

**Atıf İçin:** Karakuş, M. Ş. (2025). Biyoaktif maddelerin ekstraksiyonunda sulu iki fazlı (etanol-tuz bazlı) sistemlerin yetenekleri: Model bir yapı olarak fıstık (*Pistacia Vera L.*) atıkları. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 15(2), 543-555.

**To Cite:** Karakuş, M. Ş. (2025). The potential of aqueous two-phase (ethanol-salt based) systems in the extraction of bioactive groups: Pistachio (*Pistacia Vera L.*) wastes as a model structure. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 15(2), 543-555.

**Biyoaktif Maddelerin Ekstraksiyonunda Sulu İki Fazlı (Etanol-Tuz Bazlı) Sistemlerin Yetenekleri: Model Bir Yapı Olarak Fıstık (*Pistacia vera L.*) Atıkları**

Mehmet Şükrü KARAKUŞ<sup>1\*</sup>

**Öne Çıkanlar:**

- Fıstık atıklarının değerlendirilmesi
- Alkol/tuz bazlı özütleme
- Fenolik bileşiklerin saflaştırılması

**Anahtar Kelimeler:**

- Fıstık atığı
- İki fazlı özütleme
- FTIR
- Flavonoid
- Tanen

**ÖZET:**

Bu çalışma, fıstık posası atıklarının karakterizasyonunu ve bu materyaldeki biyoaktif bileşikleri saflaştırmak amacıyla alkol/tuz bazlı sulu iki fazlı özütleme (ATPS) yönteminin etkinliğini geleneksel yöntemle kıyaslayarak araştırmaktadır. İlk aşamada, fıstık posasının fizikokimyasal özellikleri (nem içeriği, toplam kül, yağ oranı ve renk değerleri) belirlenmiştir. Fıstık atıklarının karakteristik yapısı Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile doğrulanmıştır. Ayrıca, atıkların mineral madde içeriği İndüktif Eşleşmiş Plazma-Optik Emisyon Spektrometresi (ICP-OES) ile belirlenmiştir. İkinci aşamada ise ATPS'nin bileşimi belirlenmiştir. ATPS'nin bileşiminde kullanılan etanol ve amonyum sülfat oranı toplam fenolik madde değişkeni baz alınarak tespit edilmiştir. En yüksek fenolik maddeye sahip ATPS-3 noktası en uygun nokta olarak seçilmiştir. Bu noktada kullanılan etanol oranı %28 ve amonyum sülfat oranı ise %18 olarak bulunmuştur. Optimum koşullardaki hacim oranı (R) ve bölüşüm katsayısı (K) değerleri ise 1.56 ve 10.00 olarak tespit edilmiştir. Optimum ATPS noktası ile geleneksel özütleme toplam fenolik madde, toplam flavonoid, toplam hidrolize tanen ve antioksidan aktivite değerleri açısından karşılaştırılmıştır. ATPS özütlerinin biyolojik aktivite değerleri açısından geleneksel özütlemeye göre daha üstün olduğu bulunmuştur. Çalışma sonunda, bu yenilikçi özütleme yönteminin geleneksel özütleme yöntemlerine bir alternatif olabileceği sonucuna varılabilir.

**The Potential of Aqueous Two-Phase (Ethanol-Salt Based) Systems in the Extraction of Bioactive Compounds: Pistachio (*Pistacia vera L.*) Wastes as a Model Structure**

**Highlights:**

- Evaluation of pistachio waste
- Alcohol/salt based extraction
- Purification of phenolic compounds

**Keywords:**

- Pistachio waste
- Two phase extraction
- FTIR
- Flavonoid
- Tannin

**ABSTRACT:**

This study investigates the characterization of pistachio waste and evaluates the effectiveness of an alcohol/salt-based aqueous two-phase extraction (ATPS) method for purifying bioactive compounds in this material by comparing with the conventional method. In the initial stage, the physicochemical properties of pistachio wastes (moisture content, total ash, oil content, and color values) were analyzed. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) confirmed the characteristic structure of pistachio wastes. In addition, the mineral content of the wastes was determined by Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry (ICP-OES). In the second stage, the composition of ATPS was selected. The ratio of ethanol to ammonium sulfate used in the composition of ATPS was based on the total phenolic content variable. The ATPS-3 point with the highest phenolic content was identified as the optimal point. The ethanol ratio was 28%, while the ammonium sulfate ratio was 18%. The values for the volume ratio (R) and partition coefficient (K) under optimum conditions were determined as 1.56 and 10.00, respectively. Furthermore, the optimum ATPS point was compared with the traditional extraction regarding total phenolic substances, total flavonoids, total hydrolyzed tannins, and antioxidant activity values. ATPS extracts demonstrated greater biological activity compared to traditional extraction methods. In conclusion, this innovative extraction method can serve as a viable alternative to traditional extraction techniques.

<sup>1</sup> Mehmet Şükrü KARAKUŞ ([Orcid ID: 0000-0002-1805-8206](https://orcid.org/0000-0002-1805-8206)), Harran Üniversitesi, Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, Şanlıurfa, Türkiye

**\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Mehmet Şükrü KARAKUŞ, e-mail: [sukrukarakus@harran.edu.tr](mailto:sukrukarakus@harran.edu.tr)

## GİRİŞ

Antep Fıstığı (*Pistacia vera L.*) sakız ağacıgiller familyasına ait yoğun aroması ile bilinen ince kabuklu ve yağlı bir meyvedir. Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde coğrafi işaretli Antep Fıstığı, gıda sektöründe yaygın kullanım alanına sahiptir. Ayrıca bu ürünün protein, yağ, vitamin ve yağ asitleri bakımından zengin olması insan beslenmesindeki önemini de ortaya çıkarmaktadır (Mertdinç ve ark., 2023). Fıstık meyvesindeki kırmızı dış kabuk sert kabuktan ayrılarak kabuk ayırma işlemi gerçekleştirilmektedir. Endüstriyel ölçekte yapılan bu işlemle hasat zamanı fıstık meyvesi, sap ve yaprak olmak üzere bir bütün halinde toplanmakta ve kabuk ayırma (kavlatma) işlemine tabi tutulmaktadır. Buna karşın endüstriyel kabuk ayırma işlemi sırasında üretilen ve biriken yan ürünlerin neredeyse %70'i atık olarak ortaya çıkmaktadır (Maccarronello ve ark., 2024). Bu atıklar içerisinde fıstık yumuşak dış kabuğu (yeşil/kırmızı), sap ve yaprak gibi birçok materyal bulunmaktadır. İşlem sonunda ortaya çıkan bu atıklar ya gübre olarak kullanılmakta ya da yakıt olarak değerlendirilmektedir. Buna karşın fıstık posalarının katma değerli bir ürüne dönüştürülme aşamasında bir eksiklik bulunmaktadır. Ayrıca fıstık dış kabuğu üzerine birçok çalışma bulunmasına rağmen fıstık posası üzerine yapılmış yeterli çalışma bulunmamaktadır. Fıstık yumuşak dış kabuğu üzerine yapılan çalışmalarda ise bu ürünün yüksek oranda protein ve yağ içerdiği rapor edilmiştir (Barut ve ark., 2021). Ayrıca dış kabuğun antioksidan ve antimikrobiyal etkiye sahip olduğu da yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Barreca ve ark., 2016; Erşan ve ark., 2018; Sonmezdag ve ark., 2017).

