

**İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ENDÜSTRİYEL BİR ATIK OLARAK HURMA ÇEKİRDEĞİ; KAVURMA  
PROSESİNİN HURMA ÇEKİRDEĞİ UNU VE HURMA ÇEKİRDEĞİ KAHVESİNİN  
ANTIOKSİDAN KAPASİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Hatice Merve KILIÇ**

**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Gıda Mühendisliği Programı**

**EKİM 2015**



**İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ENDÜSTRİYEL BİR ATIK OLARAK HURMA ÇEKİRDEĞİ; KAVURMA  
PROSESİNİN HURMA ÇEKİRDEĞİ UNU VE HURMA ÇEKİRDEĞİ KAHVESİNİN  
ANTIOKSİDAN KAPASİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Hatice Merve KILIÇ**

**(506121512)**

**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Gıda Mühendisliği Programı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Beraat ÖZCELİK**

**EKİM 2015**



İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 506121512 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Hatice Merve KILIÇ**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**Endüstriyel bir atık olarak hurma çekirdeği; kavurma prosesinin hurma çekirdeği unu ve hurma çekirdeği kahvesinin antioksidan kapasitesi üzerine etkisi**” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı :**      **Prof. Dr. Beraat ÖZÇELİK**      .....

İstanbul Teknik Üniversitesi

**Jüri Üyeleri :**      **Prof.Dr.Artemis KARAALI**      .....

Yeditepe Üniversitesi

**Doç.Dr.Esra ÇAPANOĞLU GÜVEN**      .....

İstanbul Teknik Üniversitesi

**Teslim Tarihi :**      **09 Eylül 2015**

**Savunma Tarihi :**      **06 Ekim 2015**



*Anneme ,*





## ÖNSÖZ

Öncelikle, tez çalışmam süresince, danışmanlığımı üstlenerek, ilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, birlikte çalışmaktan onur ve zevk duyduğum çok değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Beraat ÖZÇELİK'e saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Değerli fikirleri ile beni yönlendiren ve laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Gıda Yük. Müh. Nalan Demir'e ve Gıda Müh. Evren DEMIRCAN' a teşekkürlerimi sunarım.

Hurma çekirdeklerinin farklı sürelerde kavurlma işlemi için gerekli ekipmanları kullanmamda yardımcı olan CHERRYBEAN COFFEE ve sahibi Şehriban ÇAM'a teşekkürlerimi sunarım. İstanbul Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği hocalarıma, teşekkürlerimi sunarım.

Desteği ve sevgisi ile her zaman yanımda olan, varlığı ile bana güven veren, bugünlere gelmemde büyük emekleri olan canım aileme ve özellikle annem Fevziye KILIÇ'a, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ekim 2015

Hatice Merve KILIÇ  
(Gıda Mühendisi)



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>vii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>ix</b>
<b>KISALTMALAR</b> .....	<b>xi</b>
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b> .....	<b>xiii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<b>xv</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>xvii</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>xix</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1 Tezin Amacı .....	2
1.2 Literatür Araştırması .....	3
1.2.1 Hurma.....	3
1.2.2 Serbest radikaller, oksidatif stres ve antioksidanlar.....	7
1.2.3 Fenolik bileşikler.....	10
1.2.4 Kahve üretimi ve kavurma prosesinin kahve fenolikleri ve antioksidanları üzerine etkisi .....	15
1.2.5 Biyoyararlılık .....	17
1.3 Hipotez .....	18
<b>2. MATERYAL VE METOT</b> .....	<b>19</b>
2.1 Materyal .....	19
2.1.1 Hurma örnekleri .....	19
2.1.2 Analizlerde kullanılan kimyasallar .....	19
2.2 Method .....	20
2.2.1 Hurma çekirdeklerinin hazırlanması .....	20
2.2.2 Ekstrakt hazırlama.....	21
2.2.3 Nem içeriğinin belirlenmesi.....	22
2.2.4 Toplam fenolik (TP) analizi .....	22
2.2.5 Toplam antioksidan kapasitesinin tayini.....	23
2.2.5.1 DPPH (1,1-difenil-2- pikrilhidrazil ) radikal yakalama metodu .....	23
2.2.5.2 CUPRAC (Bakır İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi) metodu .....	24
2.2.6 In-vitro mide-bağırsak sindirim sistemi metodu.....	24
2.2.7 İstatistiksel Analizler.....	25
<b>3. BULGULAR VE TARTIŞMA</b> .....	<b>27</b>
3.1 Nem içeriği .....	27
3.2 Toplam Fenolik Madde Analizi .....	27
3.3 Toplam Antioksidan Aktivite Analizleri.....	30
3.3.1 DPPH radikal yakalama metodu .....	31
3.3.2 CUPRAC (Bakır indirgeyici antioksidan kapasitesi) metodu.....	33
3.4 Korelasyon Katsayıları .....	35
3.5 In-vitro Mide-BağVBırsak (GI) Sindirim Sistemi .....	36

3.5.1 Mide- bağırsak (GI) sindirimi sonrası toplam fenolik madde analizi .....	36
3.5.2 Mide- bağırsak (GI) sindirimi sonrası toplam antioksidan aktivitesi analizleri .....	38
<b>4. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>41</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>43</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>49</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>55</b>

## KISALTMALAR

<b>ABTS</b>	: 2,2- azinobis 3-etilbenzothiazolin-6-sulfonik asit diammonium salt
<b>ANOVA</b>	: Varyans analizi
<b>B1</b>	: Öğütülmüş hurma çekirdeği brewleri
<b>B5</b>	: 5 dk. kavrularak öğütülmüş hurma çekirdeği brewleri
<b>B10</b>	: 10 dk. kavrularak öğütülmüş hurma çekirdeği brewleri
<b>B15</b>	: 15 dk. kavrularak öğütülmüş hurma çekirdeği brewleri
<b>CUPRAC</b>	: Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasitesi
<b>Ç1</b>	: Öğütülmüş hurma çekirdeği numuneleri
<b>Ç5</b>	: 5 dk. kavrularak öğütülmüş hurma çekirdeği numuneleri
<b>Ç10</b>	: 10 dk. kavrularak öğütülmüş hurma çekirdeği numuneleri
<b>Ç15</b>	: 15 dk. kavrularak öğütülmüş hurma çekirdeği numuneleri
<b>DPPH</b>	: 1,1-difenil-2- pikrilhidrazil
<b>GAE</b>	: Gallik asit eşdeğeri
<b>HPLC</b>	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
<b>µg</b>	: Microgram
<b>ROT</b>	: Reaktif Oksijen Türleri
<b>RU</b>	: Rutin eşdeğer antioksidan kapasitesi
<b>SPSS</b>	: Sosyal bilimler için istatistik programı
<b>TEAC</b>	: Troloks eşdeğer antioksidan kapasitesi
<b>TPC</b>	: Toplam fenolik madde



## ÇİZELGE LİSTESİ

### Sayfa

<b>Çizelge 1.1</b> : Hurma çekirdeği türlerinde nem, protein, yağ, kül ve karbonhidrat kompozisyonları .....	5
<b>Çizelge 1.2</b> : Hurma çekirdeği türlerinde diyet lif (g/100g), toplam fenolik (mg/100g) ve antioksidan(µmol/100g) miktarları.....	6
<b>Çizelge 1.3</b> : Serbest radikaller ve radikal olmayan reaktif türleri .....	8
<b>Çizelge 1.4</b> : Minas, Cioccolato, Cherry ve Vietnam türü kahve çekirdeklerinin kavurma dereceleri.....	16
<b>Çizelge 3.1</b> : Çekirdek ve Brewlerin Kuru Madde Üzerinden Toplam Fenolik Madde Miktarları .....	28
<b>Çizelge 3.2</b> : Çekirdek ve Brewlerin Kuru Madde Üzerinden DPPH metodu ile Antioksidan aktiviteleri.....	32
<b>Çizelge 3.3</b> : Çekirdek ve Brewlerin Kuru Madde Üzerinden CUPRAC metodu ile antioksidan aktiviteleri.....	34
<b>Çizelge 3.4</b> : Toplam fenolik ve toplam antioksidan kapasiteleri (DPPH, CUPRAC) arasındaki korelasyon ( $R^2$ ) sonuçları .....	35
<b>Çizelge 3.5</b> : In vitro mide-bağırsak sindirim sistemi sonrasında çekirdeklerin toplam fenolik madde miktarında meydana gelen değişimler .....	36
<b>Çizelge 3.6</b> : PG, IN, OUT fraksiyonları için toplam fenolik madde miktarında % geri kazanım.....	37
<b>Çizelge 3.7</b> : In vitro mide-bağırsak sindirim sistemi sonrasında çekirdeklerin DPPH metodu ile antioksidan aktivitesinde meydana gelen değişimler.....	38
<b>Çizelge 3.8</b> : PG, IN, OUT fraksiyonları için DPPH metodu ile antioksidan aktivite miktarında % geri kazanım .....	39
<b>Çizelge 3.9</b> : In vitro mide-bağırsak sindirim sistemi sonrasında çekirdeklerin CUPRAC metodu ile antioksidan aktivitesinde meydana gelen değişimler.....	39
<b>Çizelge 3.10</b> : PG, IN, OUT fraksiyonları için CUPRAC metodu ile antioksidan aktivite miktarında % geri kazanım .....	40
<b>Çizelge B.1</b> : Başlangıç örneklerine ait istatistiksel sonuçlar.....	53
<b>Çizelge B.2</b> : Folin-Ciocalteu analizi için IN, OUT ve PG fraksiyonlarına ait istatistiksel sonuçlar .....	53
<b>Çizelge B.3</b> : DPPH analizi için IN, OUT ve PG fraksiyonlarına ait istatistiksel sonuçlar .....	54
<b>Çizelge B.4</b> : CUPRAC analizi için IN, OUT ve PG fraksiyonlarına ait istatistiksel sonuçlar .....	54





## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1 : Fenol halkası ... ..	11
Şekil 1.2 : Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması. ... ..	12
Şekil 1.3 : Hidroksibenzoik asitlerin kimyasal yapısı .....	12
Şekil 1.4 : Hidroksisünamik asitlerin kimyasal yapısı .....	13
Şekil 1.5 : Flavonoidlerin temel kimyasal yapısı.....	13
Şekil 1.6 : Flavonoid alt gruplarının temel kimyasal yapıları .....	14
Şekil 2.1 : Mebrun türü hurma ve çekirdeği ... ..	19
Şekil 2.2 : (a) Hearthware Precision Coffee Roaster, (b)azotlu IKA A11 marka sıvı azotlu öğütücü .....	20
Şekil 2.3 : 5, 10 ve 15 dk kavrulmuş çekirdeklerdeki renk değişimi.....	20
Şekil 2.4 : (a) VWM marka ultrasonik banyo , (b) Universal 32R .....	21
Şekil 2.5 : Christ, Alpha 1-2 LD liyofilizatör ... ..	22
Şekil 2.6 : Synergy HT, BioTek Instruments Inc. Mikroplate okuyucu .....	23
Şekil 2.7 : Çalkalayıcı Su Banyosu Memmert, Schwabach, Germany ... ..	25
Şekil A.1 : %80'lik su-etanol'deki toplam fenolik madde kalibrasyon eğrisi .....	50
Şekil A.2 : %80'lik su-etanol'deki DPPH kalibrasyon eğrisi .....	50
Şekil A.3 : %80'lik su-etanol'deki CUPRAC kalibrasyon eğrisi .....	51
Şekil A.4 : %80'lik su-etanol'deki toplam fenolik madde kalibrasyon eğrisi (IN-OUT ve PG fraksiyonları) ... ..	51
Şekil A.5 : %80'lik su-etanol'deki DPPH kalibrasyon eğrisi (IN-OUT ve PG fraksiyonları) ... ..	52
Şekil A.6 : %80'lik su-etanol'deki CUPRAC kalibrasyon eğrisi (IN-OUT ve PG fraksiyonları) ... ..	52



# ENDÜSTRİEL BİR ATIK OLARAK HURMA ÇEKİRDEĞİ; KAVURMA PROSESİNİN HURMA ÇEKİRDEĞİ UNU VE HURMA ÇEKİRDEĞİ KAHVESİNİN ANTIOKSIDAN KAPASİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

## ÖZET

Hurma, insanoğlunun yetiştirdiği en eski bitkilerden biridir. Kuzey Afrika ve Orta Doğu bölgelerinin ekonomisinde çok eski zamanlardan beri büyük rol oynar. Amerika'ya İspanyollar tarafından 19. yüzyılın başlarında getirilmiş ve Meksika civarında yetiştirilmiştir. Türkiye'de, Batı ve Güney Anadolu ve Akdeniz bölgesinde yetiştirilmekte ve yurdumuzun her bölgesinde yüksek miktarlarda tüketilmektedir. İlk defa Basra Körfezi'nde yetiştirildiği tahmin edilen hurma bitkisi, yaklaşık 18-24 m boyundadır. Meyveleri sarımsı kahve renkli, dış kabuk sarımsıdır. Orta kısım etli ve şeker bakımından zengindir. Çekirdeği silindirik, sert ve bir yüzü boyunca derin olukludur. Hurma çekirdeği çok zengin bir gıda lifi, fenolik madde ve antioksidan kaynağıdır. Çekirdekler beslenmede potansiyel ucuz lif ve antioksidan kaynağı olarak düşünülebilir. Bu itibarla tohumlar fonksiyonel gıda katkı maddesi olarak kullanılabilirler. Araplarda çekirdekler öğütülüp kafeinsiz kahve olarak tüketilmektedir. Bunun dışında çekirdekler atık olarak kabul edilmekte ve hayvan yemi olarak değerlendirilmektedir.

Bu çalışmada, mebrum türü hurma çekirdeğinin fenolik içeriği ve antioksidan kapasitesi incelenmiş ve aynı tür hurma çekirdeklerinin, farklı sürelerde kavurulup, öğütülmesiyle elde edilen kahvelerin ve bu kahvelerden elde edilmiş brewlerin (kahvelerin pişirilip telvesinden ayrılmış sulu kısmı) fenolik içeriği ve antioksidan kapasitesinin nasıl etkilendiği araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda Türkiye'de en çok tüketilen ve endüstriyel anlamda kullanılan mebrum türü hurmanın çekirdekleri kullanılmıştır. Çekirdekler *hearthware precision coffee roaster* yardımıyla sabit sıcaklıkta (200 °C) 5,10 ve 15 dakika kavularak öğütülmüştür.

Kavurma işlemi uygulanmadan, un haline getirilmiş çekirdekler ve farklı sürelerde kavurulmuş çekirdek örneklerinin fenolik madde içerikleri ve antioksidan aktiviteleri çeşitli metotlar ile tespit edildikten sonra biyoyararlılığı incelenmiştir.

Çalışmada kullanılan örneklerinin toplam fenolik madde ve toplam antioksidan aktivite tayinleri için uygulanan metotlarda kullanılmak üzere ekstratlar hazırlanmıştır. Uygun çözgen sisteminin hazırlanmasında literatürdeki çalışmalar esas alınarak %80'lik etanol kullanılmıştır. Örneklerin toplam fenolik madde içerikleri Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak belirlenmiş ve sonuçlar mg gallik asit / 100 g kuru madde cinsinden ifade edilmiştir.

Analiz sonunda hurma çekirdeği unu örneklerinin ortalama toplam fenolik madde miktarı 3616.1 mg GAE / 100 g kuru madde olarak tespit edilmiştir, hurma çekirdeği unundan elde edilmiş brew de ise ortalama 635.55 mg GAE / 100 g toplam fenolik madde bulunmuştur.

5, 10 ve 15 dk. kavurma işlemi uygulan çekirdeklerde sırasıyla 3237.12, 2080.93, 1583.66 mg GAE / 100 g kuru madde tespit edilmiştir. Bu çekirdeklerden, geleneksel Türk kahvesi yöntemi ile elde edilen kahvelerin, telvesi süzildükten sonra kalan sulu kısmına, çekirdeklerden ne kadar fenolik madde geçişi olduğunu analiz etmek amacıyla hazırlanan brewlerde ise 334.20, 102.39, 85.08 mg GAE / 100 g kuru madde bulunmuştur.

Toplam antioksidan aktivitesi tayininde DPPH ve CUPRAC yöntemleri kullanılmış, ve örneklerin antioksidan aktivitesi troloks eş değeriği antioksidan kapasite (TEAC) cinsinden ifade edilmiştir. DPPH metodu ile analiz sonuçlarında, kavrulmamış hurma çekirdeği örneklerinin ortalama toplam antioksidan kapasitesi 10315.06 g TEAC / 100 g kuru madde, kavrulmamış hurma çekirdeği brewlerinin ise 5131.56 g TEAC / 100 g kuru madde bulunmuştur. 5, 10 ve 15 dk kavrulmuş hurma çekirdeklerinin sırası ile ortalama sonuçları 5343.04, 4902.52, 3858.26 g TEAC / 100 g kuru madde iken bu çekirdeklerden elde edilen brewlerin sonuçları ortalama olarak 356.12, 86.52, 40.27 g TEAC / 100 g kuru madde bulunmuştur. CUPRAC metodu ile analiz sonuçlarında, kavrulmamış hurma çekirdeği örneklerinin ortalama toplam antioksidan kapasitesi 18514.19 g TEAC / 100 g kuru madde, kavrulmamış hurma çekirdeği brewlerinin ise 2313.62 g TEAC / 100 g kuru madde olarak bulunmuştur. 5, 10 ve 15 dk kavrulmuş hurma çekirdeklerinin sırası ile ortalama sonuçları 9189.92, 6275.11, 3919.6 g TEAC / 100 g kuru madde iken bu çekirdeklerden elde edilen brewlerin sonuçları ortalama olarak 945.71, 336.60, 247.80 g TEAC / 100 g kuru madde bulunmuştur. Yapılan analizler arasındaki korelasyon katsayıları hesaplanmış ve istatistiksel olarak önem dereceleri incelenmiştir.

Kavurulmuş ve kavrulmamış hurma çekirdekleri örneklerinde bulunan fenoliklerin biyoyararlılığı in vitro sindirim metodu kullanılarak mide ve ince bağırsak sindirimi fizyokimyasal ve biyokimyasal anatomi simüle edilerek incelenmiştir. İnsan ve hayvan gibi organizmalarda yapılan araştırmalar karmaşıklık, pahalılık ve etik sebeplerden dolayı tercih edilmemektedir. Diğer yandan, in-vitro metodu laboratuvar ortamında hızlı ve basit yöntem sunarak, değerlendirme olanağı sağlamaktadır. PG, IN, OUT fraksiyonları elde edilerek; toplam fenolik madde ve toplam antioksidan kapasitesi (DPPH ve CUPRAC) analizleri her bir fraksiyona uygulanmıştır. “Başlangıç” değeri sindirim öncesini, “PG (Post-gastric) mide çıkışını, “IN” ince bağırsağa geçen kısmı, “OUT” kolona geçen kısmı ifade etmektedir. Her cinsin % geri kazanım değerleri toplam fenolik madde ve toplam antioksidan kapasitesi analizleri sonuçlarına göre hesaplanmıştır. Genellikle, PG fraksiyonlarının toplam fenolik içeriği ve antioksidan kapasiteleri, IN ve OUT değerlerinden daha yüksek bulunmuştur. Bunun sebebi ise, mide ortamının asitliği polifenolik bileşikler dengelenmesi ve stabilize etmesidir.

Çalışma sonunda, hurma çekirdeğinin literatürdeki sonuçlarıyla orantılı olarak yüksek fenolik içeriğine sahip olduğu görülmektedir. Ancak bu yüksek içerik kavurma işleminden etkilenmekte ve antioksidan kapasitesi ile fenolik madde içeriğinde azalmalar olmaktadır. Çekirdeklerden daha düşük sonuçlar veren brewlerde de kavurma sonucu toplam fenolik madde miktarında ve antioksidan kapasitesinde azalmalar olmaktadır.

