ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SİYAH HAVUÇ SUYU KONSANTRESİ ÜRETİMİ VE DEPOLANMASI SÜRECİNDE FENOLİK MADDELERDEKİ DEĞİŞİMLER VE BU DEĞİŞİMLERİN ANTİOKSİDAN AKTİVİTE İLE İLİŞKİSİ

Ufuk DERELİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2010

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SİYAH HAVUÇ SUYU KONSANTRESİ ÜRETİMİ VE DEPOLANMASI SÜRECİNDE FENOLİK MADDELERDEKİ DEĞİŞİMLER VE BU DEĞİŞİMLERİN ANTİOKSİDAN AKTİVİTE İLE İLİŞKİSİ

Ufuk DERELİ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Mehmet ÖZKAN

Bu çalışmada, durultma ve pastörizasyon işlemlerinin siyah havuç suyunun toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan aktivitesine etkisi incelenmiştir. Ayrıca 5°C, 20°C ve 30°C sıcaklıklarda 8 ay depolama süresince, siyah havuç suyu konsantrelerinin toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite içeriğindeki değişimler de gözlenmiştir. Toplam fenolik bileşik içeriği, Folin Ciocalteu yöntemi ile spektrofotometrik olarak ölçülmüş, sonuçlar "gallik asit eşdeğeri" olarak ifade edilmiştir. Antioksidan aktivite ise, ABTS yöntemi ile belirlenmiş ve sonuçlar "TEAC (troloks eşdeğer antioksidan kapasite) eşdeğeri" olarak verilmiştir. Siyah havuç sularının fenolik madde kompozisyonu, HPLC-MS yöntemi ile belirlenmiştir.

Siyah havuç sularının durultulmasında, önce depektinizasyon daha sonra da berraklaştırma işlemi uygulanmıştır. Berraklaştırmada, durultma yardımcı maddeleri olarak adlandırılan bentonit, kizelsol ve jelatin kullanılmıştır. Enzim uygulaması sonucu hücre duvarlarından fenolik maddelerin serbest kalması nedeniyle, depektinize edilmiş siyah havuç suyunun fenolik içeriğinde %12 ve buna bağlı olarak da antioksidan aktivitesinde ise, %10 düzeyinde bir artış belirlenmiştir. Buna karşın, depektinize edilmiş örneğe bentonit uygulaması sonucunda; fenolik içeriğinde %10 ve antioksidan aktivitede %9 düzeyinde azalış saptanmıştır. Ayrıca, jelatin uygulamasından sonra fenolik maddelerde %25 ve antioksidan aktivitede %15 düzeyinde azalış saptanmıştır. Pastörizasyon işleminden sonra siyah havuç suyu örneklerinde bulanma gözlenmiştir. Siyah havuç suyu konsantrelerinin depolanması süresince; fenolik miktarında ve antioksidan aktivite düzeyinde %4−11 düzeyinde az da olsa değişimler saptanmıştır.

Siyah havuç suyu ve konsantresinde, 3 temel fenolik madde saptanmış ve HPLC-MS analizleri sonucunda bunlardan başat fenolik maddenin klorojenik asit olduğu belirlenmiştir. Toplam pik alanının %90'ı klorojenik asitten oluşmuştur. Fenolik madde analizi ve antioksidan aktivite ölçümleri siyah havuç suyu ve konsantresinin antioksidan aktivitesinin, örneklerin yüksek klorojenik asit içeriğinden kaynaklandığını göstermiştir.

Elde edilen sonuçlar, siyah havuç suyunun fenolik madde miktarındaki en önemli azalmanın jelatin-kizelsol ile durultma sonucunda olduğunu, fakat; siyah havuç suyu konsantresinin fenolik madde miktarında depolama boyunca önemli bir değişimin olmadığını göstermiştir. Ayrıca bu çalışmada, depolama boyunca siyah havuç suyu konsantrelerinin antioksidan aktivite düzeylerinde önemli bir değişim olmadığı gözlenmiştir. Depolama boyunca; fenolik maddelerin parçalanmasında sıcaklığın önemli bir etkisinin olmaması nedeniyle, fenolik maddelerin parçalanmasına ilişkin aktivasyon enerjisi hesaplanmamıştır.

Aralık 2010, 69 sayfa

Anahtar Kelimeler: Siyah havuç suyu, konsantre, durultma, depolama, fenolik maddeler, antioksidan aktivite.

ABSTRACT

Master Thesis

CHANGES IN PHENOLİC COMPOUNDS OF BLACK CARROT JUICE CONCENTRATE DURING PRODUCTION AND STORAGE AND AND ITS RELATION WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY

Ufuk DERELİ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof.Dr. Mehmet ÖZKAN

This study was conducted to determine the effects of clarification and pasteurization on the phenolic content and antioxidant activity of black carrot juice. Moreover, the changes in phenolic content and antioxidant activity of black carrot juice concentrates were also monitored during storage at 5°C, 20°C and 30°C for a period of 8 months. Total phenolic content was measured spectrophotometerically according to the Folin Ciocalteu method and the results were expressed as "gallic acid equivalents". Antioxidant activity was determined by the ABTS method and the results were expressed as "TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity)". Phenolic composition of black carrot juice was determined by HPLC-MS method.

For the clarification of the black carrot juice, first depectinization and then the clarification were carried out. For the clarification; bentonite, gelatin and kizelsol were used as clarification agents. As a result of enzyme application, phenolics were release from cell wall and this resulted in 12 and 10% increase in total phenolic content and antioxidant activity of depectinized black carrot juice, respectively. On the other hand, bentonite application caused in the phenolic content and antioxidant activity, respectively. Also, after gelatin application, 25 and 15% decreases were observed in the phenolic content and antioxidant activity of the juice samples, respectively. Haze formation occurred after pasteurization of black carrot juice samples. Measurements of phenolic content and antioxidant activity showed small losses (4–11%) during storage of black carrot juice concentrate.

Three main phenolics were determined in black carrot juice and concentrate samples by HPLC-MS and chlorogenic acid was identified as the the predominant phenolic in black carrot juice. In fact, 90% of the total peak areas were quantified as chlorogenic acid. The results from phenolic and activity analyses revealed that the antioxidant activity of black carrot juice and concentrate was due to the high content of chlorogenic acid.

The results showed that the highest loss of phenolic content in the black carrot juice occurred as a result of clarification with gelatin-kizelsol application. However, there was no significant change in the amount of phenolic content of black carrot juice concentrate during storage. Also in this study, the antioxidant activity of black carrot juice concentrate did not change significantly during storage. Since temperature had no significant effect in the degradation of phenolic substances, activation energy for degradation of phenolic substances during storage has not been calculated.

December 2010, **69 pages**

Key words: Black carrot juice, concentrate, clarification, storage, phenolic substances, antioxidant activity.

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında ilgi ve desteğini gördüğüm danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet ÖZKAN'a, siyah havuç suyu konsantresi üretimi, HPLC analizlerinde ve istatistik analizlerinde yardımlarına sıklıkla başvurduğum ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli arkadaşım Meltem TÜRKYILMAZ'a ve değerli hocam Dr. Oktay YEMİŞ'e, bana burs imkanı sağlayan TÜBİTAK (BİDEP)'e ve çalışmalarım süresince yardım ve desteklerini gördüğüm her zaman yanımda olan sevgili aileme ve iş arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından 20070745055 No'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

Ufuk DERELİ

Ankara, Aralık 2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
TEŞEKKÜR ..... **iii**
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... **viii**
ÇİZELGELER LİSTESİ ..... **ix**
1. GİRİŞ **1**
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ **3**
3. MATERYAL ve YÖNTEM **14**
3.1 Materyal **14**
3.1.1 Siyah havuç **14**
3.1.2 Kimyasallar **14**
3.2 Yöntem **15**
3.2.1 Siyah havuç suyuna işlenmesi **15**
3.2.2 Siyah havuç ham suyunun depektinizasyonu **15**
3.2.3 Siyah havuç suyunun durultulması **16**
3.2.4 Siyah havuç sularının konsantreye işlenmesi **17**
3.2.5 Siyah havuç suyu ve konsantrelerinin pastörize edilmesi **17**
3.2.6 Siyah havuç suyu konsantrelerinin depolanması **17**
3.2.7 Fiziksel analizler **18**
3.2.7.1 Suda çözünür kuru madde tayini **18**
3.2.7.2 pH tayini **18**
3.2.7.3 Bulanıklık düzeyinin ölçülmesi **19**
3.2.8 Kimyasal analizler **19**
3.2.8.1 Titrasyon asitliği tayini **19**
3.2.8.2 Toplam fenolik madde tayini **19**
3.2.8.3 Kondense olabilen fenolik madde tayini **21**
3.2.8.4 Antioksidan aktivite tayini **22**
3.2.8.5 Fenolik kompozisyonunun belirlenmesi **24**
3.2.8.5.1 HPLC yöntemi **24**

3.2.8.5.2 Kütle spektroskopisi (HPLC-DAD-MS) yöntemi.....27

3.2.9 İstatistik değerlendirme.....30

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....31

4.1 Siyah Havuç Sularının Briks, pH, Titrasyon Asitliği ve Bulanıklılık (NTU) Değerleri Gibi Bazı Analitik Özellikleri Üzerine Durultma ve Pastörizasyonun Etkisi.....32

4.2 Siyah Havuç Ham Suyunun Durultulması.....33

4.2.1 Siyah havuç suyunun depektinizasyonu.....33

4.2.2 Siyah havuç suyunun durultulması.....34

4.3 Siyah Havuç Suyu ve Konsantrelerinin Fenolik Madde İçerikleri ile Antioksidan Aktivite Düzeylerinin Belirlenmesinde Kullanılan Standart Eğriler.....36

4.4 Siyah Havuç Sularının Toplam Fenolik Madde İçerikleri Üzerine Durultma ve Pastörizasyon İşlemlerinin Etkisi.....36

4.5 Siyah Havuç Sularının Antioksidan Aktivite Düzeyine Durultma ve Pastörizasyon İşlemlerinin Etkisi.....42

4.6 Siyah Havuç Sularının Kondense Olabilen Fenolik Madde Miktarı Üzerine Durultma ve Pastörizasyon İşlemlerinin Etkisi.....46

4.7 Siyah Havuç Suyu Konsantrelerinin Farklı Sıcaklıklardaki Depolanması Süresince Toplam Fenolik Madde ve Antioksidan Aktivitesindeki Değişmeler.....46

4.8 Siyah Havuç Suyu Konsantrelerinin Farklı Sıcaklıklardaki Depolanması Süresince Kondense Olabilen Fenolik Madde Miktarındaki Değişmeler.....50

4.9 Siyah Havuç Suyu Konsantrelerinin Farklı Sıcaklıklardaki Depolanması Süresince Briks, pH, Titrasyon Asitliği ve Bulanıklılık (NTU) Değerlerindeki Değişimler.....52

5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....54

KAYNAKLAR.....56

EKLER.....63

EK 1 Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları.....64

EK 2 Siyah havuç suyu fenolik kromatogramları.....65

ÖZGEÇMİŞ.....69

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

AAPH	2,2'-**a**zobis (2-**a**midino**p**ropan) di**h**idroklorür
ABAP	2,2-**a**zo-**b**is-2-**a**midino**p**ropan hidroklorit
$ABTS^{\bullet+}$	ABTS radikali
ABTS	2,2'-**a**zinobis-(3-etil**b**enzo**t**iazolin-6-**s**ulfonik asit)
AEAC	Askorbik asit eşdeğer antioksidan kapasite (**A**scorbic acid **E**quivalent **A**ntioxidant **C**apacity)
AH	Antioksidan (**A**ntioxidant)
Briks, ^{o}Bx	Suda çözünür kuru madde
dak	Dakika
DMPD	N,N-dimetil-*p*-fenilendiamin (N,N-**d**i**m**ethyl-*p*-**p**henylene**d**iamine)
DNA	Deoksiribonükleik asit (**D**eoxyribo**n**ucleic **a**cid)
DPPH	2,2-**D**i**p**henyl-1-**p**icryl**h**ydrazyl
ET	Elektron transferi (**E**lectron **T**ransfer)
FRAP	Ferrik iyon indirgeme antioksidan parametresi (**F**erric ion **R**educing **A**ntioxidant **P**arameter)
GSHPx	Glutatiyon peroksidaz (**G**lutathione **p**eroxidase)
h	Saat (**h**our)
HAT	Hidrojen atomu transferi (**H**ydrogen **A**tom **T**ransfer)
HMF	Hidroksimetil furfural (5-**H**ydroxy**m**ethyl-2-**f**urfural)
IFU	Uluslararası Meyve Suyu Federasyonu (**I**nternational **F**ruit **J**uice **U**nion)
LH	Lipit (**L**ipid)
NTU	**N**ephelometric **T**urbidity **U**nit
*OH	Hidroksi radikali (Hydroxy radical)
ORAC	Oksijen radikal absorbans kapasitesi (**O**xygen **R**adical **A**bsorbance **C**apacity)
PBS	Fosfat tamponu (**P**hosphate **B**uffer **S**aline)
PET	Polietilen terafitalat (**P**oly**e**thylene tera**p**hthalate)
PVDF	Poliviniliden florür (**P**oly**v**inyli**d**ene **f**luoride)
R*	Lipit radikali (Lipid radical)
RO*	Alkoksi radikali (Alkoxy radical)
ROO*	Peroksi radikali (Peroxy radical)

ROS	Reaktif oksijen formları (**R**eactive **O**xygen **S**pecies)
SOD	Süperoksit dismutaz (**S**uper**o**xide **d**ismutase)
TEAC	Troloks eşdeğer antioksidan kapasite (**T**rolox **E**quivalent **A**ntioxidant **C**apacity)
TRAP	Toplam radikal tutma antioksidan parametresi (**T**otal **R**adical trapping **A**ntioxidant **P**arameter)
UV	Ultraviyole (**U**ltra**v**iolet)

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1	$ABTS^{\bullet+}$ radikali ile antioksidan arasındaki reaksiyon.....	13
Şekil 4.1	Siyah havuç ham suyuna uygulanan durultma ve örnek alma aşamaları …….…….…….....	31
Şekil 4.2	Klorojenik asit standart eğrisi…….…….…….……...	38
Şekil 4.3	Gallik asit standart eğrisi ……..……...……...	38
Şekil 4.4	Troloks standart eğrisi ……	39
Şekil 4.5	Siyah havuç ham suyundaki fenoliklerin HPLC kromotogramı.....	42

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 2.1	Siyah havuç suyunun bazı analitik özellikleri.....	5
Çizelge 3.1	HPLC ile fenolikler için uygulanan elüsyon profili…….....	28
Çizelge 3.2	HPLC-DAD-MS ile fenolikler için uygulanan elüsyon profili..	30
Çizelge 4.1	Siyah havuç suyunun farklı üretim aşamalarındaki briks, pH ve titrasyon asitliği değerleri……...	32
Çizelge 4.2	Siyah havuç suyuna uygulanan depektinizasyon deneme sonuçları ……....	34
Çizelge 4.3	Siyah havuç suyuna uygulanan bentonit deneme sonuçları …..	34
Çizelge 4.4	Siyah havuç suyuna uygulanan jelatin ve kizelsol deneme sonuçları……..	35
Çizelge 4.5	Siyah havuç suyuna uygulanan kizelsol deneme sonuçları…….	36
Çizelge 4.6	Siyah havuç suyunun farklı üretim aşamalarındaki toplam fenolik madde miktarları…….	39
Çizelge 4.7	Siyah havuç suyunun farklı üretim aşamalarındaki klorojenik asit miktarları.....	43
Çizelge 4.8	Siyah havuç suyunun farklı üretim aşamalarındaki antioksidan aktivite düzeyleri ve toplam fenolik madde içerikleri …….....	44
Çizelge 4.9	Siyah havuç suyunun farklı üretim aşamalarındaki kondense olabilen fenolik madde miktarları……...	47
Çizelge 4.10	Farklı sıcaklıklarda depolanan siyah havuç suyu konsantrelerinde toplam fenolik madde miktarları.....	48
Çizelge 4.11	Siyah havuç suyu konsantrelerinin farklı sıcaklıklarda depolanması süresince fenolik madde miktarındaki azalmaya ilişkin varyans analiz çizelgesi……	49
Çizelge 4.12	Farklı sıcaklıklarda depolanan siyah havuç suyu konsantrelerinde ölçülen antioksidan aktivite değerleri……	49
Çizelge 4.13	Siyah havuç suyu konsantrelerinin farklı sıcaklıklarda depolanması süresince antioksidan aktivitedeki azalmaya ilişkin varyans analiz çizelgesi……	50

Çizelge 4.14 Farklı sıcaklıklarda depolanan siyah havuç suyu konsantrelerinin toplam fenolik madde miktarları..... 51

Çizelge 4.15 Farklı sıcaklıklarda depolanan siyah havuç suyu konsantrelerinde ölçülen kondense olabilen fenolik madde değerleri…….....… 51

Çizelge 4.16 Farklı sıcaklıklarda depolanan siyah havuç suyu konsantrelerinin briks, bulanıklık, pH, titrasyon asitliği ve bulanıklık değerleri…… 52

1. GİRİŞ

Son yıllarda yapılan çalışmalar, bitkisel kaynaklı gıdaların yapısında bulunan ve fitokimyasal (doğal antioksidanlar, lifler ve diğer bioaktif maddeler) olarak adlandırılan maddelerin insan sağlığına önemli etkilerinin olduğunu göstermiştir. Bu fitokimyasallar arasında da özellikle antioksidan aktivite gösteren maddelerin oksidasyon reaksiyonlarına bağlı olarak gelişen kanser ve kalp hastalıkları gibi kronik hastalıklara karşı etkili olduğu düşünülmektedir. Antioksidan olarak adlandırılan bu maddelerin aynı zamanda yaşlanmayı da geciktirdikleri ileri sürülmektedir. Meyve ve sebzelerin yapısında bulunan en önemli antioksidan maddeler; C vitamini (askorbik asit), karotenoidler ve fenoliklerdir. Bunların dışında tokoferoller de önemli düzeyde antioksidan aktivite göstermektedirler. Ancak tokoferoller daha çok yağlı çerezlerde ve tahıllarda bulunmakta, meyve ve sebzelerde ise çok az miktarda bulunmaktadır.

C vitamini, karotenoidler ve fenoliklerin antioksidan etkileri nedeniyle, bu maddelerin bulunduğu meyve ve sebzelere ve bunlardan elde edilen ürünlere tüketicilerin talebi önemli düzeyde artmıştır. Meyve ve sebzelerin hasattan başlayarak işlenmesine kadar geçen aşamalarda, bu ürünlerin yapısında bulunan ve antioksan aktivite gösteren maddelerin muhafaza edilmesi giderek önem kazanmıştır.

Yüksek düzeyde koyu kırmızı renkli antosiyanin içermeleri nedeniyle, siyah havuçtan elde edilen siyah havuç suyu ve konsantreleri, son yıllarda gıdaların boyanmasında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Başta sıcaklık olmak üzere, birçok faktörden kolaylıkla etkilenen antosiyaninlerin stabilitesi, antosiyaninlerin asitlere bağlanmasıya, yani açillenmesiyle artmaktadır. Siyah havuç antosiyaninlerinin büyük bölümünün açillenmiş olması, siyah havuçtan elde edilen konsantre ürünlere olan talebi artırmıştır. Fenolik maddelerin bir alt grubu olan antosiyaninler ile özellikle yüksek molekül ağırlığındaki fenoliklerin antioksidan aktivite göstermesi, siyah havucun sadece renginden dolayı değil, aynı zamanda antioksidan aktive göstermesinden dolayı da önem kazanmasına neden olmuştur.

Bu çalışmada, siyah havuç suyunun durultulmasından başlayarak konsantre edilmesi ve elde edilen konsantrenin farklı sıcaklıklarda depolanması süresince, antioksidan aktivite gösteren fenolik maddelerin düzeyindeki değişimlerin incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, tüm bu aşamalarda gerek siyah havuç suyunda gerekse siyah havuç suyu konsantrelerinde antioksidan aktivite ölçümleri de yapılarak, fenolik maddeler ile antioksidan aktivite arasındaki ilişki de belirlenecektir. Son olarak da, siyah havuç suyundaki fenoliklerin HPLC-MS yöntemi ile kompozisyonu da saptanacaktır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

Siyah havuç (*Daucus carota* L. ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.), Umbelliferae (şemsiyegiller) familyasına ait, kökleri yenebilen iki yıllık bir kültür sebzesidir. Yenilebilen etli kökler birinci yıl, çiçek ve tohumları ise ikinci yılda yetişmektedir (Bayraktar 1970). Yaprakları çok parçalı olup, küçük, beyaz ve sık yapılı çiçekleri ise, şemsiye biçiminde bir arada bulunmaktadır. Siyah havuç derinde, yumuşak ve kumlu topraklarda iyi yetişmektedir. Botanik olarak havuç; antosiyanin grubu (*Daucus carota* L. ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) ve karoten grubu (*Daucus carota* ssp. sativus) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Siyah havuçlar antosiyanin grubuna girmekte ve kendilerine özgü koyu kırmızı renkleri, içerdikleri antosiyaninlerden kaynaklanmaktadır.

Siyah havuç ülkemiz dışında; Afganistan, Mısır, Pakistan, Hindistan ve Uzak Doğu ülkelerinde (Berry vd. 1989) yetiştirilmektedir. Ülkemizde Kuşadası ve Anamur'da kısmen yetiştirilse de, üretiminin tamamına yakını Konya'nın Ereğli ilçesinde ve Adana yörelerinde gerçekleşmektedir. Bununla birlikte, siyah havuç üretiminin merkezi Ereğli ilçesidir. Ereğli'de siyah havuç ekilen arazi; 2007 yılında 8 bin dekarken, 2008 yılında 25 bin dekara çıktığı belirtilmektedir (www.marketingturkey.com). Son yıllarda siyah havuca talebin artmasıyla siyah havuç üretiminin önceki yıllara oranla büyük artış gösterdiği ve yıllık 80 bin tonun üzerine çıktığı belirtilmiştir. Siyah havuç üretiminin hububat üretimine göre daha kolay ve karlı olması nedeniyle de, Konya Ereğli'de üretimin giderek arttığı ifade edilmektedir. Ülkemizde üretilen siyah havucun bir bölümü diğer ürünlere işlenmeden taze olarak; başta İtalya, Danimarka, Fransa, Almanya, Güney Kore ve Japonya gibi Avrupa ve Uzak Doğu ülkeleri olmak üzere çeşitli ülkelere ihraç edilmektedir.

