DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜLER İLE CEVİZ KABUKLARINDAN FENOLİK BİLEŞENLERİN ELDESİ

Ayşenur ERDEM

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜLER İLE CEVİZ KABUKLARINDAN FENOLİK BİLEŞENLERİN ELDESİ

Ayşenur ERDEM
0009-0003-4202-6866

Doç. Dr. Senem KAMİLOĞLU BEŞTEPE
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2025
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜLER İLE CEVİZ KABUKLARINDAN FENOLİK BİLEŞENLERİN ELDESİ

Ayşenur ERDEM

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Senem KAMİLOĞLU BEŞTEPE

Hem evsel hem de endüstriyel düzeyde atık olarak ayrılan ceviz kabukları, fenolik bileşikler açısından iyi bir kaynaktır. Fenolik bileşikler, bitki materyallerinden geleneksel veya yeşil ekstraksiyon yöntemleriyle ekstrakte edilebilir. Bu çalışmanın amacı, ceviz kabuğu atıklarından fenolik bileşikleri geri kazanmak ve elde edilen yeşil ekstraktların *in vitro* biyoerişilebilirliğini değerlendirmek için on farklı kolin klorür bazlı doğal derin ötektik çözücünün kullanıldığı bir ultrases destekli ekstraksiyon yöntemini uygulamaktır. Yeşil teknolojilerden biri olan ultrases destekli ekstraksiyon, geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine kıyasla çeşitli avantajlar sunmaktadır. Yeni nesil, yeşil çözücüler olarak bilinen doğal derin ötektik çözücüler, organik çözücülere kıyasla ekstraksiyonda daha verimli sonuçlar vermektedir. Fenolik bileşikler UPLC-ESI-MS/MS kullanılarak tanımlanmış ve miktarları belirlenmiştir. Sonuçlar, ceviz kabuklarında baskın flavonoidlerin kuersitrin ve taksifolin, baskın fenolik asitin ise ellajik asit olduğunu ortaya koymuştur. Biyoerişilebilir toplam fenolik madde içeriğinin, toplam antioksidan kapasitenin, flavonoidlerin ve fenolik asitler ve aldehitlerin çoğu doğal derin ötektik çözücü ekstraktında, etanolik ekstrakta kıyasla daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Kolin klorür:laktik asitle hazırlanan ekstraktlar, toplam fenolik madde içeriği (%79), toplam antioksidan kapasite (%72) ve flavonoidler (%81) açısından en yüksek biyoerişilebilirliği sergilerken, kolin klorür:gliserolün en yüksek biyoerişilebilir fenolik asit ve aldehit seviyelerine (%99) sahip olduğu görülmüştür. Bu çalışma, fenolik bileşiklerin geri kazanımını ve biyoerişilebilirliğini iyileştirmek için ceviz kabuklarının ultrases destekli doğal derin ötektik çözücüler ile işlenmesinin etkinliğini vurgulamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Ceviz kabukları, derin ötektik çözücüler, atık değerlendirilmesi, fenolik bileşenler, ultrases destekli ekstraksiyon
2025, xiv + 61 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

ULTRASOUND-ASSISTED DEEP EUTECTIC SOLVENT EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM WALNUT SHELL WASTE

Ayşenur ERDEM

Bursa Uludag University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Senem KAMİLOĞLU BEŞTEPE

Walnut shells, which are discarded as waste at both domestic and industrial levels, are good sources of phenolic compounds. Phenolic compounds can be extracted from plant materials by conventional extraction or green extraction methods. The aim of this study was to apply an ultrasound-assisted extraction method using ten different choline chloride-based natural deep eutectic solvents to recover phenolic compounds from walnut shell waste and to evaluate the *in vitro* bioaccessibility of the obtained green extracts. Ultrasound-assisted extraction, one of the green technologies, offers several advantages over conventional extraction methods. Natural deep eutectic solvents, which are new generation green solvents, provide more efficient extraction results compared to chemical solvents. Phenolic compounds were identified and quantified using ultra-performance liquid chromatography coupled with UPLC-ESI-MS/MS. The results revealed that the dominant flavonoids in walnut shells were quercitrin and taxifolin, while the dominant phenolic acid was ellagic acid. Bioaccessible total phenolic content, total antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids and aldehydes were higher in most natural deep eutectic solvent extracts compared to ethanolic extract. Extracts prepared with choline chloride:lactic acid exhibited the highest bioaccessibility for total phenolic content (79%), total antioxidant capacity (72%) and flavonoids (81%), while choline chloride:glycerol had the highest bioaccessible phenolic acids and aldehyde levels (99%). This study highlighted the effectiveness of treating walnut shells with natural deep eutectic solvents combined with ultrasound to improve the recovery and bioaccessibility of phenolic compounds.

Key words: Walnut shell, deep eutectic solvents, waste valorization, phenolic compounds, ultrasound assisted extraction
2025, xiv + 61 pages.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başlamama teşvik eden, bu eğitim sürecinde desteğini esgiremeyen, her türlü imkanla yanımda olan, hayatım boyunca en büyük iyikilerimden olacak sayın danışmanım Doç. Dr. Senem KAMİLOĞLU BEŞTEPE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tecrübelerini ve kişisel deneyimlerini paylaşarak yol gösteren, analiz ve araştırmalarımızı gerçekleştirmek için olanak sağlayan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ömer Utku ÇOPUR'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımda ve analizlerimde bana yardımcı olan desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşım Melek KESKİN'e teşekkürlerimi sunarım. Araş. Gör. Dr. Ertürk BEKAR'a kromatografik analizlerin gerçekleştirilmesinde sağladığı değerli katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her zaman arkamda duran, her kararımda yanımda olan vazgeçmeme müsaade etmeyip benden çok çabalayan, yorulduğumda elimi bırakmayan, kendimi şanslı hissettiren, çok sevdiğim canım babam Hüseyin ERDEM'e, annem Esra ERDEM'e, abim Samed ERDEM'e teşekkürlerimi sunarım.

Başarılarımla gururlanıp benimle birlikte mutlu olan, ben üzülünce üzülen sevgi ve emeklerini her zaman hissettiğim kıymetli büyüklerim, dedelerim Halil ERDEM ve Selim KESEN'e, babaannem Ayşe ERDEM'e, anneannem Ayşe KESEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Tezimi FHIZ-2024-1843 proje kodu ile destekleyen Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (BAP)'ne teşekkürlerimi sunarım.

Ayşenur ERDEM
…/…/…….

İÇİNDEKİLER

ÖZET……..…viii
ABSTRACT……...……..ix
TEŞEKKÜR……...…….…..x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ……...…….....xii
ŞEKİLLER DİZİNİ……...….xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ……..……...……..xiv
1. GİRİŞ…...……..1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI……....3
2.1. Gıda Atıkları……...3
2.2. Ceviz (*Juglans regia* L.)…….……....5
2.3. Ceviz Kabuğu……7
2.4. Biyoaktif Bileşenler……..……10
2.4.1. Fenolik Asitlerler……...12
2.4.2. Toplam Fenolik Madde İçeriği ve Antioksidan Kapasite……..……12
2.4.3. Flavonoidler……...13
2.5. Doğal Derin Ötektik Çözücüler…….…..……14
2.6. Doğal Derin Ötektik Çözücüler ile Biyoaktif Bileşen Eldesi……...16
2.7. Biyoerişilebilirlik……...……...22
3. MATERYAL ve YÖNTEM…….....24
3.1. MATERYAL……..……...…….....24
3.2. Doğal Derin Ötektik Çözücülerin (NADES) Hazırlanması…….……...….24
3.3. Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Fiziksel Özelliklerinin Belirlenmesi..…….....25
3.3.1. Yoğunluk ve pH…….……...…….....….....25
3.3.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)……..…….....25
3.4. Fenolik Bileşiklerin Ultrases Destekli Ekstraksiyonu ..……...…….…26
3.5. *In Vitro* Gastrointestinal Sindirim Simülasyonu …….…...……...…...…26
3.6. Toplam Fenolik Madde Tayini …….....27
3.7. Toplam Antioksidan Kapasite Tayini ……..…….....28
3.7.1. CUPRAC (Bakır (II) İyonu İndirgenme Antioksidan Kapasitesi) Tayini……..28
3.7.2. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Radikal Süpürme Aktivitesi Tayini……...29
3.8. Fenolik Bileşenlerin UPLC-ESI-MS/MS ile Tanımlanması ve Kantifikasyonu...30
3.9. İstatistiksel Analiz……...…….……..30
4. BULGULAR ve TARTIŞMA…….……..…....31
4.1. Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Karakterizasyonu……...…….....31
4.2. Toplam Fenolik Madde Tayini ve Toplam Antioksidan Kapasite Tayini…….....33
4.3. Flavonoidler….……...…….…….…37
4.4. Fenolik Asitler ve Aldehitler…….....…....…….…43
5. SONUÇ ……...…....….....48
KAYNAKLAR…….……...….....49
ÖZGEÇMİŞ……..…61

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	**Açıklama**
%	Yüzde
°C	Santrigrat Derece
dk	Dakika
g	Gram
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
sn	Saniye
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre

Kısaltmalar	**Açıklama**
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
$CaCl_2$	Kalsiyum Klorür
CUPRAC	2,9-dimetil-1,10-fenantrolin
DNA	Deoksiriboz nükleik asit
DPPH	2,2–difenil–1–pikrilhidrazil
EC	European Comission
ESI	Elektrosprey İyonizasyon
FAO	Food and Agriculture Organization
FTIR	Fourier Transform Infrared
GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
HBA	Hidrojen Bağı Alıcısı
HBD	Hidrojen Bağı Donörü
HCl	Hidrojen Klorür
KCl	Potasyum Klorür
KH_2PO_4	Mono Potasyum Fosfat
MS	Kütle Kromatografisi
KH_2PO_4	Mono Potasyum Fosfat
NaCl	Sodyum Klorür
NADES	Doğal Derin Ötektik Çözücü
$NaHCO_3$	Sodyum Bikarbonat
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
TAC	Toplam Antioksidan Kapasite
TPC	Toplam Fenolik Madde
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UPLC	Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1.	Gıda atığı değerlendirme, grafiksel özet.....	4
Şekil 2.2.	Ceviz kabuğu atığı ve uygulamaları.....	9
Şekil 2.3.	Polifenollerin sınıflandırılması…….....	12
Şekil 2.4.	İkili bir karışımın genel katı-sıvı faz diyagramı.....	14
Şekil 2.5.	Derin ötektik çözücü….....	16
Şekil 3.1.	Doğal derin ötektik çözücüler ile elde edilen……... ekstraktlar.....	26
Şekil 3.2.	Gallik asit kalibrasyon eğrisi.....	28
Şekil 3.3.	Troloks kalibrasyon eğrisi (CUPRAC).....	29
Şekil 3.4.	Troloks kalibrasyon eğrisi (DPPH).....	29
Şekil 4.1.	Sentezlenen NADES'lerin FTIR spektrumları….....	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

		Sayfa
Çizelge 3.1.	Doğal derin tektik çözücülerin yoğunluk pH'sı…….....	25
Çizelge 3.2.	Mide ve bağırsak elektrolit solüsyonları……...	27
Çizelge 4.1.	*İn vitro* sindirim sırasında ceviz kabuğu ekstraktlarının... toplam fenolik madde içeriğindeki (TPC) ve toplam…… antioksidan kapasitesindeki (TAC) değişimler…….	36
Çizelge 4.2.	UPLC–ESI–MS/MS kullanılarak ceviz kabuklarında….. tespit edilen fenolik bileşiklerin tanımlanması…….....	39
Çizelge 4.3.	*İn vitro* sindirim sırasında ceviz kabuğu …….. ekstraktlarının flavonoidlerindeki değişimler……...	40
Çizelge 4.4.	*İn vitro* sindirim sırasında ceviz kabuğu…… ekstraktlarındaki fenolik asit ve aldehitlerdeki……. değişimler……...	44

1. GİRİŞ

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü' nün güncel verilerine göre ceviz üretimi yaklaşık olarak yıllık 4 milyon tona ulaşmıştır. Çin, ABD, ve İran' dan sonra Türkiye dünyanın en büyük ceviz üreticileri arasında yer almaktadır (FAO 2024). Türkiye'de yetiştirilen cevizlerin çoğunluğu taze olarak tüketilmektedir. Bu durum hem evsel hem de endüstriyel düzeyde kabuk oluşumuna sebep olmaktadır. Ceviz kabuğu cevizin toplam ağırlığının %50'sinden fazlasını oluşturmaktadır ve her yıl yaklaşık 2,3 milyon ton ceviz kabuğu tarımsal atık olarak ortaya çıkmaktadır (Ventura ve ark., 2023). Endüstriyel üretim sonucu oluşan kabuk atıklarının çoğunluğu biyoyakıt üretiminde kullanılsa da ceviz kabuğu atıklarının zengin fenolik bileşik içerikleri onlara yüksek değerli ürünlere dönüştürülebilme potansiyeli sağlamaktadır.

Fenolik bileşikler bitki materyallerinden geleneksel veya yeşil yöntemlerle ekstrakte edilebilirler. Yeşil teknolojilerden biri olan ultrases destekli ekstraksiyon, geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine göre çeşitli avantajlar sunmaktadır. Bu avantajlar arasında ısıya duyarlı bileşiklerin daha iyi tutulması, enerji tüketiminin azalması ve işlem sürelerinin daha kısa sürmesi yer almaktadır (Yolcı Ömeroğlu ve ark., 2019). Ultrases, salınım yoluyla hücre duvarlarının geçirgenliğini arttırarak bitki materyali ve çözücü arasındaki etkileşimi arttırmaktadır. Bu işlem bitkinin hücre duvarlarını bozarak fenolik bileşiklerin çözücüye transferini sağlamaktadır (Akpınar Bayizit ve ark., 2023).

Etanol, metanol, aseton ve izopropanol gibi organik çözücüler, farklı oranlarda su ile karıştırılarak, ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi kullanılarak bitki kaynaklarından fenolik bileşiklerin elde edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Dzah ve ark., 2020). Ancak bu organik çözücülerin kullanılması çevreye zararlı olabilmektedir ve ekstraktlarda toksik kalıntılar bırakabilmektedir. Gıda ve gıda bileşenlerinin üretiminde ekstraksiyon çözücülerinin kullanımını düzenleyen 2009/32/EC sayılı direktifte belirtildiği üzere gıda ürünleri, insan sağlığına zararlı olabilecek seviyelerde solvent kalıntıları içermemelidir (European Commission, 2009). Yeni nesil, yeşil çözücü olan doğal derin ötektik çözücüler, bu sorunların üstesinden gelmek için geliştirilmiştir.

Doğal derin ötektik çözücüler, tipik olarak tuzlar ve moleküler bileşiklerden olmak üzere, bir bileşenin hidrojen bağı donörü ve diğer bileşenin hidrojen bağı alıcısı olarak görev yaptığı iyonik olmayan bileşiklerin belirli bir molar oranında birleşmesiyle sentezlenir (Osamede Airouyuwa ve ark., 2022). Hidrojen bağı alıcısı, kolin klorür gibi bir kuarterner amonyum tuzudur. Hidrojen bağı donörü ise çeşitli kimyasal sınıflardan gelebilir. Bu kimyasal sınıflara şekerler, organik asitler, aminler veya polialkoller örnek olarak verilebilir. Bu moleküller her bir bileşenin geçiş sıcaklığından daha düşük geçiş sıcaklığına sahip ötektik bir karışım oluşturur (Della-Posta ve ark., 2023). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, gıda atıklarından fenolik bileşiklerin geri kazanılması için ekstraksiyon çözücüsü olarak doğal derin ötektik çözücülerin, geleneksel organik çözücülerden daha iyi performans sergilediğini ve etkili bir strateji olduğunu göstermiştir (Fu ve ark., 2022; Cao ve ark., 2023).

Fenolik bileşiklerin sağlık üzerine potansiyel yararları, mide bağırsak sisteminde salınımlarına, yani biyoerişilebilirliklerine bağlıdır. Hızlı, güvenilir ve *in vivo* yöntemlerle ilişkili etik kaygıları taşımayan *in vitro* sindirim yöntemleri, mide bağırsak koşullarının simüle edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Wojtunik-Kulesza ve ark., 2020). Doğal derin ötektik çözücüler ile ekstrakte edilen fenolik bileşiklerin *in vitro* biyoerişilebilirliğine ilişkin araştırmalar sınırlıdır (Atayoğlu ve ark., 2023; Aslan Türker ve Doğan, 2022) ve bilindiği kadarıyla, daha önce ceviz kabuğu atığından elde edilen doğal derin ötektik çözücü ekstraktlarındaki fenolik bileşiklerin biyoerişilebilirliğini değerlendiren bir çalışma yapılmamıştır. Bu boşluğu doldurmak için, bu tez kapsamında kolin klorür bazlı doğal derin ötektik çözücüler kullanılarak ve ultrases destekli bir ekstraksiyon yöntemi uygulayarak ceviz kabuğu atıklarından fenolik bileşikleri geri kazanılması ve elde edilen yeşil ekstraktların *in vitro* biyoerişilebilirliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

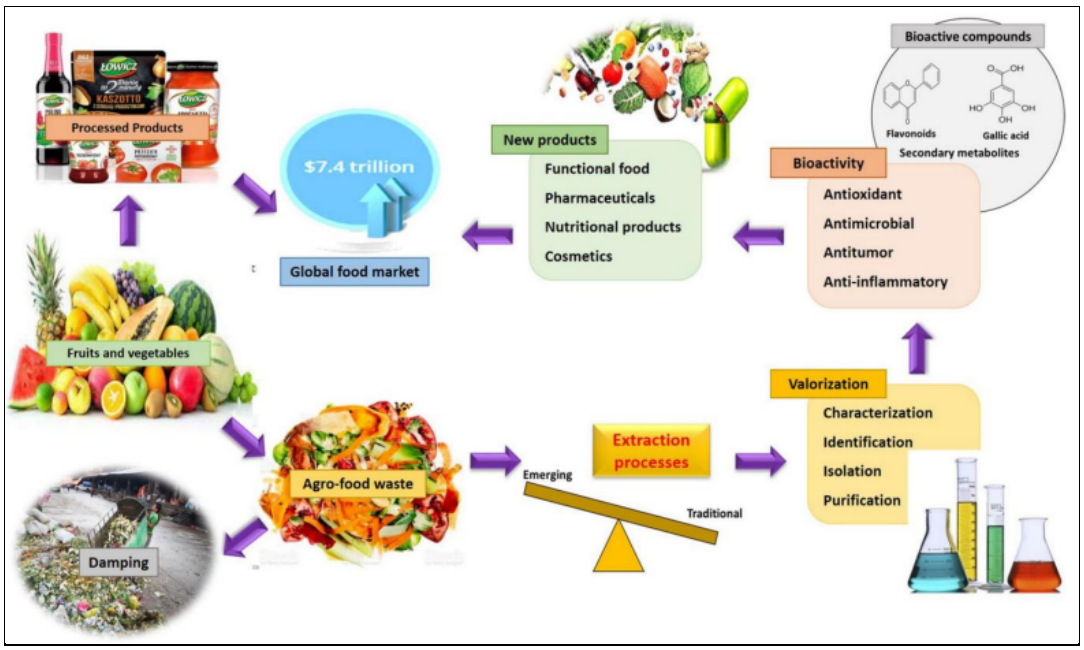
2.1. Gıda Atıkları

Gıda, yaşamın devamı ve sürdürülmesi için gerekli temel bir bileşendir. Hızla büyüyen küresel nüfus daha fazla gıdaya ihtiyaç duyarken, eş zamanlı olarak ciddi miktarda gıda atığı üretmektedir. 2022 yılı itibariyle 7,9 milyar olan dünya nüfusunun, 2050 yılında 9,8 milyara ulaşacağı tahmin edilmektedir. Öte yandan, gıda üretim hızının insan nüfus artış hızından daha fazla olduğu ve günümüzde 10 milyar insanı besleyecek düzeyde gıda üretiminin yapıldığı bilinmektedir. Ancak, her yıl üretimin yaklaşık %30'u gıda tedarik zincirinde atık olarak karşımıza çıkmaktadır (Özkan ve ark., 2022; Holt-Giménez ve ark., 2012).

Son yıllarda oldukça hızlı bir artış gösteren gıda üretimi nedeniyle, gıda işletmelerindeki atık miktarlarında da benzer oranda artışlar meydana gelmektedir. Türkiye'de gıda üretim atıkları diğer sanayi atıklarının %5'ini oluşturmaktadır (TÜİK, 2021). Gıda atıkları doğal kaynakları, toprak verimliliğini, tarımı, ekonomiyi, küresel ısınma ve iklimi etkileyen önemli bir konudur ve Dünya genelinde acil önlem alınılması gereken konular arasındadır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü verilerine göre toplam gıda üretiminin yaklaşık üçte birinin yıllık gıda atığı olarak üretildiği ve bunun potansiyel olarak 1,26 milyar yetersiz beslenen kişiyi besleyebileceği tahmin edilmektedir. Gıda atıkları, üretimin başlangıcı olan tarlalardan itibaren oluşmaya başlamaktadır (Özkan ve ark., 2022). Gıda atıklarının uygun olmayan yöntemlerle işlenmesi çevreye ciddi hasarlar verebilmektedir.

Biyoaktif bileşenler açısından zengin atıkların değerlendirilmesi atık miktarını azaltacağı gibi yeni ekonomik imkanlar oluşturması da mümkündür. Aynı zamanda gıda atıklarının değerlendirilmesi, geri dönüşüme olan ilgiyi arttırmayı amaçlamaktadır (Liu ve ark., 2023). Gıda atıklarının kaynakları; meyve ve sebzeler, süt ürünleri, et ürünleri, deniz ürünleri ve tarımsal atıklar olarak sınıflandırılabilmektedir. Dünya genelinde gıda atıklarının %30'unu tahıllar, %40-50'sini köklü bitkiler, meyveler ve sebzeler, %20'sini yağlı tohumlar, et ve süt ürünleri ile balık çeşitleri oluşturmaktadır (Tekiner ve ark., 2021).

Türkiye İsraf Raporuna göre, ülkemizde her yıl 26 milyon ton gıda israf olmaktadır. En fazla israf meyve ve sebze grubunda gerçekleşmekte olup, üretilen miktarın %25-40'ı kaybedilmektedir (Tekiner ve ark, 2021; Şahin ve ark., 2018). Atık Direktifi 2008/98/EC' de atık "sahibinin attığı veya atmayı planladığı veya atması gereken herhangi bir madde veya nesne" şeklinde tanımlanmaktadır (Liu ve ark., 2023; Atık Direktifi 2008/98/EC). Ceviz, hindistan cevizi, yer fıstığı, muz, avokado vb. gıdaların kabukları tarımsal atık olarak değerlendirilmektedir (Liu ve ark., 2023; Dai ve ark., 2018). Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü' nün raporuna göre, farklı ürün işleme yöntemlerinden kaynaklanan yaklaşık 250 milyon ton tüketilemeyecek bitki atığı oluşmuştur (Liu ve ark., 2023; FAO, 2013; Heredia-Guerrero ve ark., 2017). Avrupa Atık Yönetmeliği'nde değişiklikler yapılmış ve üye devletlerin gıda israfını 2025 yılına kadar %30 azaltmaları talep edilmiştir (Tekiner ve ark., 2021). Tarımsal atıklar yok edilirken genellikle yakma yöntemi tercih edilmektedir. Bu yöntem ciddi boyutlarda hava, toprak, su ve gıda kirliliklerine sebep olabilmektedir. Tarımsal atıklar oldukça çeşitli yüksek değerli ürünler üretmek için düşük maliyetli ve doğal bir alternatif olarak kullanılabilir (Liu ve ark., 2023; Cheng ve ark., 2010). Bu sebeple atıkların değerlendirilmesi ve atık değerlendirme esnasında çevreye zarar verilmemesi adına yeşil yöntemler geliştirilip uygulanmaya başlanmıştır.



