T.C
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NAR DOKULARINDAN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARIN BİYOLOJİK VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ

Seba ALSATAF

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2019

Doç. Dr. Mehmet KARAASLAN danışmanlığında, Seba ALSATAF'nın hazırladığı 'Nar Dokularından Elde Edilen Ekstraktların Biyolojik ve Antimikrobiyal Aktiviteleri' konulu bu çalışma 16/12/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Doç. Dr. Mehmet KARAASLAN ……..

Üye : Prof. Dr. Hasan VARDİN ……..

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Hidayet SAĞLAM ……..

Bu tezin Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında yapıldığını ve Enstitümüz kurallarına göre düzenlendiğini onaylarım.

Enstitü Müdürü
Doç. Dr. İsmail HİLALİ

Bu çalışma HÜBAK tarafından desteklenmiştir
Proje No: 19053

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET i

ABSTRACT ii

TEŞEKKÜR iii

ŞEKİLLER DİZİNİ iv

ÇİZELGELER DİZİNİ v

SİMGELER DİZİNİ vi

1.GİRİŞ 1

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 8

2.1.Çözünür (serbest) ve çözünmeyen (esterleşmiş ve bağlı) fenolik ekstraksiyonu 8

2.2.Biyoaktif bileşiklerin tayini 11

2.3.Biyolojik aktivitelerin belirlenmesi 14

2.3.1.Antioksidan aktivite 14

2.3.2.Antidiyabetik aktivite 19

2.3.3.Antimikrobiyal aktivite 20

2.4.Bireysel fenolik bileşiklerin belirlenmesi 22

2.4.1.Yüksek performanslı sıvı kromatografi-kütle spektrometresi HPLC-MS 22

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER 23

3.1. Materyal 23

3.1.1.Nar kaynağı 23

3.1.2.Kimyasallar 23

3.2. Yöntem 24

3.2.1. Solvent konsantrasyonunun optimizasyonu 24

3.2.2.Serbest fenolik (çözünür fenolik) bileşiklerin ekstraksiyonu 24

3.2.3.Esterleşmiş fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu 24

3.2.4.Bağlı fenolikler (çözünmeyen fenolik) bileşiklerin ekstraksiyonu 25

3.2.5.pH analizi 26

3.2.6. % Kuru madde içeriği 26

3.2.7. % Kül içeriği 26

3.2.8.Biyoaktif bileşiklerin tayini 27

3.2.9.Biyolojik aktivitelerin belirlenmesi 28

3.2.10.Bireysel fenolik bileşiklerin LC-MS ile belirlenmesi 31

3.2.11. Nar dokularının şeker bileşimlerinin HPLC ile belirlenmesi 32

3.2.12. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) 32

3.2.13. İstatistiksel analiz 32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 33
4.1.Solvent kombinasyonunun optimizasyonu 33
4.2.pH analizi 33
4.3.%Kuru madde içeriği 34
4.4.%Kül içeriği 34
4.5.Nar dokularında bulunan biyoaktif bileşikler 35
4.6.Nar dokularının serbest, esterleşmiş ve bağlı fenolik fraksiyonlarının antioksidan aktivitesi ... 40
4.6.1. Radikal süpürücü aktivitesi 41
4.6.2. İndirgeyici antioksidan gücü 42
4.7.Nar dokularının serbest, esterleşmiş ve bağlı fenolik fraksiyonlarının Anti-diyabetik aktivitesi 44
4.8.Nar dokularının antimikrobiyal aktivitesi 46
4.9.Nar dokularında fenolik bileşiklerin ve şeker kompozisyonunun belirlenmesi 51
4.10.Nar dokularında taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi 54
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 56
6. KAYNAKLAR 58
ÖZGEÇMİŞ 66
EKLER 67

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

NAR DOKULARINDAN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARIN BİYOLOJİK VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ

Seba ALSATAF

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet KARAASLAN
Yıl: 2019 , Sayfa: 69

Nar (*Punica granatum L*), insan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerinden dolayı son yıllarda dikkat çeken bir meyvedir. Farklı nar dokularının serbest, esterleşmiş, bağlı fenolik içerikleri, antioksidan kapasiteleri, antimikrobiyal ve diyabetik aktivitelerini daha iyi aydınlatmak için çalışmalar yapılması gerekmektedir. Bu çalışmada nar kabuğu (NK), nar çekirdeği (NÇ), nar mezokarpı (NM) ve nar suyu (NS) üzerinde araştırmalar yapılmıştır. Serbest, esterleşmiş ve çözünmeyen bağlı fenolikler tanımlanmıştır ve sıvı kromatografi-elektrosprey iyonizasyon tandem kütle spektrometrisi kullanılarak miktarları ölçülmüştür. Hücre duvarı lokalize olan çözünmeyen fenolikleri elde etmek için enzimatik, termal, alkali metotlar kullanılmıştır. Sonuçlar, enzimatik hidrolizin diğer iki metoda göre çözünmeyen fenoliklerin ekstraksiyonunu daha iyi sağladığını göstermiştir. Fenoliklerin toplam konsantrasyonu, NK'de en yüksek ve NÇ'de en düşük olan 3.52 mg ile 84.1 mg gallik asit eşdeğeri (GAE) / 100 g KA arasında değişmiştir. Bağlı fenoliklerin toplam fenolik maddelerin içerisindeki oranları NK, NM, NÇ olarak sırasıyla %7.13, %40, %9.64, %31.8 olmuştur. Nar kabuğundaki fenolik maddeler içerisinde en yüksek konsantrasyonu sahip olan kateşin (1063.2 µg/g), mezokarpta ellajik asit (590.8 µg/g), çekirdeklerde ellajik asit (81.1 µg/g) ve nar suyunda phloridzindi hidrat (28.7 µg/g) olarak tespit edilmiştir. Ekstraktların antioksidan aktivitesi DPPH, ABTS, FRAP ve CUPRAC metotları kullanılarak araştırmıştır. Nar ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi, patojenik bakterilere, küfe ve mayaya karşı in *vitro* koşullarda test edilmiştir ve minimum inhibitör konsantrasyon (MIC), minimum bakterisidal / fungisidal konsantrasyon (MBC / MFC) ve inhibisyon çaplarının ortalaması olarak tanımlanmıştır. Nar dokularının anti-diyabetik potansiyelleri ayrıca karaciğer bozuklukları, şişkinlik ve karın krampları gibi çeşitli yan etkilere neden olduğu bildirilen α-amilaz ve α-glukosidaz enzimleri üzerindeki inhibe edici aktiviteleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, her bir nar dokusunun, kendine özgü antioksidan, antidiyabetik ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

ANAHTAR KELIMELER: nar, bağlı fenolik, CUPRAC, MIC, anti-diyabetik

ABSTRACT

MSc Thesis

BIOLOGICAL AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF POMEGRANATE TISSUE EXTRACTS

Seba ALSATAF

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet KARAASLAN
Year: 2019 , Page: 69

Considerable attention was given to studies on pomegranate (*punica granatum L*) as the reports indicate its positive effects on human health. Still, much work needs to be done to better elucidate free, esterified, bound phenolic contents, antioxidant capacities, antimicrobial and anti-diabetic activities of distinct pomegranate tissues. The pomegranate parts investigated in this study included pomegranate peel (PP), pomegranate seed (PS), pomegranate mesocarp (PM), and pomegranate juice (PJ). Free, esterified, and insoluble-bound phenolics were simultaneously identified and quantified by using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. Enzymatic, thermal, alkaline treatments have been employed to obtain the cell wall localized insoluble phenolics. The results indicated that enzymatic hydrolysis contributed to the extraction of insoluble phenolics rather than the two other treatments. The total concentration of phenolics ranged from 3.8 mg to 86.6 mg gallic acid equivalents (GAE)/100 g DW as being the highest in PP and the lowest in PS. The percentage contribution of bound to total phenolics was %7.13, %9.64, %31.8 in PP, PM, PS, respectively. Catechin content was remarkable in PP (1063.2 µg/g), ellagic acid in PM (590.8 µg/g), ellagic acid in PS (81.1 µg/g), phloridizindi hidrat in PJ (28.7 µg/g). The antioxidant activity of the extracts was investigated using DPPH, ABTS, FRAP and CUPRAC methods. The antimicrobial activity of pomegranate extracts was tested *in vitro* against pathogenic bacteria, fungi, and yeast and defined as minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal/fungicidal concentration (MBC/MFC) and mean of inhibition diameters. The anti-diabetic potentials of pomegranate tissues were also evaluated by α-amylase and α-glucosidase inhibitors which are reported to cause several side effects, such as liver disorders, flatulence and abdominal cramping. Results indicated that each pomegranate tissue has its own characteristic antioxidant, antidiabetic, and antimicrobial activity.

KEYWORDS: pomegranate, bound phenolic, CUPRAC, MIC, anti-diabetic

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimi boyunca beni cesaretlendiren ve her sorun yaşadığımda destek veren ayrıca bize sağladığı güzel çalışma ortamı ve maddi, manevi desteklerinden dolayı ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli danışman hocam Doç.Dr.Mehmet KARAASLAN'a teşekkür ederim, Tez çalışmanın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana büyük destek veren sayın Prof.Dr.Hasan VARDİN'e teşekkür ederim, Antimikrobiyal konusunda bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Hidayet SAĞLAM'a teşekkür ederim, Laboratuvar aşamasında bana yardımcı olan ve desteklerin esirgemeyen Arş.Gör.Bülent BAŞYİĞİT'e teşekkür ederim, Tez süreci boyunca manevi desteğini esirgemeyen Dr.Selin ALİHANOĞLU'na teşekkür ederim, Hayatımın her alanında olduğu gibi tez çalışmama hazırlarken de her aşamada bana yardımcı olan arkadaşım Demet EKTİREN'e ve meslektaş arakdaşlarım Şifa KANDEMİR ve İmad ALJASSEM'e teşekkür ederim.

Bu süreçte maddi ve manevi desteklerin esirgemeyen ve her zaman yanımda olan değerli aileme sonsuz teşekkürler. Şuan aramızda olmasada daima yanımda hissteğim babam Kamel ALSATAF'a tezimi sunuyorum.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 3.1. Nar dokularının (kabuk, mezokarp, çekirdek) tozları 20
Şekil 4.2. Nar dokularının (kabuk, mezokarp, çekirdek) kuru madde analizi 30
Şekil 4.3. Nar kabuğu, mezokarpı, çekirdekleri ve nar suyunun *E.coli* karışı antimikrobiyal aktivitesi 44
Şekil 4.4. Nar kabuğu, mezokarpı, çekirdekleri ve nar suyunun P.aeruginosa karşı antimikrobiyal aktivitesi 44
Şekil 4.5. Nar kabuğu, mezokarpı, çekirdekleri ve nar suyunun *E.faecalis* karşı antimikrobiyal aktivitesi 45
Şekil 4.6. Nar kabuğu, mezokarpı, çekirdekleri ve nar suyunun *S.aureus* karşı antimikrobiyal aktivitesi 45
Şekil 4.7. Nar kabuğu, mezokarpı, çekirdekleri ve nar suyunun *C.albicans* karşı antimikrobiyal aktivitesi 46
Şekil 4.8. Nar dokularının SEM görüntüleri 51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 4.1. Nar dokularının ve nar suyunun pH değerleri 29
Çizelge 4.2. Nar dokularının ve nar suyunun % kuru madde değerleri 30
Çizelge 4.3. Nar dokularının ve nar suyunun % kül madde değerleri 30
Çizelge 4.4. Nar dokularının ve nar suyunun fenolik madde içerikleri 35
Çizelge 4.5. Nar kabuğu, mezokarpı, çekirdeği ve nar suyundan elde edilen, serbest, esterleşmiş, ve çözünmez bağlanmış fenolik fraksiyonların antioksidan aktiviteleri 39
Çizelge 4.6. Nar kabuğu, mezokarpı, çekirdeği ve nar suyundan elde edilen, serbest, esterleşmiş, ve çözünmez bağlanmış fenolik fraksiyonların IC_{50} değerleri 41
Çizelge 4.7. Nar kabuğu, mezokarpı, çekirdeği ve nar suyundan elde edilen, serbest, esterleşmiş, ve çözünmez bağlanmış fenolik fraksiyonların antimikrobiyal aktiviteleri 47
Çizelge 4.8. Nar kabuğu, mezokarpı, çekirdeği ve nar suyunun fenolik madde bileşikleri 49
Çizelge 4.9. Nar kabuğu, mezokarpı, çekirdeği ve nar suyunun şeker içerikleri 50

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

NK	Nar kabuğu
NM	Nar mezokarpı
NÇ	Nar çekirdeği
NS	Nar suyu
HCl	Hidroklorik asit
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
$AlCl_3$	Alüminyum klorür
$NaNO_2$	Sodyum nitrat
KCl	Potasyum klorür
DE	Dietil asetat
EA	Etil asetat
M	Molarite
mL	Mililitre
Nm	Nanometre
µmol	Mikromol
µl	Mikrolitre
KA	Kuru ağırlık
OS	Oda sıcaklığı
TÇK	Toplam çözünür katılar
ROS	Reaktif oksijen radikalleri
TFM	Toplam fenolik madde
HT	Hidrolizlenebilir tanen
MIC	Minimum inhibitör konsantrasyonu
MBC	Minimum bakterisidal konsantrasyonu
MFC	Minimum fungisidal konsantrasyonu
GAE	Gallik asit eşdeğeri
TAE	Tannik asit eşdeğeri
SGE	Siyanidin-3-O-glükozit eşdeğeri
AA	Antioksidan akivite
ABTS	2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiyazolin-6-sülfürik asit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
FRAP	Ferrik indirgeyici antioksidan gücü
CUPRAC	Cupric Ion antioksidan kapasitesi
ORAC	Oksijen radikal emme kapasitesi
TEAC	Trolox eşdeğeri antioksidan kapasiteli

1.GİRİŞ

Nar bitkisinin latince ismi *Punica granatum L*. dir ve Hazar denizi, Doğu Anadolu, Iran toprakları bu bitkinin ilk kültüre alındığı yerler olarak bilinmektedir. İçerdiği vitaminler, biyoaktif bileşenler ve mikro besin elementleri dolayısıyla yüzyıllar boyunca şifalı amaçlarla kadim kültürlerde tüketilmesi tavsiye edilmiştir. Batı Asya ve Akdeniz ülkelerinde ılıman iklim koşullarında yaygın olarak yetiştirilmektedir. Narın ortak adı (*Punica granatum*), Latince ponus ve granatus kelimelerinden türetilmiş olup aynı zamanda anar, dalim ve pomegranate gibi farklı isimlerle de tanımlanmıştır. Nar temel olarak 4 ana kısımdan oluşur. Bu kısımlar; kabuk, çekirdek, taneler, ve beyaz zardan (mezokarp) oluşmaktadır. Nar %60-67 tanelerden ve %33-40 kabuktan oluşmaktadır. Tanelerin meyve suyu verimi %76-85'ken %45-61 bütün narın meyve suyu verimi olarak ölçülmektedir. Nar meyvesi %75 su, %1.6 protein, 16 ppm askorbik asit, %0.7 kül ile yüksek miktarda mineralden oluşmaktadır ve asitlik değeri %0.58 olarak bildirilmiştir. Bu minerallere örnek olarak kalsiyum, fosfor, magnezyum, potasyum, sodyum, demir, çinko, mangan ve bakır verilebilir (Opara ve ark., 2008).

Dünyada en fazla nar üreten ülkeler arasında Türkiye yer almaktadır. Türkiye, koyu renkli sulu Hicaz çeşidiyle öne çıkan nar yetiştiricisidir. Türkiye'deki ekolojik koşullarının uygunluğu ve arazi miktarının çokluğu ve iç-dış talepler üretimi hızlı bir şekilde artırmaktadır. Şanlıurfa, Türkiye'de nar üretiminde önemli bir yere sahiptir ve bölgenin Türkiye'nin nar üretiminin yüzde 20'sini karşıladığı bildirilmektedir (Çam ve ark., 2010).

Nar meyvesi sofralık olarak tüketildiği gibi meyve suyu, şaraplar, aromalar ve ekstrakt gibi çeşitli ürünlere işlenir. Taze nar meyvesi tüketiminin artmaya devam etmesi beklenmektedir. Nar veya nar dokularını içeren farmakolojik aktiviteye sahip 400'den fazla işlenmiş ürün pazarda bulunmaktadır. Nar işleme sırasında çok sayıda atık ortaya çıkmaktadır. Meyve işleme tesislerinde önemli miktarda atık meydana gelmektedir. Nar atıkları mezokarp dokusu (NM), nar kabuğu (NK) ve nar

çekirdeğinden (NÇ) oluşmaktadır. Nar atıkları toplam meyve ağırlığının yaklaşık % 60 karşılık gelmektedir (Gomez ve ark., 2013).

Doğal bileşikler, organik maddeler, fitokimyasallar ve nutrasötikler nar dokularında bulunmaktadır. Fitofenolik kompozisyonlar, bitkilerin yenilebilir ve yenilmeyen kısımlarında farklılıklar gösterir ve bu alanda araştırmalar halen devam etmektedir. Nar meyvesinin (kabuğu, mezokarp, çekirdekleri ve meyve suyunun) fenolik asitler, flavanoller, flavonlar, flavononlar, antosiyanidinler ve antosiyanin bakımından zengin olduğu bildirilmiştir (Rummun ve ark., 2013). Nar fitokimyasalları içinde en yaygın olarak bulunan doğal bileşenleri polifenollerdir (çoklu hidroksil grupları içeren fenolik halkalar). Nar polifenolleri, flavonoidleri (flavonoller, flavanoller ve antosiyaninler), kondense tanenleri (proantosiyanidinler) ve hidrolizlenebilir tanenleri (ellajitaninler ve gallotaninler) içerir. Nardan tanımlanan diğer fitokimyasallar organik ve fenolik asitler, steroller ve triterpenoidler, yağ asitleri, trigliseritler ve alkaloitlerdir.

Doğal polifenoller arasında, basit moleküller (fenolik asitler, fenilpropanoidler, flavonoidler), polimerizasyonla sentezleren bileşikler (ligninler, melaninler, tanenler) ve yaygın şekilde bulunan flavonoidler olarak isimlendirlir (Viuda ve ark., 2010). Kimyasal olarak, fenolik asitler, bir veya daha fazla hidroksillemiş aromatik halkaya sahip moleküller olarak tanımlanabilir (Noratiqah ve ark., 2018).

Nar kabuk ekstraktı içerisinde en çok flavonoidler (luteolin, kersetin ve kaempferol) bulunurken; nar tanelerinde yüksek miktarda antosiyaninler bulunur (pelargonidin-3-glukozit, siyanidin-3-glukozit, delphinidin-3-glukozit, pelargonidin 3,5-diglukozit, siyanidin 3,5-diglukozit ve delfinidin 3,5-diglukozit14,15). Antosiyaninler, nar suyunun parlak kırmızı renginden sorumlu olan suda çözünür pigmentlerdir (Viuda ve ark., 2010).

Tanenler, kimyasal ve biyolojik olarak 3 gruba ayrılmış olup bunlar; kondanse tanenler veya proantosiyanidinler, hidrolizlenebilir tanenler (HT) ve gallotanenler olarak bilinmektedir (Shukla ve ark., 2008). HT en çok kabuklar, mezokarp ve

meyve çekirdeklerinde bulunur. Ayrıca, HT nar suyunda bulunan baskın polifenollerdir ve antioksidan aktivitesinin % 92'sini oluşturur (Saad ve ark., 2012). Baskın olan nar HT bileşenleri arasında, meyve suyunun toplam antioksidan kapasitesinin yaklaşık yarısını oluşturan punikalajin olarak söylenebilir. Nar suyundaki çözünür polifenol içeriğinin % 0.2 ile % 1.0 arasında değiştiği bildirilmiştir (Fischer ve ark., 2011). HT, şekerler gibi poliollerden oluşan gallik asit ve ellajik asit esterleridir. HT enzimatik ve enzimatik olmayan hidrolize karşı hassastırlar ve ayrıca hidroliz ürünlerine göre de sınıflandırılırlar: gallotaninler; gallik asit ve glukoz verirken, ellagitaninler; ellajik asit ve glikoz ürünlerini verir. Monomerlerin bu kombinasyonu büyük yapısal heterojenliğe yol açar. Örneğin, nar yaprakları, kabukları ve meyveleri 18' den fazla bireysel HT yapısı içerir. Diğer yapılar arasında gallotaninler, ellagitanninler (bir veya daha fazla galloil ikameli D-glukozun ellagik asit esterleri), punikalajin ve punikalin gibi esterler bulunmaktadır (Opara ve ark., 2008).

Son zamanlarda, bitkisel meyve ürünleri ve besin takviyelerinde nar meyve dokularının kullanımında bir artış olmuştur. Bu ekstraktların içerisinde, meyvelerin meyve suyu, nar kabukları, mezokarp ve çekirdekler gibi çeşitli dokulardan elde edilmiş polifenol ve yağ asidi bileşenleri bulunabilir. Araştırmalar, NS' nin meyve ağırlığının yaklaşık % 30' unu oluşturduğu ve bileşimde şeker, vitamin, polisakkarit, polifenol, mineral ve çoklu doymamış n-3 yağ asitleri olduğunu ortaya koymuştur (Karimi ve ark., 2017). Örneğin, nar çekirdeği yağı % 60 'dan fazla punjik asit ve konjuge linolenik içerir. Nar çekirdeği yağında bulunan diğer yağ asitleri arasında linoleik, oleik, palmitik, stearik, ve palmitoleik asit bulunmuştur. Çekirdekler ince beyaz bir mezokarp ile kaplıdır ve yüksek tannik asit içeriğinden dolayı bu zarın tadı acı olarak algılanır. Nar kabuğu, toplam meyve ağırlığının % 26-30' unu oluşturmaktadır. Nar suyunun işlenmesi sırasında açığa çıkan bir atık materyal olarak değerlendilir. Nar atıkları (kabuğu, mezokarp ve çekirdek) her ne kadar yüksek miktarda polifenol bileşikler ve faydalı biyolojik ajanlar içerse de genellikle atık olarak işlem görmektedir ve herhangi bir şekilde değerlendirilmemektedir (Rowayshed ve ark., 2013). Taze meyve suyunun yaklaşık % 85.4'ü sudur, bunun dışında toplam çözünür katılar (TÇK), toplam şekerler, indirgen şekerler,

antosiyaninler, fenolikler, askorbik asit, proteinler ve antioksidanlar mevcuttur (Karimi ve ark., 2017). Nar suyunun diğer ana bileşenleri, ellajik, kafeik ve punijik asitlerdir. Bu fenolik bileşikler çeşitli biyoaktivitelere sahiptir ve kimyasal yapı olarak farklı alt gruplara ayrılır (Elfalleh ve ark., 2011).

Narın sağlığa olan faydaları son yıllarda açıkça ortaya konmuştur. Mısır'da NK, iltihap giderici, ishal, bağırsak solucanları, öksürük ve kısırlığın tedavisinde kullanmıştır (Lansky ve ark., 2007). Nar tüketiminin, kalp hastalıkları, diyabet, Alzheimer hastalığı, artirit, obezite, bakteriyel enfeksiyonlar, tümör oluşumu ve kardiyovasküler rahatsızlıkların oluşumunun engellemesiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Narların koruyucu etkisinin zengin fenolik, antosiyanin, flavonoid içeriği ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, nar atıklarının biyolojik aktivitesi ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Araştırmalar, nar polifenollerinin ve diğer flavonoid bileşiklerin influenza A virüsüne karşı virüloidal olduğunu göstermiştir, virüsün hücrelerde çoğalmasını engellemiştir (Albarri ve ark., 2017). Diş hekimliği alanında, periodontitis hastalarında dişeti kanaması oluşumunun ve plak tedavisinde kullanılmıştır (Karimi ve ark., 2017). Polifenolik bileşikler iltihaplanma önleyici ve immünomodülatör aktivitelere sahip oldukları gibi, aynı zamanda önceden beri var olan iltihaplanma biyolojik markörlerini de azaltmıştır (Rogers ve ark., 2005). Nar kabuğu da hiperkolesterolemi ve ateroskleroz tedavisi için bir diyet lifi kaynağı olarak önerilmiştir (Ismail ve ark., 2012).