Kasım ve Aralık aylarında hasat edilen siyah havuç, ülkemizde taze olarak tüketilebildiği gibi (salata ve turşularda), başta Adana ve Mersin illerimizde olmak üzere Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde sıkça tüketilen fermente bir içecek türü olan "şalgam"ın da ham maddesi olarak kullanılmaktadır. Taze olarak tüketilmesi ile şalgam üretiminde kullanılmasının yanında, ülkemizde üretilen siyah havucun

önemli bir bölümü siyah havuç suyu konsantresine işlenmekte ve üretilen bu konsantrenin de önemli bir bölümü ihraç edilmektedir.

Siyah havucun son yıllarda değer kazanmasındaki en önemli unsurlar, yüksek düzeyde antosiyanin içermesi ve bu antosiyaninlerin de stabilitesinin yüksek olmasıdır. Türkyılmaz (2009) tarafından yapılan bir araştırmada, siyah havuç ham suyunun 488 mg/L düzeyinde toplam monomerik antosiyanin içerdiği ve HPLC-MS yöntemiyle yapılan analizlerle de siyah havuç antosiyaninlerinin %84'ünün mono açillenmiş yapıda olduğu ortaya konulmuştur. Bilindiği üzere, açillenmiş yapıdaki antosiyaninlerin stabilitesi açillenmemiş antosiyaninlere göre çok daha fazladır (Stintzing vd. 2002). Yüksek düzeyde stabil antosiyanin içeriğinin yanında, siyah havucun önemli düzeyde antioksidan aktivite gösterdiği de bildirilmektedir. Siyah havuç suyunun antioksidan kapasitesinin, normal havuç suyunun (turuncu) antioksidan kapasitesinden yaklaşık 13□14 kat daha fazla olduğu saptanmıştır (Özkan vd. 2005).

Siyah havuç antosiyaninleri, asidik pH'larda mükemmel düzeyde parlak çilek kırmızısı rengi sağlamalarından dolayı, siyah havuç suyu veya konsantreleri; meyve suları ve nektarlarının, meşrubatların, reçellerin, marmelatların ve şekerlemelerin renklendirilmesinde kullanılmaktadır (Downham ve Collins 2000). Kırca vd. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, birçok meyve suyu (elma, beyaz üzüm, portakal, greyfurt, mandarin ve limon suyu), nektar (şeftali, kayısı ve ananas nektarı) ve çilek marmelatının siyah havuç suyu kullanılarak renklendirilmesi (boyanması) durumunda, siyah havuç antosiyaninlerinin bu ürünlerdeki stabilitesinin yüksek olduğu ve bu nedenle siyah havuç suyu konsantresinin gıda boyası olarak kullanımasının uygun olduğu belirtilmiştir.

Siyah havuç suyunun bazı analitik özellikleri çizelge 2.1'de verilmiştir. Gerek ülkemizdeki siyah havuç suyu ve konsantresi üretimine (MEYED 2005) yönelik gerekse de siyah havuç suyu konsantresi ihracatı ile ilgili olarak herhangi bir istatistiksel veriye ulaşılamamıştır.

Çizelge 2.1 Siyah havuç ham suyunun bazı analitik özellikleri (Kırca 2004)

Analitik Özellikler	Miktar
Briks	10.75
Titrasyon asitliği (g/100 mL)	0.112
pH	6.02
İndirgen şeker (g/L)	15.54
Toplam şeker (g/L)	49.53
Sakaroz (g/L)	33.99
Askorbik asit (mg/100 mL)	2.640

Yaşamsal faaliyetlerin sürdürülebilmesi için gerekli enerji; glukoz ve yağ asitleri gibi moleküllerin oksidasyonu ile sağlanmaktadır. Bu enerji sağlanırken, bir yandan da yapısında oksijen içeren radikaller ve radikal olmayan türevler oluşmaktadır. İster radikal olsun ister radikal olmasın, yapısında oksijen içeren maddelerin tümü, reaktif oksijen türleri (ROS, **R**eactive **O**xygen **S**pecies) olarak tanımlanmaktadır. Oksijen radikalleri; süperoksit anyon, hidroksi, peroksi, alkoksi ve hidroperoksi radikallerdir. Oluşan bu RO türleri, doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek lipitlerin peroksidasyonuna ve protein ve DNA'ların (Deoksiribonükleik asit; **D**eoxyribo**n**ucleic **a**cid) zarar görmesine neden olarak hücrenin inaktivasyonuna neden olmaktadırlar (Murthy vd. 2002). Dolayısı ile, RO türleri aralarında kanser ve kardiyovasküler hastalıkların da bulunduğu birçok kronik hastalığın başlamasına neden olmaktadırlar. Ortamda antioksidan olarak adlandırılan maddelerin bulunması durumunda ise, RO türleri, ortamda bulunan antioksidanları okside ederek biyolojik moleküllerin (lipid ve protein) oksidasyonunu önlemektedirler.

Gıdalardaki bileşenlerin ve canlı dokulardaki lipit, protein ve DNA gibi biyolojik moleküllerin oksidasyonunu geciktiren veya engelleyen maddeler antioksidan olarak tanımlanmaktadır. Antioksidanlar, oksidatif zincir reaksiyonlarının (chain-breaking); başlama (initiation) veya gelişmesini (propagation) inhibe ederler (Javanmardi vd. 2003). Oksidatif zincir reaksiyonlarının "başlamasını önleyen primer antioksidanlar" ve "gelişimini önleyen ikincil veya koruyucu (preventive) antioksidanlar" olmak üzere 2 ana başlık altında antioksidanlar incelenmektedir (Apak vd. 2007). Birincil

antioksidanlar, hidrojen veya elektron vericisi gibi davranıp serbest radikallerle reaksiyona girerek (2.1), serbest radikallerin stabil ürünlere dönüşmesini sağlamaktadırlar ve zincir reaksiyonların başlamasını önlemektedirler (Yanishlieva 2000). Bu antioksidanlar çok düşük konsantrasyonlarda bile etkilidirler. Oksidatif zincir reaksiyonlarının gelişme basamağında ise, peroksi (ROO*) (2.1) veya alkoksi (RO*) (2.2) radikalleriyle reaksiyona girerek engellerler.

$$R^* + AH \rightarrow RH + A^* \quad (2.1)$$

$$ROO^* + AH \rightarrow ROOH + A^* \quad (2.2)$$

$$RO^* + AH \rightarrow ROH + A^* \quad (2.3)$$

Birincil antioksidanlardan farklı olarak, ikincil antioksidanlar ise, lipitlerle doğrudan reaksiyona girmeden, lipidlerin oksidasyonuna neden olan maddelerle reaksiyona girerek oksidasyon reaksiyonlarını önlerler. Bu tip reaksiyonlara örnek olarak, antioksidanların metallerle kelat oluşturduğu reaksiyonlar verilebilir. Antioksidanların bu dolaylı etkisi ile, ferro demirin (Fe^{2+}) katıldığı Fenton tipi reaksiyonların oluşumu önlenmektedir. Ayrıca reaktif hidroksi radikalinin (*OH) oluşumu da önlenmektedir. Bu reaksiyon 2.4 No'lu eşitlikte verilmiştir.

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + {}^*OH + OH^- \quad (2.4)$$

Gıdaların yapısında doğal olarak bulunan antioksidanlar (C ve E vitamini, karotenoidler ve fenolik bileşikler) dışında, başta Maillard reaksiyonu olmak üzere, çeşitli kimyasal reaksiyonlarda oluşan ara veya son ürünler de antioksidatif etki göstermektedirler. Canlı dokularda ise; enzimatik veya enzimatik olmayan çeşitli antioksidan bileşikler bulunmaktadır. Enzimatik antioksidanların başlıcaları; süperoksit dismutaz (SOD, **S**uper**o**xide **d**ismutase), glutatiyon peroksidaz (GSHPx, **G**lutathione **p**eroxidase) ve katalazdır. Buna karşın, enzimatik olmayan antioksidan bileşikler ise; başta C ve E vitamini, karotenoidler ve fenolik bileşikler olmak üzere, indirgenmiş glutatiyon, albumin, seruloplazmin ve ferritinden oluşmaktadır (Guo vd. 2003).

C ve E vitaminleri ile karotenoid maddeler, reaktif oksijen türlerini inaktive etmek suretiyle veya oksidatif zincir reaksiyonlarında zincir kırıcı etki göstererek antioksidan etki göstermektedir. Buna karşın fenolik maddeler ise, serbest radikalleri bağlayarak, metallerle kelat oluşturarak ve lipoksigenaz enzimini inaktive etmek suretiyle bu etkiyi göstermektedirler (Frankel 1999).

Antioksidanlar içinde önemli bir yeri olan fenolik bileşikler tüm meyve ve sebzelerde bulunan ve onların renk, tat ve tekstür özellikleri üzerinde belirleyici rol oynayan bileşiklerdir. Bunun yanında, fenolik bileşiklerin antioksidan ve antimikrobiyel aktiviteleri de bulunmaktadır. Antioksidan etki nedeniyle, fenolik bileşiklerin kalp ve damar hastalıkları, kanser, diyabet gibi pek çok hastalığı önleyici etki gösterdiği bilinmektedir. Ayrıca, fenolik bileşiklerin yaşlanmayı geciktirici etkilerinin de olduğu saptanmıştır.

Fenolik bileşikler arasında fenolik asitlerin, flavonoidlerin ve flavonoid olmayan resravatrollerin önemli düzeyde antioksidan aktivite gösterdikleri saptanmıştır (Rice-Evans vd. 1996). Fenoliklerin antioksidan aktivite gösterebilmesi için iki koşulu yerine getirmesi gerekmektedir (Rice-Evans vd. 1996). Birincisi, oksidasyonunu önleyeceği maddeden daha düşük konsantrasyonda bulunduğunda bile, otooksidasyon veya serbest radikaller tarafından başlatılan oksidasyonu ya önlemeli ya da geciktirmelidir. İkinci olarak da, fenoliklerin reaksiyonu sonucu oluşan radikaller, moleküller arası kurulan hidrojen bağları ile stabil bir yapıya kavuşmalı ve böylece daha ileri düzeydeki oksidasyon önlenmelidir.

Fenolik bileşiklerin en önemli grubu olan flavonoidlerden; flavonlar, izoflavonlar, flavononlar, antosiyaninler ve kateşinler önemli düzeyde antioksidan aktivite göstermektedirler. Kateşinler bitkilerde en yaygın olarak bulunan flavanollerin başında gelmekte ve önemli düzeyde antioksidan aktivite göstermektedirler. Yeşil çayın antioksidan aktivitesinin %78'inin kateşin ve kateşin-gallat esterlerinden kaynaklandığı bildirilmektedir (Rice-Evans vd. 1996). Benzer şekilde, antosiyaninlerin de önemli düzeyde antioksidan aktivite gösterdikleri ve bu etkinin de muhtemelen antosiyanidinlerin ferro demiri ile kelat oluşturmasıyla reaktif *OH radikalinin

oluşumunu önlemesinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Noda vd. 2002). Bu flavonoller dışında, kateşinlerin polimerizasyonu ile oluşan prosiyanidinler de yüksek düzeyde antioksidan aktivite içermektedirler (Puiggros vd. 2005, Güzel 2010).

Fenolik bileşiklerin, yapılarındaki hidroksil gruplarının sayısına ve pozisyonuna bağlı olarak antioksidan aktivite gösterdikleri belirlenmiştir (Miller ve Rice-Evans 1997). Yapısında önemli düzeyde serbest hidroksil grubu bulunan prosiyanidinlerin önemli düzeyde antioksidan aktivite gösterdikleri saptanmıştır (Güzel 2010). Nar sularında yapılan bir araştırmada, yapısında 16 tane serbest hidroksil grubu bulunan punikalajinin en fazla antioksidan aktivite gösterdiği saptanmıştır (Gil vd. 2000). Hidroksil gruplarının sayısı kadar, molekül içindeki pozisyonu da antioksidan aktivite için önemlidir. Yapısında 3 tane serbest hidroksil grubu bulunan gallik asidin, yapısında 4 tane serbest hidroksil grubu bulunan ellajik asitten 2.5 kat daha fazla antioksidan aktivite göstermesi, hidroksil sayısı yanında hidroksil gruplarının moleküldeki pozisyonlarının da önemli olduğunu göstermektedir.

Prosiyanidinlerin antioksidan aktiviteleri molekül ağırlıkları ve kompozisyonlarına göre değişmektedir. Molekül ağırlığı en fazla olan polimerik prosiyanidinlerin en fazla antioksidan aktivite gösterdiği ve onu takiben de oligomerik prosiyanidinlerin antioksidan aktivite gösterdikleri bilinmektedir. Buna karşın prosiyanidinler içinde en düşük molekül ağırlığına sahip kateşinlerin, oligomer ve polimerlerine göre daha az antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmektedir (Spranger vd. 2008).

Antioksidanlar, meyve ve sebze dokularının farklı organellerinde bulunmakta ve gerek sudaki çözünürlükleri, gerekse oksidasyona duyarlılıkları farklılık göstermektedir. Bu faktörler antioksidanların gerek bitki dokularında, gerekse işlendikleri gıdalarda ve nihayet vücuttaki fonksiyonlarını etkilemektedir. Bazı antioksidanların bitkinin, özellikle fotosentez sırasında oluşan oksijen etkisiyle maruz kaldığı hasarı önlemede önemli rollerinin olduğu bilinmektedir.

Meyve ve sebzelerin hasatından başlayarak, taşınmasına, depolanmasına ve bu ürünlerin çeşitli gıdalara işlenmesi ve işlenmiş gıdaların depolama koşullarına bağlı olarak gerek

görsel kalitesinde gerekse kimyasal kompozisyonunda önemli kayıplar oluşabilmektedir. Kimyasal kompozisyondaki değişimler sırasında, antioksidan aktivitede de önemli kayıplarla karşılaşılmaktadır. Gıdaların işlenmesi sırasında antioksidan aktivite gösteren maddelerdeki en önemli kayıp, parçalama ve suda haşlama işlemleri sırasında meydana gelmektedir. Suda çözünen fenolik maddeler ve C vitamini, suda haşlama işlemi sırasında dokudan ayrılıp haşlama suyuna geçerek dokudan uzaklaşmaktadır. Bunun dışında, işlenmiş gıdaların depolanması sırasında da antioksidan aktivite düzeylerinin değiştiği saptanmıştır (Arena vd. 2001, Del Caro vd. 2004, Naithani vd. 2006, Klimczak vd. 2007).

Diyetle alınan fenolik maddelerin önemli bölümü, üzümsü meyvelerden (böğürtlen, yaban mersini vb.), ağaçta yetişen meyvelerden (vişne, kiraz, elma vb.) ve soğandan gelmektedir. Bunun dışında çay da önemli düzeyde fenolik madde içermektedir. Yüksek düzeyde antosiyanin içeren böğürtlen ve yaban mersininin, aynı zamanda yüksek düzeyde antioksidan aktivite gösterdiği de bilinmektedir. Siyah havuç da yüksek düzeyde antosiyanin ve fenolik madde içermesi nedeniyle önemli düzeyde antioksidan aktivite göstermektedir. Gerek ucuz olması gerekse önemli miktarda üretiminin olması nedeniyle Türk insanının diyetinde fenolik maddeler özellikle elma ve çayla alınmaktadır.

Meyve ve sebzelerin işlenmesi sırasında uygulanan parçalama ve ısıtma işlemleri| antioksidanların oksidasyonuna, termal degradasyonuna ve suda çözünerek uzaklaşmalarına neden olmaktadır. Bu kayıplar özellikle askorbik asit ve fenoliklerde, diğer antioksidan bileşiklere göre daha belirgindir. Puuponen-Pimia vd. (2003) tarafından yapılan bir araştırmada, havuç ve patateslerin haşlanması ve uzun süreli dondurularak muhafazası sırasında %20□30 arasında fenolik madde içeriğinde azalma saptanmıştır. Bu azalma özellikle suda haşlama işlemi sırasında gerçekleşmektedir. Bu işlem sırasında ısı etkisi ile hücre duvarının yapısı bozulmakta ve bunun sonucunda fenolikler dokudan ayrılarak suya geçmektedirler. Bunun dışında meyve suyu üretimi sırasında polifenol oksidaz enziminin de fenoliklerin parçalanmasına neden olduğu bildirilmektedir (Kalt 2005).

Pastörizasyon, sterilizasyon ve pişirme gibi yoğun ısı uygulamaları genelde antioksidan maddeler üzerine olumsuz etki göstermektedirler. Buna karşın, likopen ve β-karoten gibi karotenoidler, uzun süreli ısıtma sonucunda bile hala stabil kalabilmektedir. Fenolik maddelerin fazla olmamak kaydıyla, belli düzeyde okside olmaları onların antioksidan aktivitelerini artırdığı saptanmıştır. Bunun başlıca nedeninin, fenolik maddelerin aromatik hidroksil gruplarından hidrojen vererek serbest radikallerin reaktivitesini sonlandırması olduğu ileri sürülmektedir (Nicoli vd. 1999). Fenolik maddelerin enzimatik oksidasyonu sonucunda, depolama süresince antioksidan özelliklerinin azaldığı, buna karşın düşük sıcaklıklarda kimyasal oksidasyon sonucunda antioksidan aktivitelerinin arttığı saptanmıştır. Bunun dışında, ya yüksek sıcaklıklarda ya da uzun süreli depolama sonucu oluşan Maillard reaksiyonu ürünlerinin de genelde yüksek antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmektedir (Nicoli vd. 1999). Özellike Maillard reaksiyonunun son aşamalarında oluşan yüksek molekül ağırlığına sahip esmer renkli maddeler, yüksek antioksidan aktivite göstermektedirler. Buna karşın Maillard reakisyonunun başlangıcında oluşan reaktif radikallerin ise, pro-oksidan olarak davrandıkları ileri sürülmektedir.

Siyah havuç, antioksidan aktivite gösteren fenolikler ve karotenoidlerce zengin bir üründür. Turuncu havuca göre, siyah havucun 2.3 kat daha fazla karotenoid içerdiği saptanmıştır (Alasalvar vd. 2005). Bunun dışında, aynı çalışmada siyah havuç, turuncu havuca göre, 2.9 kat daha fazla toplam fenolik ve 2.3 kat daha fazla antioksidan aktivite gösterdiği bulunmuştur. Turuncu havuçtan farklı olarak siyah havuç fenolik maddelerin bir alt grubu olan antosiyaninlerce de oldukça zengindir. Depektinize edilmemiş ve durultulmamış siyah havuç ham sularında 488 mg/L düzeyinde antosiyanin saptanmıştır (Türkyılmaz 2009).

Siyah havucun ticari kalitesini belirleyen en önemli kriter, içerdiği antosiyanin pigmentleridir. Siyah havucun karakteristik kırmızı rengi, bir yandan antosiyaninlerin kimyasal yapısına diğer yandan da antosiyaninlerin konsantrasyonuna bağlıdır. Delfinidin ve türevleri mavi ve viole rengi verirken, pelargonidin kırmızı-turuncu rengi vermektedir (Hernandez vd. 1999). Siyah havuç suyundaki baskın antosiyanininler siyanidinlerdir (Kamerer vd. 2004). Türkyılmaz (2009) siyah havuç sularında HPLC-

MS yöntemiyle 5 temel antosiyanin tanımlamış ve bunlardan 3 tanesinin ferulik asit, kumarik asit ve sinapik asit ile açillenmiş antosiyanin olduğunu belirlemiştir. Bu çalışmada, siyah havuç suyunun başat antosiyaninin siyanidin-3-galaktozid-ksilozid-glukozid-ferulik asit (%45) olduğu, bunu sırasıyla siyanidin-3-galaktozid-ksilozid-glukosid-kumarik asit (22%), siyanidin-3- galaktozid-ksilozid-glukosid-sinapik asit (17%), siyanidin-3-galaktozid-ksilozid-glukosid (10%) ve siyanidin-3- galaktozid-ksilozid (6%)'un takip ettiği belirlenmiştir.

Bitkisel kaynaklı gıdaların antioksidan aktiviteleri nedeniyle giderek önem kazanmaları, gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesine yönelik yöntemlere de ilgiyi artırmıştır. Bu amaçla birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler ya hidrojen atomu transferi (HAT, **H**ydrogen **A**tom **T**ransfer) reaksiyonuna ya da elektron transferi reaksiyonuna (ET, **E**lectron **T**ransfer) dayanmaktadır (Huang vd. 2005). HAT'ne dayalı antioksidan aktivite ölçüm yöntemlerinde; antioksidan (AH, **A**ntioxidant) ve substrat (lipit; LH), azo bileşiklerinin parçalanması ile oluşan peroksi radikalleri için yarışmaktadır (Apak vd. 2007). Bu reakisyonlar sırasında, antioksidanlar peroksi radikali ile reaksiyona girerek okside olmakta ve bu sırada da lipitlerin peroksidasyonunu önlemektedirler. Bu reaksiyonlar 2.1 ve 2.2 No'lu eşitliklerde verilmiştir.

$$ROO^* + AH \rightarrow ROOH + A^* \quad (2.1)$$

$$ROO^* + LH \rightarrow ROOH + L^* \quad (2.2)$$

Gıdaların antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde en yaygın olarak kulanılan HAT'ne dayalı yöntemler; oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC, **O**xygen **R**adical **A**bsorbance **C**apacity) ile toplam radikal tutma antioksidan parametresi (TRAP, **T**otal **R**adical trapping **A**ntioxidant **P**arameter) yöntemleridir.

