

## NAR KABUĞUNDAN ANTİMİKROBİYAL VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTEYE SAHİP FENOLİK BİLEŞİKLERİN EKSTRAKSİYON KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU

Tuğba Demir<sup>1\*</sup>, Özlem Akpınar<sup>2</sup>, Haki Kara<sup>3</sup>, Hüseyin Güngör<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü, Sivas, Türkiye

<sup>2</sup>Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Tokat, Türkiye

<sup>3</sup>Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Bölümü, Sivas, Türkiye

Geliş / Received: 06.08.2018; Kabul / Accepted: 24.02.2019; Online baskı / Published online: 01.04.2019

Demir, T., Akpınar, Ö., Kara, H., Güngör, H. (2019). Nar kabuğundan antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteye sahip fenolik bileşiklerin ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu. GIDA (2019) 44 (2): 369-382 doi: 10.15237/gida.GD18081

Demir, T., Akpınar, Ö., Kara, H., Güngör, H. (2019). *Optimization of the extraction conditions of phenolic compounds with antimicrobial and antioxidant activity from pomegranate peel. GIDA (2019) 44 (2): 369-382 doi: 10.15237/gida.GD18081*

### ÖZ

Bu çalışmada, nar kabuğunun fenolik, flavonoid, antioksidan ve antimikrobiyal, özellikleri araştırılmıştır. 17 farklı koşulda elde edilen ekstraktların fenolik ve flavonoid bileşiklerinin ekstraksiyon (sıcaklık, süre ve etanol konsantrasyonu) koşulları, cevap yüzey metodu kullanılarak optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışmalarının sonunda nar kabuğu için 78°C, %33 etanol konsantrasyonu, 113 dakika optimum koşul olarak belirlenmiştir. Elde edilen ekstraktların yüksek oranda antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Optimum koşullarda elde edilen ekstraktların fenolik bileşikleri yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile analiz edilmiş, nar kabuğu ekstraktlarının en fazla kuarsetin ve epikateşin içerdiği bulunmuştur. Sonuçlar, nar kabuklarının gerek gıda gerekse gıda dışı endüstrilerde, önemli bir kaynak olarak da kullanım potansiyeli olabileceğini desteklemektedir.

**Anahtar kelimeler:** Nar kabuğu, fenolik bileşik, flavonoid, antioksidan, antimikrobiyel, HPLC

## OPTIMIZATION OF THE EXTRACTION CONDITIONS OF PHENOLIC COMPOUNDS WITH ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY FROM POMEGRANATE PEEL

### ABSTRACT

In this study, phenolic, flavonoid, antioxidant and antimicrobial properties of pomegranate peel were investigated. The extraction conditions (temperature, time and ethanol concentration) of phenolic and flavonoid compounds obtained under 17 different conditions were optimized using the response surface method. At the end of optimization studies; for pomegranate peels; 78°C, 33% ethanol concentration 113 minutes were determined as the optimum conditions. The obtained extracts were found to have high antioxidant and antimicrobial activity. Phenolic compounds of the extracts obtained under optimum conditions were analyzed by high pressure liquid chromatography and pomegranate peels extracts were found to contain the most quercetin and epicatechin. The results support that pomegranate peels may be potentially useful as an important source of food or non-food industries.

**Keywords:** Pomegranate peel, phenolic compound, flavonoid, antioxidant, antimicrobial, HPLC

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉ tugbilim@hotmail.com

☎ (+90) 346 219 1010/ 2595

☎ (+90) 346 219 1812

## GİRİŞ

*Punicaceae* ailesinin içinde yer alan nar meyvesi; antik dönemlerden bu yana mistik özellikleriyle ön plana çıkan, oldukça farklı özelliklere sahip bir meyvedir. Binlerce yıldır farklı medeniyetler tarafından, halk arasında tedavi amacıyla yaygın olarak kullanılmıştır (Bayram vd., 2010). Son yıllarda, çok yönlü ve besleyici olması nedeniyle popülerlik kazanmıştır. Türkiye’de son yıllarda nar üretiminin 5 kat arttığı gözlenmektedir (TUIK 2017). Nar meyvesi, hastalık riskini azalttığı bildirilen tanen ve diğer biyokimyasallardan özellikle fenolik bileşikler açısından zengindir (Jaiswal ve Porter, 2010).

Son yıllarda, strese bağlı kronik hastalıkların artması, antibiyotiklerin gelişi-güzel kullanımı nedeniyle, insan patojeni bakterilerin ilaçlara karşı direnç kazanması antioksidan ve antimikrobiyel etkili fenolik bileşiklere olan ilgiyi artırmıştır. Fenolik bileşiklerin antioksidan etkisi oksidatif süreci azalttığından, hem insan vücudunda hem de gıda sistemlerinde oksidatif değişiklikleri kontrol etmede önemli bir rol oynamaktadır (Samaranayaka vd., 2011).

Narın fenolik bileşikler açısından da zengin olduğu yapılan birçok çalışma ile belirtilmiştir (Wang vd., 2010; Prakash ve Prakash, 2011; Amyrgialaki vd., 2014; Nahar vd., 2014). Li vd., (2006)’nın nar kabukları üzerine yaptıkları çalışmada kabuk ve posa kısımlarında toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde ve pro-antosiyanidin miktarları ayrı ayrı incelenmiş ve kabuk kısmında bu maddelerin daha yüksek olduğunu (Li vd., 2006) ayrıca antioksidan aktivitenin hem posadan hem de sentetik antioksidanlardan daha üstün olduğu saptanmıştır (Singh vd., 2002; Negi ve Jayaprakasha, 2003; Zoral ve Turgay, 2014). Nar meyvesinin ve kabuğunun antosiyaninler, gallotanenler, hidroksisünamik asit, hidroksibenzoik asitler ile elajitanenler ve gallagil esterler gibi hidrolize edilebilir tanenler içerdiği tespit edilmiştir (Yılmaz ve Usta, 2011). Nar kabuklarının bakterileri gelişimini inhibe ettiği (Scalbert ve Sandos, 2000; Al Zoreky, 2009; Panichayupakaranant vd., 2010; Sweetie vd., 2010) patojen mikroorganizmaların enzim aktivitelerini durdurarak ve hücre

membranlarındaki elektron taşıma sistemini engelleyerek antimikrobiyal etki gösterdiği rapor edilmiştir (Prasanth vd., 2001).

Her ne kadar nar kabukları ile ilgili çalışmalar olsa da, hala fenolik maddelerin etkin bir şekilde ekstraksiyonu ve ekstrakte edilen bu bileşiklerin biyolojik aktivitesinin araştırıldığı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Bu çalışmada nar kabuklarından yüksek miktarda fenolik bileşik ekstraksiyonu için ekstraksiyon koşulları optimize edilmiş ve optimizasyon için istatistiksel ve matematiksel testlerin kombine kullanıldığı cevap yüzey yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde; sistemin verdiği cevabı ve üzerinde etkili olan bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemek için modelleme teknikleri kullanılmakta ve bunun yanında proses değişkenlerinin sistemin cevabında istenen etkiyi gösterdiği seviyelerin bulunması amaçlanmaktadır (Myers vd., 1995).

Bu çalışmanın amacı nar kabuklarından antioksidan ve antimikrobiyel özelliğe sahip fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için uygun koşulları belirlemektir. Nar kabuklarının toplam fenolik ve flavonoid miktarlarının en fazla olacak şekilde ekstraksiyonunu sağlayabilmek amacıyla etanol/su oranı, ekstraksiyon süresi ve sıcaklık bakımından optimize edilmiş, farklı koşullarda elde edilen ekstraktların antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri de incelenmiştir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

Nar (*Punica granatum L.*) kabukları yerel marketlerden temin edilen nar meyvesinden elde edilmiş olup, etüvde (40°C) kurutulmuştur. Kabuklar öğütülerek, +4°C’de analiz edilinceye kadar depolanmıştır. Eosin Metilen Blue (EMB), Chapman Agar, Sabouraud Glikoz Agar, Mueller Hinton Agar (MHA) ve Mueller Hinton Broth (MHB) Merck (Merck KGaA, Almanya) firmasından alınmıştır. *E. coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *S. aureus* (ATCC 29213), *Aspergillus flavus* (ATCC 9170) ve *Aspergillus niger* (ATCC 6275) mikroorganizmaları Cumhuriyet Üniversitesi Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Ampicillin

antimikrobiyal duyarlılık diski Oxoid™ (Thermo Fisher Scientific, ABD)'den alınmıştır. Brownlee Analitik C18 (4.6 x 250mm, 5µm) HPLC kolonu Perkin Elmer'den (ABD) temin edilmiştir. Kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik standartta olup Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD) veya Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) firmalarından alınmıştır.

