

TAZE VE DONDURULMUŞ ELMALARDA VE ELMA POSASINDA POLİFENOL BİYOERİŞİLEBİLİRLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Senem Kamiloğlu*

Mevsim Gıda Sanayi ve Soğuk Depo Ticaret A.Ş., Turanköy, 16450, Kestel, Bursa, Türkiye

Geliş / Received: 23.01.2019; Kabul / Accepted: 08.04.2019; Online baskı / Published online: 26.04.2019

Kamiloğlu, S. (2019). Taze ve dondurulmuş elmalarda ve elma posasında polifenol biyoerişilebilirliğinin değerlendirilmesi. *GIDA* (2019) 44 (3): 409-418 doi: 10.15237/gida.GD19026

Kamiloğlu, S. (2019). Evaluation of polyphenol bioaccessibility in fresh and frozen apples and apple pomace. *GIDA* (2019) 44 (3): 409-418 doi: 10.15237/gida.GD19026

ÖZ

Elma taze tüketilebildiği gibi dondurulmuş elma gibi çeşitli formlara işlenerek de tüketilebilmektedir. Elma işleme sonucu posa olarak adlandırılan biyoaktif bileşenler açısından zengin bir atık ürün oluşmaktadır. Bu çalışmada taze ve dondurulmuş elmalarda ve elma posasında bulunan polifenollerin biyoerişilebilirliklerinin *in vitro* gastrointestinal sindirim modeli kullanılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde ve toplam antioksidan kapasiteki değişimler spektrofotometrik yöntemlerle tespit edilmiş olup, polifenolik bileşiklerin miktarının tespiti yüksek performanslı sıvı kromatografisi–fotodiyot dizi dedektörü (HPLC–PDA) kullanılarak kromatografik yöntemle yapılmıştır. *In vitro* gastrointestinal sindirim simülasyonu sonrasında HPLC–PDA ile belirlenen toplam biyoerişilebilir polifenol miktarları göz önüne alındığında, dondurulmuş elma ve elma posasının taze elmalara kıyasla %11–16 kadar daha fazla biyoerişilebilir polifenole sahip olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen bulgular gıda işlemenin sindirim sırasında polifenollerin matriksten salınımını etkilediğini göstermiş olup, sindirilmemiş örnekler için tespit edilen değerlerin biyoerişilebilirlik değerlerinden farklı olabileceğine dikkat çekmiştir.

Anahtar kelimeler: Granny Smith, bireysel hızlı dondurma, *in vitro* gastrointestinal sindirim, flavonoidler, fenolik asitler, toplam antioksidan kapasite, HPLC–PDA

EVALUATION OF POLYPHENOL BIOACCESSIBILITY IN FRESH AND FROZEN APPLES AND APPLE POMACE

ABSTRACT

Apples can be consumed as fresh or processed into various products including frozen apples. As a result of processing, pomace which is rich in bioactive compounds, is generated. The aim of this study was to evaluate the bioaccessibility of polyphenols in fresh and frozen apples and apple pomace using an *in vitro* gastrointestinal digestion model. Total phenolics, flavonoids, and antioxidant capacity were determined spectrophotometrically, whereas the quantification of polyphenols were carried out chromatographically using high performance liquid chromatography–photodiode array detector (HPLC–PDA). Considering the bioaccessible polyphenols determined using HPLC–PDA after *in vitro* gastrointestinal digestion simulation, it was found that frozen apples and pomace contained 11–16% more bioaccessible polyphenols compared to fresh apples. In conclusion, results obtained in this study showed that food processing affects the release of polyphenols from the matrix during digestion and that the values determined for undigested samples may be different from the bioaccessibility values.

Keywords: Granny Smith, individual quick freezing, *in vitro* gastrointestinal digestion, flavonoids, phenolic acids, total antioxidant capacity, HPLC–PDA

*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ senem@mvsm.com.tr,

☎ (+90) 224 3833601,

☎ (+90) 224 3833123

GİRİŞ

Elma dünyada tarımı yaygın olarak yapılan bir meyve olup, muz ve üzümünden sonra en fazla üretilen üçüncü meyvedir (FAO, 2017). Epidemiyolojik çalışmalar, elma tüketiminin bazı kanser türleri, kardiyovasküler hastalıklar, astım ve diyabet riskini azalttığını öne sürmüştür. Görülen bu hastalıklara karşı koruyucu etkiler polifenollerin varlığı ile ilişkilendirilmektedir. Elma polifenollerinin güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu, kanser hücrelerinin çoğalmasını önlediği, lipid oksidasyonunu azalttığı ve kolesterolü düşürdüğü bilinmektedir (Boyer ve Liu, 2004).

Elma taze tüketilebildiği gibi çeşitli ürünlere işlenerek de tüketilebilmektedir. Bireysel hızlı dondurma (IQF) doğranmış veya dilimlenmiş elmaların düşük sıcaklıklarda (-30 ile -40°C arasında) hava püskürtmeli dondurucuda dondurulması işlemi olup, geleneksel dondurmaya kıyasla çok daha kısa sürede gerçekleştirilmektedir. Elma işleme sonucu kabuk, kök, çekirdek ve küspeyi içeren elma posası olarak bilinen bir atık ürün oluşmaktadır (Skinner vd., 2018). Elma üretiminden elde edilen yıllık atık miktarının 3.0-4.2 milyon mt olduğu tahmin edilmektedir (Younis ve Ahmad, 2015). Sanayi üretiminde oluşan yan ürünlerin bertarafı hem gıda üreticisine bir maliyet oluşturmakta hem de çevre üzerinde potansiyel bir olumsuz etki yaratmaktadır. İlave olarak, yapılan araştırmalar yan ürünlerin birçoğunun potansiyel olarak değerli biyoaktif bileşiklerin kaynağı olabileceğini ortaya koymuştur (Wijngaard vd., 2012; Huang vd., 2013).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda insan vücudundaki fizyolojik fonksiyonlar için bir önkoşul olan biyoerişilebilirlik konusuna daha fazla dikkat gösterilmeye başlanmıştır. İnsanlar üzerinde yapılan *in vivo* çalışmalar zaman alıcı ve maliyetli olup, etik kaygılarla da kısıtlandığından, sindirimin etkilerini araştırmak için *in vitro* modeller geliştirilmiştir. *In vitro* gastrointestinal sindirim modelleri polifenollerin gıda matriksinden salınımını belirlemek ve vücutta emilmeden önce profillerindeki değişiklikleri değerlendirmek için kullanılmaktadır. Bununla