ET'ne dayalı yöntemlerin temel ilkesi, antioksidan tarafından indirgenen oksidanın renginde meydana gelen değişimlerin ölçülmesidir. Oksidan maddenin rengindeki değişim ile örnek içinde bulunan antioksidan miktarı arasında ilişki bulunmaktadır (Apak vd. 2007). Başlıca ET'ne dayalı yöntemler; troloks eşdeğer antioksidan

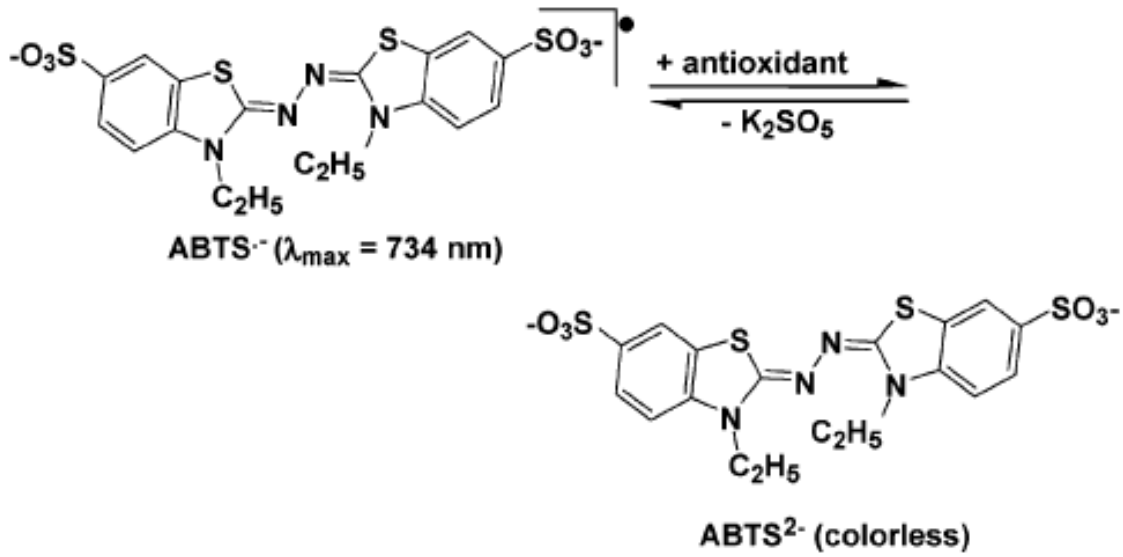
kapasitesi (ABTS/TEAC), difenil-1-pikrilhidrazil radikal tutma kapasitesi (DPPH, 2,2-**Di**p**h**enyl-1-**p**icryl**h**ydrazyl radical scavenging capacity assay), ferrik iyon indirgeme antioksidan parametresi (FRAP, **F**erric ion **R**educing **A**ntioxidant **P**arameter) ve N,N-dimetil-*p*-fenilendiamin analizi (DMPD, N,N–**di**m**e**thyl–*p*-**p**henylene**d**iamine assay) yöntemleridir. Gıdaların antioksidan aktivitelerinin ölçülmesinde en yaygın olarak kullanılan yöntemlerin başında; ABTS/TEAC yöntemi ile DPPH yöntemi gelmektedir.

Bu araştırmamızda, siyah havuç suyu ve konsantrelerinin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde ABTS/TEAC yönetiminden yararlanılmıştır. ABTS/TEAC yöntemi; Miller vd. (1993) tarafından ilk kez biyolojik örneklerin antioksidan aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmış olup, daha sonra Re vd. (1999) tarafından geliştirilerek gıdaların antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla uygulanmaya başlanmıştır. Bu yöntemde, *ABTS*'nin *(2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit))* oksidasyonu sonucu oluşan $ABTS^{\bullet+}$ radikali, gıdalardaki antioksidan maddeler ile reaksiyona girmekte ve bu sırada radikal indirgenerek rengi değişmektedir. Mavi/yeşil renkli $ABTS^{\bullet+}$ radikalinin renginin değişimi, 600–750 nm dalga boyunda ölçülmektedir. $ABTS^{\bullet+}$ radikali ile antioksidan arasındaki reaksiyon sonucu harcanan $ABTS^{\bullet+}$ miktarı, troloks (sentetik bir antioksidant) eşdeğeri olarak hesaplanmakta ve sonuç "TEAC değeri" (Troloks eşdeğer antioksidan kapasitesi) olarak ifade edilerek gıdaların antioksidan aktivitesi belirlenmektedir (Garcia-Alonso vd. 2004).

$ABTS^{\bullet+}$ radikali; çeşitli dalga boylarında (λ=414, 645, 734 ve 815 nm) absorbans vermesine karşın, antioksidan aktivite tayininde genelde 734 nm'de ölçüm yapılmaktadır. ABTS çözeltisinden $ABTS^{\bullet+}$ radikali çeşitli yöntemlerle oluşturulabilmektedir. Bu amaçla ABTS maddesinin $ABTS^{\bullet+}$ radikaline oksidasyonu; ya miyoglobin veya bayır turbu peroksidazı kullanılarak enzimatik yolla ya da MnO_2, potasyum persülfat veya peroksit radikalleri kullanılarak kimyasal olarak gerçekleştirilmektedir (Villano vd. 2004).

ABTS/TEAC yönteminin ayrıntıları "**3.2.8.4 Antioksidan aktivite tayini**" başlığı altında yöntem bölümünde verilmiştir. Bu yöntem, hem biyolojik sıvılara hem de

gıdalara uygulanabilmektedir (Villano vd. 2004). Bu yöntem ile; flavonoidler, hidroksisinamik asitler, karotenoidler gibi hidrofilik ve lipofilik antioksidanlar ölçülebilmektedir (Re vd. 1999). Bu yönteme ilişkin reaksiyon şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1 $ABTS^{\bullet+}$ radikali ile antioksidan arasındaki reaksiyon (Apak vd. 2007)

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Siyah havuç

Araştırmada materyal olarak, Konya'nın Ereğli ilçesinden temin edilen siyah havuçlar kullanılmıştır.

3.1.2 Kimyasallar

Siyah havuç suyunda bulunan klorojenik asidin tanımlanmasında ve miktarının hesaplanmasında kullanılan "klorojenik asit" standardı Sigma firmasından (St. Louis, MO, A.B.D.) satın alınmıştır. Fenoliklerin ekstraksiyonunda, saflaştırılmasında ve HPLC ile analizinde, kloroform dışında daima HPLC saflığında (HPLC grade) solventler kullanılmıştır. Kloroform ise, analitik saflıkta (a.g, analytical grade) olup, fenoliklerin ekstraksiyonunda kullanılmıştır. Fenoliklerin saflaştırılmasında kullanılan C_{18}-Sep-Pak kartuşları (kolonları) Waters firmasından (Milford, MA, A.B.D.) temin edilmiştir.

Antioksidan aktivite tayininde; radikal çözelti hazırlanmasında kullanılan ABTS (2,2'-**a**zinobis-(3-etil**b**enzo**t**iazolin-6-**s**ulfonik asit)) ve troloks standardı ile kondense olabilen fenolik madde tayininde kullanılan kimyasallar Sigma firmasından (St. Louis, MO, A.B.D.), toplam fenolik madde tayininde kullanılan; gallik asit standardı ile Folin-Ciocalteu ayracı Merck firmasından (Darmstadt, Almanya) satın alınmıştır. Diğer analizlerde; Merck (Darmstad, Almanya) firmasından temin edilen, ya analitik saflıkta ya da yüksek saflıkta (extra pure) kimyasallar kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Siyah havuç suyuna işlenmesi

Siyah havuçlar, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi "Meyve Suyu Pilot İşletmesi"nde havuç suyuna işlenmiştir. Bu amaçla havuçlar yıkama makinesinde etkin bir şekilde yıkanmış ve yıkama suyunun süzülmesi için bir süre beklendikten sonra tartılarak ağırlıkları belirlenmiştir. Daha sonra işletmede bulanan rendeleme cihazında havuçlar rendelendikten sonra, paketli preste (Bucher-Guyer, Niederweningen, İsviçre) preslenmiş ve siyah havuç ham suyu elde edilmiştir. Preslemede, maksimum basınca kademeli olarak 30 dak.'da çıkılmasına özen gösterilmiştir (Cemeroğlu 1977). Preslemede randımanın %35–40 düzeyinde olması hedeflenmiş (Kırca 2004) ve kullanılan bu materyalde %36'lık bir randımana ulaşılmıştır.

$$\text{Randıman (\%)} = \frac{\text{73.6 kg siyah havuç ham suyu}}{\text{205 kg siyah havuç}} \ (100) \ = \ \%36$$

Elde edilen siyah havuç ham suyu 3 kat tülbent bezinden filtre edilerek, kaba partiküllerinden ayrılmıştır. Depektinizasyon işleminden önce, siyah havuç ham suyunda suda çözünür kuru madde (briks), pH, titrasyon asitliği, toplam fenolik madde miktarı, kondense olabilen fenolik madde miktarı, fenolik kompozisyonu ve antioksidan aktivite düzeyi aşağıda verilen yöntemler kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.2 Siyah havuç ham suyunun depektinizasyonu

Elde edilen havuç ham suyuna sitrik asit çözeltisi eklenerek (%50, w/v), siyah havuç suyunun pH'ı 4.3'e ayarlanmıştır. Siyah havuç suyunu asitlendirmenin başlıca nedeni, bu çalışmada kullanılan küf kaynaklı pektolitik enzim preparatının pH 4.3'te optimum aktivite göstermesidir. Asitlendirlmiş siyah havuç suyuna 2.85 mL/L düzeyinde ticari enzim preparatından "Fructozym P" (Döhler, Geisenheim, Almanya) eklenerek 50°C'de 2 h süreyle bekletilerek, çözünmüş halde bulunan ve koruyucu kolloid olarak

davranmak suretiyle durultmada en önemli sorun yaratan pektinin parçalanması sağlanmıştır. Bu işlem sonunda üstte oluşan tortu bir süzgeç yardımıyla alınmıştır.

Siyah havuç suyunun yoğun kırmızı rengi nedeniyle, alkolle pektinin reaksiyonu sonucu oluşan tortunun oluşumu çıplak gözle izlenememiş, bu nedenle depektinizasyon işleminin tamamlanıp tamamlanmadığı türbidimetre ile belirlenmiştir. Bu amaçla, depektinize edilen örnekler kaba filtrasyona tabi tutulmuş ve bulanıklık düzeyleri türbidimetrede (HACH Ratio/XR 43900, Loveland, A.B.D.) ölçülmüştür. Bu denemelere ilişkin sonuçlar, "4. Araştırma Bulguları ve Tartışma" bölümünde verilmiştir.

3.2.3 Siyah havuç suyunun durultulması

Depektinize edilmiş siyah havuç suları; bentonit, jelatin ve kizelsol kullanılarak durultulmuştur. Gerekli bentonit, jelatin ve kizelsol miktarlarını belirlemek amacıyla, dozaj saptama deneyleri yapılmıştır. Bu amaçla, önce uygun bentonit dozajı, daha sonra jelatin ve en son olarak da kizelsol dozajları belirlenmiştir. Dozaj denemelerinden alınan sonuçlar, "4. Araştırma Bulguları ve Tartışma" bölümünde verilmiştir.

Denemelerde kullanılan bentonit, kütlesinin 9 katı su ile iyice karıştırılarak süspansiyon haline getirilmiş ve bu süspansiyon 1 gece kendi halinde 20°C'de bekletilerek şişmesi sağlanmıştır (Cemeroğlu ve Karadeniz, 2009). Depektinize edilmiş havuç suyuna bentonit çözeltisinden 7.15 mL/L (%10, w/v) eklendikten sonra 50°C'de 30 dak. bekletilmiştir. Bu süre sonunda, havuç suyu tülbent bezinden geçirilerek bir gece sıcaklık kontrollü inkübatöre (Sanyo MIR 253, Osaka, Japonya) konularak sıcaklığının +4°C'ye gelmesi sağlanmıştır. Daha sonra sıcaklığı +4°C'ye getirilen bu havuç suyuna 7.5 mL/L jelatin (%2, w/v) ve 2.6 mL/L kizelsol (%15, v/v) çözeltisinden eklenerek +4°C'de 8 h bekletilerek durultma işlemi tamamlanmıştır. Bu süre sonunda, durultulan havuç suyu kaba filtrasyona tabi tutulmuştur. Her bir durultma aşamasında örnek alınmış (depektinizasyondan önce ve sonra, bentonit uygulamasından sonra ve bentonit, jelatin ve kizelsol uygulamalarından sonra) ve bu örneklerin bir bölümü pastörize (90°C, 15 dak.) edildikten sonra, kalan bölümü ise, pastörize edilmeden analizlere kadar

dondurulmuş olarak –23°C'de muhafaza edilmiştir. Durultulan havuç suları 1.5 L'lik PET şişelere doldurularak, konsantrasyon işlemine kadar dondurulmuş olarak muhafaza edilmiştir.

3.2.4 Siyah havuç sularının konsantreye işlenmesi

Elde edilen havuç ham suları durultulduktan sonra 68°Briks derecesine kadar vakum altında 40°C'de döner (rotary) evaporatörde (Heidolph Laborota 4003, Schwabach, Almanya) konsantre edilmiştir. Dondurulmuş havuç suları, konsantreye işlenmeden önce +4°C'de bırakılarak, kendi halinde çözünmesi sağlanmıştır.

3.2.5 Siyah havuç suyu ve konsantrelerinin pastörize edilmesi

Çeşitli aşamalarda alınan siyah havuç suyu örneklerinin bir kısmı pastörize edilmiştir. Bu amaçla, siyah havuç suları cam şişelere konulmuş ve şişelerin ağzı hermetik olarak kapatıldıktan sonra, 90°C'de 15 dak süreyle su banyosunda pastörize edilmiştir. Pastörizasyon işlemi sonunda örnekler hızla soğutularak oda sıcaklığına getirilmişlerdir.

Konsantre örneklerinin muhafaza edileceği kavanozlar boş olarak ve kapakları hafif aralı olarak kapatılarak, otoklavda 121°C'de 15 dak.. süreyle sterilize edilmiştir. Siyah havuç suyu konsantreleri, steril kavanozlara doldurulmadan önce döner evaporatörde 70°C'ye ısıtılmıştır. Daha sonra steril kavanozların kapakları bunzen beki yanında açılıp, 70°C'ye ısıtılmış yaklaşık 90 g konsantre örneği hızlı bir şekilde kavanozlara doldurulmuş ve kapakları hermetik olarak kapatılmıştır. Bunu izleyerek kavanozlar hızla oda sıcaklığına kadar soğutulmuşlardır. Konsantre örnekleri için yapılan bu işlem tam bir pastörizasyon işlemi olmayıp, örneklerin uzun süre mikrobiyolojik bir bozulma olmadan depolanabilmesi amacıyla yapılmıştır.

3.2.6 Siyah havuç suyu konsantrelerinin depolanması

Konsantre örneklerinin bulunduğu kavanozlar, depolamanın yapılacağı sıcaklık kontrollü inkübatörlere yerleştirilmiştir. +5 °C, 20 °C ve 30 °C'deki depolama deneyleri

253 L'lik sıcaklık kontrollü inkübatörlerde (Sanyo MIR 253, Gunma, Japonya) yapılmıştır. Depolama süresince, uygulanan sıcaklığa bağlı olmaksızın 2 ay aralıkla örnek alınmıştır. Konsantre örnekleri 8 ay süresince depolanmıştır. Periyodik (2 ay) olarak alınan konsantre örnekleri ile doğal ve durultulmuş (depektinizasyondan önce ve sonra, bentonit uygulamasından sonra ve bentonit, jelatin ve kizelsol uygulamalarından sonra alınan) havuç sularında aşağıda belirtilen fiziksel ve kimyasal analizler yapılmıştır.

3.2.7 Fiziksel analizler

3.2.7.1 Suda çözünür kuru madde tayini

Örneklerde suda çözünür kuru madde (briks) dijital bir refraktometre (Atago Rx-7000α, Tokyo, Japonya) kullanılarak saptanmıştır. Siyah havuç suyu konsantrelerinin briksleri herhangi bir işlem yapılmadan doğrudan ölçülmüştür. Buna karşın, depektinize edilmemiş bulanık havuç suları, kaba bir filtre kağıdından filtre edildikten sonra briksleri ölçülmüştür. Bulanıklık, briksin olduğundan daha yüksek okunmasına neden olmakta ve bu nedenle de bulanık meyve ve sebze sularının brikslerinin mutlaka filtre edildikten sonra ölçülmesi önerilmektedir (Cemeroğlu, 2010). Briks ölçümleri, 20°C'de yapılmıştır.

3.2.7.2 pH tayini

pH değeri, potansiyometrik olarak pH-metre (WTW Inolab Level 1, Weilheim, Almanya) ile saptanmıştır. Bu amaçla, siyah havuç suyu örneklerinden 10 mL alınarak, üzerine 10 mL damıtık su ilave edildikten sonra pH değeri belirlenmiştir. Konsantre örneklerinde ise, 1.5 g konsantre örneği üzerine 20 mL damıtık su ilave edildikten sonra pH değeri belirlenmiştir. Meyve ve sebze suları gibi tampon niteliği yüksek olan gıdalarda sulandırma oranı fazla olsa bile, pH değeri değişmediği için (Cemeroğlu, 2010), gerek havuç sularına gerekse de konsantre örneklerine pH ölçümlerini kolaylaştırmak için önemli miktarda su eklenebilmiştir. pH ölçümleri, 20ºC'de yapılmıştır.

3.2.7.3 Bulanıklık düzeyinin ölçülmesi

Durultulmuş ve kaba filtreden geçirilmiş havuç suyu örneklerinin bulanıklık düzeyi, bir türbidimetre (HACH 2100N, Loveland, A.B.D.) yardımıyla belirlenmiştir. Bulanıklık düzeyi "NTU (Nephelometric Turbidity Unit)" değeri ile ifade edilmiştir. Bulanıklık düzeyi, havuç sularında doğrudan, konsantrelerde ise; doğal havuç suyu briksine (10.7°Briks) kadar seyreltildikten sonra belirlenmiştir. Bu amaçla, yaklaşık 5 g siyah havuç suyu konsantresine, 30 mL damıtık su ilavesiyle seyreltilerek doğal havuç suyu briksine getirilmiştir. Türbidimetrenin sıfır ayarı, konsantrelerin seyreltilmesinde kullanılan damıtık su ile yapılmıştır.

3.2.8 Kimyasal analizler

3.2.8.1 Titrasyon asitliği tayini

Titrasyon asitliği, pH ile izlenerek yürütülen elektrometrik titrasyonla saptanmış olup, analizde IFU (1968) tarafından önerilen işlemler uygulanmıştır. Bu amaçla, pH tayini için hazırlanmış olan havuç sularından 20 mL alınarak ayarlı 0.1 *N* NaOH çözeltisi ile ve pH metre yardımıyla, pH 8.1'e ulaşıncaya kadar titre edilmiştir. Havuç suyu ve konsantre örneklerinin titrasyon asitliği, susuz sitrik asit cinsinden sırasıyla, "g/100 mL" veya "g/100 g" olarak hesaplanmıştır.

3.2.8.2 Toplam fenolik madde tayini

Singleton ve Rossi (1965) tarafından tanımlanmış bulunan Folin-Ciocalteu yöntemine göre yapılmıştır. Bu yöntemin ilkesi bir redoks reaksiyonuna dayanmaktadır. Fenolik bileşikler alkali bir ortamda Folin-Ciocalteu ayıracını indirgeyerek, kendileri oksitlenmiş forma dönüşmekte ve oluşan mavi renk, spektrofotometrede 720 nm dalga boyunda şahide karşı okunarak standart kurve yardımıyla fenolik madde miktarı belirlenmektedir (Özkan vd. 2007).

Siyah havuç suyu ve konsantre örnekleri fazla miktarda fenolik bileşik içermeleri nedeniyle seyreltilerek analize hazırlanmıştır. Bulanık ve berrak siyah havuç suları 1:10 (v/v), bulanık ve berrak siyah havuç suyu konsantreleri ise, 1:100 (w/v) oranında seyreltilmiştir. 100 mL'lik ölçü balonuna konulan 75 mL damıtık su üzerine 1 mL seyreltilmiş siyah havuç suyu veya konsantresinden eklenmiştir. Daha sonra, balon içeriği üzerine 5 mL Folin-Ciocalteu ayracı eklenerek balon iyice çalkalanmış ve 3 dak. kendi haline bırakıldıktan sonra üzerine 10 mL %20'lik sodyum karbonat çözeltisi eklenip, balon damıtık su ile işaretine tamamlanmıştır. Balon içeriği bir kez daha çalkalandıktan sonra kendi halinde 1 h bekletildikten sonra spektrofotometrede aynı şekilde hazırlanmış şahide karşı 720 nm'de absorbansı saptanmıştır.

Siyah havuç suyu ve konsantrelerinin fenolik madde içerikleri gallik asit kullanılarak hazırlanan standart eğriden hesaplanmıştır. Bu amaçla 25 mg gallik asit 50 mL absolü etil alkolde çözündürülerek 500 mg/L konsantrasyonda gallik asit stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 ve 8.0 mL alınarak her biri 10 mL'lik ölçü balonlarına aktarılmış, balonlar absolü etil alkol ile çizgisine tamamlanmıştır. Bu şekilde sırasıyla 50, 100, 200, 300 ve 400 mg gallik asit/L konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltiler ile 500 mg/L konsantrasyonda hazırlanan stok çözeltiye, siyah havuç suyu ve konsantresi örneklerine uygulanan analiz aşamaları uygulanmıştır. Bu 6 çözeltinin absorbans değerleri 720 nm dalga boyunda saptanmıştır. Bu absorbans değerleri gallik asit konsantrasyonlarına karşı bir grafiğe aktarılmış ve elde edilen verilere doğrusal regresyon analizi uygulanarak gallik asit standart eğrisi ve bu eğriyi tanımlayan eşitliğe ulaşılmıştır.

Örnekler için elde edilen absorbans değerleri gallik asit standart eğrisini tanımlayan regresyon eşitliğinde yerine konularak fenolik bileşik miktarı "gallik asit" cinsinden hesaplanmıştır. Bu değerler, uygulanan seyreltme oranları ile çarpılarak örneklerdeki toplam fenolik madde miktarı saptanmıştır. Örneklerdeki toplam fenolik bileşik miktarları "mg gallik asit/L" veya "mg gallik asit/kg" cinsinden ifade edilmiştir.

3.2.8.3 Kondense olabilen fenolik madde tayini

Tanner ve Brunner (1979) tarafından önerilen yönteme göre yapılmıştır. Bu yöntemde, düşük moleküllü monomerik kateşin ve löykoantosiyaninler tayin edilmektedir. Vanilin; kateşinler ve löykoantosiyaninlerin 6. ve 8. pozisyonlarındaki hidroksil gruplarıyla reaksiyona girerek kırmızı renk oluşturmaktadır. Oluşan kırmızı renk, spektrofotometrede 500 nm dalga boyunda şahide (damıtık su) karşı okunarak standart kurve yardımıyla kondense fenolik madde miktarı belirlenmektedir.

