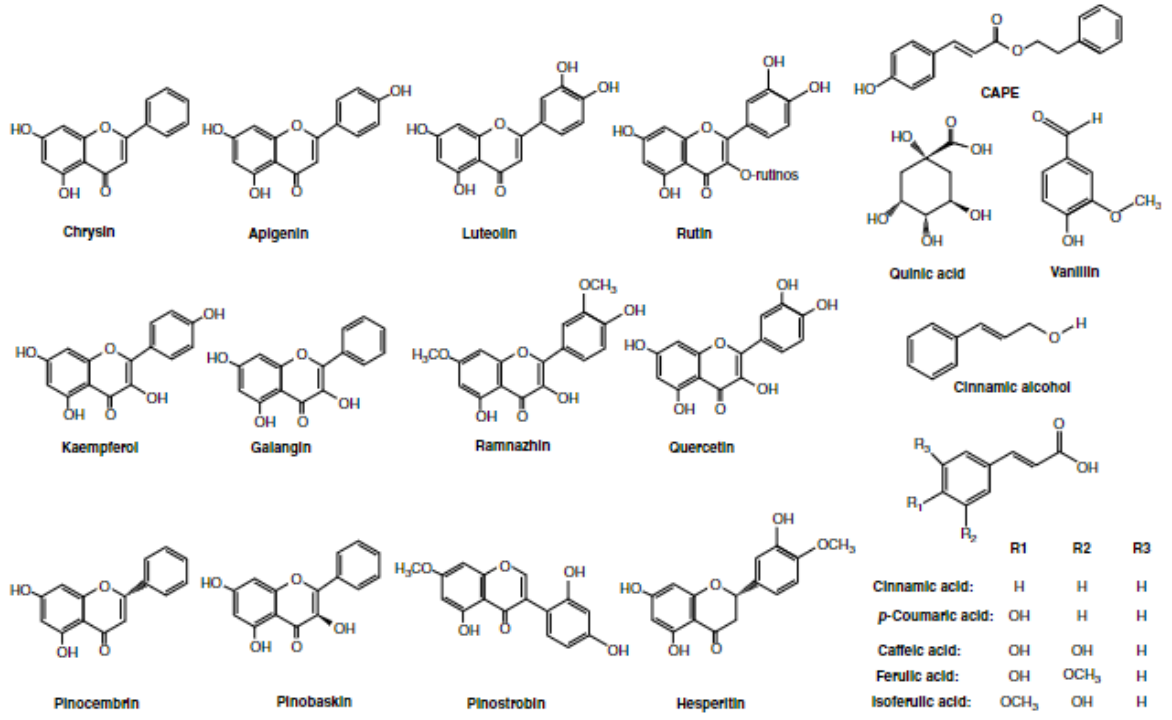
Propolis, bal arılarının (*Apis Mellifera* L.) peteklerdeki delik ve çatlakları onarmak ve petek kenarlarını güçlendirmek için kullandıkları reçinemsî bir maddedir. Ayrıca kovanı zararlı mikroorganizmalar ve diğer canlılardan koruyan bir savunma maddesidir. Bu madde insanlar tarafından arı kovanlarından ham halde toplanır ve ekstraksiyon işleminden sonra gıda takviyesi olarak kullanılır. Propolisin biyoaktif bileşenleri nedeniyle, ekstraktlar gıda takviyesi olarak geniş bir kullanım alanına sahiptir. İçeriğinde balmumu gibi safsızlıklar içermesi nedeniyle ham propolis gıda takviyesi olarak kullanılmaz, ancak uygun çözücülerde ekstrakte edildikten sonra tüketilebilmektedir. Ham propolis en iyi %70 etanolde ekstrakte edilmektedir ancak glükolden türetilen su bazlı çözücülerde de bulunmaktadır. Propolis ekstraktları tamamlayıcı tıpta antioksidan, antimikrobiyal, antiviral, anti-inflamatuar ve antitümör ajanlar olarak geniş bir kullanım alanına sahiptir [73-75].

Propolisin kimyasal bileşimini ve biyolojik olarak aktif özelliklerini etkileyen birçok faktör vardır. Toplama dönemi ve kovan tipi propolisin özelliklerini etkilerken, coğrafi bölge ve bölgenin florası en belirleyici faktörlerdir. Propolis yapısı genel olarak balmumu, balsam (reçine) ve uçucu bileşiklerden oluşmaktadır. Etanol içinde ekstrakte edilebilen balzamik kısım, apiterapötik uygulamalarda en yaygın kullanılan kısımdır. Bu kısım büyük oranda fenolik bileşikler ve esterler içermektedir [76-79]. Reçinenin geldiği bitki kaynağına bağlı olarak propolis türleri kavak tipi propolis, *Baccharis* tipi propolis, *Betula* tipi propolis, *Macaranga* tipi propolis ve *Dalbergia* tipi propolis vb. olarak ayrılabilir. Bal arıları Anadolu'da kestane, söğüt, ardıç, çam, meşe, elma, kavak, huş, ıhlamur, fındık ve orman gülü gibi çok sayıda bitki türünden propolis elde etmektedir. Propolis türleri, genellikle botanik kökenlerine bağlı olarak sarı, kahverengimsi-kırmızı, kahverengi, sarımsı-kahverengi, grimsi-kahverengi veya gri-siyah renktedir [80-83]. Bugüne kadar yapılan



araştırmalarda propoliste 300'den fazla bileşik tanımlanmıştır. Bunlar: kafeik asit, *p*-kumarik asit ve ferulik asit gibi serbest fenolik asitler, kafeik asit fenetil ester (CAPE) gibi bu asitlerin esterleri ve krisin, luteolin, apigenin ve kaempferol gibi flavonlar ve flavonollerdir [84]. Türkiye'nin 23 farklı Őehrinden alınan propolis örneklerinin 1:30 (w/v), %70 etanol (v/v) ile konvansiyonel ekstraksiyonunun yapıldığı bir çalışmada propolis örneklerinin toplam fenolik madde miktarı 34,53-259,4 mg GAE/g ve toplam antioksidan kapasite (CUPRAC) 95,35-710,43 mg TE/g olarak raporlanmıştır [18]. Bir başka çalışmada Türkiye'nin farklı bölgelerinden tedarik edilen 40 propolis rneği ile incelenmiştir. Propolis rneklerinin 3,5:30 (w/v), %70 etanol (v/v) ile etanolik ekstraksiyon işleminde toplam fenolik madde miktarı 56-241 mg GAE/g olarak tespit edilmiştir. Yapılan alışmada Kafeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, kuersetin, *t*-sinnamik asit, krisin, pinokembrin ve CAPE tüm örneklerde değişen miktarlarda tespit edilmiştir. Hesperidin ve ramnetin çoğu örneklerde tespit edilirken, ellagik asit sadece üç örneklerde tespit edilmiştir [85].

Krisin, galangin, pinocembrin ve pinobanksin gibi flavonoidler ılıman iklime sahip bölgelerdeki propolisin karakteristik özellikleridir. Kafeik asit fenetil ester (CAPE) ılıman iklimlerde önemlidir. CAPE çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahip bir bileşiktir. Tropikal bölgelerde propolisin baskın kimyasal bileşenleri artepillin C gibi prenilenmiş fenilpropanoidler ve diterpenlerdir. Pasifik bölgelerde ve Afrika'da ise geranil flavanonlar baskın bileşen gruplarıdır. Başlıca flavonoidlere ek olarak propolis vanilin, *p*-kumarik asit, kinik asit, sinnamik alkol, sinnamik asit türevleri, kafeik asit, ferulik asit ve izoferulik asit gibi diğer fenolikleri de içermektedir [86]. Yapılan çalışmalarda krisin, kafeik asit, *p*-kumarik asit ve ferulik asidin dünyadaki çoğu propolis örneğinin ana bileşenleri olduğu gösterilmiştir [87, 88]. Propoliste bulunan başlıca flavonoidlerin ve fenolik asit türevlerinin kimyasal yapıları Şekil 2.8'de [86] gösterilmiştir.



Şekil 2.8 Propoliste bulunan başlıca polifenollerin kimyasal yapıları

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Nar Kabuğu

Çalışmada kullanılan organik nar (*Punica granatum* L.) kabukları, Tasargem Enj, İnş. Mak. Müh. Gıd. San. Tic. Ltd. şti. firmasından (Adana, Türkiye) tedarik edilmiştir. -18 °C'de dondurulmuş nar kabukları 48-60 saat liyofilizatör (Christ, Almanya) kullanılarak kurutulmuştur. Kurutulduktan sonra ev tipi öğütücü (Fakir, Türkiye) kullanılarak homojen bir şekilde öğütölmüştür. Ekstraksiyon deneylerinde kullanıllana dek 4 °C'de buzdolabı koşullarında muhafaza edilmiştir.

##### 3.1.2. Propolis Ekstraktı

%10 ve %15 glikol (%70 v/v glikol) propolis ekstrakt örneklere ile, %20 ve %30 etanol (%70 v/v etanol) propolis ekstrakt örneklere SBS Bilimsel Bio Çözümler San. Ve Tic. A.ř. (Bee'ö Arı Ürünleri) firmasından (İstanbul, Türkiye) tedarik edilmiştir. Analizlerde kullanıllana dek 4 °C'de buzdolabı koşullarında muhafaza edilmiştir.

#### 3.2. Nar kabuğu fenolik bileşiklerinin ekstraksiyonu

##### 3.2.1. Maserasyon yöntemiyle ekstraksiyon

Nar kabuklarında bulunan fenolik bileşiklerin konvansiyonel (maserasyon) ekstraksiyonu için çalkalamalı su banyosu (Mikrotest, msc 30, Türkiye) kullanılmıştır. Liyofilize nar kabuğu örneği (1 g) ve çözücü (%70 v/v etanol), 1:10, 1:20 ve 1:30 (w/v) oranlarında karıştırılarak; 30, 40 ve 50 °C sıcaklıklarda ve 1, 2 ve 3 saatlik sürelerde ekstraksiyon gerçeleştirilmiştir. Elde edilen örneklere Whatman (grade 4) filtre kağından geçirilerek analizlere uygun hale getirilmiştir. Analiz edilene kadar -18 °C'de muhafaza edilmiştir. Elde edilen ekstraktlarda; toplam fenolik madde ve antioksidan kapasitesi tayinleri yapılmıştır. Uygulanan tüm analizler, 3 tekrarlı olarak gerçeleştirilip sonuçlar bu tekrarların ortalaması şeklinde verilmiştir.

### 3.2.2. Ultrason destekli ekstraksiyon

Nar kabuklarında bulunan fenolik bileşiklerin ultrason destekli ekstraksiyonu için ultrasonik banyo (Şimşek Labortechnik, WF-UD10, Ankara, Türkiye) kullanılmıştır. Liyofilize nar kabuğu örneği (1 g) ve çözücü (%70 v/v etanol), 1:10, 1:20 ve 1:30 (w/v) oranlarında liyofilize örnek ve çözücü (%70 v/v etanol) karıştırılarak, 30, 40 ve 50 °C sıcaklıklarda ve 30, 60 ve 90 dakikalık sürelerde ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen örnekler Whatman (grade 4) filtre kağıdından geçirilerek analizlere uygun hale getirilmiştir. Analiz edilene kadar -18 °C'de muhafaza edilmiştir. Elde edilen ekstraktlarda; toplam fenolik madde ve antioksidan kapasitesi tayini yapılmıştır. Uygulanan tüm analizler, 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilip sonuçlar bu tekrarların ortalaması şeklinde verilmiştir.

### 3.3. Ekstraksiyon koşullarının deney tasarımı ve optimizasyonu

Konvansiyonel ve ultrason destekli ekstraksiyon koşullarının deneysel tasarımında Box-Behnken deneysel tasarımı ve koşulların optimizasyon için Yanıt Yüzey Yöntemi kullanılmıştır. Yanıt Yüzey Yöntemi, deney tasarımında bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenleri nasıl etkilediğini gösteren, farklı deney koşulları içindeki optimum koşulların belirlenmesinde kullanılan istatistiksel bir yöntemdir [48].

Bu çalışmada her iki ekstraksiyon yöntemi için 3 farklı bağımsız değişkenin bağımlı değişkenler üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Çalışmada Design-Expert v12 programı (Minneapolis, ABD) kullanılarak Box-Behnken deney tasarımı hazırlanmıştır. Box-Behnken deney tasarımında deney sayısı aşağıdaki eşitliğe göre belirlenmiştir [89] (Eş. 3.1)

$$N = 2.k.(k - 1) + c_p \quad (3.1)$$

Eşitlik 3.1'de k, bağımsız değişken sayısını,  $c_p$  merkez noktasında tekrarlanan deney sayısını ifade etmektedir.

Çalışmadaki bağımsız değişkenler, ekstraksiyon süresi (saat / dakika), sıcaklık (°C) ve katı örnek kütlesi/çözücü hacmidir (g/ml). Değişkenlerin değerleri literatürdeki benzer kaynaklar referans alınarak belirlenmiştir [90-93]. Çizelge 3.1'de konvansiyonel (maserasyon) ekstraksiyon yöntemi için ve Çizelge 3.2'de ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi için

değişkenlerin kodlanmış ve gerçek değerleri verilmiştir. Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4'te Design-Expert programı tarafından hazırlanan tüm deneyler sırasıyla konvansiyonel ve ultrason destekli ekstraksiyon için gösterilmiştir.

**Çizelge 3.1** Konvansiyonel ekstraksiyon yönteminde kullanılacak bağımsız değişkenlerin kodlanmış ve gerçek değerleri

Bağımsız değişkenler	Derecelerin gerçek değerleri		
	-1	0	1
Süre (saat)	X <sub>1</sub> 1	2	3
Sıcaklık (°C)	X <sub>2</sub> 30	40	50
Örnek miktarı / çözücü hacmi (g/mL)	X <sub>3</sub> 1:10	1:20	1:30

**Çizelge 3.2** Ultrason destekli ekstraksiyon yönteminde kullanılacak bağımsız değişkenlerin kodlanmış ve gerçek değerleri

Bağımsız değişkenler	Derecelerin gerçek değerleri		
	-1	0	1
Süre (dakika)	Y <sub>1</sub> 30	60	90
Sıcaklık (°C)	Y <sub>2</sub> 30	40	50
Örnek miktarı / çözücü hacmi (g/mL)	Y <sub>3</sub> 1:10	1:20	1:30

Box-Behnken deneysel tasarımına göre 17 adet konvansiyonel ve 17 adet ultrason destekli ekstraksiyon deneyi tasarlanmıştır. Tüm değişkenlerin kodlanmış değerlerinin 0 olduğu merkez noktasında 5'er tekrar yapılmıştır. Merkez noktasında yapılan bu tekrarlar istatistiksel modelin uygunluğunun ve deneysel hatanın belirlenmesini sağlamaktadır.

**Çizelge 3.3** Box-Behnken deneysel tasarımına göre konvansiyonel ekstraksiyonda kodlanmış olarak gerçekleştirilen deneyler

	<b>X<sub>1</sub> (sa)</b>	<b>X<sub>2</sub> (°C)</b>	<b>X<sub>3</sub> (g/mL)</b>
<b>Deney No.</b>	<b>Kodlanmış</b>	<b>Kodlanmış</b>	<b>Kodlanmış</b>
<b>1</b>	0	0	0
<b>2</b>	0	0	0
<b>3</b>	-1	-1	0
<b>4</b>	0	0	0
<b>5</b>	1	0	-1
<b>6</b>	0	1	-1
<b>7</b>	0	0	0
<b>8</b>	-1	1	0
<b>9</b>	0	1	1
<b>10</b>	0	0	0
<b>11</b>	-1	0	-1
<b>12</b>	-1	0	1
<b>13</b>	0	-1	-1
<b>14</b>	1	1	0
<b>15</b>	1	0	1
<b>16</b>	0	-1	1
<b>17</b>	1	-1	0

**Çizelge 3.4** Box-Behnken deneysel tasarımına göre ultrason destekli ekstraksiyonda kodlanmış olarak gerçekleştirilen deneyler

	<b>Y<sub>1</sub> (dk)</b>	<b>Y<sub>2</sub> (°C)</b>	<b>Y<sub>3</sub> (g/mL)</b>
<b>Deney No.</b>	<b>Kodlanmış</b>	<b>Kodlanmış</b>	<b>Kodlanmış</b>
<b>1</b>	0	0	0
<b>2</b>	0	0	0
<b>3</b>	-1	-1	0
<b>4</b>	0	0	0
<b>5</b>	1	0	-1
<b>6</b>	0	1	-1
<b>7</b>	0	0	0
<b>8</b>	-1	1	0
<b>9</b>	0	1	1
<b>10</b>	0	0	0
<b>11</b>	-1	0	-1
<b>12</b>	-1	0	1
<b>13</b>	0	-1	-1
<b>14</b>	1	1	0
<b>15</b>	1	0	1
<b>16</b>	0	-1	1
<b>17</b>	1	-1	0

Konvansiyonel ve ultrason destekli ekstraksiyon için tasarlanan tüm deneyler gerçekleştirildikten sonra bağımlı değişkenlerin değerleri tespit edilmiştir. Bunlar toplam fenolik madde miktarı (TFM), toplam antioksidan kapasitedir (TAK<sub>CUPRAC</sub> ve TAK<sub>DPPH</sub>). Design-Expert v12 programı kullanılarak yapılan tüm deneyler sonucunda elde edilen yanıt değişkenleri maksimum tutularak konvansiyonel ve ultrason destekli ekstraksiyon için optimum koşullar belirlenmiştir. Optimum koşul kombinasyonlarından bağımlı değişken değerleri en yüksek ve hedefe ulaşma fonksiyonu olan 1 değerine en yakın olan koşul seçilmiş bu koşulda deneyler tekrarlanmış ve optimum koşul doğrulanmıştır. Konvansiyonel

ve ultrason destekli ekstraksiyon optimum deney sonuçları kıyaslanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre çalışmaya optimum koşulda gerçekleştirilen ultrason destekli ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen nar kabuğu özütüyle devam edilmiştir.

### **3.4. Fenolik bileşiklerin tozunun hazırlanması**

Optimum koşulda, ultrason destekli ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen ekstrakt, döner vakumlu evaporatör (Heidolph, Almanya) kullanılarak etanol çözücüsü uzaklaştırılıp 35 °C’de konsantre edilmiştir. Konsantre özütler cam petri kaplarına konularak üstleri parafin ile kaplanmış ve üzerine delikler açılmıştır. Bu şekilde iki gün boyunca -18 °C’de dondurulmuştur. Daha sonra örnekler liyofilizatörde (Christ, Almanya) dondurularak kurutulmuştur. Dondurarak kurutma işlemi 0,1 mPa’nın altında, 48 saat süresince gerçekleştirilmiştir. Kurutma işlemi sonrasında ince toz haline getirilmiş nar kabuğu fenolik tozu, deneylerde kullanılabileceği kadar -18 °C’de dondurucuda saklanmıştır.

### **3.5. Toplam fenolik madde ve toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi**

#### **3.5.1. Toplam fenolik madde (TFM) tayini**

Çalışmada gerçekleştirilen toplam fenolik madde (TFM) tayini analizlerinin tamamında Folin-Ciocalteu metodu uygulanmıştır. Bu metotta, Folin-Ciocalteu fenol reaktifi, fenolik bileşiklerin varlığında sodyum karbonat ile indirgenmesinin sonucunda renk değiştirir [94]. Toplam fenolik madde tayini için 0,5 mL örnek ile 2,5 mL 0,2 N Folin-Ciocalteu fenol reaktifi karıştırılmış, vortekslenmiş ve 5 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra 2 mL (75g/L) sodyum karbonat çözeltisi eklenir, karıştırılır. Oda koşullarında, karanlıkta bir saat bekletilir. Örneklerin 765 nm dalga boyunda kör örneğe karşı absorpsiyonları ölçülür. Kör örnek, 2,5 mL 0,2 N Folin-Ciocalteu fenol reaktifi ve 2 mL sodyum karbonat (75 g/L) karışımından oluşmaktadır. 20, 40, 60, 80 ve 100 ppm konsantrasyonlarında hazırlanan gallik asit (3,4,5-trihydroxybenzoic acid) çözeltileri ile kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş ve TFM sonuçları mg GAE/L olarak hesaplanmıştır. Çalışmada örneklerde kullanılan çözücüler (%70 v/v glikol ve %70 v/v etanol) için EK A’da yer alan kalibrasyon eğrileri kullanılmıştır [95, 96].



### 3.5.2. CUPRAC yöntemiyle antioksidan kapasite belirlenmesi (TAK<sub>CUPRAC</sub>)

Çalışmada, Apak ve ark. [97] tarafından uygulanan CUPRAC yöntemi uygulanmıştır. Yöntemde, bakır (II)-neocuprione (Cu(II)-Nc) bileşeni okside edici bir ajan olarak kullanılmıştır. CUPRAC yönteminde kullanılan çözeltilerin hazırlanışı şu şekildedir; Bakır (II) klorür çözeltisi:  $1.0 \times 10^{-2}$  M olacak şekilde  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 'tan 0,4262 g tartılır, distile su ile 250 mL'ye tamamlanır.

Amonyum asetat tamponu: 1 M (pH=7) olacak şekilde 19.27 g tartılır, distile su ile 250 mL'ye tamamlanır.

Neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) çözeltisi:  $7.5 \times 10^{-3}$  M olacak şekilde 0,156 g tartılır ve etanolle 100 mL'ye tamamlanır.

CUPRAC yöntemi ile toplam antioksidan kapasitenin (TAK<sub>CUPRAC</sub>) belirlenmesinde örnek çözeltisi 1 mL Cu(II), 1 mL Nc, 1mL  $\text{NH}_4\text{Ac}$  ve 0,5 mL antioksidan ekstrakt çözelti ve (1.1-0,5) mL  $\text{H}_2\text{O}$  karıştırılarak hazırlanır. Referans çözeltisi 1 mL, Cu(II), 1 mL Nc , 1 mL  $\text{NH}_4\text{Ac}$  ve 1.1 mL  $\text{H}_2\text{O}$  karıştırılarak hazırlanır.

Çözeltiler iyice karıştırılmış ve ağzı kapalı olacak şekilde 30 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Süre sonunda 450 nm dalga boyunda referans çözeltiliye karşı absorbansları okunmuştur [97]. Nar kabuğu ekstraksiyonunda elde edilen örneklerde CUPRAC yöntemi ile antioksidan kapasite aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır (Eş 3.2). Sonuçlar mmol TR/kg örnek cinsinden verilmiştir.

$$\text{TAK}_{\text{CUPRAC}} (\text{mmol TR/g örnek}) = \frac{A}{\epsilon} \times \frac{V_t}{V_0} \times \text{S.f.} \times \frac{V_e}{m} \quad (3.2)$$

Nar kabuğu ve propolis ekstraktlarının karışımıyla elde edilen örneklerde CUPRAC yöntemi ile antioksidan kapasite aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır (Eş 3.3).

$$\text{TAK}_{\text{CUPRAC}} (\text{mM TR}) = \frac{A}{\epsilon} \times \frac{V_t}{V_0} \times \text{S.f.} \times 1000 \quad (3.3)$$

Eşitlik 3.2 ve 3.3'te A: 450 nm'de ölçülen örnek absorbans, E: Troloks (TR) bileşiğinin CUPRAC yöntemindeki molar absorplama katsayısı, Vt: CUPRAC ölçüm çözeltisinin toplam hacmi (4.1 mL), Vö: Örnek hacmi (mL), Ve: Hazırlanan ekstrenin hacmi (mL), m: Ekstraksiyon işleminde alınan örnek miktarı (g), S.f.: Seyreltme faktörüdür [98]. CUPRAC metodunda kullanılan Troloks standart eğrisi EK A'da verilmiştir.

### 3.5.3. DPPH yöntemiyle antioksidan kapasite belirlenmesi (TAK<sub>DPPH</sub>)

Nar kabuğu ekstraktlarında DPPH analizi Çilek ve ark. [99] tarafından uygulanan metoda bazı modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır. Ekstrakt örneğinden 0,1 mL alınarak üzerine 3,9 mL 25 ppm'lik DPPH radikal çözeltisinden eklenmiştir. Oda sıcaklığında 30 dakika karanlıkta bekletildikten sonra 517 nm'de metanole karşı absorpsiyon değeri ölçülmüştür. Ekstraktların DPPH radikali üzerindeki süpürücü etkisi aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır (Eş 3.4).

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_{\text{kör}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kör}}] \times 100 \quad (3.4)$$

Eşitlik 3.4'te A<sub>kör</sub> kontrol absorbans, A<sub>örnek</sub> ekstraktın absorbans değeridir [100].

Standart eğrinin oluşturulması:

Uygun konsantrasyon aralığında hazırlanan Troloks çözeltilerinin DPPH radikali üzerindeki süpürme oranı tespit edilmiştir. Troloks çözeltileri konsantrasyonu ve süpürme yüzdesi arasında doğrusal regresyon denklemi oluşturulmuştur. Denklem ile örnek çözeltilerin DPPH radikali süpürme yüzdelerine karşı okunan değer ile DPPH radikalinde %50 inhibisyon sağlayan antioksidan konsantrasyonu (IC<sub>50</sub>) tespit edilmektedir. IC<sub>50</sub> değeri DPPH radikalinin %50'sini süpürmesi için gereken konsantrasyonu ifade etmektedir. Kuru örnek miktarının bilinmesi durumunda kalibrasyon eğrisinden antioksidan kapasite Troloks eşdeğeri olarak hesaplanabilir [101, 102]. Nar kabuğu örneklerinde DPPH antioksidan kapasite Troloks eş değeri cinsinden hesaplanırken, sıvı ekstrakt örneklerinde IC<sub>50</sub> değeri olarak hesaplanmıştır. DPPH metodunda kullanılan standart eğriler EK A'da verilmiştir.

### 3.6. Örneklerin hazırlanması

Çalışmanın ikinci kısmı olan in vitro gastrointestinal sindirim uygulamasında, propolis ekstraktı örnekleri (%10, %15, %20 ve %30), optimum nar kabuğu etanolik ekstraktı ve 3.4'te hazırlanan örnek kullanılmıştır. 3.4 te hazırlanan örnek %70 v/v glikol ile 1:30 (w/v) oranında seyreltilmiştir. Karışımlarda %15'lik glikolik ve %30'luk etanolik propolis ekstrakt örnekleri kullanılmıştır. Nar kabuğu ekstraktı ve propolis ekstraktı karışımları 1:1, 1:2 ve 2:1 (v/v) oranlarında hazırlanmıştır.

**Çizelge 3.5** In-vitro gastrointestinal sindirim çalışmada kullanılan örnekler

No	Kod	Örnek
1	NKE	Ultrasonik yöntemle elde edilen nar kabuğunun etanolik (%70 v/v) ekstraktı
2	NKEG	Ultrasonik yöntemle elde edilen nar kabuğu ekstraktının etanolünden uzaklaştırılıp liyofilize edilmesi ve 1:30 oranında glikol (%70 v/v) ile çözülmesi
3	PR10	%10'luk propolis ekstraktı-çözücü %70 v/v glikol
4	PR15	%15'lik propolis ekstraktı-çözücü %70 v/v glikol
5	PR20	%20'lik propolis ekstraktı -çözücü %70 v/v etanol
6	PR30	%30'luk propolis ekstraktı -çözücü %70 v/v etanol
7	1:1 NKEG:PR15	NKEG ve PR15'in 1:1 (v/v) oranında karıştırılması
8	1:2 NKEG:PR15	NKEG ve PR15'in 1:2 (v/v) oranında karıştırılması
9	2:1 NKEG:PR15	NKEG ve PR15'in 2:1 (v/v) oranında karıştırılması
10	1:1 NKE:PR30	NKE ve PR30'un 1:1 (v/v) oranında karıştırılması
11	1:2 NKE:PR30	NKE ve PR30'un 1:2 (v/v) oranında karıştırılması
12	2:1 NKE:PR30	NKE ve PR30'un 2:1 (v/v) oranında karıştırılması

### 3.7. In-vitro sindirim

İnsan vücudundaki gastrointestinal sistem koşullarını simüle etmek için ağız sıvısı, mide sıvısı ve bağırsak sıvısını simüle eden sindirim sıvıları kullanılmıştır. Simüle ağız (SAS),

simüle mide (SMS) ve simüle bağırsak sıvıları (SBS) Çizelge 3.5'te verilen formülasyonlara göre hazırlanmıştır [52].