birlikte, *in vitro* gastrointestinal sindirim modellerinde uygulanan koşulların çeşitliliği farklı çalışmalarda elde edilen sonuçların birbirleri ile karşılaştırılmasını sınırlamıştır (Alminger vd., 2014). Bu sorunun üstesinden gelmek için, fizyolojik olarak uygun koşullara dayanan standartlaştırılmış ve pratik bir statik sindirim modeli önerilmiştir (Minekus vd., 2014). Bu model daha önce polifenol içeriği zengin bazı gıda atıklarının biyoerişilebilirliğinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır (Kamiloğlu vd., 2017; Guven vd., 2018). Bununla birlikte bilindiği kadarıyla, daha önce yapılan çalışmalarda endüstriyel üretim sonucu açığa çıkan elma posasında bulunan polifenollerin biyoerişilebilirliği hammadde ve donmuş ürün ile mukayese edilmemiştir.

Yukarıda sunulan bilgiler dikkate alınarak bu çalışmanın amacı, taze ve dondurulmuş elmalarda ve elma posasında toplam fenolik maddenin, toplam flavonoid maddenin, toplam antioksidan kapasitenin ve polifenolik bileşiklerin biyoerişilebilirliklerinin standartlaştırılmış *in vitro* gastrointestinal sindirim modeli kullanılarak değerlendirilmesidir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Taze ve dondurulmuş elmalar (*Malus domestica* Borkh. var. Granny Smith), ve üretim sonucu açığa çıkan elma posası endüstriyel bir gıda işleme fabrikasından (Mevsim Gıda Sanayi ve Soğuk Depo Ticaret A.Ş., Turanköy, Bursa) farklı üretim günlerinde 3 tekrarlı olarak temin edilmiştir. Elmalar bireysel hızlı dondurma (IQF) işleminden önce sırasıyla kabuk soyma ve çekirdek alma, asitlendirme ve küp kesim işlemlerine tabii tutulmuştur. Toplanan numuneler değirmen (IKA, Almanya) yardımıyla sıvı azot içerisinde ince bir toz halinde öğütülmüş ve analizlere kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

Kimyasallar

In vitro gastrointestinal sindirim simülasyonunda kullanılan α -amilaz (EC 3.2.1.1), pepsin (EC 3.4.23.1), pankreatin (EC 232.468.9) ve safra Sigma-Aldrich'den (Almanya) temin edilmiştir. Polifenollerin miktarının tespiti için kullanılan \geq %98 saflıktaki klorojenik asit, kafeik asit,

kateşin, epikateşin, hiperin (kuersetin-3-galaktozit), izokuersitrin (kuersetin-3-glukozit), kuersitrin (kuersetin-3-ramnozid) ve floridzin standartları da Sigma-Aldrich'den (Almanya) satın alınmıştır.

Sindirilmemiş Numunelerin Ekstraksiyonu

2.00 ± 0.01 g toz halinde öğütülmüş numune 5 mL %0.1 formik asit içeren %75 metanol solüsyonu ile muamele edilmiştir. Sonrasında numuneler ultrasonik banyoda (VWR, ABD) 15 dk. sonike edilmiş ve 4 °C'de, 2700 x g hızında 10 dk. süreyle santrifüjlenerek (Hettich, Almanya) üst faz toplanmıştır. Bu ekstraksiyon protokolü bir

kez daha tekrarlanmış ve iki üst faz 10 mL'lik nihai bir hacme tamamlanmıştır (Kamiloglu ve Capanoglu, 2015). Hazırlanan ekstraktlar analizlerden önce -20°C'de muhafaza edilmiştir.

İn Vitro Gastrointestinal Sindirim

Polifenollerin biyoerişilebilirliğinin tespiti için sırasıyla ağız, mide ve bağırsak sindirimini simüle eden üç aşamalı bir *in vitro* gastrointestinal sindirim modeli uygulanmıştır (Minekus vd., 2014). Kullanılan ağız, mide ve bağırsak elektrolit solüsyonlarının içeriği Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Ağız, mide ve bağırsak elektrolit solüsyonları
Table 1. Oral, gastric and intestinal electrolyte solutions

Bileşenler <i>Constituents</i>	Stok konsantrasyonu (mol/L) <i>Stock concentration (mol/L)</i>	Stok hacmi (mL) <i>Volume of stock (mL)</i>		
		Ağız elektrolit solüsyonu (Oral electrolyte solution)	Mide elektrolit solüsyonu (Gastric electrolyte solution)	Bağırsak elektrolit solüsyonu (Intestinal electrolyte solution)
KCl	0.5	15.1	6.9	6.8
KH ₂ PO ₄	0.5	3.7	0.9	0.8
NaHCO ₃	1	6.8	12.5	42.5
NaCl	2	-	11.8	9.6
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0.15	0.5	0.4	1.1
(NH ₄) ₂ CO ₃	0.5	0.06	0.5	-
HCl	6	0.09	1.3	0.7

Tüm solüsyonlar distile su ile hazırlanmış olup, toplam hacim 400 mL'ye tamamlanmıştır.

All solutions are prepared with distilled water to a total volume of 400 mL.

Ağız sindirimini simülasyonu için 5.00 ± 0.01 g numuneye 3.5 mL ağız elektrolit solüsyonu, 0.5 mL α-amilaz (1500 U/mL), 25 µL 0.3 M CaCl₂ ve 975 µL distile su ilave edilerek karışım çalkalayıcı su banyosunda (Mommert, Almanya) 37 °C'de 2 dk. boyunca inkübe edilmiştir. Ağız sindirimi tamamlandıktan sonra, her bir numune için 2 mL örnek alınmıştır.

Mide sindirimini simüle etmek için, kalan solüsyona 6 mL mide elektrolit solüsyonu, 1.28 mL pepsin (25000 U/mL), 4 µL 0.3 M CaCl₂ eklenmiş ve 1 M HCl kullanılarak pH 3'e ayarlanmıştır. Daha sonra distile su ilavesi ile toplam hacim 8 mL'ye tamamlanmış ve karışım çalkalayıcı su banyosunda 37 °C'de 2 saat süreyle inkübe edilmiştir. Mide sindirimi tamamlandıktan

sonra, her bir numune için 2 mL örnek toplanmıştır.

