



Araştırma/Research

Anadolu Tarım Bilim. Derg./Anadolu J Agr Sci, 36 (2021)
ISSN: 1308-8750 (Print) 1308-8769 (Online)
doi: 10.7161/omuanajas.751354

Bazı Ceviz (*Juglans regia* L.) Çeşitlerinin Antioksidant Aktiviteleri ve Fenolik Madde İçeriklerinin Belirlenmesi

●Ersin Gülsoy^{a*}, ●Elif Duygu Kaya^b, ●Ayşe Türkhan^c

^a Iğdır Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Iğdır

^b Iğdır Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Iğdır

^c Iğdır Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Kimya ve Kimyasal İşleme Teknolojileri Bölümü, Iğdır

*Sorumlu yazar/corresponding author: ersin.gulsoy@igdir.edu.tr

Geliş/Received 11/06/2020

Kabul/Accepted 12/10/2020

ÖZET

Bu çalışmada Türkiye orijinli dört ceviz çeşidinden (Şebin, Bilecik, Kaman, Yalova-3) alınan meyvelerin fenolik madde içerikleri, antioksidan ve serbest radikal giderme aktiviteleri araştırılmıştır. Meyvelerdeki toplam fenolik madde miktarı 7.16-13.95 mg GAE g⁻¹ arasında ve toplam flavonoid madde miktarı 0.73-1.11 mgQE g⁻¹ arasında belirlenmiştir. Hem fenolik hem de flavonoid maddenin en yüksek miktarı Yalova-3 çeşidinde tespit edilmiştir. Ceviz meyvelerinin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi amacıyla DPPH, (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil), ABTS•+ (2,2'-azino-bis (3-etil benziyoazolin -6-sülfonik asit) ve CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) olmak üzere üç yöntem kullanılmıştır. Çeşitlerin serbest radikali süpürme aktiviteleri DPPH yönteminde %28.35-39.44, ABTS•+ yönteminde %63.63-87.38 olarak tespit edilmiştir. Kuprik iyonlarını (Cu²⁺) indirgeme kapasitesi CUPRAC yöntemi ile 2.26-2.94 mMolTR g⁻¹ arasında bulunmuştur. Meyve örneklerinin HPLC ile yapılan içerik analizlerinde bileşik olarak gallik asit, kateşin, kafeik asit, p-kumarik asit, trans ferulik asit ve orto-kumarik asit tespit edilmiştir. Tüm analizlerde ceviz çeşitleri arasındaki fark istatistiki olarak çok önemli bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler:
Ceviz
Juglans.regia L
Fenolik Bileşik
DPPH
ABTS•+
CUPRAC

Determination of Antioxidant Activities and Phenolic Content of Some Walnut (*Juglans regia* L.) Cultivars

ABSTRACT

In this study phenolic contents of the four walnut cultivars (Şebin, Bilecik, Kaman, Yalova-3) originated from Turkey, antioxidant and radical scavenging activity was investigated. Total phenolic content has been determined 7.16-13.95 mg GAE g⁻¹ and total flavonoid content between 0.73-1.11 mgQE g⁻¹ in walnut varieties. The highest amount of both phenolic and flavonoid content were in the highest Yalova-3 cultivar. In order to determine the antioxidant activity of walnut fruit DPPH, (1,1-diphenyl-2-picril-hydrazyl), ABTS•+ (2,2'-azino-bis (3-ethyl benzthioazoline -6-sulfonic acid) and CUPRAC(cupric ion reducing antioxidant capacity) methods were used. Free radical sweeping activities of walnut varieties were determined as 28.35-39.44% by DPPH method and 63.63-87.38% by ABTS method. The capacity to reduce cupric ions (Cu²⁺) was found between 2.26-2.94 mMolTR g⁻¹ by CUPRAC method. In the analysis of walnut samples by HPLC, gallic acid, catechin, caffeic acid, p-coumaric acid, trans ferrulic acid and o-coumaric acid compounds were determined. In all analyzes the difference was found statistically very important between walnut varieties.

Keywords:
Walnut
Juglans.regia L
Phenolic Compound
DPPH
ABTS•+
CUPRAC

1. Giriş

Ceviz bir insanın sağlıklı beslenmesi için gerekli olan temel gıdalardan yağları, özellikle linoleik asit ve Omega 3 gibi doymamış yağ asitlerini bol miktarda içeren, protein ve mineraller bakımından zengin bir meyvedir (Şen, 2015; Chatrabnous ve ark., 2018). Bununla birlikte antioksidan etkiye sahip melatonin, elajik asit, E vitamini, karotenoidler ve polifenoller gibi fitokimyasal maddeleri de içermektedir (Şen, 2011; Carey ve ark., 2012). İçeriğindeki fitokimyasal maddelerden E vitamininin serbest radikallerin sebep olduğu oksidatif stres ve iltihaplanmayı azalttığı (Şen ve Karadeniz, 2015) ayrıca yaşlanma, kanser, Parkinson ve Alzheimer gibi dejeneratif hastalıkların gelişimini erteleyebilme ve azaltabilme fonksiyonlarına sahip olduğu çalışmalarla ortaya konulmuştur (Sen, 2011; Carey ve ark., 2012). Bununla birlikte içeriğindeki polifenollerin kardiyovasküler sistem (Estruch ve ark. 2013), metabolik sendrom (Murase ve ark. 2011), diyabet (Li ve ark., 2011) ve enflamasyonla ilişkili çeşitli patolojik hastalıklara (Konstantinidou ve ark., 2010) karşı birçok faydasının olduğu da bildirilmiştir. Ceviz özellikle içerdiği besleyici yağ asitleri, zengin besin içeriği ve sağlığa olan faydaları nedeniyle son yıllarda diyet programlarında önemli bir yer bulmuştur (Şahin, 2005; Vinson ve ark.2011).