Literatür çalışmaları incelendiğinde özütleme yöntemleri arasında genellikle geleneksel özütleme, mikrodalga destekli özütleme ve subkritik su özütleme bulunmaktadır. Buna karşın, bitkisel materyallerden doğal biyoaktif bileşikleri çıkarmak için uygulanan maserasyon yöntemlerinde düşük verim, yüksek miktarda çözücü kullanılmaktadır. Tüm bunların yanı sıra yalnızca polifenoller değil, aynı zamanda daha fazla kullanım için diğer saflaştırma işlemlerine ihtiyaç duyulan diğer bileşikler de elde edilmektedir (Zhang ve ark., 2017). Ayrıca, geleneksel özütleme teknikleri, saflaştırma işlemleri gerektiren maddelerin (serbest şeker ve diğer maddelerin) birikimine neden olmaktadır (Wu ve ark., 2011). Bu sorunların üstesinden gelebilmek amacıyla mikrodalga destekli özütleme, ultra yüksek basınçlı özütleme, darbeli elektrik alanı uygulama gibi birçok teknik uygulanmıştır. Ancak bu özütleme yöntemlerinde kullanılan su, metanol, etanol vb. çözücülerin bir saflaştırma fonksiyonu bulunmamaktadır (Xi ve ark., 2023). Bu nedenle, özütlerdeki safsızlık oranı yüksek olmakta bu da işlemin zorluğunu arttırmaktadır (Zhu ve ark., 2022). Bundan dolayı, yüksek biyolojik aktiviteye sahip bileşiklerin özütlenmesinde saflaştırma etkisine sahip yeni bir çözücü geliştirmek büyük önem arz etmektedir.

Sulu iki fazlı sistem (ATPS), kimyasal bileşiklerin çıkarılması, ayrılması ve saflaştırılması potansiyeli nedeniyle son yıllarda önem kazanan bir sıvı-sıvı ayırma tekniğidir (Iqbal ve ark., 2016). Bu sistem, belirli bir konsantrasyonda suda karıştırılan iki veya daha fazla hidrofilik bileşiğin kendiliğinden oluşturduğu iki uyumsuz sulu fazdan oluşan yeni bir çözücüdür; mükemmel faz ayırma etkileri, yüksek seçicilik, kolay ölçeklenebilirlik ve düşük maliyet gibi avantajlara sahiptir (Wang ve ark., 2022). Bu teknik ile özütleme ve saflaştırma adımları tek adımlı bir prosedürde birleştirilmektedir. Başka bir deyişle, sadece aktif bileşenlerin izole edilmesi söz konusu olmamakla beraber istenmeyen bileşenler de tek bir operasyonel süreçte uzaklaştırılabilmektedir (Phong ve ark., 2018). Bu çalışmada kullanılan alkol/tuz bazlı ATPS'nin faz ayırma tekniği üzerinde durulmuştur. Bu sistemde su, alkol ve inorganik tuzlar kullanılmaktadır. Kısa zincirli alkoller metanol, etanol ve 2-propanol özütleme işlemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Buna karşın metanolün tüm tuzlarla ATPS oluşturmadığı rapor edilmiştir (Xi ve ark., 2023). Etanolün ise amonyum sülfat ve sodyum sülfat ile daha güçlü faz ayırma

teknigi olduğu bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2017). Bu çalışmada ise etanol/amonyum sülfat ile ATPS oluşturularak özütlenme kullanılması planlanmıştır. Buna karşın, nihai bileşim ve ilgi duyulan miktar, ATPS'de yer alan alkol ve tuz konsantrasyonları, numune yükleme ve ekstraksiyon sıcaklığı gibi birçok faktöre bağlıdır (Feng ve ark., 2015). Bu yüzden ATPS’de kullanılan alkol/tuz konsantrasyonlarının fıstık posasında yer alan aktif bileşiklerin en yüksek seviyede elde edilmesinde uygun oranların belirlenmesi gerekmektedir.

Bu bağlamda, çalışmanın amaçları (i) fıstık posası tozunu karakterize etmek; (ii) fıstık posası özütünün saflaştırılmasında kullanılacak ATPS parametrelerini bileşimini belirlemek; (iii) elde edilen en uygun ATPS noktası ile geleneksel özütlenme yönteminin fıstık posası tozlarının biyolojik aktivite özellikleri (toplam fenolik madde, antioksidan aktivite, flavonoid ve kondanse tanen) üzerindeki etkilerini karşılaştırmaktır.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Fıstık atıkları Şanlıurfa’nın Bozova ilçesinde yer alan yerel bir fıstık işleme (kavlatma) tesisinden temin edilmiştir. Folin-Ciocalteu reaktifi, sodyum karbonat (toplam fenolik madde), sodyum nitrit, alüminyum klorür, sodyum hidroksit (toplam flavonoid), potasyum iyodat (hidrplize tanen), (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazol-6-sulphonic acid), potasyum persülfat (ABTS), demir (II) klorür, 2,4,6-Tris (2-piridil)-s-triazin (FRAP), neocuproine, amonyum asetat, bakır (II) klorür (CUPRAC) analitik saflıkta olup Merck, Darmstadt (Almanya) ve Sigma Aldrich (Co., St. Louis, MO, ABD) firmalarından satın alınmıştır.

### Fıstık atık tozlarının hazırlanması

Fıstık atıklarına ait hammaddeler ağustos ayında toplanmıştır. Kabuk soyma işleminden sonra elde edilen posalar kaba kirlerinden arındırıldıktan sonra bir etüv fırınında 45 °C’de 24 saat kurumaya bırakılmıştır (Elakremi ve ark., 2020). Kurutma işleminden sonra posalar bir öğütücü yardımıyla toz (0,3 mm) haline getirilmiştir.

### Fıstık atıklarına ait fizikokimyasal analizler

Fıstık atıklarının nem miktarı için 3-5 g numune bir kaba tartılmış ve 105 °C’ye ayarlanmış bir etüv fırınında sabit bir ağırlığa ulaşana kadar bekletilmiştir. Süre sonunda gerekli tartımlar yapılmış ve sonuçlar % olarak verilmiştir (Tatar ve ark., 2014). Kül tayini için ise krozelere 1-3 g toz örnek tartılmıştır. Numune konulan krozeler, sıcaklığı 550 °C’ye ayarlanmış kül fırınına yerleştirilmiştir. Fıstık atıklarının içermiş olduğu toplam kül miktarı örneğin ilk ve son ağırlığı kullanılarak hesaplanmıştır (El Sohaimy ve ark., 2015). Fıstık atıklarına ait yağ miktarı Soxhlet yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar % olarak ifade edilmiştir. Örneklerin renk değerleri, HunterLab, (Color Quest® XE, ABD) renk cihazı ile (L (açıklık-koyuluk), a\* (kırmızı-yeşil) ve b\* (sarı-mavi)) belirlenmiştir (Duangmal ve ark., 2008).

