



Effect of Thermosonication Treatment on Enzyme Activity and Phenolic Compounds in Apple Juice: FTIR and HPLC Study

Hande Baltacıoğlu^{1,a,*}, Emine Melike Türk^{1,b}, Gözde Doğanay^{1,c}

¹Department of Food Engineering, Niğde Ömer Halisdemir University, 51240 Niğde, Türkiye

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 02.10.2023 Accepted : 29.11.2023</p> <p>Keywords: Apple Juice FTIR HPLC Phenolic Compound Thermosonication</p>	<p>In this study, fresh apple juice was pasteurized at different amplitudes (60, 80, and 100%), times (5, 10, 15, 20, 25, and 30 min), and temperatures (40, 50, 60, and 70°C) with thermosonication (TS), which is an alternative to heat treatment. The effect of TS on polyphenol oxidase (PPO), peroxidase (POD), and phenolic compounds found in apple juice was examined. Phenolic compounds were investigated using HPLC and FTIR spectroscopy. When looking at the inactivation results, 99% of the PPO enzyme was inactivated in apple juice after 15 minutes of TS treatment at 100% amplitude and 70°C, while 94.5% of the POD enzyme was inactivated under similar conditions. 80% amplitude, 60°C, and 15 minutes were detected as the process parameters in which total phenolic content and antioxidant activity were best preserved. Catechin, epicatechin, chlorogenic acid, caempferol, and caffeic acid were determined by HPLC as phenolic compounds. When FTIR spectra were examined no significant change was determined in phenolic compounds. At the same time, the phenolic compounds determined by HPLC and FTIR seemed to be compatible. Thermosonication can be recommended as a promising method for the inactivation of enzymes and the protection of bioactive compounds in apple juice processing.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 12(1): 72-82, 2024

Termosonikasyon İşleminin Elma Suyunda Enzim Aktivitesi ve Fenolik Bileşiklere Etkisi: FTIR ve HPLC Çalışması

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 02.10.2023 Kabul : 29.11.2023</p> <p>Anahtar Kelimeler: Elma suyu Fenolik Bileşik FTIR HPLC Termosonikasyon</p>	<p>Yapılan bu çalışmada ısı işleme alternatif termosonikasyon (TS) yöntemi ile taze elma suyu farklı genlik (%60, 80, 100), sıcaklık (40, 50, 60 ve 70°C) ve sürelerde (5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dakika) pastörize edilmiştir. Bu yöntemin elma suyunda bulunan polifenoloksidaz (PPO) ile peroksidaz (POD) ile fenolik bileşiklere etkisi araştırılmıştır. Fenolik bileşikler HPLC ve FTIR spektroskopisi kullanılarak belirlenmiştir. İnaktivasyon sonuçlarına bakıldığında elma suyunda %100 genlikte, 70°C sıcaklıkta 15 dakika işlem sonunda PPO enziminin %99'u inaktif olurken, aynı koşullarda POD enziminin %94,5'i inaktif olmuştur. %80 genlik, 60°C sıcaklık ve 15 dakika toplam fenolik madde ve antioksidan aktivitenin en iyi korunduğu işlem parametreleri olarak belirlenmiştir. HPLC ile belirlenen fenolik bileşikler; kateşin, epikateşin, klorojenik asit, kafeik asit ve kamferoldur. FTIR spektrumlarına bakıldığında fenolik bileşiklerde önemli bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir. Aynı zamanda HPLC ve FTIR ile belirlenen fenolik bileşiklerin benzer olduğu tespit edilmiştir. Termosonikasyon elma sularının işlenmesinde enzimlerin inaktivasyonu ve biyoaktif bileşiklerin korunmasında umut verici bir yöntem olarak önerilebilmektedir.</p>

^a handebaltacioglu@ohu.edu.tr
^c gdoganay33@gmail.com

^b <https://orcid.org/0000-0003-0774-0872>
<https://orcid.org/0000-0002-1227-9892>

^b meliksahh16@gmail.com ^d <https://orcid.org/0000-0002-9960-1855>



Giriş

Anavatanı Anadolu, Kafkasya ve Türkistan olan elma, vitaminler, mineral maddeler ve organik asitlerden malik asit yönünden zengin bir meyvedir (Anonim, 2016). Meyvenin sahip olduğu şeker ve asit miktarı lezzet ve aromasını etkilemektedir. Genellikle elma yapısındaki toplam şeker miktarı %7-12 arasında, toplam asit miktarı ise %0,20-1,70 arasında değişmektedir. Genel olarak elma suyu aroma açısından zengin, asit-şeker dengesi yeterli, uygun dönemde hasat edilmiş elmalardan üretilmektedir. Bu nedenle elma suyu üretimi için hasat zamanı oldukça önemli olup, elmaların sofra olgunluğundan bir önceki dönemde hasat edilmesi gerekmektedir. Bu dönemde hasat edilen elmalar aromatiktir (Erdoğan ve ark., 2011). Ülkemizde meyve suyuna işlenen meyveler arasında birinci sırada yer alan elma %46'lık paya sahiptir (Anonim, 2011). Elma ve elma suyunun içeriğinde belirlenen kateşin, epikateşin, klorojenik asit, prosiyanidin, floridzin ve floretinksiloglukozit başlıca bulunan fenolik bileşiklerdir (Karadeniz, 1994). Çeşitli hastalıklara karşı koruyucu etkisi olan elmanın lif içeriğinin yüksek olması nedeniyle kalori değeri düşük olup, tokluk hissi vermektedir (Demirtaş, 2018).

Hasatı yapılan meyve-sebzeler ürüne işlenerek kaliteyi olumsuz etkileyen mikroorganizma ve enzimleri inaktive etmek için çeşitli işlemlere tabi tutulmaktadır. Isıl işlem yöntemleri (haşlama, pastörizasyon veya sterilizasyon) enzim inaktivasyonu için kullanılan en yaygın yöntemlerdendir. Ancak yüksek sıcaklıklar ürün kalitesini olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle gıdaların işlenmesi sırasında kalite özellikleri (renk, koku, tat) ile besinsel değerini daha az etkileyecek ısıl işlem yöntemleri yerine alternatif gıda muhafaza yöntemleri tercih edilmeye başlanmıştır (Demirtaş, 2018). Çevreye karşı duyarlı, enerji ve zamanı daha verimli kullanan, ısıl işleme alternatif yöntemlerden bazıları VEA (vurgulu elektrik alan), ultraviyole ışık, yüksek hidrostatik basınç, ışılama ve ultrason gibi yeni teknolojilerdir. Yüksek güçlü ultrason dalgaları, gıdalarda enzimlerin ve mikroorganizmaların inaktivasyonu için tek başına kullanılabilirdiği gibi diğer muhafaza yöntemleri (sıcaklık ve basınç) ile birlikte kombine şekilde de kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden birisi termosonikasyondur. Kısaca termosonikasyon (TS), ultrasonun etkinliğini artırmak için sıcaklık ile birlikte uygulandığı kombinasyonlara denilmektedir (Demirtaş, 2018). Frekans aralığı 20 kHz-10 MHz aralığında olan ultrason cihazları gıdaların işlenmesinde kullanılmaktadır. Ultrason cihazı kullanımına göre genellikle düşük (1 W/cm², 100 kHz) ve yüksek (10-1000 W/cm², 20-100 kHz) enerjili ultrason uygulaması olarak sınıflandırılmaktadır. Düşük enerjili ultrason uygulamaları gıdalarda fizyokimyasal özelliklerin belirlenmesinde, yüksek enerjili ultrason uygulamaları ise gıdalarda enzimlerin ve mikroorganizmaların inaktivasyonu için kullanılmaktadır (Wang ve ark., 2013).

Isıl işleme alternatif olarak uygulanan yöntemlerin etkisinin belirlenmesi için tek başına enzim inaktivasyonunu belirlemek yeterli değildir. Bununla birlikte uygulanan işlemin gıda kalitesi üzerindeki etkisinin de belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu amaçla bu çalışmada elma suyuna termosonikasyon işleminin etkisi araştırılmıştır. Elma suyunda enzimatik esmerleşmeye

sebebi olarak meyve suyunun renk kalitesini etkileyen Polifenol oksidaz (PPO) ve Peroksidaz (POD) enzimleri üzerine etkisi inaktivasyon değerleri ile belirlenmiştir. Aynı zamanda termosonikasyon yönteminin elma suyundaki fenolik bileşikler üzerine etkisini belirlemek ve değişiminin incelemek için Toplam Fenolik Madde (TFM) miktarı ve antioksidan aktivite değerleri (EC₅₀) hesaplanmıştır. Bununla birlikte bu çalışmada HPLC ve FTIR spektroskopisi kullanılarak termosonikasyon işlemi ile fenolik bileşiklerin değişimi incelenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Çalışmada kullanılan elmalar (Red Chief) yerel üreticilerden 2018 yılının Eylül ayında taze olarak temin edilmiş ve elma suyu üretimine kadar buzdolabında 4°C'de muhafaza edilmiştir. Elmalar yıkanıp, kurulandıktan sonra dört parçaya bölünüp parçalayıcıdan (Arnica Orbital Mix, Türkiye) geçirilmiş, daha sonra 4 katlı tülbent ile süzülerek elma suyu elde edilmiştir. Taze elma suyu kontrol örneği olarak belirlenmiştir.

