

Bireysel Hızlı Dondurma İşlemi Basamaklarının Granny Smith Elmaların Polifenol İçeriği ve Antioksidan Kapasitesine Etkileri

Senem Kamiloğlu 

Mevsim Gıda Sanayi ve Soğuk Depo Ticaret A.Ş., Turanköy, 16540, Kestel, Bursa

Geliş Tarihi (Received): 27.01.2019, Kabul Tarihi (Accepted): 14.03.2019

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): senem@mvs.com.tr (S. Kamiloğlu)

☎ 0 224 383 36 01 📠 0 224 383 31 23

ÖZ

Granny Smith elmalar taze olarak tüketilebildiği gibi donmuş gıda sanayinde de yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Gıdaların üretim basamakları sırasında polifenol içeriğinde meydana gelen değişimlerin incelenmesi son ürünün besin değerini artırmak açısından önemlidir. Bu konu dikkate alınarak, bu çalışmada Granny Smith elmaların bireysel hızlı dondurma (IQF) işlemi sırasında çeşitli üretim basamaklardan alınan numunelerin polifenol içeriğinde meydana gelen değişimlerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Toplam fenolik ve flavonoid madde ile toplam antioksidan kapasitedeki değişimler spektrofotometrik yöntemlerle tespit edilmiş olup, polifenolik bileşiklerin tayini yüksek performanslı sıvı kromatografisi–fotodiyot dizi dedektörü (HPLC–PDA) kullanılarak kromatografik yöntemle yapılmıştır. HPLC–PDA ile yapılan analizler sonucunda hammaddede flavanoller, dihidrokalkonlar, fenolik asitler ve flavonoller dahil 4 gruba ait toplam 10 adet polifenolik bileşen tespit edilmiştir. Atık olarak ayrılan ürünlerin dihidrokalkonlar ve flavonoller açısından hammaddeden daha zengin olduğu görülmüştür (%140–378) ($p<0.05$). Asitlendirme toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde, toplam antioksidan kapasite, flavanoller ve fenolik asitlerin içeriğinde önemli artışlara neden olmuştur (%9–121) ($p<0.05$). Kesim ve dondurma işlemlerinden sonra asitlendirmeye kıyasla düşüşler görülmüş olsa da, hammadde ve son ürün arasında toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde, flavanol, dihidrokalkon ve fenolik asit içeriği bakımından istatistiksel olarak önemli bir farklılık görülmemiştir ($p>0.05$). Bu sonuçlar IQF Granny Smith elmaların da taze elmalar gibi iyi bir polifenol kaynağı olduğuna işaret etmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Malus domestica* Borkh., IQF, Flavonoidler, Fenolik asitler, HPLC–PDA

Effect of Individual Quick Freezing Steps on Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Granny Smith Apples

ABSTRACT

Granny Smith apples can be consumed as fresh or they are widely used in the frozen food industry. Determining the changes in polyphenol content during the production steps of foods is important for the nutritional value of the final product. The aim of this study was to determine the changes in the polyphenol content of Granny Smith apples taken from various steps of the individual quick freezing (IQF) treatment. Total phenolic content, total flavonoid content, and total antioxidant capacity were determined using spectrophotometric methods whereas the quantification of polyphenols were carried out by a chromatographic method using high performance liquid chromatography–photodiode array detector (HPLC–PDA). As a result of HPLC–PDA analysis, a total of 10 polyphenolic compounds belonging to 4 groups including flavanols, dihydrochalcones, phenolic acids and flavonols were identified in the raw material. Waste product was richer in dihydrochalcones and flavonols compared to raw material (140-378%) ($p<0.05$). Acidification resulted in significant increases in total phenolic content, total flavonoid content, total antioxidant capacity, flavanols and phenolic acids (%9–121) ($p<0.05$). Although there were decreases after cutting and freezing

steps compared to acidification, there was no statistically significant difference between the raw material and end product in terms of the total phenolic content, total flavonoid content, flavanols, dihydrochalcones and phenolic acids ($p>0.05$). These results indicated that IQF Granny Smith apples are good sources of polyphenols, just as fresh apples.

Keywords: *Malus domestica* Borkh., IQF, Flavonoids, Phenolic acids, HPLC–PDA

GİRİŞ

Elma (*Malus domestica* Borkh.) *Rosaceae* familyasının bir üyesi olup, dünyadaki en önemli ve en yaygın yetiştirilen ılıman meyvedir. Türkiye, Çin ve ABD'yi takip eden dünyanın en büyük üçüncü elma üreticisi ülkesidir [1]. Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü'nün 2018 yılının Nisan ayında yayınladığı bir rapora göre, Türkiye'de üretilen toplam elma miktarı içerisinde Starking çeşidi %38.97 oranı ile ilk sırada yer alırken, Golden çeşidi %25.66 oranı ile ikinci, Amasya çeşidi %7.93 oranı ile üçüncü ve Granny Smith çeşidi %4.60 oranı ile dördüncü sırada yer almaktadır. Yüzdesel olarak üretim diğer bazı elma çeşitlerinden düşük olsa da, Granny Smith elma üretim hacmi son yıllarda artışa geçmiştir. Yine aynı raporda verilen istatistiklere göre, 2012 yılında Granny Smith elma üretimi 103 569 ton iken, 2016 yılında 134 448 tona ulaşmıştır [2].

Elma tüketiminin kardiyovasküler hastalıklar ve kanserle ilgili patofizyolojik koşulları önleyerek, sağlık ve yaşam kalitesini artırdığı bilinmektedir [3, 4]. Görülen bu hastalıklara karşı koruyucu etkiler polifenoller ile özdeşleştirilmiştir. Polifenoller, bitkilerde sadece fizyolojik rol oynamakla kalmayıp aynı zamanda antioksidan özellikleri sayesinde insan sağlığı için de olumlu etkileri olan sekonder metabolitlerdir [5]. Elma zengin bir polifenol kaynağıdır (136 mg/100 g) ve nitekim, yeşil çay ve zeytinyağı gibi iyi bilinen iki polifenol kaynağı, elmadan daha düşük seviyede polifenol içermektedir (sırasıyla 89 ve 62 mg/100 g) [6].

