

Yağı Alınmış Nar Çekirdeklerinden Fenolik Antioksidanların Özütlenmesinde Ultrases Sisteminin Kullanımı

Bülent BAŞYIĞIT¹

¹Harran Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü 63000 Haliliye-Şanlıurfa

¹<https://orcid.org/0000-0002-6617-1836>

✉: bulentbasyigit@harran.edu.tr

ÖZET

Bu çalışmada yağı alınmış nar çekirdeklerin fenolik antioksidanların uygun şartlarda özütlenmesine odaklanılmıştır. Bu bağlamda özütleme adımında ultrases sistemi kullanılmış ve şartlar yanıt yüzey yöntemi ile optimize edilmiştir. Optimizasyon işlemi, özütleme süresinin (5-60 dk) ve ultrases cihazının genliğinin (%20-100) toplam fenolik madde miktarı üzerine etkisi araştırılmıştır. Maksimum toplam fenolik madde miktarı (TFM), özütleme süresinin 52 dk ve genliğin %88 olduğu noktada elde edilmiştir. Optimum koşullarda elde edilen özütler için özellikler klasik yöntemle (metanolik özütler) elde edilen özütlerle karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Ultrases sistemi kullanılarak elde edilen özütlerin TFM (2.94 mg GAE g⁻¹), toplam flavanoid madde miktarı (TFMM) (0.36 mg KE g⁻¹) ve toplam hidrolize tanen madde miktarı (THTM) (22.07 mg TAE g⁻¹) metanolik özütlerden (2.60 mg GAE g⁻¹, 0.27 mg KE g⁻¹, 16.73 mg TAE g⁻¹) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. LC-ESI-MS/MS sonuçları yağsız nar çekirdeklerinin gallik asit ve ellajik asit açısından zengin olduğunu göstermiştir. Fenolik asitlerin baskınlığı FTIR spektroskopisi ile doğrulanmıştır. Üstün antioksidatif davranış optimum koşullarda hazırlanan özütlerde (DPPH: 105.26 µmol TEAC g⁻¹, ABTS: 57.65 µmol TEAC g⁻¹, FRAP: 13.03 µmol TEAC g⁻¹, CUPRAC: 8.91 µmol TEAC g⁻¹) tespit edilmiştir. Sonuçlar, meyve çekirdeklerden biyoaktif maddelerin özütlenmesinde ultrases sisteminin efektif bir uygulama olduğunu ortaya koymuştur.

Gıda Bilimi

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 01.11.2022

Kabul Tarihi : 01.06.2023

Anahtar Kelimeler

Yağı Alınmış Nar Çekirdeği
Ultrases Destekli Özütleme
LC-ESI-MS/MS
FTIR Spektroskopisi
Antioksidan Kapasite

Use of Ultrasound System in Extraction of Phenolic Antioxidants from Oil-Free Pomegranate Seeds

ABSTRACT

This study focused on the extraction of phenolic antioxidants from oil-free pomegranate seeds under suitable conditions. In this context, the ultrasound system was applied in the extraction step and the conditions were optimized by the response surface method. The effects of the extraction time (5-60 min) and the amplitude (20-100%) on total phenolic content were investigated. The optimum conditions were 52 min and 88% amplitude for providing maximum total phenolic content. The attributes of the extracts produced under optimum conditions were compared with the extracts obtained by the classical method (methanolic extracts). Total contents of phenolic (2.94 mg GAE g⁻¹), flavonoid (0.36 mg CE g⁻¹), and hydrolysable tannin (22.07 mg TAE g⁻¹) in the extracts prepared using ultrasound assisted system were superior than those of methanolic extracts (2.60 mg GAE g⁻¹, 0.27 mg CE g⁻¹, 16.73 mg TAE g⁻¹). LC-ESI-MS/MS results indicated that defatted pomegranate seeds were rich in gallic acid and ellagic acid. The predominance of phenolic acids was endorsed by FTIR spectroscopy. The extracts produced in the optimum conditions exhibited higher antioxidative behavior (DPPH: 105.26 µmol TEAC g⁻¹, ABTS: 57.65 µmol TEAC g⁻¹, FRAP: 13.03 µmol TEAC g⁻¹, CUPRAC: 8.91 µmol TEAC g⁻¹). The results indicated that ultrasound system created awareness in terms of the effective extraction of bioactive substances from fruit seeds.

Food Science

Research Article

Article History

Received : 01.11.2022

Accepted : 01.06.2023

Keywords

Oil-Free Pomegranate Seed
Ultrasound Assisted Extraction
LC-ESI-MS/MS
FTIR Spectroscopy
Antioxidant Capacity

Atıf Şekli:	Başığit, B., (2023). Yağı Alınmış Nar Çekirdeklerinden Fenolik Antioksidanların Özütlenmesinde Ultrases Sisteminin Kullanımı. <i>KSÜ Tarım ve Doğa Derg</i> 26 (6), 1346-1357. https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.1197761
To Cite:	Başığit, B., (2023). Use of Ultrasound System in Extraction of Phenolic Antioxidants from Oil-Free Pomegranate Seeds. <i>KSU J. Agric Nat</i> 26 (6), 1346-1357. https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.1197761

GİRİŞ

Artan nüfus artışı ve popülasyonların yaşam tarzındaki farklılıklara paralel olarak atık materyallerin değerlendirilmesi ve ekonomiye kazandırılması için son yıllarda küresel boyutta göz ardı edilemez bir çaba vardır. Atık yönetiminde, gıda işleme atıklarından katma değerli ürünlerin elde edilmesi bilimsel çalışmalar ve endüstri için öncelikli konular arasındadır. Daha önce yürütülmüş çalışmalar ve endüstriyel üretimler de bu yaklaşımı desteklemektedir. Gelişmiş (680 milyar dolar) ve gelişmekte (310 milyar dolar) olan ülkelerde, gıda atıklarından kaynaklı önemli maddi kayıpların olduğu önceki çalışmalarda ortaya konmuştur (Brito ve ark., 2022). Küresel olarak ortaya çıkan gıda orijinli atıkların hacminin 1,3 ile 1,4 milyar ton arasında değiştiği yapılan araştırmalar ile kanıtlanmış olup bu oranın önümüzdeki birkaç yıl içerisinde 2,6 milyar tona ulaşacağı tahmin edilmektedir (Sinha & Tripathi, 2021). Gıda kaynaklı bu atıkların yaklaşık %25-30'luk kısmını meyve-sebzelerin işleme ve hasat sonrası sürecinde açığa çıkan yan ürünler oluşturmaktadır (Sagar ve ark., 2018). Bu atıkların fonksiyonel özellikler sergileme potansiyeli olan oluşumları yüksek miktarlarda yapılarında barındırdığı önceki çalışmalarda vurgulanmıştır (Méndez ve ark., 2022). Dolayısıyla meyve-sebze işleme atıklarından ekonomik değeri olan ürünlerin üretilmesi ve bu ürünlerin pazara kazandırılması ulusal/küresel bağlamda önem arz etmektedir.