Termosonikasyon Uygulaması

Taze elma suyunda termosonikasyon uygulaması için UP400S (Dr. Hielscher GmbH, Germany) model ultrason cihazı kullanılmıştır. Ultrason cihazının paslanmaz çelik probu 22 mm çapındadır. Bu ucun akustik güç yoğunluğu 460 W/cm²'dir. Elma suyu örneklerine termosonikasyon işlemi farklı genlik seviyeleri (% 60, 80 ve 100), farklı sıcaklık (40, 50 ve 60°C) ve farklı sürelerde (5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dakika) uygulanmıştır. Bununla birlikte yapılan enzim aktivitesi sonuçlarına göre %100 genlik seviyesinde 70°C sıcaklık için de termosonikasyon işlemi uygulanmıştır. Cam behere (7 cm × 9,5 cm) 200 ml taze elma suyu konulmuş ve içerisine ultrason probu 2,5 cm derinlikte daldırılmıştır. İşlem sırasında sıcaklığı kontrol altında tutmak için, cam beher su banyosunun içine konulmuştur. Termosonikasyon işlemi esnasında sıcaklık artışı olacağından ve bu sıcaklık artışı uygulanan güç seviyesine göre değişiklik göstereceğinden kullanılan suyun sıcaklığı her işlem öncesinde deneysel olarak belirlenmiştir. Dijital termometre kullanılarak işlem sırasında örnek sıcaklığı sürekli kontrol edilmiştir. Elma suyu örnekleri, aktivite değerlerinin ölçülmesi için termosonikasyon uygulamasından sonra hemen buzlu su banyosuna alınmıştır.

Kalan PPO Aktivitesinin Belirlenmesi

Termosonikasyon işleminden sonra kalan PPO aktivitesi ölçümleri Baltacıoğlu ve Doğanay (2021) tarafından kullanılan yöntemle göre belirlenmiştir. Kalan enzim aktivitesi kontrolün aktivitesine oranlanarak (%) belirtilmiştir.

Kalan POD Aktivitesinin Belirlenmesi

Termosonikasyon işleminden sonra kalan POD aktivitesi ölçümleri Baltacıoğlu ve Doğanay (2021) tarafından kullanılan yöntemle göre belirlenmiştir. Kalan enzim aktivitesi kontrolün aktivitesine oranlanarak (%) belirtilmiştir.

TFM Tayini

TFM tayini Baltacıoğlu ve Doğanay (2021) tarafından kullanılan yöntem ile belirlenmiş, mg GAE (eşdeğer gallik asit) / kg yaş ağırlık (YA) olarak hesaplanmıştır.

DPPH Yöntemiyle Antioksidan Aktivite

Antioksidan aktivite değerleri DPPH radikali kullanılarak Baltacıoğlu ve Doğanay (2021) tarafından kullanılan yöntemdeki gibi ölçülmüştür. % inhibisyon eşitlik 1'e göre hesaplanmıştır:

$$\% = \frac{KA - \ddot{O}A}{KA} \times 100 \quad (1)$$

KA : Kontrolün absorbansı

ÖA : Örneğin absorbansı

20, 40, 60, 80 ve 100 µl örnek konsantrasyonuna karşı hesaplanan % inhibisyon değerleri ile oluşturulan grafikten %50 inhibisyona neden olan EC₅₀ (mg/ml) değerleri bulunmuştur.

FTIR Spektroskopisi ile Fenolik Madde Değişiminin Belirlenmesi

Bu çalışmada fenolik bileşiklerin farklı inaktivasyon işlemleri ile değişimi Fourier Dönüşüm Kızıl Ötesi (FTIR) spektroskopisi (Bruker, Almanya) ile belirlenmiştir. ATR hücresi üzerine yerleştirilen dondurarak kurtulmuş örneklerden, 2 cm⁻¹ çözünürlükte 128 tarama yapılarak MIR (400-4000 cm⁻¹) bölgesinde spektrum elde edilmiştir.

HPLC Yöntemiyle Fenolik Bileşiklerin Belirlenmesi

HPLC yöntemi kullanılarak elma suyunun fenolik içeriği belirlenmiştir (Baltacıoğlu ve Doğanay, 2021).

İstatistik Analizleri

Minitab (18 versiyon, Minitab Inc., State College, PA, ABD) programı kullanılarak verilerin istatistiksel analizi gerçekleştirilmiştir. Genel lineer model verilerin analizinde kullanılmıştır. Tukey's çoklu karşılaştırma testi yapılarak uygulamalar arasındaki farklılıklar tespit edilmiştir. Deneyler üç kez tekrarlanmıştır.

Bulgular ve Tartışma

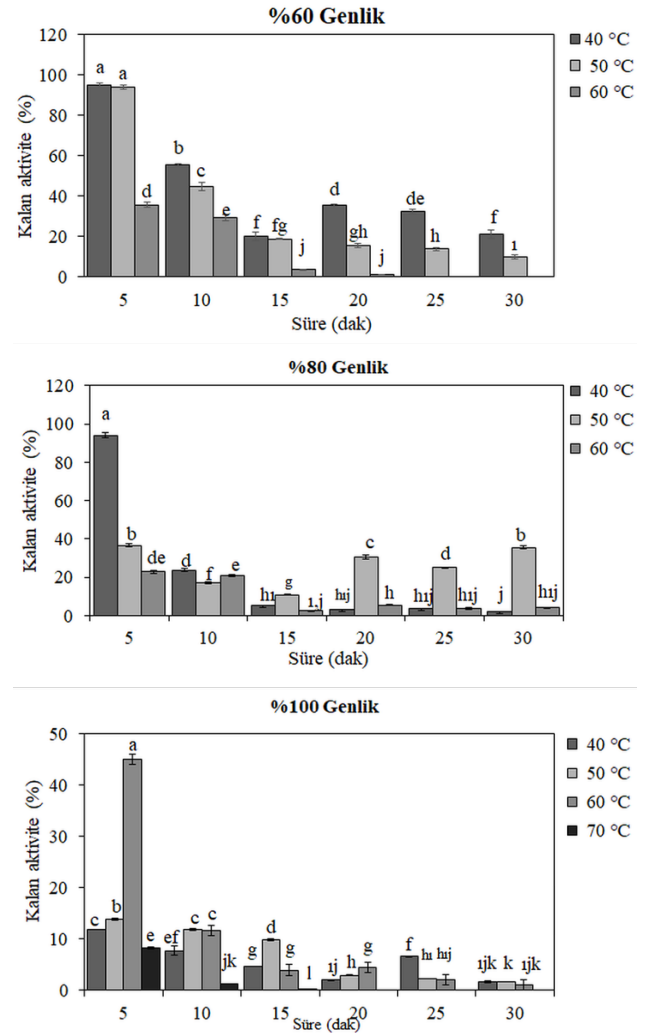
Termosonikasyon yöntemiyle PPO İnaktivasyonu

Ultrasonun enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için farklı genlik, farklı sıcaklık ve farklı sürelerde elma suyuna termosonikasyon işlemi uygulanmıştır. İşlem öncesi ve sonrası PPO aktivitesi belirlenmiştir. Kalan enzim aktivitesi kontrol örneğinin aktivitesine oranlanarak (%) belirtilmiştir. Farklı koşullarda termosonikasyon işlemi gerçekleştirilmiş örneklerde belirlenen kalan PPO aktivitesi Şekil 1' de gösterilmektedir. Genellikle her bir genlik değerinde sıcaklık ve süre artışı ile PPO aktivitesi azalmıştır. Tek başına sıcaklık ve süre ile sıcaklık ve süre interaksiyonunun PPO aktivitesi üzerine etkisi istatistiksel açıdan önemlidir (P<0,05).

Şekil 1'e göre %60 genlikte 40°C ve 50°C için 5 dakika işlem süresinin PPO inaktivasyonuna etkisine bakıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir (P>0,05). Aynı genlikte 40°C derece için 15 ve 30 dakika

işlem süreleri arasında, 60°C için 5 ve 20 dakika işlem süreleri arasında ve 60°C' de 15 ve 20 dakika işlem süreleri arasında istatistiksel açıdan bir fark yoktur (P>0,05). % 80 genlikte 50°C için 5 ve 30 dakika işlem süreleri arasında PPO inaktivasyonu açısından anlamlı bir fark belirlenmemiştir (P>0,05). Aynı genlikte 40°C' de 20 ve 25 dakika uygulanan işlemler ile 60°C' de 25 ve 30 dakika uygulanan işlemler arasında istatistiksel açıdan bir fark yoktur (P>0,05). %100 genlikte 50°C ve 60°C' de 10 dakika uygulanan termosonikasyon işlemleriyle 40°C' de 5 dakika uygulanan termosonikasyon işlemi arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark belirlenmemiştir (P>0,05). Aynı genlikte 40°C' de 15 dakika uygulanan işlem ile 60°C' de 15 ve 20 dakika uygulanan işlemler arasında istatistiksel açıdan fark yoktur (P>0,05).

