



T.C.
N DE ÖMER HAL SDEM R ÜN VERS TES
FEN B L MLER ENST TÜSÜ
GIDA MÜHEND SL ANAB L M DALI

ELMA SUYUNDA TERMOSON KASYON SÜRES NCE FENOL K
B LE KLERDEK DE M N FTIR SPEKTROSKOP S KULLANILARAK
BEL RLENMES VE POL FENOL OKS DAZ, PEROKS DAZ NAKT VASYONU

EM NE MEL KE AH N

Ekim 2019

T.C.
N DE ÖMER HAL SDEM R ÜN VERS TES
FEN B L MLER ENST TÜSÜ
GIDA MÜHEND SL ANAB L M DALI

ELMA SUYUNDA TERMOSON KASYON SÜRES NCE FENOL K
B LE KLERDEK DE M N FTIR SPEKTROSKOP S KULLANILARAK
BEL RLENMES VE POL FENOL OKS DAZ, PEROKS DAZ NAKT VASYONU

EM NE MEL KE AH N

Yüksek Lisans Tezi

Danı man

Dr. Ö r. Üyesi Hande BALTACIO LU

Ekim 2019

Emine Melike ŞAHİN tarafından **Dr. Öğr. Üyesi Hande BALTACIOĞLU** danışmanlığında hazırlanan “Elma Suyunda Termosonikasyon Süresince Fenolik Bileşiklerdeki Değişimin FTIR Spektroskopi Kullanılarak Belirlenmesi ve Polifenol Oksidaz, Peroksidaz İnaktivasyonu” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Hasan USLU

Niğde Ömer Halisdemir Ü. Müh. Fak. Gıda Müh. Böl.

Üye : Doç. Dr. Erkan KARACABEY

Süleyman Demirel Ü. Müh. Fak. Gıda Müh. Böl.

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Hande BALTACIOĞLU

Niğde Ömer Halisdemir Ü. Müh. Fak. Gıda Müh. Böl.

ONAY:

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından/...../20.... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu’nun/...../20.... tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../20...

Prof. Dr. Murat BARUT
MÜDÜR

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Emine Melike ŞAHİN



ÖZET

ELMA SUYUNDA TERMOSONİKASYON SÜRESİNCE FENOLİK BİLEŞİMLERDEKİ DEĞİŞİMLERİN FTIR SPEKTROSKOPİ KULLANILARAK BELİRLENMESİ VE POLİFENOL OKSİDAZ, PEROKSİDAZ NAKTİVASYONU

AH N, Emine Melike

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Hande BALTACIOĞLU

Ekim 2019, 63 sayfa

Bu çalışmada termosonikasyon (TS) uygulamasının farklı genlik (%60, 80, 100) farklı sıcaklık (40, 50, 60 ve 70 °C) ve sürelerde (5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dakika) elma suyunda bulunan polifenoloksidaz (PPO) ile peroksidaz (POD) enzimlerine ve fenolik bileşiklere etkisi incelenmiştir. Fenolik bileşikler FTIR spektroskopisi ve HPLC ile belirlenmiştir. Termosonikasyon uygulama sonucunda PPO enzimi için %100 genlik 70 °C sıcaklıkta 15 dakika sonunda %99 inaktivasyon sağlanırken, aynı koşullarda POD enzimi %94,5'i inaktif olmuştur. Toplam fenolik madde ve antioksidan aktivitenin en iyi korunduğu yöntem olarak %80 genlik, 60 °C ve 15 dakika kombinasyonu belirlenmiştir. FTIR spektroskopisi ile elde edilen spektrumlar ile fenolik bileşiklerde önemli bir değişimlik olmadığı tespit edilmiştir. HPLC ile katekin, klorojenik asit, kafeik asit, epikatekin ve kamferol saptanmıştır. FTIR ve HPLC ile belirlenen fenolik bileşik içeriğinin uyumlu olduğu görülmektedir. Termosonikasyon uygulaması elma sularının inlenmesinde enzim inaktivasyonunun sağlanması ve fenolik bileşiklerin korunması için gelecek vaat eden bir yöntem olarak önerilebilmektedir.

Anahtar Sözcükler: Antioksidan aktivite, elma suyu, enzim inaktivasyonu, fenolik madde, fourier dönüşüm kızıl ötesi spektroskopisi (FTIR), HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi), polifenol oksidaz, peroksidaz, termosonikasyon

SUMMARY

DETERMINATION OF CHANGES IN PHENOLIC COMPOUNDS AND INACTIVATION OF POLYPHENOL OXIDASE, PEROXIDASE IN APPLE JUICE DURING THERMOSONICATION BY FTIR SPECTROSCOPY

AH N, Emine Melike

Ni de Ömer Halisdemir University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Food Engineering

Supervisor : Assist. Prof. Dr. Hande BALTACIO LU

October 2019, 63 pages

In this study, the effect of TS with different amplitude (60, 80, 100%) different temperatures (40, 50, 60 and 70 ° C) and times (5, 10, 15, 20, 25 and 30 min) on the PPO, POD enzymes and phenolic compounds in apple juice was investigated. Phenolic compounds were determined by FTIR spectroscopy and HPLC. As a result of the TS application, while 99% inactivation was achieved at 100% amplitude, 70 °C after 15 minutes for the PPO, POD was inactivated by 94,5% under the same conditions. The combination of 80% amplitude, 60 °C and 15 minutes was determined as the best preservation method for total phenolic content antioxidant activity. FTIR spectroscopy showed that there was no significant change in phenolic compounds by spectra obtained from samples. Catechin, chlorogenic acid, caffeic acid, epicatechin and kaempferol were determined by HPLC. The results showed that the content of phenolic compounds determined by FTIR and HPLC were consistent. Thermosonication can be suggested as a promising method for the enzyme inactivation and protection of phenolic compounds in apple juice processing.

Keywords: Antioxidant activity, apple juice, enzyme inactivation, fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), HPLC (high performance liquid chromatography), peroxidase, phenolic substance, polyphenol oxidase, thermosonication

ÖN SÖZ

Yüksek Lisans tez çalışmamın her aamasında bana yol gösteren, ara tırmamın gerçekte tirilmesi ve de erlendirilmesinde katkılarını esirgemeyen; bana her konuda destek olan ve bilimsel bir bakı açısı kazanmamı sa layan de erli danı man hocam Sayın Dr. Ö r. Üyesi Hande BALTACIO LU' na

Çalışmam sırasında öneri ve bakı açılarıyla önemli katkılarda bulunan Tez jürisinin de erli üyeleri Sayın Prof. Dr. Hasan USLU ve Sayın Doç. Dr. Erkan KARACABEY'e

Çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimini esirgemeyen sayın bölüm hocalarıma,

Tez çalışmamın laboratuvar aamasında yardımlarını esirgemeyen Yüksek Lisans öğrencisi Gözde DO ANAY'a ve çalışmamızın materyali olan elmanın tedariki inde yardımcı olan Mehmet Ali GÖK'e desteklerinden dolayı çok te ekkür ederim.

Beni her konuda destekleyen ve sevgileri ile hep yanımda olan canım aileme, en içten te ekkürlerimi sunarım.

Ç İNDEK İLER D İZ İN

ÖZET.....	iv
SUMMARY.....	v
ÖN SÖZ.....	vi
Ç İZELGELER D İZ İN	ix
EK İLLER D İZ İN	xi
S İMGE VE KISALTMALAR.....	xi
BÖLÜM I.....	1
G İR	1
BÖLÜM II.....	3
KAYNAK ARA İTİRMASI.....	3
2.1 Elma.....	3
2.2 Enzim.....	5
2.2.1 Polifenol oksidaz enzimi.....	6
2.2.2 Peroksidaz enzimi.....	8
2.3 Termosonik Uygulamanın Elma PPO ve POD Enzimlerine Etkisi.....	9
2.4 Fenolik Madde.....	13
2.5 Fourier Dönü üm Kızıl Ötesi Spektroskopisi.....	15
2.6 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	18
2.7 Termosonikasyon Uygulamasının Fenolik Bile ikler ve Antioksidan Aktiviteye Etkisi.....	21
BÖLÜM III.....	24
DENEYSEL ÇALI MALAR.....	24
3.1 Materyal.....	24
3.2 Yöntem.....	24
3.2.1 Meyve suyu üretimi.....	24
3.2.2 Termosonikasyon uygulaması.....	24
3.2.3 Kalan enzim aktivitelerinin belirlenmesi.....	25
3.2.3.1 Kalan PPO aktivitesinin belirlenmesi.....	25
3.2.3.2 Kalan POD aktivitesinin belirlenmesi.....	25

3.2.4 Toplam fenolik madde tayini.....	26
3.2.5 DPPH yöntemiyle antioksidan aktivite tayini.....	26
3.2.6 Fenolik madde de i iminin FTIR spektroskopisi kullanılarak belirlenmesi..	27
3.2.7 HPLC yöntemi ile fenolik madde belirlenmesi.....	27
3.2.8 statiksel analiz.....	28
BÖLÜM IV.....	29
BULGULAR VE TARTI MA.....	29
4.1 Termosonik Uygulama ile PPO naktivasyonu.....	29
4.2 Termosonik Uygulama ile POD naktivasyonu.....	32
4.3 Toplam Fenolik Madde Tayini.....	35
4.4 DPPH Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini.....	39
4.5 FTIR Çalı maları.....	43
4.6 HPLC Çalı maları.....	46
BÖLÜM V.....	49
SONUÇLAR.....	49
KAYNAKLAR.....	51
EKLER.....	60
ÖZ GEÇM	63

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Türkiye’de meyve suyuna işlenen meyvelerin üretimi.....	4
Çizelge 2.2. Fenolik maddelerin sınıflandırılması.....	14
Çizelge 4.1. TS i llemi ile elma suyu örneklerinde bulunan EC ₅₀ de erleri.....	40
Çizelge 4.2. HPLC ile belirlenen fenolik bile ikler ve miktarları.....	47



EKLER DİZİNİ

ekil 2.1. 2010 yılında meyve suyuna i lenen meyve miktar da ılımı.....	5
ekil 2.2. PPO enziminin katalizledi i reaksiyonlar.....	7
ekil 4.1. TS i lem sonunda elma suyunda PPO'nun kalan enzim aktivitesi	30
ekil 4.2. TS i lem sonunda elma suyunda POD'un enziminin kalan enzim aktivitesi.	33
ekil 4.3. Toplam fenolik madde standart e risi	35
ekil 4.4. Elma suyunda toplam fenolik madde miktarındaki de i im	36
ekil 4.5. Elma suyu örneklerinde EC ₅₀ de erlerindeki de i im	41
ekil 4.6. TS uygulama sonunda elma suyu örneklerinin FTIR spektrumları.....	43
ekil 4.7. TS i lem sonunda elma suyu örneklerinin ayrı tırılmı FTIR spektrumları...	44
ekil 4.8. TS uygulama sonunda elma suyu örneklerinin FTIR spektrumları.....	45
ekil 4.9. TS i lem sonunda elma suyu örneklerinin ayrı tırılmı FTIR spektrumları..	45

S MGE VE KISALTMALAR

Simgeler

°	Derece
µg	Mikrogram

Açıklama

Kısaltmalar

ARGE	Ara tırma-Geli tirme
FTIR	Fourier Dönü üm Kızıl Ötesi Spektroskopisi
GAE	Gallik Asit E de eri
HHP	Yüksek Hidrositatik Basınç
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
MAE	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon
MS	Manosonikasyon
MTS	Manotermosonikasyon
POD	Peroksidaz
PPO	Polifenol Oksidaz
TS	Termosonikasyon
UAE	Ultrason Destekli Ekstraksiyon
US	Ultrasonikasyon
VCEAC	C vitamini E de er Antioksidant Kapasitesi
YA	Ya A ırlık

Açıklama

BÖLÜM I

G R

Meyve suyu üretiminde PPO ve POD kaynaklı enzimatik esmerle meyve ba lı olarak meydana gelen renk de i imleri, kaliteyi etkileyen önemli problemlerden biri olarak görülmektedir. Bu nedenle meyve ve sebzelerin i lenmesinde kalitesinin sa lanması için enzimlerin inaktive edilmesi büyük önem ta ımaktadır. Günümüzde enzim inaktivasyonunu sa lamak için gıdaların birço u ısıl i lemden geçirilmektedir. Geleneksel ısıl i lemlere göre ta ıdı ı avantajlar nedeniyle gıda endüstrisinde ısıl olmayan i lemlerin kullanımı gittikçe önem kazanmaktadır. Bu açıdan ısıl olmayan koruma teknikleri ya da bu teknolojilerin dü ük sıcaklıktaki ısıl uygulamaları ile kombinasyonu, yüksek sıcaklıkta uygulanan ısıl i lemler ile kıyaslandı nda daha yüksek kalitede gıda üretimi için enzim ve mikroorganizmaların inaktivasyonunu sa lamaktadır.

Bununla birlikte ısıl olmayan bir i lemin etkinli ini belirlemek için enzim inaktivasyonu ile birlikte uygulanan prosesin gıdanın kalite parametreleri üzerindeki etkisinin de belirlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle termosonikasyon uygulaması ile enzim inaktivasyonu sa lanırken meyve sularında önemli biyoaktif bile enlerden olan fenolik bile iklerin de i iminin de incelenmesi önemlidir. FTIR spektroskopisi meyve veya meyve suyu ba ta olmak üzere çe itli gıdalarda farklı kalite özelliklerini incelemek için yaygın olarak kullanılmaya ba lanan bir tekniktir. Bu teknik hızlı, ekonomik, güvenilir ve kolay bir metot olarak fenolik bile ik gibi çe itli bile enlerin belirlenmesinde önem kazanmaya ba lamı tır.

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), farklı bitki özleri ve gıda örneklerinde fenolik bile iklerin analizi için kullanılan en yaygın ve güvenilir tekniktir. Bunun nedeni, bu yöntemin duyarlılı ı, kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozulabilen bile iklerin ayrılmasına uygunlu u, en önemlisi ise sanayinin birçok bilim dalının ve toplumun birinci derecede ilgilendi i maddelere geni bir eilde uygulanabilirli i yer almaktadır.

Bu alı mada ülkemizde meyve suyuna en çok i lenen meyveler arasında elma suyuna, termosonikasyon uygulamasının etkisi incelenmi tir. Bu amaçla çalı mada Red Chief elma e idi kullanılmı tır. Bu alı mada meyve sularında enzimatik esmerle meye neden olan PPO ve POD enzimleri üzerine termosonikasyon uygulamasının etkisi ara tırılmı tır. Bununla birlikte termosonikasyon i leminin gıda kalitesine etkisinin belirlendi i çalı malar literatürde gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Fenolik bile ikler gibi biyoaktif bile enlere termosonikasyon i leminin etkisini belirlemek için toplam fenolik madde içeri i ve antioksidan aktivite de eri belirlenmi tir. Ayrıca bu çalı mada termosonikasyon uygulamasının fenolik bile ik içeri ine etkisi FTIR spektroskopisi ve HPLC kullanılarak belirlenmi tir.



BÖLÜM II

KAYNAK ARA TIRMASI

2.1 Elma

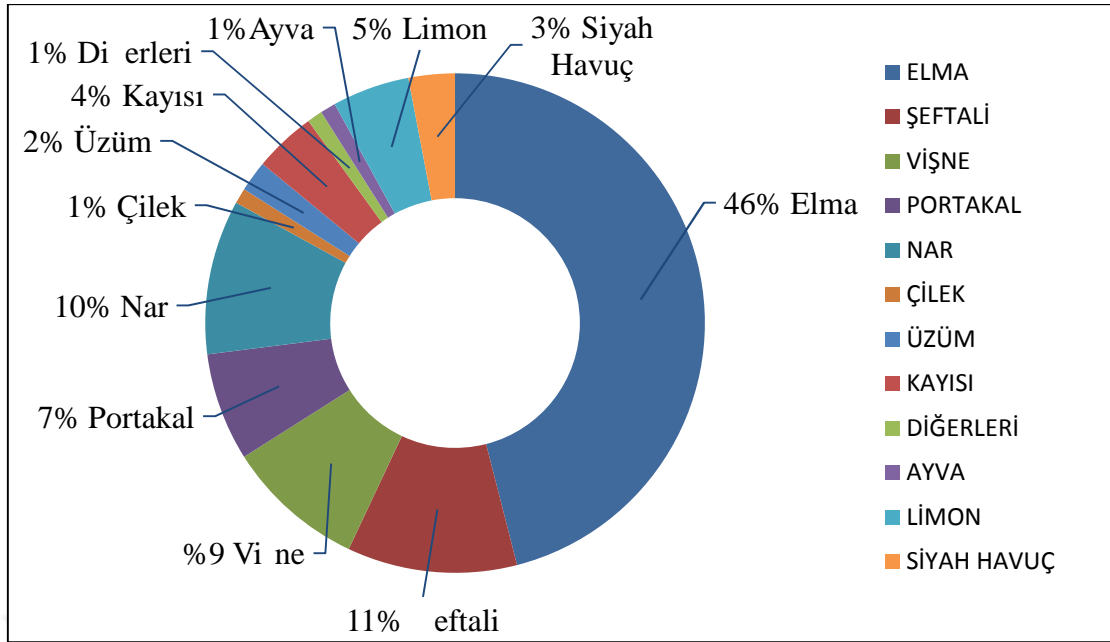
Red chief çe idi elma, meyveleri iri, tat, renk ve lezzet bakımından cezbedici olan, besin içeri i özellikle yapısındaki A ve C vitaminleri, karotenoidler ve fenolik maddeler açısından di er cinslere göre ön plana çıkmakan bir çe ittir. Elma vitaminlerden; A, B₁, B₂, E ve C, mineral madde olarak potasyum, sodyum, kalsiyum, magnezyum, silisyum ve organik asitlerden baskın olan malik asit içermektedir. Meyvelerin aroma ve lezzeti yapısındaki eker ve asitlerden kaynaklanmaktadır. Elma içeri indeki toplam asit miktarı %0,20-1,70 arasındadır. Toplam eker miktarı ise %7-12 arasında de i mektedir (Erdo an vd., 2011). Elma ve elma suyunda bulunan ba lıca fenolik bile ikler; klorojenik asit, epikate in, floridzin, prosiyanidin, kate in ve floretinksiloglukozittir (Karadeniz,1994). Birçok hastalı a kar ı koruyucu etkisi bulunan elma, yüksek oranda gıda lifi içerdinden dolayı (%1,9) kalorisi dü üktür ve tokluk hissi vermektedir (Demirta , 2018).

Elmanın ana vatanı Anadolu, Kafkasya ve Türkistan'dır (Anonim, 2016). Türkiye sahip oldu u üretim alanı ve ekolojik yapısıyla taze meyve üretimini 2009 yılı itibarıyla 16,3 milyon tona yükseltmi ve bu miktarın %27'sini yumu ak çekirdekli meyveler olu turmaktadır. Çok sayıda elma çe idi bulunurken ticari olarak önemli miktarda üretimi yapılan 20 çe it vardır. Bunların 5 çe idi "Red Delicious, Golden Delicious, McIntosh, Rome Beauty ve Granny Smith" olarak önemli bir yere sahiptir. Türkiye, yıllık 3.032.164 tonluk elma üretimi ile Çin ve Amerika'dan sonra Dünya'da 3. sırada yer almaktadır (FAO, 2017). Elmanın yazlık, kılık ve güzlük çe itleri bulunmaktadır. Özellikle kılık çe itlerin iyi muhafaza ko ulları altında uzun süre dayanabilmesi, nakliyyeye elveri lili i, taze tüketim yanında kurutularak ya da meyve suyu, komposto, marmelat ve sirke ekinde de erlendirilebilmesi önemini daha da artırmaktadır (Anonim, 2016). Ürün bazında üretim ülkemizde meyve suyuna i lenen ba lıca meyveler; elma, kayısı, eftali, vi ne, portakal, üzüm ve nardır (Anonim, 2011). Türkiye'de meyve suyuna i lenen meyvelerin üretimi Çizelge 2.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. Türkiye’de meyve suyuna i lenen meyvelerin üretimi (Anonim, 2011)

MEYVE	2005	2006	2007	2008	2009	2010
	Üretim (ton)					
Elma	2,57	2,002	2,458	2,505	2,782	2,6
Kayısı	894	483	590	751	695	476
eftali	510	553	539	552	547	539
Vi ne	140	122	180	185	192	195
Portakal	1,445	1,536	1,441	1,427	1,69	1,71
Domates	10,05	9,855	9,937	10,985	10,746	10,052
Armut	360	318	356	356	384	380
Sarı Havuç	370	371	544	549	566	487
Mandalina	715	791	744	756	846	859
TOPLAM	16,541	16,031	16,789	18,066	17,827	16,119

yi bir elma suyu, uygun dönemde hasat edilmi , aroma açısından zengin ve asit- eker dengesi yeterli olan elmalardan elde edilir. Meyve suyu üretiminde kullanılacak elmaların hasat zamanı önem ta ır. Sofra olgunlu undan bir önceki dönemde hasat edilen elmalarda yapı küçük, kabu un ete oranı daha fazla ve aroma lezzet açısından zengindir (Erdo an vd., 2011). Ülkemizde meyve suyuna i lenen meyveler arasında elma %46’lık pay ile ilk sıradadır (Anonim, 2011). 2010 yılında meyve suyuna i lenen meyve miktar da ılımı ekil 2.1’de gösterilmektedir.



ekil 2.1. 2010 yılında meyve suyuna i lenen meyve miktar da ılımı (Anonim, 2011)

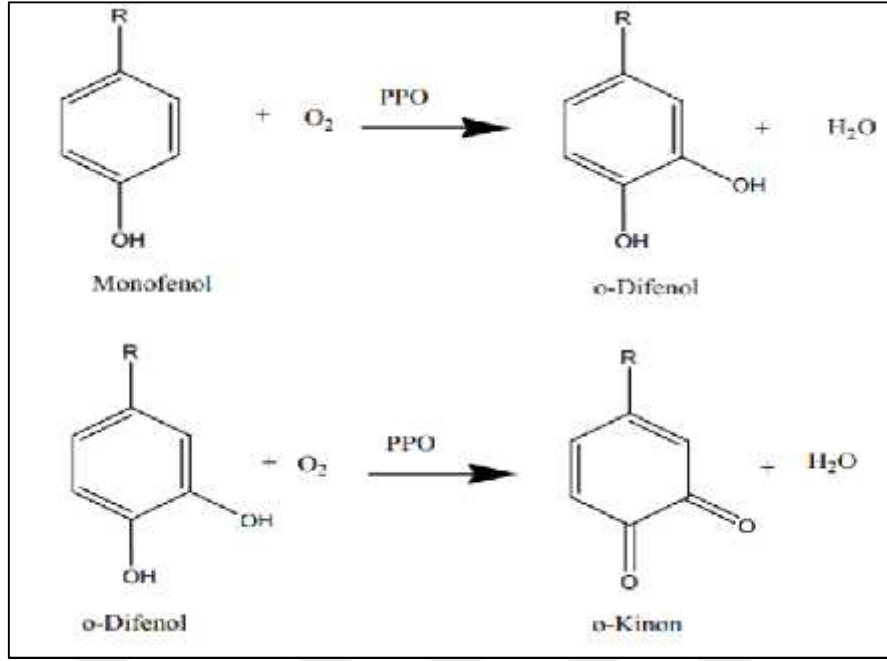
2.2 Enzim

Protein yapısındaki enzimler, birçok biyokimyasal olayda görev alan biyolojik katalizörlerdir. Gıdalarda minör bile en olarak bulunan, canlılar açısından hayati öneme sahip olan enzimler, etki ettikleri substratla bir arada bulunmayıp ayrı ayrı bölgelerde yo unla mı tır. Örnek olarak PPO enzimi sitoplazmada ve substratları olan fenolik maddeler vakuoller içinde bulunmaktadır (Yemenicio lu ve Cemero lu, 1998a). Enzimler, genel olarak iki grupta incelenebilir; gıdalarda istenen de i iklikleri yapan ve istenmeyen kalite de i ikliklerine neden olanlardır (Damodaran vd., 2008). Enzimler hasat sonrasında da aktivitesini koruyabilir. Gıdaların i leme ve depolanmalarında olumsuz de i imlere neden olmaktadır. Birçok enzim sayılabilece i gibi kalitede renk de i imine katılan meyveler için önemli olan iki enzim; Polifenol oksidaz ve Peroksidazdır. Bu enzimler i leme ve muhafazada renk de i imine neden olarak ürünün raf ömründe kılmasına neden olmaktadır. Bu nedenle gıdaların i lenmesi sırasında belirli bir a amada enzim inaktivasyonunu sa layan bir ara i lem uygulanmalıdır. Enzim inaktivasyonunda en yaygın yöntem ısıtma i lemidir. lemin uygulaması kontrollü bir ekilde yapılmalıdır. Aksi takdirde istenmeyen renk, tat ve dokudaki tekstürel de i imlere neden olurken enzimin aktivasyonunu da sa layabilir (Yemenicio lu ve Cemero lu, 1998a).