Deneye başlamadan önce, bulanık ve berrak siyah havuç suları 1:100 (v/v), bulanık ve berrak siyah havuç suyu konsantreleri ise 1:500 (w/v) oranında seyreltilerek ölçümlerin yapılacağı dalga boyunda abosorbans değerleri 0.2–0.6 arasına getirilmiştir. Seyreltmiş örnekten aşağıda verildiği şekilde, A, B ve C tüpü olmak üzere 3 tüp hazırlanmıştır. A tüpü, 2.0 mL seyreltmiş örnek ve 4.0 mL vanilin çözeltisi; B tüpü, 2.0 mL seyreltmiş örnek ve 4.0 mL sülfirik asit çözeltisi (%70, v/v) ve C tüpü ise, 2.0 mL damıtık su ve 4.0 mL vanilin çözeltisi (şahit tüpü) içermiştir. Tüp içeriklerinin sıcaklıklarının 35°C'yi aşmaması için, %70'lik H_2SO_4 çözeltisinin ile vanilin çözeltisinin eklenmesi sırasında tüpler, buzlu su banyosunda soğutulmuştur. Hazırlandıktan tam 15 dak. sonra, tüp içeriklerinin 500 nm'de damıtık suya karşı absorbansları okunmuştur.

Standart eğrinin hazırlanmasında, 25 mg kateşin 50 mL etil alkolde (absolü) çözündürülerek, 500 mg/L kateşin içeren kateşin stok çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra 100 mL'lik balonlara bu stok çözeltiden sıra ile 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 ve 5.0 mL çözelti aktarılmış ve balonlar damıtık su ile hacme tamamlanmıştır. Böylece sıra ile; 5, 10, 15, 20 ve 25 mg kateşin L^{-1} konsantrasyonlarda bir seri standart çözelti elde edilmiştir. Bu standart çözeltilerin her birinden doğrudan 2.0 mL alınarak yukarıda örnek için verildiği gibi A ve B tüpleri hazırlanmıştır. A tüpündeki standartlar için saptanan absorbans değerinden B ve C'ye (şahit) ait absorbanslar çıkarılarak bulunan absorbans değerleri, kateşin konsantrasyonlarına karşı bir grafiğe aktarılmış ve böylece sıfır noktasından geçen standart bir eğri elde edilmiştir.

Örnek kullanılarak yürütülen deneyde, A tüpüne ait absorbans değerinden aynı deneye ait B ve C tüplerinde okunmuş absorbans değerleri çıkarılarak, net absorbans değerleri bulunmuştur. Bu absorbans değerleri standart eğri için hesaplanan doğrusal regresyon denkleminde yerine konularak, seyreltilmiş örnekteki kondense olabilir fenolik bileşiklerin miktarı hesaplanmıştır. Uygulanmış seyreltme oranları dikkate alınarak, gerçek örnekteki kondense olabilir fenolik bileşiklerin miktarı "mg kateşin/L" veya "mg kateşin/kg" birimiyle belirlenmiştir.

3.2.8.4 Antioksidan aktivite tayini

Bu amaçla, Miller ve Rice-Evans (1997) ile Arts vd. (2001) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemin ayrıntıları Kırca ve Özkan (2010) tarafından verilmiştir. Bu yöntem, $ABTS^{\bullet+}$ (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)) radikal katyonu tarafından tutulan antioksidatif maddelerin miktarının, sentetik bir antioksidan olan Troloks'un (suda çözünen E vitamini analoğu) standart miktarlarıyla kıyaslanarak bağıl ölçümünü sağlamaktadır. Ölçümler, mavi/yeşil renkli stabil bir bileşik olan $ABTS^{\bullet+}$ radikalinin kayboluşunun spektrofotometrik olarak belirlenmesiyle yapılmıştır. Mavi/yeşil $ABTS^{\bullet+}$ kromoforu oluşturmak için ABTS ve potasyum persülfat arasında gerçekleşen reaksiyondan yararlanılmıştır.

Antioksidan aktivite tayini analizlerinde öncelikle 2.45 m*M* potasyum persülfat içeren 7 m*M*'lık ABTS çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti, 20°C'ye ayarlı sıcaklık kontrollü bir inkübatörde (Sanyo MIR 253, Gunma, Japonya) 12–16 h arasında bekletilerek, $ABTS^{\bullet+}$ radikalinin oluşması sağlanmıştır. Bunun dışında; radikal çözeltisinin, örneklerin ve troloks standardının seyreltilmesinde kullanılacak olan PBS (phosphate buffer saline) çözeltisi hazırlanmıştır. Bu amaçla, hazırlanan 0.1 *M* fosfat tamponu üzerine 8.77 g NaCl eklenerek 1 L'ye damıtık suyla tamamlanmış ve pH'sı 7.4'e ayarlanmış PBS çözeltisi elde edilmiştir. Ayarlama işlemleri NaOH ya da HCl ile yapılmıştır.

Siyah havuç suyu ve konsantreleri yüksek antioksidan aktivite gösterdiğinden, örnekler analizden önce seyreltilmişlerdir. Bu amaçla 1 mL siyah havuç suyu alınarak 100 mL

hacme PBS ile tamamlanmıştır. Siyah havuç suyu konsantreleri ise, kavanoz içeriği karıştırılmadan yüzeye yakın kısımdan yaklaşık 1 g örnek alınarak, 500 mL hacme PBS ile seyreltilmiştir. Örneklerin absorbans değerleri, örnek ve şahidin (PBS) aynı anda konulabildiği çift huzmeli (double beam) spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir. Küvetlerin bulunduğu bölümün sıcaklığı sirkülasyonlu su banyosu (PolyScience 9106, Niles, IL, A.B.D.) ile 30°C'de sabit tutulmuştur. Absorbans ölçümleri 734 nm'de 1.5 mL hacimde 1 cm tabaka kalınlığındaki tek kullanımlık küvetlerde (Brand Gmbh, Postfach, Wertheim, Almanya) yapılmıştır.

Analize başlamadan önce $ABTS^{\bullet+}$ radikal çözeltisinden 1 mL alınarak 734 nm'de absorbans değeri 0.70±0.02 olacak şekilde yaklaşık 90–100 mL PBS ile seyreltilmiştir. Seyreltilmiş $ABTS^{\bullet+}$ radikal çözeltisinden 1 mL küvete alınmış, PBS çözeltisine karşı okuma yapmak üzere spektrofotometreye yerleştirilmiş ve başlangıç absorbans değeri belirlenmiştir. Daha sonra küvet içeriği 1 mL olacak şekilde, küvete eklenen 990 µL radikal çözeltisi üzerine örnekten 10 µL eklenir eklenmez kronometre çalıştırılmıştır. 6 dak. boyunca, her bir dakikada absorbans ölçümü yapılarak sonuçlar kaydedilmiştir. Siyah havuç suyu örneklerinde bulunan antioksidan bileşikler, radikal çözeltisinin rengini gittikçe açarak 6 dak.'lık süreçte absorbans değerleri zamana bağlı olarak düşmüştür. 6. dak. sonunda saptanmış olan absorbans değeri esas alınarak, başlangıç değerine göre yüzde azalma oranı (inhibisyon oranı) hesaplanmıştır.

$$\text{İnhibisyon oranı (\%)} = \frac{\text{Başlangıç absorbans değeri} - \text{Son absorbans değeri}}{\text{Başlangıç absorbans değeri}} (100)$$

10 µL örnek alınarak yapılan bu işlemler en az 3 kez tekrarlanmış ve inhibisyon oranları hesaplanarak bunların ortalaması alınmıştır. Daha sonra, örnek hacmi değiştirilerek 20, 30 ve 40 µL hacimlerde aynı işlemler tekrarlanmıştır. Her defasında küvet içeriği 1 mL olacak şekilde farklı miktarlarda radikal çözeltisi eklenmiştir. 20, 30 ve 40 µL örnek hacimlerine karşı, sırasıyla 980, 970 ve 960 µL radikal çözeltisi eklenmiştir. Elde edilen ortalama yüzde inhibisyon değerleri örnek hacimlerine (10, 20, 30 ve 40 µL) karşı bir grafiğe aktarılmış ve bu verilere doğrusal regresyon analizi uygulanarak örneğe ilişkin eğriye ve bu eğriyi tanımlayan eşitliğe ulaşılmıştır.

Analize başlamadan önce 2.5 m*M* troloks stok çözeltisinden 10 mL'lik 4 ölçü balonuna sırasıyla 2, 4, 6 ve 8 mL alınıp balonlar PBS çözeltisi ile hacme tamamlanarak, standart çözeltiler elde edilmiştir. Bu standart çözeltilerden 10 µL alınıp, mikro küvet içerisindeki 990 µL radikal çözeltisine eklediğinde mikro küvet içerisinde sırasıyla 5, 10, 15 ve 20 µM konsantrasyonlarda troloks olması sağlanmıştır. Örneklere uygulanan spektrofotometrik uygulamalar troloks standartlarına da uygulanmış, ortalama inhibisyon değerleri hesaplanarak troloks konsantrasyonuna karşı grafiğe işlenmiştir. Elde edilen verilere doğrusal regresyon analizi uygulanmak suretiyle, troloks standart eğrisine ve bu eğriyi tanımlayan eşitliğe ulaşılmıştır.

Sonuçlar TEAC ("trolox equivalent antioxidant capacity;" troloks eşdeğer antioksidan aktivite) değeri olarak ifade edilmiştir. Bu değer, örneğe ait yüzde inhibisyon eğrisinin eğiminin, troloks standart eğrisinin eğimine oranlanmasıyla elde edilmiştir. Elde edilen eğim değeri, seyreltme faktörü ile de çarpılarak örneklerin antioksidan aktivitesi belirlenmiştir.

3.2.8.5 Fenolik kompozisyonunun belirlenmesi

Siyah havuç suyu ve konsantrelerinde fenolik kompozisyonu, HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografi) ve HPLC-DAD-MS (kütle spektroskopisi) yöntemleri ile belirlenmiştir.

3.2.8.5.1 HPLC yöntemi

HPLC yöntemi üç aşamadan (ekstraksiyon, saflaştırma ve hesaplama) oluşan bir uygulama olup, bu aşamalar aşağıda açıklanmıştır.

Ekstraksiyon

Bu amaçla, Lee ve Wrolstad (2004) tarafından ortaya konulan yöntem izlenmiş, ancak örnek hazırlama aşamasında tarafımızdan bazı değişiklikler yapılmıştır. Siyah havuç suyundan 2 mL ekstraksiyon işleminin yapılacağı plastik bir tüpe alınarak, 10 mL

%100'lük aseton ile birlikte 1 dak. tüp karıştırıcıda (CAT, VM2, Staufen, Almanya) çalkalanmıştır. Siyah havuç suyu konsantre örneklerinde ise, 4 g konsantre 25 mL'lik bir ölçü balonuna tartılmış ve balon damıtık su ile hacmine tamamlanmıştır. Bu kitleden 2 mL alınıp, 10 mL %100'lük aseton ilave edildikten sonra 1 dak. tüp karıştırıcıda karıştırılmıştır. Her iki şekilde elde edilmiş homojenizata aşağıdaki işlemler uygulanmıştır.

Homojen sıvı, Buchner hunisinden Whatman 1 No'lu filtre kağıdından vakum uygulanmaksızın filtre edilmiştir. Ekstraksiyon işlemlerinin gerçekleştirildiği plastik tüpün çeperlerine yapışan kitledeki fenolikleri de ekstrakte etmek için; tüp, 10 mL %70'lik aseton (aseton: damıtık su, 70:30, v/v) ile tüp karıştırıcıda 1 dak. süreyle karıştırılmıştır. Aynı işlem, 10 mL %70'lik aseton ve 10 mL %50'lik aseton (aseton: damıtık su, 50:50, v/v) ile tekrarlanmıştır. Yıkantılar, Buchner hunisine aktarılmış ve vakum uygulanmadan filtre edilmiştir. Son olarak filtre kağıdı üzerinde oluşmuş filtre kekini tamamen renksiz kılmak için; 10 mL %50'lik aseton ile bir kez daha yıkanmıştır. Tüm yıkama işlemi boyunca, başlangıçta vakum pompası çalıştırılmadan, filtre keki yukarıda verilen hacim ve konsantrasyondaki aseton içinde bir süre bekletilmiş ve en son eklenen 10 mL %50'lik aseton ile yıkama sonunda vakum uygulanarak filtre edilmiştir. Filtrat bir ayırma hunisinde bulunan 120 mL kloroform üzerine aktarılmış ve böylece aseton: kloroform oranı, 1:2 (v/v) düzeyine erişmiştir. Emzikli erlenmayerdeki ekstraktın tümünün kayıpsız olarak alınması için erlenmayer 3–5 mL %70'lik aseton ile yıkanmış ve yıkantı kloroformun üzerine aktarılmıştır. Ayırma hunisi dairesel hareketlerle hafifçe karıştırılmış, +4ºC'de bir gece bekletilerek faz ayrımı sağlanmıştır.

Bu ayrım sağlandıktan sonra, altta bulunan kloroform fazı dikkatle uzaklaştırılmış ve antosiyaninleri ve diğer polifenolleri içeren üstteki renkli faz, ayırma hunisinin çeperleri 3–5 mL %70'lik asetonla yıkanarak kayıpsız bir şekilde bir rotary evaporatör balonuna alınmıştır. Renkli fazdaki aseton ve az miktardaki kloroform, 40ºC'de rotary evaporatörde vakum altında uzaklaştırılmıştır. Kalan sulu ekstrakt, asitlendirilmiş su (%0.01 HCl içeren) ile 10 mL'lik ölçü balonuna yıkanarak hacmine tamamlanmıştır. Balondaki çözelti 0.45 µm gözenek çaplı PVDF (polyvinylidene fluoride) filtreden (Millipore, Bedford, MA, A.B.D.) filtre edilmiş ve böylece bundan sonra yapılacak

saflaştırma işleminin etkinliği artırılmıştır. Işığın bileşenler üzerindeki olumsuz etkisini azaltmak için, ekstraktlar amber renkli şişelere aktarılmıştır.

Saflaştırma

Elde edilen ekstrakttan; şeker ve organik asit gibi unsurların uzaklaştırılması amacıyla saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Bu amaçla Skrede vd. (2000) tarafından önerilen yöntem uygulanmıştır. Saflaştırma işleminin ilk aşamasında C-18 Sep-Pak kolonlarındaki dolgu maddesinin (sorbentin, 200 mg) polifenollerle reaksiyona girebilmesini sağlamak için şartlandırılma (conditioning) işlemi yapılmıştır. Bu işlemde kolondan sırasıyla; 5 mL etil asetat, 5 mL %0.01 HCl içerecek şekilde asitlendirilmiş metanol ve son olarak da 2 mL %0.01 HCl içerecek şekilde asitlendirilmiş su geçirilmiştir. Ekstraksiyona hazır hale getirilen kolona, saflaştırılacak bileşeni içeren 1 mL ekstrakt yüklenmiş ve daha sonra 2 mL asitlendirilmiş suyla elüe edilmiştir. Böylece bu elüsyon ile organik asitler, şekerler ve suda çözünür nitelikteki diğer bileşikler gibi analizi interfere eden bileşikler uzaklaştırılırken, antosiyaninler ve diğer polifenolik bileşikler kolon üzerinde sorbente bağlanmıştır. Eşdüze bir saflaştırma işlemi için saflaştırma düzeneğinden (manifold) (Waters, Milford, MA, A.B.D.) yararlanılmıştır. C-18 Sep-Pak kolonu, 3 dak. süresince N_2 gazı akımında tutularak kalıntının kuruması sağlanmıştır.

Daha sonra kurutulmuş kolon, 5 mL etil asetat ile yıkanarak fenolik bileşikleri içeren ekstrakt elde edilmiştir. Fenolikleri içeren bu ekstrakt bir evaporasyon tüpüne alınmış ve 35º±0.1°C'deki su banyosuna (Memmert WB 14, Schwabach, Almanya) yerleştirilerek, etil asetat, N_2 gazı altında uzaklaştırılmıştır. Daha sonra evaporasyon tüpündeki kalıntı üzerine 2 mL asitlendirilmiş su eklenerek çözündürülmüştür. Fenolikleri içeren bu çözelti 0.45 μm gözenek çaplı PVDF filtreden filtre edilerek, HPLC'nin oto-örnekleme (auto-sampler) ünitesinde kullanılan amber renkli 2 mL'lik cam şişelere (vial) alınmış ve bekletilmeden HPLC'ye enjekte edilmiştir.

Hesaplama

Fenoliklerin miktarlarının hesaplanmasında "yüksek performanslı sıvı kromatografi" cihazından (HPLC, Agilent 1200 serisi, Waldbronn, Almanya) yararlanılmıştır. Kullanılan HPLC sistemi; ikili (binary) pompa, foto diyoderey dedektörü (PDA, photo dioderay dedector), +4°C'ye inebilen soğutma sistemine sahip oto-örnekleyici (auto-sampler), gaz giderici (degasser) ve kolon fırınından (thermostatted column compartment) oluşmaktadır. Elde edilen kromatogramlar "ChemStation rev.B.02.01" yazılım programı ile değerlendirilmiştir.

Kromatografi koşulları

- **Kolon**: Ters faz (reverse phase) C_{18} kolonu (250 x 4.6 mm, 5 µm) (Phenomenex, Los Angeles, CA, A.B.D.)
- **Koruyucu kolon**: C_{18} koruyucu kolonu (4 x 3 mm, 5 µm) (Phenomenex, Los Angeles, CA, A.B.D.)
- **Akış hızı**: 1 mL dak.$^{-1}$
- **Elüsyon süresi**: 70 dak.
- **Enjeksiyon hacmi**: 20 µL
- **Dalga boyu**: 320 nm
- **Hareketli faz (mobile phase)** : Asetonitril (%100) (A) ile %1 formik asit (B) karışımı. Gradiyent akış söz konusu olup, Chaovanalikit ve Wrolstad (2004) tarafından önerilen elüsyon profili tarafımızdan modifiye edilerek uygulanmıştır (Çizelge 3.1).

3.2.8.5.2 Kütle spektroskopisi (HPLC-DAD-MS) yöntemi

HPLC yöntemiyle; siyah havuç suyu konsantresinin fenolik kompozisyonunun 3 temel fenolikten oluştuğu saptanmıştır. Bu fenoliklerin birinin tanımlanmasında HPLC-DAD sistemi kullanılmıştır. Örnekteki baskın pikin HPLC-DAD yöntemi ile tanımlanması dışında, bu pikin bir kez daha doğrulanması amacıyla, "yüksek basınçlı sıvı

kromatografisi-diyoderay dedektör-kütle spektroskopisi" (**H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography-**D**iode**A**rray**D**edector-**M**ass **S**pectroscopy; **HPLC-DAD-MS**) yöntemi uygulanmıştır.

Çizelge 3.1 HPLC ile fenolikler için uygulanan elüsyon profili

Süre (dak)	%A	%B
0	5	95
50	25	75
55	50	50
60	50	50
65	5	95
70	5	95

Bu çalışmada kullanılan HPLC-DAD-MS cihazındaki HPLC-DAD kısmı fenoliklerin belirlenmesinde kullanılan HPLC-DAD cihazı ile aynı konfigürasyona sahiptir. Fenoliklerin tanımlanmasında, Agilent Technologies tarafından üretilen ve Agilent 1200 serisi HPLC sistemine uyumlu "VL" modeli kütle spektroskopisi (Waldbronn, Almanya) kullanılmıştır. Bu analizde kullanılan sistemde, multimode (MM) iyonizasyon sistemi bulunmakta ve bu sistem de ESI (elektron spray ionization) ile APCI (atmospheric pressure chemical ionization) iyonlaştırma yöntemlerini içermektedir. Daha ılımlı bir iyonizasyon tekniği olması nedeniyle, fenoliklerin tanımlanmasında ESI iyonizasyon sitemi kullanılmıştır (Giusti vd. 1999). Kurutucu gaz olarak, bir jeneratörde üretilen azot gazından yararlanılmıştır.

HPLC-DAD-MS kromotografi koşulları

- *MS koşulları*
  - **Mode**: Scan
  - **Polarite**: Pozitif
  - **İyonizasyon**: MM-ES

- **Kütle aralığı**: 100-500
- **Fragmentor**: 50

➢ *İyonizasyon (Method Spray Chamber) Koşulları*

- **Method Spray Chamber:** MM+ES+APCI
- **Azot gazı akış hızı:** 5 L dak.$^{-1}$
- **Püskürtücü (Nebulizer) basıncı:** 60 psig
- **Azot gazı sıcaklığı**: 250°C
- **Buharlaşma sıcaklığı:** : 250°C
- **Kapiler voltaj**: 2000 V
- **Yük (Charging) voltajı**: 2000 V

➢ *HPLC koşulları*

- **Kolon**: Ters faz (reverse phase) C_{18} kolonu (250 x 4.6 mm, 5 µm) (Phenomenex, Los Angeles, CA, A.B.D.)
- **Koruyucu kolon**: C_{18} koruyucu kolonu (4 x 3 mm, 5 µm) (Phenomenex, Los Angeles, CA, A.B.D.)
- **Akış hızı** : 1 mL dak^{-1}
- **Elüsyon süresi** : 22 dak.
- **Enjeksiyon hacmi** : 10 µL olup, HPLC yöntemi için kullanılan siyah havuç ekstraktları kullanılmıştır.
- **Dalga boyu** : 280 nm
- **Hareketli faz (mobile phase)** : Asetonitril (%100) (A) ile formik asit (%1) (B).

Piklerin tanımlanmasında tek iyon modu (single ion mode, SIM) kullanılmıştır. Bu sistemde, siyah havuç suyundaki 3 pikten, baskın olan pikin, yani klorojenik asit için elde edilen pikin tanımlanmasında, Kammerer vd. (2004) tarafından daha önce

belirlenmiş olan kütle/yük oranı dikkate alınmıştır. Elde edilen kromotogramlar Agilent ChemStation programı ile değerlendirilmiştir.

