

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KALECİK KARASI ÜZÜMLERDEN (*Vitis vinifera* L.) ÜRETİLEN KIRMIZI
ÜZÜM SUYUNUN ÇEŞİTLİ DURULTMA YARDIMCI MADDELERİ İLE
DURULTULMASI VE DURULTMANIN ÜZÜM SUYU RENGİ ÜZERİNE
ETKİSİ**

Sevgin DIBLAN

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2013**

Her hakkı saklıdır

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

19.12.13

Sevgin DIBLAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KALECİK KARASI ÜZÜMLERDEN (*Vitis vinifera* L.) ÜRETİLEN KIRMIZI ÜZÜM SUYUNUN ÇEŞİTLİ DURULTMA YARDIMCI MADDELERİ İLE DURULTULMASI VE DURULTMANIN ÜZÜM SUYU RENGİ ÜZERİNE ETKİSİ

Sevgin DIBLAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet ÖZKAN

Bu çalışmada, 5 farklı durultma yardımcı maddesinin Kalecik Karası üzümünden elde edilen kırmızı üzüm suyu ACN'leri üzerine etkisi incelenmiştir. Durultmanın, kırmızı üzüm suyu renk özelliklerine etkisini gözlemlemek amacıyla, durultulmamış ve durultulmuş meyve sularında, toplam monomerik ACN analizi, ACN dağılım analizi, polimerik renk ve reflektans renk değerleri tayinleri yapılmıştır.

Durultma işleminden sonra üzüm suyunun bulanıklık değeri, bentonitin; kazein ve albumin kombinasyonu ile, 28 NTU'dan 4.2–4.4 NTU seviyesine düşmüştür. Bunu, bentonit (5.7 NTU) ve “bentonit+jelatin” (8.8 NTU) uygulamaları takip etmektedir. Durultma işlemi sonunda en yüksek NTU seviyesine ise, kitosan ve “bentonit+kitosan” uygulaması ile ulaşılmıştır. Bentonit, “bentonit+kazein” ve “bentonit+albumin” uygulamalarından sonra, ACN miktarında önemli bir kayıp saptanmazken, kitosan, “bentonit+kitosan” ve “bentonit+jelatin” durultmasından sonra ACN miktarında görülen kayıp sırasıyla, %38, 26 ve 20'dir. Kayba uğrayan ACN miktarında görülen bu farklılığın nedeni, polifenollerin durultma yardımcı maddeleri ile oluşturdukları flokların farklı büyüklükte olmasıdır. Örneğin, jelatin; albumin ve kazeine göre, üzüm suyunda bulunan polifenoller ile daha büyük floklar oluşturmuş ve bunun sonucunda daha fazla ACN'i beraberinde sürükleyerek, daha fazla kayba yol açmıştır. Kalecik Karası üzüm suyunda, HPLC yöntemiyle, 4 farklı ACN saptanmıştır. Malvidin-3-glikozitin (%57), bu üzüm çeşidinde bulunan başat ACN olduğu saptanmıştır. Üzüm suyunda tanımlanan diğer ACN'ler ise; peonidin-3-glikozit (%10), siyanidin-3-glikozit (%6) ve delfinidin-3-glikozittir (%4).

Elde edilen sonuçlar, durultmanın etkisinin durultma yardımcı maddesi dozundan çok, durultma yardımcı maddesi türüne bağlı olduğunu açık bir şekilde göstermiştir. Berraklık açısından, en iyi sonuçlar kazein ve albumin durultma uygulamalarında elde edilmiştir. Aynı zamanda, bu uygulamalar sonunda üzüm suyu renk özelliklerinde önemli bir değişim saptanmamıştır. Bu sonuçlar göz önüne alınarak, gerek en iyi berraklık, gerekse de en az ACN kaybı olduğu için, kırmızı üzüm suyu durultmasında, “bentonit+kazein” ve “bentonit+albumin” kombinasyonları önerilmektedir.

Aralık 2013, 100 sayfa

Anahtar Kelimeler: Durultma, antosiyanin, durultma yardımcı maddeleri, bentonit, kitosan, jelatin, kazein, albumin.

ABSTRACT

Master Thesis

CLARIFICATION of RED GRAPE JUICE from KALECIK KARASI GRAPES (*Vitis vinifera* L.) with VARIOUS CLARIFICATION AGENTS and EFFECTS of CLARIFICATION on the COLOR of GRAPE JUICE

Sevgin DIBLAN

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

Supervisor : Prof. Dr. Mehmet ÖZKAN

In this research, the effects of five different types fining agent on anthocyanins (ACNs) and color of red grape juice produced from Kalecik Karasi variety (*Vitis vinifera* L.) were investigated. Total monomeric ACN, ACN composition, polymeric color and reflectance color analyses were carried out to determine the color changes during clarification of grape juice samples.

The turbidity of red grape juice decreased from 28 NTU to 4.2–4.4 NTU with “bentonite+albumin” and “bentonite+casein” combinations. This was followed by bentonite (5.7 NTU) and “bentonite+gelatin” clarifications (8.8 NTU). Chitosan and “bentonite+chitosan” combination had the highest turbidity level (11 NTU) among all clarification treatments. The clarification with bentonite, “bentonite+casein” and “bentonite+albumin” did not cause significant reductions in ACNs. On the contrary, chitosan, “bentonite+chitosan” and “bentonite+gelatin” resulted in dramatical reductions in ACN contents of red grade juice samples, namely 38, 26 and 20%, respectively. The main reason for the various removals of ACNs can be attributed to the formation of different sizes of complexes with polyphenols by the various fining agents. For example, gelatin forms much bigger complexes with polyphenols in grape juice, than those formed by albumin and casein. This, in turn, resulted in the sweeping of more ACNs by the gelatin-polyphenol complexes during sedimentation. Four major ACNs were identified in red grape juice by HPLC. Malvidin-3-glucoside (57%) was the major anthocyanin, followed by peonidin-3-glucoside (10%), cyanidin-3-glucoside (6%) and delphinidine-3-glucoside (4%).

The results of this study clearly showed that the effect of clarification depends on the type of fining agents more than the dosage used during clarification. In terms of turbidity, the clarification with casein and albumin resulted in the highest clarity among all clarification treatments. At the same time, the clarification with casein and albumin did not cause much change in color values of red grape juice. Accordin to these results, the combinations of “bentonite+casein” and “bentonite+albumin” are recommended for the clarification of red grape juice in terms of both highest clarity and lowest ACN loss among all clarification treatments.

December 2013, 100 pages

Key Words: Clarification, anthocyanin, fining agents, bentonite, chitosan, gelatin, casein, albumin.

TEŞEKKÜR

Çalışmam boyunca bilgi ve tecrübesiyle bana her zaman destek olan, sadece laboratuvar çalışmalarında değil, hayatım boyunca önüme çıkan zorluklar karşısında nasıl durmam gerektiğini öğreten, beni daha güçlü bir insan yapan, saygıdeğer hocam Prof. Dr. Mehmet ÖZKAN'a (Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü) sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Çalışmamda yaptığım analizler konusunda, beni yetiştiren değerli arkadaşım Dr. Betül ERKAN KOÇ'a, bilgi ve tecrübelerini hiçbir zaman esirgemeyen Dr. Meltem TÜRKYILMAZ'a çok teşekkür ederim. Ayrıca, tezimin her aşamada yardımları ve destekleri ile yanımda olan sevgili dostlarım Buket ORHAN ve Sümeyye ALAGÖZ'e, üzüm suyu üretimi sırasında verdikleri emekler için Kübra ERTAN ve Ayşe NAVRUZ'a çok teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında, aldığım her kararda, her zaman arkamda duran, her şekilde beni destekleyen, en değerli varlıklarım, annem Sevgi DIBLAN ve babam Turgay Habib DIBLAN'a sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü tarafından 13L4343004 no'lu proje kapsamında desteklenmiş olup, verdiği destek için Ankara Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederiz.

Sevgin DIBLAN

Ankara, Aralık 2013

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KURUMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1 Ülkemizde Üzüm Üretimi ve Değerlendirme Alanları.....	3
2.2 Kırmızı Üzüm Suyunun Bileşimi.....	4
2.2.1 Polifenoller.....	5
2.2.1.1 Fenolik asitler.....	6
2.2.1.2 Flavonoidler.....	7
2.2.2 Proteinler.....	14
2.3 Kırmızı Üzüm Suyu Durultması.....	15
2.3.1 Bulanıklık etmeni bileşik grupları.....	16
2.3.2 Bulanıklık oluşum mekanizması.....	16
2.3.3 Durultma prensibi.....	20
2.3.4 Durultma yardımcı maddeleri ve etki mekanizmaları.....	21
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	27
3.1 Materyal.....	27
3.1.1 Kırmızı üzüm suyu.....	27
3.1.2 Kimyasallar.....	27
3.2 Yöntem.....	28
3.2.1 Kırmızı üzüm suyu üretimi.....	28
3.2.2 Kırmızı üzüm suyu durultması.....	28

3.2.2.1 Durultma yardımcı maddelerinin hazırlanması.....	28
3.2.2.2 Durultma uygulaması.....	30
3.2.3 Fiziksel analizler.....	32
3.2.3.1 pH tayini.....	32
3.2.3.2 Bulanıklık düzeyinin ölçülmesi.....	32
3.2.3.3 Reflektans renk tayini.....	32
3.2.4 Kimyasal analizler.....	32
3.2.4.1 Titrasyon asitliği.....	32
3.2.4.2 Toplam monomerik antosiyanin tayini.....	33
3.2.4.3 Antosiyanin parçalanma ölçütlerinin belirlenmesi.....	34
3.2.4.4 Antosiyanin dağılımının belirlenmesi.....	35
3.2.4.4.1 Üzüm suyu antosiyaninleri için geri kazanım (recovery) analizi.....	38
3.2.4.5 Fenolik dağılımının belirlenmesi.....	39
3.2.4.5 Antioksidan aktivite tayini.....	39
3.3 İstatistik Değerlendirme.....	42
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	43
4.1 Durultma Ön Deneme Sonuçları ve Durultma Yardımcı Maddesi Dozunun Belirlenmesi.....	43
4.1.1 Üzüm suyunun bentonit ile durultulması.....	44
4.1.2 Üzüm suyunun jelatin, albumin ve kazein ile durultulması.....	45
4.1.3 Üzüm suyunun kitosan ile durultulması.....	48
4.1.4 Durultma sonrası bulanıklık değerleri ve fenolik dağılımının bulanıklık üzerine etkisi.....	49
4.2 Üzüm Suyu Antosiyanin İçeriklerinin HPLC Yöntemi ile Belirlenmesinde Kullanılan Standart Eğriler.....	55
4.3 Durultmanın Üzüm Suyu Renk Özellikleri Üzerine Etkisi.....	55
4.3.1 Toplam monomerik antosiyanin miktarları.....	58
4.3.2 Antosiyanin dağılım ve miktar analiz sonuçları.....	61
4.3.3 Spektrofotometrik ve HPLC yöntemleri ile yapılan toplam monomerik antosiyanin analizlerinin karşılaştırılması.....	67
4.3.4 Polimerik renk değerleri.....	69
4.3.5 Reflektans renk değerleri.....	72

