

**KARADUT (*Morus nigra* L.) MEYVELERİNDE
ANTOSİYANİNLERİN KARAKTERİZASYONU
VE ANTİOKSİDANT ÖZELLİKLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEHMET ŞENOL

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
AĞUSTOS- 2017**

**KARADUT (*Morus nigra* L.) MEYVELERİNDE
ANTOSİYANİNLERİN KARAKTERİZASYONU
VE ANTİOKSİDANT ÖZELLİKLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEHMET ŞENOL

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**




**BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**Danışman
Prof. Dr. Yüksel KELEŞ**

**MERSİN
AĞUSTOS - 2017**

ONAY

Mehmet ŞENOL tarafından Prof. Dr. Yüksel KELEŞ danışmanlığında hazırlanan “Karadut (*Morus Nigra* L.) Meyvelerinde Antosiyaninlerin Karakterizasyonu ve Antioksidant Özellikleri” başlıklı çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 25 Ağustos 2017 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği ile Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof.Dr. Ahmet AKBAŞ	
Üye	Prof.Dr. Yüksel KELEŞ	
Üye	Yrd.Doç.Dr.F. Özlem ÇEKİÇ	

Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 06/10/2017 tarih ve 2017.38/1247 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Ayla ÇELİK
Fen Bilimleri Enstitü Müdürü

Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
 - Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
 - Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
 - Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi
- beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

25 AĞUSTOS 2017



İmza

MEHMET ŞENOL

ÖZET

KARADUT (*Morus nigra* L.) MEYVELERİNDE ANTOSİYANİNLERİN KAREKTERİZASYONU VE ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİ

Bu çalışmada, karadut bitkisinin (*Morus nigra* L) Shangri La ve Pendula çeşitleri kullanılmıştır. Taze karadut örnekleri Çankırı ve Mersin ilindeki ağaçlardan Temmuz ayında toplanmıştır. Karadut örneklerinin pH değeri, titrasyon asitliği, degradasyon indeksi ve kararlılık özellikleri belirlenmiştir. Karadut meyvelerinin toplam çözünür fenolik madde miktarı, monomerik antosiyanin miktarı ve antioksidan kapasitesi belirlenmiştir. Antosiyanin profilini belirlemek amacıyla ince tabaka kromatografisi (TLC) yöntemi ile karadut meyvelerinin içerdiği antosiyaninler ayrılmış, Rf değerleri ve maksimum ışık absorbansı ölçümleri ile antosiyanin tipleri belirlenmiştir.

Araştırılan karadut örneklerinin pH değeri Shangri La çeşidinde 4.88, Pendula çeşidinde 5.68 ve titrasyon asitliği Shangri La'da % 0.37, Pendula'da % 0.09 (sitrik asit eşdeğeri olarak) olarak bulunmuştur. Antioksidan kapasite Shangri La'da 3700 Pendula'da 8900 ve Pendula kurusunda 16900 ($\mu\text{g}/100\text{g}$ askorbik asit eşdeğeri olarak) belirlenmiştir. Toplam çözünür fenolik miktarı Shangri La'da 596, pendula'da 328, pendula kurusunda ise 944 $\text{mg}/100\text{g}$ (gallik eşit eşdeğeri olarak) olarak bulunmuştur. Monomerik antosiyanin miktarı Shangri La örneğinde 2.17 mg g^{-1} , *Morus nigra* Pendula'da 0.47 mg g^{-1} , kurutulmuş Pendula meyvelerinde 178 mg g^{-1} olarak belirlenmiştir. Degradasyon indeksi Shangri La'da % 9.32 ve Pendula'da % 15.86 arasında bulunmuştur.

Karadut meyvelerinde bulunan antosiyaninler, selüloz ince tabaka üzerinde 530 nm'de maksimum absorbansa sahip iki siyanidin lekesi oluşturmuştur. Bu lekelerden Rf değeri 0.50 olan siyanidin 3-rutinozid ve Rf değeri 0.29 olanın siyanidin 3-glikozid olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan kapasite, degradasyon indeksi, fenolikler, TLC, siyanidin, titrasyon asitliği.

Danışman: Prof. Dr. Yüksel KELEŞ, Mersin Üniversitesi, Biyoloji Ana Bilim Dalı

ABSTRACT

ANTIOXIDANT PROPERTIES AND CHARACTERIZATION OF ANTHOCYANINS IN BLACK MULBERRY (*Morus nigra* L.) FRUITS

In this study, Shangri La and Pendula varieties of black mulberry plants (*Morus nigra* L.) were used. Fresh mulberry samples were collected from the trees in Çankırı and Mersin provinces in July. The pH value, titration acidity, degradation index and stability properties of the black mulberry samples were determined. The amount of the total soluble phenolic compounds, monomeric anthocyanin and antioxidant capacity of black mulberry fruits were determined. In order to determine the anthocyanin profiles, the anthocyanin contained black mulberry fruits were separated by thin layer chromatography (TLC) method and the type of anthocyanin was determined by Rf values and maximum light absorbance measurements.

The pH values of the investigated black mulberry fruits were 4.88 in Shangri La, 5.68 in Pendula, 0.37% in Shangri La and 0.09% (as citric acid equivalent) in Pendula. Antioxidant capacity was determined as 8900 (as $\mu\text{g} / 100 \text{ g}$ ascorbic acid equivalent) in Shangri La, 3700 in Pendula and 16900 in dried Pendula fruits. The total soluble phenolic amount was found to be 596 in Shangri La, 328 in Pendula, and 944 mg / 100 g in dried pendula (as gallic acid equivalents). The amount of monomeric anthocyanin was determined to be 2.17 mg g⁻¹ in Shang La, 0.18 mg g⁻¹ in Pendula and 0.47 mg g⁻¹ in dried Pendula fruits. The degradation index was found to be 9.32 % in Shangri La and 15.86 % in Pendula.

The anthocyanins present in the black mulberry fruits formed two cyanine spots with a maximum absorbance at 530 nm on the cellulose thin layer. These spots were determined to be cyanidin 3-rutinoside with Rf value of 0.50 and cyanidin 3-glucoside with Rf value of 0.29.

Keywords: Antioxidant capacity, cyanide, degradation index, phenolics, titration acidity, TLC.

Supervisor: Prof. Dr. Yüksel KELEŞ, Mersin University, Department of Biotechnology

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmamın her aşamasında bana destek veren, bilgi, deneyim, öneri ve görüşlerini her zaman benimle paylaşan, saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Yüksel KELEŞ 'e çok teşekkür ederim. Tez çalışmalarım süresince gösterdiği fedakârlık için eşim Yrd. Doç. Dr. Derya KAYA ŞENOL'a teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim boyunca derslerine katıldığım Mersin Üniversitesi Öğretim Üyelerine teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan değerli arkadaşım Ar. Gör. Mert ÖKTEN'e teşekkür ederim. Tezimin değerlendirmesine katılan ve önerileri ile katkıda bulunan değerli jüri üyelerine teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	ii
ONAY	iii
ETİK BEYAN	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR ve SİMGELER	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. Çalışma Materyali Karadut (Morus nigra L.)	3
2.1.1. Dut Sistematığı ve Anavatanı	3
2.1.2. Ağaç ve Meyve Özellikleri	3
2.1.3. İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri	4
2.2. Karadutun Biyoaktif Bileşikleri	5
2.2.1. Fenolik Bileşikler	5
2.2.1.1. Flavonoidlerin Primer Yapısı	5
2.2.1.2. Flavonoidlerin Sekonder Yapısı	7
2.2.1.3. Flavonoidlerin Tersiyer Yapısı	7
2.2.2. Antosiyaninlerin Kimyasal Yapısı	8
2.2.3. Oksidasyon Ve Oksidanlar	10
2.2.4. Antioksidanlar	11
3. MATERYAL ve YÖNTEM	13
3.1. Karadut Meyvesi	13
3.2. Karadut Kuru Örneği	13
3.3. pH Değeri Tayini	13
3.4. Titrasyon Asitliği Tayini	14
3.5. Toplam Antioksidan Kapasite Tayini	14
3.5.1. Yöntemin İlkesi	14
3.6. Toplam Monomerik Antosiyanin Tayini	16
3.6.1. Yöntemin İlkesi	16
3.7. Toplam Çözünür Fenolik Madde Tayini	18
3.7.1. Yöntemin İlkesi	18
3.8. Antosiyaninlerin Degradasyon İndeksi Tayini	19
3.8.1. Yöntemin İlkesi	19
3.9. Antosiyanin Profilinin Belirlenmesi	21
3.9.1. Yöntemin İlkesi	21
3.10. Sıcaklık Ve Işık Koşullarında Antosiyaninin Kararlılık Testi	23
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	24
4.1. Karadut Meyvesinin pH Değeri ve Titrasyon Asitliği	24
4.2. Karadutun Antioksidan Kapasitesi	25
4.3. Toplam Monomerik Antosiyanin Miktarı	26
4.4. Toplam Çözünür Fenolik Madde Miktarı	29
4.5. Degradasyon İndeksi Analizi	31
4.6. Antosiyanin Profilinin Belirlenmesi	33
4.7. Sıcaklık ve Işık Koşullarında Antosiyanin Kararlılığı	35
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	38
KAYNAKLAR	40



TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 4.1. Karadut örneklerinin asitlik özelliklerine ilişkin analiz sonuçları	24
Tablo 4.2. Karadut örneklerinin antioksidan özelliklerine ilişkin analiz sonuçları	25
Tablo 4.3. Karadutun antioksidan kapasitesi analizine ait istatistiksel bilgiler	26
Tablo 4.4. Karaduttaki toplam monomerik antosiyanin miktarı analizi	27
Tablo 4.5. Karaduttaki toplam monomerik antosiyanin miktarı varyans analizi	28
Tablo 4.6. Karadut örneklerinin analitik özelliklerine ilişkin varyans analizi	28
Tablo 4.7. Karadut örneklerinde toplam çözünür fenolik madde miktarı analizi	29
Tablo4.8. Karadutun toplam çözünür fenolik madde miktarı varyans analizi	31
Tablo 4.9.Karaduttaki degradasyon indeksi sonuçları	31
Tablo 4.10. Karadut çeşitlerinde degradasyon indeksi varyans analizi	32
Tablo 4.11. Yalnız kuru dut örneklerinin degradasyon indeksi varyans analizi	33
Tablo 4.12. Yalnız taze dut örneklerinin degradasyon indeksi varyans analizi	33
Tablo 4.13.Shangri La çeşidi karadutun farklı sıcaklıklarda kararlılık durumları için varyans analizi	36

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Genel flavanoid iskeleti (a) ve fenilbenzopiran yapısı (b)	6
Şekil 2.2. Quercetin molekülünden rutin oluşumu	6
Şekil 2.3. Antosiyaninlerin genel formülü ve antosiyanin gruplarında yan grupların dağılımı	8
Şekil2.4. Antosiyaninlerin antioksidan aktivitesi OH gruplarının sayısındaki artışın etkisi	9
Şekil2.5. Antosiyaninlerin farklı pH'lardaki kimyasal yapıları	16
Şekil 4.1. Karadut taze ve kurularındaki antioksidan kapasitesi	26
Şekil 4.2. Karadut çeşitlerindeki toplam monomerik antosiyanin miktarı	27
Şekil4.3. Karadutlarda toplam çözünür fenolik madde miktarı	30
Şekil4.4. Karadutlarda degradasyon indeksi	32
Şekil 4.5. Karadut antosiyaninlerinin selüloz ince tabakada vermiş olduğukromatogram	34
Şekil 4.6. İnce tabaka üzerinde gözlenen iki lekenin 500-600 nm dalga boyu arasındaki absorbanları	35
Şekil 4.7. Shangri La çeşidi karadutun farklı sıcaklıklarda kararlılık durumları	36
Şekil4.8. Shangri La çeşidinden elde edilen ekstraktların farklı sıcaklıklarda 7 gün bekletildikten sonraki görüntüleri	37
Şekil4.9. Shangri La çeşidi karadutun doğrudan olmayan gün ışığında kararlılık durumları	37

KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simgesi	Tanım
AAE	Askorbik asit eşdeğeri
AVI	Antosiyanik vakuoler inklüzyonları
Cy-3-gly	Siyanidin 3 glikozit
FAD	Flavin adenindinükleotid
GAE	Gallik asit eşdeğeri
LDL	Düşük yoğunluklu kolesterol
ROT	Reaktif oksijen türleri
TA	Titrasyon asitliği
TE	Trolox eşdeğeri
TLC	İnce tabaka kromatografisi



1. GİRİŞ

Dut bitkisi, farklı iklim, toprak ve sıcaklık şartlarına yüksek uyum kabiliyeti ile ılıman, tropik ve subtropik iklim bölgelerinde yetişebilen çoklu ve mayhoş tatlı bir meyve türüdür. Anadolunun birçok bölgesinde doğal olarak bulunmaktadır. Özellikle üzüm bitkisinin yetiştiği her bölgede bulunabilir. Ülkemizde, 2.402.000 adet meyve veren dut ağacından 71.724 ton ürün elde edilmektedir [1].

Dünyada ve Türkiye’de geniş bir yayılım gösteren karadut ağaçları Haziran- Ağustos ayları arasında antosiyanin bakımından zengin meyveler vermektedir. Karadut meyveleri besleyici özellikleri nedeniyle ekonomik öneme sahiptir [2,3]. Çoğunlukla yaz aylarında taze meyveler, kış aylarında ise pekmez ve dut suyu olarak tüketilir. Halk arasında bağırsakları düzenlemek, ateşi ve kan basıncını düşürmek, ağız yaralarını tedavi etmek amacıyla kullanılmaktadır. İnsanların bilinçlenmesi ve eğitim düzeyinin artması sonucu, gıda ve içeceklerdeki antosiyaninler gibi doğal renk pigmentleri içeren ürünler tercih edilmektedir. Son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar, karadutun besleyici özellikleri yanında sağlığın korunması ve hastalıkların önlenmesinde oldukça önemli rollerinin olduğunu ortaya koymuştur [4, 5, 6].

İnsan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerinin ortaya çıkmasıyla birlikte flavonoidler ve antosiyaninler bakımından zengin meyveler üzerinde çalışmaların önemi giderek artmaktadır. Antosiyaninlerin insan sağlığı üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla laboratuvar biyotestleri (in vitro), hayvan deneyleri (in vivo), epidemiyolojik çalışmalar (popülasyon araştırmaları) ve klinik deneyleri (insan deneyleri) içeren çok sayıda biyolojik uygulamalar gerçekleştirildi. Bu uygulamalarda hedef hastalık olarak görme kusurları, sinirlerin korunması, kanser, kalp ve damar hastalıkları gibi bazı sağlıksız durumlar in vivo, epidemiyolojik, klinik, *in vitro* araştırma yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Ayrıca antosiyaninler, aflatoksin biyosentezinin engellenmesi, karaciğer işlev bozuklukları, hipertansiyon, DNA’nın ve zar lipidlerinin oksidasyondan korunması, özellikle gece görüşünün iyileştirilmesi, sinirlerin korunması, yaşlanmaya bağlı sinir bozukluklarını azaltması, kalp-damar hastalıklarına karşı koruma, kalp krizi riskinin azaltılması, karsinogenezin başlangıç evresini durdurulması gibi görevler üstlenir.

O₂ molekülü canlı hücre içinde gerçekleşen oksijenli solunumda kullanılan hücrede mutlak olarak bulunması gereken bir moleküldür. Fakat canlı hücre için son derece elzem olan bu yararlı molekülün hücrelerin normal metabolizmaları sırasında ve çevrenin olumsuz etkisiyle süperoksit radikali (O₂⁻), hidroksil radikali (-OH), singlet oksijen (¹O₂) ve radikalik olmayan hidrojen peroksit (H₂O₂), peroksinitrit (ONOO⁻) gibi “reaktif oksijen türleri (ROT)” yani serbest radikallere dönüştüğü görülmektedir. Meydana gelen bu serbest radikaller

organizmada lipidler, nükleik asitler, proteinler ve karbonhidratlar gibi biyolojik moleküllere saldırarak bu yapıları ciddi hasara uğratar. Antosiyanin gibi antioksidan maddeler, serbest radikallerin neden olduğu reaksiyonları durdurarak oksijeni ve metalleri bağlayarak oksidasyonun neden olduğu zararları engeller [7, 8].

Meyve ve sebzeler içerisinde fenolik madde ve özellikle antosiyanince zengin olan meyveler yüksek antioksidan kapasiteye sahiptir [9]. Yapılan çalışmalar karadutun antioksidanlarca zengin olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Organizmanın antioksidan kapasitesinin yetersizliği durumunda, metabolik reaksiyonlar hücreler için zararlı olmakta ve önlenemeyen bu zararlı reaksiyonlar neticesinde deride akne ve kırıxıklık, premature yaşlanma, koroner damar hastalıkları, diyabet, Alzheimer, Parkinson ve değişik kanser türlerinin oluşmasına zemin hazırlamaktadır [10, 11, 12].

Chen vd. (2005) dut meyvelerinde yaptıkları araştırmada, oldukça fazla miktarda antosiyanin bulunduğunu ve bu antosiyaninlerinde siyanidin 3-rutinozid ve 3-siyanidin 3-glikozit olduğu belirlenmiştir [13]. Siyanidin 3-sophoroside, pelargonidin 3-glikozit ve pelargonidin 3-rutinozitin akciğer kanser hücrelerine saldırması ve yayılması üzerine engelleyici etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir [14]. Heinonen ve ark. (1998), LDL (düşük yoğunluklu kolesterol) oksidasyonunun inhibisyonunda antioksidan aktivitesi en yüksek antosiyanidin delfinidin olduğunu bunu sırasıyla siyanidin, malvidin ve pelargonidin izlediğini belirtmişlerdir [15].

Bu tez çalışmasında, Türkiye’de yetişen iki karadut çeşidinin antosiyanin karakterizasyonu ve antioksidan özelliklerini belirlemek amaçlanmıştır. Karadut meyvelerinden antosiyanin ekstraksiyonunun yapılması ve miktarlarının belirlenmesi yanında ince tabaka kromatografisi ile ayrımı sayesinde meyvede bulunan antosiyanin tiplerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca karadut meyvelerinin pH değerleri, titrasyon asitliği, antioksidan kapasitesi, toplam fenolik madde miktarı gibi özelliklerinin belirlenmesi amacıyla analizler gerçekleştirilmiştir. Antosiyaninlerin gıda sektöründe kullanımına temel oluşturmak üzere antosiyanin değredasyon indeksinin belirlenmesi taze ve kuru örnekler arasındaki stabilite farklılıklarının ölçülmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Çalışma Materyali Karadut (*Morus nigra* L.)