**Çizelge 3.6** Simüle gastrointestinal sıvılarının formülasyonları

	SAS		SMS		SBS		
	pH=7		pH=3		pH=7		
	Stok	Hacim	SAS	Hacim	SMS	Hacim	SBS
			içindeki		içindeki		içindeki
			derişim		derişim		derişim
	g L <sup>-1</sup>	mL	mmol L <sup>-1</sup>	mL	mmol L <sup>-1</sup>	mL	mmol L <sup>-1</sup>
<b>KCl</b>	<b>37,3</b>	15,1	15,1	6,9	6,9	6,8	6,8
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>68</b>	3,7	3,7	0,9	0,9	0,8	0,8
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	<b>84</b>	6,8	13,6	12,5	25	42,5	85
<b>NaCl</b>	<b>117</b>	-	-	11,8	47,2	9,6	38,4
<b>MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub></b>	<b>30,5</b>	0,5	0,15	0,4	0,1	1,1	0,33

Solüsyonların son hacimleri distile su ile 400 mL'ye tamamlanmış ve -20 °C 'de muhafaza edilmiştir. In vitro sindirim prosedürü Papillo ve ark. [103] tarafından bildirilen prosedürden uyarlanmıştır. 5 g kuru öğütülmüş gıda veya 10 mL model sistem 50 mL'lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Gıda numuneleri için 5 mL SAS eklenmiş ve ağızdan geçişi simüle etmek için şişe 2 dakika boyunca çalkalanmıştır. Sıvı model sistem örnekleri oral faza maruz bırakılmamış, bu nedenle doğrudan gastrik faza konulmuştur. 5 mL pepsin çözeltisi (12,5 mg/mL 0.1 M HCl) ve 10 mL SMS eklendikten sonra karışım pH değeri 2'ye ayarlanmıştır. Daha sonra asitlendirilmiş karışım, mide fazını simüle etmek için dakikada 60 vuruşluk bir çalkalama hızındaki su banyosunda 2 saat boyunca çalkalanarak 37 °C'de inkübe edilmiştir. Safra tuzları SBS çözeltisi içinde 10 mg/mL konsantrasyona kadar çözülmüştür. Gastrik fazdan sonra pH 7,5'e ayarlanmış ve sonra şişeye 20 mL safra tuzları ve SBS karışımı ile 5 mL pankreatin çözeltisi (10 mg/mL su) eklenmiştir. Karışım, bağırsak fazını simüle etmek için dakikada 60 vuruşluk bir çalkalama hızındaki su banyosunda 2 saat boyunca çalkalanarak 37 °C 'de inkübe edilmiştir. Mide ve bağırsak fazları sonrası elde edilen örneklerde TFM ve TAK analizleri, 3.5 başlıklı bölümde belirtilen yöntemlere göre yapılmıştır.

### **3.8. İstatistiksel analiz**

Nar kabuğu ekstraksiyonu çalışmalarında istatistiksel analiz Design-Expert v12 programı kullanılarak ve ANOVA testi yapılarak gerçekleştirilmiştir. İn-vitro gastrointestinal sindirim çalışmasında veriler SPSS IBM-23 programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Varyansların homojen olması durumunda ANOVA, post-hoc Tukey testi, varyansların homojen olmaması durumunda ise Welch, post-hoc Games-Howell testi kullanılmıştır. Gruplar arasında önemli farklılık düzeyi  $p < 0,05$  olarak belirlenmiştir.

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Nar kabuğunun konvansiyonel ekstraksiyonunda bağımlı değişkenlerin yanıt yüzey yöntemi ile modellenmesi

Box-Behnken deney tasarımı kullanılarak oluşturulmuş deney planına göre gerçekleştirilen konvansiyonel ekstraksiyon deneyleri sonucunda elde edilen yanıtlar Çizelge 4.1’de verilmiştir 3 bağımsız değişken ile deneyler gerçekleştirildikten sonra belirlenen bağımlı değişkenler; A1; toplam fenolik miktarı (TFM), A2; DPPH yöntemi ile belirlenen toplam antioksidan kapasitesi ( $TAK_{DPPH}$ ) ve A3; CUPRAC yöntemi ile belirlenen toplam antioksidan kapasitesidir ( $TAK_{CUPRAC}$ ). Elde edilen sonuçlara göre toplam fenolik madde miktarı (TFM) 17,28-195,17 mg GAE/g kuru ağırlık, DPPH yöntemiyle tespit edilen toplam antioksidan kapasite ( $TAK_{DPPH}$ ) 20,84-64,03 mmol TE/kg kuru ağırlık, CUPRAC yöntemiyle tespit edilen toplam antioksidan kapasite ( $TAK_{CUPRAC}$ ) 182,75-2586,32 mmol TE/kg kuru ağırlık arasında değiştiği tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.1** Konvansiyonel ekstraksiyon deneylerinde elde edilen yanıtlar

<b>Deney no</b>	<b>A1 (TFM)</b>	<b>A2 (TAK<sub>DPPH</sub>)</b>	<b>A3 (TAK<sub>CUPRAC</sub>)</b>
1	83,88±0,43	43,54±0,14	1130,01±11,19
2	83,96±0,85	42,08±0,19	1112,38±11,12
3	47,48±6,68	42,56±0,65	415,86±16,52
4	83,72±0,65	43,69±0,38	1126,97±11,16
5	53,68±4,44	20,84±0,16	314,62±2,64
6	30,41±0,37	21,27±0,21	182,75±8,51
7	83,48±0,44	43,39±0,48	1139,61±11,17
8	54,85±9,74	40,51±0,13	471,92±6,10
9	83,42±5,31	64,03±0,28	908,57±9,65
10	83,63±0,32	43,60±0,38	1117,37±11,17
11	74,60±0,92	21,06±0,09	639,54±0,56
12	195,17±2,07	63,25±0,35	920,42±4,22
13	17,28±4,48	21,30±0,03	566,81±7,39
14	83,45±0,43	40,75±0,05	1058,81±6,22
15	115,09±1,33	63,29±0,24	1625,81±5,13
16	88,41±1,45	55,84±0,24	2586,32±14,21
17	29,97±3,33	37,32±0,05	1077,92±2,23

TFM=Toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/g kuru ağırlık)

TAK<sub>DPPH</sub>=DPPH yöntemi ile belirlenen toplam antioksidan kapasitesi (mmol TE/ kg kuru ağırlık)

TAK<sub>CUPRAC</sub>=CUPRAC yöntemi ile belirlenen toplam antioksidan kapasitesi (mmol TE/ kg kuru ağırlık)

Çalışmada konvansiyonel ekstraksiyon yöntemi için seçilen bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenler üzerindeki etkilerini gösteren model denklemler Design-Expert v12 programı kullanılarak türetilmiş ve çoklu regresyon analizi yapılmıştır. Eşitliklerin oluşturulmasında, Design-Expert v12 programı tarafından önerilmiş ikinci dereceden model denklem kullanılmıştır. Her modelleme çalışması için yine Design-Expert v12 programı kullanılarak varyans analizleri (ANOVA) yapılmıştır. Yapılan varyans analizleri sonucunda oluşturulan

modellerin gerçek cevaplara uygunluklarının belirlenmesinde, modelin önemli bulunması ( $p < 0,05$ ), uyum eksikliğinin önemsiz ( $p > 0,05$ ) olması ve ilgili modele ait regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerinin 0,75'ten büyük olması dikkate alınmıştır. Program ile elde edilen model eşitlikler ile deney sonuçları ve hesaplanan değerler oluşturulan grafikler ile karşılaştırılmıştır.

Konvansiyonel ekstraksiyon yönteminde ekstraksiyon süresi ( $X_1$ ), ekstraksiyon sıcaklığı ( $X_2$ ) ve örnek miktarı / çözücü hacminin ( $X_3$ ) toplam fenolik madde miktarı ( $A_1$ ) üzerindeki etkisinin gösterildiği ikinci dereceden oluşturulan model denklem Eşitlik 4.1'de gösterilmiştir.

$$A_1 = + 83,73 + 2,71X_1 + 15,28X_2 + 17,67X_3 + 11,53X_1X_2 + 13,10X_1X_3 + 8,78X_2X_3 + 5,19(X_1)^2 - 34,98(X_2)^2 - 7,18(X_3)^2 \quad (4.1)$$

$A_1$  bağımlı değişkeni için regresyon katsayı değeri  $R^2 = 1,0000$  olarak tespit edilmiştir.  $R^2$  değerinin 1 olması deneysel olarak elde edilmiş  $A_1$  değerleriyle Eşitlik 4.1 kullanılarak hesaplanan  $A_1$  değerinin denk olduğunu gösterir. Bahsedilen bu modelleme için yapılan varyans analizi (ANOVA) sonuçları Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde model önemli ( $p < 0,05$ ) ve uyum eksikliği önemsiz ( $p > 0,05$ ) olarak tespit edilmiştir.

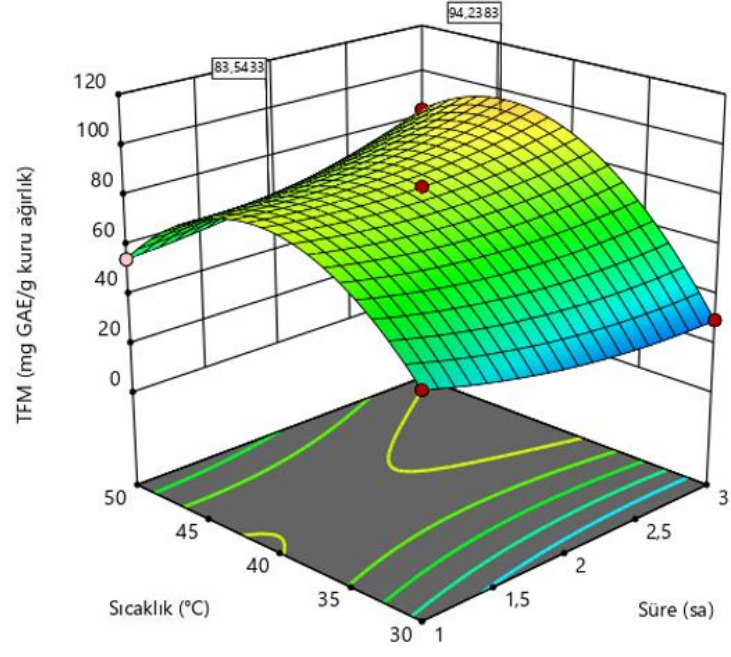


**Çizelge 4.2**  $X_1$ ,  $X_2$  ve  $X_3$  bağımsız değişkenlerinin TFM (A1) üzerindeki etkisinin ANOVA sonuçları

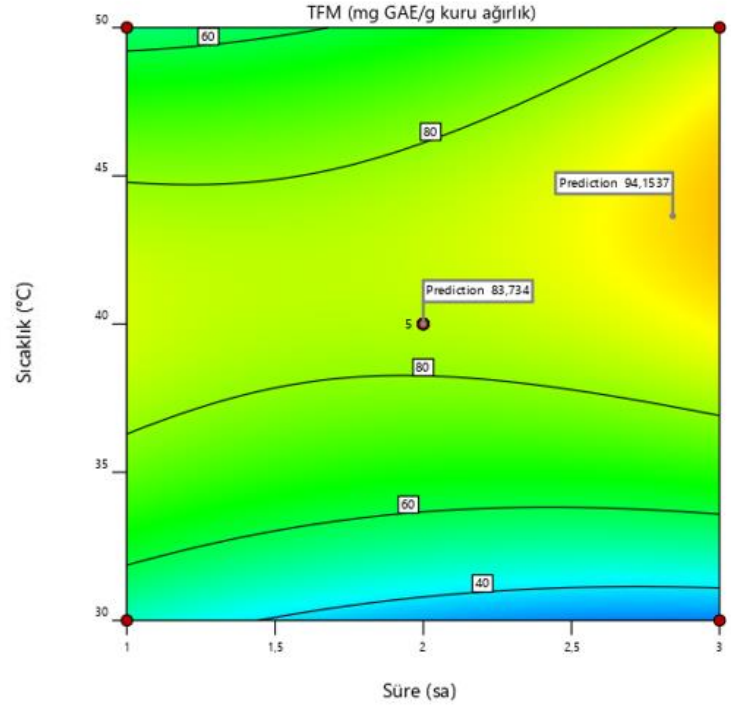
Kaynak	SD	KO	F değeri	p değeri
Model	9	1133,09	22961,62	< 0,0001
$X_1$	1	35,21	713,48	< 0,0001
$X_2$	1	1120,21	22700,47	< 0,0001
$X_3$	1	832,14	16862,90	< 0,0001
$X_1X_2$	1	531,53	10771,26	< 0,0001
$X_1X_3$	1	294,38	5965,38	< 0,0001
$X_2X_3$	1	132,03	2675,45	< 0,0001
$(X_1)^2$	1	83,80	1698,12	< 0,0001
$(X_2)^2$	1	3814,16	77292,21	< 0,0001
$(X_3)^2$	1	105,70	2141,90	< 0,0001
Uyumsuzluk	1	0,0988	2,67	0,1775
Salt hata	4	0,0370		
DKT	14			

SD: Serbestlik Derecesi, KO: Kareler Ortalaması,  
DKT: Düzeltilmiş Kareler Toplamı

Konvansiyonel ekstraksiyon işleminde ekstraksiyon süresi ( $X_1$ ) ve ekstraksiyon sıcaklığı ( $X_2$ ) değişkenlerinin toplam fenolik madde miktarı (A1) yanıtı üzerindeki etkisi Şekil 4.1'deki yanıt yüzey ve kontur grafiklerinde gösterilmiştir. Şekil 4.1.a'da yer alan yanıt yüzey grafiğine bakıldığında sıcaklık ( $X_2$ ) ve süre ( $X_1$ ) değerlerinin belirli bir değere kadar artmasıyla A1 yanıtının arttığı görülmektedir. İşaretlenen noktalara bakıldığında  $X_2$  yaklaşık 43 °C olduğunda  $X_1$  yaklaşık 1,3 saat iken A1 83,5 mg GAE/g kuru ağırlık,  $X_1$  yaklaşık 2,9 iken A1 94,2 mg GAE/g kuru ağırlık olduğu görülmektedir. Sürenin sabit tutulmasıyla ve sıcaklık değerinin 45 °C'nin üzerine çıkmasıyla A1 yanıtının belirli biçimde azaldığı görülmektedir. Şekil 4.1.b'deki kontur grafiğine bakıldığında merkez noktasında  $X_1$  değeri 2 saat ve  $X_2$  değeri 40 °C iken toplam fenolik madde miktarı 83,7 mg GAE/g kuru ağırlık olarak görülmektedir. A1 değerinin en yüksek olduğu değerlere yakın işaretlenen diğer noktada ise  $X_1$  değeri 2,8 saat ve  $X_2$  değeri 43,6 °C iken toplam fenolik madde miktarı 94,1 mg GAE/g kuru ağırlık olarak görülmektedir.



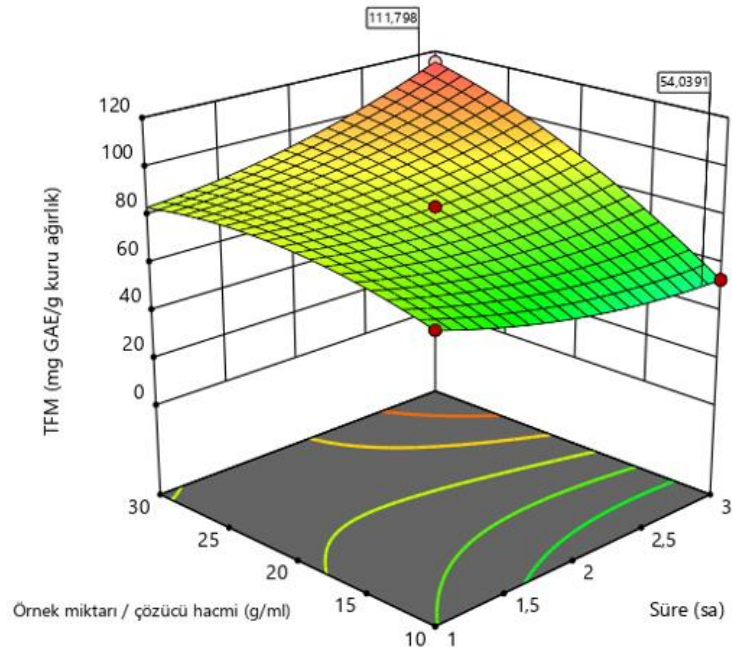
(a)



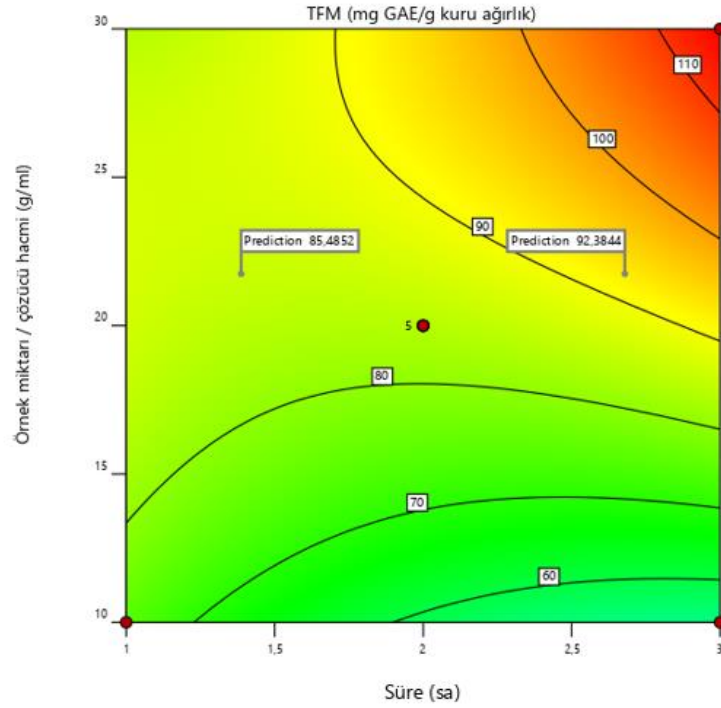
(b)

**Şekil 4.1** Ekstraksiyon süresi ( $X_1$ ) ve ekstraksiyon sıcaklığı ( $X_2$ ) değişimlerinin TFM ( $A_1$ ) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri ( $X_3=1:20$  g/mL)

Şekil 4.2’de konvansiyonel yöntemde ekstraksiyon süresi ( $X_1$ ) ve örnek miktarı / çözücü hacmi ( $X_3$ ) bağımsız değişkenlerinin A1 yanıtı üzerindeki etkisi gösterilmiştir. Yanıt yüzey grafiği (Şekil 4.2.a) incelendiğinde belirli bir sıcaklıkta çözücü oranı arttıkça A1 yanıtı değerinin arttığı görülmektedir. İşaretlenen yerlerde belirli  $X_1$  değerindeki 51,0 mg GAE/g kuru ağırlık ve 111,8 mg GAE/g kuru ağırlık değerleri çözücü miktarı arttıkça A1 yanıt değerinin arttığını göstermektedir. Kontur grafiğinde (Şekil 4.2.b) işaretlenmiş 85,5 mg GAE/g kuru ağırlık ve 92,4 mg GAE/g kuru ağırlık değerleri, 21,8 °C sıcaklık değerinde ekstraksiyon sürelerinin 1,4 saat ve 2,7 saat olduğu durumları göstermektedir.



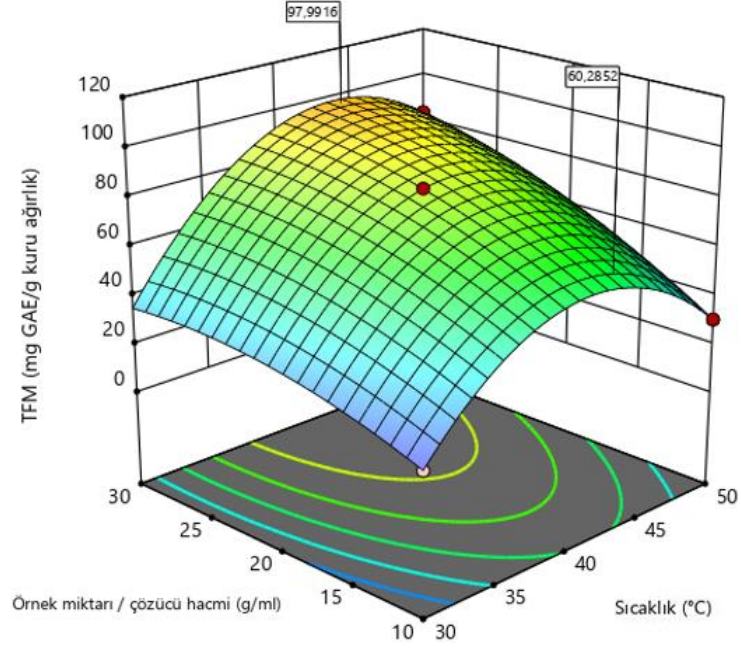
(a)



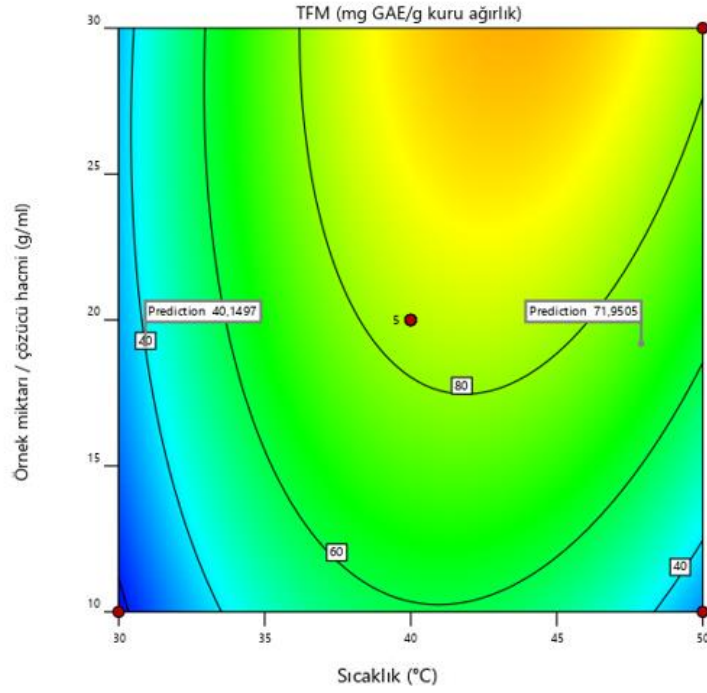
(b)

**Şekil 4.2** Süre ( $X_1$ ) ve örnek miktarı / çözücü hacmi ( $X_3$ ) değişimlerinin TFM ( $A_1$ ) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri ( $X_2=40$  °C)

Şekil 4.3'te konvansiyonel ekstraksiyon yönteminde ekstraksiyon sıcaklığı ( $X_2$ ) ile örnek miktarı / çözücü hacmi ( $X_3$ ) değişkenlerinin  $A_1$  yanıtı üzerindeki etkileri yanıt yüzey ve kontur grafikleri Şekil 4.3.a ve Şekil 4.3.b'de gösterilmiştir. Şekil 4.3.a'da işaretli noktalar incelendiğinde;  $X_2$  43,5 °C değerinde  $A_1$  yanıtı 60,3 mg GAE/g kuru ağırlık ve 98,0 mg GAE/g kuru ağırlık değerlerindeki  $X_3$  değişkeni sırasıyla 1:11 g/mL ve 1:29,5 g/mL olduğu görülmektedir. Böylece çözücü miktarı arttıkça toplam fenolik madde miktarının arttığı anlaşılmaktadır. Şekil 4.3.b kontur grafiği; 40,1 mg GAE/g kuru ağırlık ve 72,0 mg GAE/g kuru ağırlık değerlerinde  $X_3$  değişkeninin 1:19,2 g/mL ve  $X_2$  değişkeninin sırasıyla 31,0 °C ve 48,9 °C olduğu durumları göstermektedir. Grafikten anlaşıldığı üzere sıcaklığın artmasıyla  $A_1$  yanıtının arttığı görülmektedir.



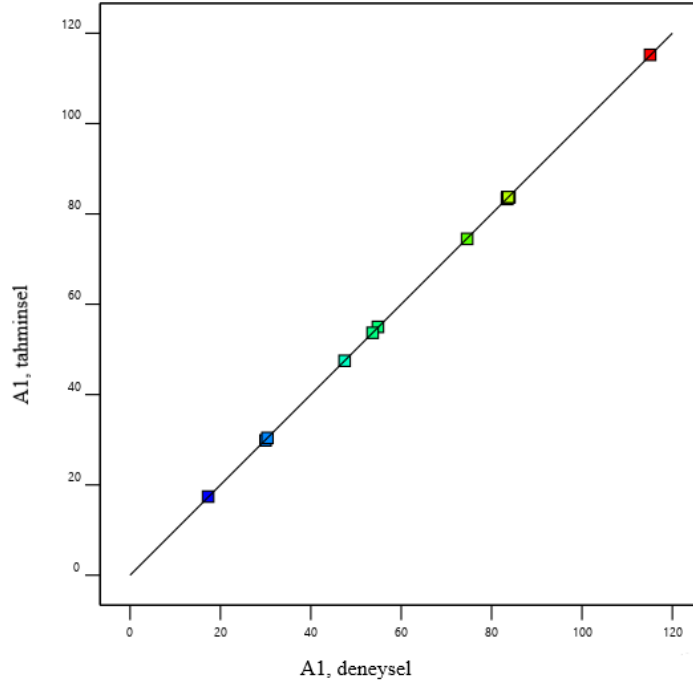
(a)



(b)

**Şekil 4.3** Sıcaklık ( $X_2$ ) ve örnek miktarı / çözücü hacmi ( $X_3$ ) değişimlerinin TFM ( $A_1$ ) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri ( $X_1=2$  saat)

Şekil 4.4'te toplam fenolik madde miktarının (A1) Eşitlik 4.1 ile hesaplanan tahminsel değerleri ile deneysel verilerin karşılaştırılması gösterilmiştir.  $R^2$  değerinin 1,000 olması Eşitlik 4.1 ile elde edilen verilerin deneysel olarak elde edilen verilere denk olduğunu göstermektedir.



**Şekil 4.4** Toplam fenolik madde miktarının (A1) deneysel sonuçları ile Eşitlik 4.1 ile hesaplanan tahminsel sonuçlarının karşılaştırılması ( $R^2=1,0000$ )

Konvansiyonel ekstraksiyon yönteminde ekstraksiyon süresi ( $X_1$ ), ekstraksiyon sıcaklığı ( $X_2$ ) ve örnek miktarı / çözücü hacminin ( $X_3$ ) DPPH yöntemiyle tespit edilen toplam antioksidan kapasitesi ( $A_2$ ) üzerindeki etkisinin gösterildiği ikinci dereceden oluşturulan model denklem Eşitlik 4.2'de gösterilmiştir.

$$A_2 = + 43,26 - 1,03X_1 + 21,69X_3 + 1,37X_1X_2 - 1,43(X_1)^2 - 1,54(X_2)^2 \quad (4.2)$$

$A_2$  bağımlı değişkeni için regresyon katsayı değeri  $R^2 = 0,9989$  olarak tespit edilmiştir.  $R^2$  değerinin 0,9989 olması deneysel olarak elde edilmiş  $A_2$  değerleriyle Eşitlik 4.2 kullanılarak hesaplanan  $A_2$  değerinin birbirine yakın olduğunu göstermektedir. Bahsedilen bu modelleme için yapılan varyans analizi (ANOVA) sonuçları Çizelge 4.3'te gösterilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde model önemli ( $p < 0,05$ ) ve uyum eksikliği önemsiz ( $p > 0,05$ ) olarak

tespit edilmiştir. Model denkleminde göre A2 yanıtı üzerinde  $X_1$ ,  $X_3$ ,  $X_1X_2$ ,  $(X_1)^2$  ve  $(X_2)^2$  etkiye sahipken ( $p < 0,05$ ),  $X_2$ ,  $X_1X_3$ ,  $X_2X_3$  ve  $(X_3)^2$  anlamlı etkiye sahip değildir ( $p > 0,05$ ).