Şekil 2.1. Gıda atığı değerlendirme, grafiksel özet (Patara ve ark., 2022)

Tarımsal gıda atıkları ve yan ürünleri, fenoller ve antioksidanlar gibi farmasötik, kozmetik ve gıda endüstrilerinde ve hayvan yemlerinde fonksiyonel bileşenler olarak kullanılabilen yüksek potansiyelli biyoaktif bileşik kaynaklarıdır (Fontana ve ark. 2013; Castrica ve ark. 2019). Sert kabuklu meyveler, sağlığı geliştirici özelliklere sahip yüksek konsantrasyonlarda antioksidan ve fitokimyasal içermelerinden dolayı "fonksiyonel gıda" olarak tanımlanmaktadır (Dikmen 2015; Pycia ve ark. 2019; Gülsoy ve ark. 2021). Son yıllarda üzerinde çalışmaların yoğunlaştığı fonksiyonel gıdalar; temel besin öğeleri gereksinimini karşılamanın yanında, vücutta özel fizyolojik etki sağlayan, hastalıklardan korunma ve tedavide etkinlik gösteren gıdalar olarak tanımlanmaktadır. Gıdalar, bileşimlerindeki öğelere bağlı olarak fonksiyonel olabildiği gibi, bu öğelerin yoğun olduğu gıdalardan ayrılarak bir başka gıdaya eklenmekte ve böylece fonksiyonel hale gelmektedir (Yiğit ve ark., 2005; Açkurt ve ark., 1999). Kalp sağlığını korumak için verilen diyet önerilerinde haftada 4-5 kez 1 porsiyon sert kabuklu kuruyemişler tüketilmesi önerilmektedir. Son dönemlerde Dünya'da ve ülkemizde polifenoller ve minerallerce zengin besin içeriğine sahip olması dolayısıyla ceviz üretiminde ve talebinde büyük oranda artışlar meydana gelmiştir (Cerit ve ark. 2017; Pycia ve ark. 2019).

2.2. Ceviz (*Juglans regia* L.)

TÜİK istatistiklerine göre Türkiye'nin 2005 yılında 150 bin ton olan ceviz üretimi 2020 yılında yaklaşık 286 bin ton cevize ulaşmıştır (TÜİK, 2021). Türkiye'de ceviz üretiminde önceki sezona göre %4,7' lik bir artış meydana gelmiştir. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü verilerine göre ceviz sert kabuklu meyveler içerisinde dünyada alan olarak %9,1'lik pay ile ilk dört içerisinde yer almakta olup, üretim miktarı bakımından ise %19,9'luk pay ile ikinci sırada yer almaktadır (FAO, 2020). Türkiye'nin üretimde dördüncü sırada yer almasının sebepleri arasında ceviz üretiminin büyük bir kısmının tohumdan yetişmiş ağaçlardan karşılanması, ekolojik koşullara göre uygun çeşit seçiminin yapılmaması, hastalık ve zararlılar ile mücadelenin tam olarak uygulanmaması, standart ceviz çeşitleri ile kurulu kapama bahçe sayısının az olması, ve üretim ve çoğaltma tekniklerindeki yetersizlikler yer almaktadır (Varol ve ark. 2020). 2019 yılında dünyada kabuklu ceviz ihracatı yaklaşık dört yüz otuz dört bin ton iken,

yüz elli sekiz bin tonluk ihracat miktarı ile ABD ilk sırada yer almaktadır. 2019 yılında dünyada kabuklu ceviz ithalatı üç yüz elli bin ton iken altmış bin tonla Türkiye ilk sırada yer almaktadır (FAO, 2020).

Ceviz ağacı (*J. regia* L.) *Juglandaceae* familyasına ait olup dünya çapında (Güneydoğu Avrupa, Doğu Asya ve Kuzey Amerika başta olmak üzere) yaygın şekilde yetiştirilmektedir (Salık ve ark., 2023; Bou ve ark., 2016; Jahanban-Eshaflan ve ark., 2019). Arkeolojik araştırmalarda Anadolu'da yaşayan insanların en az 3000 yıldır cevizi tanıdıkları ve ürünlerinden yararlandıklarına dair izlere rastlanmıştır (Bayazit ve ark., 2016). Ceviz, Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü tarafından, besin değerinin oldukça yüksek olması ve biyoaktif bileşiklerce zengin olması nedeniyle, öncelikli bitkiler grubuna dâhil edilmiş ve insan beslenmesi için stratejik bir tür olarak sınıflandırılmıştır (Salık ve ark., 2023; Bou ve ark., 2016; Jahanban-Eshaflan ve ark., 2019).

Ceviz (*Juglans regia* L.) soğuğa ve kurağa karşı dayanaklı, çeşitli ekolojik koşullarda yetişebilen bir meyve türüdür (Kadakoğlu ve ark., 2022). Ceviz, temel besin öğeleri yönünden incelendiğinde; %13,6–22,3 oranında protein, %56,4–70,6 oranında yağ ve %2 civarında kül içerdiği bildirilmektedir. Biyolojik kalitesi yüksek (lisin/arjinin oranı düşük) ve kolay hazım edilebilen protein içermesi sebebiyle vejetaryen beslenmede önemli bir yer sağlamıştır. Ayrıca bu tip beslenmede, baklagillerle birlikte ceviz tüketildiğinde gereksinim duyulan proteinlerin büyük çoğunluğunun karşılandığı ifade edilmiştir (Yiğit ve ark., 2005).

Cevizi fonksiyonel yapan en önemli bileşenlerinden biri içerdiği yağdır. Özellikle yağın, oransal olarak çoklu doymamış yağ asitlerince zengin olması beslenmedeki önemini daha da arttırmaktadır. Ceviz yağının; %72 çoklu doymamış yağ asidi (%59 linoleik [n-6], %13 α-linolenik [n-3]), %18 tekli doymamış yağ asidi (oleik asit) ve %10 doymuş yağ asidi içerdiği bilinmektedir (Yiğit ve ark., 2005; Lavedrine ve ark., 1999). Ceviz içi bileşiminde yağda çözünen vitaminlerden A ve E vitaminleri, suda çözünenlerden C, B1, B2, folik asit, pantotenik asit ve niasin, minerallerden; demir, çinko, bakır, magnezyum ve fosfor bulunmaktadır. Cevizin iyi bir manganez ve bakır kaynağı olduğu; bu iki mineralin antioksidan korumasındaki önemli enzimlerde temel

mineraller olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Yiğit ve ark., 2005). Bunun yanı sıra lif içeriği nedeniyle insan sindirim sisteminde yararlı bir görev üstlenmektedir (Yiğit ve ark., 2005; Serrano ve ark., 2005). İçeriğindeki fitokimyasal maddelerden E vitamininin serbest radikallerin sebep olduğu oksidatif stres ve iltihaplanmayı azalttığı ayrıca yaşlanma, kanser, Parkinson ve Alzheimer gibi dejeneratif hastalıkların gelişimini erteleyebilme ve azaltabilme fonksiyonlarına sahip olduğu çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bununla birlikte içeriğindeki polifenollerin kardiyovasküler sistem, metabolik sendrom ve diyabetle ilişkili çeşitli patolojik hastalıklara karşı birçok faydasının olduğu da bildirilmiştir (Gülsoy ve ark., 2021). Antioksidanlar, vücutta üretilen veya gıdalardan sağlanan ve hücre hasarlarını önleyen bileşiklerdir. Serbest radikalleri temizler ve oksidasyonun neden olduğu hasarı azaltırlar (Gülsoy ve ark., 2021; Lee ve ark., 2004). Ayrıca DNA mutasyonu, proteinlerin çapraz bağlanması ve yağların peroksidasyonu gibi serbest radikallerin neden olduğu hasarları inhibe ederler (Pereira ve ark., 2008; Gülsoy ve ark., 2021). Ceviz diğer sert kabuklu meyve türlerine göre daha yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir (Yin ve ark., 2015; Bi ve ark., 2016; Gülsoy ve ark., 2021). Bu aktivite özellikle cevizin iç meyve zarında bulunan polifenollerden E vitamini, melatonin ve bitki bileşiklerinden kaynaklanmaktadır (Haddad ve ark., 2014; Gülsoy ve ark., 2021). Sağlıklı yetişkinler üzerinde yapılan bir çalışmada ceviz yemenin, damar sertliğine yol açan, kötü kolesterolden (LDL) kaynaklanan hasar da dahil olmak üzere insan vücudundaki oksidatif hasarla savaşmaya yardımcı olabilecek mükemmel bir antioksidan kaynağı olduğu gözlemlenmiştir (Gülsoy ve ark., 2021; Sánchez-González ve ark., 2017).

2.3. Ceviz Kabuğu

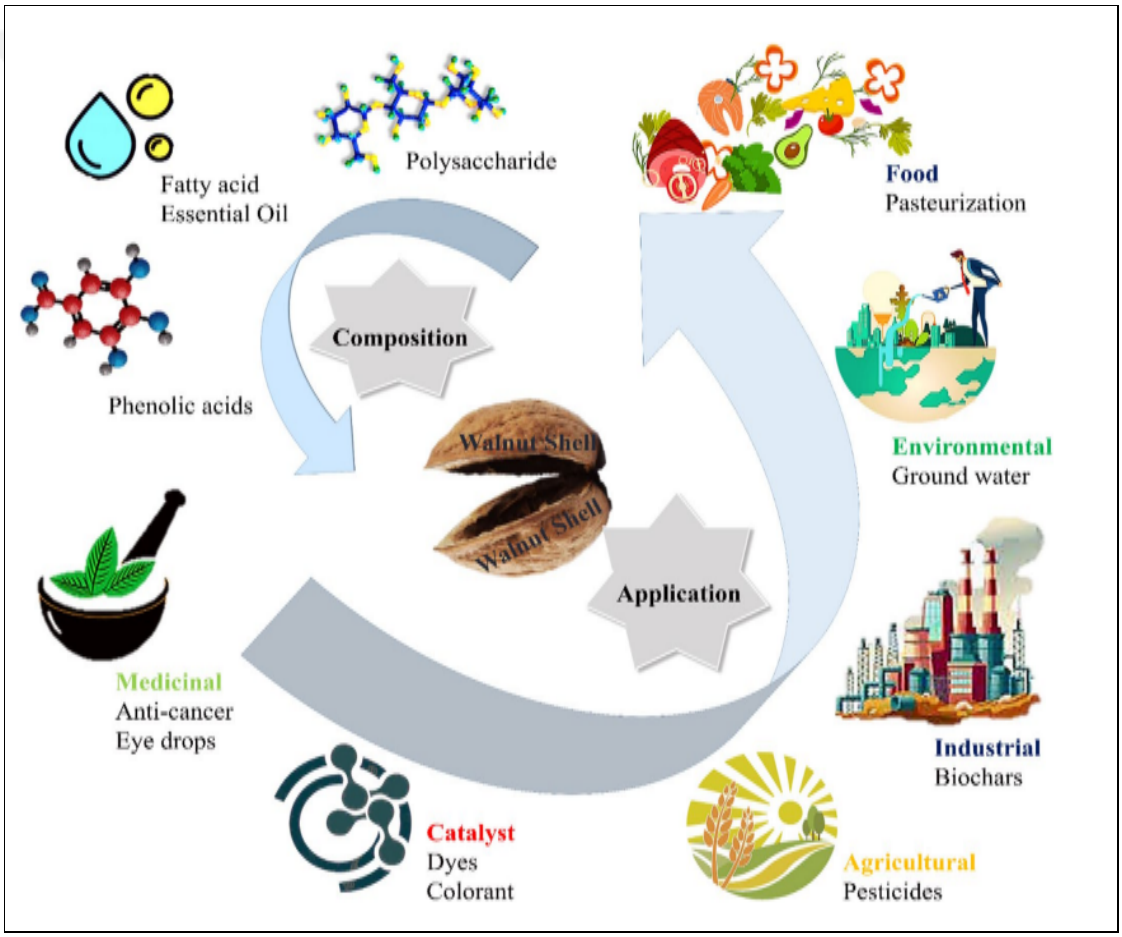
Ceviz (*Juglans regia*), sert bir kabuk içine alınmış yenilebilir çekirdekleri için dünya çapında yetiştirilmektedir. Kabuk bir cevizin toplam ağırlığının %67'sini oluşturduğu için yaklaşık 2,3 milyon ton ceviz kabuğu geride kalmaktadır. Kabukta hemiselüloz, selüloz ve ligninden oluşan bileşim, kabuğun sert, toksik olmayan, biyolojik olarak parçalanabilir ve yenilenebilir olmasını sağlamaktadır. Sklerenkima hücreleri de artık genişlemeyen kabuk ve destek dokularında bulunmaktadır. Ceviz kabuklarının ikincil duvarları, odunsu hücrelerle kalın ve sert tabakalar tarafından oluşmaktadır (Han ve ark.

2018). Lignoselülozik bileşikler, farklı bitki veya odun biyokütleleri arasındaki toplam biyokütlenin yaklaşık %70'ini oluşturur (Albatrni ve ark., 2022; De Hoyos-Martinez ve ark., 2018). Ceviz kabuklarının ana bileşenleri, diğer kimyasallar ve malzemeler oluşturmak için kullanılabilen lignin, selüloz, hemiselüloz ve tanenleri içeren odun biyokütlesine çok benzerdir (Albatrni ve ark., 2022; Jahanban-Esfahlan ve ark, 2018). Kabukta yüksek oranda çapraz bağlı polimerik yapıların bulunması nedeniyle ceviz kabuklarının kimyasal bileşenlerinin açıklanması son derece zordur. Ceviz kabukları yaygın uygulamalarda kullanıldığından, kimyasal bileşenlerini tanımlayabilmek çok önemlidir. Ceviz kabuklarının yaklaşık kimyasal bileşiminin %50,3 lignin, %22,4 hemiselüloz, %23,9 selüloz ve %3,4 külden oluştuğu bildirilmiştir (Albatrni ve ark., 2022; Jahanban-Esfahlan ve ark, 2019). Bununla birlikte, her bir bileşenin yüzdesi cevizin kaynağına, bitki genetiğine, bitkinin yetiştirildiği ortama ve meyvenin işleme koşullarına bağlı olarak biraz değişebilir (Albatrni ve ark., 2022). Günümüze kadar bazı özellikleri tespit edilmiş olan 22 ceviz türü bulunmaktadır (Koşar ve ark., 2023). Bu çalışmada ceviz türü olarak Chandler kullanılmıştır. Tüketicilerin tercih ettiği sarı iç rengine sahip “Chandler” ceviz çeşidi ile Türkiye'de farklı ekolojilerde birçok yeni plantasyon kurulmuştur (Acarsoy Bilgin ve ark., 2023).

Gıda sektöründe genel olarak iç meyvesi kullanılıyor olsa da yeşil dış kabuğu, sert kabuğu, ağacı ve yaprakları da kozmetik, eczacılık, mobilya gibi birçok sektörde yaygın olarak kullanılmaktadır (Jahanban-Esfahlan ve ark. 2019). Ceviz ağacının yan ürünlerinin birçok uygulama alanı bulunmaktadır. Ceviz meyvesinin sadece kabuk kısmı, kabuklu yemişin toplam ağırlığının önemli bir yüzdesini oluşturmaktadır ve geniş bir uygulama alanına sahiptir. Yeşil ceviz kabukları, çekirdekleri, iç kabuk ve yaprakları kozmetik ve ilaç sanayisinde kullanılmaktadır (Kadiroğlu ve Ekici 2018; Jahanban-Esfahlan ve ark. 2019). Ceviz kabukları ayrıca fenolik maddeler, yağ asitleri, amino asitler ve eser elementler açısından da zengindir. Dahası, yenilenebilir bir kaynak olarak, ceviz kabuklarının birikmesi aşırı kullanımla karşılaşmadan yenilenebilir, bu da ceviz kabuklarının geri kazandırılmasında bir avantajdır.

Küresel kaynakların tükenmesiyle, ceviz kabuklarının işlenmesi ve kullanımı giderek daha fazla ilgi görmektedir. Kimyasal yapısı sebebiyle yüksek potansiyeline rağmen,

geleneksel olarak ısıtma için bir enerji kaynağı, metalleri, plastikleri, ahşabı temizlemek ve parlatmak için aşındırıcı bir madde ve yağı, tehlikeli maddeleri ve ağır metalleri ayırmak için bir filtre ortamı olarak kullanılmıştır. Yakıt ve yakacak sektöründe yerini alan ceviz kabuğu birçok alternatif yakacak arasında hem çevresel sebeplerden dolayı hem de ekonomik olması sebebiyle herkes tarafından tercih edilmektedir. Günümüzde, biyofiltrasyon potansiyeli nedeniyle, petrol sahalarından ve atık suları arıtmak için kullanılmaktadır. Son yıllarda, araştırmalar fenolik bileşiklerin varlığıyla bağlantılı olan ceviz kabuklarından antioksidanlar ve antimikrobiyallerin üretimine odaklanmıştır (Chamorro ve ark., 2022).



Şekil 2.2. Ceviz kabuğu atığı ve uygulamaları (Fordos ve ark., 2023)

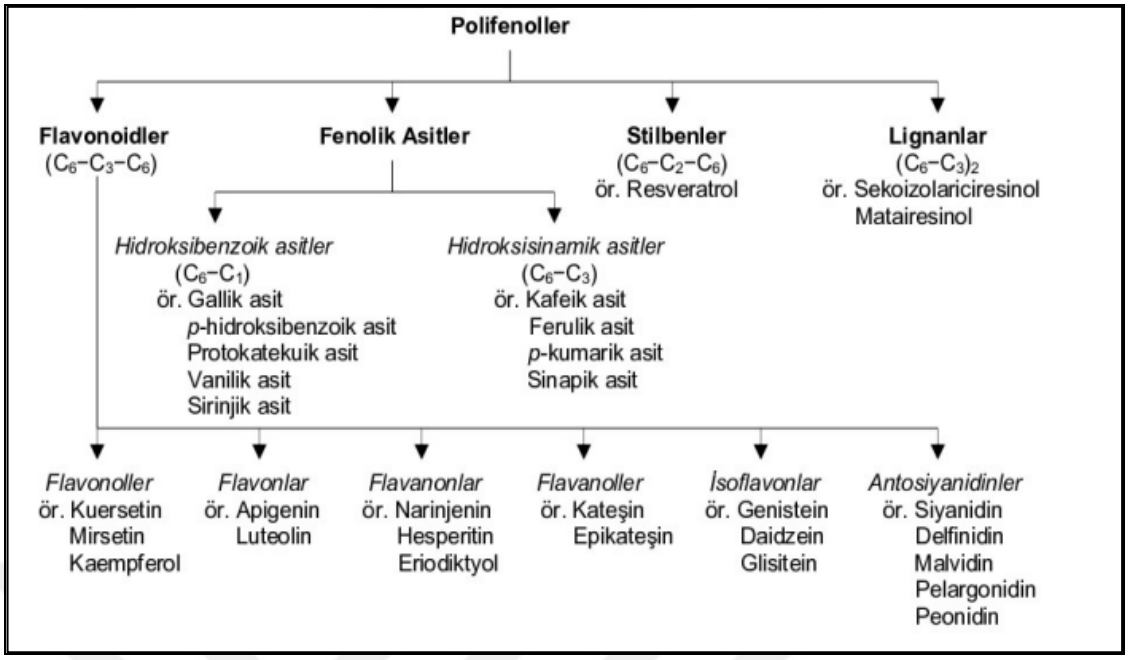
2.4. Biyoaktif Bileşenler

Meyveler, makro besinler (karbonhidrat, lipitler, protein) ve mikro besinler (vitaminler, mineraller, biyoaktif bileşikler) gibi çeşitli bileşenlerin potansiyel kaynağıdır (Mahato ve ark., 2019; Patra ve ark., 2022). Meyve işleme endüstrilerinden elde edilen önemli yan ürünler arasında kabuk/deri, tohumlar, yapraklar, yumrular, kökler ve posa bulunmaktadır. Bu yan ürünlerin bertarafı çevreye zarar vermektedir ve ilgili endüstrilere ekonomik yük getirmektedir (Altemimi ve ark. 2017a; Chemat ve ark. 2012; Kapoor ve ark. 2020, Patra ve ark., 2022). Öte yandan, bu yan ürünler fenolik bileşikler (fenolik asit, favonoidler), biyoaktif proteinler (peptit izolatı, amino asitler), yağ asitleri, lifler gibi biyoaktif bileşiklerin zengin bir kaynağıdır. Benzer şekilde, kabuklar pektin, değerli lifler ve mineraller içerir (Marić ve ark. 2018; Mena-García ve ark. 2019; Patra ve ark., 2022). Bu biyoaktif bileşikler, farklı teknolojiler kullanılarak yan ürünlerden ekstrakte edilebilir ve fonksiyonel gıdalar veya diyet takviyeleri dahil olmak üzere çeşitli değerli ürünler geliştirmek için kullanılabilirler. Biyoaktif bileşikler, kanser, katarakt, alzheimer, parkinson hastalığı, yaşlanma bozukluğu ve kalp ile ilgili hastalıklara yakalanma riskini düşürmektedir. Yüksek antioksidan aktiviteleri ve antimikrobiyal aktiviteleri nedeniyle, bu bileşikler kronik hastalıklara karşı savunmacı bir etki göstermektedir, kanserli kimyasalların üretimini önler ve bağışıklık sistemini dengelemektedir. Bu bileşiklerin, fonksiyonel gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılması veya besin takviyesi olarak tüketilmesi faydalıdır. Nutrasötik özelliklerinin yanı sıra, doğal antioksidanlar ve renk bileşikleri sentetik antioksidanlarına yerine geçerek farklı ilaç ve işleme endüstrilerinde kullanılabilecektir (Altemimi vd. 2017a; Azmir vd. 2013; Sasidharan vd. 2011; Patra ve ark., 2022). Bu nedenle, meyve endüstrisi yan ürünlerinden biyoaktif bileşiklerin ekstrakte edilmesi ve değerlendirilmesi, besleyici gıda sağlayarak, çevre sorununu hafifleterek ve atık bertarafı yükünü azaltarak toplum sağlığını iyileştirmeyi hedeflemektedir. Meyve ve sebzelerin biyoaktivitesi, diyabet, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, osteoporoz vb. gibi çeşitli hastalıkların olumsuz etkilerini önleme kapasitesi olarak tanımlanmıştır.

Biyoaktif bileşikler, bitkinin ikincil metabolitleridir, temel ve temel olmayan besinler olarak sınıflandırılmaktadır. Fenolik bileşikler, diyet lifleri ve yağ asitleri temel

olmayan bileşiklerdir, vitaminler ve mineraller ise temel bileşiklerdir (Guil-Guerrero ve ark. 2016; Padayachee ve ark. 2017, Patra ve ark., 2022). Meyvelerin yan ürünleri fenolik bileşikler, vitaminler, mineraller, diyet lifi ve diğer biyoaktif bileşikleri içeren fitokimyasalları içermektedir. Meyvenin içinde bulunan polifenolik bileşikler insan sağlığının gelişimine karşı bağışıklık sağlar. Fenolik bileşikler meyvelerin ikincil metabolitleridir ve serbest radikallere ve oksidatif streslere karşı etki edebilirler ve bu nedenle antioksidan olarak adlandırılmışlardırılmaktadırlar (Singh ve ark. 2017; Trigo ve ark. 2020; Patra ve ark., 2022). Bunlar yüksek moleküler ağırlıklı, yapısal olarak karmaşık bileşiklerdir (Patra ve ark., 2022).

Kimyasal analizler, fenolik bileşikler, tanenler, vitaminler, favonoidler, pektin ve yağ asidi içeriklerinin çeşitli analizlerde belirlenmesi için, gallik asit, tannik asit, kateşin, galakturonik asit, oleik asit gibi standartların eşdeğerleri kullanılarak bu bileşiklerin miktarlarının hesaplanmasıyla ifade edilmektedir (Ivanović et al. 2020; Trigo et al. 2020; Patra ve ark., 2022). Biyoaktif bileşiklerin ayrılması ve izolasyonu, polaritelerine göre ayırt edilen kromatografik yöntemlerle belirlenir. Gaz-sıvı kromatografisi kullanılırken, ekstrakt bazı hafif uçucu bileşikler içermektedir ve sıvı-katı kromatografisi kullanılırken, karışım yüksek molekül ağırlıklı moleküller içermektedir (Altemimi ve ark. 2017a; Patra ve ark., 2022). Bu bileşikler polaritelerine göre kolon da ayrılmaktadırlar. Biyoaktif bileşiklerin izolasyonundan sonra, moleküllerin tanımlanması, kompozisyonu ve içindeki bağlanmanın belirlenmesi için çeşitli spektroskopik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin temel prensibi, bir spektrum veren moleküller tarafından elektromanyetik radyasyonun emilimidir. Spektrumlar, her spektrum moleküldeki her bağ türü için belirtildiğinden tanımlama amaçlıdır. UV-Vis, FTIR, NMR ve MS bu yöntemlere bazı örneklerdir (Ivanović ve ark., 2020; Sasidharan ve ark., 2011; Patra ve ark., 2022).