Bağırsak sindirimini simüle etmek için, karışımın geri kalanı 7.7 mL bağırsak elektrolit solüsyonu, 3.5 mL pankreatin (800 U/mL), 1.75 mL 160 mM safra, 28 µL 0.3 M CaCl₂ ile karıştırılmış ve 1 M NaOH kullanılarak pH 7'ye ayarlanmıştır. Ardından toplam hacim 14 mL olacak şekilde distile su ilavesi yapılmış ve karışım çalkalayıcı su banyosunda 37 °C'de 2 saat daha inkübe edilmiştir. Bağırsak sindirimi simülasyonunun ardından tekrar her bir numune için 2 mL örnek alınmıştır.

Ağız, mide ve bağırsak sindirimi simülasyonları sonrası toplanan örneklerin pH'sı formik asit ile

2'ye ayarlanmış ve 4 °C'de, 23000 x g hızında 5 dk. süreyle santrifüjlenmiştir. Toplanan üst fazlar analizlere kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Yukarıdaki işlemlere ilaveten, elma örnekleri katılmadan aynı koşullar altında inkübasyonlar yapılmış ve toplanan kör (blank) örnekler sindirim sıvılarından kaynaklanan etkileşimlerin düzeltilmesi için kullanılmıştır.

Spektrofotometrik Analizler

Toplam fenolik madde (TFEM) miktarı, toplam flavonoid madde (TFLM) miktarı ve toplam antioksidan kapasite (TAK) ölçümleri spektrofotometre (Optima, Japonya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

TFEM miktarı Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak daha önce literatürde tarif edilen şekilde tespit edilmiştir (Velioglu vd., 1998). 100 µL ekstrakt 0.75 mL Folin-Ciocalteu reaktifi ile karıştırılmıştır. Karışım 5 dk. oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve daha sonra 0.75 mL %6 Na₂CO₃ solüsyonu karışıma ilave edilmiştir. 90 dk. inkübasyondan sonra 725 nm'de absorbans ölçülmüştür. TFEM miktarı, 100 g ağırlık başına mg gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak ifade edilmiştir.

TFLM miktarı kolorimetrik alüminyum klorür metodu uygulanarak tespit edilmiştir (Kim vd., 2003). Başlangıçta 1 mL ekstrakta 0.3 mL %5 NaNO₂ eklenmiştir. 5 dk. sonra 0.3 mL %10 AlCl₃ ilave edilmiştir ve 6. dk.'da 2 mL 1 M NaOH eklenmiştir. Hemen ardından 2.4 mL saf su ilave edilip, karışım vortekslenmiş ve 510 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. TFLM miktarı, 100 g ağırlık başına (+)-kateşin eşdeğeri (KE) olarak ifade edilmiştir.

TAK dört farklı metot (bakır (II) iyonu indirgenme antioksidan kapasitesi (CUPRAC), 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit diamonyum tuzu) (ABTS), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP)) kullanılarak değerlendirilmiştir. CUPRAC metodu için, 100 µL ekstrakt 1 mL 10 mM CuCl₂, 7.5 mM neokuproin ve 1 M NH₄C₂H₃O₂ ile karıştırılmıştır. Ardından karışıma 1 mL distile su ilave edilerek nihai hacim 4.1 mL'ye getirilmiştir.

Oda sıcaklığında 30 dk. inkübasyondan sonra 450 nm'de absorbans ölçülmüştür (Apak vd., 2004). ABTS metodu için, ABTS stok solüsyonu, 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 8.0) içinde, 734 nm'de 0.90 (± 0.05) absorbans derecesine seyreltilmiştir. Sonra, 100 µL ekstrakt, 1 mL ABTS-çalışma solüsyonu ile karıştırılmış ve 1 dk. sonra 734 nm'de absorbans ölçülmüştür (Miller ve Rice-Evans, 1997). DPPH metodu için, 100 µL ekstrakt, 2 mL 0.1 mM metanolde çözülmüş DPPH reaktifi ile karıştırılmıştır. 30 dk. inkübasyondan sonra 517 nm'de absorbans ölçülmüştür (Kumaran ve Karunakaran, 2006). FRAP metodu için, 900 µL FRAP reaktifi (sırasıyla 10:1:1 oranlarında asetat tamponu (pH 3.6), 10 mM 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) solüsyonu ve 20 mM FeCl₃ karışımı), 100 µL ekstrakt ile karıştırılmıştır. Karışımın absorbansı 4 dk. sonra 593 nm'de kaydedilmiştir (Benzie ve Strain, 1996). Tüm TAK tahlilleri için, sonuçlar 100 g ağırlık başına mg Trolox® eşdeğeri (TE) olarak ifade edilmiştir.

Kromatografik Analizler

Polifenollerin miktarı yüksek performanslı sıvı kromatografisi-fotodiyot dizi dedektörü (HPLC-PDA) (Waters, ABD) kullanılarak daha önce literatürde tarif edilen şekilde belirlenmiştir (Capanoglu vd., 2008). Toplanan tüm örnekler, 0.45 µm membran filtrelerden geçirilerek HPLC'ye enjekte edilmiştir. Durgun faz olarak C18 kolonu (25 cm x 4.6 mm, 5 µm; Sigma-Aldrich, Almanya) kullanılmıştır. 280, 312 ve 360 nm'de spektral ölçüm için 1 mL/dk. bir akış hızı ve 10 µL enjeksiyon hacmi olan şu solüsyonlar kullanılmıştır: Trifloroasetik asit (TFA)/ultra saf su (1:1000, v/v; elüent A) ve TFA/asetonitril (1:1000, v/v; elüent B). Kullanılan lineer gradyan şu şekildedir: 0 dk., %95 A ve %5 B; 45 dk., %65 A ve %35 B; 47 dk., %25 A ve %75 B; 49 dk., %65 A ve %35 B; 50 dk., %95 A ve %5 B. Polifenollerin tanımlanmasında kolonda tutunma süreleri ve karakteristik UV spektralleri dikkate alınmıştır. Miktar tespiti için otantik standartlar kullanılarak sonuçlar kg ağırlık başına mg olarak ifade edilmiş olup, reynoutrin (kuersetin-3-ksilozit) ve avikularin (kuersetin-3-arabinozit) miktarı kuersetin-3-glukozit standardı kullanılarak hesaplanmıştır.