Son yıllarda yaşam koşullarına, teknolojiye ve beslenme şekillerine bağlı olarak oluşan stres faktörleri; serbest radikallerin artmasına, özellikle kanser olmak üzere birçok hastalığın hızlı bir şekilde ortaya çıkmasına neden olmuştur. Polifenoller kolayca okside olabilme özelliği nedeniyle antioksidan aktiviteye sahiptirler. Doğal kaynaklı antioksidanlar gıda endüstrisinde koruyucu madde olarak kullanılmakla birlikte; insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle de önemlidirler. Antioksidan maddelerin ekstraksiyonu genellikle çözücü karışımları kullanılarak yapılır. Nar ekstraktlarının antioksidan etkileri özellikle flavonoidler başta olmak üzere sinnamik asit türevleri, kumarinler gibi fenolik bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Kabuk ve çekirdekte bulunan tanen, ellajik asit, ferulik asit,

kafeik asit, klorogenik asit ve protokatasurik asit gibi polifenollerin mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmektedir (McCarrell ve ark., 2008).

Bitkilerin antimikrobiyal bileşikleri genellikle esansiyal yağ kısmında bulunmaktadır. Bu bileşikler bitkinin karekteristik aromasının oluşumundan flavorından da sorumludurlar ve genellikle bitkilerden su buharı distilasyonuyla elde edilirler. Antimikrobiyal aktivite; bitkinin türüne, kompozisyonuna ve konsantrasyonuna, hedef mikroorganizmanın türüne ve yüküne, gıdanın kompozisyonuna, işleme ve depolama koşullarına bağlıdır. Proteinler, lipitler, tuzlar, pH ve sıcaklık, fenolik maddelerin antimikrobiyal aktivitelerini etkileyen faktörlerdir. Antibakteriyel aktivitenin, bileşiminde özellikle punikalajin ve ellagik asit olan nar ekstraktında hidrolize edilebilir tanenlerin ve polifenollerin varlığına bağlı olabileceği gösterilmiştir. Bu, tanenlerin antimikrobiyal etkisinin toksisitesi ve moleküler yapısı ile ilgili olduğu anlamına gelmektedir ve bu sayede antimikrobiyal aktiviteye katkı sunmaktadırlar (Navarro ve ark., 1996).

Serbest radikallerin meydana getirdiği oksidatif stres ve DNA hasarı gibi zararlı etkiler yaşlanma, kanser gelişimi ve birçok hastalıktaki patolojik durum ile ilişkilendirilmiştir. Bitkilerde bulunan flavonoidler oksidatif stres tarafından indüklenen genotoksisiteye karşı da koruyucu etki gösterdiğinden bitki sekonder metabolitleri klinik çalışmalarda kullanılabilecek ideal etken maddelerdir. Son yıllarda sekonder metabolitlerden olan flavonoidlerin bu üstün özellikleri nedeni ile kanser tedavisinde kullanılabilme olanaklarının araştırılması üzerine yapılan çalışmaların hız kazandığı görülmüştür. Doğal fenoliklerin apoptozun indüklenmesini sağlayarak tümör hücresinin eliminasyonunda ve kanser gelişiminin önlenmesinde görev aldığı bildirilmiştir. Bu nedenle apoptozu indükleyici ajanların ideal kanser ilaçları olması umut edilmiştir (Ozgen ve ark., 2008).

İnsanlar arasında en yaygın görülen diyabet türü olan tip 2 diyabet, diyabetli toplam hasta sayısının yüzde 90 ile 95'i arasında görülmektedir. Bu tip diyabet genellikle yaş, obezite, kalıtım, hastalıklı aile öyküsü, kişisel tıbbi geçmiş (örneğin

gebelik diyabeti vakaları), fiziksel hareketsizlik ve etnik köken ile ilişkilidir. Tip 2 diyabeti olan hastalar yeterli insüline sahiptir, ancak vücut açıklanamayan nedenlerden dolayı, insülin direnci olarak bilinen insülinden etkin bir şekilde faydalanamamakta ve kullanmamaktadır. Birkaç yıl sonra, insülin üretimi azalır. Hastanın durumu tip 1 diyabete benzer. Kan şekeri biriktirilir ve vücut etkin bir şekilde kendi enerji kaynağını (glikoz) kullanamaz (Elya ve ark., 2015). Nar, son zamanlarda, tip 2 diyabet tedavisinin önlenmesinde etkili bir tıbbi etkiye sahip, çok zengin bir aktif bileşen kaynağı olarak kabul edilmiştir. Nardaki diyabetik etkiye sahip etken maddelerden arasında punikalajin ve ellajik, gallik, oleanolik, ursolik ve allik asitler sayılabilir. Ayrıca, nar suyunun polifenolik tanen ve antosiyaninler nedeniyle tip 2 diyabet üzerinde güçlü bir etkisi vardır. Bu bileşikler temel olarak, bazı antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak doğrudan veya dolaylı olarak meydana gelen reaktif oksijen radikalleri ROS'un zarar verici etkilerini antagonize ederler (Banihani ve ark., 2013).

Narla ilgili önceki çalışmalar, çoğunlukla yenilebilir parçaların serbest fenolik içeriğine yoğunlaşmıştır ve sadece bazı çalışmalar diğer nar dokularından elde edilen serbest fenoliklerin antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesini bildirmiştir (Kharchoufi ve ark., 2018). Hücre çeperi bileşenleri üzerinde lokalize edilmiş esterleşmiş ve çözünmeyen bağlı fenolik fraksiyonun uygun bir şekilde tespit edilmeden nar dokularının fenolik içeriğinin muhtemelen hafife alındığı açıktır. Nar dokularında bulunan çözünür, esterleşmiş ve çözünmeyen bağlı fenoliklerin daha ileri analizleri ve bunların yenilebilir kısımlarla karşılaştırılması gerekir.

Bu nedenle, bu çalışmanın amacı, Hicaz nar dokularının fenolik içeriğini değerlendirmek ve sıvı kromatografi-elektrosprey iyonizasyon tandem kütle spektrometresi kullanılarak serbest, esterleşmiş ve çözünmeyen bağlı formları içeren fenolik bileşiklerin tanımlanması ve miktarının belirlenmesidir. Ayrıca, üç fenolik formunu içeren çeşitli nar ekstraktlarının antimikrobiyal etkileri *Pseudomonas, Enterobacter, Enterococcus, Staphylococcus, Candida, Aspergillus spp*. üzerinde araştırılmıştır. Türkiye'de en yaygın olarak yetiştirilen Hicaz narlarının kabuk, mezokarp, çekirdek gibi atıklarındaki serbest, esterleşmiş ve çözünmeyen bağlı

fenolik içeriklerinin belirlenmesi yenilebilir kısımlarla karşılaştırılması ve bunun yanı sıra nar dokularının ve nar suyunun antimikrobiyal, antioksidan, anti-diyabet gibi biyolojik fonksiyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma kapsamında elde edilen nar atıklarının gıda, ilaç ve nütrasötik sektörlerinde kullanım potansiyellerinin belirlenmesine ışık tutabilecektir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1.Çözünür (serbest) ve çözünmeyen (esterleşmiş ve bağlı) fenolik ekstraksiyonu

Alkali hidrolizi yöntemiyle *Brassica campestris* ve *Brassica napus* tohumlarının fenolik madde içerikleri ve yapılarındaki esterleşmiş fenolik maddeler metanol-aseton-su çözücüsü ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraktlar hazırlandıktan sonra fenolik maddeler gaz-sıvı kromatografisiyle belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ekstraktlarda O-kumarik, ρ-kumarik, trans-izoferulik, trans-ferulik, kafeik, trans-sinapik gibi fenolik maddeler bulunmuştur (Krygier ve ark., 1982).

Buğdaydaki fenolik maddeler alkali hidrolizi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve elektrokimysal algılama ile araştırılmıştır. En çok bulunan fenolik maddeler ferulik asit, sinapik asit ve kafeik asittir. Ferulik asit (4.3 – 34.2 mg/100 g KA) bulunurken kafeik asit (0.002 – 0.016 mg/100 g KA) olarak bulunmuştur. Toplam polifenol içerikleri 152.4 – 324.0 mg GAE/100 g olarak tespit edilmiştir. Çözünmeyen bağlı fenolik asitlerin, buğdayın antioksidan aktivitesine katkıda bulunduğu görülmektedir (Yoshida ve ark., 2010).

Bolivya mor mısırlarında (*Zea mays L*) serbest ve bağlı fenolik fraksiyonlar 9 farklı çeşitle belirlenmiştir. Serbest fenolik, etanol/su (80:20 h/h) çözücüsü kullanılarak ekstrakt edilirken bağlı fenolik maddeler enzimatik, termal ve alkalin hidrolizi yöntemleriyle ekstrakte edilmiştir. Toplam fenolik madde içeriği 311.0-817.6 mg GAE/100 g KA arasında değişmiştir ve bağlı fenolik maddeler toplam fenolik maddenin % 62.1-86.6'sını oluşturmuştur. Enzimatik hidroliz, diğer yöntemlerden daha yüksek oranda bağlı fenolik ekstrakte etmiştir ve 109.6 - 205.0 mg GAE/100 g KA tespit edilmiştir (Montilla ve ark., 2011).

Siyah, mavi ve sarı buğday serbest fenoliklerin su-metanol çözücüsü kullanılarak ekstrakte edilirken bağlı fenolikler alkalin hidroliz yöntemiyle ekstrakte

edilmiştir. Sonuçlara göre, 28 buğday çeşitelerde serbest ve bağlı fenolik ekstraktlarında bulunan ana fenolik bileşen ferulik asittir. Serbest fenolik fraksiyondaki ana bileşen ρ-kumarik asittir (Abdel-Aal ve ark., 2012).

Alkali hidroliz yöntemiyle buğday kepeğinden fenolikler ekstrakte sonra HPLC ile fenolik asitler analiz edilmiştir. Sonuçlara göre, bağlı fenolik fraksiyonda bulunan ana fenolik asitler ferulik (%43-97) ve ρ-kumarik (%2-55) asit olarak bulunmuştur (Gamel ve ark., 2012).

Asit hidrolizi ve alkalin hidrolizi yöntemleriyle Litchi pulpundan (*Litchi chinensis Sonn*) serbest fenolikler beş farklı çözücü kullanılarak (% 80 metanol, %80 etanol, % 80 aseton,% 80 etil asetat veya deiyonize su; 1: 2, ağırlık / hacim) ekstrakte edilmiştir. Serbest fenolik fraksiyonun toplam fenolik içeriği (121.76±4.23 , 210.67±9.85 mg GAE/100 g KA) bağlı fenolik fraksiyondan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (30.71±0.51 , 61.27±1.78 mg GAE/100 g KA) (Su ve ark., 2014).

Serbest, esterleşmiş ve bağlı fenolik fraksiyonları kimyon (*Nigella sativa L*), keten (*Linum usitatissimum L*), nar (*Punica granatum L*) ve balkabağı (*Cucurbita pepo L*) tohumlarında ve atıklarında araştırılmıştır. Metanol çözücü olarak kullanılarak (%70) serbest fenolikler ekstrakte edilmiştir. Alkali hidroliz yöntemiyle bağlı fenolikler ekstrakte edilirken, esterleşmiş fenolik dietil-etil asetat (DA / EA) çözücüsü kullanılarak eksrakte edilmiştir. Ekstraktlar hazırlandıktan sonra HPLC yüksek performanslı sıvı kromotografisi ile 13 fenolik asit analiz edilmiştir (Krimer ve ark., 2016).

Serbest, esterleşmiş ve bağlı fenolik fraksiyonları nar kabuğundan, mezokarptan ve zardan ilk kez araştırılmıştır. Serbest fenolik %70 aseton çözücü kullanılarak ekstrakte edilirken, bağlı fenolik alkali hidroliz yöntemiyle ekstrakte edilmiştir (Ambigaipalan ve ark., 2016).

Ekstrakte edilebilir ve ekstrakte edilemeyen bağlı fenolik fraksiyonlar ve antioksidan aktiviteleri siyah soya fasulyesi (*Glycinemax L merr*) tohum kabuğunda

ve kotiledonunda araştırılmıştır. Ekstrakte edilebilir fenolikler metanol-su çözücü kullanılarak ekstrakte edilirken, ekstrakte edilebilir olmayan fenolikler iki yöntemle (asit hidrolizi ve alkali hidrolizi) ekstrakte edilmiştir. Sonuçlara göre, asit hidroliz yönteminin alkali hidrolizinden daha etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca, tohum kabuğunda tüm fenolik fraksiyonlar bağlamında kotiledondakinden daha fazla fenolik madde içerdiği belirlenmiştir (Peng ve ark., 2017).

Serbest ve bağlı fenolik fraksiyonları Şili cristalino mısırından (*Zea mays L*) ekstraksiyonu optimize etmiştir. Serbest fenolik, (Dewanto ve ark., 2002)'ya göre ekstrakte edilirken, bağlı fenolikler (Parra ve ark., 2007)'ye göre alkalin hidrolizi yöntemi kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Serbest ve bağlı fenolik fraksiyonların en iyi ekstraksiyon koşulları, 63 dakika - % 69 aseton ve 90 dakika - 3 M NaOH olarak bulunmuştur. Bu koşullarda, serbest ve bağlı fraksiyonların toplam fenolik içeriği sırasıyla 59.9 ± 0.7 – 172.9 ± 1.1 mg GAE/100 g olarak değerlendirilmiştir (Fuentealba ve ark., 2016).

Serbest ve bağlı fenolik fraksiyonların ve antioksidan aktivitleri buğdayda, beyaz kepekte, kırmızı ve siyah pirinçte belirlenmiştir. Serbest fenolik fraksiyon (Shaove ark., 2014) tarafından ekstrakte edilmiştir. Serbest fenolikler hekzan-metanol çözücü ile ekstrakte edilirken, bağlı fenolikler alkali hidroliz metodu ile ekstrakte edilmiştir. Sonuçlar, bağlı fenolik fraksiyonun, serbest fenolik fraksiyondan daha yüksek miktarda toplam fenolik içeriğe sahip olduğunu göstermiştir (Pang ve ark., 2018).

Pirinç endüstrisinden bol miktarda atık olduğu için serbest ve bağlı fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu optimize edilmiştir. Serbest fenolikler için en uygun koşullar % 41-56 etanol / su, 40°C, 10 dakika, ve bağlı fenolikler için en uygun koşullar 10 ml NaOH (2.5-3.6 M) kullanılan alkali hidroliz yöntemi olarak belirlenmiştir. Uygulamalı deney tasarımına göre, pirinç kepeği ve pirinç kabuğundan elde edilen ekstraktların toplam fenolik içerikleri sırasıyla 206-464 mg GAE/100 g ve 67-233 mg GAE/100 g olarak belirlenmiştir (Irakli ve ark., 2018).

2.2.Biyoaktif bileşiklerin tayini

Dört farklı tipte Wonderful nar suyunun toplam fenolik içeriği, Folin-ciocalteu reaktifi (Singleton ve ark., 1999) ile ölçülmüştür. Nar suyunun fenolik içeriği hem deneysel hem de ticari olarak, kırmızı şarap ile aynı aralıkta bulunmuştur. Sonuçlara göre, ticari nar suyunun laboratuarda arillerden (1800-2100 mg / L) üretilen nar suyundan daha yüksek bir fenolik içeriğe (2500 mg / L) sahip olduğunu göstermiştir. Yeşil çay ve kırmızı şaraptaki toplam fenolik bileşik, sırasıyla 1029±36 mg / L, 2036±59 mg / L nar suyundakinden daha düşük olduğunu göstermiştir (Gil ve ark., 2000).

Nar kabuğu ve çekirdeklerinin ekstraktlarındaki fenolik bileşik içerikleri belirlenmiştir ve sonuçlar tanik asit eşdeğeri olarak ifade edilmiştir. Metanol ekstraktının fenolik içeriği maksimum seviye de 2.6-44 %A/A olarak bulunmuştur. Su ekstraktında fenolik içeriği çok düşüktür (63.0 %A/A). Benzer şekilde, toplam fenolik maddelerin nar kabuğundan ekstraksiyonunda en yüksek verim metanol kullanımıyla elde edilmiştir sonra sırasıyla su ve etanol gelmiştir (44.0-18.0-03.0 %A/A). Çekirdeklerden fenolik ekstraksiyonunda en yüksek verim su kullanımıyla elde edilmiştir sonra sırasıyla metanol ve etanol gelmiştir (0.3-2.6-2.1 %A/A) (Singh ve ark., 2002).

Nar kabuğu ve pulp kısımlarının toplam fenolik, flavonoidler ve proantosiyanin içerikleri ölçülmüştür. Nar kabuğu ekstraktında bulunan polifenol bileşikleri (319.4 mg/g), nar pulp ekstraktından (46.9 mg/g) daha yüksektir (Li ve ark., 2006).

Tunus'da yetiştirilen 6 farklı narını suyunun, kabuğunun ve çekirdek yağlarının antosiyanin ve hidroliz edilebilir tanen içerikleri belirlenmiştir. Nar kabuğundaki hem antosiyaninler hem de tanen içerikleri nar suyundan daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Nar çeşitleri arasındaki antosiyaninlerin farklı olduğu gözlenmiştir. Toplam kabuk antosiyaninleri GB3 çeşitinde 63.76 ± 2.47 mg CGE/g KA ve GR çeşitinde 84.31 ± 1.91 mg CGE/g KA olduğu tespit edilmiştir. Meyve suyunda en yüksek antosiyanin değeri CH çeşitinde (48.27 ± 5.01 CGE mg / L) belirlenirken en

düşük değer GB3 çeşitinde (28.15 ± 5.12 CGE mg / L) belirlenmiştir. Toplam kabuk hidrolize edilebilir tanenleri GB3 çeşitinde 111.23 ± 10.22 mg/g KA ve GR çeşitinde 140.55 ± 7.37 mg/g KA olarak tespit edilmiştir. Nar suyunda hidrolize edilebilir tanenler 1.97 ± 0.48 mg TAE/mL ve 3.38 ± 0.67 mg TAE/mL değerleri arasında belirlenmiştir (Elfalleh ve ark., 2011).

Marc nar çeşidindeki toplam fenolik ve flavonoidleri belirlenmek için farklı çözücülerin, sıcaklık koşulları, çözücü-katı oranları ve parçacık boyutları, katı-çözücü ekstraksiyonu üzerindeki etkileri (Wang ve ark., 2011) tarafından araştırılmıştır. Nar kabuğu metanol ekstraktı en yüksek ekstrakt verimine sahiptir %8.26, ardından su (%5.90), etanol (%1.55), aseton (%0.37) ve etil asetat gelmektedir. Ekstraksiyon, 4 saat boyunca 40 ° C'de çözücü / numune 15: 1 (A/A) oranı ile yapılmıştır. Etil asetat ekstraksiyonu %20.24 fenolik madde, %2.65 proantosiyanidin ve %3.92 flavonoid içerikleri ile en yüksek verime sahip olduğu tespit edilmiştir.

Hicaz nar çeşidindeki kabuk, çekirdek ve nar suyu ekstraktlarındaki polifenol bileşikleri, (Orak ve ark., 2012) tarafından belirlenmiştir. Toplam fenolik, antosiyanin, flavonoid ve tanen içerikleri, farklı reaktifler ile UV-spektrofotometre kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, kabuğun zengin bir hidrolize edilebilir tanen kaynağı olduğunu ve nar suyunun kendisine özel kırmızı bir renk veren zengin bir antosiyanin kaynağı olduğunu göstermiştir. Sonuçlara göre, toplam fenolik içeriği nar kabuğunda 126.11 ± 0.40 - 212.48 ± 0.65 µg GAE/mg bulunurken, nar suyunda 25.96 ± 0.40 - 30.25 ± 0.65 µg GAE/mg, ve nar çekirdeklerde 49.67 ± 0.75 - 63.77 ± 2.16 µg GAE/mg olarak bulunmuştur. Antosiyanin içeriği nar suyunda 0.594 ± 1.027 µg/mg, nar kabuğunda 0.058 ± 0.293 µg/mg ve nar çekirdeklerde 0.017 ± 0.040 µg/mg olarak bulunmuştur.

Yedi farklı nar çeşidinin kabuğundan metanolik ekstraktlar kolorimetrik yöntemler kullanılarak toplam fenolik, flavonoid, gallotannin ve antosiyanin içerikleri gibi fenolik içerikler belirlenmiştir. En yüksek toplam fenolik içeriği Gansh çeşitinde bulunurken (295.5 mg / g) en düşük toplam fenolik içeriği Molla de elche

çeşitinde (179.3 mg / g) bulunmuştur. Wonderful çeşidinin toplam antosiyanin içeriği 322.2 ± 11.90 µg C3gE/g KA, toplam flavonoid içeriği 97.8 ± 2.10 mg GAE/g KA seviyesindedir. Farklı nar çeşitlerinin gallotannin içeriği 326.0 ± 35.28 - 783.6 ± 65.11 µg GAE/g KA olarak bulunmuştur. Flavonoidlerin Ruby çeşidinde en yüksek miktar olduğu belirlenmiştir (126.0 ± 0.57 µg/GAE/g KA) (Fawole ve ark., 2012).

Sri Lanka'da yetiştirilen nar çeşitlerinin tanelerinden (Nayana, Daya, Nimali ve Hint) toplam fenolik içerikleri belirlenmişitir. Toplam fenolik içeriği, Hint çeşidinde 1199 mg GAE/L bulunurken Daya çeşidinde 2390 mg GAE/L olarak bulunmuştur (Bopitiya ve ark., 2012).

Hicaz nar üç çeşiti farklı presleme programı ile elde edilen nar sularının polifenol bileşikleri (toplam fenolik ve proantosiyanidinler) tarafından belirlenmiştir. Presleme basıncı ile toplam fenolik içerik arasında doğrusal bir korelasyon bulunmuştur ($y = 263.35x + 1932.4$, $r = 0.979$) (İlmaz ve ark., 2013).

Genellikle narın atık kısımları (çiçek, kapuk, yaprak, gövde ve çekirdeğin), biyoaktif bileşenler açısından zengindir ve bu nedenle gıda uygulamalarında kullanım potansiyeline sahiptir. Nar çiçeği ekstraktı en yüksek flavonoid madde içeriğine sahipitir, bunu takiben kabuk, yaprak, sap ve çekirdek ekstraktları gelmektedir. Ekstraktların toplam fenolik bileşiklerinin içeriği 0.65 ± 0.004 mg GAE / g KA ve 336.51 ± 0.70 mg GAE / g KA arasında bulunmuştur, Çiçek ekstraktı en yüksek fenolik bileşik içeriğine sahip olduğu tespit edimiştir. Toplam fenolik içeriği, 0.332 ± 0.003 mg QE / g KA ve 213.54 ± 3.14 mg QE / g KA arasında önemli farklılıklar göstermiştir (Rummun ve ark., 2013).

Nar suyunun, posasının ve kabuğunun toplam fenolik ve flavonoid içerikleri, su, %50 etanol ve %100 etanol çözücüler kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Toplam fenolik içeriği ve toplam flavonoid içeriği en yüksek sırasıyla kabuk sonra posa ve meyve suyu olarak tespit edilmiştir. Nar posası ekstraktlarından en yüksek toplam fenolik içeriği %100 etanol kullanılarak (282.20 mg CE / 100 ml) bulunmuştur. Nar posasın ekstraktlarından toplam fenolik içeriği %50 etanol çözücü kullanılarak

bulunurken (157.80 mg CE / 100 ml) nar posasın ekstraktlarından toplam fenolik içeriği su çözücü kullanılarak 199.40 mg CE / 100 ml olarak bulunmuştur. Nar kabuğunda en yüksek fenolik içeriği %50 etanol çözücüsü kullanılarak elde edilmiştir (1505 mg CE / 100 ml), ardından su ve %100 etanol çözücü kullanılarak sırasıyla 1197 ve 844.80 mg CE / 100 ml olarak belirlenmiştir (Fawole ve ark., 2016).

Elma ve nar meyvelerinde fenolik içeriklerinin belirlenmesi çalışmaları yapılmıştır. Nar meyvesi, elmadan daha yüksek fenolik madde içeriğine sahiptir (0.60 ± 0.01 ve 0.39 ± 0.01 mg GAE/ml sırasıyla). En yüksek fenolik madde içeriği sırasıyla nar kabuğunda, membranda ve tanelerinde bulunmuştur (0.79 ± 0.02 , 0.81 ± 0.02 ve 0.39 ± 0.01 mg GAE/ml) (Dorsey ve ark., 2017).

Tunus'ta yetiştirilen Nabli ve Gabsi narlarının çiçek, kabuk ve yapraklarının toplam fenolik bileşikleri (Fellah ve ark., 2018) tarafından araştırılmıştır. En yüksek fenolik içerik Nabli çiçeklerinde bulunmuştur (152.6 mg GAE/100 g), ardından Gabsi kabukları ekstraktları (125.8 mg GAE/100 g) gelmektedir. Flavonoidler ve flavonol madde içerikleri Gabsi kabuklarında en yüksektir (19.2-26.0 mg Rutin/100 g) .