Şekil 2.3. Polifenollerin sınıflandırılması (Grootaert ve ark. 2015)

2.4.1. Fenolik Asitler

Fenolik asitlerin biyolojik yetenekleri, moleküler çeşitlilikleri kadar karmaşıktır çünkü bu moleküller antihipertansif, antidiyareik, antidepresan, nöroprotektif, antiinflamatuar, antikanser ve antihiperglisemik ajanlar olarak işlev görebilir (Tungmunnithum ve ark., 2018).

2.4.2. Toplam Fenolik Madde İçeriği ve Antioksidan Kapasite

Son yıllarda, antioksidan aktiviteye sahip fenolik ve flavonoid maddeler açısından zengin doğal diyetler beslenme ve gıda bilimine olan ilgiyi artırmıştır (Lee ve ark., 2015; Aryal ve ark., 2019). Doğal fenolik ve flavonoid bileşikleri, en az bir hidroksil grubu taşıyan aromatik bir halka tutan bitki sekonder metabolitleridir (Tungmunnithum ve ark., 2018; Lee ve ark., 2015). Fenolik bileşikler, hidroksil grupları doğrudan antioksidan etkiye katkıda bulunabildiği için iyi elektron vericileridir (Bendary ve ark., 2013; Lee ve ark., 2015). Literatürdeki çok sayıda rapora göre, fenolik bileşikler biyolojik sistemlerde serbest radikal inhibisyonu, peroksit ayrışması, metal inaktivasyonu önler (Babbar ve ark., 2015; Lee ve ark., 2015).

Yapraklı sebzelerdeki doğal antioksidanlar, serbest radikallerin etkisine karşı korumada hayati bir rol oynarlar (Yen ve Chuang, 2000; Lee ve ark., 2015). Birçok epidemiyolojik çalışmada güçlü antioksidan aktiviteye sahip fenolik ve flavonoid bileşikleri içeren yapraklı sebze tüketiminin kardiyovasküler hastalıklar, kanser, diyabet ve nörodejeneratif hastalıklara yakalanma riskini düşürdüğü görülmüştür (Adebooye ve ark., 2008; Lee ve ark., 2015). Geleneksel tanımıyla antioksidan, hastalıklara karşı koruyan, oksijen ya da peroksitlerle ilerleyen reaksiyonları engelleyen maddelerdir. Bu antioksidan maddelerin çoğu çeşitli ürünlerde koruyucu olarak kullanılmaktadır. Daha biyolojik olarak ise antioksidan madde, havadaki oksijen ile bozulan ürünlere ilave edilerek bozulmayı engelleyen veya bozulmayı geciktiren sentetik veya doğal madde olarak tanımlanmaktadır. Gıda endüstrisinde antioksidanlar geniş bir kullanım alanına sahiptir (Üneş, 2016; Huang ve ark., 2005).

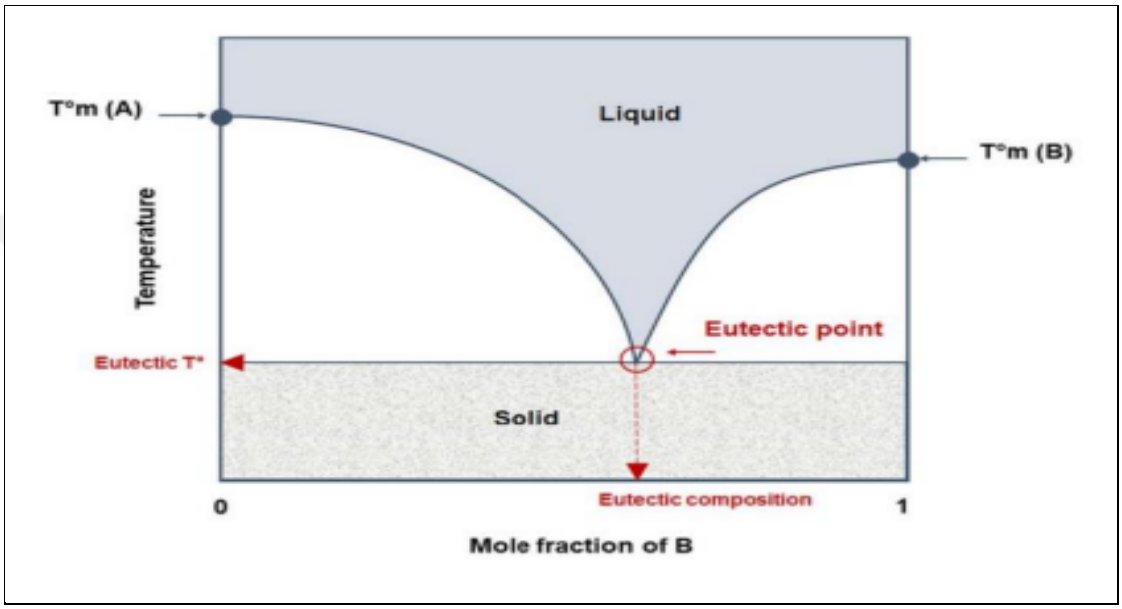
2.4.3. Flavonoidler

Flavonoidler muhtemelen en yaygın polifenoller olup, genellikle üç oksijenli heterosiklon oluşturan karbon atomuyla bağlanan iki aromatik halka içeren bileşiklerdir (Huyut ve ark., 2017; Rana ve ark., 2022). Flavonoidler, altı alt sınıfa ayrılmaktadır: antosiyaninler, flavonlar, flavanoller, izoflavonlar, flavanoller ve flavanonlar (Panche ve ark., 2016; Rana ve ark., 2022). 4000'den fazla bitki türünün flavonoid içerdiği bulunmuştur; bunların çoğu yaprakların, sebzelerin ve çiçeklerin çekici renklerinden sorumludur (Karak, 2019; Rana ve ark., 2022).

Yapraklarda, çiçeklerde ve meyvelerde görülen kızıl, turuncu ve mavi renkler, bitkilerde polifenollerin glikosile türevleri olarak bulunduğu bilinen flavonoidlerden kaynaklanmaktadır (Pietta, 2000; Rana ve ark., 2022). Bu bileşiklerin biyolojik özellikleri, özellikle antioksidan işlevi, hem yapısal farklılıklardan hem de glikozilasyon eğilimlerinden etkilenmektedir. Flavonoid açısından zengin gıdaların uzun süreli tüketilmesinin insan sağlığını ve uzun ömürlülüğünü artırabileceği öne sürülmüştür (Bondonno ve ark., 2019; Rana ve ark., 2022). Flavonoidler ayrıca, davranışı ve hafızayı iyileştirebilir ve oksidatif stresi azaltabilirler. Bu bileşikler Alzheimer hastalığı semptomlarını hafifletmeye de yardımcı olabilirler (Rana ve ark., 2022).

2.5. Doğal Derin Ötektik Çözücüler

Faz diyagramında, iki ya da daha fazla bileşiğin karışması sırasında, bu karışımı oluşturan bileşiklerin erime noktalarından daha düşük değere sahip olan bir karışım oluşabilmektedir. Bu karışımın oluştuğu nokta, ötektik nokta ve oluşan karışım da derin ötektik çözücü olarak adlandırılmaktadır (de Maria, 2017).



Şekil 2.4. İkili bir karışımın genel katı-sıvı faz diyagramı. Tm (A) ve Tm (B) sırasıyla A ve B bileşiklerinin erime sıcaklıklarını temsil eder. Ötektik nokta her iki bileşiğin erime eğrilerinin buluştuğu bileşimi ve minimum erime sıcaklığını temsil eder. (Achkar ve ark., 2021)

Derin ötektik çözücü, genellikle en az iki bileşenin, bir hidrojen bağı alıcısı ve bir hidrojen bağı donörü karışımından oluşan sistemler olarak tanımlanır. Bunlar, her bir bileşeninkinden daha düşük bir erime noktası (100°C'nin altında) ile karakterize edilen yeni bir ötektik faz oluşturmak için kendi kendine birleşebilirler. Bunu oluşturan bileşenler ayrıca güvenli özelliklere, düşük toksisiteye, yenilenebilirliğe ve biyolojik olarak parçalanabilirliğe ve düşük maliyete sahip olmalıdır (Smith ve ark, 2014; Tomé ve ark., 2018).

Pratik ve deneysel bir bakış açısından, derin ötektik çözücüler genellikle hidrojen bağı alıcısı ve hidrojen bağı donörüne uygun bir sıcaklıkta iki yoldan biriyle karıştırarak hazırlanabilmektedir: (i) Düşük erime noktalı bileşen önce eritilir ve ardından yüksek

erime noktalı bileşik sıvıya eklenir ve karışımlar birlikte eritilir; (ii) Her iki bileşen de yüksek erime noktalarına sahip olduğunda, iki bileşen karıştırılır ve birlikte eritilir (Tomé ve ark., 2018).

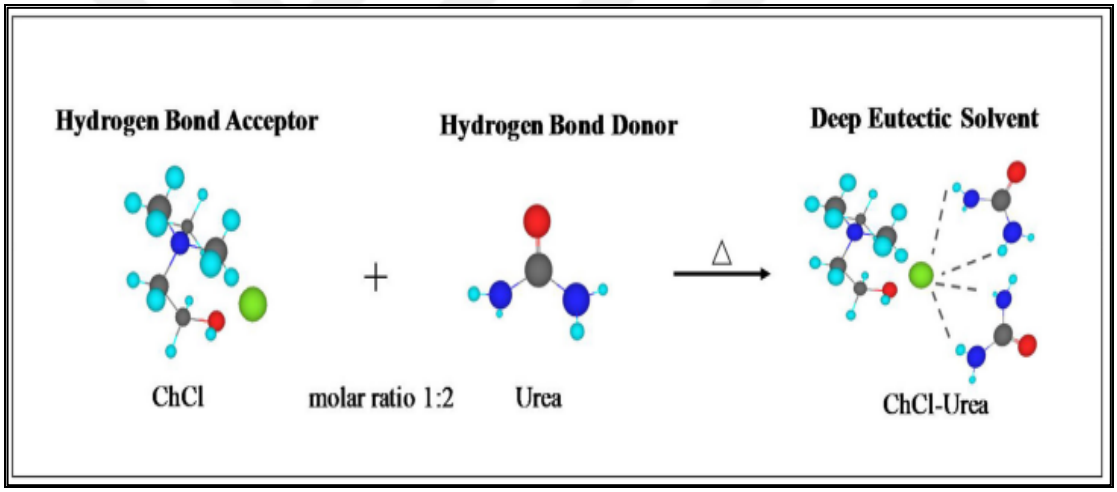
Derin ötektik çözücülerin doğru tasarımı ve uygulamalarını gerçekçi bir şekilde geliştirmek için, bu çözücülerin fiziksel özelliklerinin ayrıntılı bir şekilde anlaşılması son derece önemlidir. Genel olarak, derin ötektik çözücüler düşük erime noktaları, düşük uçuculuk, yanıcılık, düşük buhar basıncı, dipolar yapı, kimyasal ve termal kararlılık, yüksek çözünürlük, ayarlanabilirlik, düşük toksisite ve biyolojik olarak parçalanabilirlik ile ifade edilebilir (Zhang ve ark., 2012; Tomé ve ark., 2018). Ayrıca, bu çözücüler kimyasal olarak ayarlanabilir olduğundan, özellikleri, öngörülen uygulamalara göre farklı fizikokimyasal özelliklere sahip özel derin ötektik çözücü oluşturmak için uyarlanabilir (Tomé ve ark., 2018).

Derin ötektik çözücülerin fizikokimyasal özellikleri, araştırmacıların bu çözücülere olan artan ilgisinin arkasındaki ana nedenlerden biridir. Düşük uçuculuk, yanmazlık, düşük buhar basıncı ve kimyasal ve termal kararlılığa sahip olmasının yanı sıra, derin ötektik çözücüler kimyasal olarak ayarlanabilirdir, yani olası derin ötektik çözücülerin oluşturduğu bileşiklerin geniş çeşitliliği göz önüne alındığında belirli uygulamalar için tasarlanabilmektedir. Bu çalışmada, doğal derin ötektik çözücülerin ana fizikokimyasal özellikleri, yani faz davranışları ve yoğunlukları gibi özellikleri incelenmiştir.

Yukarıda belirtildiği gibi, derin ötektik çözücüler saf bileşikler değil, iki veya daha fazla saf bileşiğin karışımlarıdır. Derin ötektik çözücü adlandırması yalnızca ideal ötektik sıcaklığından daha düşük bir erime noktasına sahip karışımları kapsamalıdır. Aksi takdirde, derin ötektik çözücüler "derin" olarak adlandırılmaz ve diğer karışımlardan ayırt edilemez (Martins ve ark., 2019; El Achkar ve ark., 2021). Ek olarak, ötektik olandan farklı bir bileşim gerektirse bile, derin ötektik bir çözücünün çalışma sıcaklığında sıvı olması gerektiğini belirtilmiştir. Hidrojen bağı donörünün seçimi (Abbott ve ark., 2003; Abbott ve ark., 2004a, b), organik tuzun ve anyonunun doğası (Abbott ve ark., 2003) ve organik tuz/hidrojen bağı donörü molar oranı (Shahbaz ve ark., 2011) karışımın donma noktasını etkileyebilir. Hazırlama yöntemi donma noktasının değerini etkileyebilir, ancak kullanılan yöntem ne olursa olsun değişmeden

kalması gereken ötektik bileşimi etkilemez (Abbott ve ark., 2006). Öte yandan, yapılan bazı çalışmalarda derin ötektik bir çözücünün donma noktası ile saf bileşenlerinin erime noktaları arasında bir korelasyon bulunamamıştır (Abbott ve ark., 2004a, b; El Achkar ve ark., 2021; Zhang ve ark., 2012;).

Çok sayıda derin ötektik çözücünün faz davranışı, yoğunluğu, viskozitesi, iletkenliği, yüzey gerilimi, iyonlaşması, elektrokimyasal davranışı, toksisitesi ve çevresel etkisi için literatürde bu veriler sağlanmıştır (García-Álvarez ve ark., 2015; Kudlak ve ark, 2015; Mbous ve ark., 2017; Smith ve ark., 2014; Zhang ve ark., 2012). Derin ötektik çözücülerde en yaygın kullanılan bileşikler: kolin klorür, sitrik asit, malik asit, maleik asit, asetik asit, glikoz, fruktoz, sakaroz, trehaloz, terpenoidler veya su şeklinde sıralanabilir (Socas-Rodríguez ve ark., 2021).



Şekil 2.5. Derin ötektik çözücü (Kalhor ve Gandhi, 2019)

2.6. Doğal Derin Ötektik Çözücüler ile Biyoaktif Bileşen Eldesi

Doğal derin ötektik çözücülerin olası bir alternatif olarak ilk ses getiren çalışması 2003 yılında Abbott ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (Abbott ve ark., 2003; Ivanovic ve ark., 2020). Genel olarak derin ötektik çözücü, optimum koşullar altında (sıcaklık ve karıştırma süresi) sıvılaşan ve kararlı bir ötektik oluşturan iki veya daha fazla katı organik veya inorganik bileşiğin bir karışımı olarak tanımlanmıştır (Ivanovic ve ark., 2020; Choi ve ark., 2011). Bugüne kadar elde edilen, çeşitli enstrümantal analizlere

(NMR, kristalografik veriler ve FTIR) dayalı sonuçlara göre, doğal derin ötektik çözücülerin bileşenleri hidrojen bağları ve Van der Waals kuvvetlerinin oluşumu ile bir arada tutulmaktadır (Choi ve ark., 2011; Dai ve ark., 2013; Espino ve ark., 2016; Ivanovic ve ark., 2020). Kullanılan ve karışım oluşturan doğal derin ötektik çözücüler etkenlerinin türüne bağlı olarak, dört gruba ayrılabilirler: (i) kuaterner amonyum tuzu ve metal klorür; (ii) kuaterner amonyum tuzu ve metal klorür hidratı; (iii) kuaterner amonyum tuzu ve hidrojen bağı donörü ve (iv) metal klorür hidratı ve hidrojen bağı donörü (Ivanovic ve ark., 2020; Smith ve ark., 2014). Derin ötektik çözücülerde tip III en yaygın olarak kullanılır. Burada kolin klorür (hidrojen bağı alıcısı) genellikle kuaterner amonyum tuzu olarak seçilirken, tipik hidrojen bağı donörleri üre, polialkoller, şekerler, organik asitler ve fenolik bileşiklerdir. Derin ötektik çözücü oluşturan bileşenler bol miktarda hücresel bileşen (şekerler ve organik asitler) içeriyorsa, bu karışımlara doğal derin ötektik çözücüler adı verilir (Ivanovic ve ark., 2020).

Özel doğal derin ötektik çözücü üretimi için benimsenen ve en sık açıklanan üç yöntem vardır: (i) ısıtma ve karıştırma yöntemi; (ii) buharlaştırma yöntemi ve (iii) dondurarak kurutma yöntemi. Yapılan çalışmalar sonucunda, derin ötektik çözeltilerin sentezinin 50°C'de ve 15-20 dakikalık bir ultrases banyosunda gerçekleştirildiğini göz önünde bulundurarak, derin ötektik çözücülerin ultrases destekli sentezinin daha çevre dostu ve etkili bir yöntem olduğu gözlemlenmiştir (Ivanovic ve ark., 2020).

Son on yılda, özellikle biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu olmak üzere, ayırma prosesleri için derin ötektik çözücülere olan ilgi hızla artmıştır ve bu durum, insan tüketimi için doğrudan kullanım amaçlı bitki özütlerinin üretiminde büyük potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Ekstraksiyonda kullanımlarının sağladığı ek avantajlardan bazıları zenginleştirilmiş ekstraksiyon verimliliği, derin ötektik çözücü/doğal derin ötektik çözücü matrisinde hedef bileşiklerin artan stabilitesi ve bunların üretimi için sınırsız olanaklardır. Daha önce de belirtildiği gibi, uygun çözücünün seçilmesine ek olarak, onun fizikokimyasal özellikleri ve uygulanan ekstraksiyon koşulları da ekstraksiyon verimliliği için belirleyici olmaktadır. Özel yapım derin ötektik çözücü/doğal derin ötektik çözücü üretimleri için kullanılan

hidrojen bağı donörü ve hidrojen bağı alıcısının farklı kombinasyonları en önemli fizikokimyasal özellikler (viskozite, yoğunluk, yüzey gerilimi ve pH) üzerinde bir kontrol de sunmaktadır (Cunha ve Fernandes, 2018; El Achkar ve ark., 2019; De los Ángeles Fernández ve ark., 2018; Ivanovic ve ark., 2020).

Genel olarak, doğal derin ötektik çözücüler oda sıcaklığında oldukça viskoz sıvılardır (>100 cP) ve bu, bileşenleri arasındaki yoğun hidrojen bağıyla ilişkilidir. Doğal derin ötektik çözücülerin fizikokimyasal özellikleri ayrıca başlangıç bileşiklerinin kimyasal özellikleri, doğal derin ötektik çözücü bileşenleri arasındaki molar oran, sıcaklık ve su ilavesi gibi diğer faktörlere de bağlıdır. Örneğin, kolin klorür ve organik asitlere dayalı doğal derin ötektik çözücülerin viskozitesi, hidrojen bağı donörü olarak oksalik veya tartarik asit kullanıldığında, laktik asitle karşılaştırıldığında çok daha yüksektir, bu aynı doğal derin ötektik çözücü "sınıfı" için geçerli olsa bile doğal derin ötektik çözücülerin oda sıcaklığındaki yüksek viskozitesi aslında bu çözücülerin ana dezavantajlarından biridir ve bu durum hala büyük endüstriyel ölçekte kullanımlarını sınırlamaktadır. Asıl durum, doğal derin ötektik çözücülerin çok düşük buharlaşma basıncında yatmaktadır. Bir ekstraksiyon bakışı açısından, ekstraksiyon sıcaklığının ekstraksiyon çözücülerini kaybetmeden (buharlaşma yoluyla) artırılabileceği düşünüldüğünde bu özellik tercih edilmektedir (Ruesgas-Ramón ve ark., 2017). Diğer yandan düşük buharlaşma basıncı kuru ekstraktların üretimi söz konusu olduğunda büyük bir dezavantajdır. Doğal derin ötektik çözücülerin buharlaşmasının gerçekleşebileceği koşullar olmadığından alternatif saflaştırma yöntemleri kullanılmalıdır. Doğal derin ötektik çözücülerin viskoziteleri ve yoğunlukları su eklenerek önemli ölçüde azaltılabilmektedir. Ancak, doğal derin ötektik çözücü sistemine su eklenirken dikkatli olunmalıdır, çünkü literatürde de belirtildiği gibi fazla su bileşenler arasındaki hidrojen bağlarını kırabilmekte ve böylece üretilen çözücünün ötektik özelliği kaybedebilmektedir (Vilková ve ark., 2020; Ivanovic ve ark., 2020).

Ultrases destekli ekstraksiyon, malzemenin genleşme ve büzülme döngüleri nedeniyle kavitasyona neden olan yüksek frekanslı (20-1000 kHz) ultrasonik dalgaların oluşumuna dayanan en yaygın kullanılan ekstraksiyon tekniklerinden biridir (Chemat ve ark., 2017; Dzah ve ark., 2020; Fu ve ark., 2020; Pico ve ark., 2013). Biyoaktif

bileşiklerin ekstraksiyonunda ultrases desteği kullanımına ilişkin araştırmaların kökenleri, tekniğin standart laboratuvar ekipmanı (örneğin, ultrasonik temizleme banyosu) ile kolayca gerçekleştirilebilen hedef moleküllerin önemli ölçüde iyileştirilmiş ekstraksiyon verimlerine sahip bir metodoloji olarak tanımlandığı 1980'lere kadar uzanmaktadır (Vinatoru ve ark., 2017). Ancak, ilgili uygulamalar için ultrases destekli ekstraksiyon yönteminin optimizasyonu hala bir zorluk teşkil etmektedir ve hesaba katılması gereken bazı faktörler vardır. Bu faktörlerden bazıları sıcaklık, ekstraksiyon süresi, ultrases gücü, ultrases frekansı ve kullanılan çözücünün türü ve hacmidir. Genel olarak, ekstraksiyon işlemi sırasında sıcaklığı artırmanın olumlu etkisi, kullanılan çözücülerin viskozitesinin ve yüzey geriliminin azalmasına yansımıştır ve bu da genel ekstraksiyon veriminde bir artışla sonuçlanmıştır. Ekstraksiyon süresiyle ilgili olarak, toplam ekstraksiyon verimini artırmak ve enerji girişini azaltmak arasında bir tercih yapılmalıdır. İncelenen literatüre dayanarak, yaklaşık 30 dakikalık bir ekstraksiyon süresi birçok araştırmacı tarafından optimum olarak sunulmuştur (Chen ve ark., 2018; Irakli ve ark., 2018; Setyaningsih ve ark., 2019). Sonuç olarak, ultrases destekli ekstraksiyonun avantajlarının çeşitli biyoaktif bileşikler için yeşil ekstraksiyon yöntemi olan doğal derin ötektik çözücülerin kanıtlanmış ekstrakte edilebilirliği ile birleştirilmesi, klasik uzun vadeli ekstraksiyon yöntemlerine karşı umut verici bir alternatif sunmuştur (Ivanovic ve ark., 2020).

Doğal derin ötektik çözücülerin geleneksel ekstraksiyonlara kıyasla kullanılmasının şu avantajlarına dikkat çekilebilir: (i) geleneksel olarak kullanılan tehlikeli organik çözücülere kıyasla özel yapım doğal derin ötektik çözücü fiyatlarının daha uygun olması, (ii) hedef moleküllerin seçici ekstraksiyonuna izin veren ayarlanabilir fizikokimyasal özelliklere sahip olması, ve (iii) hava kirliliği risklerini en aza indiren gerçekten düşük bir buhar basıncına sahip olması (Bosiljkov ve ark., 2017; Ivanovic ve ark., 2020). Çeşitli biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu için ultrases destekli ekstraksiyon yönteminde doğal derin ötektik çözücü kullanımını açıklayan yayınlanmış araştırma makalelerinin sayısı 2016'dan bu yana önemli ölçüde artmıştır (Ivanovic ve ark., 2020).