Elma taze tüketilebildiği gibi meyve suyu, konserve, kurutulmuş meyve ve dondurulmuş meyve gibi çeşitli ürünlere işlenerek de tüketilmektedir [7]. Bireysel hızlı dondurma (IQF) doğranmış veya dilimlenmiş elmaların düşük sıcaklıklarda (-30 ile -40°C arasında) hava püskürtmeli akışkan yataklı dondurucuda dondurulması işlemi olup, konvansiyonel dondurmaya kıyasla çok daha kısa sürede gerçekleştirilmektedir. Dondurma işlemi sırasında hava güçlü fanlar yardımıyla gıda maddesi ile evaporatör arasında hızla hareket eder ve böylece durgun hava ile yapılan dondurma işlemine kıyasla gıda maddesinin daha kısa sürede dondurulması sağlanır. Akışkan yataklı dondurucularda dondurulan ürünler blok halinde değil taneler halinde donar ve bu şekilde her bir parçacığın ayrı ayrı donması işlemine IQF adı verilir. IQF işlemi ile gıdaların dondurulması konvansiyonel yöntemlere kıyasla gıdaların kalite özelliklerinin daha iyi korunmasını sağlamaktadır. Nitekim literatürde daha önce yapılan bir çalışmada, IQF yöntemi ile dondurulan meyvelerin toplam flavonoid madde miktarının konvansiyonel yöntemle dondurulan meyvelere kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür [8]. Gıda sanayinde IQF elma üretiminde, diğer elma

çeşitlerine kıyasla kararma hızı daha düşük olduğu için Granny Smith çeşidi tercih edilmektedir.

Gıdaların üretim basamakları sırasında polifenol içeriğinde meydana gelen değişimlerin incelenmesi son ürünün besin değerini artırmak açısından önemlidir. Literatürde dondurma işleminin elmanın kompozisyonuna etkisini inceleyen çalışmalar sınırlı olup [9], bilindiği kadarıyla daha önce yapılmış hiçbir çalışmada IQF işlemi basamaklarının Granny Smith elmaların polifenol içeriği ve antioksidan kapasitesine etkileri incelenmemiştir. Yukarıdakiler dikkate alınarak, bu çalışmanın amacı Granny Smith elmaların IQF işlemi sırasında çeşitli üretim basamaklardan alınan numunelerde toplam fenolik maddede, toplam flavonoid maddede, toplam antioksidan kapasitede ve polifenol içeriğinde meydana gelen değişimleri değerlendirmektir.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Isparta'nın Senirkent ilçesinden hasat edilen taze Granny Smith elmalar (*Malus domestica* Borkh.) 2018 yılının Mayıs ayında endüstriyel bir gıda işleme fabrikasında (Mevsim Gıda Sanayi ve Soğuk Depo Ticaret A.Ş., Turanköy, Bursa) Şekil 1'de verilen akım şemasına göre dondurulmuşlardır. Akım şeması üzerinde işaretlenen 5 farklı noktadan 3 farklı üretim günü numuneler toplanmıştır. Toplanan numuneler -20°C'de depolanmış ve ertesi hafta soğuk zincirle laboratuvara nakledilmiştir. Önceden soğutulmuş değirmen (IKA, Almanya) kullanılarak sıvı azot içinde yaklaşık 30 saniye boyunca ince bir toz halinde öğütülmüş ve analizlerden önce -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Analizlerde kullanılan tüm kimyasallar ve reaktifler, analitik veya HPLC derecesine sahip olup, aksi belirtilmediği takdirde Sigma-Aldrich'den (Almanya) temin edilmiştir.

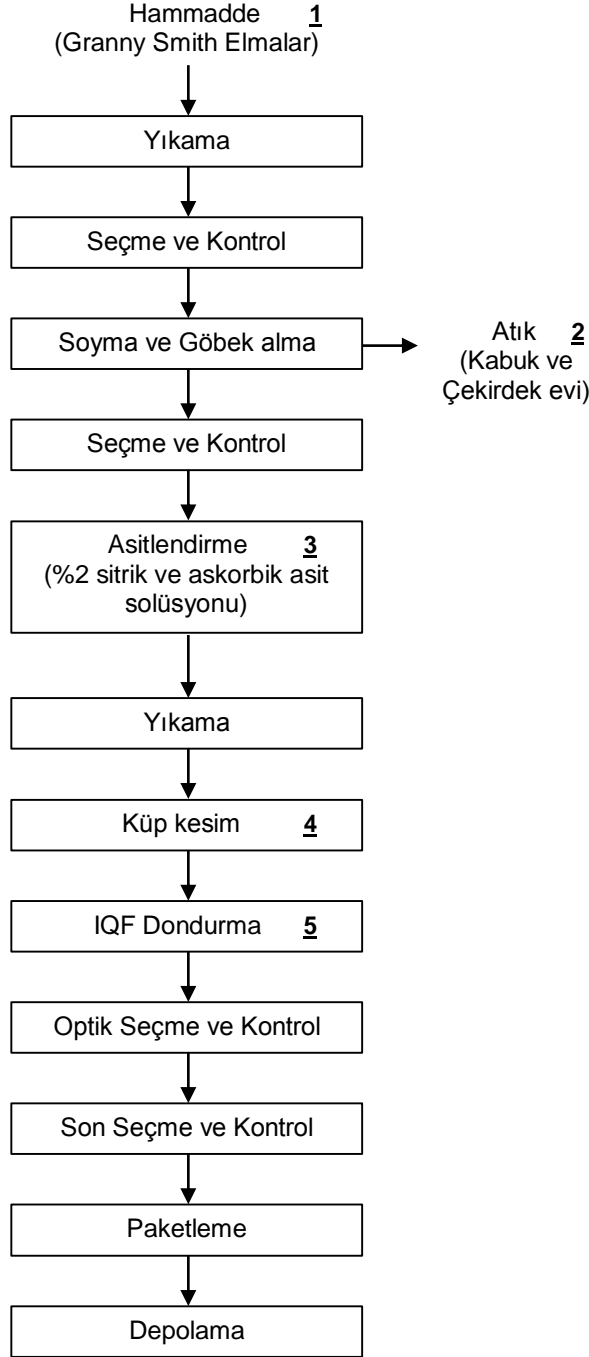
Nem Tayini

Numunelerin nem içeriği Resmi Analitik Kimyacılar Derneği (AOAC) analiz yöntemi [10] referans alınarak belirlenmiştir. 2.00±0.01 g numune önceden tartılmış alüminyum kaplara alınmıştır. Numuneler nem içeriği dengeye ulaşıncaya kadar etüv (Memmert, Almanya) içerisinde 105°C'de kurutulmuşlardır. Kurutma işlemi tamamlandıktan sonra, kaplar etüvden çıkarılıp desikatörde soğumaya bırakılmış ve tekrar tartılmışlardır. Numunelerin nem miktarları yüzde (%) olarak ifade edilmiştir.