## Yöntem

### Ekstraksiyon ve Ekstraksiyon Koşullarının Optimizasyonu

Öğütülmüş kabuklar; 10:1 (mL solvent/g bitki) oranında solvent ile karıştırılmış ve farklı sıcaklık ve sürelerde ekstraksiyona tabi tutularak ekstraksiyon koşulları optimize edilmiştir. Ekstraksiyon süresi sonunda örnekler santrüfuj (5000 rpm'de 10 dakika) sonra da filtre edilerek ekstraktlar elde edilmiş ve -18°C'de muhafaza edilmiştir (Cai vd., 2004).

### Deneyel Tasarım ve Cevap Yüzey Metodu (Response Surface Methodology-RSM) ile Ekstraksiyon Koşullarının Optimizasyonu

Bağımsız değişkenler için değer aralıklarının seçiminde literatür taraması sonuçlarından yararlanılarak; fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu etanol konsantrasyonu, sıcaklık ve süre bakımından optimize edilmiştir. Nar kabuğu ekstraksiyonları için denenen bağımsız değişkenlerin değerleri Çizelge 1'de verilmiştir. Toplam fenolik ve toplam flavonoid miktarının yüksek olduğu koşullar optimum ekstraksiyon koşulları olarak seçilmiştir. Optimum koşullar için seçilen model aşağıdaki eşitlikte (Eşitlik 1) açıklanmıştır:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 \quad (\text{Eş. 1})$$

Çizelge 1. Nar kabukları ekstraksiyonu için bağımsız değişkenlerin değerleri

Table 1. Independent variables for the pomegranate peels extraction

|                                       | Bağımsız Değişkenler<br><i>Independent Variables</i> | Sembol<br><i>Symbol</i> | -1 | 0  | +1  |
|---------------------------------------|--|-------------------------|----|----|-----|
| Nar kabuğu<br><i>Pomegranate peel</i> | Etanol (%) <i>Ethanol</i>                            | X <sub>1</sub>          | 25 | 50 | 75  |
|                                       | Süre (dk) <i>Time (min)</i>                          | X <sub>2</sub>          | 20 | 70 | 120 |
|                                       | Sıcaklık (°C) <i>Temperature</i>                     | X <sub>3</sub>          | 40 | 60 | 80  |

Eşitlikte 1'de Y bağımlı değişkenleri (toplam fenolik ve flavonoid) b<sub>0</sub> sabit, b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub> ve b<sub>3</sub> lineer terimleri, b<sub>11</sub>, b<sub>22</sub> ve b<sub>33</sub> kuadratik terimleri ve X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> ve X<sub>3</sub> bağımsız değişkenleri temsil etmektedir. Design-Expert V7 (Stat-Ease Inc., Minneapolis) programı elde edilen dataların regresyon ve grafiksel analizi için kullanılmıştır. Fischer's testi model eşitliğini elde etmek için, Student's t-testi regresyon katsayılarının istatistiksel önemini bulmak için kullanılmıştır.

### Toplam Fenolik Madde Tayini

Ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri Singleton ve Rossi (1965) tarafından tanımlanan yöntemle göre belirlenmiştir. 2 N 100 µL Folin-Ciocalteu fenol ayracı, 100 µL ekstrakt, 2.3 mL saf su ve 1 mL %7 sulu sodyum karbonat çözeltisi karıştırıldıktan sonra, oda sıcaklığında 2 saat bekletilmiş ve süre sonunda örneklerin 750 nm dalga boyundaki absorbansı ölçülmüştür.

Sonuçlar gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak açıklanmıştır.

### Toplam Flavonoid Miktarlarının Belirlenmesi

Nar kabuğu ekstraktlarının toplam flavonoid miktarları Zhishen (1999)'a göre belirlenmiştir. Ekstraktlar %5 NaNO<sub>2</sub>, %10 AlCl<sub>3</sub> ile ve 1 M NaOH ile reaksiyona sokulmuştur. Karışımların 510 nm'de absorbansları okunmuş ve toplam flavonoid miktarları kuarsetin eşdeğeri (KE) olarak ifade edilmiştir.

### Antioksidan Aktivite

**Radikal Süpürme Aktivitesi – DPPH:** 1.95 mL 2.2 difenil-1-pikrihidrazil (DPPH) çalışma çözeltisi ile ve 50 µL ekstraktlar/50 µL Troloks standart çözeltileri karıştırılmış ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda spektrofotometrede 517 nm dalga boyundaki

absorbansları ölçülmüştür (Brand-Williams vd., 1995). Sonuçlar Troloks eşdeğeri (TE) olarak açıklanmıştır.

**Demir (III) İndirgeme Antioksidan Gücü – FRAP:** FRAP yöntemiyle antioksidan kapasite tayini için 300 mM sodyum asetat (pH 3.6) tampon çözeltisi, 20 mM sulu demir (III) klorür çözeltisi ve 10 mM sulu 2.4.6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) çözeltisi hazırlanıp 10/1/1 oranında karıştırılarak FRAP çalışma çözeltisi elde edilmiştir. 2.9 mL FRAP çalışma çözeltisi ile 100 µL ekstraktlar/100 µL Troloks standart çözeltileri karıştırılarak oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiş ve süre sonunda örneklerin absorbansları 593 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Sonuçlar TE olarak açıklanmıştır (Benzie ve Strain, 1996).

**Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi – TEAC:** TEAC yöntemiyle antioksidan kapasite tayini için 7 mM sulu ABTS [2.2'-Azino-bis (3-etilbenzothiazolin-6-sulfonik asit)] çözeltisi ve 2.45 mM sulu potasyum persülfat çözeltisi karışımı (1/1, v/v) 16 saat süreyle oda sıcaklığında karanlık bir ortamda reaksiyona bırakılmış, ABTS radikal katyonu (ABTS'+) stok çözeltisi elde edilmiştir. ABTS'+ çalışma çözeltisi, 2.9 ml, 100 µL ekstrakt ile karıştırılarak oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiş ve süre sonunda absorbansı 734 nm dalga boyundaki ölçülmüştür. Sonuçlar TE olarak açıklanmıştır (Re vd., 1999).

#### Antimikrobiyel Aktivite

Antimikrobiyel aktivite testlerinde kullanılan mikroorganizmaların (*E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *A. flavus* ve *A. niger*) üretiminde *E. coli* ve *E. faecalis* için EMB agar, *S. aureus* için Chapman agar (Staphylococcus Selective Agar), küfler için ise Sabouraud glikoz agar kullanılmıştır.

#### Disk Difüzyon Yöntemi

Ekstraktların antimikrobiyel aktiviteleri Ebrahimabadi vd. (2010), tarafından belirtilen disk difüzyon yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Mikroorganizmaların (Bakteri ve Küf) katı besiyerlerinde üretilmiş 18-24 saatlik taze kültürlerinden alınan koloniler serum fizyolojik içinde süspanse edilip ve 0.5 McFarland

bulanıklık tüpüyle kıyaslanarak  $10^8$  kob/mL'lik dilüsyonları hazırlanmıştır. MHA içeren petrilere bakteri dilüsyonundan 100 µl ekim yapılmıştır. Elde edilen ekstraktlar (direkt kullanılmıştır) 6 mm çapındaki steril boş disklerle emdirilmiş, diskler petrilere yerleştirildikten sonra bakteriler 37°C'de, küfler ise 30°C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda inhibisyon zonlarının çapları ölçülmüştür. Kontrol olarak ekstraksiyon solventi, su ve standart antibiyotik disk olan Ampicillin kullanılmıştır.

#### Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Tayini

Ekstraktların minimum inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) değerlerini belirlemede Oskay vd. (2007), tarafından açıklanan makrobroth yöntemi esas alınmış ve modifiye edilerek kullanılmıştır. Hazırlanan her bir mikroorganizma kültürlerinden (18 saatlik) 25 µL ( $1 \times 10^8$  kob/mL), 3 mL MHB ve 10 mL farklı dilüsyonlarda hazırlanan ekstraktlara (30 mg bitki/mL-0.46 mg bitki/ mL) aktarılmıştır. Daha sonra bakteriler 37°C'de, küfler ise 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra üremenin görülmediği tüplerdeki en düşük konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlenmiştir. Ayrıca bulanıklık oluşmayan tüplerden 50 µL alınarak MHA'ya ekim yapılmış, büyüme olup olmadığı kontrol edilmiş ve bu şekilde Minimum Bakterisit Konsantrasyonu (MBK) da belirlenmiştir. Kontrol olarak ampicillin kullanılmıştır.