Araştırmacılar derin ötektik çözücüleri hazırlamak için genellikle iki ana yöntemden birini kullanmaktadırlar: (i) ısıtma yöntemi ve (ii) öğütme yöntemi. Isıtma yöntemi homojen bir sıvı oluşana kadar bileşiklerin sürekli karıştırılması ve ısıtılmasından oluşur (Achkar ve ark., 2021). Isıtma sıcaklığı genellikle 50 ila 100 °C arasındadır. Ancak yüksek bir sıcaklık, hazırlama yönteminden bağımsız olarak esterleşme reaksiyonu nedeniyle derin ötektik çözücünün bozulmasına yol açabilmektedir (Rodriguez ve ark., 2019). Öğütme yöntemi, bileşiklerin oda sıcaklığında karıştırılması ve berrak bir sıvı oluşana kadar bir havan ve tokmakta ezilmesi esasına dayanmaktadır (Florindo ve ark., 2014). Son olarak, doğal derin ötektik çözücülerin ultrases destekli sentezi yakın zamanda tanıtılmıştır (Achkar ve ark., 2021; Santana ve ark., 2019).

Giriş bölümünde belirtildiği gibi, tarımsal yan ürünler, bu ürünlerin gıda endüstrisinde, kozmetik, nutrasötik veya farmakolojik uygulamalarda kullanılmak üzere değerlendirilmesi olasılığını ortaya çıkaran önemli biyoaktif bileşik kaynakları olarak dikkat çekmektedir (Osorio ve ark., 2021; Socas-Rodríguez ve ark., 2021). Bu bağlamda, bu kaynaklardan istenen biyoaktif bileşikleri etkili bir şekilde ekstrakte etmek için uygun prosedürleri geliştirmek amacıyla araştırmalar yapılmıştır. Ancak, bu prosedürlerin çoğu, yüksek miktarda toksik çözücülerin kullanıldığı geleneksel ekstraksiyonları içermektedir. Bu nedenle, yalnızca geniş bir perspektiften sürdürülebilirliğe katkıda bulunmakla kalmayıp aynı zamanda elde edilen ürünlerin daha sonra belirtilen sektörlerde kullanılmaya uygunluğunu, tüketicilerin güvenliğini riske atan toksik maddelerin kullanımıyla tehlikeye atmayan daha yeşil metodolojilerin tasarlanması ve geliştirilmesine önemli çabalar yöneltilmektedir. Yeşil kimya ilkelerine dayalı farklı eylem hatları yürütülmüştür. Bunlar arasında, doğal derin ötektik çözücülerin ekstraksiyon çözücüleri olarak kullanımının daha önce belirtilen avantajlarının bir sonucu olarak, doğal derin ötektik çözücülerin yenilikçi yeşil çözücüler olarak uygulanması son yıllarda oldukça artmıştır (Socas-Rodríguez ve ark., 2021).

Tarımsal yan ürünlerin biyoaktif bileşiklerinin ekstrakte edilerek değerlendirilmesi, FAO'nun gıda atığı geri kazanım hiyerarşisinde ele alındığı gibi, bunların yakılmasına veya hatta kompostlanmasına göre daha faydalı bir alternatiftir (FAO, 2017). Biyoaktif

bileşikler, çok sayıda sağlık yararı sağlayabilen biyolojik özellikleri nedeniyle yoğun bir şekilde incelenmiştir. Bu bileşenlerin elde edilmesi, kabuklaı gibi tarım, gıda ve balıkçılık endüstrilerinin yan ürünlerinden elde edilmesiyle sınırlı değildir. Aynı zamanda sıfır atığa dayalı döngüsel bir ekonomiye doğru şekilde katkıda bulunabilen bitkilerden, alglerden veya mikroalg yan ürünlerinden de elde edilebilmektedir. Tarımsal gıda endüstrisi, normalde atılan ve ciddi bir çevre sorununa neden olabilen önemli miktarda yan ürün üretmektedir. Bununla birlikte, bu yan ürünler, fenolikler, proteinler, alkaloidler, karotenoidler, şekerler veya lipitler dahil olmak üzere pek çok biyoaktif bileşik kaynağıdır. Bu biyoaktif bileşiklerin birçoğunun antihipertansif, antikanser, antiinflamatuar, hipoglisemik, antimikrobiyal, antiviral, antitümör, antitrombotik, hipokolesterolemik gibi çok sayıda sağlık yararı sağlayan özellikleri bulunmaktadır. Uygulamalar için, özellikle gıda, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde, bu bileşikler genellikle organik çözücüler veya geleneksel çözücüler (metanol, aseton, benzen, kloroform, petrol eteri ve heksan) kullanılarak ekstrakte edilir. Bunlar çoğu zaman yanıcı, patlayıcı, zayıf biyolojik olarak parçalanabilir ve son tüketiciye üretebilecekleri toksisite nedeniyle reddedilmektedir. Bu nedenlerden dolayı, genel olarak güvenli olarak tanımlanan çözücülerin (GRAS) kullanımı önerilmiştir. Sadece birkaç geleneksel çözücü GRAS olarak tanınır, ayrıca bunların çoğu polar olup apolar molekülleri çözemez ve bu da ekstraksiyonu çok sınırlı hale getirmektedir. Ayrıca, son yıllarda gözlemlenen iklim değişikliği nedeniyle, çevre için önemli bir endişe söz konusudur. Bu nedenle, enerji, su ve çözücü tüketimini ve karbon emisyonlarını azaltma isteği vardır ve bu da ekolojik ekstraksiyon süreçlerine olan talebi artırmıştır. Verimliliği artırma, süreç seçiciliğini iyileştirme ve enerji tüketimini azaltma ihtiyacını dikkate alarak yeşil teknolojiler test edilmektedir. Bu soruna bir çözüm alternatif çözücülerin kullanılmasıdır. İyonik sıvı çözücüler, derin ötektik çözücüler ve doğal ötektik çözücüler yeşil çözücüler olarak bildirilmektedir (Socas-Rodríguez ve ark., 2021).

Bazı araştırmacılar bu çözücülerin biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu için uygulanmasını araştırmışlardır. Bu inceleme ile, yalnızca yüksek verime sahip olmakla kalmayıp aynı zamanda çevre dostu olduğu ve düşük veya neredeyse sıfır toksisite sunduğu gösterilen doğal ürünlerden biyoaktif bileşikleri ekstrakte etmek için derin

ötektik çözücülerin ve doğal derin ötektik çözücülerin kullanımının uygun olduğu sonucuna varılmıştır (Benvenutti ve ark., 2017; Socas-Rodríguez ve ark., 2021).

2.7. Biyoerişilebilirlik

Biyoerişilebilirlik, gıdanın sindirim sonrasında çözünerek bağırsak emilimi için hazır hale gelmesi olarak tanımlanmıştır (Hedrén vd., 2002; Helal vd., 2014; Şensoy ve Karakaya, 2016; Tagliazucchi vd., 2012). Gıda matrisinden salınımı gerçekleşmemiş olan ve intestinal bariyerden geçme özelliği bulunmayan gıda bileşenlerinin biyoerişilebilir olmadığı ifade edilmiştir (Hedrén vd., 2002; Saura-Calixto vd., 2007; Şensoy ve Karakaya, 2016). Biyoyararlılık ise gıda matrisinden salınımı gerçekleşen bileşenin bağırsaklardan emilerek dokulara ulaşması olarak tanımlanmıştır (Porrini ve Riso, 2008; Şensoy ve Karakaya, 2016). Literatüre göre bir gıda bileşeninin biyoyararlı olabilmesi için öncelikle biyoerişilebilir özelliğe sahip olması gerekmektedir. Polifenollerin gıda matrisinden salınarak ve/veya enzimatik veya bakteriyel aktiviteler sonucunda modifikasyona uğrayarak biyoerişilebilir hale geldikleri gözlemlenmiştir (Rodríguez-Roque vd., 2014; Saura-Calixto vd., 2007; Şensoy ve Karakaya, 2016). Bir polifenolik bileşeninin biyoerişilebilirliği ve biyoyararlılığının, bu bileşen ile beraber gıda matrisini oluşturan diğer besin maddelerinin varlığı sonucunda değişime uğrayabilir olduğu söylenmiştir (Ortega vd., 2011; Şensoy ve Karakaya, 2016). Gıda matrisinin dışarıdan müdahaleler ile değişikliğe uğraması besin değerinin azalmasına sebep olurken biyoyararlılığı olumlu yönde etkileyebilmektedir (Parada ve Aguilera, 2007; Şensoy ve Karakaya, 2016). Örneğin ısıtma, dondurma, konserveleme ve pişirme gibi işlemler gıda matrisini baskılayarak besinlerin biyoyararlılığını artırabilen işlemlerdir (Parada ve Aguilera, 2007; Şensoy ve Karakaya, 2016).

Fenolik fitokimyasallar kimyasal yapı ve özellikleri bakımından çok farklılık göstermektedirler. Fenolik bileşikler, fenolik asit gibi basit moleküllerden proantosiyanidin gibi yüksek dereceli polimerize olmuş moleküllere kadar çeşitlilik göstermektedirler. Bu onların sindirim sırasındaki biyoerişilebilirliklerini önemli ölçüde etkilemektedir. Polifenoliklerin biyoerişilebilirliklerini sindirim sistemi içerisinde gıda matrisinden salınımları, partikül boyutu, glikolizasyonları ile ilgili olarak

hidrofilik/lipofilik dengeleri ve, pH'a bağlı transformasyonları (parçalanmaları, hidrolizasyonları ve oksiadasyonları) etkilemektedir. Bunlara ilave olarak, polifenollerin gıda bileşenleri ile etkileşimi de biyoerişilebilirliklerini etkiler. Gıdanın kompoziyonu, nasıl işlenmiş olduğu ve diğer bileşenlerle etkileşimi fitokimyasalların gıda matrisinden salınımını etkiler ve biyoerişiliebilirliklerini etkiler/değiştirir. Besinsel lifler fenolik bileşenlerin ana taşıyıcılarıdır ve biyoerişilebilirliklerini etkilemektedir. Life hapsolmuş polifenollerin ekstraksiyonu ve sindirim sıvılarında çözünürlükleri düşüktür (Şensoy ve Karakaya, 2016).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

Bu çalışmada hem Türkiye'de hem de dünyada en çok tüketilen ceviz türü olarak bilinen Chandler cevizleri (*Juglans regia* L.) kullanılmıştır. Ceviz örnekleri Ceviz Üreticileri Derneği tarafından temin edilmiştir. Kabuklar temizlenmiş ve ceviz kıracağı kullanılarak meyveden ayrılmıştır. Elde edilen ceviz kabukları santrifüjlü yüksek hızlı bir öğütücü (Retsch ZM 200, Haan, Almanya) yardımı ile ince bir toz haline getirilmiştir. Daha sonrasında toz elekten (1 mm) geçirilerek analizler gerçekleştirilene kadar -20°C' de muhafaza edilmiştir.

3.2. Doğal Derin Ötektik Çözücülerin (NADES) Hazırlanması

Doğal derin ötektik çözücülerin hazırlanmasında hidrojen alıcısı olarak Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya) firmasından temin edilen kolin klorür (≥%98) kullanılmıştır. Hidrojen bağı donörleri olarak ise TCI (Tokyo, Japonya) firmasından temin edilen laktik asit (>%90,0), sitrik asit (>%98,0) ve malik asit (>%99,0), ve Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilen glikoz (>%98,0) ve gliserol (>%99,0) kullanılmıştır. Literatürde daha önce yapılmış çalışmalar dikkate alınarak belirlenen molar oranları ile hazırlanan doğal derin ötektik çözücüler (Della-Posta ve ark., 2023; Zheng ve ark., 2022; Husanu ve ark., 2020) homojen renksiz sıvılar elde edilene kadar 80°C sıcaklıkta çalkalamalı su banyosunda (Nüve ST 30, Ankara, Türkiye) karıştırılmıştır. Daha sonra viskoziteyi azaltmak için karışımlara %30 (v/v) oranında su ilave edilerek vortekslenmiş ve karışımların çözünürlüğünden emin olmak için 10 dakika süre ile ultrases banyosunda (Elma LC30H, Darmstadt, Almanya) tutulmuştur. Kontrol olarak %70'lik etanol çözeltisi kullanılmıştır. Karışımlara ilave edilen su oranı (%30 (v/v)), daha önce literatürde yapılmış olan çalışmalarda en iyi fenolik bileşen geri kazanımının sağlandığı orandır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Doğal derin ötektik çözücülerin yoğunluk ve pH'sı; Tüm çözücüler %30 (v/v) su ile seyreltilmiştir. Sonuçlar üç ölçümün ortalaması olarak ifade edilmiştir.

NADES	HBA	HBD	Molar oranı	Yoğunluk (g/cm^3)	pH
1	Kolin klorür	Laktik asit	1:2	1,1385	1,31
2	Kolin klorür	Laktik asit	1:1	1,1425	1,78
3	Kolin klorür	Gliserol	1:2	1,1645	3,97
4	Kolin klorür	Gliserol	1:3	1,1655	3,62
5	Kolin klorür	Glukoz	2:1	1,1650	3,55
6	Kolin klorür	Glukoz	1:1	1,1145	3,41
7	Kolin klorür	Sitrik asit	1:2	1,2780	0,41
8	Kolin klorür	Sitrik asit	1:1	1,2190	0,80
9	Kolin klorür	Malik asit	1:2	1,2485	0,67
10	Kolin klorür	Malik asit	1:1	1,2065	0,92

3.3. Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Fiziksel Özelliklerinin Belirlenmesi

3.3.1. Yoğunluk ve pH

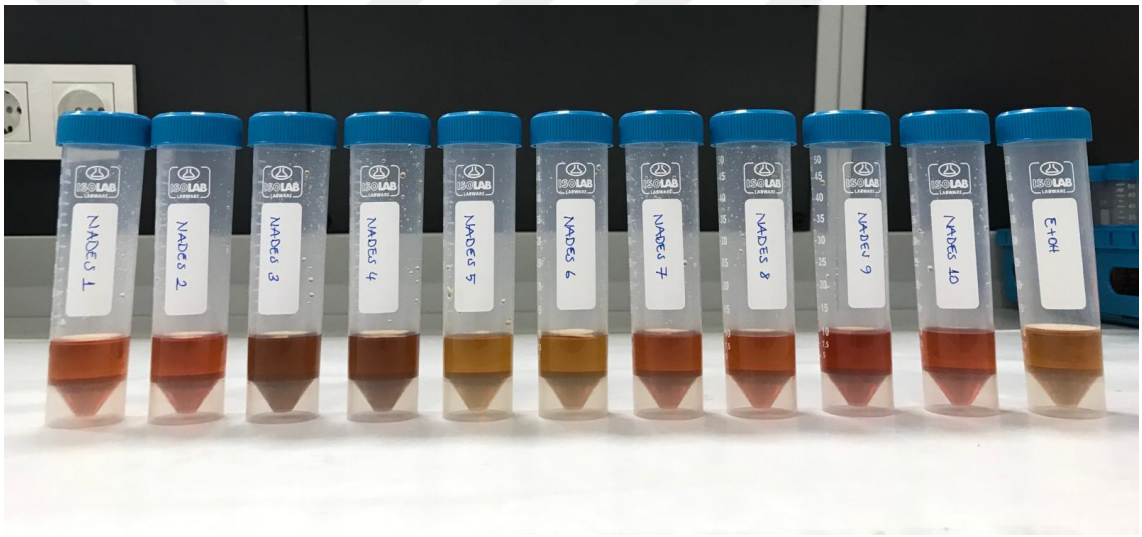
Doğal derin ötektik çözücülerin yoğunluğunun tespiti için 1 mL'lik solüsyonlar oda sıcaklığında hassas analitik terazide (Mettler Toledo, MS3002S) tartılmıştır. Daha sonrasında yoğunluk şu formül kullanılarak hesaplanmıştır : $\rho = m_{NADES}/V_{NADES}$. Doğal derin ötektik çözücülerin pH'sı pH metre (Mettler Toledo S220) ile ölçülmüştür.

3.3.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Doğal derin ötektik çözücülerin FTIR spektrumu, 4 cm^{-1} çözünürlük ve spektrum başına 32 tarama ile 4500 ila 500 cm^{-1} dalga sayısı aralığında oda sıcaklığında elde edilmiştir (Shimadzu IRTracer-100, Tokyo, Japonya).

3.4. Fenolik Bileşiklerin Ultrases Destekli Ekstraksiyonu

Fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu daha önce literatürde belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir (Özkan, 2024). 0,5 g toz ceviz kabuğu örneği üzerine Çizelge 3.1'de belirtilen şekilde hazırlanmış olan 10 mL doğal derin ötektik çözücü solüsyonu eklenerek karışım 30 dakika süresince 60 °C'lik 50 Hz frekansında ultrases banyosunda (Elma LC30H) tutulmuştur. Ardından karışım 10 dakika süresince 10000 x g hızında santrifüjlenmiştir (Hitachi CF15RN, Tokyo, Japonya) ve üst faz temiz bir tüpe alınmıştır. Aynı işlemler kontrol olarak kullanılmış olan %70'lik etanol çözeltisi ile de gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan tüm ekstraktlar analizlere kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. Doğal derin ötektik çözücüler ile elde edilen ekstraktlar

3.5. *In Vitro* Gastrointestinal Sindirim Simülasyonu

Fenolik bileşiklerin biyoerişebilirliğinin tespiti için mide ve bağırsak sindirimini simüle eden INFOGEST *in vitro* mide-bağırsak sindirim modeli uygulanmıştır (Minekus ve ark., 2014). Kullanılmış olan mide ve bağırsak elektrolit solüsyonlarının içeriği Çizelge 3.2'de verilmiştir. Mide sindirimini simüle etmek için, 10 mL ekstrakta 7,5 mL mide elektrolit solüsyonu, 1,6 mL pepsin (25000 U/mL), 5 mL 0,3 M $CaCl_2$ eklenmiş ve 1 M HCl kullanılarak pH 3'e ayarlanmıştır. Daha sonra distile su ilavesi ile toplam hacim 20

mL'ye tamamlanarak karışım çalkalıyıcılı su banyosunda (Nüve ST 30; Ankara, Türkiye) 37°C'de 2 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında bağırsak sindirimini simüle etmek için karışıma 11 mL bağırsak elektrolit solüsyonu, 5 mL pankreatin (800 U/mL), 2,5 mL 160 mm safra, 40 mL olacak şekilde distile su ilavesi yapılmış ve karışım çalkalayıcılı su banyosunda 37°C'de 2 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlemlere ilaveten ekstraktlar katılmadan aynı koşullar altında inkübasyonlar yapılmıştır ve toplanan kör (blank) örnekler sindirim sıvılarından kaynaklanan etkileşimlerin düzeltilmesi için kullanılmıştır. Mide ve bağırsak sindiriminin ardından her örnekten 5 mL'lik numuneler alınmıştır. Bu numuneler 20000 x g'de 5 dakika santrifüj (Hitachi CF15RN) edilmiştir ve üst fazlar -20°C'de saklanmıştır.

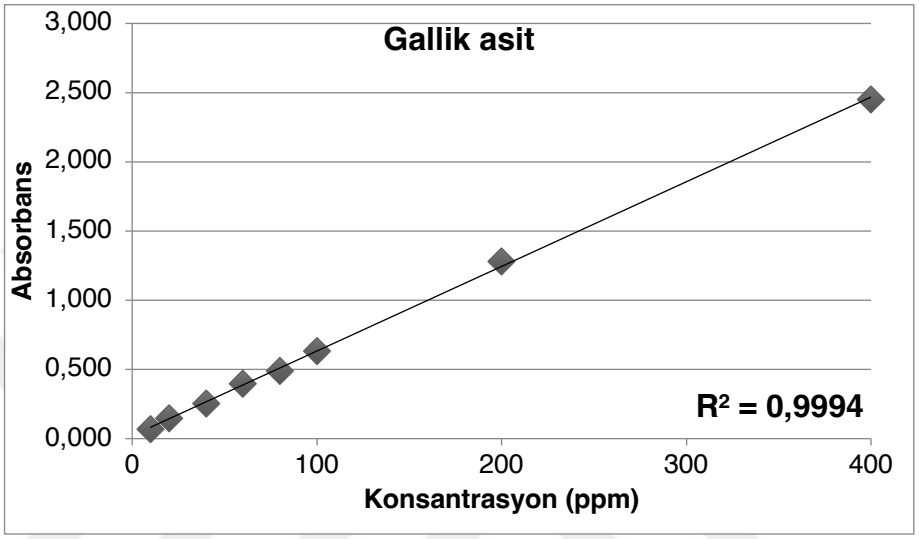
Çizelge 3.2. Mide ve bağırsak elektrolit solüsyonları; Tüm solüsyonlar distile su ile hazırlanarak, toplam hacim 400 mL' ye tamamlanmıştır

Bileşenler	**Stok Konsantrasyonu (mol/L)**	**Stok Hacmi (mL)**	
		Mide elektrolit solüsyonu	**Bağırsak elektrolit Solüsyonu**
KCL	0,5	6,9	6,8
KH_2PO_4	0,5	0,9	0,8
$NaHCO_3$	1	12,5	42,5
NaCl	2	11,8	9,6
$MgCl_2(H_2O_6)$	0,15	0,4	1,1
$(NH_4)_2CO_3$	0,5	0,5	-
HCL	6	1,3	0,7

3.6. Toplam Fenolik Madde Tayini

Toplam fenolik madde miktarı daha önce literatürde belirtilen şekilde tespit edilmiştir (Velioğlu ve ark., 1998). 100 µL ekstrakta 0,75 mL Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edildikten sonra karışım 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 0,75 mL %6 sodyum karbonat solüsyonu eklenerek 90 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra,

spektrofotometre (Agilent Cary 60, Santa Clara, Kaliforniya, ABD) ile 725 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. Gallik asit standart eğrisi kullanılarak (konsantrasyon aralığı: 10-400 mg/L, R^2=0,9994) ekstraktların toplam fenolik madde miktarları belirlenmiş ve sonuçlar mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/kg olarak ifade edilmiştir.

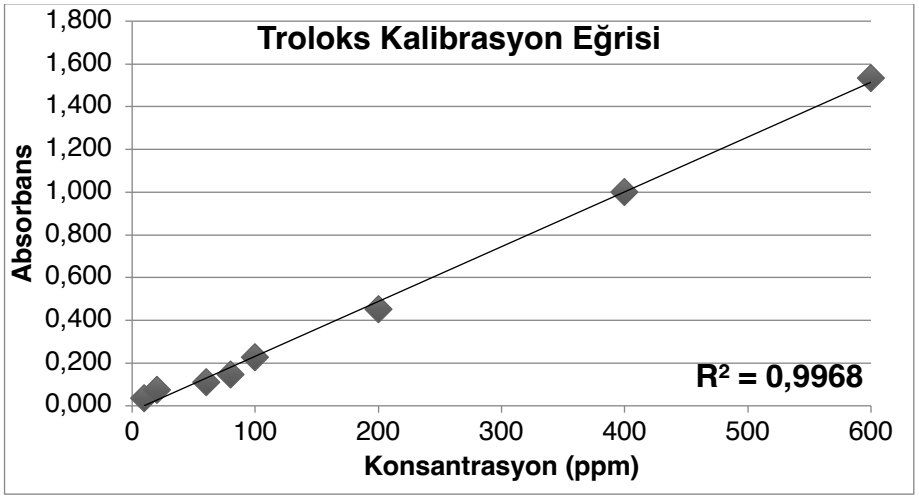


Şekil 3.2. Gallik asit kalibrasyon eğrisi

3.7. Toplam Antioksidan Kapasite Tayini

3.7.1. CUPRAC (Bakır (II) İyonu İndirgenme Antioksidan Kapasitesi) Tayini

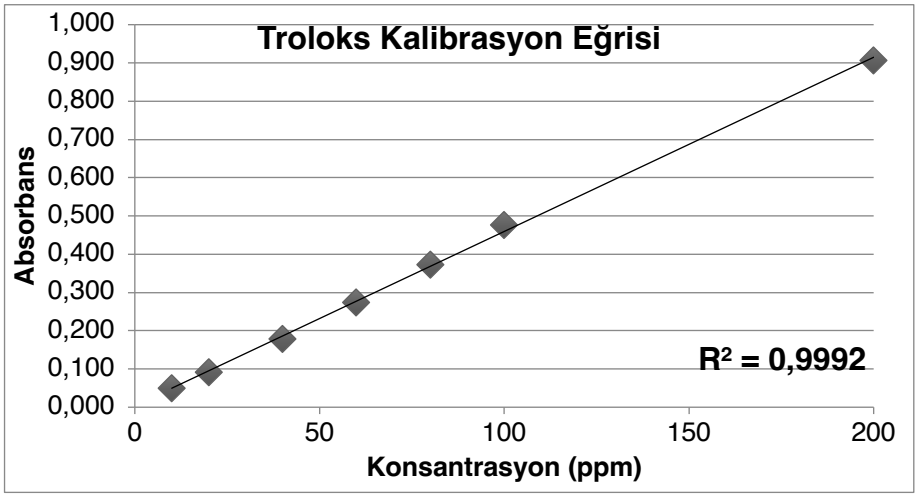
CUPRAC metodu daha önce literatürde belirtilen şekilde uygulanmıştır (Apak ve ark., 2004). 100 µL ekstrakta sırasıyla 1 mL 10 mM bakır (II) klorür, 1 mL 7,5 mM neokuproin, 1 mL 1 M amonyum asetat ve 1 mL distile su ilave edilerek, hacim 4,1 mL'ye tamamlanmıştır. 30 dakika inkübasyondan sonra spektrofotometre ile 450 nm'de absorbans ölçülmüştür. Sonuçlar Troloks® standart eğrisi (konsantrasyon aralığı: 1–600 mg/L, R^2>0,997) kullanılarak elde edilmiş ve g Troloks® eşdeğeri (TE)/kg olarak ifade edilmiştir.



