



## ISIL İŞLEMİN ELMA SUYUNDA ENZİM AKTİVİTESİ VE FENOLİK BİLEŞİKLERE ETKİSİ: FTIR VE HPLC ÇALIŞMASI

Hande BALTACIOĞLU\*, Gözde DOĞANAY

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Niğde, Türkiye

| Anahtar Kelimeler  | Öz   |
|--|--|
| <i>Elma Suyu,<br/>Isıl İşlem,<br/>Fenolik Bileşik,<br/>FTIR,<br/>HPLC.</i> | Bu çalışmada farklı sıcaklık (40, 50, 60, 70 ve 80 °C) ve sürelerde (5, 10, 15, 20, 25, 30 dakika) uygulanan ısıtma işleminin elma suyunda Polifenol oksidaz (PPO) ve Peroksidaz (POD) enzim aktivitesi ile fenolik bileşikler üzerine etkisi incelenmiş ve fenolik bileşiklerdeki değişim FTIR spektroskopisi ve HPLC kullanılarak belirlenmiştir. Enzim inaktivasyonu genellikle artan sıcaklık ve zamanla artmıştır. PPO enziminde 80 °C'de 20 dakika sonunda % 99 inaktivasyon sağlanırken, POD enziminde 80 °C'de 20 dakika sonunda % 93,29 inaktivasyon sağlanmıştır. Genellikle 70 ve 80 °C sıcaklıkta toplam fenolik ve antioksidan aktivitede artış belirlenmiştir. Bu artış, enzim inaktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir. 80 °C'de 20 dakika ısıtma işleminden sonra toplam fenolik madde miktarı 668,41 ± 12,70 mg GAE/kg yaş ağırlık, EC <sub>50</sub> değeri 24,28 ± 0,69 mg/ml olarak belirlenmiştir. HPLC ile elma suyunda belirlenen fenolik bileşikler kateşin, klorojenik asit, epikateşin ve kamferol olmuştur. FTIR spektrumları incelendiğinde spesifik bantların epikateşin ve klorojenik asitle uyumlu olduğu ve bulunan sonuçların HPLC ile paralellik gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca FTIR spektroskopisi ile fenolik bileşik içeriğinde bir değişim gözlenmemiştir. |

## EFFECT OF THERMAL TREATMENT ON ENZYME ACTIVITY AND PHENOLIC COMPOUNDS IN APPLE JUICE: FTIR AND HPLC STUDY

| Keywords  | Abstract  |
|---|---|
| <i>Apple Juice,<br/>Thermal Treatment,<br/>Phenolic Compound,<br/>FTIR,<br/>HPLC.</i> | In this study, the effect of thermal treatment with different temperatures (40, 50, 60, 70, 80 °C) and times (5, 10, 15, 20, 25, 30 minutes) on Polyphenol oxidase(PPO) and Peroxidase (POD) and phenolic compounds in apple juice was investigated and the change in phenolic compounds was determined by FTIR spectroscopy and HPLC. Enzyme inactivation generally increased with increasing temperature and time. In PPO 99 % and in POD 93.29 % inactivation was achieved after 20 minutes at 80 °C. Generally, an increase was determined at 70 and 80 °C in total phenolic content (TPC) and antioxidant activity. This increase has been associated with enzyme inactivation. After 20 minutes at 80 °C, TPC was determined as 668.41 ± 12.70 mg GAE/kg fresh weight, EC <sub>50</sub> value was 24.28 ± 0.69 mg/ml. The phenolic compounds identified in apple juice by HPLC were catechin, chlorogenic acid, epicatechin and kaempferol. An increase in the amount of phenolic compounds was determined for 20 minutes at 80 °C. When FTIR spectra were examined, it was determined that the specific bands were compatible with epicatechin and chlorogenic acid and these results were parallel to HPLC. In addition, no change in phenolic compounds was observed with FTIR spectroscopy. |

### Alıntı / Cite

Baltacıoğlu, H., Doğanay, G., (2021). Isıl İşlemin Elma Suyunda Enzim Aktivitesi ve Fenolik Bileşiklere Etkisi: FTIR ve HPLC Çalışması, Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi, 9(1), 14-26.

### Yazar Kimliği / Author ID (ORCID Number)

H. Baltacıoğlu, 0000-0003-0774-0872  
G. Doğanay, 0000-0002-1227-9892

### Makale Süreci / Article Process

|   |            |
|---|------------|
| <b>Başvuru Tarihi / Submission Date</b> | 28.12.2020 |
| <b>Revizyon Tarihi / Revision Date</b>  | 15.02.2021 |
| <b>Kabul Tarihi / Accepted Date</b>     | 28.02.2021 |
| <b>Yayın Tarihi / Published Date</b>    | 30.03.2021 |

\* İlgili yazar / Corresponding author: handebaltacioglu@ohu.edu.tr, + 90-388-225-4226

## 1. Giriş (Introduction)

Meyvelerin ve sebzelerin işlenmesinde gıda kalitesinin sağlanması için enzimlerin inaktive edilmesi oldukça önem taşımaktadır. Polifenol oksidaz (PPO) ve Peroksidaz (POD) kaynaklı enzimatik esmerleşmeye bağlı olarak meydana gelen renk değişimleri, meyve suyunda kaliteyi etkileyen önemli bir problem olarak görülmektedir. Günümüzde meyve suyu üretiminde mikroorganizma ve enzimlerin inaktivasyonu için genellikle ısı işlem kullanılmaktadır. Ancak, ısı işlemler sırasında seçilen parametrelere göre gıdanın besinsel ve duyu özellikleri olumsuz etkilenmektedir. Bu nedenle ısı işlem ile enzim inaktivasyonu sağlanırken meyve sularında önemli bioaktif bileşenlerden olan fenolik bileşiklerin değişiminin de belirlenmesi önemlidir.

Yapılan bu çalışmada ülkemizde meyve suyu sektöründe en fazla üretilen meyve suyu olan elma suyuna, ısı işlem uygulamasının etkisi incelenmiştir. Bu amaçla ısı işlem uygulaması ile meyve sularının kalitesini olumsuz etkileyen PPO ve POD enzimlerinin inaktivasyonu araştırılmıştır. Bununla birlikte ısı işlem uygulamasının fenolik bileşikler üzerine etkisi belirlenmiştir. Bu amaçla toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu yöntemiyle belirlenirken, antioksidan aktivite tayini DPPH yöntemiyle tespit edilmiştir. Ayrıca bireysel fenolik bileşiklerin ısı işlem ile değişimi yaygın kullanılan HPLC yöntemiyle ve FTIR spektroskopisiyle belirlenmiştir. Son yıllarda FTIR spektroskopisi meyve veya meyve suyu gibi çeşitli gıdalarda farklı kalite özelliklerini incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. FTIR spektroskopisi fenolik bileşik gibi çeşitli biyoaktif bileşenlerin belirlenmesinde hızlı, ekonomik, güvenilir ve kolay bir metot olarak önem kazanmaya başlamıştır.

Bu çalışma ısı işlem uygulamasının hem PPO ve POD gibi enzimatik esmerleşmeden sorumlu enzimlere etkisi hem de fenolik bileşiklere etkisinin Red Chief elma çeşidinde belirlendiği ilk çalışma olacaktır. Bu amaçla hafif ısı ( $\leq 80$  °C) uygulaması ve uzun işlem sürelerinde elma suyunda enzim aktivitesi, toplam fenolik madde, antioksidan aktivite ile FTIR spektroskopisi ve HPLC kullanılarak fenolik bileşiklerin değişiminin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. Kaynak Araştırması (Literature Survey)

Elma (*Malus domestica*), gülgiller (*Rosaceae*) familyasından kültürü yapılan bir meyve türüdür. Lezzetli ve ekonomik olması, kolay bulunabilmesi ve sağlık üzerine olumlu etkileri bakımından en çok tüketilen gıdalardan biridir. İnsan beslenmesinde monosakkaritlerin, minerallerin, diyet lifinin, çeşitli biyolojik aktif bileşiklerin, C vitamini ve doğal antioksidan olarak bilinen fenolik bileşenlerin kaynağıdır (Erdogan ve Demirci, 2014). Ülkemiz meyve suyu sanayisinde işlenen meyvelerde en büyük payı yaklaşık % 46 ile elma almaktadır (Anonim, 2011).

Meyve ve sebzelerde bulunan doğal enzimlerden işleme teknolojisi açısından en önemlisi kuşkusuz PPO (EC 1.14.18.1) enzimidir. Doğrama, parçalama, ezme gibi işlemler veya başka bir mekanik etki sonucu oluşan zedelenme yerlerinde rengin hızla esmerleşip kararması bu enzimlerin istenmeyen etkilerinin sonucudur (Terefe vd., 2014). PPO'lar bakır içeren oksidoredüktazlardır. Substratları olan fenolik bileşikler oksijen eşliğinde esmer renkli bileşiklere oksitlemektedirler (Önez, 2006). POD'lar (EC 1.11.1.7), hidrojen peroksit varlığında fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyerek kahverengi bozunma ürünlerinin oluşumuna öncülük eder (Cemeroğlu vd., 2001).

Gıdalarda kalite kayıplarına neden olan enzimleri inaktif hale getirmek için çeşitli yöntemler uygulanmaktadır. Isıl işlemler enzim inaktivasyonunda gıda endüstrisinde en yaygın kullanılan yöntemlerdir. Literatürde ısı işlem uygulaması ile elma PPO ve POD enzimlerinin inaktivasyonu üzerine çalışmalar bulunmaktadır. Doğal enzimler, farklı termal kararlılıklara sahip izoenzimlerden oluşabilmektedir. Bu nedenle farklı meyvelerde veya aynı meyvenin farklı çeşitlerinde inaktivasyon süreleri ve sıcaklıkları farklılık göstermektedir (Yemenicioğlu vd., 1997).