2.3.Biyolojik aktivitelerin belirlenmesi

2.3.1.Antioksidan aktivite

Dört farklı Wonderful nar suyunun antioksidan aktivitesi, dört farklı yöntem ile (ABTS, DPPH, DMPD ve FRAP) değerlendirilmiş ve kırmızı şarap ve yeşil çay ile karşılaştırılmıştır. Ticari nar suları, kırmızı şarap ve yeşil çaydan üç kat daha yüksek bir antioksidan aktivite göstermiştir. Bütün narlardan elde edilen ticari nar sularında, sadece tanelerden elde edilen nar sularına göre daha yüksek antioksidan aktivite vardır. Endüstriyel nar işlemenin, meyve kabuğunda bulunan hidrolizlenebilir tanenlerin bir kısmını çıkardığını göstermiştir. Ticari meyve sularının deneysel

olanlara kıyasla daha yüksek antioksidan aktivite gösterebildiği tespit edilmiştir (Gil ve ark., 2000).

Nar kabuğu ve nar çekirdeklerinin etil asetat, su ve metanol ekstraktlarından antioksidan aktivitesi bilirlenmiştir. β-karoten-linoleat ve DPPH yöntemler kullanılarak antioksidan aktivite değerlendirilmiştir. Nar kabuğunun metanol ekstraktı, bütün ekstraktlar arasında en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. β-karoten-linoleat yöntem kullanılarak 50 ppm konsantrasyonda, nar kabuğun etanol, metanol ve su ekstraktlarının sırasıyla %53, %82 ve %64 antioksidan aktivite bulunurken, 100 ppm konsantrasyonda, nar çekirdekleri etanol, metanol ve su ekstraktlarının sırasıyla %39, %22 ve %57 antioksidan aktivite bulunmuştur. DPPH yöntem kullanılarak, 50 ppm'de, nar kabuğunun etanol, metanol ve su ekstraktların sırasıyla %46, %81 ve %43 serbest radikal temizleme aktivitesi bulunurken, 100 ppm'de, nar çekirdeklerinin etanol, metanol ve su ekstraktları, sırasıyla % 26.5, %23.2 ve %39.6 serbest radikal temizleme aktivitesi bulunmuştur (Singh ve ark., 2002).

Nar kabuğu ve mezokarpın etanol, metanol ve aseton ekstraktalrının antioksidan aktivitesi belirlenmiştir. Sonuçlar, nar kabuğu ekstraktının, pulp ekstraktından daha yüksek antioksidan kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir (Li ve ark., 2006).

İran'da altı farklı nar çeşidinin çekirdeklerinden antioksidan aktiviteleri FRAP yöntemiyle belirlenmiştir. Sonuçlar, farklı çözücüler kullanılarak nar çekirdeklerinden elde edilen ekstraktların, farklı derecelerde antioksidan aktivitleri değerlendirilmiştir. Ayrıca, ekşi beyaz kabuğun farklı nar çekirdek çeşitlerinde en yüksek etkili antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Sadeghi ve ark., 2009).

Wonderful nar kabuğunun antioksidan aktivitesi, DPPH yöntemi kullanılarak hidrojen bağışı veya radikal süpürme kabiliyeti açısından ölçülmüştür. Sonuçlar, ekstraktlardaki toplam fenolik ve flavonoid içeriği ile doğrusal bir ilişkiye sahip

olduğu tespit edilmiştir. Nar antioksidan ekstraktında metanolün çözücü olarak su ile karşılaştırılması sırasıyla toplam ekstrakt veriminin %43.18 ve %46.51, toplam fenolik veriminin %5.90 ve %8.26, fenolik içeriğinin %13.63 ve %17.78 ve DPPH antioksidan aktiviteleri %53.74 ve %65.30 bulunmuştur (Wang ve ark., 2011).

Tunus'ta yetiştirien nar dokularından (meyve suyu, kabukları ve çekirdek yağları) antioksidan kapasiteleri, ferrik indirgen antioksidan güç FRAP ve oksijen radikal emme kapasitesi ORAC yöntemleri ile belirlenmiştir. En yüksek antioksidan aktivitesi kabuklarda bulunmuştur. Nar suyundan, FRAP yöntem kullanılarak, ZH çeşidinde 6.36 mmol / L bulunurken, GR çeşitinde 8.65 mmol / L değerlenmiştir. Çekirdek yağında, FRAP yöntem kullanılarak MZ çeşidinde 5.38 mmol / 100 g bulunurken, GB3 çeşitinde 10.04 mmol / 100 g (çekirdek yağı) değerlenmiştir. Nar kabuğundan, FRAP yöntem kullanılarak, MZ çeşitinde 21.24 mmol / 100 g bulunurken, GR çeşitinde 29.8 mmol / 100 g, ortalama 25.63 ± 3.67 mmol / 100 g (kabuk) değerlendirilmiştir (Elfalleh ve ark., 2011).

Nar doku ekstraktlarının ve meyve sularının antioksidan aktivitesi, TEAC ve FRAP yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. En yüksek antioksidan aktivitesi nar mezokarp ekstraktında belirlenirken (2887.1 ± 6.5 mg/kg KA TEAC yöntemiyle), en düşük antioksidan aktivitesi nar suyunda tespit edilmiştir (Fischer ve ark., 2011).

Güney Afrika'da ticari olarak yetiştirilen yedi nar çeşidinin kabuğundan metanolik ekstraktların antioksidan aktivitesi, DPPH ve FRAP yöntemleri kullanılarak ile değerlendirilmiştir. En yüksek konsantrasyonda (1000 ug / ml), radikal süpürme aktiviteleri Arakta çeşidinde (%83.54), Ganesh çeşidinde (%83.56) ve Ruby çeşdtinde (%83.34) bulunmuştur. En yüksek konsantrasyondaki tüm çeşitler arasında azaltma kapasitelerinde önemli bir fark yok tespit edilmiştir (Fawole ve ark., 2012).

Sri Lankada yetiştirilen narların farklı çeşitlerinin ekstraktlarında antioksidan potansiyeli DPPH radikal süpürme, FRAP metot ve β-karoten-linoleat yöntemleri kullanılarak ölçülmüştür. Toplam antioksidan kapasite ABTS radikal kullanılarak

ölçülmüştür. Nayana çeşidi, dört yöntemin de belirlediği gibi en yüksek antioksidan potansiyelini göstermiştir. Sonuçlar, nar ekstraktların IC_{50} (DPPH) değerinin 0.182 mg / ml ve 0.446 mg / ml arasında bulunmuştur. En yüksek antioksidan aktiviteyi gösteren Nayana çeşidi, ardından İndian çeşiti, Nimali çeşidi ve Daya çeşidi olduğu belirlenmiştir. ABTS radikaliyle ölçülen nar ekstraktlarının toplam antioksidan kapasitesi %93.1 ve %72.73 arasında değişmiş ve en yüksek değer Nayana çeşidinde tespit edilmiştir (Bopitiya ve ark., 2012).

Ülkemizin Antalya ilinde yetişen Hicaz nar çeşidinin meyve suyu, kabuğu ve çekirdek kısımlarının antioksidan aktiviteleri DPPH süpürme aktivitesi, β-karoten ağartma yöntemi, azaltıcı güç ve metal şelatlama aktivitesi kullanılarak belirlenmiştir. Kabuk ekstraktlarında DPPH'nin IC_{50} değerleri meyve ekstraktından daha yüksek bulunurken kabuk ekstraktlarında azaltma gücü çekirdek ekstraktlarından daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. En yüksek metal şelatlama kapasitesi nar kabuğunda %37.22 bulunurken, çekirdek en düşük değere sahip olduğu tespit edilmiştir (%7.151) (Orak ve ark., 2012).

Narın atık kısımlarının (çiçek, kabuk, yaprak, gövde ve çekirdek) antioksidan kapasitesi, ferrik indirgeyici antioksidan güç FRAP, Trolox eşdeğeri antioksidan kapasiteli TEAC ve demir kenetleme aktivite yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. TEAC değeri 14.04 ± 2.40 µmol TROLOX / g KA ve 5206.01 ± 578.48 µmol TROLOX / g KA arasında bulunmuştur. En yüksek TEAC değerini nar kabuğunda bulunmuştur. Ferrik indirgeme potansiyeli 6.29 ± 0.38 µmol Fe^{+2} / g KA ve 5933.00 ± 54.06 µmol Fe^{+2} / g KA arasında değişmiştir. Nar çiçeği doku, diğer nar dokularına kıyasla bu üç yöntemle en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Rummun ve ark., 2013).

Hicaz çeşitdi nar sularının antioksidan aktivitesi ABTS yöntemiyle ölçülmüştür. En düşük antioksidan aktivite, en düşük presleme basıncı kullanılarak elde edilen nar suyunda tespit edilmiştir. En yüksek antioksidan aktivite, en yüksek presleme basıncı kullanılarak elde edilen nar suyunda tespit edilmiştir (İlmaz ve ark., 2013).

Nar dokularından serbest, esterleşmiş ve çözünmeyen fenolik fraksiyonun radikal süpürme aktiviteleri (ABTS, DPPH ve hidroksil radikalleri) ve metal şelatlanması gibi antioksidan aktiviteler belirlenmiştir. Nar kabuğunun serbest fenolik fraksiyonu, tüm yöntemler açısından en güçlü antioksidan kapasiteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Nar mezocarp ve zar kısmı esterleşmiş fenolik fraksiyonu, bütün yöntemler açısından en güçlü antioksidan kapasiteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Ambigaipalan ve ark., 2016).

Nar dokuların farklı çözücülerile ekstraktları elde edilmiş ve meyve suyundaki toplam antioksidan kapasiteye etkilerini, DPPH, ABTS ve FRAP yöntemler kullanarak değerlendirilmiştir. %50 etanol ve su ekstraktları, etanol ekstraktlarından daha yüksek azaltma gücü göstermiştir. Ayrıca, kabuk ekstraktları, meyve suyu ve posa ekstraktlarından 5 ile 30 kat azaltma güçü gösterdiği tespit edilmiştir (Fawole ve ark., 2016).

Elma (Red delicious çeşidi) ve Narların (Wonderful çeşidi), antioksidan kapasiteleri FRAP yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlara göre, nar, elmanınkinden yaklaşık dört kat daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Nar kabuğu ve membran ektraktları, tane ekstraktlarından yaklaşık üç kat daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Dorsey ve ark., 2017).

Nabli ve Gabsi nar çeşitlerin kabuğunun, çiçeklerinin ve yapraklarının ekstraktları, antioksidan kapasitesi, DPPH radikal süpürme ve ferrik indirgeyici antioksidan FRAP yöntemler kullanılarak belirlenmiştir. En yüksek antioksidan kapasitesi Gabsi nar kabuklarında (144.4 mg GAE/100 g) ve Nabli (161.6 mg GAE/100 g) nar çiçeklerinde bulunmuştur (Fellah ve ark., 2018).

Nar kabuğu farklı ekstraktlarının (%70 etanol / petrol eteri, etil asetat, bütanol ve su olarak sıvı / sıvı) antioksidan aktivitesi, dört farklı yöntemle (DPPH, ABTS, FRAP ve β-karoten) değerlendirilmiştir. Bütanol ve etil asetat ekstraktların en çok

DPPH ve ABTS analizlerinde aktifken, su ekstraktı FRAP ve β-karoten testlerinde en güçlü aktiviteyi göstermiştir (Avikin ve ark., 2018).

2.3.2.Antidiyabetik aktivite

Narın suyu, kabukları, çekirdekleri ve çiçek eksraktlarının, karbonhidrat sindirim enzimleri (α-amilaz ve α-glukosidaz) üzerindeki etkileri karşılaştırılmıştır. Metanolik çiçek ekstraktı, α-amilaz ve α-glukosidazı inhibe ederken, metanolik kabuk eksraktı, α-glukozidazı inhibe belirelenmiştir. Etil asetat ekstraktı, her iki enzimin inhibe edilmesinde su ekstraktından daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Kam ve ark., 2012).

Nar dokuların ekstraktlarının antidiyabetik aktivitesi, α-glukosidaz ve lipaz inhibe edici aktivite kullanılarak değerlendirilmiştir. Nar kabuğu ekstraktı, en yüksek α-glukosidaz inhibisyonunu gösteren, ancak mutlaka en yüksek lipaz inhibitör aktivitesini göstermeyen ekstraktları içer olduğu tespitedilmiştir (Ambigaipalan ve ark., 2016).

Nar kabuğunun sıvı / sıvı ekstraktlarının (%70 etanolik / petrol eteri, etil asetat, bütanol ve su) antidiyabetik aktivitesi; α-amilaz ve α-glukosidaz inhibisyon aktivite analizleri kullanılarak değerlendirmiştir. En aktif olanı etil asetat ekstraktıdır, ardından bütanolik ekstrakttır, ayrıca istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Su-etanol ekstraktı ve su ekstraktı orta düzeyde aktivite gösterirken, benzin eteri ekstraktı en düşük aktivite göstermiştir. α-amilaz IC_{50} değeri 23.6 ve 284.3 µg / ml arasında değişmiştir, α-glukosidaz IC_{50} değeri 0.26 ve 4.57 µg / ml arasında değişmiştir ve α-amilaz inhibisyonu α-glukosidaz inhibisyonuna göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Avikin ve ark. 2018).

2.3.3.Antimikrobiyal aktivite

Nar ekstraktının *Staphylococcus aureus* gelişimi üzerindeki etkilerinin değerlendiriliği bir çalışmada düşük ekstrakt konsantrasyonunda bakteri çoğalmanın geciktiği tespit edilmiştir. Yüksek ekstrakt konsantrasyonunda bakteri çoğalmadığı belirlenmiştir (Braga ve ark., 2005).

Nar kabuğu, çekirdekleri ve nar suyu ekstraktları yedi bakteri suşu (*Bacillus coagulans, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Escherichia coli, Klebsiella pneumonia, S.aureus and Pseudomonas aeruginosa*) ve beş fungal suşu *(Aspergillus niger, Mucor indicus, Penicillium citrinum, Rhizopus oryzae and Trichoderma ressei*) üzerinde antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. Nar kabuğu ekstraktı, diğer ekstraktlara kıyasla daha yüksek antimikrobiyal aktiviteyi göstermiştir. Seçilen bakteri ve mantar kültürleri arasında en yüksek antibakteriyel aktivite *S.aureus'a* karşı kaydedilmiş ve mantarlar arasında *A.niger'e* karşı yüksek aktivite belirlenmiştir (Dahham ve ark., 2010).

Nar kabuğu ekstraktının antifungal aktivitesi, minimum inhibitör konsantrasyonlu MIC, disk difüzyon yöntemi kullanılarak *Candida albicans* and *C.parapsilodid* karşı değerlendirilmiştir. Sonuçlar, flukonazol içeren agar plaka üzerinde inhibe edici bölgeler gösterirken, çözücü olarak su kullanılan diskler test edilmiş ve herhangi bir inhibitör bölge gözlenmemiştir (Endo ve ark., 2010).

Ülkemizin Antalya ilinde yetişen üç farklı Hicaz nar çeşidi genotipinde, agar difüzyon yöntemi kullanılarak antibakteriyal ve antifungal aktiviteler değerlendirilmiştir. Nar kabuğu ekstraktlarının antibakteriyal aktivitesi, üç bakteri suşuna (*S.aureus, E.coli ve Salmonella enteritidis*) karşı test edilmiştir. Antifungal aktivite, iki *Aspergillus parasiticus* mantar suşuna karşı test edilmiştir. Tüm ekstraktların, test edilen tüm bakteriyal ve fungal suşlara karşı dikkate değer antibakteriyal ve antifungal aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Oraki ve ark., 2011).

Antibakteriyal aktivite Gram-pozitif (*B.subtilis ve S.aureus*) ve Gram-negatif bakteriler (*E.coli ve Klebsiella pneumonia*) üzerinde, Güney Afrika'dan yedi farklı nar çeşidinin kabukların eksraktleri mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak test edilmiştir. Metanolik kabuk ekstraktları, Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı geniş spektrumlu aktivite göstermiş, minimum inhibitör konsantrasyonları (MİC) 0.2 ile 0.78 mg / ml arasında değiştiği belirlenmiştir (Fawole ve ark., 2012).

Narın atık kısımlarının (çiçek, yaprak, kabuk, gövde ve çekirdek) antimikrobiyal aktivitesi *Streptococcus mutans, Streptococcus* ve *Lactobacillus acidophilus* bakterilerine karşı disk difüzyon yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Kabuk ekstraktı daha güçlü antimikrobiyal aktivite göstermiş ve en yüksek inhibisyon bölgesi oluşturmuş, yaprak ekstraktı ile ikinci en yüksek inhibisyon bölgesi üretmiştir. Çiçek ekstraktının antimikrobiyal aktivite etkisi, diğer dokulara göre daha az olduğu tespit edilmiştir (Rummun ve ark., 2013).

Hicaz nar çeşidinin meyve suyularının antimikrobiyal aktivitesi agar koyucuk metodu kullanılarak *B.megaterium, B.subtilis, S.aureus ve Pseudomonas sp*. mikroorganizmaları arasında değerlenmiştir. Sonuçlara göre, artan basınç, meyve sularının antimikrobiyal aktivitesinde önemli bir değişikliğe yol gözlenmemiştir (İlmaz ve ark., 2013).

Nar kabuğu ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi, dört Gram pozitif bakteri (*B.subtilis, B.cereus, S.aureus ve B.megaterium*) ve altı Gram negatif bakteri (*E.coli, Salmonella typhi, Salmonella paratyphi A, Salmonella paratyphi B, Proteus vulgaris ve P.aeruginosa*) suşuna karşı değerlendirilmiştir. Su, etanol, metanol, asetik asit ve petrol eteri kullanılarak ekstraktlar hazırlanmıştır. Değerlendirmeler agar koyucuk yöntemi kullanılarak zon oluşumunun belirlenmesi şekilde uygulanmıştır. Sulu, etanol ve metanol ekstraktlarının, asetik asit ve petrol eteri ekstraktlarının test edilen mikroorganizmalara karşı daha aktif olduğu bulunmuştur (Hajoori ve ark., 2014).

Nar kabuğu ekstraktlarının, bir Gram pozitif (*S.aureus*) ve iki Gram negatif (*E.coli ve P.aeruginosa*) bakteri suşuna karşı antibakteriyal aktivitesi agar kuyucuk

difüzyon metodu kullanılarak zon oluşumunun belirkenmesi şeklinde tespit edilmiştir. Su, metanol, etanol, petrol eteri ve etil asetat çözücülerden farklı ekstraktlar hazırlanmıştır. Nar kabuğu, hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilere karşı önemli ölçüde aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Sajjad ve ark., 2015).

2.4.Bireysel fenolik bileşiklerin belirlenmesi

2.4.1.Yüksek performanslı sıvı kromatografi-kütle spektrometresi HPLC-MS

Dört çeşit nar suyunun ayrı ayrı fenolik bileşikleri HPLC-MS yöntemi ile belirlenmiştir. Ticari ve deneysel meyve suları arasında gözlenen ana fark, ticari meyve sularında bulunan yüksek punikalajin ve ellajik asit içeriğidir (Gil ve ark.,. 2000).

Bireysel fenolik bileşikler, nar kabuğu, mezokarp ve tanelerden ile ekstrakte edilmiştir. Nar kabuğu ve meyve suları HPLC-MS ile karakterize edilmiştir. Toplamda, 48 ayrı fenolik bileşik tespit edilmiştir (Fischer ve ark., 2011).

Narın metanolik kabuk ekstraktındaki fenolik bileşiklerin bireysel konsantrasyonlarını belirlemek için yüksek performanslı sıvı kromatografi-kütle spektrometresi HPLC-MS kullanılmıştır. Yedi bireysel fenolik tanımlanmıştır ve ölçülmüştür. Fenolik profil ve konsantrasyon meyve çeşitlerinde farklılık göstermiştir (Fawole ve ark., 2012 ; Ambigaipalan ve ark., 2016).

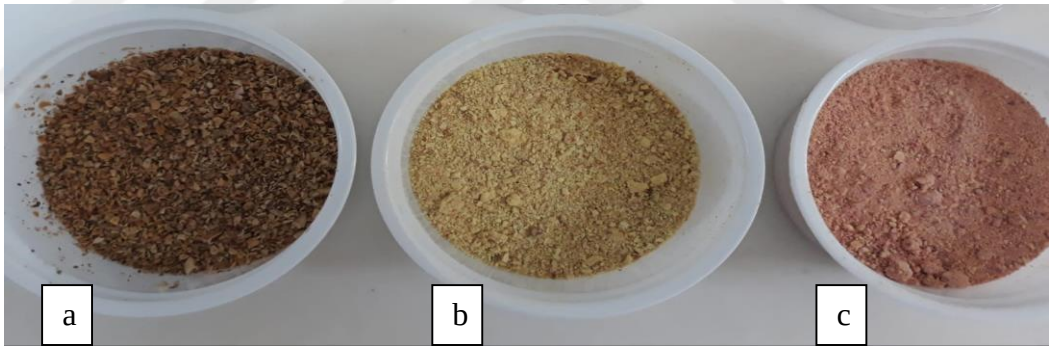
Nar dokularının 79 bireysel fenolik bileşiği, HPLC-MS kullanılarak tanımlanmıştır. Nar kabuğundaki başlıca fenolik bileşiğin gallik asit, kaempferol 3-o-glukozit majör flavonoid olduğu belirlenmiştir. Ellajik asit ve monogalloil-heksosid başlıca hidrolizlenebilir tanenler, baskın proantosiyanidin prosiyanidin dimerlerin olduğu tespit edilmiştir (Ambigaipalan ve ark., 2016).

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Materyal

3.1.1.Nar kaynağı

Bu çalışma, bölgesel pazarlardan toplanan Hicaz nar kullanılarak Harran üniversitesinde gerçekleştirilmiştir. Nar meyvesinin kabuk, mezokarp ve çekirdekleri elle ayrılmıştır. Bu parçalar doğrudan açık hava ile kurutulup, öğütücüde toz haline getirilmiştir. Nar suyu taze tanelerden elle sıkılarak elde edilmiştir. Kurutulmuş nar dokularının tozu oda sıcaklığında saklanırken, meyve suyu analiz edilene kadar -20C^{o}de saklanmıştır.



Şekil 3.1. Nar dokularının ; (a) çekirdek, (b) mezokarp, (c) kabuk tozları

3.1.2.Kimyasallar

Analizlerde kullanılan kimyasallar Merck, Darmstadt, Almanyadan temin edilmiştir. Bağlı fenolik özütleme için HC, enerji P7, ve fruktazim MA-LG enzimleri kullanılmıştır, (Erbslöh, Geisenheim, Almanya).

3.2. Yöntem

3.2.1. Solvent konsantrasyonunun optimizasyonu

Meyve dokularından biyoaktif bileşikleri elde etmek için iki ekstraksiyon çözücüsü (etanol-su) seçilmiştir. Etanol / su oranının etkisi toplam fenolik içerik ve antioksidan aktivite üzerinde çalışılmıştır.

Öğütülmüş 1 g meyve dokuları falkonlara konulup üzerine 50 ml etanol-su çözücüsü eklenmiştir. Ekstraksiyon bir karıştırıcıda oda sıcaklığında 30 dakika sürdürülmüştür. Santrifüjden sonra (4000 rpm- 5 dk), elde edilen süpernatant toplanmıştır ve analiz edilene kadar -18°C' de saklanmıştır.

3.2.2.Serbest fenolik (çözünür fenolik) bileşiklerin ekstraksiyonu

Serbest fenolik ekstraksiyonu, rapor edilen metotların modifikasyonuna bağlı olarak gerçekleştirilmiştir (Bonoli ve ark., 2004). Bir gram nar tozu (NK-NM-NÇ) 10 ml etanol / su (42: 58; H/H) ile karıştırılmıştır, bir mekanik çalkalayıcı kullanarak oda sıcaklığında 30 dakika boyunca ekstrakt edilmiştir. Bu prosedür üç kez tekrar edilmiştir. Her seferinde, karışım daha sonra oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir (5 dk - 4000 rpm). Süpernatanlar birleştirilmiştir, bundan sonra pH değeri yaklaşık pH'a (1.5 - 2) ayarlanmıştır. Serbest fenolik üç kez eşit miktarda dietil eter ve etil asetat (1: 1 H/H) ile ekstrakt edilmiştir. Organik faz, sodyum sülfattan süzülmüştür. Karışım, rotary bir buharlaştırıcı kullanılarak 50°C'de buharlaştırılmıştır. Nihai hacim, metanol ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.