2.2.1 Polifenol oksidaz enzimi

Meyve ve sebzelerin doğal olarak yapısında bulunan, işleme teknolojisi açısından en önemli enzim Polifenol oksidaz enzimidir. Bu enzim, dokuların parçalama, doğrama, ezme ve başka herhangi bir mekanik etki ile zedelenen kısımlarında oluşan esmerleme reaksiyonunun sebebidir (Terefe vd., 2014). PPO enzimi, Uluslararası Biyokimya Birliğinin sınıflandırılmasında monofenol monooksijenaz (EC 1.10.3.1) ve katekol oksidaz (EC 1.10.3.1) olarak yer almaktadır. Sulu meyve ve sebze dokularında PPO enziminin bir kısmı sitoplazmada serbest halde bulunurken, büyük bir kısmı hücrenin tilakoid ve kloroplast gibi unsurlarında, membrana bağlı olarak bulunmakta ve bunların substratları olan fenolik bileşikler de vakuoller içerisinde bulunmaktadır (Yemenicioğlu ve Cemeroğlu, 1998b). Esmerleme reaksiyonları özellikle elma, armut, kayısı, eftali, muz, patates ve mantar gibi çeşitli ürünler için önemli olmakta ve ürün kayıpları ortaya çıkmaktadır. Ancak, limon ve turuncgillerde, yapısındaki sitrik asit nedeniyle oksitlenme renksiz olur, kahverengiye döner (Önez, 2006).

PPO enziminin substratları fenolik bileşiklerdir, renk değişimini fenolik bileşiklerin kahverengi pigmentleri üreten kinonlara oksidasyonunu katalizleyerek gerçekleştirir. (Yılmaz ve Elmacı, 2018). Bir monofenol olan p-kresolü, difenol 4-metil katekol okside ederlerken, bir o-difenol olan katekol ise o-benzokinone parçalarlar. Bakır içeren bir enzim olan PPO iki farklı reaksiyon katalizler: monofenollerin o-difenollere hidroksilasyonu (monofenolaz) ve o-difenollerin o-kinonlara dehidrojenasyonu (difenolaz) dur. Her iki reaksiyonda da oksijen yardımcı substrat olarak kullanılır. Oluşan o-kinonlar daha sonra enzimatik olmayan reaksiyonlar sonucu kahverengi-siyah renkteki melanin pigmentlerine döner (Demirtaş, 2018). PPO enziminin katalizlediği reaksiyonlar Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



ekil 2.2 PPO enziminin katalizledi i reaksiyonlar (Demirta , 2018)

PPO enzim aktivitesinin meyvenin de i ik b l u m l e r i n d e f a r k l ı o l d u u b i l i n m e k l e b i r l i k t e m e y v e n i n k a b u k k ı s ı m ı n d a y u k s e k a k t i v i t e g o r u l u r . P P O , m e y v e d e k i b u t u n f e n o l i k b i l e i k l e r e e t k i e t m e z , s u b s t r a t s p e s i f i k l i i v a r d ı r v e e l d e e d i l d i i k a y n a a g o r e d e i k e n l i k g o s t e r i r (O n e z , 2 0 0 6) . S a l ı k l ı m e y v e v e s e b z e l e r i n d o k u l a r ı n d a P P O v e s u b s t r a t l a r ı o l a n f e n o l i k b i l e i k l e r i n t e m a s ı s o z k o n u s u d e i l d i r . M e y v e v e s e b z e l e r i n h a s a t e d i l m e s i s ı r a s ı n d a d ı e t k e n o l a r a k a l d ı i f i z i k s e l h a s a r , t a i m a , z e d e l e n m e v e u y g u l a n a n c e i t l i i l e m l e r s o n u c u n d a d o k u b u t u n l u u b o z u l m a k t a d ı r . B o y l e c e e n z i m l e r s u b s t r a t l a r ı o l a n f e n o l i k b i l e i k l e r l e v e o k s i j e n l e b i r a r a y a g e l e r e k e n z i m a t i k e s m e r l e m e y e n e d e n o l m a k t a d ı r (C e m e r o l u v d . , 2 0 0 1) . F e n o l i k b i l e e n l e r i c e r e n u r u n l e r d e , e n z i m a t i k e s m e r l e m e s o n u c u n d a g o r u n u o l u m s u z e t k i l e n i p i s t e n m e y e n r e n k , k o k u v e t a t o l u m a k t a v e u r u n l e r i n b e s l e y i c i d e e r i n d e o n e m l i o l c u d e k a y ı l l a r a n e d e n o l m a k t a d ı r . B u d u r u m u r u n l e r i n t u k e t i c i t a r a f ı n d a n k a b u l e d i l i r l i i n i o l u m s u z e t k i l e m e k t e v e e k o n o m i k k a y ı p l a r o r t a y a c ı k ı m a k t a d ı r (Y ı l m a z v e E l m a c ı , 2 0 1 8) .

Isıl i l e m u y g u l a y a r a k b a z ı m e y v e , m e y v e s u l a r ı v e s e b z e l e r d e P P O e n z i m i n i i n a k t i v e e t m e k y a y g ı n u y g u l a m a l a r d a n b i r i d i r . G e n e l o l a r a k , P P O y u k s e k s ı c a k l ı k l a r a k a r ı d a y a n ı k l ı d e i l d i r . S ı c a k l ı k a r a l ı i 7 0 - 9 0 ° C d e u y g u l a n a n ı s ı l i l e m e n z i m i n k a t a l i t i k a k t i v i t e s i n i y o k e d e r y a d a k ı s ı m e n i n a k t i v e e d e r (D e m i r t a , 2 0 1 8) . B u s u r e c t e i n a k t i v a s y o n i c i n g e r e k l i o l a n z a m a n u r u n y a p ı s ı n a b a l ı d ı r .

2.2.2 Peroksidaz enzimi

Peroksidaz enzimi, yüksek yapılı bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalarda bulunmaktadır. Oksidoredüktazlar grubunda yer alan Peroksidazlar (EC 1.11.1.7), oksitleyici (oksidant) olarak hidrojen peroksit veya organik hidrojen peroksitleri kullanırlar (nal, 2013). Bitkiler âleminde çok yaygın olup, geli melerinde önemli rollere sahiptirler. Sebzelerin POD aktivitesi, meyvelere göre daha fazladır. Bitkisel dokularda kısmen sitoplazmada çözünmü formda, kısmen de hücre duvarına ba lı olarak çözünmeyen formda bulunan POD enzimi, hidroksilasyon veya oksidasyon ile peroksidasyon reaksiyonlarının katalizini gerçekle tirmektedir (Cemero lu vd., 2001). POD, spesifik aktivite, optimum pH, kofaktörler, substrat ilgisi ve inhibitörlere hassasiyet gibi biyokimyasal özellikleri bakımından farklılık gösterir (nal, 2013). POD enzimleri a a ıda belirtilen genel denklemden oluştu u ekilde reaksiyonları katalize ederler;



Bu peroksidatik reaksiyonda;

R: H⁺, CH₃, C₂H₅

AH₂: indirgenmi formda hidrojen donörü

A: Oksitlenmi formda hidrojen donörünü ifade etmektedir.

Yukarıda verilen bilgiye göre; POD enzimleri bir hidrojen donörü e li inde, peroksitleri parçalayan reaksiyonu katalize ederler. Bu durumda temel substratı peroksitlerdir ve bunların ba ında hidrojen peroksit gelir. Yukarıda bahsedildi i gibi, metil veya etil hidrojen peroksit gibi organik peroksitler de substrat olarak kullanılmaktadır. Donör substratlar arasında bulunan bazı maddeler bu enzim e li inde belirli amaçlarla kullanılabilir. POD, hidrojen peroksit varlı ında fenolik bile iklerin oksidasyonunu katalizleyerek kahverengi bozunma ürünlerinin oluşumuna öncülük eder (Cemero lu vd., 2001).

POD enzimi yukarıda belirtilen ve ba lıca aktivitesi olan “peroksisatif etki” yanında birtakım yan aktivitelere de sahiptir. Bunlardan en önemlisi hiç ku kusuz H₂O₂ olmadan

da yürüyebilen “oksidatif etki” dir. Ancak bu defa O_2 ve Mn^{+2} veya fenol gibi birtakım kofaktörlere ihtiyaç vardır. POD enzimi, H donörü bulunmayan ortamlarda bir anlamda katalaz enzimi gibi davranarak hidrojen peroksite su ve oksijene parçalanması reaksiyonunu da katalize edebilmektedir. Bu etki ekli ise “katalitik etki” olarak adlandırılmaktadır. Bu enzimin bir di er ve sonuncu aktivitesi ise “hidroksilatif etki” eklidir. Bu etki yoluyla; O_2 veya monofenolik bile iklerden aynen PPO enzimlerinin yaptı ı gibi difenolik bile ikler olu turulmaktadır. Ancak farklı olarak POD enzimi hidroksilasyon yetene ini gösterebilmek için bir hidrojen donörüne ihtiyaç duymaktadır (Cemero lu vd., 2001).

POD ısıya en dirençli enzim oldu undan, ısıl i lem sonucunda e er inaktivasyon sa lanmı sa di er etkin enzimlerin hepsinin inaktive oldu u dü ünülür. Bu açıdan sebzelerin ha lanmasında POD enziminin inaktivasyonu bir kriterdir (Cemero lu vd., 2001). Isıya en dirençli enzim olmasının yanında enzimin kökenine, bulundu u meyve ve sebze ye göre direnci de i iklik gösterebilir. Örne in, patates POD’ ı $95^{\circ}C$ ’ de 10 dakikada tamamen inaktive oldu u halde, lahana kökenli olanlar $120^{\circ}C$ ’ de 10 dakika sonunda ba langıç aktivitesinin %0,3’ ünü koruyabilmektedir (Bahçeci, 2003).

2.3 Termosonikasyon Uygulamasının Elma PPO ve POD Enzimlerine Etkisi

Meyve ve sebze ürünleri, i leme ve depolama sırasında sorun yaratan mikroorganizmaları ve kaliteyi olumsuz etkileyen çe itli enzimleri inaktive etmek için bazı uygulamalara maruz bırakılmaktadır. Hama, pastörizasyon veya sterilizasyon gibi ısıl i lemler, enzimleri inaktive etmek için kullanılan yaygın yöntemlerdendir. Gıdaların i lenmesinde tat, koku, renk gibi genel kalite özellikleri ile besinsel de erine daha az etki sa layacak, alternatif pastörizasyon ve sterilizasyon yöntemleri üzerinde ARGE çalı maları yapılarak gıda muhafaza yöntemlerine yenileri eklenmektedir (Demirta , 2018).

Enerjiyi ve zamanı daha verimli kullanan, çevreye duyarlı alternatif teknolojilerden bazıları yüksek hidrostatik basınç, vurgulu elektrik alan, ultraviyole ı ık, ı nılama ve ultrason teknolojileridir.

Gıdalarda özellikle mikroorganizma ve enzimlerin inaktif hale getirilmesi amacıyla yüksek güçlü ultrason dalgaları yalnız olarak veya di er muhafaza yöntemleri ile birlikte kullanılmaktadır (Demirta , 2018). Bu bakımdan üç farklı yöntem bulunmaktadır.

Termosonikasyon (TS): Ultrasonun etkisini artırabilmek için yüksek sıcaklık ve ultrasonun birlikte uygulandı ı kombinasyonlara denilmektedir (Demirta , 2018).

Manosonikasyon (MS): Basınç uygulaması (600 kPa'a kadar) ve ultrason tekniklerinin bir arada kullanıldı ı yöntemdir (Demirdöven ve Baysal, 2008).

Manotermosonikasyon (MTS): Basınç, sıcaklık ve ultrason uygulamalarının kombinasyonu olarak ifade edilmekte, daha etkin enzim ve mikroorganizma inaktivasyonu sa lamaktadır (Demirdöven ve Baysal, 2008).

Genel anlamda ultrason, ses dalgalarının saniyede 20.000 veya daha fazla titre imler sonucunda olu an enerjii ifade eder. Fiziksel bir muhafaza metodu olarak ultrason üzerine yapılan ara tırmalar, bu teknolojinin çe itli gıdaların (meyve ve sebzeler, meyve suları, vb.) pastörizasyonu için geçerli bir alternatif olarak oldukça ümit verici oldu unu göstermektedir. Gıda i leme teknolojisinde, 20 kHz ile 10 MHz frekans aralı ndaki ultrason ekipmanları kullanılmakta ve ultrason kullanım açısından genelde dü ük enerjili uygulama (1 W/cm², 100 kHz) ve yüksek enerjili (Power ultrason) uygulama (10-1000 W/cm², 20-100 kHz) olarak ikiye ayrılmaktadır. Dü ük enerjili ultrasonik uygulama gıdaların fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde kullanılırken yüksek enerjili ultrasonik uygulama ise gıdalarda mikrobiyel ve enzimatik inaktivasyon amaçlı kullanılır (Wang vd., 2013). Ultrason teknolojisi sıvı sistemlerde daha etkili olup bu etki ba lıca kavitasyon olgusuna ba lıdır. Sıvı içerisine gönderilen ses dalgaları, içinde bulunan moleküllerin titre mesi ve bu titre imi kom u moleküle aktararak devam ettirmesi ile meydana gelir. Bu enerjinin aktarımı ile ortamdaki moleküllerde sıkı ma ve gev emeler olmaktadır. Moleküllerin birbirine uzakla ma anından yakla ma evresine geçerken devam eden osilasyon sonucu olu an kabarcıklar birbirine yakla an moleküller arasında ani olarak patlar. Bu patlama ile kabarcı ın etrafında çok kısa bir an içinde 550°C' ye kadar bir sıcaklık ve 50 MPa bir basınç olu ur. Kavitasyon tarafından salınan enerji miktarı kabarcıkların, kabarcık büyüme kineti i ve çökü ü üzerindeki etkisine

ba lıdır. Bu enerji sıvının buhar basıncı ile kabarcıkların ara yüzeyindeki yüzey gerilimi ile birlikte artabilir. Özellikle sulu gıdalar yüksek yüzey gerilimine sahipse kavitasyon için ortamın etkisi çok daha fazladır (Yüksel, 2013).

Ultrasonun enzimleri üç farklı mekanizma ile etkisizle tirdi i bilinmektedir; enzimin kavitasyondan kaynaklanan yüksek sıcaklık ile inaktive olması, sonik dalgaların oku ile açığı a çıkan mekanik güç ve suyun sonolize olması ile serbest radikallerin açığı a çıkması ile ifade edilebilir. Ultrason uygulaması sırasında suyun ayrı ması sonucunda H^+ ve OH^- radikalleri olmaktadır. Meydana gelen serbest radikaller, enzimin yapısal stabilizasyonunda veya katalitik fonksiyonlarında rol alan amino asitlerle reaksiyona girebilmekte ve enzim denatürasyonuna neden olmaktadır. Denatürasyon sonucu enzimlerin ikincil yapısı zarar görmektedir (Yüksel, 2013).

Literatürde, son yıllarda gıdaların i lenmesi sırasında enzim inaktivasyonunu sa lamak için ultrason kullanımı ile ilgili çalı maların sayısında artışı gözlenmektedir (Cheng vd., 2007; Cheng vd., 2013; Ba lar ve Ertugay, 2013; Abid vd., 2014; Dias vd., 2015; Baltacıo lu vd., 2017). Ancak, yapılan çalı malarda bulunan sonuçlar ultrason prosesinin ısı ve/veya basınç ile kombinasyonunun, tek ba ına ısı ve tek ba ına ultrason uygulamasına göre enzimlerin inaktivasyonunda daha etkili oldu unu göstermiştir. Isı ve/veya basınç ile birlikte kullanılan ultrasonun lipoksigenaz, pektinmetilesteraz, POD ve PPO gibi çe itli gıda kalitesi ile ili kili enzimlere kar ı etkili oldu u bildirilmiştir (O'Donnell vd., 2010).

Silva vd. (2015) yaptı ı çalı mada, elma küplerinde ve elma suyunda ultrasonik uygulama ile POD ve PPO inaktivasyonunu de erlendirmi , elma küpleri ve elma suyu 55- 3300 W/L arasında de i en güç yo unlukları ile ultrasonik i leme tabi tutulmu tur.

Tem 23°C (ortam sıcaklığı) ila 60°C arasında de i en sıcaklıklarda yapılmı ve i lem süreleri genellikle uygulanan ana çalı ma ko ullarına ba lı olarak 5 ila 20 dakika olacak şekilde ultrasonik güç uygulanmıştır. Elma suyunda, elma küplerinden daha yüksek bir enzim inaktivasyonu elde edildi i rapor edilmiştir. Elma suyundaki PPO ve POD aktivitesi ultrasonik güç yo unlu undaki artışa ba lı olarak azalmıştır. En yüksek güç yo unlu unda (3300 W/L) PPO için maksimum düzeyde (%57'lik) bir azalma görülürken POD enzim aktivitesinde maksimum kayıp %15 olarak saptanmıştır. Düşük sıcaklıklarda uygulanan ultrason uygulamasının elma suyunda POD ve PPO enzim

aktivitesini azaltmakta tek başına ultrason kullanımına göre daha etkili olduğu bildirilmiştir.

Benzer şekilde Sulaiman vd. (2015), elma (Royal Gana) püresinde ısıl işlemle kıyasla daha düşük sıcaklıkta PPO enzimini inaktive etmişlerdir. Bu çalışmada PPO enziminin termosonikasyon koşulları (0,6-1,3 W/g, 27-73 °C ve 10 dak) ve termal inaktivasyon (50-85 °C ve <30 dak) kinetiği belirlenmiş ve karşılaştırılmıştır. 10 dakikalık bir ultrason işleminin ardından PPO aktivitesinde önemli bir azalma görülmüştür. Isıl işlem (75 °C) kıyasla, termosonikasyon işlemi (72 °C) ile daha fazla enzim inaktivasyonu gözlemlenmiştir. Ayrıca elde edilen sonuçlara göre 32 °C'deki ultrasonun, PPO aktivitesinin azaltılmasında etkili olduğu görülmüştür. Buna göre ultrasonikasyonun çok düşük sıcaklıklarda işlem yapılmasına olanak sağladığı ve orijinal meyve kalitesinin daha iyi korunmasına neden olduğu rapor edilmiştir.

Tek başına ultrason ve sıcaklık kombinasyonu ile birlikte uygulanan ultrasonun, PPO enziminin etkisiz hale getirilmesi için yapılan bir çalışmada, elma suyunda PPO enzim aktivitesinde %90 azalma için tek başına ultrason uygulaması 45 dakika uygulanırken, ısıl işlem ile birlikte 6 dakikalık ultrason uygulaması yeterli olmuştur (Bot vd., 2018).

Farklı elma çeşitlerindeki enzimlerin stabiliteleri farklılık göstermektedir. Bunun nedeni farklı izoenzimlerin bulunmasıdır. Bu çalışmada (Golden delicious) elma suyuna düşük sıcaklıklardaki (40, 50 ve 60 °C) ultrason uygulaması ile ısıl işlemle kıyasla daha fazla PPO enzim inaktivasyonu sağlanmış ve çalışmada sonunda 60 °C'nin üzerindeki sıcaklıklardaki ultrason uygulama, ısıya dayanıklı POD enziminin duyarlılığını arttırmıştır. 60 °C'de uygulanan ultrason ile POD enziminde %40 inaktivasyon sağlanmıştır (Balar ve Ertugay, 2013).

Yapılan bir diğer çalışmada taze elma suyunda ultrasonik banyo (25 kHz, 30 dak, 0,06 W/cm³) ve prob tipi ultrason (20 kHz, 5 ve 10 dak, 0,30 W/cm³) kullanılarak 20, 40 ve 60 °C sıcaklıkta, PPO ve POD enzimleri inaktive edilmiştir. Termosonikasyon uygulaması ile elma suyu PPO ve POD enzimlerinin 60°C sıcaklıkta ve 10 dakika sonunda en yüksek enzim inaktivasyonu sırasıyla %93 ve %85 oranında olduğu belirlenmiştir (Abid vd., 2014).

Benzer ekilde bulanık elma suyunda dü ük sıcaklıklarda (42-67 °C) uygulanan ultrason uygulamasının PPO inaktivasyonunda etkili oldu u bildirilmi tir. PPO için, en yüksek sıcaklıkta (67 °C), 1,15 W/mL güç yo unlu unda çalı rken neredeyse tamamen inaktivasyon (%3 ± 1) elde edilmi tir. Dü ük güç yo unlu u de erlerinde, belli bir inaktivasyona ula mak için daha yüksek sıcaklıklarda çalı mak gerekti i rapor edilmi tir (Illera vd., 2018).

Cruz vd. (2006), yaptı ı çalı mada ısı ve ısı / ultrason (termosonikasyon) i leminin (40–92,5 °C), su teresinde (*Nasturtium officinale*) POD enzimi inaktivasyon kineti ine etkisini incelenmi tir. Daha dü ük sıcaklıklarda uygulama ile kaliteyi arttırmak için termosonikasyon i lemi uygulanmı tir. Su teresinde POD enzim için termosonikasyon uygulaması ile 85 °C' nin üstündeki sıcaklıklarda daha yüksek inaktivasyon sa lanmı tir. Böylece çalı mada, termosonikasyon uygulaması geleneksel ısıl i leme kıyasla daha iyi bir alternatif yöntem olarak rapor edilmi tir.