Antioksidanlar, vücutta üretilen veya gıdalardan sağlanan ve hücre hasarlarını önleyen bileşiklerdir. Serbest radikalleri temizler ve oksidasyonun neden olduğu hasarı azaltırlar (Lee ve ark.,2004). Ayrıca DNA mutasyonu, proteinlerin çapraz bağlanması ve yağların peroksidasyonu gibi serbest radikallerin neden olduğu hasarları inhibe ederler (Pereira ve ark., 2008). Ceviz diğer sert kabuklu meyve türlerine göre daha yüksek antioksidan aktivitesine sahiptir (Yin ve ark., 2015; Bi ve ark., 2016). Bu aktivite özellikle cevizin iç meyve zarında bulunan polifenollerden E vitamini, melatonin ve bitki bileşiklerinden kaynaklanmaktadır (Haddad ve ark., 2014). Sağlıklı yetişkinler üzerinde yapılan bir çalışmada ceviz yemenin, damar sertliğine yol açan, kötü kolesterolden (LDL) kaynaklanan hasar da dahil olmak üzere insan vücudundaki oksidatif hasarla savaşmaya yardımcı olabilecek mükemmel bir antioksidan kaynağı olduğunu göstermiştir (González ve ark., 2017).

Her hangi bir örneğin antioksidan kapasitesi belirlenirken sadece tek bir yöntemle tespit yapılması antioksidan maddelerin moleküler çeşitliliği etkisinden dolayı, kullanılan yöntemler arasında doğrusal ilişki oluşmasına engel olabilir. Bu sebeple bir örneğin antioksidan kapasitesinin tayininde tek bir yöntem kullanılması, kapasite hakkında doğru karar vermede yeterli olmayabilir (Halliwell, 1994; Gülçin, 2012). Bu yüzden bu çalışmada antioksidan aktivite miktarı tayininde 3 yöntemden (DPPH• , ABTS•+ve CUPRAC) yararlanılmıştır.

Bu çalışmada Türkiye’de yetiştiriciliği yapılan 4 ceviz çeşidinin (Şebin, Bilecik, Kaman, Yalova-3) meyvelerinin antioksidan ve radikal giderme aktivitelerini belirlemek amacı ile toplam fenolik bileşik miktar tayini, toplam flavonoid miktarı tayini, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil serbest radikal (DPPH•) giderme aktivitesi, 2,2’-azino-bis(3-etilbenztiyoazolin-6-sülfonik asit) radikal (ABTS•+) giderme aktivitesi ve kuprik iyonlarını (Cu²⁺) indirgeme kapasitesi(CUPRAC) araştırılmıştır. Modifiye atmosfer ve ışınlama (tek veya diğer yöntemlerle birlikte) gibi pek çok alternatif uygulama üzerinde çalışmalar yapılmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Bitkisel materyalin temin edilmesi ve ekstaksiyonu

Bu çalışmanın materyalini 2018 yılı vejetasyon döneminde Diyarbakır İline bağlı Hani ilçesinde yer alan bir üreticinin bahçesinden temin edilen 4 ceviz çeşidi oluşturmuştur. Tohum anacı üzerine aşılı Şebin, Bilecik, Kaman ve Yalova-3 çeşitleriyle kurulan ceviz bahçesine ağaçlar 7x7 metre mesafeyle dikilmiş ve bahçe 2013 yılında tesis edilmiştir. 5-6 yaşında olan ağaçlarda her yıl düzenli olarak kültürel ve bakım işleri yapılmıştır. 3 tekerrürlü olarak kurulan çalışmada her bir ağaçtan 15 adet meyve örneği alınmıştır.

Alınan meyve örnekleri yeşil kabuklarından ayrıldıktan sonra normal oda sıcaklığında gölgede 1 hafta süreyle kurumaya bırakılmıştır.

Kurutulmuş olan meyve örneklerinde nem oranının birörnek olabilmesi için 30 °C’ye ayarlı etüvde 24 saat süreyle bekletilmişlerdir. Kurutulan meyve örnekleri, analizler yapılmaya kadar -20°C’de 3 ay derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

Analizlerde kullanılmak üzere alınan ceviz meyveleri sert kabuğundan ayrılmış ve 1 g iç meyve örneği tartılarak porselen havanda iyice öğütülmüş ve 1:50 oranında %80 etanol- su karışımı içine alınmıştır. Örnekler oda sıcaklığında çalkalayıcıda 1 saat ekstrakte edildikten sonra 4°C’de 10000 rpm’de 20 dakika santrifüjlenmiş ve ardından 110 mm filtre kâğıdından süzülerek kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan Folin Ciocalteu Reaktifi, gallik asit, querchetin, DPPH•(1,1-difenil-2-pikril-hidrazil), ABTS•+ (2,2’-azino-bis (3-etilbenztiyoazolin-6-sülfonik asit), neocuproin, sodyum asetat (CH₃COONa.3H₂O), potasyum persülfat (K₂S₂O₈), etanol, metanol ve diğer kimyasallar Sigma- Aldrich ve Merck firmalarından temin edilmiştir.