#### Fenolik Bileşiklerin Tanımlanması

Optimum koşullarda hazırlanan ekstraktların fenolik bileşik içerikleri kantitatif olarak DAD detektöre (Diode-Array Detektör; Perkin Elmer Model Flexar, USA) sahip Perkin Elmer yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) sisteminde analiz edilmiştir. Sistemde kolon olarak Brownlee Analitik C18 (4.6 x 250mm, 5µm) kolonu (Perkin Elmer) kullanılmıştır. Ortofosforik asit ile pH'sı 2.5'e ayarlanan su Solvent A, asetonitril ise Solvent B olarak kullanılmıştır ve kullanılan solvent sistemi Çizelge 2'de verilmiştir. Örnekler 25°C'de 0.8 mL/dk akış hızı, asetonitril-ortofosforik ile asitlendirilen su gradient ile kolondan elut edilmiştir.

Çizelge 2. HPLC’de kullanılan solvent sistemi  
Table 2. Solvent system used in HPLC

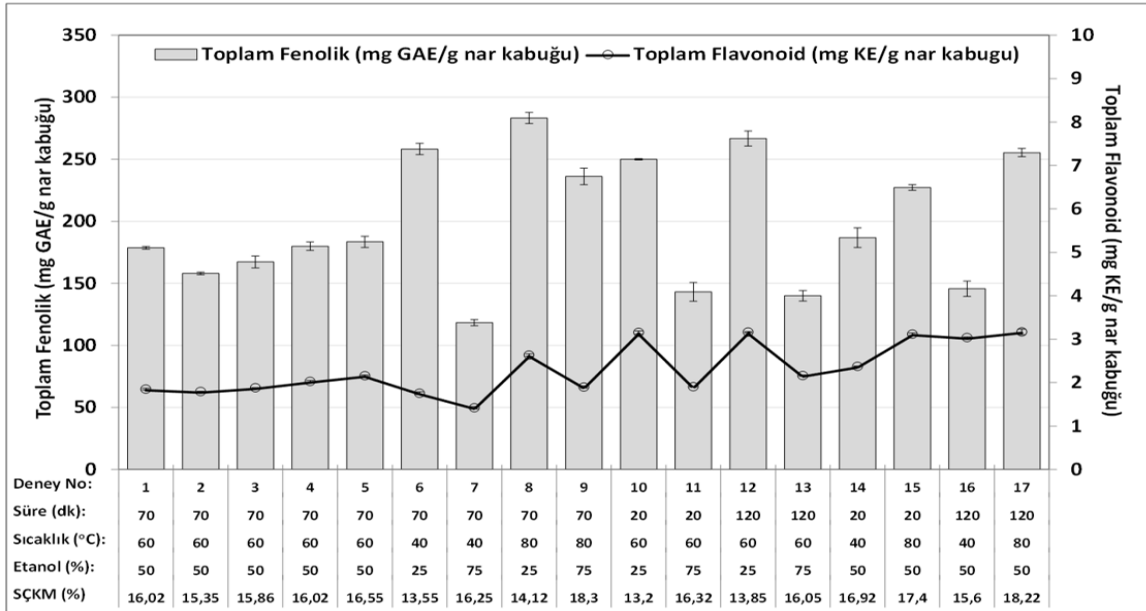
|   | Solvent A<br><i>Solvent A</i> | Solvent B<br><i>Solvent B</i> | Süre (dk)<br><i>Time (min)</i> |
|---|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 1 | 100-91                        | 0-9                           | 12                             |
| 2 | 91-87                         | 9-13                          | 8                              |
| 3 | 87-67                         | 13-33                         | 12                             |
| 4 | 67-57                         | 33-43                         | 10                             |
| 5 | 57                            | 43                            | 18                             |
| 6 | 100                           | 0                             | 10                             |

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### Toplam Fenolik ve Flavonoid Bileşiklerin Ekstraksiyonu

Çalışmada incelenen nar kabuklarının farklı sıcaklık, süre ve etanol konsantrasyonlarından oluşan, deneysel tasarım sonucu elde edilen 17 farklı koşulda ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstraktlarda toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarları belirlenmiştir ve sonuçlar Şekil 1’de sunulmuştur. Nar kabuğu ekstraktlarının toplam fenolik ve toplam flavonoid sonuçları incelendiğinde, etanol konsantrasyonunun artışı, ekstraksiyonlarda elde edilen toplam fenolik ve flavonoid madde miktarlarını azaltırken, sıcaklık ise artırmıştır.

Ekstraksiyon süresinin ise elde edilen ekstraktların toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriği üzerine etkisi önemli olarak tespit edilmemiştir. Toplam fenolik madde miktarında en yüksek değer 283.28 mg GAE/g nar kabuğu olarak Deney 8’de (%25, 80°C, 70 dk) gözlemlenmiştir, en fazla toplam flavonoid madde miktarı ise 3.17 mg KE/g nar kabuğu olarak Deney 17’de (%50, 80°C, 120 dk) elde edilmiştir. Nar kabuğu için bağımsız değişkenlerden etanol konsantrasyonunun artışı, ekstraksiyonlarda elde edilen toplam fenolik ve flavonoid madde miktarlarını azaltırken, sıcaklık ile artırmıştır. Ekstraksiyon süresinin ise elde edilen ekstraktların toplam fenolik ve flavonoid içeriği üzerine etkisi önemli olarak tespit edilmemiştir. Literatürde nar kabuğunun süre ve sıcaklık değişkenlerinin, ekstrakte edilen toplam fenolik madde miktarına etkisinin araştırıldığı bir çalışmada; en yüksek verimin etanol ile 45°C’de 60 dakikada elde edildiği bildirilmiştir (59.2 mg GAE/g nar kabuğu) (Pan vd., 2011). Farklı bir çalışmada ise nar kabuklarının değişen etanol konsantrasyonlarında ve farklı sürelerde elde edilen ekstraktlarının toplam fenolik madde verimleri karşılaştırılmış, en yüksek verim %63 etanol konsantrasyonunda 22 dk da, %14.8 olarak tespit edilmiştir (25°C) (Li vd., 2006).



SÇKM: Suda Çözünür Kuru Madde

Şekil 1. Nar kabuğu ekstraktlarının toplam fenolik ve flavonoid madde içerikleri

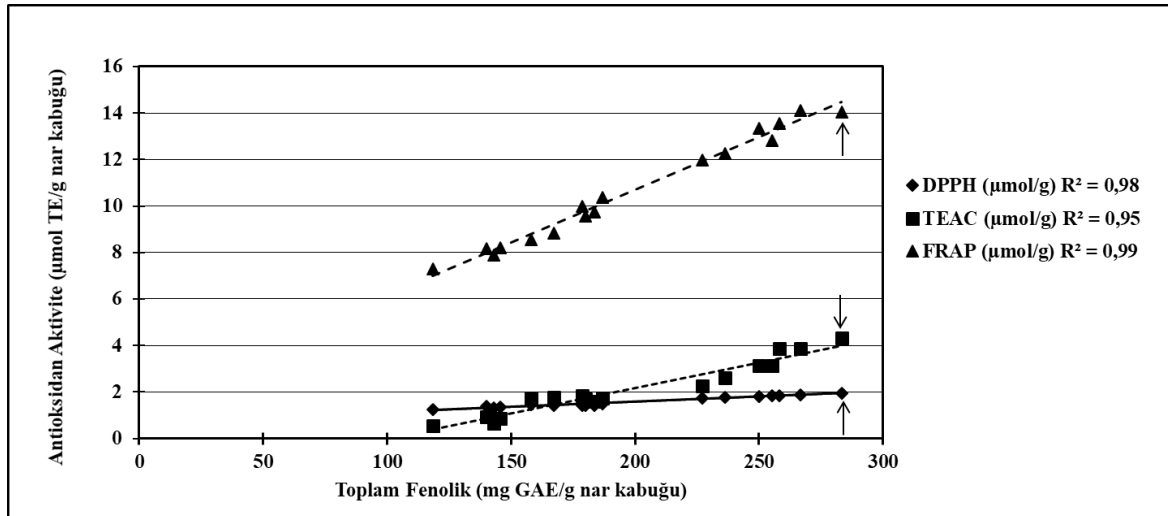
Figure 1. Total phenolic and flavonoid content of pomegranate peel extracts

Bir başka çalışmada da en yüksek oranda fenolik bileşikler 28.29 mg GAE/g nar kabuğu ile %64 etanol konsantrasyonunda, 60°C'de, 25 dk da elde edilmiştir (Wang vd., 2008). Sonuçlar literatür bulguları ile kıyaslandığında, daha yüksek sıcaklık ve sürede, buna karşın daha düşük etanol konsantrasyonu ile elde edilen nar kabuğu ekstraktlarında en yüksek verime ulaşılmıştır.