2.1.1. Dut Sistematığı ve Anavatanı

Magnoliophyta (kapalı tohumlular) bölümünden, Magnoliopsida (iki çenekliler) sınıfından, Urticales takımına ait olan dut bitkisinin familyası *Moraceae* olup, *Morus* L. cinsinde yer almaktadır. *Morus* cinsine ait 24 tür ile 100'den fazla çeşit bulunmaktadır [16].

Ancak dutun yaygın olarak karşılaşılan 14 farklı türü bulunmaktadır. Bunlar karadut (*Morus nigra*), beyaz dut (*Morus alba*), Çin dutu (*Morus australis*), Afrika dutu (*Morus mesozygia*), Moğol dutu (*Morus mongolica*), Teksas dutu (*Morus microphylla*), kırmızı dut (*Morus rubra*), Himalaya dutu (*Morus serrata*), Ihlamur yapraklı dut (*Morus tiliaefolia*), *Morus trilobata*, *Morus cathayana*, *Morus liboensis*, *Morus notabilis*'dir [17].

2.1.2. Ağaç ve Meyve Özellikleri

Meyvesinden, yapraklarından ve ağacından faydalanmak amacıyla yetiştirilen dut ağacı, güney yarım kürenin tropik bölgelerinden kuzey yarım kürenin subtropik bölgelerine kadar farklı sıcaklıklarda ve çok çeşitli iklim, topografik özellikler ve toprak şartlarında yetişebilmektedir [18, 19]. Bu meyve; Çin, Japonya, Kuzey İran, Suriye, Suudi Arabistan, Yunanistan, Fransa, İtalya, İspanya, Rusya, Güney Asya bölgelerinde ve ayrıca; Amerika Birleşik Devletleri, Avustralya ve Hindistan, Akdeniz ülkeleri, Orta Avrupa ve kısmen Avrupa'nın kuzey bölgelerinde de yetişmektedir [20, 21]. Karadutun yetiştirildiği ülkelerin başında Hindistan, Çin ve Japonya gelmektedir. Bu ülkelerde dut, yaprağı için yetiştirilir. Dut yaprağı ipek böceği yetiştiriciliğinde kullanılmaktadır [18]. Bu ülkeleri, aralarında Türkiye ve Yunanistan'ın bulunduğu pek çok Avrupa ülkesi takip etmektedir ve bu ülkelerde ise dut, yaprağından çok meyvesi için yetiştirilir [22, 23]. Anadolu'da da yüksek kaliteli karadut yetiştirilmektedir [24]. Dutun Çin ve Japonya'daki kültürü M.Ö. 4000 yıllarına dayanmaktadır. Araştırmacıların çoğu, dutun Japonya'nın doğal bitkisi olduğunu kabul etmektedir [25].

Beyaz dutun anavatanı Asya iken, kırmızı dutun Kuzey Amerika ve Türkiye, karadutun ise İran'dır. Ülkemizde ve Kuzey Amerika'da beyaz dutun ipekböceği yetiştiriciliği için geniş çapta kültürü yapılmaktadır.

Koyuncu ve Vural (2003) yaptıkları çalışmada, *Morus nigra*'nın ortalama olarak 15-20 m boyunda ağaçlar oluşturduğu 30 m'ye kadar boylanmalarına rastlandığını bildirmişlerdir [26]. Karadut ağacı çoğunlukla geniş, yuvarlak tepeli, toplu bir taç yapısına sahiptir. Karadut meyvesi

çoklu meyve (multiple) yapısındadır. İki ucu basık oval-silindir şeklinde, uzunluğu yaklaşık 2,5 cm olan karadut meyvesi pek çok meyve türüne göre özel bir aromaya sahip olup, siyahımsı-mor renkli, etli-sulu ve mayhoş tattadır.

Morus nigra var. *Pendula* (ters dut); kışın yaprak döken, yaklaşık 2 metre kadar boylanabilen sarkık dallı bir çalıdır. Meyve fındıksı meyve olmakla birlikte çanak yaprakların etleşmesi sonucu bileşik meyve görünümünü alır. Güneşli yerlerde ve ılıman iklimlerde yetişir. Her türlü toprakta yetişmekle birlikte derin ve verimli toprakları tercih eder. Soğuklara dayanıklıdır, tek olarak park ve bahçelerde, yol kenarlarında ve orta refüjlerde süs olarak kullanılır. Dalları aşağıya doğru sarkıktır. Yaprakları geniş yumurta şeklinde 10-15 cm, almaçlı dizili, dip kısmı kürek şeklinde kenarları düzensiz kaba dişlidir. Olgun meyve siyah renkte ve bileşik meyve tipindedir.

Morus nigra var. *Shangri La*; tombul ve çok hoş lezetli, çok çekirdekli meyvelidir. Orta büyüklükteki bir ağaca sahip, meyveleri tatlı-tart, dolgun ve siyah renklidir. Kalp şeklindeki yaprakları ve güzel ağaç görünümü ile peyzajda güzel manzara oluşturur. Florida kökenli olmakla birlikte kuzey kesimlerde daha iyi gelişir. Zararlı ve hastalıklara dayanıklıdır. Kuraklık ve sıcaklığa toleranslıdır. Nisandan yaz boyunca olgunlaşır. Kendi kendine tozlaşır.

2.1.3. İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri

Yapraklarından beden ve zihin gevşetici, rahatlatıcı etkiye sahip çaylar yapılan, meyvesinden de şarap, jöle, reçel, pekmez gibi çeşitli ürünlerin elde edildiği dut, halk arasında bağırsakları düzenlemek, ateş ve kan basıncını düşürmek, ağız yaralarını tedavi etmek amacıyla kullanılmaktadır. Yüksek oranda antosiyanin içermesi nedeniyle kalp-damar hastalıklarını engellemekte, kansere karşı koruma sağlamaktadır. Dutun biyolojik ve farmakolojik özellikleri hakkında günümüzde çok az bilgiye sahip olunmasına karşın, içecek piyasasında dut ağacının yapraklarından elde edilen içeceklerin önemi artmaktadır [27].

Modern tıpta dutun tek kullanımı karaduttan elde edilen şuruptur [28]. Karadut şurubu gargara olarak ağız ve boğaz hastalıklarına, özellikle de bebeklerde pamukçuklara karşı uygulanır. Karadut kök ve gövde kabukları idrar söktürücü ve tenya düşürücü olarak bilinir. Meyveleri iştah açar. Karadut yapraklarından, hafif kan şekerini düşürücü etkisi nedeniyle faydalanılır [29].

Dut meyvesi, insan vücudunun sentezleyemediği esansiyel yağ asitlerini de (omega-3, omega-6 vb.) içermektedir. Bu yağ asitleri uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri olup, sağlıklı hücre membranının şekillenmesi, beyin ve sinir sisteminin fonksiyonlarının uygun şekilde yürütülebilmesi ve 'eikosanoid' olarak adlandırılan hormon benzeri maddelerin üretimi

için gereklidirler [30]. Kök ve gövde kabukları solucan düşürücü olarak halk arasında kullanılmaktadır [31].

2.2. Karadutun Biyoaktif Bileşikleri

2.2.1. Fenolik Bileşikler

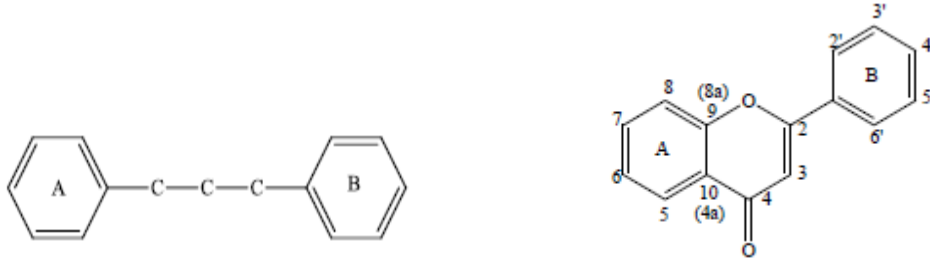
Flavonoidler, sarı renkli olmaları nedeniyle Latince'de 'sarı' anlamına gelen 'flavus' sözcüğünden türetilerek 'flavonoid' adını almıştır. Angiospermiler boyunca meydana gelen ve görünür spektrumda en çok renk sağlayan en önemli çiçek pigmentleridir. Çeşitli bitkilerde flavonoidlerin, mikroorganizmalara sinyal verme, patojenlere karşı koruma, biyotik ve abiyotik streslerde iyileştirme, oksinleri taşımayı etkileme ve bitki üretkenliğini sağlama gibi fonksiyonlara hizmet ettiği görülür. Fakat flavonoidlerin en belirgin ve en iyi karakteristik özellikleri böcek ve hayvan tozlaştırıcılar için çiçek görsel ipuçları oluşturmaktır [32].

Bunun yanında, yaygın olarak kullanılan ve besinsel özelliği olmayan ve hastalıklara karşı koruyucu özelliği olan gıdalarla birlikte flavonoidler de diyetel antioksidanlar olarak adlandırılır. Koruyucu etkisinin en önemli nedeni antioksidan etkilere sahip olmaları ve serbest radikalleri yakalama kapasiteleridir. Yine flavonoidlerin antioksidan özelliklerinin yanında antiinflamatuvar, antiviral, antialerjik, antitrombotik gibi özellikleri de bulunur [33, 34, 35]. Flavonoidleri P vitamini olarak kabul eden görüşler de vardır [36].

Flavonoidler bitkilerde, enzim inhibitörü ve ışıktan koruma, bulaşıcı hastalıklara karşı savunma gibi fonksiyonlara sahiptir [37, 38, 39]. Bazı flavonoidler UV ışınlardan koruma özelliklerine sahip olmaları nedeni ile kozmetik ürünlerde kullanılmaktadır. Antimikrobiyal ve iltihaplanmayı önleyici ve hatta iltihaplanmayı tedavi edici özellikleri de vardır [40, 41, 42].

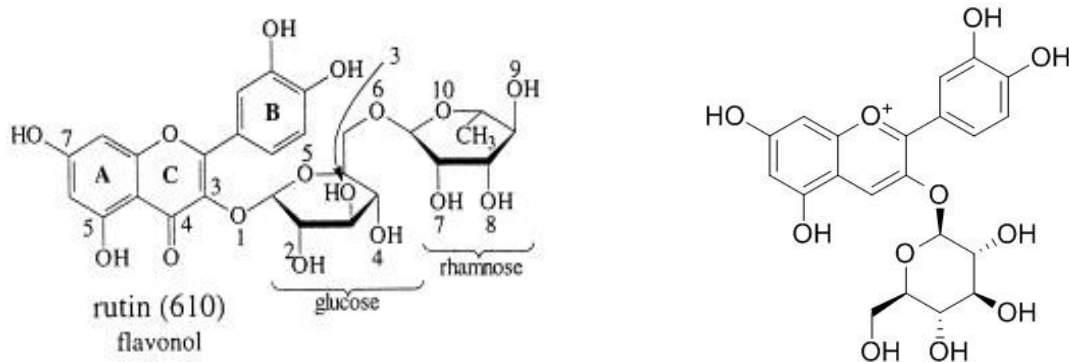
2.2.1.1. Flavonoidlerin Primer Yapısı

Flavonoidler 15 karbon (C) atomu tabanlı 2-fenilbenzopiran (difenil propan) yapısı gösterirler. Bu yapıları nedeniyle polifenolik bileşikler olarak kabul edilir. Bu 15 karbon atomu C6-C3-C6 konfigürasyonunda düzenlenmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Genel Flavonoid İskeleti (solda) ve fenilbenzopiran yapısı (sağda)

Fenil benzopiran yapısı A, B, C halkalarından meydana gelmiştir. A halkası glikoz metabolizması sonucu oluşan asetil Co-A'nın karboksilasyonu ile oluşan malonil Co-A'nın 3 molekülünün kondensasyonu ile oluşur. B ve C halkaları ise yine glikoz metabolizmaları sonucu oluşan şikimik asit üzerinden sinamik asit gibi fenil propanoid bileşiklerden oluşmuştur. Flavonoidlerin çeşitli sınıfları C halkasının oksidasyon derecesi ile belirlenir. Aynı zamanda fenolik halkaların belirli bölgelerine bağlanan gruplar ve bağlanma şekilleri flavonoidlerin çeşitlenmesine neden olurlar. Bir flavonoid pigmentinin temel yapısal özellikleri çift bağ konjugasyon ve oksijenasyon (hidroksilasyondan gelen) derecelerini içerir. Örneğin bir flavonol olan kuersetinin 3. karbon atomuna bağlı -OH grubuna rutinozun konjugasyonu ile oluşan flavonoid rutin olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.2.) [43].



Şekil 2.2. Quarcetin molekülünden rutin oluşumu. Rutinoz (6-O-alfa-ramnozil-D-glikoz) molekülü kuersetinin C halkasındaki 3. Karbona bağlanır (solda). Siyanidin 3-glikozit molekül formülü (sağda).

Flavonoid pigmentlerin içinde, kalkonlar, aurone ve flavonoller daha sınırlı bir rol oynarken antosiyaninler en baskın olanlarıdır.

2.2.1.2. Flavanoidlerin Sekonder Yapısı

Antosiyaninlerin önemli bir karakteristik özelliği, renk yoğunluğunda ve tonunda hatta renk kaybında pH'ye bağlı olarak renk değişimlerini geçirmesidir. Bunun sebebi ise, bir antosiyanin molekülünün sulu çözeltilerde kompleks düzenlenmelere uğramasıdır, çevresinin pH değerlerine bağlı olarak farklı renkli ya da renksiz formları da mevcuttur [44, 45]. Antosiyaninlerin kararlı formları sadece asidik pH değerlerinde bulunur. Bu, kırmızı ya da turuncu *flavylium* katyon formudur.

Yüksek pH değerlerinde diğer renkli formları genellikle kararsız olarak bulunur. pH nötrale doğru arttıkça nötral kuinonoidal baz genellikle mor rengi oluşturur ve alkalın pH değerlerinde, mavi anyonik kuinonoidal bazların oluşması ile takip edilir. Flavylium katyonu ve kuinonoidal baz formlarının her ikisi de çiçek pigmentasyonunda önemlidir [44].

Antosiyanin kimyasının başka yüzü de hafif asidik koşullar (pH 3-6)'da renksiz formlarda mevcut olmasıdır. Bunun nedeni de bu koşullar altında antosiyaninin *flavyum* katyonu hidrasyona savunmasız kalır ve hızlı bir reaksiyonla onları renksiz *hemiasetale* ve sonra da kalkona dönüştürür. Hücre vakuollerinde antosiyaninlerin biriktirildiği ve birçok türün petal hücrel vakuol ortamının hafif asidik olduğu, farklı mekanizmalarla hidrasyonun önlenildiği ve karalı renkli antosiyanin formların oluşturulduğu belirlenmiştir. Bu mekanizmaların çoğu üçüncül yapı oluşturulması merkezlidir. Vakuolde biriktirilen pigmentli cisimler antosiyanoplast veya AVI (antosiyanik vakuoler inklüzyonlar) olarak adlandırılır [46].

Malonil antosiyaninlerin diğer antosiyaninlerden daha kararlı olduğu gözlenmiştir [47]. Malonilasyon, malonil gruplarının proton kaybından kaynaklanan asitlik nedeni ile antosiyaninlerin renksizleşmesini engelleyebilir.

2.2.1.3. Flavanoidlerin Tersiyer Yapısı

Son yıllarda araştırmalar, flavonoidlerin üçüncül yapısının çiçek rengi üzerinde birincil öneme sahip olduğunu ortaya koymuştur. Flavonoidlerin üçüncül yapısı antosiyaninlerin kararlılığı için çok önemlidir. Flavonoid renginde çeşitlilik oluşturmak için üçüncül yapılar da önemli bir mekanizmadır (özellikle antosiyaninde). Üçüncül yapı aynı zamanda, pigmentler tarafından emilen ışığın miktarında ve ışığın dalga boyunda değişikliğe sebep olur [45].

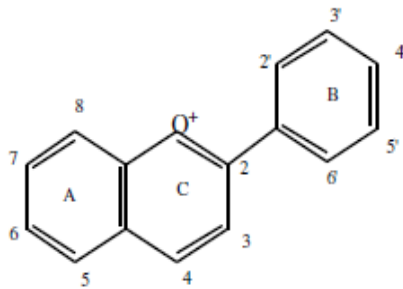
Moleküller arası eş pigmentasyonunda, bir tersiyer yapısı, antosiyanin molekülünün iki eş pigment arasında sandviç gibi yerleşmesi gibi moleküllerinin dikey istiflemesi ile oluşturulur [48].

Eş pigmentler genellikle flavonoller veya flavonlar gibi diğer flavonoidlerdir. Fakat antosiyaninlerin varlığı bu eş pigmentasyon komplekslerini daha kararlı hale getirir. İntermoleküler eş-pigmentasyon aromatik asitlerle poliester oluşturan çok kompleks antosiyaninler için kararlılık sağlamaktadır [48].

2.2.2. Antosiyaninlerin Kimyasal Yapısı

Antosiyanidinler, doğal olarak antosiyanin adı verilen glikozit formunda bulunmakta olup bazı şekerler ve şeker olmayan (aglikon) maddelerden meydana gelmiştir. Aglikon kısmını antosiyanidinler oluşturmaktadır (Şekil 2.3.). Antosiyaninler 400-800 nm arasındaki görünür ışığı soğurma yeteneğine sahiptir ve bu nedenle pigmenttirler. Antosiyaninler en uzun dalgaboylu ışığı absorbe ederler ve turuncu, pembe, kırmızı, magenta, mor, mavi ve mavi-siyah çiçek renklerini oluştururlar [49, 50]

Antosiyanin pigmentlerin renkleri birinci seviyede B halkasının oksijenasyon derecesine bağlıdır. Turuncu ve pembe renkler pelargonidin türevlerinden, kırmızı renkler siyanidin türevlerinden ve mor - mavi renkler delfinidin türevlerinden kaynaklanmaktadır [51]. C halkasının 3. karbonuna bağlı OH grubunun eksikliği durumunda, soğurdukları dalga boyu önemli ölçüde farklılaştığından sarı, turuncu, parlak kırmızı çiçek renklerini oluştururlar [52, 53].