İstatistiksel Analiz

Analizler 3 tekrarlı olarak temin edilen numunelerin her birinde 3'er ölçüm yapılarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar ortalama \pm standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. Veriler SPSS yazılımı (IBM, ABD) kullanılarak tek yönlü ANOVA'ya tabii tutulmuş ve numuneler arasındaki farklılıkların belirlenmesinde Tukey testi kullanılmıştır ($P < 0.05$). Spektrofotometrik analizler arası korelasyon katsayıları (R^2) Excel yazılımı (Microsoft, ABD) kullanılarak hesaplanmıştır.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Spektrofotometrik Ölçümler

In vitro gastrointestinal sindirimin TFEM, TFLM ve TAK üzerine etkileri Çizelge 2'de verilmiştir. Sindirilmemiş örnekler için, dondurulmuş elmaların ve elma posasının taze elmalara kıyasla daha düşük miktarda TFEM (%39–49), TFLM (%33–50) ve TAK (%36–68) içerdiği görülmüştür. Bu durum elmanın işlenmesi sırasında oluşması muhtemel enzimatik esmerleşme ve oksidasyon reaksiyonlarının TFEM ve TFLM miktarlarında kayıplara neden olmasıyla ve bu nedenle TAK değerlerinin de düşmesi ile açıklanabilir. *In vitro* ağız sindirimi sonrasında tüm numuneler için sindirilmemiş örneklerle kıyasla daha düşük miktarlarda TFEM (%28–40), TFLM (%24–43) ve TAK (%9–71) değerleri elde edilmiştir. Literatürde bazı polifenollerin, özellikle çok sayıda hidroksil grubu olanların, albumin gibi proteinlere güçlü bir şekilde bağlandıkları ve bunun sonucunda polifenol emilimini azaltan kompleksler ortaya çıkardıkları bildirilmiştir (Bohn, 2014). Ayrıca, görülen bu durum ağız sindirimi için uygulanan inkübasyon süresinin (2 dk.) TFEM, TFLM ve TAK'ye katkıda bulunan bileşenlerin gıda matrisinden salınımı için yeterli olmamasından da kaynaklanıyor olabilir. Nitekim, 2 saat süren mide sindirimi simülasyonu sonrasında TFEM, TFLM ve TAK değerleri ağız sindirimine kıyasla sırasıyla %82–143, %75–112 ve %47–111 artış göstermiş ve sindirilmemiş numunelerde bulunan miktarlara erişmiş ve hatta taze elmalar için TFLM ve FRAP metodu ile ölçülen TAK değerlerinde istatistiksel olarak önemli artışlar görülmüştür ($P < 0.05$). Daha önce kuru meyveler ile yapılmış bir çalışmada da mide sindirimi simülasyonundan

sonra TFLM değerlerinde artışlar görülmüştür (Kamiloğlu vd., 2014). Bu durum, mide sindirimi boyunca elma flavonoidlerinin gıda matrisinden ekstraksiyon işleminin devam ettiğini ve serbest kalan flavonoidlerin midedeki asidik ortamda iyi bir stabilitesi olduğunu göstermektedir. *In vitro* bağırsak sindirimi taze elmalar için genel olarak TFEM, TFLM ve TAK değerlerinde düşüşe neden olmuş olup, biyoerişilebilirlik değerleri sindirilmemiş numunelere kıyasla sırasıyla %80, %41 ve %39–69 olarak tespit edilmiştir. Dondurulmuş elmalar ve elma posası için de, TFLM değeri için görülen trend taze elmalarla benzerlik göstermiş ve biyoerişilebilirlik değeri %65 olarak bulunmuştur. Diğer taraftan, bağırsak sindirimi simülasyonu sonrası dondurulmuş elmalar ve elma posasının TFEM ve TAK biyoerişilebilirlik değerleri sindirilmemiş numunelere kıyasla sırasıyla %129–165 ve %65–205 olarak tespit edilmiştir. Literatürde daha önce yapılan bir çalışmada da bağırsak sindirimi sonrasında benzer artışlar görülmüş ve durum gıda maddesinin bağırsak sıvıları ile olan ilave temas süresi ve/veya bağırsaktaki sindirim enzimlerinin matrikse bağlı polifenollerin salınımını kolaylaştırıcı etkisi ile açıklanmıştır (Bouayed vd., 2011). Elde edilen bu sonuçlar, gıda işleminin sindirim sırasında polifenollerin matriksten salınımı etkilediğini göstermiş olup, sindirilmemiş örnekler için tespit edilen değerlerin biyoerişilebilirlik değerlerinden farklı olabileceğine işaret etmiştir.

TFEM, TFLM ve TAK arası korelasyonlar da belirlenmiştir. *In vitro* gastrointestinal sindirim öncesinde TFEM, TFLM ve TAK arasında oldukça lineer bir ilişki elde edilmiş olup, en yüksek değer TFLM ve FRAP ($R^2 = 0.924$) arasında tespit edilmiştir. TAK metodları arasında da, özellikle FRAP ve CUPRAC metodları arasında ($R^2 = 0.987$), oldukça yüksek bir korelasyon görülmüştür. Görülen bu pozitif lineer ilişki *in vitro* ağız sindirimi sonrasında da devam etmiştir ($R^2 = 0.813–0.991$). Mide sindirimi simülasyonundan sonra ise daha ortalama bir ilişki görülmekle beraber ($R^2 \leq 0.959$), bağırsak sindirimi neticesinde oldukça düşük bir korelasyon ($R^2 \leq 0.469$) elde edilmiştir. Bu çalışmada uygulanan TAK metodlarının pH koşulları göz önüne alındığında, pH 3.6'da