### FTIR

Fıstık atıklarının karakteristik grupları FTIR spektroskopisi ile belirlenmiştir. Çözünürlük 4 1/cm ve dalga boyu aralığı 500-4000 1/cm olarak tarama gerçekleştirilmiştir (Arriola ve ark., 2019).

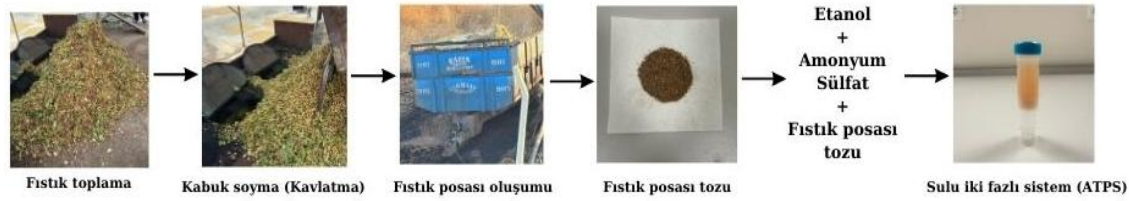
### Mineral Madde İçerik Analizi

Toz forma dönüştürülen fıstık atıkları tartıldıktan sonra çözündürme kaplarına alınmış ve 8 mL HNO<sub>3</sub> ile muamele edilmiştir. Ardından mikrodalga fırınında (MSW2, Berghof) yakma işlemine tabi tutulmuştur. ICP OES çalışma koşulları; 1350 W güç, 15 L dk plazma gaz akışı (Ar), 1.5 L dk yardımcı

gaz akışı (Ar), 0.75 L dk nebulizatör gaz akışı (Ar), 15 rpm pompa hızı ve 1.5 mL dk akış hızına ayarlanmıştır. Daha sonra, örnekler damıtılmış su ile 14 mL'ye seyreltilmiş ve mineral madde içerikleri ICP OES (Perkin Elmer Optima 5300 DV) ile belirlenmiştir.

### İki fazlı sulu sistemlerin oluşturulması (ATPS)

Etanol ve amonyum sülfattan oluşan iki fazlı sistemin oluşumu bulanıklık titrasyon yöntemiyle hazırlanmıştır (Li ve ark., 2009). Bu amaçla daha önce yürütülmüş bir çalışmada bazı modifikasyonlar yapılarak deneme noktaları belirlenmiştir (Le ve ark., 2023). Belirli oranda amonyum sülfat bir test tüpüne tartıldıktan sonra distile suda iyice çözündürülmüştür (Çizelge 1). Ardından üzerine damla damla etanol ilave edilmiş ve eklenen etanol miktarı kaydedilmiştir. Test tüpüne fıstık atıkları özütü ilave edildikten sonra bir girdap oluşturmak amacıyla iyice karıştırılmıştır (Özütleme işleminde kullanılan toplam sıvı miktarı 50 g'dır). Alkol ve tuz çözeltisinin uyumsuzluğu nedeniyle, faz ayrımı birkaç dakika içinde gözlemlenmiştir. ATPS, karışım bulutlanma noktasında (bulanıklık) iki faz ayrımı gösterdiğinde oluşturulmuştur. Karışım oda sıcaklığında bir saat bekletildikten sonra farklı renklerde iki faz oluşmuştur. Alt ve üst fazların hacimleri dereceli tüplerde görsel olarak tahmin edilmiştir.



**Şekil 1.** Fıstık posasına ait ATPS sisteminin oluşum mekanizması

Üst faz alkol ve fenolik bileşikler, alt faz ise tuz ve polisakkaritler içermektedir (Feng ve ark., 2015). Farklı bulanıklık noktalarındaki etanol ve amonyum sülfat konsantrasyonlarına göre ATPS işlemi yapılmıştır. Yapılan işlem sonucunda en yüksek toplam fenolik madde miktarını veren nokta en iyi ATPS noktası olarak seçilmiştir. Seçilen ATPS noktası ile geleneksel özütleme noktasına (0.5 g örnek + 50 mL distile su ile gerçekleştirilmiştir) ait özütlerin toplam fenolik madde, toplam flavonoid, toplam hidrolize tanen içerikleri ve antioksidan aktivite değerleri (DPPH, ABTS, FRAP ve CUPRAC) tartışılmıştır.

**Çizelge 1.** Etanol ve amonyum sülfat bazlı ATPS sisteminin bileşimi

| Örnek | Amonyum sülfat (g) | Su (mL) | Etanol (mL) | Amonyum sülfat (%) | Etanol (%) |
|-------|--------------------|---------|-------------|--------------------|------------|
| 1     | 3.0                | 9.9     | 1.8         | 14                 | 20         |
| 2     | 3.2                | 9.0     | 1.9         | 16                 | 24         |
| 3     | 3.6                | 9.8     | 1.6         | 18                 | 28         |
| 4     | 4.0                | 8.8     | 1.7         | 20                 | 32         |
| 5     | 4.4                | 8.5     | 2.0         | 22                 | 36         |

### ATPS hacim oranı (R) ve bölüşüm katsayısı (K)

Hacim oranı (R), üst fazdaki etanol oranının alt fazdaki amonyum sülfat oranına bölünmesiyle tespit edilmiştir. ATPS bölüşüm katsayısı (K) ise üst fazdaki toplam fenolik madde miktarının alt fazdaki toplam fenolik madde miktarına bölünmesiyle hesaplanmıştır (Li ve ark., 2009).

## Biyolojik aktivite analizleri

### Toplam fenolik madde tayini

Toplam fenolik içerik (TPM), Folin-Ciocalteu reaktifi ile saptanmıştır (Singleton ve Rossi, 1965). TPC için, 0.4 mL özüt, 2 mL seyreltik Folin-Ciocalteu reaktifi (1:9, v/v) ve 1.6 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (%7.5, w/v) karıştırılmış ve ortam sıcaklığında 60 dk inkübasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra, karışımların absorbansı 765 nm'de ölçülmüştür. Kör numune için özüt yerine su kullanılarak aynı şekilde prosedür uygulanmıştır. Sonuçlar, g numune başına mg gallik asit eşdeğeri (mg GAE/g) olarak sunulmuştur.

### Toplam flavonoid madde miktarı

Toplam flavonoid içeriği (TFM), bazı değişikliklerle önceki bir yöntem baz alınarak belirlenmiştir (Zhishen ve ark., 1999). Bu bağlamda, 1 mL özüt, 4 mL distile su ve 0.3 mL %5 (w/v) NaNO<sub>2</sub> karıştırılmış ve 5 dk süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra, üzerine 0.3 mL %10 (w/v) AlCl<sub>3</sub> ilave edilmiştir. Bir dk süre sonunda, karışıma 2 mL 1 M NaOH eklenmiştir. Son hacim, damıtılmış su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Absorbans, 510 nm'de ölçülmüştür. Sonuçlar, g numune başına mg kateşin eşdeğeri (mg KE/g) olarak verilmiştir.