4.4 Geri kazanım (Recovery) Testi.....	73
4.5 Durultmanın Üzüm Suyu Antioksidan Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	74
4.6 Durultmanın Üzüm Suyunun Bazı Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Etkisi.....	76
5. SONUÇLAR.....	78
KAYNAKLAR.....	79
EKLER.....	87
EK 1 Varyans Analizi ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi Sonuçları.....	88
EK 2 Üzüm Suyu Antosiyanin Dağılım Kromatogramları.....	96
ÖZGEÇMİŞ.....	100

SİMGELER DİZİNİ

Briks ($^{\circ}\text{Bx}$)	Suda çözünür kuru madde
h	Saat (hour)
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
r	Korelasyon katsayısı
R^2	Determinasyon katsayısı
MeOH	Metanol
NTU	Nephelometric Turbidity Units
UV	

Kısaltmalar

ACN	Antosiyanin
Cy-3-glu	Siyanidin-3-glikozit
Cy-3,5-diglu	Siyanidin-3,5-diglikozit
Dp-3-glu	Delfinidin-3-glikozit
IFU	Uluslararası Meyve Suyu Federasyonu (International Fruit Juice Union)
MEYED	Meyve Suyu Endüstrisi Derneği
Mv-3-glu	Malvidin-3-glikozit
PDA	Foto dioderay dedektörü
PET	Polietilen terafitalat (Polyethylene teraphthalate)
Pn-3-glu	Peonidin-3-glikozit
PVDF	Poliviniliden florür (Polyvinylidene fluoride)
PVPP	Polyvinilpoliprolidon
TEAC	Trolox Equivalent Antioksidant Capacity

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Gallik asit ve elajik asit.....	7
Şekil 2.2	Flavonoidlerin temel yapısı.....	8
Şekil 2.3	Meyvelerde yaygın olarak bulunan flavan-3-ol'ler.....	9
Şekil 2.4	Flavilium katyonu.....	10
Şekil 2.5	Antosiyaninlere bağlanan aromatik asitler (a), alifatik asitler (b).....	12
Şekil 2.6	Polifenol-protein interaksiyonu.....	17
Şekil 3.1	Üzüm suyu üretim akış şeması.....	29
Şekil 3.2	Durultma işlem basamakları.....	31
Şekil 3.3	Epikateşin standart eğrisi.....	40
Şekil 4.1	Bulanık düzeyi ve fenolik madde miktarları arasında görülen doğrusal ilişki.....	50
Şekil 4.2	Üzüm suyundaki fenolik maddelerin HPLC kromatogramı.....	53
Şekil 4.3	Malvidin-3-glikozit standart eğrisi.....	57
Şekil 4.4	Peonidin-3-glikozit standart eğrisi.....	57
Şekil 4.5	Delfinidin-3-glikozit standart eğrisi.....	57
Şekil 4.6	Siyanidin-3-glikozit standart eğrisi.....	58
Şekil 4.7	Siyanidin-3,5-diglikozit standart eğrisi.....	58
Şekil 4.8	Üzüm suyu ACN'lerin HPLC kromatogramı.....	66
Şekil 4.9	Farklı yöntemlerle durultulan üzüm sularındaki ACN'lerin spektrofotometrik ve HPLC yöntemleri ile hesaplanan miktarları.....	68
Şekil 4.10	Spektrofotometrik ve HPLC yöntemleri ile belirlenen ACN miktarları arasında bulunan doğrusal ilişki.....	68
Şekil 4.11	Troloks standart eğrisi.....	76

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1	Yıllara göre Türkiye'nin üzüm üretimi ve payı.....	4
Çizelge 2.2	Antosiyaninlerin yapısal farklılıkları ve maksimum dalga boyları	10
Çizelge 2.3	Durultma yardımcı maddelerinin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması.....	22
Çizelge 2.4	En çoktan aza doğru bazı durultma yardımcı maddelerinin etkileri.....	26
Çizelge 3.1	Antosiyaninler için uygulanacak elüsyon profili.....	37
Çizelge 3.2	Fenolik madde dağılımı için uygulanacak elüsyon profili.....	40
Çizelge 4.1	Bentonit ile durultma ön deneme sonuçları.....	44
Çizelge 4.2	Jelatin, albumin ve kazein durultma yardımcı maddeleri ve bentonit kombinasyonları ile yapılan durultma ön deneme sonuçları.....	47
Çizelge 4.3	Kitosan ile yapılan durultma ön deneme sonuçları.....	49
Çizelge 4.4	Durultma işleminin bulanıklık düzeyi üzerine etkisi.....	50
Çizelge 4.5	Farklı durultma yardımcı maddeleri ve kombinasyonları ile durultulan üzüm sularının fenolik madde miktarında görülen değişim.....	52
Çizelge 4.6	Farklı durultma yardımcı maddeleri ve kombinasyonları ile durultulan üzüm suyunun farklı fenoliklerinin miktarlarında görülen değişim.....	56
Çizelge 4.7	Farklı durultma yardımcı maddeleri ve kombinasyonları ile durultulan üzüm suyunun toplam monomerik ACN miktarları.....	59
Çizelge 4.8	Farklı durultma yardımcı maddeleri ve kombinasyonları ile durultulan üzüm suyunun ACN miktarları.....	63
Çizelge 4.9	Farklı durultma yardımcı maddeleri ve kombinasyonları ile durultulan üzüm suyunun farklı ACN miktarlarında görülen değişim.....	64
Çizelge 4.10	Farklı durultma yardımcı maddeleri ve kombinasyonları ile durultulan üzüm suyunun polimerik renk değeri ve oranı.....	69
Çizelge 4.11	Farklı durultma yardımcı maddeleri ve kombinasyonları ile durultulan üzüm suyunun reflektans renk değerleri.....	73
Çizelge 4.12	Üzüm suyu antosiyaninlerinin geri kazanımı.....	74

Çizelge 4.13	Farklı durultma yardımcı maddeleri ve kombinasyonları ile durultulan üzüm sularının antioksidan aktivitesinde görülen değişim.....	75
Çizelge 4.14	Durultulmamış ve durultulmuş örneklerin bazı analitik özellikleri.....	77

1. GİRİŞ

Son yıllarda, kanser başta olmak üzere, tedavisi zor ve pahalı olan kronik hastalıklarla mücadele eden hasta sayısının artması ve bu doğrultuda yapılan araştırmaların, bu hastalıkların beslenme alışkanlığından, olumlu veya olumsuz yönde etkilendiğinin göstermesiyle insanların sağlıklı beslenmeye olan ilgileri artmıştır. Dolayısıyla, tüketici, üreticiden doğal, kaliteli ve aynı zamanda, prebiyotik, probiyotik, antioksidan gibi ayrıca bir özelliği olan gıdalar talep etmektedir. Meyve suları, antioksidan özelliği bilenen gıda maddelerinin başında gelmektedir. Özellikle kırmızı meyvelerden elde edilen meyve sularına olan ilgi, gerek antioksidan içerikleri gerekse çekici renkleri nedeniyle gün geçtikçe artmaktadır. Kırmızı üzüm suyu ise, bu meyve suları arasında bulunmakta ve bu ürüne olan talep, gün ve gün artmaktadır.

Kırmızı üzümünden elde edilen üzüm suyunda antioksidan aktivite gösteren birçok fenolik bileşik, yani polifenoller, saptanmıştır. Fenolik maddelerin bir alt grubu olan antosiyaninler, kırmızı üzüm ve sularının karakteristik kırmızı renklerinden sorumlu pigment grubudur. Antosiyaninlerin üzüm suyuna (şirasına) geçmesi, maserasyon aşamasında gerçekleşirken, üretim aşamalarının bazıları, özellikle durultma, bu pigment grubunu olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Tiwari vd. 2010).

Durultma, meyve suyunda bulunan ve bulanıklığa neden olan protein ve polifenol gibi bileşenleri, uygun durultma yardımcı maddeleri (bentonit, jelatin, kazein, albumin vb.) kullanarak uzaklaştırmak ve bu sayede, istenen berraklıkta ürün elde etmek amacıyla yapılan bir proses basamağıdır. Berraklaştırma amacıyla kullanılan durultma yardımcı maddelerinin etki mekanizmaları farklılık göstermektedir. Örneğin, bentonit durultmada proteinleri uzaklaştırmak için kullanılırken, jelatin yüksek molekül ağırlıklı polifenollere etki etmektedir. Bu şekilde farklı amaçlarla kullanılan durultma yardımcı maddeleri ile, ürünün renk, burukluk gibi organoleptik özelliklerinden sorumlu polifenollerin reaksiyonları sonucu bu özelliklerde istenmeyen değişimler meydana gelebilmektedir.

Bu araştırmanın konusunu, daha önce sınırlı düzeyde incelenmiş olan, farklı durultma yardımcı maddelerinin kırmızı üzüm suyu antosiyaninlerine ve diğer renk özelliklerine olan etkilerinin araştırılması oluşturmaktadır. Bu amaçla, araştırmamızda, Kalecik Karası üzüm çeşidinden elde edilen üzüm sularının durultulmasında, bentonit, jelatin, kazein, albumin ve kitosan durultma yardımcı maddeleri ve bunların kombinasyonları kullanılmıştır.

2. KURUMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

Literatürde, meyve sularının çeşitli özellikleri üzerine birçok araştırma bulunmaktadır. Buna karşın üzüm suları üzerine yapılan araştırmaların önemli bölümü beyaz üzüm sularında yapılmış olup, bu araştırmaların da çoğunluğu yurtdışında yapılmıştır. Buna ek olarak, kırmızı üzüm suları üzerine yapılan araştırma sayısı sınırlı olup, özellikle kırmızı üzüm suyunun durultulması ve bu işlemin renk özellikleri üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Kırmızı üzüm ve üzüm suyu ile ilgili bilgiler ve yapılan araştırmalar bu bölümde özetlenmiştir.

2.1 Ülkemizde Üzüm Üretimi ve Değerlendirme Alanları

Üzüm, dünyada en çok çeşidi bulunan ve en yaygın olarak yetiştirilen bitki kültürlerinden birisidir. Birçok çeşidinin olması, üzümün birçok ürüne işlenmesine olanak sağlamıştır. Üzüm; taze olarak tüketimin dışında, en çok kuru üzüme ve kısmen de şaraba işlenmektedir. Bunun dışında, üzüm suyuna (şıraya) işlendikten sonra; pekmez, sirke, pestil ve meyve suyuna işlenerek de değerlendirilmektedir.

Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO) 2011 yılı verilerine göre, Türkiye üzüm üretiminde; İtalya, Amerika, Fransa, İspanya ve Çin'in ardından 6. sırada yer almaktadır (Anonymous 2011). Çizelge 2.1'de, ülkemizin üzüm üretim miktarı ve bu miktarın, meyve suyuna işlenen tüm meyve çeşitlerinin (elma, kayısı, şeftali, vişne vb.) toplam üretim miktarları arasındaki payı verilmektedir.