gerçekleştirilen FRAP metodu, midedeki antioksidan aktiviteyi değerlendirmek için daha uygun olabilirken, pH 7.0–8.0'de uygulanan DPPH ve CUPRAC metodlarının ağız ve bağırsaktaki TAK'yi değerlendirmek için daha uygun olabileceği varsayılabilir. Sonuç olarak, tek bir antioksidan kapasite ölçüm metodu kullanarak gıda ürünlerinin antioksidan kapasitesinin ölçülmesi ile tatmin edici bir değerlendirme yapılması mümkün olmayacağı görülmüştür. Bu nedenle TAK ölçümlerinde farklı mekanizmalara sahip birden fazla metodun kullanılması önerilmektedir (Apak vd., 2016). Buna ilaveten, TFEM ölçümünde kullanılan Folin-Ciocalteu metodu sadece fenolik bileşenlere özgü olan bir test olmayıp, askorbik asit, sitrik asit, basit şekerler

ve bazı amino asitler gibi indirgen bileşenleri de ölçerek, toplam fenolik madde içeriğinin gerçek değerinden farklı çıkmasına neden olabilmektedir (Capanoğlu vd., 2018). Benzer şekilde TFLM ölçülmesinde kullanılan kolorimetrik metod da sadece flavonoidlere özgü bir test değildir. Flavonoidlerin yanı sıra, fenolik asitler de bu testte oldukça güçlü bir reaksiyon verirken, flavan-3-oller hariç çoğu flavonoid bu teste zayıf reaksiyon vermektedir (Ho vd., 2012). Spektrofotometrik metodlarla elde edilen TFEM ve TFLM sonuçlarının spesifik olmaması nedeniyle, bu çalışmada polifenollerin kromatografik yöntemle miktarlarının tespiti de yapılmasına karar verilmiştir.

Çizelge 2. *In vitro* gastrointestinal sindirim sırasında toplam fenolik madde (TFEM), toplam flavonoid madde (TFLM) ve toplam antioksidan kapasitede (TAK) meydana gelen değişimler

Table 2. *Changes in total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC) and total antioxidant capacity (TAC) during in vitro gastrointestinal digestion*

Numune Sample	Sindirilmemiş Undigested	Ağız Mouth	Mide Stomach	Bağırsak Intestine
TFEM (mg GAE/100 g numune) – TPC (mg GAE/100 g sample)				
Taze elma – <i>Fresh apple</i>	21.8 ± 3.9 ab	15.8 ± 1.3 b	28.7 ± 2.3 a	17.5 ± 2.8 b
Dondurulmuş elma – <i>Frozen apple</i>	11.2 ± 2.8 bc	6.7 ± 0.3 c	16.3 ± 1.6 ab	18.5 ± 3.3 a
Elma posası – <i>Apple pomace</i>	13.2 ± 3.1 ab	8.4 ± 1.1 b	16.1 ± 3.4 a	17.0 ± 3.3 a
TFLM (mg KE/100 g numune) – TFC (mg CE/100 g sample)				
Taze elma – <i>Fresh apple</i>	60.7 ± 6.9 b	46.1 ± 0.2 b	80.8 ± 9.1 a	24.8 ± 1.5 c
Dondurulmuş elma – <i>Frozen apple</i>	30.3 ± 4.1 ab	17.2 ± 1.0 c	36.5 ± 1.0 a	19.9 ± 8.7 bc
Elma posası – <i>Apple pomace</i>	40.5 ± 6.6 ab	24.2 ± 4.6 b	41.5 ± 10.0 a	26.3 ± 1.5 ab
TAK (mg TE/100 g numune) – TAC (mg TE/100 g sample)				
CUPRAC				
Taze elma – <i>Fresh apple</i>	189.5 ± 15.3 a	123.9 ± 2.4 b	187.5 ± 13.7 a	126.2 ± 10.1 b
Dondurulmuş elma – <i>Frozen apple</i>	90.5 ± 18.1 a	50.7 ± 2.2 b	87.5 ± 6.9 a	85.9 ± 3.6 a
Elma posası – <i>Apple pomace</i>	103.4 ± 25.5 ab	68.6 ± 8.0 b	114.9 ± 11.1 a	104.2 ± 14.5 ab
ABTS				
Taze elma – <i>Fresh apple</i>	123.0 ± 12.9 a	45.1 ± 4.2 c	66.5 ± 5.0 bc	84.3 ± 17.0 b
Dondurulmuş elma – <i>Frozen apple</i>	38.8 ± 1.8 c	29.3 ± 3.6 d	61.8 ± 4.4 b	79.7 ± 2.4 a
Elma posası – <i>Apple pomace</i>	79.2 ± 13.5 b	32.6 ± 2.3 c	59.7 ± 6.9 b	104.6 ± 5.3 a
DPPH				
Taze elma – <i>Fresh apple</i>	47.8 ± 7.3 a	16.3 ± 0.4 c	27.9 ± 0.9 b	18.7 ± 1.3 bc
Dondurulmuş elma – <i>Frozen apple</i>	24.2 ± 1.4 a	7.1 ± 0.1 d	13.9 ± 1.2 c	19.1 ± 1.3 b
Elma posası – <i>Apple pomace</i>	26.8 ± 4.7 a	8.5 ± 0.4 c	13.2 ± 2.4 bc	17.4 ± 3.2 b
FRAP				
Taze elma – <i>Fresh apple</i>	29.8 ± 1.9 b	27.1 ± 2.2 b	41.2 ± 3.8 a	19.4 ± 2.6 c
Dondurulmuş elma – <i>Frozen apple</i>	16.9 ± 3.4 ab	10.6 ± 0.9 b	19.0 ± 4.5 a	17.1 ± 1.5 ab
Elma posası – <i>Apple pomace</i>	19.0 ± 4.0 ab	13.5 ± 2.5 b	27.4 ± 6.3 a	18.5 ± 2.6 ab

Bu tabloda gösterilen veriler 3 tekrarlı olarak temin edilen numunelerde yapılan ölçümlerin ortalama ± standart sapma değerleridir. Satırlardaki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları temsil etmektedir ($P < 0.05$).

Data presented in this table consist of average values ± standard deviation of 3 batches. Different letters in the rows represent statistically significant differences ($P < 0.05$).