### Toplam hidrolize tanen (THM) miktarı

Toplam hidrolize tanen miktarı spektroskopik yöntemle tespit edilmiştir. Uygun oranda seyreltilmiş 1 mL örnek ile 5 mL KIO<sub>3</sub> (%2.5, w/v) karıştırılarak karanlık bir ortamda 4 dk inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda numunenin absorbans değeri 550 nm'de okunmuştur. Sonuçlar, g örnek başına mg tannik asit eşdeğeri (mg TAE/g) cinsinden verilmiştir (Willis, 1998).

### Antioksidan aktivite tayini

Antioksidan aktivite tayinleri için 4 farklı metot kullanılmıştır. DPPH yönteminde, DPPH çözeltisinden (25 mg/L metanolik DPPH) 3.9 mL alınmış ve 0.1 mL özüt ile karıştırıldıktan sonra karanlık bir ortamda 30 dk inkübasyona tabi tutulmuştur. Örneklerin absorbansı 515 nm'de okunmuştur (Çam ve ark., 2009). ABTS yöntemi için, 7.5 mM ABTS reaktifi ve 2.45 mM potasyum persülfat barındıran ABTS radikal çözeltisi hazırlanarak ortam sıcaklığında bir gece inkübasyona tabi tutulmuştur. Özütlerin seyreltilme işlemi için 0.2 M sodyum fosfat tamponu (pH: 7.4) kullanılmıştır. Farklı miktarlarda özütler alınarak (20, 40, 60 ve 80 µL) üzerine 2 mL ABTS radikal çözeltisi ile muamele edilerek karanlık bir ortamda 6 dk süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Absorbans değerleri 734 nm'de okunmuştur (Çam ve ark., 2009). FRAP metodu için, 25 mL 30 mM asetat çözeltisi, 2.5 mL 10 mM 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazin ve 2.5 mL 20 mM demir (II) klorür barındıran FRAP tampon çözeltisi ayarlanmıştır. Seyreltilmiş örnek (150 µL) ile FRAP tampon çözeltisi (2850 µL) karıştırılmış ve inkübasyondan sonra (30 dk) absorbans değeri 593 nm'de kaydedilmiştir (Benzie ve Strain, 1996). CUPRAC yönteminde ise seyreltilmiş özütler (0.1 mL), 1 mL amonyum tampon çözeltisi (1,0 M), 1 mL etanolik neokuproin çözeltisi ( $7.5 \times 10^{-3}$  M) ve 1 mL CuCl<sub>2</sub> çözeltisi (0,01 M) içeren test tüpüne eklenmiştir. Daha sonra, son hacimler damıtılmış distile su ile 4,1 mL'ye ayarlanmıştır. Absorbanslar 30 dk'lık beklemeden sonra 450 nm'de okunmuştur (Apak ve ark., 2008). Antioksidan aktivite sonuçları gram başına mikromol troluks eşdeğeri (µmol TE/g) olarak ifade edilmiştir.

### İstatistiksel analizler

Bu çalışmada yapılan analizler 3 tekrarlı olarak yürütülmüştür. SPSS (Windows için sürüm 22,0, SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) paket programı yardımıyla tek yönlü varyans analizi (ANOVA) gerçekleştirilerek ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) değerleri belirlenmiştir. Ortalamalar arası

karşılaştırma için Tukey çoklu karşılaştırma testi ( $p<0,05$ ) uygulanmıştır. Çalışmada yer alan şekiller ise OriginPro 8 (Origin Lab Inc., Northampton, ABD) paket programı kullanılarak oluşturulmuştur.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### Fıstık posasına ait fizikokimyasal analizler

Fıstık posası tozlarına ait fizikokimyasal özelliklere ait sonuçlar Çizelge 2.'de sunulmuştur. Örneğin nem içeriği %7.21, toplam kül oranı %10.13 ve toplam yağ oranı ise %9.16 olarak tespit edilmiştir. Renk özelliklerinde ise L, a\* ve b\* değerleri sırasıyla 54.43, 5.01 ve 14.98 olarak belirlenmiştir.

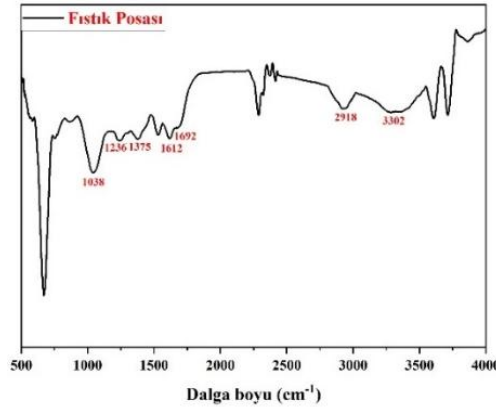
**Çizelge 2.** Fıstık posasına ait fizikokimyasal analiz değerleri

| Analizler            | Fıstık Posası |
|----------------------|---------------|
| Nem içeriği (%)      | 7.21±0.11     |
| Toplam kül oranı (%) | 10.13±0.18    |
| Toplam yağ oranı (%) | 9.16±0.21     |
| L                    | 54.43±0.02    |
| a*                   | 5.01±0.01     |
| b*                   | 14.98±0.01    |

Sonuçlar üç tekrarlı (n=3) ortalama ±standart sapma şeklinde ifade edilmiştir.

### FTIR

FTIR spektroskopisi malzemelerin kimyasal yapısını tanımlamada kullanılan bir yöntemdir (Kumar ve ark., 2021). Fıstık posasına ait karakteristik spektrumlar Şekil 2.'de gösterilmiştir. Şekil 2.'de görüldüğü üzere 3302 1/cm dalga boyunda gözlemlenen bant su, alkoller, fenoller veya karboksilik asitlerde hidroksil gruplarının (-OH) varlığına atfedilmiştir (Çelik ve ark., 2021).



**Şekil 2.** Fıstık posasına ait FTIR spektrumu

2918 1/cm dalga boyundaki tepe noktası CH<sub>2</sub> ve CH<sub>3</sub> gruplarının C-H gerilme titreşimlerine bağlanmıştır. 1692 1/cm frekansındaki absorpsiyon bandı ise yağ içeriğine atfedilmiştir (Piness, 2010). 1612 1/cm dalga boyundaki tepe noktası karbonil grubunun C=O gerilmesinden kaynaklanmaktadır. 1375 1/cm dalga boyundaki bant, alkan ve alkil gruplarındaki titreşimlerle ilişkilendirilmiştir. Ayrıca 1236 1/cm frekansındaki absorpsiyon bandı C=C titreşimlerindeki gerilme hareketlerinden kaynaklanmaktadır. İlave, 1038 1/cm bandındaki pik ise selüloz ve hemiselülozun C-OH titreşimlerine bağlı olduğu bildirilmiştir (Çelik ve ark., 2021). FTIR spektrumundan da anlaşılacağı üzere fıstık posasına ait tüm pikler belirgin bir şekilde tespit edilmiştir.