Yemenicioğlu vd. (1997), 6 farklı elma çeşidinden (Golden Delicious, Starking Delicious, Granny Smith, Gloster, Starcrimson ve Amasya) elde edilen PPO'nun ısı parametrelerini belirlemek için üç farklı sıcaklık (68, 73, 78 °C) kullanmış ve elmadan elde edilen PPO' nın diğer meyvelerden elde edilene göre ısıya karşı daha dirençli olduğu bildirilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada Red Fuji, Granny Smith ve Golden Delicious PPO enzimleri arasında Granny Smith PPO enziminin 25-45 °C sıcaklık aralığında ısıya en fazla dayanıklı enzim olduğu, buna karşın Red Fuji PPO enziminin 65 °C' de en çok stabil kalan enzim olduğu belirlenmiştir (Liu vd., 2017). Krapfenbauer vd. (2006), sekiz farklı elma çeşidinden üretilen elma sularına (Florina, Gala, Golden Delicious, Idared, Jonagold, Pilot, Pinova ve Topaz) 60-90 °C sıcaklıkta ve kısa süreli (20-100 s) ısı işlem uygulamış ve PPO enziminin 80 °C' de tamamen inaktive olduğunu belirlemiştir. Niu vd. (2010), bulanık elma suyunda 55 °C' de hafif ısı uygulaması ile PPO enziminin minimum kalıntı aktivitesini % 66,4 ve 65 °C' de % 38,6 olarak bulmuştur. Golden HP ve Red delicious cinsinde POD enzimi 70 °C' de 10 dakika sonunda inaktif olurken, Golden JK ve Royal delicious 70 °C de 5 dakika sonunda inaktif olmuştur (Dubey vd., 2007). Jonagold Red cinsi elmalarda pastörizasyon sonunda POD' in kalıntı aktivitesi % 52 ve PPO' ın ise % 54 olarak belirlenmiştir (Riener vd., 2008).

Isıl işlemin etkinliğini belirlemek için sadece enzim inaktivasyonuna bakmak yeterli değildir. Enzim inaktivasyonu ile birlikte uygulanan prosesin gıdanın kalite parametreleri üzerindeki etkisi de incelenmelidir. Özellikle yüksek sıcaklıklardaki ısıl işlemler gıdanın besinsel ve duyuşal özellikleri üzerinde olumsuz etkilere sahiptirler. Sıcaklığın etkisiyle fenolik bileşikler gibi bileşenlerde olumsuzluklar ortaya çıkmaktadır. Literatürde yapılan bazı çalışmalar, ısıl işlem ile hücre duvarı ve hücre matriksinin yapısının bozulması nedeniyle fenolik asitlerin miktarının arttığını ifade ederken bazı çalışmalar ise ısıl işlem ile fenolik bileşenlerde ve antioksidan aktivitede azalma veya bir değişiklik olmadığını belirtmektedir (Meral, 2016).

Aguilar-Rosas vd. (2007), termal pastörizasyon (90 °C' de 30 saniye) ile elma suyunda toplam fenolik maddede %32,2'lik bir azalma belirlemiştir. Golden delicious cinsi elmalarda ısıl işlem (90 °C 1 dak) uygulaması sonunda toplam fenolik maddede kayıp % 21-26 arasında tespit edilmiştir (Başlar ve Erturgay, 2013). Yapılan başka bir çalışmada HTST pastörizasyonunun (85 °C, 30 s; 90 °C, 15 s) bulanık elma suyunun fenolik içeriği üzerine düşük bir etkisi olduğu saptanmıştır (Nayak vd., 2017). He vd. (2016), elma suyunda 80 °C'de 30 dakikalık ısıl işlemden sonra toplam fenolik madde miktarında % 1,35 artış belirlerken, 90 °C 'de 30 saniye ısıl işlem gören elma suyu örneklerinde % 9,82 azalış gözlemlenmiştir.

Literatürde elma suyunda çeşitli sıcaklık ve süre parametrelerine bağlı olarak uygulanan ısıl işlemin enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlendiği çalışmalar mevcutken, fenolik maddedeki ve antioksidan aktivitedeki değişimin belirlendiği çalışmalar sınırlıdır. Bu çalışma ile elma (Red Chief) suyunda hafif ısı ( $\leq 80$  °C) uygulaması ve uzun işlem sürelerinde enzim aktivitesi, toplam fenolik madde, antioksidan aktivite ile FTIR spektroskopisi ve HPLC kullanılarak fenolik bileşiklerin değişimi incelenmiştir.

### 3. Materyal ve Yöntem (Material and Method)

#### 3.1. Materyal (Material)

Bu çalışmada kullanılan taze elma (*Malus domestica*) yerel üreticilerden sağlanmıştır. Çalışmada Red Chief çeşidi elma kullanılmıştır. Meyveler, meyve suyu eldesinden önce 4°C sıcaklıkta depolanmıştır. Yıkamış ve kâğıt havlu ile yüzeyleri kurulanmış meyveler dörde kesilip, çekirdek evleri ayrılmış ve blenderdan (Arnica AA 1233 GH21530 Orbital Mix, Türkiye) geçirilmiştir. Elde edilen meyve suyu 4 katlı tülbentten süzölmüştür. Taze sıkılmış meyve suları kontrol olarak ayrılmıştır.

#### 3.2. Önerilen Yöntem (Proposed Method)

##### 3.2.1. Isıl işlem (Thermal treatment)

Elde edilen taze meyve suyu farklı sıcaklık ve sürenin meyve suyu üzerine etkisini belirlemek için ısıl işleme tabi tutulmuştur. 200 ml meyve suyu 7 cm çap ve 9,5 cm uzunluğa sahip cam beher içine konularak, cam beher su banyosu (Yüksel Kaya Makine, YKM-AS209, Türkiye) içine yerleştirilmiştir. Isıl işlem sırasında örnek içinde hızlı bir şekilde sıcaklığın homojen dağılımını sağlayabilmek için laboratuvar tipi özel mekanik karıştırıcı (İsolab, 615.01.001, GmbH, Germany) kullanılmıştır. Meyve suyuna farklı sıcaklıklarda (40, 50, 60, 70 ve 80°C) ve farklı sürelerde (5, 10, 15, 20, 25, 30 dakika) ısıl işlem uygulanmıştır. İşlem boyunca örnek sıcaklığı dijital sıcaklık ölçer kullanılarak kontrol edilmiştir. Cam beher içine konulan meyve suyu sıcaklığı istenen değere ulaştığında ısıl işlem başlatılmıştır. Örnekler enzim aktivitesinin ölçümü için ısıl işlemin hemen sonrasında buzlu su banyosuna alınmıştır. Her bir uygulama üç kez tekrarlanmıştır.

##### 3.2.2. Kalan PPO enzim aktivitesinin belirlenmesi (Determination of residual PPO enzyme activity)

İnaktivasyon sonunda PPO enzim aktivitesi ölçümleri Baltacıoğlu vd. (2015) tarafından kullanılan yöntem modifiye edilerek, spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Bu amaçla Thermo Scientific marka Evolution 300 model (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) spektrofotometre kullanılmıştır. PPO enzim aktivitesi 420 nm dalga boyunda absorbans artışı ölçülerek belirlenmiştir. Test tüplerine konulacaklar aşağıda listelenmiştir:

|  | Test    | Şahit   |
|--|---------|---------|
| 50 mM (pH=6,5) potasyum fosfat tamponu             | 2,00 ml | 2,30 ml |
| 0,25 M kateşol (K- fosfat tamponu içinde çözünmüş) | 0,30 ml | 0,30 ml |
| Örnek  | 0,30 ml | 0,00 ml |

Reaksiyon, örnek ilavesi ile başlamıştır. Tüp içeriği vorteks ile karıştırıldıktan sonra absorbans değerleri 3 dakika boyunca 5 saniyede bir kaydedilmiştir. Aktivite ölçüm sıcaklığı  $25 \pm 2$  °C olarak sağlanmıştır. PPO enzim aktivitesi zamana karşı çizilen  $A_{420}$  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.

### 3.2.3. Kalan POD enzim aktivitesinin belirlenmesi (Determination of residual POD enzyme activity)

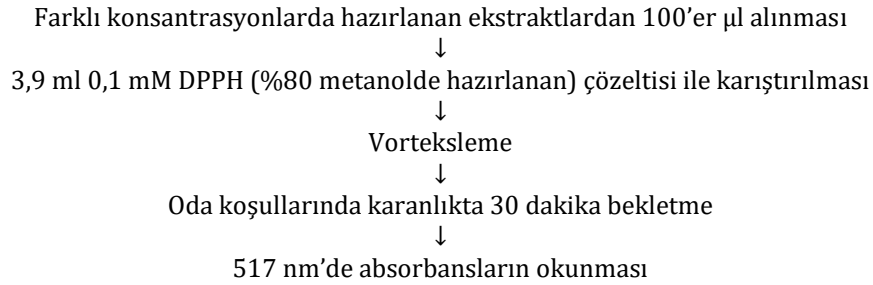
İnaktivasyon sonunda POD enzim aktivitesi ölçümleri spektrofotometrik yöntemle Abid vd. (2014) tarafından kullanılan yöntemde değişiklik yapılarak belirlenmiştir. Bu amaçla Thermo Scientific marka Evolution 300 model (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) spektrofotometre kullanılmıştır. POD aktivitesi substrat olarak pirogallol kullanılarak belirlenmiştir. Tüp içerisine 1 ml örnek, 1,52 ml 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 6), 0,32 ml %5 pirogallol ve 0,16 ml 0,147 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> karıştırılmıştır. Reaksiyon H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilavesi ile başlatılmış ve absorbansdaki artış 3 dakika boyunca 5 saniyede bir kaydedilmiştir. Aktivite ölçüm sıcaklığı 25 ± 2 °C olarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesi zamana karşı çizilen A420 grafiğinin ilk doğrusal kısmının eğiminin belirlenmesiyle, birim zamanda absorbansdaki 0,001'lik değişim olarak ifade edilmiştir. Kalan enzim aktivitesi kontrolün aktivitesine oranla yüzde olarak ifade edilmiştir.