%60 genlikte düşük sıcaklıklarda (40 ve 50°C) 30 dakika termosonikasyon işlemi sonunda ölçülen PPO aktivitesi sırasıyla; %21,24 ± 2,18, %9,74 ± 1,08 olarak tespit edilmiştir. %60 genlik 60°C sıcaklıkta 20 dakika sonunda kalan aktivite ise %1,23 ± 0,12'dir. Aynı genlik seviyesi ve sıcaklıkta 25 ve 30 dakika termosonikasyon işlemi sonunda PPO inaktivasyonu sağlanmıştır.



Şekil 1. TS işlemi sonunda kalan PPO aktivitesi (Aynı grafikteki farklı harfler (a, b, c...), değerler arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir.)

Figure 1. Residual PPO activity after thermosonication treatment (Different letters (a, b, c) on the same graph indicate a significant difference between the values)

%60 genlikte sıcaklık ve süre artışıyla birlikte PPO aktivitesinde azalış belirlenmiştir.%80 genlikte 40°C sıcaklıkta termosonikasyon uygulanan örneklerde artan sürenin etkisine bağlı olarak kalan PPO aktivitesi azalış göstermiş ve 30 dakika sonunda $2,26 \pm 0,09$ olarak ölçülmüştür. %80 genlikte 50°C'de, 15 dakika işlem sonunda minimum aktivite değeri $10,73 \pm 0,23$ olarak belirlenirken aynı genlik ve sıcaklıkta uzun işlem sürelerinde (20, 25 ve 30 dakika) kalan enzim aktivitesinde artış belirlenmiştir. Enzim aktivitesinde belirlenen bu artışın, düşük sıcaklık değerlerinde uygulanan termosonikasyon işleminin süresine göre enzimin ikincil yapısını değiştirmesi ve buna bağlı olarak enzim-substrat etkileşimini arttırmasıyla ilgili olabileceği düşünülmektedir (Cruz ve ark., 2006). %80 genlikte 60°C sıcaklığa bakıldığında minimum kalan aktivite değeri 15 dakika işlem sonunda $2,39 \pm 0,21$ olarak belirlenmiştir.

%100 genlikte 40°C sıcaklıkta gerçekleştirilen termosonikasyon işleminde artan süre ile kalan enzim aktivitesi azalmıştır. %100 genlikte 40 ve 50°C sıcaklıkta kalan enzim aktivitesi en düşük 30 dakika işlem sonunda belirlenmiş ve bu değerler sırasıyla; $1,59 \pm 0,20$, $1,67 \pm 0,03$ 'dir. Aynı genlik seviyesinde 60°C'de 5 dakika işlem sonucunda kalan aktivite artış göstererek $44,93 \pm 0,69$ olarak tespit edilmiştir. Bir başka çalışmada benzer olarak düşük sıcaklık (<65°C) uygulamasında ultrason gücü artışı ile aktivite artışı ölçülmüştür (Kuldiloke, 2002). %100 genlik, 60°C'de 30 dakika sonunda kalan aktivite değeri $1,11 \pm 0,39$ 'dir. Benzer şekilde 70°C'de 15 dakika işlem ile %99,8'lik bir inaktivasyon sağlanmıştır.

Genellikle, PPO enzimi yüksek sıcaklığa karşı dayanıklı değildir. 70-90°C sıcaklık aralığında gerçekleştirilen ısı işlem uygulaması enzimin katalitik aktivitesini kısmen inaktive eder veya tamamen yok eder (Demirtaş, 2018). Bu süreçte inaktivasyon süresi ürünün yapısına bağlı olarak değişmektedir. Benzer şekilde Abid ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada elma suyunda 60°C sıcaklıkta 10 dakika termosonikasyon işlemi sonunda PPO'nun %93,85 oranında inaktif edildiğini belirlemişlerdir. Silva ve ark. (2015), yaptığı çalışmada elma suyuna farklı (55-3300 W/L) ultrason gücü yoğunluğunda, farklı (23-60°C) sıcaklık ve süre (5-20 dakika) aralığında termosonikasyon uygulamıştır. Enzim aktivitesinin artan güç yoğunluğunda azaldığı belirlenmiştir. Uygulanan en yüksek (3300 W/L) ultrason gücünde PPO için belirlenen en büyük kayıp (%57) gerçekleşmiştir. Yapılan başka bir çalışmada bulanık elma suyunda 1.15 W/mL güç yoğunluğunda, düşük sıcaklıklarda (67°C) gerçekleştirilen termosonikasyon işleminde PPO enziminin tamamına yakını inaktif (3 ± 1) hale gelmiştir. Ayrıca düşük güç yoğunluğunda, belirli bir inaktivasyon değerini elde edebilmek için daha yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir (Illera ve ark., 2018).

Termosonikasyon yöntemiyle POD İnaktivasyonu

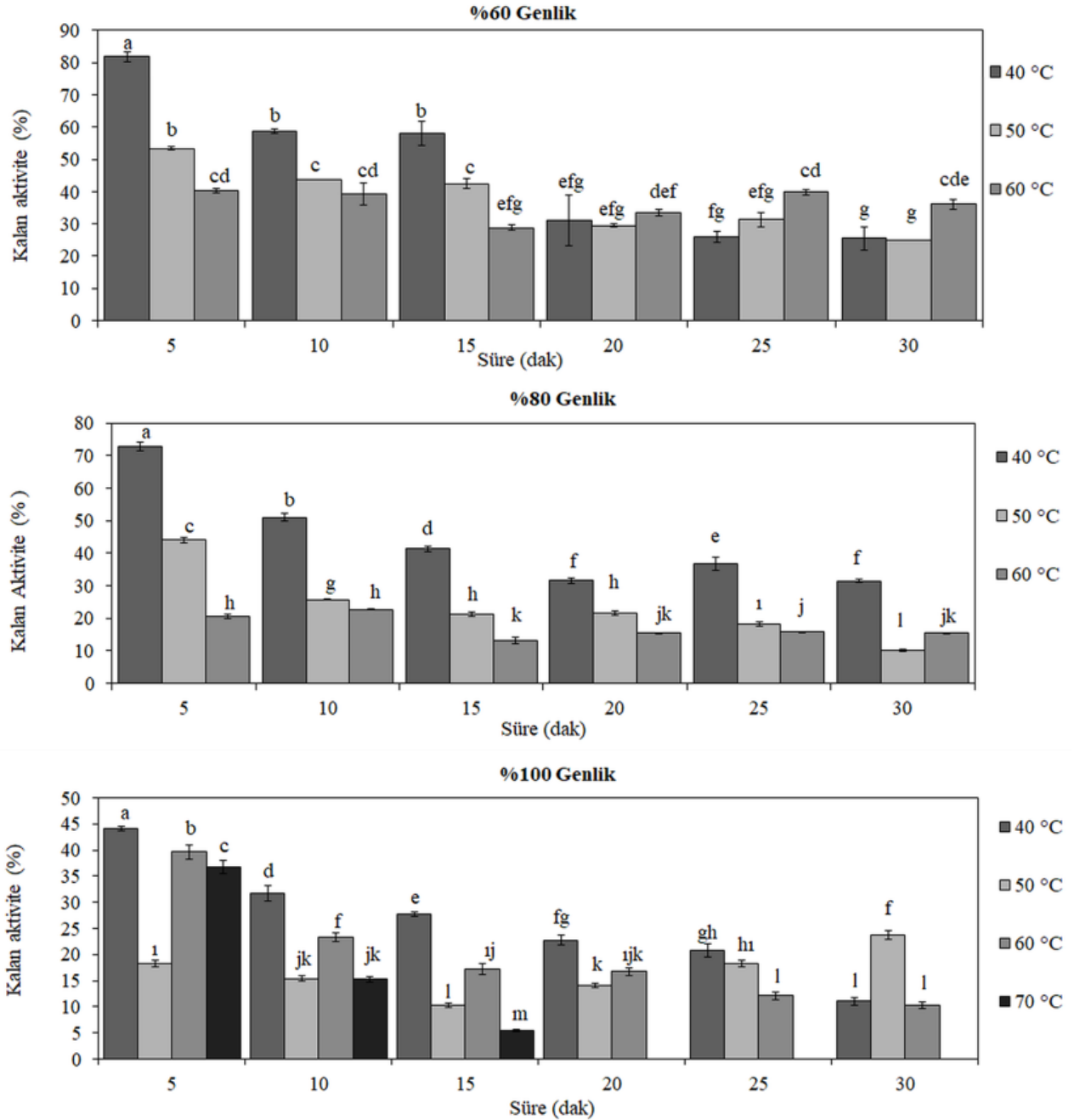
Farklı koşullarda termosonikasyon işlemi gerçekleştirilmiş elma suyu örneklerinde POD için belirlenen kalan enzim aktivitesi değerleri Şekil 2' de gösterilmektedir. Elma suyunda genellikle her bir genlik için artan sıcaklık-süre ile birlikte POD aktivitesi azalmıştır ($P < 0,05$). Ayrıca sıcaklık ve süre ile sıcaklık-süre interaksiyonunun POD aktivitesine etkisi istatistiksel olarak önemlidir ($P < 0,05$).