2.2. DPPH' serbest radikal giderme aktivitesi tayini

DPPH' (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) serbest radikali yakalama aktivitesi tayini Brand-Williams ve ark., (1995) metodunun modifiye edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Bu metotta, kararlı, sentetik ve mor renkli bir radikal olan DPPH' kullanılmıştır. Antioksidanların DPPH' radikalini indirgeme yeteneklerinin ölçülmesiyle antioksidan aktivite tanımlanmıştır (Pokorny ve ark., 2001).

Bu yöntemde ceviz ekstraktları 0.2 mg mL⁻¹ konsantrasyonunda seyreltilmiştir. 300 µL DPPH çözeltisi X µL extract ve (2700-X) µL metanol bir tüp içerisinde karıştırılmış ve 30 dakika süreyle karanlıkta bekletilmiştir. Absorbans köre karşı 517nm'de spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Kõr olarak metanol kullanılmıştır. %DPPH radikal giderme aktivitesi aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır.

DPPH' radikal süpürme kapasitesi (%)=(Akontrol – Aörnek) x 100 / Akontrol

Aörnek: örneğin absorbansı,

Akontrol: kontrolün absorbansı

2.3. ABTS'+ radikal katyon yakalama aktivitesi tayini

ABTS'+ radikal katyon yakalama aktivitesi tayini Özgen ve ark., (2006) metoduna göre belirlenmiştir. Bu metotta 2.45 mmol potasyum persülfat içeren 7 mM'lık ABTS'+ çözeltisi hazırlanmıştır. Çözelti oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda 12-16 saat süreyle radikal oluşumu için bekletilmiştir. Koyu mavi renkli bu çözelti, 20 mM sodyum asetat (pH:4.5) çözeltisi ile absorbansı 734 nm'de 0.7±0.01nm olana kadar seyreltilmiştir. Kuvet içindeki radikal çözelti üzerine ceviz ekstraktlarından eklenerek süre başlatılmış ve 6.dakika sonunda absorbans değerinde meydana gelen azalma 734 nm'deki okuma ile ölçülmüştür. ABTS'+ radikal miktarındaki azalma % olarak aşağıdaki formül yardımı ile hesaplanmıştır

ABTS'+ radikal süpürme kapasitesi (%)=Akontrol – Aörnek) x 100 / Akontrol

Aörnek: örneğin absorbansı,

Akontrol: kontrolün absorbansı

2.4. Kuprak (Cubrac) analizi

CUPRAC analizi Apak ve ark., (2004) 'in metoduna göre yapılmıştır. Bu metoda göre 1 ml CuCl2 çözeltisi, 1 ml neokuprin çözeltisi ve 1 ml amonyum asetat tamponu (pH:7.0) deney tüpünde karıştırılmış ve üzerine tayini yapılacak antioksidan çözelti eklenmiştir. Son hacim saf su ile 4.1 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra tüp 30 dakika boyunca karanlık bir yerde saklanmıştır. Yarım saatlik bir inkübasyondan sonra 450 nm'de absorbansları kaydedilmiştir.

2.5. Toplam fenolik bileşik tayini

Fenolik madde tayini Singleton ve Rossi (1965) tarafından uygulanan Folin-Ciocalteu metoduna göre yapılmıştır. Bu yöntemde göre 250 µl Folin Ciocalteu reaktifi ve 50 µl ekstrakt çözeltisi tüpe eklendikten sonra toplam hacim 3ml'ye saf suyla tamamlanmıştır. 5 dk'lık inkübasyon sonrasında 750 µl %20 (w/v) Na2CO3 çözeltisi eklenmiş ve tüpler vortekste karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında karanlık ortamda 90 dk bekletildikten sonra spektrofotometrede 765 nm de absorbans ölçülmüştür. Toplam fenol içeriği oluşturulan gallik asit standart eğrisinden yararlanılarak gallik asite eşdeğer olarak verilmiştir. Bu amaçla 1 mg ml⁻¹ gallik asit çözeltisi kullanılmıştır. Ceviz ekstraksiyonlarının fenolik bileşik içerik analizi HPLC cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

2.6. Toplam flavanoid tayini

Toplam flavanoid madde miktarı analizi Vital ve ark., (2017) metoduna göre yapılmıştır. İlk olarak 50 g L⁻¹'lik AlCl3 çözeltisi hazırlanmıştır. Ceviz örneklerinden elde edilen ekstraktan 300 µl alınmış, 150 µl AlCl3 çözeltisi ve 2550 µl metanol ile karıştırılmış, elde edilen ekstrakt-AlCl3-metanol karışımı, oda sıcaklığında 30 dk süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Karışım küvetlere alınmış ve spektrofotometrede 425 nm'de okuma yapılmıştır. Kontrol olarak örnek yerine %80 etanol kullanılmıştır. Standart olarak quercetin (0.01-0.2 mg ml⁻¹) kullanılmış olup, sonuçlar quercetin eşdeğeri (QE) olarak verilmiştir.