### 3.2.4. Toplam fenolik madde tayini (Determination of total phenolic content)

Toplam fenolik madde tayini Folin-Ciocalteu metoduna göre yapılmıştır (Singleton ve Rossi, 1965). Standart olarak gallik asit kullanılmıştır. Meyve suyundaki fenolik bileşikler (1:5) % 1 HCl içeren % 80'lik metanol ile ekstrakte edilmiştir. Karışım 4 saat boyunca 40 rpm devirde çalkalanmış ve berrak kısmın ayrılması için 9000 devirde, +4 C'de, 15 dakika santrifüj (Nüve marka NR 800R model, Türkiye) edilmiş, elde edilen berrak kısım tüp içine alınmıştır. Toplam fenolik tayini için 100 µl örnek üzerine 0,75 ml Folin- Ciocalteu çözeltisi (suda, %10'luk) eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 0,75 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (suda, 75g/L) ilave edilerek kuvvetlice karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında karanlıkta 1 saat bekletilmiş ve süre sonunda 725 nm'de çözeltilerin absorbansları okunmuştur. Aynı işlemler 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 yaş ağırlık).

### 3.2.5. DPPH yöntemiyle antioksidan aktivite tayini (Antioxidant activity determination by DPPH method)

Serbest radikal yakalama etkinliği deneyi 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikali kullanılarak Blois'in metoduna göre çalışılmış ve aşağıdaki prosedür uygulanmıştır (Blois, 1958).



Örnek yerine 0,1 ml %80'lik metanol kullanılarak aynı şartlarda kontrol olarak kullanılmış ve kontrolün absorbansı günlük olarak ölçülmüştür. Şahit olarak %80 metanol kullanılmıştır. % DPPH radikali giderme aktivitesi Denklem 1' e göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ DPPH Radikali Giderme Aktivitesi} = \frac{\text{Kontrolün absorbansı} - \text{Örnek Absorbansı}}{\text{Kontrol Absorbansı}} \quad (1)$$

Örneklerin farklı konsantrasyonlarına karşı hesaplanan % inhibisyon değerleri ile çizilen grafikten lineer regresyon ile % 50 inhibisyona neden olan antioksidan derişimleri elde edilmiş ve sonuçlar EC<sub>50</sub> (mg/ml) olarak ifade edilmiştir.

### 3.2.6. Fenolik bileşik değişiminin FTIR spektroskopisi kullanılarak belirlenmesi (Determination of phenolic compound change using FTIR spectroscopy)

Uygulanan inaktivasyon yönteminin fenolik madde içeriğine etkisi Fourier Dönüşüm Kızıl Ötesi (FTIR) spektroskopisi kullanılarak belirlenmiştir. Örneklerin absorpsiyon spektrumu Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında bulunan ATR hücreesine sahip FTIR spektroskopisi (Bruker,

Almanya) kullanılarak, 2 cm<sup>-1</sup> çözünürlükte 128 tarama yapılarak 400-4000 cm<sup>-1</sup> bölgesinde elde edilmiştir. Ekstraksiyon solventinin (metanol, %80) karışımının bantları kapatmasından dolayı örnekler liyofilize edilerek kurutulduktan sonra (önce etüvde metanol uçurulmuş), okuma kurutulmuş örnekte gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.7. HPLC ile fenolik bileşiklerin belirlenmesi (Determination of phenolic compounds by HPLC)

Elma suyunun fenolik içeriğini belirlemek için HPLC yöntemi uygulanmıştır (Kuşçu ve Bulantekin, 2016). Ekstrakt eldesi için, öncelikle 15'şer ml falkon tüplerinde 2 g elma suyu üzerine % 80'lik metanol (%1'lik HCl içeren) çözeltisi ilave edilerek 10 ml hacme tamamlanmış ve oda sıcaklığında, ışık almayacak şekilde 240 dak çalkalanması ile ekstraksiyon sağlanmıştır. Sonrasında ekstrakt 9000 rpm, 15 dak, +4 C'de santrifüj edilerek, elde edilen süzütüden tüp içine alınmıştır. Enjeksiyondan önce ekstraktlar, 0,45µm teflon membran filtreden geçirilmiş ve kahverengi şişelere doldurulmuştur. Daha sonra, şişelerdeki ekstraktların 20 µl'si SIL-10AD vp otomatik örnekleme sistemi ile HPLC'ye (Shimadzu Corporation, Kyoto Japan) enjekte edilmiştir. HPLC sistemi bir pompa (LC-10ADvp), degazer (DGU- 14A), kontrol fırını (CTO-10Avp), bir detektörden (DAD dedektör (λ<sub>max</sub>=278nm)) oluşmaktadır. Polifenolikler Agilent Eclipse XDB-C18 kolonu kullanılarak ((250x4,60 mm), 5 mikron ) ayrılmıştır. Kolon sıcaklığı 30 °C'dir. Ayrım ikili çözücü sistemiyle gradient program uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Mobil faz % 3 asetik asit (A) ve metanolden (B) oluşmaktadır. Akış hızı çalışma boyunca 0,8 ml/dakikadır. Gradient programı Tablo 1'e göre uygulanmıştır.

**Tablo 1.** Gradient programı (Gradient program)

| Süre (dakika) | A (%) | B (%) |
|---------------|-------|-------|
| 0             | 93    | 7     |
| 20            | 72    | 28    |
| 28            | 75    | 25    |
| 35            | 70    | 30    |
| 50            | 70    | 30    |
| 60            | 67    | 33    |
| 62            | 58    | 42    |
| 70            | 50    | 50    |
| 73            | 30    | 70    |
| 75            | 20    | 80    |
| 80            | 0     | 100   |
| 81            | 93    | 7     |

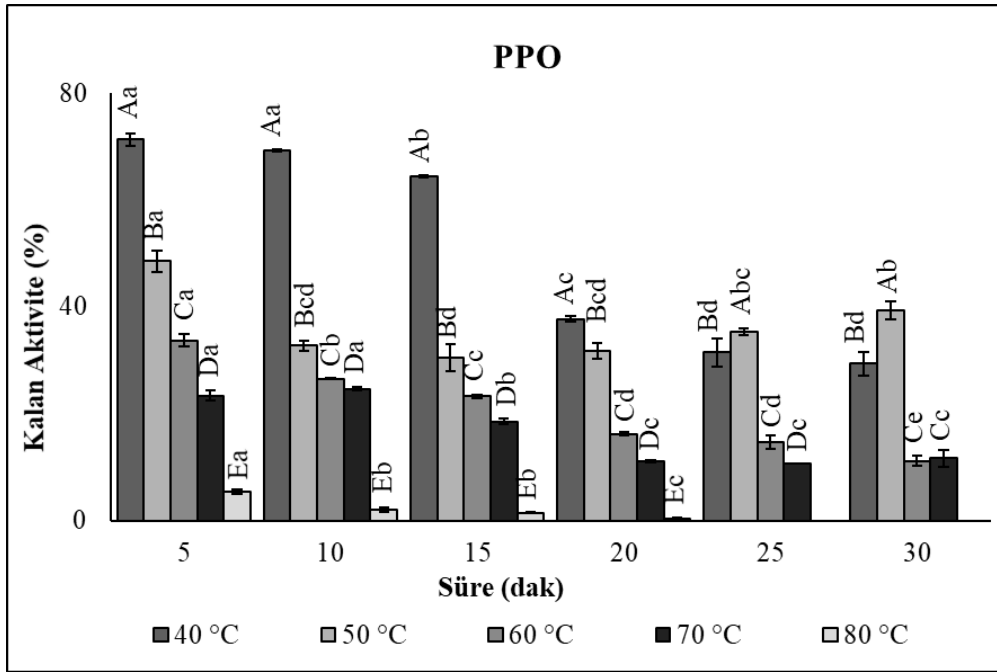
### 3.2.8. İstatistiksel analiz (Statistical analysis)

Veriler Minitab (17 versiyon, Minitab Inc., State College, PA, ABD) paket programı kullanılarak % 95 güvenlik aralığında analiz edilmiş olup verilerin analizinde genel lineer model kullanılmıştır. Uygulamalar arasındaki farklılıkların tespiti için Tukey's çoklu karşılaştırma testi yapılmıştır. Her bir deney en az üç kez tekrarlanmıştır.

## 4. Deneysel Sonuçlar (Experimental Results)

### 4.1. Isıl İşlem Sonrasında Elma Suyunda Kalan PPO Aktivitesi (Residual PPO Activity in Apple Juice after Thermal Treatment)

Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için farklı sürelerde elma suyu örneklerine ısıl işlem uygulanmıştır. Isıl işlem öncesi ve sonrasında PPO enzimlerinin aktiviteleri belirlenmiştir. Kalan enzim aktivitesi kontrolün aktivitesine oranla yüzde olarak ifade edilmiştir. Buna göre uygulanan sıcaklık ve süreye göre kalan enzim aktivitesinde gözlenen değişiklikler PPO enzimi için Şekil 1' de verilmiştir.



Grafikteki farklı harfler ((A, B, C...), sıcaklıklar; (a, b, c...), süreler) değerler arasında önemli bir fark olduğunu göstermektedir.