Gradiyent akış söz konusu olup, elüsyon profili çizelge 3.2'de verilmiştir:

Çizelge 3.2 HPLC-DAD-MS ile fenolikler için uygulanan elüsyon profili

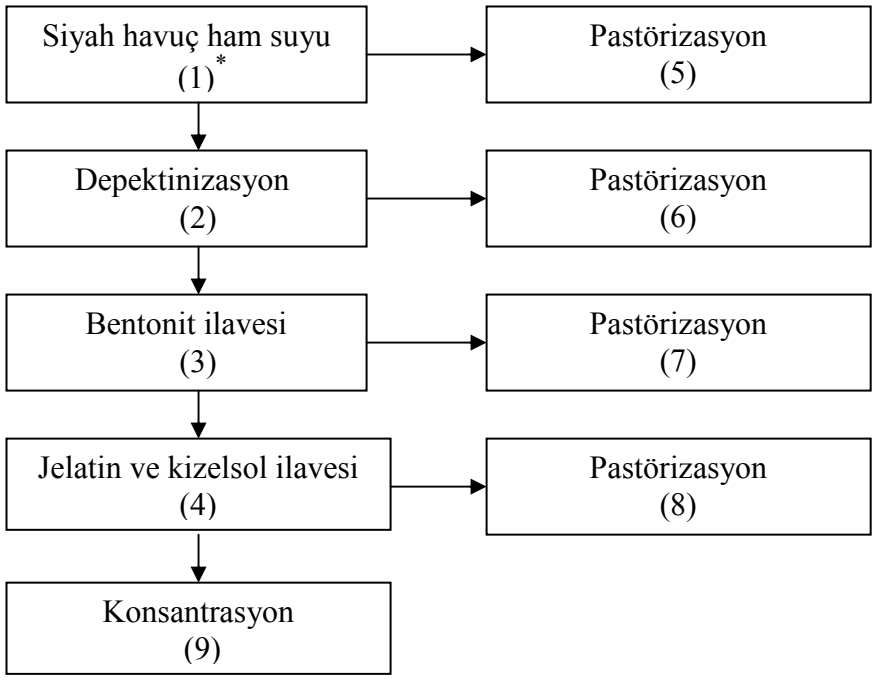
Süre (dak)	%A	%B
0	10	90
13	22	78
14	40	60
20	60	40
22	10	90

3.2.9 İstatistik değerlendirme

Siyah havuç suyu konsantrelerinin farklı sıcaklıklarda (5°C, 20°C ve 30°C) depolanması süresinin toplam fenolik madde miktarı için her depolama sıcaklığında elde edilen veriler iki tekerrürlü faktöriyel düzende varyans analiz tekniği kullanılarak değerlendirilmiştir. Varyans analizi sonucuna göre, gerekli olduğu durumda Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılarak faktörlerin hangi seviyeleri arasındaki farklılığın önemli olduğu araştırılmıştır. İstatistik analizler için "Minitab for Windows (ver. 15.1)" ve "MSTAT" paket programları kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Elde edilen siyah havuç ham suyuna, uygulanan işlemler ve örnek alma aşamaları şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Siyah havuç ham suyuna uygulanan durultma ve örnek alma aşamaları
*Örnek alma aşamaları

Şekil 4.1'de görüldüğü üzere, siyah havuç ham suyu pektolitik enzimler ile depektinize edilmiş ve daha sonra bentonit, jelatin ve kizelsol ilavesi ile berraklaştırılmıştır. Yani, siyah havuç ham suyuna, durultmanın; depektinizasyon ve berraklaştırma aşamalarının her ikisi de uygulanmıştır. Daha sonra her aşamada örnek alınmış ve alınan örneklerin bir kısmı pastörize edilmeden, bir kısmı ise pastörize edilerek analizlerde kullanılmıştır. Ayrıca, durultulmuş siyah havuç suyunun bir bölümü konsantre edilmiş ve elde edilen siyah havuç suyu konsantresi farklı sıcaklıklarda depolanmıştır.

4.1 Siyah Havuç Sularının Briks, pH, Titrasyon Asitliği ve Bulanıklılık (NTU) Değerleri Gibi Bazı Analitik Özellikleri Üzerine Durultma ve Pastörizasyonun Etkisi

Siyah havuç sularının farklı üretim aşamalarında briks, pH ve titrasyon asitliği gibi genel bileşime yönelik bazı nitelikler belirlenmiş ve sonuçlar çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Siyah havuç suyunun farklı üretim aşamalarındaki briks, pH ve titrasyon asitliği değerleri

Siyah havuç suyu	Briks	pH	Titrasyon asitliği* (mg/100 mL)	Bulanıklık (NTU)
Pastörize edilmemiş				
Siyah havuç ham suyu (1)	11.02	4.35	0.57	510
Depektinize edilmiş (2)	11.62	4.43	0.65	13
Depektinize edilmiş ve bentonit uygulanmış (3)	11.54	4.40	0.47	21
Durultulmuş (bentonit, jelatin ve kizelsol) (4)	11.29	4.45	0.54	4
Pastörize edilmiş				
Siyah havuç ham suyu (5)	11.06	4.37	0.60	2827
Depektinize edilmiş (6)	11.67	4.46	0.69	349
Depektinize edilmiş ve bentonit uygulanmış (7)	11.60	4.38	0.51	253
Durultulmuş (bentonit, jelatin ve kizelsol) (8)	11.29	4.46	0.49	34

* : Susuz sitrik asit cinsinden

Çizelge 4.1'de görüldüğü üzere, depektinizasyon aşamasından sonra siyah havuç suyunun; briks, pH ve titrasyon asitliği değerleri artmıştır. Bilindiği gibi, depektinizasyon amacıyla siyah havuç ham suyuna ilave edilen pektolitik enzimler hücreleri birbirine bağlayan pektini parçalayarak galakturonik asit ünitelerinin açığa çıkmasına neden olmaktadır. Serbest hale geçen galakturonik asidin ise, siyah havuç sularında gerek briks gerekse de titrasyon asitliğinin artmasına neden olduğu sanılmaktadır. Bayındırlı vd. (1994), nar suyuna jelatin uygulanarak yapılan

durultmanın suda çözünür kuru madde değerlerinde azalmaya yol açtığını belirtmektedirler.

Bulanıklılık değerlerinde ise, beklenildiği gibi durultmayla beraber önemli düzeyde azalış saptanmıştır. Pastörize edilmiş örneklerde de aynı durum söz konusudur. Aynı zamanda örnekler pastörize edildiği zamanda bulanıklılık değerleri artmıştır. Bunun sebebinin ise, hücre duvarının sıcaklığın etkisiyle parçalanarak bazı fenoliklerin ve bulanıklılık yapan unsurların açığa çıkmasından dolayı olduğu sanılmaktadır.

4.2 Siyah Havuç Ham Suyunun Durultulması

4.2.1 Siyah havuç suyunun depektinizasyonu

Paketli preste preslenerek elde edilen bulanık siyah havuç suyuna önce durultma işleminin ilk aşaması olan depektinizasyon işlemi uygulanmış ve bu amaçla ticari enzim preparatı kullanılmıştır. Her bir depektinizasyon denemesinde 250 mL siyah havuç suyu kullanılmıştır. "3.2.2 Siyah havuç ham suyunun depektinizasyonu" başlığı altında belirtildiği gibi depektinizasyon işleminden önce siyah havuç suyunun sıcaklığı 50°C'ye getirilmiştir. Depektinizasyon amacıyla; siyah havuç sularına 0.25 g, 0.50 g ve 1.0 ml/100 mL miktarlarında 3 ayrı dozda pektolitik enzim içeren çözelti eklenmiş ve +50°C'de 2 h süreyle bekletilmiştir. Daha sonra örnekler kaba filtrasyona tabi tutulmuş ve türbidimetrede NTU değerleri belirlenmiştir. Daha sonra alkol testi ile depektinizasyon işleminin tamamlanıp tamamlanmadığı izlenmeye çalışılmıştır. Ancak; tortu oluşumu kontrol örneklerinde bile, yoğun renk nedeniyle izlenememiştir. Bu nedenle, örnekler kaba filtrasyona tabi tutulmuş ve bulanıklık düzeyleri türbidimetrede ile ölçülmüştür. Bu denemelere ilişkin sonuçlar çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2'de verilen deney sonuçlarına göre, en düşük NTU değerine; yani, maksimum berraklık düzeyine 100 mL'ye 0.5 mL enzim preparatı uygulamasıyla ulaşılmıştır. Bu enzim dozajı dikkate alınarak, gerekli enzim eklenmiş, tüm siyah havuç suyu kitlesi 50°C'de 2 h süreyle bekletilerek depektinize edilmiştir.

Çizelge 4.2 Siyah havuç suyuna uygulanan depektinizasyon deneme sonuçları

Dozaj (mL/100 mL)	NTU
0.25	3.83
0.50	2.35
1	3.15

4.2.2 Siyah havuç suyunun durultulması

Yukarıda anlatıldığı gibi, depektinize edilen siyah havuç suyunda bentonit, jelatin ve kizelsol için uygun dozajı saptama deneyleri yapılmıştır. "3.2.3 Siyah havuç suyunun durultulması" başlığı altında belirtildiği gibi durultma, 50°C'deki siyah havuç suyuna uygulanmıştır. Bu amaçla, önce uygun bentonit dozajı saptanmıştır. Depektinize edilmiş siyah havuç suyuna %10 (w/v) konsantrasyonda hazırlanan bentonit çözeltisinden farklı miktarlarda eklendikten sonra 50°C'de 30 dak bekletilmiştir. Bentonit denemelerine ilişkin sonuçlar çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3 Siyah havuç suyuna (250 mL) uygulanan bentonit deneme sonuçları

Bentonit (mL; %10, w/v)	NTU
0.5	2.67
1.0	2.62
1.5	3.04
2.0	1.85
2.5	1.75*

*Bu denemede yapılan ölçüm sırasında çok fazla salınım gözlenmiş ve bu nedenle bu deneme değerlendirmeye alınmamıştır.

Bu denemelerden alınan sonuçlara göre, maksimum berraklığa 250 mL depektinize edilmiş siyah havuç suyuna 2 mL bentonit eklenerek ulaşıldığı saptanmıştır. Daha sonra sıcaklığı +4°C'ye getirilen depektinize edilmiş ve bentonit uygulanmış siyah havuç suyuna %1'lik (w/v) jelatin çözeltisinden ve %15'lik (v/v) kizelsol çözeltisinden farklı

miktarlarda eklenerek, jelatin ve kizelsol için dozaj deneyleri yapılmıştır. Jelatin ve kizelsol denemelerine ilişkin sonuçlar çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4 Siyah havuç suyuna (150 mL) uygulanan jelatin ve kizelsol deneme sonuçları

Jelatin (mL; %1, w/v)	Kizelsol (mL; %15, v/v)	NTU
1.5	0.4	5.05
1.5	0.8	3.37
1.5	1.2	2.34
2.25	0.4	3.97
2.25	0.8	2.84
2.25	1.2	1.97
3.0	0.4	1.97
3.0	0.8	2.60
3.0	1.2	1.83

Çizelge 4.4'de verilen sonuçlar dikkate alınarak kizelsol dozajını belirlemek için bir deneme daha yapılmıştır. Bu amaçla, 200 mL siyah havuç ham suyuna 1 mL pektolitik enzim eklenerek depektinize edilmiş ve depektinize edilen siyah havuç suyuna 1.64 mL bentonit (%10) ve 3 mL jelatin (%1) eklenmiş ve son olarak da %15'lik (w/v) kizelsol çözeltisinden farklı miktarlarda eklenerek, kizelsol için dozaj deneyleri yapılmıştır. Bu sonuçlar çizelge 4.5'de verilmiştir.

Bu denemelerden alınan sonuçlara göre, maksimum berraklığa 200 mL depektinize edilmiş ve bentonit uygulanmış siyah havuç suyuna 3 mL jelatin (%1) ve 0.53 mL kizelsol (%15) eklenerek ulaşıldığı saptanmıştır.

Çizelge 4.5 Siyah havuç suyuna (200 mL) uygulanan kizelsol deneme sonuçları

Kizelsol (mL; %15, w/v)	NTU
0.27	2.33
0.53	1.82
0.80	2.16
1.06	1.93
1.33	2.84

4.3 Siyah Havuç Suyu ve Konsantrelerinin Fenolik Madde İçerikleri ile Antioksidan Aktivite Düzeylerinin Belirlenmesinde Kullanılan Standart Eğriler

Siyah havuç suyu ve konsantrelerinde HPLC yöntemiyle fenolik miktarının tayininde yapılacak hesaplamalar için gerekli olan klorojenik asit standart eğrisi, spektrofotometrik yöntemle toplam fenolik madde miktarlarının tayininde yapılacak hesaplamalar için gerekli olan gallik asit standart eğrisi ile spektrofotometrik yöntemle antioksidan aktivite tayininde gerekli olan troloks standart eğrisi hazırlanmış ve bu eğriler sırasıyla şekil 4.2-4.4'de verilmiştir.

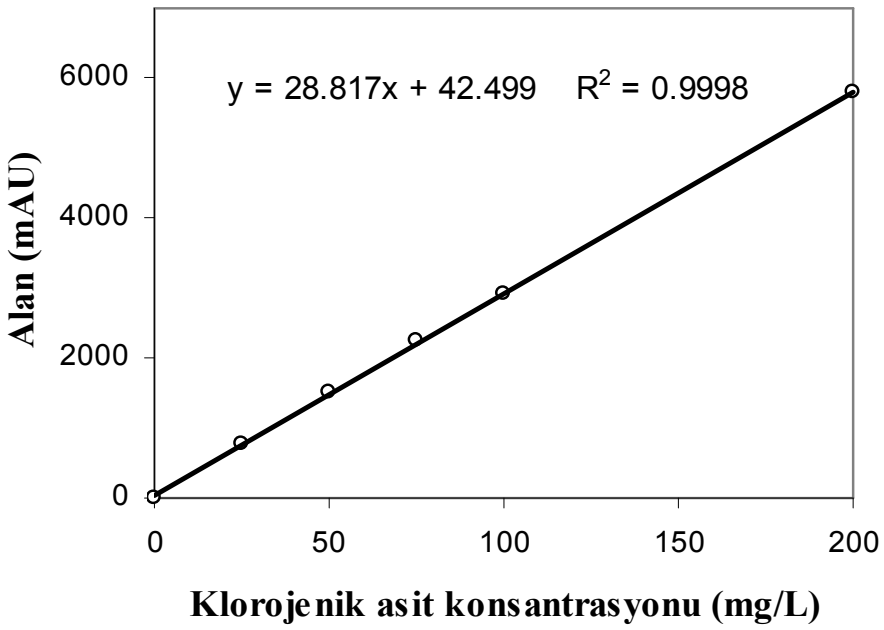
Standart eğrilerin oluşturulmasında analizlerde elde edilen verilere doğrusal regresyon analizi uygulanmış ve bu eğrileri tanımlayan eşitlikler belirlenmiştir. Bu eşitlik yardımıyla siyah havuç suyu ve konsantrelerinde bulunan başat pik olan klorojenik asit miktarı, toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivite düzeyi hesaplanmıştır.

4.4 Siyah Havuç Sularının Toplam Fenolik Madde İçerikleri Üzerine Durultma ve Pastörizasyon İşlemlerinin Etkisi

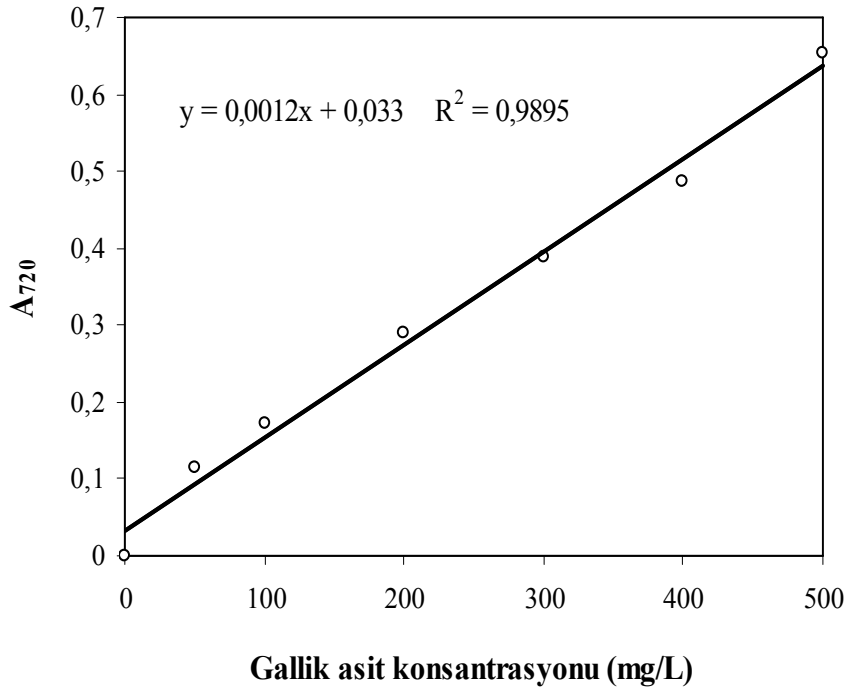
Durultmanın fenolik maddeler üzerine etkisini saptamak üzere, siyah havuç sularında toplam fenolik madde miktarları, durultma işleminden önce ve durultma işleminin tüm aşamalarında ("depektinizasyondan sonra," "bentonit uygulamasından sonra" ve "bentonit + jelatin + kizelsol uygulamasından sonra") belirlenmiştir. Ayrıca durultma işleminden önce ve durultma aşamalarında alınan siyah havuç suyu örneklerinin toplam

fenolik miktarları; pastörizasyon işleminden önce ve sonra belirlenerek, pastörizasyon işleminin fenolikler üzerine etkisi de ortaya konulmuştur. Siyah havuç sularında, yukarıda belirtilen aşamalarda yapılan, toplam fenolik madde miktarı analizlerine ilişkin deney sonuçları çizelge 4.6'da verilmiştir.

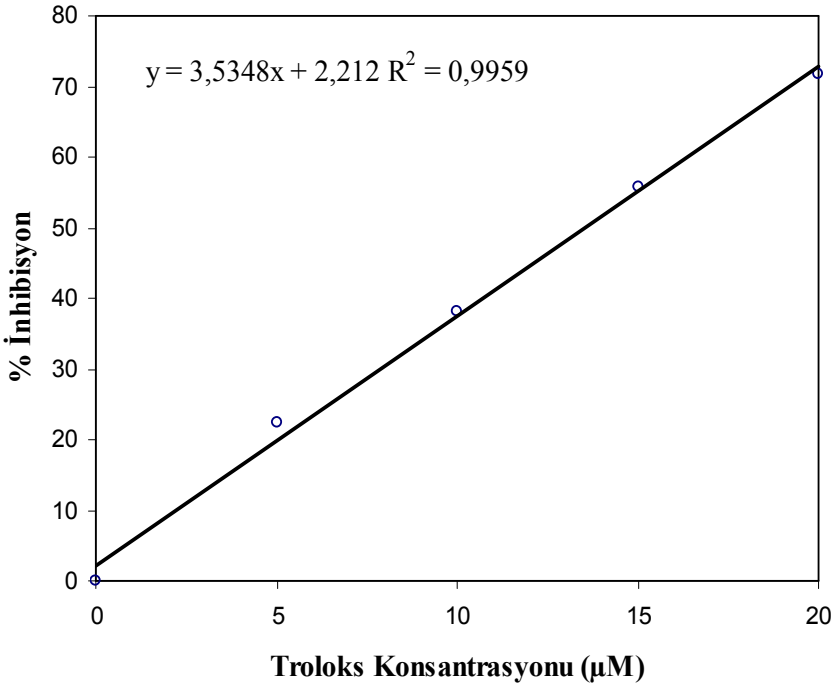
Çizelge 4.6'da görüldüğü gibi, depektinize edilmemiş siyah havuç ham sularında gallik asit cinsinden 3037 mg/L toplam fenolik madde saptanırken, depektinize edilmiş siyah havuç sularında ise 3447 mg/L düzeyinde toplam fenolik madde saptanmıştır. Depektinizasyon işleminden sonra toplam fenolik madde miktarında %13 artış saptanmıştır. "**4.1 Siyah Havuç Sularının Bazı Analitik Özellikleri Üzerine Durultma ve Pastörizasyon İşlemlerinin Etkisi"** bölümünde de ifade edildiği gibi, depektinizasyon aşamasında siyah havuç suyuna pektolitik enzimler ilave edilmekte olup, bu enzim; bitkisel dokularda hücreleri birbirine bağlayan pektini parçalayarak, hücre içinde bulunan fenolik maddeler gibi bileşenlerin açığa çıkmasını sağlamaktadır. Depektinizasyon işlemi sonunda fenolik madde miktarında gözlenen bu artışın, pektinin parçalanması sonucu fenoliklerin serbest kalmasından kaynaklandığı sanılmaktadır. Benzer şekilde, pektolitik enzimlerin; erik suyunda (Chang vd. 1994), Frenk üzümü (black currant) suyunda (Mikkelsen ve Poll 2002) ve böğürtlen (blackberry) suyu ve şarabında (Rommel vd. 1992) başta toplam fenolik madde olmak üzere, suda çözünür kuru madde, titrasyon asitliği ve antosiyanin miktarlarında önemli düzeyde artışa neden olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.2 Klorojenik asit standart eğrisi



Şekil 4.3 Gallik asit standart eğrisi



Şekil 4.4 Troloks standart eğrisi

Çizelge 4.6 Siyah havuç suyunun farklı üretim aşamalarındaki toplam fenolik madde miktarları

Siyah havuç suyu	Toplam fenolik madde miktarı* (mg gallik asit/L)
Pastörize edilmemiş	
Siyah havuç ham suyu (1)	3037
Depektinize edilmiş (2)	3447
Depektinize edilmiş ve bentonit uygulanmış (3)	3107
Durultulmuş (bentonit, jelatin ve kizelsol) (4)	2327
Pastörize edilmiş	
Siyah havuç ham suyu (5)	3237
Depektinize edilmiş (6)	3767
Depektinize edilmiş ve bentonit uygulanmış (7)	3162
Durultulmuş (bentonit, jelatin ve kizelsol) (8)	2257

Daha sonraki durultma aşamalarında ise, beklenildiği gibi fenolik maddelerde bir azalış saptanmıştır. Depektinize edilmiş siyah havuç suyuna bentonit eklenmesi sonucunda, fenolik maddede yaklaşık %10'luk bir azalış saptanmıştır. Aynı şekilde durultma işleminin son aşamasında depektinize edilmiş ve bentonit ilave edilmiş siyah havuç suyuna "jelatin + kizelsol" ilave edildiğinde fenolik madde miktarında, depektinize edilmiş ve bentonit ilave edilmiş siyah havuç suyuna göre yaklaşık %28'lik bir azalış saptanmıştır.