2.7. İstatistiksel analiz

Çalışma tesadüf blokları deneme deseninde 4 çeşit üzerinde 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 3 ağaç olacak şekilde kurulmuştur. Verilerin aritmetik ortalamaları ile standart hataları hesaplanmıştır. Elde edilen veriler SPSS 17.0

istatistik paket programında tek yönlü varyans analizi uygulanarak (ANOVA) değerlendirilmiş ve ortalamalar arasındaki farkın önemliliği DUNCAN (%5) testi ile kontrol edilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı

Ceviz çeşitlerine ait meyve örneklerinde toplam fenolik madde miktarları 7.16-13.95 mg GAE g⁻¹ arasında değişim göstermiştir. Çeşitler arasında toplam fenolik madde içerikleri istatistiki açıdan çok önemli bulunmuştur (P <0.01). En yüksek fenolik madde miktarı Yalova-3 çeşidinde (13.95 mg GA g⁻¹) en düşük Bilecik çeşidinde (7.16 mg GAE g⁻¹) tespit edilmiştir (Çizelge 1). Antioksidan aktivitenin bitkilerin bulunduğu çevresel koşulların ve meyvenin kimyasal kompozisyonunun yanında, kullanılan ekstraksiyon metodu, ekstraksiyon sırasında kullanılan çözücülerin cinsi ve asidifiye olup olmadığı, sıcaklık ve ekstraksiyon süresi gibi pek çok faktörden etkilendiği bilinmektedir. Bugüne kadar bu çalışmayla birebir aynı metot ve çözücü oranı kullanılarak yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır ancak benzer çalışmalardan elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

Arcan ve Yemencioğlu (2009), su ardından etanol (%96) ile ekstrakte edilen taze ve kurutulmuş fındık, fıstık, ceviz numunelerinin antioksidan özelliklerini inceledikleri çalışmalarında cevizlerin toplam fenolik bileşik miktarını 175-515 mg GAE 100 g⁻¹ kuru ağırlık (dw) olarak tespit etmişlerdir. Chatrabnous ve ark., (2018) İran'da hasat döneminde toplanan taze cevizlerin antioksidan özelliklerini araştırdıkları çalışmalarında, %80 metanol ile ekstrakte ettikleri taze ceviz içlerinin toplam fenolik bileşik miktarını Folin metodu ile 1.54 mg GAE g⁻¹ dw olarak bulmuşlardır. Arranz ve ark., (2008) bütün ceviz, yağ ve yağın uzaklaştırılması ile elde edilen küspe kısmın antioksidan özelliklerini araştırdıkları çalışmalarında ceviz örneklerini önce asidifiye metanol-su (%50:50) ve ardından aseton:su (70:30) karışımı ile ekstrakte etmişler ve toplam fenolik bileşik miktarını bütün ceviz için 2.016 mg GAE 100 g⁻¹ dw olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada kullanılan ceviz çeşitlerinin daha yüksek fenolik bileşik miktarına sahip olduğu görülmektedir. Ancak Cerit ve ark., (2017) Türkiye'de yetiştirilen sekiz ceviz çeşidinin fonksiyonel özelliklerini araştırdıkları çalışmalarında taze ceviz içleri önce soxhlet ekstraktörü ile yağ uzaklaştırılmış, kalan kısımdan %70-30 metanol su karışımı ile ekstrakt hazırlanmıştır. Ekstraktların toplam fenolik bileşik miktarı gallik asit eşdeğeri olarak 33.5-50.3 mg GAE g⁻¹ aralığında bulunmuştur. Bu çalışmayla karşılaştırıldığında toplam fenolik bileşik miktarı yüksek bulunmasının sebebinin soxhlet ekstraksiyonu işlemi ile cevizden yağın uzaklaştırılması olduğu düşünülmektedir. Arranz et.al., (2008) cevizin antioksidan kapasitesine en büyük katkının yağsız kısmının içerdiği fenolik bileşiklerden kaynaklandığını bildirmişlerdir.

3.2. Toplam Flavonoid Madde Miktarı

İncelenen ceviz çeşitlerinin meyvelerinde toplam flavonoid madde miktarı bakımından istatistiki olarak çok önemli fark bulunmuştur (P <0.01). Çeşitlerin toplam flavonoid miktarları querchetin eşdeğeri 0.73-1.11 mg (QE) g⁻¹ arasında belirlenmiştir. Yalova-3 çeşidinin toplam flavonoid içeriğinin diğer çeşitlere göre daha yüksek olduğu (1.11 mg QE g⁻¹) görülmüş, en düşük flavonoid miktarı Bilecik çeşidinde (0.73 mg QE g⁻¹) bulunmuştur (Çizelge 1). Esen, (2013) çalışmasında cevizin farklı kısımlarının sağlıkla ilgili özelliklerini araştırmıştır. Ceviz örneklerini önce %80 aseton ile ardından saf metanol ile ekstrakte etmiş ve ceviz içi için toplam flavonoid miktarını kateşin eşdeğeri olarak 12.9 mg CE g⁻¹ dw bulmuştur. Shi ve ark., (2017) çalışmalarında, ceviz örneklerini %50 metanol ile ekstrakte etmişler ve ceviz meyvelerinin gelişme sürecinde ortalama toplam flavonoid içeriği 1.03 mg RE g⁻¹ FW olarak bulunmuştur. Ayrıca literatürde ceviz örnekleri için farklı kromatografi cihazları kullanılarak farklı flavonoid tespitleri yapılmıştır (Vu ve ark., 2018).