### Ekstraktların Antioksidan Özellikleri

İncelenen nar kabuğu ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri, radikal süpürme aktivitesi-DPPH, TEAC ve FRAP yöntemleri ile ölçülmüştür. Antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerin yapıları ve özellikleri birbirinden çok farklı olduğundan,

tek bir yöntem ile ölçüm yetmemektedir. Bu nedenle birden fazla ölçüm yöntemi ile antioksidan aktivitenin değerlendirilmesi gerekmektedir (MacDonald vd., 2006). Nar kabuklarının farklı koşullarda elde edilen ekstraktlarının, en yüksek antioksidan aktivitesi Deney 8'de (%25, 80°C, 70 dk) gözlemlenmiştir ve DPPH, FRAP ve TEAC ile ölçülen antioksidan aktiviteleri sırasıyla 1.95 µmol TE/g, 14.03 µmol TE/g, 4.32 µmol TE/g nar kabuğu olarak bulunmuştur. Denenen tüm koşullarda nar kabuklarının antioksidan aktivitelerinin yüksek olduğu ve elde edilen ekstraktların; fenolik madde içerikleri ile antioksidan aktiviteleri arasında da yüksek korelasyon görülmüştür ( $R^2 > 0.9$ ) (Şekil 2).



Şekil 2. Nar kabuğu ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ile antioksidan aktiviteleri arasındaki ilişki

Figure 2. The relation between total phenolic content and antioxidant activity of pomegranate peel extracts

### Ekstraktların Antimikrobiyel Özellikleri

Literatürde pek çok bitkinin patojenlere karşı oluşturduğu bir seri reaksiyon sonucunda antimikrobiyel aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir. Fenolik bileşikler ve türevleri, bitkilerin savunma sisteminde önemli bileşiklerdir ve patojen bir çok mikroorganizmanın gelişmelerini durdurucu yönde etki etmektedir (Araújo vd., 2017). Mikroorganizma gelişmesini durdurmak ve daha sonrasında oluşabilecek ikincil bir enfeksiyonun önüne geçebilmek, bitkisel kökenli antimikrobiyel ajanlarda beklenen özelliklerdir (Farag vd., 2015). Bu çalışmada, gıda kaynaklı çeşitli enfeksiyonlara (bakteriler) ve

intoksikasyonlara (küfler) neden olan birçok bakteri ve küf arasından en önemli ve en sık karşılaşılan mikroorganizmalar seçilmiştir. Bakterilerin seçiminde kendi aralarında farklılık gösteren gruplar göz önünde bulundurulmuştur (*S. aureus*; Gram (+), fakültatif anaerob, hareketsiz kok; *E. faecalis*; Gram (+), aerobik, hareketsiz kok; *E. coli*; Gram (-), fakültatif anaerob, hareketli basil; *A. niger*; Aflatoksin B<sub>2</sub>; *A. flavus*; Aflatoksin B<sub>1</sub>) (Anonim, 2016, Girgin vd., 2001).

Nar kabuğu ekstraktlarının seçilen bakteriler ve küfler için en yüksek antibakteriyel ve antifungal aktivitesi, Deney 8'de (%25, 80°C, 70 dk)

saptanmış, inhibisyon zon çapları ise; sırasıyla *S. aureus* için 23.0 mm, *E. faecalis* için 18.5 mm, *E. coli* için 16.5 mm, küflerde; *A. niger* için 20.5 mm ve *A.flavus* için 17.5 mm olarak bulunmuştur. MİK

ler ise Deney 8’de sırasıyla 1.87 mg/mL, 3.75 mg/mL, 3.75 mg/mL, 1.87 mg/mL, ve 3.75 mg/mL olarak bulunmuştur (Çizelge 3).

Çizelge 3. Nar kabuğu ekstraktlarının minimum inhibisyon ve minimum bakterisit konsantrasyonları  
Table 3. Minimum inhibition and minimum bactericidal concentrations of pomegranate peel extracts

| Deney Numarası | Etanol (%) | Sıcaklık (°C) | Süre (dk) | <i>S. aureus</i><br>(mg bitki /mL) |       | <i>E.fecalis</i><br>(mg bitki /mL) |        | <i>E.coli</i><br>(mg bitki /mL) |        | <i>A.niger</i><br>(mg bitki /mL) |        | <i>A.flavus</i><br>(mg bitki /mL) |        |
|----------------|------------|---------------|-----------|------------------------------------|-------|------------------------------------|--------|---------------------------------|--------|----------------------------------|--------|-----------------------------------|--------|
|                |            |               |           | MİK                                | MBK   | MİK                                | MBK    | MİK                             | MBK    | MİK                              | MBK    | MİK                               | MBK    |
| 1              | 50         | 60            | 70        | 3.75±0.00                          | 3.75- | 15.00±0.00                         | 15.00- | 15.00±0.00                      | 15.00- | 7.50±0.00                        | 7.50-  | 15.00±0.00                        | 15.00- |
| 2              | 50         | 60            | 70        | 3.75±0.00                          | 3.75- | 15.00±0.00                         | 15.00- | 15.00±0.00                      | 15.00- | 7.50±0.00                        | 7.50-  | 15.00±0.00                        | 15.00- |
| 3              | 50         | 60            | 70        | 3.75±0.00                          | 3.75- | 15.00±0.00                         | 15.00- | 15.00±0.00                      | 15.00- | 7.50±0.00                        | 7.50-  | 15.00±0.00                        | 15.00- |
| 4              | 50         | 60            | 70        | 3.75±0.00                          | 3.75- | 15.00±0.00                         | 15.00- | 15.00±0.00                      | 15.00- | 7.50±0.00                        | 7.50-  | 15.00±0.00                        | 15.00- |
| 5              | 50         | 60            | 70        | 3.75±0.00                          | 3.75- | 15.00±0.00                         | 15.00- | 15.00±0.00                      | 15.00- | 7.50±0.00                        | 7.50-  | 15.00±0.00                        | 15.00- |
| 6              | 25         | 40            | 70        | 1.87±0.00                          | 1.87- | 3.75±0.00                          | 3.75-  | 7.50±0.00                       | 7.50-  | 3.75±0.00                        | 3.75-  | 3.75±0.00                         | 3.75-  |
| 7              | 75         | 40            | 70        | 7.50±0.00                          | 7.50- | 15.00±0.00                         | 15.00- | 15.00±0.00                      | 15.00- | 15.00±0.00                       | 15.00- | 15.00±0.00                        | 15.00- |
| 8              | 25         | 80            | 70        | 1.87±0.00                          | 1.87- | 3.75±0.00                          | 3.75-  | 3.75±0.00                       | 3.75-  | 1.87±0.00                        | 1.87-  | 3.75±0.00                         | 3.75-  |
| 9              | 75         | 80            | 70        | 3.75±0.00                          | 3.75- | 7.50±0.00                          | 7.50-  | 7.50±0.00                       | 7.50-  | 3.75±0.00                        | 3.75-  | 3.75±0.00                         | 3.75-  |
| 10             | 25         | 60            | 20        | 3.75±0.00                          | 3.75- | 7.50±0.00                          | 7.50-  | 7.50±0.00                       | 7.50-  | 3.75±0.00                        | 3.75-  | 3.75±0.00                         | 3.75-  |
| 11             | 75         | 60            | 20        | 7.50±0.00                          | 7.50- | 15.00±0.00                         | 15.00- | 15.00±0.00                      | 15.00- | 15.00±0.00                       | 15.00- | 15.00±0.00                        | 15.00- |
| 12             | 25         | 60            | 120       | 1.87±0.00                          | 1.87- | 3.75±0.00                          | 3.75-  | 3.75±0.00                       | 3.75-  | 1.87±0.00                        | 1.87-  | 3.75±0.00                         | 3.75-  |
| 13             | 75         | 60            | 120       | 3.75±0.00                          | 3.75- | 15.00±0.00                         | 15.00- | 15.00±0.00                      | 15.00- | 7.50±0.00                        | 7.50-  | 15.00±0.00                        | 15.00- |
| 14             | 50         | 40            | 20        | 3.75±0.00                          | 3.75- | 7.50±0.00                          | 7.50-  | 7.50±0.00                       | 7.50-  | 3.75±0.00                        | 3.75-  | 7.50±0.00                         | 7.50-  |
| 15             | 50         | 80            | 20        | 3.75±0.00                          | 3.75- | 7.50±0.00                          | 7.50-  | 7.50±0.00                       | 7.50-  | 3.75±0.00                        | 3.75-  | 7.50±0.00                         | 7.50-  |
| 16             | 50         | 40            | 120       | 7.50±0.00                          | 7.50- | 15.00±0.00                         | 15.00- | 15.00±0.00                      | 15.00- | 7.50±0.00                        | 7.50-  | 15.00±0.00                        | 15.00- |
| 17             | 50         | 80            | 120       | 1.87±0.00                          | 1.87- | 7.50±0.00                          | 7.50-  | 7.50±0.00                       | 7.50-  | 3.75±0.00                        | 3.75-  | 3.75±0.00                         | 3.75-  |
|                | Ampicillin |               |           | 0.48±0.00                          | 0.48  | 0.48±0.00                          | 0.48-  | 0.48±0.00                       | 0.48-  | 0.96±0.00                        | 0.48-  | 0.96±0.00                         | 0.96-  |