Ekstraksiyon

Ekstraksiyonlar daha önce Kamiloğlu ve Capanoğlu'nun [5] çalışmasında belirtilen şekilde yapılmıştır. 2.00±0.01 g numuneye 5 mL %0.1 formik asit içeren %75 metanol (Merck, Almanya) solüsyonu ilave edilmiş ve 15 dakika soğutulmuş ultrasonik banyoda (VWR, ABD)

tutulmuştur. Sonrasında 4°C'de 10 dk. boyunca 2700 x g devirde santrifüjlenmiştir (Hettich, Almanya). Üst faz temiz bir tüpe alınarak, aynı işlemler bir kez daha tekrar edilmiştir. İki üst faz birleştirilip, son hacim 10 mL olarak ayarlanmıştır. Hazırlanan ekstraktlar analizlerden önce -20°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 1. Bireysel hızlı dondurulmuş (IQF) küp elma üretiminin akım şeması. 1: Hammadde, 2: Atık, 3: Asitlendirme, 4: Kesim, 5: Dondurma.

Toplam Fenolik Madde Analizi

Toplam fenolik madde analizi daha önce Velioglu ve ark. [11] tarafından tarif edilen şekilde yapılmıştır. 100 µL

ekstrakt 0.75 mL Folin-Ciocalteu reaktifi ile karıştırılıp 5 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra 0.75 mL %6 Na₂CO₃ solüsyonu karışıma ilave edilmiş ve 90 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresinden sonra 725 nm'de spektrofotometre (Optima, Japonya) ile absorbans ölçümü yapılmıştır. Numunelerin toplam fenolik madde miktarları gallik asit standart eğrisi kullanılarak belirlenip (lineer aralık: 10–400 ppm, $R^2= 0.999$), sonuçlar mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/100 g kuru ağırlık (KA) olarak ifade edilmiştir.

Toplam Flavonoid Madde Analizi

Toplam flavonoid madde miktarı daha önce Kim ve ark. [12] tarafından uygulanan şekilde tespit edilmiştir. 1 mL ekstrakta 0.3 mL %5 NaNO₂ eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra 0.3 mL %10 AlCl₃ eklenmiş ve 1 dakika sonrasında karışıma 2 mL 1 M NaOH ilave edilmiştir. Hemen ardından 2.4 mL saf su eklenmiş ve 510 nm'de spektrofotometre ile absorbans ölçümü yapılmıştır. Numunelerin toplam flavonoid madde miktarları (+)-kateşin standart eğrisi kullanılarak belirlenip (lineer aralık: 10–400 ppm, $R^2= 0.999$), sonuçlar mg kateşin eşdeğeri (KE)/100 g KA olarak ifade edilmiştir.

Toplam Antioksidan Kapasite Analizleri

Toplam antioksidan kapasitenin tespiti için 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit diamonyum tuzu) (ABTS), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP) ve bakır (II) iyonu indirgenen antioksidan kapasitesi (CUPRAC) metotları uygulanmıştır. Literatürde daha önce yapılmış çalışmalarda gıdalarda antioksidan kapasite ölçümünün tek bir metot kullanılarak doğru değerlendirilmesinin mümkün olmadığı belirtilip, farklı çalışma prensiplerine sahip birden fazla metodun uygulanması tavsiye edilmiştir [13]. Bu nedenle bu çalışmada 4 farklı antioksidan kapasite analiz metodu uygulanmıştır.

ABTS metodu daha önce Miller ve RiceEvans [14] tarafından tarif edilen şekilde uygulanmıştır. ABTS stok solüsyonu (Applichem, Almanya) 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 8.0) içinde 734 nm'de 0.90±0.05 absorbans derecesine seyreltilmiştir. Sonrasında 100 µL ekstrakt, 1 mL ABTS-çalışma solüsyonu ile karıştırılmıştır. 1 dakika sonra 734 nm'de spektrofotometre ile absorbans ölçümü yapılmıştır. Numunelerin toplam antioksidan kapasiteleri Trolox® standart eğrisi kullanılarak belirlenip (lineer aralık: 1–100 ppm, $R^2= 0.994$), sonuçlar mg Trolox® eşdeğeri (TE)/100 g KA olarak ifade edilmiştir.

DPPH metodu daha önce Kumaran ve Karunakaran'ın [15] çalışmasında belirtilen şekilde uygulanmıştır. 100 µL ekstrakt, 2 mL 0.1 mM metanolde çözünmüş DPPH reaktifi ile karıştırılmıştır. 30 dakika inkübasyondan sonra 517 nm'de spektrofotometre ile absorbans ölçülmüştür. Numunelerin toplam antioksidan kapasitesi Trolox® standart eğrisi kullanılarak belirlenip (lineer aralık: 10–100 ppm, $R^2= 0.999$), sonuçlar mg TE/100 g KA olarak ifade edilmiştir.

FRAP metodu daha önce Benzie ve Strain [16] tarafından belirtilen şekilde uygulanmıştır. 100 µL ekstrakt 900 µL FRAP reaktifi (sırasıyla 10:1:1

oranlarında asetat tamponu (pH 3.6), 10 mM 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) solüsyonu ve 20 mM FeCl₃ karışımı ile karıştırılmıştır. 4 dakika sonra 593 nm'de spektrofotometre ile absorbans ölçümü yapılmıştır. Numunelerin toplam antioksidan kapasiteleri Trolox® standart eğrisi kullanılarak belirlenip (lineer aralık: 10–100 ppm, $R^2= 0.991$), sonuçlar mg TE/100 g KA olarak ifade edilmiştir.