3.3. Antioksidan Aktivite

Cevizin çoklu doymamış yağ asitlerinin yanı sıra antioksidan içeriğinin oldukça yüksek olduğu çalışmalarla ortaya konulmuştur. Cevizde bulunan antioksidan maddeler ceviz içinde, ceviz iç zarında, ceviz erkek çiçeğinde, yapraklarında, sürgünlerinde ve yeşil kabuklarında yer almaktadır (Almedia ve ark., 2008; Labuckas ve ark., 2008; Cheniany ve ark., 2013; Fernández-Agulló ve ark., 2013; Wang ve ark., 2014). Bitkilerde antioksidan aktivite birçok metotla tespit edilebilmesine rağmen onaylanmış ya da standart bir metot bulunmamaktadır. Bir çalışmadan elde edilecek antioksidan aktivite sonuçları kullanılan metoda bağlı olarak değişebilmektedir (Frankel ve Meyer, 2000). Bu çalışmada ceviz meyvelerinde antioksidan aktivite belirlenmesi amacıyla DPPH., ABTS•+ ve CUPRAC olmak üzere üç yöntem kullanılmıştır. Çalışmada her üç metotla elde edilen sonuçlara göre çeşitler arasında istatistiki fark çok önemli bulunmuştur (P <0.01).

DPPH radikal giderme aktivitesi bitkisel materyallerin antioksidan potansiyellerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılan bir metottür. Çalışmada 0.2 mg ml⁻¹ konsantrasyonunda hazırlanan ceviz çeşitlerinin DPPH. radikal süpürme aktivitesi % 28.35 ile % 39.44 arasında bulunmuştur. En yüksek DPPH. süpürücü aktivite Şebın çeşidinde, en düşük ise Kaman çeşidinde tespit edilmiştir (Çizelge 1). Cerit et. al. (2017) bu çalışmayla benzer olarak aynı konsantrasyonda 0.2 mg ml⁻¹ olarak hazırladıkları ceviz ekstraktlarının DPPH radikalini süpürme etkisini %16.2 ile % 40 aralığında bulmuşlardır. Sonuçlar mevcut çalışmayla benzerlik göstermektedir. Samaranayaka ve ark., (2008) çalışmalarında ceviz içlerini 1:5 oranında hegzan ile karıştırarak yağını uzaklaştırmış ardından fenoliklerin ekstraksiyonu için 1:10 oranında %95 etanol kullanılarak DPPH radikal giderme aktivitesi araştırılmıştır. Örneklerin 0.207 mg ml⁻¹ konsantrasyonunda DPPH radikalini %50'sini süpürdüğünü gözlemlemişlerdir. Akbari ve ark., (2012) cevizin pelet ve çekirdek kısımlarının DPPH radikal giderme aktivitesini sırasıyla % 73.3 ve % 1.2 olarak bulmuşlardır. Zhang ve ark., (2009) petrol eteri ile yağı uzaklaştırdıktan sonra % 80 etanol ve ardından etil asetat ve n-bütanol ile ekstrakte edilen ceviz içlerinin DPPH radikalini % 50'sini süpüren ekstrakt konsantrasyonunu (IC50) sırası ile 0.83 ve 0.88 mg ml⁻¹ ekstrakt olarak bulmuşlardır. Aynı konsantrasyonda hazırlanan ceviz çeşitlerinin ABTS•+ radikalini süpürücü etkisi %87.38 ile en fazla Yalova-3 çeşidinde, en düşük %63.63 ile Kaman çeşidinde tespit edilmiştir. Çeşitlerin serbest radikal süpürme aktivitesi ABTS yönteminde DPPH. yöntemine göre daha yüksek oranda gerçekleşmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Ceviz çeşitlerinin toplam fenolik, toplam flavonoid içerikleri ile DPPH., ABTS•+ ve CUPRAC yöntemine göre radikal süpürme aktiviteleri*

Table 1. Total phenolic, total flavonoid contents and radical scavenging activities according to DPPH., ABTS • + and CUPRAC method of walnut varieties

Çeşitler	Toplam Fenolik mg GAE g ⁻¹	Toplam Flavonoid mg GAE g ⁻¹	DPPH %	ABTS ^{•+} %	CUPRAC mMolTE g ⁻¹
Yalova-3	13.95 ± 1.19a	1.11 ± 0.01a	35.67 ± 0.01c	87.38 ± 0.02a	2.94 ± 0.02a
Bilecik	7.16 ± 0.26c	0.73 ± 0.03c	37.48 ± 0.01b	76.52 ± 0.02c	2.50 ± 0.02b
Şebın	10.79±0.31b	0.78 ± 0.001c	39.44 ± 0.01a	77.12 ± 0.04b	2.54 ± 0.01b
Kaman	12.37±0.62ab	0.98 ± 0.02b	28.35 ± 0.02d	63.63 ± 0.03d	2.26 ± 0.02c

*Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki önemlidir (P<0.01)

Ceviz çeşitlerinin CUPRAC yöntemine göre Cu²⁺ iyonlarını indirgeme kapasitesi 2.26-2.94 mMol TE g⁻¹ arasında değişmiş, en yüksek değer Yalova-3, en düşük değer Kaman çeşidinde elde edilmiştir. Cerit ve ark., (2017) çalışmalarında ceviz örneklerinin Cuprac metodu ile Cu²⁺ iyonlarını indirgeme kapasitesini 13.0 -28.8 mg TE g⁻¹ arasında bulmuşlardır.