Aglikon	3,5,7	3'	4'	5'
Delfinidin	OH	OH	OH	OH
Siyanidin	OH	OH	OH	H
Pelargonidin	OH	H	OH	H
Malvidin	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃
Peonidin	OH	OCH ₃	OH	H
Petunidin	OH	OCH ₃	OH	OH

Şekil 2.3.Antosiyaninlerin genel formülü ve antosiyanin gruplarında yan grupların dağılımı [54].

Günümüzde, 22 antosiyanidin ve 275 antosiyanin bilinmektedir [55]. Antosiyaninler arasındaki farklılıklar; moleküldeki hidroksil ve metoksil gruplarının sayısı ve konumu, moleküle bağlanan şekerlerin sayısı, türü ve bağlanış pozisyonu, moleküldeki şekerlere bağlı bileşiklerin türünden kaynaklanmaktadır [56, 57].

Genel olarak bitkilerde yaygın olarak rastlanılan antosiyanidinler; siyanidin (Cy), pelargodin (Pg), peonidin (Pn), delfinidin (Dp), petunidin (Pt) ve malvidin (Mv)'dir (Şekil 3),

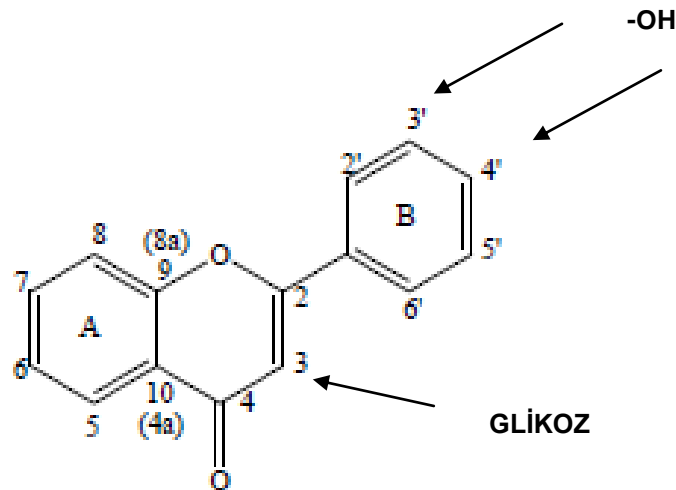
Meyve ve sebzelerde en yaygın bulunan antosiyanidin %50 oranı ile Cy'dir. Dp, Pg ve Pn %12, Pt ve Mv ise %7 oranında bulunmaktadır [43].

Ayrıca pH, metal iyonları ve kopigment varlığı yanı sıra işleme ve depolama koşulları da antosiyaninlerden kaynaklanan renk yoğunluğunu etkilemektedir [44].

Antosiyaninler düşük pH değerlerinde mor-kırmızı, yüksek pH değerlerinde ise yeşil-mavi bir renk alırlar [45]. Bu nedenle aynı antosiyanin çeşitli bitkisel dokularda farklı renkte olabilmektedir [46]. pH değerindeki değişimin renk yoğunluğunu etkilediği ve pH 8.1 değerinde petanin için maksimum renk yoğunluğuna ulaşıldığı saptanmıştır [47]. Antosiyanin kaynaklı rengin farklı işlem koşullarında korunabildiği görülmüştür. Örneğin mor patatesten izole edilen petaninin renk kararlılığı 10 °C'de ve pH 4'de 60 gün depolamadan sonra %84'den fazla oranda korunduğu belirlenmiştir [58].

Antosiyaninlerle kompleks oluşturarak, daha kararlı bileşik oluşturan maddelere kopigment denir. Antosiyaninler kopigmentlerle tersiyer yapıyı oluşturur. Antosiyanin kopigment kompleksi renk yoğunluğunu artırır ve antosiyaninleri daha kararlı hale getirir. Flavanoidler, aminoasitler, organik asitler ve hatta antosiyaninlerin kendileri kopigment olarak davranan maddelerdir [47]. Açillenmiş antosiyaninler bakımından zengin mor havuç, kırmızı turp ve kırmızı lâhana kopigmentasyon nedeni ile büyük bir renk kararlılığı gösterirler [58].

Antosiyaninlerin yapıdaki -OH sayısının artışı, B halkasındaki o-dihidroksi yapı, 3'.ve 4'. karbona -OH gruplarının bağlanması antioksidan aktiviteyi artırmaktadır (Şekil 2.4.) [59].



Şekil 2.4. Antosiyaninlerin antioksidan aktivitesi OH gruplarının sayısındaki artışa bağlıdır.

Genel olarak, 3. karbona glukoz bağlanmasıyla oluşan antosiyaninlerin antioksidan aktivitesi daha yüksektir (Şekil 4) [48, 59]. Yapıya katılan seker sayısı değiştikçe antioksidan aktivite de değişir, 3 ve daha fazla seker ilavesi antioksidan aktiviteyi azaltır [60,61].

In vitro koşullarda, düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonunu önleme açısından antosiyanidinler, büyükten küçüğe doğru delphinidin > siyanidin > malvidin > pelargonidin olarak sıralanmaktadır. Bu sıralamada, B halkasına bağlanan OH grubu sayısı arttıkça antioksidan aktivitenin arttığı bildirilmektedir [62].

2.2.3. Oksidasyon ve Oksidanlar

Bir atom veya molekül dış orbitallerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron bulunduruyorsa “serbest radikal” (SR) olarak tanımlanır. Bu tip moleküller, ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler [63].

Organizmaların normal metabolizmaları sırasında ve çevrenin olumsuz etkileri (pestisidler, toksinler, çözücüler, stres, radyasyon, sıcaklık, kuraklık vb.), gibi çeşitli dış faktörlerin etkisiyle serbest radikaller meydana gelmektedir. Serbest radikaller dış orbitallerinde ortaklanmamış elektron bulunduran, kısa ömürlü, reaktif ara moleküllerdir. Serbest radikallerin en önemlileri süperoksit radikali (O_2^-), hidroksil radikali ($\cdot OH$), singlet oksijen (1O_2) ve radikalik olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) ve peroksinitrit ($ONOO^-$) olup “reaktif oksijen türleri” (ROT) olarak bilinirler. ROT organizmada lipidler, nükleik asitler, proteinler ve karbonhidratlar gibi biyolojik moleküllere saldırarak bu yapıları ciddi hasara uğratar. Bu yüzden yaşlanma, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, immün sistem hastalıkları, katarakt, diyabet, böbrek ve karaciğer hastalıkları gibi pekçok hastalıktan sorumlu tutulurlar [65, 66]. Süperoksit radikali, tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur [63, 65].

Hidrojen peroksit (H_2O_2), moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu H_2O_2 oluşur. H_2O_2 bir radikal olmadığı halde, ROT içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli rol oynar. Çünkü geçiş metal iyonları varlığında Fenton reaksiyonu sonucu; süperoksit radikali varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve daha çok hasar verici olan hidroksil radikaline dönüşür [66].

Hidroksil radikali geçiş metalleri varlığında H_2O_2 'nin indirgenmesiyle (Fenton reaksiyonu) oluşur. Bununla birlikte suyun yüksek enerjili iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalması sonucu da oluşur. Biyolojik sistemlerdeki en reaktif ve hasar verici radikal türüdür. Yarılanma ömrü çok kısa olmasına rağmen ortamda rastladığı her biyomolekülle tepkimeye girer ve oluştuğu yerde büyük hasara sebep olur [63, 67].

Singlet oksijen (1O_2), moleküler oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle singlet oksijen oluşur.

Nitrik oksidin süperoksit radikaliyle etkileşmesi sonucu oluşan peroksinitrit ($ONOO^-$), nitrik oksitin toksisitesinden sorumlu başlıca bileşiktir.

Radyasyon ve çevresel ajanlar (hava kirliliği, pestisidler, sigara dumanı, çözücüler, anestezipler, aromatik hidrokarbonlar), Antineoplastik ajanlar (nitrofurantoin, bleomisin, doxorubicin, adriksimicin), ROT kaynaklarından bazılarıdır.

Oksidatif stres “oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar yönüne kayması ve hücre hasarına yol açması” olarak tanımlanır [65]. Oksidatif stresin, ROT’ların neden olduğu hücre hasarları sonucu birçok hastalığa katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Yapılan pek çok çalışmada ülseratif kolit [68], iskemi/reperfüzyon hasarı [69, 70], ateroskleroz [63], yaşlanma [71], diabetes mellitus [67], Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı [72, 73], sigara kullanımı [74, 75] ve hava kirliliğinin [76] neden olduğu rahatsızlıklar, KOAH [77] gibi akciğer hastalıkları, çeşitli kanser türleri, felç, hipertansiyon; romatoid artrit ve multiple skleroz gibi otoimmün hastalıklar, alerji, astım, septik şok, inflamasyon, akut pankreatit, yaşlanmaya bağlı maküler hastalıklar ve katarakt [63, 65, 78] gibi klinik durumlara serbest oksijen radikallerinin katıldığı belirtilmiştir.

Biyolojik sistemlerde en önemli radikaller, serbest oksijen radikalleri (SOR) olmakla beraber; C, N, S türevi olan radikaller ve inorganik moleküller de vardır. Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Mo^{5+} gibi geçiş metallere de ortaklanmamış elektronları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Fakat bu iyonlar reaksiyonları katalizlediklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar [67].

Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller, eozinofiller ve fagositik lökositler, çeşitli biyolojik hedeflerin etkisiz hale getirilmesini sağlayan ve enfeksiyona karşı vücudu koruyan hücrelerdir. Bu faaliyetler sırasında çeşitli serbest oksijen radikalleri (süperoksit anyonu, H_2O_2 , hidroksil radikali ve hipoklorik asit) oluşur. Fagosite edilmiş mikroorganizmalar bu ürünlerin etkisiyle öldürülür. Ancak bu oksidan ürünler hücrelerin antioksidan savunma güçlerini aştığında normal konakçı hücrelere zarar verirler.

Vücutta, pigmentlerin (flavin içeren nükleotidler, retinal, bilirubin) oksijenli ortamda ışığı absorblamasıyla, O_2 ’nin dismutasyon tepkimesi sırasında, porfirya gibi porfirin metabolizması hastalıkları da oluşabilir [63, 64].

2.2.4. Antioksidanlar

Antioksidan maddeler, serbest radikallerin neden olduğu reaksiyonu durdurarak, oksijeni ve metalleri bağlayarak ve oksidasyonun teşvik etmiş olduğu zararları engeller [7, 8].

Yapılan epidemiyolojik çalışmalarla reaktif oksijen türlerine karşı bitkisel kaynaklardaki fitonutrientlerin yararlı olduğu; meyve ve sebzelerin koruyucu etkilerinin içerdikleri askorbik asit (C vitamini), α -tokoferol (E vitamini), karotenoidler, glutatyon, flavonoidler ve fenolik asitler gibi doğal bileşiklerden dolayı olduğu bildirilmiştir [79].

Antioksidanlar serbest radikallerin neden olduğu zararlı etkileri, düşük yoğunluklu lipoproteinleri (LDL) ve lipoprotein oksidasyonunu önleyerek sağlık üzerinde olumlu etkiler yapmaktadır [7, 80]. Fenolik bileşiklerin antialerjik, antiinflamatuvar, antidiyabetik, antimikrobiyal, antipatojenik, antiviral ve antirombotik etkiye sahip olduğu yapılan pek çok araştırma ile tespit edilmiştir [7, 58].

Antioksidanlar endojen (doğal) ve ekzojen (çevresel) kaynaklı veya enzim ve enzim olamayan antioksidanlar olarak sınıflandırılabilir. Enzimler, metal iyonlarını bağlayan proteinler ve suda ve yağda çözünen radikal tutucularıdır [65]. Enzim olan antioksidanlar; Süperoksit dismutaz, katalaz, Glutasyon peroksidaz, Glutasyon redüktaz, Glutatson S transferaz, Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz şeklinde sıralanabilir.

Serbest radikallere karşı organizmadaki ilk savunma SOD enzimiyle gerçekleşir. Katalaz enzimi, peroksizomlarda yerleşmiş dört alt birimden oluşan bir hemproteindir. H_2O_2 'nin yıkılmasını sağlar. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), karaciğerde endojen oluşan H_2O_2 seviyesini düzenlemede diğerleri ile birlikte rol oynar. Glutasyon redüktaz (GSH-Red), GSH-Red prostetik grubu flavin adeninükleotid (FAD) olan, dimerik yapıda sitozol ve mitokodride bulunan bir enzimdir [65].

Ekzojen antioksidanlar vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olarak sınıflandırılabilir. α -tokoferol (E vitamini), β -karoten, askorbik asit (C vitamini), folik asit vitamin olan ekzojen antioksidanlardır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Yaş ve kuru karadut örneklerinde, pH değerleri, titrasyon asitliği, antioksidan kapasitesi, monomerik antosiyanin miktarı, toplam fenolik madde miktarı, degradasyon indeksi analizi ve ince tabaka kromatografisi ile antosiyanin profilinin belirlenmesi işlemleri yapılmıştır.

3.1. Karadut meyvesi

Bu araştırmada *Morus L.* cinsine ait *Morus nigra L.* (karadut) kullanılmıştır. Ülkemizin yaklaşık her iklim bölgesinde çokça yetiştirilebilen *Morus nigra*, çoklu meyve (multiple) yapısına sahip iki ucu basık oval-silindir şeklinde, özel bir aromaya sahip, siyahımsı-mor renkli, etli-sulu ve mayhoş tattadır. Tezde kullanılan karadut, ihtiyaç durumuna göre farklı yerlerden ve meyve verim zamanında taze olarak temin edilmiştir. Antosiyanin ve diğer antioksidanlarca çok zengin olması ve insan sağlığı bakımından çok değerli olması, insanların rahatça bu meyveyi temin edebilmesi nedeniyle karadut tercih edilmiştir.

3.2. Karadut Kuru Örneği

Araştırma materyali Çankırı yöresinden *Morus nigra* Pendula ve Mersin yöresinden *Morus nigra* Shangri La olmak üzere 2 farklı yöreden 2 farklı karadut çeşidi sağlanmıştır. Ve bunlardan elde edilen karadut kurusu örnekleri elde edilmiştir. Meyve örnekleri 2016 yılı Haziran-Temmuz döneminde sağlanmıştır. Örnek çeşitlerinden biri kurutulmak suretiyle 3. bir örnek olarak kullanılmıştır. *Morus nigra* Pendul kodlu yaş karadut örneğinden 11.79 g darası alınmış petri kabında tartılarak 70°C'de 17 saat süreyle kurumaya bırakılmıştır. Örneğin kuruması sonucu 3 g kuru ağırlık oluşmuştur. Duttaki su oranı yaklaşık % 75 olarak ölçülmüştür. Kuru örneğe ihtiyaç duyuldukça yetecek kadar *Morus nigra* Pendula çeşidi aynı şekilde kurutulmuş kullanılmıştır. Buna ek olarak degradasyon indeksi ölçümünde *Morus nigra* Shangri La örnek kurusu da kullanılmıştır.

3.3. pH değeri tayini

Her üç örnekten 1g alınarak 10 mL saf suda ekstrakt edip süzülerek karadut suları elde edildi. WTW PH 315 İ / SET markalı pH metre aleti ile her bir örnek ölçüldü.

3.4. Titrasyon asitliği tayini

Titrasyon asitliği, pH metre ile izlenen titrasyonla saptanmıştır. Örnekler pH 8.1'e 0.1 N NaOH çözeltisi ile titre edilmiş ve harcanan baz çözeltisi miktarından titrasyon asitliği (g L⁻¹ sitrik asit) olarak hesaplanmıştır [81].

2 g NaOH 0.5 L saf suda çözündüğünde 0.1 N NaOH elde edildi. Her üç örnekten 1 g alınarak su ile ekstrakte edildi ve saf su ile 50 mL'ye tamamlandı. Sitrik asitten 0,5 g alınarak 0.5 L'ye tamamlandı. İçine bir miktar (yaklaşık 0,1 g) fenolftaleyn konuldu. Sitrik asit çözeltisi ile her üç örnek 0,1 N NaOH ile ayrı ayrı titre edildi. Titrasyon asitliği aşağıdaki eşitlikle hesaplandı.

$$\text{Asitlik (g L}^{-1}\text{)} = V \cdot N \cdot E \cdot 1000 / M$$

V : titrasyonda harcanan baz

N : alkalinin normalitesi

E : baskın organik asitin mE ağırlığı (0.064)

M : alınan örnek miktarı (mL)

3.5. Toplam antioksidan kapasite tayini

Toplam antioksidan kapasite tayini Prieto vd. (1999) tarafından belirtilen yöntemle yapılmıştır [82].

3.5.1. Yöntemin ilkesi

Yöntem, yapay bir bileşik ve suda çözünür C vitaminin (askorbik asit) antioksidatif kapasitesi ile analiz örneğinin antioksidatif kapasitesinin karşılaştırılmasına dayanmaktadır. Analiz için gerekli çözeltiler aşağıda verilmiştir.

Gerekli çözeltiler

Belirteç çözeltisi; 0,6 M sülfirik asit, 28 mM sodyum fosfat ve 4 mM amonyum molibdat içeren belirteç çözelti hazırlanmıştır.

C vitamin çözeltisi (ppm); 0.5 g C vitamini 500mL'de çözüldü (1000 ppm). 0 ppm, 20 ppm, 40ppm, 60ppm, 80 ppm, 100 ppm ve 120 ppm 100 mL saf su ile tamamlandı.

Kör çözelti: Örnek yerine 150 µL metanol ve 2850 µL belirteç çözeltisi içeren kör çözelti oluşturulmuştur.

Örnek hazırlama

Bunun için her üç örnekten 1 g alındı. %96'lık 10 ml metanol içinde ayrı ayrı ekstrakt edildi. 100 ml saf su ile seyreltildi. Oluşan ekstrakt 5000'de 5 dakika santrifüj edildi. Örnek çözeltiden 150 µl ve belirteç çözeltisinden 2850 µl alınarak son hacim 3 ml olacak şekilde her örnek için 3'er tüp hazırlanmıştır. Tüpler 95 °C'de 90 dakika bekletilip oda sıcaklığına kadar soğutuldu ve 695 nm'deki absorbans değerleri ölçüldü.

C vitamini standart olarak kullanıldı. Toplam antioksidan kapasitesinin karşılaştırılabilmesi için sırasıyla; 0, 20, 40, 60, 80, 100 ve 120 ppm C vitamin çözeltileri hazırlandı.

Çalışma koşulları

Dalga boyu : 695 nm

Cam küvet : Işık yolu 1 cm olan cam küvet

Sıcaklık : 20-25 °C

Son hacim : 3 mL

Okuma : Okuma ışık yoluna küvet koymadan havaya karşı sıfırlanmış spektrofotometrede yapılmıştır.