## **DATE SEED AS AN INDUSTRIAL WASTE; EFFECT OF ROASTING ON ANTIOXIDANT CAPACITY OF DATE SEED FLOUR AND DATE SEED COFFEE BREWS**

### **SUMMARY**

Date is one of the historical plant which has been grown by humankind. This plant has been playing vital role in both North Africa's and Middle East's economy. It was transported to America by Spanish at the beginning of 19<sup>th</sup> century and was farmed in Mexico. In Turkey, dates which in East and South Mediterranean are consumed in high quality by Turkish people. Evidence of date palm cultivation goes as far back as 4000 BC in what is now southern Iraq. The date palm is found in the Near East, North Africa, and the American continent, where dates are grown commercially in large quantities.

The botanical name of the date palm is *Phoenix dactylifera L.*, and it is an important member of the family Palmaceae. There are over 2000 different date varieties, which vary in shape, size, and weight. Usually they are oblong in shape, although certain varieties may be almost round. The length ranges from 1.8 to 11.0 cm, and the width from 0.8 to 3.2 cm; the average weight per fruit is 2-60 g. As with the fruit, the seed characteristics also vary greatly according to variety, and environmental and growing conditions.

Date seeds, also called stones or pits, form part of the integral date fruit, which is composed of a fleshy pericarp and seed that constitutes between 10 and 15% of the date fruit's weight, depending on the variety and quality thus, approximately 825,000 tons of date seeds are produced annually. The seed weight ranges from 0.5 g to 4 g, the length from 1.2 to 3.6 cm, and the width from 0.6 to 1.3 cm. The seed is usually oblong, ventrally grooved, with a small embryo, and with a hard endosperm made of a cellulose deposit on the inside of the cell walls. As it is also known that date seeds contain valuable bioactive compounds, utilization of this by-product is highly desirable for the date industry. Seed of date is a cheap fiber in the diet and considered as a potential source of antioxidants. As such seeds can be used as functional food additives. Moreover, milled seeds are consumed as decaffeinated coffee by Arabs. Furthermore, date seeds are considered as waste and used as animal feed.

Epidemiological studies have consistently shown that high fruit and vegetable consumption is associated with a reduced risk of several chronic diseases, such as coronary heart disease, cardiovascular disease, cancers, atherosclerosis, neurodegenerative diseases (such as Parkinson and Alzheimer), and inflammation, as well as aging. This is attributed to the fact that these foods may provide an optimal mixture of phytochemicals such as dietary fiber, natural antioxidants such as vitamins C, E, and beta-carotene, and phenolic compounds. Interestingly, the peel and seed fractions of some fruits possess higher antioxidant activity than the pulp fraction. Date seeds appear to fit well into this category.

Several studies have reported the advantages of the incorporation of date seeds into animal diets. Some of these advantages include increased weight gain, improved feed efficiency, and improved meat palatability. Adding date seed to the starter and finisher diets improved body weight gain, feed conversion, and growth performance, comparable to the corn-soybean meal diet of broiler chicks. Results show that the date seed can be included at 10% in broiler diets to support and enhance growth performance. Also, studies show that a feeding treatment with normal date seeds (7-14%) significantly increased the testosterone in plasma, and the body weight of rats. The protein of date seeds has a higher concentration of lysine, which is often the limiting amino acid in diets based on cereals.

In this study, mebrun type dates were used and the seeds of mebrun dates were roasted in different times (5 min, 10 min, 15 min) at constant temperature (200<sup>0</sup>C) with *precision coffee roaster*. Then, roasted and unroasted seeds were milled. Extracts for the usage in the assay were prepared. 80% ethanol was used as suitable solvent on the basis of literature. Total phenolics and total antioxidant activity in roasted coffee powder, unroasted seed flour and the brews from roasted powders were measured by spectrophotometric analysis. Total phenolics were determined by Folin-Ciocalteu method. Results were expressed by mg gallic acid/ 100 g dry matter. In order to determine the antioxidants activity; DPPH Free Radical Scavenging Capacity and Cupric Reducing Antioxidant Capacity assays were performed. Results were expressed through TROLOX equivalent. Total phenolic content and total antioxidant capacity values indicated that seed flour were significantly higher. When compared to roasted and unroasted flour, total phenolic content decreased with roasting effect. Same results were obtained from brew samples. Unroasted brews showed the highest total phenolic content and antioxidant capacity and 15 min. roasted brews showed the least TPC and antioxidant capacity. In regards to the total antioxidant capacity methods, CUPRAC assay gave higher responses than the DPPH assay in accordance with the literature. The correlation coefficients between the assays were calculated and the significance of the assays were statistically analyzed.

The bioaccessibility of phenolics from roasted and unroasted powder and brews was assessed by *in vitro* gastro-intestinal digestion procedure that simulates the physiochemical and biochemical changes that occur in the gastrointestinal tract. Since *in vivo* studies on humans and animals are not preferred due to the limitations such as complexity, expensiveness and ethical reasons, *in vitro* digestion assays provide rapid and simple methods to evaluate phytochemical stability in food matrices.

Samples were collected prior to digestion (initial), after gastric digestion (post-gastric, PG), and after intestinal digestion (serum-available, IN; nonserum-available, OUT) and analyzed using spectrophotometric assays. The percent recoveries were calculated as the proportions of the values obtained for PG, IN and OUT fractions to the initial values. Results from *in vitro* digestion demonstrated that phenolic acids were found to be stable in gastric digestion due to acidic conditions.

At the end of the study, date seeds appeared to have a high phenolic content and antioxidant capacity. However, they were affected by the high content roasting and showed reduction in the antioxidant capacity and total phenolic content.





## 1. GİRİŞ

Hurma, insanlığın bilinen en eski kültür bitkilerinden biridir. Yaklaşık 6000 yıldır gıda olarak tüketilen hurma, Arecaceae (palmaceae) familyasında bulunan palmiye ağacında yetişmektedir. Değişik lezzet, renk ve görünüşteki hurma çeşitleri Phoenix dactylifera L. türüne aittirler (Robinson ve diğ, 2012).

Hurma türleri Kanarya Adaları, Kuzey ve Orta Afrika ülkeleri, Ortadoğu Ülkelerini içine alan geniş bir coğrafyaya yayılmış bulunmaktadır. Yetiştirilmesi için en önemli etken iklimin sıcak olmasıdır. Türkiye'nin iklim şartları meyvenin olgunlaşması için yeterli olmasa da Güney Ege ve Batı Akdeniz bölgelerinin bir kısmında yetiştirilmektedir (Bozbuga ve Hazir 2008).

Ekonomik değeri yüksek olan hurmanın dünya toplam üretimi FAO (2013) verilerine göre dünya genelinde 7 462 510 ton'dur. Hurma üretiminde, Mısır birinci, Suudi Arabistan ikinci ve İran üçüncü sıradadır. Bu ülkeleri Pakistan, Birleşik Arap Emirlikleri, Cezayir takip etmektedir. Türkiye ise 16. sırada yer almaktadır (Anonymous 2013).

Hurmanın botanik yapısı en içte bir çekirdek ve çekirdeği saran sert bir endokarp tabakası, bunun üzerinde etli kısmı oluşturan mezokarp tabakası ve en dışta da meyveyi saran ince bir epikarp tabakasından oluşan bir meyve çeşididir (Hasnaoui ve diğ, 2010).

Hurma çekirdeği meyvenin en iç kısmında bulunmakta ve ağırlığı yaklaşık olarak meyvenin ağırlığının %5.6-15'ini oluşturmaktadır. Hurma çekirdeği çok zengin bir gıda lifi (%73.1), fenolik madde(3942 mg/100g) ve antioksidan (80400 µmol/100g) kaynağıdır. Meyve dokusuyla kıyaslandığında daha fazla protein (5.1 g/100g) ve yağ (9.0g/100g) içerdiği görülmektedir. Çekirdekler beslenme potansiyel ucuz bir lif ve antioksidan kaynağı olarak düşünülebilir. Bu itibarla tohumlar fonksiyonel gıda katkı maddesi olarak kullanılabilirler. Araplarda çekirdekler öğütülüp kafeinsiz içecek şeklinde için kahve olarak tüketilmektedir.

Bunun dışında çekirdekler atık olarak kabul edilmekte ve hayvan yemi olarak değerlendirilmektedir (Al-Farsi ve Lee 2008; Baliga ve diğ, 2011).

Antioksidanlar kalp ve damar hastalıklarının önlenmesinin yanı sıra kanser, parkinson ve ahlzheimer hastalıkları, enflamasyon gibi nörodejeneratif hastalıklar ve yaşlanma gibi durumların önlenmesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Antioksidanların insan bünyesindeki fizyolojik fonksiyonu, metabolizmanın rutin faaliyetleri sırasında meydana gelen reaktif oksijen ve azot gibi reaktif ürünlerin yan etkilerini azaltan maddeler olarak tanımlanır. Doğal antioksidanlar öncelikli olarak bitkisel kaynaklı fenolik maddeler, C vitamini, karotenoidler ve selenyumlardır. Bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklere örnek olarak flavonoid bileşikler (antosiyantinler), sinamik asit türevleri, kumarinler ve tokoferol (E vitamini) verilebilir (Al-Farsi ve Lee 2008; Saafi ve diğ, 2009; El-Arem ve diğ 2012; Benmeddour ve diğ 2013).

Hurma ve çekirdeği antik çağlardan günümüze kadar geleneksel tedavi amaçlı ilaç olarak kullanılmaktadır. Hurmanın kanserden ağız kokusuna kadar bilinen yaklaşık yetmiş farklı hastalığa iyi geldiği bildirilmektedir (Duke ve diğ, 2002). Karaciğer ve böbrekleri koruyucu, kanser önleyici, bağışıklık sistemini geliştirici, hormonal sistemi düzenleyici etkisi deney hayvanları üzerinde yapılan laboratuvar çalışmalarıyla kanıtlanmıştır (Baliga ve diğ, 2011).

## **1.1 Tezin Amacı**

Bu çalışmanın ilk amacı, endüstriyel bir atık olan hurma çekirdeğinin sahip olduğu toplam fenolik madde miktarını ve antioksidan aktivitesini tayin ederek, bir atığın geri dönüşümünü sağlamak ve potansiyel fonksiyonel gıda özelliğini tespit etmektir. Çalışmanın ikinci amacı ise, hurma çekirdeğinin, kavru olarak kahve haline getirilmesi ile yeni bir ürün geliştirmek ve bu çekirdeklerin su ile karıştırılıp geleneksel türk kahvesi prosesi uygulandıktan sonra, telvesinden süzülüp elde edilen sulu kısmın (brews) toplam fenolik madde miktarları ve antioksidan aktiviteleri incelenerek çekirdekten sulu kısma geçen toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivitelerini analiz edip ve biyoyararlılıklarının incelenip, kıyaslanmasıdır.

## 1.2 Literatür Araştırması

### 1.2.1 Hurma

Latince *Phoenix dactylifera* olarak bilinen hurma , palmiyegiller (*Arecaceae*) ailesine ait bir çeşit palmye türü olarak, insanoğlunun tarımını yaptığı bilinen en eski tarım ürünlerinden biridir. Yaklaşık 6000 yıldır, gıda olarak tüketilmekte olup, üretiminin yapıldığı yörelerde yaşayan insanlar için ekonomik ve sosyal açıdan büyük önem taşımaktadır. Hurmanın, yaşam ağacı olarak da isimlendirilmesi ona verilen önemi göstermektedir. Hurma tarımı 800.000 hektarlık bir alanda yapılmakta olup dünya üzerinde 2000'in üzerinde farklı çeşidi olduğu bilinmektedir. Hurma tropikal, ılıman ve çöl ikliminin yaşandığı bölgelerde yetişebilmektedir(Amer, 1994). Hurmanın yetişmesi için yeterli sıcaklık Türkiye'de sağlanamamaktadır ancak Güney Ege ve Batı Akdeniz bölgelerinin bazı kısımlarında (Datça Yarımadası ve Ege Adaları) hurma yetiştiği gözlenmektedir. Bu bölgelerde yetişen hurma türleri *Phoenix canariensis* ve *Phoenix theoprasti*'dir (Bozbuga and Hazir 2008).

Dünya üzerinde ise hurma sıcaklıkla orantılı olarak Kanarya Adaları, Kuzey ve Orta Afrika ülkeleri, Uzakdoğu ve Asya ülkelerinin birçoğunda yetişmektedir. FAO'nun 2013 verilerine göre hurma üretiminde Mısır birinci, Suudi Arabistan ikinci ve İran üçüncü sıradadır. Bu ülkeleri Pakistan, Birleşik Arap Emirlikleri, Cezayir takip etmektedir. Türkiye ise 16. sırada yer almaktadır. (Anonymous, 2013).Hurma üretimi ülkemizde az olmakla beraber, tüketim miktarı fazladır, özellikle ramazan ayında kuruyemiş olarak ülkemizde yüksek miktarda hurma tüketimi olduğu görülmektedir.

Hurma yılda bir kere meyve veren bir bitkidir. Olgunlaşma süreci 7 ay kadardır. 5 aşamadan oluşur. Polenleşmeden olgunlaşma evresine geçen hurma tamr sürecine girmiş olur, bu süreç kurutma evresi olarak da bilinir. Tamr süreci, 4 aşamalıdır. Nem miktarındaki azalışa göre kimri, khalal, rutab ve tamr evrelerini geçirir. (Zaid 1999). Hurma ülkemizde tamr evresinde, yani kuru şekilde tüketilirken, özellikle ramazan döneminde rutab döneminde, taze hurma olarak bilinen daha yüksek nemli ve şekerli haliyle de tüketilebilmektedir. Rutab aşamasındaki taze hurma %24-45 nem, %2.6 protein, %0.3 yağ ve %2.6 kül içerirken, tamr aşamasında, daha uzun süre kurutulmuş hurmanın nemi %20'nin altındadır, %2.3 protein , %0.2 yağ ve %1.7 kül içerir (Al-Shabib ve Marshall, 2003).

Dünya üzerinde 2000'den fazla hurma türü bulunmaktadır. Yetiştirme şekillerine göre de hurmanın özellikleri değişiklik gösterebilir. Hurma çeşitleri arasında genişlik 8-32 mm, uzunluk 18-110 mm ve ağırlık ise 2-60 g/adet arasında değişiklik göstermektedir. Hurma çekirdeğinde ise; genişlik 6-13 mm, uzunluk 12-36 mm, ağırlık 0.5-4 g/adet aralığında değişmektedir (Zaid, 2002).

Hurmanın, karbonhidrat, yağ, protein ve lif miktarı sırasıyla şu aralıklarda değişim göstermektedir; karbonhidrat %44-88, protein %2.3-5.6, yağ %0.2-0.5, diyet lifi %6.4-11.5. Hurmadaki yüksek miktardaki şekeri, früktoz ve glikoz oluşturmaktadır (%44-88), früktoz ve glikoz miktarları yaklaşık olarak eşittir (Al-Shahib ve Marshall 2003).

Hurmanın yaklaşık %5.6–14.2 kadarı çekirdeğidir. Dünya üzerinde, hurma üretimiyle bağlantılı olarak, yılda 825,000 ton hurma çekirdeği üretimi yapılmaktadır. Çok zengin bir gıda lifi ve antioksidan kaynağı olan hurma çekirdeğinin besin değerleri ise %3.1-10.3 nem, %71.9-87 karbonhidrat , %2.3-6.4 protein , %5-13.2 yağ ve %0.9-1.8 kül aralıklarında değişmektedir. Çizelge 1.1'de hurma çeşitlerine göre çekirdeklerindeki nem ve besin değerleri oranları verilmiştir. Hurma çekirdeği, hurma meyvesi ile kıyaslandığında daha yüksek miktarlarda yağ ve protein içermektedir. Çekirdekler beslenmede potansiyel ucuz bir lif ve antioksidan kaynağı olarak düşünülebilir. Bu yönüyle fonksiyonel gıda katkı maddesi olarak kullanılabilirler. Araplarda çekirdekler öğütülüp kafeinsiz içecek şeklinde kahve olarak tüketilmektedir. Bunun dışında çekirdekler atık olarak kabul edilmekte ve hayvan yemi olarak değerlendirilmektedir (Al-Farsi ve Lee, 2011).

Ali-Mohamed ve Khamis'in (2005) yaptığı çalışmaya göre 6 çeşit hurma çekirdeğinin mineral çeşit ve miktarları şu aralıklardadır; 459.8-542.2 potasyum, 21.7-26.1 sodyum, 6.5-11.3 kalsiyum, 61.3-69.5 magnezyum, 2.8-6.0 demir, 1.3-1.7 manganez, 1.0-1.4 çinko 0.4-0.6 bakırdır.

Nehdi ve diğ'nin (2010) yaptığı çalışmaya göre hurma çekirdeğinde bulunan ortalama yağda; %50.10 oleik asit, %19.23 linoleik asit, %10.24 laürik asit, %9.83 palmitik asit ve %7.51 stearik asit bulunmaktadır. (Nehdi ve diğ,2010) Al-Hooti ve diğ.'nin(1998) 5 hurma çeşidinde yaptığı çalışmaya göre ise yine en yüksek yağ asidi yüzdesi %56.1 ile oleik asittir. Oleik asidi, %11.9 ile palmitik asit, %11.6 linoleik

asit, %8.3 ile laürik asit, %6.0 ile myristik asit ve son olarak %2.6 ile stearik asit takip etmektedir(Al-Hooti ve diğ,1998). Hurma çekirdeği yağı yenilebilir ancak düşük ekstraksiyon miktarı sebebi ile diğer yağlık bitkilere alternatif değildir. Hurma çekirdeğinin diğer fizikokimyasal özellikleri su şekildedir; saponifikasyon sayısı 191.28, iyodun sayısı 76.66, p- anisidin değeri 3.67, peroksit değeri 3.62 meq/kg, serbest yağ asitleri içeriği % 0.59, karotenoid içeriği 5.51 mg / 100g, klorofil içeriği 0.10 mg / 100g ve kırılma indeksi 1.45'dir (Nehdi ve diğ, 2010).

**Çizelge 1.1:** Hurma çekirdeği türlerinde nem, protein, yağ, kül ve karbonhidrat kompozisyonları (Al-Farsi ve Lee, 2011).

Hurma Türleri	nem%	protein%	yağ%	kül%	karbonhidrat%
Mabseeli	3.1	3.9	5.0	1.0	87.0
Um-sellah	4.4	5.4	5.9	1.2	83.1
Shahal	5.2	2.3	5.1	0.9	86.5
Fard	10.3	5.7	9.9	1.4	72.7
Khalas	7.1	6.0	13.2	1.8	71.9
Lulu	9.9	5.2	10.5	1.0	73.4
Deglet noor	9.4	5.0	9.2	1.0	75.4
Allig	8.6	4.7	11.6	1.0	74.1
Ruzeiz	5.4	6.4	9.7	1.0	77.5
Sifri	4.5	5.9	10.0	1.1	78.5
Average	6.8	5.1	9.0	1.1	78.0

Besbes ve diğ'in (2004), Deglet Nour ve Allig cinsi hurmaların çekirdeklerinde yaptığı çalışmada hurma çekirdeği yağındaki tokaferol ve sterol profilleri karşılaştırılmıştır. Kafeik asit eşdeğeri cinsinden, toplam fenolik değerleri 22.0-52.1 mg/ 100 g arasında değişmektedir. Bu sonuç zeytinyağı dışındaki yenilebilir yağlar ile kıyaslanmış ve hurma çekirdeğinin zengin bir fenolik bileşik kaynağı olduğu gözlemlenmiştir (zeytinyağındaki toplam fenolik miktarı 12.4 -51.6 mg/100g ). Bu durum hurma çekirdeği yağındaki oksidatif kararlılığın diğer bitkisel yağlardan

yüksek oluşunu açıklayabilir. Hurma çekirdeği yağının oksidatif kararlılığı sayesinde, kozmetik ve ilaç sanayi ürünleri için iyi bir doğal fenolik kaynağı özelliği gösterebilir. Deglet Nour ve Allig türü hurma çekirdeği yağının en yüksek tokaferol oranına a-Tokofero'dür. Deglet Nour için 24.97%, Allig için 38.85% oranındadır. Toplam sterol miktarı ise; Deglet Nour için 350, Allig için 300 mg/100 g bulunmuştur. Toplam sterolde ise b-sitosterol %83.31 ve %78.66 oranıyla en yüksek miktardadır. (Besbes ve diğ, 2004).