2.4 Fenolik Madde

Fenolik bile ikler, bitkilerin ikincil metabolizma ürünleri olarak tanımlanan, bitkide en yaygın bulunan maddeler grubudur. Fenolik bile ikler bitkilerin meyve ve sebzelerde, tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövdelerinde bulunabilirler (Nizamli lu ve Nas, 2010). Fenolik bile ikler, bitkilerin geli imleri sırasında oldu u gibi; yaralanması, enfekte olması ve UV ı ı a maruz kalması gibi durumlarda sentezlenebilmektedir (Naczki ve Shahidi, 2004). Fenolik bile iklere, beslenme fizyolojisi açısından olumlu etkileri nedeniyle "biyoflavonoid" adı da verilmektedir. Antioksidan özellik gösteren fenolik bile enlerin sa lık üzerindeki olumlu etkileri, kanser ve koroner kalp hastalıklarını önleyici etkileri ile önem kazanırken; tüketiciler tarafından yo un ilgi görmekte ve fonksiyonel gıdalara olan talebi artırmaktadır (Yılmaz, 2012). Fenolik bile ikler (polifenoller), benzen halkası içeren maddelerdir. Polifenoller serbest radikalleri temizleyerek ve oksidatif stresi azaltarak çok sayıda hastalı ın olu umunu engellemektedir (Cavuldak vd., 2015). En basit fenolik bile ik, bir tane hidroksil grubu içeren benzen yani fenoldür. Di er tüm fenolik maddeler benzen (fenol)den türemi tir (Cemero lu vd., 2001). Fenolik bile ikler genel olarak fenolik asitler (fenolik karbonik asitler) ve flavonoidlerden (flavan türevleri) olu maktadır (Karadeniz ve Ek i, 2001).

Genel olarak gıdalardaki fenolik maddelerin sınıflandırılması Çizelge 2.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Fenolik maddelerin sınıflandırılması (Karadeniz ve Ek i, 2001)

1. Fenolik Asitler					
1.1.Hidroksisinnamik asitler					
o-Kumarik asit	p-Kumarik asit	Kafeik asit	Ferulik asit		
izoferulik asit		Sinapik asit			
1.2. Hidroksibenzoik asitler					
Salisilik asit	m-hidroksibenzoik asit	Vanillik asit	Protokate eik asit		
Gentisik asit	p-hidroksibenzoik asit	zovanillik asit	-Rezorsilik asit		
Gallik asit	o- hidrobenzoik asit	Sirinjik asit	-Rezorsilik asit		
1.3. Hidrosisinnamik asit					
Klorojenik asit	Neoklorojenik asit	p- Kumaroilkuinik asit	Kaftarik asit		
Kutarik asit	Kriptoklorojenik asit	zoklorojenik asit			
2. Flavonoidler					
2.1. Antosiyanidinler					
Pelergoidin	Siyenidin	Petunidin	Delfinidin	Malvidin	Peonidin
2.2. Kate inler					
(+)-Kate in	(-)-Epikate in		(+)-Gellokate in	(-)-Epigallokate in	
2.3. Lökoantosiyanidinler					
Lökoantosiyanidin			Lökoantodelfrinidin		
2.4. Flavonoller					
Kempferol	Kuersetin	Mirisetin	zoramnetin		
2.5. Flavonlar					
Apigenin			Luteolin		
2.6. Flavononlar					
Narincenin	Hesperitin	Eriyodiktol	zosekuranetin		
2.7.Prosiyanidinler					
Prosiyanidin dimerB1-B4			P. Oligomer	P.polimer	
2.8. Dihidrokalonlar					
Floridzin			Floretin		

Flavonoidler (flavan türevleri) gıdaların renginden sorumludur. Bu grup içerisindeki antosiyaninler doğal renk maddeleri olup sebzeler, meyveler, meyve suları ve arapların renklerinden sorumludurlar (Karadeniz ve Ek i, 2001).

Fenolik bileşikler pek çok gıdanın tat ve aroması üzerine etkili özellikle acılık ve burukluğun kaynağıdır (Nizamliolu ve Nas, 2010). Polifenoller kolayca okside olabileme özelliği nedeniyle antioksidan aktiviteye sahiptirler. Gıdalardaki antioksidanlar, oksidasyondan kaynaklanan acılamayı ve diğer tat bozulmalarını geciktirme veya önleme özelliğine sahip olan maddelerdir. Meyve atıkları içerisinde elma posası polifenoller, turunçgil posaları flavanoid ve fenolik asit, üzüm çekirdeği ve kabuğu ise zengin antosiyanin ve diğer fenolik madde içerikleri nedeniyle çok önemli antioksidan kaynağıdır (Zoral ve Turgay, 2014). Elma ve elma suları antioksidan özellikte fenolik asitler bakımından zengindir (Demirtaş, 2018). Elma içeriğinde katekin, epikatekin, floridzin, kuersetin, siyanidin, siyanidin-3-O-galaktozit, klorojenik asit ve hidroksi sinamat gibi çeşitli fenolik bileşenlere sahiptir. Bu bileşenler serbest radikallerin faaliyetlerini durdurarak veya etkisini yavaşlatarak kalp-damar, diyabet ve bağırsık sistemi hastalıklarından korunmada önemli rol oynamaktadırlar (Vrhovsek, 2014). Fenolik bileşiklerle ilgili üzerinde araştırma yapılan gıdalardan birisi elma suyudur. Bunun nedeni meyvedeki fenolik madde miktarının ve elma suyu işleme prosesinde diğer melerin, özellikle renkte oluşan diğer melerin ve tortu oluşumunun elma suyu kalitesine direkt olarak etki etmesidir (Karadeniz,1994).

2.5 Fourier Dönüüm Kızıl Ötesi Spektroskopisi

Yeni bir teknik olarak Fourier Dönüüm Kızıl Ötesi spektroskopisi fenolik bileşikler gibi çeşitli biyoaktif bileşenlerin belirlenmesinde son yıllarda tercih edilmektedir. Hızlı, ekonomik, güvenilir ve kolay bir teknoloji olması dolayısıyla FTIR spektroskopisi yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknik bir titreşim spektroskopisi tekniğidir. Her molekül döndükleri ve titreşimleri frekanslara bağlı olarak özel ayrık enerji seviyelerine sahiptir ve bu prensibe dayanarak belirlenmektedir.

Fourier Dönüüm Kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi, 2.500 nm ile 25.000 nm arasındaki dalga boyları tarafından tanımlanan do al olarak olu an elektromanyetik spektrumdan faydalanan spektroskopik bir tekniktir (Freifelder, 1982). Kızılötesi radyasyon üç farklı bölge; yakın kızılötesi (NIR/ Kısa dalga, 4000~14000 1/cm), orta kızıl ötesi (MIR/ orta dalga, 400~4000 1/cm) ve uzak kızılötesi (FIR/uzun dalga, 4~400 1/cm) olarak gruplanmaktadır. Genelde gıda analizlerinde kullanılan bölge orta kızılötesi bölgedir (Kılıç ve Karahan, 2010).

FTIR analizini kullanmanın genel avantajları, gıda ve tarımsal üretim süreçlerinde daha iyi karar verebilmek için hızlı analiz verileri sa lamasıdır. Geleneksel analiz yöntemleriyle kar ıla tırıldı nda, çok az veya hiç numune hazırlı ı gerektirmez ve kimyasal madde veya sarf malzemesi gerekmez. Tahribatsız, kullanıcı dostu, hızlı, güvenilir ve kusursuzdur. FTIR spektroskopisi, ölçülecek dalga boylarının tam spektrumunu içeren geni bantlı bir ık kayna ından gelen ık, interferometre adı verilen bir cihazdan geçirilir. nterferometre, verileri daha sonra i lemek için özel bir ekilde de i tirir I n, numuneye ba lı bir emilimin gerçekleşti i numuneden geçirilir. I ık algılanır ve bir bilgisayara iletilir. Bilgisayar, emilimin her bir dalga boyunda ne oldu unu ortaya çıkarmak için tüm verileri i ler ve Fourier Dönüüm tekni ini kullanarak verilere kar ılık gelen bir spektrum üretir. Bir FTIR analizörü tarafından üretilen spektrumlar birçok veri noktasına dayandı ndan, analiz edilen numunenin oldukça hassas bir spektral parmak izi sa lanmı olur. Bu anlamda, elde olunan sonuçların do rulu u ve tekrarlanabilirli i geleneksel yöntem ve kimyasal analizlere kıyasla daha iyidir (Mantsch, 2001).

FTIR spektroskopisinin gıda endüstrisinde kullanımı, et, süt, ya , tereya ı, yo unla tırılmı süt ve meyve suları analizleri dahil olmak üzere geli tirilmekte olan çe itli yöntemler ile birlikte yer almaktadır (Büyüksırt ve Kulea an, 2014). Son yıllarda birçok çalı mada FTIR spektroskopisi kullanılarak fenolik bile iklerin belirlenmesi üzerine çalı ılmaktadır (Ricci vd., 2015). FTIR teknikleri melanin pigment yapısında ana fonksiyonel gruplar hakkında bilgi vermi , antosiyaninlerin 1630-1640 1/cm aralı nda pik olu turdu u belirlenmi tir (Büyüksırt ve Kulea an, 2014).

Yapılan bir çalı mada dört so an çe idinin (kırmızı, beyaz, sarı ve tatlı) ve so ancıkların, toplam fenolik madde içeri i ve toplam antioksidan kapasitesi FTIR spektroskopisi kullanılarak belirlenmi tir. Örneklerin toplam fenolik madde ve antioksidan aktivitesini tahmin etmek için en küçük kısmi kareler (Partial Least Square, PLS) yöntemi uygulanmı tir. FTIR spektroskopisiyle ölçülen referans de erleri ile elde edilen tahmini de erler iyi bir korelasyon ($r > 0,95$) göstermi tir. Buna göre, sebzelerin toplam antioksidan kapasitesini tahmin etmek için orta kızılötesi spektroskopinin kullanılmasının, geleneksel kimyasal analizlere alternatif olarak hızlı ve kesin oldu u rapor edilmi tir (Lu vd., 2011).

Tahir vd. (2017) balda fenolik bile ik içeri ini ve antioksidan aktiviteyi belirlemek için FTIR spektroskopisini en küçük kısmi kareler yöntemi (PLS) ile kombine ederek kullanmı lardır. FTIR için belirlenen korelasyon katsayıları 0,9461 ila 0,9988 arasında de i mi tir. Elde edilen sonuçlara göre, FTIR spektroskopisinin, baldaki fenolik bile ikleri ve antioksidan etkinlikleri ölçmek için basit, hızlı ve tahribatsız bir yöntem oldu u bildirilmi tir.

Fenolik bile iklerin kırmızı arapların duysal özellikleri üzerindeki önemi iyi bilinmektedir. Bu açıdan yapısında bulunan fenolik bile iklerin üzüm kabu undan ekstrakte edilebilirli ini kontrol etmek için üzüm zarı (Nogales-Bueno vd., 2017a) ve çekirde inde (Nogales-Bueno vd., 2017b) FTIR spektroskopisi kullanılmı tir. Ayrıca, iç ve üzüm kabu u yüzeyleri arasındaki spektral farklılıklar da incelenmi tir. Buna göre FTIR spektroskopisi fenolik bile iklerin ekstrakte edilebilirli ini belirlemede etkin ekilde kullanılmı tir.

Yapılan ba ka bir çalı mada eftali ve kabakta ultrason ve solvent ekstraksiyonun toplam fenolik bile imine etkisini belirlemek için FTIR spektroskopisi kullanılmı tir. Fenolik bile iklerin balkaba ı ve eftaliden ekstraksiyonunu optimize etmek için ultrason destekli ekstraksiyon (UAE) metodu kullanılmı tir. Ekstraksiyon sıcaklıkları (30, 40 ve 50 °C), ultrasonik güç seviyeleri (%30, 50 ve 70) ve süreleri (10, 20 ve 30 dak) olarak uygulanmı tir. eftali ekstraktlarında toplam fenolik madde için en uygun ko ullar 41,53 °C sıcaklık, %43,99 güç ve 27,86 dakika olarak belirlenmi tir. Bununla birlikte, DPPH için 41,60 °C sıcaklık, %44,88 güç ve 27,49 dakikanın optimum oldu u rapor edilmi tir.

FTIR spektrumları incelendi inde, kimyasal yapılarda ultrasonik i lemeden veya çözücü ekstraksiyonundan kaynaklanan önemli bir de i iklik görülmedi i gözlenmi tir (Altemimi vd., 2016).

Okur vd. (2019), vi ne posasından fenolik bile iklerin ekstraksiyonu için farklı metodlar (geleneksel, ultrason destekli, mikrodalga destekli ve yüksek basınç ekstraksiyon) uygulamı tir. Elde edilen ekstraktların fenolik bile ik içeri i FTIR spektroskopisi kullanılarak belirlenmi tir. FTIR sonuçlarına göre, farklı ekstraksiyon tekniklerinin numunelerde önemli yapısal de i ikliklere neden olmadı ı gözlenmi tir. Spektrum analizi sonucunda 1800- 750 1/cm arasında yer alan bantlar (parmak izi bölgeleri) yaygın olarak bitkilerdeki polifenoller ile ili kilendirilmi tir. 3000–3300 1/cm hatta 2800 1/cm'e kadar uzayan bantların, aromatik halkanın C-H germe titre imlerinden kaynaklandı ı belirtilmi tir. 1730 1/cm civarında bulunan bant, karbonil grubunun germe titre imine ba lanmı ve sadece hidrolize edilebilir tanenler için mevcut olan bant olarak ifade edilmi tir. 1500–1150 1/cm aralı ındaki bantların CH (fenoller) ve OH titre imleri nedeniyle oldu u rapor edilmi tir. 1014 1/cm'de bulunan bant, piran halkasının OH ikamesinin C – O esnemesini ifade etmekte ve özellikle epikate in ile ili kilendirilmektedir.

2.6 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi kısaca HPLC (High Performance Liquid Chromatography) olarak adlandırılır. Analitik ayırma teknikleri arasında tercih edilen HPLC, fenolik bile ikleri belirlemede yaygın olarak kullanılmaktadır. HPLC yöntemi laboratuvarlar, bilimsel çalı malar ve sanayide birçok alanda uygulanmaktadır. Yöntemde, sıvı hareketli fazda bir karı ımdaki bile enler çözünür hale getirilerek yüksek basınç altında kromatografi kolonundan geçmeye zorlanırlar. HPLC tekni i özellikle kantitatif tayinlerde uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozulabilen bile iklerin ayrılmasıyla sonuç vermektedir. HPLC yöntemi ile birçok bile ikleri (pesitisitler, toksinler, ilaçlar, proteinler, amino asitler ve eker bile enleri) nitel ve nicel olarak tespit edilebilmektedir. HPLC düzene i be kısımdan olu maktadır. Bunlar:

Degazör; mobil fazda çözünümlü olarak bulunan hava kabarcıklarının giderilmesini sağlamak için,

Pompa; mobil fazın yüksek basınçla hareketini ve kolona girişini sağlamak için,

Örnekleyici; numunelerin kolon ve detektöre gönderilmesini sağlamak için,

Kolon-kolon fırını; bileşiklerinin ayrılması için,

Detektör; bileşiklerini tanımlamayı sağlar (Karakaplan, 2019).

Fenolik bileşikler kompleks yapıları ve çeşitliliği ile modern analitik teknikleri kullanılarak belirlenmeye gereksinim duymaktadır. Bu nedenle HPLC tekniği ile yeterli kalitede, hassasiyet ve makul bir zamanda fenolik bileşiklerin analizi gerçekleştirilmektedir (Karakaplan, 2019).

Literatürde elmanın fenolik bileşik içeriğinin belirlendiği birçok çalışma bulunmaktadır. Markowski ve Płocharski (2006), araştırmalarında Jonagold, Sampion, Idared ve Topaz elma çeşitleri ve bu çeşitlerin ticari ürünlerinde HPLC yöntemi kullanarak fenolik madde içeriğini belirlemiştir. Taze meyvelerde toplam fenolik madde miktarı ortalama olarak 857 mg/kg yağırlık olarak belirlenirken, en yaygın bulunan grup flavonoller (417 mg/kg), fenolik asitler (229 mg/kg) takip etmiştir. Bulanık meyve sularında fenolik bileşiklerin kaybı sadece %53'ü olarak belirlenirken, berrak meyve sularında çok daha fazla fenolik bileşik kaybı tespit edilmiştir. Çalışma sonunda elma çeşitleri morfoloji açısından önemli farklılıklar gösterse de en yaygın bulunan fenolik bileşik grubu, flavonoller olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte fenolik asitler, dihidrokalkonlar ve kuersetin glikozitlerde bulunmuştur.

Rana ve Bhushan (2016), yaptıkları derleme makalede, taze elmada, yapraklarda, ağaç kabuğunda ve posada bulunan fenolik bileşiklerin potansiyelini değerlendirilmiştir. Ayrıca yapılan derlemede sıvı kromatografisine dayalı geliştirilmiş enstrümantasyon yöntemlerinin (HPLC, UPLC, LC / MS / MS) fenolik bileşiklerin değerlendirilmesini daha hızlı ve güvenilir hale getirdiği rapor edilmiştir. Elma çeşitlerinde bulunan polifenollerin, konsantrasyonları farklı olmasına rağmen hemen hemen aynı olduğu bildirilmiştir. Elmalardaki polifenollerin yapısal sınıfları arasında flavonollerin (kuersetin, kamferol ve rutin), dihidrokalkonların (floretilin ve floridzin), flavan-3-ollerin (epikatekin ve prosiyanidinler) ve fenolik asitlerin (kafeik asit ve kumarik asit) bulunduğu belirtilmiştir.

Kalinowska vd. (2014), yaptı ı çalı mada elmanın yapısındaki fenolik bile ikleri ve onların biyolojik özelliklerini özellikle sa lıkla ilgili yönlerine vurgu yaparak özetlemi ve derlermi tir. Elmanın bireysel fenolik bile iklerinin konsantrasyonunun aynı oranda olmayıp meyvenin çe idine, olgunlu una, yeti tirme ko ullarına ve bulundu u kısımına ba lı oldu u rapor edilmi tir. Yenilebilir meyveler arasında elmanın, nihai emilim için kanda en yüksek miktarda serbest fenoli e neden oldu u sonucuna varılmı tır. Genel olarak, elma kabu u ete göre toplam fenolik bile ikler, toplam prosiyanidinler ve toplam flavonoidler açısından daha zengindir ancak bazı bireysel fenolik bile iklerin elma çe idine ba lı olarak ette kabuktan daha fazla bulundu u belirlenmi tir. Elstar, Fuji, McIntosh, Pinova, Red Delicious gibi elma çe itlerinde ete göre kabukta klorojenik asit daha fazla bulunmu ken, Idared, Golden Delicious, Granny Smith, Reineta gibi çe itlerde ette kabu undan daha fazla klorojenik asit belirlenmi tir. Elma çe itlerinden ba ımsız olarak kuersetin, kate in, epikate in, floridzin, prosiyanidin B₂ ve C₁'in elmanın kabu unda etinden daha yüksek oranda bulundu u rapor edilmi tir.

Lee vd., (2003), elmadaki her bir fitokimyasalın toplam antioksidan kapasitesine katkısını belirlemi tir. Altı elma çe idinin (Golden Delicious, Cortland, Monroe, Rhode Island Greening, Empire, ve NY674) ba lıca fitokimyasalları tanımlanmı ve miktarları belirlenmi tir. Ayrıca elma fitokimyasallarının toplam antioksidan aktivitesine katkıları, bir 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) radikal süpürme deneyi kullanılarak belirlenmi ve C vitamini e de eri antioksidan kapasite (VCEAC) olarak ifade edilmi tir. Altı elma çe idinde majör fenoliklerin ortalama konsantrasyonları (mg / 100 g taze elma a ırlı ı); kuersetin glikozitler, 13,20; prosiyanidin B₂, 9,35; klorojenik asit, 9,02; epikate in, 8,65; floretin glikozitler, 5,59 olarak belirlenmi tir. Bu bile iklerin nispi VCEAC de erleri, kuersetin (3.06)> epikate in (2.67)> prosiyanidin B₂ (2.36)> floretin (1.63)> C vitamini (1.00)> klorojenik asit (0.97) olarak ölçülmü tür. Bu nedenle, ana fenoliklerin ve C vitamininin 100 g taze elmanın toplam antioksidan kapasitesine tahmini katkısı kuersetin (40.39 VCEAC)> epikate in (23.10)> prosiyanidin B₂ (22.07)> C vitamini (12.80)> floretin (9.11)> klorojenik asit (8.75) ekinde sıralanmı tır. Bu sonuçlara göre, kuersetin, epikate in ve prosiyanidin B₂ gibi flavonoidlerin, elmaların toplam antioksidan aktivitesine C vitamininden daha fazla katkıda bulundu unu göstermi tir.

Yapılan çalı malarda elmaların, (-)- kate in ve (-)- epikate in (flavan-3-oller veya flavanoller), floridzin (dihidrokalon glikozitler), kuersetin (flavonoller), klorojenik asit (fenolik asitler), siyanidin-3-O-galaktosid (antosiyantinler) ve hidrokisinamatlar (p-kumarik asit) gibi fenolik bile ikleri içerdi i belirlenmi tir. Genel olarak, her bir elma için polifenolik bile ikler 19,6 ila 55,8 (flavan-3-oller), 17,7-33,1 (flavonoller) ve 10,6-80,3 (klorojenik asit) mg olarak belirlenmi ; en dü ük de erler floridzin (her bir elmada 1,0-9,3 mg/100 g) ve antosiyantin (her bir elmada 0,1-6,5 mg) için kaydedilmi tir (Francini ve Sebastiani, 2013).

2.7 Termosonikasyon Uygulamasının Fenolik Bile ikler ve Antioksidan Aktiviteye Etkisi

Isıl olmayan bir i lemin etkinli ini belirlemek için, enzim inaktivasyonu ile birlikte uygulanan prosesin gıdanın kalite parametreleri üzerindeki etkisi de incelenmelidir. Yapılan çalı malarda ultrason i leminin C vitamini içeri i, fenolik bile ik içeri i, renk, bulanıklık stabilitesi ve viskozite gibi meyve suları için önemli olan kalite parametreleri üzerine çok az etkisi oldu u gözlenmi tir. Termosonikasyon (ısı-ultrason) uygulamasının tek ba na ultrason uygulamasına göre meyve sularında ısıl i leme kıyasla daha dü ük sıcaklık ve sürelerde enzimleri inaktive etti i ve askorbik asit, toplam fenolik, flavonoidler ve flavonoller üzerine daha az kayba neden oldu u bildirilmi tir.

Literatürde ultrason ya da termosonikasyon uygulamasının fenolik bile iklere etkisi genelde toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite de i imi ile ifade edilmektedir. Bununla birlikte bireysel fenoliklere termosonikasyon uygulamasının etkisinin incelendi i çalı malar sınırlıdır.

Ba lar ve Ertugay (2013), ara tırmalarında farklı elma çe itlerinde ısıl i lem ve dü ük sıcaklıkta (40, 50 ve 60 °C) ultrason uygulaması yapmı lar ve toplam fenolik madde kayıplarını belirlemi lerdir. Elma sularının toplam fenolik madde miktarının 190-200 mg GAE/L arasında de i ti i belirlenmi tir. Toplam fenolik maddedeki kayıp ısıl i lemde (90 °C, 1 dak) %21-26 arasındayken, termosonikasyon i lemi ile maksimum kaybı %15 olarak tespit etmi tir.