3.2.3.Esterleşmiş fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu

Su fazı serbest fenolik ekstraksiyonundan azot altında eşit hacimde 4M NaOH ile mekanik bir karıştırıcıda oda sıcaklığında 2 saat karıştırılmıştır. Bundan sonra, karışım pH (1.5 - 2) 'ye ayarlanmıştır, sonra oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir (5 dk

- 4000 rpm). Esterleşmiş fenolik bileşikler, eşit hacimde dietil eter ve etil asetat (1: 1 H/H) ile iki kez ekstrakt edilmiştir. Organik faz, sodyum sülfattan süzülmüştür. Karışım, döner bir buharlaştırıcı kullanılarak (rotary) 50°C'de buharlaştırılmıştır. Nihai hacim, metanol ile 10 ml'ye tamamlanmıştır (Su ve ark., 2014).

3.2.4.Bağlı fenolikler (çözünmeyen fenolik) bileşiklerin ekstraksiyonu

3.2.4.1.Enzimatik hidroliz ile ekstraksiyon

Serbest ve esterleşmiş ekstraksiyonlardan altta kalan pelet, 40°C'de bir gece boyunca fırında kurutulmuştur. Üzerine 50°C'de 10 ml su ilave edilmiştir, karışımın pH değeri pH (4.5) olarak ayarlanmıştır. üzerlerine 2 µl vegazym ve 1 µl fruktazim ilave edilmiştir ve 1 saat boyunca 55°C'de mekanik bir çalkalayıcıda tutulmuştur. Bir kez daha, pH değeri (pH 5-10) olarak ayarlanmıştır, daha sonra karışıma 2 µl enerzim ilave edilmiştir ve sonra 1 saat boyunca 55°C'de mekanik bir karıştırıcıda tutulmuştur. Karışım oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir (5 dk - 4000 rpm). Süpernatant birleştirilmiştir ve analize kadar -20ºC'de saklanmıştır (Montilla ve ark., 2011). Bu sırada kalan katı enzim inaktivasyonu için etuvde (90°C, 1 saat) tutulmuştur, sonra 30°C'de bir gece kurumaya bırakılmıştır.

3.2.4.2.Alkali hidroliz ile ekstraksiyon

Bu analiz, (Bonoli ve ark., 2004) tarafından bildirilen alkalin hidroliz yönteminin değiştirilmiş bir versiyonu kullanılarak uygulanmıştır. Kurutulan enzimatik ekstraksiyon metottan alta kalan pelet, bir mekanik çalkalayıcı kullanılarak 2 saat boyunca azot altında 10 ml 4M NaOH ile hidrolize edilmiştir. Karışımın pH değeri asitleştirilmiştir, sonra santrifüjlenmiştir (5 dk - 4000 rpm). Süpernatan birleştirilmiş ve eşit hacimde dietil eter ve etil asetat (1: 1 H/H) ile üç kez ekstrakt edilmiştir. Sıvı faz, sodyum sülfattan süzülmüştür ve döner bir buharlaştırıcı kullanılarak (rotary) 50°C'de buharlaştırılmıştır. Nihai hacim 5 ml metanolle ayarlanmıştır.

3.2.4.3.Termal hidroliz ile ekstraksiyon

Alkalin hidrolizden kalan kalıntı kurutulmuş halde, 50 ml metanolde çözülmüştür ve 1 saat kaynatılmıştır. Bundan sonra, sıvı faz sodyum sülfattan süzülmüştür. Nihai hacim, metanol ilave edilerek 50 ml'ye ayarlanmıştır (Montilla ve ark., 2011).

3.2.5.pH analizi

Nar dokularının ekstraktları pH içeriği önceden kalibre edilmiş cam elektroltu Fisher sci.Model 10 (Denwer, U.S.) marka pH metre ile doğrudan ölçümüştür.

3.2.6. % Kuru madde içeriği

Yaklaşık 1 g nar dokularından tartılıtıp 75ºC de çalışan etüvde 24 saat bekletilmiştir. %kuru madde oranı aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmıştır

Kuru madde % = $(m_1\text{-}m)/(m_2\text{-}m)x100$

m= kabın darası g

m_2=kurutmadan önceki numune ile kabın kütlesi g

m_1=kurutmadan sonra numune ile kabın kütlesi g

3.2.7. % Kül içeriği

Temizlenmiş ve sabit tartıma getirilmiş krozelere alınan örnekler kül fırınında (600-700°C) yakılmak nar ekstraktların kül miktarı % aşağıda belirtilen formülle hesaplanmıştır.

% kül = $[(m_2\text{-}m_1)/m]X100$

m2=yakmadan sonraki kroze ve numune ağırlığı g

m1=sabit tartıma getirlien krozenin ağırlığı g

m=alınan örnek ağırlığı g

3.2.8.Biyoaktif bileşiklerin tayini

3.2.8.1.Toplam fenolik madde miktarı analizi

Nar kabuğu, mezokarpı, çekirdekleri ve meyve suyunun fenolik fraksiyonlarının toplam fenolik içeriği Folin-ciocalteau yöntemi ile belirlenmiştir (Singleton ve ark., 1999). Baştan, 0.4 ml seyreltilmiş örneklere 2 ml folin reaktifi (0.2 N) eklenmiştir. Bundan sonra, 1.6 ml sodyum karbonat çözeltisi (% 7.5) eklenmiştir. Karanlıkta oda sıcaklığında 1 saat reaksiyondan sonra UV-spektrofotometre kullanılarak 765 nm'de örneklerin absorbansları ölçülmüştür. Toplam fenolik içeriği, nar tozu dokularının gramı başına miligram gallik asit eşdeğeri (mg GAE) olarak ifade edilmiştir.

3.2.8.2. Toplam flavonoid miktarı analizi

Toplam flavonoid içeriği (Dewanto ve ark., 2002 ; Zhishen ve ark., 1999) tarafından bildirilen yöntemle belirlenmiştir. 4 ml saf su içinde 2 ml seyreltilmiş örnekleri eklenmıştır. Bundan sonra, 0.3 ml % 5'lik $NaNO_2$ eklenmiştir. 5 dakika sonra, 0.3 ml % 10 $AlCl_3$ ilave edilmiştir ve 6. dakikada karışıma 2 ml 1M NaOH ilave edilmiştir. Karışım hacmi, saf su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. Absorbans hemen 510 nm'de ölçülmüştür. Sonuçlar, nar tozu dokularının gramı başına mg kateşin eşdeğeri olarak ifade edilmiştir.

3.2.8.3.Toplam hidroliz olabilen tannin (gallotaninler ve ellagitanninler) miktarı analizi

Toplam hidroliz olabilen tannin (gallotanninler ve ellagitanninler) (Willies ve ark., 1998) yöntemi ile ölçülmüştür. 1 ml seyreltilmiş örneklerin üzerine 5 ml % 2,5 potasyum iyot eklenmiştir. Karışım, oda sıcaklığında 2 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Absorbans, UV-spektrofotometre kullanılarak 550 nm'de ölçülmüştür. Inkübasyon süresi (2-4 dk / OS) örneklerden örneklerye değişebilir, maksimum absorbansı bulmalınız. Inkübasyon süresi 2-4 dk / OS aralığında ölçülmüş olup

maksimum absorbans değeri belirlenmiştir. Bu sonuçlar, nar tozu dokularının g'ı başına mg tannik asit eşdeğeri olarak ifade edilmiştir.

3.2.8.4.Toplam antosiyanin miktarı analizi

Toplam antosiyanin miktarı pH-diferansiyel metoduna göre belirlenmiştir (Patil ve ark., 2009). İki tüpte, 1ml seyreltilmiş örnekler ilave edilmiştir. Sonra ilk tüpe 1 ml pH 1 tampon çözeltisinden (% 1.49 KCl) ilave edilmiştir ve diğer tüpe pH4.5 tampon çözeltisinden 1 ml (% 1.64 sodyum asetat) eklenmiştir. Örneklerin absorbansı 515 nm ve 700 nm'de ölçülmüştür. Toplam antosiyanin içeriği, nar tozu dokuları gramı başına mg siyanürleştirici 3-glukozit eşdeğeri olarak ifade edilmiştir. Örneklerde antosiyanin miktarları aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmıştır.

$TAC = (A \times M_w \times DF \times 100) / MA$

(Absorbans) $A\ (mg / l) = (A_{515} – A_{700})\ pH\ 1- (A_{515} – A_{700})\ pH\ 4.5$

M_w = antosiyaninlerin moleküler ağırlığı (433.2 g / mol)

DF = seyreltme faktörü

MA = molar emilim

3.2.9.Biyolojik aktivitelerin belirlenmesi

3.2.9.1.Antioksidan aktivite belirlenmesi

3.2.9.1.1.DPPH radikal süpürücü aktivitesi

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemi (Bolis ve ark., 1958)'e göre ölçülmüştür. 0.1 ml seyreltilmiş numune, 3.9 ml DPPH metanol çözeltisine (0.1 mM) ilave edilmiştir. Karışım oda sıcaklığında 30 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. Absorbans, UV-spektrofotometre kullanılarak 517 nm'de ölçülmüştür. Sonuçlar, nar dokuların gramı başına µmol TROLOX eşdeğeri olarak ifade edilmiştir.

3.2.9.1.2.ABTS^{+} radikal katyon süpürücü aktivite

ABTS^{+} (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfürik asit) metotu minör modifikasyonu ile (Miller ve ark., 1993) göre yapılmıştır. ABTS^{+} çözeltisi oda sıcaklığında (12-16 saat) inkübe edilmiştir, ayrıca, her analiz için taze ABTS^{+} çözeltisi hazırlanmalı. Analizden önce, ABTS^{+}, başlangıçta ABTS^{+}'nin absorbansı olarak kabul edilen PBS (fosfat tamponlu salin) ile 0.700 ± 0.02 arasında absorbansa ayarlanmıştır. 2 ml ABTS^{+}'ye 20, 40, 60, 80 µl seyreltilmiş örnek eklenmesi üzerine, sonra karışım oda sıcaklığında 6 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Absorbans UV-spektrofotometre kullanılarak 734 nm'de ölçülmüştür. Sonuçlar, nar dokuların g'ı başına (µmol) TROLOX eşdeğeri olarak ifade edilmiştir.

3.2.9.1.3.FRAP ferrik indirgeyici antioksidan gücü

(Benzie ve ark., 1996) tarafından geliştirilen FRAP analizi bazı modifikasyonlarla yapılmıştır. İlk durumda, FRAP reaktifi, 500 ml 30 mM sodyum asetat çözeltisi, 50 ml 10 mM (TPTZ) çözeltisi ve 50 ml 20 mM demir klorit çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır. FRAP reaktifi taze hazırlanmış ve bir su banyosu ile 37ºC'ye ılıtılmıştır. 2.97 ml FRAP reaktifine 0.25 ml seyreltilmiş örnek ilave edilmiştir, ardından (30 dakika - OS) inkübasyondan sonra 593 nm'de absorbans kaydedilmiştir. Sonuçlar, nar dokuların g'ı başına (µmol) TROLOX eşdeğeri olarak ifade edilmiştir.

3.2.9.1.4.CUPRAC cupric Ion antioksidan kapasitesi

CUPRAC yöntemi (Apak ve ark., 2000) ile uygulanmıştır. Başta, 0.1 ml seyreltilmiş numune, 1 ml bakır klorür ile karıştırılmış, sonra karışıma 1 ml neocuproin ilave edilmiştir. Bundan sonra, 1 ml 1 M amonyum asetat tamponu pH 7 ilave edilmiştir, ardından toplam hacim, saf su ilave edilerek 4.1 ml'ye tamamlanmıştır. Absorbans, (30 dakika - OS) inkübasyondan sonra 450 nm'de ölçülmüştür ve sonuçlar, nar dokuların g'ı başına (µmol) TROLOX eşdeğeri olarak ifade edilmiştir. Sonuçlar aşağıda belirtilen formüle gore hesaplanmıştır.

TAC(mmol TR/g – örnek)=(A/ε)x(V_t/$V_ö$)xSFx(V_e/m)

A: 450 nm de ölçülen örnek absorbansı

ε: TR bileşiğinin CUPRAC yöntemindeki molar absorplama katsayısı 16700 L $mol^{-1}.cm^{-1}$

V_t : CUPRAC ölçüm çözeltisinin toplam hacmi 4.1 ml

$V_ö$: örnek hacmi mL

SF : seyreltme faktörü

V_e : hazırlanan ekstraktı hacmi mL

m : ekstraksiyon işleminde alınan örnek miktarı g

3.2.9.2.Antidiyabetik aktivite belirlenmesi

3.2.9.2.1.α-amilaz inhibisyon aktivitesi

Bu analiz, küçük modifikasyonlarla (McDougall ve ark., 2005) tarafından bildirildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Boş tüplere, 0.5 ml% 1 çözünür nişasta çözeltisi ilave edilmiş, daha sonra 0.5 ml seyreltilmiş örnekler, 6.7 mM sodyum klorür pH 6.9 ile 0.5 ml 20 mM sodyum fosfat tamponu içinde çözülmüştür. Karışım bir su banyosunda 37°C de 10 dakika inkübe edilmiştir. Bundan sonra, 0.5 ml amilaz enzim çözeltisi ilave edilmiş ve bir su banyosunda 10 dakika daha 37°C'de bir kez daha inkübe edilmiştir. Reaksiyon, 0.5 ml renk reaktif çözeltisi ilave edilerek sonlandırılmış ve 15 dakika boyunca kaynar su banyosuna yerleştirilmiştir. Son olarak, buz üzerinde oda sıcaklığına soğutulmuş ve saf su ilave edilerek hacim 6 ml'ye tamamlanmıştır. Absorbans 540 nm'de ölüçülmüştür. Sonuçlar, kalibrasyon eğrisi ile hesaplanan bir IC_{50} değeri olarak ifade edilmiştir.

3.2.9.2.2.α-glukosidaz inhibisyon aktivitesi

Bu yöntem küçük bir değişiklikle (McDougall ve ark., 2005) tarafından uygulanmıştır. Analiz tüpleri 37°C'de bir su banyosunda bekletilmiş, 50 µl seyreltilmiş örnekler 1250 µl 67 mM potasyum fosfat tamponu pH 6.8 içinde eritilmiştir, sonra karışıma 50 µl azaltılmış solüsyon (3 mM glutatyon GSH) ilave

edilmiştir. Bu aşamada, 60 µl enzim çözeltisi ilave edilmiş ve 10 dakika 37°C'de bir su banyosunda inkübe edilmiştir. Bundan sonra, 125 µl substrat çözeltisi (10 mM p-nitrofenil a-D-Glukozit PNP-Gluc) ve su banyosunda 37°C'de tam 20 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için 2 ml sodyum karbonat çözeltisi (100 mM) eklenmiştir. Absorbanslar 400 nm'de ölüçülmüştür. Sonuçlar, kalibrasyon eğrisi ile hesaplanan bir IC_{50} değeri olarak ifade edilmiştir.

3.2.9.3.Antimikrobiyal aktivite belirlenmesi

Nar dokularının antimikrobiyal aktivitesi, iki referans bakteri suşuna *Staphylococcus aureus subsp. aureus* (ATCC 6538P), *Escherichia coli* (ATCC 8739), bir mantara *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) ve bir küfe *Candida albicans* (ATCC 29212) karşı test edilmiştir. Agar kuyucuk difüzyon yöntemi, antimikrobiyal aktivitenin değerlendirilmesi için kullanılmıştır. 9 mm büyüklüğündeki delikler katılaşmış agarda delinmiş ve bu delikler 120 µl nar dokuları ile 200 mg / ml konsantrasyonda ekstrakt edilmiştir. Mikrobiyal sayım, mililitre başına 1 x 10^5 bakteri, 1 x 10^5 mantar, 1 x 10^5 konsantrasyonuna eşdeğer bir standart olarak 0.5 Mcfarland'a ayarlanmıştır. Bakteriler, mantarlar ve küf kültürleri plakalarda çoğaltlmış ve sırasıyla 24 saat 37°C'de, 24 saat boyunca 25°C'da ve 5 gün boyunca 25°C'de enkübe edilmiştir. Minimum inhibitör konsantrasyonunun (MIC) ve minimum bakteri öldürücü konsantrasyonun (MBC) belirlenmesi için, nar dokularının ekstraktları 6.25 mg / mL ile 200 mg / mL aralığında seyreltilmiştir.

3.2.10.Bireysel fenolik bileşiklerin LC-MS ile belirlenmesi

Optimum koşullarda elde edilen nar dokuların ekstraktlarının, 0.45 um gözenekli bir membran filtreden süzülmüştür ve daha sonra bir ikili gradyan pompası, bir otomatik numune alma cihazı (SIL-20AC) bulunan Nexera Shimadzu UHPLC LC-MS / MS (Shimadzu, Kyoto, Japonya) cihazına enjekte edilmiştir, bir gaz giderici (DGU-20A3R) ve bir sütun termostatı (CTO-10ASVP). Kolon, 3 mm x 100 mm'lik bir Intersil ODS-4 analitik kolondur ve parçacık boyutu: 2µm.

Fenolik bileşiklerin ayrıştırılmasına yönelik deneyler, aşağıdaki koşullarda dayanılarak yapılmıştır: çözücü A karışımı (su içinde% 0.1 formik asit) kullanılarak 0.3 mL min-1 akış hızı, 40°C kolon sıcaklığı ve 2 µL enjeksiyon hacmi ve mobil faz olarak solvent B (metanolde% 0.1 furmik asit); gradyan koşulları:% 0 ile 4 dakika% 5 B,% 4 ile 7 dakika% 95 B,% 7 ile 7,01 dakika% 95 B ve 7,01 dakikada % 5 B'nin başlangıç koşullarına geri dönün.

3.2.11. Nar dokularının şeker bileşimlerinin HPLC ile belirlenmesi

Toz haline getirilmiş nar dokuların bir gramı tartılmış ve falkonda 10 mL su ilave edilmiştir. Ekstraksiyon, 1 saat boyunca 80°C'de su banyosunda yapılmıştır. 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatant, 0.45 um gözenekli bir membran filtreden süzülmüş ve daha sonra kırılma indeksi detektörü ile bir Shimadzu Prominence HPLC Sistemine (Shimadzu, Japonya) enjekte edilmiştir. Ayrışmalar, 0.5 mL / dk akış hızında mobil faz olarak su ve 100 µL enjeksiyon hacmi kullanılarak, 80°C'de 7.8 x 300 mm id., 8 um, Carbone Coregel-87P Kolon üzerinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.12. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Nar dokuları cihazın iki tarafa ait bant ile ilgili bir kısmına yerleştirilmiştir. Palladium, yüksek iletkenlik için kaplama numuneleri için kullanılmıştır. Numunelerin mikroyapıları, SEM (ZEISS EVO 50, Almanya) kullanılarak, 30 kV'da x5000 büyütme oranlarında çalıştırılan yüksek vakum altında analiz edilmiştir.

3.2.13. İstatistiksel analiz

Tüm analizler en az iki kez yapılmıştır. Tasarım Uzmanı 7.0.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN), deney noktaları, randomizasyon, varyans analizi ve kuadratik modellerin yerleştirilmesinde kullanılmıştır. Temel bileşen analizi (PCA), Windows için SPSS 22.0 istatistiksel yazılım paketi (SPSS Inc., Chicago, ABD) kullanılarak yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1.Solvent kombinasyonunun optimizasyonu

Yanıt-Yüzey Metodolojisi (RSM), deneysel verilerin analizinde ve farklı parametrelerin optimizasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır (Madamba ve ark., 1997). Meyve dokularından yüksek oranda biyoaktif bileşik elde etmek için optimum etanol / su oranı, RSM ile birleştirilmiş Simple-Lattice tasarımı kullanılarak belirlenmiştir. En yüksek toplam fenolik içeriği ve meyve atıklarının antioksidan aktivitesini veren en iyi denklemler (karesel ve kübik) kurulmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar, etanol-su oranı için %48-52'lik bir optimum çözücü konsantrasyonunu gösterir ve kabul edilebilirlik, optimum noktada "0.964" olarak belirlenmiştir. Etanol-su oranının bir fonksiyonu olarak her bir bağımlı değişken (yanıt) için regresyon katsayıları aşağıdaki denklemlerde verilmiştir:

$$TFM\ (mg\ GAE\ /\ g) = 64.06_A + 116.35_B + 293.16_{AB}\ (R^2 = 0.91)$$

$$AA\ (g\ numune\ /\ g\ DPPH) = 1.41_A + 0.46_B - 2.54_{AB} - 2.13_{AB\ (A\text{-}B)}\ (R^2 = 0.98)$$

4.2.pH analizi

Çizelge 4.1’de nar ekstraktlarının ve nar suyununun pH değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.1. Nar ekstraktlarının ve nar suyunun pH değerleri

Örnek	pH
Nar kabuğu	3.63±0.01
Nar mezokarpı	3.41±0.01
Nar çekirdeği	5.96±0.01
Nar suyu	3.46±0.01

Çizelgede verilen değerler ortalama ± standart sapma şeklindedir

Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi nar kabuğunun, mezokarpının, çekirdeklerinin ve nar suyunun pH değerleri sırasıyla 3.63±0.01, 3.41±0.01, 5.96±0.01 ve 3.46±0.01 olarak belirlenmiştir.

4.3.%Kuru madde içeriği

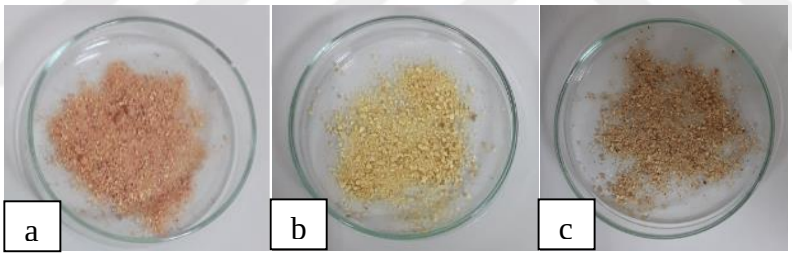
Nar dokularının ve nar suyunun % kuru madde içerikleri Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Nar ekstraktlarının ve nar suyunun %kuru madde değerleri

Örnek	% kuru madde
Nar kabuğu	91.05±0.01
Nar mezokarpı	89.74±0.05
Nar çekirdeği	93.33±0.05
Nar suyu	16.82±0.01

Çizelgede verilen değerler ortalama ± standart sapma şeklindedir

Sonuçlar değerlendirildiğinde nar dokularının (kabuk, mezokarp ve çekirdek) ve nar suyunun % kuru madde içerikleri sırasıyla %91.05±0.01, %89.74±0.05, %93.33±0.05 ve %16.82±0.01 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.2. Nar dokularının ; (a) kabuk, (b) mezokarp, (c) çekirdek kuru madde analizi

4.4.%Kül içeriği

Nar dokularının ve nar suyunun %kül içerikleri Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Nar ekstraktlarının ve nar suyunun %kül madde değerleri

Örnek	%kül
Nar kabuğu	0.51±0.01
Nar mezokarpı	0.43±0.01
Nar çekirdeği	0.47±0.05
Nar suyu	0.32±0.01

Çizelgede verilen değerler ortalama ± standart sapma şeklindedir

Sonuçlar değerlendirildiğinde nar dokularının (kabuk, mezokarp ve çekirdek) ve nar suyunun %kül içerikleri sırasıyla %0.51±0.01, 0.43±0.01, %0.47±0.05 ve %0.32±0.01 olarak belirlenmiştir.

4.5.Nar dokularında bulunan biyoaktif bileşikler

Nar dokularının (NK, NM, NÇ, NS) serbest, esterleşmiş, bağlı ve toplam fenolik içerikleri Çizelge 4.4'de gösterilmiştir ve kuru ağırlık (KA) üzerinde g başına miligram gallik asit eşdeğeri olarak ifade edilmiştir. Serbest fenolik içerik 2,2 ve 66,1 mg GAE / g KA arasında, esterleşmiş fenolik içeriği 0,2 ile 13 mg GAE / g KA arasında değişmiştir. Serbest fenolik ekstraksiyon, rapor edilen metotların modifikasyonuna bağlı olarak gerçekleştirilmiştir (Bonoli ve ark., 2004). Bağlı fenoliklerin ekstraksiyonu için nar dokularına termal, alkali, enzimatik işlemler uygulanmıştır. Nar kabuğunun kuvvetli alkali koşullar altında hidrolizi, fenolik bileşikleri 0.35 mg GAE / g KA konsantrasyonunda ve termal işlem, 0.45 mg GAE / g KA düzeyinde ölçülmüştür. Ekstraksiyon çözeltisindeki düşük bağlı fenolik verim, daha önce bildirildiği gibi bağlı fenolikleri nar hücre duvarlarından salgılamak için enzim preparatlarını (pektinazlar, selülazlar, proteazlar) kullanmamızı gerçekleştirilmiştir (Montilla ve ark., 2011). Enzim uygulamasıyla 2.8 ile 15.3 mg arasında GAE / g KA, serbest fenolik madde ekstrakte edilmiştir. En yüksek bağlı fenolik bileşikler, NK'da belirlenirken, NÇ'de en düşük değer olduğu tespit edilmiştir. Çözünmeyen bağlı fenolikler elde etmek için nar dokularında enzimatik işlemler yapılmıştır.