Bilindiği üzere; jelatin, meyve sularının pH sınırlarında (pH 3–4.5) pozitif yük kazanarak, kizelsolla agregasyona girmekte, yani flok oluşturmaktadır. Bu floklar çökelirken, fenolikler ile diğer bulanıklık yapan unsurları da beraberinde aşağı doğru sürüklemekte ve böylece durultma işlemi gerçekleşmektedir (Cemeroğlu ve Karadeniz 2009). Bu nedenle, jelatinle yapılan durultma işlemi sonundaki fenolik kaybının, bir kısım antosiyaninlerin jelatin ile kizelsol arasında oluşan flokla birlikte siyah havuç suyundan uzaklaşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışmamızda ulaşılan sonuçlar, durultma işleminin siyah havuç suyu fenolikleri üzerine önemli etkisinin olduğunu göstermiştir.

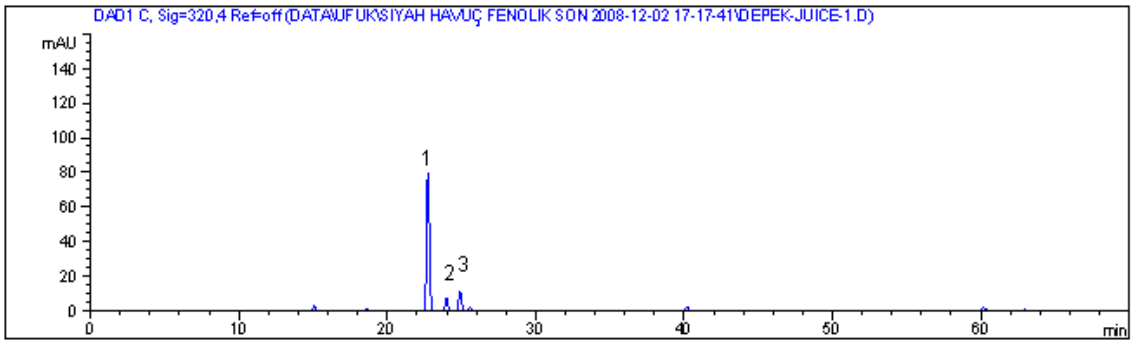
Literatürde, siyah havuç suyu fenolikleri üzerine durultmanın etkisinin incelendiği sadece bir çalışmaya rastlanmıştır (Kırca 2004). Bu çalışmada, fenolik maddeler üzerine durultmanın etkisi dolaylı olarak incelenmiş, durultmanın fenolik maddelerin bir alt grubu olan antosiyaninler üzerine etkisi saptanmıştır. Benzer şekilde, bu çalışmada da siyah havuç suyu sıcak durultma tekniği ile durultulmuş, durultmada "bentonit + jelatin + kizelsol" kullanılmıştır. Bu şekilde yapılan durultma sonunda, siyah havuç suyunda bulunan antosiyaninlerde, %3.1 kayıp saptanmıştır. Literatürde, durultmada kullanılan durultma yardımcı maddelerinin meyve sularında toplam fenolik madde miktarını azalttığını ortaya koyan çalışmalara rastlanmıştır. Cemeroğlu (1977) tarafından yürütülen çalışmada, jelatinle yapılan soğukta (+4^{o}C) durultma sonunda nar sularının fenolik madde içeriğinde %33–42 düzeyinde bir azalma saptanmıştır. Benzer şekilde, labaratuvarımızda yapılan bir çalışmada da, jelatinle durultma sonunda nar sularının

toplam fenolik madde miktarında %25–28 oranında bir azalma olduğu ortaya konmuştur (Apaydın 2008).

Durultmanın fenolik maddeler üzerine olumsuz etkilerine karşın, pastörize edilen örneklerin fenolik madde içeriklerinde bir miktar artış saptanmıştır. "**4.1 Siyah Havuç Sularının Bazı Analitik Özellikleri Üzerine Durultma ve Pastörizasyon İşlemlerinin Etkisi"** bölümünde de ifade edildiği gibi bunun nedeninin, hücre duvarının sıcaklığın etkisiyle parçalanarak, hücre duvarındaki bileşiklere bağlı olarak bulunan fenolik maddelerin serbest hale geçmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Siyah havuç sularının fenolik madde kompozisyonu, HPLC yöntemi ile ortaya konulmuş (Şekil 4.5) ve elde edilen fenolik dağılımını gösteren kromatogramda 3 pik belirlenmiştir. Bu 3 pikten, sadece siyah havuç suyunun başat fenolik maddesi olan klorojenik asit tanımlanabilmiştir. Diğer iki pik ise, tanımlanamamıştır. Bu piklerin tanımlanabilmesi için; klorojenik asit, kafeik asit, rutin, kuersetin ve kamferol standartlarından elde edilen kromatogramlardaki piklerin ve örneğe ait fenolik maddelerin spektrumları ile geliş süreleri karşılaştırılmış ve sonuçta 2 pikin de bu fenoliklere ait olmadığı saptanmıştır. Klorojenik asit pikinin alanının hesaplanmasından sonra, klorojenik asit pikine ait standart eğri esas alınmak suretiyle, siyah havuç suyunda bulunan klorojenik asidin miktarı hesaplanmıştır. Şekil 4.5'de verilen kromotagramdan da görüldüğü üzere, klorojenik aside ait pikin alanı, toplam pik alanlarının %90'ınından daha fazlasını oluşturmaktadır. Siyah havuç sularının durultulması ve pastörizasyonu sırasında klorojenik asitteki değişimler belirlenmiş ve sonuçlar çizelge 4.7'de verilmiştir.

Kammarer vd. (2004)'in, siyah havuç ekstraktında yaptıkları çalışmada klorojenik asit dışında; *p*-kumarik, kafeik ve ferulik asit ile hidroksi benzoik asit türevleri ve kuersetin glikozit de tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, klorojenik asit siyah havuç suyunda 657 mg/kg, siyah havuç suyu konsantresinde ise 5815 mg/kg miktarı ile en baskın fenolik bileşik olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.5 Siyah havuç ham suyundaki fenoliklerin HPLC kromotogramı
(Pik 1: klorojenik asit, Pik 2 ve 3: tanımlanamadı)

Siyah havuç sularının gerek durultulma gerekse pastörizasyon aşamalarında saptanan toplam fenolik madde miktarı ve klorojenik asit miktarında benzer değişimler saptanmıştır. Buna karşın, HPLC yöntemi ile saptanan ve elde edilen pik alanlarının %90'ından fazlasını oluşturan klorojenik asit miktarı ile spektrofotometrik yöntemle bulunan sonuçlar spektrofotometrik yöntemle bulunan sonuçlarla paralel olmakla birlikte HPLC yöntemiyle bulunan sonuçlar daha düşüktür. Spektrofotometrik yöntemle saptanan fenolik madde miktarının, HPLC ile saptanan miktardan 4–8 misli yüksek olduğu belirtilmektedir (Spanos ve Wrolstad 1990). Escarpa ve Gonzalez (2001) tarafından kırmızı üzüm posası, kurutulmuş mercimek, yeşil fasülye, elma ve armutlarda yapılan bir çalışmada spektrofotometrik yöntemle yapılan çalışmalarda saptanan toplam fenolik madde miktarının HPLC yöntemine göre 1.1 ile 4.8 kat arasında daha fazla olduğu saptanmıştır. Hem bu açıdan hem de bulunan fenolik maddelerin niteliklerini yansıtmadığı için spektrofotometrik yöntemle bulunan toplam fenolik madde miktarı, bir gıdanın bu hususlaki özelliklerini belirtmekten uzaktır.

4.5 Siyah Havuç Sularının Antioksidan Aktivite Düzeyine Durultma ve Pastörizasyon İşlemlerinin Etkisi

Durultmanın antioksidan aktivite üzerine etkisini saptamak üzere, siyah havuç sularında toplam fenolik madde miktarları, durultma işleminden önce ve durultma işleminin tüm aşamalarında ("depektinizasyondan sonra", "bentonit uygulamasından sonra" ve "bentonit + jelatin + kizelsol uygulamasından sonra") belirlenmiştir. Siyah havuç

sularında, yukarıda belirtilen aşamalarda yapılan, antioksidan aktivite düzeyi analizlerine ilişkin deney sonuçları çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.7 Siyah havuç suyunun farklı üretim aşamalarındaki klorojenik asit miktarları

Siyah havuç suyu	Klorojenik asit miktarı (mg/L)
Pastörize edilmemiş	
Siyah havuç ham suyu (1)	668
Depektinize edilmiş (2)	914
Depektinize edilmiş ve bentonit uygulanmış (3)	852
Durultulmuş (bentonit, jelatin ve kizelsol) (4)	633
Pastörize edilmiş	
Siyah havuç ham suyu (5)	1560
Depektinize edilmiş (6)	1516
Depektinize edilmiş ve bentonit uygulanmış (7)	1343
Durultulmuş (bentonit, jelatin ve kizelsol) (8)	1292

Çizelge 4.8'de görüldüğü gibi, depektinize edilmemiş siyah havuç sularında troloks cinsinden "40.15 µM troloks/µL siyah havuç suyu" düzeyinde antioksidan aktivite saptanırken, depektinize edilmiş siyah havuç sularında ise, "44.64 µM troloks/µL siyah havuç suyu" düzeyinde antioksidan aktivite saptanmıştır. Depektinizasyon işleminden sonra antioksidan aktivite düzeyinde %11 oranında bir artış saptanmıştır. Benzer şekilde, depektinizasyon işleminden sonra toplam fenolik madde miktarında da önemli artış saptanmıştır (Çizelge 4.8). Bu sonuç siyah havuç suyundaki antioksidan aktivitenin fenolik maddelerden kaynaklandığını göstermiştir.

Toplam fenolik madde miktarı ile antioksidan aktivite arasındaki ilişki birçok çalışmada ortaya konulmuştur. Bazı araştırmalarda toplam fenolik madde miktarı ile antioksidan aktivite arasında doğrusal bir ilişki olduğu gösterilmiştir (Price vd. 1997, Ioku ve Ayoma 2001, Vina ve Chavez 2006). Buna karşın, bu konuda yapılan diğer

araştırmalarda ise, bu iki parametre arasında ya böyle bir ilişkinin olmadığı ya da zayıf bir ilişkinin olduğu saptanmıştır (Work ve Camire 1996, Kuti ve Konuru 2004, Gerard ve Roberts 2004, Lombard ve Peffley 2005).

Çizelge 4.8 Siyah havuç suyunun farklı üretim aşamalarındaki antioksidan aktivite düzeyleri ve toplam fenolik madde içerikleri

Siyah havuç suyu	Antioksidan aktivite (μM troloks/μL)	Toplam fenolik madde miktarı (mg gallik asit/L)
Pastörize edilmemiş		
Siyah havuç ham suyu (1)	40.15	668
Depektinize edilmiş (2)	44.64	914
Depektinize edilmiş ve bentonit uygulanmış (3)	40.83	853
Durultulmuş (bentonit, jelatin ve kizelsol) (4)	34.25	633
Pastörize edilmiş		
Siyah havuç ham suyu (5)	41.16	1560
Depektinize edilmiş (6)	45.86	1516
Depektinize edilmiş ve bentonit uygulanmış (7)	41.22	1343
Durultulmuş (bentonit, jelatin ve kizelsol) (8)	34.90	1292

Bartolome ve Nunez (2004) üç farklı kırmızı üzüm çeşidi (*Vitis vinifera*) ile bunlardan elde edilen kırmızı şarapların antioksidan aktiviteleri ve toplam polifenol içeriği üzerine yaptıkları bir çalışmada, antosiyanidin (r=0.85), proantosiyanidin (r=0.75) ve toplam fenolik madde (r=0.96) içeriği ile antioksidan aktivite arasında güçlü bir ilişki bulmuşlardır. Kahkönen vd. (1999), böğürtlen ve çilekte bulunan antosiyaninler ve toplam fenolik maddeler ile TEAC değeri arasında, pozitif bir korelasyon saptamışlardır. TEAC değeri ile toplam fenolik madde miktarı arasındaki korelasyon katsayısı, r=0.98 iken, toplam monomerik antosiyanin miktarı için bu değer r=0.60 olarak belirlenmiştir. Bu değerler, antioksidan aktivitenin toplam fenolik madde miktarı ile güçlü, antosiyonin miktarı ile orta derecede bir ilişkisi olduğunu göstermektedir. Bir başka çalışmada Sellappan vd. (2002), siyah erik ve üzümsü meyvelerde toplam

monomerik antosiyanin ve toplam fenolik madde içeriği ile TEAC değeri arasında güçlü bir korelasyon (r=1) olduğunu bildirmiştir. Yine Javanmardi vd. (1997) fesleğende toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite arasında iyi bir ilişkinin olduğunu (r=0.71) belirlemiştir. Diğer taraftan Velioğlu vd. (1998) tahıl ürünlerinde ve keten tohumlarında toplam fenolik madde miktarı ile antioksidan aktivite arasında iyi bir korelasyon (r=0.82) bulmasına karşın; kırmızı soğan, mor patates, siyah erik gibi yüksek antosiyanin içeren bazı besinlerde böyle bir ilişki bulamamışlardır. Aynı şekilde İsmail vd. (2004); lahana, pırasa ve ıspanakta, toplam fenolik madde miktarı ile antioksidan aktivite arasında bir ilişkiye rastlayamamıştır. Koca (2006), ülkemizin 3 farklı yöresinden temin ettiği havuç çeşitlerinde karotenoid madde ve antioksidan aktivite düzeylerini belirlemiştir. Antioksidan aktivite ile karotenoid miktarı arasındaki ilişki incelendiğinde, bir çeşit hariç, diğer çeşitlerde antioksidan aktivite ile α-karoten ve β-karoten miktarları arasında önemli bir ilişki saptanmamıştır.

Besinlerin farklı fenolik maddeler içerdiği ve bu maddelerin farklı düzeyde antioksidan aktivite gösterdiği bilinmektedir (Sellappan vd. 2002, Chu vd. 2002, İsmail vd. 2004, Matilla ve Hellstrom 2007). Araştırmacılar (Velioğlu vd. 1998, İsmail vd. 2004) fenolik madde miktarı ile antioksidan aktivite arasındaki zayıf ilişkinin, fenolik bileşiklerin farklı antioksidan aktivite göstermelerinden ve bitkisel dokularda fenolik maddeler dışında başka antioksidan maddelerin (α-tokoferol, β-karoten, vitamin C, selenium vb.) bulunmasından kaynaklandığını ileri sürmektedir**.**

Daha sonraki durultma aşamalarında ise, beklenildiği gibi toplam fenolik madde miktarındaki azalışa bağlı olarak antioksidan aktivite düzeyinde de bir azalış saptanmıştır. Depektinize edilmiş siyah havuç suyuna bentonit eklenerek, depektinize edilmiş siyah havuç suyuna göre antioksidan aktivite düzeyinde yaklaşık %9'luk bir azalış saptanmıştır. Aynı şekilde durultma işleminin son aşamasında depektinize edilmiş ve bentonit ilave edilmiş siyah havuç suyuna "kizelsol + jelatin" ilave edildiğinde, toplam fenolik madde miktarındaki azalışa bağlı olarak antioksidan aktivite düzeyinde, depektinize edilmiş ve bentonit ilave edilmiş siyah havuç suyuna göre yaklaşık %16'lık bir azalış saptanmıştır.

Benzer bir durum pastörize örneklerde de söz konusudur. Pastörize edilen örneklerin antioksidan aktivitesi de toplam fenolik maddelerindeki artışa bağlı olarak bir miktar artış göstermiştir. "**4.1 Siyah Havuç Sularının Bazı Analitik Özellikleri Üzerine Durultma ve Pastörizasyon İşlemlerinin Etkisi"** bölümünde de ifade edildiği gibi bunun nedeninin, hücre duvarının sıcaklığın etkisiyle parçalanarak bazı fenoliklerin ve bulanıklılık yapan unsurların açığa çıkmasından dolayı olduğu düşünülmektedir.

4.6 Siyah Havuç Sularının Kondense Olabilen Fenolik Madde Miktarı Üzerine Durultma ve Pastörizasyon İşlemlerinin Etkisi

Durultmanın kondense olabilen fenolik maddeler üzerine etkisini saptamak üzere, siyah havuç sularında kondense olabilen fenolik madde miktarları, durultma işleminden önce ve durultma işleminin tüm aşamalarında ("depektinizasyondan sonra," "bentonit uygulamasından sonra" ve "bentonit + jelatin + kizelsol uygulamasından sonra") belirlenmiştir. Ayrıca durultma işleminden önce ve durultma aşamalarında alınan siyah havuç suyu örneklerinin kondense olabilen fenolik madde miktarları; pastörizasyon işleminden önce ve sonra belirlenerek, pastörizasyon işleminin kondense olabilen fenolikler üzerine etkisi de ortaya konulmuştur. Siyah havuç sularında, yukarıda belirtilen aşamalarda yapılan, kondense olabilen fenolik madde miktarı analizlerine ilişkin deney sonuçları çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9'de görüldüğü üzere, bentonit uygulama aşaması dışında, gerek depektinizasyonun gerekse durultmanın diğer aşamlarının siyah havuç sularında kondense olabilen fenolik maddeler üzerine önemli bir etkisinin olmadığı saptanmıştır. Benzer şekilde, pastörizasyonun da kondense olabilen fenolik maddeler üzerine belirgin bir etkisinin olmadığı ortaya konulmuştur.

4.7 Siyah Havuç Suyu Konsantrelerinin Farklı Sıcaklıklardaki Depolanması Süresince Toplam Fenolik Madde ve Antioksidan Aktivitesindeki Değişmeler

Siyah havuç suyu konsantrelerinin farklı sıcaklıkarda depolanması sürecinde spektrofotometre ile yapılan ölçümlerde gerek toplam fenolik madde gerekse de

antioksidan aktivite üzerinde bir miktar değişim gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, sırasıyla çizelge 4.10 ve 4.12'de ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir.

Çizelge 4.9 Siyah havuç suyunun farklı üretim aşamalarındaki kondense olabilen fenolik madde miktarları

Siyah havuç suyu	Kondense olabilen fenolik madde miktarı (mg kateşin/L)
Pastörize edilmemiş	
Siyah havuç ham suyu (1)	135
Depektinize edilmiş (2)	125
Depektinize edilmiş ve bentonit uygulanmış (3)	114
Durultulmuş (bentonit, jelatin ve kizelsol) (4)	127
Pastörize edilmiş	
Siyah havuç ham suyu (5)	127
Depektinize edilmiş (6)	133
Depektinize edilmiş ve bentonit uygulanmış (7)	113
Durultulmuş (bentonit, jelatin ve kizelsol) (8)	130

Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi depolama süresince siyah havuçlardan elde edilen konsantre örneklerinde toplam fenolik madde miktarı düzeyinde bir miktar azalış saptanmıştır. Depolama sıcaklıklarının ise, toplam fenolik madde miktarı düzeyine bir etkisi gözlemlenmemiştir. 8 aylık depolama sonunda siyah havuç konsantrelerinin toplam fenolik madde miktarı %19–21 oranında düştüğü saptanmıştır. Portakal suyunun fenolik madde miktarı üzerine depolamanın etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, 38°C'de 4 ay süresince toplam fenolik madde miktarının %45 azaldıgı saptanmıştır (Inga vd. 2007). Bir başka çalışmada dut pekmezinin fenolik madde miktarı üzerine depolamanın etkisi araştırılmış ve 20°C'de 6 ay süreyle depolanan pekmezlerin toplam fenolik madde miktarlarının %65 azaldığı belirlenmiştir (Güngör 2007).

5°C, 20°C ve 30°C'de depolanan siyah havuç suyu konsantrelerinin fenolik madde miktarları için yapılan varyans analizi sonuçları (Çizelge 4.11), depolama süresinin

fenolik madde miktarı üzerine önemli etkisinin olduğunu göstermiştir ($p<0.05$). Bu verilere Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Duncan testi sonuçlarına göre (EK 1, Çizelge 1); 5°C, 20°C ve 30°C'de depolanan siyah havuç sularının depolama süresine bağlı olarak, toplam fenolik madde içerikleri arasındaki farkların istatistik olarak önemli olduğu saptanmıştır ($p<0.05$).

Çizelge 4.10 Farklı sıcaklıklarda depolanan siyah havuç suyu konsantrelerinde toplam fenolik madde miktarları

	Depolama süresi (ay)				
Sıcaklık (°C)	0	2	4	6	8
5	22 715	21 897	20 254	19 717	18 460
20	22 715	21 713	20 572	19 310	18 267
30	22 715	21 808	20 618	19 362	18 017

Çizelge 4.12'de görüldüğü gibi depolama süresince siyah havuçlardan elde edilen konsantre örneklerinde antioksidan aktivite düzeyinde küçük de olsa, bir miktar azalış saptanmıştır. Depolama sıcaklıklarının ise, antioksidan aktivite düzeyine önemli bir etkisi gözlenmemiştir. 8 aylık depolama sonunda siyah havuç suyu konsantrelerinin antioksidan aktivitesinin %6–7 oranında düştüğü saptanmıştır.

Çizelge 4.11 Siyah havuç suyu konsantrelerinin farklı sıcaklıklarda depolanması süresince fenolik madde miktarındaki azalmaya ilişkin varyans analiz çizelgesi

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F	P
Sıcaklık	2	66 066	33 033	0.41	0.673
Süre	4	78 375 643	19 593 911	241.54	0.000*
Sıcaklık x Süre	8	519 320	64 915	0.80	0.612
Hata	15	1 216 834	81 122		
Genel toplam	29	80 177 862			

* : $p<0.05$

Çizelge 4.12 Farklı sıcaklıklarda depolanan siyah havuç suyu konsantrelerinde ölçülen antioksidan aktivite değerleri

	Depolama süresi (ay)				
Sıcaklık (°C)	0	2	4	6	8
5	238	237	231	225	224
20	238	236	230	223	223
30	238	236	229	222	221

4°C ve 20°C'de depolanan çilek reçellerinde yapılan bir çalışmada, 4°C'de depolanan reçellerin antioksidan aktivitesinin, 20°C'de depolanan reçellerden yüksek olduğu belirlenmiştir (Wicklund 2004). Bilindiği gibi, meyve ve sebzelerin antioksidan aktivitesini belirleyen en önemli bileşenler vitaminler ve fenolik maddelerdir. Buna bağlı olarak, çilek reçelinde depolama süresince toplam fenolik madde ve vitamin oranlarındaki azalmaların antioksidan aktiviteyi azaltmış olacağı bildirilmiştir. Dut pekmezinin depolanmasıyla ilgili yapılan bir çalışmada da, 20°C'de 6 ay depolanan pekmezlerde antioksidan aktivitesinde %38 azalma olduğu belirlenmiştir (Güngör 2007).