**Şekil 1.** Isıl işlem sonunda kalan PPO aktivitesi (Residual PPO activity after thermal treatment)

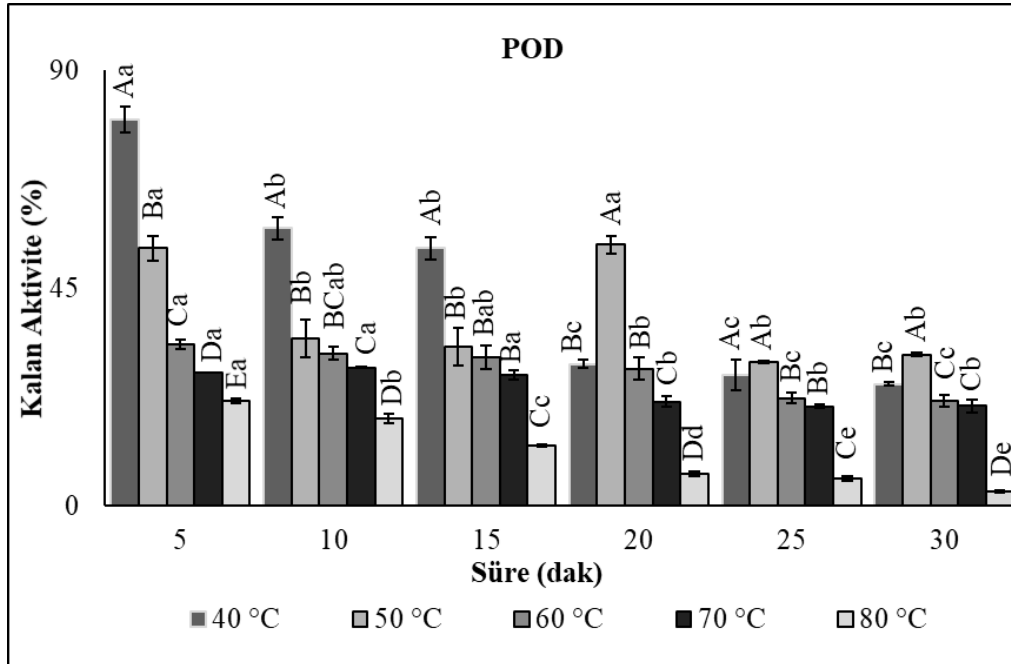
Elma suyuna uygulanan ısıl işlem sonucunda, enzim aktivitesindeki değişim incelendiğinde sıcaklığın, sürenin ve sıcaklık-süre etkileşiminin PPO enzim aktivitesi üzerine etkisi önemli bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). 40 °C sıcaklıkta 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dakika uygulanan ısıl işlem sonrasında kalan PPO enzim aktivitesi sırasıyla % 71,37 ± 1,11; % 69,33 ± 0,18; % 64,49 ± 0,18; % 37,73 ± 0,55; % 31,47 ± 2,63 ve % 29,36 ± 2,23 olarak belirlenmiştir. Aynı sıcaklık değerinde 5, 10 ve 15 dakikada enzim aktivitesindeki azalma yavaşken, 20, 25 ve 30 dakikalık süre sonunda enzim inhibisyonunda artış hızlanmıştır.

Kalan enzim aktivitesi, 50 °C sıcaklıkta artan sürelerde sırasıyla % 48,55 ± 2,05; % 32,71 ± 0,85; % 30,45 ± 2,46; % 31,74 ± 1,46; % 35,27 ± 0,66 ve % 39,26 ± 1,68 olarak saptanmıştır. Bu sıcaklık değerinde uzun işlem süreleri sonunda (25 ve 30 dakika) enzim aktivitesinde artış gözlenmiştir. Benzer şekilde elma suyunda 50 °C sıcaklıkta 60 dakikaya kadar uygulanan ısıl işlemlerde PPO enziminin aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Bunun nedeninin enzim konformasyonunda gözlenen değişim olabileceği düşünülmektedir (Murtaza vd., 2018). 60 °C sıcaklıkta ve 5 dakika sonunda kalan aktivite % 33,68 ± 1,13 iken, 30 dakika sonunda bu değer % 11,15 ± 0,88 olarak belirlenmiştir. 70 °C sıcaklıkta 5 dakika uygulanan işlemde sonra kalan aktivite değeri % 23,41 ± 0,88 bulunmuştur. Aynı sıcaklıkta 30 dakika sonunda bulunan değer % 11,61 ± 1,61 olarak tespit edilmiştir. 80 °C sıcaklıkta ise 5 dakikalık işlemde sonra % 5,40 ± 0,47 aktivite gözlenirken, 20 dakika sonunda % 99 inaktivasyon sağlanmıştır. Elma suyunda PPO enzim aktivitesinin sıcaklık ve süreye bağlı olduğu ve genellikle artan sıcaklık ve süre arasında önemli bir etkileşim ( $p < 0,05$ ) olduğu gözlenmiştir.

Benzer şekilde yapılan çalışmalarda genellikle artan sıcaklık ve süre ile PPO aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir. Royal gala cinsi elmadan elde edilen meyve suyuna 75 °C sıcaklıkta 20 dakika uygulanan ısıl işlem ile kalan PPO enzim aktivitesi % 3,2 olarak tespit edilmiştir (Sulaiman vd., 2016). Yi vd. (2017), Pink Lady, Granny Smith ve Jonagold çeşitlerinden üretilen meyve suyuna 85 °C sıcaklıkta 5 dakika ısıl işlem uygulaması sonrasında PPO enzim aktivitesi belirleyememişlerdir. Elma dilimlerine 25 °C, 35 °C, 45 °C, 55°C ve 65 °C sıcaklıkta 20 dakikalık hafif ısı uygulaması yapılan bir çalışmada, bu dilimlerden bulanık meyve suyu üretilmiş ve elma suyunda 55 °C' de ısı uygulaması sonucu PPO enziminin minimum kalıntı aktivitesi % 66,4 iken, 65 °C ise % 38,6 bulunmuştur (Niu vd., 2010). Krapfenbauer vd. (2006), sekiz farklı elma çeşidi (Florina, Gala, Golden Delicious, Idared, Jonagold, Pilot, Pinova ve Topaz) kullanarak elde ettikleri elma sularında yüksek sıcaklıkta (60-90 °C) ve kısa süreli (20-100 s) (HTST) ısıl işlem uygulamışlar ve 60 °C' de, PPO aktivitesinde önemli bir azalma tespit edememişlerdir. Ancak 20, 50 ve 100 s ısıtma süresinden sonra 70 °C' de enzim aktivitesinde önemli bir azalma olduğu bulunurken ısıtma süresi arasında bir fark gözlenmemiştir. PPO enziminin 80 °C' de ise tamamen inaktivasyonu sağlanmıştır. Bu çalışmalarda bulunan sonuçlar, literatürde belirlenenler sonuçlar ile benzer bulunmuştur.

#### 4.2. Isıl İşlem Sonrasında Elma Suyunda Kalan POD Aktivitesi (Residual POD Activity in Apple Juice after Thermal Treatment)

Elma suyu örneklerine uygulanan ısıl işlem sonrasında sıcaklık ve süreye bağlı olarak belirlenen kalan POD aktivitesi Şekil 2' de verilmiştir.



Grafikteki farklı harfler ((A, B, C...), sıcaklıklar; (a, b, c...), süreler) değerler arasında önemli bir fark olduğunu göstermektedir.

**Şekil 2.** Isıl işlem sonunda kalan POD aktivitesi (Residual POD activity after thermal treatment)

Sıcaklığın, sürenin ve sıcaklık-süre etkileşiminin POD enzim aktivitesi üzerine etkisi önemli bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). 40 °C sıcaklıkta 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dakika uygulanan ısıl işlem sonrasında kalan POD enzim aktivitesi sırasıyla % 79,81 ± 2,75; % 57,33 ± 2,29; % 53,21 ± 2,29; % 29,35 ± 0,91; % 27,06 ± 3,21; % 25,22 ± 0,45 olarak belirlenmiş ve artan süre ile POD enziminin aktivitesinin azaldığı görülmüştür. Kalan enzim aktivitesi, 50 °C sıcaklıkta ısıl işlemde sonra artan sürelerde sırasıyla % 53,24 ± 2,59; % 34,63 ± 3,96; % 32,90 ± 3,96; % 53,95 ± 1,90; % 29,68 ± 0,31; % 31,25 ± 0,31 olarak ölçülmüştür. Bu sıcaklık değerinde 20 dakika süren ısıl işlemde sonra POD enzim aktivitesinde artış gözlenmiştir. Benzer şekilde Dubey vd. (2007) tarafından, Royal delicious cinsinde 50 °C 10 ve 25 dk ısıl işlem sonrasında enzim aktivitesinde belli oranda artış görülmüştür. Aynı şekilde Red delicious cinsinde de 50 °C de 25 dakikada enzim aktivitesinde artış belirlenmiştir. Bunun nedeninin, enzim konformasyonunda gözlenen değişim olabileceği düşünülmektedir.

60 °C sıcaklıkta 5 dakika sonunda kalan aktivite % 33,33 ± 0,90 iken, 30 dakika sonunda % 21,65 ± 1,18 olarak tespit edilmiş ve artan süre normlarıyla lineer bir azalış görülmüştür. 70 °C sıcaklıkta 5 dakika sonunda kalan POD aktivitesi ise % 27,50 ± 0,01 olup, artan süre ile kalan aktivite azalış göstermiş ve 30 dakika sonunda % 20,65 ± 1,25 olarak bulunmuştur. 80 °C de ise 5 dakika sonunda kalan aktivite % 21,71 ± 0,46 olarak ölçülmüştür. Aynı sıcaklıkta 20 dakika sonunda % 93,29 inaktivasyon belirlenirken, 25 ve 30 dakikalık ısıl işlem sürelerinde elde edilen inaktivasyon arasında önemli bir fark belirlenmemiştir ( $p > 0,05$ ). Genel olarak bakıldığında 80 °C' de 20 dakika sonunda yeterli inaktivasyon sağlandığı söylenebilmektedir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde Red Chief elma çeşidinde POD enziminin PPO'ya kıyasla ısıl işleme daha dirençli olduğu belirlenmiştir.

Yi vd. (2017), Pink Lady, Granny Smith ve Jonagold çeşitlerinden üretilen meyve suyuna 85 °C sıcaklıkta 5 dakika ısıl işlem uygulaması sonrasında POD enzim aktivitesi belirlenmemiştir. Golden delicious JK cinsinden üretilen elma suyunda 70 °C 5 dakika sonunda, Red delicious cinsinde 70 °C 10 dakika sonunda, Royal delicious cinsinde 70 °C 5 dakika sonunda enzim inaktivasyonu sağlandığı belirlenmiştir (Dubey vd., 2007). Elde edilen veriler literatür ile karşılaştırıldığında farklı elma çeşitlerinde POD inaktivasyon sıcaklık ve sürelerinin farklılık gösterdiği belirlenmiştir.