### Fıstık posasına ait mineral madde içerikleri

Fıstık posası tozuna ait mineral madde miktarları Çizelge 3'te sunulmuştur. Örnekte Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na ve Zn değerleri tespit edilmiştir. En yüksek miktarda tespit edilen mineral maddeler

kalsiyum (Ca) ve potasyum (K) olurken, bunları magnezyum (Mg), demir (Fe) ve sodyum (Na) izlemiştir. Bu mineraller besin değerleri açısından insan vücudu için elzemdir. Wissall ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada fıstığın K, Na, Mg, Ca ve Fe açısından zengin bir kaynak olduğu bildirilmiştir.

**Çizelge 3.** Fıstık posasına ait mineral madde miktarları

| Elementler     | Fıstık Posası (mg/kg) |
|----------------|-----------------------|
| Kalsiyum (Ca)  | 25670±3.45            |
| Bakır (Cu)     | 7.019±0.02            |
| Demir (Fe)     | 332.6±0.76            |
| Potasyum (K)   | 22500±4.21            |
| Magnezyum (Mg) | 2247±2.46             |
| Mangan (Mn)    | 20.94±0.21            |
| Sodyum (Na)    | 770.2±1.34            |
| Çinko (Zn)     | 13.21±0.09            |

Sonuçlar üç tekrarlı (n=3) ortalama ±standart sapma şeklinde ifade edilmiştir.

Mineral bileşiminin önemi, besinsel özellikleri karşılaması ve faydalı sağlık etkilerinden ileri gelmektedir (Welna ve ark., 2008). Bu yüzden fıstık atıklarının katma değerli bir ürün olarak değerlendirilmesi hem gıda endüstrisinde hem de hayvan beslenmesinde önemli bir bileşen olacaktır.

#### **İki fazlı sulu özütlenme yönteminin oluşturulması**

ATPS sisteminin oluşturulmasında kullanılan etanol/amonyum sülfat oranları Çizelge 4'te sunulmuştur. Deneme noktalarına göre en yüksek toplam fenolik madde miktarına sahip ATPS-3 noktası seçilmiştir. Bu seçilen nokta ve geleneksel özütlenme noktası toplam fenolik madde, toplam flavonoid, toplam hidrolize tanen ve antioksidan aktivite değerleri açısından karşılaştırılmıştır.

**Çizelge 4.** Etanol ve amonyum sülfat bazlı ATPS sistemine yönelik deneme noktaları

| ATPS Türü  | Etanol oranı (%) | Amonyum sülfat oranı (%) | TPM (mg GAE/g)          |
|------------|------------------|--------------------------|-------------------------|
| ATPS-1     | 20               | 14                       | 28.23±0.12 <sup>c</sup> |
| ATPS-2     | 24               | 16                       | 28.85±0.15 <sup>c</sup> |
| ATPS-3     | 28               | 18                       | 44.12±0.09 <sup>a</sup> |
| ATPS-4     | 32               | 20                       | 34.53±0.21 <sup>b</sup> |
| ATPS-5     | 36               | 22                       | 26.34±0.14 <sup>e</sup> |
| Geleneksel | -                | -                        | 27.14±0.10 <sup>d</sup> |

Sonuçlar üç tekrarlı (n=3) ortalama ±standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. Aynı sütundaki farklı küçük harfler, istatistiksel farklılığı açıklamak için kullanılmıştır ( $p<0,05$ ); TPM: Toplam fenolik madde miktarı

ATPS'deki etanol/amonyum sülfat hacim oranı (R) (28/18) 1.56 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4). Etanol konsantrasyonun üst fazda yüksek olduğu görülmüş ve bu durumun su moleküllerine karşı için rekabet etme yeteneğinin artmasına atfedilmiştir (Fu ve ark., 2018). Ayrıca, etanol/amonyum sülfat konsantrasyonu artarsa amonyum sülfat tuz olarak kristalleşmektedir. Bu fenomen, çözücü seyreltme kristalizasyonu olarak bilinmektedir. Özütlemeyen sonra tuzu (amonyum sülfat vb.) geri kazanmak için ATPS özütlenme yöntemi kullanılabilir (Wu ve ark., 2011). Bu çalışmada, etanol bazlı ATPS'deki fenolik bileşiklerin bölüşüm katsayı (K) davranışlarını analiz etmek için inorganik tuz olarak amonyum sülfat kullanılmıştır. Örneklerdeki fenolik bileşiklerin bölünmesinde farklı davranışlar tespit edilmiştir. Üst fazdaki toplam fenolik madde miktarı 40.11 mg GAE/g iken alt fazdaki bu değer 4.01 mg GAE/g olarak belirlenmiştir. Bu durumun fenollerin çoğunun üst faza ( $K>1$ ) göç ettiğini göstermektedir. Bu durum, fıstık posasına ait fenolik bileşiklerin yüklü veya yüksüz doğasına bağlı faz polariteleri ile ilişkilendirilebilir. ATPS sistemlerinde baskın bir hidrofobik faz (etanol, üst faz) ve daha hidrofilik bir

faz (tuz, alt faz) bulunmaktadır (Shen ve ark., 2006). Bir hedef bileşik, yüzey özelliklerinin, yük etkisinin ve çeşitli kimyasal bağların (hidrojen, iyonik, vb.) etkileşimi nedeniyle ATPS çözeltisine yüklenmektedir. Sonuçta, aktif bileşik, etanol açısından zengin damlacıklar fazına ve tuz açısından zengin faza farklı oranlarda çözünecek ve bu da iki fazda hedef bileşiğin farklı içeriklerine neden olacaktır (Fu ve ark., 2018; Liu ve ark., 2013).

### Biyolojik aktivite değerleri

#### Toplam fenolik madde miktarı

Fıstık posası özütünün geleneksel ve ATPS özütlemeye sonucunda belirlenen TPM miktarları Çizelge 5'te gösterilmiştir. ATPS özütlemenin TPM miktarı üzerine önemli bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun biyoaktif bileşiklerin etanolde serbestçe çözünebilmesi nedeniyle üst faza doğru bölünmeyi tercih etmesine bağlanabilir. Başka bir ifadeyle tuz etkisinden kaynaklı itici bir güç nedeniyle bu bileşikler etanol açısından zengin fazda (üst faz) kolayca çözünmüştür. Geleneksel özütleme, diğer özütleme yöntemleriyle kıyaslanabilir olsa da bazı dezavantajları bulunmaktadır. Su polar bir çözücü olduğundan, polar olmayan bileşikler bu çözücü sisteminde sınırlı özütlemeye sahip olacaktırlar (Xi ve ark., 2023). Fıstık posası üzerine fazla çalışmaya rastlanılmadığından dolayı literatür taramasında fıstık kabuğu verileri yer almıştır. Fıstık kabuğu üzerine yapılan bir çalışmada çözücü olarak etanol:su oranı optimize edilmiştir. Sonuçlar, fenolik bileşikler özütlemeye kullanmak üzere en iyi çözücü karışımın 40:60 (etanol:su) olduğunu ve bu noktada toplam fenolik madde miktarı 39.03 mg GAE/g olduğu belirtilmiştir (Özbek ve ark., 2020). Fıstık yaprağı üzerine yapılan bir çalışmada çözücü olarak etanol kullanılmış ve fenolik madde içeriği 23.3 mg GAE/g tespit edilmiştir (Seker ve Akbas, 2024).