Şekil 3.3. Troloks kalibrasyon eğrisi (CUPRAC)

3.7.2. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Radikal Süpürme Aktivitesi Tayini

DPPH metodu daha önce literatürde belirtilen şekilde uygulanmıştır (Kumaran ve Karunakaran, 2006). 100 µL ekstrakta 2 mL 0,1 mM metanolde çözünmüş DPPH reaktifi ilave edilmiştir. 30 dakika inkübasyondan sonra spektrofotometre ile 517 nm'de absorbans ölçülmüştür. Sonuçlar Troloks® standart eğrisi (konsantrasyon aralığı: 1-600 mg/L, R^2>0,997) kullanılarak elde edilmiş ve g Troloks® eşdeğeri (TE)/kg olarak bildirilmiştir.



Şekil 3.4. Troloks kalibrasyon eğrisi (DPPH)

3.8. Fenolik Bileşenlerin UPLC-ESI-MS/MS ile Tanımlanması ve Kantifikasyonu

Fenolik bileşenlerin UPLC-ESI-MS/MS ile analizi daha önce literatürde belirtilen şekilde yapılmıştır (Akpınar Bayizit ve ark., 2023). C18 analitik kolon (3 µm parçacık boyutu, 200 A gözenek boyutu, 100 mm x 3 mm) ile Shimadzu LC-MS/MS 8060 sistemi (Kyoto, Japonya) kullanılmıştır. MS/MS sistemini çoklu reaksiyon izleme (MRM) ile negatif ve pozitif iyon modlarında çalıştırmak için elektrosprey iyonizasyon (ESI) kaynağı kullanılmıştır. Veri analizi için LabSolution (Shimadzu Co., Kyoto, Japonya) yazılımı kullanılmıştır. Cihaz parametreleri şu şekildedir: nebulizasyon gazı (N_2) akış 3,0 L/dakika, kurutma gazı (N_2) akışı 10,0 L/dakika, arayüz voltajı 4,0 kV, desolvasyon hattı sıcaklığı 250°C, arayüz sıcaklığı 300°C, ısı bloğu sıcaklığı 400°C. 0.22 µm membran filtreden geçirilen 10 µL ekstrakt, %0,1 formik asit içeren MQ su (mobil faz A) ve %0,1 formik asit içeren asetonitril (mobil faz B) kullanılarak 0,4 mL/dakika akış hızında sisteme enjekte edilmiştir. Uygulanan gradyan şu şekildedir: 0 dakika, %20 B; 0,0-0,5 dakika, %20 B, izokratik; 0,5-7,0 dakika, 20-50 B, lineer; 7,0-12,0 dakika, %50-95 B, lineer; 12,0-12,1 dakika, %95-20 B, lineer; 12,1-15,0 dakika, %20 B izokratik. Kolon sıcaklığı 40°C'de tutulurken otomatik örnekleyicinin sıcaklığı 10°C'de tutulmuştur. Bileşikler şu analitik standartlar kullanılarak kantifiye edilmiştir: kateşin (≥%99,0), izokuersitrin (≥%98,0), taksifolin (≥%95,0), kuersitrin (≥%95,0), kuersetin (≥%95,0), izoramnetin (≥%95,0), protokatekuik asit (≥%97,0), p-salisilik asit (≥%99,0), ellajik asit (≥%95,0), vanilin (≥%97) ve sinapaldehit (≥%99,0). Sonuçlar µg/kg olarak bildirilmiştir.

3.9. İstatistiksel Analiz

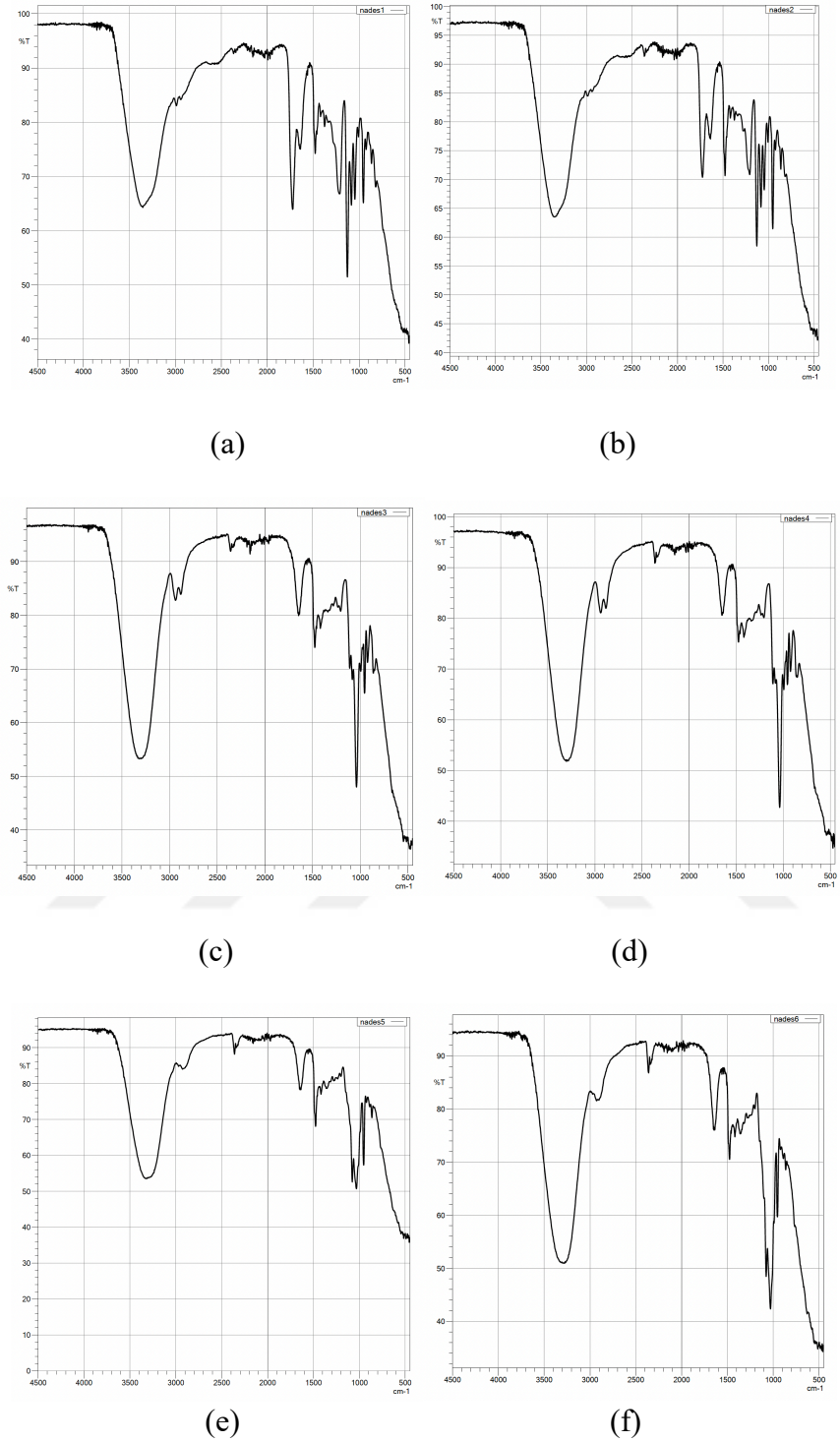
Analizler üç tekerrürlü olarak hazırlanan ekstraktlarda üç paralelli ölçümler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. Veriler SPSS yazılımı (sürüm 24; Chicago, IL, ABD) kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Sonuçlar arasındaki farklar tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey post hoc testi ile değerlendirilmiştir ($P<0.05$).

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

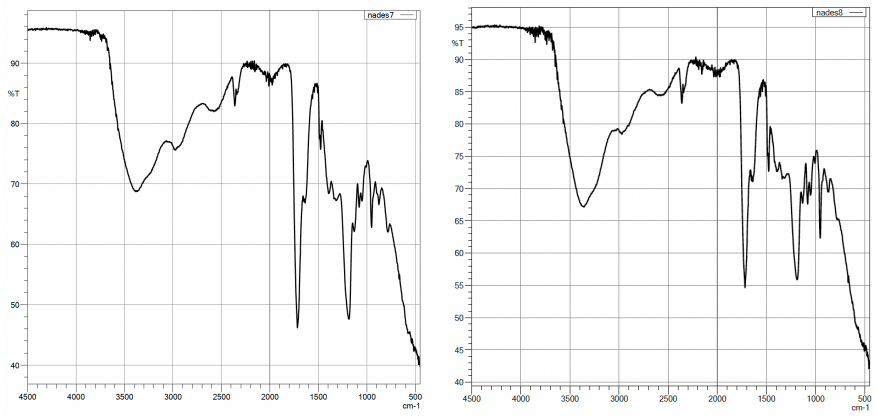
4.1 Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Karakterizasyonu

Doğal derin ötektik çözücülerin yoğunluğu kolin klorür:glikoz (1:1) için minimum 1,1145 g/cm³ ile kolin klorür:sitrik asit (1:2) için maksimum 1,2780 g/cm³ arasında değişirken, doğal derin ötektik çözücülerin pH'sı kolin klorür:sitrik asit (1:2) için minimum 0.41 ile kolin klorür:gliserol (1:2) için maksimum 3,97 arasında değişmiştir (Çizelge 3.1). Yoğunluk sonuçları, doğal derin ötektik çözücülerin çoğunluğunun sudan daha yüksek bir yoğunluğa sahip olduğunu, oda sıcaklığında tipik olarak 1,0 ila 1,35 g/cm³ arasında değiştiğini bildiren literatürle uyumludur (Saini ve ark., 2022). Doğal derin ötektik çözücülerin pH'sı, hedef çözünen maddeler ile ötektik çözücü arasındaki moleküler etkileşimleri etkilediği için ekstraksiyon işlemi sırasında önemli bir parametredir. Literatürdeki bazı çalışmalar, fenolik bileşiklerin nötr formda, yani çözücünün pH'sının fenolik bileşiklerin pKa'sından düşük olduğu durumlarda daha kolay ekstrakte edilebildiğini göstermektedir (Bertolo ve ark., 2021).

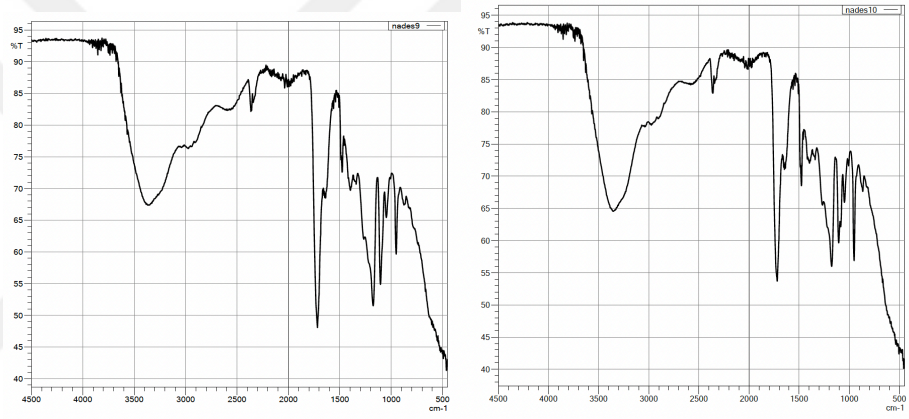
Sentezlenen doğal derin ötektik çözücülerdeki fonksiyonel grupların karakterizasyonu, Şekil 4.1'de görüldüğü üzere FTIR kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen doğal derin ötektik çözücüler, erimiş karışımın homojen çözücüler 3000–3500 cm^{-1} arasında geniş tepe noktalarıyla gösterilen serbest –OH gruplarının gerilmesine karşılık gelen hidrojen bağları sergilediğini göstermiştir. Hidroksil gruplarının varlığı, sentezlenen doğal derin ötektik çözücülerin diğer bileşiklerle hidrojen bağları oluşturabileceğini ve bu durumun doğal ürünlerden biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunu sağlayabileceğini göstermektedir (Maimulyanti ve ark., 2023).



Şekil 4.1. Sentezlenen NADES'lerin FTIR spektrumları. (a) Kolin klorür:laktik asit (1:2), (b) Kolin klorür:laktik asit (1:1), (c) Kolin klorür:gliserol (1:2), (d) Kolin klorür:gliserol (1:3), (e) Kolin klorür:glikoz (2:1), (f) Kolin klorür:glikoz (1:1), (g) Kolin klorür:sitrik asit (1:2), (h) Kolin klorür:sitrik asit (1:1), (i) Kolin klorür:malik asit (1:2), (j) Kolin klorür:malik asit (1:1)



(g) (h)



(i) (j)

Şekil 4.1. Sentezlenen NADES'in FTIR spektrumları. (a) Kolin klorür:laktik asit (1:2), (b) Kolin klorür:laktik asit (1:1), (c) Kolin klorür:gliserol (1:2), (d) Kolin klorür:gliserol (1:3), (e) Kolin klorür:glikoz (2:1), (f) Kolin klorür:glikoz (1:1), (g) Kolin klorür:sitrik asit (1:2), (h) Kolin klorür:sitrik asit (1:1), (i) Kolin klorür:malik asit (1:2), (j) Kolin klorür:malik asit (1:1) (devam)

4.2. Toplam Fenolik Madde Tayini ve Toplam Antioksidan Kapasite Tayini

On farklı doğal derin ötektik çözücü ile ultrases destekli ekstraksiyon kullanılarak hazırlanan ceviz kabuğu ekstraktlarının toplam fenolik madde ve toplam antioksidan kapasite tayinleri yapılmış ve etanolik ekstrakt için elde edilen verilerle karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.1). Sindirimden önce en yüksek toplam fenolik madde miktarı, kolin klorür:glikoz (2:1) ve kolin klorür:gliserol (1:2) ekstraktları için elde

edilmiştir ve bunlar kolin klorür:malik asit (1:2) ekstraktından istatistiksel olarak farklı değildir (P>0,05). Kolin klorür:gliserol (1:2) ekstraktı aynı zamanda hem CUPRAC hem de DPPH analizlerinde en yüksek toplam antioksidan kapasiteye sahipken, kolin klorür:glikoz (1:1) ekstraktı en düşük toplam antioksidan kapasiteye sahiptir. Polialkol bazlı bir doğal derin ötektik çözücü olan kolin klorür:gliserolün, fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için karboksilik asit ve şeker bazlı doğal derin ötektik çözücülerden daha etkili olduğu daha önce yapılan çalışmalarda da bildirilmiştir. Bu etkinlik, alkol bazlı doğal derin ötektik çözücülerin hidrojen bağı donörünün çoğunlukla sıvı, kolay sentezlenebilir ve düşük viskoziteli olmasından, diğer doğal derin ötektik çözücü tiplerinin hidrojen bağı donörünün ise tipik olarak katı ve nispeten yüksek viskoziteli olmasından kaynaklanıyor olabileceği önerilmektedir (Alam ve ark., 2021). Doğal derin ötektik çözücü ekstraktlarının birçoğu, özellikle kolin klorür:gliserol (1:2 ve 1:3) ve kolin klorür:malik asit (1:2), etanolik ekstrakt ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksek toplam fenolik madde ve toplam antioksidan kapasiteye sahiptir (%16-80) (P<0,05). Elma posası (Rashid ve ark., 2023) ve brokoli yaprakları (Cao ve ark., 2023) üzerinde yapılan önceki çalışmalar da bazı doğal derin ötektik çözücülerin fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda geleneksel organik çözücülerden daha etkili olduğunu öne sürmüştür. Dahası, doğal derin ötektik çözücüdeki kolin klorür:hidrojen bağı donörü molar oranının azalması, gliserol ve glikoz durumlarında gözlemlendiği gibi, toplam fenolik madde üzerinde önemli bir etkiye sahip değildir (P>0,05) veya önemli azalmalara neden olmuştur (P<0,05). Literatürde, kolin klorür:gliserol molar oranındaki azalmanın fenolik bileşiklerde azalmaya yol açtığı benzer sonuçlar bildirilmiştir (Gao ve ark., 2020). Bu gözlem, hidroksil grupları nedeniyle çoğu fenolik bileşiğin hidrojen bağı donörü olarak görev yapabilmesi ve bu nedenle aşırı gliserolün sistem girişimini artırarak hedef bileşikler ile klorür anyonları arasındaki etkileşimleri zayıflatabilmesiyle ilişkilidir (Bertolo ve ark., 2021). Buna paralel olarak, doğal derin ötektik çözücüde kolin klorür:hidrojen bağı donörü molar oranı azaldığında toplam antioksidan kapasite sonuçları ya değişmemiştir ya da önemli ölçüde azalmıştır (P<0,05).

Ekstraktların toplam fenolik madde ve toplam antioksidan kapasite değerleri için mide sindirimden sonra görülen trend değişiklik gösterse de, sindirilmemiş örneklerle karşılaştırıldığında genellikle azalmalar olmuştur veya önemli bir değişiklik olmamıştır.

Bağırsak sindirimi, ekstraktların toplam fenolik madde ve topam antioksidan kapasite değerlerini daha da düşürmüş veya önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. Bağırsak sindirimini takiben azalan toplam fenolik madde ve toplam antioksidan kapasite değerleri, artan pH ve enzim aktivitesi nedeniyle fenolik bileşiklerin bozunmasıyla açıklanabilir (Kamiloğlu ve ark., 2022). Biyoerişilebilir toplam fenolik madde, doğal derin ötektik çözücü ekstraktları için %57-79 arasında değişti ve bu, etanolik ekstraktın değerinden (%56) daha yüksektir. Yaban mersini ile yapılan önceki bir çalışma da, doğal derin ötektik çözücü kullanılarak elde edilen ekstraktlarda fenolik bileşiklerin bağırsak biyoerişilebilirliğinin, geleneksel organik çözücü kullanılarak elde edilenlere kıyasla önemli ölçüde daha yüksek olduğunu göstermiştir (Da Silva ve ark., 2021). Benzer şekilde, toplam fenolik madde için, kolin klorür:gliserol (1:2 ve 1:3) ve kolin klorür:glikoz (2:1) hariç, doğal derin ötektik çözücü ekstraktlarının biyoerişilebilirlik değerleri, etanolik ekstraktın değerlerinden daha yüksektir (%49-72 ve %43-52). Genel olarak, kolin klorür:laktik asit ile hazırlanan ekstraktlar en yüksek biyoerişilebilir toplam fenolik madde ve toplam antioksidan kapasiteyi içermektedir.

Bu çalışmada, CUPRAC ve DPPH analizleri olmak üzere iki antioksidan kapasite ölçüm metodu uygulanmıştır. CUPRAC yöntemi ile elde edilen değerlerin DPPH yöntemi ile elde edilenlerden daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu fark, CUPRAC analizinin hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanları ölçebilmesi, DPPH analizinin ise yalnızca lipofilik antioksidanlar için uygun olmasından kaynaklanıyor olabilir. Gıda ürünlerinin toplam antioksidan kapasitesini belirlemek için tek bir analiz kullanmak tamamen güvenilir değildir. Bu çalışmada elektron transferi temelinde CUPRAC ve karışık modlu DPPH analizlerini kullanarak gösterildiği gibi, daha doğru ve güvenilir sonuçlar için farklı mekanizmalara sahip birden fazla toplam antioksidan kapasite analizi yapılmıştır. Ayrıca, Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak yapılan toplam fenolik madde tayini analizi fenolik bileşiklere özgü değildir. Sitrik asit ve basit şekerler gibi indirgeyici maddeler analize dahil olabilir ve potansiyel olarak toplam fenolik madde miktarının hatalı tahmin edilmesine yol açabilir (Çapanoğlu ve ark., 2022). Bu sınırlamalar göz önünde bulundurularak bu çalışmada UPLC-ESI–MS/MS kullanılarak bireysel fenolik bileşikler de ölçülmüştür.