Nar (*Punica granatum* L.) farklı bölgelerde kendisine yetişme alanı bulan en eski yenilebilir meyvelerden biridir (Çam ve ark., 2014). Nar meyvesi sofralık olarak tüketiminden ziyade endüstriyel olarak işlenmektedir. Meyve suyu, nar ekşisi, reçel, pekmez ve jöle narın girdi oluşturduğu gıdalara örnek olarak verilebilir (Abid ve ark., 2018; Bou Dargham ve ark., 2022). Narın, bu gıdalara işlenmesi esnasında yüksek miktarlarda yan ürünler (kabuk ve çekirdek) açığa çıkmaktadır (Qu ve ark., 2009). Farklı çalışmalarda nar kabuğunun ve nar çekirdeğinin fenolik antioksidanlar gibi biyolojik aktivite sergileyen özel yapıları içerdiği not edilmiştir (Paul & Radhakrishnan, 2020; Kaderides ve ark., 2021). Dolayısıyla bu özel yapıların ilgili atıklardan uygun yöntemlerle izole edilip katma değerli ürünlere dönüştürülmesi bilimsel literatür ve endüstri için gereklilik arz etmektedir. Bu yaklaşıma paralel olarak nar kabukları farklı çalışmalarda konu olarak işlenmiştir (Kaderides ve ark., 2021). Nar işleme atığı olan nar çekirdekleri ile ilgili de farklı çalışmalar mevcut olup bu çalışmalarda daha çok çekirdeklerden

yağ eldesi ve elde edilen yağın karakterizasyonuna odaklanılmıştır (Paul & Radhakrishnan, 2020); ancak nar çekirdeklerinden yağ eldesinden sonra geriye kalan posa miktarı da göz ardı edilemeyecek kadar fazladır. Posanın farklı amaçlar için kullanımına yönelik çalışmalar kısıtlıdır. Bir nevi atığın atığı olan yağı alınmış nar çekirdeklerinden besinsel değeri olan materyallerin eldesi literatüre farklı bir bakış açısı kazandıracaktır. Çekirdeklerin kompleks bir yapıya sahip olduğu ve son yıllarda çevre dostu özütleme 'yeşil ekstraksiyon' yöntemlerinin ön plana çıktığı göz önünde bulundurulduğunda çekirdeklerden bu besinsel değeri olan fonksiyonel yapıların uygun tekniklerle elde edilmesi önem arz etmektedir. Bu teknikler arasında ultrases destekli özütleme sistemlerinin başarısı farklı çalışmalarda not edilmiştir (Da Porto ve ark., 2013). Corbin ve ark. (2015) keten tohumundan fenoliklerin özütlenmesi ile ilgili yürütmüş oldukları çalışmada 4 farklı yöntem (ultrases destekli, mikrogalga destekli, enzimatik destekli ve geleneksel alkali özütleme) kullanmış ve bulgular çekirdeklerden biyolojik aktiviteye sahip yapıların eldesinde ultrases sisteminin kullanımının daha makul olduğunu ortaya koymuştur. Başka bir çalışmada baobab çekirdeklerinden ultrases destekli sistemler kullanılarak elde edilen özütlerin geleneksel yöntemlerle elde edilen özütlere kıyasla fenolik maddelerce daha zengin olduğu rapor edilmiştir (Ismail ve ark., 2019). Tüm bu yaklaşımların ve sonuçların ışığı altında mevcut çalışmada:

- yağı alınmış nar çekirdeklerinden fenolik antioksidanları elde etmek amacıyla ultrases destekli özütleme yönteminin kullanılması ve özütleme koşullarının yanıt yüzey yöntemi ile optimize edilmesi,
- özütlerin toplam fenolik madde miktarının (TFM), flavonoid madde miktarının (TFMM) ve hidrolize tanen miktarının (THTM) ortaya çıkarılması,
- optimum koşullarda elde edilen yağı alınmış nar çekirdeği özütlerinin fenolik madde içeriğinin LC-ESI-MS/MS ile karakterize edilmesi,
- özütlerdeki spesifik yapıların FTIR spektroskopisi ile tespit edilmesi,
- özütlerin antioksidatif davranışlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Materyal

Çalışmada kullanılan nar çekirdekleri Isparta'da faaliyet gösteren Mavideniz Gıda A.Ş'den temin edilmiştir. Nar çekirdeklerini yağsız forma getirebilmek için laboratuvar ölçekli soğuk pres

makinesi (12 kg tohum saat⁻¹, tek kafa, 750 W güç, 12 mm çaplı çıkış ucu, 12 rpm hız ve 100 °C maksimum çıkış sıcaklığı) kullanılmıştır. Yağsız çekirdekler öğütülmüş (300-2000 µm parçacık boyutu) ve daha sonra özütleme aşamasına kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Analizde kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup aksi belirtilmedikçe Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD) ve Merck (Darmstadt, Almanya) firmalarından temin edilmiştir.

Örneklerin Hazırlanması

Ultrases destekli özütleme koşullarının optimizasyonu

Ultrases destekli özütleme işleminin optimizasyonu için 2 faktörlü ve 5 seviyeli toplam 12 farklı deneme noktası merkezi tümleşik tasarım ile yanıt yüzey yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur (Çizelge 1). Bu aşamada 60 Hz frekansa ve 665 W güce sahip laboratuvar tipi ultrases cihazı (Wiseclean WUC-D10H) kullanılmış olup özütleme süresi (5, 13, 33, 52 ve 60 dk) ve cihaz genişliğinin (%20, 32, 60, 88 ve 100) TFM üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

İlk olarak, yağsız nar çekirdekleri saf su ile karıştırılmıştır (1:10, w/v). Daha sonra hazırlanan solüsyonlar ultrases cihazının ilgili bölümüne yerleştirilmiş ve özütleme işlemi, oluşturulan deneme noktaları dikkate alınarak oda sıcaklığında farklı sürelerde (5-60 dk) ve genliklerde (%20-100) yürütülmüştür. Son olarak, her bir deneme noktası için örnekler 4000 rpm'de 10 dk süre ile santrifüj edildikten sonra süpernatantlar toplanmış ve analizlere tabi tutulmuştur.

Geleneksel yöntem

Geleneksel özütleme yöntemi Alasalvar ve Yıldırım (2021)'e göre yapılmıştır. Bunun için yağsız nar çekirdekleri metanol içeren cam şişelere ilave edilmiş (1:10, w/v) ve özütleme işlemi laboratuvar tipi bir çalkalayıcıda 250 rpm'de oda sıcaklığında 24 s boyunca yürütülmüştür. Süre sonunda örnekler 4000 rpm'de 10 dk süre ile santrifüj edilmiş ve süpernatantlar toplanmıştır. Toplanan süpernatantlarda analizler gerçekleştirilmiştir.

Toplam Fenolik Madde Miktarı

TFM analizi için Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılmıştır (Singleton & Rossi, 1965). Seyreltilmiş özütler (0.4 mL), saf su (1.8 mL) ve Folin-Ciocalteu reaktifi (0.2 mL) ile cam tüpler içerisinde karıştırılmıştır. Daha sonra tüpler içerisine %7.5'lik (w/v) sodyum karbonat solüsyonu (1.6 mL) ilave edilmiştir. Karanlık bir ortamda 60 dk'lık inkübasyondan sonra örneklerin absorbansı UV-Vis spektrofotometre (Model UV-1280, Shimadzu, Japonya) kullanılarak 765 nm'de okunmuştur. Sonuçlar g örnek başına mg gallik asit eşdeğeri (mg GAE g⁻¹) olarak ifade edilmiştir.

Toplam Flavanoid Madde Miktarı

TFMM analizi Zhishen ve ark. (1999)'a göre yürütülmüştür. On mL'lik tüpler içerisinde 1 mL seyreltilmiş özüt, 4 mL saf su ve 0.3 mL sodyum nitrit (%5, w/v) karıştırılmış ve karışım 5 dk süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda tüpler içerisine 0.3 mL alüminyum klorür (%10, w/v) ilave edilmiştir. Alüminyum klorür ilave edildikten 1 dk sonra, hazırlanan solüsyonların içerisine sırasıyla 2 mL sodyum hidroksit (1 M) ve 2.4 mL saf su eklenmiştir. Tüpler içerisindeki karışımların absorbans okumaları 510 nm'de UV-Vis spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar mg kateşin eşdeğeri g örnek⁻¹ (mg KE g⁻¹) olarak verilmiştir.