5°C , 20°C ve 30°C'de depolanan siyah havuç suyu konsantrelerinin antioksidan aktivite düzeyleri için yapılan varyans analizi sonuçları (Çizelge 4.13), "sıcaklık x süre" ikili interaksiyonunun istatistik olarak önemli olduğunu göstermiştir ($p<0.05$). Bu nedenle, elde edilen verilere Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. İkili interaksiyon önemli olduğu için sıcaklık ve depolama süresinin esas etkilerini incelemeye gerek duyulmamıştır. İkili interaksiyonun önemli olması, sıcaklık ve depolama süresi arasındaki interaksiyonun önemli olduğunu yani, depolama süreleri arasındaki farklılığın siyah havuç suyu konsantrelerinin depolama sıcaklığına göre değiştiğini ifade etmektedir. Gözlenen fark tesadüfi değildir. Duncan testi sonuçları (EK 1, Çizelge 2), siyah havuç sularının antioksidan aktivite düzeyleri üzerine sıcaklık ve depolama süresinin önemli etkisi olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.13 Siyah havuç suyu konsantrelerinin farklı sıcaklıklarda depolanması süresince antioksidan aktivitedeki azalmaya ilişkin varyans analiz çizelgesi

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F	P
Sıcaklık	2	15.262	7.631	33.20	0.000
Süre	4	1 234.950	308.737	134.333	0.000*
Sıcaklık x Süre	8	5.461	0.683	2.97	0.033
Hata	15	3.447	0.230		
Genel toplam	29	1 259.120			

* : $p<0.05$

8 aylık depolama sonunda siyah havuç suyu konsantrelerinin toplam fenolik madde içeriklerinde de, antioksidan aktivitede olduğu gibi azalmalar saptanmıştır. Depolama sonunda, toplam fenolik madde miktarında yaklaşık %20 düzeyinde azalma olduğu belirlenmiştir. Buna karşın, depolama sıcaklıklarının, toplam fenolik madde düzeyine önemli bir etkisi gözlenmemiştir. Bodur ve Yurdagel (1986), çözünür kuru madde oranları %35□38 olan nar suyu konsantrelerini +4^{o}C'de depolamışlar ve depolama başlangıcında 2199 mg/L olan toplam fenolik madde miktarının, 2 ay depolama sonunda 2167 mg/L olduğunu, 4 ay depolama sonunda 2091 mg/L olduğunu ve 6 ay depolama sonunda ise 2087 mg/L'ye düşerek, toplamda %5.1 oranında azaldığını belirlemişlerdir.

4.8 Siyah Havuç Suyu Konsantrelerinin Farklı Sıcaklıklardaki Depolanması Süresince Kondense Olabilen Fenolik Madde Miktarındaki Değişmeler

Siyah havuç suyu konsantrelerinin farklı sıcaklıkardaki depolanması sürecinde kondense olabilen fenolik madde miktarlarındaki değişimler Çizelge 4.15'de gösterilmiştir.

Tüm depolama sıcaklıklarında 2. ay sonunda, kondense olabilen fenolik madde miktarında önemli artışlar saptanmıştır. Buna karşın, depolamanın ilerliyen

dönemlerinde kondense olabilen fenolik madde miktarında bir miktar artış saptansa da, bu artış sınırlı düzeyde olmuştur. Toplam fenolik madde miktarından farklı olarak, depolama sıcaklığının artmasıyla kondense olabilen fenolik madde miktarında belirgin bir artış saptanmıştır.

Çizelge 4.14 Farklı sıcaklıklarda depolanan siyah havuç suyu konsantrelerinin toplam fenolik madde miktarları

Sıcaklık (°C)	Depolama süresi (ay)	Toplam fenolik madde miktarı (mg/kg)
5	0	22 715
	8	18 460 (%18.7)*
20	0	22 715
	8	18 267 (%19.6)
30	0	22 715
	8	18 017 (%20.7)

*: Parantez içindeki değerler depolama sonundaki "% fenolik madde kaybı" nı göstermektedir.

Çizelge 4.15 Farklı sıcaklıklarda depolanan siyah havuç suyu konsantrelerinde ölçülen kondense olabilen fenolik madde değerleri

	Depolama süresi (ay)				
Sıcaklık (^{o}C)	0	2	4	6	8
5	308	876	993	903	1046

4.9 Siyah Havuç Suyu Konsantrelerinin Farklı Sıcaklıklardaki Depolanması Süresince Briks, pH, Titrasyon Asitliği ve Bulanıklılık (NTU) Değerlerindeki Değişimler

Farklı sıcaklıklarda depolanan siyah havuç suyu konsantrelerinde 8 aylık depolama süresince elde edilen briks, pH, titrasyon asitliği ve bulanıklık değerleri 2 aylık aralıklarla izlenmiş ve sonuçlar çizelge 4.16'da verilmiştir.

Çizelge 4.16 Farklı sıcaklıklarda depolanan siyah havuç suyu konsantrelerinin briks, bulanıklık, pH, titrasyon asitliği ve bulanıklık değerleri

Sıcaklık (°C)	Depolama süresi (ay)	Briks	pH	Titrasyon asitliği* (mg/100 mL)	Bulanıklık (NTU)
5	0	67.96	4.36	3.63	6.36
	2	68.04	4.41	3.51	6.24
	4	67.52	4.35	3.69	6.50
	6	68.10	4.41	3.71	6.11
	8	67.63	4.36	4.29	6.15
20	0	67.98	4.39	3.62	6.36
	2	67.79	4.39	3.50	9.58
	4	67.38	4.42	3.60	13.15
	6	67.54	4.45	3.72	16.62
	8	67.71	4.41	3.93	27.75
30	0	67.98	4.39	3.62	6.36
	2	68.07	4.40	3.62	9.73
	4	67.38	4.40	3.63	41.5
	6	67.09	4.41	3.73	573
	8	66.93	4.41	4.16	755

* : Susuz sitrik asit cinsinden

Depolama süresince, siyah havuç suyu konsantrelerinin pH değerlerinde önemli bir değişim gözlenmemiş, briks değerlerinde az da olsa bir azalış ve titrasyon asitliğinde ise, bir miktar artış gözlenmiştir. Örneğin, 5°C'de 8 aylık depolama sonunda, siyah

havuç suyu konsantrelerinin briks değerleri 67.96°Bx'den 67.63°Bx'e, 20°C'de 8 aylık depolama sonunda 67.98°Bx'den 67.71°Bx'e ve 30°C'de 8 aylık depolama sonunda 67.98°Bx'den 66.93°Bx'e düşmüştür. Ayrıca, 5°C'de 8 aylık depolama sonunda, siyah havuç suyu konsantrelerinin titrasyon asitliği değerleri 3.63 mg/100 g'den 4.29'a, 20°C'de 8 aylık depolama sonunda 3.62 mg/100 g'den 3.93'e ve 30°C'de 8 aylık depolama sonunda 3.62 mg/100 g'den 4.16'ya yükselmiştir.

Depolama sıcaklığı arttıkça, briks değerlerinde daha fazla azalış, buna karşın titrasyon asitliği değerlerinde ise, daha fazla artış saptanmıştır. Bulanıklık değerleri ise depolama sıcaklığı ve süresinin artışına bağlı olarak, beklenildiği gibi önemli düzeyde artmıştır. Bilindiği gibi meyve suyu ve konsantrelerinin depolama süresince bulanmalarında ve tortu oluşumlarında fenolik bileşikler önemli rol oynamaktadır. Fenolik bileşikler, depolama sıcaklık ve süresine bağlı olarak polimerize olarak bulanıklığa neden olmaktadır**.**

Tabur vd. (1987), durultulmuş ve 85^{o}C'de 25 dak süreyle pastörize edilmiş nar suyunu +4^{o}C'de ve oda sıcaklığında depolamış, depolama süresince nar sularının briks değerinde az da olsa bir değişim saptamışlardır. Depolama başlangıcında %17.8 olan briks değeri, +4^{o}C'de 15 gün depolama sonrası %17.6'ya, 45 gün sonra ise, %17.5'e düşmüştür. Ayrıca, oda sıcaklığında 15 gün depolamada briks değeri %17.8, 45 gün sonunda ise, %17.4 olarak belirlenmiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Araştırmada elde edilen başlıca sonuçlar, aşağıda maddeler halinde sunulmuştur.

1. Siyah havuç suyunun; sitrik asit eklenerek pH 4.3'e ayarlandıktan sonra depektinize edilip; bentonit, jelatin ve kizelsol kullanılarak sıcak durultma (50^oC) tekniği ile durultulabileceği belirlenmiştir.
2. Siyah havuç suyunun depektinizasyonu sonucunda, hücre duvarlarının parçalanmasıyla briks, pH, titrasyon asitliği ve fenolik madde miktarının arttığı saptanmıştır. Aynı şekilde, siyah havuç suyunun antioksidan aktivitesi de depektinizasyon işlemiyle birlikte artış göstermiştir.
3. Durultmada kullanılan bentonit, jelatin ve kizelsolün ise, beklendiği gibi fenolik maddelerin kaybına neden olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde siyah havuç suyunun antioksidan aktivitesi de bentonit, jelatin ve kizelsol ilavesinden sonra azalmıştır. Bu da, siyah havuç suyunun antioksidan aktivitesinin fenolik maddelerinden kaynaklandığını göstermiştir.
4. Siyah havuç sularının depektinizasyonu ve pastörizasyonu ile, antioksidan aktivite düzeyinde belirgin bir artış saptanmıştır. Benzer şekilde, gerek depektinizasyon gerekse pastörizasyon işleminden sonra toplam fenolik madde miktarında da önemli artışlar saptanmıştır Bu sonuçlar, siyah havuç suyundaki antioksidan aktivitenin fenolik maddelerden kaynaklandığını göstermiştir.
5. Siyah havuç suyunun durultulma aşamalarında ise, gerek toplam fenolik madde miktarı azalmış gerekse de bu azalışa bağlı olarak antioksidan aktivite düzeyinde de bir azalış saptanmıştır. Bu azalış "bentonit" eklenmesinden ve "jelatin + kizelsol" eklenmesinden sonra da gözlenmiştir.
6. Pastörizasyon işleminin, siyah havuç sularının bulanmasına neden olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeninin ise, sıcaklığın hücre duvarını parçalaması sonucunda bulanıklılık yapan unsurların hücre dışına çıkması olduğu düşünülmektedir.
7. Siyah havuç suyu ve konsantrelerinde HPLC□MS yöntemi ile 3 başat pik belirlenmiş, ancak bu piklerden sadece bir tanesi tanımlanabilmiştir. Bu üç pike

ait kromotografik alanların %90'ını oluşturan pik, klorojenik asit olarak tanımlanmıştır.

8. Siyah havuç suyu konsantrelerinin depolanması süresince antioksidan aktivitelerinde az da olsa bir azalış saptanmıştır. Buna karşın, toplam fenolik madde içeriklerinde ise, belirgin azalmalar saptanmıştır. Depolama sıcaklıklarının ise, siyah havuç suyu konsantrelerinin gerek antioksidan aktivite gerekse toplam fenolik madde düzeyleri üzerine bir etkisi gözlenmemiştir.

KAYNAKLAR

Alasalvar, C., Al-Farsi, M., Quantick, P.C., Shahidi, F. and Wictorowicz, R. 2005. Effect of chill storage and modified atmosphere packaging (MAP) on antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, phenolics and sensory quality of ready-to-eat shredded orange and purple carrots. Food Chemistry, 89(1); 69-76.

Anonim. 2005. MEYED (Meyve Suyu Endüstrisi Derneği). Web sitesi. http://www.meyed.org.tr/ Erişim tarihi: 02.10.2010.

Anonim. 2006. Fenolik bileşikler ve doğal renk maddeleri. Mesleki eğitim ve öğretim sisteminin güçlendirilmesi projesi, 27 s., Ankara.

Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu, B., Berker, K.I. and Özyurt, D. 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. Molecules, 12; 1496-1547.

Apaydın, E. 2008. Nar suyu konsantresi üretim ve depolama sürecinde antioksidan aktivitedeki değişimler. Yüksek lisans tezi (basılmamış), Ankara Üniversitesi, 64 s., Ankara.

Aras, Ö. 2006. Üzüm ve üzüm ürünlerinin toplam karbonhidrat, protein, mineral madde ve fenolik bileşik içeriklerinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi (basılmamış), Süleyman Demirel Üniversitesi, 59 s., Isparta.

Arena, E., Fallico, B. and Maccarone, E. 2001. Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. Food Chemistry, 74; 423-427.

Arts, M.J.T.J., Haenen, G.R.M.M., Voss, H.-P. and Bast, A. 2001. Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein. Food and Chemical Toxicology, 39(8); 787-791

Bartolome, B. and Nunez, M. 2004. In vitro antioxidant activity of red grape skins. European Food Research and Technology, 218; 173-177.

Bayındırlı, L., Sahin, S. and Artık, N., 1994, The effects of clarification methods on pomegranate juice quality, Fruit Processing, 9; 267-270.

Bayraktar, K. 1970. Sebze yetiştiriciliği. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 245 s., İzmir.

Berry, S.K., Manan, J.K., Joshi, G.J., Saxena, A.K. and Karla, C.L. 1989. Preparation and evaluation of ready-to-serve (RTS) black carrot beverage (Kanji). Journal of Food Science Technology, 26(6); 327-328.

Bodur, İ. ve Yurdagel, Ü. 1986, Nar konsantresinin donmuş ve kimyasal katkılanmış olarak soğukta depolanması sırasında meydana gelen değişmeler üzerinde bir araştırma. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi, 4(2); 11-27.

Cemeroğlu, B. 1977. Nar suyu üretim teknolojisi üzerinde araştırmalar, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 664, Bilimsel Araştırmalar ve İncelemeler: 390, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.

Cemeroğlu, B. ve Karadeniz, F. 2009. Meyve suyu üretim teknolojisi. Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi, Cilt I, Cemeroğlu B (ed), 3. baskı, s. 391-692, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No:38, Bizim Grup Basımevi, Ankara.

Cemeroğlu, B. 2010. Gıda analizlerinde genel yöntemler. *Gıda Analizleri*, 2. Baskı, B. Cemeroğlu (ed.), s. 1-85, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No: 34, Bizim Grup Basımevi, Ankara.

Chang, W.S., Chang, Y.H., Lu, F.J., Chiang, H.C. 1994. Inhibitory effects of phenolics on xanthine oxidase. Anticancer Research, 14; 501-506

Chaovanalikit, A. and Wrolstad, R.E. 2004. Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. Journal of Food Science, 69; 67-72.

Chu, Y.F., Sun, J., Wu, X. and Liu, R.H. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50; 6910-6916.

Del Caro, A., Piga, A., Pinna, I., Fenu, P.M. and Agabbio, M. 2004. Effect of drying conditions and storage period on polyphenolic content, antioxidant capacity, and ascorbic acid of prunes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(15); 4780-4784.

Downham, A. and Collins, P. 2000. Colouring our foods in the last and next millennium. International Journal of Food Science and Technology, 35(1); 5-22.

Escarpa, A. and Gonzalez, M.C. 2001. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. Analytica Chimica Acta, 427(1); 119-127.

Frankel, E.N. 1999. Natural phenolic antioxidants and thier impact on health. Antioxidant Food Supplements in Human Health, pp. 385-392, Academic Press, London.

Garcia-Alonso, M., Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C. and Rivas-Gonzalo, J.C. 2004. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. Food Chemistry, 84; 13-18.

Gerard, K.A. and Roberts, J.S. 2004. Microwave heating of apple mash to improve juice yield and quality. Lebensmittel-Wiss- u. -Technology, 37; 551-557.

Gil, M.I., Tomas-Barberan, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M. and Kader, A.A. 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48; 4581-4589.

Giusti, M.M., Rodriguez-Saona, L.E., Griffin, D. and Wrolstad, R.E. 1999. Electrospray and tandem mass spectroscopy as tools for anthocyanin characterization. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47; 4657-4664.

Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J. and Jiang, Y. 2003. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. Nutrition Research, 23; 1719-1726.

Güngör, N. 2007. Dut pekmezinin bazı kimyasal ve fiziksel özellikleri ile antioksidan aktivitesi üzerine depolamanın etkisi. Yüksek lisans tezi (basılmamış), Atatürk Üniversitesi, 83 s., Erzurum.

Güzel, N. 2010. Nar suyu konsantresi üretim aşamalarında prosiyanidinlerdeki değişimler. Yüksek lisans tezi (basılmamış), Ankara Üniversitesi, 87 s., Ankara.

Hernandez, F., Melgarejo, P., Tomas-Barberan, F.A. and Artes, A. 1999. Evolution of juice anthocyanins during ripening of new selected pomegranate (*Punica granatum*) clones. European Food Research and Technology, 210; 39-42.

Huang, D., Ou, B. and Prior, R.L. 2005. The chemistry behing antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53; 1841-1856.

IFU. 1968. Analysen. Nr: 3. Internationale Fruchtsaft Union Juris Verlag, Zurich, Schweiz.

Ioku, K. and Ayoma, Y. 2001. Various cooking methods and the flavonoid content in onion. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 47; 78-83.

Ismail, A., Marjan, Z.M. and Foong C.W. 2004. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. Food Chemistry, 87; 581-586.

Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E. and Vivanco, J.M. 2003. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Ocimum accessions. Food Chemistry, 83; 547-550.

Kahkönen, M.P., Hopia, A.I. and Vuorela, H.J. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47; 3954-3962.

Kalt, W. 2005. Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidants. Journal of Food Science, 70(1); R11-R19.

Kammerer, D., Carle, R. and Schieber, A. 2004. Characterization of phenolic acids in black carrots *(Daucus carota ssp. sativus var. atrorubens Alef.)* by high-performance liquid chromatogtaphy/electrospray ionization mass spectrometry. Rapid Communication in Mass Spectrometry, 18(12); 1331-1340.

Kırca, A. 2004. Sıyah havuç antosiyaninlerinin bazı meyve ürünlerinde ısıl stabilitesi. Doktora tezi (basılmamış). Ankara Üniversitesi, 109 s., Ankara.

Kırca, A., Özkan, M. and Cemeroğlu, B. 2006. Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars. Food Chemistry, 97; 598-605.

Kırca, A. ve Özkan, M. 2010. Değişik amaçlı bazı test ve analiz yöntemleri. *Gıda Analizleri*, 2. Baskı, B Cemeroğlu (ed.), s. 157–200, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No: 34, Bizim Grup Basımevi, Ankara.

Klimczak, I., Malecka, M., Szlachta, M. and Gliszczynska-Swigho, A. 2007. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. Journal of Food Composition and Analysis, 20, 313-322.

Koca, N. 2006. Havuçlarda karotenoidler ve antioksidan aktivite. Doktora Tezi (basılmamış), Ankara Üniversitesi, 96 s., Ankara.

Kuti, J.O. and Konuru, H.B. 2004. Antioxidant capacity and phenolic content in leaf extracts of tree spinach *(Cnidoscolus spp.)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52; 117-121.

Lee, J. and Wrolstad, R.E. 2004. Extraction of anthocyanins and polyphenolics from blueberry processing waste. Journal of Food Science, 69(7); 564-573

Lombard, K. and Peffley, E. 2005. Quercetin in onion after heat treatment simulating home preparation. Journal of Food Composition and Analysis, 18; 571-581.

Matilla, P. and Hellstrom, J. 2007. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. Journal of Food Composition and Analysis, 20; 152-160.

Mikkelsen, B.B. and Poll, L. 2002. Decomposition and transformation of aroma compounds and anthocyanins during black currant (Ribes nigrum L.) juice processing. Journal of Food Science, 67(9); 3447-3455.

Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V. and Miller, A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clinical Sciences, 84; 407-412.

Miller, N.J. and Rice-Evans, C.A. 1997. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. Food Chemistry, 60; 331-337.

Murthy, K.N.C, Jayaprakasha, G.K. and Singh, R.P. 2002. Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using in vivo models. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 4791-4795.

Naithani, V., Nair, S. and Kakkar, P. 2006. Decline in antioxidant capacity of Indian herbal teas during storage and its relation to phenolic content. Food Research International, 39, 176-181.

Narayan, M.S. and Venkataraman, L.V. 2000. Characterization of anthocyanins derived from carrot *(Daucus carota)* cell culture. Food Chemistry, 70; 361-363.

Nicoli, M.C., Anese, M. and Parpinel, M. 1999. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. Trends in Food Science and Technology, 10(3); 94-100.

Özkan, M., Cemeroğlu, B. ve Kırca, A. 2005 Berrak siyah havuç suyu konsantresi üretimi ve antosiyaninlerin ısıl stabilitesi. Proje kesin raporu (Proje No: 20020711065). Ankara Üniversitesi Bilimsel Projeler Koordinatörlüğü, 41 s., Ankara.

Özkan, M., Kırca, A. ve Cemeroğlu, B. 2007. Gıdalara uygulanan bazı özel analiz yöntemleri. *Gıda Analizleri*, Cemeroğlu, B. (ed.), s.129-186, Bizim Büro Basımevi, Ankara.

Price, K.R., Bacon, J.R. and Rhodes, M.J.C. 1997. Effects of storage and domestic processing on the content and composition of flavonol glucosides in onion (Allium cepa). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45; 938-942.

Puiggros, F., Llopiz, N., Ardevol, A., Blade, C., Arola, L. and Salvado, M.J. 2005. Grape seed procyanidins prevent oxidative injury by modulating the expression of antioxidant enzyme systems. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(15); 6080-6086.