Örnek çözeltisi : Küvete konulan örnek çözeltisi 3 mL'dir.

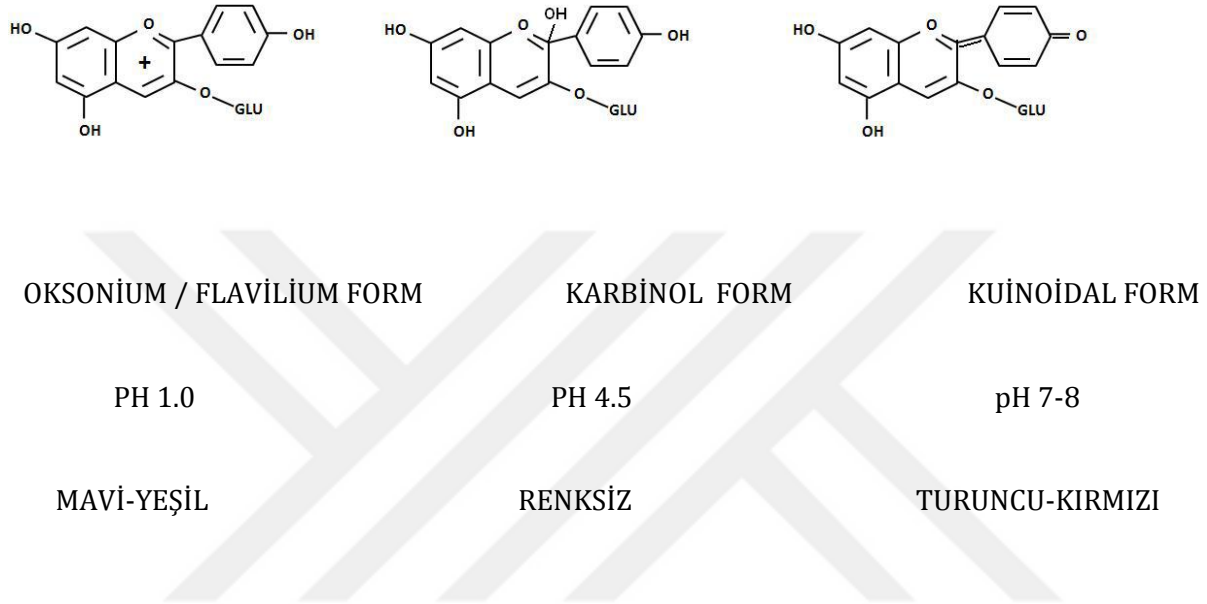
Analiz örneklerinin absorbans değerleri ile kör çözelti absorbans değerleri farkı bulundu. Toplam antioksidan kapasite miktarının hesaplanması, standart olarak kullanılan askorbik asitin kalibrasyon eğrisine göre yapılmıştır. Her üç örnek üçer kez tekrarlanmış ve ortalaması alınmıştır.

3.6. Toplam Monomerik Antosiyanin Tayini

3.6.1. Yöntemin İlkesi

Antosiyaninler birçok meyve, sebze ve çiçeklerin kendine özgü pembe, kırmızı, viole, mavi ve mor tonlarındaki çeşitli renklerini veren suda çözünebilir nitelikteki doğal renk

maddeleridir. Antosiyanin pigmentlerinin pH'ya bağlı olarak adeta bir indikatör gibi renk değiştirmesi bu bileşiklerin başlıca özelliklerinden biridir. pH 1.0 ve pH 4.5'a ayarlanmış örneklerin spektrofotometrede ölçülen absorbans değerleri arasındaki fark, örneğin antosiyanin miktarıyla doğru orantılı olarak değişmektedir. Bu nedenle yöntemin temel ilkesi, pH 1.0 ve pH 4.5'deki renk farklılığının spektrofotometrik yolla ölçümüdür. Fuleki ve Francis (1968) tarafından tanımlanan yöntemden yararlanılmıştır [83].



Şekil 2.5. Antosiyaninlerin farklı pH'lardaki kimyasal yapıları [84].

Gerekli çözeltiler

Bu analizde; pH 1.0 ile pH 4.5 arasındaki renk farklılığını gözleyebilmek amacıyla, bu pH değerlerinde iki farklı tampon çözelti hazırlanmaktadır.

pH 1.0 tampon: 250 ml 0.2 N KCl (14.9 g/L), 650 ml 0.2 N HCl (17 ml/L) çözeltisi bir behere alındı ve karıştırıldı. Çözeltinin pH değeri 1.0 olmalıdır. Eğer değil ise HCl çözeltisi ile ayarlanır.

pH 4.5 tampon: 1.64 g sodyum asetat ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 100 mL saf suda çözülür ve üzerine 1 N HCl (83 ml yoğun HCl/L) eklenerek pH'ı 4.5 olacak şekilde ayarlandı.

Örnek hazırlama

Pendula dutlarından 2.1 g tartıldı. % 96'lık alkol ve % 0.09 HCl içinde ezilerek ekstrakt yapıldı (90 ml alkol, 10 ml HCl olacak şekilde). 100 ml'lik ekstrakt süzüldü [85]. 75 °C'de kurutulmuş dutlardan 0.565 g aynı şekilde 100 ml ekstrakt yapıldı. Shangri La dutlarından 2 g tartılarak aynı şekilde 100 ml ekstrakt yapıldı. Yapılan bu ekstraktlar +4 °C'de buz dolabında 1 saat kadar tutuldu.

Hazırlanan her üç örneğe ait 100 ml'lik ekstraktlar 50 ml'lik beherlere alındı. Bu 50 ml'lik beherlerden biri pH 1.0 diğeri ise pH 4.5 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Çalışma koşulları

Dalga boyu: 516 nm (maksimum absorbans noktası), 700 nm

Cam küvet: Işık yolu 1 cm olan cam küvet

Sıcaklık: 20-25 °C

Son hacim: ~3 karşı sıfırlanmış spektrofotometrede yapılmıştır.

Absorbans ölçümü

Maksimum absorbans noktası 516 nm çalışılacak dalga boyu olarak belirlenmiştir. pH 1.0 ve pH 4.5 için hazırlanmış olan her iki örnek içinde 516 nm (maksimum dalga boyu) ve bulanıklık unsurlarının tespit edilmesi için de 700 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır.

Örneklerin 516 ve 700 nm'de okunan absorbanslarının farkları ($A_{516} - A_{700}$) hesaplanmış, daha sonra pH 1.0 için bulunan absorbans farkı, pH 4.5 için hesaplanan absorbans farkından çıkarılarak gerçek absorbans bulunmuştur.

$$\text{Absorbans} = (A_{516} - A_{700}) \text{ pH 1.0} - (A_{516} - A_{700}) \text{ pH 4.5}$$

Örneklerdeki toplam antosiyanin konsantrasyonu aşağıdaki bağıntı ile hesaplanmıştır:

$$\text{Toplam antosiyanin, mg L}^{-1} = \frac{(A) (10^3) (MW) (DF)}{(E) (L)}$$

Bu bağıntıda; A: absorbans, MW: pigmentlerin molekül ağırlığı, DF: seyreltme faktörü, E: molar absorbans, L: küvetin optik yolu (1cm) karşılığıdır.

Örnekte bulunan antosiyanin miktarı o örnekteki başat antosiyanin olan siyanidin 3-glikozit cinsinden belirlenir.

3.7. Toplam Çözünür Fenolik Madde Tayini

3.7.1.Yöntemin İlkesi

Toplam fenolik madde tayini, Folin-Ciocalteu's ayracı ile toplam fenollerin tayin yöntemi kullanılmıştır [86]. Fenolik bileşikler bazik ortamda Folin-Ciocalteus ayracını oksitleyici olarak kullanarak oksitlenir. Reaksiyon sonucunda indirgenmiş ayracın oluşturduğu mavi rengin fotometrik olarak ölçülmesiyle fenolik madde miktarı ölçülebilir. Eşdeğer olarak gallik asit kullanıldı.

Gerekli çözeltiler

Gallik asit çözeltisi: 1 g gallik asit 0.5L de çözüldü. Bu durumda 2000 ppm oldu. Bu çözeltiden 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, 500ppm olan 50ml'lik çözeltiler hazırlandı.

NaH₂PO₄ çözeltisi: 0,1g NaH₂ PO₄'ü saf su ile 50ml'e tamamlanarak çözüldü.

Örnek hazırlama

1g taze yaprak örneği üzerine 30 ml metanol ve oksidasyonu engellemek için NaH₂PO₄ çözeltisinden 1ml ilave edilerek 2 dakika homojenize edildi. Metanol ve doku karışımı 75 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 3 dakika bekletildi. Karışım filtre kağıdı ile süzülerek kağıt renksiz hale gelinceye kadar 10 ml metanol ile yıkandı. Süzüntü behere konularak 50 °C'ye etüvde buharlaşmaya bırakıldı. Kuruduktan sonra behere 25 ml saf su konularak beher çeperine yapışan içeriğin çözünmesi sağlandı. Oluşan süspansiyon 6500 devir/dakikada 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra rengi berraklaşan numuneden 0.5 ml alınarak üzerine 10 ml damıtık su, 2 ml % 20'lik Na₂CO₃ ve 1:1 oranında damıtılmış su ile seyreltilmiş Folin-Ciocalteus reaktifinden 0.5 ml ilave edildi. Karışımı homojen hale getirmek için 25 sn çalkalandı. Tüpler kaynayan suda 1 dakika bekletildikten sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Soğuduktan sonra 650 nm'de absorbans belirlendi.

Çalışma koşulları

Dalga boyu : 650 nm

Cam küvet : Işık yolu 1 cm olan cam küvet

Sıcaklık : 20-25 °C

Son hacim : ~3.0 mL

Okuma : Okuma havaya karşı sıfırlanmış spektrofotometrede yapılmıştır.

Toplam fenolik madde miktarının hesaplanması, standart olarak kullanılan gallik asitin kalibrasyon eğrisine göre yapılmıştır. *Morus nigra* Shangri La ve *Morus nigra* Pendula taze ve kuru örneklerin her biri 3 kez tekrarlanmıştır. Bu tekrarların ortalaması hesaplanmıştır. Hesaplama seyreltme katsayısı 25 olarak belirlenmiştir.

Grafikten Gelen ppm Değeri X Seyreltme Katsayısı = Fenol Miktarı (mg g⁻¹ T.A.)

3.8.Antosiyaninlerin Degradasyon İndeksi Tayini

3.8.1.Yöntemin İlkesi

Antosiyaninlerin degradasyon ölçütlerinin tayini için Fuleki ve Francis (1968) tarafından tanımlanan ve Giusti ve Wrolstad (2000) tarafından geliştirilen, monomerik antosiyaninlerin sodyum bisülfid ile tepkimesi temeline dayanan yöntem uygulanmıştır [83, 87].

Antosiyaninler, sıcaklık ve depolama süresi gibi faktörlerin etkisi ile parçalanmakta ve buna bağlı olarak ürünün rengi de değişmektedir. Bu durumda gıdalarda renk değişimi veya yoğunluk artışı şeklinde görülmektedir. Değerlendirme için; “renk yoğunluğu” ve “polimerik renk” değerleri belirlenmekte ve bunlardan üçüncü bir ölçüt olarak “polimerik renk yüzdesi” hesaplanmaktadır.

Doğal haldeki monomerik antosiyaninler sodyum bisülfid çözeltisi ile reaksiyona girdiklerinde renksiz formlar oluşturmaktadır. Buna karşın “polimerik antosiyanin-tanen” kompleksleri ve esmerleşme reaksiyonunda oluşan “melanoidin” pigmentleri bisülfidlerin ağartma etkisine karşı direnç göstererek renklerini korumaktadır. Ortama sodyum bisülfid çözeltisi eklenmesinden sonra monomerik antosiyaninlerin renkleri hızlı bir şekilde açılırken, esmer renkli pigmentlerin ortamdaki konsantrasyonu ve buna bağlı olarak 400-440 nm aralığında verdikleri absorbans değerleri artmaktadır. Örneklere bisülfid uygulanmaksızın ve uygulanarak yapılan absorbans ölçümleri sonucunda “renk yoğunluğu”, “polimerik renk” ve “polimerik renk yüzdesi” gibi değerler elde edilir.

Gerekli çözeltiler

Bisülfid çözeltisi: 1g potasyum metabisülfid ($K_2S_2O_5$) 5 ml damıtık su içerisinde çözündürülür. Bu çözelti günlük hazırlanmalıdır.

Potasyum klorid tampon: 1,86g KCl ile 980 ml saf su karıştırılır. Bu karışım PH 1 olacak şekilde HCl damlatılır ve saf su ile 1L'ye tamamlanır.

Örnek hazırlama

Her iki örnekten ve bu örneklerin kurularından 1'er g alınıp (50 ml saf su + 1.5 ml HCl) çözeltisi içinde ekstrakt edilerek hazırlanan tampon çözelti ile yeteri kadar seyreltilir. Maksimum dalga boyunda 0.5 – 0.9 aralığında absorbands vermesi amacıyla seyreltilen örnekler analizde kullanılmıştır

(Seyreltme: Shangri La örneği için 20, Pendula örneği için 5, Pendula örneği için 5, Shangri La kurusu için 5).

Çalışma koşulları

Dalga boyu : 420 nm, 516 nm, 700 nm

Cam küvet : Işık yolu 1 cm olan cam küvet

Sıcaklık : 20-25 °C

Son hacim : 3.0 mL

Okuma : Okuma saf suya karşı sıfırlanmış spektrofotometrede yapılmıştır.

Bu amaçla biri tanık, diğeri örnek için ayrılan iki küvete aşağıdaki çözeltiler sırası ile eklenmiş ve absorbands değerleri ölçülmüştür.

1. KÜVET: 2.8 mL seyreltilmiş karadut örneği

0.2 mL bisülfid çözeltisi

2. KÜVET: 2.8 mL seyreltilmiş karadut örneği

0.2 mL damıtık su

Bisülfid çözeltisinin eklenmesinden sonra 15 dakika ile 1 saat arasındaki zaman diliminde, her iki küvetteki çözeltinin absorbandsı; 420 nm, 516 nm (λ vis-max), 700 nm dalga boylarında damıtık suya karşı ölçülmüştür. Bu çalışmada bisülfid çözeltisinin eklenmesinden 60 dakika sonra ölçüm yapılmıştır.

Renk Yoğunluğu: Bu değer; “bisülfite uygulanmamış küvette bulunan örneğin, 516 nm ve 420 nm dalga boylarındaki absorbanlarının toplamı” olarak tanımlanır ve aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\text{Renk Yoğunluğu} = [(A_{516} - A_{700}) + (A_{420} - A_{700})] (Sf)$$

Polimerik Renk: Bu değer; “bisülfite uygulanmış küvetteki örneğin, 516 nm ve 420 nm dalga boylarındaki absorban toplamı” olarak tanımlanır ve aşağıdaki eşitlikle hesaplanmıştır.

$$\text{Polimerik Renk} = [(A_{516} - A_{700}) + (A_{420} - A_{700})] (Sf)$$

Polimerik Renk Yüzdesi: Bu değer ise; “polimerik rengin, renk yoğunluğuna oranı” olarak tanımlanır. Polimerik renk yüzdesi; ürünün renginin % kaçının polimerize olmuş bileşiklerden kaynaklandığının bir göstergesidir ve aşağıdaki eşitlikle hesaplanmaktadır.

$$\text{Polimerik Renk Oranı} = \frac{\text{Polimerik Renk}}{\text{Renk Yoğunluğu}} \times 100$$

Polimerik renk ve polimerik renk oranının yükselmesi, polimerik bileşiklerden kaynaklanan renk yoğunluğunun fazla olduğunu yani, koşullara bağlı olarak antosiyaninlerin parçalandığını ve esmer renkli pigmentlerin miktarlarının arttığını göstermektedir. Polimerik renk ve polimerik renk yoğunluğunun yükselmesi üründe antosiyanin parçalanmasının arttığını esmer renkli bileşiklerin yoğunluğunun arttığının göstergesidir. Hiçbir işlem görmemiş taze meyve ve sebze sularında polimerik renk yüzdesi genellikle %10'un altında iken, işlem uygulanmış, uzun süre depolanmış, depolama koşulları iyi sağlanmamış olanlarda bu oran artarak % 30 veya daha yüksek değerlere ulaşabilmektedir. Bu değerler ürünün maruz kaldığı koşullara bağlı olarak çok fazla değişkenlik göstermektedir [84].

3.9. Antosiyanin Profilinin Belirlenmesi

3.9.1. Yöntemin İlkesi

Antosiyanin profilinin belirlenmesi kalitatif olarak TLC yöntemi uygulanmıştır. Molekül ağırlıkları farklı antosiyaninlerin sabit faz olarak kullanılan selüloz tabakada uygun solventle ilerleyerek birbirlerinden ayrılması esasına dayanmaktadır. Bu şekilde selüloz tabakada oluşan

farklı lekeler solvente uygun Rf değerleri ile karşılaştırılarak seçilen örneklerdeki antosiyanin çeşitleri belirlenir. Sabit faz olan selüloz tabakadaki farklı lekeler farklı antosiyaninleri gösterdiği için bu lekeler dikkatli bir şekilde kazınarak alınır. %1 HCl içeren metanol ile antosiyaninler çözünüp 500 nm ile 600 nm arasındaki maksimum absorbanları belirlenmiştir. Literatürde verilen maksimum absorban değerleri ile karşılaştırılarak antosiyanin tipi belirlenmiştir.

Gerekli çözeltiler

Hareketli faz (solvent): HCl + formik asit + saf su (25/24/51) oranlarında karıştırılarak hazırlandı [88].

Ekstrakt çözeltisi: 100 ml metanol ile 3 ml HCl % 1 olacak şekilde karıştırılır.

Örnek hazırlama

Morus nigra Shangri La ve *Morus nigra* Pendula taze örneklerden 1 g, Pendula Kurusu örnekten 0,5 g tartılarak 20 ml asit-metanol çözeltisinde ekstrakt edildi. Örnek-çözelti karışımı süzüldü. Süzülen karışım rotavaporda 50°C sıcaklıkta buharlaştırılarak çözelti, örnekten uzaklaştırıldı. Dipte kalan örnek üzerine 2 ml kloroform eklenerek antosiyanin dışındaki faktörler ayrıştırıldı. Antosiyaninlerin bulunduğu üst kısım alındı. Alınan son örnekten 100 µl selüloz jele damlatılarak jelde yürütüldü. Jel üzerinde oluşan lekeler kazınarak alındı. Lekelerdeki antosiyaninler selüloz jelden metanol+HCl (100 ml metanol + 3ml HCl) karışımı ile ayrıştırıldı.