Daha öncede değinildiği gibi, üzüm temel olarak, sofralık, kurutmalık ve şaraplık olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadır. Ülkemizde üzüm üretiminin yaklaşık olarak, %40'ı kurutmalık, %30'u sofralık, %28'i şıralık (sirke, pekmez vb.) ve %2-3'ü şaraplık olarak değerlendirilmektedir (Çelik vd. 2005). Verilen bu oranların

haricinde, MEYED (Meyve Suyu Endüstrisi Derneği) istatistiklerine göre üzüm suyu, ülkemizde üretilen meyve suyu üretim miktarları arasında %1.7–2.5’lik paya sahiptir. Üzüm suyu üretim oranının az olmasına karşın, son yıllarda tüketicilerin bilinçlenmesi ile birlikte, özellikle %100 doğal meyve sularına olan ilgi artmış ve bunun sonucunda üzüm suyu üretimin de önemli artışlar gözlenmiştir. Nitekim üzüm suyu üretimi 2005 yılında 10,900 ton iken, 2007 yılında bu miktar 18,600 ton’a kadar yükselmiştir (Anonim 2008).

Çizelge 2.1 Yıllara göre Türkiye’nin üzüm üretimi ve payı (Anonim 2008)

	Toplam meyve üretimi (bin ton)	Üzüm üretimi (bin ton)	Üzüm üretim payı (%)
2004	7833	3500	45
2005	9489	3850	41
2006	8787	4000	46
2007	8888	3612	41
2008	8996	3448	39

2.2 Kırmızı Üzüm Suyunun Bileşimi

Üzümlerin kimyasal bileşimlerinde; çeşit, olgunluk, yetiştirilme bölgesi ve yıla bağlı olarak farklılık görülmektedir. Üzümlerin olgunluk düzeyini belirlemek ve hasat dönemine karar vermek için pH, briks ve titrasyon asitliği değerlerinden yararlanılmaktadır. Genel olarak, olgunluk arttıkça asitlik düşmekte ve pH yükselmektedir (Soyer vd. 2003).

Üzümlerde başat organik asit tartarik asit olup, bu asidi malik asit izlemektedir. Üzümlerde asitlik değeri, tartarik asit cinsinden hesaplanır. Üzümlerde, toplam asitliğin tartarik asit cinsinden %0.5–1.5 arasında olduğu (Cemeroğlu vd. 2009) ve uygun olgunluğa ulaşmış olan üzümlerin tartarik asit içeriklerinin ise, 5–6 g/L değerinde olduğu belirtilmektedir (Selli vd. 2002).

Tartarik asit, üzüm suyu üretimi için önemli bir bileşendir. Üzüm suyunda bulunan tartarik asidin bir kısmı üzüm suyunda potasyum tuzu halinde bulunmaktadır. Tartarik asidin bu tuzuna potasyum hidrojen tartarat veya bilinen adıyla “şarap taşı” denilmektedir. Şarap taşı, üzüm suyunda çözünmüş olarak bulunmaktadır. Bu tuzun çözünürlüğüne; ortam sıcaklığı, pH derecesi gibi faktörler etki etmektedir. Bu parametrelerdeki değişimler potasyum hidrojen tartaratın, üzüm suyu içerisindeki dengesini bozmakta ve bir kısım tuz, kristaller halinde çökelti oluşturmaktadır (Cemeroğlu ve Karadeniz 2009). Bu oluşuma karşı hiçbir önlem alınmadan ambalajlanan ürünlerde zamanla bulanıklık sorunu görülmektedir. Tartarik ve malik asidin yanında, üzümde bulunan diğer organik asitler; malik, sitrik, galaktronik, suksinik, laktik, fumarik ve okzalik asittir (Buglione ve Lozano 2002).

Üzüm suyunda bulunan ve suda çözünür kuru maddelerden olan glukoz ve fruktozun birbirlerine oranı olgunlaşma aşamasında yaklaşık olarak 1:1’dir (Buglione ve Lozano 2002). Nitekim üzümde bulunan %16.3 oranındaki toplam şekerin, yarısı glukoz, diğer yarısı da fruktozdan oluşmaktadır. Bunun yanında, üzümde bulunan suda çözünen kuru maddelerden diğer bir grup mineraller olup, başlıcaları sodyum, potasyum, kalsiyum ve magnezyumdur (Cemeroğlu vd. 2009). Uygun olgunluk düzeyinde bulunan üzümün briksi, 18–24°Bx (Briks) düzeyinde olduğu belirtilmektedir (Mazza vd. 1999).

Polisakkaritler dışında, üzümde bulunan diğer önemli makromolekül bileşenleri, polifenoller ve proteinlerdir. Takip eden bölümlerde, bu bileşikler ve durultma açısından önemleri ile ilgili ayrıntılı bilgi verilmektedir.

2.2.1 Polifenoller

Polifenoller meyvelere; renk, tat gibi çeşitli duyuşal özellikler kazandırmaktadır. Polifenollerin bu özelliklerinin yanında, insan sağlığına olumlu etkileri üzerine, son

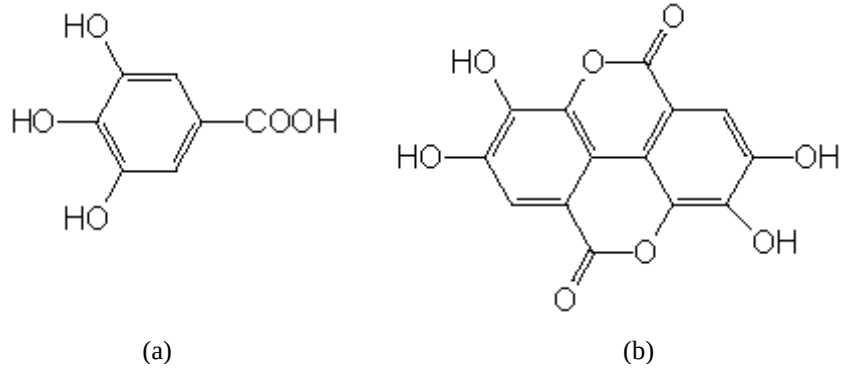
yıllarda yapılmış çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Polifenollerin koruyucu özelliklerinin başında, kardiyovasküler ve dejeneratif hastalıklara (tümör oluşumu) olan etkileri bulunmaktadır. Bu bileşikler, kimyasal yapıları sayesinde, hastalık oluşumunda ve yaşlanma sürecinde görev yaptığı bilenen serbest radikalleri uzaklaştırabilmekte ve/veya nötralize edebilmektedir (Villaño vd. 2006). Bunun yanında, polifenollerin, pıhtılaşmayı azaltarak antiinflamatuvar özelliklerinin de olduğu belirtilmektedir. Bahsedilen bu önemli etkileri yanında, aynı zamanda bu bileşiklerin kanserli hücrelerin büyümelerini engellediklerine dair yapılan araştırmalar literatürde yer almaktadır (Yeh vd. 1995).

Kimyasal yapı bakımından polifenoller, yapısında bir tane hidroksil grubu içeren benzen halkasından (fenol) oluşmakta olup, tüm polifenoller bu yapıdan türemektedir. Polifenoller; fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Cemeroğlu vd. 2009).

2.2.1.1 Fenolik asitler

Fenolik asitler, benzoik asit ve sinamik asit olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Bir benzoik asit olan gallik asit, üründe serbest olarak bulunabilmekte ve aynı zamanda, diğer bir gallik asit ile esterleşme reaksiyonu göstererek, dimerik türevi elajik asitleri oluşturabilmektedir (Yılmaz ve Toledo 2005, Cemeroğlu ve Karadeniz 2009). Daha sonra ise, elajik asitler, polimerize olarak, alkali hidroliz ile ayrılabilen ve “hidrolize olabilen tanen” olarak adlandırılan, elajitanenleri meydana getirmektedir.

Gallik asit, üzüm suyunda, kabuk ve çekirdekte bulunmaktadır. (Ribéreau-Gayon vd. 2006a). Bu fenolik asit üzümde serbest halde bulunmakta, buna karşın üzüm suyunda dimerik veya polimerik türevlerinin olup olmadığı ile ilgili literatürde yeterince araştırma bulunmamaktadır. Şekil 2.1’de gallik asit ve elajik asidin temel yapısı görülmektedir.

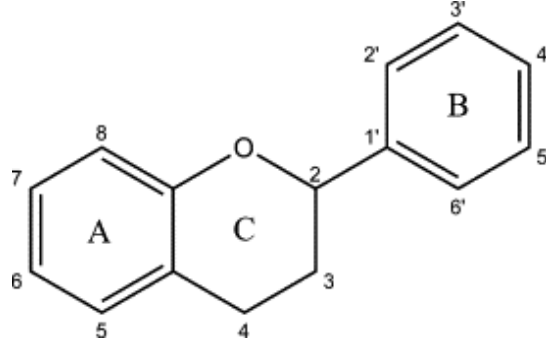


Şekil 2.1.a Gallik asit, b. elajik asit

Fenolik asitlerin diğer bir alt grubu olan sinamik asitler, üzümde çok az miktarlarda serbest olarak, ancak daha çok, tartarik asit veya antosiyaninlerle açillenmiş olarak bulunmaktadır. Sinamik asitlerden, p-kumarik ve kafeik asit çoğunlukla tartarik asit ile esterleşmiş haldedir. Bunlar yüksek düzeyde okside olabilmekte ve üzüm suyunda esmerleşme reaksiyonlarına katılmaktadırlar. Bunun yanında bu iki sinamik asit, antosiyaninlerle de, bir şeker ile esterleşerek açillenmiş yapılar oluşturabilmekte ve böylece antosiyaninlerin stabilitesi artmaktadır (Ribéreau-Gayon vd. 2006b).

2.2.1.2 Flavonoidler

Flavonoidler, polifenollerinin önemli grubudur. Flavonoidler; antosiyaninler (ACN), flavan ve flavonol'lar, flavanon'lar, löykoantosiyanin ve kateşinler ve son olarak proantosiyanidinler olmak üzere 5 gruba ayrılmaktadır. Bunların içinden kateşinler ve kateşinlerden oluşan kondense tanenler üzüm suyu bulanıklığı açısından önem taşımaktadır. Kondense tanenler, bulundukları üründe oksidasyon, enzimatik esmerleşme ve bulanıklık reaksiyonları gerçekleştirip, ürünün kalite özelliklerini olumsuz yönde etkilemektedir (Monagas vd. 2003). Şekil 2.2'de, flavonoidlerin temel yapısı ve numaralandırma sistemi görülmektedir.