Üreme yok

Ekstraktların fenolik madde içerikleri ile antimikrobiyel aktiviteleri arasındaki ilişki Şekil 3’de sunulmuştur ve incelenen nar kabuğu ekstraktlarının farklı mikroorganizmalara karşı gösterdikleri antimikrobiyel aktivite ile fenolik madde içerikleri arasında yüksek korelasyon tespit edilmiştir ( $R^2 > 0.87$ ).

### İstatistiksel Modelleme

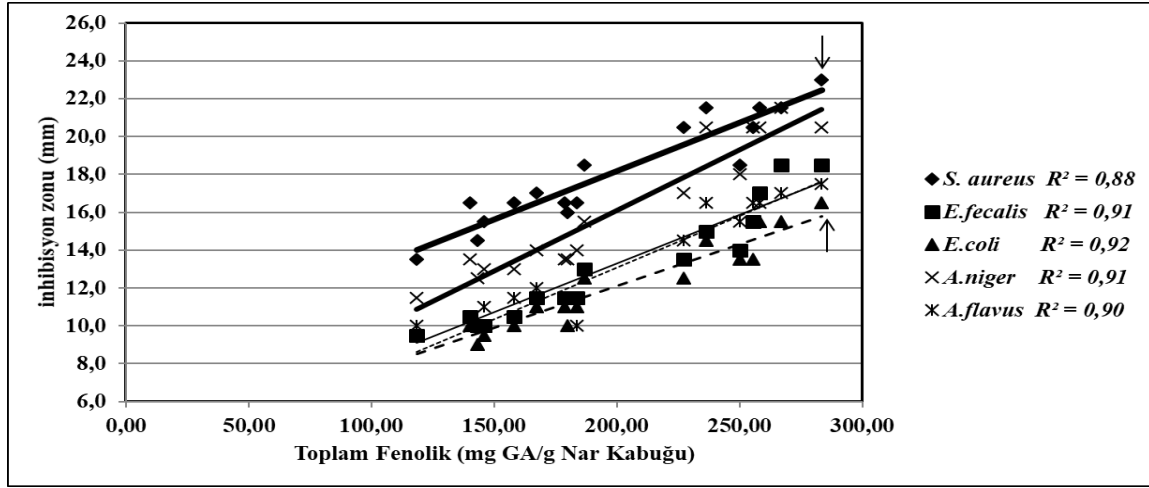
Yüksek oranda fenolik ve flavonid bileşiklerin ekstraksiyonu için; nar kabukları sıcaklık, süre ve etanol konsantrasyonu bakımından 17 farklı koşulda ekstrakte edilmiştir. İncelenen koşullara göre nar kabuklarının fenolik ve flavonoid miktarlarının oldukça farklı olduğundan (Şekil 1), elde edilen verilerin optimize edilmesi gerekmektedir. Optimizasyon sonucu elde edilen

verilere göre kuadratik model eşitlik 2 ve 3’te sunulmuştur.

$$Y_1 = 173.48 - 52.58X_1 + 36.61X_2 + 0.09X_3 + 23.37X_1^2 + 27.16X_2^2 + 3.14X_3^2 + 23.18X_1X_2 - 4.99X_1X_3 + 17.33X_2X_3 \quad (Eş.2)$$

$$Y_2 = 1.94 - 0.41X_1 + 0.28X_2 + 0.12X_3 - 0.17X_1^2 + 0.16X_2^2 + 0.82X_3^2 - 0.1X_1X_2 + 0.05X_1X_3 - 0.15X_2X_3 \quad (Eş. 3)$$

ANOVA ile değerlendirilen toplam fenolik ve flavonoid miktarları için regresyon katsayıları sırasıyla 0.98 ve 0.95 olarak bulunmuş olup, her iki model de uyum eksikliği göstermemiş ve regresyon %95 güven aralığında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4 ve Çizelge 5).



Şekil 3. Nar kabuğu ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ile antimikrobiyal aktiviteleri arasındaki ilişki

Figure 3. The relationship between the total phenolic content and the antimicrobial activity of pomegranate peel extracts

Çizelge 4. Nar kabuğundan elde edilen toplam fenolik maddeler için ANOVA çizelgesi

Table 4. ANOVA table for the total phenolic substances obtained from the pomegranate peel

| Kaynak<br>Source              | Kareler toplamı<br>Sum of squares | Serbestlik derecesi<br>Degree of freedom | Karelerin ortalaması<br>Average of squares | F-değeri<br>F-value | p-değeri<br>p-value |
|-------------------------------|-----------------------------------|--|--|---------------------|---------------------|
| Model<br>Model                | 42147.99                          | 9  | 4683.11                                    | 40.05               | < 0.0001            |
| Residual<br>Residual          | 818.59                            | 7  | 116.94                                     |                     |                     |
| Uyum eksikliği<br>Lack of fit | 368.06                            | 3  | 122.69                                     | 1.09                | 0.4496              |
| Saf hata<br>Pure error        | 450.54                            | 4  | 112.63                                     |                     |                     |
| Toplam<br>Total               | 42966.58                          | 16                                       |  |                     |                     |

R<sup>2</sup>: 0.98, Adj R<sup>2</sup>: 0.96, C.V. % : 5.44

Çizelge 5. Nar kabuğundan elde edilen toplam flavonoid maddeler için ANOVA çizelgesi

Table 5. ANOVA table for the total flavonoids substances obtained from pomegranate peel

| Kaynak<br>Source              | Kareler toplamı<br>Sum of squares | Serbestlik derecesi<br>Degree of freedom | Karelerin ortalaması<br>Average of squares | F-değeri<br>F-value | p-değeri<br>p-value |
|-------------------------------|-----------------------------------|--|--|---------------------|---------------------|
| Model<br>Model                | 5.32                              | 9  | 0.59                                       | 13.55               | 0.0012              |
| Residual<br>Residual          | 0.31                              | 7  | 0.04                                       |                     |                     |
| Uyum eksikliği<br>Lack of fit | 0.22                              | 3  | 0.07                                       | 3.20                | 0.1452              |
| Saf hata<br>Pure error        | 0.09                              | 4  | 0.02                                       |                     |                     |
| Toplam<br>Total               | 5.62                              | 16                                       |  |                     |                     |

R<sup>2</sup>: 0.95. Adj R<sup>2</sup>: 0.88. C.V. % : 8.99



Şekil 4 ve 5'te nar kabuğundan elde edilen toplam fenolik ve flavonoid madde miktarına sıcaklık, süre ve konsantrasyonun etkisini gösteren cevap yüzey ve kontür grafikleri gösterilmiştir. Şekil 4A ve 5A'da 70 dakika ekstraksiyon sonucunda sıcaklık ve çözücü konsantrasyonun fenolik ve flavonoid madde elde edilmesindeki etkisi sunulmuştur. Buna göre maksimum fenolik maddeye (290 mg GAE/g nar kabuğu) 80°C'de %25 etanol konsantrasyonunda, maksimum flavonoid maddeye (2.72 mg KE/g nar kabuğu) ise 25 dakikada 80°C'de %25 etanol konsantrasyonunda erişilmiştir. Şekil 4B ve 5B'de sıcaklık 60°C'de sabit tutulduğunda etanol konsantrasyonunun ve sürenin fenolik ve flavonoid madde elde edilmesindeki etkisi görülmektedir. Maksimum fenolik maddeye (258 mg GAE/g nar kabuğu) %25 konsantrasyonunda ve 120 dakikada, maksimum flavonoid maddeye (3.07 mg KE/g nar kabuğu) ise %25 konsantrasyonunda ve 120 dakikada erişilmiştir (3.07 mg KE/g nar kabuğu). Şekil 4C ve 5C %50 etanol konsantrasyonu sabit tutulduğunda, maksimum fenolik ve flavonoid madde