3.4. Fenolik Bileşikler

Cevizlerin fenolik bileşik içeriği araştırıldığında; bitki içeriğinde ekolojik ve genetik faktörlere bağlı olarak değişen ve oksidatif strese ilgili birçok hastalığın ortaya çıkmasını ve ilerlemesini önleyen doğal fenolik bileşiklerin varlığı bildirilmiştir (Akbari ve ark., 2012). Bu çalışmada incelenen ceviz meyvelerinde HPLC ile yapılan içerik analizlerinde gallik asit, kateşin, kafeik asit, p-kumarik asit, transferulik asit ve o-kumarik asit olmak üzere 6 fenolik bileşik tespit edilmiştir. İncelenen çeşitler arasında istatistikî fark çok önemli bulunmuştur (P <0.01). Çeşitlerde gallik asit miktarı 24.20-61.80 mg 100g⁻¹ arasında, kafeik asit içeriği 16.20-55.50 mg 100g⁻¹ arasında, p-kumarik asit içeriği 2.80-41.70 mg 100g⁻¹ arasında ve trans ferulik asit içeriği 16.10-28.55 mg 100g⁻¹ arasında tespit edilmiştir. Gallik asit en yüksek Şebın çeşidinde, en düşük Bilecik çeşidinde, kafeik asit en yüksek Yalova-3, en düşük Şebın çeşidinde, trans ferulik asit en yüksek Şebın an düşük Yalova-3 çeşidinde, p-kumarik asit en yüksek Kaman, en düşük Yalova-3 çeşidinde bulunmuştur. Kateşin fenolik bileşiği 181.8 mg 100g⁻¹değer ile sadece Kaman çeşidinde, o- kumarik asit bileşiği de 4.4 mg 100g⁻¹ değer ile yalnızca Yalova-3 çeşidinde tespit edilmiştir (Çizelge 2).

Vu ve ark., (2018) 11 farklı siyah cevizin fenolik içeriğini HPLC ile araştırdıkları çalışmalarında kateşinin birçok çeşitte düşük seviyelerde bulunduğunu ya da hiç bulunmadığını bu durumun kateşinin, glikozidler ve gallik asit konjugatları formlarında daha yaygın olarak bulunmasından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Benzer şekilde bu çalışmada da kateşin Kaman çeşidi hariç diğer ceviz çeşitlerinde belirlenmemiştir. Kaman çeşidinde ise baskın fenolik olarak görülmüştür. Figueroa ve ark. (2017), 10 farklı ceviz çeşidinin fenolik bileşik içeriğini HPLC ile araştırdıkları çalışmalarında 6 farklı flavan-3-ol (gallokateşin, kateşin, prosiyanidin B2, epigallokateşin gallat, epikateşin ve epikateşin gallat) 10 çeşidin tamamında tespit etmiş ve baskın flavonidin kateşin ve protosiyanidin B2

olduğunu belirlemiştir. Slatnar ve ark., (2015) Adams, Fernette, Ferner, Frenquette, Lara ceviz çeşitlerinin ceviz içinin, yağ ve küspesinin fenolik içeriğini HPLC-MS ile araştırdıkları çalışmalarında 28 çeşit fenolik bileşiğin tespit edildiğini, etken bileşiğin hidrolizlenebilir tanenler olduğunu ve ceviz içinde tüm çeşitlerin birbirine yakın değerlerde gallik asit içerdiğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada üç fenolik asit (gallik asit, elajik asit, siringik asit) ile iki hidrokisisinnamik asit (klorogenik asit ve p- kumarik asit) tanımlanmıştır. Sonuçlar bu çalışmayla benzerlik göstermektedir.

Çizelge 2. Ceviz çeşitlerinde bulunan fenolik bileşikler (mg/100g)*
Table 2. Phenolic compounds found in walnut varieties (mg / 100g) *

Çeşitler	Gallik Asit	Kateşin	Kafeik Asit	p-kumarik Asit	Trans ferulik Asit	o-kumarik Asit
Yalova-3	56.40 ± 0.01b	-	55.50 ± 0.01a	2.80 ± 0.02c	16.10 ± 0.01d	4.4 ± 0.02a
Şebın	61.80 ± 0.02a	-	11.40 ± 0.02d	-	28.55 ± 0.02a	-
Bilecik	24.20 ± 0.01d	-	42.33 ± 0.32b	34.00 ± 0.01b	24.70 ± 0.02c	-
Kaman	51.80 ± 0.01c	181.8 ± 0.02a	16.20 ± 0.02c	41.70 ± 0.02a	25.80 ± 0.01b	-

Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0.01)