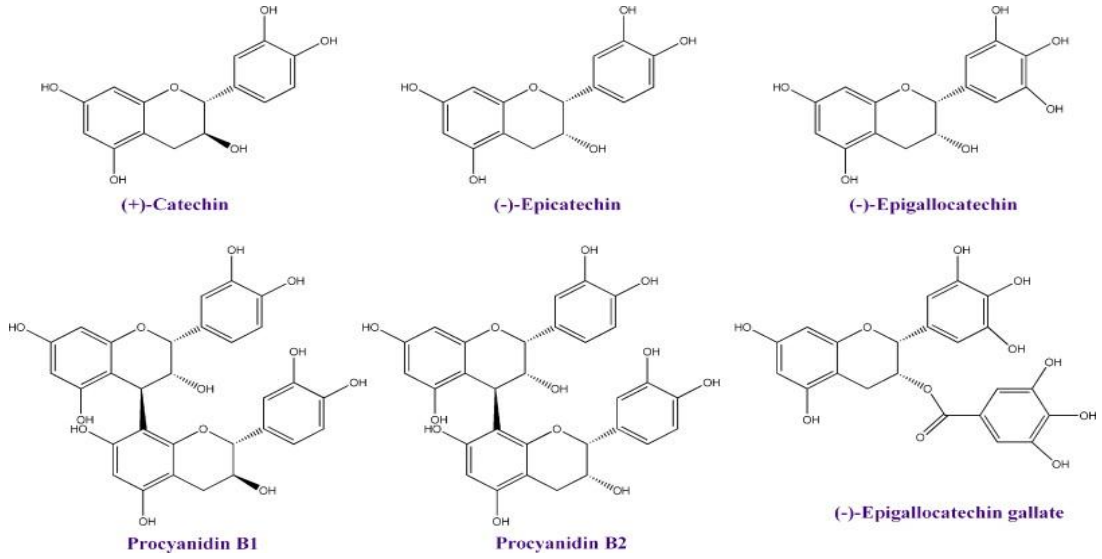


Şekil 2.2 Flavanoidlerin temel yapısı (Valls vd. 2009)

Kateşinler, flavan molekülünde bulunan ortadaki piran halkasının, yani C halkasının, 3. karbon atomuna bir OH grubu eklenmesi ile oluşmaktadır. Kısaca kateşinler, flavan-3-ol yapısındaki polifenol grubudur. Şekil 2.3’de, meyvelerde yaygın olarak bulunan flavan-3-ol’ler verilmiştir.

Flavan-3-ol’ler üzüm suyuna, presleme sırasında çekirdekten geçmektedir. Flavan-3-ol’ler, üzümün duysal özelliklerine etki etmeleri açısından önemlidir (Harbertson vd. 2003). Üzüm çekirdeğinde; kateşin, epigallokateşin, epikateşin-3-O-gallat monomerlerine ek olarak, 14 dimerik, 11 trimerik ve 1 tetramerik flavan-3-ol molekülleri tanımlanmış olup, bu bileşiklerin üzüm çekirdeğinde, 2.3–8.2 mg/g düzeyinde bulunduğu belirtilmektedir (Fuleki vd. 2003, Monagas vd. 2003, Harbertson vd. 2003).

Flavonoidlerin diğer bir alt grubu olan ACN’ler, flavonoidlerin en geniş grubunu oluşturmaktadır (Cavalcanti vd. 2011). Bundan dolayı, kırmızı üzüm suyunun polifenol içeriği, ACN’lerin yaptıkları katkıdan dolayı, beyaz üzümlere kıyasla daha fazladır. Yapılan çalışmalarda, beyaz üzüm suyunda toplam polifenol içeriği, 254–389 mg/L düzeyinde bulunurken (Soleas vd. 1997), kırmızı üzüm suyunda ise, toplam polifenol miktarının 1407–2246 mg/L arasında olduğu bildirilmiştir (Bosanek vd. 1996). Bu bilgilere ek olarak, Davalos ve ark. (2004) kırmızı üzüm suyu, beyaz üzüm suyu ve sirkenin polifenol içeriği üzerine yaptıkları çalışmada, kırmızı üzüm suyunun polifenol içeriğinin diğer ürünlere kıyasla, önemli düzeyde daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.



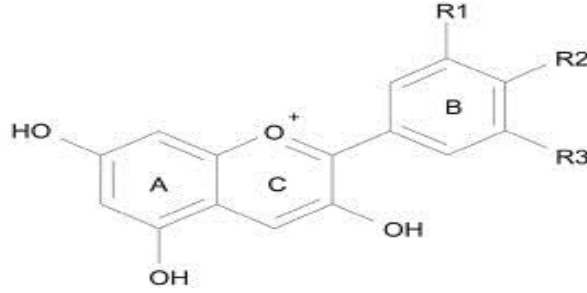
Şekil 2.3 Meyvelerde yaygın olarak bulunan flavan-3-ol'ler (Valls vd. 2009)

Antosiyaninler (ACN'ler): Meyve ve sebzelerin renk özelliklerini belirleyen doğal renk maddelerinden birisi olan ACN'ler, bu ürünlere kırmızıdan maviye kadar renklerini veren renk maddeleridir. ACN'ler, yağda çözünen karotenoid gibi, renk maddelerinin yanında suda çözünür olmaları, onların renklendirici olarak endüstride kolaylıkla kullanılabilir olmasını sağlamıştır. Bu renk maddesi, ticari doğal renk katkısı olarak kullanılmak amacıyla, üzüm, üzüksü meyveler, kırmızı lahana, siyah havuç gibi meyve ve sebzelerden üretilebilmektedir (Giusti ve Wrolstad 2003).

Yunanca “anthos (çiçek)” ve “kianos (mavi)” kelimelerinin birleşmesi sonucu antosiyanin adını alan pigment grubu, meyve, sebze ve çiçeklere, parlak turuncudan pembeye, kırmızıdan maviye kadar değişen tonlarda renkler vermektedir. Bahsedilen bu farklı renkler kimyasal yapılarına bağlanabilen, farklı bileşik grupları ile mümkün olmaktadır (Castañeda-Ovando vd. 2009).

ACN'ler, antosiyanidinler adı verilen temel yapıya bir veya birkaç şekerin ester bağı ile bağlanmasıyla meydana gelmektedir. Bu durumda, ACN yapısındaki şeker olmayan kısım, yani antosiyanidinler, “aglikon” olarak adlandırılmaktadır. Antosiyanidinlerin yapısının temeli ise, 2-fenilbenzopirilium (flavilium katyonu) oluşturmaktadır (Şekil 2.4). Bu bileşik, oksijen içeren heterosiklik C halkasına bağlı,

aromatik A halkası, ve bu yapıya karbon-karbon bağıyla bağlı üçüncü bir aromatik B halkasından oluşmaktadır.



Şekil 2.4 Flavilium katyonu (Kerio vd. 2012)

Şimdiye kadar yapılan araştırmalarda, 23 antosiyanidin tanınması ile birlikte, bunların içinden 6 tanesi meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunmaktadır. Bunlar; pelargonidin, petunidin, peonidin, malvidin, siyanidin ve delfinidindir (Çizelge 2.2). Bu antosiyanidinler arasında görülen farklılık yapılarındaki, çizelge 2.2.'de de görüldüğü gibi, R1 ve R3 pozisyonlarına (Şekil 2.4) bağlı olan hidrojen, hidroksil (OH) ve metoksil (OCH₃) gruplarından kaynaklanmaktadır (Patras vd. 2010).

Çizelge 2.2. Antosiyanidinlerin yapısal farklılıkları ve maksimum dalga boyları (Giusti ve Wrolstad 2009, Ananga vd. 2013)

Antosiyanidin	Bağlı olan gruplar		λ_{maks} (nm)
	R1	R3	
Pelargonidin	H	H	494 nm/turuncu
Petunidin	OCH ₃	OH	508 nm/kırmızı
Peonidin	OCH ₃	H	506 nm/turuncu-kırmızı
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃	510 nm/mavimsi-kırmızı
Siyanidin	OH	H	506 nm/turuncu- kırmızı
Delfinidin	OH	OH	508 nm/kırmızı

Antosiyanidinler, daha öncede bahsedildiği gibi, doğada tek başlarına bulunmazlar, şekerlerle esterleşerek, glikozit halde bulunurlar ve oluşturdukları bu yapı “antosiyanin” adını alır. Antosiyanidinlere şekerlerden genellikle, glukoz, ramnoz, galaktoz ve arabinoz bağlanmaktadır. Oluşan ACN'lerin yapısında, mutlaka 1 adet olmak üzere, 2 veya 3 şeker bulunabilir. Şeker grupları ACN molekülünde, 3-

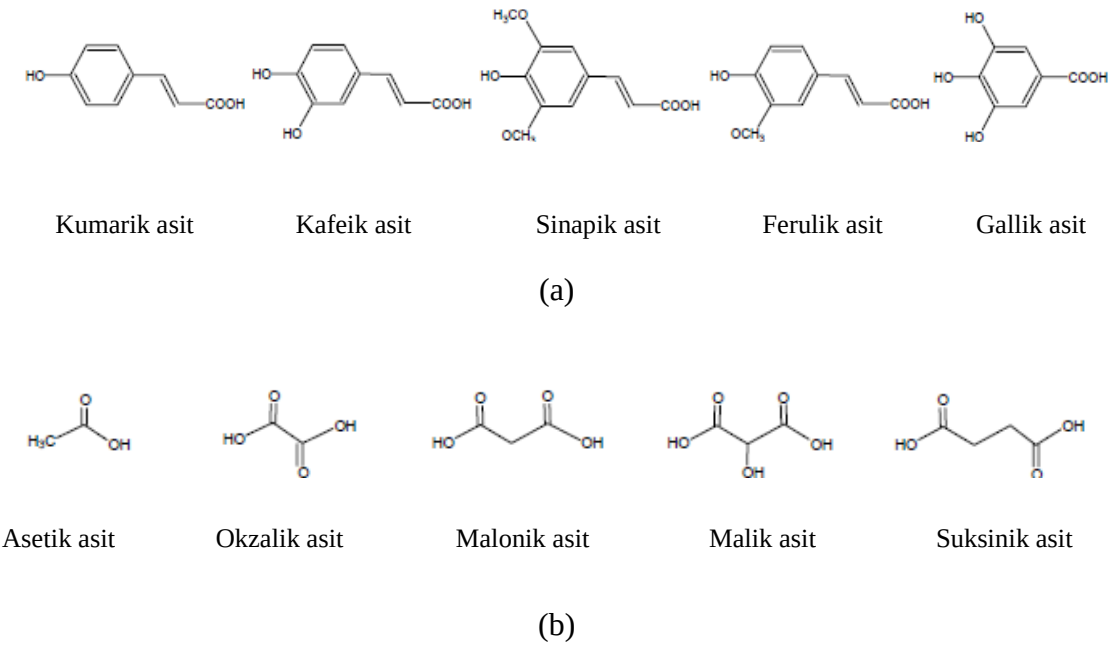
monozit, 3-biozit veya trioit, 3,5-diglikozit, 3,7- diglikozit şeklinde bulunabilir (Patras vd. 2010).

Antosiyaninler, şeker molekülüne açillenmiş halde bulunan ayrıca bir polifenol veya organik asit molekülü de içerebilmektedir. Şeker molekülü ile açillenen fenolik asitler; p-kumarik, kafeik, ferulik, sinapik ve gallik asittir (Şekil 2.5.a). Alifatik asitleri ise, malonik, asetik, malik, suksinik ve okzalik asit oluşturmaktadır (Şekil 2.5.b). Bu bileşenler genel olarak, 3. karbondaki şeker molekülünün 6-OH veya, daha az olarak, 4-OH grubunda bulunmaktadır. Bunlara ek olarak, ACN molekülünde bulunan farklı şekerlere bağlanan alifatik veya aromatik grupların olduğu bildirilmektedir (Giusti ve Wrolstad 2009).