Çizelge 4.4'de ifade edildiği gibi, sonuçlar NK'nin diğer nar dokularına (NM, NÇ ve NS) oranla daha yüksek miktarda fitokimyasallara sahip olduğunu göstermiştir.

Bu çalışma, nar dokuları ekstraktlarının çözünür fenolik fraksiyonlarının (serbest ve esterleşmiş) çözünmeyen fenolik fraksiyondan (bağlı) daha yüksek

miktarda olduğunu göstermiştir. Sonuçlar önceki araştırmalarla uyumludur (Ambigaipalan ve ark., 2016). Serbest, esterleşmiş ve çözünmez bağlı fenoliklerin toplamı 0.2 – 66.1 mg GAE / g KA olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.4). En yüksek fenolikler NK, sonra NM ve NÇ'de ölçülmüştür. Bağlı fenolikler NK'da toplam fenoliklerin %7.13'ine, NM'de toplam fenoliklerin %9.64'sine ve NÇ'de toplam fenoliklerin %31.8'ine katkıda bulunmuştur, çözünmeyen bağlı fenoliklerin çeşitli nar dokularında toplam fenoliklerin önemli bir kısmı olduğunu göstermiştir. Genel olarak, en yüksek fenolik içerik nar kabuklarında, ardından nar mezokarpında ve nar çekirdeğinde tespit edilmiştir. Fenolik bileşikler temelde diğer dokularla karşılaştırıldığında NK'da yoğunlaştığı belirlenmiştir (Elfalleh ve ark., 2012 ; Derakhshan ve ark., 2018). Narların serbest, esterleşmiş ve bağlı fenolik içeriği mor mısır çeşitlerine (Montilla ve ark., 2011) kıyasla daha yüksek ve gabsi nar özleri ile karşılaştırıldığında daha düşük oldukları belilenmiştir (Kharchoufi ve ark., 2018).

Ambigaipalan ve ark., (2016) NK ve NM'de toplam fenolik maddeleri sırasıyla 9.38 mg GAE / g ve 17.73 mg GAE / g olarak belirtilmişlerdir. Başka bir çalışmada (Fischer ve ark.,. 2011), NK'nun toplam fenolik maddeleri 83.03 mg GAE / kg iken, NS'nun toplam fenolik maddeleri 2015.2 mg GAE / L ve NM'nın toplam fenolik maddeleri 198173.3 mg GAE / kg olduğunu göstermiştir. Rummun ve ark., (2013), NK'de toplam fenolik maddelerin 190.27 ± 0.54 mg GAE / g olarak bulmuştur ve elde ettikleri değer bizim bulduğumuz değerden 84.1 ± 0.4 mg GAE / g daha yüksektir, NÇ'de toplam fenolik maddelerin 0.65 ± 0.00 mg GAE / g olarak bulmuşlardır ve bizim bulduğumuz değer 3.52 ± 0.01 mg GAE / g'dır ve bizim elde ettiğimiz değer daha yüksektir. Bu çalışmada (Jing ve ark., 2012), NÇ'nin bileşiminde 1.29-2.17 mg GAE / g düzeyinde toplam fenolik maddeler tespit etmişlerdir. Ancak, (Derakhshan ve ark., 2018) NÇ'de toplam fenolik madde içeriğini 72.4-73 mg GAE / g olarak bildirmiştir ve bizim bulduğumuz değerden daha yüksektir. Nar dokularının tespit edilen fenolik içeriğinin ve ekstraksiyon yöntemlerinin farklı olması ile açıklayabilir (Çam ve ark., 2010). Örneğin, (Wang ve ark., 2011) ve (Kharchoufi ve ark., 2018), bir çözücü olarak su yerine metanol kullanıldığında NK'den fenolik özütlemenin daha etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Ayrıca fenolik içerikteki farklılıklar genetik, çevresel faktörler ve meyve üretim süreci ile de ilişkili olabilir.

Dahası, kırmızı meyve suları fenolikler dahil değerli bir biyoaktif içerik kaynağıdır. NS'nin fenolik içeriği diğer dokularında fitokimyasal içeriği ile karşılaştırılmıştır. Nar kabuğu ve nar mezokarpındaki toplam flavonoid miktarı nar suyundan 12 mg KE / g daha yüksektir. NS'undaki toplam flavonoid miktarı NÇ'inden daha yüksektir.

Flavonoid içeriğinin sonuçları, Çizelge 4.4'de sunulmaktadır ve numunenin gramı başına mg kateşin eşdeğeri olarak ifade edilmiştir. Serbest flavonoid içeriği 2 ile 7 mg KE / g KA arasında değişmiştir ve esterleşmiş flavonoid içeriği 1 ile 2.5 mg KE / g KA arasında değişmiştir. Daha önce belirtildiği gibi, flavonoidler dahil olmak üzere bağlı biyoaktif bileşikler, enzim uygulamaları kullanılarak ekstrakte edilmiştir, çünkü termal ve alkali uygulamaları, biyoaktif bileşikleri hücre duvarlarından ekstrakte etmek için yetersizdir. Enzim uygulamasıyla 1 - 2 mg KE / g KA, dolaylarında bağlı fenolik madde elde edilmiştir.

Nar atıklarındaki en yüksek miktardaki flavonoid miktarı serbest flavonoid olarak belirlenmiştir. Flavonoid içerikleri incelendiğinde; en yüksek flavonoid miktarı NK'de 11.7 mg KE / g daha sonra sırasıyla NM (8.7 mg KE / g), NÇ (4 mg KE / g) ve (NS 1.1 mg KE / g) bulunmuştur. NK'de NS'ye göre daha fazla flavonoid bulunması daha önce yayınlanan çalışmalar ile uyumludur (Singh ve ark., 2018). Çalışmamızda incelenen Hicaz nar kabuğu, Nana ve Tounsi çeşitlerinin nar kabuklarına göre daha az flavonoid içermektedir (Amri ve ark., 2017). Toplam flavonoid miktardaki farklılıklar meyve türü (ekşi ve tatlı türü) ve yetiştirme koşulları ile yakından ilgilidir (Li ve ark., 2015).

Orak ve ark., (2012), Hicaz narının toplam flavonoid miktarını sırasıyla NK'da 14.64 µg KE / mg, NS'da 1.18 µg KE / mg ve NÇ'de 15.82 µg KE / mg bulmuştur. Fellah ve ark., (2018), iki farklı nar türü arasında toplam flavonoid miktarını karşılaştırmıştır. En yüksek miktar Gabsi nar kabuğu 19.2 ± 1.1 mg RE / 100 g iken,

Nabli nar kabuğu TFC değeri 13.4 ± 1.6 mg RE / 100 g olarak bulunmuştur. Başka bir çalışmada (Rummun ve ark., 2013), nar kabuğu ve tohumun toplam flavonoid miktarı sırasıyla 180.10 ± 1.31 mg KE / g ve 0.33 ± 0.00 mg KE / g olarak ölçülümüştür.

Narda bulunan ana fenolik bileşiklerden biri tanendir ve konsantrasyonu narın besin kalitesi hakkında bilgi vermektedir (Amri ve ark., 2017). Nar dokularında hidrolize edilebilir tanen miktarı (HTM), Çizelge 4.4'de sunulmaktadır ve numune bazlı g başına mg tannik asit eşdeğeri olarak ifade edilmiştir. Narların serbest ve esterleşmiş fraksiyonlarında HTM, sırasıyla 10.4-102 mg TAE / g KA ve 17.7-20.5 mg TAE / g KA aralığında belirlenmiştir. (Çam ve ark., 2010) NK'de HTM'nı 82.6 ± 5.6 mg TAE / g bulmuşlardır ve bizim elde ettiğimiz değerden daha yüksektir. Ek olarak, hiçbir HTM NÇ'nin esterleşmiş bir fraksiyonu olarak tanımlanmamıştır. HTM, enzim uygulamasıyla ekstrakte elde edilen çözünmeyen bağlı fraksiyonda 1 ile 10.4 TAE / g KA arasında değişmiştir. Hidrolize edilebilir tanen içerikleri incelendiğinde; en yüksek HTM NK'da (130.1 mg TAE / g) daha sonra sırasıyla NM (100.9 mg TAE / g) , NÇ (11.04 mg TAE / g) ve NS (1.1 g TAE / g)'de bulunmuştur. NK'de gözlenen yüksek HTC konsantrasyonu, (Amri ve ark., 2017) tarafından belirtilen değerlerle uyumlıdır.

Saad ve ark., (2012) yaptıkları çalışmada Chelfi ve Gabsi nar çeşitlerinin HTM'sini 449.4 mg TAE / g ve 496.6 mg TAE / g olarak bulmuşlardır ve bulunan değerler birbirlerine yakındır. Başka bir çalışmada, NK'de HTM'nin 124.10-183.18 TAE / g KA aralığında olduğu bildirilmiştir (Orak ve ark., 2012). HTM, büyüme ve olgunluk koşullarından etkilenir, ancak meyve türünden etkilenmez (Li ve ark., 2015).

Antosiyanin içeriği meyve suyu kalitesi için iyi bir göstergedir ve meyve ve çiçeklerde kırmızı, mavi ve mor renkler antosiyaninden kaynaklanır (Zhang ve ark., 2010). Bu bileşikler, farklı pH seviyeleri arasındaki yapısal kromoforu temel alan bir yöntemle ölçülür. Çizelge 4.4'de, nar dokularındaki toplam monomerik antosiyanin içeriğini özetlemektedir. Sonuçlar, siyanidin-3-0-glükozit eşdeğeri (SGE) olarak

ifade edilmiştir. Değerler 0.01 ile 0.74 mg SGE / g arasında değişmektedir. NS, atık parçaların serbest, esterleşmiş ve çözünmeyen bağlı fraksiyonuna kıyasla en yüksek monomerik antosiyanine sahiptir. NK (Bağlı), NM (Esterleşmiş ve bağlı) ve NÇ (Serbest, esterleşmiş ve bağlı) gibi bazı fraksiyonlar saptanmamıştır.

Toplam antosiyanin içerikleri (TAM) incelendiğindeki; en yüksek NS 0.74 mg SGE / g daha sonra NK 0.31 mg SGE / g ve NM 0.01 mg SGE / g bulunmuştur. Orak ve ark., (2012) toplam antosiyanin miktar, NS'de 0.594-1.027 ug SGE / mg ve NK'da 0.017-0.040 ug SGE / mg arasında olduğunu tespit etmişlerdir. (Ambigaipalan ve ark., 2017) tarafından NS'nun TAM miktarı 0.44 mg SGE / g olarak ölçülmüş ve elde ettiğimiz değerinden iki kat daha düşük olduğu belirlenmiştir. NK ve NM'nin TAM'nın sırasıyla 3.1 ve 1.2 mg SGE / g olarak bulunmuştur (Ambigaipalan ve ark., 2016). NK'nin TAM'nın 0.44 mg SGE / g olarak değerlendirilirken, NM'de hiç antosiyanin saptanmamıştır (Fischer ve ark., 2011). Antosiyaninin glikolizasyon seviyesi çevre koşullarına, özellikle iklime bağlı olarak değişmekte ve ayrıca diglikoze edilmiş antosiyaninlerin oranı mevsimsel ısınma ile artmaktadır (Mollazadeh ve ark., 2016).

Çizelge 4.4. Nar kabuğu, Mezokarpı, Çekirdeği ve Nar suyunun elde edilen, Serbest, Esterleşmiş ve Çözünmeyen Bağlı fenolik fraksiyonların toplam fenolik, toplam flavonoid, hidrolize edilebilir tanen ve toplam monomerik antosiyanin içerikleri, ND = tespit edilmedi.

Örnek	**Fenolik fraksiyon**	**Fenolik (mg GAE/g)**	**Flavonoid (mg KE/g)**	**Hidrolize edilebilir tanen (mg TAE/g)**	**Antosiyanin (mg SGE/g)**
Nar kabuğu	*Serbest*	66.1 ± 0.4^{aA}	7 ± 0.5^{aA}	102 ± 0.3^{aA}	ND^{e}
	Esterleşmiş	12 ± 0.1^{cB}	2.5 ± 0.2^{cB}	17.7 ± 0.2^{cB}	ND^{e}
	Bağlı	6 ± 0.2^{dC}	2.2 ± 0.1^{dcC}	10.4 ± 0.1^{dC}	ND^{e}
Nar Mezokarpı	*Serbest*	52.2 ± 0.2^{bA}	5.6 ± 0.1^{bA}	72.3 ± 0.6^{bA}	ND^{e}
	Esterleşmiş	13.4 ± 0.1^{cB}	1.7 ± 0.01^{fedB}	20 ± 0.5^{cB}	ND^{e}
	Bağlı	7 ± 0.1^{dC}	1.4 ± 0.02^{fedC}	8.6 ± 0.1^{dC}	ND^{e}
Nar çekirdekleri	*Serbest*	2.2 ± 0.3^{eA}	2 ± 0.01^{edA}	10.4 ± 0.1^{dA}	ND^{e}
	Esterleşmiş	0.2 ± 0.01^{eC}	1.0 ± 0.01^{fB}	ND^{eC}	ND^{e}
	Bağlı	1.12 ± 0.07^{eB}	1.0 ± 0.01^{fB}	1 ± 0.1^{eB}	ND^{e}
Nar suyu		12 ± 0.1^{c}	1.1 ± 0.01^{fe}	8.3 ± 0.3^{d}	0.74 ± 0.10^{a}

Çizelgede verilen değerler ortalama ± standart sapma şeklindedir.
a,b,c,d,e,f Aynı sütunda bulunan farklı harfler Nar kabuğu, Mezokarpı, Çekirdekleri ve Nar suyun'den elde edilen toplam fenolik, flavonoid, hidrolize edilebilir tanen ve antosiyanin kendi içlerindeki farklılıkları göstermektedir.

A, B, C Aynı satırda bulunan farklı harfler Serbest, Esterleşmiş ve Çözünmeyen Bağlı fenolik fraksiyonların toplam fenolik, flavonoid, hidrolize edilebilir tanen ve antosiyanin kendi içlerindeki farklılıkları göstermektedir. ($p<0.05$)

4.6.Nar dokularının serbest, esterleşmiş ve bağlı fenolik fraksiyonlarının antioksidan aktivitesi

Antioksidanlar, serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarına karşı koruma sağlayabilir. Oksidatif stres kalp hastalığı, kanser, artrit, inme, solunum hastalıkları, immün yetmezlik, amfizem, Parkinson hastalığı ve diğer iltihaplı durumla ilişkilendirilmiştir.

Nar, yüksek antioksidan kapasiteye sahip değerli bir polifenol kaynağıdır. Bu nedenle "süper meyve" olarak bilinir (Fischer ve ark., 2011). Yüksek düzeyde doğal biyoaktif bileşikler (antosiyanin, fenolik, flavonoid, tanen) nedeniyle, narın kansere, yaşlanmaya, ateroskleroz, hipertansiyon, kalp krizi ve diğer kronik hastalıklara yol açan reaktif oksijen türleri üzerinde inhibe edici bir etkisi vardır (Ozgen ve ark., 2008). Doğal biyoaktif bileşikler ayrıca gıdaları oksidasyona karşı korur ve gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatır.

Gıda endüstrisinde insan sağlığı üzerinde yan etkileri olan sentetik malzemeler yerine, bir antioksidan olarak doğal bileşikler tercih edilmektedir (Derakhshan ve ark., 2018). Nar dokuları, özellikle NS ve NK yüksek oranda değerlendirilirken, nar atıklarının antioksidan kapasitesi, literatürde esterleşmiş ve bağlı çözünmeyen fraksiyonlar hakkında yeterli bilgi bildirilmemiştir. Her bir antioksidan bileşiğinin, in vivo koşullarda farklı etki mekanizmasına sahip olduğu göz önüne alındığında, gıda ürünlerinde antioksidan kapasiteyi göstermek için tek bir antioksidan tahlili yeterli olmayabilir (Yashin ve ark., 2017). Bu nedenle, dört yöntem: DPPH, ABTS +, FRAP ve CUPRAC, nar atıklarındaki serbest, esterleşmiş ve bağlı çözünmeyen fraksiyonların antioksidan kapasitelerini analiz etmek için kullanılmış ve sonuçlar µmol TROLOX / g olarak ifade edilmiştir.

4.6.1. Radikal süpürücü aktivitesi

Nar atıklarında serbest, esterleşmiş ve çözünmeyen fraksiyonların radikal süpürme aktivitesi DPPH ve ABTS süpürme testi ile değerlendirilmiştir. Nar dokularının DPPH testine dayalı süpürme aktivitesi sonuçları Çizelge 4.5'de verilmiştir. DPPH yöntemi, hidrojen radikalini veya bir elektronu, derin bir mor rengiyle stabil serbest radikal olan DPPH radikaline bağışlama kabiliyetine dayanmaktadır.

Tüm atıklar için serbest fraksiyonlar, esterleşmiş ve çözünmeyen bağlı fraksiyonlara kıyasla en yüksek DPPH süpürme aktivitesini (DPPH radikal süpürme aktivitesinin neredeyse %86'sı olan 55.5-850 µmol TROLOX / g) göstermiştir. Elde edilen sonuçlara göre en güçlü süpürme aktiviteleri NK (1149.3 µmol TROLOX / g), ardından NM (567.7 µmol TROLOX / g), NS (115.7 µmol TROLOX / g) ve NÇ (70.9 µmol TROLOX / g) olarak bulunmuştur. Fellah ve ark., (2018), Nabli nar kabuğu ve Gabsi nar kabuğu ekstraktları, DPPH yöntemiyle antioksidan aktivitesini belirlemiştir, sonuçlar sırasıyla 128.5 ± 9.7 ve 144.4 ± 4.5 mg GAE / 100 gr olarak bulunmuştur. NM'den fenolik fraksiyonun DPPH aktivitesi sırasıyla serbest sonar esterleşmiş ve bağlı bulunurken, (Ambigaipalan ve ark., 2016) çalışmasında sırasıyla esterleşmiş sonar serbest ve bağlı bulmuştur.

ABTS metodu ile ölçülen süpürme aktivitesi sonuçları Çizelge 5'de sunulmaktadır. ABTS, renkli bir monosasyonik radikaline ABTS'den oksitleyici bir ajan ile geçen bir kromojendir. Serbest fraksiyonlar 37.9 ile 775 µmol TROLOX / g arasında ABTS süpürme aktivitesi de göstermiştir. Bu değer esterleşmiş fraksiyonlarda 6 ile 239.7 µmol TROLOX / g arasında değişirken çözünmeyen bağlı fraksiyonlarda 32.7 ile 150.6 µmol TROLOX / g arasında değişmektedir. NK ve NM, sırasıyla 1166.2 ve 228.5 µmol / g TEAC ile en güçlü ABTS süpürme aktivitesini gösterirken, 50.4 µmol TROLOX / g ile NS ve 76.6 µmol / g TROLOX ile NÇ en düşük süpürme aktivitesini göstermiştir. Carbone ve ark., (2011), meyve kabuğunun yüksek seviyede DPPH ve ABTS faaliyeti gösterdiğini bildirmiştir. Sonuçlar, özellikle NK ve serbest fraksiyonunun, serbest radikallerin üretimini azaltmak için kullanılabileceğini açıklamaktadır (Liu ve ark., 2015). NK'un DPPH aktivitesi

2649.7 µmol TROLOX / g (Hasnaoui ve ark., 2014) ve ABTS aktivitesi 75 µmol TROLOX / g (Elfalleh ve ark., 2012) olarak bildirilmiştir.

NK'un ABTS aktivitesi 9.3 mmol TROLOX / g (Ambigaipalan ve ark., 2016) olarak belirtilirken (Fischer ve ark., 2011) nar kabuğunun ABTS aktivitesini 2.88 mmol TROLOX / g olarak bildirmişlerdir. NM, NÇ ve NS de ABTS aktivitelerinin sırasıyla 40.6 – 0.24 – 7.48 µmol TROLOX/g olduğunu bildirmişlerdir (Ambigaipalan ve ark., 2016). Bulunan serbest radikal süpürme aktivitelerindeki farklılıklar deneysel işlemlerden ve farklı polifenol içeriğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.6.2. İndirgeyici antioksidan gücü

Bir bileşiğin indirgeyici kapasitesi, antioksidan kapasitesi hakkında önemli bilgiler verebilir. Reaktif radikaller daha stabil olabilir ve antioksidanlar tarafından reaktif olmayan formlara dönüştürülebilir. Nar dokularının serbest esterleşmiş, bağlı fraksiyonlarının indirgeme gücü FRAP ve CUPRAC analizleri ile gösterilmiştir. FRAP metodu, reaksiyonun sonunda üretilen ferrik triiritiltriazin (FE3 + -TPTZ) ile reaksiyona giren bir antioksidanın ve renkli bir demirli triirridiltriazin (FE2 + -TPTZ) 'nin indirgeme aktivitesini gösterir. CUPRAC mekanizması, neocuproin varlığında antioksidanlar tarafından CU^{2+} 'yı CU^{+} ' ya dönüştüren süreci kapsar (Gülçin ve ark., 2008).

FRAP metot ile araştırılan indirgeme gücü Çizegle 4.5'de sunulmaktadır. Serbest, esterleşmiş ve bağlı fraksiyonların indirgeme gücü sırasıyla 9.4-755.4, 2-218.2 ve 4.1-163.5 µmol TROLOX / g aralığında belirlenmiştir. Değerlendirilen tüm dokular arasında, NK en yüksek indirgeme gücü ve ardından NM, NS, ve NÇ en düşük potansiyeli sergiledi. Nar kabuğu, membranı ve çekirdekleri kısımlarına kıyasla en yüksek indirgeyici antioksidan gücüne (82.11 mmol TROLOX / 100 g) sahiptir (Li ve ark., 2006). Başka bir çalışmada, NK ve NS'nin FRAP değerleri sırasıyla 21.24-29.80 ve 6.44-8.65 mmol TROLOX / 100 g olarak bildirilmiştir (Elfalleh ve ark., 2012). Bu çalışmada Hicaz nar kabuğunun FRAP sonuçları 1137.1

µmol TROLOX / g iken Gabsi nar kabuğu 124.9 mg GAE / 100 g'dır (Fellah ve ark., 2018 ; Fischer ve ark., 2011) yaptığı çalışmada, NK, NM ve NS'nin FRAP aktivitesini sırasıyla 589.1 mmol TROLOX / kg, 1132.7 mmol TROLOX / kg ve 31.5 mmol TROLOX / L olarak ölçmüşlerdir.

Kuprik indirgeyici antioksidan kapasite CUPRAC, Cu^{2+} 'nın antioksidanlar tarafından $Cu1^{+}$ 'e indirgenmesine dayanan yönteme göre belirlenmiştir (Deng ve ark., 2011). CUPRAC analiz için sonuçlar Çizegle 5'de sunulmaktadır. Nar atıklarındaki en yüksek CUPRAC antioksidan kapasite nar kabuğunda 1.624 µmol TROLOX / g olarak belirlenmiştir, daha sonra sırasıyla NM'de 816.9 µmol TROLOX / g, NÇ'de 22.6 µmol TROLOX / g ve NS'de 0.15 µmol TROLOX / g bulunmuştur.

Yapılan antioksidan aktivite tayin analizlerine göre en yüksek antioksidan aktiviteye nar kabuğunun, en düşük antioksidan aktiviteye ise nar çekirdeğinin sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.5. Nar kabuğu, mezokarpı, çekirdeği ve nar suyunun serbest, esterleşmiş ve çözünmeyen bağlı fenolik fraksiyonların antioksidan aktiviteleri.