Kromatografik Ölçümler

Taze ve dondurulmuş elmalarda ve elma posasında HPLC–PDA kullanılarak tespit edilen başlıca polifenoller Çizelge 3’te verilmiştir. Taze elma ve elma posasında klorojenik asit, kafeik asit, kateşin, epikateşin, hiperin, izokuersitrin, reynoutrin, avikularin, kuersitrin ve floridzin dahil 10 adet polifenolik bileşen bulunmuş olup, dondurulmuş elmalarda bu bileşenlerden kuersetin glikozit türevleri olan hiperin, izokuersitrin, reynoutrin, avikularin ve kuersitrin tespit edilememiştir. Bu durum literatürde daha önce yapılan çalışmalarla tutarlı olup, kuersetin glikozit türevlerinin elmanın sadece kabuğunda bulunmasından kaynaklanmaktadır (Karaman vd., 2013). Sindirilmemiş örnekler için, taze ve dondurulmuş elmalarda en yüksek miktarlarda bulunan bileşenler kateşin, epikateşin ve klorojenik asit olup, toplam polifenolik bileşen miktarının %59–96’sını oluşturmaktadır. Elma posasında ise toplam polifenolik bileşen miktarının %88’ine tekabül eden kuersetin glikozitler en yüksek düzeyde tespit edilen bileşenlerdir. Ağız sindirimi simülasyonu sonrasında genel olarak polifenol içeriğinde sindirilmemiş numunelere kıyasla istatistiksel olarak önemli farklar görülmemekle beraber ($P > 0.05$), kuersetin glikozitlerin miktarının %51’e kadar daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu durum spektrofotometrik ölçümlerle elde edilen TFLM sonuçlarıyla tutarlı olup, ağız sindirimi için uygulanan inkübasyon süresinin kuersetin glikozitlerin gıda matrisinden salınımı için yeterli olmamasından kaynaklanıyor olabilir. Yine spektrofotometrik ölçümler için elde edilen sonuçlarda olduğu gibi, mide sindirimi simülasyonu sonrasında polifenolik bileşenlerin değerleri ağız sindirimine kıyasla sırasıyla 3 kata kadar artış göstermiş ve sindirilmemiş numunelerde bulunan miktarlara yetişmiştir. Klorojenik asit ve kateşin miktarları ise *in vitro* mide sindirimi sonrası sindirilmemiş örneklerle kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek miktarlarda tespit edilmişlerdir ($P < 0.05$). Bağırsak sindirimi simülasyonundan sonra ise değişken sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin, klorojenik asit miktarı midede elde edilen değerlere kıyasla %30–81 kadar azalırken, kafeik asit miktarında ise 8.5 kata kadar artış görülmüştür. Literatürde daha önce yapılmış

bazı çalışmalarda klorojenik asidin sindirim sırasında diğer kafeoilkinik asitlere olan izomerizasyonundan bahsedilmiştir (Tagliazucchi vd., 2012). Klorojenik asit miktarında görülen düşüşler pH değişimi ve safra tuzlarının varlığının çökelti oluşumuna neden olması ile de ilişkili olabilir (Chethan ve Malleshi, 2007). İlaveten, kafeoilkinik asitlerin sulu çözeltiler içerisinde olan kararsızlığı da görülen kayıplara katkıda bulunmuş olabilir (Vallejo vd., 2004). Kafeik asit miktarında görülen artış ise daha önce yapılmış bazı çalışmalar da bahsedildiği gibi klorojenik asitin bağırsak simülasyonu sonrasında serbest asitlerine hidrolize olmasından kaynaklanıyor olabilir (Kahle vd., 2011). Benzer şekilde bağırsak sindirimi sonrası kateşin tamamen yok olurken, epikateşin miktarında midede elde edilen değerlere kıyasla istatistiksel olarak önemli artışlar görülmüştür (5–13 kat) ($P < 0.05$). Bu durum elmada bulunan prosiyanidin B2’nin epikateşin monomerlerine ayrışmasından kaynaklanıyor olabilir (Bouayed vd., 2012). Kuersetin glikozitleri ise yine spektrofotometrik olarak elde edilen TFLM sonuçlarına paralellik göstermiş olup, midedeki değerlere kıyasla %36–69 kadar azalış göstermiştir. Elma dahil olmak üzere birçok meyve önemli miktarda diyet lifi içermektedir. Diyet lifinin bazı bitki polifenollerini üzerinde bağlayıcı etkileri olup, enzimlerin substratlarına difüzyonunu kısıtlayarak biyoerişilebilirliği azalttıkları öne sürülmüştür (Palafox-Carlos vd., 2011). Dolayısıyla kuersetin glikozitlerinin miktarlarında meydana gelen azalış, diyet liflerinin varlığı ile ilişkili olabilir. Toplamda *in vitro* gastrointestinal sindirim sonrasında biyoerişilebilir polifenol miktarları göz önüne alındığında dondurulmuş elma ve elma posasının taze elmalara kıyasla %11–16 kadar daha fazla biyoerişilebilir polifenole sahip olduğu görülmüştür. Bu bulgu spektrofotometrik olarak elde edilen sonuçları destekleyici olup, gıda işlemenin sindirim sırasında polifenollerin matriksten salınımı etkilediğini göstermiş olup, sindirilmemiş örnekler için tespit edilen değerlerin biyoerişilebilirlik değerlerinden farklı olabileceğine dikkat çekmiştir.

Çizelge 3. *In vitro* gastrointestinal sindirim sırasında polifenollerde meydana gelen değişimler
Table 3. *Changes in polyphenols during in vitro gastrointestinal digestion*