**Çizelge 5.** Geleneksel ve ATPS özütlemeye ait toplam fenolik madde (TPM), toplam flavonoid (TFM) ve toplam hidrolize tanen madde (THM) miktarları

| Örnekler            | TPM (mg GAE/g)          | TFM (mg KE/g)          | THM (mg TAE/g)          |
|---------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| Geleneksel özütleme | 27.05±0.10 <sup>b</sup> | 2.17±0.09 <sup>b</sup> | 52.11±0.23 <sup>b</sup> |
| ATPS özütleme       | 45.58±0.17 <sup>a</sup> | 7.34±0.11 <sup>a</sup> | 72.23±0.17 <sup>a</sup> |

Sonuçlar üç tekrarlı (n=3) ortalama ±standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. Aynı sütundaki farklı küçük harfler, istatistiksel farklılığı açıklamak için kullanılmıştır ( $p<0,05$ )

#### Toplam flavonoid madde miktarı

Bu çalışmada elde edilen TFM miktarları Çizelge 5'te verilmiştir. ATPS özütlemeye ile elde edilen özütlerde geleneksel özütlemeye kıyasla daha yüksek TFM miktarı saptanmıştır. Elakremi ve ark. (2022) tarafından yapılan çalışmada, farklı özütleme yöntemleri kullanılarak elde edilen fıstık yapraklarındaki flavonoid miktarlarının 1.15 ile 82.16 mg CE/g arasında değiştiği bildirilmiştir. Başka bir çalışmada ise olgunlaşmış ve olgunlaşmamış fıstık yumuşak dış kabuklarının metanolik özütlemesi yapılmıştır. Olgunlaşmış ve olgunlaşmamış fıstık kabuklarının TFM miktarları 3.59 ve 16.78 mg RE/g olarak bildirilmiştir (Kilic ve ark., 2016). Ayrıca, fıstık kabuğunun antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin araştırıldığı çalışmada ise etanolü ve sulu çözücülerden elde edilen özütler kıyaslanmış ve flavonoid içerikleri etanolü çözücü için 5.0 ve sulu çözücü için ise 2.9 mg QE/g olarak rapor edilmiştir (Seker ve Akbas, 2024).

#### Toplam hidrolize tanen

Tanenler, çoğunlukla birçok meyve ve sebzede doğal olarak bulunan, yüksek moleküler ağırlığa sahip, suda çözünür, polifenolik bileşiklerin heterojen bir grubudur. Tanenler, antioksidan ve serbest radikal temizleme aktivitesinin yanı sıra antimikrobiyal, antikanser, anti-besinsel ve kardiyoprotektif özellikler de dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik etkiler göstermektedirler (Smeriglio ve ark., 2017).

Fıstık posası atıklarına ait THM değerleri Çizelge 5’te gösterilmiştir. Geleneksel özütleme ve ATPS özütlerine ait hidrolize tanen değerleri sırasıyla 52.12 ve 72.46 mg TAE/g olarak tespit edilmiştir. Özütleme işlemi diğer özelliklerde olduğu gibi toplam hidrolize tanen değerini de etkilemiştir. Yapılan önceki çalışmalarda ise farklı türlere ait fıstık kabuklarının çözünür hidrolize tanen miktarı en düşük 34.46, en yüksek ise 55.32 mg/g olarak bildirilmiştir (del Azade ve ark., 2016). Başka bir çalışmada ise fıstık yeşil kabuklarının hidrolize tanen miktarı 62.35 mg GAE/g olarak rapor edilmiştir (Azhdari ve ark., 2023).

### Antioksidan aktivite değerleri

Fıstık posası özütlerine ait antioksidan aktivite değerleri 4 farklı yöntemle (DPPH, ABTS, FRAP ve CUPRAC) ölçülmüştür (Çizelge 6).

**Çizelge 6.** Fıstık posası özütlerine ait antioksidan aktivite değerleri

| Antioksidan aktivite            | Geleneksel özütleme          | ATPS özütleme                |
|---------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| DPPH ( $\mu\text{mol TE/g}$ )   | 0.39 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup> | 0.74 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup> |
| ABTS ( $\mu\text{mol TE/g}$ )   | 0.67 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup> | 1.12 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup> |
| FRAP ( $\mu\text{mol TE/g}$ )   | 0.93 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup> | 1.43 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup> |
| CUPRAC ( $\mu\text{mol TE/g}$ ) | 0.25 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup> | 0.42 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup> |

Sonuçlar üç tekrarlı (n=3) ortalama  $\pm$ standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. Aynı sütundaki farklı küçük harfler, istatistiksel farklılığı açıklamak için kullanılmıştır ( $p<0,05$ )

Örneklerin radikal süpürme aktiviteleri DPPH ve ABTS yöntemleriyle incelenmiştir. Geleneksel ve ATPS özütleme ile elde edilen özütlerin DPPH ile ABTS değerleri sırasıyla 0.39-0.74  $\mu\text{mol TE/g}$  (DPPH) ile 0.67-1.12  $\mu\text{mol TE/g}$  (ABTS) olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, farklı yöntemlerle elde edilen fıstık posası özütlerinin antioksidan indirgeme gücü FRAP ve CUPRAC testleri ile ortaya konulmuştur. Geleneksel ve ATPS özütleme ile elde edilen özütlerin FRAP ve CUPRAC değerleri sırasıyla 0.93-1.43  $\mu\text{mol TE/g}$  (FRAP) ve 0.25-0.42  $\mu\text{mol TE/g}$  olarak ölçülmüştür. Başka bir ifadeyle, geleneksel yöntemle elde edilen antioksidan aktivite değerleri ATPS özütleme ile elde edilen antioksidan aktivite değerlerinden daha düşük bulunmuştur. Bu durum, üst fazda yüksek oranda fenolik bileşik konsantrasyonu ile antioksidan aktivite arasındaki yüksek korelasyonlara bağlanabilir. Ayrıca, antioksidan aktiviteden sorumlu olabilecek faktörler arasında moleküllerin polaritesi, antioksidan aktiviteyi ölçmek için kullanılan test ve özütte bulunan antioksidanlar arasında meydana gelen sinerjik ve antagonistik etkilerin yer alabileceği bildirilmiştir (Djeridane ve ark., 2006). Fıstık yumuşak dış kabuğu üzerine yapılan bir çalışmada FRAP antioksidan aktivite değeri 1.071  $\mu\text{mol TE/g}$  olarak bildirilmiştir (Benli ve Bahtiyari, 2024). İncir meyvelerinden fenolik bileşiklerin saflaştırılmasında ATPS sistemi kullanılmış ve antioksidan aktivite sonuçları ABTS ve FRAP olmak üzere iki yöntemle ölçülmüştür. ATPS sistemiyle elde edilen özütlerin antioksidan aktivite değerleri (ABTS ve FRAP yöntemleri) %100 etanol ile elde edilen özütlerden daha yüksek bulunmuştur (Feng ve ark., 2015).