Örnek	Fenolik fraksiyon	DPPH (µmol Trolox/g)	ABTS (µmol Trolox/g)	FRAP (µmol Trolox/g)	CUPRAC (µmol Trolox/g)
Nar kabuğu	*Serbest*	850. ±0.8^{aA}	775.9±1.6^{aA}	755.4±1.0^{aA}	954.4±3.1^{aA}
	Esterleşmiş	209.4±0.2^{cB}	239.7±0.4^{cB}	218.2 ±0.2^{bB}	383.3±1.2^{bB}
	Bağlı	89.9±0.9^{deC}	150.6 ±0.2^{dC}	163.5 ±0.9^{bcC}	286.3±2.6^{bcC}
Nar mezokarpı	*Serbest*	485.6 ±1.5^{bA}	745.6 ±1.1^{bA}	551.4 ±1.2^{aA}	416.8±1.1^{bA}
	Esterleşmiş	54.3±0.1^{efB}	116.3±0.8^{eB}	156.5 ±0.3^{bcB}	268.9±2.1^{bcB}
	Bağlı	27.8±0.4^{fgC}	112.2±0.2^{eC}	102.5 ±0.2^{bcC}	131.2±0.8^{cdC}
Nar çekirdekleri	*Serbest*	55.5±0.4^{efA}	37.9±0.1^{gA}	9.4 ±0.1^{bcA}	10.6±0.6^{dA}
	Esterleşmiş	3.9±0.3^{gC}	6.0 ±0.1^{gC}	2.0 ±0.01^{cC}	4.6±0.3^{dC}
	Bağlı	11.5±0.8^{gB}	32.7±0.6^{hB}	4.1 ±0.2^{bcB}	7.4±0.1^{dB}
Nar suyu		115.7±2.6^{d}	50.4±0.2^{f}	176.4 ±2.3^{bc}	0.15±0.0^{d}

Çizelgede verilen değerler ortalama ± standart sapma şeklindedir.
a,b,c,d,e,f,g,h Aynı sütunda bulunan farklı harfler Nar kabuğu, Mezokarpı, Çekirdekleri ve Nar suyun'den elde edilen serbest, esterleşmiş ve çözünmeyen bağlı fenolik fraksiyonların antioksidan aktiviteleri kendi içlerindeki farklılıkları göstermektedir.
A, B, C Aynı satırda bulunan farklı harfler Serbest, Esterleşmiş ve Çözünmeyen Bağlı fenolik fraksiyonların serbest, esterlenmiş ve çözünmeyen bağlı fenolik fraksiyonların antioksidan aktiviteleri kendi içlerindeki farklılıkları göstermektedir. ($p<0.05$)

4.7.Nar dokularının serbest, esterleşmiş ve bağlı fenolik fraksiyonlarının Anti-diyabetik aktivitesi

İnsanlar arasında en yaygın görülen diyabet türü olan Tip 2 diyabet, diyabetli toplam hasta sayısının yüzde 90 ile 95'i arasındadır. Bu tip diyabet genellikle yaş, obezite, kalıtım, hastalıklı aile öyküsü, kişisel tıbbi geçmiş (örneğin gebelik diyabeti vakaları), fiziksel hareketsizlik ve etnik köken ile ilişkilidir. Tip 2 diyabeti olan hastalar, pankreas enzimleri üretmek için yeterli insüline sahiptir, ancak vücut açıklanamayan nedenlerden dolayı, insülin direnci olarak bilinen nedenden dolayı insülinden etkin bir şekilde faydalanamamakta ve kullanmamaktadır. Birkaç yıl sonra, insülin üretimi azalımaktadır. Hastanın durumu tip 1 diyabete benzer. Kan şekeri biriktirilir ve vücut etkin bir şekilde kendi enerji kaynağını (glikoz) kullanamaz (Elya ve ark., 2015).

Nar, son zamanlarda tip 2 diyabet tedavisinin önlenmesinde etkili bir tıbbi etkiye sahip, çok zengin bir aktif bileşik kaynağı olarak kabul edilmiştir. Nardaki anti-diyabetik etkiye sahip aktif maddelerden biri punikalagin ve ellajik, gallik, oleanolik, ursolik ve allik asitlerdir. Ayrıca, nar suyunun, polifenolik tanen ve antosiyaninler nedeniyle tip 2 diyabet üzerinde güçlü bir etkisi vardır. Bu bileşikler temel olarak, bazı antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak doğrudan veya dolaylı olarak meydana gelen ROS'un zarar verici etkilerini antagonize ederek etkiler (Banihani ve ark., 2013).

Farklı fenolik fraksiyonlara sahip nar ekstraktları (NK-NM-NÇ ve NS), in vitro α-amilaz ve α-glukosidaz inhibe edici aktiviteler için ölçülmüştür ve sonuçlar, IC_{50} değerleri olarak ifade edilerek Çizegle 4.6'da gösterilmiştir. Sonuçlardan, α-amilaz inhibe edici aktivitenin, nar ekstraktlarının α-glukosidaz inhibe edici aktivitesinden daha düşük olduğunu gözlemlenmiştir. α-amilaz inhibe edici aktivitenin IC_{50} değerleri 6 ile 85.5 mg / ml arasında değişmiştir. Esterleşmiş fenolik fraksiyon 1.49 ile 6.02 mg / ml arasında değişirken, diğer fenolik fraksiyonlarla (Serbest ve Bağlı) daha yüksek bir aktiviteye sahiptir.

Kam ve ark., (2012), NK'nin metanolik ekstraktının, α-amilazın yetersiz olduğu, ancak IC_{50} değeri 0.84 mg / mL olan α-glukosidaz enzimi inhibe edebildiğini

bildirmiştir. Ambigaipalan ve ark., (2016) NK'nın α-glukosidaz inhibe edici aktivitesi 0.99 ile 20.66 mg / ml arasında değişmiştir ve bizim bulduğumuz değer 0.03 ile 0.45 mg / ml arasında değişmiştir. NM'nın esterleşmiş fenolik fraksiyonu 1.49 ± 0.29 mg / ml, diğer fraksiyonlarla (Serbest ve Bağlı) karşılaştırıldığında daha yüksek aktiviteye sahiptir (Ambigaipalan ve ark., 2016).

Serbest fraksiyonlar, α-glukosidaz enziminin aktif merkezini engel etmek için esterleşmiş ve bağlı fraksiyonlara kıyasla daha etkilidirler. Ayrıca, nar dokularına ait fenolik fraksiyonları α-amilaz enzimini inhibe etme yeteneği bakımından α-glukozidaz enzimine göre daha etkili bulunmuştur. Çizegle 4.6'da gösterildiği gibi, esterleşmiş fenolik fraksiyonlar, α-amilaz enzimi inhibisyonunda diğer fraksiyonlara göre daha etkilidir. Bu sonuçlar fenolik fraksiyonların enzimlerin mekanizmalarını farklı şekilde etkilediklerini açıkça ortaya koymuştur. Sonuçlarımız, materyallerde bulunan fenolik bileşik tipinin enzim inhibisyonundaki biyoaktif bileşiklerin miktarına kıyasla daha önemli olduğunu açıkça göstermiştir. Biyoaktif bileşiklerin miktarı (fenolik ve antosiyanin) ile enzim inhibisyon aktiviteleri arasında korelasyon gözlenmemiştir (Ambigaipalan ve ark., 2016). Başka bir çalışmada, gallik asit ve ellagik asit, α-glukosidaz enziminin aktif merkezini engel etmek için iyi birer ajan olduklarını ortaya koymuştur (Kam ve ark., 2012).

Çizelge 4.6. Nar kabuğu, mezokarpı, çekirdeği ve nar suyunun serbest, esterleşmiş ve çözünmeyen bağlı fenolik fraksiyonlarının IC_{50} değerleri.

Örnek	**Fenolik fraksiyon**	**α-glukosidaz IC_{50} (mg/mL extract)**	**α-amilaz IC_{50} (mg/mL extract)**
Nar kabuğu	Serbest	0.03 ± 0.0^{cC}	26.1 ± 1.2^{bB}
	Esterleşmiş	0.45 ± 0.0^{cA}	5.7 ± 0.3^{cC}
	Bağlı	0.43 ± 0.0^{cB}	32 ± 1.1^{bA}
Nar mezokarpı	Serbest	0.01 ± 0.0^{cC}	11.0 ± 0.4^{cA}
	Esterleşmiş	0.24 ± 0.0^{cA}	1.5 ± 0.3^{cC}
	Bağlı	0.05 ± 0.0^{cB}	7.9 ± 0.3^{cB}
Nar çekirdekleri	Serbest	0.24 ± 0.0^{cC}	11.7 ± 0.6^{cA}
	Esterleşmiş	32.92 ± 0.1^{bA}	6 ± 0.2^{cC}
	Bağlı	46.85 ± 0.4^{aB}	7.5 ± 0.9^{cB}
Nar suyu		0.86 ± 0.01^{c}	85.5 ± 1.4^{a}

Çizelgede verilen değerler ortalama ± standart sapma şeklindedir.

a,b,c Aynı sütunda bulunan farklı harfler Nar kabuğu, Mezokarpı, Çekirdekleri ve Nar suyun'den elde edilen serbest, esterleşmiş ve çözünmeyen bağlı fenolik fraksiyonların anti-diyabetik aktiviteleri kendi içlerindeki farklılıkları göstermektedir.
A, B, C Aynı satırda bulunan farklı harfler Serbest, Esterleşmiş ve Çözünmeyen Bağlı fenolik fraksiyonların serbest, esterleşmiş ve çözünmeyen bağlı fenolik fraksiyonların anti-diyabetik aktiviteleri kendi içlerindeki farklılıkları göstermektedir. ($p<0.05$)

4.8.Nar dokularının antimikrobiyal aktivitesi

Nar dokularının antimikrobiyal aktivitesi, Gram negatif (*E.coli ve P. aerugonisa*), Gram pozitif (*S. aureus ve E. Faecalis*), mantar ve küflere karşı agar difüzyon metotu kullanılarak ölçülmüştür. Antimikrobiyal aktivite, mikrobisidial olarak adlandırılan mikroorganizmaları öldüren veya biyostatik olarak adlandırılan büyümesini durduran bir madde olduğunda ortaya çıkmaktadır.

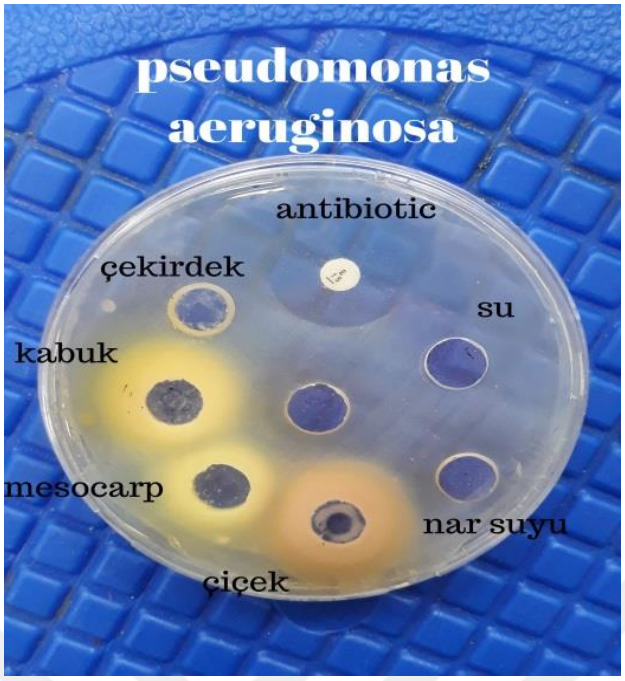
Seçilen mikroorganizmalardaki nar dokularının inhibisyon zon çapları için sonuçlar Çizelge 4.7'de sunulmaktadır. Beklendiği gibi, nar dokuları birbirlerinden farklı mikrobiyal etkiler sergilemiştir. NÇ dışındaki tüm dokular, *E.coli, P. aeruginosa, S. aureus, E. faecalis ve C. albicans'a* karşı antimikrobiyal etki gösterirken, nar dokularının *A. brasiliensis* üzerinde belirgin bir inhibitör etkisi gözlenmemiştir. Aynı zamanda, *C. albicans, A. brasiliensis* hariç, tahlil edilmiş mikroorganizmalarla karşılaştırıldığında, nar dokularına karşı en az duyarlılığa sahiptir. Yapılan bir çalışmada elde edilen sonuca benzer şekilde nar atıklarında antifungal aktivite tespit edilememiştir (Reddy ve ark., 2007). Gram negatif bakteriler arasında *P. aerugonisa, E. coli*'den daha dirençli olduğu belirlenmiştir. NK'nin su ekstraktları, *P. aeruginosa'da* küçük inhibisyon bölgelerine sahipken, *E.coli'ye* inhibe edici aktivite yok tespit edilmiştir (McCarrell ve ark., 2008). Oraki ve ark., (2011), Hicaz nar NK'nin *E.coli'ye* karşı IZ = 31.93 ± 0.55 mm olan bir inhibisyon etkisine sahip olduğunu bildirmiştir. Gram-pozitif arasında, *E. faecalis, S. aureus'tan* daha dirençlidir. McCarrell ve ark., (2008), otoklavlanan NK'nin, *S. aureus'a* karşı inhibe edici aktiviteye sahip olduğunu da göstermiştir. Oraki ve ark., (2011), Hicaz nar NK'nin, *S.aureus'a* karşı en yüksek konsantrasyonda 20.50 ± 0.60 mm olduğunu bildirmiştir. Ek olarak, Gram negatif bakterilerin genellikle lipopolisakarit membranlarından dolayı Gram pozitif bakterilere göre daha hassas duyarlı oldukları belirtilmektedir (Rev ve ark., 2003 ; Heesterbeek ve ark., 2019).

Antimikrobiyal aktivitenin daha kesin bir değerlendirmesi için, bir mikro-seyreltme deneyi yapılmıştır. Seçilen patojenik mikroorganizmaların nar dokuları ekstraktlarına karşı duyarlılığı araştırılmıştır ve sonuçlar MIC ve MBC olarak ifade edilmiştir (Çizelge 4.7). NÇ dışındaki nar dokuları ekstraktlarının, test edilen bakteri ve mantarlara karşı, <6.25-200 mg / mL MIC ve MBC'yi 6.25-> 200 mg / mL olan inhibe edici aktiviteye sahiptir. Küf dışındaki analiz edilmiş mikroorganizmalar arasında, *C. albicans*, 125-200 mg / mL MIC ile nar dokuları ekstraktlarının antimikrobiyal etkisine en dirençli olan mikroorganizmadır. Sonuçlar, bakteri, mantar ve küfün duyarlılığının genellikle birbirinden farklı olduğunu göstermiştir. Nar dokuları karşılaştırıldığında, NK ve NM, NS ve NÇ'den daha düşük MIC ve MBC'ye sahiptir. *E. coli'nin* büyümesi, sırasıyla 12.5, 25 ve 125 mg / mL MIC değerleri olan NK, NM ve NS ile inhibe edilmiştir. Voravuthikunchai ve ark., (2005), etanolik NK ekstraktının, *E. coli'ye* antimikrobiyal aktivitesinin, 0.5-3 mg / mL MIC değerlerine sahip olduğunu bildirmiştir. MIC değeri 40 mg / mL olan nar ekstraktları, *E. coli* karşı antimikrobiyal aktivite sahip olduğu belirtilmektedir (Gullon ve ark., 2016). Genel olarak, *S.aureus*, 25-50 mg / mL MIC değerleri ile nar dokularına karşı en dirençli bakteridir; NK'nin su-metanol ekstraktına kıyasla daha yüksek bir MIC (MIC 2 mg / mL) (Zoreky ve ark., 2009). *S.aureus'a* karşı MIC, 0.62 ile 2.250 mg / mL arasında olduğu tespit edilmiştir (Prashanth ve ark., 2001; Machado ve ark., 2003 ; McCarrell ve ark., 2008) . Başka bir çalışmada, narın etanolik ekstraktı, *S.aureus*'a karşı etkisiz olduğu belirlenmiştir (Nascimento ve ark., 2000). NK ve NM aynı MIC'ye (*P. aerugonisa'ya* karşı 12.5 mg / mL; NK'nin metanolik ekstraktından (10 mg / mL) daha yüksek bir MIC'e sahiptir Navarro ve ark., (1996) ve nar ekstraktlarından daha düşüktür (40 mg / mL) Gullon ve ark., (2016) ve yaban mersini ekstraktı (MIC 50 mg / mL) Silva ve ark., (2013). Genel olarak, <6.25-125 mg / mL MIC değerleri olan nar dokuları, *E. faecalis*'in büyümesinin en yüksek inhibisyonunu yapabilen kadardı. Duman ve ark., (2009), bu çalışmada analiz edilen aynı mikroorganizma ile farklı nar çeşitlerinin MIC'si olarak antimikrobiyal aktivitelerin, 40 ile > 90 ug / mL arasında olduğunu bildirmiştir. NK'nin *L. monocytogenes* (Hayrapetyan ve ark., 2012), *C. albicans* (Endo ve ark., 2010), *P. putita* ve *S. cerevisiae* Kharchoufi ve ark., (2018) gibi ve diğer bakterlere ve mayalara karşı inhibisyon aktivitesi çalışılmıştır.

Sonuçlar kapsamlı bir şekilde değerlendirildiğinde, güçlü antimikrobiyal etkiye sahip nar dokuları nispeten yüksek fenolik içerik, radikal temizleme aktivitesi ve indirgeyici güce sahip olanlardı. Nar dokularının antimikrobiyal aktivitesi fenolik içeriklerle yakından ilişkilidir. İncelenen nar dokularında fenolik madde içerikleri tespit edilirken bu fenolik maddeler içindeki en yüksek hidrolizlenebilir tananlere aittir ve en yüksek tananler nar kabuğunda bulunmuştur. Bu sonuçlar sadece toplam fenolik içeriğinin değil aynı zamanda tanen içeriğinin de dokuların antimikrobiyal aktivitesinin oluşumun da etkili olduğunu göstermiştir. Daha önceki çalışmalar da benzer sonuçlar bildirilmiştir (Gil ve ark., 2000 ; Zoreky ve ark., 2009 ; Gullon ve ark., 2016 ; Kharchoufi ve ark., 2018). Fenolik grupların antimikrobiyal etkinliği kimyasal yapılarından, özellikle de OH gruplarından kaynaklanmaktadır (Geissman ve ark., 1963 ; Heim ve ark., 2002). Gruplar, mikroorganizmaları protein ve hücre bağlanmalarında, enzimin etkisizleştirilmesinde ve DNA replikasyonunda önemli roller oynayarak etkilediği belirtimektedir (Brooks ve ark., 2001).



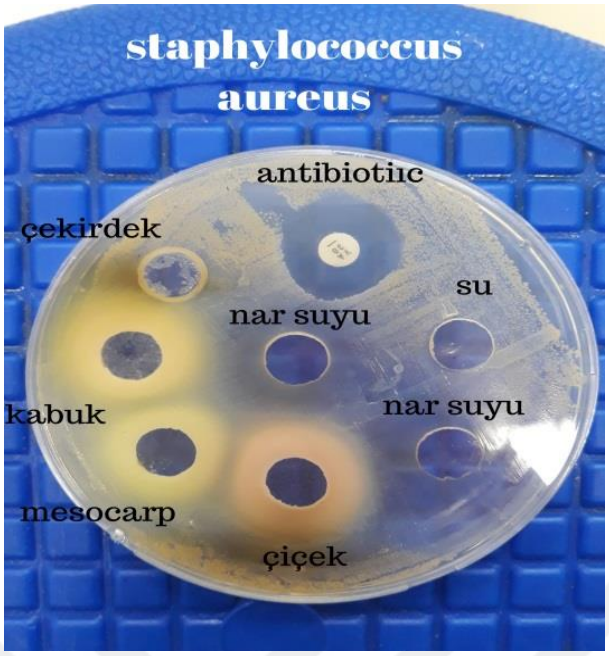
Şekil 4.3. Nar kabuğu, mezokarpı, çekirdeği ve nar suyunun antimikrobiyal aktivitesi *E.coli* karşı inhibisyon bölge çapları



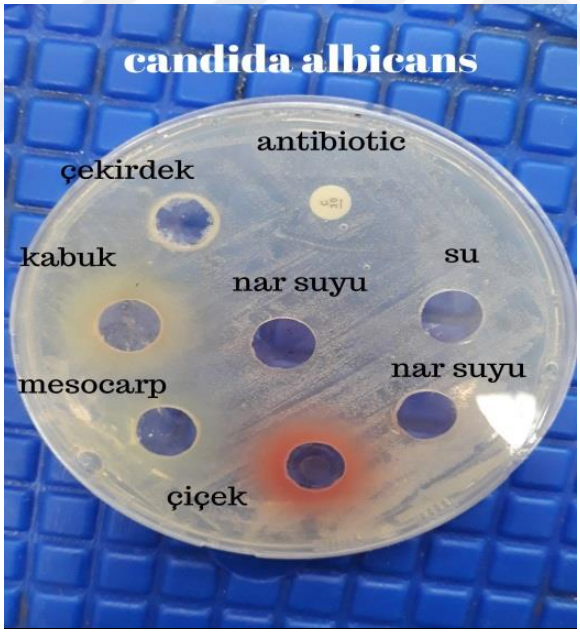
Şekil 4.4. Nar kabuğu, mezokarpı, çekirdeği ve nar suyunun antimikrobiyal aktivitesi *P.aeruginosa* karşı inhibisyon bölge çapları



Şekil 4.5. Nar kabuğu, mezokarpı, çekirdeği ve nar suyunun antimikrobiyal aktivitesi *E.faecalis* karşı inhibisyon bölge çapları



Şekil 4.6. Nar kabuğu, mezokarpı, çekirdeği ve nar suyunun antimikrobiyal aktivitesi S.aureus karşı inhibisyon bölge çapları



Şekil 4.7. Nar kabuğu, mezokarpı, çekirdeği ve nar suyunun antimikrobiyal aktivitesi *C.albicans* karşı inhibisyon bölge çapları

Çizelge 4.7. Nar kabuğu, mezokarpı, çekirdeği ve nar suyunun antimikrobiyal aktivitesi, ND= tespit edilmedi.($p<0.05$)

	Nar Kabuğu			Nar Mezokarpı			Nar suyu		
	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	IZ (cm)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	IZ (cm)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	IZ (cm)
E. coli ATCC 8739	12.5	25	2.9	25	50	2.4	125	>125	1.7
S. aureus ATCC 6538	50	100	2.3	25	50	2.2	50	100	1.8
P.aerugonia ATCC 9027	12.5	25	2.6	12.5	25	2.0	50	125	1.1
E. faecalis ATCC 29212	<6.25	6.25	2.1	25	50	1.9	125	>125	1.3
C. albicans ATCC 10231	200	>200	1.6	200	>200	1.4	125	>125	1.3
A.brasiliens ATCC 16404	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

4.9.Nar dokularında fenolik bileşiklerin ve şeker kompozisyonunun belirlenmesi

Bitkilerdeki fenolik asitler serbest, esterleşmiş ve çözünmeyen bağlı formlarda bulunabilir (Wang ve ark., 2017). Serbest fenolikler (neoklorojenik asit, klorojenik asit, kinik asit, (+) - kateşin, p-hidroksibenzoik asit, vanilik asit), esterleşmiş fenolikler (protokateik asit, gentisik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, sinapik asit, 2,3,4-trihidroksi benzoik asit), çözünmeyen bağlı fenolikler (protokateşik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, kersetin) bitki dokularında yaygın olarak bulunur. Hidroksisinamik asit ve türevleri, hidroksibenzoik asit türevleri, flavan-3-ols ve flavonoller dört nar dokularında tanımlanmış ve ölçülmüştür (Çizelge 4.8).

Elde ettiğimiz sonuçlar, hidroksisinamik asit ve Aseto hidroksisinamik asitlerin, nar kabuğundaki ve nar mezokarpındaki serbest fenolik asitlerin ikisi olduğunu göstermiştir. Serbest fenolik fraksiyon ayrıca vanillik asit ve kateşin içerir. Kateşin flavan-3-ol, nar kabuğundaki, nar mezokarpındaki en bol bulunan serbest fenolik ve nar suyunda en fazla bulunan ikinci fenoliktir ve nar çekirdeğinde

ortalama seviyelerde bulunan fenoliktir. Dört farklı nar dokularında kateşini saptayabildik. Kateşin konsantrasyonu, nar dokularında 19.0 ppm ile 1063.2 ppm arasında değişmiştir.

Ticari ve deneysel meyve suları arasında gözlenen ana fark, ticari meyve sularında bulunan yüksek punicalagin ve ellagik asit içeriğidir (Gil ve ark., 2000). Narın farklı kültür metanolik kabuğu ekstraktındaki en belirgin fenolik bileşiklerin bireysel konsantrasyonlarını belirlemek için yüksek performanslı sıvı kromatografi-kütle spektrometresi HPLC-MS kullanılmıştır (Fawole ve ark., 2012). Yedi bireysel fenolik tanımlanmış ve ölçülmüştür. Fenolik profil ve konsantrasyon meyve çeşitlerinde farklılık göstermiştir. Nar dokularının ekstraktının yetmiş dokuz bireysel fenolik bileşiği, çoğunlukla çözünmeyen bağlı şeklinde HPLC-MS kullanılarak tanımlanmıştır (Ambigaipalan ve ark., 2016). Nar kabuğundaki başlıca fenolik bileşik gallik asittir, oysa kaempferol 3-o-glukozit majör flavonoiddir. Dahası, ellagik asit ve monogalloil-heksosid başlıca hidrolizlenebilir tanenlerdir, baskın proantosiyanidin prosiyanidin dimerleriydir.