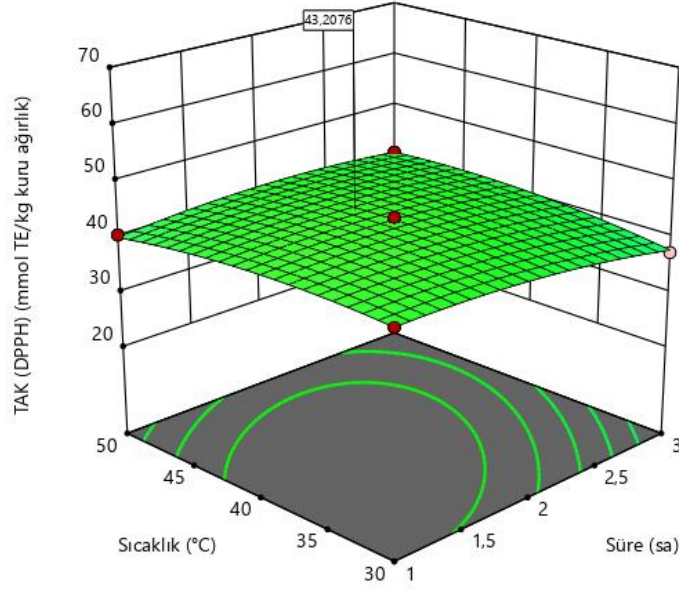
**Çizelge 4.3**  $X_1$ ,  $X_2$  ve  $X_3$  bağımsız değişkenlerinin  $TAK_{DPPH}$  (A2) üzerindeki etkisinin ANOVA sonuçları

Kaynak	SD	KO	F değeri	p değeri
Model	9	289,44	483,33	< 0,0001
$X_1$	1	5,05	8,43	0,0336
$X_2$	1	0,0701	0,1170	0,7462
$X_3$	1	1254,84	2095,44	< 0,0001
$X_1X_2$	1	7,51	12,54	0,0165
$X_1X_3$	1	0,8201	1,37	0,2946
$X_2X_3$	1	0,0134	0,0223	0,8870
$(X_1)^2$	1	6,38	10,66	0,0223
$(X_2)^2$	1	7,43	12,41	0,0169
$(X_3)^2$	1	2,21	3,69	0,1129
Uyumsuzluk	1	1,21	2,70	0,1778
Salt hata	4	0,4471		
DKT	14			

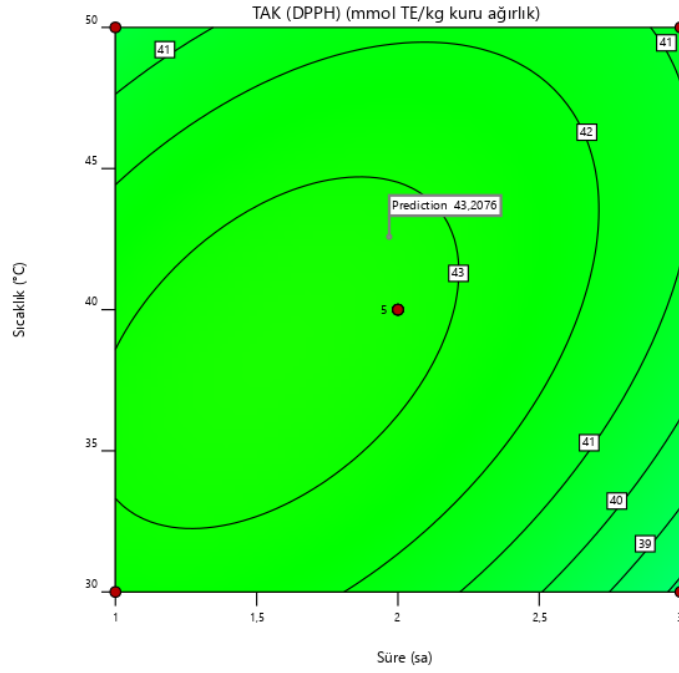
SD: Serbestlik Derecesi, KO: Kareler Ortalaması,

DKT: Düzeltmiş Kareler Toplamı

Şekil 4.5'te A2 yanıtı üzerinde  $X_1$  ve  $X_2$  bağımsız değişkenlerinin ( $X_3=1:20$  g/mL) etkisi yanıt yüzey ve kontur grafikleri ile gösterilmiştir.  $X_2$  değişkeninin A2 yanıtı üzerinde önemli etkisi görülmezken  $X_1$  değişkeni ve  $X_1X_2$  korelasyonunun etkisi görülmüştür. Şekilde işaretli yanıt olan 43,2 mmol TE/kg kuru ağırlık, 43°C ve 2 saat ekstraksiyon koşullarında elde edilmiştir. 30°C, 1 saat ve 50°C, 3 saat ekstraksiyon koşullarında yanıt değerleri sırasıyla, 42,5 ve 40,8 mmol TE/kg kuru ağırlıktır.



(a)



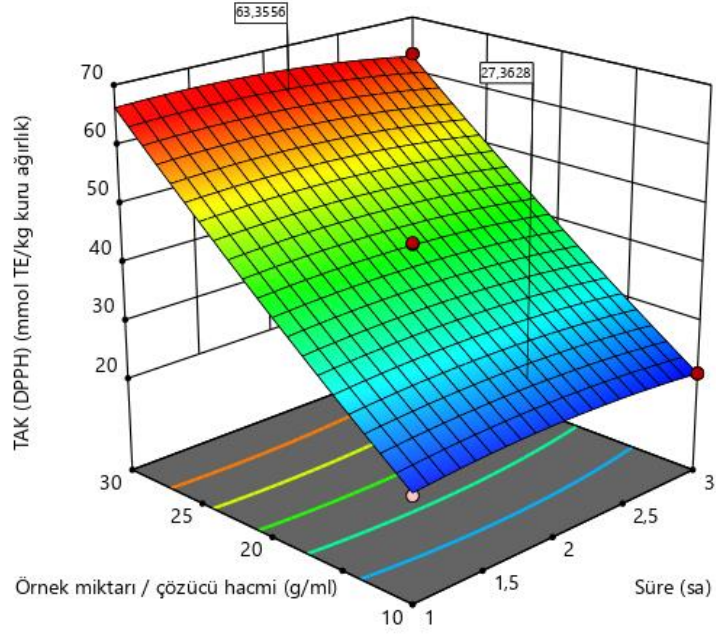
(b)

**Şekil 4.5** Ekstraksiyon süresi ( $X_1$ ) ve ekstraksiyon sıcaklığı ( $X_2$ ) değişimlerinin  $TAK_{DPPH}$  ( $A_2$ ) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri ( $X_3=1:20$  g/mL)

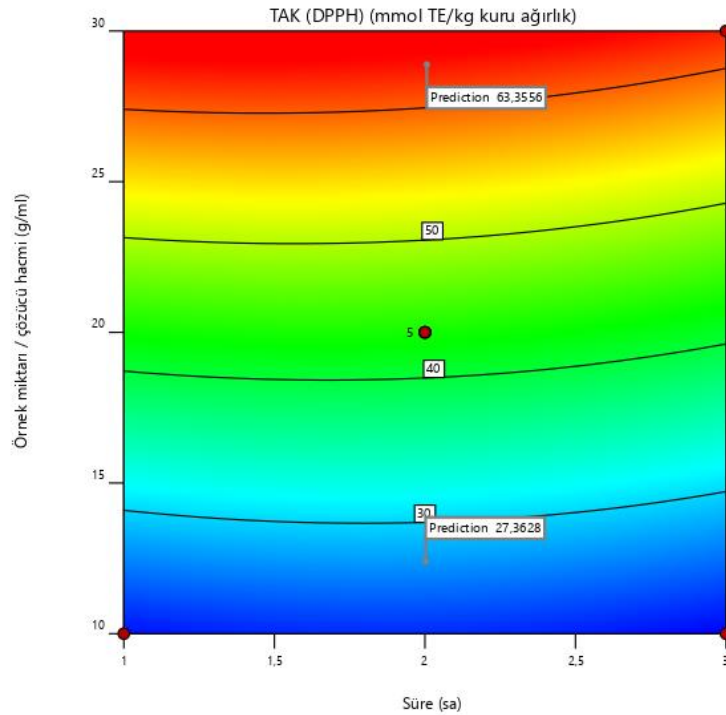
Şekil 4.6'da  $A_2$  yanıtı üzerinde  $X_1$  ve  $X_3$  değişkenlerinin etkisi ( $X_2=40^\circ\text{C}$ ) gösterilmiştir. 2 saat ekstraksiyon süresinde 1:12 ve 1:29 g/mL örnek miktarı/çözücü hacmi koşullarında elde edilen yanıtlar sırasıyla 27,4 ve 63,4 mmol TE/kg kuru ağırlıktır. Çözücünün artması  $A_2$  yanıtını önemli ölçüde artırmaktadır ancak Şekil 4.6 (a) ve (b) grafiklerinde görüldüğü üzere



aynı çözücü miktarında ekstraksiyon süresinin artması, A2 yanıtının azalmasına neden olmaktadır. Çözücü miktarı ve süre değişkenlerinin korelasyonu A2 yanıtında önemli bir etki oluşturmamaktadır.



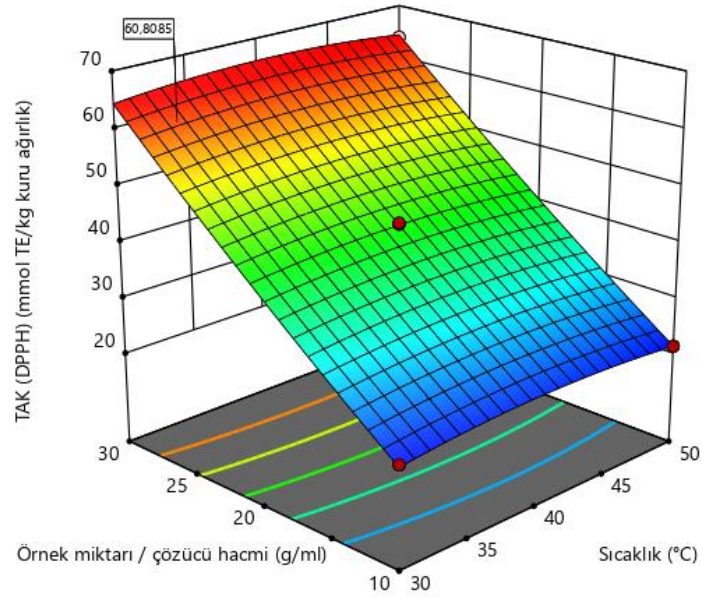
(a)



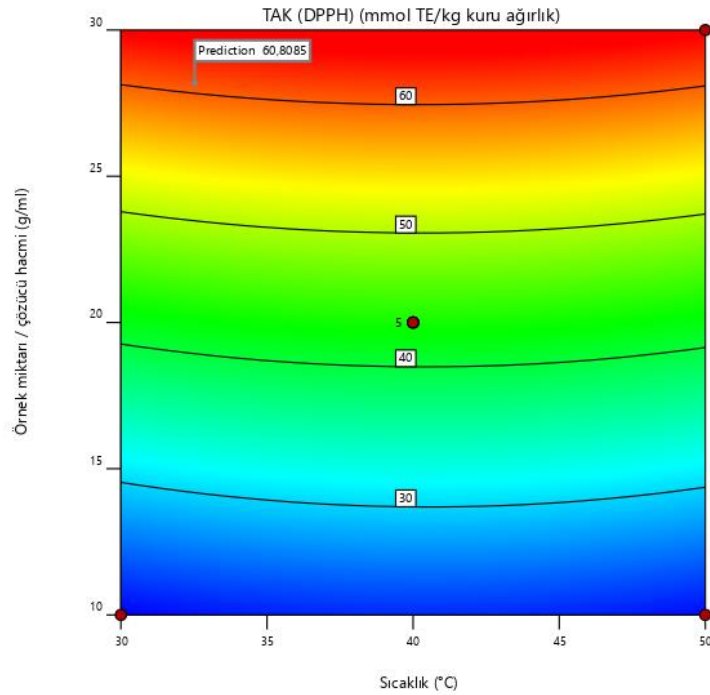
(b)

**Şekil 4.6** Süre ( $X_1$ ) ve örnek miktarı / çözücü hacmi ( $X_3$ ) değişimlerinin  $TAK_{DPPH}$  ( $A_2$ ) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri ( $X_2=40^\circ C$ )

Şekil 4.7'de  $X_2$  ve  $X_3$  değişkenlerinin A2 yanıtına etkisi gösterilmiştir ( $X_1=2$  saat). Şekil 4.6'ya benzer şekilde çözücü miktarı önemli ölçüde A2 yanıtını etkilemektedir.  $X_2$  değişkeni ve iki değişkenin korelasyonunun A2 yanıtı üzerindeki etkisi önemsiz ( $p>0,05$ ) bulunmuştur.



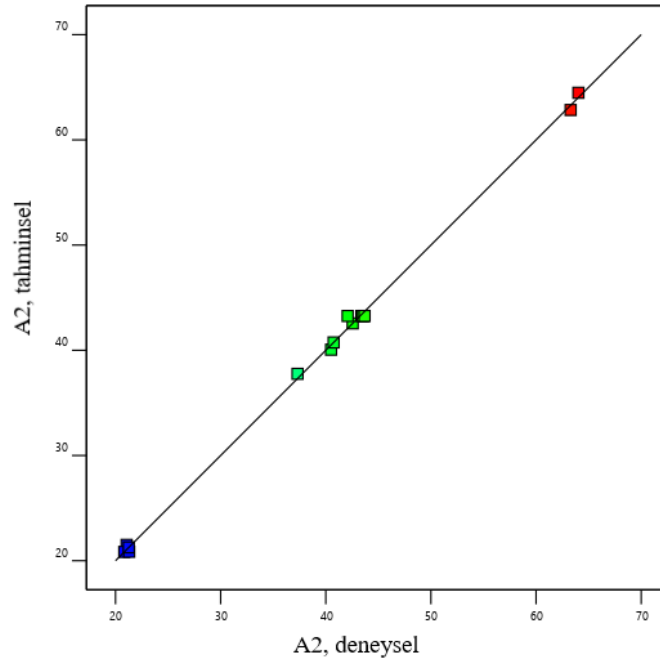
(a)



(b)

**Şekil 4.7** Sıcaklık ( $X_2$ ) ve örnek miktarı / çözücü hacmi ( $X_3$ ) değişimlerinin  $TAK_{DPPH}$  (A2) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri ( $X_1=2$  saat)

Şekil 4.8’de A2 yanıtının Eşitlik 4.2 ile hesaplanan tahminsel değerleri ile deneysel verilerin karşılaştırılması gösterilmiştir.  $R^2$  değeri 0,9989 olarak tespit edilmiştir.  $R^2$  değerinin 1,00’e yakın olması nedeniyle teorik ve deneysel olarak elde edilen verilerin oldukça yakın olduğunu görülmüştür.



**Şekil 4.8** DPPH yöntemiyle belirlenen toplam antioksidan kapasitesinin (A2) deneysel sonuçları ile Eşitlik 4.2 ile hesaplanan tahminsel sonuçlarının karşılaştırılması ( $R^2=0,9989$ )

Konvansiyonel ekstraksiyon yönteminde ekstraksiyon süresi ( $X_1$ ), ekstraksiyon sıcaklığı ( $X_2$ ) ve örnek miktarı / çözücü hacminin ( $X_3$ ) CUPRAC yöntemiyle tespit edilen toplam antioksidan kapasitesi ( $A_3$ ) üzerindeki etkisinin gösterildiği ikinci dereceden oluşturulan model denklem Eşitlik 4.3’te gösterilmiştir.

$$A_3 = + 1125,27 + 315,22X_1 + 171,97X_3 + 480,65X_1X_3 + 191,13X_2X_3 - 128,36(X_1)^2 - 240,79(X_2)^2 - 344,89 (X_3)^2 \quad (4.3)$$

$A_3$  bağımlı değişkeni için regresyon katsayı değeri  $R^2 = 0,9989$  olarak tespit edilmiştir.  $R^2$  değerinin 0,9997 olması deneysel olarak elde edilmiş  $A_3$  değerleriyle Eşitlik 4.3 kullanılarak hesaplanan  $A_3$  değerinin birbirine yakın olduğunu göstermektedir. Bahsedilen bu modelleme için yapılan varyans analizi (ANOVA) sonuçları Çizelge 4.4’te gösterilmiştir.

Sonuçlar incelendiğinde model önemli ( $p < 0,05$ ) ve uyum eksikliği önemsiz ( $p > 0,05$ ) olarak tespit edilmiştir.

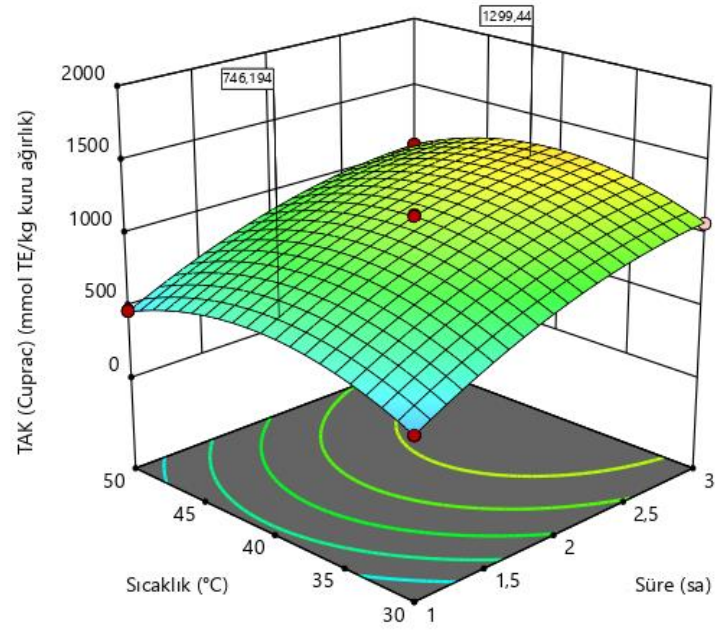
**Çizelge 4.4**  $X_1$ ,  $X_2$  ve  $X_3$  bağımsız değişkenlerinin  $TAK_{CUPRAC}$  ( $A_3$ ) üzerindeki etkisinin ANOVA sonuçları

Kaynak	SD	KO	F değeri	p değeri
Model	9	2,523E+05	1877,00	< 0,0001
$X_1$	1	4,769E+05	3548,57	< 0,0001
$X_2$	1	188,10	1,40	0,2900
$X_3$	1	78863,15	586,78	< 0,0001
$X_1X_2$	1	1412,26	10,51	0,0229
$X_1X_3$	1	3,960E+05	2946,72	< 0,0001
$X_2X_3$	1	62624,02	465,95	< 0,0001
$(X_1)^2$	1	51350,67	382,07	< 0,0001
$(X_2)^2$	1	1,807E+05	1344,61	< 0,0001
$(X_3)^2$	1	2,440E+05	1815,45	< 0,0001
Uyumsuzluk	1	212,41	1,85	0,2455
Salt hata	4	114,90		
DKT	14			

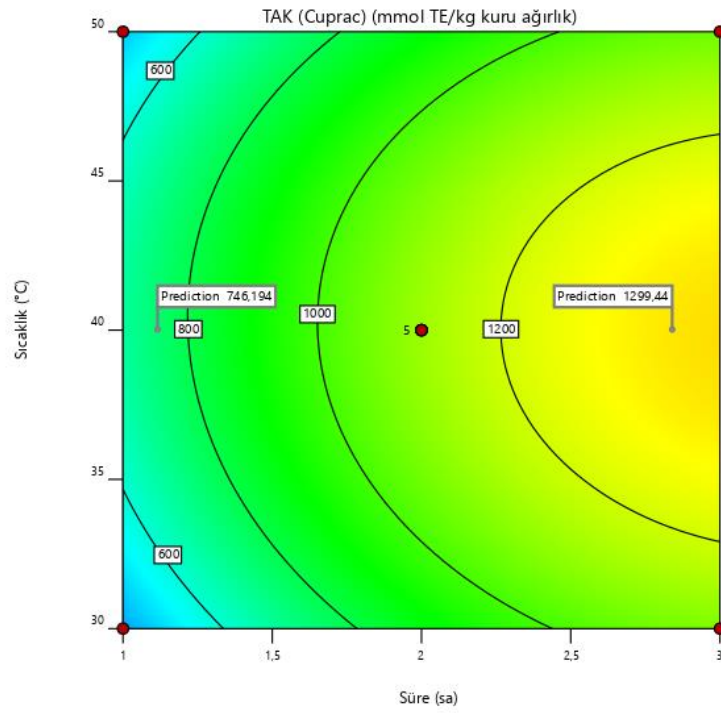
SD: Serbestlik Derecesi, KO: Kareler Ortalaması,

DKT: Düzeltilmiş Kareler Toplamı

Şekil 4.9'da  $X_1$  ve  $X_2$ 'nin  $A_3$  yanıtına etkisi gösterilmiştir ( $X_3=1:20$  g/mL).  $39,6^\circ\text{C}$  ( $X_2$ ) değerinde 1,2 ve 2,8 saat ekstraksiyon sürelerinde elde edilen  $A_3$  yanıtları sırasıyla 774,5 ve 1299,3 mmol TE/kg kuru ağırlıktır. Grafiklerde de görüldüğü üzere ekstraksiyon süresinin artması  $A_3$  yanıtını önemli değerde artırmıştır.  $X_1X_2$  korelasyonunun  $A_3$  yanıtını önemli ölçüde etkilemediği ( $p > 0,05$ ) görülmüştür.



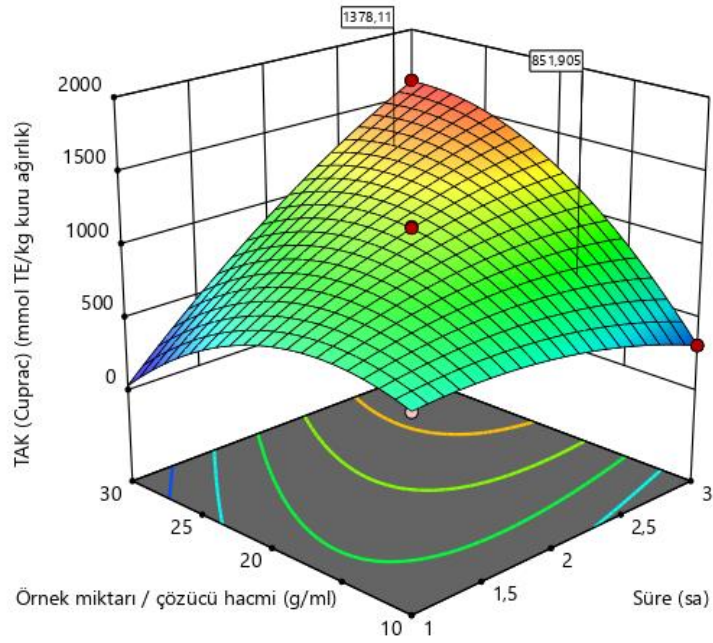
(a)



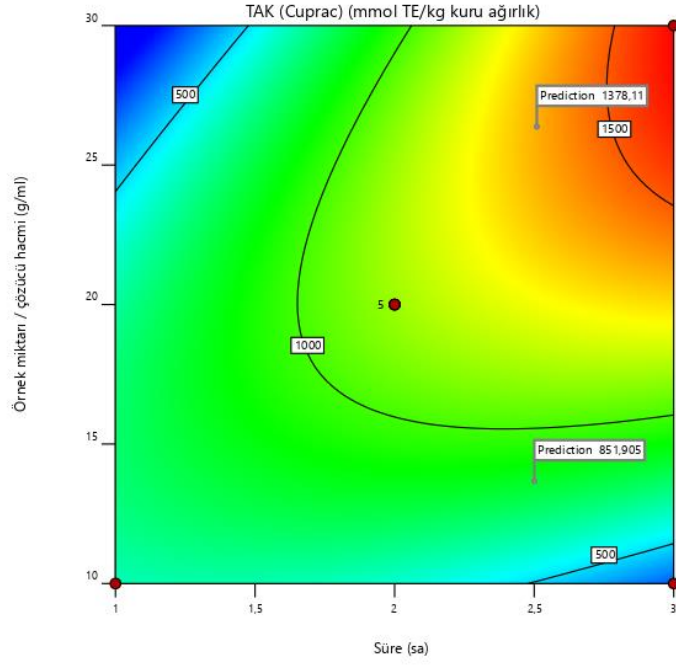
(b)

**Şekil 4.9** Ekstraksiyon süresi ( $X_1$ ) ve ekstraksiyon sıcaklığı ( $X_2$ ) değişimlerinin  $TAK_{CUPRAC}$  ( $A_3$ ) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri ( $X_3=1:20$  g/mL)

Şekil 4.10'da A3 yanıtı üzerinde  $X_1$  ve  $X_3$  değişkenlerinin etkisi gösterilmiştir ( $X_2=40^\circ\text{C}$ ).  $X_1$ ,  $X_3$  değişkenleri ve  $X_1X_3$  korelasyonu A3 yanıt değerini önemli ölçüde etkilemektedir. Grafiklerde görüldüğü üzere en yüksek ekstraksiyon süresi (3 saat) ve en fazla çözücü kullanılan (1:30 g/mL) koşullarda A3 yanıtı yüksek değerde elde edilmiştir. İstisna durumlar dışında ekstraksiyon süresi ve çözücü miktarı azaldıkça yanıt değeri de azalmaktadır. 3 saat, 1:10 g/mL koşullarında ve 1 saat, 1:30 g/mL koşullarında A3 yanıt değeri en düşük seviyelerdedir.



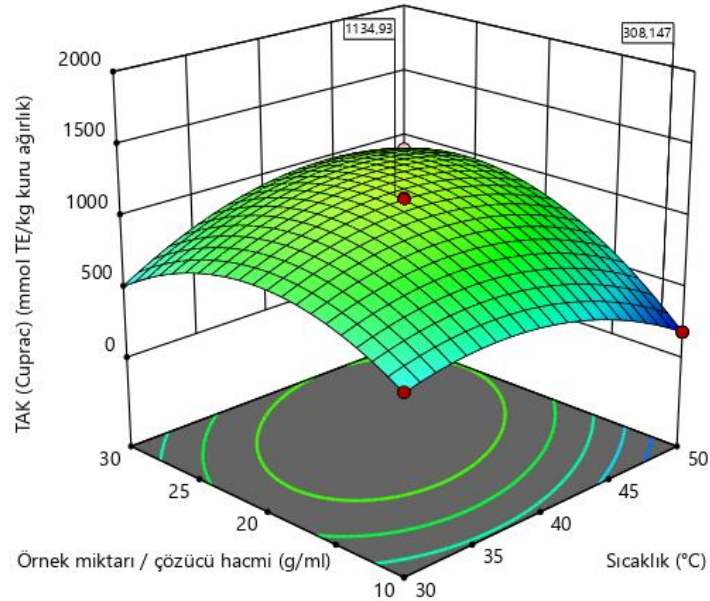
(a)



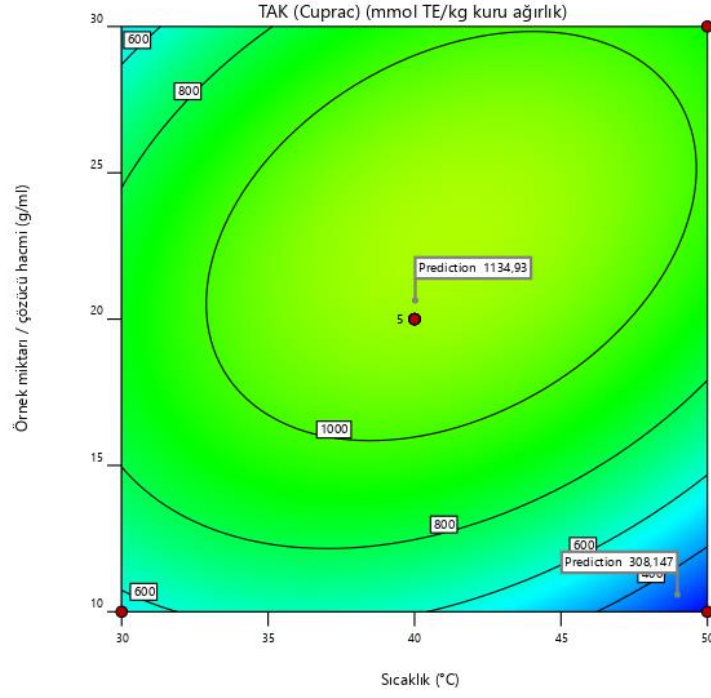
(b)

**Şekil 4.10** Süre ( $X_1$ ) ve örnek miktarı / çözücü hacmi ( $X_3$ ) değişimlerinin  $TAK_{CUPRAC}$  ( $A_3$ ) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri ( $X_2=40^\circ\text{C}$ )

Şekil 4.11'de  $X_2$  ve  $X_3$  değişkenlerinin  $A_3$  yanıtı üzerinde etkisi gösterilmiştir ( $X_1=2$  saat).  $A_3$  yanıtı  $50^\circ\text{C}$  ve  $1:10$  g/mL koşullarda en düşük seviyelerde,  $40^\circ\text{C}$  ve  $1:20-1:25$  g/mL koşullarında en yüksek düzeyde elde edilmiştir.  $X_2X_3$  korelasyonu önemli ölçüde,  $X_2$  değişkeni önemsiz düzeyde yanıt değerini etkilememektedir.



(a)

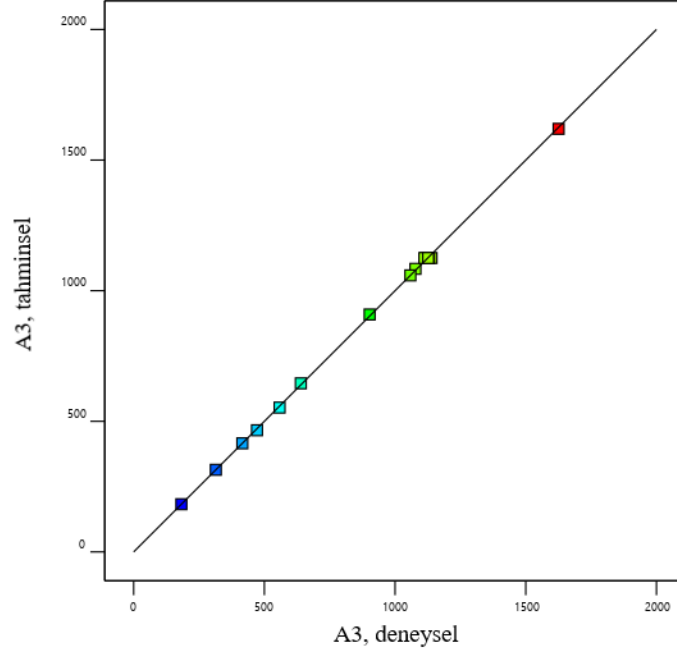


(b)

**Şekil 4.11** Sıcaklık ( $X_2$ ) ve örnek miktarı / çözücü hacmi ( $X_3$ ) değişimlerinin  $TAK_{CUPRAC}$  ( $A_3$ ) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri ( $X_1=2$  saat)

Şekil 4.12’de  $A_3$  yanıtının Eşitlik 4.3 ile hesaplanan tahminsel değerleri ile deneysel verilerin karşılaştırılması gösterilmiştir.  $R^2$  değeri 0,9997 olarak tespit edilmiştir. Tahminsel ve deneysel olarak elde edilen verilerin oldukça yakın olduğunu görülmektedir.