Çalışma koşulları

Dalga boyu: 500 nm ile 600 nm arası

Cam küvet: Işık yolu 1 cm olan cam küvet

Sıcaklık: 20-25 °C

Son hacim: ~3.0 mL

Okuma: Okuma metanol + HCl karışımına karşı sıfırlanmış spektrofotometrede yapılmıştır

Her farklı antosiyanin çeşidinin 500 nm ile 600 nm arasında okunan maksimum absorbans değerlerinin dalga boyları farklıdır. Bu dalga boylarına bakılarak antosiyanin çeşidi belirlenmiştir. Antosiyanin tipi literatürde verilen Rf değerlerinden yararlanılarak belirlenmiştir [88].

3.10. Sıcaklık ve Işık Koşullarında Antosiyanin Kararlılık Testi

Shangri La çeşidine ait örneklerin antosiyanin kararlılığı farklı sıcaklık ve ışık koşullarında incelenmiştir. Taze dut örneklerinden 2 gramı 10 ml asit metanol (%1 HCl içeren metanol) karışımında ezilmiş ve filtre edildikten sonra son hacim saf su ile 250 ml ye tamamlanmıştır. Ekstrakt alüminyum folyo ile ışık geçirmeyecek şekilde sarılmış, kapaklı deney tüplerine aktarılmıştır. Tüpler her sıcaklıkta üç adet olmak üzere 5, 30 ve 60°C sıcaklıklara ayarlanmış kabinlerde bekletilmiştir. Başlangıç absorbansı 516 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüş ve 7 gün boyunca ölçümler 24 saat arayla tekrarlanmıştır. Işık koşullarındaki kararlılığı belirlemek amacıyla yukarıda belirtilen şekilde elde edilen ekstrakt 6 tüpe bölünmüş bunlardan üçü doğrudan ışık almayacak şekilde gün ışığına, üçü ışık almayacak şekilde alüminyum folyo ile sarılarak oda sıcaklığı koşullarında karanlığa bırakılmıştır. Absorbans ölçümleri 7 gün boyunca her 24 saatte bir tekrarlanmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Karadut meyvesinde çokça bulunan antosiyaninlerin karakterizasyonu ve antioksidan etkisini açığa çıkarılması amacıyla yürütülen bu araştırma kapsamında, pH değerleri, titrasyon asitliği, antioksidan kapasitesi, monomerik antosiyanin miktarı, toplam fenolik madde miktarı, degradasyon indeksi analizi ile antosiyanin profilinin belirlenmesi yapılmıştır.

4.1. Karadut Meyvesinin pH Değerleri ve Titrasyon Asitliği

İki farklı karadut çeşidinde PH ve titrasyon asitliği belirlenmiş ve analiz bulguları Çizelge 1'de verilmiştir. Belirlenen karadut pH'ları 4,88 – 5,68 arasında olup ortalama olarak saptanan değer 5,17'dir. Ortalama % 0.26 olan titrasyon asitliği ise % 0.09 – 0.37 arasında değişmektedir.

Tablo 4.1. Karadut örneklerinin asitlik özelliklerine ilişkin analiz sonuçları

Çeşitler	pH değeri	Titrasyon asitliği (TA)(g L ⁻¹)
ShangriLa	4,88±0.35	0.37±0.05
Pendula	5,68±0.24	0.09±0.03
Pendula kuru	4,97±0.25	0.30±0.03

Çalışma sonuçlarına göre farklı bölgelerden toplanan karadutlarda olgunluk derecelerine ve iklim şartlarına göre farklı pH ve TA değerleri ölçülmüştür. Bu pH değerlerine bağlı olarak titrasyon asitliği de farklı ölçülmüştür.

Dut örneği pH metre ile ölçülerek pH 4.88 – 5.68 olarak belirlendi ve TA değeri ortalama % 0.26 ile desteklenmiştir. Farklı iklim koşullarına sahip bölgeler göz önüne alındığında Türkiye'de yetiştirilen karadut meyvesinin pH aralığı 3.31 – 3.80 olarak belirtilmiştir [84]. Edremit ve Gevaş yöresinde yapılan çalışmada karadut pH değeri 6.2 - 7.4 ve TA değeri 0.167-0.264 olarak bulunmuştur [89]. Başka bir çalışmada da karaduttan elde edilen pH ve TA değerleri sırasıyla 3.3 - 3.8, 1.94 - 2.23 şeklinde verilmiştir [90]. Çoruhli, T. (2013)'e göre dut örneğinin pH metre ile ölçülen pH 4.5 – 4.6 olarak belirlenmiştir [91]. Bu dört çalışmaya bakıldığında pH değeri Edremit ve Gevaş yöresine ait karadutların değerlerinden küçük, Çoruhli, T. (2013) değerlerine uyumlu diğer değerlerden ise büyüktür. TA değerleri ise Edremit ve Gevaş yöresine ait karadutların değerleri ile uygunluk gösterirken diğerinden küçük görülmüştür. Karadut antosiyaninleri pH 5'ten daha düşük asitlikte kırmızı renklerini ve stabilitelelerini korudukları belirtilmektedir [85]. Antosiyaninler asidik pH'da stabil

olduklarından ve farklı pH'larda farklı formlarda ve renklere bulduklarından ölçülen değerlerin literatüre uygun olduğu söylenebilir.

4.2. Karadutun Antioksidan Kapasitesi

Karadut örneklerinin antioksidan kapasite Çizelge 2'de verilmiştir. Çizelge 2 incelendiğinde her bir örnek için üç ayrı ölçüm değerleri ve ortalama değerleri görülür. Buna göre en düşük antioksidan kapasite 3700 µg AAE/100g ile Mersin yöresinden sağlanan karadutlarda bulunurken, en yüksek antioksidan kapasite 16900 µg AAE/100g ile Çankırı yöresinden sağlanan Pendula kurutulmuş karadutlarında saptanmıştır. Bütün çeşitlerde ölçülen antioksidan kapasitenin ortalamasının 9800 µg AAE/100g olduğu gözlemlenmektedir. Pendula kuru karadutların antioksidan kapasitesinin, tazesini olan Pendula karadutlardan yaklaşık 2 katı olduğu görülmüştür.

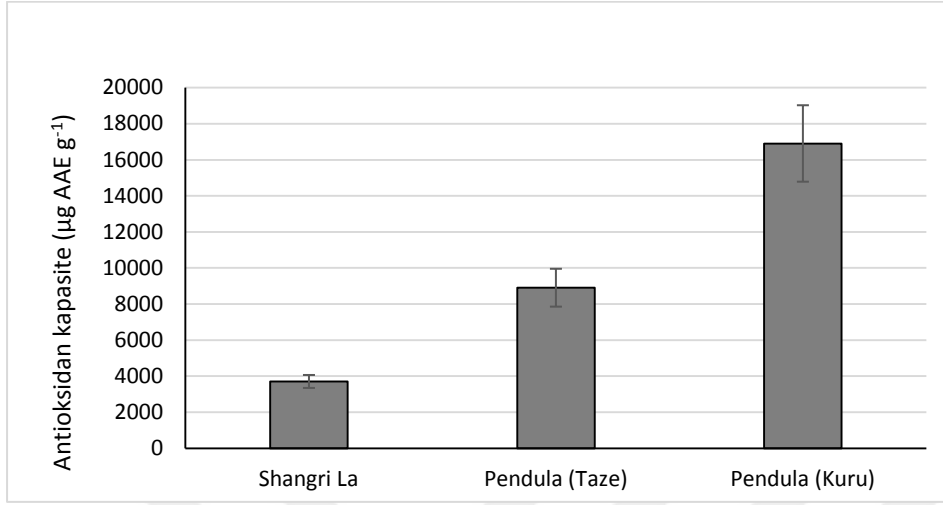
Askorbik asit kullanılarak standart grafik hazırlandı. Bu standart grafik kullanılarak örneklerin toplam antioksidan miktarları µg askorbik asit (µg AAE/100g) eşdeğeri şeklinde hesaplandı.

Tablo 4.2.Karadut örneklerinin antioksidan özelliklerine ilişkin analiz sonuçları (µg/100g T.A. askorbik asit eşdeğeri olarak verilmiştir)

Çeşitler	1 ölçüm	2. ölçüm	3. ölçüm	Ortalama±SS
ShangriLa	3800	3300	4000	3700±360
Pendula	8800	7900	10000	8900±1050
Pendu kuru	14500	18400	17900	16900±2120

Farklı iklim ve çevre koşulları, meyvenin olgunlaşma derecesi ve genetik farklılıklar fenolik madde miktarını etkilediği gibi antioksidan kapasiteyi de etkilemektedir [92].Mahmood, T. vd. (2017)'nin olgunlaşmamış, yarı olgunlaşmış ve tam olgunlaşmış çeşitli dut meyveleri üzerinde yaptığı çalışmada meyve olgunluğunun ilerlemesine bağlı olarak antioksidan aktivitede artan bir eğilimin olduğu ve hava kurumalı koşullarda tamamen olgunlaşmış dut meyvesi genellikle daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir [93]. Dut meyvesinin farklı gelişim süreçleri için yaptıkları çalışmada DPPH analizi sonucu radikal yakalama kapasitesi 950-1800 µmol Trolox/100g numune olarak bulunmuştur [87]. Başka bir çalışmada antioksidan aktivitesi analizi sonucunda elde edilen değerler 1503.7 – 2444.3 µM TE/100g arasında değişmiştir [94]. Daha başka bir çalışmada ise duttan elde edilen antosiyanin ekstraktı için 15165.23 ± 117,99 mg Trolox/100g numune olarak bulunmuştur [91].

Karadutun antioksidan kapasitesi analizine ait istatistiksel bilgiler Çizelge 3. ve şekil 6 de verilmiştir. Çalışılan örneklerin antioksidan kapasiteleri arasında önemli farkların olduğu görülmüştür.



Şekil 4.1. Karadut taze ve kurularındaki antioksidan kapasitesi ($\mu\text{g AAE } 100\text{g}^{-1}$).

Tablo 4. 3. Karadutun antioksidan kapasitesi analizine ait istatistiksel bilgiler.

DK	SD	SS	KO	F oranı	
Ara	2	26669,56	13334,78	69,65351	(**)
Hata	6	1148,67	191,44		
Toplam	8	27818,22			

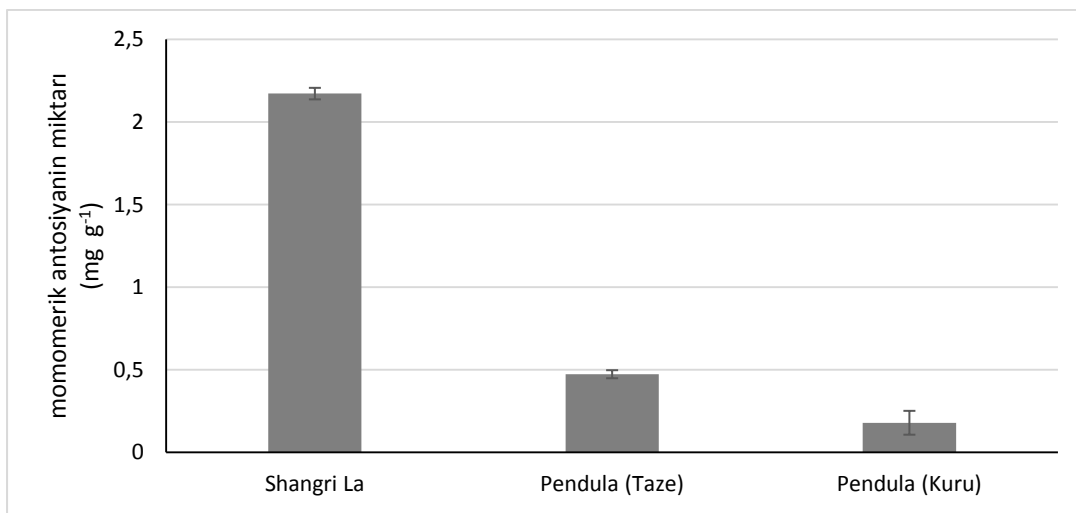
Shangri La, Pendula ve Pendula kurusuna ait antioksidan kapasitesi varyans analizinde üç örnek arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0.01$). Bu iki alttürün ve birine ait kurusunun yetiştirme alanı ve olgunlaşma değerleri göz önüne alındığında bu farkın doğal bir sonuç olduğu görülmektedir.

4.3. Karadut Toplam Monomerik Antosiyanin Miktarı

Toplam monomerik antosiyanin miktarı Çizelge 6 ve şekil 8'de verilmiştir. Bütün örneklerde toplam monomerik antosiyanin miktarı ortalaması 0.886 mg g^{-1} olarak hesaplanmıştır. Monomerik antosiyanin en düşük miktarda Çankırı'dan sağlanan *Morus nigra* Pendula kuru dutta (0.178 mg g^{-1}) bulunurken, Mersin yöresinden sağlanan *Morus nigra* Shangri La çeşiti karadutta (2.171 mg g^{-1}) en yüksek miktarda ölçülmüştür.

Tablo 4.4. Karaduttaki toplam monomerik antosiyanin miktarı analizi (mg g⁻¹).

Çeşitler	1 ölçüm	2. ölçüm	3. ölçüm	Ortalama±SS
Shangri La	2195	2187	2131	2.17±0.03
Pendula	500	456	460	0.47±0.02
Pendula kuru	124	260	150	0.18±0.07

**Şekil 4.2.** Karadut çeşitlerindeki toplam monomerik antosiyanin miktarı (mg g⁻¹).

Wu ve diğ. (2011)'in yaptıkları bir çalışmada karadut suyundaki antosiyanin miktarı 164 mg Cy-3-gly/L olarak belirtilmiştir [96]. Başka bir çalışmada *Morus atropurpurea* Roxb. türünden elde edilen dut suyu için toplam antosiyanin miktarı 203.3±25.5 mg Cy-3-gly/L olarak bulunmuştur [85]. Pliszka ve diğ. (2007)'nin yaptığı bir çalışmada ise analiz sonucunda karadut suyu antosiyanin içeriği 367,7±4 mg/L bulunmuştur [97]. Fazaeli ve diğ., (2011)'nin yaptıkları toplam antosiyanin miktarı 164 mg Cy-3-gly/L olarak belirtilmiştir [98]. Yapılan bu çalışmada *Morus nigra* Shangrila çeşitinin değerleri, literatürdeki değerlerden oldukça büyüktür. *Morus nigra* Pendula kurusunun değerleri, Fazaeli vd., (2011) ve Wu vd. (2011)'in yaptıkları çalışmaya ait değerlere uygunluk göstermektedir. *Morus nigra* Pendula'ya ait değerler ise Pliszka vd. (2007)'nin yaptığı bir çalışma değerlerine yakın olduğu görülmüştür.

Karadutun toplam monomerik antosiyanin miktarı analizine ait istatistiksel bilgiler Çizelge 7'de verilmiştir. Çalışılan örneklerin toplam monomerik antosiyanin miktarları arasında önemli farkların olduğu görülmüştür.

Tablo 4.5. Karadutun toplam monomerik antosiyanin miktarı analizine ait varyans analizi.

DK	SD	SS	KO	F oranı	
Ara	2	6945086	3472543	1483,99274	(**)
Hata	6	14040	2340,00		
Toplam	8	6959126			

Morus nigra Shangri La, Pendula ve Pendula kurusuna ait toplam çözünür fenolik madde miktarı varyans analizinde üç örnek arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0.01$). Bu iki alttürün ve birine ait kurusunun yetiştirme alanı ve olgunlaşma değerleri göz önüne alındığında bu farkın doğal bir sonuç olduğu görülmektedir. Her üç karadut örneğinin antioksidan kapasitesi, toplam fenolik madde içeriği ve monomerik antosiyanin miktarı Çizelge 8'de verilmiştir.

Tablo 4.6. Karadut örneklerinin analitik özelliklerine ilişkin varyans analizi sonuçları.

Çeşit	Antioksidan kapasitesi ($\mu\text{g AAE/g}$)	Toplam çözünür Fenolik Madde (mg GAE/100g)	Monomerik Antosiyanin (mg/L)
Shangri La	37	596	2171
Pendula	89	328	472
Pendula kuru	169	944	15

Seçilen karadut örneklerinde en yüksek antioksidan kapasitesinin ve toplam fenolik madde miktarının *Morus nigra* Pendula kuru dutlarında görülmüştür. Bunun sebebi kurutulma sırasında % 80 oranında su kaybına bağlı olarak kuru örnek miktarının fazla olmasıdır. Monomerik antosiyanin miktarının en fazla olduğu örnek *Morus nigra* Shangri la çeşitine ait örneklerde ölçülmüştür. Kurudutlarda bu değer düşük olması antosiyaninlerin yüksek sıcaklıklarda bozulmasından kaynaklanmıştır. Yüksek sıcaklık şartlarında kuru örneklerde monomerik antosiyanin miktarının azalmasına rağmen antioksidan kapasitenin arttığı görülmektedir. Toplam fenolik maddelerin artışı ile antioksidan kapasitenin arttığı görülmektedir. Bu durum antioksidan kapasitenin artışının antosiyaninlerden daha çok diğer fenolik maddelerden veya parçalanmış antosiyanin ürünlerinden kaynaklanabilir.