Abid vd. (2014), yaptığı çalışmada taze elma (Fuji) suyuna ultrasonik banyo (25 kHz, 30 dak, 0,06 W/cm³) ve prob tipi ultrason (20 kHz, 5 ve 10 dak, 0,30W/cm³) kullanarak termosonikasyon işlemi uygulandı, elma sularının askorbik asit, toplam fenolik madde, flavonoidler, flavonoller, pH, titre edilebilir asitlik, antioksidan aktivite de erleri incelenmiştir. Taze elma suyunun toplam fenolik içeriği 697,49 µg GAE/g olarak belirlenmiştir ve 20 °C düşük işlem sıcaklığında tüm ultrason uygulamaları için toplam fenolik madde artmıştır. Ancak işlem sıcaklığı 40 °C'den 60 °C'ye yükseldikçe, biyoaktif bileşimlerin degradasyonu da artmıştır, yani sıcaklığın bu bileşimlerin seviyeleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Prob tipi ultrasonda belirlenen toplam fenolik madde de erleri, 60 °C'deki ultrasonik banyoda bulunan de erlere oranla daha yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte çalışmada elma suyu için belirlenen koruyucu özellikler arasında elde olunan DPPH radikalinin % inhibisyon de eri sırasıyla 30, 60 ve 90 dak (artan süreye bağlı olarak); 39,71 ± 1,03, 43,38 ± 1,48, 46,94 ± 0,86 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre süre arttıkça antioksidan aktivitenin arttığı saptanmıştır.

Benzer şekilde yapılan başka bir çalışmada bulanık elma suyuna ısıl işlem alternatif bir uygulama olan düşük sıcaklıklarda (42-67 °C) ultrason uygulanmıştır. Ayrıca çözünmüş gazların (nitrojen ve karbondioksit) etkisi de incelenmiştir. Uygulama sonunda elma suyunda toplam fenolik bileşimler, termosonikasyon uygulanmayan elma suyuna göre artmıştır. Bununla birlikte toplam fenolik madde içeriğindeki önemli farklılık 60-67 °C'de havanın azot ile yer değiştirmesi sonucu gözlemlenmiştir (Illera, 2018).

Isıl işlem ve termosonikasyonun işlem ve depolama sırasında, ferulik asit ve meyhan özünü ile kopigmente edilmiş yabanmersini suyunun renk ve antosiyanin stabilitesi üzerindeki etkisini incelemek için yapılan bir çalışmada, meyve suyu 1 dakika boyunca 90 ± 1 °C'de ısıl işlem tabii tutulmuştur. Ultrasonik uygulama 20 kHz frekans %70 ve %100 genlikte 45 °C'de 5 dakika boyunca uygulanmıştır. Isıl işlem örnek içeriğindeki fitokimyasal bileşimleri olumsuz etkilerken, özellikle düşük genlikte uygulanan termosonikasyon işleminin fenolik bileşimler üzerinde önemli bir de işiklik göstermediği rapor edilmiştir. Depolama sırasında antosiyaninlerin parçalanmasında ve numunelerin renk kararsızlığında da benzer bir etim gözlemlenmiştir. Ana antosiyanin olarak pelargonidin-3-glukozit (%80,32) tanımlanırken bunu siyanidin-3-glukozit (%16,49) ve pelargonidin-3,5-diglukozit (%2,70) takip etmiştir. Kontrol numunesinin

toplam fenolik madde ve DPPH'in yüzde inhibisyonu, sırasıyla 1074 mg GAE/100 ml ve %83,91 olarak belirlenmiştir. Isıl işlem toplam fenolikleri 15–255 mg/100 ml miktarında ve DPPH inhibisyon yüzdesini %1,43–3,23 oranında azaltırken, özellikle %70 genlik ve 45 °C'de yapılan termosonikasyonun, ısıl işlemle karıştırıldığında meyve suyu örneklerinin toplam fenolik ve antioksidan aktivitesi üzerinde küçük bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Özellikle meyan özü ile yapılan kopigmentasyon, depolama sırasında antosiyaninlerin ve iyi korunmuş pelargonidin 3-glukozidin yarı ömrünü ve meyve suyunun renk parametrelerini önemli ölçüde arttırmıştır. Bu çalıma göre, meyan ekstraktının sentetik kopyalara iyi bir alternatif olabileceği ve termosonikasyon uygulamasının kopyalanma reaksiyonunun etkinliğini koruduğu belirlenmiştir (Chitgar vd., 2018).

Yapılan başka bir çalımada, termosonikasyon (20, 30, 40, 50, 60 °C, 1 saat ve 20 kHz) ile durultulmuş elmanın elma suyunun reolojik ve bazı fiziko-kimyasal özellikler (briks, pH, titre edilebilir asitlik, renk, bulanıklık derecesi ve toplam fenolik içeriği) üzerine etkileri incelenmiştir. Termosonikasyon uygulanan elma suyunun toplam fenolik içeriğinin kontrol örneğinden daha yüksek olduğu ve artan termosonikasyon sıcaklığı ile (20-60 °C) toplam fenolik maddenin arttığı görülmüştür. Elma sularının toplam fenolik madde içeriği 195 µg GAE/g ile 242,1 µg GAE/g arasında belirlenirken, kontrol elma suyunun toplam fenolik madde içeriği ise 176,74 µg GAE/g olarak bulunmuştur. Buna göre, termosonikasyon uygulamasının elma suyunun fenolik bileşimlerini önemli ölçüde geliştirdiği belirlenmiştir. Sonuçta, sonikasyon teknolojisinin insan sağlığı açısından, iyileştirilmiş kalitede elma suyunun üretilmesi için başarıyla kullanılabilceği rapor edilmiştir (Ozyurt vd., 2019).

BÖLÜM III

DENEYSEL ÇALI MALAR

3.1 Materyal

Bu çalı mada, meyve suyu üretiminde kullanılarak taze elma (Red Chief) yerel üreticilerden sa lanmı tır. Meyveler, meyve suyu eldesinden önce +4 C sıcaklıkta muhafaza edilmi tir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Meyve suyu üretimi

Meyve suyu; elmaların yıkanması ve bölünmesi ile blenderdan (Arnica AA 1233 GH21530 Orbital Mix, Türkiye) geçirilerek kaba parçaların alınması ile 4 katlı tülbentten süzülerek elde edilmi tir. Taze sıkılmı meyve sularından kontrol olarak ayrılmı tır.

3.2.2 Termosonikasyon uygulaması

Elde edilen taze meyve suyu Hielscher (Dr. Hielscher GmbH, Germany) marka UP400S (24 kHz, 400 W, genlik 20-100%, darbeleri mod devir faktörü: 0,00-1,0) model ultrason cihazı kullanarak pastörize edilmi tir. Termosonikasyonda 22 mm çapa sahip prob kullanılmı tır. Farklı sıcaklık, süre ve genli in taze elma suyu üzerinde etkisini belirlemek için termosonikasyon 24 kHz sabit frekansta, farklı genlik seviyelerinde (60,80 ve 100%), farklı sıcaklıklarda (40, 50, 60 °C) ve farklı sürelerde (5, 10, 15, 20, 25, 30 dakika) uygulanmı tır. 200 ml taze meyve suyu 7 cm çap ve 9,5 cm uzunlu una sahip cam beher içine konulmu ve meyve suyu içine ultrason probu 2,5 cm derinlikte daldırılmı tır. Örneklerin sıcaklı mı sabit tutmak için, içinde meyve suyu bulunan cam beher su banyosu içine yerle tirilmi tir. Termosonikasyon sırasında sıcaklık sürekli yükselece inden, uygulamada kullanılan so utma suyu sıcaklı ı i lem öncesinde deneysel olarak belirlenmi tir. lem boyunca meyve suyu sıcaklı ı ultrason cihazında bulunan dijital sıcaklık ölçer kullanılarak kontrol edilmi tir. Örnekler enzim

aktivitelerinin ölçümü için termosonikasyon uygulamasının hemen sonrasında buzlu su banyosuna alınmıştır.

3.2.3 Kalan enzim aktivitelerinin belirlenmesi

3.2.3.1 Kalan PPO aktivitesinin belirlenmesi

PPO enzim aktivitesi ölçümleri Baltacıoğlu vd. (2015) tarafından kullanılan yöntemde bazı değişiklikler yapılarak spektrofotometrik (Thermo Scientific marka Evolution 300, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) yöntemle belirlenmiştir. Enzim aktivitesini belirlemek için test tüpüne, 2 ml 50 mM (pH=6,5) potasyum fosfat tamponu ve substrat olarak 0,3 ml K-fosfat tamponu (pH=6,5) içinde çözünmüş 0,25 M katekol (Sigma) solüsyonu eklenmiştir. Reaksiyon 0,3 ml örnek ilave edildiği anda başlatılmıştır. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra spektrofotometrede absorbans değerleri 3 dakika boyunca 5 saniyede bir kaydedilmiştir. Aktivite ölçüm sıcaklığı 25 ± 2 °C olarak belirlenmiştir. Zamana karşı çizilen A_{420} grafiğinin ilk doğrusal kısmının eğimi bulunurken, PPO enzim aktivitesi birim zamanda absorbanstaki 0,001'lik değişim olarak ifade edilmiştir. Kalan enzim aktivitesi kontrolün aktivitesine oranla yüzde olarak ifade edilmiştir.

3.2.3.2 Kalan POD aktivitesinin belirlenmesi

aktivasyon sonunda POD enzim aktivitesi ölçümleri Abid vd. (2014) tarafından kullanılan yöntem modifiye edilerek spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Bu amaçla Thermo Scientific marka Evolution 300 model (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) spektrofotometre kullanılmıştır. Peroksidaz aktivitesi için substrat olarak pirogallol kullanılmıştır. Test tüplerine konulacaklar aşağıda listelenmiştir:

	Test	miktar
100 mM potasyum fosfat tamponu (pH=6)	1,52 ml	2,52 ml
%5'lik pirogallol	0,32 ml	0,32 ml
0,147 M Hidrojen peroksit solüsyonu	0,16 ml	0,16 ml
Örnek (meyve suyu)	1,00 ml	0,00 ml

En son H₂O₂ ilave edilip ve reaksiyon başlatılmıştır. Spektrofotometrede 5 saniyede bir olacak şekilde 3 dakika boyunca absorbansdaki artış değerleri kaydedilmiştir. Aktivite ölçüm sıcaklığı 25 ± 2 °C olacak şekilde belirlenmiştir. Enzim aktivitesi zamana karşı çizilen 420 nm’de belirlenen absorbans grafiğinin ilk doğrusal kısmının eğiminin belirlenmesiyle, birim zamanda absorbanstaki 0,001’lik değişim olarak ifade edilmiştir. Kalan enzim aktivitesi kontrolün aktivitesine oranla yüzde olarak ifade edilmiştir.

3.2.4 Toplam fenolik madde tayini

Toplam fenolik madde tayini Folin-Ciocalteu metoduna göre yapılmıştır (Singleton ve Rossi, 1965). Ekstrakt eldesi için, öncelikle 15’er ml falkon tüplerinde 2 g elma suyu alınmış ve %80’lik metanol (%1’lik HCl içeren) ile 10 ml’ye tamamlanmış ve oda sıcaklığında, 10 dakika bekletilmiştir. 240 dak çalkalanması ile ekstraksiyon tamamlanmıştır. Sonrasında ekstrakt 9000 rpm, 15 dak, +4 C’de santrifüj edilerek, örnek süzülmüş tüp içine alınmıştır. 100 µl örnek üzerine 0,75 ml Folin- Ciocalteu çözeltisi (suda, %10’luk) eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. 0,75 ml Na₂CO₃ (suda, 75 g/L) ilave edilerek kuvvetlice karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında karanlıkta 1,5 saat bekletilmiş ve sonra 725 nm’de örneklerin absorbansları okunmuştur. Standart olarak gallik asit kullanılmış, aynı ölçümler kalibrasyon eğrisi için hazırlanmış farklı konsantrasyonlardaki gallik asit çözeltilerine de uygulanmıştır. Ekstraktların absorbansları, çizilen gallik asit kalibrasyon eğrisinden okunarak toplam fenolik madde konsantrasyonu, eşdeğer gallik asit olarak hesaplanmıştır (mg GAE/kg ya ağırlık).

3.2.5 DPPH yöntemiyle antioksidan aktivite tayini

Serbest radikal yakalama etkinliği deneyi 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikali kullanılarak Blois’in metoduna göre yapılmıştır (Blois, 1958). Metod ekstraktların bir proton veya elektron verebilme yeteneğinin, mor renkli DPPH çözeltisinin rengini açması esasına dayanır. Reaksiyon karışımının absorbansının düşmesi yüksek serbest radikal giderme aktivitesinin göstergesidir. Ekstraktlardan 100’er µl alınarak, 3,9 ml 0,1 mM DPPH (%80 metanolde) çözeltisi ilave edilmiştir. Vortekslelendikten sonra oda koşullarında karanlıkta 30 dakika bekletilerek 517 nm’de absorbansları okunmuştur. Örnek yerine 100 µl metanol (%80’lik) kullanılarak aynı şartlarda kontrol olarak

kullanılmı tır. Kontrolun absorbanı günlük olarak llm tr. % DPPH radikali giderme aktivitesi a a ıda verilen formül ile hesaplanmı tır:

$$\% \text{ DPPH Radikali Giderme Aktivitesi} = \frac{\text{Kontrolün Absorbans} - \text{rnek Absorbans}}{\text{Kontrol Absorbans}} \times 100$$

Örneklerin farklı konsantrasyonlara (20, 40, 60, 80, 100 µl) kar ı hesaplanan %inhibisyon de erleri ile olu turulan grafikte lineer regreasyon ile EC₅₀ de erleri (%50 inhibisyona neden olan) bulunmu ve miktarları mg/ml olarak belirtilmi tır.

3.2.6 Fenolik madde de i iminin FTIR spektroskopisi kullanılarak belirlenmesi

Çalı mada Fourier Dn m Kızıl tesi (FTIR) spektroskopisi kullanılarak uygulanan inaktivasyon yönteminin fenolik madde içeri ine etkisi belirlenmi tır. Ni de mer Halisdemir Üniversitesi Merkezi Ara tırma Laboratuvarında bulunan ATR hücresine sahip FTIR spektroskopisi (Bruker, Almanya) kullanılarak, 2 1/cm çözünürlükte 128 tarama yapılarak 400-4000 1/cm bölgesinde örneklerin absorbsiyon spektrumu elde edilmi tır. Örneklerdeki metanol önce etüvde uçurulduktan sonra dondurarak kurutucuda kurutulmu , böylece ekstraksiyon solventinin (metanol, %80) kar ımının bantları kapatması nlenmi tır.

3.2.7. HPLC yöntemi ile fenolik madde belirlenmesi

Elma suyunun fenolik içeri ini belirlemek için HPLC yöntemi uygulanmı tır (Ku u ve Bulantekin, 2016). Ekstrakt eldesi için, öncelikle 15' er ml falkon tüplerinde 2 g elma suyu üzerine %80'lik metanol (%1'lik HCl içeren) ile 10 ml'ye tamamlanmı ve oda sıcaklı ında, ık almayacak ekilde 240 dakika çalkalanması ile ekstraksiyon tamamlamı tır. Sonrasında ekstrakt 9000 rpm, 15 dak, +4 C'de santrifüj edilerek, örnek szlm tp içine alınmı tır. Enjeksiyon öncesinde ekstraktlar, 0,45µm teflon membran filtreden geirilmi ve kahverengi i elere doldurulmu tur. Ardından, kahverengi i elerdeki ekstraktların 20 µl'si SIL-10AD vp otomatik rneklemesi sistemi ile HPLC'ye (Shimadzu Corporation, Kyoto Japan) enjekte edilmi tır. HPLC sistemi bir pompa (LC-10ADvp), bir kolon sıcaklı ı kontrol fırını (CTO-10Avp), bir degazör

modülü (DGU- 14A) ve bir detektörden (DAD dedektör ($\lambda_{max}=278nm$)) olu maktadır. Kromatografik ayırmalar Eclipse XDB-C18 kolonunda ((250x4,60 mm) 5 mikron, Agilent) yapılmı tır. Mobil faz %3 asetik asit (A) ve metanolden (B) olu maktadır. Süpernatantlar, a a ıdaki ikili gradyana göre yürütölmü tür: gradyan %7 B ile ba latılmı ve 20 dakikada %28 B' ye ula mı tır, sonrasında 28 dakikada %25 B, 35 dakikada %30 B, 50 dakikada %30 B, 60 dakikada %33 B, 62 dakikada %42 B, 70 dakikada %50 B, 73 dakikada %70 B, 75 dakikada %80 B, 80 dakikada %100 B ve 81 dakikada %7 B olacak ekilde program yürütölmü tür. HPLC ile elde edilen standart kromotogram EK 1' de gösterilmı tır.

3.2.8 statiksel analiz

Veriler Minitab (16 versiyon, Minitab Inc., State College, PA, ABD) paket programı kullanılarak %95 güvenlik aralı ında analiz edilmı , verilerin analizinde genel lineer model kullanılmı tır. Uygulamalar arasındaki farklılıkların tespiti için Tukey's çoklu kar ıla tırma testi yapılmı tır. Her bir deney en az üç kez tekrarlanmı tır.

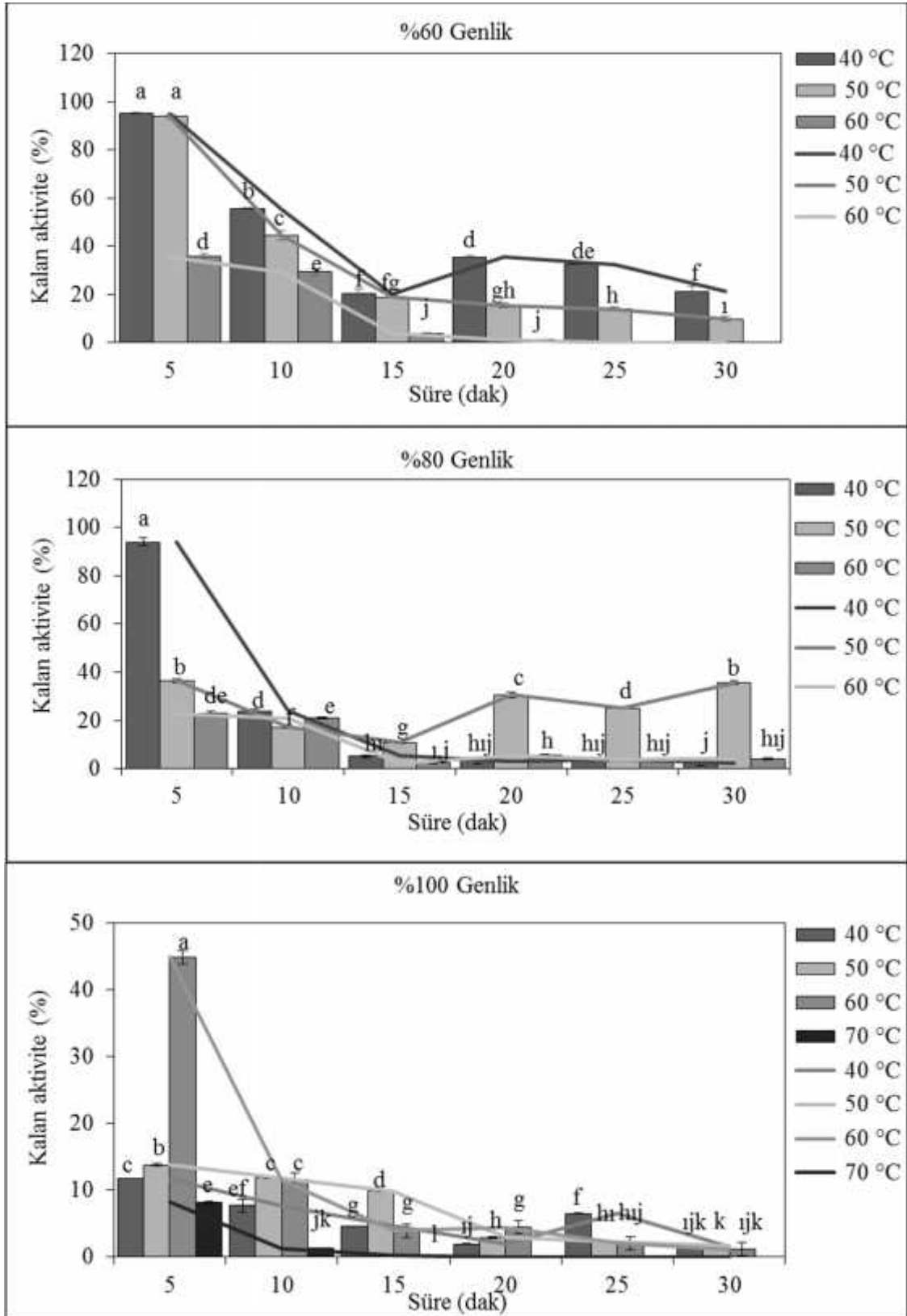
BÖLÜM IV

BULGULAR VE TARTI MA

4.1 Termosonik Uygulama ile PPO naktivasyonu

PPO enzim aktivite ölçümü için en kolay yol ürün olu umunun belirlenmesidir. Enzimatik esmerleme reaksiyonunda kinonlardan olu an renkli bile iklerin optik yo unlu u spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Kate ol, PPO enzim aktivite ölçümü için en uygun substrattır (Torales vd., 2005). Bu çalı mada da PPO enzim aktivite ölçümünde kullanılacak optimum substrat konsantrasyonunu belirlemek için, farklı substrat konsantrasyonlarında reaksiyon hızları belirlenmi tir. Elde edilen sonuçlara göre, enzim aktivitesinin belirlenmesi için optimum substrat konsantrasyonu 0,25 M kate ol olarak seçilmi tir.

Gıdaların i lenmesi ve depolanması sırasında tat, koku, renk gibi genel kalite özellikleri ile besinsel de erine daha az etki sa layacak, çe itli enzimleri inaktive etmek için alternatif pastörizasyon ve sterilizasyon yöntemleri üzerinde yüksek güçlü ultrason dalgaları yalnız olarak veya di er muhafaza yöntemleri ile birlikte kullanılmaktadır (Demirta , 2018). Elde edilen elma suyunda analizde belirlenen ko ullar sa lanarak termosonikasyon i lemi gerçekte tirilmi , kalan enzim aktivitesi kontrolün aktivitesine oranla yüzde olarak ifade edilmi tir. Buna göre elma suyunda PPO enzimi için farklı genlik, sıcaklık ve sürelerde belirlenen kalan enzim aktivitesi ekil 4.1' de gösterilmektedir.



Aynı grafikteki farklı harfler (a, b, c...), de erler arasında önemli bir fark oldu unu göstermektedir.

ekil 4.1. TS i lem sonunda elma suyunda PPO'nun kalan enzim aktivitesi

Genel olarak her bir genlik de eri için artan sıcaklık ve süre ile PPO enzim aktivitesi azalmaktadır. Sıcaklı ın, sürenin ve sıcaklık-süre etkile iminin PPO enzim aktivitesi üzerine etkisi önemli bulunmu tur ($p<0,05$).

%60 genlik 40°C sıcaklıkta 30 dakika sonunda kalan PPO enzim aktivitesi; $21,235 \pm 2,184$, 50°C sıcaklıkta 30 dakika sonunda; $9,741 \pm 1,075$ olarak belirlenmiştir. 60°C sıcaklıkta 20 dakika i lem sonunda kalan enzim aktivitesi de eri $1,233 \pm 0,1202$ 'dir. %60 genlik 60°C sıcaklık, 25 ve 30 dakika i lem süreleri sonunda PPO enzim aktivitesi görülmemi tir yani enzim tamamen inaktive olmu tur. %60 genlik de erinde artan sıcaklık ve süre ile PPO enzim aktivitesi azalmı tir.