CUPRAC metodu daha önce Apak ve ark.'nın [17] çalışmasında belirtilen şekilde uygulanmıştır. 100 µL ekstrakt 1'er mL 10 mM CuCl₂, 7.5 mM neokuproin, 1 M NH₄C₂H₃O₂ ve saf su ile karıştırılıp, nihai hacim 4.1 mL'ye getirilmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyondan sonra 450 nm'de spektrofotometre ile absorbans ölçülmüştür. Numunelerin toplam antioksidan kapasiteleri Trolox® standart eğrisi kullanılarak belirlenip (lineer aralık: 10–600 ppm, $R^2= 0.997$), sonuçlar mg TE/100 g KA olarak ifade edilmiştir.

HPLC-PDA ile Polifenollerin Tayini

Numune ekstraktlarında bulunan polifenollerin tayini için daha önce Capanoglu ve ark. [18] tarafından tarif edilen yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. 0.45 µm membran filtreden geçirilen numune ekstraktları HPLC-PDA'ya (Waters, ABD) enjekte edilmiştir. Seperasyon için 250 x 4.6 mm, 5 µm Supelcosil LC-18 kolonu (Sigma-Aldrich, Almanya) kullanılmış olup, kolon sıcaklığı 40°C olarak ayarlanmıştır. Mobil faz A %0.1 trifloroasetik asit içeren ultra saf su olup, mobil faz B olarak %0.1 trifloroasetik asitli asetonitril kullanılmıştır. Kullanılan lineer gradyan şu şekildedir: 0 dk., %95 A ve %5 B; 45 dk., %65 A ve %35 B; 47 dk., %25 A ve %75 B; 49 dk., %65 A ve %35 B; 50 dk., %95 A ve %5 B. Akış hızı 1 mL/dk. ve enjeksiyon hacmi 10 µL olup; 280, 312 ve 360 nm'de spektral ölçümler yapılmıştır. Kateşin, epikateşin, klorojenik asit, kafeik asit, floridzin, kuersetin-3-galaktozid, kuersetin-3-glukozit ve kuersetin-3-ramnozid kendi otantik standartlarının harici kalibrasyon eğrileri kullanılarak mg/100 g KA şeklinde kantifiye edilmiş olup, kuersetin-3-ksilozit ve kuersetin-3-arabinozid miktarları ise kuersetin-3-glukozit standardı kullanılarak hesaplanmıştır. Tüm polifenol standart eğrileri belirlenen konsantrasyon aralığında (0.1–200 ppm) doğrusallık göstermiştir ($R^2 \geq 0.995$). Dedeksiyon limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ), sırasıyla 0.1–0.3 ppm ve 0.3–0.9 ppm aralığındadır.

İstatistiksel Analiz

Tüm analizler 3 tekerrürlü olarak temin edilen numunelerde 3 paralelli ölçümler yapılarak gerçekleştirilmiş olup, elde edilen sonuçlar ortalama ± standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. Veriler SPSS yazılımı (IBM, ABD) kullanılarak tek yönlü varyans analizine (ANOVA) tabii tutulmuştur. Numuneler arasındaki farklılıkların belirlenmesinde Tukey testi kullanılmıştır (p<0.05). Spektrofotometrik analizler arası korelasyon katsayıları (R^2) Excel yazılımı (Microsoft, ABD) kullanılarak hesaplanmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Nem İçeriği

IQF işlemi sırasında Granny Smith elmaların nem içeriklerinde meydana gelen değişimler Tablo 1'de verilmiştir. Hammadde için tespit edilen nem miktarı literatürde belirtilenden (%84) bir miktar düşük olup [19], atık, asitlendirme, kesim ve dondurma basamaklarından

alınan numunelerin nem içeriğinde artışlar meydana gelmiştir (%4–9). Nem miktarında meydana gelen bu artışların yıkamada ve asitlendirmede kullanılan sularının meyvenin yüzeyine tutunmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Numunelerin nem miktarlarındaki farklılıkları ortadan kaldırmak için, bu çalışmadaki tüm sonuçlar kuru ağırlık (KA) olarak ifade edilmiştir.

Tablo 1. Granny Smith elmaların bireysel hızlı dondurulması (IQF) esnasında farklı üretim basamaklarında nem miktarında, toplam fenolik madde miktarında, toplam flavonoid madde miktarında ve toplam antioksidan kapasitede meydana gelen değişimler

Analizler	Hammadde	Atık	Asitlendirme	Kesim	Dondurma
Nem içeriği (%)	81.2±0.7 c	85.1±0.9 bc	86.6±0.6 ab	90.4±3.0 a	87.0±0.2 ab
Toplam fenolik madde içeriği (mg GAE/100 g KA)	115.9±20.9 ab	88.4±20.8 b	154.5±26.8 a	92.2±12.0 b	86.3±21.3 b
Toplam flavonoid madde içeriği (mg KE/100 g KA)	322.7±36.8 b	271.2±44.2 b	428.1±34.7 a	264.1±14.8 b	233.8±31.9 b
ABTS (mg TE/100 g KA)	654.4±68.8 ab	530.0±90.6 bc	712.0±71.8 a	382.2±45.9 cd	298.8±13.8 d
DPPH (mg TE/100 g KA)	254.0±38.9 ab	179.2±31.7 c	304.6±19.7 a	251.2±26.7 abc	186.8±10.8 bc
FRAP (mg TE/100 g KA)	158.4±9.9 b	127.2±26.9 b	223.0±16.6 a	146.9±6.5 b	130.4±26.2 b
CUPRAC (mg TE/100 g KA)	1007.9±81.3 ab	692.2±170.4 c	1216.4±52.9 a	776.1±37.2 bc	697.3±139.2 c

Bu tabloda gösterilen veriler 3 tekerrürlü ve 3 paralelli olarak yapılmış ölçümlerin ortalama ± standart sapma değerleridir. Satırlardaki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları temsil etmektedir ($p < 0.05$).