Numune Sample	Sindirilmemiş Undigested	Ağız Mouth	Mide Stomach	Bağırsak Intestine
Klorojenik asit (mg/kg numune) – <i>Chlorogenic acid (mg/kg sample)</i>				
Taze elma – <i>Fresh apple</i>	18.9 ± 2.5 c	22.6 ± 1.3 bc	42.5 ± 5.3 a	29.9 ± 4.0 b
Dondurulmuş elma – <i>Frozen apple</i>	12.6 ± 2.7 b	11.1 ± 1.2 b	22.6 ± 1.7 a	10.1 ± 3.0 b
Elma posası – <i>Apple pomace</i>	8.5 ± 0.1 bc	11.8 ± 1.3 b	26.1 ± 4.6 a	4.9 ± 0.2 c
Kafeik asit (mg/kg numune) – <i>Caffeic acid (mg/kg sample)</i>				
Taze elma – <i>Fresh apple</i>	0.3 ± 0.03 b	0.3 ± 0.05 b	0.4 ± 0.1 b	3.8 ± 0.6 a
Dondurulmuş elma – <i>Frozen apple</i>	0.5 ± 0.2 bc	0.3 ± 0.1 c	0.6 ± 0.02 b	2.2 ± 0.04 a
Elma posası – <i>Apple pomace</i>	0.4 ± 0.02 b	0.2 ± 0.04 c	0.4 ± 0.01 b	0.6 ± 0.02 a
Kateşin (mg/kg numune) – <i>Catechin (mg/kg sample)</i>				
Taze elma – <i>Fresh apple</i>	21.5 ± 6.3 b	14.2 ± 3.1 b	55.9 ± 15.6 a	te – nd
Dondurulmuş elma – <i>Frozen apple</i>	11.9 ± 4.0 b	13.4 ± 1.4 b	34.8 ± 6.9 a	te – nd
Elma posası – <i>Apple pomace</i>	1.3 ± 0.04 b	4.9 ± 0.6 b	22.2 ± 4.2 a	te – nd
Epikateşin (mg/kg numune) – <i>Epicatechin (mg/kg sample)</i>				
Taze elma – <i>Fresh apple</i>	16.4 ± 4.1 bc	8.8 ± 0.3 c	26.8 ± 6.0 b	152.9 ± 4.5 a
Dondurulmuş elma – <i>Frozen apple</i>	14.4 ± 2.7 b	10.9 ± 1.0 b	22.0 ± 0.4 b	224.8 ± 38.8 a
Elma posası – <i>Apple pomace</i>	3.2 ± 0.4 b	3.8 ± 1.3 b	12.6 ± 0.8 b	176.6 ± 27.2 a
Hiperin (mg/kg numune) – <i>Hyperin (mg/kg sample)</i>				
Taze elma – <i>Fresh apple</i>	12.1 ± 4.5 a	9.6 ± 3.2 a	14.5 ± 1.9 a	7.9 ± 0.8 a
Dondurulmuş elma – <i>Frozen apple</i>	te – nd	te – nd	te – nd	te – nd
Elma posası – <i>Apple pomace</i>	63.9 ± 11.0 a	32.5 ± 5.3 a	60.7 ± 20.9 a	31.4 ± 11.4 a
İzokuersitrin (mg/kg numune) – <i>Isoquercitrin (mg/kg sample)</i>				
Taze elma – <i>Fresh apple</i>	3.5 ± 0.9 a	3.4 ± 0.5 a	3.9 ± 0.7 a	2.5 ± 0.1 a
Dondurulmuş elma – <i>Frozen apple</i>	te – nd	te – nd	te – nd	te – nd
Elma posası – <i>Apple pomace</i>	21.5 ± 4.2 a	10.5 ± 1.6 b	22.6 ± 5.0 a	8.9 ± 1.2 b
Reynoutrin (mg/kg numune) – <i>Reynoutrin (mg/kg sample)</i>				
Taze elma – <i>Fresh apple</i>	4.8 ± 0.2 a	2.6 ± 0.3 b	5.6 ± 0.7 a	2.7 ± 0.1 b
Dondurulmuş elma – <i>Frozen apple</i>	te – nd	te – nd	te – nd	te – nd
Elma posası – <i>Apple pomace</i>	11.7 ± 2.3 ab	7.7 ± 1.6 bc	12.9 ± 2.4 a	4.0 ± 1.4 c
Avikularin (mg/kg numune) – <i>Avicularin (mg/kg sample)</i>				
Taze elma – <i>Fresh apple</i>	7.8 ± 1.6 a	4.0 ± 0.9 b	7.9 ± 1.4 a	4.3 ± 0.04 b
Dondurulmuş elma – <i>Frozen apple</i>	te – nd	te – nd	te – nd	te – nd
Elma posası – <i>Apple pomace</i>	19.1 ± 2.9 a	9.8 ± 2.3 b	20.3 ± 2.9 a	6.9 ± 2.8 b
Kuversitrin (mg/kg numune) – <i>Quercitrin (mg/kg sample)</i>				
Taze elma – <i>Fresh apple</i>	8.1 ± 0.9 ab	5.6 ± 1.6 b	9.3 ± 1.0 a	5.6 ± 0.2 b
Dondurulmuş elma – <i>Frozen apple</i>	te – nd	te – nd	te – nd	te – nd
Elma posası – <i>Apple pomace</i>	21.0 ± 3.8 a	11.0 ± 1.2 b	21.5 ± 5.7 a	9.9 ± 2.0 b
Floridzin (mg/kg numune) – <i>Phloridzin (mg/kg sample)</i>				
Taze elma – <i>Fresh apple</i>	2.8 ± 0.9 a	4.2 ± 0.1 a	4.1 ± 1.4 a	4.5 ± 0.4 a
Dondurulmuş elma – <i>Frozen apple</i>	1.1 ± 0.5 a	0.6 ± 0.2 a	1.0 ± 0.1 a	1.3 ± 0.3 a
Elma posası – <i>Apple pomace</i>	5.4 ± 1.4 b	9.9 ± 3.7 ab	12.0 ± 2.3 a	4.8 ± 0.5 b

Bu tabloda gösterilen veriler 3 tekrarlı olarak temin edilen numunelerde yapılan ölçümlerin ortalama ± standart sapma değerleridir. Satırlardaki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları temsil etmektedir ($P < 0.05$). te: tespit edilemedi.

Data presented in this table consist of average values ± standard deviation of 3 batches. Different letters in the rows represent statistically significant differences ($P < 0.05$). nd: not detected.

Bu çalışmada standartlaştırılmış *in vitro* gastrointestinal sindirim modeli kullanılarak taze ve dondurulmuş elmalarda ve elma posasında polifenollerin biyoerişilebilirliği değerlendirilmiştir. *In vitro* gastrointestinal sindirim modelleri uygulaması kolay, ucuz ve özel bir ekipman gerektirmeyen metotlardır. Bununla birlikte, *in vitro* gastrointestinal sindirim metotlarını kullanarak biyoyararlılığın öngörülebilmesini sınırlandıran bazı önemli hususlar vardır. Bunların en önemlilerinden biri birçok *in vitro* model için kolonik fermantasyon aşamasının olmamasıdır. Kolona ulaşan polifenoller mikrobiyal bozulmaya maruz kalır ve bu bozunma sonucu oluşan bilinmeyen bileşikler sağlığa faydalı etkiler sağlayabilirler. Bu nedenle ileride yapılacak biyoaktif bileşenlerin sindirimini değerlendiren çalışmalarda kolonik fermantasyon aşamasının da dahil edilmesi tavsiye edilmektedir.