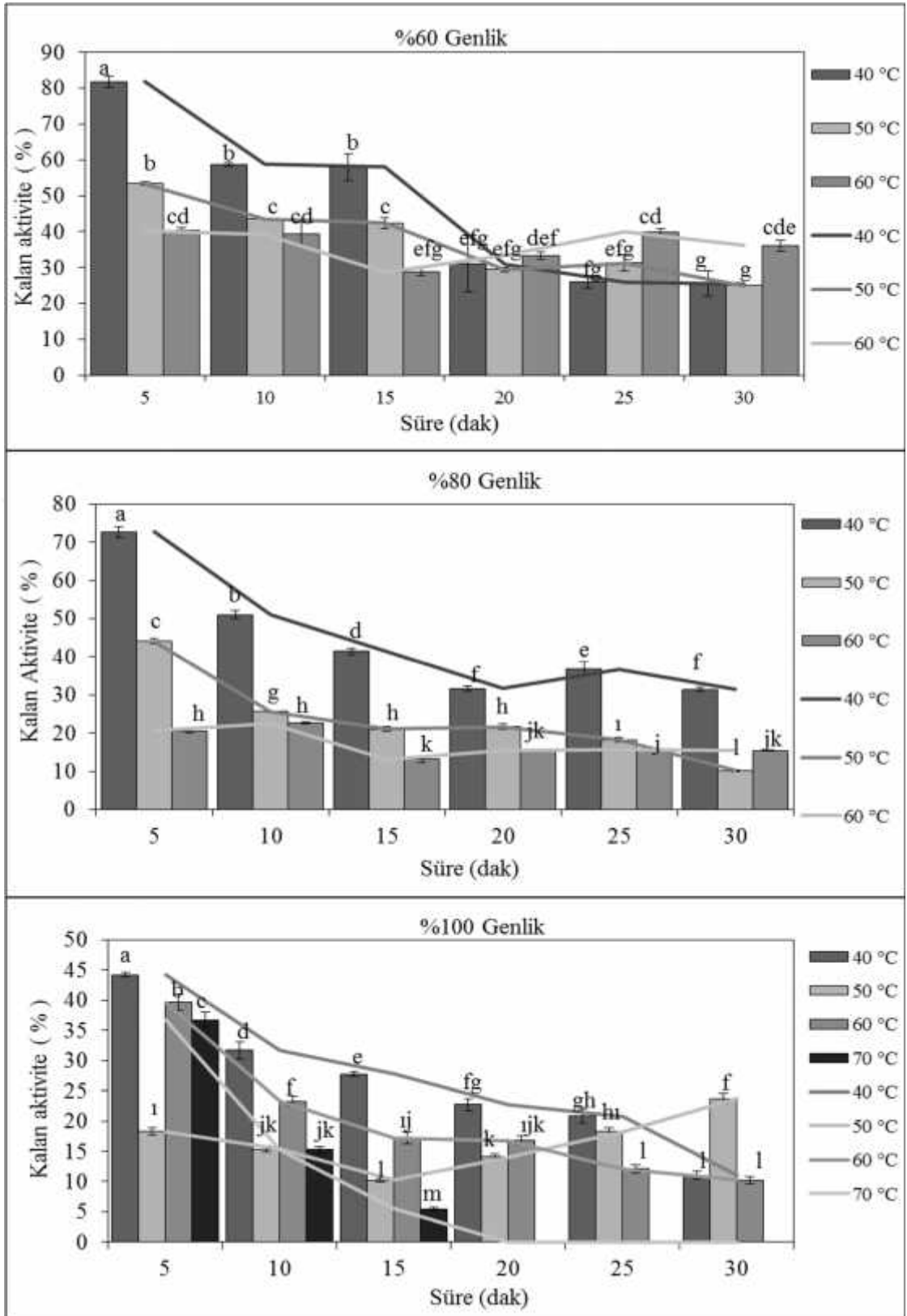
%80 genlik 40°C sıcaklık uygulaması ile artan süreye ba lı olarak 30 dakika i lem sonunda elma suyunda kalan PPO enzim aktivitesi $2,256 \pm 0,085$ 'dir. Aynı genlikte 50 °C 15 dakika termosonikasyon uygulaması sonunda minimum aktivite $10,726 \pm 0,226$ görülürken aynı sıcaklıkta 20 dakika sonunda $30,501 \pm 1,232$, 25 dakika sonunda $25,040 \pm 0,175$ ve 30 dakika i lem sonunda $35,620 \pm 0,694$ olarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesindeki bu artı ın nedeni dü ük sıcaklıklarda uygulanan ultrasonik i lemenin süreye ba lı olarak enzimin konformasyonunu de i tirmesi ve bunun sonucunda daha yüksek bir enzim-substrat etkile imi ile ilgili olabilece i dü ünülmektedir (Cruz vd., 2006). Analiz ile %80 genlik de erinde artan sıcaklık sonunda en dü ük aktivite 60 °C 15 dakika sonunda $2,395 \pm 0,211$ olarak saptanmı tir.

%100 genlik uygulanan termosonikasyon i leminde, 40 °C sıcaklıkta artan süreye ba lı olarak kalan enzim aktivitesi azalmı tir. Enzim aktivitesi en dü ük %100 genlik 40 °C 30 dakikada $1,594 \pm 0,204$ ve 50 °C 30 dakika i lem sonunda $1,670 \pm 0,028$ olarak belirlenmiştir. Aynı genlikte 60 °C sıcaklıkta 5 dakika termosonik uygulama sonunda kalan enzim aktivitesi artarak $44,934 \pm 0,693$ olarak belirlenmiştir. Benzer ekilde yapılan çalı malarda hafif ısı uygulamalarında (<65 °C) ultrason gücü arttırıldı ında aktivite artı ı gözlenmiştir (Kuldiloke, 2002). %100 genlikte, 60 °C sıcaklıkta 30 dakika sonunda kalan PPO aktivitesi $1,111 \pm 0,392$ olarak belirlenirken 70 °C'de 15 dakika sonunda PPO enzimi tamamen (%99,8) inaktive olmu tur.

Genel olarak, PPO yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklı değildir. Sıcaklık aralığı 70-90 °C'de uygulanan ısı ile pektinaz enziminin katalitik aktivitesini yok eder ya da kısmen inaktive eder (Demirtaş, 2018). Bu süreçte inaktivasyon için gerekli olan zaman ürünün yapısına bağlıdır. Çalınmamıza kıyasla Abid vd. (2014) tarafından termosonikasyon uygulaması ile elma suyunda PPO enzimlerinin 60°C sıcaklık 10 dakika süre sonunda %93,85 oranında inaktive edildiği belirlenmiştir. Benzer şekilde Silva vd. (2015) yaptıkları çalışmada, elma küplerinde ve elma suyunda (23°C- 60°C) düşük sıcaklıklar ve 5- 20 dakika işlem süresi uygulanan ultrason uygulaması ile PPO için maksimum düzeyde (%57'lik) bir azalma gözlemiştir. Yapılan başka bir çalışmada bulanık elma suyunda düşük sıcaklıklarda (42-67 °C) uygulanan ultrason uygulamasında PPO, en yüksek sıcaklıkta (67 °C), 1.15 W/mL güç yoğunluğunda çalışırken neredeyse tamamen inaktive (%3 ± 1) elde edilmiştir. Düşük güç yoğunluğunda da örneklerinde, belli bir inaktivasyona ulaşmak için daha yüksek sıcaklıklarda çalışmak gerektiği rapor edilmiştir (İllera vd., 2018).

4.2 Termosonik Uygulama ile POD inaktivasyonu

Elma suyuna, analizde belirlenen koenzimler sağlanarak termosonik uygulama gerçekleştirilmiştir, kalan enzim aktivitesi kontrolün aktivitesine oranla yüzde olarak ifade edilmiştir. Buna göre elma suyunda POD enzimi için farklı genlik, sıcaklık ve sürelerde belirlenen kalan enzim aktivitesi Şekil 4.2' de gösterilmektedir.



Aynı grafikteki farklı harfler (a, b, c...), de erler arasında önemli bir fark oldu unu göstermektedir.

ekil 4.2. TS i lem sonunda elma suyunda POD'un enziminin kalan enzim aktivitesi

Sonuçlar incelendi inde termosonikasyon işlemi sonunda elma POD enziminin, PPO enzimine kıyasla daha dirençli olduğu belirlenmiştir. Fakat benzer şekilde her bir genlikte de erime için, artan sıcaklık ve süre ile elma POD enziminin aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir ($p<0,05$). Ayrıca sıcaklığın, sürenin ve sıcaklık-süre etkileşiminin PPO enzim aktivitesi üzerine etkisi önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

Elma POD enzimi için kalan enzim aktivitesi değerleri incelendi inde, %60 genlikte 40 ve 50°C sıcaklıklarda artan süreye bağlı olarak enzim aktivitesinde azalma gözlemlenmiş ve en düşük POD aktivite değerleri 30 dakika sonunda sırasıyla; $25,505 \pm 3,580$ ve $25,000 \pm 0,000$ 'dır. %60 genlikte ve sabit süre ile artan sıcaklığa göre enzim aktivitesinde azalma görülmüştür. Ancak 60°C 15 dakika da minimum kalan aktivite değeri $28,763 \pm 0,931$ iken 60 °C 30 dakika sonunda kalan enzim aktivitesi artışı göstererek $36,111 \pm 1,577$ olarak tespit edilmiştir. Bu artış benzer şekilde 40-80 °C sıcaklık aralığında ultrason işlemi uygulanan su termesi POD enzimi için de gözlemlenmiş ve ileri kılabilirilmektedir (Cruz vd., 2006).

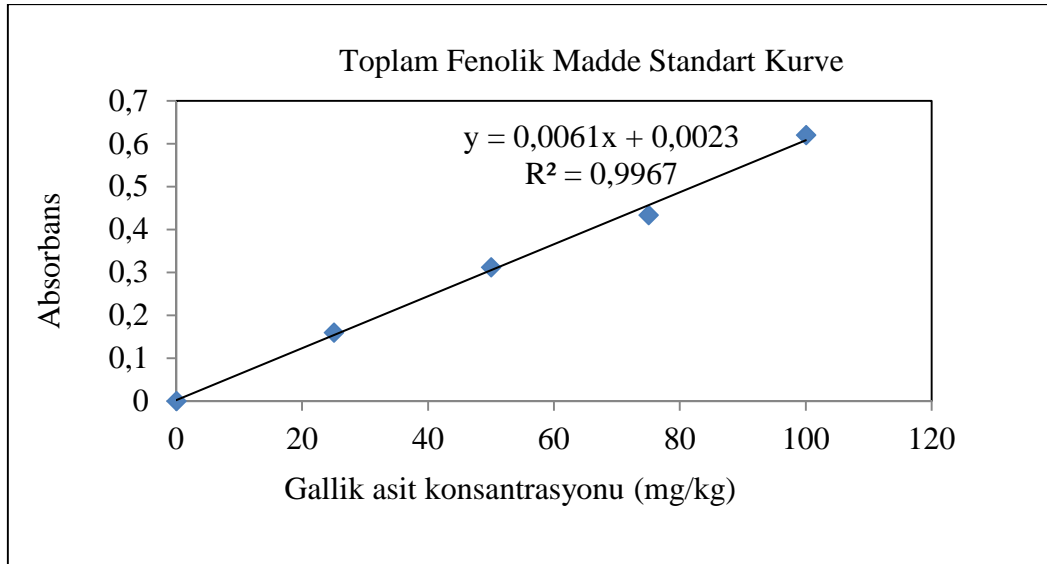
%80 genlikte uygulanan termosonikasyon işleminde düşük sıcaklıkta (40°C) artan süre ile aktivite artışı gözlemlense de 30 dakika sonunda aktivite azalmıştır. %80 genlikte 40°C 30 dakikada kalan POD aktivite değeri $31,494 \pm 0,637$ 'dir. Aynı genlikte yüksek sıcaklıklarda (50 ve 60 °C) uygulanan termosonikasyon işleminde inaktivasyonun artışı gözlemlenmiştir; 50 °C 30 dakika sonunda $10,162 \pm 0,317$ ve 60 °C 15 dakikada $13,108 \pm 0,926$ ile minimum kalan POD aktivite değeri bulunmuştur.

POD enzimi için 40 °C'de, %100 genlikte kalan enzim aktivitesinde artan süreye bağlı olarak inaktivasyon etkili bir şekilde sağlanmış minimum kalan POD enzim aktivitesi 30 dakika sonunda $11,013 \pm 0,643$ olarak saptanmıştır. Kalan enzim aktivitesi, aynı genlikte 50°C sıcaklıkta termosonikasyon uygulamasından sonra 15 dakikada $10,245 \pm 0,347$ görülürken, 60 °C 30 dakika termosonik uygulama sonunda $10,242 \pm 0,598$ ile minimum enzim aktivitesine ulaşılmıştır. Bununla birlikte termosonikasyon işleminde sıcaklık artışı POD enzim inaktivasyonunu arttırmış, 70 °C 15 dakika işlem sonunda elma suyunun POD enzimi %94,5 oranında inaktive olmuştur.

Çalı mamıza kıyasla termosonikasyon uygulaması ile elma suyu POD enzimlerinin 60°C sıcaklık ve 10 dakika işlem sonunda %85 oranında inaktive edildiği belirlenmiştir (Abid vd., 2014). Benzer şekilde yapılan bir çalışmada (Golden delicious) elma suyuna düşük sıcaklıklardaki (40, 50 ve 60 °C) ultrason uygulaması ile elde edilen sonuçlar 60 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda, ısıya dayanıklı POD enziminin duyarlılığını arttırdığını ve %40 inaktivasyon sağladığını göstermektedir (Balar ve Ertugay, 2013). Silva vd. (2015) ise yaptığı çalışmada elma küplerinde ve elma suyunda ultrasonik güç yoğunluğundaki artışa bağlı olarak enzim aktivasyonunun azaldığını ve maksimum POD aktivitesi kaybının %15 olduğunu saptamıştır.

4.3 Toplam Fenolik Madde Tayini

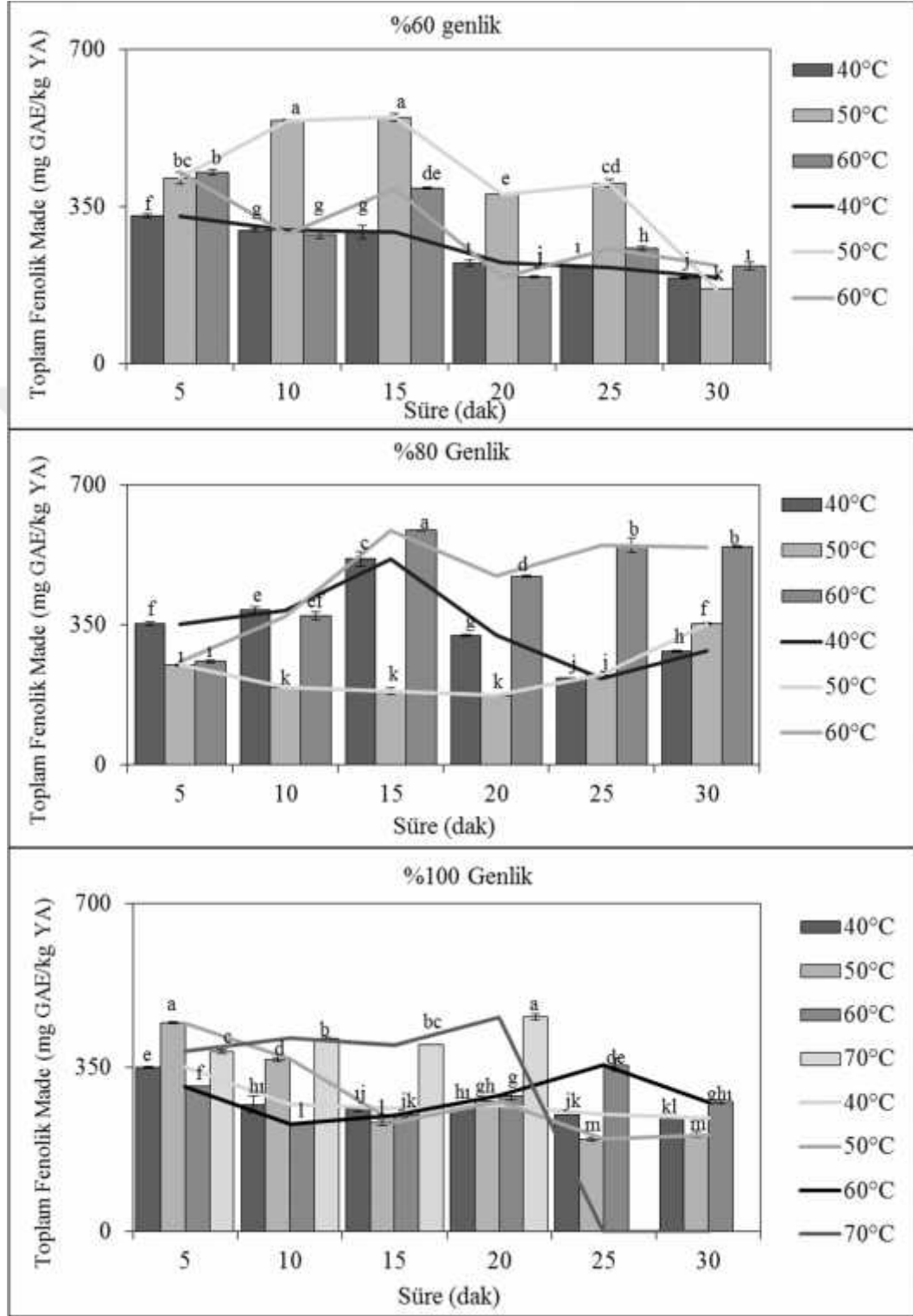
Toplam fenolik madde tayini Folin-Ciocalteu yöntemine göre yapılmıştır. Standart olarak gallik asit kullanılmıştır, farklı konsantrasyonlardaki gallik asit çözeltileri kullanılarak çizilen gallik asit kalibrasyon eğrisinden toplam fenolik madde konsantrasyonu, eşdeğer gallik asit olarak hesaplanmıştır (mg GAE/kg yağına göre). Toplam fenolik madde standart eğrisi ekil 4.3' de gösterilmektedir.



ekil 4.3. Toplam fenolik madde standart eğrisi

Termosonikasyon uygulama sonrasında fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için tüp içine elma suyundan 2 g alınmış, %1'lik HCl içeren %80'lik metanol ile 10 ml'ye

tamamlanmı ve 4 saat süre çalkalama sonunda ekstrakte edilmi tir. Örneklerde bulunan toplam fenolik bile ik miktarlarındaki de i im ekil 4.4' de gösterilmektedir.



Aynı grafikteki farklı harfler (a, b, c...), de erler arasında önemli bir fark oldu unu göstermektedir.

ekil 4.4. Elma suyunda toplam fenolik madde miktarındaki de i im

Termosonikasyon i lemi ile farklı genlik, süre ve sıcaklıkta elde edilen örneklerde toplam fenolik bile ik miktarı belirlenmi ve toplam fenolik maddede gözlenen bu de i ime, sıcaklı ın, sürenin ve sıcaklık-süre etkile iminin etkisi önemli bulunmu tur ($p<0,05$). Taze elma suyunda $401,209 \pm 6,203$ mg GAE/kg ya a ırlık olarak toplam fenolik madde belirlenmi tir.

%60 genlikte sabit süre dü ünüldü ünde dü ük sıcaklıklarda ($40-50$ °C) sıcaklık arttıkça toplam fenolik madde miktarında artı saptanmı tur. %60 genlik 40 °C 5 dakika $328,79 \pm 4,200$, 50 °C 5 dakika $412,72 \pm 13,501$. Bununla birlikte, %60 genlik 60 °C sıcaklıkta 5 dakika sonunda toplam fenolik madde yine artı göstermi ve $425,916 \pm 6,309$ mg GAE/kg ya a ırlık olarak belirlenmi tir. Toplam fenolik bile ikteki bu artı ın nedeni ultrason etkisi ile olu an kavitasyonun hücre duvarını yıkması ve bu bile iklerin salınmasını sa lamasından kaynaklanabilece i dü ünülmektedir (Feng vd., 2011). Ancak 60 °C i lem sıcaklı ında artan sürenin etkisine ba lı olarak elma sularında toplam fenolik madde miktarı azalmı tur. 60 °C termosonik i lem sıcaklı ında elde edilen toplam fenolik maddedeki dü ü ün, elmanın yapısındaki esmerle meye neden olan POD gibi enzimlerin ısıya olan direncinden yeterli inaktive olmaması sonucunda bu enzimlerin substrat olarak fenolik maddeleri kullanması ve fenolik maddelerin yüksek sıcaklıkta bozulabilece i ile ilgili olabilece i dü ünülmektedir.

%80 genlikte dü ük sıcaklıklarda (40 °C) kısa süre (5, 10 ve 15 dakika) i lem uygulanan örneklerde toplam fenolik madde miktarı kontrole kıyasla artmı ve 40 °C 5, 10 ve 15 dakika süreler sonunda elde edilen fenolik madde miktarı sırasıyla $352,622 \pm 4,630$, $386,946 \pm 6,556$, $514,042 \pm 18,439$ mg GAE/kg ya a ırlık olarak saptanmı tur. %80 genlik 50 °C sıcaklık için 25 dakikaya kadar toplam fenolik madde miktarı azalmı ve bu süreden sonra artı göstermi tir. Farklı süreler kıyaslandı ında en yüksek toplam fenolik madde miktarı 30 dakika sonunda $352,464 \pm 2,282$ mg GAE/kg ya a ırlık olarak belirlenmi tir. 60 °C sıcaklıkta ise artan süre ile genel anlamda toplam fenolik madde miktarının arttı ı tespit edilmi tir. Bunun nedeni enzim inaktivasyonu ile ortamda substrat olan fenolik bile iklerin enzimler tarafından kullanılmaması sonucunda artmı olabilece idir. %80 genlik 60 °C sıcaklık 15 dakikada $586,055 \pm 1,261$ mg GAE/kg ya a ırlık olarak saptanmı tur. Aynı sıcaklık aralı ında 20, 25 ve 30 dakika süreler sonunda elde edilen fenolik madde miktarları sırasıyla, $471,172 \pm 1,612$,

548,43 ± 18,233, 544,397 ± 3,116 mg GAE/kg ya a ırlık olarak belirlenirken kontrole göre artı sa lanmı tır.

%100 genlik 40 ve 50 °C sıcaklıkta süre arttıkça 10 dakikadan sonra toplam fenolik madde miktarında azalma gözlenmi tir. %100 genlik 40 °C 5 dakika sonunda 351,23 ± 2,050 mg GAE/kg ya a ırlık, 30 dakika sonunda 243,078 ± 2,256 mg GAE/kg ya a ırlık olarak belirlenmi tir. %100 genlik 50 °C 5 dakika sonunda 445,377 ± 2,111 mg GAE/kg ya a ırlık, 50 °C 30 dakika sonunda 207,267 ± 6,354 mg GAE/kg ya a ırlık olarak belirlenmi tir. %100 genlik 60 °C sıcaklıkta 10 dakika süreye kadar azalmı , sonrasında 25 dakikaya kadar artmı ve 30 dakika sonunda azaldı ı saptanmı tır. %100 genlik 60 °C sıcaklıkta 30 dakika sonunda 276,047 ± 4,167 mg GAE/kg ya a ırlık olarak kontrole kıyasla azalmı tır. Toplam fenolik maddedeki artı ın nedeninin enzim inaktivasyonu ile birlikte PPO gibi enzimlerin fenolik bile ikleri substrat olarak kullanmaması olabilece i dü ünülmektedir. Azalması ise fenolik bile iklerin uzun süre sonunda parçalanması ile açıklanabilmektedir. Benzer ekilde %100 genlik 70 °C sıcaklıklarda 10 dakika sonunda 412,344 ± 4,204 mg GAE/kg ya a ırlık ve 20 dakikada 457,633 ± 6,464 mg GAE/kg ya a ırlık olarak saptanmı tır. %100 genlik 70 °C sıcaklıkta 10 ve 20 dakika süreler sonunda kontrole göre artı gözlenmi tir. Bunun sebebi elma suyu yapısındaki enzimlerin inaktive edilmesi sonunda ortamda substrat olan fenolik maddelerin daha fazla olması dü ünülmektedir.