**Şekil 4.12** CUPRAC yöntemiyle belirlenen toplam antioksidan kapasitesinin (A3) deneysel sonuçları ile Eşitlik 4.3 ile hesaplanan tahminsel sonuçlarının karşılaştırılması ( $R^2=0,9997$ )

#### 4.2. Nar kabuğunun ultrason destekli ekstraksiyonunda bağımlı değişkenlerin yanıt yüzey yöntemi ile modellenmesi

Box-Behnken deney tasarımı kullanılarak oluşturulmuş deney planına göre gerçekleştirilen ultrason destekli ekstraksiyon deneyleri sonucunda elde edilen yanıtlar Çizelge 4.5'te verilmiştir 3 bağımsız değişken ile deneyler gerçekleştirildikten sonra belirlenen bağımlı değişkenler; B1; toplam fenolik miktarı (TFM), B2; DPPH yöntemi ile belirlenen toplam antioksidan kapasitesi ( $TAK_{DPPH}$ ) ve B3; CUPRAC yöntemi ile belirlenen toplam antioksidan kapasitesidir ( $TAK_{CUPRAC}$ ). Elde edilen sonuçlara göre toplam fenolik madde miktarı (TFM) 33,49-169,37 mg GAE/g kuru ağırlık, DPPH yöntemiyle tespit edilen toplam antioksidan kapasite ( $TAK_{DPPH}$ ) 20,84-64,43 mmol TE/kg kuru ağırlık, CUPRAC yöntemiyle tespit edilen toplam antioksidan kapasite ( $TAK_{CUPRAC}$ ) 2490,87-4473,34 mmol TE/kg kuru ağırlık arasında değiştiği tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.5** Ultrason destekli ekstraksiyon deneylerinde elde edilen yanıtlar

<b>Deney no</b>	<b>B1 (TFM)</b>	<b>B2 (TAK<sub>DPPH</sub>)</b>	<b>B3 (TAK<sub>CUPRAC</sub>)</b>
1	134,11±2,66	43,48±0,09	3465,69±13,46
2	136,65±1,50	43,52±0,14	3728,63±7,77
3	85,07±0,33	42,35±0,23	2770,18±10,59
4	134,19±2,65	43,63±0,05	3732,02±7,77
5	117,14±5,45	20,99±0,10	2592,06±7,77
6	51,01±1,44	20,84±0,18	2960,17±3,89
7	132,78±2,32	43,69±0,05	3694,70±5,09
8	84,22±1,42	42,44±0,11	3706,58±10,59
9	78,12±2,08	63,73±0,56	3405,50±15,31
10	134,69±2,88	43,57±0,09	3862,64±5,09
11	138,10±6,97	21,19±0,03	2490,87±1,47
12	159,95±7,37	64,20±0,14	4243,49±4,42
13	33,49±0,34	21,10±0,16	2561,52±16,94
14	142,73±2,10	42,35±0,19	4473,34±20,36
15	169,37±6,36	64,06±0,14	4040,69±20,25
16	86,55±1,69	64,43±0,16	3214,18±15,31
17	74,08±3,51	42,38±0,30	3109,45±8,81

TFM=Toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/g kuru ağırlık)

TAK<sub>DPPH</sub>=DPPH yöntemi ile belirlenen toplam antioksidan kapasitesi (mmol TE/ kg kuru ağırlık)

TAK<sub>CUPRAC</sub>=CUPRAC yöntemi ile belirlenen toplam antioksidan kapasitesi (mmol TE/ kg kuru ağırlık)

Çalışmada ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi için seçilen bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenler üzerindeki etkilerini gösteren model denklemler Design-Expert v12 programı kullanılarak türetilmiş ve çoklu regresyon analizi yapılmıştır. Eşitliklerin oluşturulmasında, Design-Expert v12 programı tarafından önerilmiş ikinci dereceden model denklem kullanılmıştır. Her modelleme çalışması için yine Design-Expert v12 programı kullanılarak varyans analizleri (ANOVA) yapılmıştır. Yapılan varyans analizleri sonucunda oluşturulan modellerin gerçek cevaplara uygunluklarının belirlenmesinde, modelin önemli

bulunması ( $p < 0,05$ ), uyum eksikliğinin önemsiz ( $p > 0,05$ ) olması ve ilgili modele ait regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerinin 0,75'ten büyük olması dikkate alınmıştır. Program ile elde edilen model eşitlikler ile deney sonuçları ve hesaplanan değerler oluşturulan grafikler ile karşılaştırılmıştır.

Ultrason destekli ekstraksiyon yönteminde ekstraksiyon süresi ( $Y_1$ ), ekstraksiyon sıcaklığı ( $Y_2$ ) ve örnek miktarı / çözücü hacminin ( $Y_3$ ) toplam fenolik madde miktarı (B1) üzerindeki etkisinin gösterildiği ikinci dereceden oluşturulan model denklem Eşitlik 4.4'te gösterilmiştir.

$$B1 = + 134,48 + 2,51Y_2 + 19,80Y_3 + 3,18Y_1Y_2 + 8,64Y_1Y_3 - 6,49Y_2Y_3 + 16,37(Y_1)^2 - 68,52(Y_2)^2 - 3,67(Y_3)^2 \quad (4.4)$$

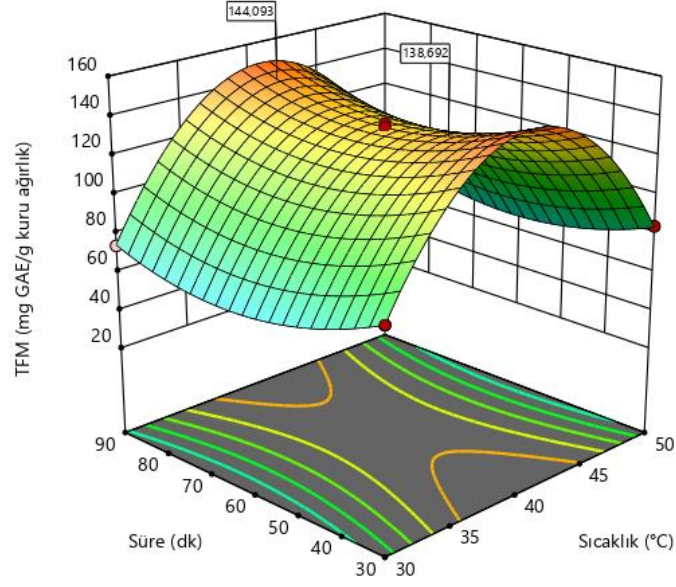
B1 bağımlı değişkeni için regresyon katsayısı değeri  $R^2 = 0,9995$  olarak tespit edilmiştir. Elde edilen  $R^2$  değeri Eşitlik 4.4 kullanılarak hesaplanan ile deneysel olarak elde edilen B1 değerlerinin birbirine oldukça yakın olduğunu göstermektedir. Modelleme için yapılan varyans analizi (ANOVA) sonuçları Çizelge 4.6'da gösterilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde model önemli ( $p < 0,05$ ) ve uyum eksikliği önemsiz ( $p > 0,05$ ) olarak tespit edilmiştir. Model denklemine göre ultrason destekli ekstraksiyon yönteminde B1 bağımlı değişken değerini,  $Y_1$  hariç ( $p > 0,05$ ),  $Y_2$  ve  $Y_3$  bağımsız değişkenleri,  $Y_1$ ,  $Y_2$  ve  $Y_3$  değişkenlerinin interaksyonu ve  $Y_1$ ,  $Y_2$  ve  $Y_3$  değerlerinin kareleri etkilemektedir ( $p < 0,05$ ).

**Çizelge 4.6** Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub> ve Y<sub>3</sub> bağımsız değişkenlerinin TFM (B1) üzerindeki etkisinin ANOVA sonuçları

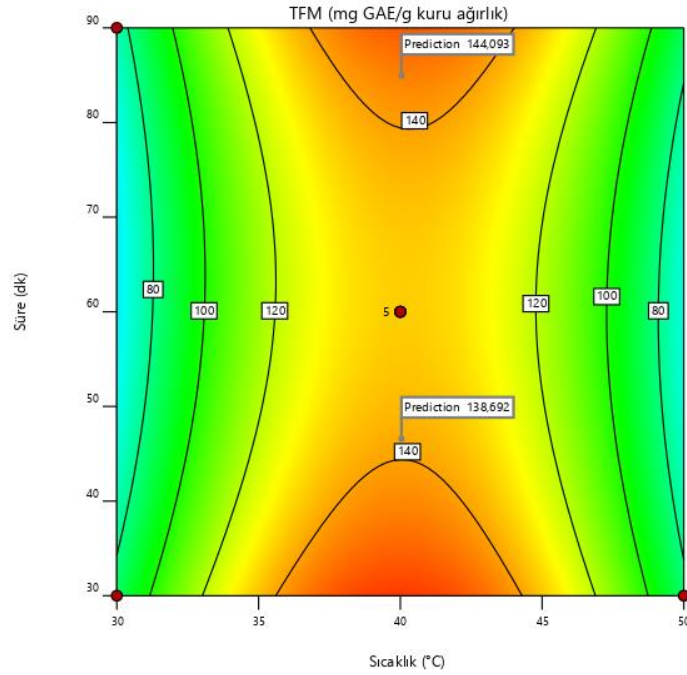
Kaynak	SD	KO	F değeri	p değeri
Model	9	2164,72	1171,80	< 0,0001
Y <sub>1</sub>	1	11,54	6,25	0,0546
Y <sub>2</sub>	1	30,28	16,39	0,0098
Y <sub>3</sub>	1	1882,43	1018,99	< 0,0001
Y <sub>1</sub> Y <sub>2</sub>	1	17,29	9,36	0,0281
Y <sub>1</sub> Y <sub>3</sub>	1	127,95	69,26	0,0004
Y <sub>2</sub> Y <sub>3</sub>	1	168,35	91,13	0,0002
(Y <sub>1</sub> ) <sup>2</sup>	1	549,48	297,44	< 0,0001
(Y <sub>2</sub> ) <sup>2</sup>	1	14635,84	7922,62	< 0,0001
(Y <sub>3</sub> ) <sup>2</sup>	1	41,90	22,68	0,0050
Uyumsuzluk	1	1,37	0,6983	0,4504
Salt hata	4	1,97		
DKT	14			

SD: Serbestlik Derecesi, KO: Kareler Ortalaması,  
DKT: Düzeltilmiş Kareler Toplamı

Ultrason destekli ekstraksiyon yönteminde ekstraksiyon süresi (Y<sub>1</sub>) ve ekstraksiyon sıcaklığı (Y<sub>2</sub>) değişkenlerinin toplam fenolik madde miktarı (B1) yanıtı üzerindeki etkisi Şekil 4.13'te gösterilmiştir. Şekil 4.13.a ve Şekil 4.13.b de yer alan yanıt yüzey grafiği ve kontur grafiğinde işaretli noktalar incelendiğinde; Y<sub>2</sub> yaklaşık 40 °C'de, Y<sub>1</sub> yaklaşık 85 dakika iken B1 144,1 mg GAE/g kuru ağırlık, Y<sub>1</sub> yaklaşık 47 dakika iken B1 138,7 mg GAE/g kuru ağırlık olduğu görülmektedir. Sıcaklık ve süre koşulları bu değerlerde iken ekstraksiyon B1 yanıtının maksimum seviyelerde olduğu görülmektedir. Süre sabit tutulup sıcaklık arttırıldığında 40 °C seviyelerine kadar B1 yanıt değerinin arttığı, sıcaklığın 40 °C'nin üzerine çıktıkça B1 yanıt değerinin azaldığı görülmektedir.



(a)

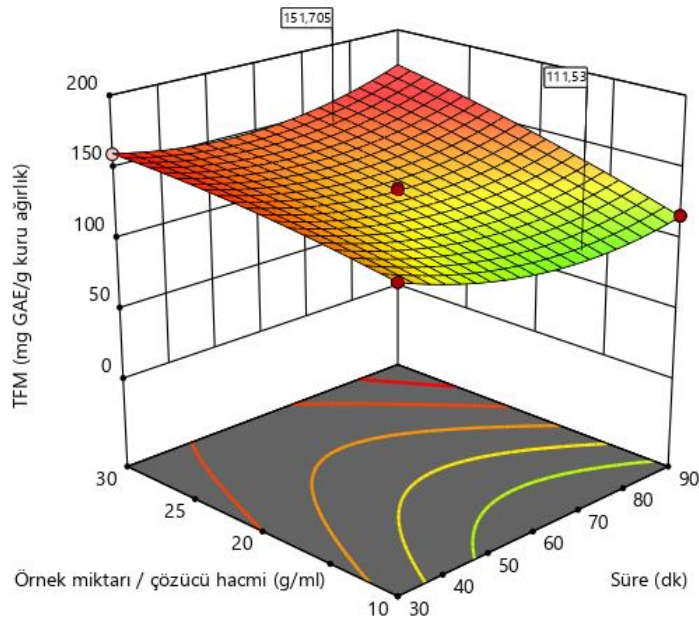


(b)

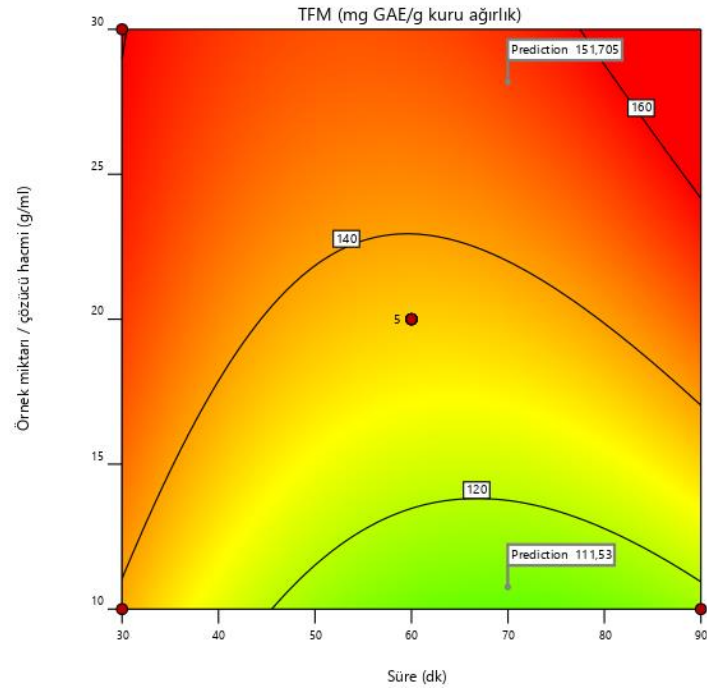
**Şekil 4.13** Ekstraksiyon süresi ( $Y_1$ ) ve ekstraksiyon sıcaklığı ( $Y_2$ ) değişimlerinin TFM ( $B_1$ ) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri ( $Y_3=1:20$  g/mL)

Şekil 4.14'te ultrason destekli ekstraksiyon yöntemde ekstraksiyon süresi ( $Y_1$ ) ve örnek miktarı/çözücü hacmi ( $Y_3$ ) bağımsız değişkenlerinin  $B_1$  yanıtı üzerindeki etkisi

gösterilmiştir. Yanıt yüzey grafiği (Şekil 4.14.a) incelendiğinde çözücü miktarı arttıkça B1 yanıtı değerinin arttığı görülmektedir. İşaretlenen yerlerde belirli  $Y_1$  (70 dk) değerindeki 151,7 mg GAE/g kuru ağırlık ve 111,6 mg GAE/g kuru ağırlık B1 yanıt değerleri çözücü miktarı arttıkça B1 yanıt değerinin arttığını göstermektedir. Kontur grafiği (Şekil 4.14.b) incelendiğinde 1:10 g/mL örnek miktarı/çözücü hacmi ( $Y_3$ ) koşulunda tüm ekstraksiyon sürelerinde diğer  $Y_3$  değişken değerlerine göre daha düşük B1 yanıt değerleri elde edilmiştir.



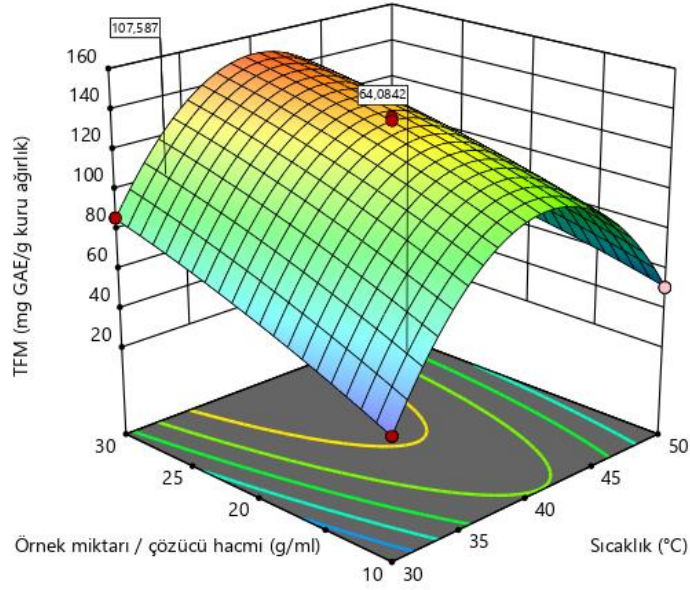
(a)



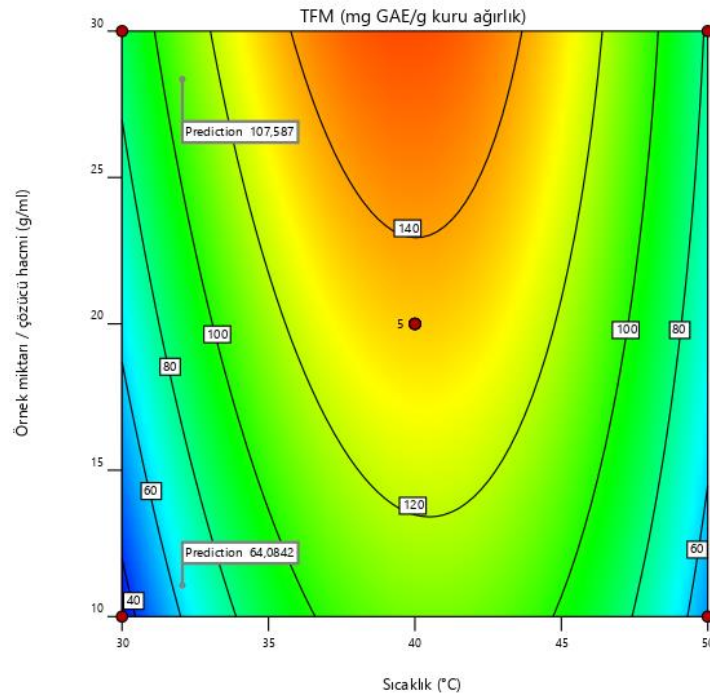
(b)

**Şekil 4.14** Ekstraksiyon süresi ( $Y_1$ ) ve örnek miktarı / çözücü hacmi ( $Y_3$ ) değişimlerinin TFM (B1) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri ( $Y_2=40^\circ\text{C}$ )

Şekil 4.15'te ultrason destekli ekstraksiyon yönteminde ekstraksiyon sıcaklığı ( $Y_2$ ) ile örnek miktarı / çözücü hacmi ( $Y_3$ ) değişkenlerinin B1 yanıtı üzerindeki etkileri yanıt yüzey ve kontur grafikleri Şekil 4.15.a ve Şekil 4.15.b'de gösterilmiştir. Şekil 4.15.a'da işaretli noktalar incelendiğinde;  $Y_2$  32,1 °C değerinde B1 yanıtı 107,6 mg GAE/g kuru ağırlık ve 64,1 mg GAE/g kuru ağırlık değerlerindeyken  $Y_3$  değişkeni sırasıyla 1:27,4 g/mL ve 1:11,1 g/mL olduğu görülmektedir. Böylece UDE yönteminde çözücü miktarı artıkça toplam fenolik madde miktarının arttığı anlaşılmaktadır. Şekil 4.15.b kontur grafiği incelendiğinde;  $Y_1$  60 dk,  $Y_2$  40°C ve  $Y_3$  1:30 g/mL koşullarında en yüksek B1 yanıt değerinin elde edildiği görülmektedir.



(a)

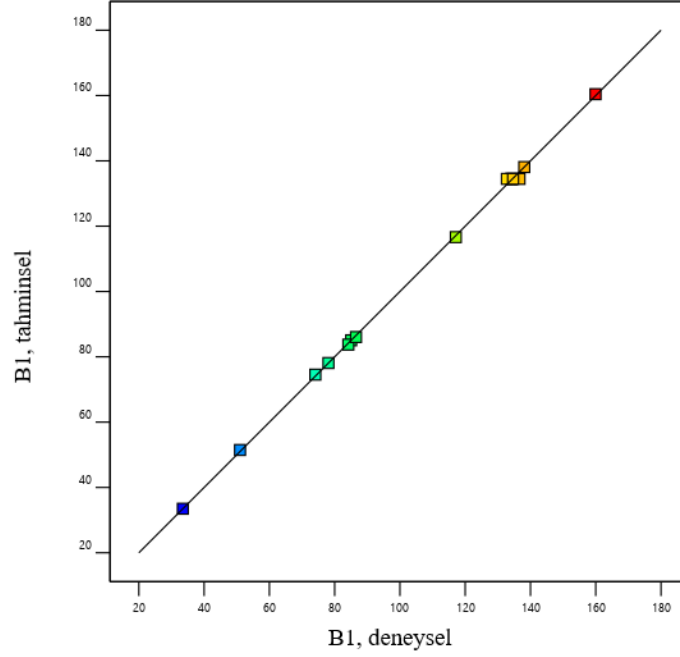


(b)

**Şekil 4.15** Sıcaklık ( $Y_2$ ) ve örnek miktarı / çözücü hacmi ( $Y_3$ ) değişimlerinin TFM ( $B_1$ ) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri ( $X_1=60$  dakika)

Şekil 4.16'da  $B_1$  yanıtının Eşitlik 4.4 ile hesaplanan tahminsel değerleri ile deneysel verilerin karşılaştırılması gösterilmiştir.  $R^2$  değerinin 0,9995 olması Eşitlik 4.4 ile elde edilen verilerin deneysel olarak elde edilen verilere oldukça yakın olduğunu göstermektedir.





**Şekil 4.16** Toplam fenolik madde miktarının (B1) deneysel sonuçları ile Eşitlik 4.4 ile hesaplanan tahminsel sonuçlarının karşılaştırılması ( $R^2 = 0,9995$ )

Ultrason destekli ekstraksiyon yönteminde ekstraksiyon süresi ( $Y_1$ ), ekstraksiyon sıcaklığı ( $Y_2$ ) ve örnek miktarı / çözücü hacminin ( $Y_3$ ) DPPH yöntemiyle tespit edilen toplam antioksidan kapasite (B2) üzerindeki etkisinin gösterildiği ikinci dereceden oluşturulan model denklem Eşitlik 4.5'te gösterilmiştir.

$$B2 = + 43,58 - 0,2033Y_2 + 21,52Y_3 - 0,6665(Y_1)^2 - 0,7132(Y_2)^2 - 0,3388(Y_3)^2 \quad (4.5)$$

B2 bağımlı değişkeni için regresyon katsayı değeri  $R^2 = 1,0000$  olarak tespit edilmiştir.  $R^2$  değerinin 1,0000'e eşit olması Eşitlik 4.5 kullanılarak hesaplanan ile deneysel olarak elde edilen B2 değerlerinin birbirine denk olduğunu göstermektedir. Modelleme için yapılan varyans analizi (ANOVA) sonuçları Çizelge 4.7'de gösterilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde model önemli ( $p < 0,05$ ) ve uyum eksikliği önemsiz ( $p > 0,05$ ) olarak tespit edilmiştir.

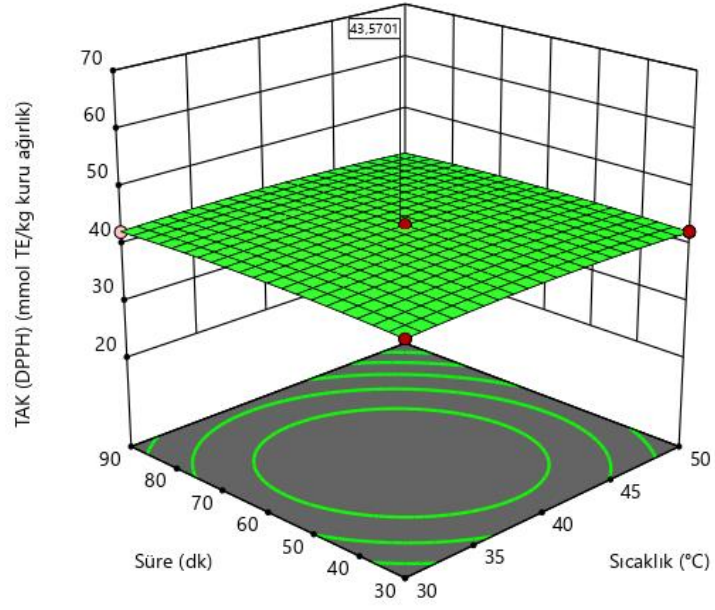
**Çizelge 4.7**  $Y_1$ ,  $Y_2$  ve  $Y_3$  bağımsız değişkenlerinin  $TAK_{DPPH}$  (B2) üzerindeki etkisinin ANOVA sonuçları

Kaynak	SD	KO	F değeri	p değeri
Model	9	359,48	29685,80	< 0,0001
$Y_1$	1	0,0683	5,64	0,0636
$Y_2$	1	0,1985	16,39	0,0098
$Y_3$	1	2222,59	1,835E+05	< 0,0001
$Y_1Y_2$	1	0,0768	6,34	0,0533
$Y_1Y_3$	1	0,0009	0,0771	0,7924
$Y_2Y_3$	1	0,0484	4,00	0,1020
$(Y_1)^2$	1	0,9112	75,25	0,0003
$(Y_2)^2$	1	1,59	130,91	<0,0001
$(Y_3)^2$	1	0,3600	29,73	0,0028
Uyumsuzluk	1	0,0323	4,56	0,0995
Salt hata	4	0,0071		
DKT	14			

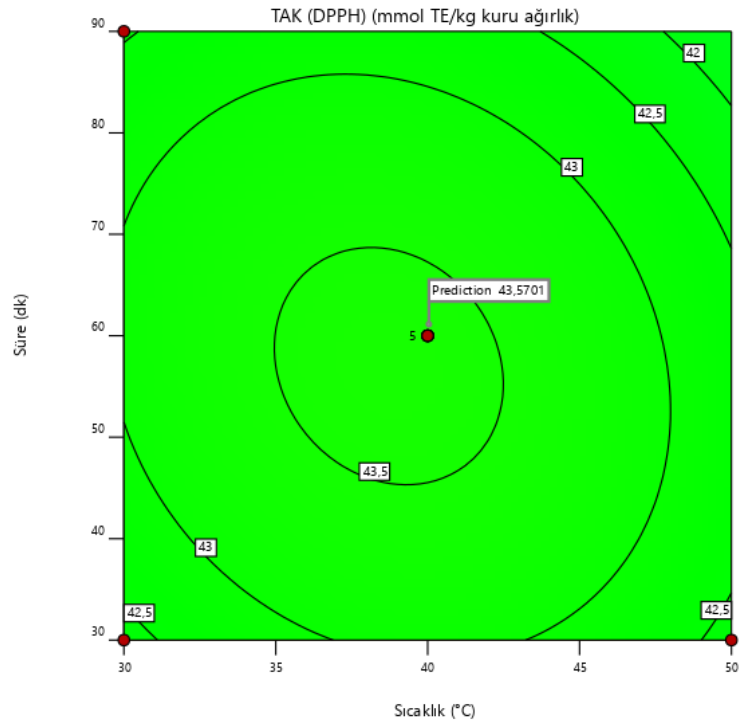
SD: Serbestlik Derecesi, KO: Kareler Ortalaması,

DKT: Düzeltilmiş Kareler Toplamı

$Y_1$  ve  $Y_2$  bağımsız değişkenlerinin ( $Y_3 = 1:20$  g/mL) B2 yanıt değeri üzerindeki değişimleri Şekil 4.17'de gösterilmiştir. Model denklemine göre  $Y_1Y_2$  korelasyonunun B2 yanıt değeri değişimine etkisi önemsiz düzeydedir ( $p>0,05$ ). Şekil 4.17'de 43,5701 mmol TE/kg kuru ağırlık yanıt değerinde  $Y_2$  40,4 °C ve  $Y_1$  61,13 dk'dır. Şekil 4.17.a ve Şekil 4.17.b grafiklerinden görüldüğü üzere B2 yanıtta,  $Y_1$  değişkeninin etkisi önemsiz ( $p>0,05$ ) iken  $Y_2$  değişkeninin etkisi önemli ( $p<0,05$ ) düzeydedir. 30-50 °C arasında değişen  $Y_2$  değerlerinde elde edilen tüm yanıtların ortalama B2 yanıt değerinde olacağı grafiklerden anlaşılmaktadır.