ACN'lerin, suda çözünebilen pigment grubu olması ve bununla birlikte birçok doğal üründen izole edilebilmesi, bu pigmentin doğal renk katkısı olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Ancak, endüstride kullanılan doğal renk maddelerinin kullanılmasına olanak sağlayan diğer bir özellik, bu renk maddelerinin stabilitesidir. ACN'ler genel olarak stabil renk maddeleri değildirler. ACN'lerin stabilitesini ve rengini etkileyen faktörler, moleküldeki hidroksil sayısı, metoksil gruplarının konumu ve sayısı, molekülde bulunan şekerlerin sayısı ve türü ve bu şeker molekülleriyle esterleşmiş alifatik ve aromatik asitler oluşturmaktadır.

ACN molekülündeki hidroksil grubu sayısı arttıkça, antosiyanidinin maksimum absorbans verdiği dalga boyu artmakta ve ayrıca renk turuncudan maviye dönüşmektedir. Örneğin, %0.01 HCl-MeOH çözeltisinde pelargonidinin $\lambda_{\max}$ değeri 520 nm (turuncu) düzeyindeyken, siyanidinin 535 nm (turuncu-kırmızı) ve delfinidinin 545 nm (mavi-kırmızı) düzeyindedir. Yani; moleküldeki hidroksil grubu sayısının artışı, rengi daha mavi, metoksil grubu sayısının artışı ise daha kırmızı yapmaktadır (Mazza ve Brouillard 1987, Mazza ve Miniati 1993, Cemeroğlu vd. 2009). Buna ek olarak, ACN molekülünün içerdiği hidroksil ve metoksil gruplarının sayısı, molekülün oksidasyon stabilitesini de etkilemektedir. Hidroksil derecesi arttıkça, ACN'lerin stabilitesi düşmekte, metoksil grup sayısı arttıkça ise, stabilite artmaktadır (Cavalcanti vd. 2011). Yapılan bir çalışmada, asitlendirilmiş alkol

çözültisi içine eklenen, siyanidin ve malvidin-3-glukozitlerinin oksidasyon stabilitesi incelenmiştir. ACN'ler, depolanmaya başladıktan birkaç gün içinde renklerini kaybetmeye başlamışlardır. Bununla beraber, malvidinin oksidasyona karşı gösterdiği direncin, siyanidinden daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bunun başlıca nedeni, malvidinin B halkasında bulunan metoksil grup sayısının fazla olması ve bu durumun malvidinin reaktivitesini sınırlandırması olarak bildirilmiştir (Sarni-Manchado vd. 1997).



Şekil 2.5.a. Antosiyaninlere bağlanan aromatik asitler, b. Antosiyaninlere bağlanan alifatik asitler

ACN'de bulunan glikozil bağının yeri ve sayısı bu molekülün stabilitesini ve sudaki çözünürlüğünü etkilemektedir (Cuyckens ve Claeys 2004). 3. karbondaki glukozilasyon ACN'lerin stabilitesini artırmakta ve aynı zamanda bu bağlanma ile ACN'lerin sudaki çözünürlüğü de artmaktadır (Jackman vd. 1987). Ayrıca, şeker molekülüne bağlı açıl gruplarının sayısı ve çeşidi de ACN'lerin, pH değişimine, ısıya ve ışığa karşı olan hassasiyetini önemli ölçüde azalttığı, yani stabilitesini artırdığı bilinmektedir (Guisti ve Wrolstad 2009). Yapılan bir araştırmada, yapısında iki açıl grubu içeren kırmızı turpun, bir açıl grubu içeren kırmızı etli patateslere göre

stabilitesinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, birden fazla açıl grubu (poliaçillenmiş) içeren ACN'lerin proses ve depolama boyunca stabilitesinin yüksek düzeyde olduğu belirtilmektedir (Rodriguez-Saona vd. 1999). Bunun yanında, aromatik açıl grubu içeren ACN'ler, alifatik içerenlere göre daha stabil olduğu bildirilmiştir (Stintzing ve Carle 2004). Bunun başlıca nedeni; aromatik açıl gruplarının, flavilium katyonunun pirilium (pyrylium) yani C halkası ile hidrofilik olarak bağlanması ve böylece suyun nükleofilik atakları sonucu meydana gelen hidrasyon reaksiyonunun engellenmesidir (Rodriguez-Saona vd. 1999). Bu bağlanma sonucu ACN'lerin stabilitesi artmaktadır.

Antosiyaninlerin stabilitesini etkileyen diğerk önemli faktör kopigmentasyon reaksiyonlarıdır. Bu reaksiyon ilk kez, 1916 yılında Willstätter ve Zollinger tarafından gözlemlenmiştir. Araştırmacılar, kırmızı üzümlerde bulunan malvidin-3-glikozitin renginde, ortama tanen ve galik asit eklendikten sonra, görülen ve kırmızıdan maviye doğru değışen rengi fark etmişlerdir (Cavalcanti vd. 2011). Kopigmentasyon reaksiyonlarının iki sonucu bulunmaktadır: Bunlardan birincisi, batokromik değışim olarak adlandırılan, ACN'lerin maksimum absorbans gösterdiği dalga boyunda görülen değışim olup, bunun sonucunda renk, kırmızıdan maviye doğru değışmektedir. Bu durum, "bluing" olarak da adlandırılmaktadır. Diğeri ise, hiperkromik etki olarak bilinmekte ve ACN'lerin renk yoğunluğunda görülen artışı ifade etmektedir (Cavalcanti vd. 2011, Rein 2005). Kopigmentasyon reaksiyonlarının sonucunda renk kalitesinde görülen iyileşmenin yanında, aynı zamanda, ACN'lerin, birçok meyvenin bulunduğu pH derecelerinde (3–5), renksiz hemiketal formunun oluşumu önlenir ve böylece bu pH derecelerinde bile ACN'lerin yoğun renk içermesini sağlamış olur (Turfan 2008, Türkyılmaz 2009).

Kopigmentasyon, farklı reaksiyon mekanizmaları ile oluşmaktadır. Bu reaksiyonlar, intra ve intermoleküler kopigmentasyon olarak ikiye ayrılmaktadır. İntramoleküler kopigmentasyonda, ACN ile kopigment, ACN molekülünün içerdiği aynı şekere bağlanarak kompleks oluşturmaktadır. İntramoleküler kopigmentasyonda, kopigment olarak aromatik açıl grupları ve organik asitler yer almaktadır. Bu reaksiyonu,

piriliyum halkasının, 2 ve 4 pozisyonunda meydana gelen hidrasyon reaksiyonu sınırlanmaktadır (Rodriguez-Saona vd. 1999, Cavalcanti vd. 2011).

İntermoleküler kopigmentasyonda ise, renkli ACN'ler ile renksiz kopigmentler (flavonoid vb.), van der Waals veya iyonik bağ gibi düşük enerjili bağlar yardımıyla kompleks oluşturmaktadır (Brouillard 1983). Üzüm sularında ve şaraplarda görülen en yaygın intermoleküler kopigmentasyon reaksiyonu, ACN ile çekirdeklerden şıraya geçen veya şarapların olgunlaştırılmasında kullanılan meşe fiçilerden şıraya geçen tanenlerin (kateşin, epikateşin, prosiyanidinler vb.) interaksiyonu olup, bu reaksiyon, malvidin-3-glukozitin renginde önemli derecede mavileşme ile sonuçlanmaktadır (Boulton 2001, Ribéreau-Gayon vd. 2006b).

Yapılan birçok araştırmada, kırmızı üzümde bulunan başat ACN'in malvidin monoglikozit (mv-3-glu) olduğu bildirilmiştir (Baiano vd. 2009, Púertolas vd. 2009). Bu ACN'in, B halkasında bulunan R1 ve R3 pozisyonlarına bağlı grupların her ikisi de metil grubudur. Bu nedenle, mv-3-glu, reaktivitesi düşük bir ACN olup, oksidasyona karşı stabil olduğu belirtilmektedir (Ribéreau-Gayon vd. 2006b). Mv-3-glu ACN'in yanında, üzümde; delfinidin, siyanidin, petunidin ve peonidin monoglikozitleride bulunmaktadır. Bu ACN'ler dışında üzümde bulunan diğer ACN'ler ise; delfinidin, siyanidin, petunidin ve peonidin monoglikozitlerinin p-kumarik veya kafeik asit ile açılmesiyle oluşan yapılarıdır (García-Beneytez vd. 2003, Gonzáles-Paramás vd. 2006).

2.2.2 Proteinler

Proteinler, amino asitlerin birleşmesi ile oluşmuş karmaşık yapıdaki polimerlerdir (Cemeroğlu vd. 2009). Bu bileşik grubu, bulunduğu içeceğin bulanıklık stabilitesini etkilemesi ve bulanıklığa yol açması açısından önem taşımaktadır. Meyve sularında bulunan protein oranı genellikle %1'in altındadır. Buna rağmen proteinler, çözünürlük durumu, amfoter özelliği ve termolabil özellikte olması nedeniyle meyve sularında büyük önem taşır. Molekül büyüklüğünden dolayı da gerçek çözelti gibi çözünmez, ancak kolloid olarak çözünürlük gösterir. Bunun yanında, proteinlerin

bulanma ile ilgili en önemli özellikleri izoelektrik noktaları olup; bir protein, izoelektrik noktasından daha asidik bir ortamda bulunuyorsa, pozitif yüklü durumdadır. Bu durumda bulunan protein, farklı yüklere sahip bileşenlerle reaksiyona girip, ürünün stabilitesini bozmaktadır. Buna ek olarak, yağış miktarı gibi etkilere bağlı olarak, protein miktarı fazla olan içeceklerde proteinlerin yeterince uzaklaştırılamaması, proteinlerin çökmesine ve sonradan bulanmaya neden olmaktadır (Cemeroğlu ve Karadeniz 2009).

Üzüm suyunda bulunan protein miktarı, en çok üzüm çeşidine göre değişmektedir. Kırmızı üzüm sularında serbest halde az miktarda protein bulunmakta olup, proteinlerin çoğu tanenler ile kompleks oluşturmuş şekildedir. Yapılan araştırmalar, üzümde bulunan proteinlerin, üzüm çeşidine bağlı olarak değiştiği ve molekül ağırlığının 12,000–67,000 Dalton, izoelektrik noktasının pH 5.2–8 arasında olduğu belirtilmektedir (Ribéreau-Gayon vd. 2006a, Cemeroğlu ve Karadeniz 2009). Bunun yanında, üzümde bulunan proteinlerin büyük kısmında önemli düzeyde prolin ve arjinin amino asitleri bulunmaktadır (Buglione ve Lozano 2002). Üzüm suyunda bulunan proteinlerin büyük kısmı termolabil özellikte olup, sıcaklık değişiminde üründe bulanıklığa sebep olmaktadır (Ferreira vd. 2002). Bu nedenle berrak üzüm suyu üretiminde protein stabilizasyonu çok kritik ve önemli bir aşamadır.