Şekil 2' ye göre %60 genlikte 50°C'de 5 dakika süren termosonikasyon işlemiyle 40°C'de 10 ve 15 dakika süren termosonikasyon işlemlerinin POD inaktivasyonuna etkisine bakıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($P > 0,05$). Aynı genlikte 50°C için 10 ve 15 dakika işlem süreleri arasında, 60°C için 5, 10 ve 25 dakika işlem süreleri arasında istatistiksel açıdan fark yoktur ($P > 0,05$). 60°C'de 15 dakika gerçekleştirilen işlem ile 40°C'de 5 dakika süren işlem ve 50°C'de 20 ve 25 dakika süren işlemler arasında fark yoktur ($P > 0,05$). %80 genlik değerinde 40°C için 20 ve 30 dakika işlem süreleri arasında, 60°C için 20 ve 30 dakika işlem süreleri arasında istatistiksel olarak fark belirlenmemiştir ($P > 0,05$). Aynı genlikte 60°C'de 5 ve 10 dakikada gerçekleştirilen işlem ile 50°C'de 15 ve 20 dakikada gerçekleştirilen işlemler arasında istatistiksel olarak fark yoktur ($P > 0,05$). %100 genlikte 60°C'de 10 dakika süren termosonikasyon işlemiyle 50°C'de 30 dakika gerçekleştirilen işlem arasında POD inaktivasyonu açısından fark belirlenmemiştir ($P > 0,05$). Aynı genlikte 40°C'de 30 dakika, 50°C'de 15 dakika, 60°C'de 25 ve 30 dakika uygulanman termosonik işlemler arasında anlamlı bir fark yoktur ($P > 0,05$). Benzer şekilde 50°C'de 10 dakika uygulanan işlemle 70°C'de 10 dakika uygulanan işlem arasında POD inaktivasyonu açısından fark belirlenmemiştir ($P > 0,05$).

Termosonikasyon işlemi sonunda belirlenen inaktivasyon sonuçlarına göre elmada bulunan POD enzimi PPO enzimine kıyasla daha dirençli bulunmuştur. Yapılan bir başka çalışmada elma suyunda POD enziminin PPO' ya kıyasla ısı işleme daha dirençli olduğu bildirilmiş ve POD inaktivasyonu 80°C'de 20 dakika sonunda % 93,29 olarak belirlenmiştir (Baltacıoğlu ve Doğanay, 2021). Elma suyu örneklerinde kalan POD aktivitesine bakıldığında, %60 genlikte düşük sıcaklıklarda (40 ve 50°C) süre artışıyla birlikte enzim aktivitesinde azalış gözlenmiş ve minimum kalan enzim aktivitesi 30 dakika işlem sonunda sırasıyla; $25,51 \pm 3,58$ ve $25,00 \pm 0,01$ olarak belirlenmiştir. %60 genlikte sabit süre düşünüldüğünde sıcaklık artışına bağlı olarak kalan enzim aktivitesinde genellikle azalış görülmüştür. Ancak 60°C sıcaklıkta 15 dakika işlem sonunda kalan aktivite değeri $28,76 \pm 0,93$ iken 30 dakika işlem sonunda kalan aktivite $36,11 \pm 1,58$ olarak belirlenmiştir. Bu genlikte ve sıcaklıkta uzun işlem sürelerinde kalan enzim aktivitesinde artış gözlenmiştir. Bu artış düşük sıcaklık (40-80°C) aralığında termosonikasyon işlemi uygulanan su teresinin POD enziminde gözlenmiştir (Cruz ve ark., 2006). %80 genlikte gerçekleştirilen termosonikasyon uygulamasında düşük sıcaklıkta (40°C) süre artışı ile birlikte genellikle kalan enzim aktivitesinde azalış gözlenmiş, minimum kalan aktivite değerinde 20 ve 30 dakika işlem sonunda istatistiksel açıdan fark görülmemiştir ($P > 0,05$). 30 dakika sonunda belirlenen kalan aktivite değeri $31,49 \pm 0,64$ olmuştur. Genel olarak %80 genlikte 50 ve 60°C sıcaklıkta uygulanan termosonikasyon işlemi sonucu enzim inaktivasyon oranlarının arttığı belirlenmiştir. Minimum kalan POD aktivitesi 50°C'de 30 dakika işlem sonucunda $10,16 \pm 0,32$ ve 60°C'de 15 dakikada $13,11 \pm 0,93$ olarak belirlenmiştir. %100 genlikte 40°C sıcaklıkta süre artışına bağlı olarak POD inaktivasyonunda artış gözlenmiştir. Bu genlik ve sıcaklıkta kalan enzim aktivitesi 30 dakika sonucunda $11,01 \pm 0,64$ olarak belirlenmiştir.

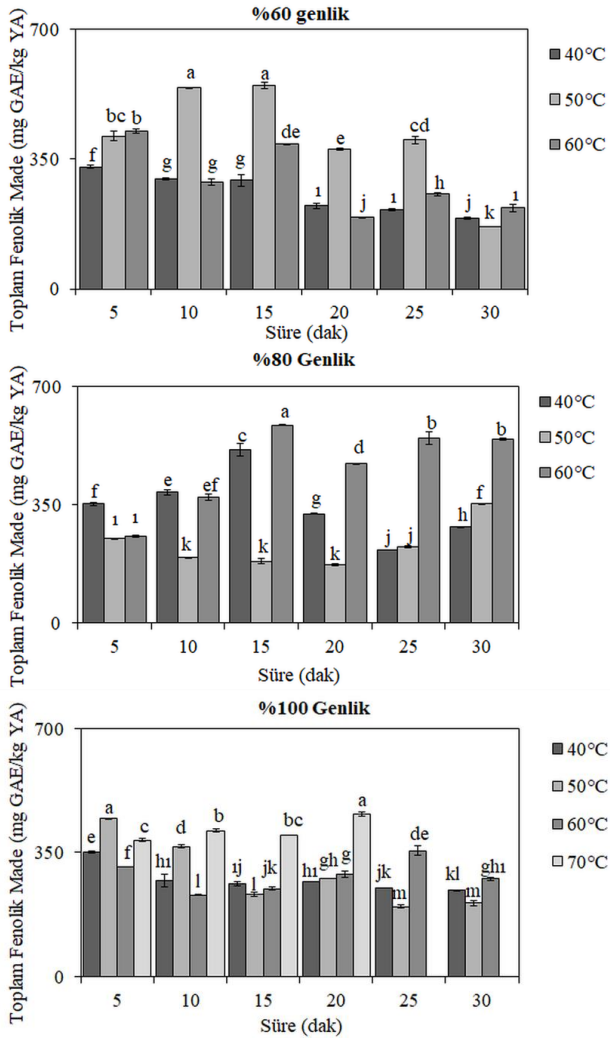
%100 genlikte 50°C’de 15 dakika termosonikasyon sonucu minimum kalan enzim aktivitesi $10,25 \pm 0,35$ olup, 60°C sıcaklıkta 30 dakika işlem sonunda $10,24 \pm 0,59$ ile paralel bir orana ulaşılmıştır. Görüldüğü gibi düşük genlik seviyelerinde uygulanan termosonikasyon işlemi POD inaktivasyonu için yeterli olmamıştır. Bununla birlikte %100 genlikte düşük sıcaklıklarda (40, 50 ve 60°C) uygulanan termosonikasyon işleminin de POD’u tamamen inaktive etmeye yeterli olmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle %100 genlikte 70°C sıcaklıkta da termosonikasyon işlemi uygulanmıştır. Böylece %100 genlikte 70°C sıcaklıkta 15 dakika uygulanan işlem sonunda POD’ın %94,5’i inaktif

hale getirilmiştir. Böylece termosonikasyon işlemi sıcaklık artışı POD inaktivasyonunu arttırmıştır. Yapılan önceki çalışmalara bakıldığında, elma suyunda 60°C sıcaklıkta 10 dakika termosonikasyon işlemi sonunda POD’ın %85’i inaktif hale gelmiştir (Abid ve ark., 2014). Yapılan bir başka çalışmada elma suyunda düşük sıcaklıklarda uygulanan (40, 50 ve 60°C) termosonikasyon işlemiyle belirlenen sonuçlara bakıldığında 60°C’de POD’ın %40’ı inaktive edilmiştir. Aynı zamanda 60°C’nin üzerinde uygulanan sıcaklıklarda termosonikasyon işleminin, ısıya dayanıklı POD enziminin duyarlılığını arttırdığı ifade edilmiştir (Başlar ve Ertugay, 2013).