Puupponen-Pimia, R, Hakkinen, St., Aarni, M., Suortti, T., Lampi, A.M., Eurola, M., Piironen, V., Nuutila, A.M. and Oksman-Caldentey, K.M. 2003. Blanching and long-term freezing affect various bioactive compounds of vegetables in different ways. Journal of the Science Food and Agriculture, 83; 1389-1402.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente A., Pannala, A.,Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, 26; 1231-1237.

Rommel, A., Wrolstad, R.E. and Heatherbell, D.A. 1992. Blackberry juice and wine:Processing and storage effects on anthocyanin composition, color and apperance. Jornal of Food Science, 57(2); 385-391.

Sellappan, S., Akoh, C.C. and Krewer, G. 2002. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-Grown blueberries and blackberries. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50; 2432-2438.

Singleton, V.L. and Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16; 144-153.

Skrede, G., Wrolstad, R.E. and Durst, R.W. 2000. Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). Journal of Food Science, 65(2); 357-364.

Spanos, G.A. and Wrolstad, R.E. 1990. Influence of processing and storage on the phenolic composition of thompson seedless grape juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38(7); 1565-1571.

Spranger, I., Sun, B., Mateus, A.M., Freitas, V., Ricardo, da Silva, J.M. 2008. Chemical characterization and polymeric procyanidin gractions from grape seeds. Food Chemistry, 108; 519-532.

Tabur, D., Bakkal, G. ve Yurdagel, Ü. 1987. Nar suyunun durultma işlemi ve depolama süresince meydana gelen değişimler üzerine araştırmalar. Ege Üniversitesi, 12(5); 305-311.

Tanner, H. and Brunner, H.R. 1979. Gentranke-Analytik. Germany:Verlag Heller Chemie und Verwaltunsgesellschaft mbH, pp. 206.

Turfan, Ö. 2008. Nar suyu konsantresi üretim ve depolama sürecinde antosiyaninlerdeki değişimler. Yüksek lisans tezi (basılmamış), Ankara Üniversitesi, 146 s., Ankara.

Türkyılmaz, M. 2009. Siyah havuç suyu konsantresi üretim ve depolama sürecinde antosiyaninlerdeki değişimler. Doktora hazırlık çalışması (basılmamış), Ankara Üniversitesi, 119 s., Ankara.

Velioğlu, Y.S., Mazza, G. and Oomah, B.D. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46; 4113-4117.

Villano, D., Fernandez-Pachon, M.S., Troncoso, A.M. and Garcia-Parrilla, M.C. 2004. The antioxidant activity of wines determined by the $ABTS^{\bullet+}$ method: Influence of sample dilution and time. Talanta, 64, 501-509.

Vina, S.Z. and Chaves, A.R. 2006. Antioxidant resposes in minimally processed celery during refrigerated storage. Food Chemistry, 94; 68-74.

Wicklund, T., Rosenfeld, H.J., Martinsen, B.K., Sundfor, M.W., Lea, P., Bruun, T., Blomhoff, R. and Haffner, K. 2004. Antioxidant capacity and colour of strawberry jam as influenced by cultivar and storage conditions. Food Science, 38(4); 387- 391.

Work, T.M. and Camire, M.E. 1996. Phenolic acid detection thresholds in processed potatoes. Food Quality and Preference, 7(3/4); 271-274.

Yanishlieva, M.N.V. 2000. Inhibiting oxidation. Antioxidant in Foods, Yanishlieva, N. and Gordan, M. (eds.), pp 22-71, CRC Press LLC and Woodhead, New York.

EKLER

EK 1 Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi Sonuçları

EK 2 Siyah Havuç Suyu Fenolik Kromatogramları

EK 1 Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi Sonuçları

Çizelge 1 Farklı sıcaklıklarda depolanan siyah havuç suyu konsantrelerinin toplam fenolik madde miktarlarının Duncan testi ile karşılaştırılması[1]

Sıcaklık	**Süre (ay)**				
(°C)	**0**	**2**	**4**	**6**	**8**
5	22715±31Aa	21897±211Ba	20254±424Ca	19717±211Da	18460±283Ea
20	22715±31Aa	21713±67 Ba	20572±494Ca	19310±71Da	18267±282Ea
30	22715±31Aa	21808±207Ba	20618±486Ca	19362±418Da	18017±281Ea

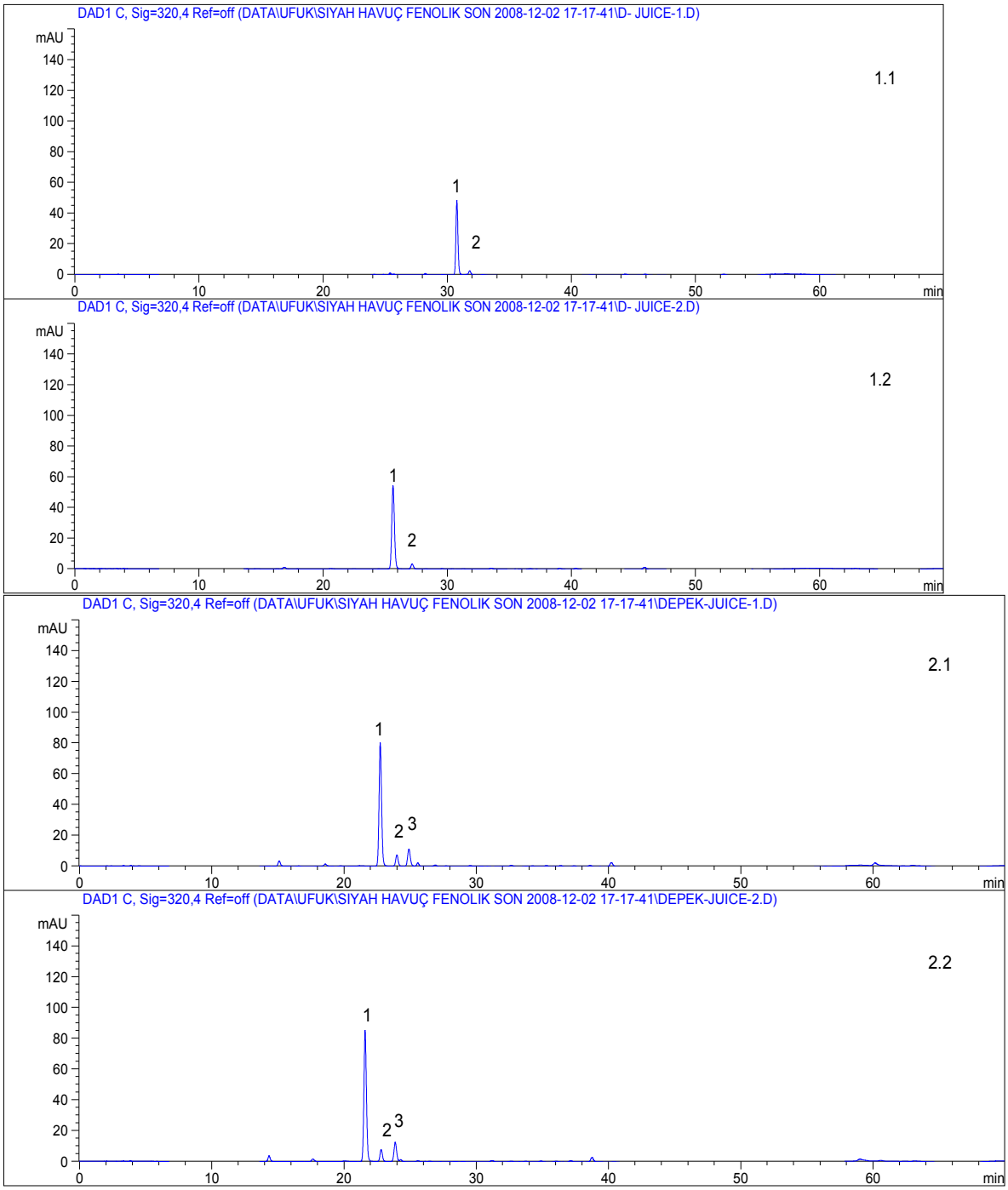
[1] Toplam fenolik madde miktarı aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmiştir
A-F : Aynı satırda değişik harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p<0.05$)
a-c : Aynı sütunda değişik harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p<0.05$)

Çizelge 2 Farklı sıcaklıklarda depolanan siyah havuç suyu konsantrelerinin antioksidan aktivite değerlerinin Duncan testi ile karşılaştırılması[2]

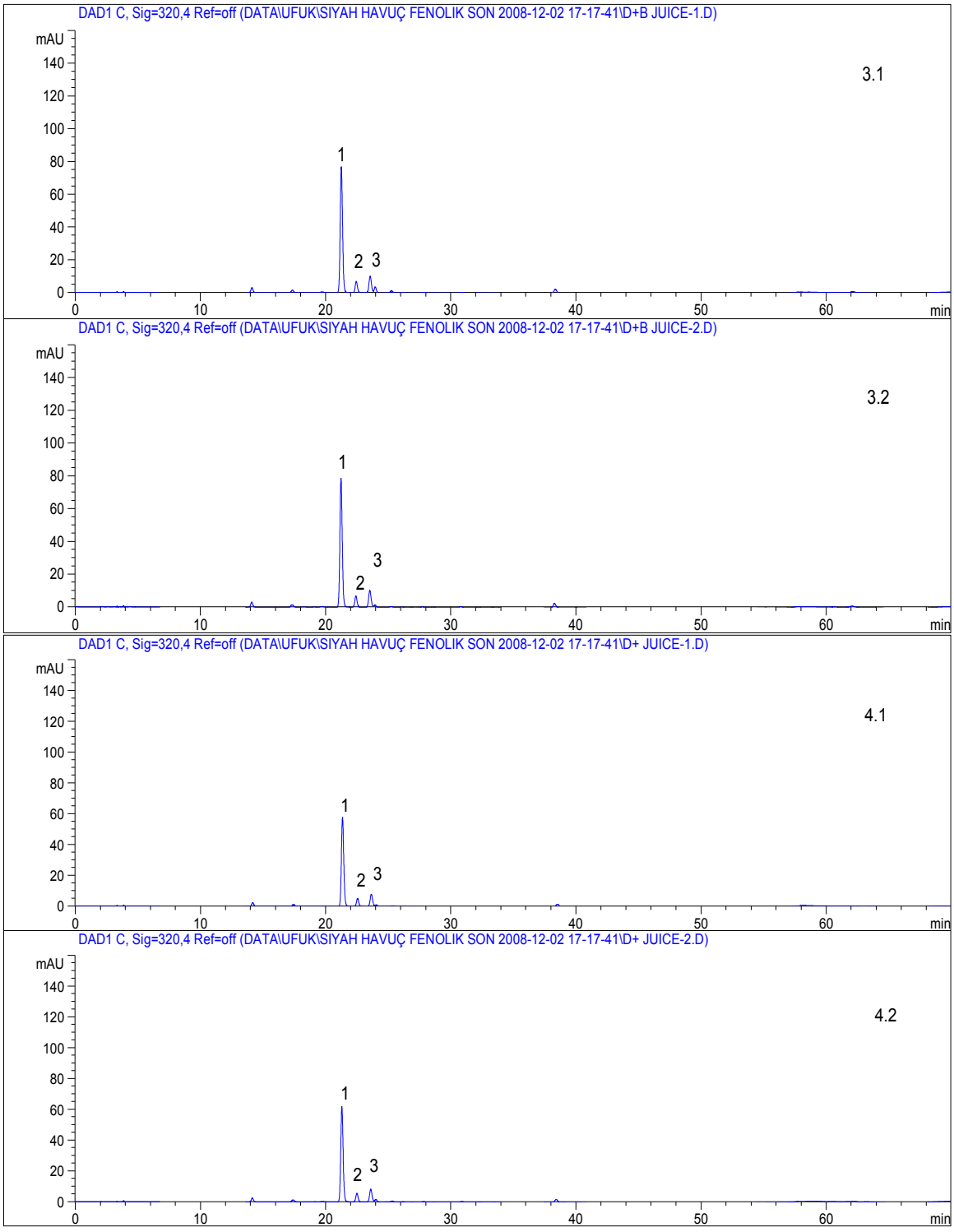
Sıcaklık	**Süre (ay)**				
(°C)	**0**	**2**	**4**	**6**	**8**
5	238±0.07Aa	237±0.35Aa	231±0.66Ba	225±0.57Ca	224±0.71Ca
20	238±0.07Aa	236±0.64Bab	230±0.42Cb	223±0.14Db	223±0.71Da
30	238±0.07Aa	236±0.35Bb	229±0.50Cb	222±0.28Dc	221±0.71Eb

[2] Toplam fenolik madde miktarı aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmiştir
A-F : Aynı satırda değişik harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p<0.05$)
a-c : Aynı sütunda değişik harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p<0.05$)

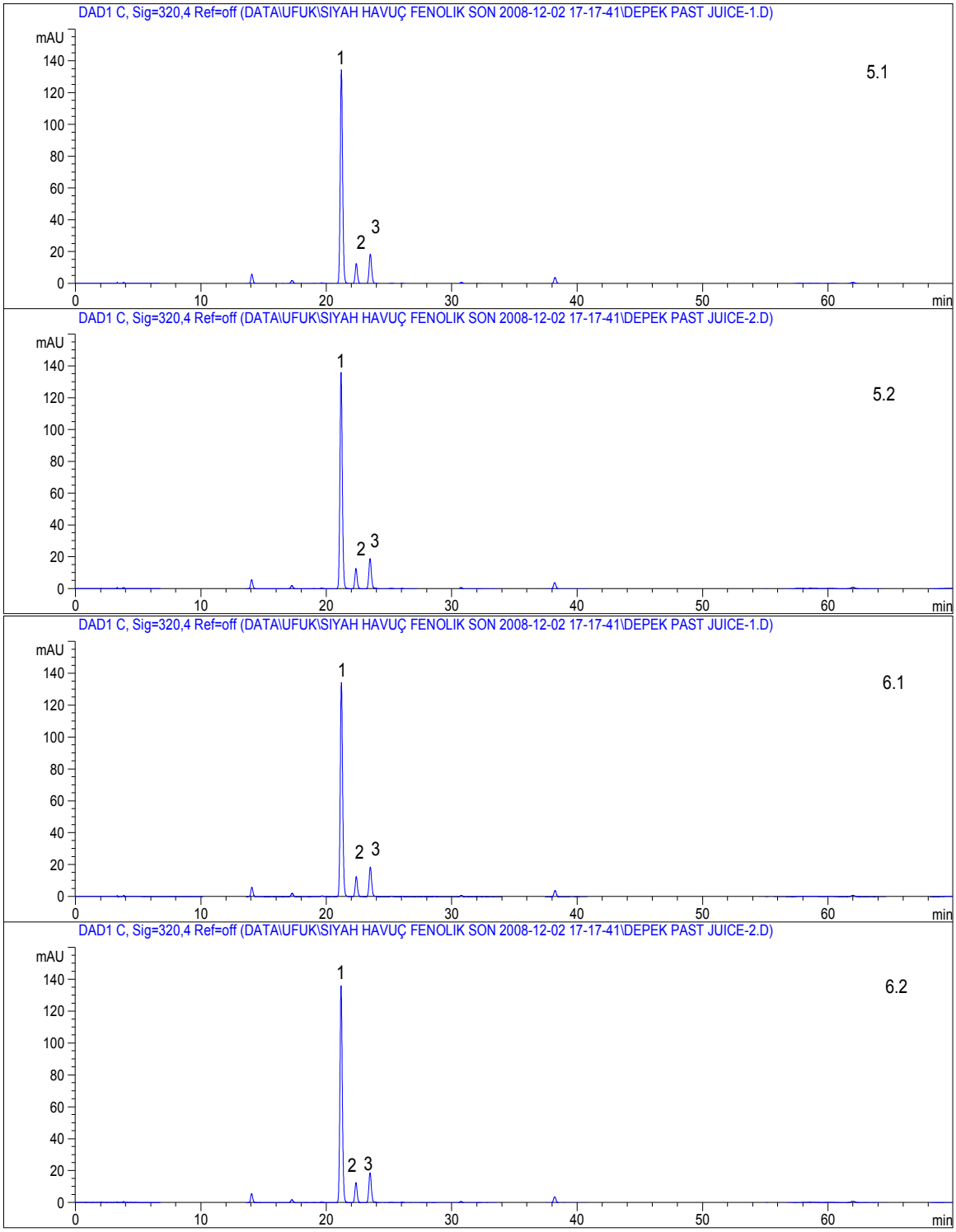
EK 2 Siyah Havuç Suyu Fenolik Kromatogramları



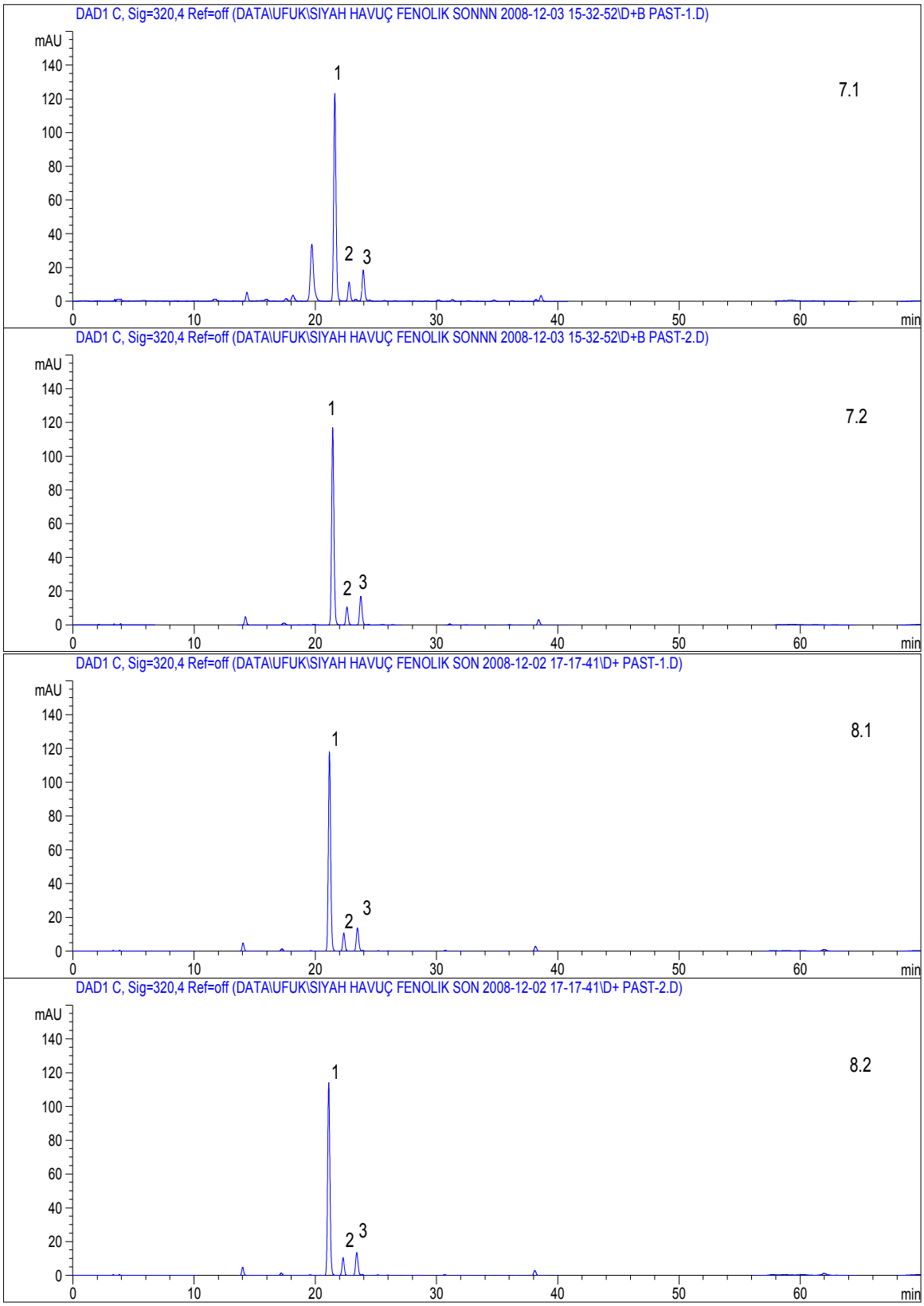
Şekil 1 Siyah havuç suyundaki fenoliklerin HPLC kromotogramları
1.1 ve 1.2 Depektinize edilmemiş
2.1 ve 2.2 Depektinize edilmiş



Şekil 2 Siyah havuç suyundaki fenoliklerin HPLC kromotogramları
3.1 ve 3.2: Depektinize edilmiş ve bentonit uygulanmış
4.1 ve 4.2: Durultulmuş (bentonit, jelatin ve kizelsol)



Şekil 3 Siyah havuç suyundaki fenoliklerin HPLC kromotogramları
5.1 ve 5.2: Depektinize edilmemiş, pastörize edilmiş
6.1 ve 6.2: Depektinize edilmiş, pastörize edilmiş



Şekil 4 Siyah havuç suyundaki fenoliklerin HPLC kromotogramları

7.1 ve 7.2: Depektinize edilmiş, bentonit uygulanmış ve pastörize edilmiş

8.1 ve 8.2: Durultulmuş (bentonit, jelatin ve kizelsol) ve pastörize edilmiş

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ufuk DERELİ

Doğum Yeri : Ermenek

Doğum Tarihi : 1985

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce, İspanyolca (Temel düzeyde)

Eğitim Durumu:

Lise : Karaman Milli Piyango Fen Lisesi (1999–2002)

Lisans : Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü (2002–2007)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (Eylül 2007–Ocak 2011)

Çalıştığı Kurumlar:

Devlet Hava Meydanları İşletmesi (2009–....)

Yayınlar:

1. Türkyılmaz, M., **Dereli, U.** ve Özkan, M. Effects of processing and storage on the antioxidant activity of black carrot juice concentrate and its relation with phenolic content. 3rd International Congress on Food and Nutrition, S Bekiroğlu (ed.), p. 136, 22-25 April 2009, Antalya.

2. Türkyılmaz, M., **Dereli, U.**, Muhacir, N., Tağı, Ş. ve Özkan, M. Effects of various juice yields on the antioxidant activity, antimicrobial activity and phenolic contents of pomegranate juice. 3rd International Congress on Food and Nutrition, S Bekiroğlu (ed.), pp. 144-145, 22-25 April 2009, Antalya.