Toplam Fenolik Madde İçeriği

Taze Granny Smith elmalar için tespit edilen toplam fenolik madde içeriği (Tablo 1) literatürde daha önce belirtilen değerlere (440–670 mg GAE/100 g KA) kıyasla düşüktür [20, 21]. Görülen bu fark, meyvenin olgunluğu, uygulanan tarımsal işlemler, meyve toplandıktan sonra fabrikaya ulaşıncaya kadar muhafaza edilen depo sıcaklığı, süresi, oksijen veya ışık varlığı gibi koşullardaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. Asitlendirme sonrası toplam fenolik madde miktarında %33 artış meydana gelirken, atık, kesim ve dondurma basamaklarından alınan numunelerde hammaddeye kıyasla %20–26 kayıplar görülmüştür. Folin-Ciocalteu sadece fenolik bileşenlere özgü olan bir test olmayıp, askorbik asit, sitrik asit, basit şekerler ve bazı amino asitler gibi indirgen bileşenleri de ölçerek, toplam fenolik madde içeriğinin gerçek değerinden fazla çıkmasına neden olabilmektedir [13]. Buna bağlı olarak asitlendirme sonrası görülen artışın sitrik ve askorbik asitten kaynaklandığı düşünülmektedir. Atık olarak ayrılan ürünün toplam fenolik madde miktarının hammaddeye düşük olması ise oksidasyon reaksiyonu ile açıklanabilir. Kesim basamağına gelindiğinde toplam fenolik madde miktarında görülen kayıp ürünün asitten arınmasından kaynaklanıyor olabileceği gibi, kesimle birlikte meyvenin oksidatif strese maruz kalarak membranın zarar görmesinden de kaynaklanıyor olabilir [22]. İlaveten, dondurma işlemi sırasında oluşan buz kristalleri hücrelerde turgor basıncı kaybına ve hücre duvarının yapısının zarar görmesine sebep olmaktadır.

Dondurma basamağında görülen toplam fenolik madde miktarındaki azalış bu duruma bağlı oluşan enzimatik esmerleşme ve oksidasyon nedeniyle olmuş olabilir [23]. İşleme basamakları boyunca toplam fenolik madde miktarında bazı dalgalanmalar gözlenmiş olsa da, görülen bu değişimler hammaddeye kıyasla istatistiksel olarak önemsizdir ($p > 0.05$).

Toplam Flavonoid Madde İçeriği

Granny Smith elmaların toplam flavonoid madde içeriğinde IQF işlemi basamaklarında görülen değişikliklerin trendi toplam fenolik madde içeriği için elde edilen sonuçlar ile benzerlik göstermiştir (Tablo 1). Diğer taraftan, hammadde için elde edilen toplam flavonoid madde miktarı literatüre kıyasla bir miktar daha yüksektir (119–220 mg KE/100 g KA) [24, 25]. Daha önce bahsedildiği üzere, bu farklılık meyve olgunluğu, depolama koşulları ve tarımsal işlemler gibi faktörlerden kaynaklanıyor olabilir. Toplam fenolik madde sonuçlarında olduğu gibi, asitlendirme toplam flavonoid madde miktarında da %33 artışa neden olurken, atık, kesim ve dondurma basamaklarından alınan numunelerde %16–27 azalışlar görülmüştür. Yukarıda belirtildiği üzere görülen bu değişimlerin sebebinin enzimatik esmerleşme ve oksidasyon reaksiyonları olduğu düşünülmektedir. Yine toplam fenolik madde sonuçlarında olduğu gibi toplam flavonoid madde miktarında meydana gelen bu düşüşler hammaddeye kıyasla istatistiksel olarak önemsizdir ($p > 0.05$). Bunlara ilaveten, Folin-Ciocalteu metodunda

olduğu gibi toplam flavonoid madde içeriğinin ölçülmesinde kullanılan kolorimetrik metot da sadece flavonoidlere özgü bir test değildir. Flavonoidlerin yanı sıra, fenolik asitler de bu testte oldukça güçlü bir reaksiyon verirken, flavanoller hariç çoğu flavonoid bu teste zayıf reaksiyon vermektedir [26]. Spektrofotometrik metotlarla elde edilen toplam fenolik ve toplam flavonoid madde sonuçlarının spesifik olmaması nedeniyle, bu çalışmada polifenollerin kromatografik yöntemle tayininin de yapılmasına karar verilmiştir.

Toplam Antioksidan Kapasite

IQF işlemi basamaklarında Granny Smith elmaların toplam antioksidan kapasitede meydana gelen değişimler 4 farklı metot (ABTS, DPPH, FRAP ve CUPRAC) kullanılarak tespit edilmiştir (Tablo 1). En yüksek toplam antioksidan kapasite CUPRAC metodu ile elde edilmiş olup, daha sonra bu metodu sırasıyla ABTS, DPPH ve FRAP metotları takip etmiştir. Bu veriler literatürde daha önce farklı metotlar kullanılarak Granny Smith elmaların toplam antioksidan kapasitesini ölçmüş bir çalışmada elde edilen sonuçlar (CUPRAC > ABTS > FRAP) ile uyumludur [20]. Gözlenen bu durum CUPRAC ve ABTS metotları ile gıda maddelerinde bulunan hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanlar tespit edilebiliyorken, DPPH metodu ile sadece lipofilik antioksidanların ve FRAP metodu ile de sadece hidrofilik antioksidanların tespit edilebiliyor olmasından kaynaklanıyor olabilir. İlâveten, FRAP metodu yavaş kinetik özelliklere sahip olan antioksidan bileşenlerin protokol süresi içinde (4 dk.) reaksiyona giremediğinden

dolayı tespit edilemiyor olması nedeni ile de eleştirilmektedir [27]. Toplam fenolik ve toplam flavonoid madde sonuçlarında olduğunda gibi asitlendirme toplam antioksidan kapasitede de artışla (%9–41) sonuçlanmış olup, atık, kesim ve dondurma basamaklarından alınan numunelerde hammaddeye kıyasla daha düşük (%1–54) toplam antioksidan kapasite miktarı tespit edilmiştir. Diğer yandan, toplam fenolik ve toplam flavonoid madde sonuçlarından farklı olarak, CUPRAC ve ABTS metotları ile tespit edilen sonuçlara göre IQF işlemi görmüş elmalar hammaddeye kıyasla istatistiksel olarak önemli miktarda daha az (%31–54) toplam antioksidan kapasiteye sahiptir ($p < 0.05$).