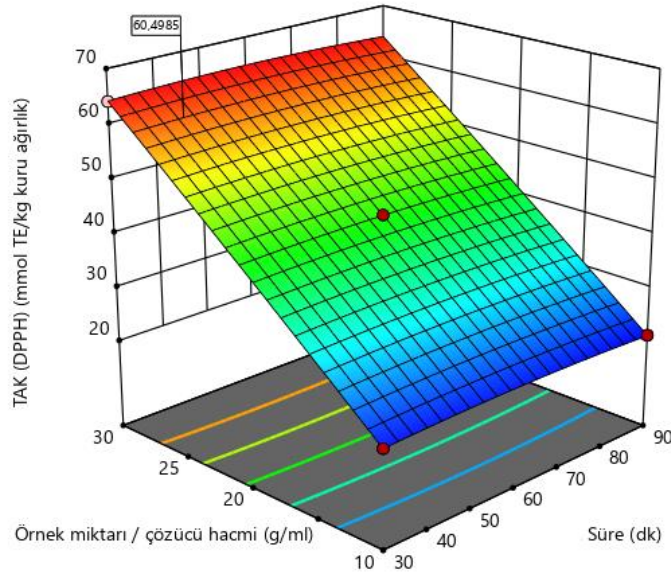
(a)



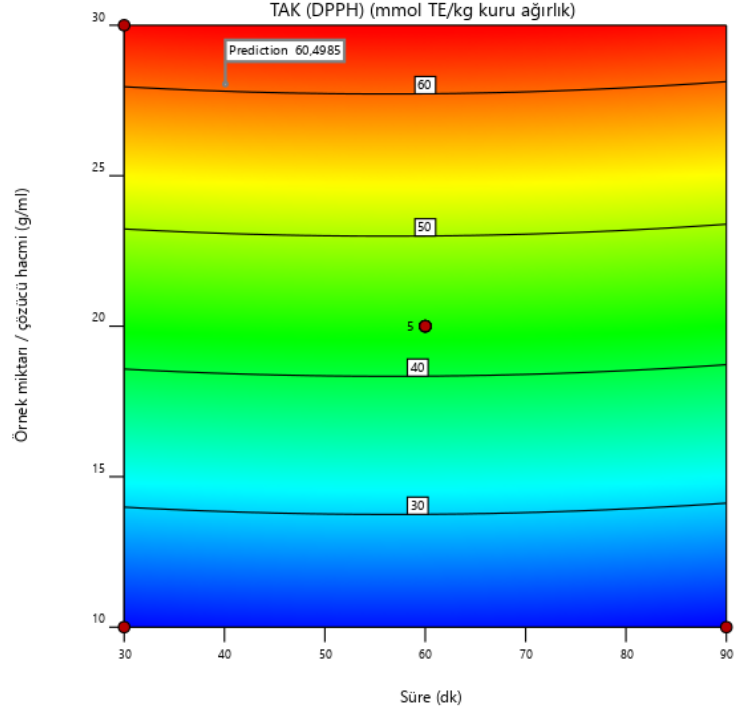
(b)

**Şekil 4.17** Ekstraksiyon süresi ( $Y_1$ ) ve ekstraksiyon sıcaklığı ( $Y_2$ ) değişimlerinin  $TAK_{DPPH}$  ( $B_2$ ) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri ( $Y_3=1:20$  g/mL)

Şekil 4.18’de  $Y_1$  ve  $Y_3$  bağımsız değişkenlerinin ( $Y_2=40^\circ\text{C}$ ) B2 yanıt değerine etkileri gösterilmiştir.  $Y_1Y_3$  korelasyonunun B2 yanıtına etkisi önemsiz düzeyde iken ( $p>0,05$ ),  $Y_3$  değişkenin etkisi önemli düzeyde bulunmuştur ( $p<0,0001$ ). Örnek miktarı/çözücü hacmi değerinde ekstraksiyon süresi arttıkça B2 yanıtının değerinde önemli değişiklik olmadığı görülmektedir. En yüksek B2 yanıtına yakın bir bölgede seçilen noktada B2 değeri 60,5 mmol TE/kg kuru ağırlık olarak görülmektedir. Bu noktada  $Y_1$  40 dk ve  $Y_3$  1:28 g/mL değerindedir.



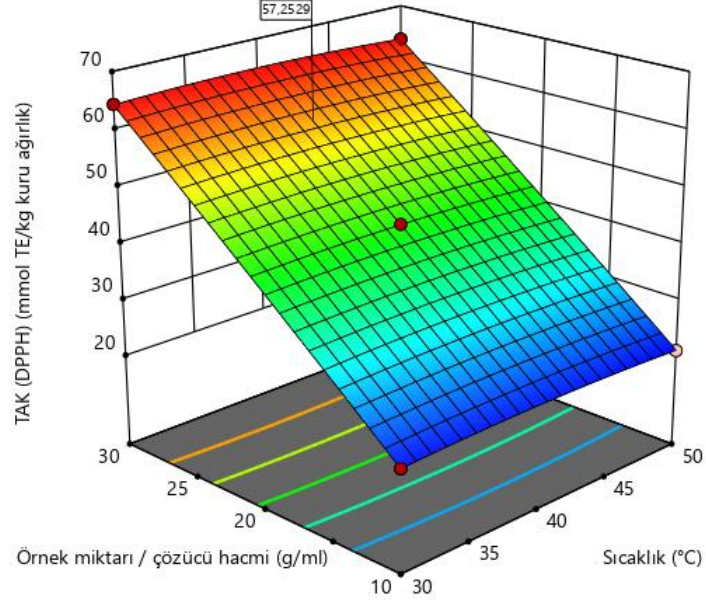
(a)



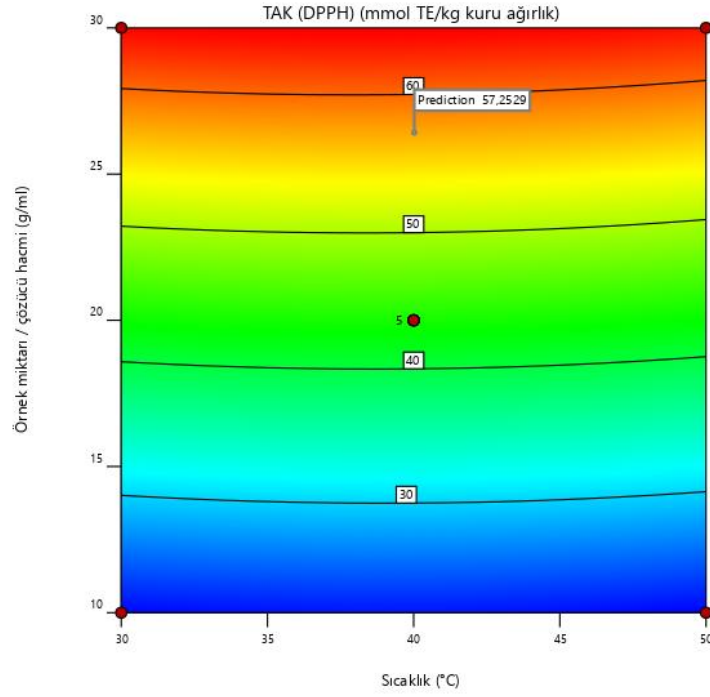
(b)

**Şekil 4.18** Süre ( $Y_1$ ) ve örnek miktarı / çözücü hacmi ( $Y_3$ ) değişimlerinin  $TAK_{DPPH}$  ( $B_2$ ) yanıt üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri ( $Y_2=40^\circ C$ )

Şekil 4.19'da  $Y_2$  ve  $Y_3$  bağımsız değişkenlerinin ( $Y_1=60$  dk)  $B_2$  yanıt değerine etkileri yanıt yüzey ve kontur grafikleriyle gösterilmiştir. Şekil 4.19'da Şekil 4.18'e benzer şekilde grafikler edilmiştir. Yapılan deney tasarımında örnek miktarı/çözücü hacminin  $B_2$  yanıt değerini belirleyici parametre olduğu grafiklerden ve model denkleminde görülmektedir.  $B_2$  yanıt değeri üzerine  $Y_2$  ( $p<0,05$ ) ve  $Y_3$  ( $p<0,0001$ ) değişkenleri önemli düzeyde etkili iken  $Y_2Y_3$  korelasyonunun etkisi önemsiz düzeydedir ( $p>0,05$ ). Şekil 4.19'da işaretlenen  $B_2$  yanıtı en yüksek yanıt değeri bölgesinde ve  $57,3$  mmol TE/kg kuru ağırlık iken  $Y_2$   $40^\circ C$  ve  $Y_3$  1:26 g/mL değerindedir. Aynı sıcaklık değerinde  $Y_3$  1:14 g/mL olduğunda  $B_2$  yanıtı  $30,1$  mmol TE/kg kuru ağırlık olarak mavi bölgede en düşük yanıt değeri bölgesinde elde edilmektedir.



(a)

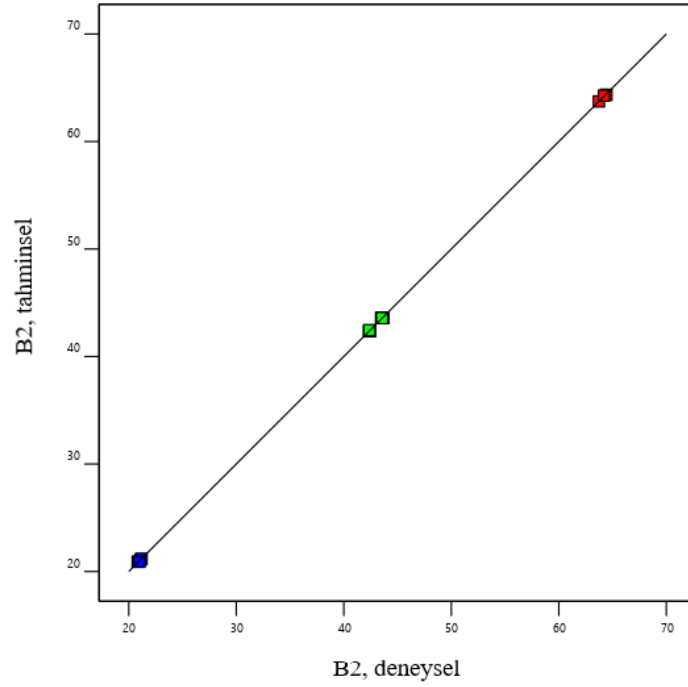


(b)

**Şekil 4.19** Sıcaklık ( $Y_2$ ) ve örnek miktarı / çözücü hacmi ( $Y_3$ ) değişimlerinin  $TAK_{DPPH}$  ( $B_2$ ) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri ( $Y_1 = 60$  dakika)

Şekil 4.20’de  $B_2$  yanıtının Eşitlik 4.5 ile hesaplanan tahminsel değerleri ile deneysel verilerin karşılaştırılması gösterilmiştir.  $R^2$  değerinin 1,0000 olması Eşitlik 4.5 ile elde edilen

verilerin deneysel olarak elde edilen veriler ile denk olduğunu göstermektedir. Bu durumun temel sebebi B2 yanıt değerini etkileyen değişkenin büyük oranda  $Y_3$  değişkeni olması,  $Y_1$  ve  $Y_2$  değerleri değişiminin B2 yanıtı üzerine etkisinin düşük olması olarak değerlendirilebilir. Ek olarak değişkenlerinin korelasyonlarının B2 yanıtı üzerinde etkili olmaması deneysel, tahminsel değişimleri etkileyen varyasyonların azalmasını sağlayarak  $R^2$  değerinin yüksek elde edilmesini sağlamaktadır.



**Şekil 4.20** DPPH yöntemiyle belirlenen toplam antioksidan kapasitesinin (B2) deneysel sonuçları ile Eşitlik 4.5 ile hesaplanan tahminsel sonuçlarının karşılaştırılması ( $R^2=1,0000$ )

Ultrason destekli ekstraksiyon yönteminde ekstraksiyon süresi ( $Y_1$ ), ekstraksiyon sıcaklığı ( $Y_2$ ) ve örnek miktarı / çözücü hacminin ( $Y_3$ ) CUPRAC yöntemiyle tespit edilen toplam antioksidan kapasite (B3) üzerindeki etkisinin gösterildiği ikinci dereceden oluşturulan model denklem Eşitlik 4.6'da gösterilmiştir.

$$B3 = + 3696,74 - 351,15Y_1 + 341,19Y_3 - 454,09Y_1Y_2 - 468,43Y_1Y_3 - 414,40(Y_1)^2 - 328,41(Y_2)^2 - 332,99(Y_3)^2 \quad (4.6)$$

B3 bağımlı değişkeni için regresyon katsayı değeri  $R^2 = 0,9534$  olarak tespit edilmiştir. Eşitlik 4.6 kullanılarak hesaplanan ile deneysel olarak elde edilen B3 değerlerinin birbirine

yakın olduğunu göstermektedir. Modelleme için yapılan varyans analizi (ANOVA) sonuçları Çizelge 4.8’de gösterilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde model önemli ( $p < 0,05$ ) ve uyum eksikliği önemsiz ( $p > 0,05$ ) olarak tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.8**  $Y_1$ ,  $Y_2$  ve  $Y_3$  bağımsız değişkenlerinin  $TAK_{CUPRAC}$  (B3) üzerindeki etkisinin ANOVA sonuçları

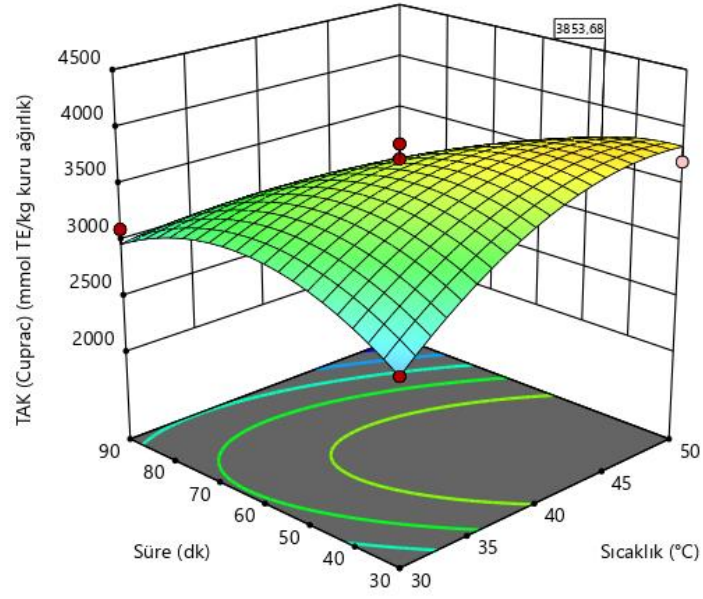
Kaynak	SD	KO	F değeri	p değeri
Model	9	4,320E+05	11,37	0,0077
$Y_1$	1	3,288E+05	8,66	0,0322
$Y_2$	1	31338,76	0,8251	0,4054
$Y_3$	1	5,588E+05	14,71	0,0122
$Y_1Y_2$	1	3,535E+05	9,31	0,0284
$Y_1Y_3$	1	3,762E+05	9,90	0,0255
$Y_2Y_3$	1	10746,43	0,2829	0,6176
$(Y_1)^2$	1	3,523E+05	9,27	0,0286
$(Y_2)^2$	1	3,362E+05	8,85	0,0310
$(Y_3)^2$	1	3,456E+05	9,10	0,0295
Uyumsuzluk	1	1,067E+05	5,13	0,0861
Salt hata	4	83172,72	20793,18	
DKT	14			

SD: Serbestlik Derecesi, KO: Kareler Ortalaması,

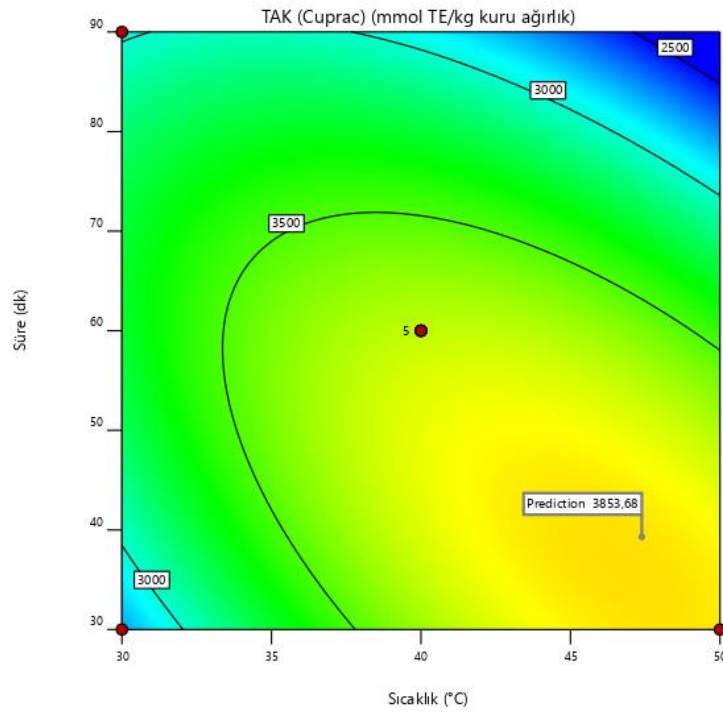
DKT: Düzeltilmiş Kareler Toplamı

B3 yanıtı üzerinde  $Y_1$  ve  $Y_2$  bağımsız değişkenlerin etkisi ( $Y_3=1:20$  g/mL) Şekil 4.21’de gösterilmiştir. B3 yanıtı üzerinde,  $Y_2$  değişkeninin etkisi önemsiz düzeyde iken ( $p > 0,05$ ),  $Y_1$  değişkeni ve  $Y_1Y_2$  korelasyonu önemli düzeyde ( $p < 0,05$ ) etkilidir. Sıcaklık ve sürenin en yüksek olduğu değerlerde B3 yanıtının en düşük seviyede olduğu görülmektedir. Aynı sıcaklık değerinde ekstraksiyon süresi arttıkça istisnalar olmakla birlikte B3 yanıtının azaldığı görülmektedir. Grafıklere göre  $Y_2$  45-50 °C ve  $Y_1$  30-40 dk değerlerinde B3 yanıt değerinin arttığı görülmektedir. İşaretli noktada  $Y_2$  47,4 °C ve  $Y_1$  39,3 dk koşullarında B3 yanıtı 3853,68 mmol TE/kg kuru ağırlıktır. Aynı sıcaklık değerinde ekstraksiyon süresi arttıkça B3 yanıt değeri önemli ölçüde azalmaktadır.





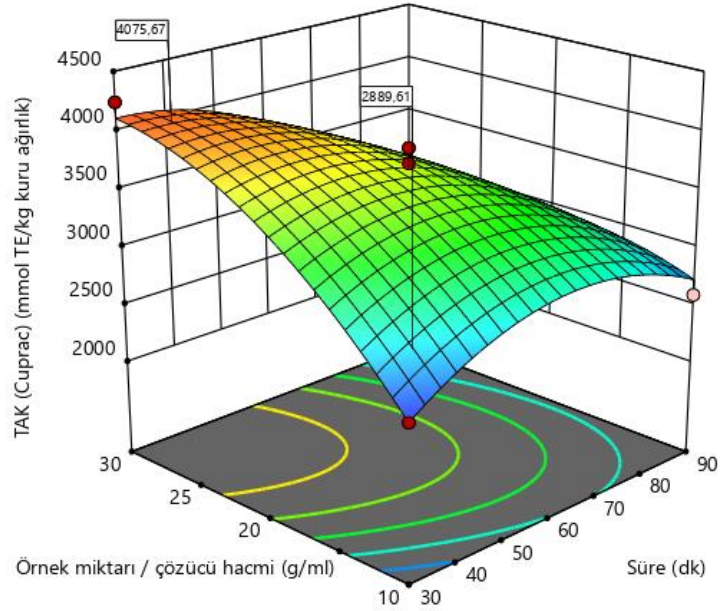
(a)



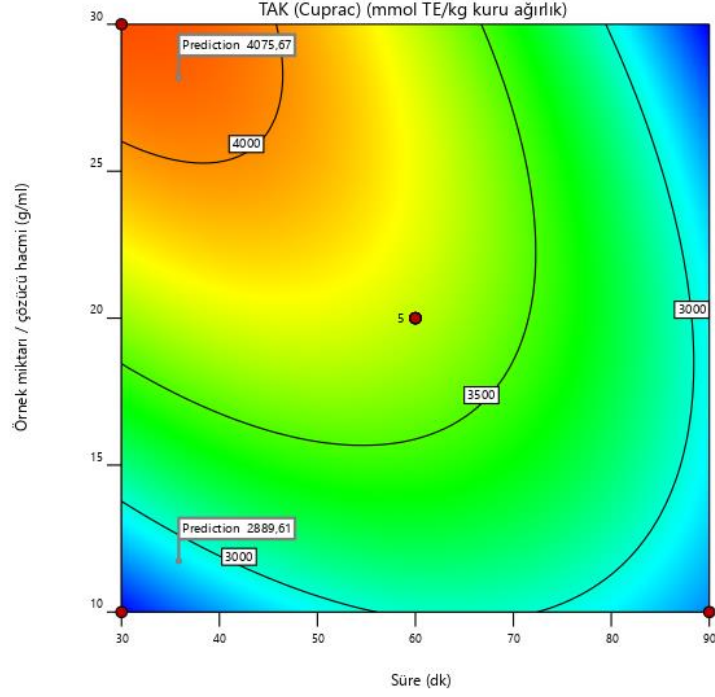
(b)

**Şekil 4.21** Ekstraksiyon süresi ( $Y_1$ ) ve ekstraksiyon sıcaklığı ( $Y_2$ ) değişimlerinin  $TAK_{CUPRAC}$  ( $B_3$ ) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri ( $Y_3=1:20$  g/mL)

Şekil 4.22’de B3 yanıtı üzerinde  $Y_1$  ve  $Y_3$  değişkenlerinin ( $Y_2=40^\circ\text{C}$ ) etkisi gösterilmiştir. Aynı  $Y_1$  ve farklı  $Y_3$  değerlerine sahip B3 yanıt değerleri Şekil 4.22’de işaretlenmiştir. 35,9 dk ekstraksiyon süresinde 1:11,7 ve 1:28,2 g/mL örnek miktarı/çözücü hacmi değerlerinde B3 yanıtları sırasıyla 2890 ve 4076 mmol TE/kg kuru ağırlıktır. Ekstraksiyon süresinin 85-90 dk arasında olduğu koşullar dışında diğer ekstraksiyon sürelerinde çözücü miktarı arttıkça B3 yanıt değerinin arttığı görülmektedir. Aynı çözücü miktarı değerinde ise 60. dakikadan sonra B3 yanıt değerlerinin genel olarak azaldığı görülmektedir. Grafiklerde görüldüğü ve model denkleminde belirtildiği üzere  $Y_1$  ve  $Y_3$  değişkenleri ile  $Y_1Y_3$  korelasyonunun B3 yanıtı üzerine etkisinin önemli düzeyde olduğu tespit edilmiştir.



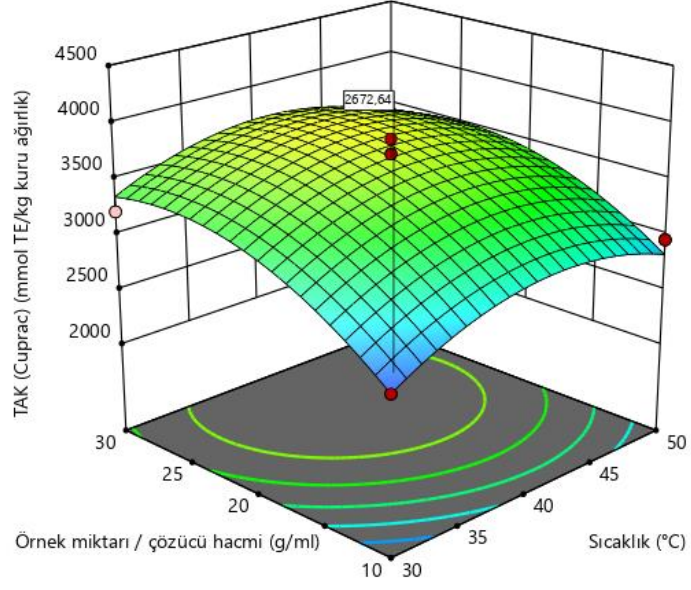
(a)



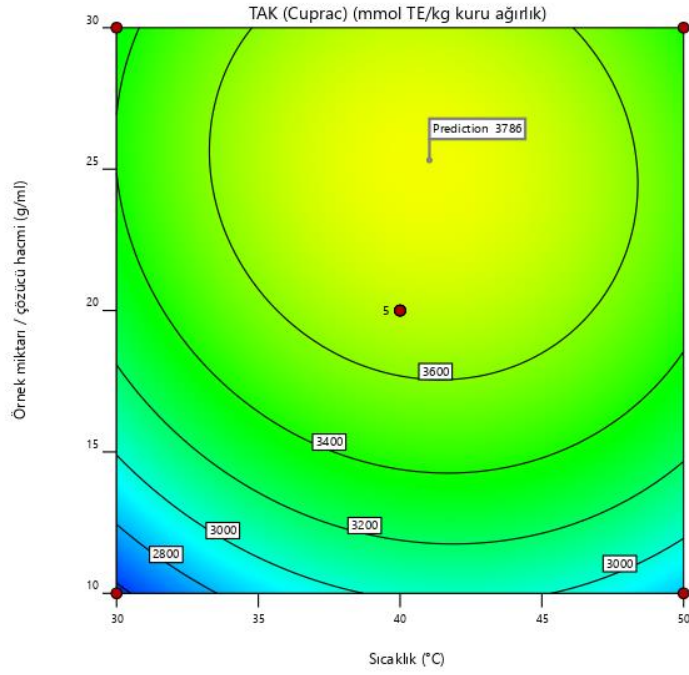
(b)

**Şekil 4.22** Süre ( $Y_1$ ) ve örnek miktarı / çözücü hacmi ( $Y_3$ ) değişimlerinin  $TAK_{CUPRAC}$  ( $B_3$ ) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri ( $Y_2=40^\circ C$ )

Şekil 4.23'te  $B_3$  yanıt değerine  $Y_2$  ve  $Y_3$  bağımsız değişkenlerinin etkisi ( $Y_1=60$  dk) gösterilmiştir. Model denkleme göre  $B_3$  yanıtı üzerinde  $Y_3$  değerinin etkisi önemli ( $p<0,05$ ) düzeyde iken  $Y_2$  değişkeni ve  $Y_2Y_3$  korelasyonu etkisi önemsiz ( $p>0,05$ ) düzeydedir. Aynı çözücü miktarı değerinde  $B_3$  yanıt değeri 30-40 °C arasında artarken, 40-50 °C arasında azalmaktadır. 30 °C ve 1:10 g/mL koşullarında en düşük, 41 °C ve 1:25 g/mL koşullarında ise en yüksek  $B_3$  yanıtı elde edilmiştir.  $B_3$  yanıt değerleri ise sırasıyla 2672 ve 3786 mmol TE/kg kuru ağırlıktır.