Çizelge 4.1. *İn vitro* sindirim sırasında ceviz kabuğu ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriğindeki (TPC) ve toplam antioksidan kapasitesindeki (TAC) değişimler

Çözücü	Sindirilmemiş	Mide Sindirimi	Bağırsak Sindirimi
TPC (g GAE/kg)			
NADES 1	$26,8 \pm 1,3^{\text{def, A}}$	$23,7 \pm 0,9^{\text{bc, B}}$	$21,2 \pm 0,8^{\text{bcd, B}}$
NADES 2	$25,2 \pm 0,8^{\text{ef, A}}$	$23,9 \pm 1,9^{\text{bc, A}}$	$19,0 \pm 0,3^{\text{d, B}}$
NADES 3	$41,0 \pm 1,2^{\text{a, A}}$	$34,7 \pm 2,6^{\text{a, B}}$	$23,5 \pm 1,6^{\text{abc, C}}$
NADES 4	$35,0 \pm 2,9^{\text{bc, A}}$	$34,9 \pm 1,6^{\text{a, A}}$	$20,3 \pm 1,5^{\text{cd, B}}$
NADES 5	$41,1 \pm 5,2^{\text{a, A}}$	$23,3 \pm 1,4^{\text{c, B}}$	$27,1 \pm 1,5^{\text{a, B}}$
NADES 6	$35,3 \pm 1,0^{\text{bc, A}}$	$23,8 \pm 1,3^{\text{bc, B}}$	$25,6 \pm 2,6^{\text{a, B}}$
NADES 7	$27,3 \pm 1,5^{\text{def, A}}$	$26,7 \pm 1,4^{\text{bc, A}}$	$18,1 \pm 0,6^{\text{d, B}}$
NADES 8	$29,8 \pm 1,3^{\text{cde, A}}$	$25,2 \pm 1,2^{\text{bc, B}}$	$18,7 \pm 1,2^{\text{d, C}}$
NADES 9	$38,2 \pm 0,9^{\text{ab, A}}$	$33,3 \pm 1,5^{\text{a, B}}$	$24,1 \pm 0,3^{\text{ab, C}}$
NADES 10	$32,4 \pm 0,2^{\text{bcd, A}}$	$27,8 \pm 1,0^{\text{b, A}}$	$21,1 \pm 1,0^{\text{bcd, C}}$
Etanol	$23,4 \pm 0,9^{\text{f, B}}$	$25,4 \pm 0,9^{\text{bc, A}}$	$13,1 \pm 0,7^{\text{e, C}}$
TAC (g TE/kg)			
CUPRAC analizi			
NADES 1	$37,5 \pm 1,3^{\text{e, A}}$	$34,9 \pm 3,3^{\text{b, A}}$	$27,1 \pm 1,7^{\text{ab, B}}$
NADES 2	$38,3 \pm 0,6^{\text{de, A}}$	$36,5 \pm 7,2^{\text{b, AB}}$	$26,6 \pm 0,4^{\text{ab, B}}$
NADES 3	$55,2 \pm 1,7^{\text{a, A}}$	$50,5 \pm 2,9^{\text{a, A}}$	$25,2 \pm 0,7^{\text{abc, B}}$
NADES 4	$52,7 \pm 2,0^{\text{ab, A}}$	$55,6 \pm 1,8^{\text{a, A}}$	$24,4 \pm 1,5^{\text{bc, B}}$
NADES 5	$36,9 \pm 1,9^{\text{e, A}}$	$32,3 \pm 4,0^{\text{b, A}}$	$16,3 \pm 1,4^{\text{d, B}}$
NADES 6	$26,7 \pm 0,8^{\text{f, A}}$	$30,5 \pm 3,7^{\text{b, A}}$	$16,0 \pm 0,4^{\text{d, B}}$
NADES 7	$41,6 \pm 0,5^{\text{cd, A}}$	$39,2 \pm 1,9^{\text{b, A}}$	$22,7 \pm 1,5^{\text{c, B}}$
NADES 8	$44,5 \pm 0,6^{\text{c, A}}$	$38,5 \pm 2,1^{\text{b, B}}$	$24,9 \pm 1,4^{\text{abc, C}}$
NADES 9	$49,3 \pm 1,2^{\text{b, A}}$	$39,8 \pm 2,8^{\text{b, B}}$	$28,4 \pm 1,7^{\text{a, C}}$
NADES 10	$38,9 \pm 0,9^{\text{de, A}}$	$32,0 \pm 3,2^{\text{b, B}}$	$21,8 \pm 0,8^{\text{c, C}}$
Ethanol	$42,7 \pm 0,9^{\text{c, A}}$	$39,0 \pm 2,3^{\text{b, A}}$	$22,3 \pm 1,4^{\text{c, B}}$

Çizelge 4.1. *İn vitro* sindirim sırasında ceviz kabuğu ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriğindeki (TPC) ve toplam antioksidan kapasitesindeki (TAC) değişimler (devam)

DPPH analizi			
NADES 1	$25,5 \pm 0,4^{cd, A}$	$18,4 \pm 0,9^{def, B}$	$16,4 \pm 1,3^{b, B}$
NADES 2	$21,8 \pm 0,7^{d, A}$	$16,5 \pm 1,3^{ef, B}$	$15,5 \pm 1,0^{b, B}$
NADES 3	$36,6 \pm 0,9^{a, A}$	$23,0 \pm 3,0^{bcd, B}$	$10,4 \pm 1,7^{c, C}$
NADES 4	$29,1 \pm 0,6^{bc, A}$	$24,0 \pm 2,4^{bcd, B}$	$10,2 \pm 1,0^{c, C}$
NADES 5	$21,7 \pm 1,5^{d, A}$	$12,5 \pm 1,3^{f, B}$	$6,9 \pm 0,1^{d, C}$
NADES 6	$14,5 \pm 1,3^{e, A}$	$15,2 \pm 1,6^{ef, A}$	$7,1 \pm 1,4^{d, B}$
NADES 7	$28,2 \pm 3,2^{bc, A}$	$27,7 \pm 4,5^{b, A}$	$15,6 \pm 0,3^{b, B}$
NADES 8	$30,8 \pm 2,1^{abc, A}$	$23,0 \pm 0,8^{bcd, B}$	$15,6 \pm 0,5^{b, C}$
NADES 9	$32,5 \pm 1,1^{ab, A}$	$34,7 \pm 1,4^{a, A}$	$20,7 \pm 0,5^{a, B}$
NADES 10	$28,9 \pm 2,7^{bc, A}$	$25,5 \pm 2,3^{bc, A}$	$15,6 \pm 0,6^{b, B}$
Etanol	$20,3 \pm 4,3^{de, A}$	$20,3 \pm 0,7^{cde, A}$	$8,8 \pm 1,0^{cd, B}$

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. Sütunlardaki farklı küçük harfler ve satırlardaki farklı büyük harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları temsil etmektedir (P<0,05).

4.3. Flavonoidler

Ceviz kabuğu ekstraktlarının UPLC–ESI–MS/MS analizi altı temel flavonoidin tanımlanmasını sağlamıştır (Çizelge 4.2). Tanımlamalar MS ve parçalanma modellerinin analiz edilmesi ve bunların mevcut literatürle karşılaştırılması ile yapılmıştır (Ventura ve ark., 2023; Hu ve ark., 2020; Chen ve ark., 2017). Tespit edilen flavonoidlerin beşi kuersetin türevleridir: izokuersitrin, taksifolin, kuersitrin, kuersetin ve izoramnetin. Geriye kalan flavonoid, yalnızca etanolik ekstraktta ve gliserol ve glikozla hazırlanan doğal derin ötektik çözücü ekstraktlarında tespit edilen bir flavanol olan kateşindir (Çizelge 4.3), bu da doğal derin ötektik çözücülerin belirli flavonoidleri ekstrakte etmede seçici olduğunu göstermektedir. Laktik asit, gliserol ve glikozla

hazırlanan doğal derin ötektik çözücü ekstraktlarında, kuersitrin en yüksek seviyede bulunan bileşik olarak tanımlanmıştır ve toplam flavonoidlerin %43-61'ini oluşturmaktadır. Ayrıca, sitrik ve malik asitle hazırlanan doğal derin ötektik çözücü ekstraktlarındaki baskın flavonoid taksifolin olup, toplam flavonoidlerin %41-53'ünü oluşturmaktadır ve bu ekstraktlar ayrıca etanol ekstraktına kıyasla önemli ölçüde daha yüksek seviyelerde taksifolin, kuersetin ve isoramnetin içermektedir (P<0,05). Karboksilik asit bazlı doğal derin ötektik çözücülerin şeker ve polialkol bazlı doğal derin ötektik çözücülerden daha polar olduğu bildirilmiştir (Osamede ve ark., 2022), bu da bu flavonoidlerin daha yüksek geri kazanım oranını açıklamaktadır. Ancak genel olarak en yüksek toplam flavonoid içeriği etanolik ve kolin klorür:gliserol (1:3) ekstraktlarında gözlemlenirken, kolin klorür:malik asit (1:1 ve 1:2) ve kolin klorür:sitrik asit (1:2) ekstraktları en düşük flavonoid içeriğine sahiptir. Doğal derin ötektik çözücüde kolin klorür:hidrojen bağı donörü molar oranının azalmasının, gliserol haricinde, flavonoidlerin geri kazanımı üzerinde önemli bir etkisi olmamıştır (P>0,05).

Spektrofotometrik analizlerin sonuçlarıyla tutarlı olarak, mide sindirimi sindirilmemiş örneklere kıyasla toplam flavonoid madde içeriğini ya önemli ölçüde değiştirmemiş ya da azaltmıştır. Bağırsak sindiriminden sonra, tüm ekstraktlar sindirilmemiş örneklere kıyasla önemli ölçüde daha düşük seviyelerde flavonoid içermektedir (%19-73) (P<0,05). Benzer şekilde, portakal kabukları (Özdemirli ve Kamiloğlu, 2024) ve ıspanak yan ürünleri (Kamiloğlu, 2020) ile yapılmış önceki çalışmalarda da bağırsak sindiriminden sonra flavonoid seviyelerinde önemli düşüşler bildirilmiştir. Bu gözlem, enzim aktivitesi ve pH'daki artış nedeniyle flavonoidlerin daha küçük fenolik bileşiklere parçalanması ile ilişkili olabilir. Biyoerişilebilir flavonoidler, doğal derin ötektik çözücü ekstraktları için %37-81 arasında değişmiştir ve bu değer etanolik ekstraktın değerinden (%27) daha yüksektir. Spektrofotometrik analizlerin sonuçlarıyla uyumlu olarak, kolin klorür:laktik asitle hazırlanan ekstraktlar en yüksek seviyelerde biyoerişilebilir flavonoidleri içermektedir.

Çizelge 4.2. UPLC–ESI–MS/MS kullanılarak ceviz kabuklarında tespit edilen fenolik bileşiklerin tanımlanması

Alıkonma Zamanı (dk)	**Kütle(m/z)**	**Diğer parçalanma iyonları (m/z)**	**Tanım**	**Referans**
Flavonoidler				
2,16	(-) 289,1	**205,1**, 145,1	Kateşin	Hu ve ark., 2020; Sheng ve ark., 2021
3,45	(-) 463,1	**300,0**, 271,0	İzokuersitrin (kuersetin 3-*O*-glukozit)	Sheng ve ark., 2021
3,87	(-) 303,1	**285,1**, 125,0	Taksifolin (dihidrokuersetin)	Sheng ve ark., 2021; Herrera ve ark., 2020
4,05	(-) 447,1	**300,0**, 271,0	Kuersitrin (kuersetin 3-*O*-ramnozit)	Ventura ve ark., 2023; Sheng ve ark., 2021
5,95	(-) 301,0	179,0, **15,.2**	Kuersetin	Herrera ve ark., 2020
7,35	(-) 314,9	**299,9**, 151,2	İzoramnetin (3-*O*-metilkuersetin)	Chen ve ark., 2017
Fenolik Asitler ve Aldehitler				
1,99	(-) 152,9	**109,0**, 90,9	Protokatekuik asit	Ventura ve ark., 2023
2,60	(-) 137,0	**93,0**, 75,1, 65,1	*p*-Salisilik asit	Sheng ve ark., 2021; Herrera ve ark., 2020
3,40	(-) 301,0	300,0, **284,0**	Ellajik asit	Sheng ve ark., 2021; Herrera ve ark., 2020; Ventura ve ark., 2023
3,55	(-) 151,0	**136,1**, 92,1	Vanilin	Hu ve ark., 2020; Sheng ve ark., 2021
4,45	(-) 206,9	**192,1**, 177,1	Sinapaldehit	-

Ana iyonlar kalın olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. *İn vitro* sindirim sırasında ceviz kabuğu ekstraktlarının flavonoidlerindeki değişimler

Çözücü	Sindirilmemiş	Mide sindirimi	Bağırsak sindirimi
Kateşin (µg/kg)			
NADES 1	<LOQ	$472,4 \pm 1,7^{d, B}$	$581,9 \pm 25,0^{c, A}$
NADES 2	<LOQ	$921,6 \pm 18,1^{d, B}$	$1093,0 \pm 22,9^{b, A}$
NADES 3	$4667,3 \pm 432,2^{c, A}$	$4120,0 \pm 23,8^{b, A}$	$552,0 \pm 23,5^{c, B}$
NADES 4	$5710,2 \pm 155,5^{b, A}$	$4524,0 \pm 244,0^{b, B}$	$532,5 \pm 31,9^{c, C}$
NADES 5	$2698,9 \pm 34,6^{d, A}$	$2098,2 \pm 113,3^{c, B}$	$1051,6 \pm 22,9^{b, C}$
NADES 6	$2445,5 \pm 37,2^{d, A}$	$2371,6 \pm 2,7^{c, A}$	$1124,6 \pm 18,0^{b, B}$
NADES 7	<LOQ	<LOQ	<LOQ
NADES 8	<LOQ	<LOQ	<LOQ
NADES 9	<LOQ	<LOQ	<LOQ
NADES 10	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Etanol	$12338,7 \pm 113,5^{a, A}$	$5529,3 \pm 342,2^{a, B}$	$2143,4 \pm 108,2^{a, C}$
İzokuersitrin (µg/kg)			
NADES 1	$427,9 \pm 28,6^{cd, A}$	$364,3 \pm 9,9^{c, A}$	$234,2 \pm 29,2^{ef, B}$
NADES 2	$460,6 \pm 15,1^{c, A}$	$348,9 \pm 2,9^{c, B}$	$284,3 \pm 15,1^{d, C}$
NADES 3	$575,8 \pm 31,3^{b, B}$	$475,4 \pm 3,7^{a, C}$	$676,8 \pm 1,7^{a, A}$
NADES 4	$675,1 \pm 3,8^{a, A}$	$400,4 \pm 6,2^{bc, C}$	$558,9 \pm 3,0^{b, B}$
NADES 5	$481,1 \pm 3,2^{c, A}$	$242,6 \pm 20,3^{d, C}$	$337,3 \pm 5,6^{c, B}$
NADES 6	$468,4 \pm 14,8^{c, A}$	$377,0 \pm 23,4^{c, B}$	$308,2 \pm 2,7^{cd, C}$
NADES 7	$219,8 \pm 8,2^{e, A}$	$193,1 \pm 18,1^{de, A}$	$175,1 \pm 15,3^{g, A}$
NADES 8	$244,1 \pm 25,1^{e, A}$	$194,0 \pm 4,7^{de, A}$	$182,5 \pm 6,1^{g, A}$
NADES 9	$132,1 \pm 29,2^{f, A}$	$157,6 \pm 26,3^{e, A}$	$112,1 \pm 6,3^{h, A}$
NADES 10	$233,5 \pm 24,3^{e, A}$	$204,7 \pm 11,3^{de, A}$	$200,2 \pm 12,5^{fg, A}$

Çizelge 4.3. *İn vitro* sindirim sırasında ceviz kabuğu ekstraktlarının flavonoidlerindeki değişimler (devam)

Etanol	351,2 ± 11,9$^{d, B}$	436,1 ± 10,1$^{ab, A}$	268,8 ± 5,2$^{de, C}$
Taksifolin (µg/kg)			
NADES 1	1937,6 ± 84,2$^{cd, A}$	1699,6 ± 27,5$^{b, A}$	1402,8 ± 206,0$^{b, A}$
NADES 2	1926,2 ± 1,1$^{cd, A}$	1652,0 ± 70,5$^{b, AB}$	14024 ± 144,2$^{b, B}$
NADES 3	1929,8 ± 4,8$^{cd, A}$	1572,4 ± 123,0$^{b, B}$	899,7 ± 10,3$^{c, C}$
NADES 4	2716,9 ± 284,0$^{bc, A}$	1523,1 ± 145,5$^{bc, B}$	892,7 ± 12,5$^{c, B}$
NADES 5	1549,1 ± 22,3$^{d, A}$	866,7 ± 22,8$^{cd, B}$	622,7 ± 5,5$^{c, C}$
NADES 6	1519,2 ± 34,9$^{d, A}$	1314,1 ± 148,6$^{bcd, A}$	652,7 ± 24,4$^{c, B}$
NADES 7	3377,4 ± 239,1$^{ab, A}$	2877,4 ± 204,3$^{a, A}$	1981,6 ± 184,5$^{a, B}$
NADES 8	3471,4 ± 29,0$^{ab, A}$	2731,2 ± 359,8$^{a, AB}$	1892,5 ± 142,8$^{a, B}$
NADES 9	3835,0 ± 225,7$^{a, A}$	2970,7 ± 257,4$^{a, B}$	1966,8 ± 47,8$^{a, C}$
NADES 10	25121 ± 520,6$^{c, A}$	1942,5 ± 99,5$^{b, A}$	1824,7 ± 159,6$^{ab, A}$
Etanol	1350,3 ± 40,4$^{d, A}$	776,5 ± 15,4$^{d, B}$	492,3 ± 16,8$^{c, C}$
Kuersitrin (µg/kg)			
NADES 1	4444,9 ± 329,0$^{cd, A}$	4342,4 ± 333,8$^{bc, A}$	2510,6 ± 256,3$^{bc, B}$
NADES 2	4508,4 ± 307,9$^{cd, A}$	4282,8 ± 131,6$^{bc, A}$	3177,9 ± 200,6$^{b, B}$
NADES 3	5425,2 ± 79,0$^{b, A}$	4844,7 ± 141,8$^{ab, A}$	4475,0 ± 432,1$^{a, A}$
NADES 4	8221,3 ± 84,9$^{a, A}$	5297,4 ± 296,4$^{a, B}$	4398,3 ± 521,9$^{a, B}$
NADES 5	4650,8 ± 430,9$^{bc, A}$	2685,8 ± 177,1$^{d, B}$	2088,6 ± 230,8$^{c, B}$
NADES 6	3744,2 ± 54,0$^{d, A}$	3646,4 ± 145,2$^{c, A}$	1977,8 ± 68,8$^{c, B}$
NADES 7	1529,6 ± 67,5$^{ef, A}$	1756,8 ± 47,3$^{ef, A}$	1528,4 ± 173,3$^{cd, A}$
NADES 8	2134,8 ± 4,6$^{e, A}$	1917,2 ± 27,2$^{def, AB}$	1646,7 ± 163,8$^{cd, B}$
NADES 9	1082,3 ± 139,0$^{f, A}$	1120,5 ± 58,1$^{f, A}$	742,2 ± 48,4$^{d, A}$
NADES 10	1891.4 ± 46,5$^{e, A}$	1645,7 ± 297,8$^{f, A}$	1657,5 ± 34,4$^{cd, A}$

Çizelge 4.3. *İn vitro* sindirim sırasında ceviz kabuğu ekstraktlarının flavonoidlerindeki değişimler (devam)

Etanol	4286,0 ± 144,0$^{cd, A}$	2587,2 ± 388,3$^{de, B}$	2014,9 ± 191,0$^{c, B}$
Kuersetin (µg/kg)			
NADES 1	564.6 ± 4.1^{c,B}	655.5 ± 1.3^{d,A}	95.5 ± 0.1^{d,C}
NADES 2	546.4 ± 41.8^{c,A}	635.8 ± 28.0^{d,A}	93.7 ± 0.8^{d,B}
NADES 3	69.0 ± 0.2^{d,A}	64.0 ± 3.9^{e,A}	<LOQ
NADES 4	85.4 ± 2.2^{d,A}	73.2 ± 0.6^{e,B}	<LOQ
NADES 5	45.9 ± 0.03^{d,A}	32.4 ± 2.3^{e,B}	<LOQ
NADES 6	57.2 ± 3.4^{d,A}	53.5 ± 4.1^{e,A}	<LOQ
NADES 7	1598.7 ± 192.3^{b,A}	1745.4 ± 187.3^{ab,A}	279.3 ± 27.0^{ab,B}
NADES 8	1533.0 ± 149.3^{b,A}	1488.5 ± 46.3^{b,A}	193.1 ± 9.6^{c,B}
NADES 9	2135.8 ± 86.4^{a,A}	1866.4 ± 6.9^{a,B}	338.3 ± 26.4^{a,C}
NADES 10	1469.9 ± 171.7^{b,A}	1117.1 ± 152.8^{c,A}	268.6 ± 31.5^{b,B}
Etanol	52.5 ± 8.9^{d,A}	29.9 ± 3.0^{e,A}	<LOQ
İzoramnetin (µg/kg)			
NADES 1	4,3 ± 0,1$^{c, A}$	3,4 ± 0,4$^{c, A}$	0,5 ± 0,02$^{bc, B}$
NADES 2	46 ± 0,3$^{c, A}$	2,5 ± 0,1$^{cd, B}$	0,2 ± 0,01$^{c, C}$
NADES 3	3,5 ± 0,1$^{c, A}$	1,2 ± 0,2$^{cd, B}$	0,2 ± 0,03$^{c, C}$
NADES 4	4,6 ± 0,1$^{c, A}$	2,1 ± 0,2$^{cd, B}$	0,2 ± 0,02$^{c, C}$
NADES 5	1,7 ± 0,01$^{c, A}$	0,5 ± 0,2$^{d, B}$	<LOQ
NADES 6	1,7 ± 0,2$^{c, A}$	0,5 ± 0,2$^{d, B}$	<LOQ
NADES 7	14,4 ± 2,2$^{ab, A}$	13,7 ± 0,2$^{a, A}$	0,9 ± 0,03$^{ab, B}$
NADES 8	12,6 ± 3,0$^{b, A}$	9,5 ± 0,1$^{b, A}$	1,5 ± 0,1$^{a, B}$
NADES 9	17,9 ± 2,1$^{a, A}$	13,7 ± 1,6$^{a, A}$	1,5 ± 0,5$^{a, B}$
NADES 10	9,7 ± 0,1$^{b, A}$	7,4 ± 0,6$^{b, B}$	1,4 ± 0,1$^{a, C}$

Çizelge 4.3. *İn vitro* sindirim sırasında ceviz kabuğu ekstraktlarının flavonoidlerindeki değişimler (devam)

Etanol	$3,7 \pm 0,4^{c, A}$	$1,3 \pm 0,2^{cd, B}$	$0,2 \pm 0,01^{c, B}$
ΣFlavonoidler (µg/kg)			
NADES 1	$7379,5 \pm 388,6^{de, A}$	$7537,6 \pm 319,6^{cde, A}$	$4825,6 \pm 104,7^{b, B}$
NADES 2	$7446,2 \pm 364,1^{de, A}$	$7843,6 \pm 12,1^{c, A}$	$6051,6 \pm 337,9^{a, B}$
NADES 3	$12670,7 \pm 546,9^{b, A}$	$11077,7 \pm 296,1^{a, A}$	$6603,7 \pm 467,6^{a, B}$
NADES 4	$17413,5 \pm 207,3^{a, A}$	$11820,2 \pm 678,9^{a, B}$	$6382,5 \pm 544,3^{a, C}$
NADES 5	$9427,5 \pm 377,3^{c, A}$	$5926,1 \pm 59,2^{fg, B}$	$4100,2 \pm 219,0^{bc, C}$
NADES 6	$8236,1 \pm 67,9^{cd, A}$	$7763,0 \pm 13,3^{cd, B}$	$4063,3 \pm 29,1^{bc, C}$
NADES 7	$6740,0 \pm 374,3^{ef, A}$	$6586,3 \pm 46,2^{cdef, A}$	$3965,3 \pm 31,1^{bc, B}$
NADES 8	$7396,0 \pm 93,6^{de, A}$	$6340,3 \pm 374,1^{defg, B}$	$3916,3 \pm 17,4^{bc, C}$
NADES 9	$7203,1 \pm 145,8^{def, A}$	$6129,0 \pm 220,3^{efg, B}$	$3160,9 \pm 128,4^{c, C}$
NADES 10	$6116,5 \pm 326,5^{f, A}$	$4917,4 \pm 362,9^{g, AB}$	$3952,3 \pm 106,1^{bc, B}$
Etanol	$18382,3 \pm 7,4^{a, A}$	$9360,2 \pm 701,8^{b, B}$	$4919,6 \pm 287,7^{b, C}$

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. Sütunlardaki farklı küçük harfler ve satırlardaki farklı büyük harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları temsil etmektedir ($P<0,05$). LOQ: kantifikasyon limiti.

4.4. Fenolik Asitler ve Aldehitler

UPLC-ESI-MS/MS kullanılarak ceviz kabuğu ekstraktlarında beş temel fenolik asit ve aldehit (protokatekuik asit, *p*-salisilik asit, ellagik asit, vanilin ve sinapaldehit) tanımlanmıştır (Çizelge 4.2). Ellajik asit tüm ekstraklarda baskın bileşik olarak tanımlanmış olup toplam fenolik asit ve aldehitlerin %60-96'sını oluştururken, protokatekuik ve *p*-salisilik asitler yalnızca kolin klorür:gliserol ve etanol özütlerinde tespit edilmiştir (Çizelge 4.4). Kolin klorür:gliserol (1:3) ekstraktı en yüksek toplam fenolik asit ve aldehit seviyesini içermektedir ve bu seviye etanol ekstraktında bulunanlardan önemli ölçüde daha yüksektir ($P<0,05$). Kestane kabuğu atıkları üzerinde yapılan önceki bir çalışmada da poliol bazlı doğal derin ötektik çözücülerin organik

çözücüye kıyasla daha yüksek seviyelerde ellajik asit ekstrakte ettiği bildirilmiştir (Husanu ve ark., 2020). Flavonoidler için elde edilen sonuçlara benzer şekilde, doğal derin ötektik çözücüde kolin klorür'ün hidrojen bağı donörüne molar oranının düşürülmesinin çoğu ekstrakt için fenolik asitlerin ve aldehitlerin geri kazanımı üzerinde önemli bir etkisi olmamıştır.