Toplam Hidrolize Tanen Madde Miktarı

THTM analizinin yürütülmesinde daha önce literatürde not edilmiş bir çalışma referans alınmıştır (Willis, 1998). Seyreltilmiş örneklerden 1 mL alınmış ve 5 mL potasyum iyodat (%2.5, w/v) çözeltisi ile karıştırılmıştır. Kırmızı renkli karışımın absorbansı 550 nm'de UV-Vis spektrofotometre ile ölçülmüştür. Nihai sonuçlar g örnek başına mg tannik asit eşdeğeri (mg TAE g⁻¹) olarak sunulmuştur.

LC-ESI-MS/MS Analizi

Yağsız nar çekirdeği özütleri, ikili gradyan pompaya, bir otomatik enjeksiyon bloğuna (SIL-20AC), bir gaz gidericiye (DGU-20A3R) ve bir kolon termostatına (CTO-10ASVP) sahip Nexera Shimadzu UHPLC LC-ESI-MS/MS (Shimadzu, Japonya) cihazına enjekte edilmeden önce 0.45 µm gözeneklere sahip membran filtrelerden geçirilmiştir. Yağsız çekirdeklerdeki fenolik fraksiyonları ayırmada, sıcaklığı 40 °C'ye getirilmiş İnertsil ODS 4 (2 µm, 2.1 x 50 mm) kolonundan yararlanılmıştır. Mobil faz olarak formik asit-ultra saf su (%0.1, v/v) (A) ve formik asit-metanol (%0.1, v/v) (B) kullanılmıştır. Örnek enjeksiyon hacmi ve akışı sırasıyla 2 µL ve 0.4 mL dk⁻¹ olacak şekilde ayarlanmıştır. Gradient koşullar: 0-4 dk (%95 B), 4.01-7 dk (%95 B) ve 7.01-12 dk (%5 B).

MS tespitinde, elektrosprey iyonizasyon (ESI) kaynağına sahip Shimadzu LC-MS/MS 8030 model üçlü tandem dört kutuplu kütle spektrometresi kullanılmıştır. Fraksiyonlara ayırma işlemi hem negatif hem de pozitif elektrosprey iyonizasyon modunda yürütülmüştür. Nebulize (3 mL/dk) ve kurutucu gaz (15 mL/dk) olarak azot kullanılmıştır. DL sıcaklığı, ısı bloğu sıcaklığı ve ara yüz voltajı sırasıyla 260 °C, 400 °C ve 4.5 kV'ye ayarlanmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde LabSolutions programından (Shimadzu, Japonya) yararlanılmıştır.

FTIR Spektroskopisi

Özütlerdeki spesifik gruplar FTIR spektroskopisi

(Shimadzu, Japonya) kullanılarak araştırılmıştır. Özütleme cihazının ilgili kısmına yerleştirildikten sonra 1 cm⁻¹ çözünürlükte spektrum taraması (4000-600 cm⁻¹) yapılmıştır (Naji ve ark., 2022).

Antioksidan Kapasite

DPPH yöntemi: Seyreltme işlemi uygulanmış yağsız nar çekirdeği özütlerinden 0.1 mL alınmış ve 3.9 mL DPPH radikali (25 mg L⁻¹) içeren tüpler içerisine ilave edilmiştir. Tüpler karanlık ortamda 30 dk inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda karışımların absorbansı 515 nm'de UV-Vis spektrofotometre kullanılarak okunmuştur (Çam ve ark., 2009).

ABTS yöntemi: Radikal solüsyonunu hazırlamak için 0.96 mg ABTS 25 mL'lik balon joje içerisinde 15 mL saf su ile tamamen çözündürülmüştür. Balon jojeye 5 mL potasyum persülfat (2.45 mM) ilave edilmiş ve nihai hacim saf su ile 25 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra solüsyon 16 s karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Radikal solüsyonun 734 nm'deki absorbansı sodyum fosfat tamponu (0.2 M, pH 7.4) ile 0.700±0.02 olacak şekilde ayarlandıktan sonra ilgili solüsyon (2 mL) ve seyreltilmiş özütler (20, 40, 60 ve 80 µL) karıştırılmıştır. Karışımlar 6 dk karanlık ortamda bekletildikten sonra absorbans değerleri UV-Vis spektrofotometre ile 734 nm'de ölçülmüştür (Çam ve ark., 2009).

FRAP yöntemi: Özütleri (150 µL) içeren tüplere daha önceden hazırlanmış 2850 µL FRAP reaktifi (30 mM sodyum asetat, 10 mM 2,3,5-Trifeniltetrazolyum klorür, 20 mM demir (III) klorür) ilave edilmiştir. Hazırlanan karışımlar 30 dk karanlık ortamda inkübasyona bırakıldıktan sonra absorbans değerlerini okumak için dalga boyu 593 nm'ye ayarlanmış UV-Vis spektrofotometrenin ilgili kısmına kuvarz küvetler içerisinde yerleştirilmiştir (Benzie & Strain, 1996).

CUPRAC yöntemi: 1 mL bakır (II) klorür (0.01 M), 1 mL etanolik neocuproine (7.5 x 10⁻³ M), 1 mL amonyum asetat solüsyonu (1 M, pH 7), 0.4 mL örnek ve 0.7 mL saf su tüpler içerisinde homojen olacak şekilde karıştırılmıştır. Karışım karanlık ortamda 30 dk'lık inkübasyona bırakıldıktan sonra UV-Vis spektrofotometrenin dalga boyu 450 nm ayarlanmış ve absorbans okumaları yapılmıştır (Apak ve ark., 2008).

Antioksidan kapasite sonuçları µmol trolox eşdeğeri antioksidan kapasite g⁻¹ (µmol TEAC g⁻¹) örnek olarak ifade edilmiştir.

İstatistik Analizler

Üretimler ve analizler en az 2 tekerrürlü olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. OriginPro 8 (Origin Lab Inc.) programı kullanılarak grafikler oluşturulmuştur. Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi için SPSS 22 paket programı (SPSS Inc., Sıkago, IL, ABD) kullanılmıştır. Ortalamalar arasındaki farklılıklar t

testi ile tespit edilmiş olup P<0.05 sınır değeri olarak kabul edilmiştir. Özütleme işleminin optimizasyonunda deneme tasarımları Design Expert 7.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN) programı ile oluşturulmuştur. Optimizasyon işleminde bağımlı değişken, ikinci dereceden bir polinom modeli elde etmek ve regresyon katsayılarını belirlemek için çoklu doğrusal regresyonlara yerleştirilmiştir (Denklem 1).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=0}^n \beta_i X_i + \sum_{i=0}^n \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

Y: Bağımlı değişken, β_0 : Kesişim regresyon katsayısı, β_i : Doğrusal regresyon katsayısı, β_{ii} : İkinci dereceden regresyon katsayısı, β_{ij} : Etkileşim regresyon katsayısı, $X_i X_j$: Ana değişkenler arasındaki etkileşim, n: Değişkenlerin sayısı.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Ultrases Destekli Özütleme Koşullarının Optimizasyonu