Bununla birlikte termosonikasyon (ısı-ultrason) uygulamasının elma sularında daha dü ük sıcaklık ve sürelerde enzimleri inaktive etti i ve askorbik asit, toplam fenolik madde üzerine daha az kayba neden oldu u bildirilmis tir. Önceki çalı malarda; farklı elma çe itlerinde dü ük sıcaklıkta (40, 50 ve 60 °C) ultrason uygulaması yapılmı ve toplam fenolik madde kayıpları maksimum %15 olarak tespit edilmi tir (Balar ve Ertugay,2013). Abid vd. (2014) yaptı ı çalı mada taze elma (Fuji) suyuna ultrasonik banyo (25 kHz, 30 dak, 0,06 W/cm³) ve prob tipi ultrason (20 kHz, 5 ve 10 dak, 0,30 W/cm³) kullanarak termosonikasyon i lemi uyguladı , 697,49 µg GAE/g olarak belirlenen taze elma suyunun toplam fenolik içeri i, 20 °C dü ük i lem sıcaklı ında kontrole kıyasla artmı tır. Ancak i lem sıcaklı ı 40 °C'den 60 °C'ye yükseldikçe, biyoaktif bile iklerin degradasyonu da artmı , yani sıcaklı ın bu bile iklerin seviyeleri üzerinde önemli bir etkiye sahip oldu u görülmü tür. Prob tipi ultrasonda belirlenen toplam fenolik madde de erleri, 60 °C'deki ultrasonik banyoda bulunan de erlere oranla

daha yüksek bulunmu tur. Benzer ekilde yapılan ba ka bir çalı mada bulanık elma suyuna ısıllı i lemle alternatif bir uygulama olan dü ük sıcaklıklarda (42-67 °C) ultrason uygulaması ve özünmü gazların (nitrojen ve karbondioksit) etkisi de incelenerek elma suyunda toplam fenolik madde miktarının, kontrole göre arttı ılı belirlenmi tir. Bununla birlikte toplam fenolik madde içeri indeki önemli farklılık 60-67 °C’de havanın azot ile yer de i tirmesi sonucu gözlenmi tir (Illera, 2018). Chitgar vd. (2018) tarafından yabanmersini suyunun renk ve antosiyanin stabilitesi üzerindeki etkisini incelemek için yapılan bir çalı mada, kontrol numunesinin toplam fenolik madde miktarı 1074 mg GAE/100 ml olarak belirlenmi tir. %70 genlik ve 45 °C’de yapılan termosonikasyonun, ısıllı i lemle kar ılı tırıldı ında meyve suyu örneklerinin toplam fenolik madde üzerinde küçük bir etkiye sahip oldu u belirlenmi tir.

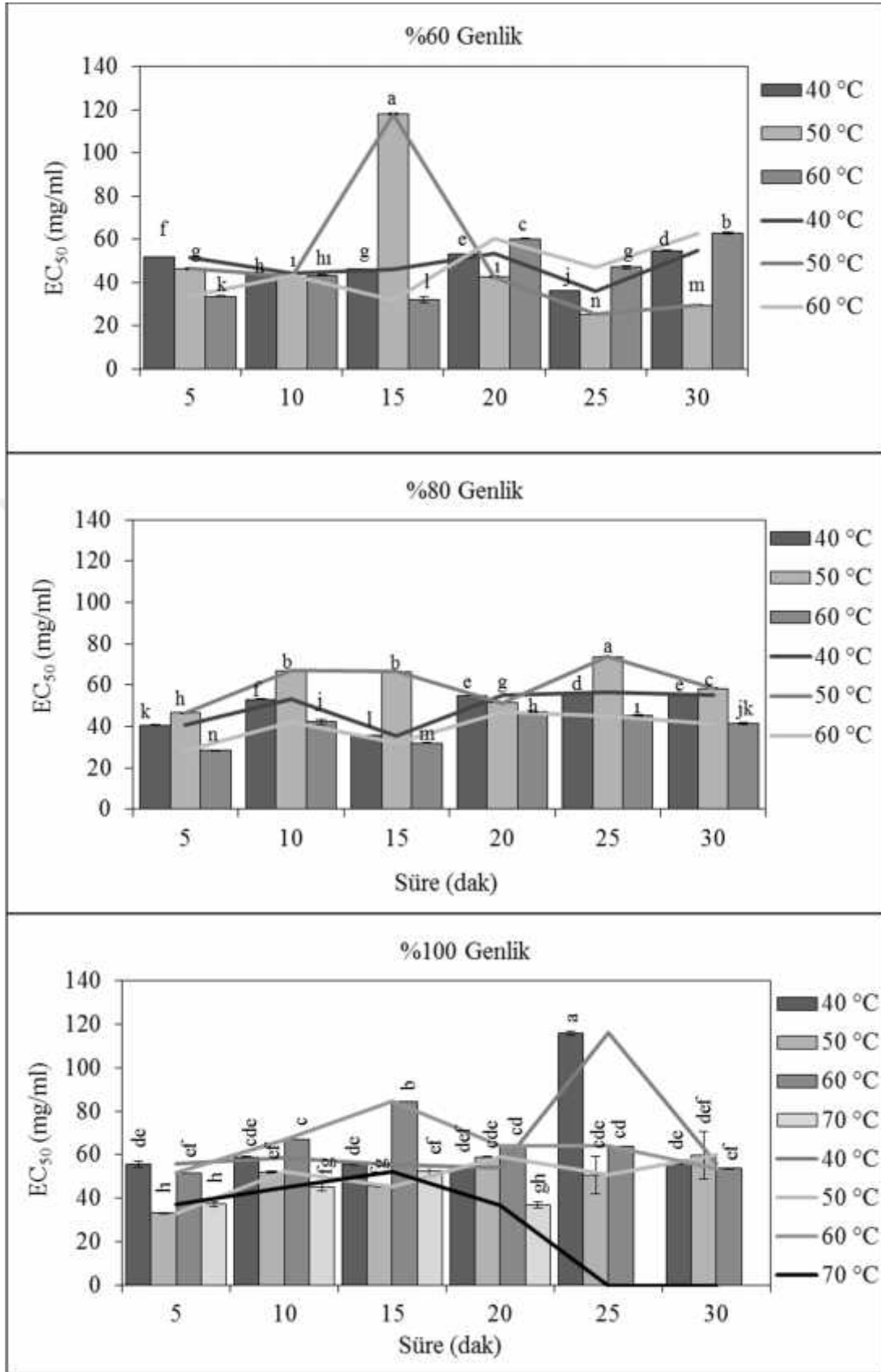
4.4 DPPH Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini

Yöntemde belirtildi i ekilde ekstrakte edilen elma suyu örneklerinde antioksidan aktivite DPPH yöntemi kullanılarak belirlenmi , örnek miktarına kar ılı hesaplanmı olan yüzde inhibisyon de erleri, lineer regresyon analizi uygulanarak bir grafi e aktarılmı ve e rinin denklemi kullanılarak EC₅₀ de eri (radikalin %50’sinin inhibisyonunu sağlayan miktar) hesaplanmı tir. Bu de er ne kadar küçük olursa, antioksidan aktivite o kadar yüksek demektir (Cemero lu, 2010). Farklı genlik, sıcaklık ve sürenin etkisiyle elma suyu örneklerinde bulunan EC₅₀ de erleri izelge 4.1’ de gösterilmi tir. Termosonikasyon i lem sonunda ekstrakte edilen elma suyu örneklerinde bulunan EC₅₀ de erlerindeki de i im ekil 4.5’ de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. TS i lemi ile elma suyu örneklerinde bulunan EC₅₀ de erleri

Süre (dak.)	%60 genlik			
	Sıcaklık (°C)			
	40	50	60	
0	28,39 ± 0,25	28,39 ± 0,25	28,39 ± 0,25	
5	51,84 ± 0,07 ^f	46,40 ± 0,32 ^g	33,70 ± 0,09 ^k	
10	44,15 ± 0,06 ^h	42,81 ± 0,29 ⁱ	43,32 ± 0,12 ^{h,i}	
15	46,38 ± 0,14 ^g	117,94 ± 0,38 ^a	32,12 ± 1,30 ^l	
20	53,33 ± 0,08 ^e	42,612 ± 0,36 ⁱ	60,32 ± 0,27 ^c	
25	36,19 ± 0,05 ^j	25,43 ± 0,21 ⁿ	47,14 ± 0,80 ^g	
30	54,78 ± 0,08 ^d	29,60 ± 0,40 ^m	62,81 ± 0,50 ^b	
Süre (dak.)	%80 genlik			
	Sıcaklık (°C)			
	40	50	60	
0	28,39 ± 0,25	28,39 ± 0,25	28,39 ± 0,25	
5	40,65 ± 0,18 ^k	46,51 ± 0,17 ^h	28,29 ± 0,36 ⁿ	
10	53,19 ± 0,27 ^f	67,11 ± 0,26 ^b	42,27 ± 1,27 ^j	
15	35,63 ± 0,17 ^l	66,52 ± 0,28 ^b	32,09 ± 0,38 ^m	
20	55,06 ± 0,24 ^e	51,31 ± 0,17 ^g	47,12 ± 0,48 ^h	
25	56,42 ± 0,25 ^d	73,80 ± 0,26 ^a	45,26 ± 0,49 ⁱ	
30	55,04 ± 0,26 ^e	58,32 ± 0,23 ^c	41,36 ± 0,46 ^{i,k}	
Süre (dak.)	%100 genlik			
	Sıcaklık (°C)			
	40	50	60	70
0	28,39 ± 0,25	28,39 ± 0,25	28,39 ± 0,25	28,39 ± 0,25
5	55,82 ± 1,37 ^{d,e}	33,08 ± 0,22 ^h	51,61 ± 0,03 ^{e,f}	37,23 ± 1,30 ^h
10	58,82 ± 0,41 ^{c,d,e}	52,14 ± 0,40 ^{e,f}	66,98 ± 0,06 ^c	45,05 ± 1,93 ^{f,g}
15	55,55 ± 0,38 ^{d,e}	45,47 ± 0,26 ^{f,g}	84,36 ± 0,08 ^b	52,24 ± 2,46 ^{e,f}
20	54,14 ± 0,36 ^{d,e,f}	58,96 ± 0,29 ^{c,d,e}	63,89 ± 0,05 ^{c,d}	36,91 ± 1,22 ^{g,h}
25	115,94 ± 0,82 ^a	50,77 ± 8,66 ^{c,d,e}	63,99 ± 0,04 ^{c,d}	
30	55,99 ± 0,32 ^{d,e}	59,78 ± 11,10 ^{d,e,f}	53,63 ± 0,076 ^{e,f}	

Aynı genlikteki farklı harfler (a, b, c...), de erler arasında önemli bir fark oldu unu göstermektedir.



Aynı grafikteki farklı harfler (a, b, c...), de erler arasında önemli bir fark oldu unu göstermektedir.

ekil 4.5. Elma suyu örneklerinde EC₅₀ de erlerindeki de i im

Analiz sonunda örneklerde termosonikasyon işlemi uygulanan her bir sıcaklık değeri için, süre arttıkça EC₅₀ değeri azalmıştır yani antioksidan aktivite deeri artmıştır. Toplam fenolik maddenin artmasına bağlı olarak genel anlamda antioksidan aktivitede artmaktadır. Antioksidan aktivitede gözlenen bu değişime, sıcaklığın, sürenin ve sıcaklık-süre etkileşiminin etkisi önemli bulunmuştur (p<0,05). Elma suyu ekstraktlarında %60 genlikte sıcaklık ve süre arttıkça, EC₅₀ değerlerinin azaldığı gözlenmiştir. Kontrol örneğinin EC₅₀ değeri 28,391 mg/ml olarak bulunmuştur.

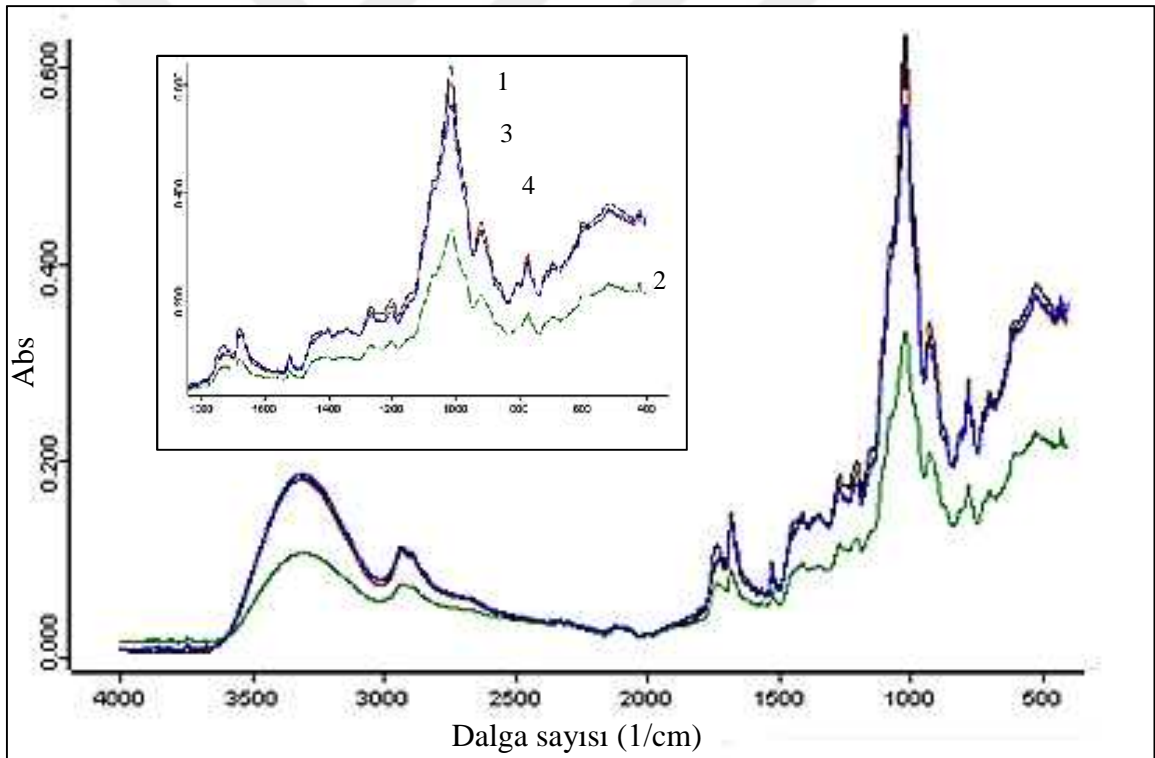
%60 genlik 40, 50, 60°C sıcaklık 5 ve 10 dakika termosonikasyon uygulaması sonunda EC₅₀ değerleri sırasıyla 51,844 ± 0,075, 46,401 ± 0,320, 33,692 ± 0,097 ve 44,157 ± 0,061, 42,809 ± 0,287, 43,322 ± 0,125 mg/ml'dir. Bununla birlikte artan sıcaklık ve süre ile (15, 20, 30 dak) EC₅₀ değerinde kontrole kıyasla artış gözlenmiş ya da daha az bir azalış saptanmıştır. Bu anlamda sıcaklığın elma suyunda bulunan fenolik bileşiklerin parçalanması ile antioksidan aktivitede azalma olabileceği düşünülmektedir.

%80 genlikte 40°C 5 dakika süre sonunda elde edilen EC₅₀ değeri, 40,656 ± 0,187 ve 30 dakika sonunda, 55,035 ± 0,257, 50 °C 5 dakika sürede 46,504 ± 0,168 ve 30 dakika işlem sonunda 58,328 ± 0,227'dir. Aynı şekilde 60°C 5 dakikada 28,290 ± 0,365 ve 30 dakika sonunda 41,360 ± 0,461'dir. %80 genlik aynı sıcaklık aralığında artan süre ile EC₅₀ değerleri artmıştır. Bu anlamda antioksidan aktivitenin azaldığı saptanmıştır.

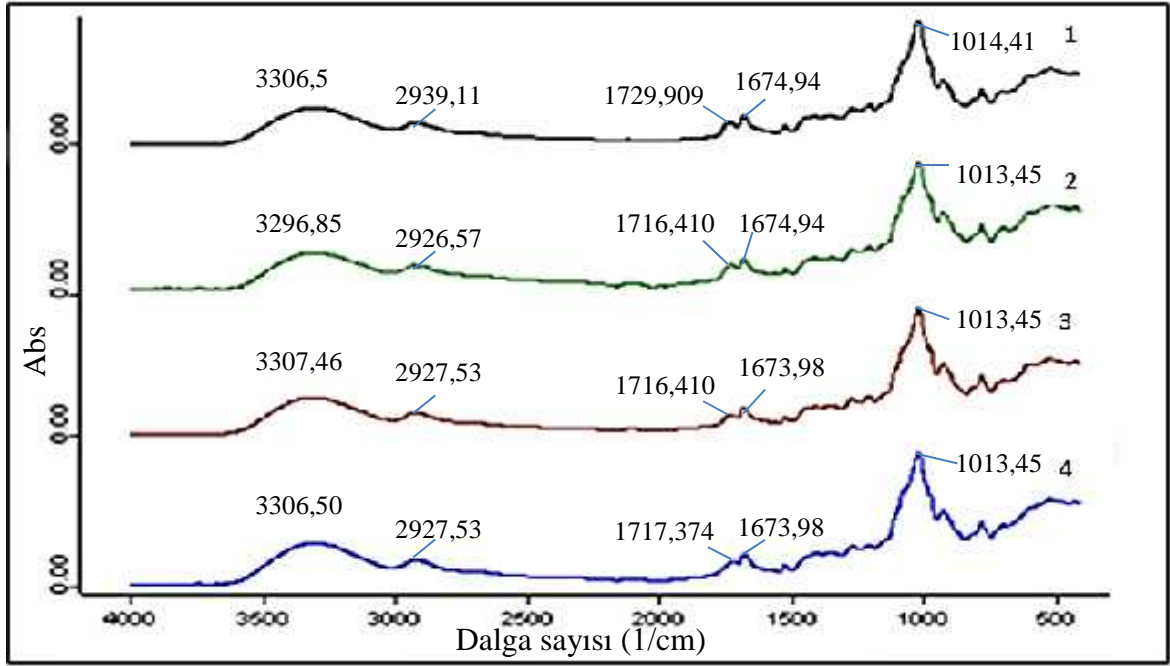
%100 genlikte yüksek sıcaklıklarda artan süre ile ilişkilendirildiğinde EC₅₀ değerleri azalmıştır. %100 genlik 40°C 5 dakika 55,825 ± 1,370 iken %100 genlik 70° 20 dakikadaki EC₅₀ değeri 36,0902 ± 1,218 mg/ml'dir. Bunun nedeni ekstrakte edilen fenolik madde miktarındaki artışa paralel olarak antioksidan aktivitenin artmasından kaynaklanmaktadır. Benzer şekilde Abid vd. (2014), yaptığı çalışmada taze elma (Fuji) suyunda termosonikasyon işlemi ile belirlediği koşullar kapsamında DPPH radikalinin % inhibisyon değerini sırasıyla 30, 60 ve 90 dk (artan süreye bağlı olarak); 39,71 ± 1,03, 43,38 ± 1,48, 46,94 ± 0,86 olarak bulmuştur. Antioksidan aktivitedeki bu azalışın sebebi, elma suyunda ultrasonik uygulama sırasında oluşan kavitasyon nedeniyle askorbik asit ve polifenolik bileşiklerinin miktarında azalış ile ilgili olduğu bildirilmiştir.

4.5 FTIR Çalışmaları

Bu çalışmada fenolik bileşiklerin FTIR spektroskopisi kullanılarak analizi yapılmıştır. Bu amaçla farklı genlik (%60, 80, 100) sabit süre (15 dak) ve sıcaklık (60 °C) uygulanmış örnekler ile farklı sıcaklık (40, 50, 60, 70 °C), sabit süre (15 dak) ve genlik (%100) uygulanmış örneklerde FTIR spektroskopisi kullanılarak fenolik bileşenler incelenmiştir. Kontrol örneği olarak termosonik işlem uygulanmamış elma suyu ekstraktı alınarak oda sıcaklığında (25 °C) FTIR spektrumları belirlenmiştir. Farklı genlik sabit sıcaklık ve süredeki elma suyu örneklerinin FTIR spektrumları ekil 4.6 ve ayrı ayrı FTIR spektrumları 4.7’de gösterilmiştir, 1- kontrol (taze meyve suyu), 2- %60 60 °C 15 dak, 3- %80 60 °C 15 dak, 4- %100 60 °C 15 dak işlem gören örnekleri ifade etmektedir.