2.3 Kırmızı Üzüm Suyu Durultması

Presten alınan meyve suları, belirli bir miktarda basit filtrasyon ile ayrılabilir boyutlarda olan ve kaba partikül olarak adlandırılan, göz ile de algılanabilen parçacıklar içerir. Bu kaba parçacıkların meyve suyundan ayrılması ürüne berraklık değil, ancak opalesans (opak) bir görüntü kazandırabilir. Bunun yanında, meyve suyunda, meyve suyu kolloidleri olarak adlandırılan bir grup bileşik de bulunmaktadır. Bu kolloidler gerçek çözelti oluşturacak kadar küçük veya parçacıklar şeklinde ayrılabilir kadar iri değildir ve ayrıca, bu kolloidler kaba (basit) filtrasyon gibi fiziksel işlemler ile de ayrılamazlar.

Meyve suyu kolloidleri; polisakkaritler, glikoproteinler ve proteinlerdir. İşte, bu kolloid bileşikler arasında bulunan protein, meyve suyunda bulanıklığa neden olan bileşik gruplarından birisidir. Proteinlerin yanında, polifenoller de kendi kendileriyle veya proteinlerle interaksiyona girebilmekte ve bu interaksiyonlar sonucunda oluşan partiküller, meyve sularının bulanık görünmesine neden olmaktadır.

Durultmanın amacı, üzüm suyuna, opak ve bulanık bir görüntü kazandıran bir kolloid olan protein ve, proteinler ile ve/veya kendi aralarında verdikleri reaksiyonlar sonucu bulanıklık meydana getiren polifenoller, durultma yardımcı maddeleri ile, filtre edilebilecek boyuta getirmek ve ortamdan uzaklaştırmaktır. Durultmada farklı amaçlarla kullanılan jelatin, albumin, bentonit, polivinilpoliprolidon (PVPP) gibi birçok durultma yardımcı maddesi bulunmaktadır. Bu durultma yardımcı maddelerinin görevi, bulanıklık etmeni bileşenleri (protein, polifenol) adsorbe ederek veya çöktürerek ortamdan uzaklaştırarak, ürüne berraklık kazandırmaktır.

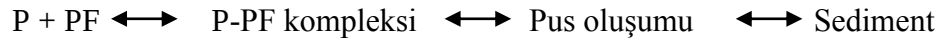
2.3.1 Bulanıklık etmeni bileşik grupları

Meyve suyu durultma tekniğinin ve durultma yardımcı maddesinin belirlenmesinde, ürünün kimyasal bileşiminin bilinmesi gerekmektedir. Kırmızı üzüm suyunda bulunan bulanıklık etmeni bileşik grupları polifenoller, proteinler, pektik bileşenler ve metallerdir. Bunların arasından, birçok farklı mekanizma ile üzüm suyunda bulanıklığa neden olduğu bilinen ve bu nedenle berraklaştırmada büyük önem taşıyan bileşenlerin başında, polifenoller ve proteinler gelmektedir.

2.3.2 Bulanıklık oluşum mekanizması

Bulanıklığa neden olan polifenol-protein interaksiyonu, kısa ve basit bir şekilde, Şekil 2.6'da görülmektedir. Meyve sularında bulanma ile sonuçlanan, protein-polifenol kompleks oluşumu ile ilgili çeşitli yaklaşımlar bulunmaktadır. Bu yaklaşımlardan birine göre, protein-polifenol kompleks oluşumu 3 fazda

gerçekleşmektedir: 1. lag fazı, 2. gelişme fazı ve 3. terminal faz. Bu aşamalı reaksiyon zincirinde öncelikle, bir amino asit molekülünün, polifenollerle kompleks oluşturması için reaktif serbest grupları, birkaç polifenol ile doldurulur. Bu kompleksler çok büyük olmayıp, oluşan interaksiyonlar geri dönüşümlüdür. Daha sonra oksidasyon veya polimerizasyon ile, daha sonra detaylı olarak bahsedilecek olan, “haze aktif” duruma gelen polifenoller gelişme fazında proteinler ile daha güçlü bağlar oluşturur ve amino aside daha fazla polifenol bağlanır. Polifenol-protein komplekslerinin büyümesi sonucu bulanıklık ve çökelti oluşumu giderek artar. Terminal fazda ise, artık iki bileşik grubunun da başka bileşiklerle bağlanabileceği açık ucu kalmaz ve bulanıklık artık stabildir. Bu aşamalardan sonra, oluşan kompleksler ortamda çözünmez durumdadır ve içeceğe gelen ışığı yansıtarak, içeceğin puslu bir görünüm kazanmasına neden olur (Siebert vd. 1996, Lee vd. 2000, Charlton vd. 2002).



Şekil 2.6 Protein (P)–Polifenol (PF) interaksiyonu (Siebert 2006)

Polifenol-protein kompleks oluşumuna her proteinin katılma eğilimi farklıdır (Cemeroğlu ve Karadeniz 2009). Meyve sularındaki “haze–aktif” proteinlerin etki mekanizması tam olarak ortaya konulmasa da, bulanıklığa neden olan proteinlerin yapısında az veya çok miktarda prolin bulunduğu bildirilmektedir (Siebert vd. 1996). Yapılan bir çalışmada, kırmızı üzümlerde bulunan prolin miktarının 180–320 mg/L arasında olduğu belirlenmiştir (Buglione ve Lozano 2002). Bununla beraber üzüm suyunda bulunan bulanıklık etmeni proteinlerin düşük molekül ağırlıklı olduğu (16,000–24,000 Dalton) ve izoelektrik noktalarının (pH 5.2–8.0) ise, yüksek olduğu belirtilmiştir (Cemeroğlu ve Karadeniz 2009).

Şarapta bulunan bulanıklık etmeni proteinleri tayin etmek için kullanılan ve temel olarak bir polifenol olan durultma amacıyla üretilen gallotanen karışımdan oluşmuş, genel olarak tannik asit olarak adlandırılan fenolik maddenin eklenmesinden sonra bulanıklık değerinin ölçülmesine dayanan bir yöntemde, kırmızı şaraba 0.0, 0.5, 1.0 ve 2.0 g L⁻¹ düzeyinde tannik asit eklenmiş ve bulanıklığın sırasıyla 1.6, 2.2, 3.3 ve

6.0 NTU (Nephelometric Turbidity Units) değerlerine ulaştığı gözlenmiştir. Bu işlem sonucunda kırmızı şarapta “haze-aktif” protein adıyla anılan ve bulanıklığa sebep olan protein varlığı gösterilmiştir (Cliffort ve Scalbert 2000, Siebert 2006).

Proteinlerin yanı sıra, yukarıda değinildiği gibi meyve sularında bulunan bir diğer bulanıklık etmeni bileşen polifenollerdir. Polifenollerin aromatik halkasındaki hidroksil grup sayısı ve konumu proteinler ile interaksiyon oluşturmalarında etkilidir. Nitekim, monofenollerin proteinlerle etkileşimi zordur. Bunun yanında orto-difenoller, meta- durumda olanlara göre proteinlere çok daha güçlü bağlanmaktadır (Siebert 2006).

Polifenoller, haze-aktif durumdaki proteinlerle bulanıklığa neden olan kompleks oluştursa da, tüm polifenoller bu kompleks oluşumuna katılamazlar. Örneğin, kondense tanenler ve hidrolize olabilen tanenler, yüksek seviyede instabil durumdadır ve çeşitli reaksiyonlar ile ürünün kalitesini değiştirebilmektedir. Ancak, bu iki karmaşık polifenol gruplarının gerçekleştirmiş oldukları farklı esterleşme reaksiyonları, protein ile interaksiyonunu etkilemektedir. Yapılan bir araştırmada, epigallokateşinin, bir protein olan ve haze-aktif özellikteki prolini yüksek oranda içeren jelatin ile interaksiyona girmediği, epigallokateşin gallat’ın ise, jelatin ile güçlü bağ oluşturduğu saptanmıştır. Buna ek olarak, bulanıklık açısından önemli olan ve gallik asit ve türevlerinin oluşturduğu, hidrolize olabilen tanenlerin ise, galloyl esterleri arttıkça proteinlerle bağlanma kapasitenin arttığı belirtilmektedir (Poncet-Legrand vd. 2006).

Protein-polifenol interaksiyonunu başlıca dört faktör etkilemektedir. Bunlar; protein konsantrasyonu, polifenol konsantrasyonu, pH ve alkol içeriğidir. Burada, protein ve polifenol konsantrasyon etkisini bir arada incelemek gerekmektedir. Meyve suyundaki protein/polifenol konsantrasyon oranına göre gelişen interaksiyon ve partikül oluşumu şu şekilde gerçekleşmektedir: Polifenol konsantrasyonu, protein konsantrasyonundan çok az olduğu durumda, ortamda bulunan az miktardaki polifenol, proteinler ile birleşir ve çok küçük miktarda partiküller oluşur. Bu durumda ortamda çok sayıda serbest halde protein molekülleri bulunmaktadır ve bu

moleküller kendilerine doğru gönderilen ışın demetini düşük oranda dağıtır. Buna karşın, ortamda büyük oranda polifenol var ise, polifenoller, proteinler ile non-kovalent bağlar sayesinde birleşirler ve protein moleküllerini doyururlar. Bu etkileşim sonucu oluşan partiküller küçük boyutlarda olsa da, ışığı fazla dağıttığından dolayı, bulanıklık değeri daha yüksektir ve bulanıklık polifenol konsantrasyonu ile birlikte doğru orantılı olarak artar (Poncet- Legrand vd. 2006).

Polifenol-protein interaksiyonunda, etanol konsantrasyonunun etkisi çok sınırlıdır. Yine de, bazı araştırmalara göre etanol, proteinlerin denatüre olmasını sağlayarak proteinlerin hidrofilik formunun hidrofobik forma dönüşmesine neden olduğu ileri sürülmekte ve böylece denatüre olan proteinler, hidrofobik yapıda bulunan tanenler ile interaksiyona girebilmektedir (Ribéreau-Gayon vd. 2006c). Etanolun etkisi, üzüm suyu için olmasa da şaraplar bakımından önem taşımaktadır.

pH faktörü, bu interaksiyonda etkin bir rol oynamaktadır. Örneğin, pH 3 ile 4 değerlerinin biraz üstündeki pH değerlerinde ışık kırılması daha net görülmektedir. Bu durum proteinlerin sahip oldukları izoelektrik noktalarına göre farklı yük kazanmaları ile açıklanmaktadır (Siebert 2006). Bilindiği gibi, proteinler izoelektrik noktaları altındaki pH derecelerinde pozitif yük taşırlar. “Haze – aktif” proteinlerin izoelektrik noktası ise, pH 8 civarlarında bulunmaktadır. Bu nedenle haze – aktif proteinler; şarap, bira, meyve suyu gibi pH derecesi düşük ortamlarda yoğun pozitif yük taşırlar ve bu pozitif yük oranı pH derecesi izoelektrik noktadan ne kadar düşerse o kadar artmaktadır. Bu nedenle güçlü pozitif yük taşıyan protein bileşikleri, negatif yüklü yüksek molekül ağırlıklı polifenollerle daha kolay ve kuvvetli bir şekilde interaksiyona girebilmektedir (Ribéreau-Gayon vd. 2006c, Cemeroğlu ve Karadeniz 2009).