Şekil 2. TS işlem sonunda kalan POD aktivitesi (Aynı grafikteki farklı harfler (a, b, c...), değerler arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir.)

Figure 2. Residual POD activity after thermosonication treatment (Different letters (a, b, c...) on the same graph indicate a significant difference between)



Şekil 3. Elma suyunda TFM miktarındaki değişim (Aynı grafikteki farklı harfler (a, b, c...), değerler arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir.)

Figure 3. Change in total phenolic content in apple juice (Different letters (a, b, c) on the same graph indicate a significant difference between the values)

Termosonikasyon Süresince TFM Miktarındaki Değişim

Elma suyunda termosonikasyon süresince TFM miktarındaki değişimi Şekil 3'de gösterilmektedir. Termosonikasyon uygulamasının sıcaklık ve süre ile sıcaklık-süre interaksiyonunun TFM miktarına etkisi önemli bulunmuştur ($P < 0,05$). Kontrol örneğinin TFM miktarı $401,21 \pm 6,20$ mg GAE/kg YA olarak belirlenmiştir. Şekil 3'e göre %60 genlik seviyesinde 40°C'de 10 ve 15 dakika uygulanan termosonikasyon işlemiyle 60°C'de 10 dakika uygulanan işlemin TFM miktarına etkisine bakıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($P > 0,05$). Aynı genlikte 40°C'de 20 ve 25 dakika uygulanan işlemlerle 60°C'de 30 dakika uygulanan işlem arasında istatistiksel açıdan fark yoktur ($P > 0,05$). %80 genlikte 60°C için 25 ve 30 dakika işlem süreleri arasında, 50°C için 10, 15 ve 20 dakika işlem süreleri arasında TFM açısından istatistiksel olarak fark yoktur ($P > 0,05$). Aynı genlik seviyesinde 5 dakika işlem süresi için 50°C ve 60°C arasında, 25 dakika için 40°C ve 50°C sıcaklıklar arasında önemli bir fark belirlenmemiştir ($P > 0,05$). %100 genlikte 40°C için 10 ve 20 dakika işlem

süreleri arasında, 50°C için 25 ve 30 dakika işlem süreleri arasında anlamlı bir fark yoktur ($P > 0,05$). Aynı genlikte 50°C'de 5 dakika süren işlem ile 70°C 20 dakika süren işlem arasında, 60°C'de 10 dakika süren işlem ile 50°C'de 25 ve 30 dakika süren işlemler arasında istatistiksel olarak fark yoktur ($P > 0,05$).

%60 genlik seviyesinde sabit süreye bakıldığında düşük sıcaklık uygulamalarında (40-50°C) sıcaklık arttıkça TFM miktarında artış gözlenmiştir. %60 genlikte 40°C sıcaklıkta 5 dakika işlem sonunda TFM miktarı $328,79 \pm 4,20$ mg GAE/kg YA olarak tespit edilmiştir. Aynı zamanda %60 genlikte 60°C sıcaklıkta 5 dakika işlem sonunda TFM miktarı artış göstermiş ve $425,92 \pm 6,31$ mg GAE/kg YA olarak ölçülmüştür. Düşük işlem sıcaklıklarında TFM'de meydana gelen bu artışın, ultrason etkisiyle oluşan kaviteasyonun hücre duvarını tahrip etmesi, bu nedenle fenoliklerin serbest hale geçmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Feng ve ark., 2011). Ancak 60°C termosonikasyon işlem sıcaklığında süre artışı ile birlikte örneklerin TFM miktarı azalmıştır. Bu sıcaklıkta belirlenen TFM miktarındaki düşüşün, elmanın yapısındaki POD enziminin ısıya olan direncinden dolayı yeteri kadar inaktif olamaması sonucunda fenolik bileşikler substrat olarak kullanılması ve/veya fenolik bileşiklerin yüksek sıcaklıklardan etkilenerek bozulabileceği ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

%80 genlik, düşük sıcaklık (40°C) ve kısa işlem sürelerinde (5, 10 ve 15 dakika) termosonikasyon uygulanmış örneklerin TFM değerleri sırasıyla $352,62 \pm 4,63$, $386,95 \pm 6,56$, $514,04 \pm 18,44$ mg GAE/kg YA olarak belirlenmiştir. %80 genlikte 50°C sıcaklıkta tüm işlem sürelerine bakıldığında kontrole göre TFM miktarında azalış belirlenmiştir. Bu sıcaklık değerinde en yüksek TFM miktarı ($28,29 \pm 0,36$ mg GAE/kg YA) 30 dakika işlem sonunda belirlenmiştir. 60°C sıcaklıkta uzun işlem sürelerinde (15, 20, 25 ve 30 dakika) TFM miktarları sırasıyla $586,05 \pm 1,26$, $471,17 \pm 1,61$, $548,43 \pm 18,23$, $544,39 \pm 3,17$ mg GAE/kg YA olarak belirlenerek kontrole kıyasla artış göstermiştir. Bu artışın nedeninin enzim inaktivasyonunun sağlanmasıyla birlikte ortamda substrat olarak bulunan fenolik bileşiklerin enzimler tarafından kullanılmamasına bağlı olduğu düşünülmektedir.

%100 genlik 40°C sıcaklıkta tüm süre parametrelerinde kontrol örneğine göre TFM miktarında azalış belirlenmiştir. %100 genlikte, 40°C sıcaklıkta 5 dakika işlem sonucunda TFM miktarı $351,23 \pm 2,05$ mg GAE/kg YA olarak belirlenirken, 30 dakika sonucunda $243,08 \pm 2,26$ mg GAE/kg YA olarak belirlenmiştir. %100 genlikte 50°C sıcaklıkta 5 dakika işlem sonucunda TFM miktarı $445,38 \pm 2,11$ mg GAE/kg YA olarak belirlenirken, 50°C sıcaklıkta 30 dakika sonucunda $207,27 \pm 6,35$ mg GAE/kg YA olarak tespit edilmiştir. Aynı genlikte 60°C sıcaklık için 10 dakika işlem süresine kadar TFM miktarında azalış belirlenirken, 25 dakika işlem süresine kadar artış belirlenmiş ve 30 dakika sonunda tekrar azalış gözlenmiştir. %100 genlikte 60°C sıcaklıkta 30 dakika işlem süresinde TFM $276,05 \pm 4,17$ mg GAE/kg YA olarak belirlenerek kontrole göre azalmıştır.

Genel anlamda TFM miktarındaki artışın sebebinin, PPO ve POD enzimlerinin inaktivasyonunun sağlanmasıyla fenolik bileşikler substrat olarak kullanılmamasına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Benzer şekilde yapılan bir başka çalışmada termosonikasyon uygulanan şeftali suyundaki fenolik bileşiklerdeki artışın, PPO ve POD gibi enzimlerin aktivitelerindeki azalmaya bağlı olabildiği ifade edilmiştir (Baltacıoğlu, 2022). Fenolik maddenin azalmasının sebebi ise uzun işlem süreleri sonunda fenolikler bileşiklerin parçalanması ile açıklanabilmektedir. %100 genlikte 70°C'de 10 ve 20 dakika işlem sonunda TFM miktarı sırasıyla 412,35 ± 4,20 ve 457,63 ± 6,47 mg GAE/kg YA olarak belirlenmiş, kontrol örneğine göre artış belirlenmiştir. Bunun nedeni PPO ve POD inaktivasyonunun sağlanmasıyla ortamda substrat olan fenolik bileşiklerin daha fazla bulunması ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda termosonikasyon yöntemiyle elma sularında daha düşük sıcaklık ve sürede enzim inaktivasyonunun sağlandığı, TFM ve askorbik asit kaybının daha az olduğu bildirilmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada farklı çeşit elmalarda düşük sıcaklıklarda (40, 50 ve 60°C) termosonikasyon uygulanmış, örneklerde TFM kayıpları en fazla %15 olarak belirlenmiştir (Başlar ve Ertugay, 2013). Benzer şekilde Abid ve ark. (2014), çalışmasında taze elma suyuna prob tipi ultrason (0,30 W/cm³, 20 kHz, 5 ve 10 dakika) ve ultrasonik banyo (0,06 W/cm³, 25 kHz, 30 dakika) kullanarak farklı şekilde termosonikasyon işlemi uygulamıştır. Kontrol örneğinde belirlenen TFM değeri 697,49 µg GAE/g'dir. Düşük sıcaklıkta (20°C) her iki uygulama şekli için TFM artmıştır. Fakat işlem sıcaklığı arttıkça (40 ve 60°C) biyoaktif bileşiklerin parçalanmasında artış olduğu, yani sıcaklık ile bu