Hurma çekirdeğindeki protein miktarı yağdan daha azdır, ancak Deglet Nour ve Allege çeşit hurma türlerinin çekirdeklerinde yapılan çalışmalarda hurma çekirdeğindeki proteinde temel aminoasitlerden glutamik asit %17.8-16.8 oranlarında bulunmuştur. Her ne kadar hurma ve çekirdeğindeki protein miktarı düşük görülse de bu miktar diğer meyvelerdeki protein miktarları ile kıyaslanınca yüksektir. (Elma %0.3, portakal %0.7, muz %1.0 ve üzüm %1.0) (Bouaziz ve diğ, 2008).

Hurma çekirdeği toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan bakımından da oldukça zengindir. Toplam fenolik miktarı farklı hurma çekirdeklerinde 3102-4430mg/100 g arasında değişirken, antioksidan miktarı 58,000-92900 µmol/100 mg arasında değişmektedir. Ayrıca hurma çekirdeği 79.84-64.5g/100g aralığında diyet lif içermektedir. Hurmada ise 172-246mg/100g toplam fenolik madde, 14,600-16,200 µmol /100 g antioksidan ve 5.9-8.7g/100g diyet lif bulundurmaktadır (Çizelge 1.2). Hurmadaki fenolik madde, antioksidan ve diyet lif miktarları çekirdeğine kıyasla düşüktür. Bu sonuçlar da hurma çekirdeğinin fonksiyonel gıda olarak kullanılabileceğini akıllara getirmektedir. (Al-Farsi ve diğ, 2007)

**Çizelge 1.2:** Hurma çekirdeği türlerinde diyet lif (g/100g), toplam fenolik (mg/100g) ve antioksidan(µmol/100g) miktarları (Al-Farsi ve Lee, 2011).

<b>Hurma Türleri</b>	<b>Diyet lif</b>	<b>Toplam Fenolik</b>	<b>Antioksidant</b>
Mabseeli	79.84	4430	58000
Um-sellah	80.15	4293	90300
Shahal	77.75	3102	92900
Fard	67.8	—	—
Khalas	64.5	—	—
Lulu	68.8	—	—
Average	73.1	3942	80400

Al-Farsi and Lee'nin (2008) çalışmasında hurma çekirdeğinde 9 farklı fenolik asit tespit edilmiştir, bunlardan 9.89 mg/100 g ile p-hydroxybenzoic asit en yüksek miktara sahipken onu, (8.84 mg/100 g) ile protocatechuic ve (8.42 mg/100 g) ile m-coumaric asit takip etmiştir (Al-Farsi ve Lee, 2008).

### 1.2.2 Serbest radikaller, oksidatif stres ve antioksidanlar

Serbest radikaller, bir atom ya da molekül yörüngesinde eşleşmemiş bir veya birden fazla elektron içeren, molekül ağırlığı düşük ve oldukça yüksek reaktif özellikte kimyasal ürünlerdir (Southorn ve Powis, 1988).

Oksijen canlılar için 2 temel fonksiyonu sebebiyle çok önemlidir. Bunlardan birincisi, oksijenin canlılar için yapısal fonksiyonudur. Oksijenin bu görevi bütün canlılar için geçerlidir ve bütün canlıların yapısını oluşturan 100 atomdan yaklaşık 25'i oksijen atomudur. Oksijenin ikinci temel görevi ise fonksiyonel özellikte olup, oksidasyon reaksiyonlarıyla canlıların solunum sisteminde yer almasıdır. Solunumla alınan oksijenin %5 canlı bünyesi tarafından serbest radikallere dönüştürülür. Bu şekilde dönüşen oksijen yüksek derecede reaktif özellik gösterip, oksijenin toksik etkisinin asıl sebebidir (Kılınç, 1986).

Bu oksijen içeren reaktif moleküller reaktif oksijen türleri (ROT) olarak da adlandırılabilirler. ROT'lar protein, yağ ve nükleik asit gibi hücrelerin temel bileşenlerine zarar vermektedir (Bissenbaev ve diğ, 2007).

Serbest radikaller 3 yolla meydana gelir; bunlar, homolitik ayrılma, heterolitik bölünme, elektron transferidir. Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikaller genellikle elektron transferi yolu ile meydana gelmektedir. Serbest radikaller ortamda pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötr olarak bulunabilirler.  $Cu^{+2}$ , Fe, Mn ve Mo gibi geçiş metallerinin ortaklaşmamış elektronu olmasına rağmen serbest radikal olarak kabul edilmezler ancak bu geçiş metalleri, iyon reaksiyonlarını katalize ettiğinden, serbest radikal oluşumundan önemli rol teşkil ederler (Akkuş, 1995). Örneğin; bu metalleri içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri, flavoproteinlerin de yardımıyla, oksijeni indirger ve süperoksit radikali oluşturur. Yüksek derecede aktif olan süperoksit radikalini, bakır içeren bir enzim olan süperoksit dismutaz enzimi ise hidrojen perokside çevirir. Süperoksit radikali göre daha az aktif olan hidrojen peroksit, hücredeki katalaz veya glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzimler yardımı ile suya dönüştürülerek, zararsız hale getirilir. Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) çiftlenmemiş elektrona sahip olmadığı için radikal değildir. Oksijen molekülü ( $O_2$ ) de bir radikaldir ancak çiftlenmemiş molekül

bulunduruyor ise süperoksit radikali ( $O_2^-$ ) olabilir (Mates, 2000). Çizelge 1.3'de serbest radikaller ve radikal olmayan reaktif türlerinin kategorizasyonu verilmiştir.

**Çizelge 1.3:** Serbest radikaller ve radikal olmayan reaktif türleri (Halliwell ve Gutteridge,1999).

SERBEST RADİKALLER	RADİKAL OLMAYAN REAKTİF TÜRLERİ
Reaktif Oksijen Türleri	Reaktif Oksijen Türleri
Singlet Oksijen ( $O_2^1$ ) Süperoksit Radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) Hidroksi Radikali ( $HO^{\cdot}$ ) Alkoksil Radikali ( $RO^{\cdot}$ ) Peroksil Radikali ( $ROO^{\cdot}$ ) Hidroperoksil Radikali ( $HO_2^{\cdot}$ ) Karbonat Radikali ( $CO_3^{\cdot-}$ ) Karbondioksit Radikali ( $CO_2^{\cdot-}$ )	Ozon ( $O_3$ ) Hidrojen Peroksid ( $H_2O_2$ ) Organik Peroksidler ( $ROOH$ ) Peroksinitrit Radikali ( $ONOO^{\cdot}$ ) Peroksinitrik Asid ( $ONOOH$ ) Peroksinitrat ( $O_2NOO^{\cdot}$ ) Peroksomono Karbonat ( $HOOCO_2^{\cdot}$ ) Hipobromik Asid ( $HOBr$ ) Hipoklorik Asid ( $HOCl$ )
Reaktif Klorür Türleri	Reaktif Klorür Türleri
Klor Radikali ( $Cl^{\cdot}$ )	Hipoklorik Asid ( $HOCl$ ) Kloraminler Brom Klorür ( $BrCl$ )
Reaktif Brom Türleri	Reaktif Brom Türleri
Brom Radikali ( $Br^{\cdot}$ )	Hipobromik Asit ( $HOBr$ ) Brom Gazı ( $Br_2$ ) Brom Klorür ( $BrCl$ )
Reaktif Azot Türleri	Reaktif Azot Türleri
Azot Doksit ( $NO_2^{\cdot}$ ) Nitrat Radikali ( $NO_3^{\cdot}$ ) Nitrik Oksid ( $NO^{\cdot}$ ) Diazot Trioksid ( $N_2O_3^{\cdot}$ )	Nitrik Asit ( $HNO_3$ ) Nitrosil Katyonu ( $NO^+$ ) Nitrosil Anyonu ( $NO^-$ ) Nitronyum Katyonu ( $NO^{2+}$ ) Dinitrojen Tetraoksid ( $N_2O_4$ ) Peroksinitrik Asit ( $ONOOH$ ) Alkil Peroksinitritler ( $ROONO$ ) Alkil Peroksinitratlar ( $RO_2NO_2$ ) Peroksiasetil Nitrat ( $CH_3C(O)O_2NO_2$ ) Peroksinitrat ( $OONOO^{\cdot}$ ) Nitril Klorit ( $CINO_2$ ) Peroksinitrit ( $OONO^{\cdot}$ ) Dinitrojen Trioksid ( $N_2O_3$ )

Serbest radikaller, oksijenin normal metabolizma basamaklarında indirgenmesi ile açığa çıktığından, biyolojik kaynaklarla oluşabileceği gibi, intraselluler birçok kaynak aracılığı ile de oluşabilirler. Intraselluler kaynaklar; küçük moleküllerin otooksidasyonu (tioller ve hidrokinonlar), enzimler ve proteinler (ksantin oksidaz, hemoglobin), mitokondrial elektron transportu, endoplazmik retikulum ve nükleer



membran elektron transport sistemleri, plazma membranı (lipoksijenaz, lipid peroksidasyonu) gibidir. Biyolojik kaynaklar ise; radyasyon, alışkanlık yapan maddeler (alkol, uyuşturucu vs), çevresel faktörler (hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, hiperoksi, pestisitler, sigara dumanı, anestezipler)'dir. Stresle beraber artan katekolamin düzeyi de bir serbest radikal kaynağıdır (Akkuş,1995).

Reaktif oksijenin oluşturduğu hasarı önlemek adına vücudun geliştirdiği birçok savunma mekanizması bulunmaktadır. Serbest radikallere karşı savunma geliştiren vücut, bunu ya serbest radikalın oluşumunu engelleyerek ya da oluşmuş radikalın etkisini ortadan kaldırmaya çalışarak yapar. Bu savunma sistemine yardımcı yapıların tümüne antioksidanlar denir. Vücutta, oksidanlar ve antioksidanlar arasında var olan dengenin oksidanlar lehine bozulması, yüksek reaktif oksijenlerin oluşmasına sebep olur buda oksidatif hasara neden olur. Bu durum oksidatif stres olarak adlandırılır. (Akkuş, 1995; Robert ve diğ, 2004). Kısaca, vücudun, antioksidan savunma mekanizması ile hücrelerin yağ peroksidasyonuna sebep olan aktif serbest radikal oluşumu arasındaki negatife yönlü dengesizliktir (Halliwell, 1999).

Oksidatif stresin artması ile; büyük proteinler, nükleik asitler ve yağlar gibi moleküllerde hasar meydana gelir, DNA zedelenmesi, kalp hastalıkları, tümör ve kanser riski artar (Liu, 2003).

Organizma, antioksidan savunma mekanizması ile var olan homeostazisini korumaya çalışır ve oksidatif stres oluşumunu engeller. Antioksidanlar bu savunmayı 4 ayrı şekilde yapar; bunlar toplayıcı, bastırıcı, zincir kırıcı ve onarıcı etkilerdir.

Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme yoluyla oluşan savunmaya toplayıcı etki denir. Bu tip etki, antioksidan enzimler ve küçük moleküllerde görülür. Serbest oksijen radikallerine bir hidrojen aktararak onların aktifliğini azaltıp veya inaktif hale getiren savunmaya ise bastırıcı etki denir. Vitaminlerin etki tarzı bastırıcıdır. Aktif serbest radikalleri kendilerine bağlama yoluyla zincirlerini kırıp, fonksiyonlarını engelleyen savunmaya da zincir kırıcı etki denir Serbest radikallerin oluşturdukları hasarların onarılmasındaki etkilerine de onarıcı etki adı verilmektedir (Akkuş, 1995; Young ve Woodside, 2001).

Antioksidanlar, endojen ve eksojen olmak üzere iki kaynaklıdır. Endojen antioksidanlar, doğrudan veya dolaylı yolla ksenobiyotiklerin, ilaçların, karsinojenlerin ve toksik maddelerin olumsuz etkilerine karşı hücreyi savunan antioksidanlardır. Kendi içlerinde enzim olanlar ve enzim olmayanlar olarak ikiye ayrılır. Enzim olanlar; mitokondrial sitokrom oksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz, glutatyon redüktaz, hidroperoksida şeklinde sıralanabilir. Enzim olmayanlar; vitamin C, E, A, metallothionin, poliaminler, seruloplazmin, melatonin, NADPH, adenosin, koenzim Q-10, ürat, ubikuinol, polifenoller, flavonoidler, sistein, homosistein, taurin, metiyonin, S-adenozil-L-metiyonin, resveratrol, nitroksidler, GSH gibidir. Enzimatik antioksidanların en önemli olanları polifenollerdir (Akkuş, 1995; Liu, 2004).

Eksojen antioksidanlar; inhibitörler tarafından oluşturulmuş antioksidanlardır. Eksojen antioksidanlar; ksantin oksidaz inhibitörleri (tungsten, allopürinol, oksipürinol, folik asit, pterin aldehid), NADPH oksidaz inhibitörleri (adenosin, lokal anestezipler, cetiedil, diphenylene iodonium), trolox-C, mannitol gibidir (Akkuş, 1995).

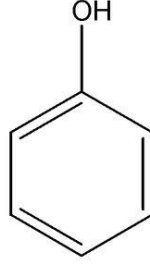
Serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stresin önlenmesi ve etkisinin minimuma indirilmesi amacıyla yeterli miktarlarda antioksidan tüketilmelidir. Çeşitli antioksidan bileşikler içeren sebze ve meyveler, hücreleri oksidatif stresten koruyarak kronik hastalık risklerini en aza indirir (Liu, 2003).

### **1.2.3 Fenolik bileşikler**

Fenolik bileşikler, yapılarında en az bir aromatik halka ve bu halkaya bağlı en az bir veya daha fazla hidroksil grubu bulunduran ve bitkiler aleminde en yaygın bulunan maddeler grubunu oluşturmaktadırlar. Bitkisel kaynaklarda çok çeşitli yapısal kombinasyonlar ve polarite özellikleri sergileyen 8000'den fazla fenolik bileşik bulunmaktadır.

Fenolik bileşiklerin molekül formülleri, en az 6 karbon atomu ve minimum bir -OH grubu içermektedir. Fenolik bileşiklerin kolay okside olabilesinden ötürü antioksidan aktiviteye sahiplerdir. -OH grubu birden çok olan fenolikler, hidrofilik karaktere sahiptir ve su, metanol gibi çözügenlerle ekstrakte edilebilirler (Bravo, 1998; Luthria, 2006; Escarpa ve Gonzalez, 2001).

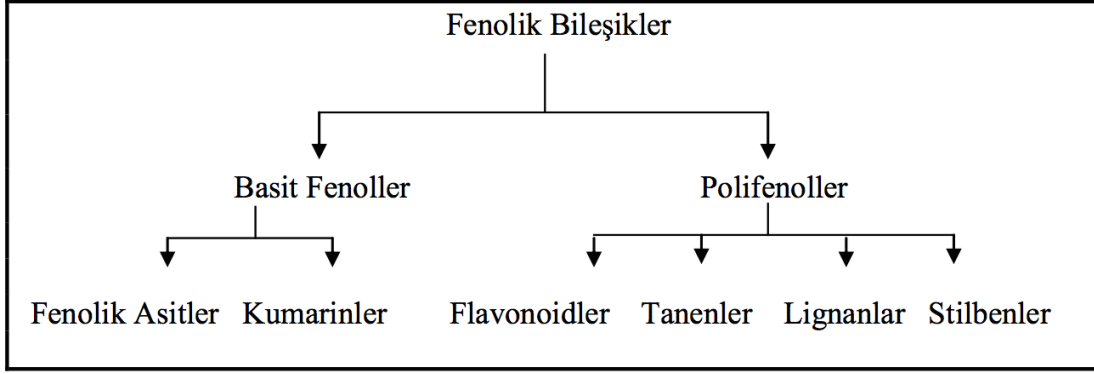
Fenol, en basit fenolik bileşiktir ve yapısı, bir benzen ve bir hidroksil grubu içerir(Şekil 1.1). Fenolik bileşiklerin, yapısında tek aromatik halkaya bir yada birden fazla hidroksil grubu bağlanmış çeşitleri basit fenoller olarak adlandırılır. Yapılarından birden çok fenol halkası içerenleri ise polifenoller olarak isimlendirilir. Polifenollerin yapılarında 3'lü halka sistemi bulunanlar flavonoidler, yüksek molekül ağırlığına sahip fenolik karışımlar ise tanenler olarak sınıflandırılır (Waterhouse, 2002).



**Şekil 1.1:** Fenol halkası.

Gıdalardaki fenolik bileşiklerin, besinsel fonksiyonları bulunmasa da sağlık üzerine olumlu etkileri vardır. Fenolik bileşikler antioksidan özellikleri yönüyle serbest radikalleri bağlamakta ve oksidatif stres oluşumunu önlemektedirler. (Tsao ve Yang, 2003). Ayrıca çalışmalar meyve, sebze ve hububatlarında bulunan fenolik bileşiklerin kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve sinir sistemi ile ilgili hastalıklar gibi bazı kronik hastalıkları önleyebilme özelliğine sahip olduğunu göstermektedir (Escarpa ve Gonzalez, 2001). Bunlara ek olarak gıdalardaki fenolik bileşikler, tat ve koku oluşumundaki etkileri, renk oluşumu ve değişimine katılmaları, antimikrobiyal etki göstermeleri, enzim inhibisyonuna neden olmaları, değişik gıdalarda saflık kontrol kriteri olmaları gibi birçok açıdan önem taşımaktadır (Acar ve Gökmen, 2007).

Şekil 1.2'deki gibi bitki fenolikleri, hidroksil gruplarının sayısı ve pozisyonuna göre basit fenoller; fenolik asitler (benzoik ve sinamik asitler), kumarinler, ve polifenoller; flavonoidler, stilbenler, hidrolize ve kondense tanenler, lignanlar ve ligninler olarak sınıflandırılabilirler (Naczki ve Shahidi, 2004).



**Şekil 1.2:** Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması.

Fenolik bileşikler genel olarak fenolik asitler, flavonoidler ve tanenler olarak 3 grupta incelenebilirler (Balasundram ve diğ, 2006).

- **Fenolik asitler**

Fenolik asitlerin 2 çeşidi vardır; bunlar hidroksibenzoik ve hidroksisinamik asitlerdir. Hidroksibenzoik asitlerin yapısı C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>'den oluşur. En yaygın rastlanan hidroksibenzoik asitler; p- hidroksibenzoik, protokateşuik, vanilik, gallik ve sirinjik asittir (Bravo, 1998). Şekil 1.3'de hidroksibenzoik asitlerin kimyasal yapıları verilmiştir. Hidroksibenzoik asitler meyvelerde genellikle ester halinde mevcuttur. Bitkisel gıdalarda şeker ve organik asitlerle esterleşmiş olarak bulunmaktadır (Jaganath ve Crozier, 2010).