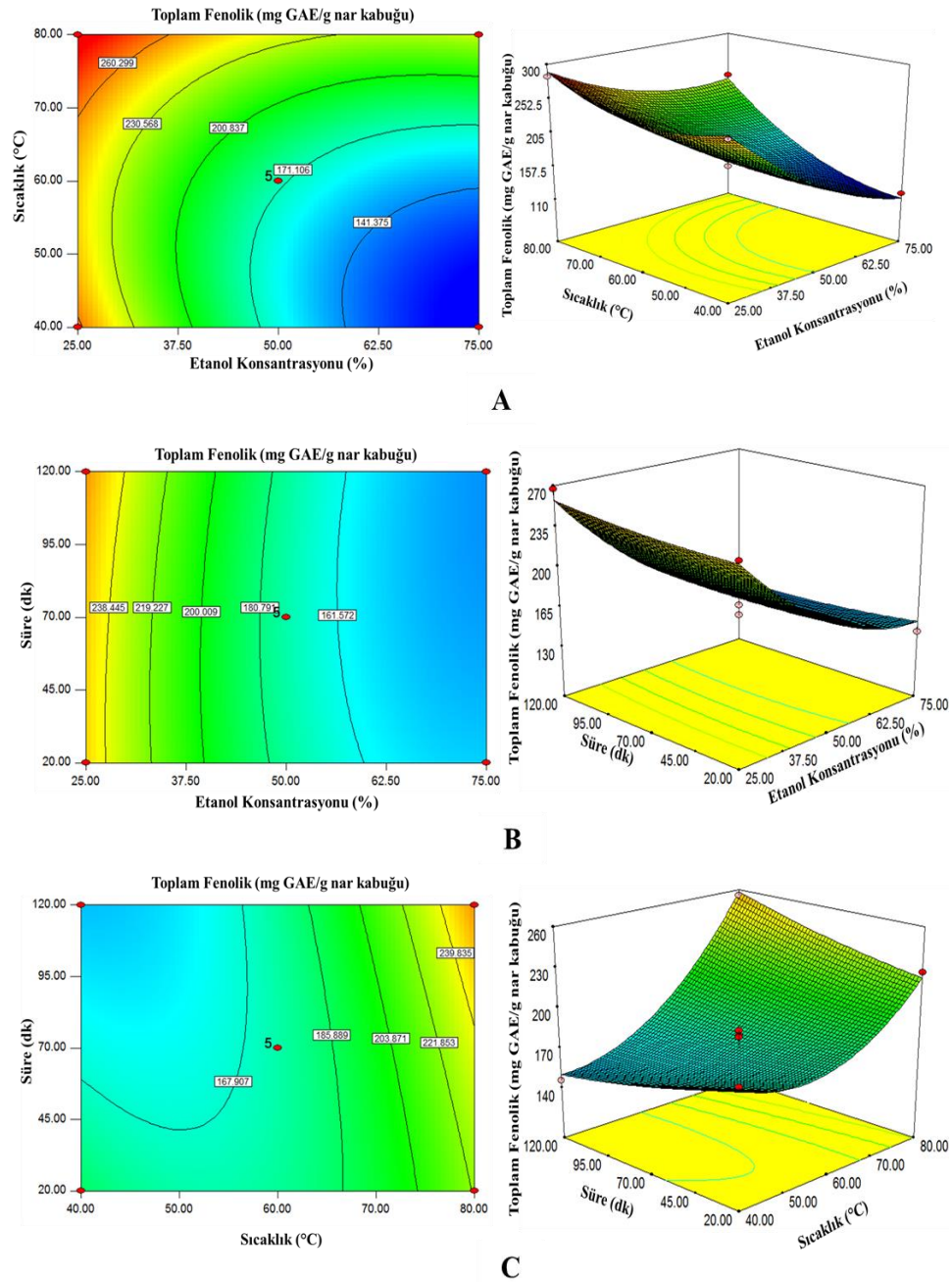
miktarlarının 258 mg GAE/g nar kabuğu ve 3.23 mg KE/g nar kabuğu olarak 80°C sıcaklıkta 120 dakika ekstraksiyon süresi sonunda olduğunu göstermektedir.

Fenolik ve flavonoid bileşikleri yüksek oranda üretmek için ekstraksiyon koşulları optimize edilmiş; fenolik bileşikler miktarının 250 mg GAE/g nar kabuğundan fazla ve flavonoid bileşikler miktarının 1,42 mg KE/g nar kabuğundan fazla olması için yapılan optimizasyon çalışmalarında program tarafından önerilen koşullar arasından %33 etanol, 78°C ve 113 dakika optimum koşul olarak seçilmiştir (Çizelge 6). Bu koşullarda yapılan deneyler sonucunda toplam fenolik miktarı ve flavonoid miktarı sırasıyla 319.25 mg GAE/g nar kabuğu ve 3.27 mg KE/g nar kabuğu olarak bulunmuştur. Program ise aynı koşullar altında, toplam fenolik miktarını 280 mg GAE/g nar kabuğu ve flavonoid miktarını ise 3.16 mg KE/g nar kabuğu olarak tahmin etmiştir. Deneysel verilerden elde edilen bulgular, programın tahmin ettiği değerlerden yüksek olarak bulunmuştur.

Çizelge 6. Optimizasyon koşulları ve optimum koşullarda elde edilen nar kabuğu ekstraktların toplam fenolik, flavonoid, antioksidan aktivite sonuçları

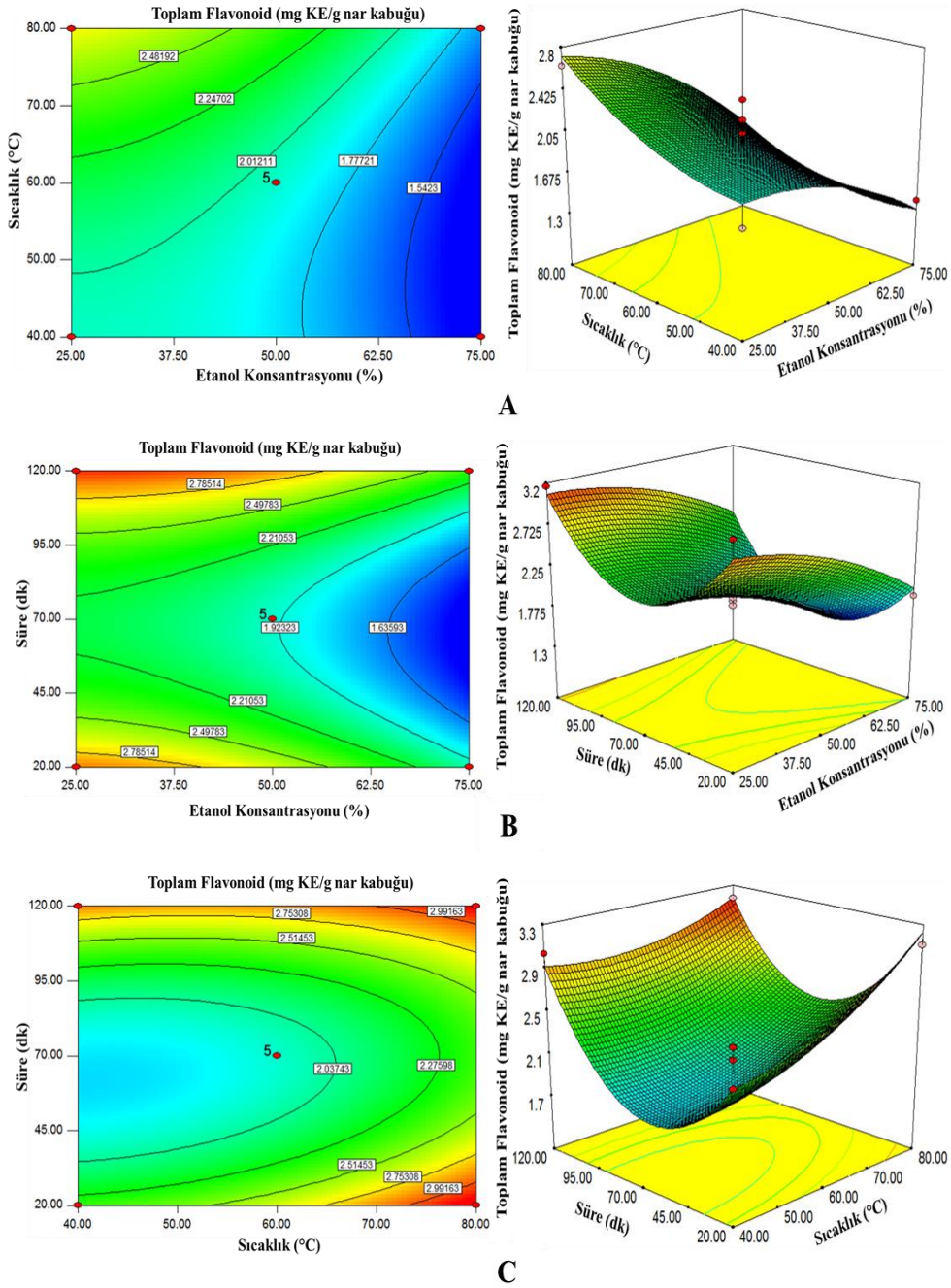
Table 6. Optimum conditions of the pomegranate peel extraction and total phenolic, flavonoid, antioxidant activity results of the pomegranate peel extract obtained under optimum conditions