bileşiklerin miktarlarının önemli bir şekilde azalmış olduğu görülmüştür. Aynı zamanda prob tipi ultrason ile gerçekleştirilen işlemde belirlenen TFM değerleri, 60°C ultrasonik banyoda gerçekleştirilen işlemde belirlenen değerlere göre daha yüksek bulunmuştur. Bir başka çalışmada bulanık elma suyuna düşük sıcaklıkta (42-67°C) termosonikasyon uygulanmış, nitrojen ve karbondioksit gibi çözünmüş gazların da etkisi incelenerek elma suyunun TFM miktarının, kontrole kıyasla artış gösterdiği belirlenmiştir. TFM içeriğindeki değişimin 60-67°C'de havanın azot gazının yerini alması sonucu oluştuğu ifade edilmiştir (Illera ve ark., 2018). Chitgar ve ark. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada yabancı maddesini suyunda ısıtma işlemi (90°C 1dk) ve termosonikasyon (%70 genlik 45°C 5 dakika) yönteminin etkisi araştırılmıştır. Termosonikasyon, ısıtma işlemle karşılaştırıldığında örneklerin TFM üzerinde küçük bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Termosonikasyon Süresince Antioksidan Aktivitedeki Değişim

Termosonikasyon işlemi sonucu elde edilen elma suyu örneklerinin antioksidan aktivitesi belirlenmiş ve EC₅₀ değeri hesaplanmıştır. Düşük EC₅₀ değeri yüksek antioksidan aktiviteyi göstermektedir (Cemeroğlu, 2010). Termosonikasyon süresince farklı işlem koşullarında (genlik, sıcaklık ve süre) elde edilen EC₅₀ değerleri Çizelge 1' de gösterilmiştir.

Çizelge 1. TS sonunda belirlenen EC₅₀ değerleri

Table 1. EC₅₀ values obtained during thermosonication treatment

Süre (dk)	% 60 genlik			
	Sıcaklık (°C)			
	40	50	60	
0	28,39 ± 0,25	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 (dk)	%80 genlik			
	Sıcaklık (°C)			
	40	50	60	
0	28,39 ± 0,25	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 (dk)	% 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 genlik için farklı harfler (a, b, c...), değerler arasındaki farkın önemli olduğunu ifade etmektedir.

Çizelge 2. HPLC ile tespit edilen fenolik bileşikler

Table 2. Phenolic compounds detected by HPLC

Numune	Kateşin (mg/kg)	Klorojenik asit (mg/kg)	Kafeik asit (mg/kg)	Epikateşin (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

Epikateşin için LOD: 0,3 mg/L, LOQ: 0,8 mg/

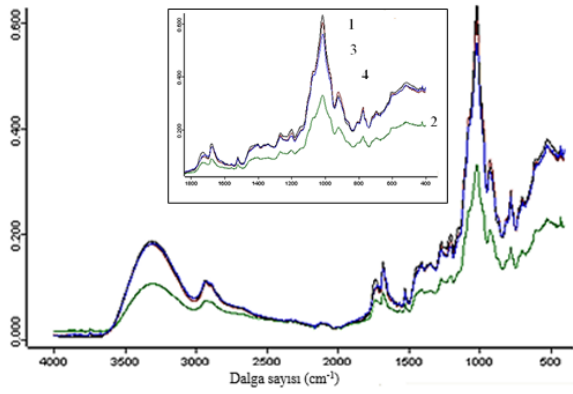
Termosonikasyon uygulanan örneklerde her bir sıcaklık değeri için, artan zaman ile EC₅₀ değeri artarak antioksidan aktivite azalmıştır. TFM miktarındaki artışla birlikte genel olarak antioksidan aktivite de artış göstermiştir. Antioksidan aktivitede belirlenen bu değişime, sıcaklık ve süre ile sıcaklık ve süre interaksiyonunun etkisi önemlidir (P<0,05). Termosonikasyon uygulanmamış örnekte EC₅₀ değeri 28,39 ± 0,25 mg/ml olarak hesaplanmıştır. Termosonikasyon uygulanmış elma suyunda %60 genlik seviyesinde sıcaklık ve süre artışı ile birlikte EC₅₀ değerleri azalmıştır. %60 genlikte 40, 50 ve 60°C sıcaklıkta 5 ve 10 dakika süre uygulanan işlem sonucunda EC₅₀ değerleri sırasıyla; 51,84 ± 0,07, 46,40 ± 0,32, 33,70 ± 0,09 ve 44,15 ± 0,06, 42,81 ± 0,29, 43,32 ± 0,12 mg/ml olarak belirlenmiştir. Genel olarak bu genlikte sıcaklık ve süre artışı ile (15, 20 ve 30 dak) EC₅₀ değerlerinde kontrol örneğine göre artış belirlenmiş ya da azalışın daha yavaş olduğu belirlenmiştir. Bu durumun sıcaklık etkisiyle fenolik bileşiklerin parçalanması ve buna bağlı olarak antioksidan aktivitenin azalmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. %80 genlikte 40, 50 ve 60°C sıcaklıkta 5 ve 30 dakika termosonikasyon işlemi sonunda belirlenen EC₅₀ değerleri sırasıyla 40,65 ± 0,18, 46,51 ± 0,17, 28,29 ± 0,36 ve 55,04 ± 0,26, 58,32 ± 0,23, 41,36 ± 0,46 mg/ml'dir. %80 genlikte aynı sıcaklık aralığı için artan süreyle birlikte EC₅₀ değerleri artarak antioksidan aktivite azalmıştır. %100 genlikte genel olarak farklı işlem koşulları ile EC₅₀ değerleri değişkenlik göstermektedir. %100 genlikte 40°C sıcaklıkta 5 dakika işlem sonunda EC₅₀ değeri 55,82 ± 1,37 iken %100 genlik 70°C sıcaklıkta 20 dakika işlem sonunda EC₅₀ değeri 36,91 ± 1,22 mg/ml olarak belirlenmiştir. Bu durum fenolik madde miktarındaki artışla birlikte antioksidan aktivitenin de artışından kaynaklanmaktadır. Abid ve ark. (2014), tarafından yapılan çalışmada termosonikasyon işlemi uygulanmış elma suyu örneklerinde süre artışına bağlı olarak DPPH radikalinin % inhibisyon değerlerini (30,60 ve 90 dakika) sırasıyla; 39,71 ± 1,03, 43,38 ± 1,48, 46,94 ± 0,86 olarak belirlemişlerdir. Antioksidan aktivitede belirlenen azalışın, ultrasonun meydana getirdiği kaviteasyon kabarcıklarının patlamasıyla oluşan ani sıcaklık ve basınç, askorbik asit ve fenolik bileşiklerin parçalanmasına ve/veya yüksek sıcaklık ve uzun işlem sürelerinden olumsuz etkilenmesine bağlı olabileceği ifade edilebilir.

HPLC Çalışmaları

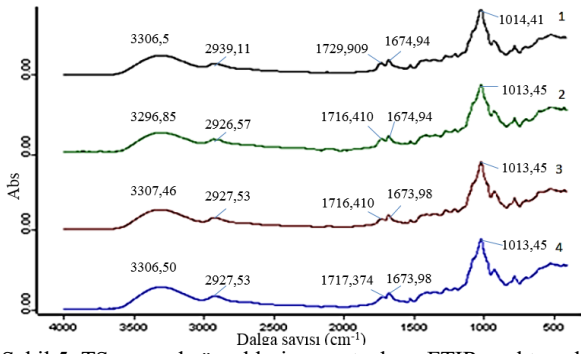
HPLC ile elma suyu örneklerinin fenolik bileşik içeriği belirlenmiş, farklı genlik, farklı sıcaklık ve sabit sürede (15 dakika) değişimi incelenmiştir. TFM miktarı ve

antioksidan aktivite değerlerinin en iyi korunduğu parametrenin %80 genlik, 60°C sıcaklık ve 15 dakika olmasından dolayı sabit süre değeri 15 dakika seçilmiştir. Buna göre kontrol örneği ile termosonikasyon uygulanmış örneklerde tespit edilen fenolik bileşikler Çizelge 2'de gösterilmektedir. Kontrol örneğinde belirlenen fenolik bileşikler; kateşin, klorojenik asit, epikateşin ve kamferoldur. 60 genlikte, 60°C sıcaklıkta ve 15 dakika termosonikasyon işlemi sonunda belirlenen fenolik bileşiklerden kateşin, epikateşin ve klorojenik asit miktarı kontrol örneğine göre azalırken kamferol miktarında artış belirlenmiştir. %80 genlikte 60°C sıcaklıkta 15 dakika termosonikasyon işlemi sonunda belirlenen fenolik bileşiklerden kamferol, kateşin ve epikateşin miktarı kontrol örneğine göre artarken klorojenik asit miktarında azalış belirlenmiştir. %100 genlikte, farklı sıcaklıklarda (40, 50, 60 ve 70°C) ve sabit sürede (15 dakika) termosonikasyon işlemi uygulanan örneklerde tespit edilen fenolik bileşiklerin miktarlarının kontrole kıyasla düşük olarak belirlendiği görülmüştür. Fakat bu durum kamferol miktarı için farklıdır. %100 genlikte, 40°C sıcaklıkta 15 dakika işlem sonunda belirlenen kamferol miktarı 11,0 mg/kg'dır. Aynı zamanda %100 genlik seviyesinde 40°C ve 50°C sıcaklıkta 15 dakika işlem sonunda örneklerin kafeik asit miktarı 1,5 mg/kg olarak tespit edilmiştir.