Flavonoidler ve spektrofotometrik analiz bulgularıyla uyumlu olarak, gastrik sindirimin sindirilmemiş örneklere kıyasla fenolik asit ve aldehitlerin toplam seviyelerini önemli ölçüde etkilemediği veya azalttığı görülmüştür. Bağırsak sindiriminden sonra, kolin klorür:gliserol (1:2) hariç tüm ekstraktlarda, sindirilmemiş örneklere kıyasla önemli ölçüde daha düşük fenolik asit ve aldehit seviyeleri görülmüştür (%23-55) (P<0,05). Fenolik asit ve aldehitlerin biyoerişilebilirliğinin, laktik asit içeren ekstrakt (%45) hariç tüm doğal derin ötektik çözücü ekstraktlarında (%47-99), etanol ekstraktına (%47) kıyasla daha yüksek olduğu kaydedilmiştir. Flavonoidler ve spektrofotometrik analiz sonuçlarının aksine, en yüksek biyoerişilebilir fenolik asit ve aldehit seviyelerine sahip ekstraktın kolin klorür:gliserol (1:2) olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. *İn vitro* sindirim sırasında ceviz kabuğu ekstraktlarındaki fenolik asit ve aldehitlerdeki değişimler

Çözücü	**Sindirilmemiş**	**Mide sindirimi**	**Bağırsak sindirimi**
Protokatekuik asit (µg/kg)			
NADES 1	<LOQ	$41,0 \pm 0,3^{c, B}$	$85,5 \pm 3,7^{c, A}$
NADES 2	<LOQ	$52,8 \pm 1,7^{bc, B}$	$93,6 \pm 3,5^{c, A}$
NADES 3	$177,4 \pm 22,8^{b, A}$	$175,7 \pm 17,9^{a, A}$	$223,4 \pm 40,5^{b, A}$
NADES 4	$174,7 \pm 3,4^{b, B}$	$168,5 \pm 11,8^{a, B}$	$281,8 \pm 14,5^{a, A}$
NADES 5	<LOQ	<LOQ	<LOQ
NADES 6	<LOQ	<LOQ	<LOQ
NADES 7	<LOQ	<LOQ	<LOQ
NADES 8	<LOQ	<LOQ	<LOQ

Çizelge 4.4. İn vitro sindirim sırasında ceviz kabuğu ekstraktlarındaki fenolik asit ve aldehitlerdeki değişimler (devam)

NADES 9	<LOQ	<LOQ	<LOQ
NADES 10	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Etanol	$223,5 \pm 14,9^{a, A}$	$76,7 \pm 0,8^{b, B}$	$57,0 \pm 0,6^{c, B}$
***p*-Salisilik asit (µg/kg)**			
NADES 1	<LOQ	<LOQ	<LOQ
NADES 2	<LOQ	<LOQ	<LOQ
NADES 3	$952,5 \pm 31,8^{b, A}$	$628,4 \pm 25,1^{b, C}$	$749,8 \pm 13,3^{b, B}$
NADES 4	$781,0 \pm 21,8^{c, A}$	$519,1 \pm 26,7^{c, B}$	$852,1 \pm 5,3^{a, A}$
NADES 5	<LOQ	<LOQ	<LOQ
NADES 6	<LOQ	<LOQ	<LOQ
NADES 7	<LOQ	<LOQ	<LOQ
NADES 8	<LOQ	<LOQ	<LOQ
NADES 9	<LOQ	<LOQ	<LOQ
NADES 10	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Etanol	$1498,7 \pm 10,2^{a, A}$	$842,3 \pm 31,4^{a, B}$	$658,6 \pm 72,6^{c, B}$
Ellajik asit (µg/kg)			
NADES 1	$9652,6 \pm 137,3^{bcde, A}$	$8290,1 \pm 132,4^{bc, B}$	$4685,2 \pm 327,6^{de, C}$
NADES 2	$11006,5 \pm 992,3^{abc, A}$	$8274,7 \pm 127,3^{bc, B}$	$4669,1 \pm 214,4^{de, C}$
NADES 3	$8681,6 \pm 318,1^{bcde, AB}$	$7420,4 \pm 453,4^{bcd, B}$	$9417,1 \pm 331,5^{a, A}$
NADES 4	$13536,5 \pm 1508,2^{a, A}$	$9342,5 \pm 336,5^{ab, B}$	$10102,1 \pm 130,6^{a, AB}$
NADES 5	$8375,8 \pm 413,4^{cde, A}$	$4496,8 \pm 345,1^{e, B}$	$4315,9 \pm 379,5^{ef, B}$
NADES 6	$7281,1 \pm 329,6^{de, A}$	$7366,2 \pm 137,0^{bcd, A}$	$3437,6 \pm 543,8^{f, B}$
NADES 7	$11202,2 \pm 1456,1^{abc, A}$	$9293,6 \pm 163,1^{ab, AB}$	$7162,3 \pm 51,8^{b, B}$
NADES 8	$10820,0 \pm 614,0^{abcd, A}$	$8408,7 \pm 463,6^{bc, B}$	$6094,3 \pm 266,5^{bc, C}$

Çizelge 4.4. İn vitro sindirim sırasında ceviz kabuğu ekstraktlarındaki fenolik asit ve aldehitlerdeki değişimler

NADES 9	12084,5 ± 1737,1$^{ab, A}$	11523,1 ± 1978,6$^{a, AB}$	5651,0 ± 61,9$^{cd, B}$
NADES 10	8400,3 ± 91,9$^{cde, A}$	6600,2 ± 32,1$^{cde, B}$	6397,0 ± 35,4$^{bc, B}$
Etanol	7175,0 ± 43,4$^{e, A}$	5667,0 ± 86,3$^{de, B}$	3960,3 ± 145,3$^{ef, C}$
Vanilin (µg/kg)			
NADES 1	1405,3 ± 151,1$^{bc, A}$	805,4 ± 2,9$^{bc, B}$	820,8 ± 13,2$^{b, B}$
NADES 2	1224,2 ± 161,5$^{c, A}$	624,4 ± 10,6$^{cd, B}$	718,6 ± 25,1$^{cd, B}$
NADES 3	1732,6 ± 124,3$^{b, A}$	1366,4 ± 13.0$^{a, B}$	1310,0 ± 12,8$^{a, B}$
NADES 4	1681,2 ± 29,8$^{b, A}$	1177,9 ± 217,7$^{ab, A}$	1305,7 ± 9,2$^{a, A}$
NADES 5	668,2 ± 34,6^{d}	<LOQ	<LOQ
NADES 6	<LOQ	<LOQ	<LOQ
NADES 7	1654,9 ± 145,2$^{b, A}$	1114,2 ± 124,8$^{ab, B}$	726,0 ± 3,9$^{cd, B}$
NADES 8	1559,5 ± 108,5$^{bc, A}$	852,3 ± 42,4$^{bc, B}$	735,8 ± 1,8$^{c, B}$
NADES 9	479,3 ± 107,4$^{d, A}$	459,2 ± 21,9$^{cd, A}$	511,8 ± 12,3$^{e, A}$
NADES 10	288,5 ± 72,0$^{d, A}$	319,8 ± 24,3$^{d, A}$	333,9 ± 26,9$^{f, A}$
Etanol	2217,0 ± 86,6$^{a, A}$	1509,3 ± 299,2$^{a, A}$	678,3 ± 10,1$^{d, B}$
Sinapaldehit (µg/kg)			
NADES 1	426,8 ± 3,6$^{c, A}$	352,5 ± 33,0$^{de, A}$	266,5 ± 1,2$^{c, B}$
NADES 2	355,0 ± 51,7$^{cd, A}$	238,1 ± 15,6$^{fg, AB}$	160,2 ± 19,6$^{e, B}$
NADES 3	736,9 ± 6,5$^{a, A}$	544,6 ± 0,5$^{b, B}$	493,7 ± 2,5$^{a, C}$
NADES 4	737,3 ± 12,4$^{a, A}$	440,4 ± 0,1$^{c, B}$	392,4 ± 19,5$^{b, B}$
NADES 5	295,7 ± 19,0$^{de, A}$	158,9 ± 12,4$^{gh, B}$	136,6 ± 1,9$^{e, B}$
NADES 6	319,5 ± 14,3$^{de, A}$	256,0 ± 20,0$^{f, B}$	142,0 ± 8,0$^{e, C}$
NADES 7	576,4 ± 6,1$^{b, A}$	418,7 ± 24,2$^{cd, B}$	275,4 ± 4,5$^{c, C}$
NADES 8	410,4 ± 12,8$^{c, A}$	288,2 ± 2,8$^{ef, B}$	175,2 ± 26,6$^{de, C}$

Çizelge 4.4. İn vitro sindirim sırasında ceviz kabuğu ekstraktlarındaki fenolik asit ve aldehitlerdeki değişimler (devam)

NADES 9	356,5 ± 8,4$^{cd, A}$	232,6 ± 31,5$^{fgh, B}$	246,3 ± 26,4$^{cd, B}$
NADES 10	253,9 ± 43,2$^{e, A}$	152,9 ± 7,6$^{h, AB}$	132,4 ± 4,4$^{e, B}$
Etanol	789,2 ± 12,8$^{a, B}$	1504,6 ± 30,7$^{a, A}$	236,6 ± 36,2$^{cd, C}$
ΣFenolik asitler and aldehitler (µg/kg)			
NADES 1	11484,8 ± 17,4$^{bcd, A}$	9489,1 ± 96,8$^{bcd, B}$	5858,2 ± 316,9$^{de, C}$
NADES 2	12585,7 ± 1205,5$^{bcd, A}$	9189,9 ± 130,7$^{bcd, B}$	5641,5 ± 262,7$^{e, C}$
NADES 3	12281,0 ± 255,0$^{bcd, A}$	10135,5 ± 396,8$^{abc, B}$	12193,9 ± 343,4$^{a, A}$
NADES 4	16910,8 ± 1465,6$^{a, A}$	11648,5 ± 539,4$^{ab, B}$	12934,1 ± 131,7$^{a, B}$
NADES 5	9339,7 ± 429,0$^{cde, A}$	4655,7 ± 357,5$^{e, B}$	4452,5 ± 377,6$^{f, B}$
NADES 6	7600,6 ± 343,9$^{e, A}$	7622,1 ± 157,0$^{cd, A}$	3579,6 ± 551,9$^{f, B}$
NADES 7	13433,6 ± 1595,2$^{ab, A}$	10826,5 ± 312.1$^{ab, AB}$	8163,7 ± 51,3$^{b, B}$
NADES 8	12789,8 ± 735,3$^{bc, A}$	9549,2 ± 424,0$^{abcd, B}$	7005,3 ± 295,0$^{c, C}$
NADES 9	12920,2 ± 1638,0$^{bc, A}$	12214,9 ± 1969.0$^{a, AB}$	6409,1 ± 47,8$^{cde, C}$
NADES 10	8942,7 ± 120,7$^{de, A}$	7072,9 ± 0,2$^{de, B}$	6863,3 ± 4,2$^{cd, B}$
Etanol	11903,4 ± 5,2$^{bcd, A}$	9599,8 ± 446,8$^{abcd, B}$	5590,9 ± 244,5^{e,C}

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. Sütunlardaki farklı küçük harfler ve satırlardaki farklı büyük harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları temsil etmektedir ($P<0,05$). LOQ: kantifikasyon limiti.

5. SONUÇ

Bilindiği kadarıyla bu çalışma, doğal derin ötektik çözücüler ile ceviz kabuklarından elde edilen ekstraktlardaki fenolik bileşenlerin biyoerişilebilirliğini değerlendiren ilk çalışmadır. Biyoerişilebilirlik sonuçlarına göre toplam fenolik madde içeriği, toplam antioksidan kapasite, flavonoidler ve fenolik asitler ile aldehitlerin çoğu doğal derin ötektik çözücü ekstraktlarında, etanolik ekstraktlara kıyasla daha yüksek değerlere sahip olduğu görülmüştür. Kolin klorür:laktik asit ile hazırlanan ekstraktlar toplam fenolik madde içeriği, toplam antioksidan kapasite ve flavonoidler için en yüksek biyoerişilebilirliğe sahipken kolin klorür:gliserol ile hazırlanan ekstraktlar fenolik asit ve aldehit açısından en yüksek biyoerişilebilirlik değerlerine sahiptir. Genel olarak bu çalışma fenolik bileşiklerin geri kazanımını ve biyoerişilebilirliğini iyileştirebilmek için ceviz kabuklarının ultrasesle birleştirilmiş doğal derin ötektik çözücüler ile işlenmesinin etkinliğini öne çıkarmıştır. Gelecekteki çalışmalarda, her derin ötektik çözücü ekstraktı için ekstraksiyon parametrelerinin optimize edilmesi, fenolik bileşiklerin daha yüksek geri kazanım oranlarına ulaşmak için iyi bir yaklaşım olabilir. İlaveten, bu doğal derin ötektik çözücü ekstraktlarının gıda formülasyonlarındaki potansiyel uygulamalarının araştırılması da gereklidir.

KAYNAKLAR

Abbott, A. P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D. L., & Rasheed, R. K. (2004). Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: Versatile alternatives to ionic liquids. *Journal of the American Chemical Society*, *126*(29), 9142–9147. https://doi.org/10.1021/ja048266j

Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K., & Tambyrajah, V. (2003). Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical Communications*, 1, 70–71. https://doi.org/10.1039/B210714G

Acarsoy Bilgin, N. & Mısırlı, A. (2023). The effect of different altitudes on nut properties and yield in "Chandler" walnut variety. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, *60*(4), 639-646, https://doi.org/10.20289/zfdergi.1266186

Açkurt, F.G. Biringen, & Löker, M. (1999). Sağlıklı beslenmede özel fizyolojik etki gösteren gıdaların yeri. Üretimden Tüketime Diyet Gıdalar Sempozyumu, İstanbul, 10-21.

Adebooye, O. C., Vijayalakshmi, R., & Singh, V. (2008). Peroxidase activity, chlorophylls and antioxidant profile of two leaf vegetables (*Solanum nigrum* L. and *Amaranthus cruentus* L.) under six pretreatment methods before cooking. *International Journal of Food Science & Technology*, *43*(1), 173-178. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01420.x

Akpinar Bayizit, A., Bekar, E., Unal, T.T., Celik, M.A., Acoglu Celik, B., Koc Alibasoglu, E., Sahin Dilmenler, P., Yolci Omeroglu, P., Copur, O.U., & Kamiloglu, S. (2023). Investigating the effect of harvest season on the bioaccessibility of bee pollen polyphenols by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *European Food Research and Technology*, *249*, 2529–2542. https://doi.org/10.1007/s00217-023-04316-8

Alam, M.A., Muhammad, G., Khan, M.N., Mofijur, M., Lv, Y., Xiong, W., & Xu, J. (2021). Choline chloride-based deep eutectic solvents as green extractants for the isolation of phenolic compounds from biomass. *Journal of Cleaner Production*, *309*, 127445. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127445

Albatrni, H., Qiblawey, H., & Al-Marri, M. J. (2022). Walnut shell based adsorbents: A review study on preparation, mechanism, and application, *Journal of Water Process Engineering*, 45 , 102527. https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102527

Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D.G., & Lightfoot, D.A. (2017). Phytochemicals: extraction, isolation, and identifcation of bioactive compounds from plant extracts. *Plants*, *6*(4), 42. https://doi.org/10.3390/plants6040042

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S.E. (2004). Novel total antioxidant capacity ındex for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ıon reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(26), 7970-7981. https://doi.org/10.1021/jf048741x

Aryal, S., Baniya, M.K., Danekhu, K., Kunwar, P., Gurung, R., & Koirala, N. (2019). Total phenoilc content, flavanoid content and antioxidant potential of wild vegetables from western Nepal. *Plants*, *8*(4), 96. https://doi.org/10.3390/plants8040096

Aslan Türker, D., & Doğan, M. (2022). Ultrasound-assisted natural deep eutectic solvent extraction of anthocyanin from black carrots: Optimization, cytotoxicity,

in-vitro bioavailability and stability. *Food and Bioproducts Processing*, *132*, 99-113. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2022.01.002

Atayoglu, A.T., Sözeri Atik, D., Bölük, E., Gürbüz, B., Ceylan, F.D., Çapanoğlu, E., Atayolu, R., Paradkar, A., Fearnley, J., & Palabiyik, I. (2023). Evaluating bioactivity and bioaccessibility properties of the propolis extract prepared with l-lactic acid: An alternative solvent to ethanol for propolis extraction. *Food Bioscience*, *53*, 102756. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102756

Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M., Sharif, K., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M., Ghafoor, K., Norulaini, N., & Omar, A. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, *117*(4), 426-436. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014

Babbar, N., Oberoi, H. S., & Sandhu, S. K. (2015). Therapeutic and nutraceutical potential of bioactive compounds extracted from fruit residues. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *55*(3), 319-337. https://doi.org/10.1080/10408398.2011.653734

Bayazit, S., Tefek, H., & Çalışkan, O. (2016) Türkiye' de ceviz (*Juglans regia* L.) araştırmaları. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 11(1), 169-179.

Bendary, E., Francis, R. R., Ali, H. M. G., Sarwat, M. I., & El Hady, S. (2013). Antioxidant and structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. *Annals of Agricultural Sciences*, *58*(2), 173-181. https://doi.org/10.1016/j.aoas.2013.07.002

Benvenutti, L., Zielinski, A.A.F., & Ferreira, S.R.S. (2019). Which is the best food emerging solvent: IL, DES or NADES?. *Trends in Food Science & Technology*, 90, 133–146. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.003

Bertolo, M. R., Martins, V. C., Plepis, A. M. G., & Junior, S. B. (2021). Utilization of pomegranate peel waste: Natural deep eutectic solvents as a green strategy to recover valuable phenolic compounds. *Journal of Cleaner Production*, *327*, 129471. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.129471

Bi, D., Zhao, Y., Jiang, R., Wang, Y., Tian, Y., Chen, X., & She, G. (2016). Phytochemistry, bioactivity and potential impact on health of Juglans: theoriginal plant of walnut. *Natural Product Communications*, *11*(6), 1934578x160110043. https://doi.org/10.1177/1934578X1601100643

Bondonno, N.P., Dalgaard, F., Kyrø, C., Murray, K., Bondonno, C. P., Lewis, J. R., Croft, K. D., Gislason, G., Scalbert, A., Cassidy, A., Tjønneland, A., Overvad, K., & Hodgson, J. M. (2019). Flavonoid intake is associated with lower mortality in the Danish diet cancer and health cohort. *Nature Communications*, *10*(1), 3651. https://doi.org/10.1038/s41467-019-11622-x

Bosiljkov, T., Dujmić, F., Bubalo, M. C., Hribar, J., Vidrih, R., Brnčić, M., Zlatic, E., Radojćić Redovniković, I., Zlatic, E., Radojćić Redovniković, I., & Jokić, S. (2017). Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins. *Food and Bioproducts Processing*, *102*, 195-203. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.12.005

Bou Abdallah, I., Baatour, O., Mechrgui, K., Herchi, W., Albouchi, A., Chalghoum, A., & Boukhchina, S. (2016). Essential oil composition of walnut tree (*Juglans regia* L.) leaves from Tunisia. *Journal of Essential Oil Research*, *28*(6), 545-550. https://doi.org/10.1080/10412905.2016.1166157

Cao, Y., Song, Z., Dong, C., Ni, W., Xin, K., Yu, Q., & Han, L. (2023). Green ultrasound-assisted natural deep eutectic solvent extraction of phenolic compounds from waste broccoli leaves: Optimization, identification, biological activity, and structural characterization. *LWT*, 190, 115407. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115407

Capanoglu, E., Kamiloglu, S., Cekic, S.D., Baskan, K.S., Avan, A.N., Uzunboy, S., & Apak, R. (2022). Antioxidant activity and capacity measurement. Plant Antioxidants and Health Springer; p. 709–773 2022. https://doi.org/10.1007/978-3-030-45299-5_22-1

Castrica, M., Rebucci, R., Giromini, C., Tretola, M., Cattaneo, D., & Baldi, A. (2019). Total phenolic content and antioxidant capacity of agri-food waste and by-products. *Italian Journal of Animal Science*, *18*(1), 336-341. https://doi.org/10.1080/1828051X.2018.1529544

Cerit, İ., Sariçam, A., Demirkol, O., Ünver, H., Sakar, E., & Coşansu, S. (2017). Comparative study of functional properties of eight walnut (*Juglans regia* L.) genotypes. *Food Science and Technology*, 37(3), 472–477. https://doi.org/10.1590/1678-457X.20516

Chamorro, F., Carpena, M., Lourenço-Lopes, C., Taofiq, O., Otero, P., Cao, H., Xiao, J., Simal-Gandara, & J., Prieto, M.A. (2022). By-products of walnut (*Juglans regia*) as a source of bioactive compounds for the formulation of nutraceuticals and functional foods. *Biology and Life Sciences Forum*, 12, 35. https://doi.org/10.3390/IECN2022-12396

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, *34*, 540-560. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035

Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: Concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(7), 8615-8627. https://doi.org/10.3390/ijms13078615

Chen, G. L., Liu, X. W., Han, M. D., Luo, C. X., & Chen, S. G. (2017). Study on the extraction and antioxidant activity of phenolic contents in *Diaphragma Juglandis* Fructus. *Food Research and Development, 38*, 67–71.

Chen, S., Zeng, Z., Hu, N. A., Bai, B. O., Wang, H., & Suo, Y. (2018). Simultaneous optimization of the ultrasound-assisted extraction for phenolic compounds content and antioxidant activity of Lycium ruthenicum Murr. fruit using response surface methodology. *Food Chemistry*, *242*, 1-8. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.105

Cheng, H., & Hu, Y. (2010). Municipal solid waste (MSW) as a renewable source of energy: Current and future practices in China. *Bioresource Technology*, *101*(11), 3816-3824. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.040

Choi, Y.H., van Spronsen, J., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I.W.C.E., Witkamp, G.J., & Verpoorte, R. (2011). Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology?. *Plant Physiology*, *156*(4), 1701-1705. https://doi.org/10.1104/pp.111.178426

Cunha, S. C., & Fernandes, J. O. (2018). Extraction techniques with deep eutectic solvents. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *105*, 225-239. https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.05.001

Da Silva, D. T., Smaniotto, F. A., Costa, I. F., Baranzelli, J., Muller, A., Somacal, S., ... & Emanuelli, T. (2021). Natural deep eutectic solvent (NADES): A strategy to improve the bioavailability of blueberry phenolic compounds in a ready-to-use extract. *Food Chemistry*, *364*, 130370. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130370

Dai, Y., Sun, Q., Wang, W., Lu, L., Liu, M., Li, J., Yang, S., Sun, Y., Zhang, K., & Xu, J. (2018). Utilizations of agricultural waste as adsorbent for the removal of contaminants: A review. *Chemosphere*, *211*, 235–253. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.179

Dai, Y., Van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, *766*, 61-68. https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019

De Hoyos-Martínez, P. L., Erdocia, X., Charrier-El Bouhtoury, F., Prado, R., & Labidi, J. (2018). Multistage treatment of almonds waste biomass: Characterization and assessment of the potential applications of raw material and products. *Waste Management*, *80*, 40-50. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.08.051

De los Ángeles Fernández, M., Espino, M., Gomez, F. J., & Silva, M. F. (2018). Novel approaches mediated by tailor-made green solvents for the extraction of phenolic compounds from agro-food industrial by-products. *Food Chemistry*, *239*, 671-678. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.150

Della Posta, S., Gallo, V., Ascrizzi, A. M., Gentili, A., De Gara, L., Dugo, L., & Fanali, C. (2023). Development of a green ultrasound-assisted procedure for the extraction of phenolic compounds from avocado peel with deep eutectic solvents. *Green Analytical Chemistry*, *7*, 100083. https://doi.org/10.1016/j.greeac.2023.100083

Dikmen, D. (2015). Sert kabuklu kuruyemişler ve sağlık üzerine etkileri. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, *43*(2), 174–182.

Directive, E. Directive. (2008). 2008/98/EC of the European Parliament and of the Council of 19 November 2008 on waste and repealing certain Directives. *Official Journal of the European Union* L312, 22.