|   |   |              |
|---|---|--------------|
| Optimum koşulları<br><i>Optimum conditions</i>  | Etanol (%)                                    | 33           |
|   | Sıcaklık (°C)                                 | 78           |
|   | Süre (dakika)                                 | 113          |
| Optimum koşullarda program tarafından tahmin edilen toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları<br><i>Values estimated by the program at optimum conditions</i>                | Tahmini Toplam Fenolik (mg GAE/g nar kabuğu)  | 280.00       |
|   | Tahmini Toplam Flavonoid (mg KE/g nar kabuğu) | 3.16         |
| Optimum koşullarda gerçekleştiren ekstraksiyon sonucu toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları<br><i>Values obtained at the end of the extraction at optimum conditions</i> | Toplam Fenolik (mg GAE/g nar kabuğu)          | 319.25±4.40  |
|   | Toplam Flavonoid (mg KE/g nar kabuğu)         | 3.27±0.04    |
| Optimum ekstraksiyon koşullarında elde edilen ekstraktın antioksidan aktiviteleri<br><i>Values obtained at the end of the extraction at optimum conditions</i>                  | DPPH (µmol TE/L)                              | 182.62±1.30  |
|   | FRAP (µmol TE/L)                              | 1288.39±5.73 |
|   | TEAC (µmol TE/L)                              | 305.92±7.23  |



Şekil 4. Nar kabuğundan fenolik bileşik ekstraksiyonu üzerine sıcaklık, zaman ve etanol konsantrasyonunun etkisini gösteren cevap yüzey grafikleri. A: 70 dakikada, sıcaklık ve etanol konsantrasyonunun fenolik madde üzerine etkisi. B: 60°C sıcaklıkta, etanol konsantrasyonu ve sürenin toplam fenolik madde üzerine etkisi. C: %50 etanol konsantrasyonunda sıcaklık ve sürenin fenolik madde üzerine etkisi.

Figure 4. The response surfaces plots showing the effect of temperature, time and ethanol concentration on the phenolic compound extraction from pomegranate peel. A: The effect of the temperature and the ethanol concentration on phenolic content for 70 minutes. B: The effect of the concentration of ethanol and time on total phenolic content at 60°C. C: The effect of the temperature and the time on total phenolic content at 50% ethanol concentration.



Şekil 5. Nar kabuğundan flavonoid bileşik ekstraksiyonu üzerine sıcaklık, süre ve konsantrasyonun etkisini gösteren cevap yüzey grafikleri. A: 70 dakikada, sıcaklık ve etanol konsantrasyonunun flavonoid madde üzerine etkisi. B: 60°C sıcaklıkta etanol konsantrasyonu ve sürenin toplam flavonoid madde üzerine etkisi. C: %50 etanol konsantrasyonunda sıcaklık ve sürenin flavonoid madde üzerine etkisi. *Figure 5. The response surfaces plots showing the effect of temperature, time and ethanol concentration on the flavonoid compound extraction from pomegranate peel. A: The effect of the temperature and the ethanol concentration on flavonoid content for 70 minutes. B: The effects of ethanol concentration and the time on total flavonoid content at 60°C. C: The effect of temperature and time on total flavonoid content at 50% ethanol concentration.*

Optimum koşullarda elde edilen ekstraktların antioksidan ve antimikrobiyel aktiviteleri ölçülmüş ve sonuçlar Çizelge 6 ve Çizelge 7'de gösterilmiştir. Optimum koşullarda elde edilen nar kabuğu ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri; DPPH: 182.62 µmol TE/L, FRAP: 1288.39 µmol TE/L ve TEAC: 305.92 µmol TE/L olduğu belirlenmiştir. Antimikrobiyel aktivite bakımından da nar kabuğu ekstraktı seçilen mikroorganizmaların gelişimini yüksek oranda engellemiştir (Çizelge 7). Ekstraktın antibakteriyel

etkinliği, Gram (+) bakteriler üzerinde daha duyarlı olduğu gözlemlenmişken, antifungal etki ise *A. niger*'e karşı daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 7). Çizelge 7'de optimum ekstraksiyon koşullarında elde edilen ekstraktların MİK sonuçları, seçilen bakteriler ve küfler için disk difüzyon yönteminde bulunan sonuçlara paralel olarak bulunmuştur. Optimum koşullarda elde edilen ekstraktlarda yüksek antioksidan aktivite gösteren ekstraktlar, yüksek antimikrobiyel aktivite göstermişlerdir.

Çizelge 7. Optimum koşullarda elde edilen ekstraktların farklı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel aktiviteleri

Table 7. Antimicrobial activities of extract obtained under optimum conditions against different microorganisms

|                    |                 | Nar Kabuğu<br><i>Pomegranate Peel</i> | Ampicillin<br><i>Ampicillin</i> |
|--------------------|-----------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| <i>S. aureus</i>   | İnhibisyon zonu | 20.00±0.00                            | 26.00                           |
|                    | MİK (mg/mL)     | 3.75±0.00                             | 0.48±0.00                       |
|                    | MBK (mg/mL)     | 3.75- Üreme yok                       | 0.48- Üreme yok                 |
| <i>E. faecalis</i> | İnhibisyon zonu | 16.00±0.71                            | 24.00                           |
|                    | MİK (mg/mL)     | 3.75±0.00                             | 0.48±0.00                       |
|                    | MBK (mg/mL)     | 3.75- Üreme yok                       | 0.48- Üreme yok                 |
| <i>E. coli</i>     | İnhibisyon zonu | 14.50±0.71                            | 23.50                           |
|                    | MİK (mg/mL)     | 7.50±0.00                             | 0.96±0.00                       |
|                    | MBK (mg/mL)     | 7.50- Üreme yok                       | 0.96- Üreme yok                 |
| <i>A. niger</i>    | İnhibisyon zonu | 18.00±0.71                            | 25.50                           |
|                    | MİK (mg/mL)     | 3.75±0.00                             | 0.96±0.00                       |
|                    | MBK (mg/mL)     | 3.75- Üreme yok                       | 0.96- Üreme yok                 |
| <i>A. flavus</i>   | İnhibisyon zonu | 16.00±0.00                            | 25.00                           |
|                    | MİK (mg/mL)     | 3.75±0.00                             | 0.96±0.00                       |
|                    | MBK (mg/mL)     | 3.75- Üreme yok                       | 0.96- Üreme yok                 |

Disk Çapı:6mm, %33 etanol tüm mikroorganizmalar için 7 mm inhibisyon zonu vermiştir.