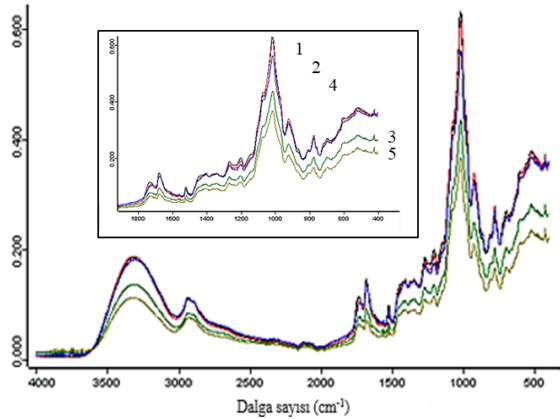
Elmanın fenolik içeriğiyle ilgili yapılan önceki çalışmalara baktığımızda Markowski ve Płocharski (2006), farklı elma çeşitleri ve işlenmiş ürünlerinde HPLC ile fenolik bileşenlerden; fenolik asitler, flavonoller (kuersetin) ve dihidrokalkonları belirlemiştir. Rana ve Bhushan (2016), çalışmasında taze elmada polifenollerin yapısal sınıfları arasında fenolik asitler (kafeik asit ve kumarik asit), flavonoller (kuersetin, kamferol ve rutin), flavan-3-oller (epikateşin ve prosiyanidinler) ve dihidrokalkonlar (floretilin ve floridzin), bulunduğunu belirtmiştir. Bir başka çalışmada elmanın kabuk kısmının, elma etine kıyasla toplam fenolik bileşikler, flavonoidler ve prosiyanidinler açısından daha zengin olduğu ve belirlenen fenolik bileşiklerin (kateşin, epikateşin, kuersetin, floridzin, prosiyanidin C₁ ve B₂) elma kabuğunda etine göre fazla oranda olabileceği tespit edilmiştir (Kalinowska ve ark., 2014). Genellikle her bir elma için belirlenen fenolik bileşikler; flavan-3-oller (19,6 -55,8 mg/100 g), flavonoller (17,7-33,1 mg/100 g) ve klorojenik asitler (10,6-80,3 mg/100 g mg). En düşük değerler antosiyanin (her bir elmada 0,1-6,5 mg/100 g elma) ve floridzin (her bir elmada 1,0-9,3 mg/100 g elma) için belirlenmiştir (Francini ve Sebastiani, 2013).



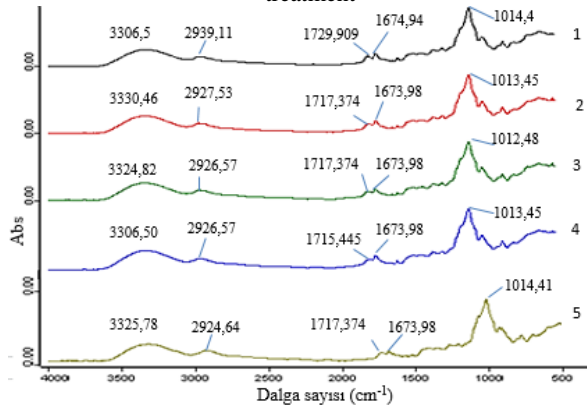
Şekil 4. TS sonunda örneklerin FTIR spektrumları
Figure 4. FTIR spectra of samples after thermosonication treatment



Şekil 5. TS sonunda örneklerin ayrıştirilmiş FTIR spektrumları
Figure 5. Separated FTIR spectra of samples after thermosonication treatment



Şekil 6. TS sonunda örneklerin FTIR spektrumları:
Figure 6. FTIR spectra of samples after thermosonication treatment



Şekil 7. TS sonunda örneklerin ayrıştirilmiş FTIR spektrumları
Figure 7. Separated FTIR spectra of samples after thermosonication treatment

FTIR Çalışmaları

Termosonikasyon uygulanmış elma suyu örneklerinde FTIR spektroskopisi ile fenolik bileşik belirlenmiştir. Farklı genlik (%60, 80, 100), 15 dakika süre ve 60°C sıcaklıkta termosonikasyon işlemi uygulanan örnekler ile farklı sıcaklık (40, 50, 60 ve 70°C), sabit süre (15 dak) ve genlikte (%100) termosonikasyon uygulanan örneklerde fenolik bileşikler FTIR spektroskopisi ile incelenmiştir. Kontrol örneği olarak termosonikasyon işlemi uygulanmamış örnek alınmış ve FTIR spektrumları 25°C sıcaklıkta belirlenmiştir. Elma suyu örneklerinin farklı genlik, sabit süre ve sıcaklıkta belirlenen FTIR spektrumları Şekil 4 ve ayrıştirilmiş FTIR spektrumları Şekil 5'de gösterilmiştir. FTIR spektrumları incelendiğinde 1-kontrol (taze elma suyu), 2- %60 genlik 60°C 15 dakika, 3- %80 genlik 60°C 15 dakika, 4- %100 genlik 60°C 15 dakika termosonikasyon uygulanmış elma suyu örneklerini ifade etmektedir. Farklı sıcaklık, sabit genlik ve sürede elma suyu örneklerinde belirlenen FTIR spektrumları Şekil 6 ve ayrıştirilmiş FTIR spektrumları Şekil 7'de gösterilmektedir. FTIR spektrumları incelendiğinde 1- kontrol (taze elma suyu), 2- %100 genlik 40°C 15 dakika, 3- %100 genlik 50°C 15 dakika, 4- %100 genlik 60°C 15 dakika, 5- %100 genlik 70°C 15 dakika termosonikasyon uygulanmış elma suyu örneklerini ifade etmektedir.

FTIR spektrumlarına bakıldığında parmak izi bölgesi olarak adlandırılan 1800-750 cm⁻¹ bölgesinde belirlenen pikler yaygın olarak bitkilerdeki polifenolik bileşikler ile ilişkilendirilmiştir. 3000–3300 cm⁻¹ aralığındaki bant ile 2800 cm⁻¹'e kadar uzayan bantların aromatik halkanın C-H germe titreşimlerinden kaynaklandığı belirtilmiştir (Okur ve ark., 2019). Literatüre bakıldığında, 1715-1680 cm⁻¹ bölgesindeki bantların hidroksibenzoik asitler ve/veya hidroksisünamik asitlerden (α , β -doymamış karboksilik asit yapıların (C=O) germe titreşimleri) kaynaklanabileceği belirlenmiştir. Bununla birlikte, 1720 cm⁻¹ civarındaki bant klorojenik asit ile ilişkilendirilmiştir (Abbas ve ark., 2017). 1500–1150 cm⁻¹ aralığında gözlemlenen bantların fenolik bileşiklerin CH ve OH titreşimleri nedeniyle olduğu belirtilmiştir. 1014 cm⁻¹'de gözlemlenen pik, piran halkasının OH ikamesinin C – O esnemesini ifade etmektedir ve epikateşin ile ilişkilendirilebilmektedir (Okur ve ark., 2019). Farklı genlik, sabit süre ve sıcaklıkta termosonikasyon işlemi uygulanan elma suyu örnekleri ile farklı sıcaklık, sabit genlik ve sürede termosonikasyon işlemi uygulanan örneklerin FTIR spektrumları incelendiğinde fenolik bileşiklerde belirgin bir değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir.

Sonuç

Isıl işleme göre termosonikasyon yönteminin daha düşük sıcaklıkta ve daha kısa sürede enzim inaktivasyonu sağlaması, biyoaktif bileşikler üzerinde olumlu etkileri nedeniyle literatür çalışmalarında gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Yapılan bu çalışmada elma suyu örneklerine farklı genlik, sıcaklık ve sürelerde termosonikasyon işlemi uygulanmıştır. Bu yöntemin elma suyunda enzimatik esmerleşmeye sebep olan PPO ve POD inaktivasyonuna ve fenolik bileşiklerdeki değişimine etkisi araştırılmıştır. Sonuçlara bakıldığında, genellikle artan ultrason gücü, sıcaklık ve süreye bağlı olarak enzim

inaktivasyonunda artış gözlenmiştir. Elma suyunda PPO enziminde %100 genlik, 70°C ve 15 dakika işlem sonucunda %99 oranında inaktivasyon gözlenirken, aynı işlem koşullarında POD için %94,5 oranında inaktivasyon sağlanmıştır. Belirlenen bu sonuçlarına göre POD'ın PPO'ya kıyasla ısıya karşı dirençli olduğu gözlenmiştir.