Spektrofotometrik Analizler Arası Korelasyonlar

Spektrofotometrik analizler arası korelasyon katsayıları (R^2) Tablo 2'de verilmiştir. Toplam fenolik madde ve toplam flavonoid madde arasında iyi bir doğrusal ilişki görülmüştür ($R^2 = 0.838$). Kullanılan 4 farklı antioksidan kapasite ölçüm metodu arasında, en yüksek korelasyon CUPRAC ve FRAP metotları arasında tespit edilmiştir ($R^2 = 0.900$). ABTS metodu hariç, toplam antioksidan kapasite ile toplam fenolik madde veya toplam flavonoid madde arasında da orta-iyi bir korelasyon görülmüştür ($R^2 = 0.654–0.875$). Bu sonuçlar fenoliklerin ve flavonoidlerin incelenen elma örneklerinin antioksidan kapasitelerine önemli katkılarda bulunduğunu göstermektedir. Daha önce yapılmış başka bir çalışmada da elma örneklerinde toplam fenolik madde ve toplam antioksidan kapasite arasında pozitif bir korelasyon tespit edilmiştir [28].

Tablo 2. Spektrofotometrik analizler arası korelasyon katsayıları (R^2)

Analizler	TFEM	TFLM	ABTS	DPPH	FRAP	CUPRAC
TFEM	1.000					
TFLM	0.838	1.000				
ABTS	0.453	0.684	1.000			
DPPH	0.728	0.654	0.376	1.000		
FRAP	0.875	0.851	0.447	0.744	1.000	
CUPRAC	0.819	0.864	0.641	0.723	0.900	1.000

TFEM: Toplam Fenolik Madde; TFLM: Toplam Flavonoid Madde

Flavanoller

HPLC–PDA kullanılarak 280 nm'de yapılan analizler sonucunda incelenen numunelerde flavanollerden kateşin ve epikateşin tespit edilmiştir (Şekil 2). Granny Smith elmalarda kateşinin ve epikateşinin varlığı literatürde daha önce yapılmış olan çalışmalarla uyumlu olup, yapılan çalışmalarda bu bileşiklere ilâveten prosiyanidin B1 ve B2 de tespit edilmiştir [29, 30]. Prosiyanidinlerin UV ile deteksiyonu spesifik olmayıp, bu bileşenlerin tespiti için floresan dedektörü kullanmak daha hassas sonuçlar vermektedir. İlâveten, bu çalışmada ticari standartların olmaması da bu bileşiklerin analizini sınırlandırmıştır. Flavanoller elmaların hem içinde hem de dış kabuğunda bulunmasına rağmen [30], atık olarak ayrılan kabukça zengin kısımda hammaddeye kıyasla %85 daha az miktarda toplam flavanol tespit edilmiştir (Tablo 3). Spektrofotometrik olarak elde edilen sonuçlarda olduğu gibi, asitlendirme hammaddeye kıyasla toplam flavanol

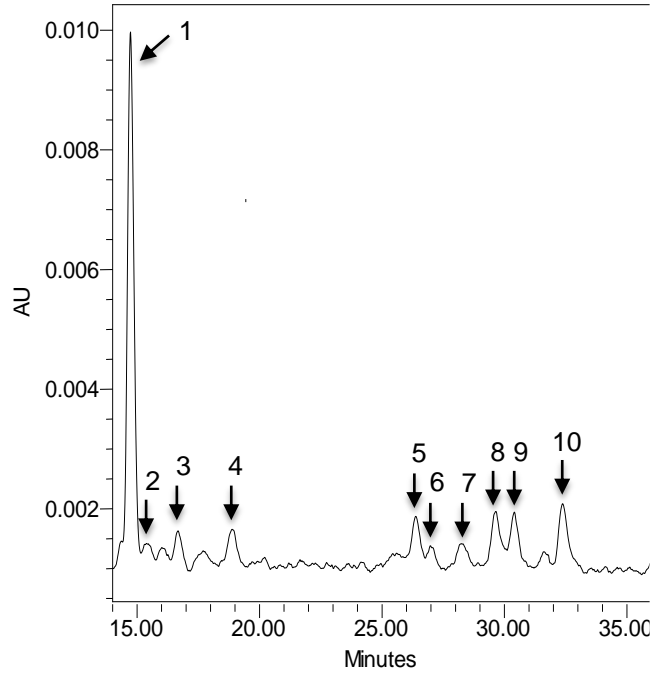
miktarında artışa neden olmuş olup (%121), kesim ve dondurma ise asitlendirmeye kıyasla %55 kadar azalışla sonuçlanmıştır ($p < 0.05$). Asitlendirme sonucu görülen artış gıda matrisine bağlı flavanollerin asit ile 2 saat inkübasyonu sonucu serbest kalması ile açıklanabilirken, sonrasında görülen azalmanın sebebinin daha önce de bahsedildiği üzere enzimatik esmerleşme ve oksidasyon reaksiyonlarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Yine spektrofotometrik sonuçlarla uyumlu olarak, hammadde ve son ürün arasında toplam flavanol içeriği bakımından istatistiksel olarak önemli bir farklılık görülmemiştir ($p > 0.05$).

Dihidrokalonlar

280 nm'de HPLC–PDA ile yapılan analizler sonucunda numunelerde dihidrokalonlar grubundan floridzin tespit edilmiştir (Şekil 2). Hammaddede atığa kıyasla istatistiksel olarak önemli derecede düşük miktarda floridzin bulunmuştur (%58) ($p < 0.05$) (Tablo 3). Literatürde daha

önce yapılan çalışmalar Granny Smith elmalarının kabuğundaki floridzin konsantrasyonunun meyvenin içi ile karşılaştırıldığında çok daha yüksek olduğunu gösterdiği için [31], kabuk açısından zengin olan atığın hammaddeye daha yüksek miktarda floridzin içermesi

beklenen bir sonuçtur. Asitlendirme, kesim ve dondurma işlemleri sonrasında floridzin içeriği bakımından hammaddeye kıyasla istatistiksel olarak önemli bir farklılık görülmemiştir ($p>0.05$).



Şekil 2. Granny Smith elma hammaddesinde bulunan polifenollerini gösteren HPLC–PDA kromatogramı.