Dzah, C. S., Duan, Y., Zhang, H., Wen, C., Zhang, J., Chen, G., & Ma, H. (2020). The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*, *35*, 100547. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100547

El Achkar, T., Fourmentin, S., & Greige-Gerges, H. (2019). Deep eutectic solvents: An overview on their interactions with water and biochemical compounds. *Journal of Molecular Liquids*, *288*, 111028. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111028

El Achkar, T., Greige-Gerges, H., & Fourmentin, S. (2021). Basics and properties of deep eutectic solvents: a review. *Environmental Chemistry Letters*, *19*, 3397-3408. https://doi.org/10.1007/s10311-021-01225-8

Espino, M., De los Ángeles Fernández, M., Gomez, F. J., & Silva, M. F. (2016). Natural designer solvents for greening analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *76*, 126-136. https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.006

European Commission. (2009). Directive 2009/32/EC of the European Parliament and of the Council of 23 April 2009 on the approximation of the laws of the Member States on extraction solvents used in the production of foodstuffs and food ingredients. *Official Journal of the European Union*, *L140*, 16–62.

FAO. (2017). Save Food for a Better Climate; FAO: Quebec City, QC, Canada.

FAO. (2020). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). FAOSTAT. http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC.

FAOSTAT. (2024). Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database. Crops. Retrieved from: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize. 2024.

Florindo, C., Oliveira, F. S., Rebelo, L. P. N., Fernandes, A. M., & Marrucho, I. M. (2014). Insights into the synthesis and properties of deep eutectic solvents based on cholinium chloride and carboxylic acids. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, *2*(10), 2416-2425. https://doi.org/10.1021/sc500439w

Fontana, A. R., Antoniolli, A., & Bottini, R. (2013). Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(38), 8987-9003. https://doi.org/10.1021/jf402586f

Food Wastage Footprint (Project). (2013). *Food Wastage Footprint: Impacts on Natural Resources: Summary Report*. Food & Agriculture Organization of the UN (FAO).

Fordos, S., Abid, N., Gulzar, M., Pasha, I., Oz, F., Shahid, A., Khan, M. K. I., Khaneghah, A. M., & Aadil, R. M. (2023). Recent development in the application of walnut processing by-products (walnut shell and walnut husk). *Biomass Conversion and Biorefinery*, *13*(16), 14389-14411. https://doi.org/10.1007/s13399-023-04778-6

Fu, X., Belwal, T., He, Y., Xu, Y., Li, L., & Luo, Z. (2022). UPLC-Triple-TOF/MS characterization of phenolic constituents and the influence of natural deep eutectic solvents on extraction of Carya cathayensis Sarg. peels: Composition, extraction mechanism and in vitro biological activities. *Food Chemistry*, *370*, 131042. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131042

Gao, M. Z., Cui, Q., Wang, L. T., Meng, Y., Yu, L., Li, Y. Y., & Fu, Y. J. (2020). A green and integrated strategy for enhanced phenolic compounds extraction from mulberry (*Morus alba* L.) leaves by deep eutectic solvent. *Microchemical Journal*, *154*, 104598. https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104598

García-Álvarez, J. (2015). Deep eutectic mixtures: Promising sustainable solvents for metal-catalysed and metal-mediated organic reactions. *European Journal of Inorganic Chemistry*, *2015*(31), 5147-5157. https://doi.org/10.1002/ejic.201500892

Guil-Guerrero, J. L., Ramos, L., Moreno, C., Zúñiga-Paredes, J. C., Carlosama-Yepez, M., & Ruales, P. (2016). Plant Foods By-Products as Sources of Health-Promoting Agents for Animal Production: A Review Focusing on the Tropics. *Agronomy Journal*, *108*(5), 1759-1774. https://doi.org/10.2134/agronj2015.0555

Gülsoy, E., Kaya, E. D., & Türkhan, A. (2021). Bazı ceviz (*Juglans regia* L.) çeşitlerinin antioksidant aktiviteleri ve fenolik madde içeriklerinin belirlenmesi. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, *36*, 55–62. https://doi.org/10.7161/omuanajas.751354

Haddad, E. H., Gaban-Chong, N., Oda, K., & Sabaté, J. (2014). Effect of a walnut meal on postprandial oxidative stress and antioxidants in healthy individuals. *Nutrition Journal*, *13*, 1-9. https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-4

Han, H., Wang, S., Rakita, M., Wang, Y., Han, Q., & Xu, Q. (2018). Effect of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds on the characteristics of walnut shells. *Food and Nutrition Sciences*, *9*(8), 1034-1045. https://doi.org/10.4236/fns.2018.98076

Hedren, E., Diaz, V., & Svanberg, U. (2002). Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an in vitro digestion method. *European Journal of Clinical Nutrition*, *56*(5), 425-430. https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601329

Helal, A., Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., & Conte, A. (2014). Bioaccessibility of polyphenols and cinnamaldehyde in cinnamon beverages subjected to *in vitro* gastro-pancreatic digestion. *Journal of Functional Foods*, *7*, 506-516. https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.01.005

Heredia-Guerrero, J. A., Heredia, A., Domínguez, E., Cingolani, R., Bayer, I. S., Athanassiou, A., & Benítez, J. J. (2017). Cutin from agro-waste as a raw material for the production of bioplastics. *Journal of Experimental Botany*, *68*(19), 5401-5410. https://doi.org/10.1093/jxb/erx272

Herrera, R., Hemming, J., Smeds, A., Gordobil, O., Willför, S., & Labidi, J. (2020). Recovery of bioactive compounds from hazelnuts and walnuts shells: Quantitative–qualitative analysis and chromatographic purification. *Biomolecules*, *10*(10), 1363. https://doi.org/10.3390/biom10101363

Holt-Giménez, E., Shattuck, A., Altieri, M., Herren, H., & Gliessman, S. (2012). We already grow enough food for 10 billion people… and still can't end hunger. *Journal of Sustainable Agriculture*, *36*(6), 595-598. https://doi.org/10.1080/10440046.2012.695331

Hu, Q., Liu, J., Li, J., Liu, H., Dong, N., Geng, Y., Lu, Y., & Wang, Y. (2020). Phenolic composition and nutritional attributes of diaphragma juglandis fructus and shell of walnut (*Juglans regia* L.). *Food Science and Biotechnology*, *29*, 187-196. https://doi.org/10.1007/s10068-019-00655-z

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(6), 1841-1856. https://doi.org/10.1021/jf030723c

Husanu, E., Mero, A., Rivera, J.G., Mezzetta, A., Ruiz, J.C., D'Andrea, F., Pomelli, C.S., & Guazzelli, L. (2020). Exploiting deep eutectic solvents and ionic liquids for the valorization of chestnut shell waste. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, *8*(50), 18386-18399. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c04945

Huyut, Z., Beydemir, Ş., & Gülçin, İ. (2017). Antioxidant and antiradical properties of selected flavonoids and phenolic compounds. *Biochemistry Research International*, *2017*(1), 7616791. https://doi.org/10.1155/2017/7616791

Irakli, M., Chatzopoulou, P., & Ekateriniadou, L. (2018). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds: Oleuropein, phenolic acids, phenolic alcohols and flavonoids from olive leaves and evaluation of its antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, *124*, 382-388. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.070

Ivanović, M., Islamčević Razboršek, M., & Kolar, M. (2020). Innovative extraction techniques using deep eutectic solvents and analytical methods for the isolation and characterization of natural bioactive compounds from plant material. *Plants*, *9*(11), 1428. https://doi.org/10.3390/plants9111428

Jahanban-Esfahlan, A., & Amarowicz, R. (2018). Walnut (*Juglans regia* L.) shell pyroligneous acid: chemical constituents and functional applications. *RSC Advances*, *8*(40), 22376-22391. https://doi.org/10.1039/c8ra03684e

Jahanban-Esfahlan, A., Ostadrahimi, A., Tabibiazar, M., & Amarowicz, R. (2019). A comparative review on the extraction, antioxidant content and antioxidant potential of different parts of walnut (*Juglans regia* L.) fruit and tree. *Molecules*, *24*(11), 2133. https://doi.org/10.3390/molecules24112133

Jahanban-Esfahlan, A., Ostadrahimi, A., Tabibiazar, M., & Amarowicz, R. (2019). A comprehensive review on the chemical constituents and functional uses of walnut (Juglans spp.) husk. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(16), 3920. https://doi.org/10.3390/ijms20163920

Kadakoğlu, B., Bayav, A., & Karlı, B. (2022). Türkiye'de ceviz üretim projeksiyonu ve rekabet gücü analizi. *Meyve Bilimi*, *9*(1), 8-15. https://doi.org/10.51532/meyve.1125552

Kadiroğlu, P., & Ekici, H. (2018). Yeşil ceviz kabuklarının biyoaktif özelliklerinin FT-IR spektroskopi yöntemiyle tahmin edilmesi. *Akademik Gıda*, *16*(1), 20–26. https://doi.org/10.24323/akademik-gida.415643

Kamiloglu, S. (2020). Industrial freezing effects on the content and bioaccessibility of spinach (Spinacia oleracea L.) polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *100*(11), 4190-4198. https://doi.org/10.1002/jsfa.10458

Kamiloglu, S., Ozdal, T., Tomas, M., & Capanoglu, E. (2022). Oil matrix modulates the bioaccessibility of polyphenols: a study of salad dressing formulation with industrial broccoli by-products and lemon juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *102*(12), 5368-5377. https://doi.org/10.1002/jsfa.11890

Kapoor, S., Gandhi, N., Tyagi, S.K., Kaur, A., & Mahajan, B. (2020). Extraction and characterization of guava seed oil: a novel industrial byproduct. *LWT*, *132*, 109882. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109882

Karak, P. (2019). Biological activities of flavonoids: an overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, *10*(4), 1567-1574. https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(4).1567-74

Koşar, M. B., Koşar, D. A., Sönmez, E., & Ertürk, E. (2023). 'Chandler' Ceviz Çeşidinin Fenolojik ve Pomolojik Özellikleri Üzerine Farklı Çöğür Anaçların Etkisi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, *13*(2), 726-735. https://doi.org/10.21597/jist.1223902

Kudłak, B., Owczarek, K., & Namieśnik, J. (2015). Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*, 11975-11992. https://doi.org/10.1007/s11356-015-4794-y

Kumaran, A., & Karunakaran, R. J. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of Coleus aromaticus. *Food Chemistry*, *97*(1), 109-114. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.032

Lavedrine, F., Zmirou, D., Ravel, A., Balducci, F., & Alary, J. (1999). Blood cholesterol and walnut consumption: a cross-sectional survey in

France. *Preventive Medicine*, *28*(4), 333-339. https://doi.org/10.1006/pmed.1999.0460

Lee, J., Koo, N., & Min, D. B. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *3*(1), 21-33. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00058.x

Lee, Y. H., Choo, C., Watawana, M. I., Jayawardena, N., & Waisundara, V. Y. (2015). An appraisal of eighteen commonly consumed edible plants as functional food based on their antioxidant and starch hydrolase inhibitory activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *95*(14), 2956-2964. https://doi.org/10.1002/jsfa.7039

Liu, Z., de Souza, T.S.P., Holland, B., Dunshea, F., Barrow, C., & Suleria, H.A.R. (2023). Valorization of Food Waste to Produce Value-Added Products Based on Its Bioactive Compounds. *Processes*, *11*, 840. https://doi.org/10.3390/pr11030840

Mahato, N., Sinha, M., Sharma, K., Koteswararao, R., & Cho, M. H. (2019). Modern extraction and purification techniques for obtaining high purity food-grade bioactive compounds and value-added co-products from citrus wastes. *Foods*, *8*(11), 523. https://doi.org/10.3390/foods8110523

Maimulyanti, A., Nurhidayati, I., Mellisani, B., Putri, F. A. R., Puspita, F., & Prihadi, A. R. (2023). Development of natural deep eutectic solvent (NADES) based on choline chloride as a green solvent to extract phenolic compound from coffee husk waste. *Arabian Journal of Chemistry*, *16*(4), 104634. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.104634

Marić, M., Grassino, A. N., Zhu, Z., Barba, F. J., Brnčić, M., & Brnčić, S. R. (2018). An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction. *Trends in Food science & Technology*, *76*, 28-37. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.022

María, P. D. (2017). Ionic liquids, switchable solvents, and eutectic mixtures. In The application of green solvents in separation processes (pp. 139-154). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805297-6.00006-1

Martins, M. A., Pinho, S. P., & Coutinho, J. A. (2019). Insights into the nature of eutectic and deep eutectic mixtures. *Journal of Solution Chemistry*, *48*, 962-982. https://doi.org/10.1007/s10953-018-0793-1

Mbous, Y. P., Hayyan, M., Hayyan, A., Wong, W. F., Hashim, M. A., & Looi, C. Y. (2017). Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering—Promises and challenges. *Biotechnology Advances*, *35*(2), 105-134. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.006

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Feunteun, S., Le Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, 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 & Function*, *5*, 1113–1124. https://doi.org/10.1039/C3FO60702J

Ortega, N., Macià, A., Romero, M. P., Reguant, J., & Motilva, M. J. (2011). Matrix composition effect on the digestibility of carob flour phenols by an in-vitro

digestion model. *Food Chemistry*, *124*(1), 65-71. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.105

Osamede Airouyuwa, J., Mostafa, H., Riaz, A., & Maqsood, S. (2022). Utilization of natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction as green extraction technique for the recovery of bioactive compounds from date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds: An investigation into optimization of process parameters. *Ultrasonics Sonochemistry*, *91*, 106233. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106233

Osorio, L. L. D. R., Flórez-López, E., & Grande-Tovar, C. D. (2021). The potential of selected agri-food loss and waste to contribute to a circular economy: Applications in the food, cosmetic and pharmaceutical industries. *Molecules*, *26*(2), 515. https://doi.org/10.3390/molecules26020515

Ozkan, G. (2024). Valorization of artichoke outer petals by using ultrasound-assisted extraction and natural deep eutectic solvents (NADES) for the recovery of phenolic compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *104*(5), 2744-2749. https://doi.org/10.1002/jsfa.13158

Ozdemirli, N., & Kamiloglu, S. (2024). Influence of industrial blanching, cutting, and freezing treatments on in vitro gastrointestinal digestion stability of orange (*Citrus sinensis* L.) and lemon (*Citrus limon* L.) peel polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *104*(4), 2165-2173. https://doi.org/10.1002/jsfa.13101

Özkan, G., Subaşı, B., Kamiloğlu, S., & Çapanoğlu, E. (2022). Sürdürülebilir Gıda ve Tarımsal Atık Yönetimi, *Çevre, İklim ve Sürdürülebilirlik*, *23*(2),145-160.

Padayachee, A., Day, L., Howell, K., & Gidley, M. J. (2017). Complexity and health functionality of plant cell wall fibers from fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(1), 59-81. https://doi.org/10.1080/10408398.2013.850652

Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, *5*, e47. https://doi.org/10.1017/jns.2016.41

Parada, J., & Aguilera, J. M. (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science*, *72*(2), R21-R32. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00274.x

Patra, A., Abdullah, S., & Pradhan, R. C. (2022). Review on the extraction of bioactive compounds and characterization of fruit industry by-products. *Bioresources and Bioprocessing*, *9*(1), 14. https://doi.org/10.1186/s40643-022-00498-3

Pereira, J. A., Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I. C., Bento, A., & Estevinho, L. (2008). Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, *46*(6), 2103-2111. https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.02.002

Picó, Y. (2013). Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *43*, 84-99. https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.12.005

Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, *63*(7), 1035–1042. https://doi.org/10.1021/np9904509

Porrini, M., & Riso, P. (2008). Factors influencing the bioavailability of antioxidants in foods: A critical appraisal, *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, *18*(10), 647– 650. https://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2008.08.004

Pycia, K., Kapusta, I., Jaworska, G., Kuźniar, P., & Kaszuba, J. (2019). Type of heat treatments on walnut fruits affects physicochemical content of walnut butter. *Journal of Food Processing and Preservation*, *43*(5), e13923. https://doi.org/10.1111/jfpp.13923

Rana, A., Samtiya, M., Dhewa, T., Mishra, V., & Aluko, R. E. (2022). Health benefits of polyphenols: A concise review. *Journal of Food Biochemistry*, *46*(10), e14264. https://doi.org/10.1111/jfbc.14264

Rashid, R., Wani, S. M., Manzoor, S., Masoodi, F. A., & Dar, M. M. (2023). Green extraction of bioactive compounds from apple pomace by ultrasound assisted natural deep eutectic solvent extraction: Optimisation, comparison and bioactivity. *Food Chemistry*, *398*, 133871. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133871

Ruesgas-Ramón, M., Figueroa-Espinoza, M. C., & Durand, E. (2017). Application of deep eutectic solvents (DES) for phenolic compounds extraction: Overview, challenges, and opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(18), 3591-3601. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01054

Rodríguez-Roque, M. J., Rojas-Graü, M. A., Elez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. (2014). *In vitro* bioaccessibility of health-related compounds from a blended fruit juice–soymilk beverage: Influence of the food matrix. *Journal of Functional Foods*, *7*, 161-169. https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.01.023

Saini, A., Kumar, A., Panesar, P. S., & Thakur, A. (2022). Potential of deep eutectic solvents in the extraction of value-added compounds from agro-industrial by-products. *Applied Food Research*, *2*(2), 100211. https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100211

Salık, M.A., & Çakmakçı, S. (2023). Ceviz (*Juglans regia* L.) Yaprağı ve yeşil kabuğu: fonksiyonel özellikleri, sağlığa yararları ve gıdalarda kullanım potansiyeli, *Akademik Gıda*, *21*(1), 90-100. https://doi.org/10.24323/akademik-gida.1274040

Sánchez-González, C., Ciudad, C. J., Noe, V., & Izquierdo-Pulido, M. (2017). Health benefits of walnut polyphenols: an exploration beyond their lipid profile. *Critical reviews in food science and nutrition*, *57*(16), 3373-3383. https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1126218

Santana, A. P., Mora-Vargas, J. A., Guimaraes, T. G., Amaral, C. D., Oliveira, A., & Gonzalez, M. H. (2019). Sustainable synthesis of natural deep eutectic solvents (NADES) by different methods. *Journal of Molecular Liquids*, *293*, 111452. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111452

Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, *101*(2), 492-501. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.006

Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., & Latha, L. Y. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, *8*(1). https://doi.org/10.4314/ajtcam.v8i1.60483

Setyaningsih, W., Saputro, I. E., Carrera, C. A., & Palma, M. (2019). Optimisation of an ultrasound-assisted extraction method for the simultaneous determination of phenolics in rice grains. *Food Chemistry*, *288*, 221-227. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.107

Shahbaz, K., Mjalli, F. S., Hashim, M. A., & AlNashef, I. M. (2011). Using deep eutectic solvents based on methyl triphenyl phosphunium bromide for the removal of glycerol from palm-oil-based biodiesel. *Energy & Fuels*, *25*(6), 2671-2678. https://doi.org/10.1021/ef2004943

Sheng, F., Hu, B., Jin, Q., Wang, J., Wu, C., & Luo, Z. (2021). The analysis of phenolic compounds in walnut husk and pellicle by UPLC-Q-Orbitrap HRMS and HPLC. *Molecules*, *26*(10), 3013. https://doi.org/10.3390/molecules26103013

Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. (2017). Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: A review. *Food Research International*, *101*, 1-16. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.026

Smith, E. L., Abbott, A. P., & Ryder, K. S. (2014). Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. *Chemical Reviews*, *114*(21), 11060-11082. https://doi.org/10.1021/cr300162p

Socas-Rodríguez, B., Torres-Cornejo, M. V., Álvarez-Rivera, G., & Mendiola, J. A. (2021). Deep eutectic solvents for the extraction of bioactive compounds from natural sources and agricultural by-products. *Applied Sciences*, *11*(11), 4897. https://doi.org/10.3390/app11114897

Şahin, S. K., & Bekar, A. (2018). Küresel Bir Sorun "Gıda Atıkları": Otel İşletmelerindeki Boyutları, *Journal of Tourism and Gastronomy Studies*, *6*(4), 1039-1061. https://doi.org/10.21325/jotags.2018.347

Şensoy, İ., & Karakaya, S. (2016). Fonksiyonel ürün tasarımı: gıda yapısı, gıda işleme ve biyoerişebilirlik arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi.

Tekiner, İ.H., Mercan, N.N., Kahraman, A., & Özel M. (2021). Dünya ve Türkiye'de gıda israfı ve kaybına genel bir bakış, *İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, *3*(2), 123-128. https://doi.org/10.47769/izufbed.884219

Tagliazucchi, D., Helal, A., Verzelloni, E., & Conte, A. (2012). The type and concentration of milk increase the in vitro bioaccessibility of coffee chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(44), 11056-11064. https://doi.org/10.1021/jf302694a

TÜİK (2021). Türkiye İstatistik Kurumu. https://data.tuik.gov.tr/Kategori/GetKategori?p=tarim-111&dil=1

Tomé, L. I., Baião, V., da Silva, W., & Brett, C. M. (2018). Deep eutectic solvents for the production and application of new materials. *Applied Materials Today*, *10*, 30-50. https://doi.org/10.1016/j.apmt.2017.11.005

Trigo, J. P., Alexandre, E. M., Saraiva, J. A., & Pintado, M. E. (2022). High value-added compounds from fruit and vegetable by-products–Characterization, bioactivities, and application in the development of novel food products. *Critical Reviews in Food science and Nutrition*, *60*(8), 1388-1416. https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1572588

Tungmunnithum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A., & Yangsabai, A. (2018). Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. *Medicine*, *5*(3), 93. https://doi.org/10.3390/medicines5030093

Torregrosa-Crespo, J., Marset, X., Guillena, G., Ramón, D. J., & Martínez-Espinosa, R. M. (2020). New guidelines for testing "Deep eutectic solvents" toxicity and their

effects on the environment and living beings. *Science of the Total Environment*, *704*, 135382. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135382

Varol, E., Gülsoy, E., & Aslantaş, R. (2020). Ümitvar ceviz (*Juglans regia* L.) genotiplerinin belirlenmesi üzerine bir araştırma: Kars-Kağızman Yöresi. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, *7*(1), 17–22. https://doi.org/10.19159/tutad.620233

Velioglu, Y., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of. Agricultural and Food Chemistry*, *46*(10), 4113-4117. https://doi.org/10.1021/jf9801973

Ventura, G., Mesto, D., Blasi, D., Cataldi, T. R., & Calvano, C. D. (2023). The effect of milling on the ethanolic extract composition of dried walnut (*Juglans regia* L.) shells. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(17), 13059. https://doi.org/10.3390/ijms241713059

Vilková, M., Płotka-Wasylka, J., & Andruch, V. (2020). The role of water in deep eutectic solvent-base extraction. *Journal of Molecular Liquids*, *304*, 112747. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.112747

Vinatoru, M., Mason, T. J., & Calinescu, I. (2017). Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *97*, 159-178. https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.002

Yen, G. C., & Chuang, D. Y. (2000). Antioxidant properties of water extracts from Cassia tora L. in relation to the degree of roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(7), 2760-2765. https://doi.org/10.1021/jf991010q

Yin, T. P., Cai, L., Chen, Y., Li, Y., Wang, Y. R., Liu, C. S., & Ding, Z. T. (2015). Tannins and antioxidant activities of the walnut (Juglans regia) pellicle. *Natural Product Communications*, *10*(12), 1934578X1501001232. https://doi.org/10.1177/1934578X1501001232

Yiğit, A., Ertürk, Ü., & Korukluoğlu, M. (2005). Fonksiyonel bir gıda: Ceviz, *Bahçe*, *34*(1), 163-170.

Yolci Omeroglu, P., Acoglu, B., Özdal, T., Tamer, C.E., & Çopur, Ö.U. (2019). Extraction Techniques for Plant-Based Bio-active Compounds. In: Swamy MK, Akhtar MS, eds. Natural Bio-active Compounds Singapore: Springer Singapore; p. 465–492. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7205-6_18

Zhang, Q., Vigier, K. D. O., Royer, S., & Jérôme, F. (2012). Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews*, *41*(21), 7108-7146. https://doi.org/10.1039/C2CS35178A

Zheng, B., Yuan, Y., Xiang, J., Jin, W., Johnson, J. B., Li, Z., Wang, C., & Luo, D. (2022). Green extraction of phenolic compounds from foxtail millet bran by ultrasonic-assisted deep eutectic solvent extraction: Optimization, comparison and bioactivities. *LWT, 154*, 112740. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112740

Wojtunik-Kulesza, K., Oniszczuk, A., Oniszczuk, T., Combrzyński, M., Nowakowska, D., & Matwijczuk, A. (2020). Influence of in vitro digestion on composition, bioaccessibility and antioxidant activity of food polyphenols—A non-systematic review. *Nutrients*, *12*(5), 1401. https://doi.org/10.3390/nu12051401