### SONUÇ

Bu çalışma, etanol ve amonyum sülfat bazlı ATPS’nin fıstık posası atıklarından biyoaktif bileşiklerin geri kazanımına yönelik potansiyelini ortaya koymaktadır. ATPS özütleme için en uygun koşullar %28 etanol ve %18 amonyum sülfat olarak belirlenmiştir. Ayrıca etanol/amonyum sülfat hacim oranı 1.56 olarak tespit edilmiştir. Bölüşüm katsayılarına bakıldığında ise üst fazdaki toplam fenolik madde miktarı 40.11 mg GAE/g, alt fazdaki ise 4.01 mg GAE/g olarak bulunmuştur. Çalışmanın bir sonraki aşamasında ATPS özütleme geleneksel özütleme ile kıyaslanmıştır. ATPS özütleme ile elde edilen fıstık posalarının toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı, toplam hidrolize tanen ve antioksidan aktivite değerleri (DPPH, ABTS, FRAP ve CUPRAC) geleneksel

özütlemeyen daha yüksek bulunmuştur. Sonuçlar, ATPS prosedürünün daha az çözücü tüketimi, daha kısa süre, işlem kolaylığı ve yüksek biyolojik aktivite gibi bazı avantajlar sağladığını göstermiştir. Bunun yanı sıra daha yüksek saflıkta biyoaktif bileşikler elde edebilmek için daha kapsamlı optimizasyonlara yer verilerek, mikrodalga ve ultrases uygulamaları ile kombine çalışmalar yapılabilir.

### Çıkar Çatışması

Makale yazarı çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

### Yazar Katkısı

Makale tek yazarlı olduğundan dolayı tüm aşamalar yazar tarafından yapılmıştır.

### KAYNAKLAR

- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Çelik, S. E. (2008). Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchimica Acta*, 160(4), 413-419. <https://doi.org/10.1007/s00604-007-0777-0>
- Arriola, N. D. A., Chater, P. I., Wilcox, M., Lucini, L., Rocchetti, G., Dalmina, M., Pearson, J. P., & de Mello Castanho Amboni, R. D. (2019). Encapsulation of stevia rebaudiana Bertoni aqueous crude extracts by ionic gelation – Effects of alginate blends and gelling solutions on the polyphenolic profile. *Food Chemistry*, 275, 123-134. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.086>
- Azhdari, P., Seif Zadeh, N., Sahari, M. A., & Ahmadi Gavligi, H. (2023). Application of enzymatic treatments in concentration of pistachio hull extract by ultrafiltration. *Food Chemistry Advances*, 3, 100471. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100471>
- Barreca, D., Laganà, G., Leuzzi, U., Smeriglio, A., Trombetta, D., & Bellocchio, E. (2016). Evaluation of the nutraceutical, antioxidant and cytoprotective properties of ripe pistachio (*Pistacia vera L.*, variety Bronte) hulls. *Food Chemistry*, 196, 493-502. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.077>
- Barut, D., Tekin, H., Kılıç, İ. H., Taş, S., & Kurt, B. S. (2021). Antepfıstığı (*Pistacia vera L.*) yumuşak dış kabuğunun kimyasal bileşimi ve antioksidan potansiyelinin belirlenmesi. *Zeugma Biological Science*, 2(1), 20-26
- Benli, H., & Bahtiyari, M. İ. (2024). An approach for the valorization of bio-waste pistachio shells (*Pistacia vera L.*): Dyeing of cellulose-based fabrics. *Journal of Cleaner Production*, 445, 141213. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2024.141213>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Çam, M., Hışıl, Y., & Durmaz, G. (2009). Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chemistry*, 112(3), 721-726. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.009>
- Çelik, Y. H., Yalcin, R., Topkaya, T., Başaran, E., & Kilickap, E. (2021). Characterization of Hazelnut, Pistachio, and Apricot Kernel Shell Particles and Analysis of Their Composite Properties. *Journal of Natural Fibers*, 18(7), 1054-1068. <https://doi.org/10.1080/15440478.2020.1739593>
- del Azade, S., Hanachi, P., & Saboor, O. (2016). Investigation of soluble and insoluble tannins and anthocyanins assay in two Cultivar pistachio (*Pistacia vera L.*). *Journal of Food Science and Technology*, 14(63), 179-186.

- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97(4), 654-660. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.028>
- Duangmal, K., Saicheua, B., & Sueeprasan, S. (2008). Colour evaluation of freeze-dried roselle extract as a natural food colorant in a model system of a drink. *LWT - Food Science and Technology*, 41(8), 1437-1445. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.08.014>
- El Sohaimy, S. A., Masry, S. H. D., & Shehata, M. G. (2015). Physicochemical characteristics of honey from different origins. *Annals of Agricultural Sciences*, 60(2), 279-287. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2015.10.015>
- Elakremi, M., Sillero, L., Ayed, L., Labidi, J., & Moussaoui, Y. (2020). Chemical composition of leaves and hull from *Pistacia vera L.* an evaluation of phenolic content and antioxidant properties of their extracts, *Research square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-128147/v1>
- Elakremi, M., Sillero, L., Ayed, L., ben Mosbah, M., Labidi, J., ben Salem, R., & Moussaoui, Y. (2022). *Pistacia vera L.* leaves as a renewable source of bioactive compounds via microwave assisted extraction. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 29, 100815. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100815>
- Erşan, S., Güçlü Üstündağ, Ö., Carle, R., & Schweiggert, R. M. (2018). Subcritical water extraction of phenolic and antioxidant constituents from pistachio (*Pistacia vera L.*) hulls. *Food Chemistry*, 253, 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.116>
- Feng, Y.-C., Li, W.-L., He, F.-M., Kong, T.-T., Huang, X.-W., Gao, Z.-H., Lu, N.-H., & Li, H.-L. (2015). Aqueous Two-Phase System as an Effective Tool for Purification of Phenolic Compounds from Fig Fruits (*Ficus carica L.*). *Separation Science and Technology*, 50(12), 1785-1793. <https://doi.org/10.1080/01496395.2015.1014054>
- Fu, X.-Q., Ma, N., Sun, W.-P., & Dang, Y.-Y. (2018). Microwave and enzyme co-assisted aqueous two-phase extraction of polyphenol and lutein from marigold (*Tagetes erecta L.*) flower. *Industrial Crops and Products*, 123, 296-302. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.087>
- Iqbal, M., Tao, Y., Xie, S., Zhu, Y., Chen, D., Wang, X., Huang, L., Peng, D., Sattar, A., Shabbir, M. A. B., Hussain, H. I., Ahmed, S., & Yuan, Z. (2016). Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. *Biological Procedures Online*, 18(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s12575-016-0048-8>
- Kilic, I. H., Sarikurkcu, C., Karagoz, I. D., Uren, M. C., Kocak, M. S., Cilkiz, M., & Tepe, B. (2016). A significant by-product of the industrial processing of pistachios: shell skin – RP-HPLC analysis, and antioxidant and enzyme inhibitory activities of the methanol extracts of *Pistacia vera L.* shell skins cultivated in Gaziantep, Turkey. *RSC Advances*, 6(2), 1203-1209. <https://doi.org/10.1039/C5RA24530C>
- Kumar, S., Brar, R. S., Babu, J. N., Dahiya, A., Saha, S., & Kumar, A. (2021). Synergistic effect of pistachio shell powder and nano-zerovalent copper for chromium remediation from aqueous solution. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(44), 63422-63436. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15285-4>
- Le, P. H., Ho, L. T. T., Le, D. H. T., & Nguyen, V. (2023). Purification of coffee polyphenols extracted from coffee pulps (*Coffea arabica L.*) using aqueous two-phase system. *Molecules*, 28(15), 5922. <https://doi.org/10.3390/molecules28155922>