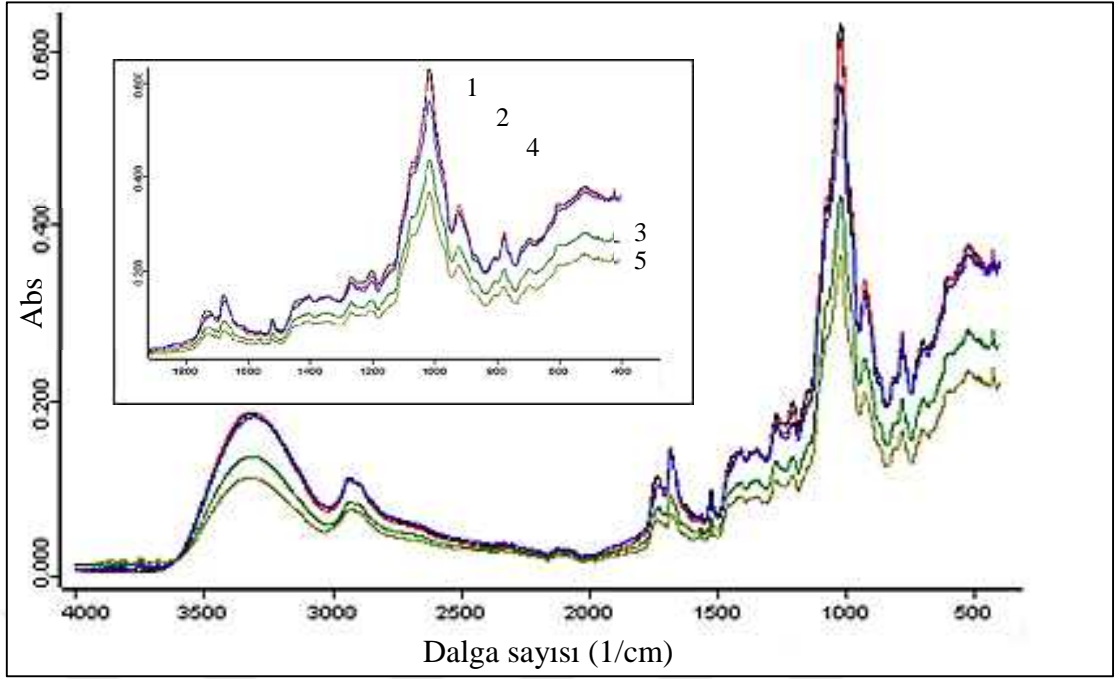
ekil 4.6. TS uygulama sonunda elma suyu örneklerinin FTIR spektrumları



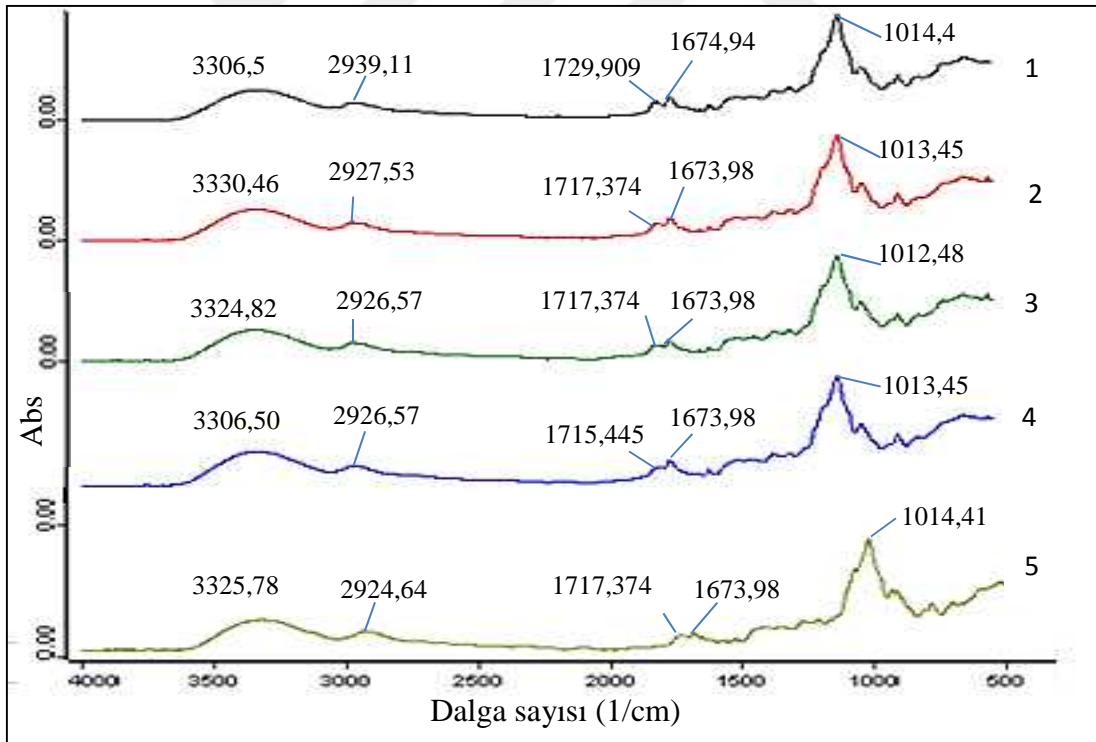
ekil 4.7. TS i lem sonunda elma suyu örneklerinin ayrı tırılmı FTIR spektrumları

Spektrum analizi sonucunda 1800- 750 1/cm arasında yer alan bantlar (parmak izi bölgeleri) yaygın olarak bitkilerdeki polifenoller ile ili kilendirilmi tir. 3000–3300 1/cm hatta 2800 1/cm'e kadar uzayan bantların, aromatik halkanın C-H germe titre imlerinden kaynaklandı ı belirtilmi tir (Okur vd., 2019). Farklı genlik, sabit sıcaklık ve sürelerde termosonikasyon uygulanan elma suyunun ayrı tırılmı FTIR spektrumu incelendi inde fenolik bile i klerde önemli bir de i klik olmamı tir. Literatürde, aril (hidroksibenzoik asitler) ve / veya , -doymamı (hidroksisinamik asitler) karboksilik asit yapıları (C=O) germe titre imleri, 1715-1680 1/cm bölgesindeki bantları göstermektedir. Ayrıca klorojenik asit, 1720 1/cm civarında bir bant vermektedir (Abbas vd., 2017). 1500–1150 1/cm aralı ndaki bantların CH (fenoller) ve OH titre imleri nedeniyle oldu u rapor edilmi tir. 1014 1/cm'de bulunan bant, pıran halkasının OH ikamesinin C – O esnemesini ifade etmekte ve özellikle epikate in ile ili kilendirilmektedir (Okur vd., 2019).

Farklı sıcaklıklar, sabit süre ve genlikteki elma suyu örneklerinin FTIR spektrumları ekil 4.8 ve ayrı tırılmı FTIR spektrumları 4.9'de gösterilmektedir.



ekil 4.8. TS uygulama sonunda elma suyu örneklerinin FTIR spektrumları



ekil 4.9. TS i lem sonunda elma suyunun ayrı tırılımı FTIR spektrumları

Elde edilen spektrum analizinde, 1- kontrol (taze meyve suyu), 2- %100 40 °C 15 dak, 3- %100 50 °C 15 dak, 4- %100 60 °C 15, 5- %100 70 °C 15 dak i lem gören örnekleri ifade etmektedir. Daha önce yapılan spektrum analizi sonucuna benzer ekilde 1800-750 1/cm arasında yer alan bantlar (parmak izi bölgeleri) yaygın olarak bitkilerdeki polifenoller ile ili kilendirilmi tir. 3000–3300 1/cm hatta 2800 1/cm'e kadar uzayan bantların, aromatik halkanın C-H germe titre imlerinden kaynaklandı ı belirtilmi tir (Okur vd., 2019). Farklı sıcaklıklar, sabit süre ve genlikte termosonikasyon uygulanan elma suyunun ayrı tırılmı FTIR spektrumu incelendi inde fenolik bile iklerde önemli bir de i iklik olmadı ı belirlenmi tir. Literatürde, 1715-1680 1/cm bölgesindeki bantlar, aril (hidroksibenzoik asitler) ve / veya , -doymamı (hidroksisinamik asitler) karboksilik asit yapıları (C=O) germe titre imlerinden kaynaklandı ı gösterilmi tir. Ayrıca 1720 1/cm civarında klorojenik asit bir bant vermektedir (Abbas vd., 2017). 1500–1150 1/cm aralı ındaki bantların CH (fenoller) ve OH titre imleri nedeniyle oldu u rapor edilmi tir. 1014 1/cm'de bulunan bant, piran halkasının OH ikamesinin C – O esnemesini ifade etmekte ve özellikle epikate in ile ili kilendirilmektedir (Okur vd., 2019).

4.6 HPLC Çalı maları

Elma suyunun fenolik içeri ini belirlemek ve farklı i lem ko ullarında de i imini incelemek için HPLC yöntemi uygulanmı tir. Buna göre kontrol örne i ve farklı ko ullarda i lem gören elma sularında belirlenen fenolik bile ikler ve miktarları Çizelge 4.2' de gösterilmektedir.

Çizelge 4.2. HPLC ile belirlenen fenolik bileşikler ve miktarları

Numune	Kate in (mg/kg)	Klorojenik asit (mg/kg)	Kafeik asit (mg/kg)	Epikate in (mg/kg)	Kamferol (mg/kg)
Kontrol	6	21,5		14,5	3
%60-60 °C -15dk	5	18		13	5
%80-60 °C -15dk	11,5	18,5		22	4
%100-40 °C -15dk	1,5	1,5	1,5	<LOQ	11
%100-50 °C -15dk	2	2,5	1,5	<LOQ	3,5
%100-60 °C -15dk	2	3,5		<LOQ	3
%100-70 °C -15dk	4,5	6,5		5	4

(Epikate in için LOD: 0,3 mg/L, LOQ: 0,8 mg/L)

Taze elma suyunda HPLC Yöntemi ile belirlenen fenolik bileşikler kate in, klorojenik asit, epikte in ve kamferoldur ve miktarları sırasıyla 6,0, 21,5, 14,5 ve 3,0 mg/kg olarak bulunmuştur. %60 genlik 60 °C sıcaklık ve 15 dakika işlem sonunda HPLC ile fenolik bileşik içeriğindeki kate in (5,0 mg/kg), klorojenik asit (18,0 mg/kg) ve epikte in (13,0 mg/kg) miktarı kontrole kıyasla azalırken kamferol miktarı (5,0 mg/kg) artmıştır. %80 genlik 60 °C sıcaklık 15 dakika süre sonunda HPLC ile elde olunan sonuçlara göre kate in (11,5 mg/kg), epikate in (22 mg/kg) ve kamferol (4,0 mg/kg) miktarı kontrole kıyasla artarken klorojenik asit (18,5 mg/kg) miktarı azalmıştır.

%100 genlik farklı sıcaklıklar (40, 50, 60, 70 °C) ve 15 dakika termosonik işlem uygulanan elma suyu örneklerinde HPLC yöntemi ile belirlenen fenolik bileşiklerin miktarları kontrole göre düşük olduğu saptanmıştır. Ancak durum kamferol miktarı için aynı değildir. %100 genlik 40 °C 15 dakika uygulanan elma suyu örneğinde kamferol miktarı 11,0 mg/kg düzeyinde olduğu görülmüştür. Bununla birlikte %100 genlikte 40 °C ve 50 °C sıcaklık 15 dakika sürede termosonik işlem uygulanan örneklerde HPLC ile kafeik asit 1,5 mg/kg olarak miktarı tespit edilmiştir.

Çalı mamıza kıyasla Markowski ve Płocharski (2006), ara tırmasında Jonagold, Sampion, Idared ve Topaz elma çe itleri ve bu çe itlerin i lenmi ürünlerinde HPLC yöntemi kullanarak yaygın bulunan fenolik bile enlerden, flavonolleri (kuersetin), fenolik asitler ve dihidrokalkonları tespit etmi tir. Benzer ekilde Rana ve Bhushan (2016), yaptıkları derleme makalede, taze elmada, yapraklarda, a aç kabu unda ve posada polifenollerin yapısal sınıfları arasında flavonoller (kuersetin, kamferol ve rutin), dihidrokalkonlar (florelin ve floridzin), flavan-3-oller (epikate in ve prosiyanidinler) ve fenolik asitler (kafeik asit ve kumarik asit) bulundu u belirtilmi tir. Yapılan ba ka bir çalı mada elma kabu u ete göre toplam fenolik bile ikler, toplam prosiyanidinler ve toplam flavonoidler açısından daha zengin oldu u ve çe itlerden ba ımsız olarak kuersetin, kate in, epikate in, floridzin, prosiyanidin B₂ ve C₁'in elmanın kabu unda etinden daha yüksek oranda bulundu u rapor edilmi tir (Kalinowska vd., 2014). Genel olarak, her bir elma için polifenolik bile ikler 19,6 ila 55,8 (flavan-3-oller), 17,7-33,1 (flavonoller) ve 10,6-80,3 (klorojenik asit) mg olarak belirlenmi ; en dü ük de erler floridzin (her bir elmada 1,0-9,3 mg/100 g elma) ve antosiyanin (her bir elmada 0,1-6,5 mg/100 g elma) için kaydedilmi tir (Francini ve Sebastiani, 2013).

BÖLÜM V

SONUÇLAR

Yapılan çalı mada farklı genlik (%60, 80, 100) farklı sıcaklık (40, 50, 60 ve 70 °C) ve sürelerin (5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dakika) sa landı ı termosonikasyon uygulaması ile meyve suyuna en çok i lenen ürünler arasında olan elma suyu içinde bulunan fenolik bile iklerdeki de i imin FTIR spektroskopi ve HPLC kullanılarak belirlenmesi ve enzimatik esmerle meye neden olan PPO, POD enzimlerinin inaktivasyonu incelenmi tir. Buna göre, genel olarak artan güç, sıcaklık ve süre ile enzim inaktivasyonu artmı tir. PPO enzimi için %100 genlik 70 °C sıcaklıkta 15 dakika sonunda kalan enzim aktivitesi $0,214 \pm 0,004$ ile %99'luk inaktivasyon sa lanırken, POD enzimi için $5,507 \pm 0,181$ kalan enzim aktivitesi %100 genlik 70 °C sıcaklık 15 dakika süre sonunda saptanmı , %94,5 oranla inaktivasyon sa lanmı tir. Elma POD enziminin PPO' a göre ısıya daha dirençli oldu u belirlenmi tir.

Isıl i lemlere göre, gıda kalitesini koruması gibi avantajları ile termosonikasyon i leminin gıda endüstrisinde kullanımı gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Antioksidan özellik gösteren fenolik bile enler (biyoﬂavonoid) beslenme fizyolojisi ve sa lık üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle tüketiciler tarafından yo un ilgi görmekte ve fonksiyonel gıdalara olan talep artmaktadır. Termosonikasyon i lemi ile belirlenen ko ullar dahilinde elde edilen örneklerden, %60 genlik için sabit süre dü ünüldü ünde dü ük sıcaklıklarda (40-50 °C) süre arttıkça toplam fenolik madde miktarında artı saptanmı tir. Ancak 60 °C i lem sıcaklı ında artan sürenin etkisine ba lı olarak elma sularında toplam fenolik madde miktarı azalmı tir. %80 genlikte dü ük sıcaklıklarda (40 °C) kısa süre (5, 10 ve 15 dakika) i lem uygulanan örneklerde toplam fenolik madde miktarı kontrole kıyasla artmı , aynı ko ullarda süre arttıkça azalı gözlenmi tir. %80 genlik ve 60 °C sıcaklık uygulamasında fenolik bile iklerin daha iyi korundu u belirlenmi ve 15 dakika süre sonunda toplam fenolik madde miktarı $586,055 \pm 1,261$ mg GAE/kg YA olarak saptanmı tir. %100 genlik 40 ve 50 °C sıcaklıkta süre arttıkça 10 dakikadan sonra toplam fenolik madde miktarında azalma gözlenmi tir. %100 genlik 60 °C sıcaklıkta 10 dakika süreye kadar azalan fenolik madde miktarı, 25 dakikaya kadar artmı ve 30 dakika sonunda azaldı ı saptanmı tir. 70 °C sıcaklıkta artan süre ile toplam fenolik madde artı gösterse de elde edilen miktarlar % 80 genlik 60 °C

sıcaklıkta elde edilen değerlerden düşüktür. Buna göre yüksek gücün fenolik bileşikler üzerinde tahrip edici etkisi olduğu görülmüştür. Termosonikasyon uygulama sonunda elma suyunda %60, %80 ve %100 genliklerde genel olarak her bir sıcaklık değeri için EC₅₀ değeri, kontrol örneğine kıyasla artmış, yani antioksidan aktivite azalmıştır. Bununla beraber toplam fenolik madde için elde edilen değerlere benzer şekilde antioksidan aktivitenin en iyi korunduğu termosonikasyon uygulaması olarak %80 genlik, 60 °C sıcaklık ve 15 dakika süre belirlenmiştir. Bu koşullarda EC₅₀ değeri 32,096 ± 0,386 mg/ml olarak saptanmıştır.

FTIR spektroskopisi ile farklı genlik, farklı sıcaklık ve sabit süredeki (15 dak) örneklerden elde edilen ayrı ayrı spektrumlar incelendiğinde fenolik bileşiklerde önemli bir değişim görülmemiştir. FTIR spektrumları parmak izi bölgesi incelendiğinde epikatein ve klorojenik asitle uyumlu spesifik bantlar olduğu belirlenmiştir. FTIR sonuçları ile HPLC sonuçları paralellik göstermektedir. Farklı bitki özleri ve gıda örneklerinde fenolik bileşiklerin analizi için kullanılan yaygın ve güvenilir yöntem olarak HPLC ile taze ve işlem görmüş elma suyunda fenolik bileşiklerden epikatein, klorojenik asit, kafeik asit, epikatein, ve kamferol saptanmış ve miktarları mg/kg olarak belirtilmiştir. %60 genlikte 60 °C 15 dak işlem sonunda elma suyunun fenolik bileşik içeriğindeki epikatein (5,0 mg/kg), klorojenik asit (18,0 mg/kg) ve epikatein (13,0 mg/kg) miktarı kontrole kıyasla azalırken kamferol miktarı (5,0 mg/kg) artmıştır. Aynı şekilde %80 genlikte 60 °C 15dk süre sonunda epikatein (11,5 mg/kg), epikatein (2,2 mg/kg) ve kamferol (4,0 mg/kg) miktarı artmış gösterirken klorojenik asit (18,5 mg/kg) miktarı azalmıştır. %100 genlik farklı sıcaklıklar (40, 50, 60, 70 °C) ve 15 dakika termosonik işlem uygulanan elma suyu örneklerinde HPLC yöntemi ile belirlenen fenolik bileşiklerin miktarları kontrole göre düşüktür. Buna göre FTIR ve HPLC ile belirlenen fenolik bileşik içeriğinin uyumlu olduğu görülmüştür.

Yapılan bu çalışma ile elma suyuna uygulanan termosonikasyon işlemi ile farklı genlik, sıcaklık ve sürenin PPO ve POD enzimi ile fenolik bileşik ve antioksidan aktiviteye etkisi belirlenmiş ve termosonikasyon uygulamasının enzim inaktivasyonunu sağlarken, fenolik bileşikler artırdığı gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre termosonikasyon uygulaması elma sularının işlenmesinde gelecek vaat eden bir yöntem olarak önerilebilmektedir.

KAYNAKLAR

Abbas, O., Compèreb, G., Larondelleb, Y., Pompeuc, D., Rogezd, H. and Baetena, V., “Phenolic compound explorer: A mid-infrared spectroscopy database”, *Vibrational Spectroscopy* 92, 111–118, 2017.

Abid, M., Jabbar, S., Hu, B., Hashim, M. M., Wu, T., Lei, S., Khan, M. K. and Zeng, X., “Thermosonication as a potential quality enhancement technique of apple juice”, *Ultrasonics Sonochemistry* 21, 984–990, 2014.

Altemimi., Watson, D. G., Choudhary, R., Dasari, M. R. and Lightfoot, D. A., “Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from peaches and pumpkins”. *Plos One* 11(2), e0148758,2016.

Anonim., “Türkiye meyve suyu vb. ürünler sanayi raporu”., <https://www.meyed.org.tr>. 2011 (Eri im tarihi: 15 Mart 2015).

Anonim., “Bahçecilik, Kütüphane, Meyve Yeti tirme”, <http://defteriniz.com/elma-uretimi-meyve-yetistirme/27891/>, 2016.

Bahçeci, S., Dondurularak muhafaza edilen edilen bazı sebzelerde peroksidaz ve lipoksigenaz enzimlerinin termal inaktivasyon ve reaksiyon ko ullarının belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 2003.

Baltacıo lu, H., Bayındırlı, A., Severcan, M. and Severcan, F., “Effect of thermal treatment on secondary structure and conformational change of mushroom polyphenol oxidase (PPO) as food quality related enzyme: A FTIR study”, *Food Chemistry* 187, 263-269, 2015.

Baltacıo lu, H., Bayındırlı, A. and Severcan, F., “Secondary structure and conformational change of mushroom polyphenol oxidase during thermosonication treatment by using FTIR spectroscopy”, *Food Chemistry* 214, 507-514, 2017.

Barth, A., “Infrared spectroscopy of proteins”, *Biochimica et Biophysica Acta* 1767, 1073–1101, 2007.

Ba lar, M. and Ertugay, M. F., “The effect of ultrasound and photosonation treatment on polyphenoloxidase (PPO) activity, total phenolic component and colour of apple juice”, *International Journal of Food Science and Technology* 48, 886–892, 2013.

Blois, M. S., “Antioxidant determinations by the use of stable free radical”. *Nature* 1199-1200, 1958.

Bot, F., Calligaris, S., Cortella, G., Plazzotta, S., Nocera, F. and Anese, M., “Study on high pressure homogenization and high power ultrasound effectiveness in inhibiting polyphenoloxidase activity in apple juice”. *Journal of Food Engineering* 221, 70-76, 2018.

Büyüksırt, T. ve Kulea an, H., “Fourier dönü ümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ve gıda analizlerinde kullanımı”, *Gıda* 2014.

Carbonaro, M. and Nucara A., “Secondary structure of food proteins by Fourier transform spectroscopy in the mid-infrared region”, *Amino Acids* 38, 679–690, 2010.

Cemero lu B., Yemenicio lu A. ve Özkan M., “Meyve ve sebzelerin bile imi so ukta depolanmaları”, *Gıda Teknolojisi Derne i Yayınları*, No:24, Ankara, 2001.

Cemero lu B., Gıda Analizleri, *Gıda Teknolojileri Derne i Yayınları*, No: 34, 2010.

Cheng, L. H., Soh, C. Y., Liew, S.C. and Teh, F. F., “Effects of sonication and carbonation on guava juice quality”, *Food Chemistry* 104(4), 1396–1401, 2007.

Cheng, X. F., Zhang, M. and Adhikari, B., “The inactivation kinetics of polyphenol oxidase in mushroom (*Agaricus bisporus*) during thermal and thermosonic treatments”. *Ultrasonics Sonochemistry* 20(2), 674–679, 2013.

Chitgar, M. F., Aalamia, M., Kadkhodaeab, R., Maghsoudloua, Y. and Milani, E., “Effect of thermosonication and thermal treatments on phytochemical stability of barberry juice copigmented with ferulic acid and licorice extract”, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 50,102–111, 2018.

Cruz R. M. S, Vieira M. C. and Silva C. L. M., “Effect of heat and thermosonication treatments on peroxidase inactivation kinetics in watercress (*Nasturtium Officinale*)”, *Journal of Food Engineering* 72, 8–15, 2006.

Damodaran, S., Parkin, K. L. and Fennema, O. R., “Fennema’s Food Chemistry”, Fourth Edition, *CRC Press* Boca Raton, 2008.

Demirdöven, A. ve Baysal T., “Meyve ve sebze i leme sanayinde yeni uygulamalar”, *Türkiye 10. Gıda Kongresi*; 21-23 Mayıs 2008.

Demirta , C., Termosonikasyon uygulamasının elma suyunun kalite özellikleri ve raf ömrü üzerine etkisi, Yüksek Lisans Tezi,*Yıldız Teknik Üniversitesi*, 2018.

Dias, D. R. C., Barros, Z. M. P. and De Carvalho, C. B. O., Honorato, F. A., Guerra, N. B., Azoubel, P. M., “Effect of sonication on soursop juice quality”. *LWT – Food Science and Technology* 62(1), 883–889, 2015.

Durst, R. and Weaver, G., “Nutritional content of fresh and canned peache”, *Journal of The Science of Food And Agriculture* 93(3), 593-603, 2013.

Erdo an, S. S., Masum B., Göksel Z. ve Kılınc A., “Bazı elma çe itlerinin elma suyu üretimine uygunlu unun ara tırılması”, *Bahçe* 40 (1): 9 – 16, 2011.

FAO, “Dünya elma üretim de erleri”, <http://faostat.fao.org>., 2017 (Eri im tarihi 15.05.2019).

Feng, H., Barbosa-Cánovas, G. V. and Weiss, J., “Ultrasound technologies for food and bioprocessing”, *Springer Science+Business Media* LLC, 2011.

Freifelder, D., “Physical chemistry, applications to biochemistry and molecular biology”, *New York* 1982.

Francini A. and Sebastiani L., “Phenolic compounds in apple (*Malus domestica* Borkh.): compounds characterization and stability during postharvest and after processing”, *Antioxidants* 181-193, 2013.

Haris P.I. and Severcan F., “FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 7, 207–221, 1999.

Illera, A. E., Sanz, M. T., Benito-Román, O., Varona, S., Beltrán, S., Melgosa, R. and Solaesa, A. G., “Effect of thermosonication batch treatment on enzyme inactivation kinetics and other quality parameters of cloudy apple juice”, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 47, 71–80, 2018.

Inal, S., Afinite kromotografisi tekni i le peroksidaz enziminin kırmızı pancardan (*Beta vulgaris*) safla tırılması ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, *Atatürk Üniversitesi*, 2013.