Literatürde fenolik antioksidanların farklı materyallerden elde edilmesi ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur (Ben Yakoub ve ark., 2018; Pandey ve ark., 2018). Yürütülen çalışmaların hemen hemen hepsinde özütleme koşulları değiştirilerek maksimum verimde prosesin yürütülmesi amaçlanmıştır. Fenolik antioksidanların eldesi ile ilgili çalışmalarda proses üzerine özütleme sıcaklığının/süresinin (Tülek ve ark., 2021) ve çözücü tipinin/oranının (Zhang & Lee, 2021) etkili olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, bu biyolojik yapıların izole edilmesinde başarısı ispatlanmış metanol gibi toksik solventler yerine son yıllarda ultrases destekli, mikrodalga destekli ve süperkritik akışkan özütleme yöntemlerine bir yönelim vardır. Farklı çalışmalarda da bu tekniklerin başarısı ortaya konmuştur; ancak bu inovatif tekniklerde de makul bir özütleme süreci için cihaz şartlarının optimize edilmesi gerektiği yürütülen çalışmalarda vurgulanmıştır (Dairi ve ark., 2021; Mrkonjić ve ark., 2021; Pinto ve ark., 2021). Tüm bunlara ilaveten bilimsel literatürdeki yaklaşımlara bakıldığında özellikle çekirdek gibi kompleks yapıya sahip materyallerden fenolik antioksidanların izolasyon sürecinde toksik solventler yerine bu yeni tekniklerin kullanımının daha makul olduğu görülmektedir. Bu yaklaşımlardan yola çıkarak mevcut çalışmada yağı alınmış nar çekirdeklerinden fenolik antioksidanların eldesinde ultrases destekli özütleme yöntemi kullanılmıştır. Özütleme koşulları sistematik yaklaşımla optimize edilmiştir. Literatür verileri ve yapılan ön çalışmalar göz önünde bulundurularak özütleme süresinin (5-60 dk) ve ultrases cihazının genlik değerinin (%20-100) özütlerdeki TFM üzerine etkisi araştırılmıştır. Özütleme sıcaklığı, solvent tipi ve solvent oranı gibi parametreler izolasyon sürecinde sabit tutulmuş olup oluşturulan tasarıma ilave edilmemiştir. Yanıt yüzey yöntemi kullanılarak oluşturulan 12 deneme noktası ve bu noktalarda

bağımlı değişken (TFM) sonuçları Çizelge 1'de sunulmuştur. TFM'nin 0.11 mg GAE g⁻¹ ile 3.45 mg GAE g⁻¹ arasında değiştiği tespit edilmiştir. Genel olarak özütleme süresi ve ultrases cihazının genliğindeki düşüşle birlikte özütlerdeki TFM miktarının da düşme eğiliminde olduğu tespit

edilmiştir. Bu durum, çekirdek materyalinin hücre duvarının kısa süre ve düşük genlikte yeterince parçalanmamasına paralel olarak hücre duvarında yer alan fenolik antioksidanların solvante difüzyon oranının sınırlı olması ile açıklanabilir.

Çizelge 1. Yağı alınmış nar çekirdeklerinden fenolik antioksidanların ultrases destekli özütleme işlemi ile ilgili deneysel tasarım

Table 1. The experimental design regarding the ultrasound-assisted extraction of phenolic antioxidants from defatted pomegranate seeds

Bağımsız değişkenler (Independent variables)		Bağımlı değişken (Dependent variable)
Özütleme süresi (dk) (Extraction time) (min)	Genlik (%) (Amplitude) (%)	Toplam fenolik madde miktarı (mg GAE g ⁻¹) (Total phenolic content) (mg GAE g ⁻¹)
33	60	1.39
33	60	1.46
33	20	2.05
52	88	2.87
33	100	3.45
33	60	1.34
33	60	1.31
13	32	0.50
13	88	1.78
60	60	2.38
5	60	0.11
52	32	2.49

GAE: Gallik asit eşdeğeri (Gallic acid equivalent).

Merkezi tümleşik tasarım kullanılarak yürütülen optimizasyon çalışması ile ilgili model istatistik sonuçları Çizelge 2'de sunulmuştur. Her bir deneme noktası için belirlenen TFM sonuçlarına göre optimizasyon işlemi için uygun olan model belirlenmiştir. Model belirleme aşamasında istatistiksel çıktılar (R²: belirleme katsayısı, R²_{Adj}: düzeltilmiş belirleme katsayısı, P değeri ve uyum eksikliği) dikkate alınmıştır. Bu parametreler arasında R² ve R²_{Adj} değerlerinin maksimum, P değerinin önem derecesinin yüksek ve uyum eksikliğinin 0.05'ten daha büyük olması uygun modelin seçiminde yol gösterici olmuştur. Çizelge

incelendiğinde lineer ve 2FI (etkileşimli) modellerde arzu edilenin aksine R² ve R²_{Adj} değerlerinin, P değerinin önem derecesinin düşük olduğu ve ayrıca uyum eksikliğinin de belirtilen sınırlar içerisinde olmadığı görülmektedir. Kübik modellerin yorumlanmasına gelince program üzerinde yapılan değerlendirmeler sonucunda ilgili modelin uygulanması ile birlikte veri kayıplarının olabileceği ve bu veri kayıpları neticesinde oluşturulan grafiklerin uygun olmayacağı tespit edilmiştir. Belirtilen yorumlar ve model istatistik sonuçları göz önünde bulundurulduğunda çalışmada bağımlı değişken olarak seçilen TFM'yi açıklamak için en uygun modelin kuadratik model olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 2. Yağı alınmış nar çekirdeklerinden fenolik antioksidanların ultrases destekli özütleme işlemi ile ilgili model istatistik sonuçları

Table 2. Model summary statistics regarding the ultrasound-assisted extraction of phenolic antioxidants from defatted pomegranate seeds

Bağımlı değişken (Response)	Modeller (Source)	Standart sapma (Std. Dev.)	R ² (R ²)	R ² _{Adj} (R ² _{Adj})	P-değeri (P-value)	Uyum eksikliği (Lack of fit)
Toplam fenolik madde miktarı (Total phenolic content)	Lineer (Linear)	0.62	0.6582	0.5822	0.0080**	0.0010
	2FI (2FI)	0.63	0.6776	0.5567	0.0229*	0.0009
	Kuadratik (Quadratic)	0.085	0.9956	0.9920	<0.0001***	0.2481
	Kübik (Cubic)	0.080	0.9974	0.9929	<0.0001***	0.1829

2FI: Etkileşimli (Interactive). İstatistiksel anlamlılık dereceleri (Statistical significance degrees): *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

Mevcut çalışma kapsamında bağımsız değişken olarak seçilen özütleme süresi ve genliğin TFM üzerine olan

muhtemel etkilerini istatistiksel boyutta ortaya koymak için varyans analizi (ANOVA) sonuçları

incelenmiş ve ilgili sonuçlar Çizelge 3'te sunulmuştur. Her iki bağımsız değişkeninde TFM üzerine istatistiksel bağlamda önemli bir etkiye sahip olduğu

belirlenmiştir (P<0.001). Benzer şekilde işlem parametrelerinin etkileşimleri (süre x genlik) de TFM üzerine P<0.01 düzeyinde etki ettiği tespit edilmiştir.

Çizelge 3. Yağı alınmış nar çekirdeklerinden fenolik antioksidanların ultrases destekli özütlenme işlemi ile ilgili model katsayıları ve varyans analizi (ANOVA) sonuçları

Table 3. Model coefficients regarding the ultrasound-assisted extraction of phenolic antioxidants from defatted pomegranate seeds

Model katsayıları/değer (Coefficient/value)	Toplam fenolik madde miktarı (mg GAE g ⁻¹) (Total phenolic content) (mg GAE g ⁻¹)
β_0	1.37***
<i>Lineer</i>	
β_1 (Süre) (Time)	0.79***
β_2 (Genlik) (Amplitude)	0.45***
<i>Etkileşimli</i>	
β_{12} (Süre × Genlik) (Time × Amplitude)	-0.22**
<i>İkinci derece</i>	
β_{11} (Süre × Süre) (Time × Time)	-0.087*
β_{22} (Genlik × Genlik) (Amplitude × Amplitude)	0.67***

GAE: Gallik asit eşdeğeri (Gallic acid equivalent). İstatistiksel anlamlılık dereceleri (Statistical significance degrees): *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

Model denklem (Model equation): Total fenolik madde miktarı (Total phenolic content) = $\beta_0 + \beta_1$ (Süre) (Time) + β_2 (Genlik) (Amplitude) + β_{12} (Süre × Genlik) (Time × Amplitude) + β_{11} (Süre × Süre) (Time × Time) + β_{22} (Genlik × Genlik) (Amplitude × Amplitude).