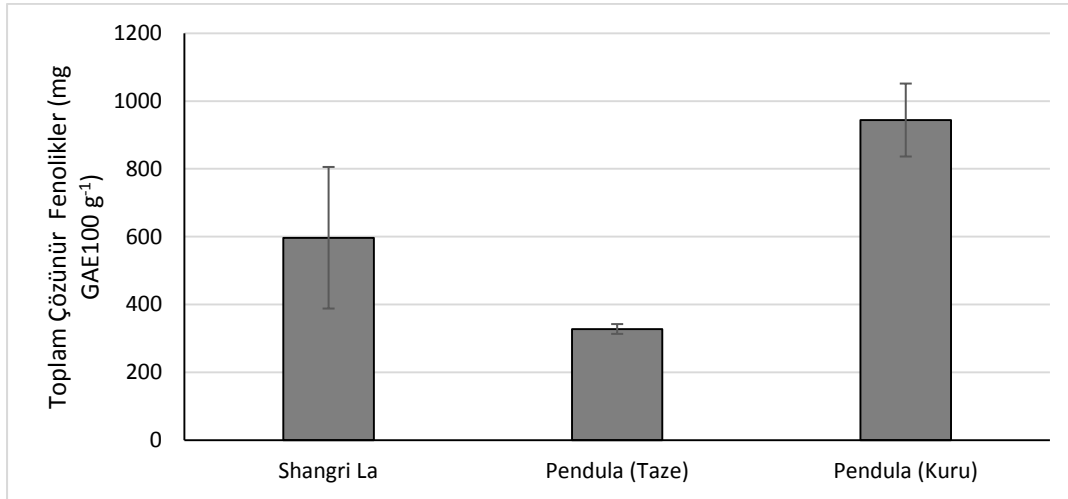
Antioksidan aktivite ile diğer veriler arasında ilişkinin varlığına dair birçok araştırma bulunmaktadır. Aramwit vd. (2010)'nin yaptığı çalışmada karadutlarda antosiyanin miktarı ile antioksidan aktivite arasında bir ilişki olduğu bildirilmektedir [99]. Özgen vd. (2009)'nin yaptığı çalışmada karadutun toplam fenolik madde ile toplam monomerik antosiyanin arasında ve toplam monomerik antosiyanin ile antioksidan aktivite arasında pozitif bir ilişki olduğunu belirlemişlerdir [100]. Orak (2007) kırmızı dut çeşidi ile yaptığı çalışmada, antioksidan aktivite ile toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite ile antosiyanin arasında yüksek bir ilişki olduğunu bildirmektedir [101]. Karadeniz vd. (2005)'nin yaptığı bir çalışmada Türkiye'de yetistirilen sebze ve meyvelerin toplam fenolik içerikleri ile antioksidan aktiviteleri arasında yüksek ve önemli bir korelasyon belirlemişlerdir [102]. Fang vd. (2009) ise böğürtlen sularında antioksidan aktivite ile toplam fenolik madde miktarının arasında önemli bir ilişki saptamışlardır [103].

4.4. Toplam Çözünür Fenolik Madde Miktarı

Toplam çözünür fenolik madde içeriği Çizelge 4'de ve toplam çözünür fenolik madde miktarı analizine ait istatistiksel bilgiler şekil 7'de verilmiştir. Toplam çözünür fenolik madde miktarı; tüm çeşitlerde ortalama olarak 622,6 mg/100g bulunurken, en düşük toplam fenolik madde içeriği Çankırı yöresinden sağlanan taze Pendula çeşidinde (328 mg/100g) saptanmış, en yüksek toplam fenolik madde içeriği Çankırı yöresinden sağlanan Pendula kuru dutlarında (944 mg/100 g) saptanmıştır.

Tablo 4.7. Karadut örneklerinde toplam çözünür fenolik miktarı analizi (mg GAE/100g).

Çözünür Fenolik Miktarı	1. Ölçüm	2. Ölçüm	3. Ölçüm	Ortalama±SS
Shangri La	770	655	365	596±209
Pendula	320	345	320	328±14
Pendula kuru	1012	1000	820	944±108



Şekil 4.3. Karadutlarda toplam çözünür fenolik miktarı (mg GAE/100g).

Sağır, C. (2014)'nin yaptığı çalışmada farklı zamanlarda hasat edilen karadut meyvesi için en yüksek 452 mg GAE/100g meyve ve en düşük 95 mg GAE/100g olarak belirtilmiştir [86]. Giusti, M. M. and Wrolstad, R. E. (2000)'nin yaptığı çalışmada toplam fenolik miktarı *M. nigra* için 1422 mg GAE/100g taze meyve olarak ölçülmüştür [87]. Çoruhli, Ç. (2013)'nin yaptığı çalışmada dut numunesi ve antosiyanin ekstraktının toplam fenolik madde miktarları $3224,30 \pm 745,67$ mg GAE/100g ekstrakt olarak bulunmuştur [91]. Lou vd. (2012)'nin yaptıkları çalışmada dut meyvesi için toplam fenolik madde miktarı 185 – 344 mg GAE/100 taze ağırlık olarak belirtilmiştir [95]. Mahmood, T. vd. (2017)'nin olgunlaşmamış, yarı olgunlaşmış ve tam olgunlaşmış çeşitli dut meyveleri üzerinde yaptığı çalışmada toplam fenolik içeriğinin meyve olgunluğunun ilerlemesine bağlı olarak 201-2287 mg / 100 g GAE şeklinde değiştiğini belirtmiştir [93].Yaptığımız çalışmada *Morus nigra* Pendula çeşitinde Lou ve diğ. (2012)'nin yaptığı çalışma ile uygunluk göstermekte fakat diğer çalışma değerlerinden küçük olduğu görülmektedir. Shangri La ve Pendula kurusundaki değerler Sağır, C. (2014) ve Lou ve diğ. (2012)'nin yaptığı çalışma değerlerinden büyük, Giusti, M. M. and Wrolstad, R. E. (2000) ve Çoruhli, Ç. (2013)'nin yaptığı çalışmada değerlerinden küçük olduğu görülmektedir. Toplam çözünür fenolik madde miktarındaki bu farklılıkların; meyvenin hasat sırasındaki olgunluk derecesine, genetik farklılıklara, meyve gelişimi sırasındaki çevresel koşullara bağlı olduğu belirtilmiştir [87]. Bu çalışmada bulunan değerler belirtilen faktörler göz önüne alındığında literatürle uygunluk göstermektedir.

Karadutun toplam fenolik madde miktarı analizine ait istatistiksel bilgiler Çizelge 5'de verilmiştir. Çalışılan örneklerin toplam çözünür fenolik madde miktarları arasında önemli farkların olduğu görülmüştür.

Tablo 4.8.Karadutun toplam çözünür fenolik madde miktarı analizine ait varyans analizi.

DK	SD	SS	KO	F oranı	
Ara	2	57,17	28,58	15,49721	(**)
Hata	6	11,07	1,84		
Toplam	8	68,24			

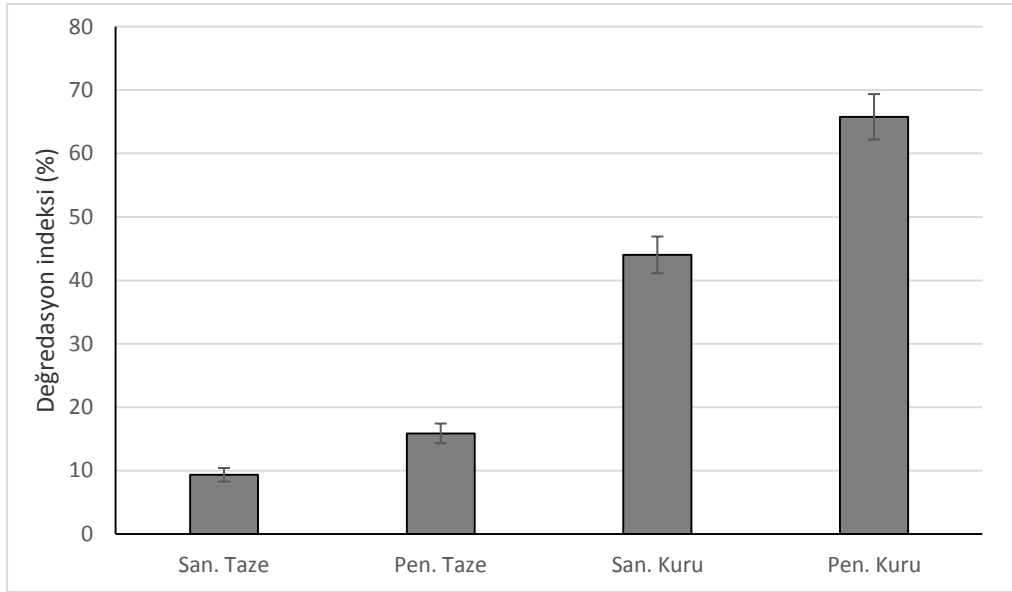
Morus nigrashangri La, *Morus nigra* pendula ve *Morus nigra* pendula kurusuna ait toplam çözünür fenolik madde miktarı varyans analizinde üç örnek arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0.01$). Bu iki alttürün yetiştirme alanı ve olgunlaşma değerleri ve birine ait kurusunun miktarı göz önüne alındığında bu farkın doğal bir sonuç olduğu görülmektedir.

4.5. Degradasyon İndeksi Analizi

Seçilen karadut alt türlerindeki degradasyon indeksi analizine ait yüzde değerleri çizelge 9 ve şekil 9'da verilmiştir. Bu çalışmada *Morus nigra* Pendula kuru dutlara ilave olarak Shangri La ait kurularına da yer verilmiştir. Bu şekilde her iki çeşidin kurularının stabilitesi karşılaştırılmış oldu. Çizelge 10'a bakıldığında en az bozulmanın % 9,32 ile Shangri La çeşitinin tazelerinde, en fazla bozulmanın ise % 65,79 ile Pendula çeşitinin kurularında gözlemlenmiştir.

Tablo 4.9. Karduttaki degradasyon indeksi sonuçları (değerler % olarak verilmiştir).

örnekler	Shangri La	Pendula	Shan. La (kuru)	Pendula (kuru)
T1	9,03	17,43	43,63	66,43
T2	10,5	14,33	45,05	69,02
T3	8,42	15,81	43,35	61,93
ORTALAMA	9,32	15,86	44,01	65,79



Şekil 4.4. Karadutlarda Degradasyon İndeksi (değerler % olarak verilmiştir).

Isıl işlem ve uygun olmayan sıcaklıklarda uzun süreli depolama gibi etkilerle antosiyaninlerde parçalanmalar görülmektedir. Aramvit vd. [99] dut meyvesinden elde ettikleri ekstraktların 70°C'de 10 saat tutulması sonucunda, ısı ve ışığın antosiyaninler üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Antosiyanin miktarında azalma olduğunu belirlemiştir. Wang vd. (2013) yaptıkları çalışmada yerfıstığındaki antisiyaninlerin stabilitesine pH, sıcaklık ve demirin etkisini incelemiş 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C ve 80°C 'lerde ölçümler yapmıştır. Mok ve Hettiarachchy (2016) ayçiçeği kabuğundaki antosiyaninlerin 65-95°C arasında değişen sıcaklıklarda ve pH 1-5 aralığında termal stabiliteleri üzerinde çalışmış ve ısıl işlem görmüş ekstraktlardaki toplam antosiyanin içeriği pH diferansiyel yöntemi ile saptanmış ve mg siyanidin 3-glikozit/L olarak ifade edilmiştir [104]. Bu çalışmada *Morus nigra* Shangri La ve *Morus nigra* Pendula çeşitleri 70 °C sıcaklıkta 17 saat bekletildi. *Morus nigra* Shangri La tazelerinde degradasyon yüzdesi 9,32 iken kurutulma sonucu bu değer 44,01 olmuştur. *Morus nigra* Pendula tazelerinde degradasyon yüzdesi 15,86 iken kurutulma sonucu bu değer 65,79 olmuştur.

Degradasyon indeksi analizine ait istatistiksel bilgiler Çizelge 10'da verilmiştir. Çalışılan örneklerde antosiyanin kararlılığı bakımından önemli farkların olduğu görülmüştür. Özellikle seçilen örneklerin tazeleri ile kuruları arasındaki farklar önemlidir. Bu nedenle örneklerin tazeleri ile kurularının istatistiksel verileri Çizelge 11 ve Çizelge 12'de ayrı ayrı verilmiştir.

Tablo 4.10.Kardut çeşitlerinde degradasyon indeksi varyans analizi.

DK	SD	SS	KO	F oranı	
Ara	2	5726,06	2863,03	523,13	(**)
Hata	6	32,84	5,47		
Toplam	8	5758,89			

*Morus nigra*Shangri La, Pendula ve her iki çeşitin kurusuna ait degradasyon indeksi varyans analizinde dört örnek arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p<0.01$). Bu iki alttürün yetiştirme alanı ve olgunlaşma değerleri ve her iki örneğin kurularının antosiyanin kayıpları göz önüne alındığında bu farkın doğal bir sonuç olduğu görülmektedir.

Tablo 4.11. Yalnız kuru dut örneklerinin degradasyon indeksi varyans analizi.

DK	SD	SS	KO	F oranı	
Ara	1	711,77	711,77	103,894187	(**)
Hata	4	27,40	6,85		
Toplam	5	739,17			

Tablo 4.12. Yalnız taze dut örneklerinin degradasyon indeksi varyans analizi.

DK	SD	SS	KO	F oranı	
Ara	1	64,16	64,16	36,17185	(**)
Hata	4	7,09	1,77		
Toplam	5	71,25			

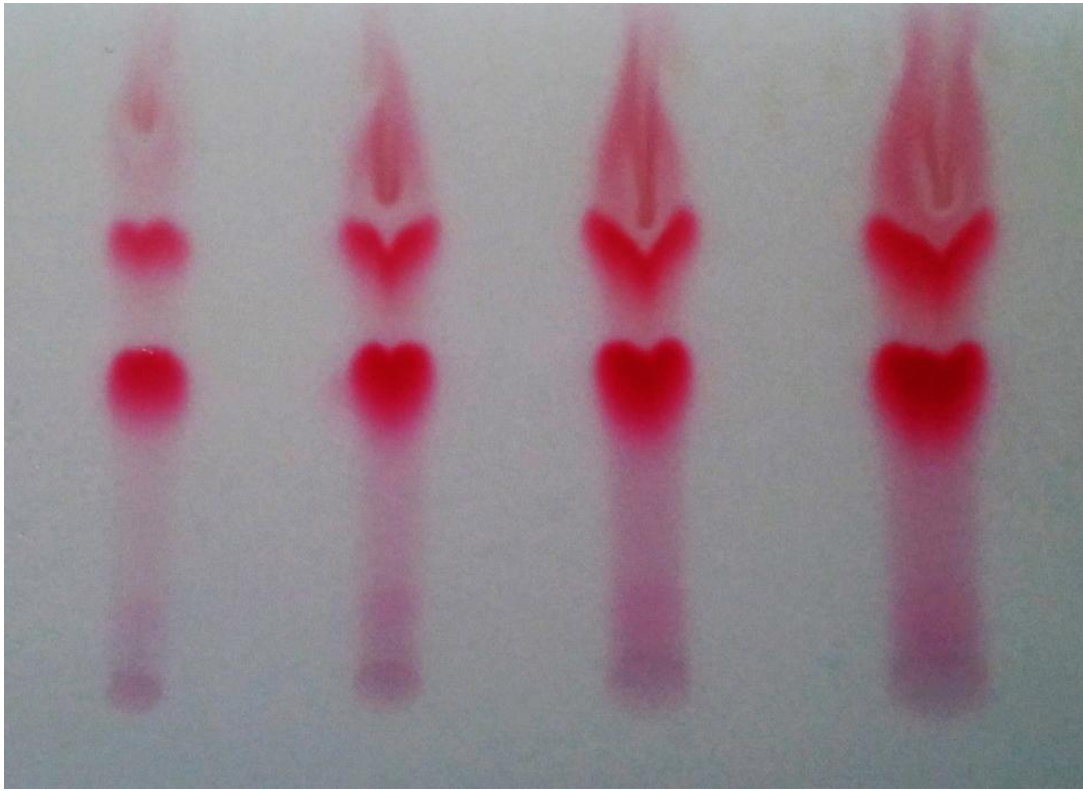
Morus

nigrashangri La ve *Morus nigra* pendula çeşitlerine ait örneklerin antosiyanin bozulmalarındaki degradasyon indeksi varyans analizinde her iki kuru ve her iki taze örnekler arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p<0.01$).

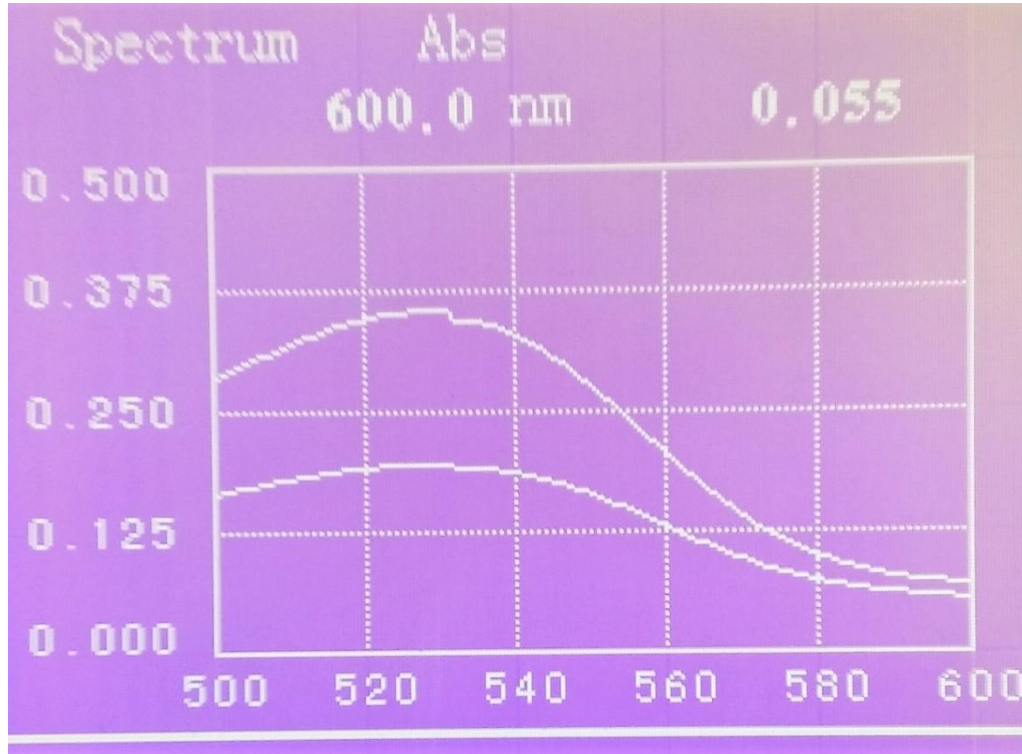
4.6.Antosiyanin Profilinin Belirlenmesi

İnce tabakadaki kromatografisi ile selüloz jelde 2 antosiyanin lekesi oluşmuştur. Bu lekelerin Rf değerleri 0.29 ve 0.50'dir. Bu lekeler ince tabakadan selüloz jel ile birlikte kazınarak

alındı ve asit metanol karışımında çözülerek 500 nm ile 600 nm arasındaki maksimum absorpsiyaları belirlendi. Metanol + %1 HCl [105] solvent sistemine göre her iki lekenin maksimum absorpsiyasının 530 nm dalga boyunda olduğu belirlendi. Bu maksimum dalga boyu siyanidin tipi antosiyanin ile örtüşmektedir. Literatüre göre bu lekelerde Rf değeri 0.29 olan siyanidin 3-glikozit, Rf değeri 0.50 olan ise siyanidin 3-retinozid olarak değerlendirildi. Her iki lekenin absorpsiyon değerleri karşılaştırıldığında Shangri La çeşidinde bulunan toplam antosiyaninin % 29'unun siyanidin 3-retinozid, % 71'inin ise siyanidin 3-glikozit olduğu hesaplanmıştır. Elde edilen kromatogramların fotoğrafı şekil 4.5.'de, spektrofotometrede elde edilen spektrum grafikleri ise şekil 4.6.'da verilmiştir.