- Li, Z., Jiang, B., Zhang, D., & Xiu, Z. (2009). Aqueous two-phase extraction of 1,3-propanediol from glycerol-based fermentation broths. *Separation and Purification Technology*, 66(3), 472-478. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2009.02.009>
- Liu, X., Mu, T., Sun, H., Zhang, M., & Chen, J. (2013). Optimisation of aqueous two-phase extraction of anthocyanins from purple sweet potatoes by response surface methodology. *Food Chemistry*, 141(3), 3034-3041. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.119>
- Mertdinç, Z., Aydar, E. F., Kadı, İ. H., Demircan, E., Çetinkaya, S. K., & Özçelik, B. (2023). A new plant-based milk alternative of *Pistacia vera* geographically indicated in Türkiye: Antioxidant activity, in vitro bio-accessibility, and sensory characteristics. *Food Bioscience*, 53, 102731. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102731>
- Maccarronello, A. E., Cardullo, N., Silva, A. M., Di Francesco, A., Costa, P. C., Rodrigues, F., & Muccilli, V. (2024). From waste to bioactive compounds: a response surface methodology approach to extract antioxidants from *Pistacia vera* shells for postprandial hyperglycaemia management. *Food Chemistry*, 443, 138504. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.138504>
- Özbek, H. N., Halahlih, F., Göğüş, F., Koçak Yanık, D., & Azaizeh, H. (2020). Pistachio (*Pistacia vera* L.) Hull as a Potential Source of Phenolic Compounds: Evaluation of Ethanol–Water Binary Solvent Extraction on Antioxidant Activity and Phenolic Content of Pistachio Hull Extracts. *Waste and Biomass Valorization*, 11(5), 2101-2110. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0512-6>
- Phong, W. N., Show, P. L., Chow, Y. H., & Ling, T. C. (2018). Recovery of biotechnological products using aqueous two phase systems. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126(3), 273-281. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.03.005>
- Piness, J. (2010). Physical and Chemical Structural Analysis of Pistachio Shells. *Journal of Undergraduate Materials Research*, 4(0). <https://doi.org/10.21061/jumr.v4i0.1564>
- Seker, G., & Akbas, M. Y. (2024). Evaluation of bioactivities of *Pistacia vera* L. hull extracts as a potential antimicrobial and antioxidant natural source. *Food Science and Technology International*, 30(8), 722-730. <https://doi.org/10.1177/10820132231193478>
- Shen, S., Chang, Z., & Liu, H. (2006). Three-liquid-phase extraction systems for separation of phenol and p-nitrophenol from wastewater. *Separation and Purification Technology*, 49(3), 217-222. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2005.09.017>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>
- Smeriglio, A., Barreca, D., Bellocchio, E., & Trombetta, D. (2017). Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1244-1262. <https://doi.org/10.1111/bph.13630>
- Sonmezdag, A. S., Kelebek, H., & Selli, S. (2017). Characterization and comparative evaluation of volatile, phenolic and antioxidant properties of pistachio (*Pistacia vera* L.) hull. *Journal of Essential Oil Research*, 29(3), 262-270. <https://doi.org/10.1080/10412905.2016.1216899>
- Tatar, F., Tunç, M. T., Dervisoglu, M., Cekmecelioglu, D., & Kahyaoglu, T. (2014). Evaluation of hemicellulose as a coating material with gum arabic for food microencapsulation. *Food Research International*, 57, 168-175. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.022>
- Wang, Y., Wang, S., & Liu, L. (2022). Recovery of natural active molecules using aqueous two-phase systems comprising of ionic liquids/deep eutectic solvents. *Green Chemical Engineering*, 3(1), 5-14. <https://doi.org/10.1016/j.gce.2021.07.007>

- Welna, M., Klimpel, M., & Zyrnicki, W. (2008). Investigation of major and trace elements and their distributions between lipid and non-lipid fractions in Brazil nuts by inductively coupled plasma atomic optical spectrometry. *Food Chemistry*, 111(4), 1012-1015. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.067>
- Willis, R. B. (1998). Improved method for measuring hydrolyzable tannins using potassium iodate. *The Analyst*, 123(3), 435-439. <https://doi.org/10.1039/a706862j>
- Wissal, D., Nahida, J., Emna, C., Maroua, B., Saloua, F., Semia, O., & Wissem, M. (2013). Chemical composition of Lentisk (*Pistacia lentiscus L.*) seed oil. *African Journal of Agricultural Research*, 8(16), 1395-1400. <https://doi.org/10.5897/AJAR11.1837>
- Wu, X., Liang, L., Zou, Y., Zhao, T., Zhao, J., Li, F., & Yang, L. (2011). Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea Roxb.*). *Food Chemistry*, 129(2), 443-453. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.097>
- Xi, J., Zhou, X., Wang, Y., & Wei, S. (2023). Short-chain alcohol/salt-based aqueous two-phase system as a novel solvent for extraction of plant active ingredients: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 138, 74-84. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.06.001>
- Zhang, Z., Liu, F., He, C., Yu, Y., & Wang, M. (2017). Optimization of Ultrasonic-Assisted Aqueous Two-Phase Extraction of Phloridzin from *Malus Micromalus Makino* with Ethanol/Ammonia Sulfate System. *Journal of Food Science*, 82(12), 2944-2953. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13958>
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)
- Zhu, J., Kou, X., Wu, C., Fan, G., Li, T., Dou, J., & Shen, D. (2022). Enhanced extraction of bioactive natural products using ultrasound-assisted aqueous two-phase system: Application to flavonoids extraction from jujube peels. *Food Chemistry*, 395, 133530. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133530>