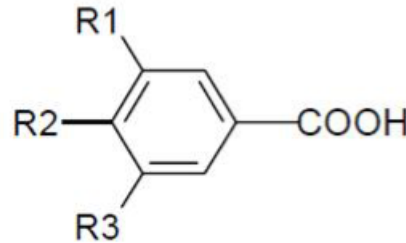
p- Hidroksibenzoik asit R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=H

Protokateşuik asit R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=OH

Vanilik asit R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>O, R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=H

Sirinjik asit R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>O, R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=H

Gallik asit R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>= R<sub>3</sub>=OH



**Şekil 1.3:** Hidroksibenzoik asitlerin kimyasal yapısı (Shahidi ve Nacz, 1995).

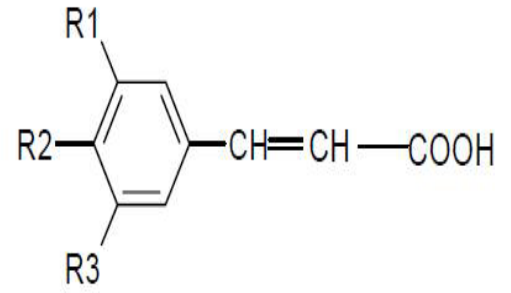
---

p- kumarik asit R1=H, R2=OH, R3=H

Kafeik asit R1=H, R2=OH, R3=OH

Ferulik asit R1=CH<sub>3</sub>O, R2=OH, R3=H

Sinapik asit R1= CH<sub>3</sub>O, R2= OH, R3= CH<sub>3</sub>O



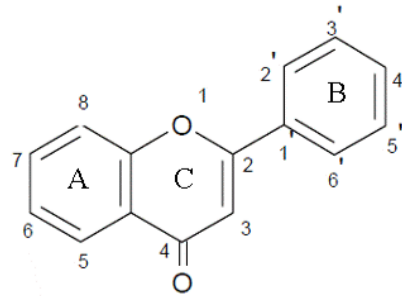
---

**Şekil 1.4:** Hidroksisinasamik asitlerin kimyasal yapısı (Shahidi ve Naczk, 1995).

Fenolik asitlerin ikinci çeşidi hidroksisinasamik asitlerdir. C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> fenilpropan yapısında olan hidroksisinasamik asitlerin en yaygın olanları; kafeik, ferulik, p-kumarik ve sinapik asittir (Bravo, 1998). Şekil 1.4' te hidroksisinasamik asitlerin kimyasal yapısı verilmiştir. Meyvelerde en sık rastlanan hidroksisinasamik asit cinsileri; kafeik asit, kumarik asit ve ferulik asittir. Hidrosinnamik asitler meyvelerde esterleşmiş halde de bulunabilirler. Kafeik asitin, kuinik asit ile yaptığı esterleşme sonucu klorojenik asit oluşmaktadır ve en çok gözlenen hidrosinnamik asit çeşididir (Belitz ve diğ, 2004; Naczk ve Shahidi, 2004).

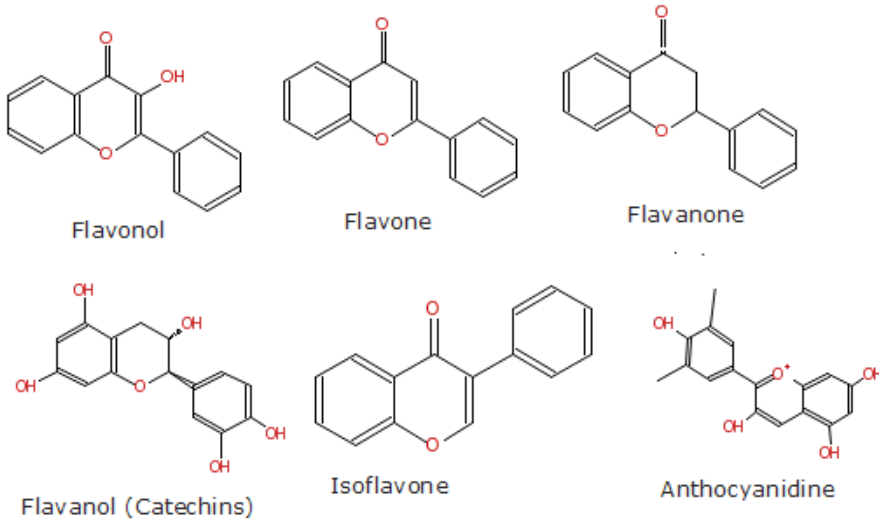
- **Flavonoidler**

En büyük polifenol grubunu meydana getiren flavonoidler, 15 karbon atomu içeren ve iki benzen halkasının (A ve B) oksijen içeren bir piren halkası (C) ile bağlanması ile oluşmaktadır. Düşük molekül ağırlıklı fenolik bileşiklerdir. Şekil 1.5'de flavonoidlerin genel yapısı görülmektedir (Naczk ve Shahidi, 2004).



**Şekil 1.5:** Flavonoidlerin temel kimyasal yapısı (Bravo, 1998).

Genelde bitkilerde glikozit türevleri halinde bulunurlar ancak aglikon şeklinde de bulunabilmektedirler (Bravo, 1998; Balasundram ve diğ., 2006). Karbon halkasının değişimine göre flavonoidler altı gruba ayrılır. Bunlar; flavanonlar, flavonlar, izoflavonlar, flavanoller (kateşinler), antosiyaninler ve flavonoller. Şekil 1.6'de flavonoidlerin alt gruplarının temel kimyasal yapısı verilmiştir. Yapısal olarak büyük farklılıklardan dolayı yaklaşık 6500 farklı flavonoid bilinmektedir (Acar ve Gökmen, 2007).



**Şekil 1.6:** Flavonoid alt gruplarının temel kimyasal yapıları (Madhavi, 1996).

- **Tanenler**

Molekül ağırlıkları 500 ile 30000 dalton arasında değişen ve suda çözünebilen bileşiklere tannenler denir. Molekül ağırlığı yüksek olan tanenlerin suda çözünemeyen çeşitleri de bulunmaktadır. (3000-30000 dalton) Bitkisel gıda ve içeceklerin genel çoğunluğunda bulunmaktadırlar. Tanenler protein ve karbonhidrat gibi bileşiklerle suda çözünmeyen kompleksler de oluşturabilirler. Kondense ve hidrolize olmak üzere 2 çeşidi bulunmaktadır. (Bravo, 1998).

#### 1.2.4 Kahve üretimi ve kavurma prosesinin kahve fenolikleri ve antioksidanları üzerine etkisi

Kahve, *Rubiacea* familyasına ait bir ağaçtır ve cinsi *Coffea*'dir. Bu ağacın meyve çekirdeğinin yüksek sıcaklıklarda kavrulup ardından öğütülmesi ile elde edilen toz, su veya süt ile karıştırılıp kahve içeceği elde edilir. Kahvenin hazırlanma süreci, yeşil kahve çekirdeğinin düzenli ve homojen şekilde kavurulması, öğütülmesi ve pişirilmesi kısımlarından oluşmaktadır. Kahveye özgü aromatik tat ve renk kavurma sürecinde oluşur. Sanayi tipi kavurma makineleri iki tiptir; sürekli ve kesikli. Her iki şekilde de ısının eşit ve homojen dağıtılması için dönen bir tambur kullanılır. Kavurma prosesi sırasında meydana gelen reaksiyonların devam etmemesi açısından, kavurma işlemi tamamlandıktan sonra kahve çekirdekleri soğutulur. Kahvenin kalitesi açısından kavurma sürecinin sıcaklık ve süresi en önemli faktörlerdir. Bu süreç sadece kahvenin rengi değil, aynı zamanda içeceğin tadını da doğrudan etkiler. Çok kavurulmuş bir kahvede acımsı tat oluşacağı gibi az kavurulmuş kahvede de kıvam eksikliği görülecektir. Kahve kavurma işlemi başlangıcında, çekirdekler önce saman sarısı rengini alır, ardından bu renk açık kahve rengine dönüşür. Kavrulmanın, piroliz aşamasında ise çekirdekler genişler, çatlama sesleri duyulur, renkte hızla koyulaşma gözlenir ve yağ çıkışı meydana gelir. Kavurulmuş çekirdek oda koşullarında ortalama 1 haftalık bir sürede tazeliğini koruyabilmektedir. Kahve prosesinde kavurma işleminden sonra öğütme işlemi gelmektedir. Bu step kahvedeki çözünür maddelerin içeceğe geçme miktarını belirlemesi açısından önemlidir. Sanayi tipi kahve değirmenlerinde orta ince ve çok ince derecelerde öğütme yapmaktadır. Kahve öğütüldükten sonra 2-3 gün tazeliğini koruyabilmektedir. Bu yüzden öğütüldükten sonra tüketilmeli veya vakum ambalajlarda saklanmalıdır(Kıvançlı, 2011).

Somporn ve arkadaşlarının (2011), çalışmasında *Coffea Arabica* kahve çekirdeklerini farklı derecelerde kavurarak fenolik bileşiklerindeki değişim ve DPPH metodu ile antioksidan aktivitesi incelenmiştir. 230 °C'de 12 dk. kavru lan çekirdekler hafif, 240 °C'de 14 dk. kavru lan çekirdekler orta, 250 °C 17dk. kavru lan çekirdekler koyu olarak tanımlanmıştır. Kavurma derecesindeki artışla beraber, antioksidan aktivitesinde azalış gözlenmiştir. En yüksek antioksidan aktivitesi en az kavru lmüş kahve çekirdeklerinde gözlenmiştir. Hem yeşil hem de kavru lmüş kahvelerde 10 çeşit fenolik asit tanımlanmıştır, en yüksek miktar klorojenik asitte

rastlanmıştır. Sirinjik asit, p-kumarik asit, gallik asit ve sinapik asit, kavurma derecesi yükseldikçe artış göstermiştir. Bu çalışmada hem toplam fenolik hem antioksidan aktivitesi bazında en yüksek sonuçlar yeşil çekirdeklerde, kavurulmuş çekirdek arasında ise hafif kavurulmuş çekirdeklerde gözlenmiştir (Somporn ve diğ., 2011).

Hecimovic ve diğ (2011), çalışmasında 4 farklı kahve çeşidini (Minas, Cioccolato, Cherry ve Vietnam), 3 farklı derecede ( hafif ,orta ve yüksek )kavurarak, polifenolik içeriklerini ve antioksidan kapasiteleri incelenmiştir. Kahveler aşağıdaki tablodaki sıcaklıklarda 10dk kavurulmuştur.

**Çizelge 1.4** : Minas, Cioccolato, Cherry ve Vietnam türü kahve çekirdeklerinin kavurma dereceleri.

Roasting degree	Coffee species			
	Minas	Cioccolato	Vietnam	Cherry
Light roasting (°C)	162	145	168	185
Medium roasting (°C)	181	167	185	195
Dark roasting (°C)	195	195	198	205

Kavrulan çekirdekler öğütüldükten sonra 2gr çekirdek 20 ml saf su ile 100°C'de kaynatılmış. Polifenolik bileşikler (flavan-3-oller, tanninler, proantosiyanidinler), ve antioksidan miktarları UV/V spektrofotometrik olarak belirlenirken, klorojenik asit türevleri ve kafein miktarları HPLC metodu ile analiz edilmiştir. Cherry tip kahve en yüksek toplam fenolik maddeye sahip iken (42.37mg GAE/g) , Minas çeşit kahve en düşük toplam fenolik maddeye sahiptir(33.37 mg GAE/g). Klorojenik asit türevlerinin en yüksek içeriği Minas ve Cioccolato kahvelerde tespit edilirken, Cherry kahvede polifenollerin bireysel sınıflarında en yüksek içerik gözlenmiştir. Genellikle 4 türde de açık ve orta derecede kavurulmuş kahvelerde yüksek kavurulmuşlara göre, toplam fenoliklerinde ve bireysel polifenolik bileşiklerinde daha yüksek sonuçlar elde edilmiştir (Hecimovic ve diğ.,2011).

Castillo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise kavurma derecesinin antioksidan aktivitesi üzerindeki etkisi ABTS metodu ile ölçülmüştür. Bu kez *Colombian Arabica* kahve çekirdekleri kullanılarak hafif(225°C, 3dk), orta (233°C, 3dk)ve koyu (240°C ,3dk) deney grupları oluşturulmuştur. Ancak analizler kahve çekirdekleri



yerine telvesi süzölmüş brewler de yapılmıştır. En yüksek antioksidan aktivitesi orta dereceli kavrulmuş brewlerde rastlanırken, en düşük koyu kavrulmuş brewlerde gözlenmiştir. (Castillo ve diğ, 2002)

Pelin Koseoglu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada farklı solventler (su, heksan, etanol ve aseton) kullanılarak farklı sürelerde (140-160°C’de 12 ,20 ,22 ,25 dk.) kavrulmuş kahve çekirdeklerinin toplam fenolik ve flavonoid miktarları, DPPH, ABTS ve CUPRAC metotları ile antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Su ile ekstrakte edilen kahve çekirdekleri 3 metotla da en yüksek antioksidan aktivitesini göstermiştir. Farklı sürelerde kavruan çekirdekler arasında değışken sonuçlar gözlenmiştir. En yüksek antikolinesteraz aktivite 25 dk. kavruan örneklerde bulunduğundan, 25 dk. kavruan örneklerin kafein miktarı HPLC yöntemi ile incelenmiştir. En yüksek kafein miktarı su ile ekstrakte edilen numunede gözlenmiştir (Köseoğlu ve diğ,2014).

### **1.2.5 Biyoyararlılık**

Biyoyararlılık, bir ilaç içinde bulunan aktif bileşenlerin veya tedavi edici maddelerin emilim hızı ve aktivite göstereceğı bölgedeki yararlılık derecesidir. Bu tanımda bahsi geçen aktif maddeler, gıdalar da bulunan aktif maddeleri de kapsamaktadır. Kısaca, alınan bir besinin, normal fizyolojik fonksiyonlarda kullanılmak ve depolanmak için erişilebilir durumdaki kısmıdır (Capanoglu ve diğ, 2010; Parada ve diğ,2007). Herhangi bir fitokimyasalın biyoyararlılığının değerlendirilmesi için absorpsiyonu, metabolizması, doku ve organlarda dağılımı ve boşaltımı gibi konularda verilere ihtiyaç duyulmaktadır.

2 çeşit biyoyararlılık modeli bulunmaktadır, bunlar in-vivo ve in- vitro modelleridir. In-vivo modelinde hayvanlar ve insanlar üzerinde yapılan bu tür çalışmalar, hem karmaşık ve pahalı olmaları, hem de ahlaki ve etik soruları gündeme getirmeleri nedeniyle tercih edilmemektedir. Biyoyararlılık çalışmalarında karşılaşılan bir diğer problem de emilimin etkinliğı ve alınan besinlerin metabolik kullanımı gibi konuların netlik kazanmamış olmasıdır (Çapanoğlu ve diğ, 2010).

In vitro modeli, hem daha ucuzdur, laboratuvar ekipmanları dışında her hangi bir gereksinime ihtiyaç duyulmamaktadır, hem de kolay uygulanabilmekte ve sonuç alınabilmektedir ancak metodunun hassasiyeti düşüktür (Bouayed ve diğ,2012).

### 1.3 Hipotez

Bu tezin hipotezi, endüstriyel bir atık olan hurma çekirdeğinin ve bu çekirdekten elde edilen farklı derecelerde kavrulmuş kahvelerin kimyasal ve besin değerlerini inceleyerek, gıda sektöründe tercih ve kullanım şeklini arttırmak ve bir atığın geri dönüşümü ile fonksiyonel yeni bir gıda ürünü üzerindeki araştırmaları geliştirmektir.

Bu tezin amacı, hurma çekirdeği ve hurma çekirdeğinden elde edilmiş farklı derecelerde kavrulmuş çekirdeklerin;

- Toplam fenolik madde miktarını ve antioksidan kapasitesini belirlemek
- In vitro sindirim yoluyla toplam fenolik madde miktarlarındaki ve antioksidan aktivitesindeki biyoerişilebilirliğini incelemek

Bu amaçla, toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu (FC) metodu ile, toplam antioksidan aktivitesi serbest radikal yakalama kapasitesi (DPPH) ve Cu(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasitesi (CUPRAC) metodları ile incelenmiştir. Biyoyararlılık analizleri için in-vitro mide bağırsak sindirim modeli kullanılmıştır.

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1 Materyal

#### 2.1.1 Hurma örnekleri

2015 yılı mahsülü Mebrun türü hurmanın, çekirdekleri manuel olarak çıkartılmış ve bu araştırmada ham madde olarak kullanılmıştır. 9 kg hurmadan 500g hurma çekirdeği çıkartılmıştır.



Şekil 2.1: Mebrun türü hurma ve çekirdeği.

#### 2.1.2 Analizlerde kullanılan kimyasallar

Çalışmada sartorius TE2145 marka hassas terazi, Universal 32R marka santrifüj, BioTek marka synergy HT spektrofotometre, Azaklı ultrasonoik banyo, Hevdolph MR3001 marka ısıtıcılı manyetik karıştırıcı, su banyosu, Biohit proline otoatik pipet, IKA MSI marka vorteks, kullanılmıştır. Analizlerde kullanılan gallik asit ( $\geq 98\%$ ), etanol ( $\geq 99.8\%$ ), Folin- Ciocalteu fenol reaktifi, gallik asit, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), neocuproin (Nc), metanol ( $\geq 99.9\%$ ), sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), dipotasyum hidrojen fosfat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), potasyum dihidrojen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), bakır (II) klorür ( $\text{CuCl}_2$ ) ve amonyum asetat ( $\text{NH}_4\text{Ac}$ ), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit (Troloks). In-vitro mide-bağırsak sindirim sistemi analizi için, diyaliz kılıfları. Tüm analizlerde distile su cihazından elde edilen distile su kullanılmıştır (TKA GenPure).

## 2.2 Method

### 2.2.1 Hurma çekirdeklerinin hazırlanması

Hurma örneklerinin çekirdekleri, el ile çıkartılarak yıkanmış daha sonra hearthware precision coffee roaster (Şekil 2.2) yardımıyla sabit sıcaklıkta ( $200^{\circ}\text{C}$ ) 5,10 ve 15 dakika kavrularak öğütülmüştür. Azotlu öğütücüde (Şekil 2.1) öğülen çekirdeklerin bir kısmı analizler için  $-18^{\circ}\text{C}$ 'de ekstraksiyon prosesine kadar muhafaza edilmiş, bir diğer kısmı ise her birinden 2 g alınarak 20 ml saf su içerisinde kaynatılarak demlenmiş ve ardından süzülerek telvesinden ayrılmıştır. (Hecimovic ve diğ, 2011).



**Şekil 2.2:** (a) Hearthware Precision Coffee Roaster, (b) azotlu IKA A11 marka sıvı azotlu öğütücü.



**Şekil 2.3:** 5. 10 ve 15 dk kavrulmuş çekirdeklerdeki renk değişimi.

### 2.2.2 Ekstrakt hazırlama

Antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi ve toplam fenolik madde analizleri için etanol çözgeni seçilmiştir. Alınan her bir örnek homojen bir şekilde öğütülmüş ve 2 g tartılarak, 10 ml %80 etanolde ekstrakte edilmiştir. 10 sn vorteksledikten (IKA MSI) sonra, 15 dakika buz eklenen ultrasonik banyoda (Azakli, Turkey) tutulan örnekler, 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir (Hettich Zentrifugen Universal 320R, Tuttlingen, Germany) . Üst faz yeni bir falkon tüpüne alınırken kalan kalıntıya yeniden 5 ml %80 etanol ilave edilerek işlem tekrarlanmıştır. Toplamda 3 sefer olacak şekilde işlem tüm örnekler için uygulanmış ve yaklaşık 20 ml ekstrakt elde edilmiştir ( Ravichandran ve diğ, 2012).