Antioksidan Kapasite Toplam Fenolik Madde, Toplam Flavonoid Madde ve Toplam Hidrolize Tannen Madde Miktarı

Optimum koşullarda ve klasik yöntemle elde edilen yağı alınmış nar çekirdeklerinin TFM, TFMM ve THTM ile ilgili sonuçlar Çizelge 4'te verilmiştir. Optimum koşullarda elde edilen özütlerin (2.94 mg GAE g⁻¹) fenolik maddelerce metanolik özütlerle (2.60 mg GAE g⁻¹) kıyasla daha zengin olduğu bulunmuştur (P<0.05). Benzer eğilim TFMM ve THTM sonuçlarında da tespit edilmiştir. Optimum koşullarda elde edilen özütler için TFMM ve THTM sırasıyla 0.36 mg KE g⁻¹ ve 22.07 mg TAE g⁻¹ iken; bu değerler metanolik özütlerde 0.27 mg KE g⁻¹ ve 16.73 mg TAE g⁻¹ olarak belirlenmiştir.

Fitokimyasalların özütlenmesinde solvent olarak su ile karşılaştırıldığında metanol kullanımının daha makul olduğu önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (Elfalleh ve ark., 2019). Mevcut çalışmada literatür verilerinin aksine biyoaktif maddelerin ultrases sisteminde solvent olarak tercih edilen sulu faza difüzyon hızının daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu durum ultrases destekli özütlemenin ne kadar etkili bir sistem olduğunu ortaya koymaktadır. Bir başka ifade ile toksik solventler prosese dahil edilmeden inovatif yöntemler kullanılarak sadece su ile biyoaktif yapıların efektif bir şekilde özütlenmesinin mümkün olabileceği görülmüştür. Bilimsel literatürde ultrases sisteminin kullanıldığı çalışmalarda benzer yorumlar yapılmıştır (Gisbert ve ark., 2021).

Çizelge 4. Yağı alınmış nar çekirdeklerinin toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde ve toplam hidrolize tannen madde miktarı

Table 4. Total phenolic, total flavonoid and total hydrolysable tannin contents of defatted pomegranate seeds

Örnekler (Samples)	Toplam fenolik madde miktarı (mg GAE g ⁻¹) (Total phenolic content) (mg GAE g ⁻¹)	Toplam flavanoid madde miktarı (mg KE g ⁻¹) (Total flavonoid content) (mg CE g ⁻¹)	Toplam hidrolize tannen madde miktarı (mg TAE g ⁻¹) (Total hydrolysable tannin content) (mg TAE g ⁻¹)
Optimum (Optimum)	2.94±0.03 ^a	0.36±0.01 ^a	22.07±0.86 ^a
Metanolik (Methanolic)	2.60±0.07 ^b	0.27±0.03 ^a	16.73±0.13 ^b

Aynı sütundaki farklı küçük harfler (a-b) istatistiksel farklılıkları gösterir (P<0.05) (Different lowercase letters (a-b) in the same column indicate statistical differences). GAE: Gallik asit eşdeğeri (Gallic acid equivalent), KE: Katesin eşdeğeri (Catechin equivalent), TAE: Tannik asit eşdeğeri (Tannic acid equivalent).

Fenolik Fraksiyonları

Optimum koşullarda Materyallerin içerdiği oldukları toplam biyoaktif madde içeriği kadar bu biyoaktif

maddelerin fraksiyonlarının da bilinmesi üzerinde durulması gereken noktalardandır. Çünkü biyoaktif maddelerin fraksiyonları ilgili materyalin biyolojik

aktivitesi ile doğrudan ilişkilidir. Mevcut çalışmanın bu bölümünde LC-ESI-MS/MS ile optimum koşullarda ve metanol kullanılarak geleneksel yöntemle elde edilen özütlerin fenolik fraksiyonları (flavanoid ve fenolik asitler) araştırılmış ve sonuçlar Çizelge 5'te sunulmuştur. Her iki özütte de toplam 9 farklı fenolik fraksiyon belirlenmiştir. Yağsız nar çekirdeklerinde tespit edilen fenoliklerin 4 tanesi flavonoid (kuersetin, mirisetin, resveratrol ve luteolin) iken; 5 adedi fenolik asitler (gallik asit, asetohidroksamik asit, ellajik asit, salisilik asit ve p-hidroksibenzoik asit) grubunda yer almaktadır. Fenolik fraksiyonlar arasında flavanoidlere kıyasla fenolik asitlerin dominant olduğu tespit edilmiştir. Fenolik asitlerden, ultrases destekli sistem ve metanol kullanılarak elde edilen özütlerde gallik asitin (optimum: 35.49 µg g⁻¹; metanolik: 25.28 µg g⁻¹) ve ellajik asitin (optimum:

77.51 µg g⁻¹; metanolik: 72.30 µg g⁻¹) baskın olduğu belirlenmiştir. Nar çekirdeklerinin gallik asit ve ellajik asit açısından zengin olduğu önceki çalışmalarda da not edilmiştir (Mesías ve ark., 2013). Bu yapıların nar çekirdeğinde baskın olması ilgili materyal için önemli avantajları da beraberinden getirmektedir. Çünkü gallik asitin ve ellajik asitin sağlık üzerine olan faydalı etkileri *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda ortaya konmuştur (Andrade ve ark., 2021; Chen ve ark., 2022). Antioksidan, antiinflamatuar, antihiperlipidemik, antiviral, antimetastatik, antikanser, antidiyabetik aktivite bu bağlamda örnek olarak verilebilir (Aishwarya ve ark., 2021). Gallik asit ve ellajik asite ilaveten, fonksiyonel özellikleri farklı çalışmalara konu olmuş resveratrol da yağı alınmış nar çekirdeklerinden tespit edilmiştir.

Çizelge 5. Yağı alınmış nar çekirdeklerinin fenolik fraksiyonları

Table 5. Phenolic fractions of defatted pomegranate seeds

Fenolik bileşik (Phenolic compound)	MF (MF)	Öncü iyon (m/z) (Precursor ion (m/z))	Ürün iyon (m/z) (Product ion (m/z))	Optimum (µg g ⁻¹) (Optimum (µg g ⁻¹))	Metanolik (µg g ⁻¹) (Methanolic (µg g ⁻¹))
Gallik asit (<i>Gallic acid</i>)	C ₇ H ₆ O ₅	169.1	124.9 178.9 150.9	35.79±0.95	25.28±1.01
Kuersetin (<i>Quercetin</i>)	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.1	58.0 44.0 150.9	0.13±0.02	0.42±0.04
Asetohidroksamik asit (<i>Acetohydroxamic acid</i>)	C ₂ H ₅ NO ₂	76.1	179.1 136.9	5.52±0.46	5.52±0.74
Mirisetin (<i>Myricetin</i>)	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	317.0	135.0 107.2	0.13±0.03	0.22±0.02
Resveratrol (<i>Resveratrol</i>)	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	229.0	228.9 145.1	0.98±0.16	0.97±0.11
Ellajik asit (<i>Ellagic acid</i>)	C ₁₄ H ₆ O ₈	301.1	93.0 65.0	77.51±1.25	72.30±1.42
Salisilik asit (<i>Salicylic acid</i>)	C ₇ H ₆ O ₃	137.2	150.9 133.0	1.03±0.17	0.62±0.09
Luteolin (<i>Luteolin</i>)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0	93.1 65.0	0.19±0.04	10.22±0.32
p-Hidroksibenzoik asit (<i>p-Hydroxybenzoic acid</i>)	C ₇ H ₆ O ₃	137.2		0.71±0.12	0.38±0.06

MF: Moleküler formül (*Molecular formula*).