Şekil 4.5. Karadut antosiyaninlerinin selüloz ince tabaka da vermiş olduğu kromatogram. Soldan sağa 25, 50, 75 ve 100 µl ekstrakt uygulamalarına ait kromatogramlar. Üstteki lekenin Rf değeri 0.50, alttaki lekenin Rf değeri 0.29'dur.



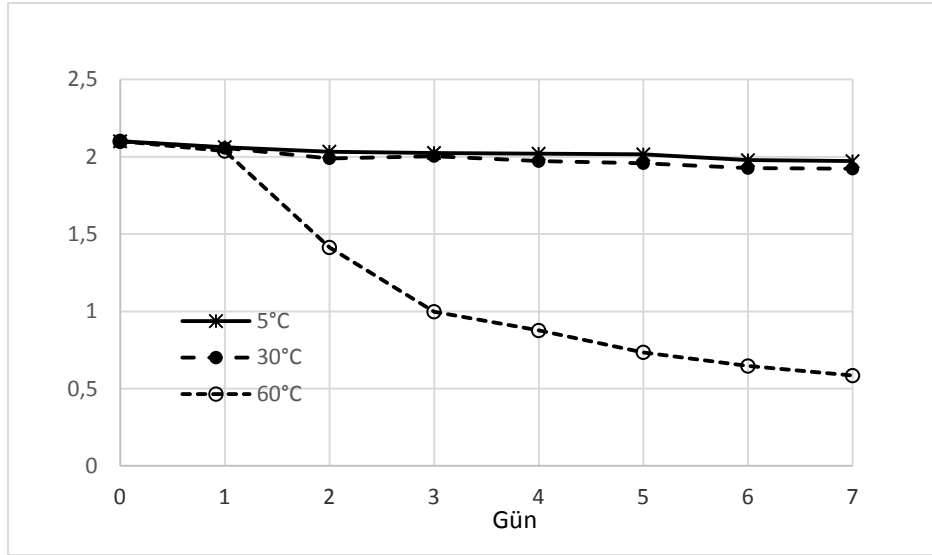
Şekil 4.6. İnce tabakada üzerinde gözlenen iki lekenin 500-600 nm dalgaboyu arasındaki absorbans grafikleri (Rf değeri 0.50 olan lekenin alttaki eğri, Rf değeri 0.29 olan lekenin üstteki eğri) Her iki lekenin maksimum absorbansının 530 nm’de olduğu görülmektedir. Maksimum absorbans değerleri siyanidin ile örtüşmektedir. Rf değeri 0.50 olan antosiyanin siyanidin 3-rutinozit, Rf değeri 0.29 olan antosiyanin ise siyanidin 3-glukozit olarak değerlendirilmiştir [88].

Özen. G (2006), karadut meyvesinin fazla miktarda antosiyanin içerdiği ve bu antosiyaninlerin siyanidin-3-glikozit, siyanidin-3-rutinozit ve pelargonidin-3-glikozit olduğunu belirlemiştir [106]. Chen vd. (2005) dut meyvelerinde yaptıkları araştırmada, oldukça fazla miktarda antosiyanin bulunduğunu ve bu antosiyaninlerinde siyanidin 3-rutinozid ve 3-siyanidin 3-glikozit olduğu belirlenmiştir [13]. Çalışmamızdaki bulgular kaynaklardaki bilgilerle uyumludur.

4.7. Sıcaklık ve Işık Koşullarında Antosiyanin Kararlılığı

Antosiyaninlerin kararlılığı üzerine sıcaklığın etkilerini araştırmak amacıyla 5, 30 ve 60°C sıcaklıklarda karanlık ortamda bekletilen ekstraktların absorbansları 7 gün boyunca günlük olarak ölçülmüştür (Şekil 13, 14 ve 15). Antosiyanin kaybı bakımından 5 ve 30°C sıcaklıklar arasında önemli bir farklılık gözlenmezken, 60°C sıcaklıkta tutulan örneklerde birinci günden sonra önemli ölçüde antosiyanin kaybı olduğu belirlenmiştir ($p \leq 0.01$). Yedinci gün sonunda 60°C sıcaklıkta antosiyanin bozulma oranı % 72.6 düzeyine ulaşmıştır (Çizelge 15).

Antosiyanin kararlılığına ışığın etkisini belirlemek amacıyla yapılan ölçümler, doğrudan olmayan gün ışığı altında bekletilen örneklerde yavaş ve düzenli biçimde bozulma olduğunu göstermiştir. Doğrudan olmayan ışıkta bekletilen örneklerde birinci günde başlayan absorbans kaybı yedinci günün sonunda % 17 düzeyine ulaşmıştır.



Şekil 4.7. Shangri La çeşidi karadutun farklı sıcaklıklarda kararlılık durumları.

Antosiyanin ekstraktlarının 516 nm dalgaboyundaki absorbansları 24 saat arayla 7 gün boyunca ölçülmüştür. Grafikte verilen değerler 3 örneğin ortalama absorbans değerleridir.

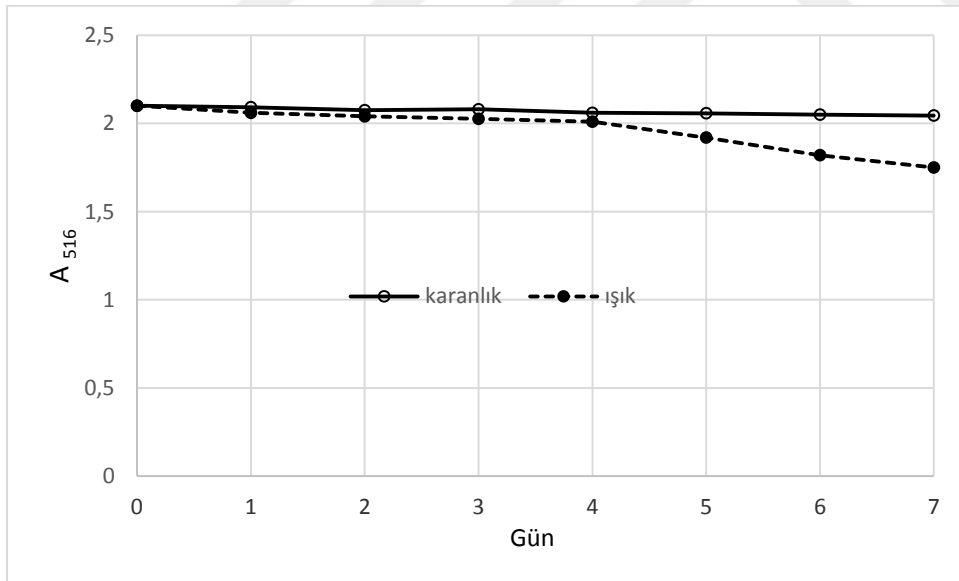
Tablo 4.13. Shangri La çeşidi karadutun farklı sıcaklıklarda kararlılık durumları için varyans analizi.

DK	SD	KT	KO	F Oranı	
Günler	7	1,18	0,17	1,58	
Sıcaklık	2	3,7	1,85	17,38	(**)
Hata	14	1,49	0,11		
Toplam	23	6,37			

Morus nigra Shangri La, çeşidine ait örneklerin üç farklı sıcaklıkta kararlılık durumlarına ilişkin varyans analizi sonuçları sıcaklıklar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir ($P \leq 0.01$).



Şekil 4.8. Shangri La çeşidinden elde edilen ekstraktların farklı sıcaklıklarda 7 gün bekletildikten sonraki görüntüleri.



Şekil 4.9. Shangri La çeşidi karadutun doğrudan olmayan gün ışığında kararlılık durumları. Antosiyanin ekstraktlarının 516 nm dalgaboyundaki absorbanları 24 saat arayla 7 gün boyunca ölçülmüştür. Grafikte verilen değerler 3 örneğin ortalama absorban değerleridir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada karadut (*Morus nigra* L.) bitkisinin çeşitlerinden Shangri La ve Pendula meyveleri biyokimyasal özellikleri bakımından araştırılmış ve bu meyvelerde bol miktarda bulunan antosiyanin bileşiklerinin gıda sektöründe kullanımına katkı sağlayacak özellikleri incelenmiştir. Çalışma konusunun seçiminde temel motivasyon gıda endüstrisinde sağlık riski oluşturan yapay gıda renklendiricileri yerine sağlığa yararlı doğal katkı maddelerinin araştırılması olmuştur. Shangri La çeşidine ait örnekler Mersin, pendula çeşidine ait örnekler ise Çankırı yöresinden yaz ortasında toplanmıştır. Karadutun besin değeri ve gıda endüstrisinde kullanımı bakımından değerli bulgular elde edilmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgular ışığında, ulaşılan sonuçlar ve buna dayalı öneriler aşağıda özetlenmiştir.

Karadut meyvelerinin pH ve titrasyon asitliği gibi özellikleri çeşit özelliklerine, meyvelerin olgunlaşma düzeylerine ve yetiştirme ortamının iklim özelliklerine bağlıdır. Her iki çeşide ait meyvelerde pH değerler asidik bölgede olup Shangri La çeşidinin meyveleri daha düşük pH değerlerine sahiptir. pH değerleri meyvelerin olgunluk düzeyine bağlı olduğundan literatürde asidik bölgede olmak üzere farklı pH değerleri görülebilmektedir. Titrasyon asitliği meyvelerin sahip olduğu toplam organik asit miktarının bir ölçüsü olup sitrik asit eşdeğeri olarak Shangri la çeşidinde daha yüksek bulunmuştur. pH değerleri ve toplam asitlik antosiyanin renkleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğundan meyvelerin renklerini etkilemektedir.

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de insan sağlığı açısından büyük öneme sahip çözünür fenolik bileşikler bakımından zengin meyvelere ve bu meyvelerden üretilen ürünlere olan ilgi gittikçe artmaktadır. Bu nedenle aromatik özellikli birçok bitkide fenolik bileşiklerin analizini içeren çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmada toplam çözünür fenolik madde içeriği Shangri La çeşidinde pendula çeşidine göre daha yüksek bulunmuştur. Pendula çeşidinin kurutulmuş meyvelerinde bu değer üç kat daha yüksek bulunmuştur. Kuru dutun gıda olarak kullanılması durumunda değerli bir fenolik madde kaynağı olduğu söylenebilir.

Farklı iklim ve çevre koşulları, meyvenin olgunlaşma derecesi ve genetik farklılıklar meyvelerin antioksidan maddeleri biriktirme kapasitesini artırmaktadır. Özellikle uygun olmayan iklim koşullarının oluşturduğu stres meyvelerde antioksidan madde birikimine neden olabilir. Bulgular pendula çeşidinin yüksek bir antioksidan kapasiteye sahip olduğunu göstermektedir ve kurutulmuş Pendula örnekleri de antioksidan özelliklerini korumuş görünmektedir. Fenolik bileşikleri az bulunduran pendula çeşidinin yüksek antioksidan kapasiteye sahip olması askorbik asit, tokoferol, glutatyon gibi fenolik olmayan antioksidanların daha fazla bulunduğunu düşündürmektedir. Literatüre bakıldığında farklı karadut çeşitlerinde

antioksidan kapasitenin farklı fakat birbirine yakın değerler olduğu görülmektedir. Karadut meyvelerinin antioksidan kapasitesinin yüksek olması besin değerini artırmaktadır.

Monomerik antosiyanin miktarı iki farklı pH'da spektrum ölçümü ile gerçekleştirilmiştir. Pendula kuru örneklerinde oldukça düşük monomerik antosiyanin bulunmuş olması kuruma sırasında antosiyaninlerin önemli ölçüde kaybedildiğini göstermektedir. Bu değer pendulanın taze örneklerindeki antosiyaninin % 62.6 kadarının kaybedildiğini göstermektedir. Shangri La çeşidinde yüksek monomerik antosiyanin miktarı belirlenmiştir. Antosiyanin birikimi özellikle meyvelerin olgunlaşma döneminde artmaktadır.

Bitki örneklerinde antosiyanin çeşitlerinin ayrılması ve kantitatif olarak ölçülmesinde geleneksel olarak HPLC veya TLC gibi kromatografik teknikler kullanılmaktadır. Son yıllarda yayınlanan makalelerde HP-TLC gibi yeni teknikler yaygınlaşmaktadır. Bu yöntem ince tabakalarda ayrılan antosiyanin tiplerinin oluşturduğu görünür lekeler densitometre ile pikler halinde gösterilmekte ve miktarları belirlenmektedir. Bu çalışmada TLC yöntemi ile selüloz plakalarda ayrılan antosiyanin lekelerinin Rf değerlerinin belirlenmesi ile ve tabakadan kazınan lekelerin spektrofotometrede maksimum absorbans verdiği dalga boyunun belirlenmesi ile antosiyanin tipleri tanımlanmıştır. Karadut meyvelerinde dominant antosiyaninin 530 nm'de maksimum absorbans veren siyanidin olduğu bulunmuştur. Selüloz ince tabakada oluşan iki lekeden küçük lekenin Rf değerleri literatür ile karşılaştırılması siyanidin 3-rutinozid ve büyük lekenin siyanidin-3-glukozid antosiyaninleri olduğunu göstermektedir. Karadut meyvelerinde bulunan toplam siyanidinlerin %29'unun siyanidin 3-rutinozid ve % 71'inin siyanidin 3-glikozid olduğu belirlenmiştir.

Antosiyanin kararlılığı, sıcaklık, ışık ve depolama süresi gibi faktörlerin etkisi altında olup bu faktörler ile çeşitli derecelerde parçalanmakta ve buna bağlı olarak ürünün rengi de değişmektedir. Bu durumda gıdalarda renk değişimi veya yoğunluk artışı şeklinde görülmektedir. Antosiyaninlerin kimyasal olarak bozulma seviyeleri degradasyon indeksi ile belirlenebilmektedir. Bu çalışmada Shangri La ve Pendula çeşidine ait meyvelerin taze ve kuru örneklerinde degradasyon indeksi değerleri belirlenmiş olup, sırasıyla taze meyvelerde düşük kuru meyvelerde yüksek değerler bulunmuştur. Pendula çeşidinin taze ve kurularında bozulma diğer çeşide göre daha fazla olmuştur. Antosiyaninlerin bozulması sonrasında renk değişiminin ortaya çıktığına bu durumda besinlerinde bozulması sırasında renginin değişeceğine dikkat edilmelidir. Antosiyanin kararlılığı yüksek sıcaklıkta önemli ölçüde azalırken, ışığın antosiyanin bozulması üzerindeki etkisi daha sınırlıdır. Düşük sıcaklıklarda antosiyaninlerin oldukça kararlı olması gıdaların soğuk saklanması önemini ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

- [1]. T.C. Gıda Tarım Ve Hayvancılık Bakanlığı. http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001, (12.07.2017)
- [2]. Cao,G., Sofic., And Prior, R.L., antioxidant Capacity of Tea and Common Vegetables. J.Agr. Food Chem. 1996;44:3426-3431..
- [3]. Deighton, N.,Brennan,. R., Finn, C., And Davies, H.V.Antioxidant Properties of Domesticated and Wild Rubus Species. J. Sci. Food and Agric. 2000;80:1307-1313.
- [4]. Wang, H., Cao, G., And Prior, R.L., Total Anthioxidant Capacity Of Fruits. J. Agric. Food Chem. 1996;44:701-705..
- [5]. Ehlenfeldt, M.K., And Prior, R.L. Oxigen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Phenolic and Anthocyanin Concertration in fruit and leaf Tissues of highbush Blueberry. J.Agric. Food Chem. 2001;49: 2222-2227.
- [6]. Guo, C., Cao, G., Sofic, E., And Prior R.L.High Performance Liquid Choromatography Cupled With Coulometric Array Detection Of Electroactive Components İn Fruits And Vegetables: Relationship To Oxigen Radical Absorbance Capacity. J.Agricchem, 1997;45(5):1787-1796.
- [7]. Aras, Ö., Üzüm Ve Üzüm Ürünlerinin Toplam Karbonhidrat, Protein, Mineral Madde ve Fenolik Bilesik İçeriklerinin Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Isparta, 2006.
- [8]. Karakaya, S., Nehir El, S., Bazı Bitkisel Çayların Toplam Fenolik Madde İçerikleri, Antioksidan Aktiviteleri ve Siyah Çay Polifenollerinin in vitro Biyoyararlılığı. GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi, 2006, 23 (1), 1-8.
- [9]. Tosun, İ., Yüksek, S., Üzümsü Meyvelerin Antioksidan Kapasitesi. Ondokuz Mayıs Üni., Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Samsun. (2003),28(3): 305-311..
- [10]. Sernikli, C. Karadut(*Morus Nigra*) Suyunda Toplam Fenolik Madde ve Suda Çözünen Vitaminlerin Isıl Parçalanma Kinetiği. Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği. Yüksek Lisans Tezi. Denizli, 2015.
- [11]. Cornelli, U., “Antioxidant use in nutraceuticals”, *Clin Dermatol*, 2009,27: 175–94.
- [12]. Davidson, GP., Decker, TR., “Chemopreventive Role of Fruits and Vegetables in Oropharyngeal Cancer”, *Nutr Clin Pract*, (2009), 24: 250–60.
- [13]. Chen P.N; Chu S. C; Chiou H. L; Kuo W. H; Chiong C. L., Hsieh Y. S. Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited and inhibitory effect on the migration and of a human long cancer cell line. *Cancer Letters* 2005,235(2):248-259.
- [14]. Dugo P, Mondello L, Errante G et al. Identification Of Anthocyanins İn Berries By Narrow-Bore High-Performance Liquid Chromatography With Electrospray İonization Detection. *J Agric Food Chem* 2001,49: 3987-3992.
- [15]. Heionen, I.M., Meyer, A.S., And Frankel, E.N., Anthioxidant Activity Of Berry Phenolics On Human Low-Densty Hipoprotein And Liposome Oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 1998,46:4107-4112.
- [16]. Akbulut M., Çoklar H., Çekiç Ç. Farklı dut çeşitlerinin bazı kimyasal özellikleri ve mineral madde içeriklerinin belirlenmesi. II. Ulusal Üzümsü Meyve Sempozyumu, 14-16 Eylül Tokat, 2006; pp:176-180
- [17]. Erdoğan, Ü. Ve Pırlak, L., “Ükümüzde Dut (*Morus Spp.*) Üretimi Ve Değerlendirilmesi”, *Alatarm*, 2005,4 (2): 38-43.
- [18]. Vijayan, K., Chauhan, S., Das, K.N., Chakrakarti, P.S., Ray, N.B., “Leaf yield component combining abilities in mulberry”, *Central Sericultural Research*, 1997, 98 47–52.
- [19]. Ercisli, S. and Orhan E., Some physico-chemical characteristics of black mulberry (*Morus nigra* L.) genotypes from Northeast Anatolia region of Turkey. *Scientia Horticulturae*, 2008,116(1):41-46.
- [20]. Davis, P.H., “Flora of Turkey and the east aegean island”, *Edinburgh*, (1982), volume 7.
- [21]. Lanska, D., “Jadalne rosliny dzika rosnace”, *Polska Oficyna Wydownictwa “Delta W-Z”*, Warszawa, 1992; p. 126-127.