1: Klorojenik asit, 2: Kafeik asit, 3: Kateşin, 4: Epikateşin, 5: Kuersetin-3-galaktozit, 6: Kuersetin-3-glukozit, 7: Kuersetin-3-ksilozit, 8: Kuersetin-3-arabinozit, 9: Kuersetin-3-ramnozit, 10: Floridzin

Tablo 3. Granny Smith elmaların bireysel hızlı dondurulma (IQF) işlemi öncesi ve sonrasında polifenol içeriğinde meydana gelen değişimler

Polifenoller	Hammadde	Atık	Asitlendirme	Kesim	Dondurma
<i>Flavanoller</i>					
Kateşin	11.5±3.3 b	0.9±0.03 c	26.0±2.2 a	7.9±0.8 b	9.2±3.1 b
Epikateşin	8.7±2.2 b	2.1±0.3 c	18.7±3.0 a	12.3±0.9 b	11.1±2.1 b
Σ Flavanoller	20.2±5.5 b	3.0±0.2 c	44.7±5.2 a	20.2±0.8 b	20.3±5.1 b
<i>Dihidroalkonlar</i>					
Floridzin	1.5±0.5 b	3.6±1.0 a	1.6±0.2 b	1.1±0.2 b	0.8±0.4 b
<i>Fenolik asitler</i>					
Klorojenik asit	10.0±1.3 b	5.7±0.1 c	14.9±1.5 a	14.1±1.8 a	9.7±2.1 b
Kafeik asit	0.2±0.02 d	0.3±0.01 cd	0.5±0.1 ab	0.7±0.1 a	0.4±0.2 bc
Σ Fenolik asitler	10.2±1.3 b	6.0±0.1 c	15.5±1.4 a	14.8±1.9 a	10.1±2.1 b
<i>Flavonoller</i>					
Kuersetin-3-galaktozit	6.4±2.4 b	42.7±7.4 a	-	-	-
Kuersetin-3-glukozit	1.8±0.5 b	14.1±2.8 a	-	-	-
Kuersetin-3-ksilozit	2.5±0.1 b	7.8±1.6 a	-	-	-
Kuersetin-3-arabinozit	4.3±0.9 b	12.8±2.0 a	-	-	-
Kuersetin-3-ramnozit	4.3±0.5 b	14.0±2.5 a	-	-	-
Σ Flavonoller	19.2±4.3 b	91.8±14.6 a	-	-	-

Bu tabloda gösterilen veriler 3 tekerrürlü ve 3 paralelli olarak yapılmış ölçümlerin ortalama \pm standart sapma değerleridir. Tüm polifenol içerikleri mg/100 g KA olarak ifade edilmiştir. Satırlardaki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları temsil etmektedir ($p<0.05$).

Fenolik Asitler

Fenolik asitlerin alt grubu hidroksisünamik asitlerden klorojenik asit ve kafeik asit HPLC–PDA ile 312 nm’de yapılan analizler sonucunda tespit edilmiştir (Şekil 2).

Klorojenik asit miktarı kafeik asite kıyasla çok daha yüksek olup (Tablo 3), tespit edilen miktar daha önce literatürde yapılmış çalışmalarla uyumludur [31]. Atık olarak alınan numunede hammaddeye kıyasla %41 kadar daha düşük miktarda toplam fenolik asit tespit

edilmiştir ($p<0.05$). Granny Smith elmalardaki fenolik asitler meyvenin iç kısmında yer almaktadır [31]. Bu sebeple kabuk açısından zengin olan atık ürünün daha az miktarda fenolik asit içermesi beklenen bir sonuçtur. Flavanoller için elde edilen sonuçlarda olduğu gibi asitlendirme sonucunda toplam fenolik asit miktarı da hammaddeye kıyasla %52 kadar artmıştır ($p<0.05$). Daha önce de belirtildiği üzere, görülen bu artışın gıda matriksine bağlı fenolik asitlerin sitrik ve askorbik asit ile uzun süre inkübasyonu sonucu serbest kalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kesim sonrası asitlendirmeye kıyasla önemli bir fark görülmezken ($p>0.05$), dondurma işlemi sonrasında kesime kıyasla %32 azalma görülmüştür ($p<0.05$). Bu azalma dondurma işlemi sırasında oluşan buz kristallerinin turgor basıncı kaybına ve hücre duvarının yapısının zarar görmesine neden olarak, bu duruma bağlı oluşan enzimatik esmerleşme ve oksidasyon reaksiyonlarından kaynaklanıyor olabilir [23]. Diğer polifenolik bileşiklerde olduğu gibi, hammadde ve son ürün arasında toplam fenolik asit içeriği bakımından da istatistiksel olarak önemli bir farklılık görülmemiştir ($p>0.05$).

Flavanoller

Son olarak, HPLC–PDA ile 360 nm’de yapılan analizler sonucunda hammadde ve atıkta flavanoller grubundan 5 adet kuersetin glikozit türevi tespit edilmiştir. Tespit edilen bileşikler kuersetin-3-galaktozid, kuersetin-3-glukozit, kuersetin-3-ksilozit, kuersetin-3-arabinozid ve kuersetin-3-ramnozittir (Şekil 2). Kuersetin-3-galaktozid en yüksek miktarda tespit edilen flavanol olup, toplam flavanol miktarının %33–47’sini oluşturmaktadır. Atıkta tespit edilen toplam flavanol miktarı hammaddeye kıyasla yaklaşık 4 kat daha fazla bulunmuştur (Tablo 3) ($p<0.05$). Asitlendirme, kesim ve dondurma işlemlerden sonra ise hiç flavanol tespit edilememiştir. Kuersetin glikozitlerinin elmanın sadece kabuğunda bulunduğu daha önce yayınlanmış çalışmalarda belirtilmiştir [32]. Bu bilgi dikkate alındığında elde edilen sonuçların literatür ile uyumlu olduğu söylenilebilir.