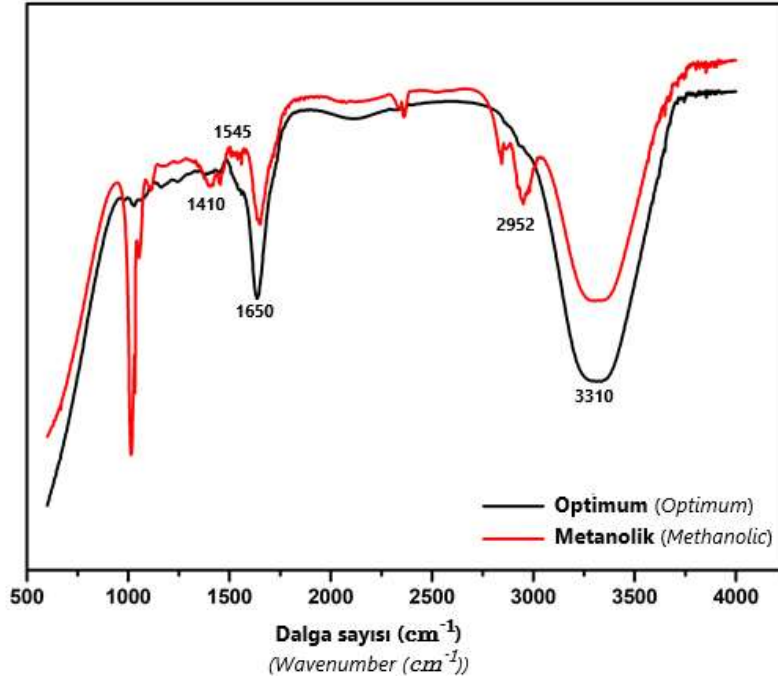
FTIR Spektroskopisi

Özütlerdeki spesifik gruplar FTIR spektroskopisi aracılığıyla araştırılmış ve örneklere ait spektrumlar Şekil 1' de verilmiştir. Yaklaşık 3310 cm⁻¹'de gözlemlenen geniş ve yayvan pik özütlerdeki hidroksil (-OH) gruplarının germe titreşimine atfedilebilir. Farklı bitkisel özütler için de benzer pikler ilgili dalga sayısında rapor edilmiş ve doğrudan hidroksil grupları ile ilişkilendirilmiştir (Santiago-Adame ve ark., 2015). Bu dalga sayısında absorpsiyon bantlarının güçlü olması özütteki fenolik bileşiklerin varlığına atfedilmiştir (Wu ve ark., 2022). Her iki özüt içinde yaklaşık 2952 cm⁻¹'de görülen absorpsiyon bantları C-H gerilmesi ile ilgili olup CH₂ veya CH₃ gruplarının

özütteki varlığına işaretler. Fenolik asitlerin varlığı ile ilişkilendirilen karboksil grupları 1650 cm⁻¹'de görülmüştür (Kashyap ve ark., 2022). Spektrum incelendiğinde özütlerde bu bantların güçlü olduğu görülmektedir ki bu durum LC-ESI-MS/MS sonuçları ile de desteklenmektedir. Çünkü fenolik bileşikler arasında yağı alınmış nar çekirdeklerinde fenolik asitlerden gallik asitin ve ellajik asitin baskın olduğu mevcut çalışma kapsamında tespit edilmiştir. Ayrıca, fenolik bileşiklerin varlığı ile ilişkilendirilen 3310 ve 1650 cm⁻¹'deki pikler optimum koşullarda elde edilen özütlerde daha güçlü bulunmuştur. LC-ESI-MS/MS sonuçlarına ek olarak TFM analizi de FTIR spektrumlarını desteklemektedir. Özütlerdeki C=O

karbonil ve -COOH grupları sırasıyla 1545 ve 1410 cm^{-1} dalga sayısı civarlarında belirlenmiştir (Hashemi ve ark., 2022; Kashyap ve ark., 2022). Fenolik yapıları temsil eden gruplar FTIR spektrumunda da net bir

şekilde tespit edilmiş olup TFM ve LC-ESI-MS/MS sonuçları ile spektrumlar arasında bir korelasyonun olduğu belirlenmiştir.



Şekil 1. Yağ nar çekirdeği özütlerinin FTIR spektrumları
Figure 1. FTIR spectrums of defatted pomegranate seed extracts

Antioksidan Kapasite

Bitkisel kaynaklı materyaller sahip oldukları biyoaktif yapılar sayesinde çeşitli fonksiyonel özellikler sergileme potansiyeline sahiptir. Mevcut çalışma kapsamında nar çekirdeklerinin içermiş olduğu başta gallik asit ve ellajik asit olmak üzere fenolik bileşikler bu kapsamda en makul örnekler olarak verilebilir. Çalışmanın fenolik fraksiyonları bölümünde bu biyoaktif yapıların farklı biyolojik özellikleri vurgulanmıştır.

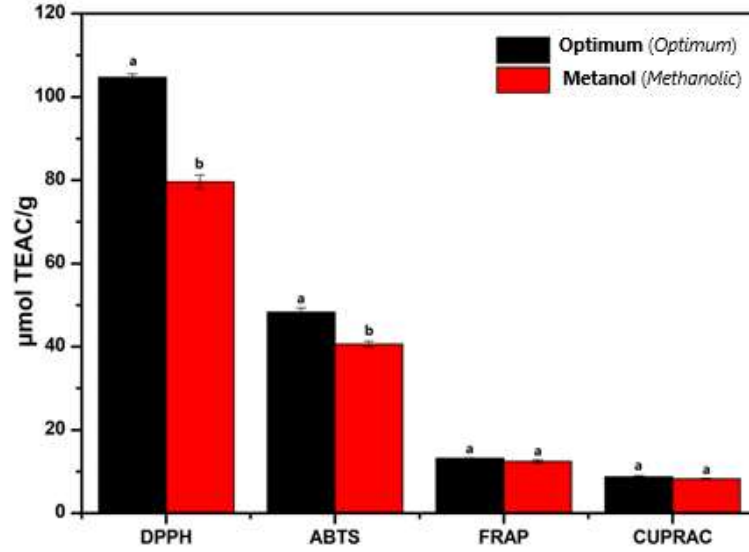
Ultrases destekli ve klasik yöntemle özütlenen yağ alınmış nar çekirdeklerinin antioksidatif davranışları bu çalışma kapsamında *in vitro* koşullarda belirlenmiştir. Analizler *in vitro* koşullarda gerçekleştirildiğinden ilgili materyalin antioksidan etkilerini tam olarak ortaya koymak adına tek bir metot yerine 4 farklı yöntem (Radikal süpürücü kapasite: DPPH ve ABTS; Demir ve bakır indirgeme gücü: FRAP ve CUPRAC) kullanılmıştır. Tüm analiz yöntemleri için sonuçlar trolox eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) olarak ifade edilmiş olup analiz sonuçları Şekil 2'de sunulmuştur. Optimum koşullarda elde edilen özütlerin radikal süpürücü gücü metanolik özütlerden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($P < 0.05$). DPPH ve ABTS sonuçları ultrases destekli özütlenme yöntemi ile üretilen özütlerde sırasıyla 105.26 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ ve 57.65 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Bu değerler metanolik özütler için 80.77 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ ve 41.10 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$

bulunmuştur. FRAP (optimum: 13.03 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$; metanolik: 12.69 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$) ve CUPRAC (optimum: 8.91 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$; metanolik: 8.15 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$) sonuçlarında ise örnekler arasında istatistiksel fark olmadığı tespit edilmiştir. Optimum koşullarda elde edilen özütlerde tespit edilen üstün antioksidan kapasite özütteki daha yoğun fenolik madde oranı ile açıklanabilir. Benzer yorumlara daha önce yürütülmüş çalışmalarda da yer verilmiştir (Ma ve ark., 2021; Karaçelik ve ark., 2022).