### 4.3. Isıl İşlem Süresince Toplam Fenolik Madde Miktarındaki Değişim (Change in Total Phenolic Content during Thermal Treatment)

Elma suyunda ısıl işlem süresince toplam fenolik madde miktarındaki değişimi Tablo 2' de gösterilmektedir. Isıl işlem uygulamasında sıcaklığın, sürenin ve sıcaklık-süre etkileşiminin toplam fenolik madde üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Taze elma suyunda  $404,13 \pm 6,20$  mg GAE/kg yaş ağırlık olarak toplam fenolik madde belirlenmiştir. Isparta ilinden elde edilen farklı elma çeşitlerinde toplam fenolik madde miktarı meyve etinde  $399,0 - 657,1$  mg GAE /100g arasında, kabuğunda ise  $929,7 - 1692,5$  mg GAE /100g arasında değişmektedir (Yıldırım vd., 2019). Buna karşın taze meyveye kıyasla meyve suyuna işleme sonucunda toplam fenolik madde miktarı azalmaktadır. Başlar ve Erturgay (2013), elma sularının toplam fenolik madde miktarının  $190 - 200$  mg GAE/L arasında değiştiğini rapor etmiştir.

**Tablo 2.** Isıl işlem süresince elde edilen toplam fenolik madde (mg GAE/kg yaş ağırlık) değerleri (Total phenolic content (mg GAE / kg wet weight) during thermal treatment)

| Süre (dak) | Sıcaklık (°C)           |                         |                        |                          |                          |
|------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|
|            | 40                      | 50                      | 60                     | 70                       | 80                       |
| 5          | $741,98 \pm 7,71^{Aa}$  | $449,25 \pm 8,17^{Dc}$  | $348,53 \pm 1,51^{Eb}$ | $538,54 \pm 16,29^{Cc}$  | $672,83 \pm 11,80^{Bab}$ |
| 10         | $712,90 \pm 13,81^{Ab}$ | $515,16 \pm 9,61^{Ca}$  | $304,28 \pm 4,84^{Dd}$ | $559,05 \pm 11,34^{Bbc}$ | $703,51 \pm 1,79^{Aa}$   |
| 15         | $603,18 \pm 1,55^{Bc}$  | $525,96 \pm 1,88^{Da}$  | $276,14 \pm 3,07^{Ee}$ | $554,57 \pm 6,45^{Cbc}$  | $636,99 \pm 2,63^{Ab}$   |
| 20         | $205,67 \pm 8,08^{Ed}$  | $388,64 \pm 15,05^{Cd}$ | $332,52 \pm 3,17^{Dc}$ | $587,64 \pm 8,15^{Ba}$   | $668,41 \pm 12,70^{Aab}$ |
| 25         | $200,33 \pm 4,90^{Ed}$  | $491,24 \pm 8,01^{Cb}$  | $346,81 \pm 1,57^{Db}$ | $573,39 \pm 3,71^{Bab}$  | $638,21 \pm 29,89^{Ab}$  |
| 30         | $223,23 \pm 9,73^{Ed}$  | $504,21 \pm 0,1^{Cab}$  | $378,52 \pm 1,61^{Da}$ | $568,74 \pm 7,48^{Bab}$  | $668,42 \pm 25,96^{Aab}$ |

Tablodaki farklı harfler ((A, B, C...), sıcaklıklar; (a, b, c...), süreler) değerler arasında önemli bir fark olduğunu göstermektedir.

40 °C' de 5, 10, 15 dakika sonunda ısıl işlem görmemiş taze elma suyuna göre toplam fenolik maddede artış belirlenirken aynı sıcaklık değerinde 20, 25, 30 dakika sonunda toplam fenolik maddede azalış tespit edilmiştir. Kısa işlem sürelerinde gözlenen bu artışın ısıl işlem ile hücre duvarı ve hücre matriksinin yapısının bozulması nedeniyle fenolik bileşik miktarının artmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (He vd., 2016). 40 °C' de artan süreye bağlı olarak fenolik bileşiklerdeki azalmanın, yüksek enzim aktivitesi ve açığa çıkan bu maddelerin uzun işlem süreleri sonucunda yapısının bozulmasından kaynaklandığı söylenebilmektedir (He vd., 2016). 50 °C' de genel olarak bakıldığında ısıl işlem görmemiş taze elma suyu örneğine göre fenolik bileşiklerde artış gözlenmiş ancak 20 dakikada gözlenen azalışın PPO ve POD enzim aktivitesindeki artış nedeniyle olabileceği düşünülmektedir. 60 °C' de genel olarak ısıl işlem görmemiş taze elma suyu örneğine göre fenolik madde de azalış belirlenmiştir. Bunun nedeni PPO ve POD enzim aktivitesinin yüksek olması ile sıcaklığın fenolik bileşikler üzerindeki olumsuz etkisinden kaynaklanabilmektedir. Yüksek sıcaklık (70 ve 80 °C) uygulamaları sonucu toplam fenolik madde değişimi ısıl işlem görmemiş taze elma suyu örneğine kıyaslanınca artış olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedeninin elma suyunda enzim inaktivasyonunun sağlanmasından dolayı, fenolik bileşiklerin substrat olarak kullanılamaması olabileceği düşünülmektedir.

Aguilar-Rosas vd. (2007), elma suyunda 90 °C' de 30 saniye boyunca termal pastörizasyon uygulaması sonucunda toplam fenolik maddede %32,2'lik bir azalma belirlemiştir. Golden delicious cinsi elmalara ısıl işlem (90 °C 1 dak) uygulaması ile toplam fenolik maddedeki kayıp ısıl işlem sonrasında % 21-26 arasında tespit edilmiştir (Başlar ve Erturgay, 2013). He vd. (2016), elma suyuna ısıl işlem uygulamışlar ve toplam fenolik madde miktarında 80 °C' lik işlemde sonra % 1,35 artış belirlerken, 90 °C' de ısıl işlem gören elma suyu örneklerinde % 9,82 azalış belirlemişlerdir. Literatürdeki çalışmalara baktığımızda yüksek sıcaklıkta (90 °C) kısa işlem sürelerinde toplam fenolik maddenin azaldığı görülmekteyken, bu çalışmada olduğu gibi hafif ısı ( $\leq 80$  °C) uygulamalarında ve uzun işlem sürelerinde toplam fenolik maddenin arttığı görülmüştür.

### 4.4. Isıl İşlem Süresince Antioksidan Aktivitedeki Değişim (Change in Antioxidant Activity during Thermal Treatment)

Örneklerin antioksidan aktivitesi DPPH yöntemi kullanılarak belirlenmiş ve EC<sub>50</sub> değeri (radikalin %50'sinin inhibisyonunu sağlayan miktar) hesaplanmıştır. Bu değer küçük olması, antioksidan aktivitenin yüksek olduğunu göstermektedir (Cemeroğlu vd., 2010). Tablo 3' de ısıl işlem süresince farklı sıcaklık ve sürelerde elde edilen EC<sub>50</sub> değerleri gösterilmektedir. Antioksidan aktivitedeki değişime, sıcaklığın, sürenin ve sıcaklık-süre etkileşiminin etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Isıl işlem görmemiş taze elma suyu örneğinin EC<sub>50</sub> değeri  $31,78 \pm 1,46$  mg/ml olarak belirlenmiştir. Toplam fenolik maddenin artışına bağlı olarak genel



anlamda antioksidan aktivite de artmaktadır.

**Tablo 3.** Isıl işlem süresince elde edilen EC<sub>50</sub> değerleri (EC<sub>50</sub> values during thermal treatment)

| Süre (dak) | Sıcaklık (°C)              |                             |                            |                            |                             |
|------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
|            | 40                         | 50                          | 60                         | 70                         | 80                          |
| 5          | 22,65 ± 0,07 <sup>Ee</sup> | 41,45 ± 1,45 <sup>Bb</sup>  | 45,60 ± 0,36 <sup>Ad</sup> | 31,68 ± 0,44 <sup>Cb</sup> | 26,71 ± 1,32 <sup>Dc</sup>  |
| 10         | 20,05 ± 0,30 <sup>Ef</sup> | 31,51 ± 1,17 <sup>Cc</sup>  | 48,27 ± 0,38 <sup>Ab</sup> | 34,43 ± 0,42 <sup>Ba</sup> | 29,22 ± 0,14 <sup>Dab</sup> |
| 15         | 24,56 ± 0,11 <sup>Dd</sup> | 32,82 ± 0,35 <sup>Bc</sup>  | 50,54 ± 0,4 <sup>Aa</sup>  | 28,87 ± 0,36 <sup>Cc</sup> | 28,25 ± 0,08 <sup>Cbc</sup> |
| 20         | 49,81 ± 0,16 <sup>Ac</sup> | 45,87 ± 1,40 <sup>Ba</sup>  | 50,49 ± 0,03 <sup>Aa</sup> | 32,65 ± 0,56 <sup>Cb</sup> | 24,29 ± 0,70 <sup>Dd</sup>  |
| 25         | 59,03 ± 0,07 <sup>Aa</sup> | 43,18 ± 0,04 <sup>Cab</sup> | 44,95 ± 0,02 <sup>Bd</sup> | 34,50 ± 0,54 <sup>Da</sup> | 24,15 ± 0,74 <sup>Ed</sup>  |
| 30         | 53,42 ± 0,17 <sup>Ab</sup> | 45,17 ± 1,42 <sup>Ba</sup>  | 47,04 ± 0,02 <sup>Bc</sup> | 32,96 ± 0,50 <sup>Cb</sup> | 30,48 ± 1,04 <sup>Da</sup>  |

Tablodaki farklı harfler ((A, B, C...), sıcaklıklar; (a, b, c...), süreler) değerler arasında önemli bir fark olduğunu göstermektedir.