KAYNAKLAR

- Alminger, M., Aura A.M., Bohn T., Dufour C., El S.N., Gomes A., Karakaya S., Martinez-Cuesta M.C., McDougall G.J., Requena T. (2014). *In vitro* models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 13(4): 413-436.
- Apak, R., Guclu K., Ozyurek M., Karademir S.E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agric Food Chem*, 52(26): 7970-7981.
- Apak, R., Ozyurek M., Guclu K., Capanoglu E. (2016). Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *J of Agric Food Chem*, 64(5): 997-1027.
- Benzie, I.F., Strain J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*, 239(1): 70-76.
- Bohn, T. (2014). Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutr Rev*, 72(7): 429-452.
- Bouayed, J., Deußer H., Hoffmann L., Bohn T. (2012). Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following *in vitro* digestion vs. their native patterns. *Food Chem*, 131(4): 1466-1472.
- Bouayed, J., Hoffmann L., Bohn T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastrointestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chem*, 128(1): 14-21.
- Boyer, J., Liu R.H. (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr J*, 3(1): 1-15.
- Capanoglu, E., Beekwilder J., Boyacioglu D., Hall R., De Vos R. (2008). Changes in antioxidant and metabolite profiles during production of tomato paste. *J Agric Food Chem*, 56(3): 964-973.
- Capanoglu, E., Kamiloglu S., Ozkan G., Apak R. (2018). Evaluation of antioxidant activity/capacity measurement methods for food products. In: Apak, R., Capanoglu, E. & Shahidi, F. (eds.) *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications*. Chichester, United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd.
- Chethan, S., Malleshi N. (2007). Finger millet polyphenols: Optimization of extraction and the effect of pH on their stability. *Food Chem*, 105(2): 862-870.
- FAO (2017). Erişim tarihi: Aralık, 2018. <http://www.fao.org/faostat/en/> - home.
- Güven, O., Sensoy I., Senyuva H., Karakaya S. (2018). Food processing and digestion: The effect of extrusion process on bioactive compounds in extrudates with artichoke leaf powder and resulting *in vitro* cynarin and cynaroside bioaccessibility. *LWT* 90:232-237.
- Ho, Y.C., Yu H.T., Su N.W. (2012). Re-examination of chromogenic quantitative assays for determining flavonoid content. *J Agric Food Chem*, 60(10): 2674-2681.
- Huang, H.W., Hsu C.P., Yang B.B., Wang C.Y. (2013). Advances in the extraction of natural ingredients by high pressure extraction technology. *Trends Food Sci Technol*, 33(1): 54-62.

- Kahle, K., Kempf M., Schreier P., Scheppach W., Schrenk D., Kautenburger T., Hecker D., Huebner W., Ackermann M., Richling E. (2011). Intestinal transit and systemic metabolism of apple polyphenols. *Eur J Nutr*, 50(7): 507-522.
- Kamiloglu, S., Capanoglu E. (2015). Polyphenol content in figs (*Ficus carica* L.): Effect of sun-drying. *Int J Food Prop*, 18(3): 521-535.
- Kamiloglu, S., Ozkan G., Isik H., Horoz O., Van Camp J., Capanoglu E. (2017). Black carrot pomace as a source of polyphenols for enhancing the nutritional value of cake: An *in vitro* digestion study with a standardized static model. *LWT-Food Sci Technol*, 77:475-481.
- Kamiloğlu, S., Paşlı A.A., Çapanoğlu E., Özçelik B. (2014). Kuru Meyvelerin Kuruyemişler ile Birlikte Tüketiminin Flavonoidlerin *In Vitro* Biyoyararlılığına Etkisinin İncelenmesi. *GIDA* 39(4): 227-233.
- Karaman, Ş., Tütem E., Başkan K.S., Apak R. (2013). Comparison of antioxidant capacity and phenolic composition of peel and flesh of some apple varieties. *J Sci Food Agric*, 93(4): 867-875.
- Kim, D.O., Jeong S.W., Lee C.Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem*, 81(3): 321-326.
- Kumaran, A., Karunakaran R.J. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chem*, 97(1): 109-114.
- Miller, N.J., Rice-Evans C. (1997). Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS•+ radical cation assay. *Free Radic Res*, 26(6): 195-199.
- Minekus, M., Alminger M., Alvito P., Ballance S., Bohn T., Bourlieu C., Carriere F., Boutrou R., Corredig M., Dupont D., Dufour C., Egger L., Golding M., Karakaya S., Kirkhus B., Le Feunteun S., Lesmes U., Macierzanka A., Mackie A., Marze S., McClements D.J., Menard O., Recio I., Santos C.N., Singh R.P., Vegarud G.E., Wickham M.S.J., Weitschies W., Brodkorb A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food—an international consensus. *Food Funct*, 5(6): 1113-1124.
- Palafox-Carlos, H., Ayala-Zavala J.F., Gonzalez-Aguilar G.A. (2011). The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *J Food Sci*, 76(1): R6-R15.
- Skinner, R.C., Gigliotti J.C., Ku K.M., Tou J.C. (2018). A comprehensive analysis of the composition, health benefits, and safety of apple pomace. *Nutr Rev*, 76(12): 893-909.
- Tagliacozzi, D., Helal A., Verzelloni E., Conte A. (2012). The type and concentration of milk increase the *in vitro* bioaccessibility of coffee chlorogenic acids. *J Agric Food Chem*, 60(44): 11056-11064.
- Vallejo, F., Gil-Izquierdo A., Perez-Vicente A., Garcia-Viguera C. (2004). In vitro gastrointestinal digestion study of broccoli inflorescence phenolic compounds, glucosinolates, and vitamin C. *J Agric Food Chem*, 52(1): 135-138.
- Velioglu, Y.S., Mazza G., Gao L., Oomah B.D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agric Food Chem*, 46(10): 4113-4117.
- Wijngaard, H., Hossain M.B., Rai D.K., Brunton N. (2012). Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Res Int*, 46(2): 505-513.
- Younis, K., Ahmad S. (2015). Waste utilization of apple pomace as a source of functional ingredient in buffalo meat sausage. *Cogent Food Agric*, 1(1): 1119397.