Mevcut çalışma ile benzer yaklaşımın sergilendiği bir çalışmada Çin'de kendisine yetişme alanı bulan 4 farklı nar çeşidine ait çekirdeklerde yağlar alınmış ve yağ alınmış materyallerde antioksidatif davranışlar araştırılmıştır. Yazarlar, yağ alınmış nar çekirdekleri için ABTS sonuçlarının 7.40 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ ile 17.80 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ arasında değerler aldığını bulmuştur (Jing ve ark., 2012). Başka bir çalışmada da nar çekirdekleri için antioksidan kapasite mevcut çalışmada elde edilen sonuçlardan daha düşük olduğu rapor edilmiştir (Peng, 2019). Nar çekirdeklerinden özütlenen serbest, esterifiye ve bağlı fenolik yapıların antioksidatif özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada ABTS sonuçları sırasıyla 18.30, 11.30 ve 11.0 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ olarak bulunurken DPPH sonuçlarının 360, 430 ve 200 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ olduğu not edilmiştir (Ambigaipalan ve ark., 2017). Literatür çalışmalarının birbiri arasında ve mevcut çalışma ile olan farklılıkları

kullanılan hammaddenin çeşidine (fiziksel ve kimyasal yapısı vb.) ve özütleme işleminde farklı

yöntemlerin/solventlerin kullanılmasına bağlanabilir.



Şekil 2. Yağı alınmış nar çekirdeklerinin antioksidan kapasitesi
Figure 2. Antioxidant capacity of defatted pomegranate seeds

Her bir antioksidan kapasite analizi için farklı küçük harfler (a-b) istatistiksel farklılıkları gösterir (P<0.05) (Different lowercase letters (a-b) for each antioxidant capacity analysis indicate statistical differences). TEAC: Trolox eşdeğeri antioksidan aktivite (Trolox equivalent antioxidant capacity).

SONUÇ ve ÖNERİLER

Son yıllarda atık materyallerin değerlendirilip katma değerli ürünlere dönüştürülmesini konu alan farklı çalışmalar mevcuttur; ancak yapılan çalışmalarda atık materyaller değerlendirildikten sonra geriye kalan kısımları (atığın atığı) herhangi bir prosese dahil edilmeden bertaraf edilmektedir. Bu çalışma kapsamında atığın atığı olan materyallerin de hâlâ içerisinde önemli yapıları barındırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca bilimsel literatürde ve endüstride, toksik özelliğe sahip solventlerin proseslerde kullanımını sınırlandırmak için göz ardı edilemez çabaların olduğu bilinmektedir. Bu bağlamda çalışma kapsamında inovatif tekniklerle bu problemlerin minimize edilebileceği sonucuna varılmıştır. Belirtilen bu noktalardan ötürü elde edilen sonuçlar ve çalışmaya olan yaklaşım ileride yürütülecek farklı çalışmalara yön verecek niteliktedir. Bu tarz materyallerle ilgili çalışmaları arttırmak ve bir pazar oluşturmak için elde edilen özütler farklı ürün gruplarında girdi olarak kullanılabilir.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Makale tek yazarlı olup çalışmaya ait verilerin toplanmasından yazım aşamasına kadar tüm süreçler yazar tarafından organize edilmiştir.

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazar bu çalışmada herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Abid, M., Yaich, H., Hidouri, H., Attia, H., & Ayadi, M. A. (2018). Effect of substituted gelling agents from pomegranate peel on colour, textural and sensory properties of pomegranate jam. *Food Chemistry*, 239, 1047–1054. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.006>
- Aishwarya, V., Solaipriya, S., & Sivaramakrishnan, V. (2021). Role of ellagic acid for the prevention and treatment of liver diseases. *Phytotherapy Research*, 35(6), 2925–2944. <https://doi.org/10.1002/ptr.7001>
- Alasalvar, H., & Yildirim, Z. (2021). Ultrasound-assisted extraction of antioxidant phenolic compounds from *Lavandula angustifolia* flowers using natural deep eutectic solvents: An experimental design approach. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 22, 100492. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2021.100492>
- Ambigaipalan, P., de Camargo, A. C., & Shahidi, F. (2017). Identification of phenolic antioxidants and bioactives of pomegranate seeds following juice extraction using HPLC-DAD-ESI-MSn. *Food Chemistry*, 221, 1883–1894. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.058>
- Andrade, S., Loureiro, J. A., & Pereira, M. do C. (2021). Influence of in vitro neuronal membranes on the anti-amyloidogenic activity of gallic acid: Implication for the therapy of Alzheimer's disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 711, 109022. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.109022>

- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Çelik, S. E. (2008). Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchimica Acta*, 160(4), 413–419. <https://doi.org/10.1007/s00604-007-0777-0>
- Ben Yakoub, A. R., Abdehedi, O., Jridi, M., Elfalleh, W., Nasri, M., & Ferchichi, A. (2018). Flavonoids, phenols, antioxidant, and antimicrobial activities in various extracts from *Tossa jute* leave (*Corchorus olitorus* L.). *Industrial Crops and Products*, 118, 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.03.047>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bou Dargham, M., Matar Boumosleh, J., Farhat, A., Abdelkhalek, S., Bou-Maroun, E., & el Hosry, L. (2022). Antioxidant and anti-diabetic activities in commercial and homemade pomegranate molasses in Lebanon. *Food Bioscience*, 46, 101540. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101540>
- Brito, T. B. N., Ferreira, M. S. L., & Fai, A. E. C. (2022). Utilization of agricultural by-products: Bioactive properties and technological applications. *Food Reviews International*, 38(6), 1305–1329. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1804930>
- Çam, M., Hışıl, Y., & Durmaz, G. (2009). Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chemistry*, 112(3), 721–726. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.009>
- Çam, M., İçyer, N. C., & Erdoğan, F. (2014). Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. *LWT-Food Science and Technology*, 55(1), 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.011>
- Chen, D., Bai, R., Yong, H., Zong, S., Jin, C., & Liu, J. (2022). Improving the digestive stability and prebiotic effect of carboxymethyl chitosan by grafting with gallic acid: *In vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 214, 685–696. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.06.170>
- Corbin, C., Fidel, T., Leclerc, E. A., Barakzoy, E., Sagot, N., Falguières, A., ... & Hano, C. (2015). Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 26, 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.02.008>
- Da Porto, C., Porretto, E., & Decorti, D. (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(4), 1076–1080. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.12.002>
- Dairi, S., Dahmoune, F., Belbahi, A., Remini, H., Kadri, N., Aoun, O., Bouaoudia, N., & Madani, K. (2021). Optimization of microwave extraction method of phenolic compounds from red onion using response surface methodology and inhibition of lipoprotein low-density oxidation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 22, 100301. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2021.100301>
- Elfalleh, W., Kirkan, B., & Sarikurkcu, C. (2019). Antioxidant potential and phenolic composition of extracts from *Stachys tmolea*: An endemic plant from Turkey. *Industrial Crops and Products*, 127, 212–216. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.078>
- Gisbert, M., Barcala, M., Rosell, C. M., Sineiro, J., & Moreira, R. (2021). Aqueous extracts characteristics obtained by ultrasound-assisted extraction from *Ascophyllum nodosum* seaweeds: Effect of operation conditions. *Journal of Applied Phycology*, 33(5), 3297–3308. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02546-5>
- Hashemi, Z., Shirzadi-Ahodashti, M., Mortazavi-Derazkola, S., & Ebrahimzadeh, M. A. (2022). Sustainable biosynthesis of metallic silver nanoparticles using barberry phenolic extract: Optimization and evaluation of photocatalytic, *in vitro* cytotoxicity, and antibacterial activities against multidrug-resistant bacteria. *Inorganic Chemistry Communications*, 139, 109320. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2022.109320>
- Ismail, B. B., Guo, M., Pu, Y., Wang, W., Ye, X., & Liu, D. (2019). Valorisation of baobab (*Adansonia digitata*) seeds by ultrasound assisted extraction of polyphenolics. Optimisation and comparison with conventional methods. *Ultrasonics Sonochemistry*, 52, 257–267. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.11.023>
- Jing, P., Ye, T., Shi, H., Sheng, Y., Slavin, M., Gao, B., Liu, L., & Yu, L. (Lucy). (2012). Antioxidant properties and phytochemical composition of China-grown pomegranate seeds. *Food Chemistry*, 132(3), 1457–1464. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.002>
- Kaderides, K., Kyriakoudi, A., Mourtzinis, I., & Goula, A. M. (2021). Potential of pomegranate peel extract as a natural additive in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 115, 380–390. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.050>
- Karaçelik, A. A., Şeker, M. E., & Karaköse, M. (2022). Determination of antioxidant activity of different extracts from bark of *Pinus* spp. grown in Giresun (Turkey) province—phenolic analysis by RP-HPLC-DAD. *Kahramanmaraş Sütçü İmam University Journal of Agriculture and Nature*, 25(1), 10–18. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.875313>

- Kashyap, P., Riar, C. S., & Jindal, N. (2022). Effect of extraction methods and simulated *in vitro* gastrointestinal digestion on phenolic compound profile, bio-accessibility, and antioxidant activity of *Meghalayan* cherry (*Prunus nepalensis*) pomace extracts. *LWT-Food Science and Technology*, *153*, 112570. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112570>
- Ma, Y.-L., Sun, P., Feng, J., Yuan, J., Wang, Y., Shang, Y.-F., Niu, X.-L., Yang, S.-H., & Wei, Z.-J. (2021). Solvent effect on phenolics and antioxidant activity of Huangshan Gongju (*Dendranthema morifolium* (Ramat) Tzvel. cv. Gongju) extract. *Food and Chemical Toxicology*, *147*, 111875. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111875>
- Méndez, D. A., Fabra, M. J., Odriozola-Serrano, I., Martín-Belloso, O., Salvia-Trujillo, L., López-Rubio, A., & Martínez-Abad, A. (2022). Influence of the extraction conditions on the carbohydrate and phenolic composition of functional pectin from persimmon waste streams. *Food Hydrocolloids*, *123*, 107066. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107066>
- Mesías, M., Navarro, M., Gökmen, V., & Morales, F. J. (2013). Antiglycative effect of fruit and vegetable seed extracts: Inhibition of AGE formation and carbonyl-trapping abilities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *93*(8), 2037–2044. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6012>
- Mrkonjić, Ž., Rakić, D., Olgun, E. O., Canli, O., Kaplan, M., Teslić, N., Zeković, Z., & Pavlić, B. (2021). Optimization of antioxidants recovery from wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) by ultrasound-assisted extraction: Multi-response approach. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, *24*, 100333. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2021.100333>
- Naji, A. M., Başıyigit, B., Alaşalvar, H., Salum, P., Berktaş, S., Erbay, Z., & Çam, M. (2022). Instant soluble roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) powder rich in bioactive compounds: Effect of the production process on volatile compounds. *Journal of Food Measurement and Characterization*. <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01593-x>
- Pandey, A., Belwal, T., Sekar, K. C., Bhatt, I. D., & Rawal, R. S. (2018). Optimization of ultrasonic-assisted extraction (UAE) of phenolics and antioxidant compounds from rhizomes of *Rheum moorcroftianum* using response surface methodology (RSM). *Industrial Crops and Products*, *119*, 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.019>
- Paul, A., & Radhakrishnan, M. (2020). Pomegranate seed oil in food industry: Extraction, characterization, and applications. *Trends in Food Science & Technology*, *105*, 273–283. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.014>
- Peng, Y. (2019). Comparative analysis of the biological components of pomegranate seed from different cultivars. *International Journal of Food Properties*, *22*(1), 784–794. <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1609028>
- Pinto, D., Vieira, E. F., Peixoto, A. F., Freire, C., Freitas, V., Costa, P., Delerue-Matos, C., & Rodrigues, F. (2021). Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from chestnut shells by subcritical water extraction using response surface methodology. *Food Chemistry*, *334*, 127521. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127521>
- Qu, W., Pan, Z., Zhang, R., Ma, H., Zhu, B., Wang, Z., & Atungulu, G. G. (2009). Integrated extraction and anaerobic digestion process for recovery of nutraceuticals and biogas from pomegranate marc. *Transactions of the ASABE*, *52*(6), 1997–2006. <https://doi.org/10.13031/2013.29196>
- Sagar, N. A., Pareek, S., Sharma, S., Yahia, E. M., & Lobo, M. G. (2018). Fruit and vegetable waste: Bioactive compounds, their extraction, and possible utilization. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *17*(3), 512–531. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12330>
- Santiago-Adame, R., Medina-Torres, L., Gallegos-Infante, J. A., Calderas, F., González-Laredo, R. F., Rocha-Guzmán, N. E., Ochoa-Martínez, L. A., & Bernad-Bernad, M. J. (2015). Spray drying-microencapsulation of cinnamon infusions (*Cinnamomum zeylanicum*) with maltodextrin. *LWT-Food Science and Technology*, *64*(2), 571–577. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.020>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, *16*, 144–158.
- Sinha, S., & Tripathi, P. (2021). Trends and challenges in valorisation of food waste in developing economies: A case study of India. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, *4*, 100162. <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2021.100162>
- Tülek, Z., Alaşalvar, H., Başıyigit, B., Berktaş, S., Salum, P., Erbay, Z., Telci, I., & Çam, M. (2021). Extraction optimization and microencapsulation of phenolic antioxidant compounds from lemon balm (*Melissa officinalis* L.): Instant soluble tea production. *Journal of Food Processing and Preservation*, *45*(1). <https://doi.org/10.1111/jfpp.14995>
- Willis, R. B. (1998). Improved method for measuring hydrolyzable tannins using potassium iodate. *The Analyst*, *123*(3), 435–439. <https://doi.org/10.1039/a706862j>
- Wu, J., Wang, X., He, Y., Li, J., Ma, K., Zhang, Y., Li, H., Yin, C., & Zhang, Y. (2022). Stability evaluation of gardenia yellow pigment in presence of different phenolic compounds. *Food Chemistry*, *373*, 131441. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131441>
- Zhang, J., & Lee, T. G. (2021). Optimization of phenolics and flavonoids extraction from the fruit of

Empetrum nigrum var. japonicum from Jeju Island in South Korea. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 98, 350–357. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.03.031>
Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999).

The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555–559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)