(a)

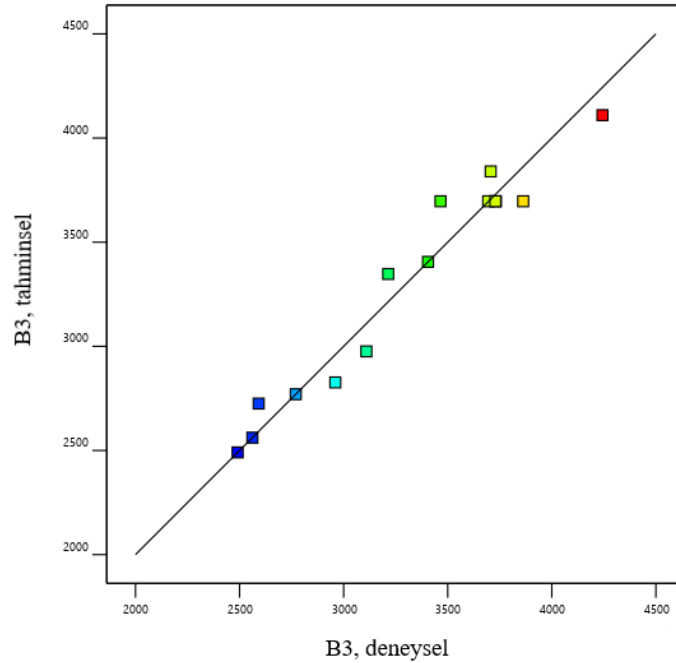


(b)

**Şekil 4.23** Sıcaklık ( $Y_2$ ) ve örnek miktarı / çözücü hacmi ( $Y_3$ ) değişimlerinin  $TAK_{CUPRAC}$  ( $B_3$ ) yanıtı üzerindeki değişimlerini gösteren yanıt yüzey (a) ve kontur (b) grafikleri ( $Y_1=60$  dakika)

Şekil 4.24'te  $B_3$  yanıtının Eşitlik 4.6 ile hesaplanan tahminsel değerleri ile deneysel verilerin karşılaştırılması gösterilmiştir.  $R^2$  değerinin 0,9534 olarak elde edilmiştir. Değerin 0,75'ten büyük ve 1,00'e yakın olması Eşitlik 4.6 ile elde edilen verilerin deneysel olarak elde edilen

veriler ile yakın olduğunu göstermektedir. CUPRAC metodu yapılış yöntemi nedeniyle ölçümsel veya deneysel yapılan hatalar sonuçları diğer metotlara göre daha fazla etkileyebilmektedir. Buna bağlı olarak daha fazla standart sapma olabilmesi nedeniyle tahminsel ve deneysel değerler arasında farklılıklar meydana gelebilmektedir.



**Şekil 4.24** CUPRAC yöntemiyle belirlenen toplam antioksidan kapasitesinin (B3) deneysel sonuçları ile Eşitlik 4.6 ile hesaplanan tahminsel sonuçlarının karşılaştırılması ( $R^2=0,9534$ )

### 4.3. Ekstraksiyon yöntemlerinin optimizasyonu

Çalışmada konvansiyonel ve ultrason destekli ekstraksiyon yöntemlerinde elde edilen yanıtlara göre optimum koşullar Design-Expert v12 programı kullanılarak belirlenmiştir. Konvansiyonel ekstraksiyon yönteminde bağımsız değişkenler; ekstraksiyon süresi ( $X_1$ ), sıcaklık ( $X_2$ ) ve örnek miktarı / çözücü oranı ( $X_3$ ) olarak, ultrason destekli ekstraksiyon yönteminde bağımsız değişkenler; ekstraksiyon süresi ( $Y_1$ ), sıcaklık ( $Y_2$ ) ve örnek miktarı / çözücü oranı ( $Y_3$ ) olarak belirlenmiştir. Çalışmada bağımlı değişkenler, konvansiyonel ekstraksiyon yönteminde, TFM ( $A_1$ ),  $TAK_{DPPH}$  ( $A_2$ ) ve  $TAK_{CUPRAC}$  ( $A_3$ ) olarak, ultrason destekli ekstraksiyon yönteminde TFM ( $B_1$ ),  $TAK_{DPPH}$  ( $B_2$ ) ve  $TAK_{CUPRAC}$  ( $B_3$ ) olarak belirlenmiştir. Optimizasyon çalışmasında istenilen hedefe göre bu hedefe ulaşma fonksiyonu kullanılarak ekstraksiyon parametrelerinde optimum koşullar ve yanıtların ön görülen değerleri elde edilmiştir. Program ile konvansiyonel ekstraksiyon yönteminde 82 adet, ultrason destekli ekstraksiyon yönteminde 20 adet farklı çözüm oluşturulmuştur.

Konvansiyonel ekstraksiyon yönteminde istenilen hedefe ulaşabilme oranı 0,951-1,000 arasında, ultrason destekli ekstraksiyon yönteminde ise istenilen hedefe ulaşabilme oranı 0,946-0,964 arasında değişmektedir. Optimizasyon çalışmaları konvansiyonel ekstraksiyon yönteminde 1,000 ve ultrason destekli ekstraksiyon yönteminde 0,964 orana sahip ekstraksiyon koşullarında deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon yöntemleri için optimum çalışma koşulları ve yanıt değerleri Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10'da gösterilmiştir.

UDE yönteminin maserasyon yöntemine göre çok daha kısa sürede gerçekleşmesi ve UDE yöntemi ile elde edilen nar kabuğu ekstraktının TFM ve TAK<sub>CUPRAC</sub> değerlerinin daha yüksek olması nedeniyle UDE yönteminin optimum değerlerinde elde edilen nar kabuğu ekstraktı örneği ileriki çalışmalarda kullanılmıştır.

**Çizelge 4.9** Konvansiyonel ve ultrason destekli ekstraksiyon yöntemlerinde yanıt yüzey yöntemine göre belirlenen optimum koşullar

Optimum koşullar	Konvansiyonel ekstraksiyon	Ultrason destekli ekstraksiyon
Süre	3 saat	30 dakika
Sıcaklık	43 °C	41 °C
Örnek miktarı/çözücü hacmi	1/30 g/mL	1/30 g/mL

**Çizelge 4.10** Konvansiyonel ve ultrason destekli ekstraksiyon yöntemlerinde optimum koşullarda elde edilen yanıtlar

Optimum koşullarda elde edilen yanıtlar	Konvansiyonel ekstraksiyon		Ultrason destekli ekstraksiyon	
	Deneysel	Tahminsel	Deneysel	Tahminsel
TFM (mg GAE/g kuru ağırlık)	120,9	122,7	159,3	160,4
TAK <sub>DPPH</sub> (mmol TE/kg kuru ağırlık)	60,6	63,1	64,3	64,3
TAK <sub>CUPRAC</sub> (mmol TE/kg kuru ağırlık)	1645,2	1651,7	4149,5	4110,11

Živković ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada UDE (ultrasonik banyo) ile nar kabuğu fenolik madde ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmada bağımsız parametreler süre (5, 20, 35, 50, 65 dakika), % etanol konsantrasyonu (10, 30, 50, 70, 90), katı (1) / çözücü oranı (10, 20, 30, 40, 50) ve ekstraksiyon sıcaklığı (20, 35, 50, 65, 80 °C) olarak belirlenmiştir. Optimum ekstraksiyon koşulları TFM ve yanıtların elagik asit, gallik asit, punikalın ve punikalagin içeriğine göre belirlenmiştir. Optimizasyon yanıt yüzey metodu kullanılarak yapılmıştır. Deney tasarımı, merkez noktada beş tekrarlı 30 rastgele çalışmadan oluşmuştur. UDE yöntemi kullanılarak elde edilen ekstraktlardaki TFM değerleri 118,01-190,94 mg GAE/g kuru ağırlık arasında raporlanmıştır. En yüksek TFM değerini elde edilmesi için uygulanan parametreler: 50 dk, %30 etanol, 1:40 g/mL, 65 °C; en düşük değer için ise 35 dk, %90 etanol, 1:30 g/mL, 50 °C olarak tespit edilmiştir [104].

Nar kabuğundan fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda UDE yönteminin farklı koşullarda gerçekleştirilmesinde farklı TFM değerleri elde edilmektedir. %60 ultrasonik güçte, 20 kHz ultrasonik frekansta ve 6,2 dakikada TFM 42,2 mg GAE/g [70], 60 °C ultrasonik sıcaklıkta ve 37 kHz frekansta TFM 43,20 mg GAE/g [105], 60 dk, 45 °C ultrasonik sıcaklık, %50 metanol çözücüsü ve 1:20 g/mL örnek/çözücü oranında TFM 72,21 mg GAE/g [106] olarak tespit edilmiştir.

Liu ve ark. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada UDE yöntemiyle ekstraksiyon gerçekleştirilmiş ve nar kabuğunun başlıca polifenolik bileşeni olan punikalagin

incelenmiştir. Nar kabuğundan en yüksek punikalagin içeriğini elde etmek için ekstraksiyon yöntemi YYM kullanılarak optimize edilmiştir. Çalışmada bağımsız değişkenler; etanol konsantrasyonu (%40-80), örnek miktarı/çözücü oranı (1:10-1:50 g/mL), ultrasonik güç (500-1050 W) ve ekstraksiyon süresi (10-50 dk) olarak, yanıt ise punikalagin verimi olarak belirlenmiştir. Punicalagin veriminin etanol konsantrasyonu %40'tan %50'ye çıktığında arttığı, etanol konsantrasyonu %50'yi aştığında azaldığı belirlenmiştir. Ultrasonik gücün punikalagin ekstraksiyon verimini önemli ölçüde etkilediği ve ultrasonik gücün 500'den 650 W'a çıkarılması ile punikalagin veriminin arttığı raporlanmıştır. En yüksek punikalagin verimi için en uygun ekstraksiyon süresi 20-40 dakika arasında, en uygun örnek miktarı/çözücü oranı 1:10–1:30 g/mL arasında olduğu belirtilmiştir [107].

Bu çalışmada en yüksek punikalagin verimi için belirtilen optimum koşullar ile çalışmamızda elde edilen sonuçlar uyumluluk göstermektedir. UDE yöntemlerinde ultrasonik probu yöntemin ultrasonik banyolu yöntemine göre daha verimli olduğu önceki kısımlarda belirtilmişti. Bu sebeple, çalışmada en yüksek punikalagin verimi için gerekli optimum çözücü yüzdesinin çalışmamızdaki optimum çözücü yüzdesinden daha düşük olduğu söylenebilir.

#### **4.4. Toplam fenolik madde miktarı (TFM)**

Çizelge 4.11'de propolis örneklerinin (3-6) TFM değerleri gösterilmiştir. Propolis örneklerinin TFM miktarı 40,78-88,02 mg GAE/mL arasında olduğu ve elde edilen TFM sonuçları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0,05$ ) olduğu tespit edilmiştir. En düşük TFM değeri %10'luk propolis ekstraktı (3) örneğinde, en yüksek TFM değeri %30'luk propolis ekstraktı (6) örneğinde tespit edilmiştir.

%10 ve %20 glikol (%70 v/v glikol), %20 ve %30 etanol (%70 v/v etanol) Anadolu propolisi ekstrakt örneklerinde yapılan bir çalışmada TFM değerleri sırasıyla 48,15; 55,96; 59,34 ve 79,76 mg GAE/mL olarak raporlamıştır [108]. %30 etanol (%70 v/v etanol) Anadolu propolisinin ratlarda in-vivo ve in-vitro anti-diyabetik etkisinin incelendiği bir çalışmada propolis örneğinin TFM değeri 102,30 mg GAE/mL olarak tespit edilmiştir [109]. Türkiye'de üretilmiş 20 farklı ticari propolis ekstrakt örneklerinde yapılan bir çalışmada TFM değerleri 0,25 mg GAE/mL - 77,68 mg GAE/mL arasında değiştiği raporlanmıştır [110]. Etanolik çözücü konsantrasyonları %20, %50 ve %80 olan Malezya propolislerinde



yapılan çalışmada TFM değerleri sırasıyla 1,456 mg GAE/mL, 3,851 mg GAE/mL ve 8,898 mg GAE/mL olarak tespit edilmiştir [111].

Çizelge 4.12’de karışımlarda kullanılan nar kabuğu (1,2) ve propolis ekstraktı (4,6) örnekleri ve bunların farklı oranlarda karışımlarının (7,12) TFM sonuçları verilmiştir. Çizelge 4.12 incelendiğinde nar kabuğu ekstraktlarının TFM değerleri NKE (1) için 8,44 f, NKEG (2) için 7,82 mg GAE/mL olarak tespit edilmiştir. Örnekler arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Burada NKEG (2) örneği, NKE (1) örneğinin etanol çözücüsü uzaklaştırıldıktan sonra liyofilizatörde kurutulup toz hale getirildikten sonra glikol ile seyreltilmesi ile elde edilmiştir. Bu işlemler ile NKEG (2) elde edilirken TFM değerinde önemli bir değişiklik olmadığı ( $p>0,05$ ) anlaşılmaktadır. Çizelge 4.12’de yer alan PR15 (4) ve PR30 (6) örneklerinin TFM değerleri sırasıyla 53,30 mg GAE/mL ve 88,02 mg GAE/mL’dir ve örnekler arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Propolis oranıyla beraber, fenolik bileşik miktarı da artış göstermiştir.

NKEG (2) ve PR15 (4) örneklerinin 1:1 (7), 1:2 (8) ve 2:1 (9) oranında (v/v) karışımlarının TFM değerleri sırasıyla, 10,79; 18,28 ve 13,13 mg GAE/mL olarak tespit edilmiştir. Değerler arasındaki fark anlamlı ( $p<0,05$ ) bulunmuştur. En yüksek değer 1:2 (8) karışımda elde edilirken en düşük değer 1:1 (7) karışımda elde edilmiştir. NKE (1) ve PR30 (6) örneklerinin 1:1 (10), 1:2 (11) ve 2:1 (12) oranında (v/v) karışımlarının TFM değerleri sırasıyla, 61,53; 52,41 ve  $27,46\pm 0,69$  mg GAE/mL olarak tespit edilmiş ve değerler arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ). En yüksek değer 1:1 (10), en düşük değer 2:1 (12) örneğinde elde edilmiştir.

Karışımlarda kullanılan örneklerin ve karışımların TFM değerleri karşılaştırıldığında PR15 (4) ve 1:2 NKE:PR30 (11) örnekleri arasındaki farkın önemli olmadığı ( $p>0,05$ ) görülmüştür.

#### **4.5. Toplam antioksidan kapasite**

DPPH ve CUPRAC metotlarıyla yapılan TAK analizlerinde sonuçlar arasında farklılıklar bulunmaktadır. Bu farklılıklar birçok etkiye bağlı olarak meydana gelmektedir. Ölçümün yapıldığı dalga boyu, gerekli reaksiyon süresi, reaksiyon koşullarının farklılığı sonuçların farklı çıkmasına neden olan etmenler arasında gösterilebilir [112, 113].

#### 4.5.1. CUPRAC metodu ile antioksidan kapasite tayini

CUPRAC metodu ile yapılan toplam antioksidan kapasite sonuçları propolis örnekleri için Çizelge 4.11’de, karışımlarda kullanılan örnekler ve karışımlar için Çizelge 4.13’te verilmiştir. Çizelge 4.11 incelendiğinde PR10 (3), PR15 (4), PR20 (5) ve PR30 (6) örneklerinin  $TAK_{CUPRAC}$  değerleri sırasıyla 122,11; 191,10; 220,00 ve 252,56 mg TE/mL olarak tespit edilmiştir. Değerler arasındaki fark anlamlı ( $p<0,05$ ) bulunmuştur. TFM değerlerinde olduğu gibi, en yüksek değer PR30 (6), en düşük değer PR10 (3) örneklerinde elde edilmiştir. Özkök ve ark. (2021) tarafından yapılan çalışmada %10, %15 propolis ekstrakt (%70 v/v glikol) ve %20, %30 propolis ekstrakt (%70 v/v etanol) örneklerinde elde edilen  $TAK_{CUPRAC}$  değerleri sırasıyla 116,90, 151,94, 165,16 ve 236,49 mg TE/mL olarak tespit edilmiştir [108]. Atayoglu ve ark. (2023) tarafından propolis ekstraksiyonu için etanole farklı bir alternatifin araştırıldığı çalışmada propolis-etanolik çözeltisi (%10) ve propolis-laktik asit çözeltisi (%10) incelenmiştir. Örneklerde elde edilen  $TAK_{CUPRAC}$  sonuçları sırasıyla 2.490 ve 2.640 mM TE/L olarak raporlanmıştır [114].

Çizelge 4.13 incelendiğinde; NKE (1) ve 2:1 NKEG:PR15 (8) arasında önemsiz ( $p>0,05$ ), 1:2 NKE:PR30 (11) ve 2:1 NKE:PR30 (12) arasında önemsiz ( $p>0,05$ ), NKE (1), 1:1 NKEG:PR15 (7), 1:2 NKEG:PR15 (8), 2:1 NKEG:PR15 (9) arasında önemsiz ( $p>0,05$ ) fark bulunmuştur. NKEG (2), PR15 (4), PR30 (6) ve 2:1 NKE:PR30 (12) örneklerinin tüm örnekler ile arasındaki fark anlamlı ( $p<0,05$ ) bulunmuştur.

Glikolik karışımların (7, 8, 9) oranları arasındaki fark ve (10) ile (11) etanolik karışımların arasındaki fark anlamsız ( $p>0,05$ ) bulunurken, (12) örneğinin diğer etanolik karışımlar arasındaki farklı anlamlı ( $p<0,05$ ) bulunmuştur. Glikolik ve etanolik karışımlar birbiri ile kıyaslandığında çözücülerin değişmesi ile oluşan fark anlamlı ( $p<0,05$ ) bulunmuştur.

#### 4.5.2. DPPH metodu ile antioksidan kapasite tayini

DPPH metodu ile yapılan toplam antioksidan kapasite sonuçları propolis örnekleri için Çizelge 4.11’de gösterilmiştir. (3), (4), (5) ve (6) örneklerinde elde edilen  $TAK_{DPPH} IC_{50}$  değerleri sırasıyla 0,54; 0,53; 0,51 ve 0,50 mg/mL olarak belirlenmiş ve değerler arasındaki fark anlamlı ( $p<0,05$ ) bulunmuştur.  $IC_{50}$  değeri DPPH radikalinin %50’sini süpürmesi için

gerekli antioksidan madde miktarını ifade ettiği için elde edilen değerin düşük olması daha yüksek antioksidan aktiviteyi ifade etmektedir.

Mārghitas ve ark. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, coğrafi bölgesi, hasat yılı ve metodu farklılık gösteren 13 adet propolis örneğinin antioksidan aktivitesi incelenmiştir. DPPH metodu kullanılarak yapılan antioksidan kapasite tayininde düşük %inhibisyon değerlerine sahip propolis örneklerinde serbest radikallerin %50'sini inhibe etmek için yüksek konsantrasyonda propolis çözeltilisine ihtiyaç duyulduğu tespit edilmiştir. Tüm örneklerde IC<sub>50</sub> değerlerinin 0,3 ila 5,6 mg/mL arasında değiştiği raporlanmıştır. Bazı propolis örneklerinde IC<sub>50</sub> değerlerinin çok düşük olup bu durumun yüksek antioksidan aktiviteye işaret ettiği bildirilmiştir [115].

Çizelge 4.13'te karışımlarda kullanılan örnekler ve karışımlar için TAK<sub>DPPH</sub> değerleri gösterilmiştir. NKE (1) ve NKEG (2) TAK<sub>DPPH</sub> değerleri sırasıyla 0,553 ve 0,548 mg/mL olarak tespit edilmiş ve değerler arasındaki fark önemsiz ( $p>0,05$ ) bulunmuştur. (4) ve (6) örneklerinin diğer tüm örnekler ile olan farkının anlamlı ( $p<0,05$ ) olduğu görülmektedir. Karışımların (7-12) TAK<sub>DPPH</sub> değerleri sırasıyla 0,439; 0,394; 0,483; 0,439; 0,404 ve 0,479 mg/mL olarak bulunmuştur. Karışımlar içerisinde en yüksek TAK<sub>DPPH</sub> 1:2 NKEG:PR15 (8), en düşük TAK<sub>DPPH</sub> 2:1 NKEG:PR15 (9) örneğinde tespit edilmiştir. Tüm karışımlarda TAK<sub>DPPH</sub>, nar kabuğu ekstraktı (1,2) ve propolis ekstraktı (4,6) örneklerinden anlamlı ( $p<0,05$ ) yüksek bulunmuştur.

Etanolik karışımların arasında önemsiz fark ( $p>0,05$ ) tespit edilmiştir. Glikolik karışımlarda (7) örneğinin (8) ve (9) örnekleri ile farkının önemsiz ( $p>0,05$ ), (8) örneğinin (9) örneği ile farkının önemli ( $p<0,05$ ) olduğu görülmektedir.

Polifenollerin ekstraksiyonu için genellikle kullanılan çözücüler metanol, su, kloroform, n-hekzan, etanol, propanol, etil asetat ve asetonur. Bu çözücüler polariteleri bakımından farklılık gösterir ve bu nedenle fitokimyasalların ekstraksiyonu üzerinde farklı etkilere sahiptir. Organik çözücüler kolayca karışabildiğinden, çeşitli çalışmalarda önerildiği gibi, amaç ekstraksiyon verimini artırmak olduğunda dikkate alınırlar. Bu çözücülerin ekstrakttaki kalıntıları nedeniyle ekstraktan ayrılması gerekebilir. Bu da enerji gerektiren ve zaman alan bir süreçtir. Bu sorunun çözülmesi amacıyla ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)

tarafından genel olarak kabul edilen (GRAS) kimyasallar olarak bilinen propolien glikol ve gliserin gibi polioller alternatif çözücüler olarak kullanılmaktadır [34, 116].

Myo ve Khat-udomkiri, (2022) tarafından yapılan çalışmada, propilen glikol ve etanol çözücüleri kullanarak kahve posasından UDE ve maserasyon yöntemleriyle fenolik bileşikler ekstrakte edilmiştir. Her iki ekstraksiyon metodunda da çözücü türünün toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasiteyi etkilediği gösterilmiştir. UDE yönteminde glikol ve etanol kullanılarak yapılan ekstraksiyonda TFM değerleri sırasıyla 9,29 ve 7,49 mg GAE/g, TAK değerleri sırasıyla 7,56 ve 6,59 mg TE/g olarak; maserasyon yönteminde ise glikol ve etanol kullanılarak yapılan ekstraksiyonda TFM değerleri sırasıyla 8,50 ve 7,19 mg GAE/g, TAK değerleri sırasıyla 5,63 ve 4,66 mg TE/g olarak tespit edilmiştir. Her iki ekstraksiyon yönteminde de çözücü olarak glikol kullanılması TFM ve TAK değerlerini önemli düzeyde artırmıştır ( $p < 0,05$ ) [116].

**Çizelge 4.11** Propolis örneklerinin başlangıç ve in-vitro sindirim sonuçları

No	TFM mg GAE/mL			TAK <sub>DPPH</sub> mg/mL			TAK <sub>CUPRAC</sub> mg TE/mL		
	Başlangıç*	Mide*	Bağırsak*	Başlangıç*	Mide*	Bağırsak*	Başlangıç*	Mide*	Bağırsak*
3	40,78±0,34 <sup>d</sup>	5,42±0,37 <sup>c</sup>	5,85±0,16 <sup>d</sup>	0,54±0,00 <sup>a</sup>	1,36±0,00 <sup>a</sup>	0,88±0,01 <sup>a</sup>	122,11±0,45 <sup>d</sup>	16,41±1,16 <sup>b</sup>	13,42±1,10 <sup>c</sup>
4	53,30±0,67 <sup>c</sup>	4,26±0,11 <sup>c</sup>	15,04±0,40 <sup>c</sup>	0,53±0,00 <sup>b</sup>	1,26±0,02 <sup>c</sup>	0,79±0,04 <sup>b</sup>	191,10±0,82 <sup>c</sup>	12,70±0,91 <sup>c</sup>	45,28±1,91 <sup>a</sup>
5	74,76±0,94 <sup>b</sup>	19,85±0,19 <sup>a</sup>	18,76±0,32 <sup>b</sup>	0,51±0,00 <sup>c</sup>	1,33±0,00 <sup>b</sup>	0,76±0,02 <sup>b</sup>	220,00±0,56 <sup>b</sup>	17,48±1,05 <sup>b</sup>	35,65±1,40 <sup>b</sup>
6	88,02±0,66 <sup>a</sup>	17,43±0,33 <sup>b</sup>	23,14±0,37 <sup>a</sup>	0,50±0,00 <sup>d</sup>	1,26±0,00 <sup>c</sup>	0,81±0,00 <sup>ab</sup>	252,56±0,90 <sup>a</sup>	24,59±0,88 <sup>a</sup>	31,69±1,07 <sup>b</sup>

\*Veriler üç bağımsız örneğin ortalama değerleri±standart sapmasını temsil etmektedir. Sütunlardaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları temsil etmektedir (p<0,05)

**Çizelge 4.12** Örneklerin başlangıç ve in-vitro sindirimi sırasında elde edilen TFM (mg GAE/mL) değerleri

<b>Örnek no.</b>	<b>Başlangıç*</b>	<b>Mide*</b>	<b>Bağırsak*</b>
<b>1</b>	8,44±0,34 <sup>h</sup>	8,68±0,36 <sup>d</sup>	14,78±0,33 <sup>d</sup>
<b>2</b>	7,82±0,02 <sup>h</sup>	5,20±0,15 <sup>f</sup>	6,41±0,12 <sup>e</sup>
<b>4</b>	53,30±0,67 <sup>c</sup>	4,26±0,11 <sup>g</sup>	15,04±0,40 <sup>d</sup>
<b>6</b>	88,02±0,66 <sup>a</sup>	17,43±0,33 <sup>c</sup>	23,14±0,37 <sup>c</sup>
<b>7</b>	10,79±0,53 <sup>g</sup>	9,47±0,22 <sup>d</sup>	6,02±0,21 <sup>e</sup>
<b>8</b>	18,28±0,68 <sup>e</sup>	8,38±0,11 <sup>d</sup>	3,42±0,16 <sup>f</sup>
<b>9</b>	13,13±0,24 <sup>f</sup>	8,38±0,09 <sup>d</sup>	5,77±0,27 <sup>e</sup>
<b>10</b>	61,53±0,60 <sup>b</sup>	52,77±0,55 <sup>a</sup>	41,86±0,81 <sup>a</sup>
<b>11</b>	52,41±0,44 <sup>c</sup>	21,72±0,55 <sup>b</sup>	34,50±0,80 <sup>b</sup>
<b>12</b>	27,46±0,69 <sup>d</sup>	7,00±0,26 <sup>e</sup>	24,61±0,85 <sup>c</sup>

\*Veriler üç bağımsız örneğin ortalama değerleri±standart sapmasını temsil etmektedir. Sütunlardaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları temsil etmektedir (p<0,05)

**Çizelge 4.13** Örneklerin başlangıç ve in-vitro sindirimi sonucunda DPPH ve CUPRAC yöntemleriyle elde edilen TAK değerleri

No	DPPH			CUPRAC		
	IC <sub>50</sub> , mg/mL			mg TE/mL		
	Başlangıç*	Mide*	Bağırsak*	Başlangıç*	Mide*	Bağırsak*
<b>1</b>	0,553±0,002 <sup>a</sup>	1,345±0,002 <sup>d</sup>	0,823±0,018 <sup>b</sup>	58,337±1,611 <sup>eg</sup>	82,203±0,535 <sup>a</sup>	92,710±3,986 <sup>b</sup>
<b>2</b>	0,548±0,001 <sup>a</sup>	1,376±0,006 <sup>abc</sup>	0,837±0,003 <sup>b</sup>	11,103±0,157 <sup>h</sup>	4,647±0,090 <sup>i</sup>	13,200±0,439 <sup>h</sup>
<b>4</b>	0,510±0,002 <sup>c</sup>	1,252±0,015 <sup>e</sup>	0,788±0,038 <sup>b</sup>	191,103±0,816 <sup>b</sup>	12,700±0,906 <sup>h</sup>	45,280±1,905 <sup>de</sup>
<b>6</b>	0,538±0,002 <sup>b</sup>	1,257±0,002 <sup>e</sup>	0,811±0,003 <sup>b</sup>	252,550±0,899 <sup>a</sup>	24,587±0,881 <sup>ef</sup>	31,693±1,069 <sup>g</sup>
<b>7</b>	0,439±0,009 <sup>efh</sup>	1,373±0,009 <sup>bc</sup>	1,091±0,009 <sup>a</sup>	23,793±1,707 <sup>fg</sup>	20,917±0,404 <sup>eg</sup>	41,827±1,986 <sup>def</sup>
<b>8</b>	0,394±0,010 <sup>fg</sup>	1,400±0,008 <sup>ac</sup>	0,613±0,043 <sup>de</sup>	40,897±3,862 <sup>efg</sup>	23,067±1,824 <sup>efg</sup>	38,567±1,796 <sup>ef</sup>
<b>9</b>	0,483±0,005 <sup>dh</sup>	1,396±0,015 <sup>abc</sup>	0,686±0,030 <sup>cd</sup>	33,117±0,708 <sup>g</sup>	22,893±1,063 <sup>efg</sup>	44,423±0,202 <sup>de</sup>
<b>10</b>	0,439±0,009 <sup>efh</sup>	1,373±0,008 <sup>bc</sup>	1,091±0,009 <sup>ad</sup>	119,683±3,831 <sup>c</sup>	51,380±1,050 <sup>b</sup>	77,830±2,824 <sup>c</sup>
<b>11</b>	0,404±0,004 <sup>efg</sup>	1,400±0,008 <sup>ac</sup>	0,613±0,042 <sup>de</sup>	130,727±6,556 <sup>c</sup>	43,690±0,926 <sup>c</sup>	104,627±2,458 <sup>a</sup>
<b>12</b>	0,479±0,002 <sup>deh</sup>	1,395±0,014 <sup>abc</sup>	0,674±0,021 <sup>cde</sup>	68,113±1,469 <sup>d</sup>	33,440±0,876 <sup>d</sup>	43,573±2,021 <sup>def</sup>

\*Veriler üç bağımsız örneğin ortalama değerleri±standart sapmasını temsil etmektedir. Sütunlardaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları temsil etmektedir (p<0,05)

## 4.6. In-vitro sindirim

### 4.6.1. Nar kabuğu ekstraktlarının biyoerişilebilirliği

Nar kabuğu ekstrakt örneklerinin (1,2) Mide ve bağırsak fazı sonrası TFM ve TAK değerleri Çizelge 4.12 ve Çizelge 4.13'te gösterilmiştir. TFM değerleri incelendiğinde (1) örneği için mide fazında 8,68 mg GAE/mL, bağırsak fazında 14,78 mg GAE/mL olarak bulunmuştur. (2) örneği için ise mide ve bağırsak fazı TFM değerleri sırasıyla 5,20 ve 6,41 mg GAE/mL'dir.