NK, NM, NÇ ve NS'de toplam 16 farklı fenolik bileşik tanımlanmıştır (Fischer ve ark., 2011). NK, NM ve NS'de 48 farklı fenolik bileşik tespit edilmişlerdir.

Elde edilen sonuçlara göre salisilik asit sadece NM'de bulunmuştur. Tespit edilen en yüksek miktardaki fenolik bileşik kateşindir 1063.2 ppm ve NK'de bulunmuştur. NM'de yüksek miktarda gallik asit 21.8 ppm bulunmuştur ve sağlık hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerine karşı sitotoksisite gösterdiği belirlenmiştir. NÇ'de vanillik asit 78.3 ppm olarak bulunmuştur ve anti-enflamatuar, antimikrobiyal ve antifungal özelliklere sahiptir.

Çizelge 4.8. Nar kabuğu, mezokarpı, çekirdeği ve nar suyunun fenolik bileşikleri, LC-ESI-MS / MS ile tanımlanmıştır, ND=tespit edilmedi.

Fenolik bileşikler	Tutma süresi	MF	öncül iyon	Nar kabuk (µg/g)ppm	Nar Mezokarp (µg/g)ppm	Nar çekirdek (µg/g)ppm	Nar suyu (µg/g)ppm
Kateşin	4.555	$C_{15}H_{14}O_6$	291.10	1063.2±2.5^{a}	52.8±1.8^{b}	50.3±1.1^{b}	19.0±1.9^{c}
Asetohidroksamik asit	1.995	$C_2H_5NO_2$	76.10	0.3±0.0^{b}	0.8±0.2^{a}	0.2±0.0^{c}	0.2±0.1^{c}
Vanillik asit	6.436	$C_8H_8O_4$	168.80	67.4±0.7^{b}	60.9±0.8^{c}	78.3±1.5^{a}	2.1±0.5^{d}
Resveratrol	5.604	$C_{14}H_{12}O_3$	229.10	1.1±0.1^{c}	1.1±0.3^{c}	1.4±0.2^{b}	2.1±0.4^{a}
Fumarik asit	3.713	$C_4H_4O_4$	115.20	2.2±0.1^{b}	2.1±0.1^{b}	3.5±0.3^{a}	nd
gallik asit	4.114	$C_7H_6O_5$	169.20	20.5±0.4^{a}	21.8±0.9^{a}	14.5±1.0^{b}	2.5±0.6^{c}
Kafeik asit	5.180	$C_9H_8O_4$	179.20	1.7±0.2^{b}	0.4±0.1^{c}	2.5±0.6^{a}	nd
Phloridzindi hidrat	4.718	$C_{21}H_{28}O_{12}$	435.00	69.7±0.6^{a}	3.6±0.4^{d}	5.1±0.7^{c}	28.7±2.0^{b}
Oleuropein	5.237	$C_{25}H_{32}O_{13}$	539.10	1.1±0.1^{b}	nd	nd	18.79±0.5^{a}
Hidroksisinamik asit	5.510	$C_9H_8O_3$	163.20	35.9±1.0^{b}	65.8±1.3^{a}	34.4±1.2^{b}	nd
Ellagik asit	5.714	$C_{14}H_6O_8$	300.90	1034.7±2.7^{a}	590.8±2.6^{b}	81.1±1.0^{c}	26.52±1.6^{d}
Silimarin	5.236	$C_{25}H_{22}O_{10}$	481.00	27.9±0.9^{a}	28.2±1.6^{a}	nd	8.18±1.3^{b}
Butein	5.754	$C_{15}H_{12}O_5$	271.10	0.3±0.01^{a}	0.1±0.0^{b}	0.3±0.0^{a}	nd
Hidroksibenzoik asit	6.105	$C_7H_6O_3$	137.20	1.1±0.1^{b}	2.3±0.6^{a}	0.6±0.1^{c}	0.3±0.1^{d}
Salisilik asit	6.046	$C_7H_6O_3$	137.20	nd	0.1±0.0	nd	nd
Curmin	6.495	$C_{12}H_{19}O_6$	301.10	nd	nd	nd	nd

Çizelgede verilen değerler ortalama ± standart sapma şeklindedir.
a,b,c,d Aynı sütunda bulunan farklı harfler Nar kabuğu, Mezokarpı, Çekirdekleri ve Nar suyun'den elde fenolik bileşkleri kendi içlerindeki farklılıkları göstermektedir.($p<0.05$)

Çizelge 4.9'de belirtilen nar dokularının şeker bileşimi, mg / g olarak ifade edilmiştir. Tüm nar dokularında glukoz, fruktoz ve sukroz saptanmış ve ölçülmüştür. Glukoz tüm dokularda ana şekerdi, ardından fruktoz ve sükroz. En yüksek glukoz NM'de (115.4 mg / g) ve en yüksek fruktoz NK'da (58.1 mg / g) saptanırken, atık parçalar arasında NÇ'de en düşük glikoz ve fruktoz seviyeleri saptanmıştır.

Gabsi nar türünden elde edilen nar suyu sırasıyla 85.12, 2.08 ve 99.69 g / L olarak glukoz, sukroz ve fruktoz şekerlerine sahiptir. Hasnaoui ve ark., (2011), Hicaz nar tipinden elde edilen meyve suyunda da benzer şekilde sırasıyla 11316.726, 66.701 ve 3081.251 mg / g olarak belirtilen bu şekerler bulunmuştur. Çalışılan tüm dokularda arabinoz, ksiloz ve mannoz saptanmamıştır.

Çizelge 4.9. Nar kabuğu, mezokarpı, çekirdeği ve nar suyunun şeker bileşikleri, HPLC ile tanımlanmıştır.

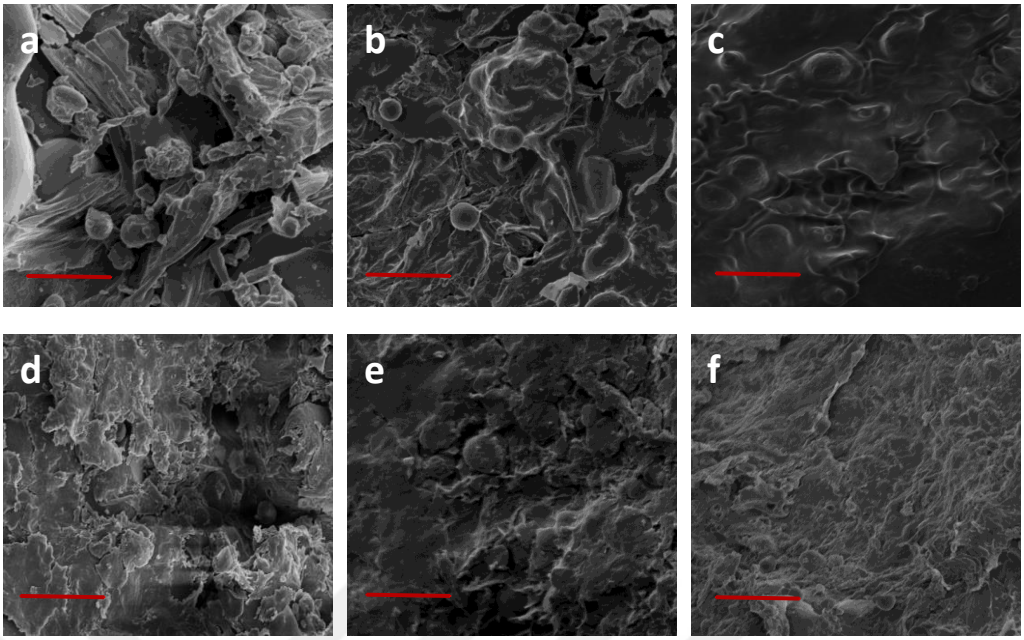
	NK mg/g	NM mg/g	NÇ mg/g	NS mg/g
Glukoz	90.2 ± 0.1^{c}	115.4 ± 0.3^{b}	0.78 ± 0.3^{d}	11316.7 ± 2.7^{a}
Fruktoz	58.1 ± 0.3^{b}	46.6 ± 0.8^{c}	11.7 ± 0.4^{d}	3081.2±2.2a
Sukroz	10.0 ± 0.9^{c}	11.7 ± 0.1^{b}	0.56 ± 0.0^{d}	66.7 ± 0.2^{a}

Çizelgede verilen değerler ortalama ± standart sapma şeklindedir.
a,b,c,d Aynı sütunda bulunan farklı harfler Nar kabuğu, Mezokarpı, Çekirdekleri ve Nar suyun'den elde şeker bileşkleri kendi içlerindeki farklılıkları göstermektedir.($p<0.05$)

4.10.Nar dokularında taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Nar dokularına ait SEM görüntüleri Şekil 4.8'de verilmektedir. Enzimatik işlem gören dokular daha fazla parçalanırken enzim uygulanmamış dokular daha sağlam kalmıştır.

Bu kırıntı büyük olasılıkla selüloz, hemiselüloz ve pektin fraksiyonlarından oluşur. Nar hücresi duvarlarında hidrolitik enzimlerin bozucu aktivitesi, enzimatik işlemden sonra bağlı fenolik bileşiklerin salınımı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.8. İşlem görmemiş (a-c) ve enzim ile muamele edilmiş (d-f) nar dokularının SEM görüntüleri. İşlem görmemiş nar kabuğu (a), nar mesocarp (b), nar çekirdeği (c). Enzim işlenmiş nar kabuğu (d), nar mezokarp (e), nar çekirdeği (f). Ölçek çubukları 10 mikron µm.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Nar suyu değerli bir fitokimyasal kaynağıdır. Yaplan çalışmalar nar suyunun insan beslenmesi için önemli bir kaynak olduğunu ve insan sağlığını olumlu yönde etkileyen bir gıda maddesi olduğunu ortaya koymuştur.

Yapılan bu çalışmada narın yenilebilir kısımları kabuklarının, mezokarbının ve çekirdeğinin de önemli birer fitokimyasal kaynağı olduğunu ortaya koymuştur.

Kullanılması gereken binlerce ton katı atık var, kabuklar ve çekirdekler, toplam meyvenin sırasıyla % 34 ile 41'ini ve % 3.9 ile 14.4'ünü oluştururlar. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, nar atıkalrın kimyasal bileşiminin, gıda endüstrisinde ve insan beslenmesinde, antimikrobiyal ve antioksidant olarak kullanılabileceği açıktır.

Sonuçlarımıza göre, araştırmacıların, nar fitokimyasallarının bileşimi konusundaki anlayışımızı geliştirmek için kütle spektral analizi ve NMR teknikleri gibi fitokimyasal analizler ile birlikte kullanılacak yeni kromatografik ayırma yöntemleri geliştirmeye devam etmesinin çok önemli olduğunu tartışabiliriz.

Bu çalışmanın kapsamı nar meyvesinde bulunan fitokimyasalların biyoaktiviteleri hakkındaki güncel bilgileri gözden geçirmektir.

Nar meyvesi önemli bir biyoaktif madde kaynağıdır ve son yıllarda artık fonksiyonel bir gıda olarak değerlendirilmeye başlanmıştır. Son yıllarda artan tüketici bilinci ve ekonomik refar fonksiyonel gıdalara olan talebi artımıştır.

Yapılan bilimsel çalışmalar narın antienflamatuar, antidiabet, antioksidan ve antimikrobiyal etkilere sahip olduğunu göstermiştir.

Ancak nar üzerinde yapılan çalışmalar çoğunlukla narın yenilebilir kısımlarına odaklanmıştır. Narın işlenmesi esnasında önemli miktarda atıkları açığı çıkmaktadır. Bu atıklar arasında kabuk, mezokarp ve çekirdek öne çıkmaktadır. Yapılan çalışmalar nar atıklarının biyoaktif bileşikler zengin olduğunu göstermiştir.

Dolaysıyla nar atıkları da fonksiyonel gıdaların geliştirilmesinde kullanabilecek kaynaklardır.

Bu tez kapsamında nar kabuğu, nar mezokarbı ve nar çekirdeğinin kompozisyonu ve biyolojik aktiviteleri nar suyuna kıyasla incelenmiştir. Nar dokularındaki fenolik bileşenler serbest, esterleşmiş ve bağlı fraksiyonlar halinde izole edilmiş ve miktarları ölçülmüştür.

Bu meyvenin içine gizlenmiş sırların kilidini açmak, normal ve hastalıklı hücrelerde, nutrigenomikler, proteomikler ve subselüler sinyalleme yollarının detaylı çalışmalarını içeren tüm modern beslenme bilimi yöntemlerimizin uygulanmasını gerektirecektir.

Bu çalışmadan, Nar suyunun üretiminin ve tüketicinin sağlık yararları konusundaki farkındalığını artırmak için artırılması. Nar atıklarının elden çıkarılması, aynı zamanda, doğal gıda katkı maddesi olarak kullanılması için gerekli olan, mahsulün ekonomik olarak uygulanabilirliğini artıran ve tüketicilerin sağlığını koruyan pektin, renklendiriciler ve antioksidanlar gibi yan ürünlerin üretimine de yol açar.

6. KAYNAKLAR

KATARINA S., JELENA Z., ANA A., GORDANA Z., ve TEODORA J., 2018. Activity Guided Fractionation of Pomegranate Extract and Its Antioxidant, Antidiabetic and Antineurodegenerative Properties.

EL-SAYED M., ABDEL-AL., THIN-MIEW C., SIMARATA D., ve IWONA R., 2012. Free and Bound Phenolic Acids and Total Phenolics in Black, Blue, and Yellow Barley and Their Contribution to Free Radical Scavenging Capacity.

OSMAN A., IŞIL V., AMANİ B., MELDA M., CANSU Ö., MARİAM H., M., ve FATİH K., 2017. The Potential Effects of Pomegranate on Bacteria and Viruses: A Review. Çukurova Univesity, TR-01100, Adana, Turkey.

PRİYATHARİNİ A., ADRİANO C., ve FEREİDOON S., 2016. Phenolic Compounds of Pomegranate Byproducts (Outer Skin, Mesocarp, Divider Membrane) and Their Antioxidant Activities. Journal of Agricultural and Food Chemistry 64:6584–6604.

PRİYATHARİNİ A., ADRİANO C., ve FEREİDOON S., 2017. Identification of Phenolic Antioxidants and Bioactives of Pomegranate Seeds Following Juice Extraction Using HPLC-DAD-ESI-MS N. Food Chemistry 221:1883–94.

AMRİ Z., ZAOUAY F., LAZREG-AREF H., SOLTANA H., MNERİ A., MARS M., ve HAMMAMİ M., 2017. Phytochemical Content, Fatty Acids Composition and Antioxidant Potential of Different Pomegranate Parts: Comparison between Edible and Non Edible Varieties Grown in Tunisia.

RAYMOND B. WİLLİS., 1998. Improved Method for Measuring Hydrolyzable Tannins Using Potassium Iodate.

APAK R., GÜÇLÜ K., DEMİRATA B., OZYÜREK M., CELİK SE., ve BEKTAŞOĞLU B., BERKER KI., OZYURT D., 2007. Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. Istanbul University, Faculty of Engineering, Department of Chemistry, Avcilar, Istanbul 34320 Turkey. rapak@istanbul.edu.tr

BANİHANİ S., SWEDAN S., ve ALGURAAN Z., 2013. Pomegranate and Type 2 Diabetes. Department of Medical Laboratory Sciences, Jordan University of Science and Technology, Irbid 22110, Jordan. sabanihani@just.edu.jo.

BENZİE İF., ve STRAİN JJ., 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power The FRAP Assay. Department of Health Sciences, Hong Kong Polytechnic University, Kowloon, Hung Hom, Hong Kong.

THEODORE A., ve GEİSSMAN., 1963. Flavonoid Compounds, Tannins, Lignins and, Related Compounds.

BONOLİ M., EMANUELE M., VE MARİA FC., 2004. Free and Bound Phenolic Compounds in Barley (*Hordeum Vulgare L.*) Flours. Journal of Chromatography A 1057:1–12.

BOPİTİYA D., ve MADHUJİTH., 2015. Antioxidant Potential of Pomegranate (*Punica granatum L.*) Cultivars Grown in Sri Lanka. Tropical Agricultural Research, 24(1), pp.71–81. DOI: http://doi.org/10.4038/tar.v24i1.7990.

BRAGA LC., SHUPP JW., CUMMİNG C., JETT M., TAKAHASHİ JA., ve

CARMO LS., CHARTONE-SOUZA E., NASCİMENTO AM., 2005. Pomegranate Extract Inhibits Staphylococcus Aureus Growth and Subsequent Enterotoxin Production. Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

BROOKS G.F., BUTEL J.S., ve MORSE S.A., 2001. Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology (22ndedn.). Lange Medical Books. Pp. 145-150.

ÇAM M., ve İÇYER NC., 2015. Phenolics of Pomegranate Peels: Extraction Optimization by Central Composite Design and Alpha Glucosidase Inhibition Potentials. Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Erciyes University, 38039 Kayseri, Turkey.

MUSTAFA Ç., ve YASAR H., 2010. Pressurised Water Extraction of Polyphenols from Pomegranate Peels. Food Chemistry 123:878–85.

CARBONE K., GİAMİNİ B., PİCCHİ V., LO SCAİZO R., ve CECCHİNİ F., 2011. Phenolic Composition and Free Radical Scavenging Activity of Different Apple Varieties in Relation to the Cultivar, Tissue Type and Storage. Agricultural Research Council - Research Unit for Enology in Central Italy (CRA-ENC), Via della Cantina Sperimentale 1, 00049 Velletri, Rome, Italy. Electronic address: katya.carbone@entecra.it.

İLLHAMİ GÜLÇİN., 2008. Measurement of Antioxidant Ability of Melatonin and Serotonin by the DMPD and CUPRAC Methods as Trolox Equivalent. Journal of enzyme inhibition and medicinal

SAAD S.D., MİR N.A., ve HAJERA.T., 2010. Studies on Antibacterial and Antifungal Activity of Pomegranate (*Punica Granatum L.*).

JING D., WANGYUAN C., VE GUANGZHONG Y., 2011. A Novel Antioxidant Activity Index (AAU) for Natural Products Using the DPPH Assay.

ZAHRA D., MARGHERİTA F., MARZİEH T., FARNOOSH A., ALİ H., MOTAHREH S.H., ve GEA O.C., 2018. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Ethanolic Extract of Pomegranate Peels, Juice and Seeds.

DEWANTO V., WU X., ADOM KK., ve LİU RH., 2002. Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. Department of Food Science and Institute of Comparative and Environmental Toxicology, Stocking Hall, Cornell University, Ithaca, New York 14853, USA.

DEWANTO V., WU X., ve LİU RH., 2002. Processed Sweet Corn Has Higher Antioxidant Activity. Department of Food Science and Institute of Comparative and Environmental Toxicology, Stocking Hall, Cornell University, Ithaca, New York 14853, USA.

PAMELA G.D., RONALD B.P., XİAOXİ L., ve PHİLİP G., 2017. Inhibition of Non-Enzymatic Protein Glycation by Pomegranate (*Punica granatum*) Whole Fruit and Its Components. Journal of Food Chemistry & Nanotechnology 03.

DUMAN AD., OZGEN M., DAYİSOYLU KS., ERBİL N., ve DURGAC C., 2009. Antimicrobial Activity of Six Pomegranate (*Punica granatum L.*) Varieties and Their Relation to Some of Their Pomological and Phytonutrient Characteristics. Department of Food Engineering, University

of Kahramanmaras Sutcu Imam, Kahramanmaras, Turkey. adduman@ksu.edu.tr

WALİD E., HEDİA H., NİZA T., YASSİNE Y., NİZAR N., ve ALİ F., 2012. Total Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Pomegranate Peel, Seed, Leaf and Flower. Journal of Medicinal Plants Research 6.

WALİD E., HEDİA H., NİZA T., YASSİNE Y., NİZAR N., ALİ F., NİZAR C., ve MA Y., 2011. Antioxidant Capacities of Phenolic Compounds and Tocopherols from Tunisian Pomegranate (*Punica Granatum*) Fruits. Journal of Food Science 76:707.

BERNA E., ROSİTA H., RANİ S., AZİZAHWATİ., UQİE S.H., İDAM T.P., ve YUNİTA I.P., 2015. Antidiabetic Activity and Phytochemical Screening of Extracts from Indonesian Plants by Inhibition of Alpha Amylase, Alpha Glucosidase and Dipeptidyl Peptidase IV. Pakistan Journal of Biological Sciences 18:279–84.

ENDO EH., CORTEZ DA., UEDA-NAKAMURA T., NAKAMURA CV., ve DİAS FİLHO BP., 2010. Potent Antifungal Activity of Extracts and Pure Compound Isolated from Pomegranate Peels and Synergism with Fluconazole against Candida Albicans. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900 Maringá, PR, Brazil. Research in Microbiology 161:534–40.

FAWOLE OA., MAKUNGA NP., ve OPARA UL., 2012. Antibacterial, Antioxidant and Tyrosinase-Inhibition Activities of Pomegranate Fruit Peel Methanolic Extract. Postharvest Technology Research Laboratory, South African Research Chair in Postharvest Technology, Faculty of AgriSciences, Stellenbosch University, Private Bag X1, Stellenbosch, 7602, South Africa.

FAWOLE OA., ve OPARA UL., 2016. Stability of Total Phenolic Concentration and Antioxidant Capacity of Extracts from Pomegranate Co-Products Subjected to in Vitro Digestion. BMC Complementary and Alternative Medicine 16.

BOUTHEİNA F., MARWA B., GABRİELE R., LUİGİ L., ve ALİ F., 2018. Phenolic Profiling and Antioxidant Capacity in Flowers, Leaves and Peels of Tunisian Cultivars of *Punica granatum L*. Journal of Food Science and Technology 55:3606–15.

ULRİKE A., FİSCHER., REİNHOLD C., ve DİETMAR R.K., 2011. Identification and Quantification of Phenolic Compounds from Pomegranate (*Punica granatum L*.) Peel, Mesocarp, Aril and Differently Produced Juices by HPLC-DAD–ESI/MSn. Food Chemistry 127:807–21.

CLAUDİA F., ANA M Q-V., ADRİAN G.M., JORGE S.T., KALİDAS S., ve LENA G.R., 2016. Optimized Methodology for the Extraction of Free and Bound Phenolic Acids from Chilean Cristalino corn (*Zea MaysL*.) Accession. CyTA - Journal of Food 1–8.

GAMEL, T., ve ABDEL-Aal, E.-S. M., 2012. Phenolic acids and antioxidant properties of barley wholegrain and pearling fractions. Agricultural and Food Science, 21(2), 118-131. https://doi.org/10.23986/afsci.4727

GİL Mİ., TOMAS-BARBERAN FA., HESS-PİERCE B., HOLCROFT DM., ve KADER AA., 2000. Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its

Relationship with Phenolic Composition and Processing. Department of Pomology, University of California, Davis, California 95616, USA.

BEATRİZ G., MANUELA P., JOSE ANGEL P-A., ve MANUEL V-M., 2016. Assessment of Polyphenolic Profile and Antibacterial Activity of Pomegranate Peel (*Punica granatum*) Flour Obtained from Co-Product of Juice Extraction.

MURTAZA Hajoori ., 2014. Evaluation of Antimicrobial Activity of Punica Granatum Peel Extracts Using Different Solvent System. International Journal of Pharmacological.

HASNAOUİ N., WATHELET B., ve JİMENEZ-ARAUJO A., 2014. Valorization of Pomegranate Peel from 12 Cultivars: Dietary Fibre Composition, Antioxidant Capacity and Functional Properties.

NEJİB H., RANİA J., MESSAOUD M., MOKHTAR T., AFAF K-E., PABLO M., ve FRANCİSCA H., 2011. Organic Acids, Sugars, and Anthocyanins Contents in Juices of Tunisian Pomegranate Fruits. International Journal of Food Properties 14:741–57.

HASMİK H., WİLMA C.H., ve RİJKELT R.B., 2012. Inhibition of Listeria Monocytogenes by Pomegranate (*Punica granatum*) Peel Extract in Meat Paté at Different Temperatures. Laboratory of Food Microbiology, Wageningen University, P.O. Box 8129, 6700 EV Wageningen, The Netherlands.

HEESTERBEEK DAC., MARTİN Nİ., VELTHUİZEN A., DUİJST M., RUYKEN M., WUBBOLTS R., ROOİJAKKERS SHM.,ve BARDOEL BW., 2019. Complement-Dependent Outer Membrane Perturbation Sensitizes Gram-Negative Bacteria to Gram-Positive Specific Antibiotics.

HEİM KE., TAGLİAFERRO AR., ve BOBİLYA DJ., 2002. Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-Activity Relationships. Department of Animal and Nutritional Sciences, University of New Hampshire, 03824, Durham, NH, USA.