**Şekil 2.4 :** (a) VWM marka ultrasonik banyo , (b) Universal 32R marka santrifüj.

Örneklerin diğer bir kısmı demleme işlemine tabi tutulmuştur. Geleneksel Türk kahvesi prosesi gibi 2 g alınan toz çekirdekler, 20 ml saf suya eklenerek kaynatılmıştır (Hecimovic ve diğ., 2011). Süzülerek telvesinden ayrılan sıvı kısım, -18<sup>0</sup>C'de dondurulduktan sonra liyofilizasyon yöntemi ile suyundan uzaklaştırılmıştır. (Christ, Alpha 1-2 LD, Germany) Bu işlem örnekler denge nemine ulaşincaya kadar devam etmiştir (24 saat). Petride kalan kısımlar falkona alınarak 10 ml %80 etanolde ekstrakte edilmiştir. Toz çekirdeklere uygulanan proses demlenen kahve örnekleri içinde tekrarlanmış ve ortalama 20 ml ekstrakt elde edilmiştir. Tüm örneklerde analizler 3 tekrarlı yapılmıştır ( Ravichandran ve diğ, 2012).

### 2.2.3 Nem içeriğinin belirlenmesi

Hurma çekirdeğinin nem içeriği liyofilizasyon prosesi yardımıyla belirlenmiştir. Liyofilizasyon; dondurulmuş fazdan (buz) süblimasyon yoluyla suyun uzaklaştırılmasıdır. Bu işlemde, gıda önce dondurulur ve sonra yüksek vakuma maruz bırakılarak çözünme olmadan buzun buharlaşması sağlanır. Çok düşük sıcaklıkta açığa çıkan su buharı kondansatör yüzeyinde yoğunlaştırılır. Belirli miktarda alınan örnekler önceden tartılmış petri kaplarında konular ve tartılır. Tüm örneklerdeki nem içeriği  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de ve 0.010 mbar'da (Christ, Alpha 1-2 LD, Germany) (şekil 2.2) liyofilizasyon işlemi ile uzaklaştırılır ve bu işlem örnekler denge nem içeriğine ulaşana kadar devam eder (24 saat). Liyofilizasyon işleminden sonra, liyofilize edilen örnekleri içeren petri kapları tekrar tartılır. Tüm örneklerde analizler üç tekrarlı yapılmıştır.



Şekil 2.5: Christ, Alpha 1-2 LD liyofilizatör.

### 2.2.4 Toplam fenolik madde (TP) analizi

Toplam fenolik madde analizi yaygın bir metot olan Folin-Ciocalteu yöntemine göre yapılmıştır. Deneyde Toor ve Savage (2006)'in uyguladığı Folin-Ciocalteu metodunda bazı değişiklikler yapılarak fenolik madde tayini yapılmıştır. Standart olarak gallik asit kullanılmıştır. Bu yöntemde uygun oranlarda seyreltilmiş 200  $\mu\text{l}$  ekstrakt çözeltisi ve 1,5 ml Folin-Ciocalteu reaktifi (10 kat seyreltilmiş olarak) karıştırılmıştır. %7.5 (w/v)'lik sodyum karbonat çözeltisinden 1,2 ml eklendikten sonra tüpler vortekste karıştırılmıştır.

$25^{\circ}\text{C}$ 'de karanlık ortamda 90 dakika bekletildikten sonra mikroplate okuyucu ile (şekil 2.3) (Synergy HT, BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) 765 nm'de absorbans ölçülmüştür.

Toplam fenol içeriği gallik asit kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak gallik asit eğdeğeri olarak verilmiştir. Deneyle 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve sonuçların ortalaması alınmıştır. Kalibrasyon eğrisi Ekler A, Şekil A.1’de gösterilmektedir.



**Şekil 2.6:** Synergy HT, BioTek Instruments Inc. Mikroplate okuyucu.

### **2.2.5 Toplam antioksidan kapasitesinin tayini**

Literatüre göre değişik meyve çekirdeğinde başarılı sonuçlar verdiği bilinen bir metot olarak DPPH ve ikinci metot olarak da CUPRAC metodu seçilmiş ve her bir örneğin toplam antioksidan aktivitesi ölçülmüştür. Deneyle 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve sonuçların ortalaması alınarak rapor edilmiştir. Sonuçlar, Troloks eğdeğeri (TE) cinsinden ifade edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi Ekler, Şekil A.2-A.3’ da gösterilmektedir.

#### **2.2.5.1 DPPH (1,1-difenil-2- pikrilhidrazil ) radikal yakalama yöntemi**

Kumaran ve diğ. (2006)’nin uyguladığı metoda göre ekstraktların antioksidan aktivitesi hidrojen bağlama kabiliyeti yani DPPH radikalini yakalama kabiliyetine göre ölçülmüştür. Bu yönteme göre, belli bir konsantrasyon aralığındaki uygun oranda seyreltilmiş örnek ekstraktlarından ve standart madde Trolokstan 100 l alınmış ve üzerine 2 ml 0,1 mM DPPH %100 metanol solüsyonu ilave edildikten sonra vortekste karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 30 dk. bekletildikten sonra, reaksiyon sonucunda oluşan rengin absorbansı, mikroplate okuyucuda 517 nm’de ölçülmüştür.

### **2.2.5.2 CUPRAC (Bakır İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi) metodu**

Apak ve diğ. (2005)'nin uyguladığı metoda göre polifenollerin çözeltide bulunan bakır iyonunu azaltma kabiliyeti ölçülerek toplam antioksidan aktivitesi belirlenmiştir. Bu yöntemle göre uygun oranlarda seyreltilmiş örnekten 100 µl alınarak; 1 ml 10-2 mM Copper (II) chloride çözeltisi, 1 ml  $7.5 \times 10^{-3}$  Neocuproine çözeltisi, 1 ml 1 M amonyum asetat (pH 7) tampon çözeltisi, 1 ml saf su ile karıştırılmış, vortekslelendikten sonra 1 saat orda sıcaklığında karanlıkta bekletilmiştir. Reaksiyon sonucu oluşan rengin absorbans değeri mikropate okuyucuda 450 nm'de ölçülmüştür.

### **2.2.6 In-vitro mide-bağırsak sindirim sistemi metodu**

McDougall ve diğ. (2005) sindirim sistemi metodu birkaç değişiklik yapılarak uygulanmıştır. Metot iki kısımdan oluşmaktadır: Birinci kısım örneklerin başlangıç olarak gastrik koşulları taklit etmek için (37°C'de 2 saat boyunca) mide çözeltisi ile muamele edilmesi, ardından ikinci olarak bağırsak koşullarını taklit etmek için (37°C'de 2 saat boyunca) safra tuzları/ pankreatin çözeltisi ile muamele edilmesidir.

#### **Mide çözeltisinin hazırlanışı:**

1.5 ml pepsin çözeltisi ( 10ml 0,1 M HCl'ün içerisinde 10 mg pepsin çözülerek hazırlanır) 20 ml distile su içerisinde çözüldükten sonra 5 M HCl ile pH 1.7'ye ayarlanmıştır. 5 şer g hurma çekirdeği örnekleri, 250 ml'lik behere tartılmış ardından üzerine 20 ml mide çözeltisi eklenmiştir. Karışım homojen oluncaya dek karıştırılmış ve tekrar pH 1.7'ye ayarlanmıştır. Daha sonra çalkalayıcı su banyosunda (Memmert, Schwabach, Germany) (Şekil 2.4) 2 saat süreyle 100 rpm karıştırma hızıyla 37°C'de bekletildikten sonra 4 ml mide çıkışı olarak kabul edilen PG (Post Gastric) kodu verilen örnekler alınmıştır.

#### **Bağırsak çözeltisinin hazırlanışı:**

Bağırsak ortamını sağlamak için beherdeki numunelere, pankreatin (4 mg/ml) ve safra tuzları (25 mg/ml) (400 mg pankreatin ve 2,5 g safra tuzu 100ml saf suda çözümlenerek hazırlanmıştır) karıştırılarak 4.5 ml ilave edilmiştir.

Diyaliz poşetinin içine 20 ml sodyum bikarbonat(NaHCO<sub>3</sub>) eklenmiş ve iki ucu bağlanarak beherin içine bırakılmıştır. Bağırsak sistemini taklit etmek üzere çalkalayıcı su banyosunda (Memmert, Schwabach, Germany) (Şekil 2.4) 2 saat



süreyle 100 rpm karıştırma hızıyla 37° C’de bekletilmiştir. Diyaliz tüpünün içindeki kısım IN (serum), beherde kalan diyaliz tüpünün dışındaki kısım ise OUT (kolondan ayrılan) olarak ayrılmıştır. 2 saat sonunda hem IN (serum) hem de OUT (kolondan ayrılan) numunelerden 4ml alınarak PG kodlu örneklerle beraber analizlere kadar -18° C’de saklanmıştır.

Ependorf tüplerinde 4°C’de 18000 rpm’de santrifüjlenerak (Hettich Zentrifugen Universal 32R) ayrılan numunelere daha sonra toplam fenolik madde, toplam ve antioksidan aktivitesi analiz yöntemlerinden DPPH ve CUPRAC metodu uygulanmıştır. Deneyle 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve sonuçların ortalaması alınarak rapor edilmiştir. Toplam fenolik madde ve antioksidan aktivitesi analizi kalibrasyon eğrileri Ek A, Şekil A.4, A-5 ve A-6’da gösterilmiştir.



**Şekil 2.7:** Çalkalıyıcılı Su Banyosu Memmert, Schwabach, Germany.

### **2.2.7 İstatistiksel analizler**

Her numune çeşidinin toplam fenolik madde ve antioksidan madde içerikleri "SPSS 22.0" programı ile karşılaştırılmıştır. Varyans analizi (ANOVA) Çizelgesi oluşturulmuş, genel lineer modelleme yapılmıştır ve verilerin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı incelenmiştir. Model anlamlı bulunduğunda, Tukey Karşılaştırma testiyle % 95 önem düzeyinde ikili karşılaştırmalar yapılarak, örnekler arasındaki farklılık incelenmiştir. İstatistik çizelgesi, Ekler B, Çizelge B.1, B-2 , B-3 ve B-4 ’de gösterilmektedir.



### **3. BULGULAR VE TARTIŞMA**

#### **3.1 Nem İçeriği**

Hurma çekirdekleri öğütüldükten sonra petrilere alınıp, net ve brüt ağırlıkları hesaplanmış ve 24 saat liyofilizasyon prosesine tabi tutulup kurutulmuştur. 3 petride yapılan nem ölçümünde 1. numunenin ne miktarı %7, ikinci numunenin ne miktarı %6.8, 3. numunenin ne miktarı %6.6 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar, Al-Farsi ve Lee'nin çalışmasında 11 çeşit hurma türünde değişen nem miktarları ile örtüşmektedir ( %3.1- %9.9) (Al-Farsi ve Lee, 2011).

#### **3.2 Toplam Fenolik Madde Analizi**

Toplam fenolik madde tayini (TF) analizinde, örneklerin toplam fenolik madde miktarı mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/100 g kuru madde olarak verilmiştir. Bu amaçla öncelikle gallik asit kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Gallik asidin etanolik çözeltisi hazırlanmış ve kalibrasyon eğrisinin çizilmesinde 0.005-0.1 mg/ml konsantrasyon aralığındaki gallik asit çözeltisi kullanılmıştır. Gallik asit kalibrasyon eğrisi Ek A, Şekil A.1'de gösterilmiştir. Gallik asit kalibrasyon eğrisi çizildikten sonra örnek konsantrasyonlarının absorbansı bu kalibrasyon eğrisinin içinde okunacak şekilde seyreltilmiştir. Toplam fenolik madde analizi gallik asit kalibrasyon denkleminde yararlanılarak hesaplanmıştır. 3 tekrar yapılmış ve ortalama alınmıştır.

Tüm örneklerin fenolik madde içeriği 100 gram kuru maddede mg GAE olarak belirlenmiştir. Bulunan tüm değerler Çizelge 3.1 gösterilmiştir. İşlem uygulanmış örnekler arasında en yüksek fenolik madde miktarı, hurma çekirdeği unu örneğinde (3616.09 GAE mg/100 g kuru madde) bulunurken, en düşük fenolik madde içeriği 15 dk kavurularak öğütülmüş örnekte (1583.66 GAE mg/100 g kuru madde ) tespit edilmiştir.

Kavurma ile fenolik madde miktarında azalma gözlenmiştir. Brew olarak hazırlanan numunelerde çekirdeklere göre daha düşük fenolik madde analiz edilmiştir. Brewlerde de çekirdeklerdeki gibi en yüksek miktar kavrulmamış hurma çekirdeğinde (635.55 GAE mg/100 g kuru madde ) gözlenirken, en düşük 15 dk kavrulmuş çekirdeğin brewinde (85.08 GAE mg/100 g kuru madde ) gözlenmiştir.

**Çizelge 3.1 :** Çekirdek ve Brewlerin Kuru Madde Üzerinden Toplam Fenolik Madde Miktarları.<sup>1</sup>

Örnekler	Ortalama mg GAE/100g kuru örnek
Ç1	3616,09 ± 15,97 <sup>a</sup>
Ç5	3237,12± 23,64 <sup>b</sup>
Ç10	2080,12± 8,78 <sup>c</sup>
Ç15	1583,66 ± 64,39 <sup>d</sup>
B1	635,55± 6,37 <sup>e</sup>
B5	334,20 ±4,87 <sup>f</sup>
B10	102,39± 0,21 <sup>g</sup>
B15	85,08±2,19 <sup>g</sup>

<sup>1</sup> Veriler, 3 tekrar üzerinden elde edilen numunelerin ortalaması alınarak hesaplanmıştır, ± standart sapmayı temsil etmektedir. Her kavurma derecesi için farklı harfi taşıyan ortalamalar için istatistiksel olarak önemli bir farklılık vardır (P<0.05)

Tukey testi ile kavurma işleminin toplam fenolik bileşikler üzerindeki etkisi incelendiğinde 15 dk kavrulmuş brewler haricindeki gruplar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P<0,05). 15 dk kavrulmuş brewler ise istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Varyans analiz sonuçları ve Tukey testinin detaylı sonuçları EK B Çizelge B.1’de verilmiştir.

Al-Farsi ve diğ erlerinin (2007), 3 farklı hurma türünde yaptığı çalışmada, Mabseli, Um-sellah ve Shahal türü hurmaların toplam fenolik madde miktarlarını incelemiş ve sırası ile şu sonuçları elde etmiştir; 4430 mg GAE /100g, 4293 mg GAE /100g ve 3102 mg GAE/ 100g'dır.

Al-Farsi ve Lee (2008) , çalışmada, sıcaklık, ekstraksiyon süresi ve sayısı, çözgen türlerine göre hurma çekirdeğindeki toplam fenolik madde miktarlarını kıyaslamıştır. Aseton, ethanol, su ve methanolde yapılan çalışmada toplam fenolik madde miktarları 18.10-36.26 g/100g aralığında değ işkenlik göstermiştir. Aseton ve metanol çözgen olarak en yüksek toplam fenolik madde miktarını vermiştir.

Somporn ve diğ erleri (2011) çalışmalarında, kahve çekirdeklerinde kavurma prosesinin toplam fenolik madde miktarı üzerine etkisini ölçmek amacıyla, 230 °C'de 12 dk , 240 °C'de 14 dk ve 250 °C'de 17 dk kavurmuş ve bu sonuçları kavrulmamış kahve çekirdeklerinden elde ettiği sonuçlarla kıyaslamıştır. En yüksek toplam fenolik madde miktarı, 34.32 mg GAE/g ile yeş il kahve çekirdeklerinden elde edilirken sırasıyla 240°C kavrulmuş çekirdeklerden 31.55 mg GAE/g , 250°C kavurulmuş çekirdeklerden 24.98 mg GAE/g, 250°C kavurulmuş çekirdeklerden 22.31 mg GAE /g analiz edilmiştir.

Hecimovic ve diğ erlerinin (2011) çalışmasında 4 farklı tür kahve çekirdeklerinden elde ettiği brewlerin, farklı kavurma derecelerinde (açık, orta ve koyu) toplam fenolik madde miktarlarını yeş il çekirdeklerinininki ile kıyaslanmıştır. Chrrery tip kahve 3 derecede de diğ er türlere göre en yüksek toplam fenolik sonuçlarını vermiştir ( ortalama 42.37 mg GAE/ g), en düşük sonuçlar ise 21.10 mg GAE/g ile Ciocolatato tip kahve çekirdeğ inden elde edilmiştir. Hafif ve orta kavurma koşullarında hazırlanmış kahve çekirdeklerinde, yeş il ve koyu kavurulmuşlardan daha yüksek toplam fenolik madde miktarı analiz edilmiştir.

Benzer gözlemler Baggenstoss ve arkadaşlarının (2008) çalışmasında da gözlenmiştir. Termal proseslerin, toplam fenolik asitler üzerinde, hem olumsuz hem olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir. Roy ve diğ . (2007) ve Chan ve diğ . (2009)'nin çalışmalarında, sebzelerin toplam fenolik madde miktarlarında ısıl işleme beraber azalma gözlemlendiği bildirilmiştir.

Hücresel bileşenlerin ısı ile işleme beraber parçalanmasıyla daha bağlı fenolik asitler meydana gelebileceği gibi hücre duvarı tarafından bitkilerdeki antioksidanları yok edebilecek oksidatif ve hidrolitik enzimler de salınabilir(Chism ve Haard, 1996).

Yılmaz ve diğerlerinin (2014) çalışmasında aynı çeşit kahve türünde 4 farklı çözüge kullanılarak, farklı kavurma derecelerinde toplam fenolik madde miktarı analiz edilmiştir. 140-160°C'de 12, 20, 22 ve 25 dk kavrulup, hekzan, aseton ve ethanolle ekstrakte edilmiş ve toplam fenolik madde miktarları kendi aralarında kıyaslanmıştır. Elde edilen sonuçlarda toplam fenolik madde içeriğinin kavurma derecesinden düzensiz olarak etkilendiği gözlenmiştir. Çözgenler arasında ise en yüksek sonuç hekzanla ekstrakte edilen kahve çekirdeklerinden elde edilmiştir.

### **3.3 Toplam Antioksidan Aktivite Analizleri**

Antioksidan aktivite analizleri, farklı bitki materyallerini veya onlardan elde edilen ürünleri karakterize etmek amacıyla çoğu kez başka metotlarla beraber kullanılırlar. Buna rağmen, antioksidan analizlerinin, dokulardaki tüm kullanılabilir antioksidanları analizleme kabiliyetine sahip değildir ve mevcut antioksidan metotlarının birbirlerine göre bir çok avantaj ve dezavantaj gösterebilirler. Metotların prensipleri, oluşan radikale veya reaksiyon süresine göre oldukça farklılık göstermektedir. Hatta DPPH ve ABTS gibi aynı prensip ile işleyen metotlar bile farklı tipteki antioksidanlara karşı farklı sonuçlar verebilmektedirler. Ayrıca radikal oluşum reaksiyonları veya farklı çözgen sistemlerdeki radikallerin çözünürlükleri de her metot için farklılık göstermektedir (Çapanoğlu, 2008).

Bitkisel gıdalarda tek metotla antioksidan aktivitesi ölçümü, bitkinin sahip olduğu fitokimyasalların karmaşık ve kompleks yapıları sebebiyle hatalı sonuçlar verebilmektedir. Bu sebeple, örneklerin toplam antioksidan kapasiteleri 2 farklı metot ile ölçülmüştür ve sonuçlar kuru madde olarak ifade edilmiş olup kavurulmuş, kavurılmamış ve brew örnekleri arasındaki değişim gösterilmektedir. DPPH ve CUPRAC metotları kullanılmıştır.