Termosonikasyon uygulanmış elma suyu örneklerinin TFM içeriğine bakıldığında, %60 genlikte sabit süreye bakıldığında düşük sıcaklık uygulamalarında (40-50°C) artan sıcaklık ile TFM miktarında artış belirlenmiştir. Ancak 60°C sıcaklıkta süre artışına bağlı olarak örneklerin TFM miktarı azalmıştır. %80 genlik, düşük sıcaklık (40°C) ve kısa işlem sürelerinde (5, 10 ve 15 dakika) TFM miktarı kontrol örneğine göre artmış, aynı şartlarda süre arttıkça azalma görülmüştür. Genellikle %80 genlikte 60°C sıcaklıkta gerçekleştirilen işlemin fenolik bileşikler daha iyi korunduğu belirlenmiş, işlem süreleri arasında 15 dakika sonunda $586,05 \pm 1,26$ mg GAE/kg YA değeri ile en yüksek fenolik madde miktarı belirlenmiştir. %100 genlikte 40, 50 ve 60°C sıcaklıkta uygulanan termosonikasyon işleminde artan süreye bağlı olarak TFM miktarı değişkenlik göstermiştir. %100 genlikte 70°C'de süre artışıyla birlikte TFM artış gösterse de belirlenen miktar % 80 genlikte 60°C sıcaklıkta belirlenen miktardan daha düşüktür. Bu nedenle artan ultrason gücünün fenolik bileşikler üzerinde tahrip edici etkisi olduğu belirlenmiştir.

Termosonikasyon uygulanmış elma suyu örneklerinde, %60, 80 ve 100 genlikte genellikle her bir sıcaklık değeri için, EC₅₀ değerleri kontrole göre artmış, yani antioksidan aktivite azalmıştır. Bununla birlikte TFM için belirlenen koşullar (%80, 60°C ve 15 dakika) aynı şekilde antioksidan aktivitenin de en iyi korunduğu işlem parametreleri olarak seçilmiştir. Bu şartlarda EC₅₀ değeri $32,09 \pm 0,38$ mg/ml olarak belirlenmiştir. Farklı koşullarda işlem gören örneklerden elde edilen FTIR spektrumlarına bakıldığında fenolik bileşiklerde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. FTIR spektrumlarının parmak izi bölgesine bakıldığında klorojenik asit ve epikateşinle uyumlu spesifik bantlar olduğu görülmüştür. FTIR ve HPLC ile belirlenen sonuçlar birbirleriyle paralellik göstermektedir. Termosonikasyon uygulanmış elma suyu örneklerinde belirlenen fenolik bileşikler; kateşin, klorojenik asit, kafeik asit, epikateşin ve kamferol'dur. %60 genlikte 60°C sıcaklıkta 15 dakika işlem sonunda elma suyu örneklerinin fenolik içeriğinde belirlenen kateşin, epikateşin ve klorojenik asit miktarı kontrole kıyasla azalırken kamferol miktarı artmıştır. %80 genlikte 60°C sıcaklıkta 15 dakika işlem sonunda ise kateşin, epikateşin ve kamferol miktarı artmış klorojenik asit miktarı azalmıştır. %100 genlikte tüm sıcaklıklarda 15 dakika işlem süresi sonunda elma suyu örneklerinin fenolik bileşik miktarlarının kontrole kıyasla düşük olduğu belirlenmiştir. Buna göre HPLC ve FTIR spektroskopisi ile tespit edilen fenolik bileşiklerin uyumlu olduğu görülmüştür. Elma suyunda termosonikasyon işlemiyle enzim inaktivasyonu sağlanırken, fenolik bileşiklerde artış sağladığı gözlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre termosonikasyonun elma sularının işlenmesinde ısı işleme alternatif, gelecek vaat eden bir yöntem olarak önerilebilmektedir.

Kaynaklar

- Abbas, O., Compère, G., Larondelle, Y., Pompeu, D., Rogez, H., & Baetena, V. (2017). Phenolic compound explorer: A mid-infrared spectroscopy database. *Vibrational Spectroscopy*, 92, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2017.05.008>
- Abid, M., Jabbar, S., Hu, B., Hashim, M. M., Wu, T., Lei, S., Khan, M. K., & Zeng, X. (2014). Thermosonication as a potential quality enhancement technique of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21, 984–990. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.12.003>
- Anonim, (2011). Türkiye meyve suyu vb. ürünler sanayi raporu. <https://www.meyed.org.tr> (Erişim tarihi: 15 Mart 2015).
- Anonim, (2016). Bahçecilik, Kütüphane, Meyve Yetiştirme. <http://defteriniz.com/elma-uretimi-meyve-yetistirme/27891/>
- Baltacıoğlu, H. (2022). Thermosonication of peach juice: investigation of PPO and POD activities, physicochemical and bioactive compounds changes, and development of FT-IR-based chemometric models for the evaluation of quality. *International Journal of Food Science and Technology*, 57, 1688–1697. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15536>
- Baltacıoğlu, H., & Doğanay, G. (2021). Isıl işlemin elma suyunda enzim aktivitesi ve fenolik bileşiklere etkisi: FTIR ve HPLC çalışması. *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*, 9(1), 14–26. <https://doi.org/10.21923/jesd.848043>
- Başlar, M., & Ertugay, M. F. (2013). The effect of ultrasound and photosonication treatment on polyphenoloxidase (PPO) activity, total phenolic component and colour of apple juice. *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 886–892. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12015>
- Cemeroğlu, B. (2010). Gıda Analizleri. *Gıda Teknolojileri Derneği Yayınları*, No: 34, Ankara.
- Chitgar, M. F., Aalamia, M., Kadkhodae, R., Maghsoudlou, Y., & Milani, E. (2018). 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. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.09.004>
- Cruz, R. M. S., Vieira, M. C., & Silva, C. L. M. (2006). Effect of heat and thermosonication treatments on peroxidase inactivation kinetics in watercress (*Nasturtium Officinale*). *Journal of Food Engineering*, 72, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.jifset.2007.10.005>
- Demirtaş, C. (2018). Termosonikasyon uygulamasının elma suyunun kalite özellikleri ve raf ömrü üzerine etkisi. Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Erdoğan, S. S., Masum, B., Göksel, Z., & Kılınc, A. (2011). Bazı elma çeşitlerinin elma suyu üretimine uygunluğunun araştırılması. *Bahçe*, 40(1), 9 – 16.
- Feng, H., Barbosa-Cánovas, G. V., & Weiss, J. (2011). Ultrasound technologies for food and bioprocessing. *Food Engineering Series*, Springer, New York.
- Francini, A., & Sebastiani, L. (2013). Phenolic compounds in apple (*Malus domestica* Borkh.): compounds characterization and stability during postharvest and after processing. *Antioxidants*, 2, 181–193. <https://doi.org/10.3390/antiox2030181>
- Illera, A. E., Sanz, M. T., Benito-Román, O., Varona, S., Beltrán, S., Melgosa, R., & Solaesa, A. G. (2018). 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. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.02.001>
- Kalinowska, M., Bielawska, A., Lewandowska-Siwkiewicz, H., Priebe, W., & Lewandow, W. (2014). 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. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.09.006>

- Karadeniz, F. (1994). Elma suyunda fenolik madde dağılımı ve konsantreye işleme sırasında değişimi. Ankara Üniversitesi, Doktora Tezi.
- Kuldiloke, J. (2002). Effect of ultrasound, temperature and pressure treatments on enzyme activity and quality indicators of fruit and vegetable juices. Berlin Teknik Üniversitesi, Gıda Biyoteknolojisi ve Proses Mühendisliği, Doktora tezi.
- Markowski, J., & Płocharski, W. (2006). Determination of phenolic compounds in apples and processed apple products. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 14(2), 133-142.
- Okur, İ., Baltacıoğlu, C., Baltacıoğlu, H., Alpas, H., & Ağçam, E. (2019). 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*, 10, 3545-3555. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00771-1>
- Rana, S., & Bhushan, S. (2016). Apple phenolics as nutraceuticals: assessment, analysis and application. *Journal Food Science Technologies*, 53(4), 1727-1738. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2093-8>
- Silva, L. C. A., Almeida, P. S., Rodrigues, S., & Fernandes, F. A. N. (2015). 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. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12451>
- Wang, J., Zhao, Y. M., Tian, Y. T., Yan, C. L., & Guo, C. Y. (2013). Ultrasound-Assisted extraction of total phenolic compounds from inula helenium. *Scientific World Journal*, 157527. <https://doi.org/10.1155/2013/157527>