40 °C' de 5, 10 ve 15 dakikada antioksidan aktivitede artış, daha sonraki sürelerde antioksidan aktivitede azalış görülmüştür. Bu durum toplam fenolik miktarının değişimine bağlanmıştır. Çetković vd. (2008), farklı elma çeşitlerini (Pinova, Reinders, Jonagold, Iduna, Braeburn) kullanarak elde ettikleri elma posasının fenolik ve antioksidan kapasitesini inceledikleri çalışmada; toplam fenolik madde en yüksek 8,67 mg/g ile Reinders cinsinde belirlenirken, en düşük EC<sub>50</sub> değerleri 6,33 ± 0,31 mg/ml olarak yine Reinders cinsinde belirlenmiştir. Bu cinsin en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olması toplam fenolik ile ilişkilendirilmiştir.

50 °C' de tüm sürelerde ısıl işlem görmemiş taze elma suyuna göre EC<sub>50</sub> değerlerinde bir artış belirlenmiş ve bu durum antioksidan aktivitede azalış olduğunu göstermiştir. Antioksidan aktivitede 15. dakikaya kadar artarken, bu süreden sonraki işlemlerde azalma gözlenmiştir. Bu değişim toplam fenolik madde miktarında gözlenen değişim ile paralellik göstermektedir. 60 °C' de 5 dakika sonunda EC<sub>50</sub> değeri 45,59 ± 0,36 mg/ml olarak bulunurken, 30 dakika sonunda 47,04 ± 0,02 mg/ml olarak bulunmuştur. Bu sıcaklıkta EC<sub>50</sub> değerleri ısıl işlem görmemiş taze elma suyu örneğine göre artmış yani antioksidan aktivitede azalış belirlenmiştir. Bu durum toplam fenolik madde miktarının azalışına bağlanmıştır.

70 °C' de EC<sub>50</sub> değerleri incelendiğinde elde edilen değerler ısıl işlem görmemiş taze elma suyu değerine yakın bulunmuştur. Antioksidan aktivitenin yüksek olması toplam fenolik madde miktarının yüksek olması ile ilişkilendirilebilir. 80 °C' de EC<sub>50</sub> değerleri 5 dakika ısıl işlem sonunda 26,70 ± 1,31 mg/ml olarak bulunmuşken, 20 dakika sonunda 24,28 ± 0,69 mg/ml olarak belirlenmiştir. 20 dakikalık ısıl işlem süresinden sonra genel olarak antioksidan aktivitede artış görülmüştür. Bunun nedeninin yeterli (> %90) enzim inaktivasyonunun sağlanması ve toplam fenolik madde miktarının artışı olduğu söylenebilmektedir.

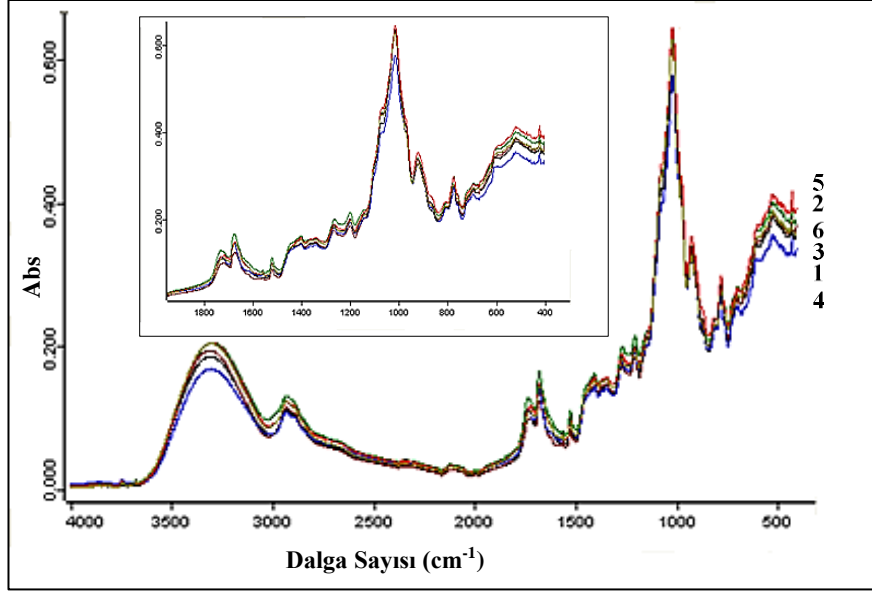
Bahukhandi vd. (2018), Hindistan'ın farklı yerlerinde yetişen üç geleneksel elma çeşidinin (Benoni, Fanny ve Rymerin) antioksidan aktivitesinin (DPPH), 4,99–14,06 mmol/kg YA aralığında olduğunu belirlemiştir. Yıldırım vd. (2019), Isparta ilinden temin edilen beş farklı elma (Starking Delicious, Golden Delicious, Pink Lady, Arap Kızı ve Granny Smith) çeşidinde antioksidan aktiviteyi (% inhibisyon) meyve eti kısmında sırasıyla (% 44,42; % 47,06; % 32,52 % 51,33; % 49,54) olarak belirlerken, kabuk kısmında sırasıyla (% 73,51; % 77,28; % 66,67; % 74,23; % 87,21) olarak tespit etmişlerdir.

#### 4.5. FTIR Çalışmaları (FTIR Study)

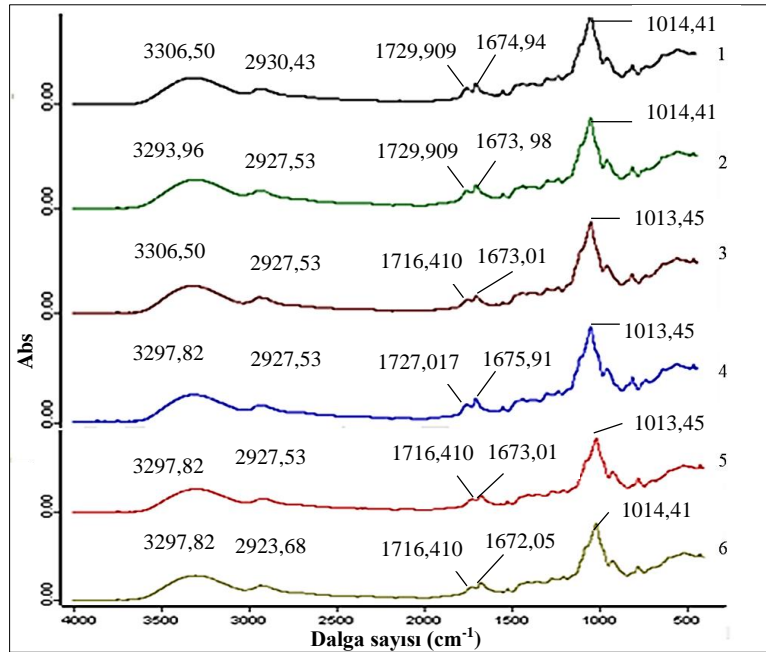
Bu çalışmada fenolik bileşiklerin FTIR spektroskopisi kullanılarak analizi yapılmıştır. Bu amaçla farklı sıcaklık (40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C ve 80 °C) ve sabit süre (20 dk) ısıl işlem uygulanmış örneklerde FTIR spektroskopisi kullanılarak fenolik bileşenler incelenmiştir. Kontrol örneği olarak ısıl işlem uygulanmamış elma suyu ekstraktı alınarak oda sıcaklığında (25 °C) FTIR spektrumları belirlenmiştir. Farklı sıcaklık ve sabit süredeki elma suyu örneklerinin FTIR spektrumları Şekil 3 ve ayrıştırılmış FTIR spektrumları Şekil 4' de gösterilmektedir.

FTIR spektrumlarına bakıldığında 1. spektrum kontrol örneğini (taze meyve suyu), 2. spektrum 40 °C 20 dakika, 3. spektrum 50 °C 20 dakika, 4. spektrum 60 °C 20 dakika, 5. spektrum 70 °C 20 dakika ve 6. spektrum 80 °C 20 dakika ısıl işlem uygulanmış elma suyu örneklerini ifade etmektedir. 1800 - 750 cm<sup>-1</sup> (parmak izi bölgeleri) dalga sayıları arasında bulunan bantlar, bitkilerde bulunan polifenollerle ilgilidir (Okur vd., 2019). Dört soğan çeşidinin toplam fenolik içeriğinin FTIR spektroskopisi kullanılarak belirlendiği çalışmada, 1618 cm<sup>-1</sup>'de bulunan belirgin tepe, C-C uzaması polifenolik bileşenlerde yüksek seviyelerde bulunan fenil halkasını ifade ettiği söylenmiştir (Lu vd., 2011). Tahir vd. (2017), baldaki fenolik bileşiklerin belirlenmesi için, FTIR spektrofotometresini kullanmışlar ve 1700-1600 cm<sup>-1</sup>'deki bantları, karbonil gruplarının C-O ve C-C germe hareketine bağlanmış ve bu bölge fenolik moleküllerle ilişkilendirmiştir. 1715-1680 cm<sup>-1</sup> bölgesindeki bantların, aril (hidroksibenzoik asitler) ve / veya α,β-

doymamış (hidroksisünamik asitler) karboksilik asit yapıları (C=O) germe titreşimlerinden kaynaklandığı belirtilmektedir. Ayrıca 1720  $\text{cm}^{-1}$  civarındaki bant klorojenik asit olarak gösterilmektedir (Abbas vd., 2017). Okur vd. (2019), vişne posasından fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için farklı metodlar uygulamış ve elde edilen ekstraktların fenolik bileşik içeriğini FTIR spektroskopisi kullanarak belirlemiştir. 3000-3300  $\text{cm}^{-1}$  hatta 2800  $\text{cm}^{-1}$ 'e kadar uzayan bantların, aromatik halkanın C-H germe titreşimlerinden kaynaklandığı belirtilmiştir. 1500-1150  $\text{cm}^{-1}$  aralığındaki bantların CH (fenoller) ve OH titreşimleri nedeniyle olduğu rapor edilmiştir. 1014  $\text{cm}^{-1}$ 'de bulunan bant, piran halkasının OH ikamesinin C-O esnemesini ifade etmiş ve özellikle epikateşin ile ilişkilendirilmiştir. FTIR sonuçları incelendiğinde farklı sıcaklık, sabit süre uygulanan ısıl işlemin fenolik bileşik profili açısından bir değişime neden olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 3. Elma suyu örneklerinin FTIR spektrumları (FTIR spectra of apple juice samples)



Şekil 4. Elma suyunun ayrıştırılmış FTIR spektrumları (Separated FTIR spectra of apple juice)

#### 4.6. HPLC Çalışmaları (HPLC Study)

Elma suyunun fenolik içeriğini belirlemek ve farklı sıcaklık ve sabit süre (20 dk) parametrelerinde değişimini incelemek için HPLC kullanılmıştır. Kontrol (ısıl işlem görmemiş taze elma suyu) örneği ve farklı koşullarda işlem gören elma sularında belirlenen fenolik bileşikler ve miktarları Tablo 4' de gösterilmektedir.