Mide ve bağırsak fazları için TAK<sub>DPPH</sub> (1) örneğinde; 1,345 ve 0,823 mg/mL, (2) örneğinde; 1,376 ve 0,837 mg/mL olarak, TAK<sub>CUPRAC</sub> (1) örneğinde; 82,203 ve 92,710 mg TE/mL olarak, (2) örneğinde; 4,647 ve 13,200 mg TE/mL olarak tespit edilmiştir. İki örnek arasındaki mide ve bağırsak fazlarında elde edilen TFM ve TAK<sub>CUPRAC</sub> değerleri farkı önemli ( $p < 0,05$ ), TAK<sub>DPPH</sub> değerleri farkı mide fazında önemli ( $p < 0,05$ ), bağırsak fazında önemsiz ( $p > 0,05$ ) bulunmuştur.

Bir çalışmada, 1 g nar kabuğu 10 mL farklı çözücülerle (distile su, %50 etanol ve %100 etanol) 1 saat boyunca sonikatörde ekstrakte edilmiştir. Ekstrakt örneklerinde su, %50 etanol ve etanol çözücülerinde elde edilen TFM değerleri sırasıyla, 2.658,00; 2.992,93 ve 2.458,03 mg GAE/100 mL olarak raporlanmıştır. %50 etanol ekstraktlarında su ve etanol ekstraktlarına göre önemli ölçüde ( $p < 0,05$ ) daha yüksek TFM değeri tespit edilmiştir. Mide fazında sırasıyla 2.693,58; 3.185,00 ve 2.605,41 mg GAE/100 mL, bağırsak fazında ise sırasıyla 2.264,42; 2.935,46 ve 2.242,77 mg GAE/100 mL'dir. Bağırsak fazında elde edilen TFM değerleri çözücülerden bağımsız olarak mide fazında elde edilen TFM değerlerine göre anlamlı düzeyde düşük ( $p < 0,05$ ) bulunmuştur. Çalışmada bu durum gıda matrisi özelliklerinin ve in vitro sindirim koşullarının farkıyla ilişkilendirilmiştir [117].

### 4.6.2. Propolis ekstraktlarının biyoerişilebilirliği

Propolis örnekleri (3-6) in-vitro gastrointestinal sindirim sonuçları Çizelge 4.11'de gösterilmiştir. Mide fazı için örneklerin TFM değerleri sırasıyla, 5,42; 4,26; 19,85 ve 17,43 mg GAE/mL, Bağırsak fazı için ise sırasıyla, 5,85; 15,04; 18,76 ve 23,14 mg GAE/mL'dir. Mide fazı TFM değeri farkı (3) ve (4) örnekleri arasında önemsiz ( $p > 0,05$ ) bulunmuştur.



Mide fazında (5) örneğinin TFM değeri diğer örneklerden önemli düzeyde ( $p<0,05$ ) yüksek bulunmuştur. Bağırsak fazında örnekler arasında TFM değerleri arasındaki fark anlamlı ( $p<0,05$ ) bulunmuştur. En yüksek değer PR30 (6), en düşük değer PR10 (3) örneğinde belirlenmiştir.

Bağırsak fazından sonra propolis örneklerinde yapılan TFM analizi sonucunda, bu bileşiklerin ortalama biyoerişilebilirliği %23,5 olarak bulunmuştur. Bağırsak fazından sonra antioksidan bileşenlerin biyoerişilebilirlik oranı %15,9 olarak bulunmuştur.

Propolis örneklerinin (3-6) in-vitro sindirimi sonucu elde TAK değerleri incelendiğinde; Mide fazında  $TAK_{DPPH}$  sonuçları sırasıyla 1,36; 1,26; 1,33 ve 1,26 mg/mL'dir. (4) ve (6) örnekleri arasında fark önemsiz ( $p>0,05$ ) ve (4) ve (6) örneklerinin diğer örneklere göre antioksidan kapasiteleri anlamlı düzeyde yüksek ( $p<0,05$ ) bulunmuştur. Bağırsak fazında  $TAK_{DPPH}$  değerleri sırasıyla 0,88; 0,79; 0,76 ve 0,81 mg/mL'dir. (3) örneğinin (4) ve (5) örnekleri ile farkı önemli ( $p<0,05$ ), (6) örneği ile önemsiz ( $p>0,05$ ) bulunmuştur.  $TAK_{DPPH}$  bağırsak fazında en yüksek antioksidan kapasiteye sahip örneğin PR20 (5) olduğu ancak PR15 (4) ve PR30 (6) örneklerinden önemli düzeyde yüksek olmadığı ( $p>0,05$ ) tespit edilmiştir.

Propolis örneklerinin (3-6) mide fazında  $TAK_{CUPRAC}$  sonuçları sırasıyla, 16,41; 12,70; 17,48 ve 24,59 mg TE/mL'dir. (3) ve (5) örnekleri arasında fark önemsiz düzeyde ( $p>0,05$ ), (6) örneği antioksidan kapasitesi diğer örneklerden önemli düzeyde yüksek ( $p<0,05$ ) bulunmuştur. Bağırsak fazında  $TAK_{CUPRAC}$  sonuçları sırasıyla, 13,42; 45,28; 35,65 ve 31,69 mg TE/mL'dir. (4) örneği antioksidan kapasitesi diğer örneklere göre anlamlı düzeyde ( $p<0,05$ ) yüksek bulunmuştur. En düşük TAK (3) örneğinde tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). Bağırsak fazında (5) ve (6) örneklerindeki fark önemsiz düzeydedir ( $p>0,05$ ).

Türkiye'nin 11 farklı lokasyonundan tedarik edilen propolis örneklerinde in-vitro sindirim çalışması gerçekleştirilmiştir. Örnekler toz hale getirildikten sonra 1 g propolise 15 mL (%70 etanol) eklenerek 24 saat boyunca oda sıcaklığında sürekli karıştırarak ekstraksiyon işlemi yapılmıştır. Örneklerde toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı ve toplam antioksidan kapasite belirlenmiştir. Toplam antioksidan kapasite DPPH ve CUPRAC yöntemleri ile tayin edilmiştir. Daha sonra örneklerde simüle in-vitro sindirim uygulaması yapılmıştır. İn-vitro biyoerişilebilirlik sonuçları incelendiğinde bağırsak fazından sonra

fenolik bileşiklerin seviyeleri analizi sonucunda, bu bileşiklerin ortalama biyoerişilebilirliği %13,1 olarak bulunmuştur. Antioksidan bileşiklerin biyoerişilebilirliği ise %22,6 olmuştur [118]. Atayoglu ve ark. (2023) tarafından yapılan çalışmada, propolis-çözücü örnekleri %70 etanol veya %80 L-laktik asit kullanılarak %10, %20, %30 ve %40 (g/g) oranlarında hazırlanmıştır. Örnekler 30 dakika boyunca homojenizatör kullanılarak homojenize edilmiş ve propolis örnekleri 15 gün boyunca karanlıkta oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra, hazırlanan çözeltiler Whatman No. 4 filtre kağıdı kullanılarak yerçekimi filtrasyonu ile süzölmüştür. Tüm örneklerin TFM değerleri 17,3 g GAE/L ve 136,2 g GAE/L arasında değiştiği raporlanmıştır. Etanolik ve laktik asit ekstraktları için başlangıç ekstraktlarından mide ve bağırsak fazları aşamalarında önemli bir düşüş olduğu belirlenmiş ve bağırsak fazında etanolik ve laktik asit ekstraktları TFM değerleri için biyoerişilebilirlik oranları sırasıyla, %9,3 ve %3,3 olarak raporlanmıştır. DPPH ve CUPRAC metotlarıyla yapılan TAK analizlerinde, propolis konsantrasyonu arttıkça antioksidan aktivitenin de arttığı gözlemlenmiştir. Aynı konsantrasyonda farklı çözücülerle hazırlanan propolis örneklerinde, %10'luk propolis-laktik asit çözeltisinin etanol ile hazırlanana kıyasla istatistiksel olarak benzer düzeyde antioksidan kapasiteye sahip olduğu belirtilmiştir. Bağırsak fazından sonra DPPH metodunda etanolik ve laktik asit ekstraktları için antioksidan bileşenlerin biyoerişilebilirlik oranları sırasıyla %53,2 ve %109,3; CUPRAC metodunda ise %83,5 ve %105,7 olarak tespit edilmiştir. Laktik asit bazlı çözeltilerin pH değerlerinin çok düşük olması nedeniyle, mide ve bağırsak aşamalarının pH seviyelerini taklit etmek için ön denemeler yapılmıştır. Bu ön denemeler sonucunda laktik asit bazlı çözeltilerin sindirimden önce %50 oranında seyreltildiğinde daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir [114].

#### **4.6.3. Ekstrakt karışımlarının biyoerişilebilirliği**

Karşım örneklerinin (7-12) in-vitro gastrointestinal sindirim TFM değerleri Çizelge 4.12'de TAK değerleri ise Çizelge 4.13'te gösterilmiştir. Glikolik karışımların (7-9) mide fazında TFM değerleri sırasıyla, 9,47; 8,38 ve 8,38±0,09 mg GAE/mL'dir. Glikolik karışımların mide fazında TFM değerleri arasındaki fark önemsiz düzeydedir ( $p>0,05$ ).

Bağırsak fazında TFM değerleri ise sırasıyla, 6,02; 3,42 ve 5,77 mg GAE/mL'dir. (7) ve (9) örnekleri farkı önemsiz ( $p>0,05$ ) iken (8) değeri diğer glikolik karışımlara göre önemli düzeyde ( $p<0,05$ ) düşüktür.

(2) ve (4) örneklerinin farklı oranlarda (1:1, 1:2, 2:1) karışımlarından elde edilen (7), (8) ve (9) örneklerinin mide fazında, karışımları oluşturan örnekler ile kıyaslandığında karışımların, (2) ve (4) örneklerinden anlamlı düzeyde ( $p<0,05$ ) yüksek TFM'ye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bağırsak fazında (8) örneği anlamlı düzeyde ( $p<0,05$ ) en düşük, (4) örneği anlamlı düzeyde ( $p<0,05$ ) en yüksek TFM miktarına sahiptir. (2), (7) ve (9) örnekleri arasındaki TFM miktarı farkı ise önemsiz ( $p>0,05$ ) düzeydedir.

Etanolik karışımlarda (10-12) mide fazında TFM değerleri sırasıyla 52,77; 21,72 ve 7,00 mg GAE/mL'dir ( $p<0,05$ ). Mide fazında en yüksek değer (10) örneğinde iken en düşük (12) örneğindedir. Bağırsak fazında TFM değerleri sırasıyla 41,86; 34,50 ve 24,61 mg GAE/mL'dir ( $p<0,05$ ). Bağırsak fazında TFM en yüksek (10) ve en düşük (12) örneğinde belirlenmiştir.

Etanolik karışımlar (10-12), (1) ve (6) örneklerinin farklı oranlarda karışımından (1:1, 1:2, 2:1) elde edilmiştir. Karışımlar ve karışımları oluşturan ekstrakt örnekleri karşılaştırıldığında; mide fazı için (10) ve (11) örneklerinin karışımı oluşturan örneklerden daha yüksek ( $p<0,05$ ) TFM değerine sahip olduğu, (12) örneğinin ise daha düşük ( $p<0,05$ ) TFM'ye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bağırsak fazı için (10) ve (11) örneklerinin (1) ve (6) örneklerinden daha yüksek ( $p<0,05$ ) TFM'ye sahip olduğu, (12) örneğinin (1) örneğinden önemli düzeyde ( $p<0,05$ ), (6) örneğinden önemsiz ( $p>0,05$ ) düzeyde farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Bağırsak fazında etanolik karışımların glikolik karışımlardan önemli ölçüde daha yüksek TFM'ye sahip olduğu görülmektedir ( $p<0,05$ ).

Mide fazında  $TAK_{DPPH}$  değerleri glikolik karışımlarda (7-9) sırasıyla 1,373; 1,400; 1,396 mg/mL ve etanolik karışımlarda (10-12) sırasıyla 1,373; 1,400; 1,395 mg/mL'dir. Mide fazında  $TAK_{DPPH}$  değerlerinde tüm karışımlarda (7-12) değerler arasındaki farklar önemsizdir ( $p>0,05$ ). (2) ve (4) örneklerinin karışımlarıyla elde edilen glikolik örneklerin ve (1) ve (6) örneklerinin karışımıyla elde edilen etanolik örneklerin tamamında mide fazında antioksidan kapasitenin azaldığı ( $p<0,05$ ) tespit edilmiştir.

Bağırsak fazında  $TAK_{DPPH}$  değerleri glikolik karışımlarda (7-9) sırasıyla 1,091; 0,613; 0,686 mg/mL, etanolik karışımlarda (10-12) sırasıyla 1,091; 0,613; 0,674 mg/mL'dir. Bağırsak fazında glikolik karışımlarda (8) ve (9) örnekleri arasındaki fark önemsizken ( $p>0,05$ ) bu örnekler (7) örneğinden önemli düzeyde ( $p<0,05$ ) daha yüksek antioksidan kapasiteye

sahiptir. Etanolik karışımlarda karışımlar arasında anlamlı fark bulunamamıştır ( $p>0,05$ ). Glikolik ve etanolik karışımlar arasında, (7) örneği önemli ölçüde ( $p<0,05$ ) diğer tüm karışımlara göre daha düşük antioksidan kapasiteye sahiptir. Diğer karışım örnekleri (8-12) arasında ise önemli düzeyde farklılık bulunamamıştır ( $p>0,05$ ).

Mide fazında  $TAK_{CUPRAC}$  değerleri tüm karışımlarda (7-12) sırasıyla 20,917; 23,067; 22,893; 51,380; 43,690 ve 33,440 mg TE/mL'dir. Değerler glikolik karışımlarda anlamlı farklılık göstermezken ( $p>0,05$ ), etanolik karışımlarda anlamlı farklılık göstermiştir ( $p<0,05$ ). Etanolik karışımlarda en yüksek antioksidan kapasite (10) örneğinde  $51,380\pm 1,050$  mg TE/mL olarak tespit edilmiştir. Mide fazında etanolik karışımların toplam antioksidan kapasiteleri glikolik karışımlardan önemli düzeyde yüksektir ( $p<0,05$ ).

Bağırsak fazında  $TAK_{CUPRAC}$  değerleri tüm karışımlarda (7-12) sırasıyla 41,827; 38,567; 44,423; 77,830; 104,627 ve 43,573 mg TE/mL'dir. Glikolik karışımlar arasındaki fark önemsiz ( $p>0,05$ ), etanolik karışımlar arasındaki fark ise önemli bulunmuştur. En yüksek antioksidan kapasite değeri (11) örneğinde tespit edilmiştir. Tüm karışımlar değerlendirildiğinde (10) ve (11) örneklerinin diğer karışımlarla olan farkı önemli düzeydeyken ( $p<0,05$ ) diğer karışımlarının (7, 8, 9 ve 12) bağırsak fazında antioksidan değerleri arasındaki fark önemsizdir ( $p>0,05$ ).

Mide fazında istisnalar hariç örneklerin çoğunda antioksidan kapasitenin azaldığı tespit edilmiştir. Bunun sebebini ortamın pH değeri olduğu söylenebilir. Çünkü ortamın pH değeri fenoliklerin antioksidan aktivitesini etkilemektedir [119]. Enzimlerin uygulanması ve inkübasyon süresinin etkisiyle bağırsak fazında genel olarak antioksidan kapasite değerleri daha yüksek elde edilmektedir [120].

In-vitro sindirim çalışmasında analizi yapılan tüm örneklerin bağırsak fazı sonrasında TFM ve TAK % biyoerişilebilirlikleri Çizelge 4.14'te gösterilmiştir. Örneklerin % biyoerişilebilirlik değerleri: NKE ve NKEG örneğinde TFM için sırasıyla 175,1 ve 82,0; TAK için sırasıyla 158,9 ve 118,9; PR10, PR15, PR20 ve PR30 TFM için sırasıyla 14,3; 28,2; 25,1 ve 26,3; TAK için sırasıyla 11,0; 23,7; 16,2 ve 12,5 olarak tespit edilmiştir. 1:1, 1:2 ve 2:1 oranlarında hazırlanan glikolik karışım örneklerinin % biyoerişilebilirliği TFM için sırasıyla, 55,8; 18,7 ve 43,9; TAK için sırasıyla, 175,8; 94,3 ve 134,1 olarak, 1:1, 1:2 ve 2:1 oranlarında hazırlanan etanolik karışım örneklerinin % biyoerişilebilirliği TFM için

sırasıyla, 68,0; 65,8 ve 89,6; TAK için sırasıyla, 65,0; 80,0 ve 64,0 olarak belirlenmiştir. Tüm karışımlarda TFM % biyoerişilebilirliği en yüksek 2:1 NKE:PR30 örneği iken en düşük 1:2 NKEG:PR15 örneği, TAK % biyoerişilebilirliği en yüksek 1:1 NKEG:PR15 örneği iken en düşük 2:1 NKE:PR30 örneğidir.

**Çizelge 4.14** In-vitro sindirim sonrasında TFM ve TAK % biyoerişilebilirlik değerleri

<b>Örnek no.</b>	<b>% biyoerişilebilirlik</b>	
	<b>TFM</b>	<b>TAK</b>
<b>1</b>	175,1	158,9
<b>2</b>	82,0	118,9
<b>3</b>	14,3	11,0
<b>4</b>	28,2	23,7
<b>5</b>	25,1	16,2
<b>6</b>	26,3	12,5
<b>7</b>	55,8	175,8
<b>8</b>	18,7	94,3
<b>9</b>	43,9	134,1
<b>10</b>	68,0	65,0
<b>11</b>	65,8	80,0
<b>12</b>	89,6	64,0

## 5. SONUÇ

Bu tez çalışmasında amaç, ultrason-destekli ekstraksiyon yöntemiyle optimum koşullarda elde edilen nar kabuğu ekstraktı ile propolis ekstraktı karışımlarının in-vitro sindirimi ile biyoerişilebilirliğinin incelenerek, birlikte kullanılabilirliğini değerlendirmektedir. Çalışmanın ilk aşamasında, nar kabuğundan maserasyon ve UDE yöntemleriyle fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstraktlarda, TFM ve TAK değerleri hesaplanmış; YYM kullanılarak optimizasyon uygulanmıştır. Optimum koşullar ve optimum koşullarda elde edilen yanıtlar şu şekildedir: Maserasyon yöntemi için; 3 saat, 43°C, 1:30 g/mL, TFM: 120,9 mg GAE/g, TAK<sub>DPPH</sub>: 60,6 mmol TE/kg, TAK<sub>CUPRAC</sub>: 1645,2 mmol TE/kg. UDE yöntemi için; 30 dk, 41°C, 1:30 g/mL, TFM: 159,3 mg GAE/g, TAK<sub>DPPH</sub>: 64,3 mmol TE/kg, TAK<sub>CUPRAC</sub>: 4149,5 mmol TE/kg. Optimizasyon sonucunda elde edilen verilere göre özellikle süre avantajı ve TFM, TAK<sub>CUPRAC</sub> değerlerindeki farklılık nedeniyle UDE yönteminin maserasyon yöntemine göre daha ideal yöntem olduğu görülmüştür. Toplam antioksidan kapasite değerlerine göre, DPPH ve CUPRAC analizleri arasında farklılıklar bulunmaktadır. CUPRAC yöntemi ile daha yüksek değerler elde edilmiştir. Bu farklılıklar, ölçümlerin yapıldığı dalga boyu ve gerekli reaksiyon süresi de dahil olmak üzere reaksiyon koşullarının çeşitliliği ile ilgili olabilmektedir. Ekstraksiyon çalışmasında elde edilen etanolik nar kabuğu ekstraktı ve bu ekstraktın glikolik çözelti formuna getirilmiş hali çalışmanın ikinci bölümünde kullanılmıştır.

Etanolik nar kabuğu ekstraktı ile bu ekstraktın glikolik çözelti formunda simüle in-vitro sindirim çalışması yapılmıştır. Bağırsak fazından sonra yapılan TFM ve TAK<sub>CUPRAC</sub> analizinde örneklerin % biyoerişilebilirlikleri sırasıyla; %175, %82 ve %158, %118 olarak bulunmuştur. Bağırsak fazından sonra toplam fenolik madde ve antioksidan kapasitedeki bu artışların nedeni; fenoliklerin bağırsak fazı sırasında enzimlerin uygulanması ve inkübasyon (2 saat) ile salımlarının etkisiyle biyoerişilebilirliğinin artması olarak gösterilebilir. Ayrıca nar kabuğunda bulunan başlıca fenolik bileşiklerden olan ellagik asidin simüle edilmiş gastrointestinal sistem boyunca kararlı olduğu bilinmektedir. Ekstraksiyon sırasında suda çözünen bazı bileşenler ekstrakta geçebilir, bu da antioksidan kapasitenin daha yüksek olduğu bağırsak seviyesinde gözlemlenen antioksidan aktiviteye katkıda bulunabilir.

Tedarik edilen %10, %15 glikolik, %20, %30 etanolik propolis ekstraktı örneklerinde başlangıç ve in-vitro sindirim mide ve bağırsak fazları sonrasında TFM ve TAK analizleri yapılmıştır. Bağırsak fazı sonrasında yapılan TFM analizi ve TAK<sub>CUPRAC</sub> analizi sonucunda propolis örneklerinin % biyoerişilebilirlikleri sırasıyla, %14,3, %28,2, %25,1, %26,3 ve %10,9, %23,7, %16,2, 12,55 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre karışımlarda %15 glikolik ve %30 etanolik propolis ekstraktları kullanılmıştır.

Karışımlar glikolik ve etanolik olmak üzere iki grupta ve 1:1, 1:2 ve 2:1 (v/v) oranlarında hazırlanmıştır. Tüm karışımlarda başlangıç TFM ve TAK analizleri yapılmıştır. Daha sonra karışımlar ile simüle in-vitro sindirim çalışması gerçekleştirilmiş, mide ve bağırsak fazları sonrasında tüm örneklerde TFM ve TAK analizleri yapılmıştır. Tüm karışımların % biyoerişilebilirlik değerleri: Glikolik karışımların TFM analizi sonrası için sırasıyla %55,8, %18,7, %44, TAK analizi sonrası için sırasıyla %175,8, %94,3, %134,3 olarak tespit edilmiştir. Etanolik karışımların TFM analizi sonrası için sırasıyla %68, %65,8, %89,6, TAK analizi sonrası için ise sırasıyla %65, %80, %64 olarak tespit edilmiştir. In-vitro sindirimi yapılan istisnalar hariç tüm örneklerde mide fazında TFM değerleri ve antioksidan kapasiteleri azalmıştır. Bu durumun sebebi; polifenollerin antioksidan aktivitesinin önemli ölçüde pH değerine bağlı olduğu ve genellikle daha düşük pH değerinde antioksidan kapasitenin azalması olarak gösterilebilir. Ayrıca in vitro sindirim sisteminde kullanılan enzimlerin, yapısal özellikleri nedeniyle % biyoerişilebilirlik sonuçları üzerinde etkisi olabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak, yapılan biyoerişilebilirlik çalışmasında nar kabuğu ekstraktının propolis ekstraktı ile kullanılması propolisin % biyoerişilebilirlik oranını olumlu etkilediği, en ideal karışım örneğinin 1:1 NKEG:PR15 olduğu tespit edilmiştir.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] Mutreja, R. and Kumar, P. *Comparison of Antioxidant Properties of Pomegranate Peel Extract by Different Methods*. in *International Conference on Chemical, Agricultural and Biological Sciences (CABS-2015) Sept. 2015*.
- [2] Rasera, G.B., de Camargo, A.C., and de Castro, R.J.S., Bioaccessibility of phenolic compounds using the standardized INFOGEST protocol: A narrative review, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **2023** 22(1): p. 260-286.
- [3] Wang, Y., Neilson, L.C., and Ji, S., Mindfulness through agency in health consumption: Empirical evidence from committed dietary supplement consumers, *Journal of Consumer Affairs*, **2023**.
- [4] Djaoudene, O., Romano, A., Bradai, Y.D., Zebiri, F., Ouchene, A., Yousfi, Y., Amrane-Abider, M., Sahraoui-Remini, Y., and Madani, K., A global overview of dietary supplements: regulation, market trends, usage during the COVID-19 pandemic, and health effects, *Nutrients*, **2023** 15(15): p. 3320.
- [5] Shahidi, F. and Ambigaipalan, P., Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review, *Journal of functional foods*, **2015** 18: p. 820-897.
- [6] Zhang, H. and Tsao, R., Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects, *Current Opinion in Food Science*, **2016** 8: p. 33-42.
- [7] Adebooye, O.C., Alashi, A.M., and Aluko, R.E., A brief review on emerging trends in global polyphenol research, *Journal of Food Biochemistry*, **2018** 42(4): p. e12519.
- [8] Lopes, M., Coimbra, M.A., Costa, M.d.C., and Ramos, F., Food supplement vitamins, minerals, amino-acids, fatty acids, phenolic and alkaloid-based substances: An overview of their interaction with drugs, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2023** 63(19): p. 4106-4140.
- [9] Gullon, B., Pintado, M.E., Pérez-Álvarez, J.A., and Viuda-Martos, M., Assessment of polyphenolic profile and antibacterial activity of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-product of juice extraction, *Food control*, **2016** 59: p. 94-98.
- [10] Rosenblat, M., Volkova, N., Coleman, R., and Aviram, M., Pomegranate Byproduct Administration to Apolipoprotein E-Deficient Mice Attenuates Atherosclerosis Development as a Result of Decreased Macrophage Oxidative Stress and Reduced Cellular Uptake of Oxidized Low-Density Lipoprotein, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006** 54(5): p. 1928-1935.
- [11] Hadree, J., Shahidi, F., Mohebbi, M., and Abbaspour, M., Evaluation of Effects of Spray Drying Conditions on Physicochemical Properties of Pomegranate Juice Powder Enriched with Pomegranate Peel Phenolic Compounds: Modeling and Optimization by RSM, *Foods*, **2023** 12(10): p. 2066.
- [12] Kaderides, K., Kyriakoudi, A., Mourtzinou, I., and Goula, A.M., Potential of pomegranate peel extract as a natural additive in foods, *Trends in Food Science & Technology*, **2021** 115: p. 380-390.
- [13] Salatino, A., Teixeira, É.W., and Negri, G., Origin and chemical variation of Brazilian propolis, *Evidence-based complementary and alternative medicine*, **2005** 2: p. 33-38.