SONUÇ

Bu çalışmada Granny Smith elmaların IQF işlemi sırasında hammaddeden dondurmaya kadar çeşitli üretim basamaklarından alınan numunelerin polifenol içeriğinde meydana gelen değişimler değerlendirilmiştir. Hammaddede flavanoller, dihidrokalkonlar, fenolik asitler ve flavanoller dahil 4 gruba ait toplam 10 adet polifenolik bileşen tespit edilmiştir. Atık olarak ayrılan ürünlerin dihidrokalkonlar ve flavanoller açısından hammaddeden daha zengin olduğu görülmüştür (%140–378) ($p<0.05$). Asitlendirme toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde, toplam antioksidan kapasite, flavanoller ve fenolik asitlerin içeriğinde önemli artışlara neden oluştur (%9–121) ($p<0.05$). Kesim ve dondurma işlemlerinden sonra asitlendirmeye kıyasla düşüşler görülmüş olsa da, hammadde ve son ürün arasında toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde, flavanol, dihidrokalkon ve fenolik asit içeriği bakımından istatistiksel olarak önemli bir farklılık görülmemiştir ($p>0.05$). Bu sonuçlar IQF Granny Smith elmaların da

taze elmalar gibi önemli bir polifenol kaynağı olduğuna işaret etmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Rana, S., Bhushan, S. (2016). Apple phenolics as nutraceuticals: Assessment, analysis and application. *Journal of Food Science and Technology*, 53(4), 1727-1738.
- [2] T.C. Gıda, Tarım Ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Ekonomi Ve Politika Geliştirme Enstitüsü (TEPGE). Ürün Raporu Elma 2017. Erişim tarihi: Aralık, 2018. <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge>.
- [3] Weichselbaum, E., Wyness, L., Stanner, S. (2010). Apple polyphenols and cardiovascular disease—a review of the evidence. *Nutrition Bulletin*, 35(2), 92-101.
- [4] Tu, S.H., Chen, L.C., Ho, Y.S. (2017). An apple a day to prevent cancer formation: Reducing cancer risk with flavonoids. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(1), 119-124.
- [5] Kamiloglu, S., Capanoglu, E. (2015). Polyphenol content in figs (*Ficus carica* L.): Effect of sun-drying. *International Journal of Food Properties*, 18(3), 521-535.
- [6] Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Vos, F., Scalbert, A. (2010). Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(S3), S112.
- [7] Taiwo, K., Angersbach, A., Knorr, D. (2002). Rehydration studies on pretreated and osmotically dehydrated apple slices. *Journal of Food Science*, 67(2), 842-847.
- [8] Şengül, Y. (2014). Farklı Dondurma Ve Çözündürme Metotlarının Nar Tanelerinin Fiziksel Ve Antioksidan Özellikleri Üzerine Etkisi. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [9] Chassagne-Berces, S., Fonseca, F., Citeau, M., Marin, M. (2010). Freezing protocol effect on quality properties of fruit tissue according to the fruit, the variety and the stage of maturity. *LWT-Food Science and Technology*, 43(9), 1441-1449.
- [10] AOAC. (1999). *Official Method of Analysis* (16th ed.). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- [11] Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4113-4117.
- [12] Kim, D.O., Jeong, S.W., Lee, C.Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, 81(3), 321-326.
- [13] Capanoglu, E., Kamiloglu, S., Ozkan, G., Apak, R. (2018). Evaluation of antioxidant activity/capacity measurement methods for food products. In *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications*, R. Apak, E. Capanoglu, & F. Shahidi, Editors., Chicester, United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd., p. 273-286.

- [14] Miller, N.J., Rice-Evans, C. (1997). Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS•+ radical cation assay. *Free Radical Research*, 26(6), 195-199.
- [15] Kumaran, A., Karunakaran, R.J. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chemistry*, 97(1), 109-114.
- [16] Benzie, I.F., Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- [17] Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., Karademir, S.E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- [18] Capanoglu, E., Beekwilder, J., Boyacioglu, D., Hall, R., De Vos, R. (2008). Changes in antioxidant and metabolite profiles during production of tomato paste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 964-973.
- [19] Cruz, A.C., Guiné, R.P., Gonçalves, J.C. (2015). Drying kinetics and product quality for convective drying of apples (cvs. Golden Delicious and Granny Smith). *International Journal of Fruit Science*, 15(1), 54-78.
- [20] Dalmau, M.E., Bornhorst, G.M., Eim, V., Rosselló, C., Simal, S. (2017). Effects of freezing, freeze drying and convective drying on in vitro gastric digestion of apples. *Food Chemistry*, 215, 7-16.
- [21] Santacatalina, J., Contreras, M., Simal, S., Cárcel, J., Garcia-Perez, J.V. (2016). Impact of applied ultrasonic power on the low temperature drying of apple. *Ultrasonics Sonochemistry*, 28, 100-109.
- [22] Capanoglu, E., Beekwilder, J., Boyacioglu, D., De Vos, R.C., Hall, R.D. (2010). The effect of industrial food processing on potentially health-beneficial tomato antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(10), 919-930.
- [23] Loncaric, A., Dugalic, K., Mihaljevic, I., Jakobek, L., Pilizota, V. (2014). Effects of sugar addition on total polyphenol content and antioxidant activity of frozen and freeze-dried apple purée. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(7), 1674-1682.
- [24] Santacatalina, J., Rodríguez, O., Simal, S., Cárcel, J., Mulet, A., García-Pérez, J.V. (2014). Ultrasonically enhanced low-temperature drying of apple: Influence on drying kinetics and antioxidant potential. *Journal of Food Engineering*, 138, 35-44.
- [25] Ertekin Filiz, B., Seydim, A.C. (2018). Kinetic changes of antioxidant parameters, ascorbic acid loss, and hydroxymethyl furfural formation during apple chips production. *Journal of Food Biochemistry*, 42(6), e12676.
- [26] Ho, Y.C., Yu, H.T., Su, N.W. (2012). Re-examination of chromogenic quantitative assays for determining flavonoid content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(10), 2674-2681.
- [27] Apak, R., Guclu, K., Demirata, B., Ozyurek, M., Celik, S.E., Bektasoglu, B., Berker, K.I., Ozyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12(7), 1496-1547.
- [28] Khanizadeh, S., Tsao, R., Rekika, D., Yang, R., Charles, M.T., Rupasinghe, H.V. (2008). Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(5), 396-401.
- [29] Vrhovsek, U., Rigo, A., Tonon, D., Mattivi, F. (2004). Quantitation of polyphenols in different apple varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(21), 6532-6538.
- [30] Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Psomas, A., Zovoili, A., Siatis, V. (2009). Polyphenolic profile and antioxidant activity of five apple cultivars grown under organic and conventional agricultural practices. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(6), 1167-1175.
- [31] Karaman, Ş., Tütem, E., Başkan, K.S., Apak, R. (2013). Comparison of antioxidant capacity and phenolic composition of peel and flesh of some apple varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(4), 867-875.
- [32] Erdoğan, S.S., Demirci, M. (2015). Fitokimyasal kaynağı elma posası. *Akademik Gıda*, 13(3), 265-271.