Meyve suyunda bulanıklığa neden olan diğer bir etkileşim de polifenollerin kendi aralarında görülmektedir. Özellikle protein içeriği düşük olan, nar suyu gibi, meyve sularında bulanıklık oluşumunda esas olarak polifenol-polifenol kompleksi sorumludur (Turfan 2008). Meyve sularında bulunan polifenoller arasında, dimerik, oligamerik ve polimerik türevleri olan prosiyanidinler, yüksek seviyede kararsız

bileşiklerdir ve verdikleri reaksiyonlar ile önce rengin esmerleşmesine neden olmaktadır ve polimerizasyon derecesi ilerledikçe, molekül ağırlığı artmakta ve bunun sonucunda da tortu oluşumu gözlemlenmektedir (Ribéreau-Gayon vd. 2006c).

2.3.3 Durultma prensibi

Durultma, meyve sularının kalite kriterlerini etkileyen önemli proses basamaklarından birisidir. Durultmanın amacı, ürüne puslu bir görünüm veren ve basit filtrasyon yöntemleri ile ayrılamayan bileşenleri, durultma yardımcı maddelerinden biri veya birkaçının kombinasyonu yardımıyla, filtre edilebilecek boyuta getirmektir. Bu sayede, tüketici tercihinde başlıca etkili faktör, berraklık artırılmış olup, ürüne çekici bir görünüm kazandırılmaktadır. Durultma parametrelerini; sıcaklık, süre, durultma yardımcı maddesi türü ve dozu oluşturmaktadır. Durultmada başarı sağlanması için, ürün bileşimini oluşturan ve bulanıklığa neden olan bileşenlerin iyi bilinmesi gerekmekte ve durultma parametrelerinin ve özellikle durultma yardımcı maddesinin dozunun ön denemeler ile belirlenmesine özen gösterilmelidir. Günümüzde, çok uzun sürmesi nedeniyle soğuk durultma, yani 20°C ve altında yapılan durultma, endüstri tarafından tercih edilmemektedir. Bunun yerine, çok daha kısa sürede tamamlanan ve 50°C’de yapılan, sıcak durultma olarak adlandırılan yöntem tercih edilmektedir.

Meyve sularında bulunan ve bulanıklığa sebep olan iki önemli bileşenden (protein, polifenol) daha önce detaylı olarak bahsedilmişti. Bu bileşenlerin üründen uzaklaştırılmasında, bileşiklerin birbirleriyle oluşturdukları interaksiyondan yararlanılmaktadır. Örneğin, polifenollerce zengin bir meyve suyunun durultulmasında, “haze-aktif” amino asitlerce zengin proteinler (jelatin, kazein gibi) kullanılmaktadır. Bu sayede meyve suyu pH aralığında pozitif yüklü durumda bulunan protein molekülleri, negatif yüklü polifenollerle birleşerek, çökelti oluşturabilecek veya filtre edilebilecek boyutta partiküller oluşturmakta ve ardından üründen ayrılmaktadır.

Benzer olarak, üründe bulunan proteinlerin uzaklaştırılmasında kullanılan yöntemlerden birisi de ürüne tanen eklemektir. Bu yöntem ile bir önceki paragrafta bahsedilen mekanizma kullanılmakta, ancak bu defa üründen protein uzaklaştırılmaktadır. Bu yöntem teorik olarak etkili görünse de, pratikte ürünün burukluğunu artırdığı ve sonradan bulanmaya neden olduğu gözlemlendiği için fazla tercih edilmemektedir (Ribéreau-Gayon vd. 2006c). Protein stabilizasyonunda kullanılan ve daha çok tercih edilen yöntemde ise, proteinin pozitif yüklü olmasından yararlanılmaktadır. Bu amaçla, negatif yüklü olması ve proteinleri absorbe edebilmesi nedeniyle bentonit, üründen proteinleri uzaklaştırmak amacıyla günümüzde daha çok tercih edilmektedir.

2.3.4 Durultma yardımcı maddeleri ve etki mekanizmaları

Üzümün, polifenoller yönünden zengin bir meyve olmasının yanı sıra, önemli düzeyde protein içermesi, durultma ve durultma yardımcı maddelerinin seçimi bakımından önem teşkil etmektedir. Daha önce belirtildiği gibi birçok meyve suyunda bulanık oluşturan en önemli reaksiyon protein-polifenol interaksyondur. Bu iki bileşenin stabilitesi durultma yardımcı maddeleri sayesinde bozulabilmektedir. Böylece daha önce, filtrasyon gibi fiziksel bir işlem ile ayrılamayan küçük partiküller, durultma yardımcı maddeleri ile birleşerek daha büyük partiküllere dönüştürülmekte ve meyve suyundan uzaklaştırılabilmektedir. Bunun sonucunda ise, berrak meyve suyu elde edilmektedir. Günümüzde sıklıkla kullanılan başlıca durultma yardımcı maddelerinin kimyasal özelliklerine göre sınıflandırılması çizelge 2.3’de verilmiştir.

Berraklaştırma işlemi sırasında bütün bu durultma yardımcı maddelerinin etki ettiği farklı bir bileşen grubu ve etki mekanizmaları bulunmaktadır. Durultma amacıyla tek bir durultma yardımcı maddesi seçilebildiği gibi, birden farklı durultma yardımcı maddesini içeren kombinasyonlar da kullanılmaktadır. Hangi durultma yardımcı maddesi/maddelerinin seçilmesi gerektiği üründe bulunan bulanıklık unsurlarının çeşit ve miktarlarına göre belirlenmektedir.

Çizelge 2.3 Durultma yardımcı maddelerinin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması (Morris ve Main 1995)

Kimyasal yapı	Durultma yardımcı maddesi
Toprak bazlı	Bentonit
Protein bazlı	Jelatin, kazein, albumin, isinglass
Polisakkarit	Agarlar
Sentetik polimer	Polivinilpoliprolidon (PVPP)
Silikon dioksit	Kizelsol
Diğer	Çelatörler, enzimler, karbonlar, kitosan

Bentonit: Bentonit, durultmada proteinleri adsorbe etme özelliğinden dolayı kullanılmaktadır (Blade ve Boulton 1988). Kalsiyum ve sodyum bentonit ticari olarak meyve sularının durultulmasında kullanılan iki bentonit çeşididir. Bunların içinde sodyum hidrat çeşidi daha fazla aktif alana sahip olup, bundan dolayı etkinliği Ca-bentonite göre daha fazladır. Bentonitin etki mekanizması elektrostatiktir. Bir bentonit hidratı negatif yüklü durumdadır. Ortamda bulunan pozitif yüklü bileşenler ise, bu yüzeye adsorbsiyon ile tutunur ve böylece filtrasyon veya başka bir yöntem ile ayrılabilir boyutta parçacıklar oluşur (Blade ve Boulton 1988, Morris ve Main 1995). Bu reaksiyon hızlı bir şekilde gerçekleşse de oluşan partiküller yer çekimi etkisiyle yavaşça çökmektedir (Morris ve Main 1995). Bentonitin temel kullanım amacı protein stabilizasyonu olsa da, işlem sırasında ACN’ler gibi diğer pozitif yüklü maddeleri de uzaklaştırabilmektedir. Buna ek olarak, yapılan bir araştırmada bentonitin, şarap içinde bulunan demir ve bakır gibi metallerin uzaklaştırabildiği gerekçesiyle “bluefining” olarak adlandırılan bu işlemde de kullanıldığı belirtilmiştir (Ribéreau-Gayon vd. 2006c, Schubert ve Glomb 2010).

Bentonitin durultmada gösterdiği adsorbe etkisi, ortamın pH ve sıcaklık derecelerine göre değişir. Örneğin elma sularında yapılan bir çalışmada, pH 3.0’da, bentonitin protein adsorbe etme gücünün maksimum olduğu gözlemlenmiştir. Bunun yanında, pH’nın yükselmesi, adsorbsiyon yeteneğinde azalmaya neden olduğu

belirtilmektedir. Bentonitin optimum olarak çalıştığı sıcaklık aralığı, 20°–50 °C olup, bu sıcaklık aralığında etkili olarak çalışabilmektedir (Gülcü 2008).

Kitosan: Kitosan, β -(1,4)-2-asetoamido-2-deoksi-D-glukoz ve β -(1,4)-2-amino-2-deoksi-D-glukoz ünitelerinden meydana gelmiş bir kopolimeridir. Bu durultma yardımcı maddesi, beyaz renkte, kokusuz ve tatsız, yarı şeffaf partikül veya toz halinde bir madde olup, yenilenebilir ve çevreye uyumlu olması, ticari olarak kolaylıkla elde edilebilmesi ve birçok formda kullanılabilmesi nedeniyle, gıda endüstrisinde çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır (Agnihotri vd. 2004, Kurt 2005, Koç ve Özkan 2011).

Son yıllarda yapılan çeşitli araştırmalarda; kitosanın güçlü pozitif yük taşıması, asit bağlayıcı özellikte olması, kolloidal ve dispers partiküllerin ayrılmasında etkili olması dolayısıyla sıvılardaki katı partikülleri sararak çöktürebilme niteliğine sahip olduğu ortaya konulmuştur. Bu özelliği nedeniyle, kitosanın meyve suyu üretiminde, özellikle polifenollerin uzaklaştırılması amacıyla etkili bir durultma yardımcı maddesi olarak kullanılabileceği belirtilmektedir (No vd. 2007, Orhan 2012). Yapılan bir çalışmada, kitosanın polikasyonik yapısı sayesinde, meyve suyunda bulunan protein miktarını önemli düzeyde azalttığı bildirilmiştir (Chatterjee vd. 2004). Bu durum, kitosanın yalnızca polifenoller değil, aynı zamanda protein stabilitesi amacıyla da meyve sularının durultulmasında kullanılabileceğini gösterse de, protein stabilizasyonu amacıyla kitosanın kullanılabileceğini ortaya koyan araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Jelatin: Jelatin, polifenoller üzerindeki etkisinden dolayı tercih edilmektedir. Diğer protein bazlı durultma yardımcı maddelerinde olduğu gibi jelatin de, meyve sularının pH aralığında (3.0–4.0) pozitif yüklüdür. Böylece, jelatin negatif yüklü polifenollerle (MA>500 Da üzerindeki polifenoller, örneğin tanenler ve polimerize antosiyaninler) reaksiyona girmektedir (Versari vd. 1998, Turfan vd. 2011). Jelatinler ile polifenollerin reaksiyona girmesi sonucu, polifenol-jelatin kompleksi oluşmaktadır (Djagny vd. 2001). Bu reaksiyon, polifenollerin yapısında bulunan hidroksil grupları ile proteinlerin peptit bağları arasında oluşan hidrojen bağları ile gerçekleşmektedir.