- [22]. Gerasopoulos, D. and Stavroulakis G., "Quality Characteristics of Four Mulberry (*Morus* sp) Cultivars in the Area of Chania, Greece", *J Sci Food Agric.*, 1997, 73, 261–264.
- [23]. Ercisli, S., A short review of the fruit germplasm resources of Turkey. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2004, 51:419-435.
- [24]. Yaltırık, F., Davis, P.H., (Ed) "Morus flora of Turkey", UK. Edinburgh: *Edinburgh University Pres*, 1982, Vol 7 641–642.
- [25]. De Candolle, A., "Origin of Cultivated Plants", New York and London, (1967); p.149-153.
- [26]. Koyuncu F., Vural E. Karadut ağacının bazı organ ve dokularının morfolojik özellikleri. *Ulusal Kivi ve Üzümü Meyveler Sempozyumu*, Ordu, 23-25 Ekim 2003.
- [27]. Bae, S.H., Suh, H.J., Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea. *LWT Food Science and Technology*, 2007,40: 955-962.
- [28]. Grieve, M., Mulberry common. <http://botanical.com/botanical/mgmh/m/mul.com62>. (10.08.2009).
- [29]. Asımgil, A., Şifalı bitkiler. Timaş Yayınları, İstanbul, 1997.
- [30]. Simopoulos, A.P. and Salem, N., "Fatty Acids and Lipids From Cell Biology to Human Disease", *Lipids*, 31 (suppl), SI, 1996.
- [31]. Baytop, A., "Farmasötik Botanik", *İstanbul Üniv. Yay. No: 3637, Eczacılık Fak. Yay. No:58*, İstanbul, 1996; 315 s.
- [32]. Schwinn KE, Davies KM., "Flavonoids, in *Plant Pigments and Their Manipulation*", Annual Plant Reviews, Vol 14 (Ed. K Davies), Blackwell Publishing, 2004, pp, 92-128.
- [33]. Stavric B. "Role of chemopreventers in human diet" *Clin. biochem.* 1994, 27 (5):319-332.
- [34]. Stavric B. "Qercetin in our diet: from potent mutagen to probable anticarcinojen". *Clin. Biochem* 1994,27(4): 245-248.
- [35]. Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. "Flavonoid as antioxidant: determination of radical-scavenging efficiencies: methods in enzymology". 1990, 186:343-355.
- [36]. Sorata, Y., Takahama, U., Kimura, M., "Protective effect of quercetin and rutin on photosensitized lysis of hematoporphyrin". *Biochim. Biophys.* 1984, Acta.799:313-317.
- [37]. Harborne, J. B., Marby, T., Marby, J. H., "The Flavonoids", Chapman And Hall, London, 1975.
- [38]. Harborne, J. B., Marby, T. J., "The Flavonoids: advances" in research, Chapman And Hall, London, 1982.
- [39]. Smith, D. A., Banks, S. W., "Plants flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological and structure activity relationship", 1986, 113-124.
- [40]. Watson, R.R. ve Preedy, V.R. "Nutrition and heart disease causation and Prevention". CRC Press., U.S.A., 2004.
- [41]. Cardon, D., "Natural dyes - sources, tradition, technology and science". Archetype Publications Ltd., London, 2007.
- [42]. Dölen, E., "Tekstil tarihi: Dünyada ve Türkiye' de tekstil teknolojisinin ve sanayiinin tarihsel gelişimi", Marmara Üniversitesi Teknik Eğitim Fakültesi Yayınları No:92/1, Matbaa Eğitimi Bölümü Yayın No:6, İstanbul, 1992.
- [43]. Sorata, Y., Takahama, U., Kimura, M., "Protective effect of quercetin and rutin on fotosensitized lysis of hematoporphyrin", *Biochim. Biophys.* 1984, Acta.799: 313-317.
- [44]. Brouillard, R. "Flavonoid and flower colour", in the *Flavonoids: Advances in Research Since 1980* (ed. J. B. Harborne), Chapman & Hall, London, UK, 1988; pp. 525-538.
- [45]. Brouillard, R. & Dangles, O. "Flavonoid and flower colour", in the *Flavonoids: Advances in Research Since 1986* (ed. J. B. Harborne), Chapman & Hall, London, UK, 1993; pp. 565-587.
- [46]. Markham, K.R., Gould, K.S. ve ark. "Anthocyanic vacuolar inclusions-their nature and significance in flower colouration", *Phytochem*, 2000,55:327-336.
- [47]. Saito, N., Abe, K., Honda, T., Timberlake, C. F. & Bridle, P. "Acylated delphinidin glucosides and flavanols from *Clitoria ternatea*". *Phytochemistry*, 1985, 24, 1583.
- [48]. Goto, T., Kondo, T. "Structure and molecular stacking of anthocyanins – flower color of variation", *Ang Chemie – Int. Ed. Eng.*, 1991,30: 17-33.
- [49]. Yoshida, K., Mori, M., Kondo, T., "Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology", *Nat Prod Rep*, 2009, 26: 884-915.

- [50]. Prior, R.L., Wu X. "Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities", *Free Radical Res*, 2006,40: 1014-1028.
- [51]. Harborne, J.B., Williams, C.A., "Anthocyanins and other flavonoids", *Nat Prod Rep*, 2001,18: 310-333.
- [52]. Schwinn KE, Davies KM., "Flavonoids, in *Plant Pigments and Their Manipulation*", Annual Plant Reviews, Vol 14 (Ed. K Davies), Blackwell Publishing, 2004; pp, 92-128.
- [53]. Taiz L, Zaiger E., "Bitki Fizyolojisi", (Çev. Ed. İ. Türkan), Palme Yayıncılık, 2008, s: 293-295.
- [54]. Wang, H. Cao, Prior Rl. Oxygen Radical Absorbing Capacity Of Anthocyanins. *J Agric Food Chem*, 1997, 45:304-309.
- [55]. Francis FJ. Anthocyanins and betalains: composition and applications. *Cereal*, (2000).
- [56]. Cemeroglu B, Yemenicioğlu A, Özkan M. *Meyve ve Sebzelerin Bilesimi Sogukta Depolanmaları*. Gıda Teknolojisi Dernegi Yayınları, Ankara. 2001, 328s.
- [57]. Clifford MN. Anthocyanins-nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food* 2000, Agric, 80: 1063-1072.
- [58]. MacDougall, D.B., *Colour in Food Improving Quality*. Woodhead Publishing Limited. Cambridge, England, 2002,179-221.
- [59]. Harborne, J.B., Williams, C.A., "Advances in flavonoid" research since 1992. *Phytochem*, 2000, 55: 481-504.
- [60]. Wang H, Nair MG, Strasburg GM, Cheng Y-C, Booren AM, Gray JI, Dewitt DL. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin from tart cherries. *J Nat Prod*, 1999, 62: 294-296.
- [61]. Stintzing FC, Stintzing AS, Carle R, Frei B, Wrolstad RE. Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanins pigments. *J Agric Food Chem*, 2002,50: 6172-6181.
- [62]. Satué-Garci A MT, Heinonen M, Frankel EN. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin liposome systems. *J Agri C Food Chem*, 1997, 45: 3362-3367.
- [63]. Halliwell B., Gutteridge Jmc., "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview." In: *Methods in Enzymology*, 1990, 186, 1-85.
- [64]. Gutteridge JMC., Richmond R., Halliwell B., "Oxygen free radicals and lipid peroxidation: Inhibition by the protein caeruloplasmin." *FEBS Letters*, 1980,112(2), 269-272.
- [65]. Halliwell B., "Free radicals and antioxidants:A personal view." *Nutrition Reviews*, 1994,52(8), 253-265.
- [66]. Halliwell B., Clement Mv., Long Lh., "Hydrogen Peroxida İn The Human Body." *Febs Letter*, 2000, 486, 10-13.
- [67]. Akkuş İ, Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, Konya, 1995.
- [68]. Dağlı Ü., Balk M., Yücel D., Ülker A., Över H., vd., "The role of reactive oxygen metabolites in ulcerative colitis." *Inflammatory Bowel Diseases*, 1997,3(4), 260-264.
- [69]. Cruthirds DL, Novak L, Akhi Km., Sanders Pw., Thompson JA., vd., "Mitochondrial targets of oxidative stress during renal ischemia/reperfusion." *Archives Biochemistry and Biophysics*, 2003, 412, 27-33.
- [70]. Taşçı I, Yavuz N., Caner M., Göksel S., Yılmaz O., vd., "Karaciğer sıcak iskemi ve reperfüzyon hasarında dimetilsülfoksil (DMSO), allopurinol ve deferoksamin'in etkileri." *Çağdaş Cerrahi Dergisi*, 1995, 9, 198-202.
- [71]. Hıpkiss A.R., "Biological aspects of ageing." *Psychiatry*, 2007,6(12), 476-479.
- [72]. Dauer W., Przedborski S., "Parkinson's disease: Mechanism and models." *Neuron*, 2003,39, 889-909.
- [73]. Mosley RL., Benner EJ., Kadiu I., Thomas M., Boska Md., vd., "Neuroinflammation, oxidative stress, and the pathogenesis of Parkinson's disease." *Clinical Neuroscience Research*, 2006, 6(5), 261-281.
- [74]. Zalata A., Yahia S., El-Bakary A., Elsheikha HM., "Increased DNA damage in children caused by passive smoking as assessed by comet assay and oxidative stress." *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2007, 629(2), 140-147.

- [75]. Kösecik M., Erel Ö., Sevinç E., Selek S., "Increased oxidative stres in children exposed to passive smoking." *International Journal of Cardiology*, 2005,100(1), 61-64.
- [76]. Tao F., Gonzales-Flecha B., Kobzik L., "Reactive oxygen species in pulmonary inflammation by ambient particulates." *Free Radical Biology and Medicine*, 2003, 35(4), 327-340.
- [77]. Bowler R., Barnes P., Crapo J., "The role of oxidative stres in chronic obstructive pulmonary disease." *Journal of Chronic Obstructive PulmonaryDisease*, 2004, 1(2), 255-277.
- [78]. Anderson R.A., "Prescribing antioxidants. 2007," Chapter 103, p.1083-1094, In: *Rakel: Integrative Medicine*, 2nd ed., Saunders.
- [79]. Halvorsen Bl., Holte K., Myhrstad Mcw., Barıgmo I., Hvattum E., Remberg Sf. vd., "A Systematic Screening Of Total Antioxidants İn Dietary Plants." *The Journal Of Nutrition*, 2002, 132(3), 461-471.
- [80]. Kafkas, E., Bozdoğan, A., Burgut, A., Türemiş, N., Paydaş Kargı, S., Cabaroğlu, T., Bazı Üzümsü Meyvelerde Toplam Fenol ve Antosiyenin İçerikleri. II. Ulusal Üzümsü Meyveler Sempozyumu, Tokat, 2006, 309-312.
- [81]. Anonymous. Determination of titratable acidity. IFU-Analysis Nr. 3. International Federation of Fruit Producers. Paris, 1996.
- [82]. Prieto, P., Manuel, P., Miguel, A. "Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E." *Analytical biochemistry* 1999, 269.2: 337-341.
- [83]. Fuleki, T. and Francis, F. Quantitative methods for anthocyanins. *J. FoodScience*, 1968, 33, 72-77, 78-83.
- [84]. Damar, İ. Vişne Suyunun Antosiyenin Profili ve Antioksidan Kapasitesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi. Ankara, 2010.
- [85]. Potravinarstvo, Scientific Journal For Food Industry vol.7, no:1,p.130-135.doi:10.5219/293. Web sitesi.http://www.potravarstvo.com. (3 july 2013).
- [86]. Sağır, C. Lamiaceae ve Poaceae Familyalarına Ait Bazı Türlerin AntioksidanKapasitelerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, 2014.
- [87]. Giusti, M. M. and Wrolstad, R. E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. <http://www.does.org/masterli/facsample.htm>. (27.10.2009)
- [88]. Francis, G.W. and Anderson, O.M. Naturel Pigments In Handbook of Thin Layer Chromatography 3th Edition. Marcel Dekker, New York USA, 2003; pp. 697-732-924.
- [89]. Çam İ. Edremit ve Gevaş yöresi dutlarının fenolojik ve pomolojik özellikleri ile seleksiyonu üzerine araştırmalar. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi (basılmamış), Van, 2000.
- [90]. Uzun H., Bayır A. Farklı dut genoilerinin bazı kimyasal özellikleri ve antiradikal aktiviteleri. III. Ulusal Üzümsü Meyveler Sempozyumu, Kahramanmaraş, 10-12 Haziran 2009.
- [91]. Çoruhlu, T. Kara Dut Antosiyaninlerinin İyonik Jelasyon Yöntemi İle Enkapsülasyonu Ve Enkapsülasyon Parametrelerinin Tepki Yüzeyi Metodu İle Optimize Edilmesi. İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 2013.
- [92]. Ercisli, S., ve Orhan, E. Some Physico-Chemical Characteristics Of Black Mulberry (*Morus Nigra L.*) Genotypes From Northeast Anatolia Region Of Turkey, *Scientia Horticulturae*, 2008, 116, 41-46.
- [93]. Mahmood, T., Anwar, F., Afzal, N., Kausar, R., Ilyas, S.,. Influence of ripening stages and drying methods on polyphenolic content and antioxidant activities of mulberry fruits. *J. Food Meas. Charact.* 2017, 0, 0. doi:10.1007/s11694-017-9602-6.
- [94]. Özkaya Erkaleli, Z. Uşak İli Ulubey İlçesinde Yetişen Karadutların (*Morus Nigra L.*) Morfolojik, Fenolojik Ve Pomolojik Özelliklerinin Belirlenmesi Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, 2015.
- [95]. Lou, H., Hu, Y., Zhang, L., Sun, P. ve Lu, H., Nondestructive Evaluation Of The Changes Of Total Flavonoid, Total Phenols, ABTS And DPPH Radical Scavenging Activities, And Sugars During Mulberry (*Morus Alba L.*) Fruits Development By Chlorophyll Fluorescence And RGB Intensity Values, *LWT - Food Science And Technology*, 2012, 47, 19-24.

- [96]. Wu, X., Liang, L., Zou, Y., Zhao, T., Zhao, J., Li, F., ve Yang, L., Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.), *Food Chemistry*, 2011,129, 443–453.
- [97]. Pliszka, B., Wazbinska, J., Huszcza-Ciolkowska, G. ve Ploszaj, B., Content of polyphenolic compounds and their antioxidative properties in harvested black mulberry (*Morus nigra* L.) fruit at different ripeness phases. *Scientific Works of the Lithuanian Institute of Horticulture and Lithuanian University of Agriculture*, 2007,26(3).
- [98]. Fazaeli, M., Yousefi, S. ve Emam-Djomeh, Z., Investigation on the effects of microwave and conventional heating methods on the phytochemicals of pomegranate (*Punica granatum* L.) and black mulberry juices, *Food Research International*, 2011.
- [99]. Aramwit, P., Bang N. And Srichana T. The Properties And Stability Of Nthocyanins İn Mulberry Fruits. *Food Res. Internat.*, 2010, 43, 1093–1097.
- [100]. Özgen, M., Serçe, S. And Kaya, C. Phytochemical And Antioxidant Properties Of Anthocyanin-Rich *Morus Nigra* And *Morus Rubra* Fruits. *Scien. Horticul.*, 2009,119, 275–279.
- [101]. Orak, H. H. Total Antioxidant Activities, Phenolics, Anthocyanins, Polyphenoloxidase Activities Of Selected Red Grape Cultivars And Their Correlations. *Scien. Horticul.*, 2007,111, 235–241.
- [102]. Karadeniz, F., Burdurlu, H. S., Koca, N. And Soyer, Y. Antioxidant Activity Of Selected Fruits And Vegetables Grown İn Turkey. *J. Agric. Forestry*, , 2005, 29, 297–303.
- [103]. Fang, Z., Zhang, Y., Lü, Y., Ma, G., Chen, J., Liu, D. And Ye, X. Phenolic Compounds And Antioxidant Capacities Of Bayberry Juices. *Food Chem.*, 2009, 113, 884–888.
- [104]. Food Waste, Meyve Ve Sebze Atıklarından Elde Edilen Doğal Renk Maddelerinin Üretimi Ve Gıda Sanayinde Kullanım Alanları, [Http://Eng.Ege.Edu.Tr](http://Eng.Ege.Edu.Tr),(10.2.2016).
- [105]. Siegelman, H.W. And Hendricks, S.B. Photocontrol Of Alcohol, Aldehyde and Anthocyanin Production in Apple Skin. *Plant Phys.* 1958, 33:409-413.
- [106]. Özen G. Karadut Suyu Antosiyaninlerinin HPLC İle Belirlenmesi Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Semineri Konya, (2006), 55s.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Mehmet ŞENOL

Doğum Tarihi: 01/01/1974

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lise	Matematik-Fen	Tevfik Sırrı Gür Lisesi	1989-1992
Lisans	Biyoloji Öğretmenliği	Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi	1993-1998
Yüksek Lisans	Biyoteknoloji	Mersin Üniversitesi	2014-2017

Görevler:

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Öğretmen	Özel Dershaneler	2004-2014
Öğretmen	Milli Eğitim Bakanlığı	2014-2017