Kalinowska, M., Bielawska, A., Lewandowska-Siwkiewicz, H., Priebe, W. and Lewandowski, W., “Apples: content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties”, *Plant Physiology and Biochemistry* 84, 169-188, 2014.

Karadeniz F., Elma suyunda fenolik madde da ılımı ve konsantreye i leme sırasında de i imi, Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi*, 1994.

Karadeniz, F., Ek i A., “Elma suyunda esmerle me düzeyi ile do al etkenler arasındaki ili ki”. *Tarım Bilimleri Dergisi* 7(3), 135-141, 2001.

Karakaplan, M., “Nar, ayva ve elma sularında fenolik bile iklerin HPLC ve LC MS/MS ile incelenmesi”, Doktora Tezi, *TÜ Fen Bilimleri Enstitüsü*, stanbul, 2019.

Kılıç, A., Bartın, *Orman Fakültesi Dergisi* Cilt:10 Sayı:13, 2008.

Kılıç, Gülden. ve Karahan, A. G., “Fourier dönü ümlü kızıl ötesi (FTIR) spektroskopisi ve laktik asit bakterilerinin tanısında kullanılması”, *Gıda* 35 (6): 445-452, 2010.

Kuldiloke, J., Effect of ultrasound, temperature and pressure treatments on enzyme activity and quality indicators of fruit and vegetable juices, Doktora tezi, *Gıda Biyoteknolojisi ve Proses Mühendisli i*, Berlin Teknik Üniversitesi, 2002.

Kuç, A. ve Bulantekin, Ö., “The effects of production methods and storage on the chemical constituents of apple pekmez”, *Journal of Food Science and Technology* 2016.

Lee K. W., Kim Y. J., Kim D., Lee H. J. and Lee C. Y., “Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003.

Liu, L., Cao, S. Q., Qi, X. Y. and Yang, Z. F., “The effect of pH on the activity, thermokinetics and inhibition of polyphenol oxidase from peach”, *Journal Food Science Technology* 52(11), 7465–7471, 2015a.

Liu, Q., Wang, R. F., Zhang, B. B., Zhao, X. Y., Wang, D. and Zhang, C., “Protein secondary structure changes of watermelon juice treated with high hydrostatic pressure by FTIR spectroscopy”, *Journal of Food Process Engineering* 37, 543–549, 2015b.

Lu, X., Wang, J., Al-Qadiri, H. M., Ross, C.F., Powers, J. R., Tang, J. and Rasco, B. A., “Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of onion (*Allium cepa*) and shallot (*Allium oschaninii*) using infrared spectroscopy”, *Food Chemistry* 129, 637–644, 2011.

Lurie, S. and Crisosto, C. H., “Chilling injury in peach and nectarine”, *Postharvest Biology And Technology* 37(3), 195-208, 2005.

Mantsch, H. H., “Infrared and raman spectroscopy of biological materials”, *Marcel Dekker*, 2001.

Markowski, J. and Płocharski, W., “Determination of phenolic compounds in apples and processed apple products”, *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 2006.

Naczki, M. and Shahidi, F., “Extraction and analysis of phenolics in food”, *Journal Chromatography A*. 1054, 95-111, 2004.

Nizamlio lu N. M. ve Nas, S., “Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler; yapıları ve önemleri”, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi* Cilt:5, No: 1, 2010 .

Nogales-Bueno, J., Baca-Bocanegra, B., Rooney, A., Hernández-Hierro, J. M., Heredia, F. J. and Byrne, H. J., “Linking ATR-FTIR and raman features to phenolic extractability and other attributes in grape skin”, *Talanta* 167, 44–50, 2017a.

Nogales-Bueno, J., Baca-Bocanegra, B., Rooney, A., Hernández-Hierro, J. M., Byrne, H. J. and Heredia, F. J., “Study of phenolic extractability in grape seeds by means of ATR-FTIR and raman spectroscopy”, *Food Chemistry* 232, 602–609, 2017b.

Okur, ., Baltacıo lu C., Baltacıo lu H., Alpas H. ve Açam E., “Evaluation of the effect of different extraction techniques on sour cherry pomace phenolic content and antioxidant activity and determination of phenolic compounds by FTIR and HPLC”, *Waste and Biomass Valorization* 2019.

Ozyurt, V. H., Cier F. and Otles S., “Effects of the thermoneutral clarification on the rheological properties of apple juice”, *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI – Food Technology* 43(1), 81-93, 2019.

O’Donnell, C. P., Tiwari, B. K., Bourke, P. and Cullen, P. J., “Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance”, *Trends in Food Science & Technology* 21, 358-367, 2010,

Önez, Z., Üzümden (*Vitis Vinifera L.*) izole edilen polifenol oksidaz enziminin özelliklerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 2006.

Rana, S. and Bhushan, S., “Apple phenolics as nutraceuticals: assessment, analysis and application”, *Journal Food Science Technologi* 53(4):1727–1738, 2016.

Ricci, A., Olejar, K. J., Parpinello, G. P., Kilmartin, P. A. and Versari, A., “Application of fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy in the characterization of tannins”. *Applied Spectroscopy Reviews* 50, 407–442, (2015).

Severcan, M., Severcan, F. and Haris, P. I., “Estimation of protein secondary structure from FTIR spectra using neural networks”, *Journal of Molecular Structure* 565-566, 383-387, 2001.

Silva, L. C. A., Almeida, P.S., Rodrigues, S. and Fernandes, F. A. N., “Inactivation of polyphenoloxidase and peroxidase apple cubes and in apple juice subjected to high intensity power ultrasound processing”, *Journal of Food Processing and Preservation* 39, 2081–2087, 2015.

Singleton, V. L. and Rossi, J. A., “Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents”, *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144–158, 1965.

Sulaiman, A., Soo, M. J., Farid, M. and Silva, F. V. M., “Thermosonication for polyphenoloxidase inactivation in fruits: Modeling the ultrasound and thermal kinetics in pear, apple and strawberry purees at different temperatures”, *Journal of Food Engineering* 165, 133–140, 2015.

Tahir, H. E., Xiaobo, Z., Zhihua, L., Jiyong, S., Zhai, X. and Mariod, A. A., “Rapid prediction of phenolic compounds and antioxidant activity of sudanese honey using raman and fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy”, *Food Chemistry* 226, 202–211, 2017.

Terefe, N. S., Buckow, R. and Versteeg, C., “Quality-related enzymes in fruit and vegetable products: effects of novel food processing technologies part 1: high-pressure processing”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 54(1), 24-63, 2014.

Toralles, R. P., Vendruscolo, J. L., Vendruscolo, C. T., Del Pino, F. A. B. and Antunes, P. L., “Properties of polyphenoloxidase and peroxidase from granada clingstone peaches”, *Braz. Journal Food Technologi* 8(3), 233-242, 2005.

Vrhovsek, U., Rigo, A., Tonon, D. and Mattivi, F., “Quantitation of polyphenols in different apple varieties”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (21): 6532-6538, 2004.

Yemenicio lu, A., Özkan, M. and Cemero lu, B., “Heat inactivation kinetics of apple polyphenoloxidase and activation of its latent form”, *Journal of Food Science* 62(3), 508-510, 1997.

Yemenicio lu, A. ve Cemero lu, B., “Hale haven eftalilerinde polifenol oksidaz enzimlerinin bazı nitelikleri”, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 22, 261-265, 1998.

Yemenicio lu, A. ve Cemero lu, B., “Enzimlerin aktivasyon ve rejenerasyonunun gıdaların kalitesi üzerine etkileri”, *The Effect of Enzyme Activation and Regeneration on Food Quality* 23,415-423,1998.

Yılmaz F. M., “Vi ne (*Prunus cerasus* L.) posasından fenolik madde ekstraksiyonun optimizasyonu”, Doktora Tezi, *Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 2012.

Yılmaz L. ve Elmacı Y., “Polifenol oksidaz enzimi ve inaktivasyon yöntemleri”, *Türk Tarım Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi* 6(3):333-345, 2018.

Yi, J. Y., Dong, P., Wang, Y. T., Jiang, B., Liao, X. J., Hu, X. S. and Zhang, Y., “Study on the effect of high hydrostatic pressure treatment on the secondary structure of mushroom polyphenoloxidase by SRCD and FTIR”, *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi/Spectroscopy and Spectral Analysis* 32(2), 317-323, 2012.

Yüksel, F., Gıda Teknolojisinde Ultrason Uygulamaları, *Gıda Teknolojisi Dergisi* 30 s, 2013.

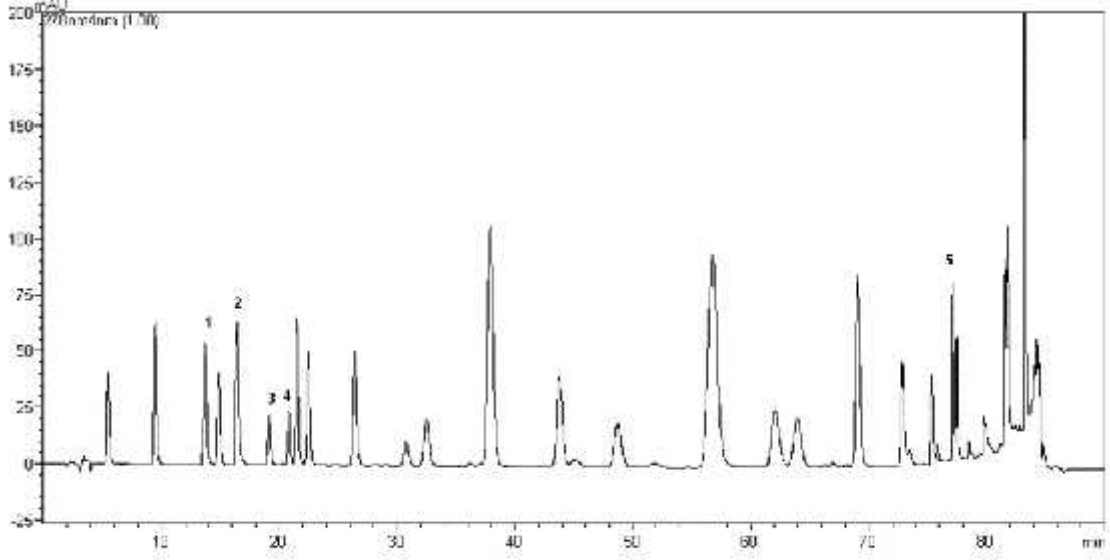
Zoral, F. B. ve Turgay Ö., “Çe itli gıda atıklarının toplam fenolik madde içeri inin, antioksidan ve antimikrobiyel aktivitelelerinin ara tırılması”, *KSÜ Do a Bilim Dergisi* 17(2), 2014.

Wang J., Zhao Y. M., Tian Y. T., Yan C. L., Guo C. Y., “Ultrasound-Assisted extraction of total phenolic compounds from inula helenium”, *Scientific World J. Doi* 2013.



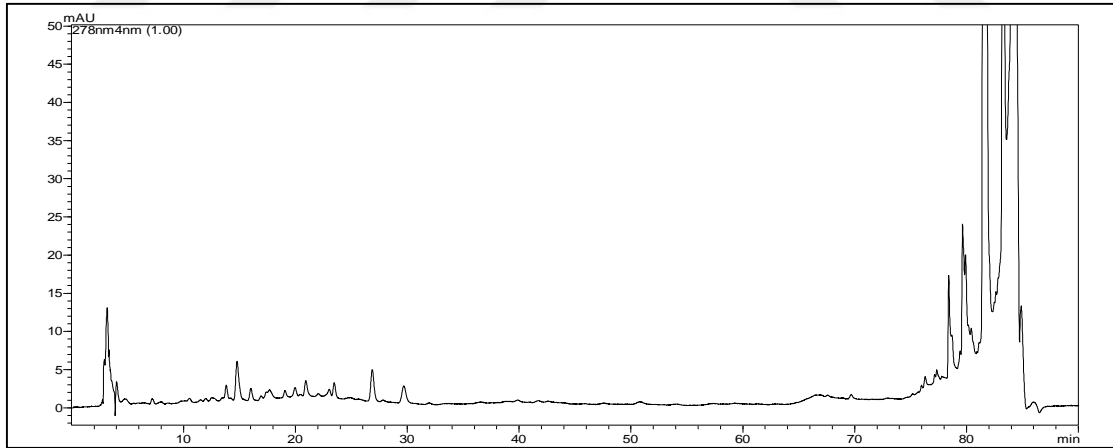
EKLER

EK 1. Standart kromotogram

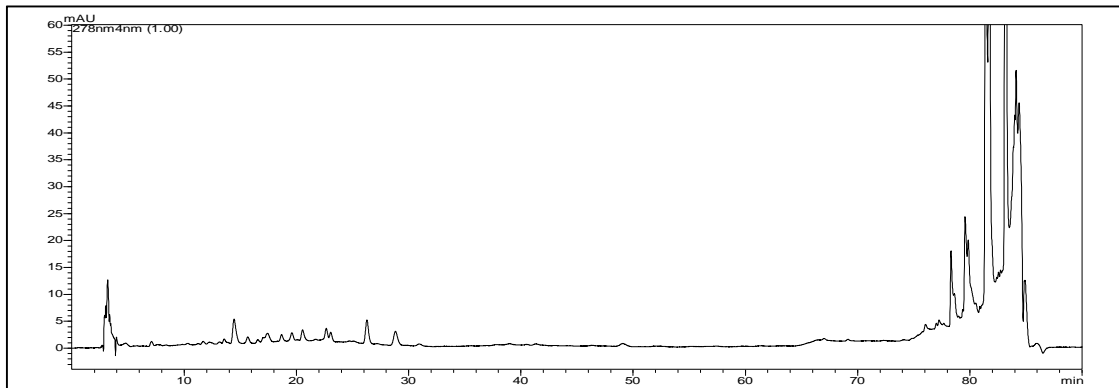


1: kate in 2: klorojenik asit 3: kafeik asit 4: epikate in 5: kamferol

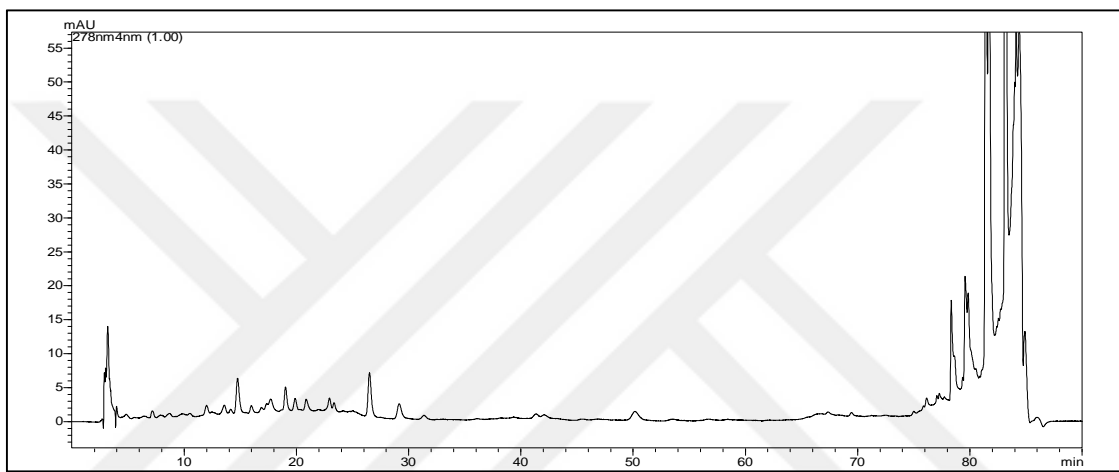
EK 2. Kontrol Numune kromotogramı



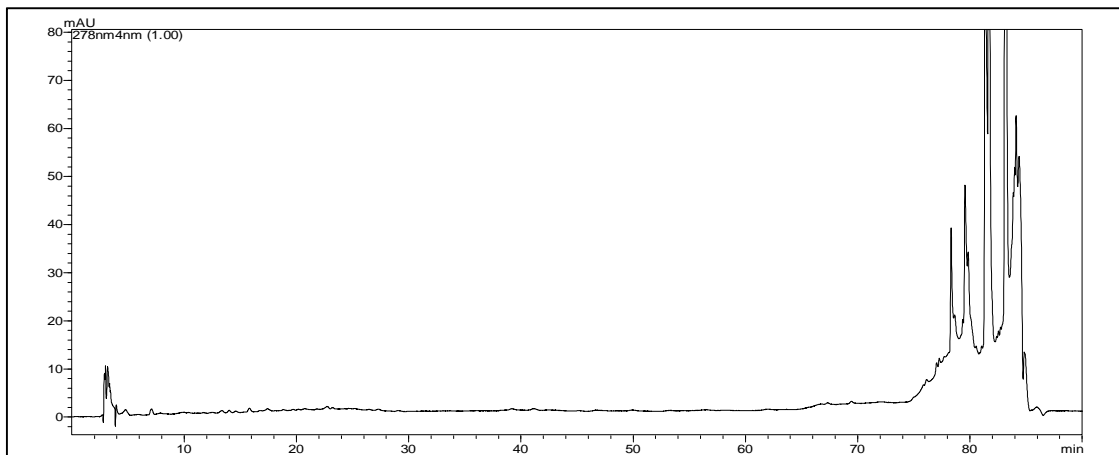
EK 3. %60-60-15dk



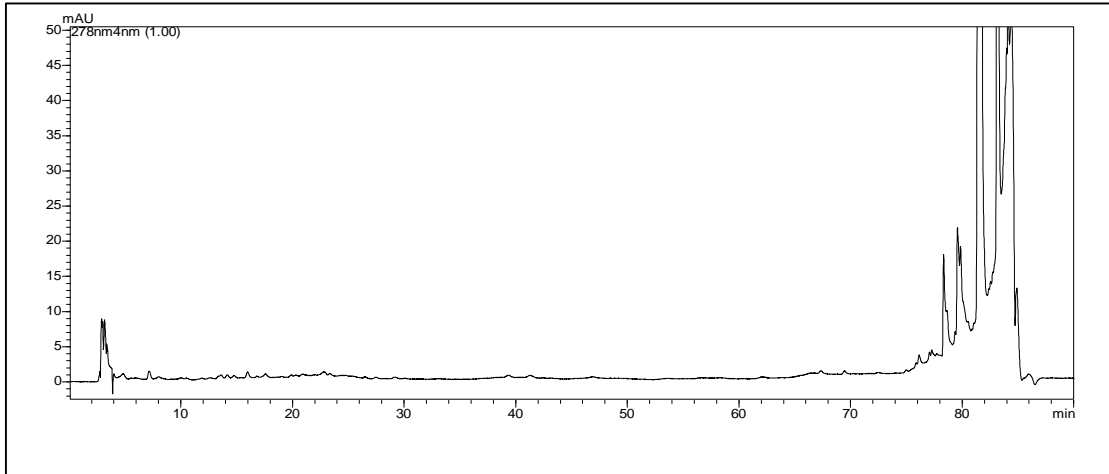
EK 4. %80-60-15dk



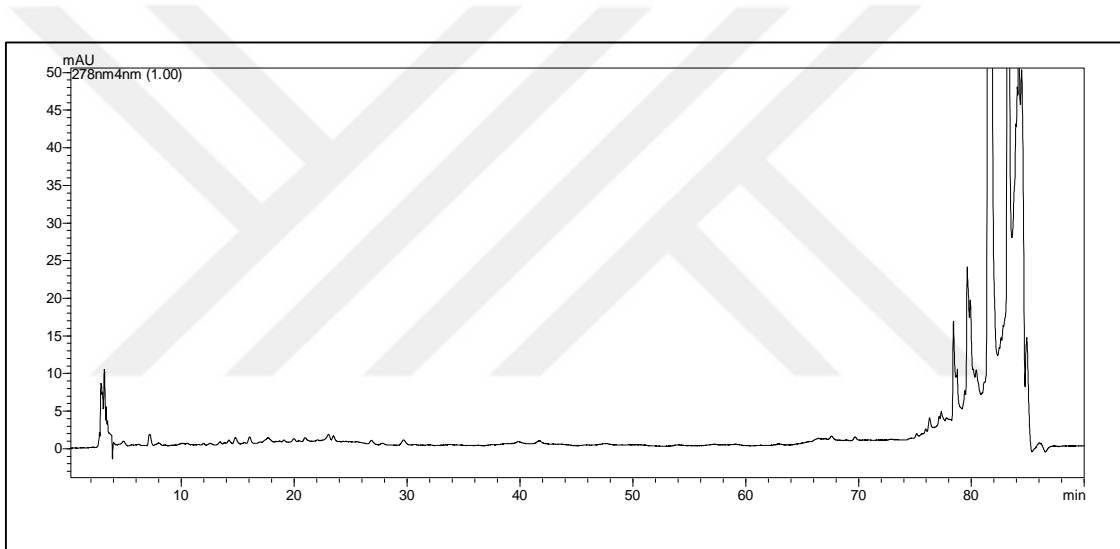
EK 5. %100-40-15dk



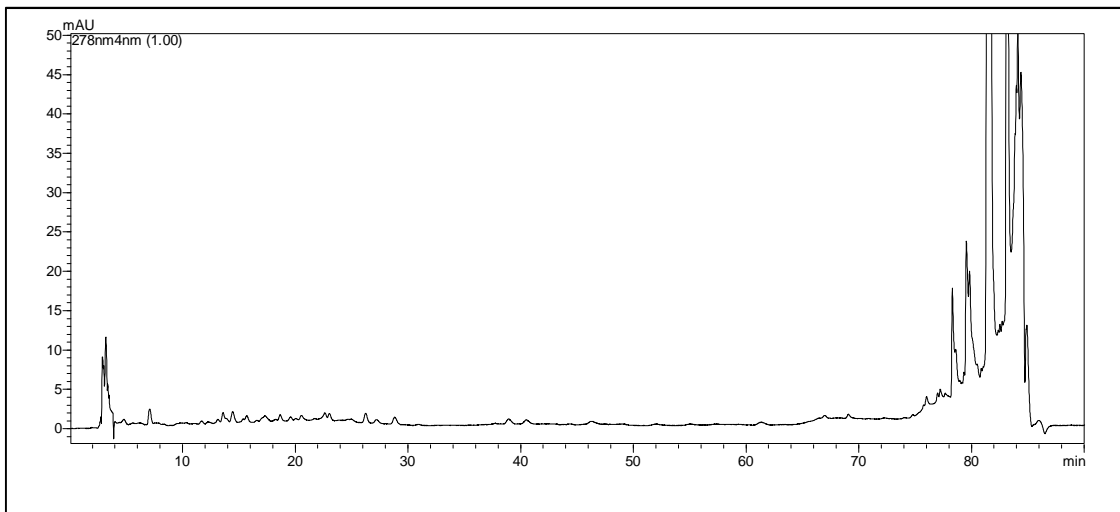
EK 6. % 100-50-15dk



EK 7. % 100-60-15dk



EK 8. % 100-70-15dk



ÖZ GEÇM

Emine Melike AH N 05.05.1995 tarihinde Tarsus/Mersin’de do du. İlk, orta ve lise e itimini Tarsus’ta tamamladı. 2013 yılında girdi i Ni de Üniversitesi Gıda Mühendisli i Bölümün’den 2017 yılında mezun oldu. Aynı yıl Ni de Ömer Halisdemir Üniversitesi Gıda Mühendisli i Bölümünde Yüksek Lisans Ö renimine ba ladı. Bilim dalında ilgi alanı Meyve ve Sebze leme Teknolojisidir.