4. Sonuç

Ceviz yağ asidi bileşimi, besin değeri ve güçlü antioksidan seviyesi, oksidatif stres ve serbest radikallerin dejeneratif etkilerine karşı üstlendikleri önemli rolleri sayesinde gün geçtikçe değer kazanmakta ve beslenmemizde daha fazla yer almaktadır. Çalışmada elde edilen sonuçlarda Şebın, Bilecik, Kaman ve Yalova-3 çeşitlerinin farklı antioksidan aktiviteleri gösterdikleri ve çeşitler arasında istatistiki farkın bütün analizlerde çok önemli olduğu görülmüştür (P <0.01). Literatürde cevizlerin antioksidan ve serbest radikal giderme aktivitelerinin araştırdığı sınırlı sayıda çalışmaya rastlanılmış, bu yönüyle çalışmadan elde edilen sonuçların literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Sonuç olarak son zamanlarda sert kabuklu meyvelerin sağlık üzerine olan yararlı etkilerine ilginin de arttığı göz önünde bulundurulduğunda, mevcut çalışmada incelenen 4 ceviz çeşidinin hem antioksidan hem de serbest radikal giderme aktiviteleri sonuçlarının cevizlerin insan sağlığına olan faydaları üzerine mevcut bilgimize katkı sağlayacağı ön görülmektedir.

Kaynaklar

- Akbari, V., Jamei, R., Heidari, R., Esfahlan, J., 2012. Antiradical activity of different parts of walnut (*Juglans regia* L.) fruit as a function of genotype. *Food Chemistry* 135: 2404-2410. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.030>
- Almeida, I. F., Fernandes, E., Lima, J. L. F. C., Costa, P. C., 2008. Walnut (*Juglans regia* L.) leaf extracts are strong scavengers of pro-oxidant reactive species. *Food Chemistry*, 106, 1014-1020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.017>
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., 2004. A novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols, vitamin c and e, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970- 7981.
- Arcan, I., Yemenicioğlu, A., 2009. Antioxidant activity and phenolic content of fresh and dry nuts with or without the seed coat. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(3), 184-188.
- Arranz, S., Jimenez, J. P., Saura-Calixto, F., 2008. Antioxidant capacity of walnut (*Juglans regia* L.): Contribution of oil and defatted matter. *European Food Research and Technology*. 227, 425-431. DOI 10.1007/s00217-007-0737-2
- Bi, D., Zhao, Y., Jiang, R., Wang, Y., Tian, Y., Chen, X., She, G., 2016. Phytochemistry, bioactivity and potential impact on health of *Juglans*: the original plant of walnut. *Natural Product Communications*, 11(6), 1934578X1601100643.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C., 1995. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science Technology-Leb*. 28, 25-30.
- Carey, A.N., Poulouse, S.M., Shukitt-Hale, B., 2012. The beneficial effects of tree nuts on the aging brain, *Nutrition and Aging*, 1(1): 55-67. DOI 10.3233/NUA-2012-0007