**Tablo 4.** HPLC ile belirlenen fenolik bileşikler ve miktarları (Phenolic compounds and their amounts determined by HPLC)

| Numune      | Kateşin (mg/kg)           | Klorojenik asit (mg/kg)   | Kafeik asit (mg/kg) | Epikateşin (mg/kg)        | Kamferol (mg/kg)         |
|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------|---------------------------|--------------------------|
| Kontrol     | 6,02 ± 0,22 <sup>C</sup>  | 21,48 ± 0,23 <sup>B</sup> |                     | 14,57 ± 0,19 <sup>C</sup> | 2,99 ± 0,12 <sup>D</sup> |
| 40 °C 20 dk | 1,51 ± 0,06 <sup>F</sup>  | 2,53 ± 0,16 <sup>F</sup>  | 0,50 ± 0,02         | <LOQ                      | 4,48 ± 0,06 <sup>A</sup> |
| 50 °C 20 dk | 4,51 ± 0,13 <sup>D</sup>  | 7,48 ± 0,12 <sup>E</sup>  |                     | 7,05 ± 0,18 <sup>E</sup>  | 4,05 ± 0,10 <sup>B</sup> |
| 60 °C 20 dk | 3,54 ± 0,08 <sup>E</sup>  | 9,49 ± 0,11 <sup>D</sup>  |                     | 8,06 ± 0,15 <sup>D</sup>  | 3,01 ± 0,08 <sup>D</sup> |
| 70 °C 20 dk | 8,01 ± 0,16 <sup>B</sup>  | 16,53 ± 0,18 <sup>C</sup> |                     | 27,03 ± 0,29 <sup>B</sup> | 3,97 ± 0,08 <sup>B</sup> |
| 80 °C 20 dk | 11,51 ± 0,16 <sup>A</sup> | 24,48 ± 0,11 <sup>A</sup> |                     | 34,01 ± 0,33 <sup>A</sup> | 3,51 ± 0,01 <sup>C</sup> |

Tabloda aynı sütundaki farklı harfler (A, B, C...) değerler arasında önemli bir fark olduğunu göstermektedir. (Epikateşin için LOD: 0,3 mg/L LOQ: 0,8 mg/L)

HPLC ile ısıl işlem görmemiş taze elma suyunda belirlenen fenolik bileşikler kateşin, klorojenik asit, epikateşin ve kamferoldur. Genel olarak bakıldığında artan sıcaklığa bağlı olarak fenolik bileşiklerde artış görülmüştür. 40 °C' de 20 dakika ısıl işlem sonunda fenolik bileşiklerdeki değişim incelendiğinde kateşin ve klorojenik asit ısıl işlem görmemiş taze elma suyuna göre azalış gösterirken, kamferol miktarında artış belirlenmiştir. Aynı sıcaklık değerinde kafeik asit 0,50 ± 0,02 ppm olarak belirlenmiştir. Bu durum düşük sıcaklık uygulaması ile bağlı halde bulunan fenolik bileşiklerin, serbest forma geçmesiyle açıklanmıştır (Szalzo vd., 2004). Daha yüksek sıcaklık uygulamalarında düşük miktarda belirlenmiş bu bileşiğin parçalandığı ve tespit edilemediği düşünülmektedir. 50 °C 20 dakika sonunda kateşin, klorojenik asit, epikateşin ısıl işlem görmemiş taze elma suyuna göre azalış gösterirken kamferolde artış belirlenmiştir. 60 °C sıcaklıkta işlem sonunda kateşin, klorojenik asit, epikateşin ısıl işlem görmemiş taze elma suyuna göre azalış gösterirken kamferol miktarında değişiklik olmamıştır. 70 °C ve 80 °C' de 20 dakikada gerçekleştirilen ısıl işlem sonunda fenolik bileşiklerde artış belirlenmiştir. Bu durum toplam fenolik madde miktarındaki artışla paralellik göstermektedir. Bunun nedeninin enzim inaktivasyonunun sağlanması sonucu fenolik bileşiklerin substrat olarak kullanılamamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Benzer şekilde Moro cinsi portakal sularında 80 °C' de 1 dakika pastörizasyon sonunda, kafeik asit, klorojenik asit ve toplam hidroksisinamik asitlerin miktarının arttığı belirlenmiştir (Szalzo vd., 2004). Bu durum katabolizma içinde yer alan ve inaktivasyona neden olan enzimlerin aktif bölümlerinin ısıl işlem ile alikonulması şeklinde açıklanmıştır.

Türkiye' de yetiştirilen bazı elma çeşitlerinin başlıca fenolik bileşikleri HPLC yöntemiyle incelenmiş ve analiz sonucuna göre elma sularında kateşin (9,09-115,30 mg/l), klorojenik asit (41,10-276,3 mg/l), epikateşin (3,38-6,76 mg/l), kafeik asit (3,04-79,09 mg/l) ve floridzin (0,52-20,13 mg/l) tespit edilmiştir (Karaman, 2008). Pearson vd. (1999), 6 farklı ticari elma suyunun fenolik bileşimini HPLC yöntemiyle incelemişler ve fenolik bileşenlerden kateşin 7,6 - 33,8 mg/l, klorojenik asit 17,0 - 58,3 mg/l ve rutin 1,1 - 7,8 mg/l aralığında belirlenmiştir. Ayrıca aynı çalışmada toplam fenolik madde miktarı meyve suyunda 181,7- 48,4 mg/l olarak belirlenmiştir. Karadeniz vd. (2001), 3 farklı çeşit (Amasya, Golden, Starking) elmadan hazırlanan elma suyu örneklerine 97 °C 20 dakika ısıl işlem uygulamış ve fenolik madde kompozisyonunu araştırmışlardır. Bulgulara göre elma suyunda konsantrasyonu en yüksek fenolik bileşik klorojenik asit (62,3-342,6 mg/l) olmuştur. Bunu epikateşin (5,3- 240,1 mg/l), floretinlikozit (5,5-60,0 mg/l), floridzin (6,9-29,7 mg/l) ve p-kumarik asit (1,1-16,0 mg/l) izlemektedir. Elma suyundaki fenolik madde miktarının öncelikle meyve çeşidine bağlı olarak değiştiği belirtilmiştir.

Elmalardaki fenolik bileşik içeriğini ve işlenmiş ürünleri değerlendirmek amacıyla Jonagold, Sampion, Idared ve Topaz cinsi elmaların kullanıldığı bir çalışmada, meyvelerde en yüksek fenolik asit içeriği Idared (346 mg/kg) cinsinde bulunmuştur. En yüksek miktarda kuersetin glikozit içeriği Jonagold (87 mg/kg) ve Topaz (83 mg/kg) cinslerindedir (Markowski ve Płocharski, 2006). Buna göre elma suyunda bulunan fenolik bileşikler literatürde yapılan çalışmalarda belirlenenler ile benzerlik göstermektedir.

## 5. Sonuç ve Tartışma (Result and Discussion)

Yapılan bu çalışmada, Red Chief cinsinden üretilen elma suyuna, farklı sıcaklık (40, 50, 60, 70, 80 °C) ve sürelerde (5, 10, 15, 20, 25, 30 dakika) ısıl işlem uygulamasının meyve sularının kalitesini olumsuz etkileyen PPO ve POD enzim inaktivasyonu üzerine etkisi belirlenmiş ve fenolik bileşiklerin değişimine etkisi araştırılmıştır.

Genellikle artan süre ve sıcaklığa bağlı olarak PPO ve POD enzimlerinin aktivitesinde azalış belirlenmiştir. PPO enziminde 80 °C sıcaklıkta 5 dakikalık ısıl işlemden sonra % 5,40 ± 0,47 aktivite gözlenirken, 20 dakika sonunda % 99 enzim inaktivasyonu sağlanmıştır. POD enzimi için 80 °C' de 5 dakika sonunda kalan aktivite % 21,71 ± 0,46 olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte aynı sıcaklıkta 20 dakika sonunda % 93,29 inaktivasyon belirlenirken, 25

ve 30 dakikalık ısı işlem sürelerinde elde edilen inaktivasyon değerleri arasında önemli bir fark belirlenmemiştir ( $p > 0,05$ ). Yani genel olarak bakıldığında 80 °C' de 20 dakika sonunda yeterli inaktivasyon sağlandığı söylenebilmektedir. Aynı zamanda elde edilen veriler değerlendirildiğinde POD enziminin PPO' ya kıyasla ısı işleme daha dirençli olduğu belirlenmiştir.

Genel olarak toplam fenolik madde miktarında değişimine bakıldığında düşük sıcaklık uygulamalarında bazı parametrelerde artış bazı parametrelerde azalış belirlenmiştir. Bu durum fenolik bileşiklerin ısıya duyarlı olup sıcaklıktan etkilenmesiyle ve yapıdaki enzimlerin aktiflik durumuyla ilişkilendirilmiştir. 80 °C' de 20 dakika sonunda toplam fenolik madde miktarı  $668,41 \pm 12,70$  mg GAE/ kg yaş ağırlık olarak belirlenmiştir. Yüksek sıcaklık uygulamaları sonucu toplam fenolik madde değişimi incelendiğinde ısı işlem görmemiş taze elma suyu örneğine kıyaslanınca artış olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedeninin elma suyunda enzim inaktivasyonunun sağlanmasından dolayı, fenolik bileşiklerin substrat olarak kullanılamaması olabileceği düşünülmektedir.