### 3.3.1 DPPH radikal yakalama metodu

DPPH radikal yakalama analizinde örneklerin toplam antioksidan aktivitesi troloks eşdeğeri olarak verilmiştir. Bu amaçla öncelikle troloks kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Troloks metanolik çözeltisi hazırlanmış ve kalibrasyon eğrisinin çizilmesinde 0.01-0.2 mg/ml konsantrasyon aralığındaki troloks çözeltisi kullanılmıştır. Troloks kalibrasyon eğrisi EK A , Şekil A.2’de gösterilmiştir. Analiz sonuçlarına göre toplam antioksidan aktivitesi, troloks kalibrasyon denkleminde yararlanılarak hesaplanmıştır. Analizler 3 tekrarlı olarak yapılmış ve sonuçların ortalaması alınmıştır.

Tüm örneklerin toplam antioksidan aktivitesi gram ekstraktta mg Troloks olarak belirlenmiştir. Çekirdekler arasında en yüksek toplam antioksidan kapasitesi kavrulmamış çekirdeklerde bulunurken (10315.06 mg Troloks/ 100 g), en düşük antioksidan kapasitesi 15 dk. kavrulmuş çekirdeklerde bulunmaktadır (3858.26 mg Troloks/ 100 g). Brew örneklerinde de en yüksek sonuç yine kavrulmamış çekirdeklerden (5131,56 mg Troloks/ 100 g), en düşük sonuç ise 15 dk. kavrulmuş çekirdeklerden (40,27 mg Troloks/ 100 g) elde edilmiştir. Hem çekirdek örneklerinde, hem de çekirdeklerden elde edilen brewlerde kavurma derecesi arttıkça toplam antioksidan kapasitesinin düştüğü gözlenmiştir. Tüm analiz sonuçları Çizelge 3.2’de verilmiştir. Kavurma işlemleri gruplarının,DPPH metodu ile antioksidan aktivitesi üzerine etkisi istatistiksel olarak incelendiğinde önemli ölçüde farklı olduğu tespit edilmiştir. Yalnız 15 dk kavrulmuş brewlerin antioksidan aktivitesi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Varyans analiz sonuçları ve Tukey testinin detaylı sonuçları EK B’de Çizelge B.1’de verilmiştir.

Al-Farsi ve diğerlerinin (2007), 3 farklı hurma türünde yaptığı çalışmada, Mabseli, Um-sellah ve Shahal türü hurmaların antioksidan aktivitesi ORAC yöntemi ile incelemiş ve sırası ile şu ortalamalar elde etmiştir; 580 µmol TEAC / g kuru madde, 903 µmol TEAC/ g kuru madde ve 929 µmol TEAC/ g kuru maddedir. Şekil 3.2’deki sonuçlar, mg TEAC/ g kuru madde üzerinden verilmiştir. Sonuçlar, µmol TEAC / g kuru maddeye çevrildiğinde kavrulmamış ve kavrulmuş çekirdek ve brewlerin değerleri sırası ile şöyledir; 412.6 µmol TEAC/ g kuru madde, 213.72 µmol TEAC/ g kuru madde, 196.08 µmol TEAC/ g kuru madde, 156.78 µmol TEAC/ g kuru madde, 205.24 µmol TEAC/ g kuru madde, 14.25 µmol TEAC/ g kuru madde, 3.45 µmol

TEAC/ g kuru madde, 1.61  $\mu$ mol TEAC/ g kuru maddedir. Mebrun türü kullandığımız hurma çekirdeğinin DPPH metodu ile hesaplanan antioksidan aktivitesi Mabseli, Umsellah ve Shahal türlerine göre daha düşüktür.

**Çizelge 3.2:** Çekirdek ve Brewlerin Kuru Madde Üzerinden DPPH metodu ile Antioksidan aktiviteleri.<sup>1</sup>

Örnekler	Ortalama mg TROLOX/100g kuru örnek
Ç1	10315.06 $\pm$ 120.14 <sup>a</sup>
Ç5	5343.04 $\pm$ 32.21 <sup>b</sup>
Ç10	4902.52 $\pm$ 45.58 <sup>d</sup>
Ç15	3858.26 $\pm$ 40.80 <sup>e</sup>
B1	5131.56 $\pm$ 51.84 <sup>c</sup>
B5	356.12 $\pm$ 26.62 <sup>f</sup>
B10	86.52 $\pm$ 2.38 <sup>g</sup>
B15	40.27 $\pm$ 0.92 <sup>g</sup>

<sup>1</sup> Veriler, 3 tekrar üzerinden elde edilen numunelerin ortalaması alınarak hesaplanmıştır,  $\pm$  standart sapmayı temsil etmektedir. Her kavurma derecesi için farklı harfi taşıyan ortalamalar için istatistiksel olarak önemli bir farklılık vardır (P<0.05)

Al-Farsi ve Lee (2008) , çalışmada, sıcaklık, ekstraksiyon süresi ve sayısı, çözen tülerine göre hurma çekirdeğindeki antioksidan aktivitesi ABTS metodu kullanılarak kıyaslamıştır . Aseton, ethanol, su ve methanolde yapılan çalışmada antioksidan aktibitesi 1.88- 1.01 g TEAC /100g aralığında değişkenlik göstermiştir.

Somporn ve diğerleri (2011) çalışmalarında, kahve çekirdeklerinde kavurma prosesinin antioksidan aktivitesi üzerine etkisini ölçmek amacıyla, 230 °C’de 12 dk , 240 °C’de 14 dk ve 250 °C’de 17 dk kavurmuş ve bu sonuçları kavrulmamış kahve çekirdeklerinden elde ettiği sonuçlarla kıyaslamıştır. Antioksidan analizi için DPPH metodunu kullanmıştır.



Sonuçlar, sırasıyla şu şekilde bulunmuştur; açık kavrulmamış (%92.63) > kavrulmuş (%92.52) > orta kavrulmuş (%88.87) > koyu kavrulmuş (%86.98). İstatistiksel olarak açık ve kavrulmamış çekirdek arasındaki farklılık ile koyu ve orta dereceli kavrulmuş çekirdekler arasındaki farklılık önemsiz bulunmuştur. Catillo ve diğ. (2002)'nin çalışmasına göre ise, Colombian Arabica kahve çekirdeklerinin antioksidan aktivite sonuçlarında en yüksek değer orta dereceli kavurmada elde edilirken (233 °C, 3dk.) , en düşük değer koyu kavrulmuşlardan elde edilmiştir (240 °C, 3 dk.) .

Hecimovic ve diğerlerinin (2011) çalışmasında 4 farklı tür kahve çekirdeklerinden elde ettiği brewlerin, farklı kavurma derecelerinde (açık, orta ve koyu) antioksidan aktivitesini FRAP ve ABTS metodlarını kullanarak, yeşil çekirdeklerinki ile kıyaslanmıştır. ABTS metodunun sonuçları incelendiğinde herangi bir düzenlilik tespit edilememiştir. Vietnam türünde en yüksek sonucu açık dereceli kavrulmuş çekirdekler verirken, Cherry türünde orta dereceli kavrulmuş çekirdekler, Cioccolato türünde koyu dereceli kavrulmuş çekirdekler en yüksek sonucu vermiştir. Ayrıca, yeşil kahvelerin, kavrulmuş olanlarla ilişkileri göz önüne alındığında, yoğunlaştırılmış kavurma derecesinin olumsuz etkisi fark edilebilir. Her ne kadar istatistiksel olarak , farklı kavurma derecelerinin antioksidan kapasiteleri üzerindeki etkisi anlamlı düzeyde olmasada , antioksidan kapasitesindeki dalgalanma yüksek sıcaklıklarda uzun süre kavurmanın antioksidan kapasite üzerinde azalmaya neden olduğunu göstermektedir. FRAP metodu, ABTS'nin aksine her türde düzenli olarak açık kavrulmuşlar da yüksek sonuç vermiştir. Yoğun kavurma derecesi antioksidan aktivitesini olumsuz etkilemiştir.

### **3.3.2 CUPRAC (bakır indirgeyici antioksidan kapasitesi) metodu**

Polifenollerin bakır iyonunu azaltma kabiliyetine dayanarak toplam antioksidan aktivitesini belirlemeye yarayan bu yöntemde toplam antioksidan aktivitesi troloks eşdeğeri olarak verilmiştir. Bu amaçla öncelikle troloks kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Troloksun metanolik çözeltisi hazırlanmış ve kalibrasyon eğrisinin çizilmesinde 0.01-0.8mg/ml konsantrasyon aralığındaki rutin çözeltisi kullanılmıştır. Troloks kalibrasyon eğrisi EK A, Şekil A.3'de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.3:** Çekirdek ve Brewlerin Kuru Madde Üzerinden CUPRAC metodu ile Antioksidan aktiviteleri.<sup>1</sup>

Örnekler	Ortalama mg TROLOX/100g kuru örnek
Ç1	18514.19 ± 258.38 <sup>a</sup>
Ç5	9189.92 ± 29.55 <sup>b</sup>
Ç10	6275.11 ± 67.73 <sup>c</sup>
Ç15	3919.60 ± 75.70 <sup>d</sup>
B1	2313.62 ± 59.35 <sup>e</sup>
B5	945.71 ± 21.83 <sup>f</sup>
B10	336.60 ± 27.04 <sup>g</sup>
B15	247.80 ± 15.21 <sup>g</sup>

<sup>1</sup> Veriler, 3 tekrar üzerinden elde edilen numunelerin ortalaması alınarak hesaplanmıştır, ± standart sapmayı temsil etmektedir. Her kavurma derecesi için farklı harfi taşıyan ortalamalar için istatistiksel olarak önemli bir farklılık vardır (P<0.05)

Örneklerin CUPRAC analizi sonuçları troloks kalibrasyon denkleminde yararlanılarak hesaplanmıştır. 3 tekrar yapılmış ve sonuçların ortalaması alınmıştır. Yapılan CUPRAC analizi sonucunda tüm örneklerin toplam antioksidan aktivitesi 100 gram ekstrakta mg Troloks olarak belirlenmiştir. Çekirdekler arasında en yüksek toplam antioksidan kapasitesi kavrulmamış çekirdeklerde bulunurken (18514.19 mg Troloxs/ 100 g), en düşük antioksidan kapasitesi 15 dk. kavrulmuş çekirdeklerde bulunmaktadır (3858.29 mg Troloxs/ 100 g). Brew örneklerinde de en yüksek sonuç yine kavrulmamış çekirdeklerden (2313.62 mg Troloxs/ 100 g), en düşük sonuç ise 15 dk. kavrulmuş çekirdeklerden (247.80 mg Troloxs/ 100 g) elde edilmiştir. Hem çekirdek örneklerinde, hem de çekirdeklerden elde edilen brewlerde kavurma derecesi arttıkça toplam antioksidan kapasitesinin düştüğü gözlenmiştir. Tüm analiz sonuçları Çizelge 3.3 verilmiştir.

Kavrma işlemleri gruplarının, CUPRAC metodu ile antioksidan aktivitesi üzerine etkisi istatistiksel olarak incelendiğinde önemli ölçüde farklı olduğu tespit edilmiştir. Yalnız 15 dk kavrulmuş brewlerin antioksidan aktivitesi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Varyans analiz sonuçları ve Tukey testinin detaylı sonuçları EK B’de Çizelge B.1’de verilmiştir.

Literature incelemelerinde hurma çekirdeğindeki antioksidan aktivitesiyle ilgili farklı yöntemlerle yapılan sonuçlardan daha önce bahsettik ancak CUPRAC metodu ile hurma çekirdeğindeki antioksidan aktivitesi üzerine her hangi bir çalışmaya rastlanmadı. Ancak bir çok yazarın bildirdiği üzere, DPPH metodu CUPRAC ve diğer antioksidan analiz metodlarıyla kıyaslandığında daha düşük sonuçlar vermektedir. Benzer şekilde, Yılmaz ve diğerlerinin (2014) çalışmasında aynı çeşit kahve türünde 4 farklı çözgen kullanılarak, farklı kavurma derecelerinde antioksidan aktiviteleri DPPH ve CUPRAC metodları ile analiz edilmiştir. CUPRAC metodu ile elde edilen sonuçlar DPPH metodu ile elde edilen sonuçların ortalama 4 katı daha yüksek hesaplanmıştır.

### 3.4 Korelasyon Katsayıları

Doğrusal korelasyon katsayıları toplam fenolik ve toplam antioksidan analizlerine göre hesaplanmıştır. Bu sonuçlar Çizelge 3.4’de gösterilmiştir. En yüksek korelasyonu toplam fenolik ve antioksidan analizleri arasından CUPRAC göstermiştir. ( TF – CUPRAC  $R^2= 0.927$ ) En düşük korelasyon ise toplam fenolik ile antioksidan analizlerinden DPPH arasında gözlenmiştir. ( TF – DPPH  $R^2= 0.874$ ) Antioksidan analizleri arasındaki korelasyon ise DPPH- CUPRAC  $R^2= 0.918$  olarak saptanmıştır.

**Çizelge 3.4 :** Toplam fenolik ve toplam antioksidan kapasiteleri (DPPH, CUPRAC) arasındaki korelasyon ( $R^2$ ) sonuçları.

	<b>TF</b>	<b>DPPH</b>	<b>CUPRAC</b>
<b>TF</b>	1	-	-
<b>DPPH</b>	0.874**	1	-
<b>CUPRAC</b>	0.927**	0.918**	1

\*\* Önem düzeyi 0,01

### 3.5 In-vitro Mide-Bağırsak (GI) Sindirim Sistemi

Mide-bağırsak sisteminin taklit edilmesi sonucunda PG, IN, OUT fraksiyonları elde edilerek; toplam fenolik madde ve antioksidan kapasitesi (DPPH, CUPRAC) analizleri her bir fraksiyona uygulanmıştır. Sonuçlar Çizelge 3.5-3.7’de gösterilmektedir. Şekillerdeki “Başlangıç” değeri sindirim öncesini, “PG (Post-gastric) mide çıkışını, “IN” ince bağırsağa geçen kısmı, “OUT” kolona geçen kısmı ifade etmektedir. Her cinsin % geri kazanım değerleri toplam fenolik madde ve antioksidan kapasitesi analizleri sonuçlarına göre IN değerinin başlangıç değerine oranlanması ile hesaplanmıştır ( $\text{Gerikazanım}(\%) = (\text{PG, IN, OUT} / \text{Başlangıç}) \times 100$ ).

#### 3.5.1 Mide-Bağırsak (GI) sindirimi sonrası toplam fenolik madde analizi

Mide- Bağırsak (GI) sindirimi sonrası PG, IN ve OUT fraksiyonlarından elde edilen örneklerin toplam fenolik madde miktarı mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/100 g kuru madde olarak hesaplanmıştır. Bu amaçla öncelikle gallik asit kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Gallik asidin etanolik çözeltisi hazırlanmış ve kalibrasyon eğrisinin çizilmesinde 0.005-0.1 mg/ml konsantrasyon aralığındaki gallik asit çözeltisi kullanılmıştır. Gallik asit kalibrasyon eğrisi Ek A, Şekil A.4’de gösterilmiştir. Gallik asit kalibrasyon eğrisi çizildikten sonra örnek konsantrasyonlarının absorbansı bu kalibrasyon eğrisinin içinde okunacak şekilde seyreltilmiştir. Toplam fenolik madde analizi gallik asit kalibrasyon denkleminde yararlanılarak hesaplanmıştır. 3 tekrar yapılmış (15 dk. Kavru lan çekirdeklerden 2 tekrar yapılmıştır) ve ortalama alınmıştır.

**Çizelge 3.5 :** In vitro mide-bağırsak sindirim sistemi sonrasında çekirdeklerin toplam. fenolik madde miktarında meydana gelen değişimler.<sup>1</sup>

Örnekler	Başlangıç	PG	IN	OUT
Ç1	36.16±0.16	5.20±0.25 <sup>a</sup>	1.25±0.05 <sup>a</sup>	4.19±0.03 <sup>a</sup>
Ç5	32.37±0.24	4.40±0.08 <sup>b</sup>	1.03±0.19 <sup>ab</sup>	3.69±0.37 <sup>a</sup>
Ç10	20.80±0.09	3.18±0.13 <sup>c</sup>	0.67±0.19 <sup>b</sup>	2.0±0.38 <sup>b</sup>
Ç15	15.83±0.64	2.68±0.09 <sup>d</sup>	0.67±0.02 <sup>b</sup>	2.07±0.16 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Veriler, 3 tekrar üzerinden elde edilen numunelerin ortalaması alınarak hesaplanmıştır ve mg GAE/g kuru madde olarak ifade edilmiştir, ± standart sapmayı temsil etmektedir. Her kavurma derecesi için farklı harfi taşıyan ortalamalar için istatistiksel olarak önemli bir farklılık vardır ( $P < 0.05$ )

Toplam fenolik madde analizinin geri kazanım (%) sonuçları başlangıç değerleri 100 kabul edilerek hesaplanmıştır, buna göre geri kazanım sonuçları şu şekildedir; PG fraksiyonları için; öğütülmemiş çekirdekler ve 5,10,15 dk kavrulmuş çekirdekler için sırasıyla %14.39, %13.61, %15.27, %16.93, IN fraksiyonları için; öğütülmemiş çekirdekler ve 5,10,15 dk kavrulmuş çekirdekler için sırasıyla %3.46 , %3.18, %3.23, %4.21 , OUT farksiyonları için; öğütülmemiş çekirdekler ve 5,10,15 dk kavrulmuş çekirdekler için sırasıyla %11.50, %11.38, %9.62, %13.08 olarak bulunmuştur (Çizelge 3.6).

Genellikle, PG farksiyonlarının toplam fenolik içeriği IN ve OUT değerlerinden daha yüksek bulunmuştur. Bunun sebebi ise, mide ortamının asitliği polifenolik bileşikleri dengeler ve stabilize eder. Mide ortamının aksine, ince bağırsağın orta derecede alkali özellik gösteren pH'sı, bir çok fenolik asitin parçalanmasına sebep olmaktadır (Tagliazucchi ve diğ., 2010). Polifenoller, mide-bağırsak sindirimi sırasında, karbonhidratlar, yağlar veya lifler gibi diğer gıda bileşikleriyle etkileşime girerek biyolojik erişilebilirliklerinde artma veya azalma meydana gelebilir. (Palafox-Carlos ve diğ.,2011).

Çizelge 3.5'de görüldüğü üzere, toplam fenolik miktarları literatürle uyumlu olarak, en yüksek sonuca PG fraksiyonunda rastlanırken, en düşük sonuç IN fraksiyonunda gözlenmiştir (Liang ve diğ., 2012; Tagliazucchi ve diğ., 2010) .

**Çizelge 3.6 :** PG, IN, OUT fraksiyonları için toplam fenolik madde miktarında % geri kazanım.

Örnekler	Başlangıç	PG	IN	OUT
Ç1	100	14.39	3.46	11.50
Ç5	100	13.61	3.18	11.38
Ç10	100	15.27	3.23	9.62
Ç15	100	16.93	4.21	13.08

### 3.5.2 Mide-Bağırsak (GI) sindirimi sonrası toplam antioksidan aktivitesi analizleri

Mide- Bağırsak (GI) sindirimi sonrası PG, IN ve OUT fraksiyonlarından elde edilen örneklerin antioksidan kapasitesi DPPH ve CUPRAC metodları ile mg TROLOKS eşdeğeri (TEAC)/100 g kuru madde olarak hesaplanmıştır. Bu amaçla öncelikle troloks kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Troloksun etanolik çözeltisi hazırlanmış ve kalibrasyon eğrisinin çizilmesinde 0.01-0.2 mg/ml konsantrasyon aralığındaki toloks çözeltisi kullanılmıştır. Troloks kalibrasyon eğrisi Ek A, Şekil A.5’de gösterilmiştir. Troloks kalibrasyon eğrisi çizildikten sonra örnek konsantrasyonlarının absorbansı bu kalibrasyon eğrisinin içinde okunacak şekilde seyreltilmiştir. 3 tekrar yapılmış (15 dk. Kavru lan çekirdeklerden 2 tekrar yapılmıştır) ve ortalama alınmıştır.