- Cerit, İ., Sariçam, A., Demirkol, O.İ., Ünver, H., Sakar, E., Coşansu, S., 2017. Comparative study of functional properties of eight walnut (*Juglans regia* L.) genotypes. *Food Science and Technology*. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457X.2051>.
- Chatrabnous, N., Yazdani, N., Vahdati, K., 2018. Determination of nutritional value and oxidative stability of fresh walnut. *Journal of Nuts*, 9(1), 11-20. 10.22034/JON.2018.540862
- Cheniany, M., Ebrahimzadeh, H., Vahdati, K., Preece, J. E., Masoudinejad, A., Mirmasoumi, M., 2013. Content of different groups of phenolic compounds in microshoots of *Juglans regia* cultivars and studies on antioxidant activity. *Acta Physiologiae Plantarum*. 35, 443–450. DOI 10.1007/s11738-012-1087-7
- Esen, Ö.B., 2013. Health related properties of different parts of walnut. PhD thesis. Istanbul Technical University Graduate School of Science. Food Engineering .Istanbul.
- Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M.-I., Corella, D., Aros, F., 2013. Primary prevention of cardiovascular disease with a mediterranean diet. *New England Journal of Medicine*, 368:1279–1290. DOI: 10.1056/NEJMoa1200303
- Fernández-Agulló, A., Pereira, E. Freire, M. S., Valentao, P., Andrade, P. B., González-Álvarez, J., Pereira, J., 2013. Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husks extracts. *Industrial Crops and Products* 42, 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.10.016>
- Figueroa, F., Marhuenda, J., Zafrilla, P., Villaño, D., Martínez-Cachá, A., Tejada, L., Cerdá, B., Mulero, J., 2017. High-performance liquid chromatography-diode array detector determination and availability of phenolic compounds in 10 genotypes of walnuts. *International Journal of Food Properties* 20:5 (1074-1084). <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1199036>
- Frankel, E. N., Meyer, A. S., 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1925–1941.
- Gülçin, İ., 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology* , 86(3), 345-391. DOI 10.1007/s00204-011-0774-2
- Haddad, E. H., Gaban-Chong, N., Oda, K., Sabaté, J. 2014. Effect of a walnut meal on post prandial oxidative stress and antioxidants in healthy individuals. *Nutrition Journal*, 13(1), 4. doi:10.1186/1475-2891-13-4
- Halliwell, B., 1994. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews*, 52, 253-265.
- Konstantinidou, V., Covas, M.-I., Muñoz-Aguayo, D., Khymenets, O., de la Torre, R., Saez, G., 2010. In vivo nutrigenomic effects of virgin olive oil polyphenols within the frame of the Mediterranean diet: A randomized controlled trial. *FASEB J*. 24:2546–2557. doi: 10.1096/fj.09-148452
- Labuckas, D. O., Maestri, D. M., Perelló, M., Martínez, M. L., Lamarque, A. L., 2008. Phenolics from walnut (*Juglans regia* L.) kernels: antioxidant activity and interactions with proteins. *Food Chemistry*, 107, 607–612. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.051>
- Lee, J., Koo, N., Min, D. B., 2004. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *comprehensive reviews in food. Science and Food Safety*; 3: 21- 33
- Li, S.-C., Liu, Y.-H., Liu, J.-F., Chang, W.-H., Chen, C.-M. and Chen, C.-Y. O. 2011. Almond consumption improved glycemic control and lipid profiles in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 60:474– 479. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2010.04.009>
- Murase, T., Misawa, K., Minegishi, Y., Aoki, M., Ominami, H., Suzuki, Y., 2011. Coffee polyphenols suppress diet-induced body fat accumulation by down-regulating SREBP-1c and related molecules in C57BL/6J mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 300: E122–E133. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00441.2010>
- Özgen, M., Reese, R., 2006. Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-sulfonic acid (abts) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric. *Journal of Agricultural Food Science and Technology*, 1151-1157. 10.1021/jf051960d
- Pereira, J. A., Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I. C., Bento, A., Estevinho, L., 2008. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, 46(6), 2103-2111. PMID:18334279. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2008.02.002>.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., And Gordon, M., 2001. Antioxidants In Food, CRC Press, ISBN: 9781855736160, USA.
- Samaranayaka, A. G. P., John, J. A., Shahidi, F., 2008. Antioxidant activity of english walnut (*Juglans regia* L.). *Journal of Food Lipids* 15 : 384–397.
- González, C., Ciudad, C. J., Noe, V., Izquierdo-Pulido, M., 2017. Health benefits of walnut polyphenols: An exploration beyond their lipid profile. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(16), <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1126218> 3373-3383.
- Sen S. M., 2011. Walnut, cultivation, nutritional value, folklore (4th Ed.) (in Turkish). ICC Publication, Ankara, Turkey, pp. 220.

- Shi, B., Zhang, W., Li, X., Pan, X., 2017. Seasonal variations of phenolic profiles and antioxidant activity of walnut (*Juglans sigillata* Dode) green husks. *International Journal of Food Properties*, 20(sup3), <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1381706> S2635-S2646.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdenic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158
- Slatnar, A., Mikulic-Petkovsek, A., Stampar, F., Veberic, R., Anita Solar, A., 2015. Identification and quantification of phenolic compounds in kernels, oil and bagasse pellets of common walnut (*Juglans regia* L.) *Food Research International* 67:255-263. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.016>
- Şahin G., 2005. Sağlıklı Beslenmede Ceviz. *Bahçe Dergisi*, 34(1): 157-162.
- Şen, S.M., Karadeniz, T., 2015. The nutritional value of walnut, *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 11: 68-71.
- Şen, S. M., 2011. Ceviz Yetiştiriciliği-Besin Değeri-Folklorü. ÜÇM yayıncılık. Ankara. 169-170 s.
- Şen, S., 2015. Ceviz ye sağlıklı yaşa. ÜÇM Yayıncılık. Ankara
- Vital, A. C. P., Croge, C., Gomes-da-Costa, S. M., Matumoto-Pintro, P. T., 2017. Effect of addition of *agaricus blazei* mushroom residue to milk enriched with omega-3 on the prevention of lipid oxidation and bioavailability of bioactive compounds after in vitro gastrointestinal digestion. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(6), 1483–1490. doi:10.1111/ijfs.13413
- Vu, D.C., Vo, P.C., Coggeshall, M.V., Lin, C.H., 2018. Identification and characterization of phenolic compounds in black walnut kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 66 (17): 4503-4511. doi: 10.1021 / acs.jafc.8b01181.
- Vinson J.A., Cai Y., 2011. Nuts, especially walnuts, have both antioxidant quantity and efficacy and exhibit significant potential health benefits. *Food & Function*, 3(2): 134-40. DOI: 10.1039/C2FO10152A
- Wang, C. L., Zhang, W. E., Pan, X. J., 2014. Nutritional quality of the walnut male inflorescences at four flowering stages. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2014, 2, 457–464. DOI:10.12691/jfnr-2-8-5
- Yin, T. P., Cai, L., Chen, Y., Li, Y., Wang, Y. R., Liu, C. S., Ding, Z. T., 2015. Tannins and antioxidant activities of the walnut (*Juglans regia* L.) pellicle. *Natural Product Communications*, 10(12), 1934578X1501001232.
- Mokrani, A., Madani, K., 2016. Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. *Separation and Purification Technology*. 162, 68-76. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.01.043>
- Zhang, Z., Liao, L., Moore, J., Wua, T., Wang, Z., 2009. Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.) *Food Chemistry* 113: 160–165. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.061>