Isıl işlem uygulamasından sonra genellikle antioksidan aktivitedeki değişim toplam fenolik madde değişimiyle ilişkili bulunmuştur. 80 °C' de EC<sub>50</sub> değeri 20 dakika sonunda  $24,28 \pm 0,69$  mg/ml olarak belirlenmiştir. Bu sıcaklık değerinde genel olarak antioksidan aktivitede artış görülmüştür. Bunun nedeninin yeterli (> %90) enzim inaktivasyonunun sağlanması ve toplam fenolik madde miktarının artışı olduğu söylenebilmektedir.

FTIR spektrumları incelendiğinde farklı sıcaklık, sabit süre uygulanan ısı işlem sonucunda fenolik bileşik içeriğinde bir değişim gözlenmemiştir. Parmak izi bölgesi (1800 - 750 cm<sup>-1</sup>) incelendiğinde spesifik bantların epikateşin ve klorojenik asitle uyumlu olduğu belirlenmiş, belirlenen fenolik bileşiklerin HPLC ile belirlenen fenolik bileşikler ile paralellik gösterdiği belirlenmiştir.

HPLC ile fenolik bileşikler incelenmiş, ısı işlem görmemiş taze elma suyunda belirlenen fenolik bileşikler kateşin, klorojenik asit, epikateşin, kamferol olmuştur ve genel olarak artan sıcaklığa bağlı olarak fenolik bileşiklerde artış görülmüştür. 70 °C ve 80 °C' de 20 dakikada gerçekleştirilen ısı işlem sonunda fenolik bileşiklerde artış belirlenmiştir. Bu durum toplam fenolik madde miktarındaki artışla paralellik göstermektedir.

Yapılan çalışma sonucunda elma suyuna uygulanacak en uygun parametre 80 °C 20 dakikalık ısı işlem uygulaması olmuştur. Bu parametrelerde PPO ve POD enzimlerinde yeterli enzim inaktivasyonu (>%90) sağlanmış, aynı zamanda fenolik bileşiklerde ve antioksidan aktivitede artış belirlenmiştir.

### Çıkar Çatışması (Conflict of Interest)

Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması beyan edilmemiştir. No conflict of interest was declared by the authors.

### Kaynaklar (References)

- 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.
- 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.
- Aguilar-Rosas, S.F., Ballinas-Casarrubias, M.L., Nevarez-Moorillon, G.V., Martin-Belloso, O., Ortega-Rivas, E., 2007. Thermal and Pulsed Electric Fields Pasteurization of Apple Juice: Effects on Physicochemical Properties and Flavour Compounds. *Journal of Food Engineering*, 83, 41-46.
- Anonim, 2011, "Türkiye meyve suyu v.b. ürünler sanayi raporu", <https://www.meyed.org.tr> (Erişim tarihi: 15 Mart 2015).
- Bahukhandi, A., Dhyani, P., Bhatt, I.D., Rawal, R.S., 2018. Variation in Polyphenolics and Antioxidant Activity of traditional Apple Cultivars from West Himalaya, Uttarakhand. *Horticultural Plant Journal*, 4(4), 151-157.
- Baltacıoğlu, H., Bayındırlı, A., Severcan, M., Severcan, F., 2015. 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.
- Başlar, M., Ertugay, M.F., 2013. 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.
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant Determinations by the Use of Stable Free Radical. *Nature*, 181(4617) 1199-1200.
- Cemeroğlu, B., 2010. Gıda Analizleri. Gıda Teknolojileri Derneği Yayınları, 34.
- Cemeroğlu, B., Yemencioğlu, A., Özkan, M., 2001. Meyve ve Sebzelelerin Bileşimi Soğukta Depolanmaları. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, 24.
- Ćetković, G., Čanadanović-Brunet, J., Djilas, S., Savatović, S., Mandić, A., Tumbas, V., 2008. Assessment of Polyphenolic Content and *in vitro* Antiradical Characteristics of Apple Pomace. *Food Chemistry*, 109(2), 340-347.
- Dubey, A., Diwakar, S.K., Rawat, S.K., Kumar, P., Batra, N., Joshi, A., Singh, J., 2007. Characterization of Ionically Bound Peroxidases from Apple (*Mallus pumilus*) Fruits. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 37(1), 47-58.

- Erdoğan, S.S., Demirci, M., 2014. Elmanın Fenolik Bileşen ve Lif İçeriği Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü. Gıda Teknolojisi Bölümü, 43(1-2), 41-52.
- He, Z., Tao, Y., Zeng, M., Zhang, S., Tao, G., Qin, F., Chen, J., 2016. High Pressure Homogenization Processing, Thermal Treatment and Milk Matrix Affect *in vitro* Bioaccessibility of Phenolics in Apple, Grape and Orange Juice to Different Extents. Food Chemistry, 200, 107-116.
- Karadeniz, F., Ekşi, A., 2001. Elma Suyunda Fenolik Madde Dağılımı Üzerine Araştırma. Tarım Bilimleri Dergisi, 7(3), 135-141.
- Karaman, Ş., 2008. Türkiye’de Yetiştirilen Bazı Elma Çeşitlerinin Toplam Antioksidan Kapasitelerinin ve Antioksidan Özellik Gösteren Başlıca Bileşenlerinin Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Krapfenbauer, G., Kinner, M., Gössinger, M., Schönlechner, R., Berghofer, E., 2006. Effect of Thermal Treatment on the Quality of Cloudy Apple Juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(15), 5453-5460.
- Kuşçu, A., Bulantekin, Ö., 2016. The Effects of Production Methods and Storage on the Chemical Constituents of Apple Pekmez. Journal of Food Science and Technology, 53(7), 3038-3092.
- Liu, F., Han, Q., Ni, Y., 2017. Comparison of Biochemical Properties and Thermal Inactivation of Membrane-Bound Polyphenol Oxidase from Three Apple Cultivars (*Malus domestica* Borkh). International Journal of Food Science and Technology, 17, 1-8.
- Lo Scalzo, R., Iannocari, T., Summa, C., Morelli, R., Rapisarda, P., 2004. Effect of Thermal Treatments on Antioxidant and Antiradical Activity of Blood Orange Juice. Food Chemistry, 85(1), 41-47.
- Lu, X., Wang, J., Al-Qadiri, H.M., Ross, C.F., Powers, J.R., Tang, J., Rasco, B.A., 2011. Determination of Total Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Onion (*Allium cepa*) and Shallot (*Allium oschaninii*) Using Infrared Spectroscopy. Food Chemistry, 129, 637-644.
- 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.
- Meral, R., 2016. Farklı Isıl İşlem Uygulamalarının Fenolik Bileşenler Üzerine Etkisi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi/ Journal of The Institute of Natural and Applied Sciences, 21(1), 55-67.
- Murtaza, A., Muhammad, Z., Iqbal, A., Ramzan, R., Liu, Y., Pan, S., Hu, W., 2018. Aggregation and Conformational Changes in Native and Thermally Treated Polyphenol Oxidase From Apple Juice (*Malus domestica*). Front. Chem., 6:203.
- Nayak, P.K., Rayaguru, K., Krishnan, K.R., 2017. Quality Comparison of Elephant Apple Juices After High-Pressure Processing and Thermal Treatment. Journal Science Food Agricultural 97, 1404-1411.
- Niu, S., Xu, Z., Fang, Y., Zhang, L., Yang, Y., Liao, X., Hu, X., 2010. Comparative Study on Cloudy Apple Juice Qualities from Apple Slices Treated by High Pressure Carbon Dioxide and Mild Heat. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 11(1), 91-97.
- 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.
- Önez, Z., 2006. Üzümden (*Vitis Vinifera L.*) İzole Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Pearson, D.A., Tan, C.H., German, J.B., Davis, P.A., Gershwin, M.E., 1999. Apple Juice Inhibits Human Low Density Lipoprotein Oxidation. Life Sciences, 64(21), 1913-1920.
- Riener, J., Noci, F., Cronin, D.A., Morgan, D.J., Lyng, J.G., 2008. Combined Effect of Temperature and Pulsed Electric Fields on Apple Juice Peroxidase and Polyphenoloxidase Inactivation. Food Chemistry, 109(2), 402-407.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16, 144-158.
- Sulaiman, A., Farid, M., Silva, F.V., 2016. Quality Stability and Sensory Attributes of Apple Juice Processed by Thermosonication, Pulsed Electric Field and Thermal Processing. Food Science and Technology International, 23(3), 265-276.
- Tahir, H.E., Xiaobo, Z., Zhihua, L., Jiyong, S., Zhai, X., Wang, S., Mariod, A.A., 2017. 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.
- Terefe, N.S., Buckow, R., Versteeg, C., 2014. 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.
- Yemenicioğlu, A., Özkan, M., Cemeröğlu, B., 1997. Heat Inactivation Kinetics of Apple Polyphenoloxidase and Activation of its Latent Form. Journal of Food Science, 62(3), 508-510.
- Yıldırım, M., Benzer, F., Çimen, M., Barış, D., Yıldırım H., Sanyürek, N.K., Karakavuk, E., 2019. Isparta’da Yetişen Bazı Elma Çeşitlerinin Meyve Eti, Kabuk ve Çekirdek Yuvasındaki Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi. International Journal of Pure and Applied Sciences, 5(1), 31-36.
- Yi, J., Kebede, B.T., Hai Dang, D.N., Buvé, C., Grauwet, T., Van Loey, A., Hu, X., Hendrickx, M., 2017. Quality Change During High Pressure Processing and Thermal Processing of Cloudy Apple Juice. LWT- Food Science and Technology, 75, 85-92.