- [14] Almuhayawi, M.S., Propolis as a novel antibacterial agent, *Saudi Journal of Biological Sciences*, **2020** 27(11): p. 3079-3086.
- [15] Aliyazıcıoğlu, R., Sahin, H., Erturk, O., Ulusoy, E., and Kolaylı, S., Properties of phenolic composition and biological activity of propolis from Turkey, *International Journal of Food Properties*, **2013** 16(2): p. 277-287.
- [16] Sforcin, J.M., Propolis and the immune system: a review, *Journal of Ethnopharmacology*, **2007** 113(1): p. 1-14.
- [17] Burdock, G., Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis), *Food and Chemical toxicology*, **1998** 36(4): p. 347-363.
- [18] Özkök, A., Keskin, M., Tanuğur Samancı, A.E., Yorulmaz Önder, E., and Takma, Ç., Determination of antioxidant activity and phenolic compounds for basic standardization of Turkish propolis, *Applied Biological Chemistry*, **2021** 64(1): p. 1-10.
- [19] Delgado, A.M., Issaoui, M., and Chammem, N., Analysis of main and healthy phenolic compounds in foods, *Journal of AOAC International*, **2019** 102(5): p. 1356-1364.
- [20] Bravo, L., Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance, *Nutrition Reviews*, **1998** 56(11): p. 317-333.
- [21] Sagar, N.A., Pareek, S., Sharma, S., Yahia, E.M., and Lobo, M.G., Fruit and Vegetable Waste: Bioactive Compounds, Their Extraction, and Possible Utilization, *Compr Rev Food Sci Food Saf*, **2018** 17(3): p. 512-531.
- [22] Prabhu, S., Molath, A., Choksi, H., Kumar, S., and Mehra, R., Classifications of polyphenols and their potential application in human health and diseases, *Int. J. Physiol. Nutr. Phys. Educ*, **2021** 6(1): p. 293-301.
- [23] Vermerris, W., Nicholson, R., Vermerris, W., and Nicholson, R., Families of phenolic compounds and means of classification, *Phenolic compound biochemistry*, **2006**: p. 1-34.
- [24] Rosales, T.K.O. and Fabi, J.P., Valorization of polyphenolic compounds from food industry by-products for application in polysaccharide-based nanoparticles, *Frontiers in Nutrition*, **2023** 10: p. 1144677.
- [25] Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., and Jiménez, L., Polyphenols: food sources and bioavailability, *The American Journal of Clinical Nutrition*, **2004** 79(5): p. 727-747.
- [26] Mattila, P., Hellström, J., and Törrönen, R., Phenolic Acids in Berries, Fruits, and Beverages, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006** 54(19): p. 7193-7199.
- [27] Chen, L., Cao, H., Huang, Q., Xiao, J., and Teng, H., Absorption, metabolism and bioavailability of flavonoids: A review, *Critical reviews in food science and nutrition*, **2022** 62(28): p. 7730-7742.
- [28] Smaoui, S., Hlima, H.B., Mtibaa, A.C., Fourati, M., Sellem, I., Elhadef, K., Ennouri, K., and Mellouli, L., Pomegranate peel as phenolic compounds source: Advanced analytical strategies and practical use in meat products, *Meat science*, **2019** 158: p. 107914.
- [29] Huang, S., Zhang, C.-P., Wang, K., Li, G.Q., and Hu, F.-L., Recent advances in the chemical composition of propolis, *Molecules*, **2014** 19(12): p. 19610-19632.
- [30] Lipińska, L., Klewicka, E., and Sójka, M., The structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: a general review, *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, **2014** 13(3): p. 289-299.
- [31] Seeram, N.P., Lee, R., and Heber, D., Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice, *Clinica chimica acta*, **2004** 348(1-2): p. 63-68.

- [32] Sun, Y.-q., Xin, T., Xiao-ming, M., Xu, Z.-w., and Tian, W., In vitro and in vivo antioxidant activities of three major polyphenolic compounds in pomegranate peel: Ellagic acid, punicalin, and punicalagin, *Journal of integrative agriculture*, **2017** 16(8): p. 1808-1818.
- [33] Osorio-Tobón, J.F., Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds, *Journal of Food Science and Technology*, **2020** 57: p. 4299-4315.
- [34] Alara, O.R., Abdurahman, N.H., and Ukaegbu, C.I., Extraction of phenolic compounds: A review, *Current Research in Food Science*, **2021** 4: p. 200-214.
- [35] Büyüktünel, E., Gelişmiş ekstraksiyon teknikleri I, *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, **2012**(2): p. 209-242.
- [36] de Medeiros, T.D.M., Dufossé, L., and Bicas, J.L., Lignocellulosic substrates as starting materials for the production of bioactive biopigments, *Food Chemistry: X*, **2022** 13: p. 100223.
- [37] Sarangi, P.K., Vivekanand, V., Mohanakrishna, G., Pattnaik, B., Muddapur, U.M., and Aminabhavi, T.M., Production of bioactive phenolic compounds from agricultural by-products towards bioeconomic perspectives, *Journal of Cleaner Production*, **2023** 414: p. 137460.
- [38] Chemat, F., Vian, M.A., and Cravotto, G., Green extraction of natural products: Concept and principles, *International journal of molecular sciences*, **2012** 13(7): p. 8615-8627.
- [39] Herrero, M. and Ibañez, E., Green extraction processes, biorefineries and sustainability: Recovery of high added-value products from natural sources, *The Journal of Supercritical Fluids*, **2018** 134: p. 252-259.
- [40] Sharma, M., Hussain, S., Shalima, T., Aav, R., and Bhat, R., Valorization of seabuckthorn pomace to obtain bioactive carotenoids: An innovative approach of using green extraction techniques (ultrasonic and microwave-assisted extractions) synergized with green solvents (edible oils), *Industrial Crops and Products*, **2022** 175: p. 114257.
- [41] Kutlu, N., Yılmaz, M.S., İşci, A., and Şakıyan, Ö., Utilization of deep eutectic solvents in the extraction of bioactive compounds from food materials, *NOHU J. Eng. Sci*, **2021** 10(2): p. 591-597.
- [42] Kyriakidou, A., Makris, D.P., Lazaridou, A., Biliaderis, C.G., and Mourtzinis, I., Physical properties of chitosan films containing pomegranate peel extracts obtained by deep eutectic solvents, *Foods*, **2021** 10(6): p. 1262.
- [43] Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.-S., and Chemat, F., Ultrasound-assisted extraction, *Natural product extraction: principles and applications*, **2013** 21: p. 89.
- [44] Lavilla, I. and Bendicho, C., *Fundamentals of ultrasound-assisted extraction*, in *Water extraction of bioactive compounds*. 2017, Elsevier. p. 291-316.
- [45] Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., and Abert-Vian, M., Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review, *Ultrasonics sonochemistry*, **2017** 34: p. 540-560.
- [46] Kumar, K., Srivastav, S., and Sharanagat, V.S., Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review, *Ultrasonics sonochemistry*, **2021** 70: p. 105325.
- [47] Khuri, A.I. and Mukhopadhyay, S., Response surface methodology, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, **2010** 2(2): p. 128-149.
- [48] Baş, D. and Boyacı, İ.H., Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology, *Journal of Food Engineering*, **2007** 78(3): p. 836-845.

- [49] Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., and Escaleira, L.A., Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta*, **2008** 76(5): p. 965-977.
- [50] Costa, A.G.V., Garcia-Diaz, D.F., Jimenez, P., and Silva, P.I., Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red–black berries, *Journal of functional foods*, **2013** 5(2): p. 539-549.
- [51] Rein, M.J., Renouf, M., Cruz-Hernandez, C., Actis-Goretta, L., Thakkar, S.K., and da Silva Pinto, M., Bioavailability of bioactive food compounds: A challenging journey to bioefficacy, *British journal of clinical pharmacology*, **2013** 75(3): p. 588-602.
- [52] Minekus, M., Marie, A., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., and Brodtkorb, A., A standardised static in-vitro digestion method suitable for food – an international consensus, *Food & Function*, **2014**.
- [53] Brodtkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., and Carrière, F., INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion, *Nature protocols*, **2019** 14(4): p. 991-1014.
- [54] Hur, S.J., Lim, B.O., Decker, E.A., and McClements, D.J., In vitro human digestion models for food applications, *Food Chemistry*, **2011** 125(1): p. 1-12.
- [55] Dantas, A.M., Mafaldo, I.M., de Lima Oliveira, P.M., dos Santos Lima, M., Magnani, M., and Borges, G.d.S.C., Bioaccessibility of phenolic compounds in native and exotic frozen pulps explored in Brazil using a digestion model coupled with a simulated intestinal barrier, *Food Chemistry*, **2019** 274: p. 202-214.
- [56] Bueno-Herrera, M. and Pérez-Magariño, S., Validation of an extraction method for the quantification of soluble free and insoluble bound phenolic compounds in wheat by HPLC-DAD, *Journal of Cereal Science*, **2020** 93: p. 102984.
- [57] Xie, Y., Kosińska, A., Xu, H., and Andlauer, W., Milk enhances intestinal absorption of green tea catechins in in vitro digestion/Caco-2 cells model, *Food Research International*, **2013** 53(2): p. 793-800.
- [58] Yu, J., Li, W., You, B., Yang, S., Xian, W., Deng, Y., Huang, W., and Yang, R., Phenolic profiles, bioaccessibility and antioxidant activity of plum (*Prunus Salicina* Lindl), *Food Research International*, **2021** 143: p. 110300.
- [59] Mackie, A., Mulet-Cabero, A.-I., and Torcello-Gómez, A., Simulating human digestion: Developing our knowledge to create healthier and more sustainable foods, *Food & function*, **2020** 11(11): p. 9397-9431.
- [60] Li, C., Yu, W., Wu, P., and Chen, X.D., Current in vitro digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract, *Trends in Food Science & Technology*, **2020** 96: p. 114-126.
- [61] Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Álvarez, J.A.P., and Fernández-López, J., Changes in bioaccessibility, polyphenol profile and antioxidant potential of flours obtained from persimmon fruit (*Diospyros kaki*) co-products during in vitro gastrointestinal digestion, *Food chemistry*, **2018** 256: p. 252-258.
- [62] Inada, K.O.P., Silva, T.B.R., Lobo, L.A., Domingues, R.M.C.P., Perrone, D., and Monteiro, M., Bioaccessibility of phenolic compounds of jaboticaba (*Plinia jaboticaba*) peel and seed after simulated gastrointestinal digestion and gut microbiota fermentation, *Journal of Functional Foods*, **2020** 67: p. 103851.
- [63] Dantas, A.M., Fernandes, F.G., Magnani, M., and da Silva Campelo Borges, G., Gastrointestinal digestion assays for evaluating the bioaccessibility of phenolic

- compounds in fruits and their derivatives: an overview, *Food Research International*, **2023** 170: p. 112920.
- [64] Zago, G.R., Gottardo, F.M., Bilibio, D., Freitas, C.P., Bertol, C.D., Dickel, E.L., and Santos, L.R.d., Pomegranate (*Punica granatum* L.) peel lyophilized extract delays lipid oxidation in tuscan sausages, *Ciência Rural*, **2020** 50.
- [65] Akhtar, S., Ismail, T., Fraternali, D., and Sestili, P., Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features, *Food Chemistry*, **2015** 174: p. 417-425.
- [66] Gil-Martín, E., Forbes-Hernández, T., Romero, A., Cianciosi, D., Giampieri, F., and Battino, M., Influence of the extraction method on the recovery of bioactive phenolic compounds from food industry by-products, *Food Chemistry*, **2022** 378: p. 131918.
- [67] Kennas, A. and Amellal-Chibane, H., Comparison of five solvents in the extraction of phenolic antioxidants from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, *The North African Journal of Food and Nutrition Research*, **2019** 3(5): p. 140-147.
- [68] Pagliarulo, C., De Vito, V., Picariello, G., Colicchio, R., Pastore, G., Salvatore, P., and Volpe, M.G., Inhibitory effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenol extracts on the bacterial growth and survival of clinical isolates of pathogenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Food chemistry*, **2016** 190: p. 824-831.
- [69] Kaderides, K., Papaoikonomou, L., Serafim, M., and Goula, A.M., Microwave-assisted extraction of phenolics from pomegranate peels: Optimization, kinetics, and comparison with ultrasounds extraction, *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, **2019** 137: p. 1-11.
- [70] Sharayei, P., Azarpazhooh, E., Zomorodi, S., and Ramaswamy, H.S., Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, *Lwt*, **2019** 101: p. 342-350.
- [71] Singh, J.P., Kaur, A., Shevkani, K., and Singh, N., Composition, bioactive compounds and antioxidant activity of common Indian fruits and vegetables, *Journal of food science and technology*, **2016** 53: p. 4056-4066.
- [72] Orak, H.H., Yagar, H., and Isbilir, S.S., Comparison of antioxidant activities of juice, peel, and seed of pomegranate (*Punica granatum* L.) and inter-relationships with total phenolic, Tannin, anthocyanin, and flavonoid contents, *Food Science and Biotechnology*, **2012** 21: p. 373-387.
- [73] Sforcin, J.M. and Bankova, V., Propolis: is there a potential for the development of new drugs?, *Journal of ethnopharmacology*, **2011** 133(2): p. 253-260.
- [74] Bankova, V., Popova, M., and Trusheva, B., Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review, *Chemistry Central Journal*, **2014** 8(1): p. 28.
- [75] Kara, Y., Can, Z., and Kolaylı, S., What should be the ideal solvent percentage and solvent-Propolis ratio in the preparation of Ethanolic Propolis extract?, *Food Analytical Methods*, **2022** 15(6): p. 1707-1719.
- [76] Mountford-McAuley, R., Prior, J., and Clavijo McCormick, A., Factors affecting propolis production, *Journal of Apicultural Research*, **2023** 62(1): p. 162-170.
- [77] Kekeçoğlu, M., Keskin, M., Birinci, C., Birinci, E., and Kolaylı, S., Effects of honey bee race and season on propolis composition, *Journal of Agricultural Sciences*, **2021** 27(3): p. 292-297.
- [78] Anjum, S.I., Ullah, A., Khan, K.A., Attaullah, M., Khan, H., Ali, H., Bashir, M.A., Tahir, M., Ansari, M.J., and Ghramh, H.A., Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review, *Saudi journal of biological sciences*, **2019** 26(7): p. 1695-1703.

- [79] El-Guendouz, S., Lyoussi, B., and Miguel, M.G., Insight on propolis from mediterranean countries: Chemical composition, biological activities and application fields, *Chemistry & biodiversity*, **2019** 16(7): p. e1900094.
- [80] Barth, O.M., Palynological analysis of geopropolis samples obtained from six species of Meliponinae in the Campus of the Universidade de Ribeirão Preto, USP, Brazil, *Apiacta*, **2006** 41(2): p. 71-85.
- [81] Tugba Degirmencioglu, H., Guzelmeric, E., Yuksel, P.I., Kırmızıbekmez, H., Deniz, I., and Yesilada, E., A new type of Anatolian propolis: Evaluation of its chemical composition, activity profile and botanical origin, *Chemistry & biodiversity*, **2019** 16(12): p. e1900492.
- [82] Guzelmeric, E., Ristivojević, P., Trifković, J., Dastan, T., Yilmaz, O., Cengiz, O., and Yesilada, E., Authentication of Turkish propolis through HPTLC fingerprints combined with multivariate analysis and palynological data and their comparative antioxidant activity, *Lwt*, **2018** 87: p. 23-32.
- [83] Zhu, L., Zhang, J., Yang, H., Li, G., Li, H., Deng, Z., and Zhang, B., Propolis polyphenols: A review on the composition and anti-obesity mechanism of different types of propolis polyphenols, *Frontiers in Nutrition*, **2023** 10: p. 511.
- [84] Ristivojević, P., Trifković, J., Andrić, F., and Milojković-Opsenica, D., Poplar-type propolis: Chemical composition, botanical origin and biological activity, *Natural product communications*, **2015** 10(11): p. 1934578X1501001117.
- [85] Kolaylı, S., Birinci, C., Kara, Y., Ozkok, A., Samancı, A.E.T., Sahin, H., and Yildiz, O., A melissopalynological and chemical characterization of Anatolian propolis and an assessment of its antioxidant potential, *European Food Research and Technology*, **2023** 249(5): p. 1213-1233.
- [86] Farooqui, T. and Farooqui, A.A., Apitherapy: therapeutic effects of propolis on neurological disorders, *Neuroprotective Effects of Phytochemicals in Neurological Disorders*, **2017**: p. 335-358.
- [87] Celińska-Janowicz, K., Zaręba, I., Lazarek, U., Teul, J., Tomczyk, M., Pałka, J., and Milyk, W., Constituents of propolis: Chrysin, caffeic acid, p-coumaric acid, and ferulic acid induce PRODH/POX-dependent apoptosis in human tongue squamous cell carcinoma cell (CAL-27), *Frontiers in Pharmacology*, **2018** 9: p. 336.
- [88] Kurek-Górecka, A., Keskin, Ş., Bobis, O., Felitti, R., Górecki, M., Otręba, M., Stojko, J., Olczyk, P., Kolaylı, S., and Rzepecka-Stojko, A., Comparison of the antioxidant activity of propolis samples from different geographical regions, *Plants*, **2022** 11(9): p. 1203.
- [89] Yolmeh, M. and Jafari, S.M., Applications of Response Surface Methodology in the Food Industry Processes, *Food and Bioprocess Technology*, **2017** 10(3): p. 413-433.
- [90] Demir, T., AKPINAR, Ö., Haki, K., and Güngör, H., Nar Kabuğundan Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktiviteye Sahip Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyon Koşullarının Optimizasyonu, *Gıda*, **2019** 44(2): p. 369-382.
- [91] Kazemi, M., Karim, R., Mirhosseini, H., and Abdul Hamid, A., Optimization of pulsed ultrasound-assisted technique for extraction of phenolics from pomegranate peel of Malas variety: Punicalagin and hydroxybenzoic acids, *Food Chemistry*, **2016** 206: p. 156-166.
- [92] Tabaraki, R., Heidarizadi, E., and Benvidi, A., Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel antioxidants by response surface methodology, *Separation and Purification Technology*, **2012** 98: p. 16-23.
- [93] Magangana, T.P., Makunga, N.P., Fawole, O.A., and Opara, U.L., Processing Factors Affecting the Phytochemical and Nutritional Properties of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel Waste: A Review, *Molecules*, **2020** 25(20): p. 4690.

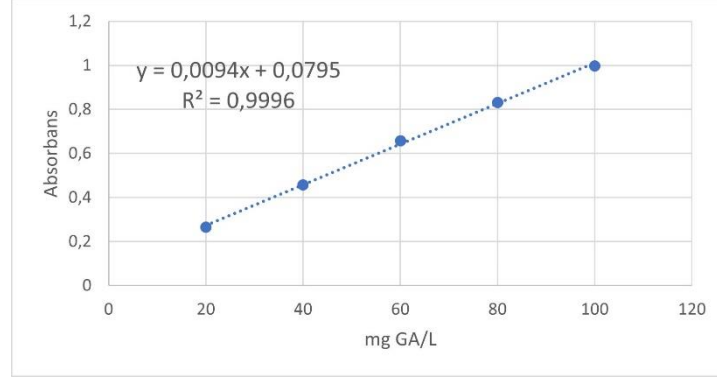
- [94] Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., and Facino, R., Standardization of antioxidant properties of honey by combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics, *Analytica Chimica Acta - ANAL CHIM ACTA*, **2005** 533: p. 185-191.
- [95] Monter, A., Hernández-Falcón, T., Cruz-Cansino, N., Ramírez-Moreno, E., Alanis, E., Arias-Rico, J., and Ariza Ortega, J.A., Functional Properties, Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Purple Cactus Pear (*Opuntia ficus-indica*) Waste: Comparison with Commercial Fibers, *Waste and Biomass Valorization*, **2019** 10.
- [96] Akdeniz, B., Sumnu, G., and Sahin, S., Microencapsulation of phenolic compounds extracted from onion (*Allium cepa*) skin, *Journal of Food Processing and Preservation*, **2018** 42(7): p. e13648.
- [97] Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., and Karademir, S.E., Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004** 52(26): p. 7970-7981.
- [98] Bekdeşer, B., Bener, M., Önem, A.N., and Apak, R., Toplam Antioksidan Kapasite Tayini için CUPRAC Yöntemi Uygulama Föyü, *Gıda Antioksidanları Ölçümü Uygulama ve Araştırma Merkezi, İstanbul Üniversitesi*, **2014**.
- [99] Cilek, B., Luca, A., Hasirci, V., Sahin, S., and Sumnu, G., Microencapsulation of phenolic compounds extracted from sour cherry pomace: effect of formulation, ultrasonication time and core to coating ratio, *European Food Research and Technology*, **2012** 235(4): p. 587-596.
- [100] Malviya, S., Arvind, Jha, A., and Hettiarachchy, N., Antioxidant and antibacterial potential of pomegranate peel extracts, *Journal of Food Science and Technology*, **2014** 51(12): p. 4132-4137.
- [101] Seyhan, S.A., DPPH antioksidan analizinin yeniden değerlendirilmesi, *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*, **2019** 9(2): p. 125-135.
- [102] Liao, H., Dong, W., Shi, X., Liu, H., and Yuan, K., Analysis and comparison of the active components and antioxidant activities of extracts from *Abelmoschus esculentus* L, *Pharmacognosy Magazine*, **2012** 8(30): p. 156.
- [103] Papillo, V.A., Vitaglione, P., Graziani, G., Gokmen, V., and Fogliano, V., Release of Antioxidant Capacity from Five Plant Foods during a Multistep Enzymatic Digestion Protocol, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2014** 62(18): p. 4119-4126.
- [104] Živković, J., Šavikin, K., Janković, T., Čujić, N., and Menković, N., Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from pomegranate peel using response surface methodology, *Separation and Purification Technology*, **2018** 194: p. 40-47.
- [105] Machado, A.P.D.F., Sumere, B.R., Mekar, C., Martinez, J., Bezerra, R.M.N., and Rostagno, M.A., Extraction of polyphenols and antioxidants from pomegranate peel using ultrasound: Influence of temperature, frequency and operation mode, *International Journal of Food Science & Technology*, **2019** 54(9): p. 2792-2801.
- [106] Ranjha, M.M.A.N., Amjad, S., Ashraf, S., Khawar, L., Safdar, M.N., Jabbar, S., Nadeem, M., Mahmood, S., and Murtaza, M.A., Extraction of polyphenols from apple and pomegranate peels employing different extraction techniques for the development of functional date bars, *International Journal of Fruit Science*, **2020** 20(sup3): p. S1201-S1221.

- [107] Liu, Y., Kong, K.W., Wu, D.-T., Liu, H.-Y., Li, H.-B., Zhang, J.-R., and Gan, R.-Y., Pomegranate peel-derived punicalagin: Ultrasonic-assisted extraction, purification, and its  $\alpha$ -glucosidase inhibitory mechanism, *Food chemistry*, **2022** 374: p. 131635.
- [108] Özkök, A., Keskin, M., Samancı, A., Önder, E., and Takma, Ç., Characterization of propolis extracts prepared using different solvents at the different concentrations, *Progress in Nutrition*, **2021** 23(3).
- [109] El Adaouia Taleb, R., Djebli, N., Chenini, H., Sahin, H., and Kolayli, S., In vivo and in vitro anti-diabetic activity of ethanolic propolis extract, *Journal of Food Biochemistry*, **2020** 44(7): p. e13267.
- [110] Keskin, M., ticari propolis ekstraktlarının kalite parametreleri açısından karşılaştırılması, *Uludağ Arıcılık Dergisi*, **2019** 19(1): p. 43-49.
- [111] Yusof, N., Munaim, M.A., and Kutty, R.V. *The effects of different ethanol concentration on total phenolic and total flavonoid content in Malaysian propolis.* in *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2020. IOP Publishing.
- [112] Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., and Robards, K., Methods for testing antioxidant activity, *Analyst*, **2002** 127(1): p. 183-198.
- [113] Capanoglu, E., Beekwilder, J., Boyacioglu, D., De Vos, R.C., and Hall, R.D., The effect of industrial food processing on potentially health-beneficial tomato antioxidants, *Critical reviews in food science and nutrition*, **2010** 50(10): p. 919-930.
- [114] Atayoglu, A.T., Sözeri Atik, D., Bölük, E., Gürbüz, B., Ceylan, F.D., Çapanoğlu, E., Atayolu, R., Paradkar, A., Fearnley, J., and Palabiyik, I., Evaluating bioactivity and bioaccessibility properties of the propolis extract prepared with l-lactic acid: An alternative solvent to ethanol for propolis extraction, *Food Bioscience*, **2023** 53: p. 102756.
- [115] Mărghitaş, L.A., Dezmirean, D., Moise, A., Mihai, C.M., and Laslo, L., DPPH method for evaluation of propolis antioxidant activity, *Bulletin USAMV*, **2009** 66: p. 253-258.
- [116] Myo, H. and Khat-Udomkiri, N., Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from coffee pulp using propylene glycol as a solvent and their antioxidant activities, *Ultrasonics Sonochemistry*, **2022** 89: p. 106127.
- [117] Fawole, O.A. and Opara, U.L., Stability of total phenolic concentration and antioxidant capacity of extracts from pomegranate co-products subjected to in vitro digestion, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **2016** 16(1): p. 1-10.
- [118] Ozdal, T., Ceylan, F.D., Eroglu, N., Kaplan, M., Olgun, E.O., and Capanoglu, E., Investigation of antioxidant capacity, bioaccessibility and LC-MS/MS phenolic profile of Turkish propolis, *Food Research International*, **2019** 122: p. 528-536.
- [119] Bouayed, J. and Bohn, T., Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses, *Oxidative medicine and cellular longevity*, **2010** 3(4): p. 228-237.
- [120] Bouayed, J., Hoffmann, L., and Bohn, T., Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake, *Food chemistry*, **2011** 128(1): p. 14-21.

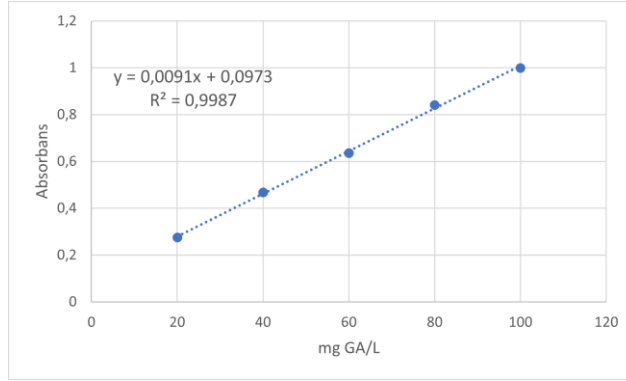
## EKLER

### EK A

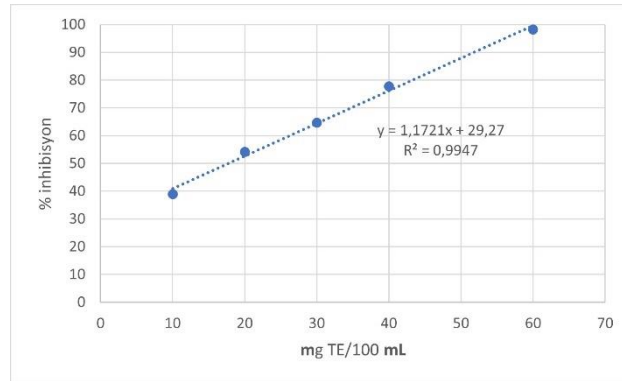
#### KALİBRASYON EĞRİLERİ



Şekil A.1 TFM analizi için gallik asit kalibrasyon eğrisi (%70 etanol)

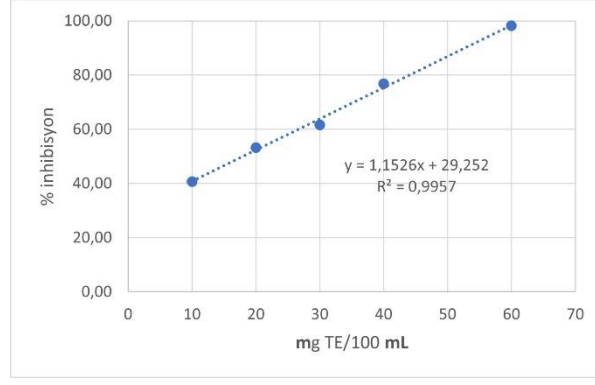


Şekil A.2 TFM analizi için gallik asit kalibrasyon eğrisi (%70 glikol)

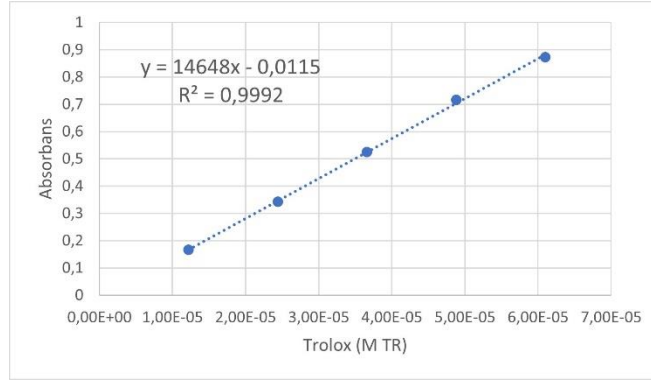


Şekil A.3 TAK<sub>DPPH</sub> analizi için troloks kalibrasyon eğrisi (%70 etanol)

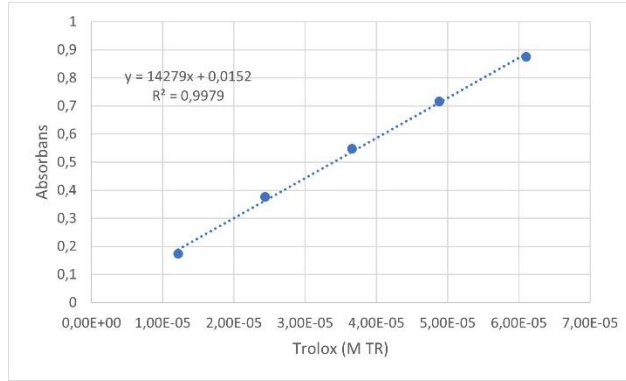




Şekil A.4 TAK<sub>DPPH</sub> analizi için troloks kalibrasyon eğrisi (%70 glikol)



Şekil A.5 TAK<sub>CUPRAC</sub> analizi için troloks kalibrasyon eğrisi (%70 etanol)



Şekil A.6 TAK<sub>CUPRAC</sub> analizi için troloks kalibrasyon eğrisi (%70 glikol)