### Optimum Koşullarda Elde Edilen Nar Kabuğu Ekstraktlarının Fenolik Bileşik Kompozisyonları

Optimum koşullarda elde edilen nar kabuğu ekstraktlarının fenolik bileşiklerinin tanımlanması HPLC ile yapılmış ve sonuçlar Çizelge 8'de sunulmuştur. Çizelge 8'de görüldüğü gibi, optimum koşullarda elde edilen nar kabuğu ekstraktlarında da 13 adet fenolik tanımlanmış ve nar kabuğu ekstraktlarının en fazla kuarsetin ve epikateşin içerdiği, bunu ferulik asit ve 2.4 hidroksibenzoik asitin izlediği görülmektedir

Bu çalışmada nar kabuğu ekstraktlarında gallik asit, kateşin, klorojenik asit, kafeik asit, epikateşin, elajik asit, ferulik asit, kuarsetin, kaempferolün yanında pirogallol, şiringik asit, 2.4 hidroksibenzoik asit, vanilik asit, rosmarinik asit ve naringenin tanımlanmış ve literature benzer sonuçlar elde edilmiştir (Seeram, 2005). Gil vd., (2000) tarafından yapılan araştırmada ise nar kabuğunun yüksek oranda elajik asit, gallik asit ve bu bileşiklerin izomerleri içerdiği ifade edilmiştir. Nar kabuğu ile ilgili yapılan bir çalışmada gallik asit (2.69 mg/g), punikalajin (64.98 mg/g), kateşin

(12.65 mg/g); klorojenik asit (0.35 mg/g); kafeik asit (0.02 mg/g); epikateşin (0.94 mg/g); rutin (0.36 mg/g) ve elajik asit (2.83 mg/g) tanımlanmıştır (Singh vd., 2002). Bu çalışmada elajik asit 0.84 mg/mg nar kabuğu, gallik asit ise 0.15 mg/mg nar kabuğu olarak bulunmuştur. HPLC kromatogramında yüksek oranda tanımlanamayan piklerin punikalajin ve türevlerine ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) ait olabileceği sonucuna varılmıştır (Türkyılmaz vd., 2017).

Çizelge 8. Optimum koşullarda elde edilen ekstraktın fenolik bileşik içeriği

Table 8. Phenolic compound content of the extract obtained under optimum conditions

| No | Fenolik Bileşik<br><i>Phenolic Compound</i> | Nar Kabuğu<br>(mg/g nar kabuğu)<br><i>Pomegranate Peel</i><br>(mg/g pomegranate peel) |
|----|---|---|
| 1  | Gallik asit                                 | 0.15±0.00   |
| 2  | Kafeik asit                                 | 0.56±0.00   |
| 3  | Ferulik asit                                | 1.10±0.01   |
| 4  | Kateşin                                     | 0.34±0.00   |
| 5  | 2.4 hidroksibenzoik asit                    | 1.04±0.01   |
| 6  | Klorojenik asit                             | 0.40±0.00   |
| 7  | Elajik asit                                 | 0.84±0.01   |
| 8  | Vanilik asit                                | 0.88±0.01   |
| 9  | Kuarsetin                                   | 1.32±0.01   |
| 10 | Epikateşin                                  | 1.32±0.01   |
| 11 | Kaempeferol                                 | 0.43±0.00   |
| 12 | Rosmarinik asit                             | 0.20±0.00   |
| 13 | Naringenin                                  | 0.28±0.00   |

## SONUÇ

Doğal olmayan antioksidan ve antimikrobiyel maddelerin vücutta oluşturdukları zararlardan dolayı sentetik maddelerin yerini alabilecek doğal koruyucu madde arayışlarını ve özellikle fenolik bileşikler üzerindeki araştırmaları hızlandırmıştır. Bu çalışmada nar (*P. granatum L.*) kabuklarından antioksidan ve antimikrobiyel aktiviteye sahip yüksek oranda fenolik ve flavonoid eldesi için optimizasyon çalışmaları yapılmış ve optimum koşul olarak 78°C, %33 etanol konsantrasyonu, 113 dakika belirlenmiştir. Sonuç olarak nar kabuklarından elde edilen fenolik bileşiklerin antioksidan özellikleri ile sentetik antioksidanların

yerine, antimikrobiyel özellikleri ile patojen mikroorganizmaların gelişimini engellemede, yaşamın ilerleyen süreçlerinde oluşabilecek serbest radikaller ve bunların zararlı etkilerini önlemede ve bu şekilde insanların daha sağlıklı bir yaşam sürebilmesini sağlayabilecek potansiyellerinin olduğu ortaya konmuştur.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma; Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından V-056 nolu proje ile desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

Amyrgialaki, E., Makris, D. P., Mauromoustakos, A., Kefalas, P. (2014). Optimisation of the extraction of pomegranate (*Punica granatum*) husk phenolics using water/ethanol solvent systems and response surface methodology. *Ind Crops Pro*, 59, 216-222.

Anonim, 2016 <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/>

Bayram, E., Kırıcı, S., Tansı, S., Yılmaz, G., Arabacı, O., Kızıl, S., Telci, İ. (2010). Tıbbi ve aromatik bitkiler üretiminin artırılması olanakları, Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, Ankara.

Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal Bioanal Chem*, 239, 70-76.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M., Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol Res*, 28, 25-30.

Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H. (2014). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci*, 74 (17), 2157-2184.

Ebrahimabadi, A. H., Bidgoli, Z., Mazoochi, A., Kashi, F. J., Batooli, H. (2010). Essential oil composition, antioxidant and antimicrobial activity of the leaves and flowers of *Chaerophyllum macropodium* Boiss. *Food Control*, 21, 1173-1178.

- Farag, M. A., Al-Mahdy, D. A., Salah El Dine, R., Fahmy, S., Yassin, A., Porzel, A., Brandt, W. (2015). Structure activity relationships of antimicrobial gallic acid derivatives from pomegranate and acacia fruit extracts against potato bacterial wilt pathogen. *Chemistry & Biodiversity*, 12 (6), 955-962.
- Girgin, G., Başaran, N., Şahin, G. (2001). Dünyada ve Türkiye’de insan sağlığını tehdit eden mikotoksinler. *Türk Hij. Den. Biyol. Derg.*, 58: 97-118.
- Jaiswal, V., DerMarderosian, A., Porter, J. R. (2010). Anthocyanins and polyphenol oxidase from dried arils of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Food Chem*, 118(1), 11-16.
- Li, Y., Guo, C., J. Yang, J., Wei, J., Xu, J., Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chem*, 96 (2), 254-260.
- MacDonald-Wicks, L. K., Wood, L. G., Garg, M. L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: A review. *J Sci Food Agric*, 86 (13), 2046-2056.
- Nahar, P. P., Driscoll, M. V., Li, L., Slitt, A. L., Seeram, N. P. (2014). Phenolic mediated anti-inflammatory properties of a maple syrup extract in RAW 264.7 murine macrophages. *J Func Foods*, 6, 126-136.
- Oskay, M., Aktaş, K., Sarı, D., Azeri, C. (2007). *Asphodelus aestivus* (Liliaceae)’un antimikrobiyal etkisinin çukur ve disk diffüzyon yöntemiyle karşılaştırmalı olarak belirlenmesi. *Ekoloji Dergisi*, 16, 62-65.
- Pan, Z., Qu, W., Ma, H., Atungulu, G. G., McHugh, T. H. (2011). Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(5), 1249-1257.
- Prakash, C.V.S., Prakash, I. (2011). Bioactive chemical constituents from pomegranate (*Punica granatum*) juice, seed and peel - a review. *Int J Res in Chem Environt*, 1 (1), 1-18.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26, 1231-1237.
- Samaranayaka, A. G. P., Li-Chan, E. C. Y. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *J Func Foods*, 3 (4), 229-254.
- Seeram, N. P., Adams, L. S., Henning, S. M., Niu, Y., Zhang, Y., Nair, M.G., Heber, D.(2005). In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J Nutr Biochem*, 16, 360-367.
- Singh, R.P., Chidambara-Murthy, K. N., Jayaprakasha, G. K. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *J Agric Food Chem*, 50 (1), 81-86.
- Singleton, V. L. ve Rossi, J. A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*, 16, 144-158.
- TUİK, (2017). T.C. Başbakanlık Türkiye İstatistik Kurumu  
<https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>
- Türkyılmaz, M., Tağı, Ş., Özkan, M. (2017). Narın farklı bölümlerinin polifenol içeriği, antioksidan ve antibakteriyel aktivitesi üzerine ekstraksiyon çözümlerinin etkisi. *Akademik Gıda*, 15(2), 109-118.
- Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., Li, X. (2008). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chem*, 106 (2), 804-810.
- Wang, R., Ding, Y., Liu, R., Xiang, L., Du, L. (2010). Pomegranate: Constituents, bioactivities and pharmacokinetics. *Fruit, Vegetable Cereal Sci Biotechn*, 4 (2), 77-87.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*, 64 (4), 555-559.