MARİA İ., FOTİS K., KALLİOPİ K., ve DİMİTRİOS K., 2018. Optimizing Extraction Conditions of Free and Bound Phenolic Compounds from Rice By-Products and Their Antioxidant Effects. Foods 7:93.

ISMAİL T., SESTİLİ P., ve AKHTAR S., 2012. Pomegranate Peel and Fruit Extracts: A Review of Potential Anti-Inflammatory and Anti-Infective Effects. Journal of ethnopharmacology.

PU J., TİAN Y., HAİMİNG S., Yİ S., MARGARET S., BOYAN G., LİNWEİ L., ve LİANGLİ Y., 2012. Antioxidant Properties and Phytochemical Composition of China-Grown Pomegranate Seeds.

Kam A., Lİ KM., RAZMOVSKİ-NAUMOVSKİ V., NAMMİ S., SHİ J., CHAN K., ve Lİ GQ., 2012. A Comparative Study on the Inhibitory Effects of Different Parts and Chemical Constituents of Pomegranate on Upalpha-Amylase and Upalpha-Glucosidase. Faculty of Pharmacy, University of Sydney, NSW 2006, Australia. Phytotherapy Research 27:1614–20.

MAHSAN K., ROHOLLAH S., ve JOZEF K., 2017. Pomegranate as a Promising Opportunity in Medicine and Nanotechnology.

SAMİRA K., FABİO L., LAURA S., GİUSEPPE M., MOKTHAR H., ve CRİSTİNA R., 2018. Antimicrobial and Antioxidant Features of Gabsi Pomegranate Peel Extracts.

VERA K-M., MİHALJ P., ZUZANA S., ve LJİLJANA P., 2016. Determination of Phenolic Acids in Seeds of Black Cumin, Flax, Pomegranate and Pumpkin and Their by-Products. Acta Periodica Technologica 19–28.

KRZYSZTOF K., FRANK S., ve LAWRENCE H., 1982. Free, Esterified, and Insoluble-Bound Phenolic Acids. 1. Extraction and Purification Procedure.

LANSKY EP., ve NEWMAN RA., 2007. *Punica granatum* (Pomegranate) and Its Potential for Prevention and Treatment of Inflammation and Cancer. Punisyn Pharmaceuticals Ltd, Haifa, Israel. info@punisyn.com.

Lİ X., WASİLA H., LİU L., YUAN T., GAO Z., ZHAO B., ve AHMAD İ., 2015. Physicochemical Characteristics, Polyphenol Compositions and Antioxidant Potential of Pomegranate Juices from 10 Chinese Cultivars and the Environmental Factors Analysis.

YUNFENG L., CHANGJİANG G., JİJUN Y., YİNGYU W., JİNG X., ve SHUANG C., 2006. Evaluation of Antioxidant Properties of Pomegranate Peel Extract in Comparison with Pomegranate Pulp Extract.

HUI L., JİANKANG C., ve WEİBO J., 2015. Evaluation and Comparison of Vitamin C, Phenolic Compounds, Antioxidant Properties and Metal Chelating Activity of Pulp and Peel from Selected Peach Cultivars.

MACHADO TB., PİNTO AV., PİNTO MC., LEAL İC., SİLVA MG., AMARAL AC., KUSTER RM., ve NETTO KR., 2003. In Vitro Activity of Brazilian Medicinal Plants, Naturally Occurring Naphthoquinones and Their Analogues, against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus. Núleo de Pesquisas de Productos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

MCCARRELL EM., GOULD SW., FİELDER MD., KELLY AF., EL SANKARY W., ve NAUGHTON DP., 2008. Antimicrobial Activities of Pomegranate Rind Extracts: Enhancement by Addition of Metal Salts and Vitamin C. School of Life Sciences, Kingston University, Kingston-upon-Thames, UK. erinmccarrell@hotmail.com.

MCDOUGALL GJ., SHPRİO F., DOBSON P., SMİTH P., BLAKE A., ve STEWART D., 2005. Different Polyphenolic Components of Soft Fruits Inhibit α-Amylase and α-Glucosidase. Quality, Health and Nutrition Programme, Genes to Products Theme, Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, Dundee, DD2 5DA, UK. gmcdou@scri.sari.ac.uk.

NS Al-Zoreky., 2009. Antimicrobial Activity of Pomegranate (*Punica granatum L.*) Fruit Peels. International Journal of Food Microbiology.

MİLLER NJ., RİCE-EVANS C., DAVİES MJ., GOPİNATHAN V., ve MİLNER A., 1993. A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and Its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates. Division of Biochemistry, UMDS-Guy's Campus, London, U.K.

MOLLAZADEH H., SADEGHNİA HR., HOSEİNİ A., FARZADNİA M., ve BOROUSHAKİ MT., 2016. Effects of Pomegranate Seed Oil on Oxidative Stress Markers, Serum Biochemical Parameters and Pathological Findings in Kidney and Heart of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Renal Failure 38:1256–66.

CUEVAS MONTİLLA E., HİLLEBRAND S., ANTEZANA A., ve WİNTERHALTER P., 2011. Soluble and Bound Phenolic Compounds in Different Bolivian Purple Corn (*Zea Mays L.*) Cultivars. Institute of Food

Chemistry, Technische Universität Braunschweig , Schleinitzstrasse 20, 38106 Braunschweig, Germany. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59:7068–74.

GİSLENE G.F.NASCİMENTO., JULİANAN LOCATELLİ., PAULO C. FREİTAS., ve GİULİANA L.SİLVA., 2000. Antibacterial Activity of Plant Extracts and Phytochemicals on Antibiotic-Resistant Bacteria. Brazilian Journal of Microbiology.

BOLİS MS., 1958. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical.

NAVARRO V., VİLLARREAL ML., ROJAS G., ve LOZOYA X., 1996. Antimicrobial Evaluation of Some Plants Used in Mexican Traditional Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social, Morelos, México.

MİMİE N.J., NORHASLİNDA R., ATİF B., ve MOHD AKR., 2018. Quantitative and Optimization of Phenolic Acid Extracted from Pomegranate by High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

HAKİME H.O., HULYA Y., ve SEBNEM S.İ., 2012. Comparison of Antioxidant Activities of Juice, Peel, and Seed of Pomegranate (*Punica granatum L.*) and Inter-Relationships with Total Phenolic, Tannin, Anthocyanin and Flavonoid Content.

HAKİME H.O., AHMET Ş.D., ve TUNCAY G., 2011. Antibacterial and Antifungal Activity of Pomegranate (*Punica granatum L. Cv.*) Peel.

MUSTAFA O., COŞKUN D., SEDAT S., ve CEMAL K., 2008. Chemical and Antioxidant Properties of Pomegranate Cultivars Grown in the Mediterranean Region of Turkey.

YUEHAN P., SULAİMAN A., YANJİE X., TRUST B., ZHİWEİ Z., YAFANG S., ve JİNSONG B., 2018. Bound Phenolic Compounds and Antioxidant Properties of Whole Grain and Bran of White, Red and Black Rice. Food Chemistry 240:212–21.

DE LA PARRA C., SALDİVAR SO., ve LİU RH., 2007. Effect of Processing on the Phytochemical Profiles and Antioxidant Activity of Corn for Production of Masa, Tortillas, and Tortilla Chips. Department of Food Science, Cornell University, Ithaca, New York 14853-7201, USA.

GANAPATHİ PATİL, M.C. MADHUSUDHAN, B. RAVİNDRA BABU, ve K.S.M.S. RAGHAVARAO., 2009. Extraction, Dealcoholization and Concentration of Anthocyanin from Red Radish. Department of Food Engineering, Central Food Technological Research Institute, Council of Scientific and Industrial Research, Mysore 570020, India.

HAN P., WENTİNG L., HONGYAN L., ZEYUAN D., ve BİNG Z., 2017. Extractable and Non-Extractable Bound Phenolic Compositions and Their Antioxidant Properties in Seed Coat and Cotyledon of Black Soybean (Glycinemax (L.) Merr). Journal of Functional Foods 32:296–312.

PRASHANTH D., ASHA MK., ve AMİT A., 2001. Antibacterial Activity of *Punica granatum*. Microbiology Laboratory, Research & Development Centre, Natural Remedies Pvt. Ltd., Plot No. 5B, Veerasandra Indl. Area, Hosur Road, 561 229, Bangalore, India. indherbs@vsnl.com.

REDDY MK., GUPTA SK., JACOB MR., KHAN Sİ., ve FERREİRA D., 2007.

Antioxidant, Antimalarial and Antimicrobial Activities of Tannin-Rich Fractions, Ellagitannins and Phenolic Acids from *Punica granatum L*. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, The University of Mississippi, USA.

NİKAİDO H., 2003. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. Department of Molecular and Cell Biology, University of California, Berkeley, California 94720-3202, USA. nhiroshi@uclinik4.berkeley.edu.

ROGERS J., PERKİNS İ., VAN OLPHEN A., BURDASH N., KLEİN TW., ve FRİEDMAN H., 2005. Epigallocatechin Gallate Modulates Cytokine Production by Bone Marrow-Derived Dendritic Cells Stimulated with Lipopolysaccharide or Muramyldipeptide, or Infected with Legionella Pneumophila. Department of Medical Microbiology and Immunology, University of South Florida, Tampa, FL 33612, USA.

ROWAYSHED G., SALAMA A., ABUL-FADL M., AKİLA-HAMZA S., EMAD., ve A.MOHAMED., 2013. Nutritional and Chemical Evaluation for Pomegranate (*Punica granatum L*.) Fruit Peel and Seeds Powders by Products.

NAWRAJ R., JHOTİ S., SRİSHTİ R., THEESHAN B., ve VİDUSHİ S., 2013. Bioactivity of Nonedible Parts Of *Punica granatumL*.: A Potential Source of Functional Ingredients. International Journal of Food Science 2013:1–12.

SAAD H., CHARRİER-EL B., PİZZİ A., RODE K., CHARRİER B., ve AYED N., 2012. Characterization of Pomegranate Peels Tannin Extractives. Industrial Crops and Products 40:239–46.

N. SADEGHİ., BEHROOZ J., MOHAMMAD R.O., ve M.HAJİMAHMOODİ., 2009. Antioxidant Activity of Iranian Pomegranate *(Punica granatum L*.) Seed Extracts.

WASİM S., MOHAMMAD S., BARKAT A., ABDUL H., GHUFRAN UD D., MUHAMMAD H., IMRAN K., MANZOOR A., ve SULİMAN K., 2015. Antibacterial Activity of *Punica granatum* Peel Extract.

YAFANG S., FEİFEİ X., XİAO S., JİNSONG B., ve TRUST B., 2014. Identification and Quantification of Phenolic Acids and Anthocyanins as Antioxidants in Bran, Embryo and Endosperm of White, Red and Black Rice Kernels (*Oryza Sativa L*),

SHUKLA M., GUPTA K., RASHEED Z., KHAN KA., ve HAQQİ TM., 2008. Consumption of Hydrolyzable Tannins-Rich Pomegranate Extract Suppresses Inflammation and Joint Damage in Rheumatoid Arthritis. Division of Rheumatic Diseases, Department of Medicine, Case Western Reserve University/University Hospitals of Cleveland, Cleveland, Ohio, USA.

BRUNO T.S., CAROLİNA D.A., SYLVİA N., LEOPOLDO S.M., ERİKA M.P., LUCİANA S., ve REGİLDO S., 2013. Atividade Antimicrobiana in Vitro de Extrato de *Punica granatum L*. Sobre Staphylococcus Aureus Isolado Em Leite Bovino.

BALWİNDER S., JATİNDER PAL S., AMRİTPAL K., ve NARPİNDER S., 2018. Phenolic Compounds as Beneficial Phytochemicals in Pomegranate (*Punica granatum L*.) Peel: A Review.

SİNGH RP., CHİDAMBARA MURTHY KN., ve JAYAPRAKASHA GK., 2002. Studies on the Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel and Seed Extracts Using in Vitro Models. Human Resource Development, Central Food Technological Research Institute, Mysore 570 013, India.

SİNGLETON., JOSEPH A. ve ROSSİ., 1965. Colorimetry of Total Phenolics With Phosphomolybdic Acid-phosphotungstic Acid Reagents.

DONGXİAO SU., RUİFEN Z., FANGLİ H., MİNGWEİ Z., JİNXİN G., FEİ H., YUAN D., ve ZHENCHENG W., 2014. Comparison of the Free and Bound Phenolic Profiles and Cellular Antioxidant Activities of Litchi Pulp Extracts from Different Solvents. BMC Complementary and Alternative Medicine 14.

MADAMBA., 1997. Optimization of the Drying Process: An Application to the Drying of Garlic.

MELTEM TÜRKYILMAZ., ŞEREF T., UFUK D., ve MEHMET Ö., 2013. Effects of Various Pressing Programs and Yields on the Antioxidant Activity, Antimicrobial Activity, Phenolic Content and Colour of Pomegranate Juices. Food Chemistry 138:1810–18.

M. VİUDA-MARTOS., J. FERNANDEZ-LOPEZ., ve J.A. PEREZ-ALVARES., 2010. Pomegranate and Its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 9:635–54.

SUPAYANG P.V., TREECHADA S., SURASAK L., THANOMJİT S., TETSUYA İ., ve TAKESHİ H., 2005. Inhibitory Effects of Active Compounds from *Punica granatum* Pericarp on Verocytotoxin Production by Enterohemorrhagic *Escherichia Coli* O157: H7.

WANG M., JİANG N., WANG Y., JİANG D., ve FENG X., 2017. Characterization of Phenolic Compounds from Early and Late Ripening Sweet Cherries and Their Antioxidant and Antifungal Activities.

ZHONGLİ P., HALİE M., ve GRİFFİTHS A., 2011. Extract of Phenolics from Pomegranate Peels.

YASHİN A., YASHİN Y., XİA X., ve NEMZER B., 2017. Antioxidant Activity of Spices and Their Impact on Human Health: A Review.

ATSUKO Y., KEİSUKE S., YOİCHİ N., TAKASHİ N., MAKİ S., TOMOYUKİ O., SHUNJİRO H., ve HİDEAKİ O., 2010. Determination of Free and Bound Phenolic Acids, and Evaluation of Antioxidant Activities and Total Polyphenolic Contents in Selected Pearled Barley.

ZHANG MW., ZHANG RF., ZHANG FX., ve LİU RH., 2010. Phenolic Profiles and Antioxidant Activity of Black Rice Bran of Different Commercially Available Varieties. Department of Food Science, Cornell University, Ithaca, New York 14853-7201, USA.

JİA Z., TANG M., ve WU J., 1999. The Determination of Flavonoid Contents in Mulberry and Their Scavenging Effects on Superoxide Radicals.

ÖZGEÇMİŞ

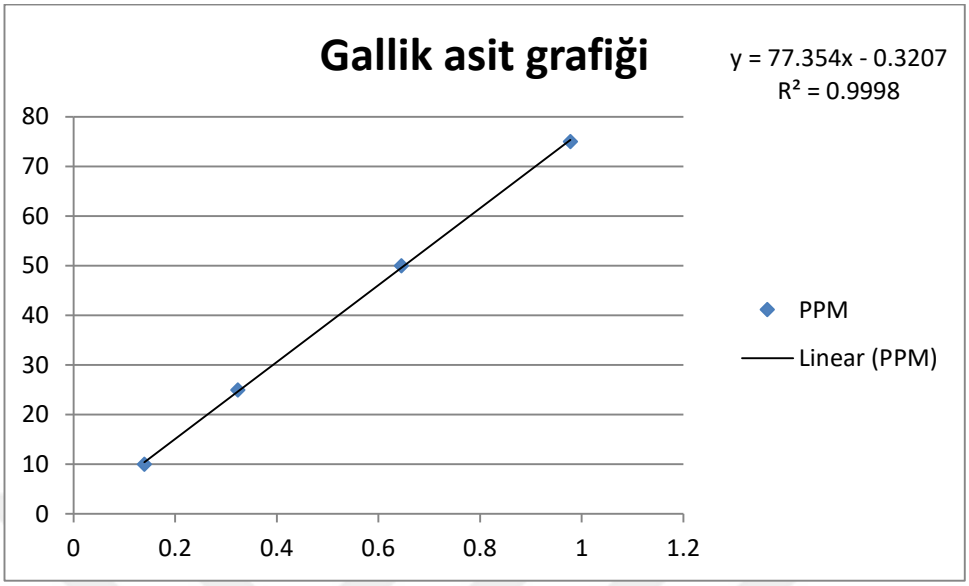
KİŞİSEL BİLGİLER

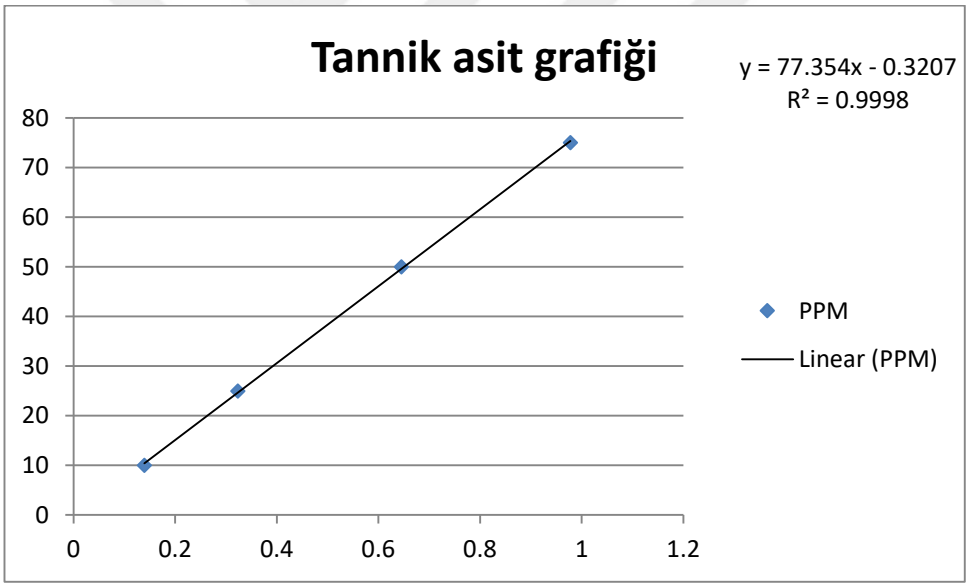
Adı Soyadı : Seba ALSATAF
Uyruğu : T. C
Doğum Yeri ve Tarihi: RAKKA 22/04/1994
Telefon : 05313574832
e-mail : sebakamel22@gmail.com

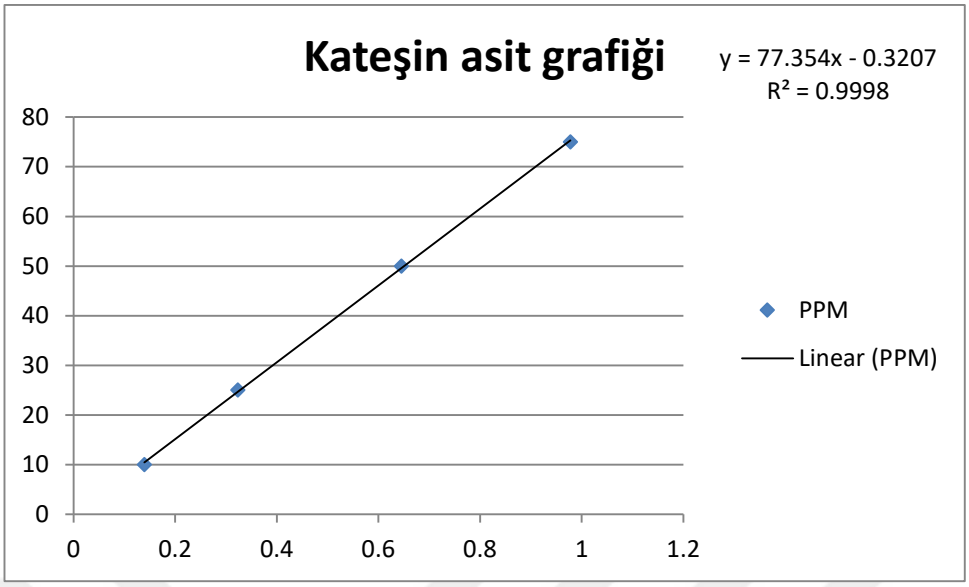
EĞİTİM

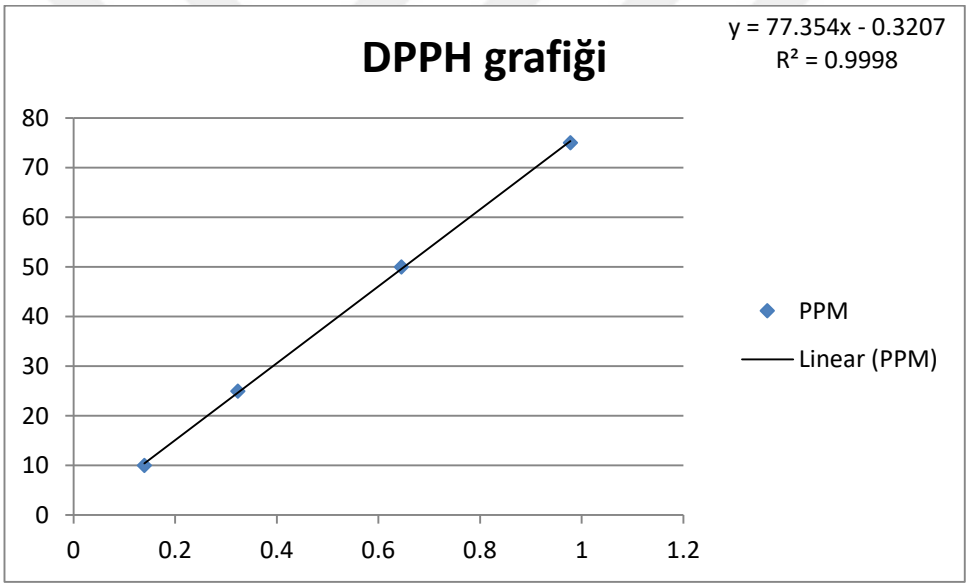
Derece	Adı, İl, İlçe	Bitirme Yılı
Lise	Albaseel Lisesi, Rakka, Suriye	2011
Üniversite	Halep Üniversitesi, Halep/Suriye	2016

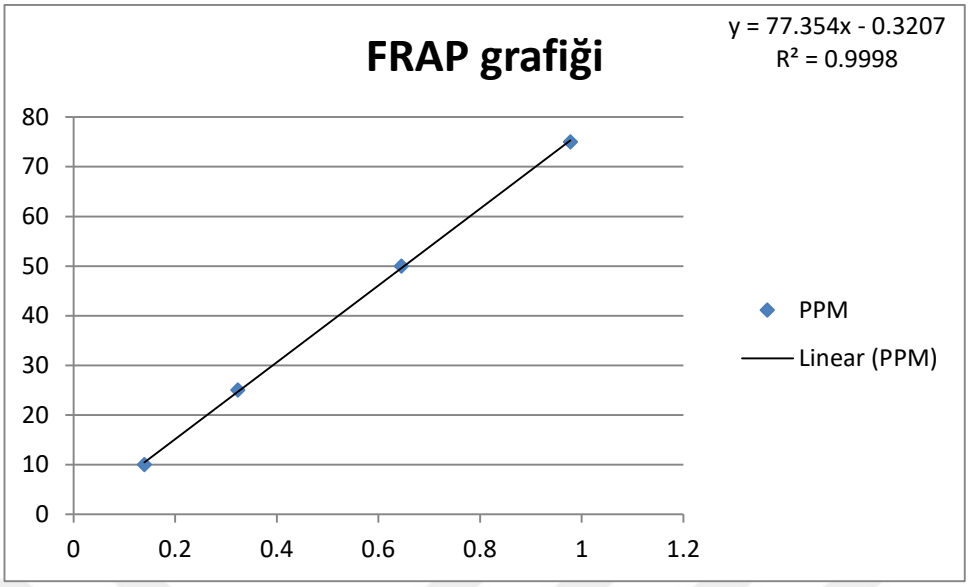
EKLER


Gallik asit grafiği
y = 77.354x - 0.3207
R² = 0.9998
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
PPM
Linear (PPM)


Tannik asit grafiği
y = 77.354x - 0.3207
R² = 0.9998
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
PPM
Linear (PPM)


Kateşin asit grafiği
y = 77.354x - 0.3207
R² = 0.9998
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
PPM
Linear (PPM)


DPPH grafiği
y = 77.354x - 0.3207
R² = 0.9998
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
PPM
Linear (PPM)


FRAP grafiği
y = 77.354x - 0.3207
R² = 0.9998
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
PPM
Linear (PPM)