**Çizelge 3.7 :** In vitro mide-bağırsak sindirim sistemi sonrasında çekirdeklerin DPPH metodu ile antioksidan aktivitesinde meydana gelen değişimler.<sup>1</sup>

Örnekler	Başlangıç	PG	IN	OUT
Ç1	103.15±1.20	2.26±0.20 <sup>a</sup>	0.42±0.12 <sup>a</sup>	1.52±0.11 <sup>a</sup>
Ç5	53.43±0.32	1.46±0.13 <sup>b</sup>	0.25±0.01 <sup>a</sup>	1.25±0.16 <sup>a</sup>
Ç10	49.03±0.46	0.68±0.09 <sup>c</sup>	0.05±0.02 <sup>b</sup>	0.65±0.24 <sup>b</sup>
Ç15	39.19±0.41	2.70±0.22 <sup>c</sup>	0.02±0.02 <sup>b</sup>	0.62±0.03 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Veriler, 3 tekrar üzerinden elde edilen numunelerin ortalaması alınarak hesaplanmıştır, ± standart sapmayı temsil etmektedir. Her kavurma derecesi için farklı harfi taşıyan ortalamalar için istatistiksel olarak önemli bir farklılık vardır (P<0.05)

DPPH metoduna göre antioksidan aktivite analizinin başlangıç verileri %100 kabul edilerek hesaplanmış geri kazanım (%) sonuçları; PG fraksiyonları için; öğütülmemiş çekirdekler ve 5,10,15 dk kavrulmuş çekirdekler için sırasıyla %2.19, % 2.74, %1.43 , %1.79 ,IN fraksiyonları için; öğütülmemiş çekirdekler ve 5,10,15 dk kavrulmuş çekirdekler için sırasıyla %0.40 , %0.46 , %0.11 , %0.04 ,OUT fraksiyonları için; öğütülmemiş çekirdekler ve 5,10,15 dk kavrulmuş çekirdekler için sırasıyla % 1.48, %2.34, % 1.32, % 3,92 olarak bulunmuştur (Çizelge 3.8).

Daha önce bahsettiğimiz üzere bir çok çalışma, DPPH metodunun, diğer antioksidan metodlarına göre daha düşük sonuç verdiğini bildirmiştir. Biyoyararlılık DPPH

sonuçları da diğer antioksidan metodlarına göre daha düşük sonuç vermiştir. Hem CUPRAC hem de DPPH metodunda en yüksek sonuç literatüre uygun olarak PG fraksiyonunda ardından OUT ve IN fraksiyonlarında gözlenmiştir.

**Çizelge 3.8 :** PG, IN, OUT fraksiyonları için DPPH metodu ile antioksidan aktivite miktarında % geri kazanım.

Örnekler	Başlangıç	PG	IN	OUT
Ç1	100	2.19	0.40	1.48
Ç5	100	2.74	0.46	2.34
Ç10	100	1.43	0.11	1.32
Ç15	100	1.79	0.04	1.57

Antioksidan analizleri için kullanılan ikinci method CUPRAC metodudur. DPPH metodunda olduğu gibi, öncelikle troloks kalibrasyon eğrisi çizilmiş, troloksun etanolik çözeltisi hazırlanmış ve kalibrasyon eğrisinin çizilmesinde 0.01-0.2 mg/ml konsantrasyon aralığındaki troloks çözeltisi kullanılmıştır. Troloks kalibrasyon eğrisi Ek A, Şekil A.6'da gösterilmiştir. Troloks kalibrasyon eğrisi çizildikten sonra örnek konsantrasyonlarının absorbansı bu kalibrasyon eğrisinin içinde okunacak şekilde seyreltilmiştir. Örnekler mg TROLOKS eşdeğeri (TEAC)/100 g kuru madde olarak hesaplanmıştır. 3 tekrar yapılmış (15 dk. Kavrulan çekirdeklerden 2 tekrar yapılmıştır) ve ortalama alınmıştır.

**Çizelge 3.9 :** In vitro mide-bağırsak sindirim sistemi sonrasında çekirdeklerin CUPRAC metodu ile antioksidan aktivitesinde meydana gelen değişimler<sup>1</sup>

Örnekler	Başlangıç	PG	IN	OUT
Ç1	185.14±2.58	8.96±0.21 <sup>a</sup>	1.67±0.11 <sup>a</sup>	6.95±0.44 <sup>a</sup>
Ç5	91.89±0.29	8.25±0.40 <sup>a</sup>	1.42±0.12 <sup>b</sup>	6.07±0.76 <sup>b</sup>
Ç10	62.75±0.68	6.19±0.06 <sup>b</sup>	1.13±0.02 <sup>d</sup>	2.60±0.51 <sup>d</sup>
Ç15	38.58±0.76	5.29±0.12 <sup>c</sup>	1.37±0.07 <sup>c</sup>	3.32±0.23 <sup>c</sup>

<sup>1</sup>Veriler, 3 tekrar üzerinden elde edilen numunelerin ortalaması alınarak hesaplanmıştır, ± standart sapmayı temsil etmektedir. Her kavurma derecesi için farklı harfi taşıyan ortalamalar için istatistiksel olarak önemli bir farklılık vardır (P<0.05)

**Çizelge 3.10** : PG, IN, OUT fraksiyonları için CUPRAC metodu ile antioksidan aktivite miktarında % geri kazanım

Örnekler	Başlangıç	PG	IN	OUT
Ç1	100	4.84	0.90	3.75
Ç5	100	4.46	1.54	6.61
Ç10	100	3.34	1.81	4.15
Ç15	100	2.86	3.55	8.61

CUPRAC metoduna göre antikoksidan aktivite analizinin geri kazanım (%) sonuçları; PG fraksiyonları için; öğütülmemiş çekirdekler ve 5,10,15 dk kavrulmuş çekirdekler için sırasıyla %4.84 , % 4.46 , % 3.34 , %2.86 ,IN fraksiyonları için; öğütülmemiş çekirdekler ve 5,10,15 dk kavrulmuş çekirdekler için sırasıyla %0.90 , %1.54 , %1.81 , %3.55 ,OUT farksiyonları için; öğütülmemiş çekirdekler ve 5,10,15 dk kavrulmuş çekirdekler için sırasıyla %3.75, %6.61, %4.15, % 8.61 olarak bulunmuştur (Çizelge 3.10).



#### 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hurma üretildiği coğrafya dışında tüm dünyada bolca tüketilen ve çeşitli endüstriyel ürünlerin üretimi için ham madde teşkil eden bir meyvedir. Bu açıdan bakıldığında, hurma çekirdeği ucuz maliyetli, yüksek lif yapısına ve antioksidan kapasitesine sahip bir endüstriyel atık olarak dikkat çekmektedir. İkinci olarak bu çalışmada, bir endüstriyel atık olan hurma çekirdeğinde kavurma prosesi etkisi incelenmiştir. Sabit sıcaklıkta (200 °C) 3 farklı sürede kavru lan hurma çekirdeklerinin (5dk, 10dk, 15 dk), kavurmadan öğütülmüş çekirdeklerin ve bunlardan elde edilen brewlerin toplam fenolik madde ve antioksidan bileşenleri üzerindeki etki incelenmiştir.

Her bir numune için toplam fenolik madde içeriği karşılaştırıldığında, kavurmadan öğütülmüş çekirdek unundan en yüksek sonuç elde edilmiştir. Bu sonucu, 5dk kavrulmuş çekirdek ve 10 dk kavrulmuş çekirdek takip etmiştir. En düşük toplam fenolik madde miktarını 15 dk kavrulmuş çekirdeklerde gözlenmiş. Brew olarak hazırlanan numuneler içinde benzer sonuçlar elde edilmiş ve kavurma prosesi arttıkça, toplam fenolik madde miktarları azalma görülmüştür. 15 dk kavrulmuş çekirdek dışında, kavurma dereceleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli düzeyde bulunmuştur.

Toplam antioksidan aktivitesi analizleri için 2 farklı metod kullanılmıştır (DPPH, CUPRAC). Sonuçlar incelendiği zaman; her iki yöntemle de kavurma işlemi ile antioksidan aktivitesinde azalış tespit edilmiştir. Benzer şekilde, çekirdeklerden elde edilen demlenmiş kahvelerde toplam fenolik miktarda ve toplam antioksidan aktivitesi sonuçlarında azalma gözlenmiştir. Metodlar arasında istatistiksel olarak farklılık önemli bulunmuştur. CUPRAC metodu ile elde edilen sonuçlar literatüre uygun olarak DPPH metoduyla elde edilen sonuçlardan daha yüksek bulunmuştur.

Kavrulmuş ve kavurulmamış hurma çekirdekleri örneklerinde bulunan toplam fenolik madde ve antioksidan aktivitenin biyoyararlılığı in vitro sindirim metodu kullanılarak mide ve ince bağırsak sindirimi fizyokimyasal ve biyokimyasal anatomi simüle

edilerek incelenmiştir. İnsan ve hayvan gibi organizmalarda yapılan araştırmalar karmaşıklık, pahalılık ve etik sebeplerden dolayı tercih edilmemektedir. Diğer yandan, in-vitro metodu labaratuvar ortamında hızlı ve basit yöntem sunarak, değerlendirme olanağı sağlamaktadır. PG, IN, OUT fraksiyonları elde edilerek; toplam fenolik madde ve toplam antioksidan kapasitesi (DPPH ve CUPRAC) analizleri her bir fraksiyona uygulanmıştır. “Başlangıç” değerı sindirim öncesini, “PG (Post-gastric) mide çıkışını, “IN” ince bağırsağa geçen kısmı, “OUT” kolona geçen kısmı ifade etmektedir. Her cinsin % geri kazanım değerleri toplam fenolik madde ve toplam antioksidan kapasitesi analizleri sonuçlarına göre hesaplanmıştır. Genellikle, PG farksiyonlarının toplam fenolik içeriği ve antioksidan kapasiteleri, IN ve OUT değerlerinden daha yüksek bulunmuştur. Bunun sebebi ise, mide ortamının asitliği polifenolik bileşikleri dengelemesi ve stabilize etmesidir. Ayrıca OUT fraksiyonundaki sonuçlar, IN fraksiyonundan yüksek bulunmuştur.

Bu çalışmanın sonucunda, hurma çekirdeği antioksidan aktivitesi ve toplam fenolik madde içeriği bakımından yüksek değerlere sahip olduğu görülmüştür. Bu bağlamda hurma çekirdeği gibi bir atığın potansiyel antioksidan kaynağı olarak geri dönüştürülmesi ve potansiyel gıda kaktı maddesi kaynağı olarak düşünülebilir. Buna rağmen, kavurma prosesinin çekirdeğin fenolik ve antioksidanları üzerinde azalmaya sebep olduğu gözlenmiştir. Çekirdeğin bu özelikleri göz önüne alınarak doğru şekillerde değerlendirilmesi sağlanabilir. Kahve olarak tüketildiğinde antioksidan ve fenolik özelliklerinde azalma gözlenen çekirdekler, ğtlerek un olarak tüketilebilir veya bu alanda çalışmalar yürütülerek farklı bir bakış açısı geliştirilebilir.

## KAYNAKLAR

- Acar, J., Gökmen, V.** (2007). Fenolik Bileşikler ve Doğal Renk Maddeleri. Gıda Kimyası. (Saldamlı, İ., -Ed.) Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 463-492. Ankara.
- Akkuş, I.** (1995). Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, Konya.
- Al Farsi, M., Alasalvar, C., Morris, A., Baron, M., and Shahidi, F.** (2005). Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, and phenolics of three native fresh and sun-dried date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties grown in Oman. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 7586–7599.
- Al-Farsi, M., Alasalvar, C., Al-Abid, M., Al-Shoaily, K., Al-Amry, M., & Al-Rawahy, F.** (2007). Compositional and functional characteristics of dates, syrups, and their by-products. *Food Chemistry*, **104**, 943-947.
- Al-Farsi, M. A., Lee C. Y.,** (2008). Nutritional and functional properties of dates: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **48**:877–887.
- Al-Farsi, M., Lee, C.Y.** (2011). Usage of Date (*Phoenix dactylifera* L.) Seeds in Human Health and Animal Feed. *Nuts & Seeds in Health and Disease Prevention*, **53**, 447-452.
- Al-Hooti, S., Sidhu, J. S., Qabazard, H.** (1998). Chemical composition of seeds date fruit cultivars of United Arab Emirates. *Journal of Food Science and Technology*, **35**, 44-46.
- Al-Shabib, W., Marshall, R.J.** (2003). The Date Palm the Possible Use as The Best Food for The Future. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **54**:4, 247-2
- Ali-Mohamed, A. Y., & Khamis, A. S. H.** (2004). Mineral ion content of seeds of six cultivars of Bahraini date palm (*Phoenix dactylifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 6522-6525.
- Amer, W.M.** (1994). Taxonomic and Documentary Study of Food Plants in Ancient Egypt. Cairo University, 12-44.
- Anonymous,** (2013). Food and Agricultural Commodities Production. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.
- Baggenstoss, J., Poisson, L., Kaegi, R., Perren, R. & Escher, F.** (2008). Coffee roasting and aroma formation: application of different time - temperature conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 5836–5846.

- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S.** (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191-203.
- Baliga, M. S., Baliga, B. R. V., Kandathil, S. M., Bhat, H. P., Vayalil, P. K.** (2011). A review of the chemistry and pharmacology of the date fruits (*Phoenix dactylifera* L.). *Food Research International* 44 1812–1822.
- Belitz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P.** (2004). Chapter 22-Spices, Salt and Vinegar. *Food Chemistry*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 970-985.
- Benmeddour, Z., Mehinagic, E., Meurlay, D. L., Louaileche, H.** (2013). Phenolic composition and antioxidant capacities of ten Algerian date (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars: A comparative study. *Journal of Functional Foods* 5 346-354.
- Besbes, S., Blecken, C., Deroanne, C., Dirra, N. E., Attia, H.,** (2004). Date seeds: chemical composition and characteristic profiles of the lipid fraction. *Food Chemistry* **84**, 577–584.
- Bissenbaev, A. K., Altybaeva, N. A. and Kolbaeva, G. A.,** (2007). Role of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in hormone regulating programmed cell death of wheat aleurone layer, *Journal of Cell and Molecular Biology*, **6**, (1), 41-48.
- Bouayed, J., Deußer, H., Hoffmann, L., & Bohn, T.** (2012). Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following *in vitro* digestion vs. their native patterns. *Food Chemistry*, 131(4), 1466-1472.
- Bouaziz, M. A., Besbes, S., Blecker, C., Wathelet, B., Deroanne, C., & Attia, H.** (2008). Protein and amino acid profiles of Tunisian Deglet Nour and Allig date palm fruit seeds. *Fruits*, **63**, 37-43.
- Bozbuga, R., Hazir, A.,** (2008). Pests of the palm (*Palmae* sp.) and date palm (*Phoenix dactylifera*) determined in Turkey and evaluation of red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus* Olivier) (Coleoptera:Curculionidae). *OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **38**, 127–130.
- Bravo, L.** (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56 (11), 317-333.
- Capanoğlu, E.,** (2008). Changes in antioxidant profiles, metabolites and enzymes during development of tomato fruit and tomato paste processing, PhD Thesis, Istanbul Technical University, İstanbul.
- Capanoglu, E., Beekwilder, J., Boyacioglu, D., De Vos, R.C.H. and Hall, R.D.** (2010). The effect of industrial food processing on potentially health-beneficial tomato antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50, 919-930.
- Castillo, M.D., Ames, M.J., Gordon, M.H.**(2002). Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3698-3703

- Chan, E.W.C., Lim, Y.Y., Wong, S.K., Lim, K.K., Tan, F.S. & Lianto, M.Y.** (2009). Effect of different drying methods on the antioxidant properties of leaves and tea of ginger species. *Food chemistry*, **113**, 892–895.
- Chism, G.W., Haard, N.F.**, (1996). Characteristics of edible plant tissues. In: *Food Chemistry* (edited by O.R. Fennema), 3rd edn, Pp. 943–1011. New York: Dekker.
- Duke, J. A., Bogenschutz-Godwin, M., Cellier, M. J., Duke, P. K.** (2002). *Handbook of Medicinal Herbs*. Second Edition. CRC PRESS. Boca Raton London New York Washington, D.C. p:245.
- El-Arem, A., Behija, S. E., Beligh, M., Lamia, L., Manel, I., Mohamed, H. and Lotfi A.** (2012). Effects of the ripening stage on phenolic profile, phytochemical composition and antioxidant activity of date palm fruit. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **60**, 10896–10902.
- Escarpa, A. and Gonzalez, M. C.**, (2001). An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods, critical reviews in analytical chemistry, **31**, (2), 57-139.
- Halliwell, B., Gutteridge, M.C.** (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Third Edition, Oxford University Pres. Inc., New York, 936.
- Hasnaoui, A., Elhoumaizi, M. A., Asehrou, A., Sindic, M., Deroanne, C., Hakkou, A.** (2010). Chemical composition and microbial quality of dates grown in Figuig Oasis of Morocco. *International Journal of Agriculture and Biology* **12**: 311-314.
- Hecimovic, I., Belcak-Cvitanovic, A., Horzic, D., Komes, D.** (2011). Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting, *Food Chemistry*, **129**, 991-1000.
- Irtem, F.**, (2013). Erzurum piyasasında satılan başlıca hurma (*phoenix dactylifera* L.) çeşitlerinin kimyasal, fiziksel ve mikrobiyolojik özellikleri, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum
- Jaganath, I.B., Crozier, A.** (2010). Dietary Flavanoids and Phenolic Compounds. In: *Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry Nutrition, and Pharmacology*. (Fraga, C.G., -Ed.).A John Wiley & Sons, Inc.. Publication, 1- 49 p, New Jersey.
- Kılınç, K.** (1986) . Oxygen radicals: Their production, function and toxic effects. *Biyokimya Dergisi*, **9**(3): 59-76
- Kıvançlı, J.** (2011). Türk Kahvesinin karakteristik lezzetinin GS/MS ve lezzet profili analizi tekniği ile belirlenmesi. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi.
- Köseoğlu, P.Y., Hacıbekiroğlu, I., Kolak, U.**(2014). Effect of roasting on antioxidant and anticholinesterase capacities of coffee. *Journal of Food and Nutrition Research*, **53**, 232–239.
- Liu, R. H.**, (2003).Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals, *Am. J. Clin. Nutr.*, **78**, 517–520.

- Liu, R.H.** (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action, *The Journal of Nutrition*, 134, 3479-3485.
- Luthria, D. L.** (2006). Significance of sample preparation in developing analytical methodologies for accurate estimation of bioactive compounds in functional foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2266-2272.
- Madhavi, D. L., Deshpande, S. S. and Salunkhe, D. K.,** (1996). Food antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives, pp. 41-50, Marcel Dekker, Newyork.
- Mates, J. M.** (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology, *Toxicology*, 153, 83–104.
- Naczk, M., Shahidi, F.** (2004). Extarction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054, 95-111.
- Nehdi I., Omri S., Khalil M.I., Al-Resayes S.I.,** (2010). Characteristics and chemical composition of date palm (*Phoenix canariensis*) seeds and seed oil. *Industrial Crops and Products*, 32 ,360–365
- Parada, J. and Aguilera, J.M.** (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients, *Journal of Food Science*, 72, 21-32.
- Palafox-Carlos, H., Ayala-Zavala, J. F., & Ganzalez-Aguilar, J. A.** (2011). The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science*, 76, R6–R15.
- Ravichandran, K., Abdelrahman, R.A., Knorr, D., Smetanska, I.** (2012). The effect of different processing methods on phenolic acid content and antioxidant activity of red beet. *Food Research International*, 48, 16–20.
- Robinson, M. L., Brown, B., Williams, C. F.,** (2012). The date palm in Southern Nevada. University of Nevada Cooperative extension. SP 02-12.
- Roy, M.K., Takenaka, M., Isob, E.S. & Tsushida, T.** (2007). Antioxidant potential, antiproliferative, and phenolic content in water – soluble fractions of some commonly consumed vegetables: effect of thermal treatment. *Food Chemistry*, 103, 106–114.
- Saafi, E. B., El-Arem, A., Issaoui, M., Hammami, M. and Achour, L.** (2009). Phenolic content and antioxidant activity of four date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruit varieties grown in Tunisia. *International Journal of Food Science and Technology* 44, 2314–2319.
- Shahidi, F. and Naczk, M.** (1995). *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications*, Technomic Publishing, Lancaster, PA.
- Shahidi, F. and Naczk, M.** (2004). Phenolic Compounds in Fruits and Vegetables, in *Phenolics in Food and Nutraceuticals*, pp. 12-47, Eds. Shahidi, F. and Naczk, M., CRC Press LLC, Boca Raton.

- Somporn, C., Kamtuo, A., Theerakulpisut, P., Siriamornpun, S.** (2011). Effects of roasting degree on radical scavenging activity, phenolics and volatile compounds of Arabica coffee beans (*Coffea arabica* L. cv. Catimor). *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 2287-2296
- Southorn, P.A., Powis, O.** (1988). Free radical in medicine I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc.*, 63(4):381-389.
- Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A.** (2010). In vitro bioaccessibility and antioxidant activity of grape berries polyphenols. *Food Chemistry*, 120, 599–606.
- Tsao, R. and Yang, R.**, (2003). Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1018, 29–40.
- Waterhouse, A.L.** (2002). Wine phenolics. *Ann. N. Y. Acad Sci.*, 957, 21-26.
- Young IS, Woodside JV.** (2001). Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, 54: 176-186.
- Zaid, A.** (1999). Date palm cultivation. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Plant Production and Protection. 156, 74-106.
- Zaid, A.** (2002). Date palm cultivation. FAO Plant Production and Protection Paper 156, Rome, Italy.



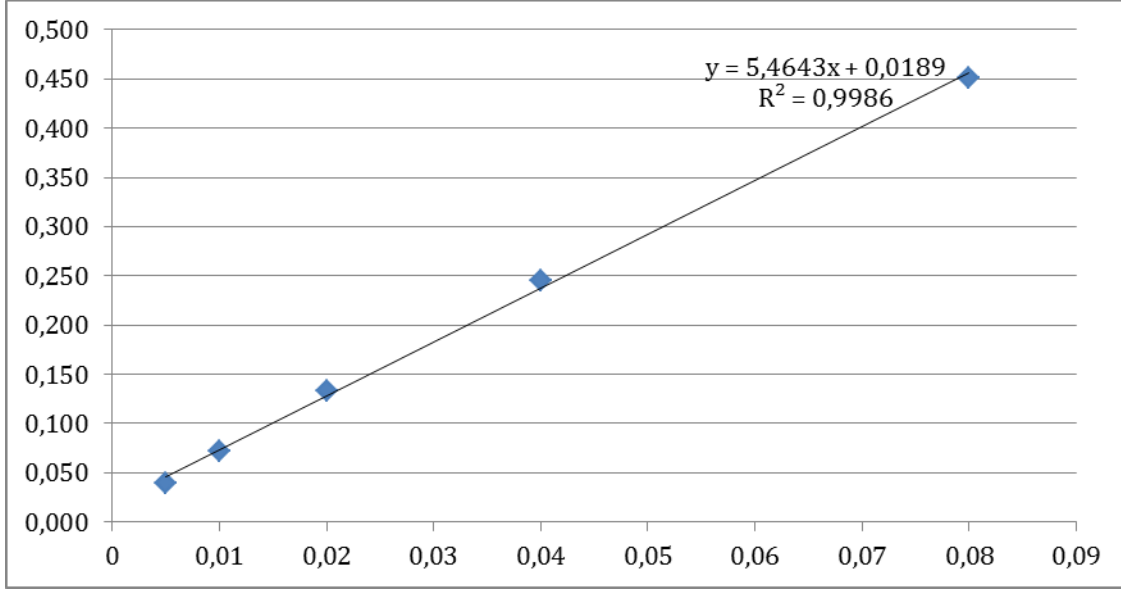


## **EKLER**

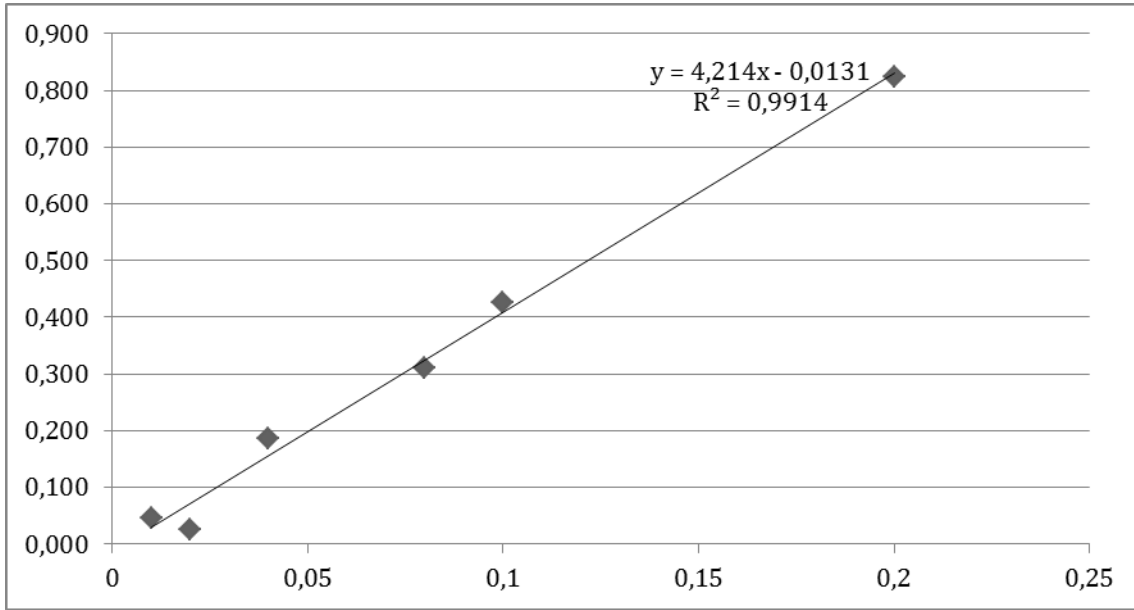
**EK A: KALİBRASYON EĞRİLERİ**

**EK B: ANOVA TABLOLARI**

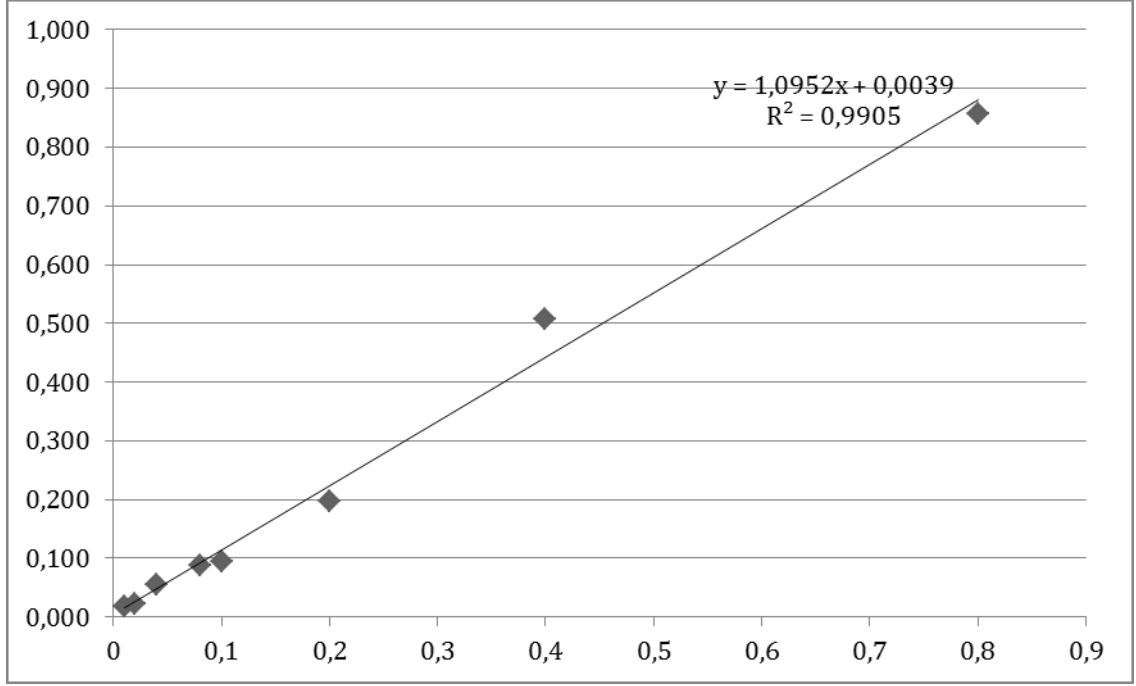
## EK A: KALİBRASYON EĞRİLERİ



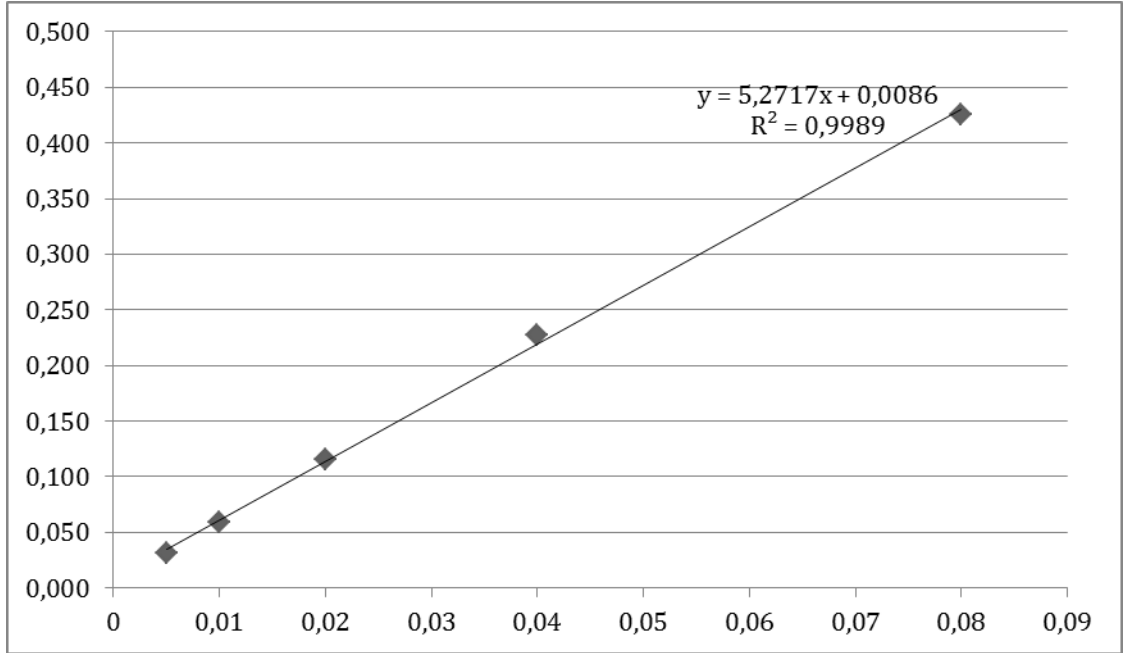
Şekil A.1: %80'lik su-etanol'deki toplam fenolik madde kalibrasyon eğrisi.



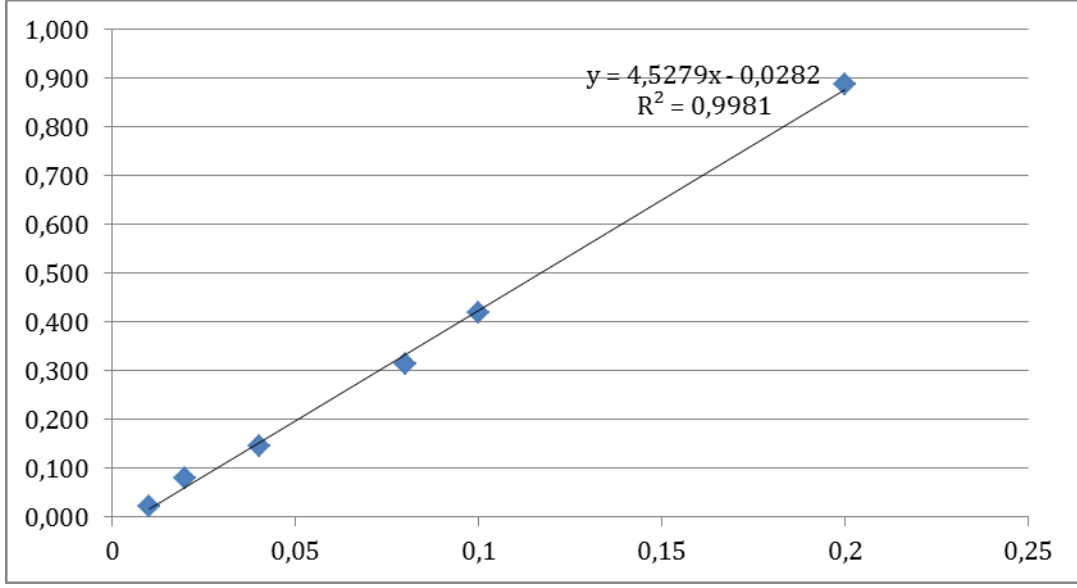
Şekil A.2: %80'lik su-etanol'deki DPPH kalibrasyon eğrisi.



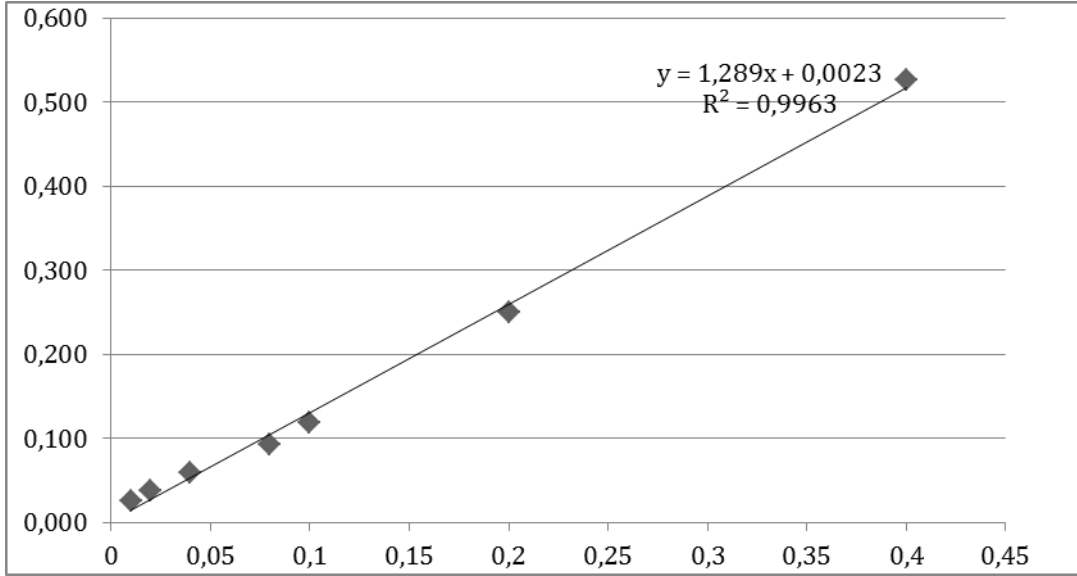
Şekil A.3: %80'lik su-etanol'deki CUPRAC kalibrasyon eğrisi.



Şekil A.4: %80'lik su-etanol'deki toplam fenolik madde kalibrasyon eğrisi (IN-OUT ve PG fraksiyonları için).



**Şekil A.5:** %80'lik su-etanol'deki DPPH kalibrasyon eğrisi(IN-OUT ve PG fraksiyonları için).



**Şekil A.6:** %80'lik su-etanol'deki CUPRAC kalibrasyon eğrisi(IN-OUT ve PG fraksiyonları için).

## EK B: ANOVA TABLOLARI

**Çizelge B.1:** Başlangıç örneklerine ait istatistiksel sonuçlar.

### ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Folin	Between Groups	4167,436	7	595,348	9191,606	,000
	Within Groups	1,036	16	,065		
	Total	4168,472	23			
DPPH	Between Groups	26281,746	7	3754,535	13268,471	,000
	Within Groups	4,527	16	,283		
	Total	26286,273	23			
CUPRAC	Between Groups	81226,299	7	11603,757	11175,188	,000
	Within Groups	16,614	16	1,038		
	Total	81242,912	23			

**Çizelge B.2:** Folin-Ciocalteu analizi için IN, OUT ve PG fraksiyonlarına ait istatistiksel sonuçlar.

### ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
PG	Between Groups	64,437	3	21,479	133,294	,000
	Within Groups	1,128	7	,161		
	Total	65,565	10			
OUT	Between Groups	63,322	3	21,107	31,447	,000
	Within Groups	4,698	7	,671		
	Total	68,020	10			
IN	Between Groups	4,234	3	1,411	10,713	,005
	Within Groups	,922	7	,132		
	Total	5,156	10			

**Çizelge B.3:** DPPH analizi için IN, OUT ve PG fraksiyonlarına ait istatistiksel sonuçlar.

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
PG	Between Groups	29,554	3	9,851	60,943	,000
	Within Groups	1,132	7	,162		
	Total	30,685	10			
OUT	Between Groups	10,365	3	3,455	19,570	,001
	Within Groups	1,236	7	,177		
	Total	11,600	10			
IN	Between Groups	1,757	3	,586	22,186	,001
	Within Groups	,185	7	,026		
	Total	1,941	10			

**Çizelge B.4:** CUPRAC analizi için IN, OUT ve PG fraksiyonlarına ait istatistiksel sonuçlar.

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
PG	Between Groups	142,319	3	47,440	122,321	,000
	Within Groups	2,715	7	,388		
	Total	145,034	10			
OUT	Between Groups	234,500	3	78,167	41,672	,000
	Within Groups	13,130	7	1,876		
	Total	247,630	10			
IN	Between Groups	2,659	3	,886	17,215	,001
	Within Groups	,360	7	,051		
	Total	3,019	10			

## ÖZGEÇMİŞ



**Ad Soyad** : Hatice Merve KILIÇ

**Doğum Yeri ve Tarihi** : Üsküdar 14.10.1988

**E-Posta** : haticemervekilic@gmail.com

### ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2011, ODTÜ, Mühendislik Fakültesi, Gıda Müh.
- **Yükseklisans** : 2015, ITU, Gıda Müh.

### MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- (2015-halen) Türk Standartları Enstitüsü – Uzman Yardımcısı
- (2011-2013) NAMET gıda san. ve tic. a.ş – Kalite ve Ar-ge departmanı - AR-GE Sorumlusu
- (07/08 2010) Ülker Pendik Nişasta Sanayii İstanbul- Kalite Kontrol Bölümü – Stajyer
- (08/09 2009) İstanbul Halk Ekmek(Kartal Cevizli Fabrikası)- Üretim Bölümü - Stajyer