Polifenol-protein kompleksi sayesinde oluşan partiküller (floklar) kritik boyuta ulaştıktan sonra çökelmeye başlar (Versari vd. 1998).

Ribéreau-Gayon vd. (2006c), bu durultma yardımcı maddesini aşağıdaki şekilde 3 gruba ayırmıştır:

1. **“Heat-soluble” jelatin:** %30–50 oranlarında protein içermektedir. Güçlü elektrostatik özellikleri bulunmaktadır. Molekül ağırlığı 10^5 Dalton’un üstündedir.
2. **Sıvı jelatin:** Kimyasal hidroliz ile elde edilmektedir. Molekül ağırlığı 10^5 Dalton’dan daha azdır.
3. **“Cold-soluble” jelatin:** Enzimatik hidroliz ile üretilmektedir. Düşük miktarda peptit bağı içermektedir. Zayıf elektrostatik özelliği bulunmaktadır.

Bunun yanında, jelatin, üretiminde kullanılan hidroliz tekniğine göre de, 2 gruba ayrılabilir (Cemeroğlu ve Karadeniz 2009):

1. **A tipi jelatin:** Kimyasal hidroliz işlemi asitle yapılır. Bu tip jelatinin izoelektrik noktası pH 7.0–9.0 arasındadır. Bu nedenle meyve suyu pH dereceleri arasında (3.0–4.0) (Monagas vd. 2005) yoğun pozitif yük taşırlar. Bu tip jelatin, meyve sularının durultulmasında kullanılmaktadır.
2. **B tipi jelatin:** Bu tip jelatin, bir alkali eşliğinde (kalsiyum hidroksit v.b) uzun süre bekletilip, hidrolize edilerek üretilmektedir. İzoelektrik noktası ise, pH 4.4–5.0 arasındadır. Bu tip jelatin, meyve sularının durultulmasına uygun değildir.

Yukarıda özellikleri verilen katı haldeki jelatinler kendilerine özgü sıcaklıklarda çözeltileri hazırlandıktan sonra, sıvı durumda olan jelatin ise, dozaj hesaplandıktan sonra doğrudan meyve suyuna ilave edilir. Durultma işlemine başlamadan önce jelatin dozajı ön denemelerle belirlenmeli ve minimum miktarda jelatin kullanılmaya özen gösterilmelidir. Aksi halde, gereğinden fazla jelatin kullanılması durumunda,

“overfining (aşırı durulma)” olarak adlandırılan istenmeyen durum ortaya çıkabilir. Gereğinden fazla jelatin ilave edilme durumunda, ya çok fazla miktarda polifenol (örneğin, antosiyanin) kaybı olur ya da ortamda jelatinle interaksiyona girip çökelti oluşturacak düzeyde yeterli polifenol bulunmuyorsa, ürün içerisinde jelatin kalıntısı kalabilir, bu durumda da sonradan bulanma meydana gelir. Bu durumu önlemek için ön denemelerle uygun jelatin dozajının mutlaka belirlenmesi veya kiselzol gibi kalıntı jelatini uzaklaştıracak bir madde eklenmesi önerilmektedir (Ribéreau-Gayon vd. 2006c).

Kazein: Kazein, sütün bileşiminde bulunan başlıca proteindir. Bu durultma yardımcı maddesinin iki çeşidi bulunmaktadır. Bunlardan birincisi potasyum kazeinat olup, hidrofil niteliğinden dolayı daha çok tercih edilmektedir. Kazein, protein yapısında bir durultma yardımcı maddesi olması nedeniyle üründen tanenleri uzaklaştırmak için kullanılmaktadır (Morris ve Main 1995).

Proteinlerin fonksiyonel grupları olan ve kazeinin bileşiminde de bulunan $-COOH$, $-NH_2$ ve $-OH$ fonksiyonel grupları ile polifenollerin yapısında bulunan $-OH$ grupları arasında hidrojen bağı oluşur ve böylece polifenoller kazein ile birlikte ortamdan uzaklaştırılır (Spagna vd. 2000). Bu durultma yardımcı maddesinin tipik özelliği, tanenler ile kompleks oluşturması için asidik ortama ihtiyaç duymasıdır. Dolayısıyla, kazeinin flok oluşturması, meyve suyu gibi asidik ortamlarda gerçekleşebilmektedir (Ribéreau-Gayon vd. 2006c).

Yumurta albumini: Protein yapısındaki yumurta albumini en eski durultma yardımcı maddelerinden birisi olup, halihazırda şarapların durultulmasında yaygın olarak kullanılmakta ve son zamanlarda meyve suyu durultulmasında da kullanılmaktadır. Yumurta beyazında %12.5 oranında albumin bulunmaktadır (Ribéreau-Gayon vd. 2006c). Albumin, negatif yüklü tanenlere bağlanabilen pozitif yüklü yüzey alanına sahiptir (Morris ve Main 1995). Bu durultma yardımcı maddesi, tanen molekülerinin hidroksil gruplarıyla hidrojen bağı oluşturarak birleşmekte (Kalkan-Yıldırım 2011) ve böylece tanenleri uzaklaştırmaktadır. Yumurta albuminin daha iyi etki gösterebilmesi için ortamda yüksek oranda tanen bulunması

gerekmektedir. Bu nedenle, yıllandırılmış şarapların durultulması sırasında albumin ile çok başarılı sonuçlar elde edilebilmektedir (Ribéreau-Gayon vd. 2006c).

Yumurta beyazı durultmada doğrudan durultma yardımcı maddesi olarak kullanılabilir. Bunun için yumurta beyazları ayrıldıktan sonra az miktarda su ile karıştırılır. Karıştırma işlemi sırasında mümkün olduğu kadar az köpük oluşmasına dikkat edilmelidir. Çözündürme işlemi sırasında, çok az miktarda sodyum klorür ilavesi çözünmeyi hızlandırmaktadır. Doğrudan yumurta beyazının kullanılması durumunda, 225 L ürün için 3–8 adet yumurta beyazı yeterli olduğu bildirilmektedir (Ribéreau-Gayon vd. 2006c). Bunun yanında, çözünme sırasında sodyum klorür yerine sodyum karbonat eklenerek hazırlanan çözelti, kurutulup toz haline getirildikten sonra da kullanılabilir. Bu şekilde hazırlanan yumurta albumini durultma yardımcı maddesi 5–15 g hL⁻¹ dozajlarında şarap durultulmasında kullanılmaktadır. Yumurta albumini aynı zamanda piyasada “ready-to-use” olarak kullanıma hazır bir şekilde de bulunmaktadır. Bu tip albumin ise, sterilize edilmiş olup, sıvı formda bulunmaktadır (Ribéreau-Gayon vd. 2006c).

Yukarıda değinilen durultma yardımcı maddelerinin dışında, piyasada birçok farklı durultma yardımcı maddesi bulunmaktadır. Bütün bu maddelerin olumlu etkileri (durultma ve stabilizasyon) yanında olumsuz etkileri de (aşırı durultma, renk kaybı vb.) bulunmaktadır. Çizelge 2.4’de bu durultma yardımcı maddeleri; renk kaybı, aşırı durultma ve stabilizasyon üzerine etkileri bakımından en etkiliden daha az etkiliye doğru sıralanmıştır.

Çizelge 2.4 En çoktan aza doğru bazı durultma yardımcı maddelerinin etkileri (Morris ve Main 1995)

Renk kaybı	“Overfining potansiyeli” “(aşırı durultma)”	Durultma ve stabilizasyon
Aktif kömür	Jelatin	Bentonit
Jelatin	Aktif kömür	Aktif kömür
Kazein	Albumin	Kazein
Albumin	Kazein	Jelatin
PVPP	PVPP	Albumin
Bentonit	Bentonit	PVPP

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Kırmızı üzüm suyu

Araştırmada materyal Kalecik Karası üzüm (*Vitis vinifera* L.) çeşidinden elde edilen üzüm suyu kullanılmıştır. Üzümler, Ankara'nın Kalecik ilçesinde bulunan Ankara Üniversitesi'ne bağlı bağlardan temin edilmiştir. Üzümlerin hasadında, suda çözünür kuru madde içeriği (briks) ile asitlik değerleri temel alınmıştır. Üzümlerin; 18–24^oBx arasında (Mazza vd. 1999), tartarik asit cinsinden titrasyon asitliği değerinin ise, 5–6 g/L arasında (Selli vd. 2004) olması göz önünde bulundurulmuştur. Bu değerlere sahip üzümler, bölüm 3.2.1'de detaylı olarak anlatılan yöntem ile üzüm suyuna işlenmiştir.

3.1.2 Kimyasallar

Antosiyanin dağılımının belirlenmesi amacıyla kullanılan malvidin, delfinidin, peonidin ve siyanidin monoglikozitleri, Extrasynthese firmasından (Genay, Fransa) temin edilmiştir. ACN'lerin saflaştırılmasında kullanılan C₁₈-Sep-Pak kartuşları (kolonları) Waters firmasından (Milford, MA, A.B.D.) temin edilmiştir. ACN'lerin ekstraksiyonunda, saflaştırılmasında ve HPLC ile analizinde, daima HPLC saflığında (HPLC grade) solventler kullanılmıştır. Diğer analizlerde; Merck (Darmstad, Almanya) firmasından temin edilen, ya analitik saflıkta ya da yüksek saflıkta (extra pure) kimyasallar kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan durultma yardımcı maddeleri; bentonit (Begerow, Langenlonsheim, Almanya), kazein (Laffort, Bordeaux, Fransa), albumin (Sigma, St. Louis, MO, A.B.D.), kitosan (Aldrich, Saint Louis, MO, A.B.D.) ve jelatindir (Seljel, Türkiye).

3.2 Yöntem

3.2.1 Kırmızı üzüm suyu üretimi

Yıkama ve sap ayırma-patlatma: Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi'ne bağlı meyve suyu pilot işletmesine getirilen üzümler öncelikle yıkanmıştır. Daha sonra, üzümlerin sapları elle ayrılıp, daneler patlatılmıştır.

Enzimasyon: Üzüm kabuğunda bulunan rengin üzüm şirasına geçmesi amacıyla enzimasyon işlemi yapılmıştır. Enzimasyonda uygulanan ısıtma ile, üzüm suyunun kalitesini etkileyen enzimlerin de inaktivasyonunun sağlanması amaçlanmıştır. Polifenollerin ve ACN'leri enzimatik olarak parçalayan polifenol oksidaz enzimini inaktif etmek için, üzüm suyunda orta derecede ısıtma önerilmektedir (Patras vd. 2010). Bu amaçla 50°C sıcaklığa getirilen mayşeye, renk enzimi olarak adlandırılan Pectinex Ultracolor (Novozymes, Dittingen, İsviçre) enziminden üretici firmanın önerdiği dozajda eklenmiş ve 2 h sürekli karıştırılarak sıcaklığın homojen kalması sağlanmıştır. Bu süre sonunda meyve suyu pilot işletmesinde bulunan paketli pres yardımıyla üzüm suyu elde edilmiştir. Üzüm sularının 1.5 L'lık PET şişelere dolumu yapılıp, süratle buzlu su banyosunda soğutulmuştur.

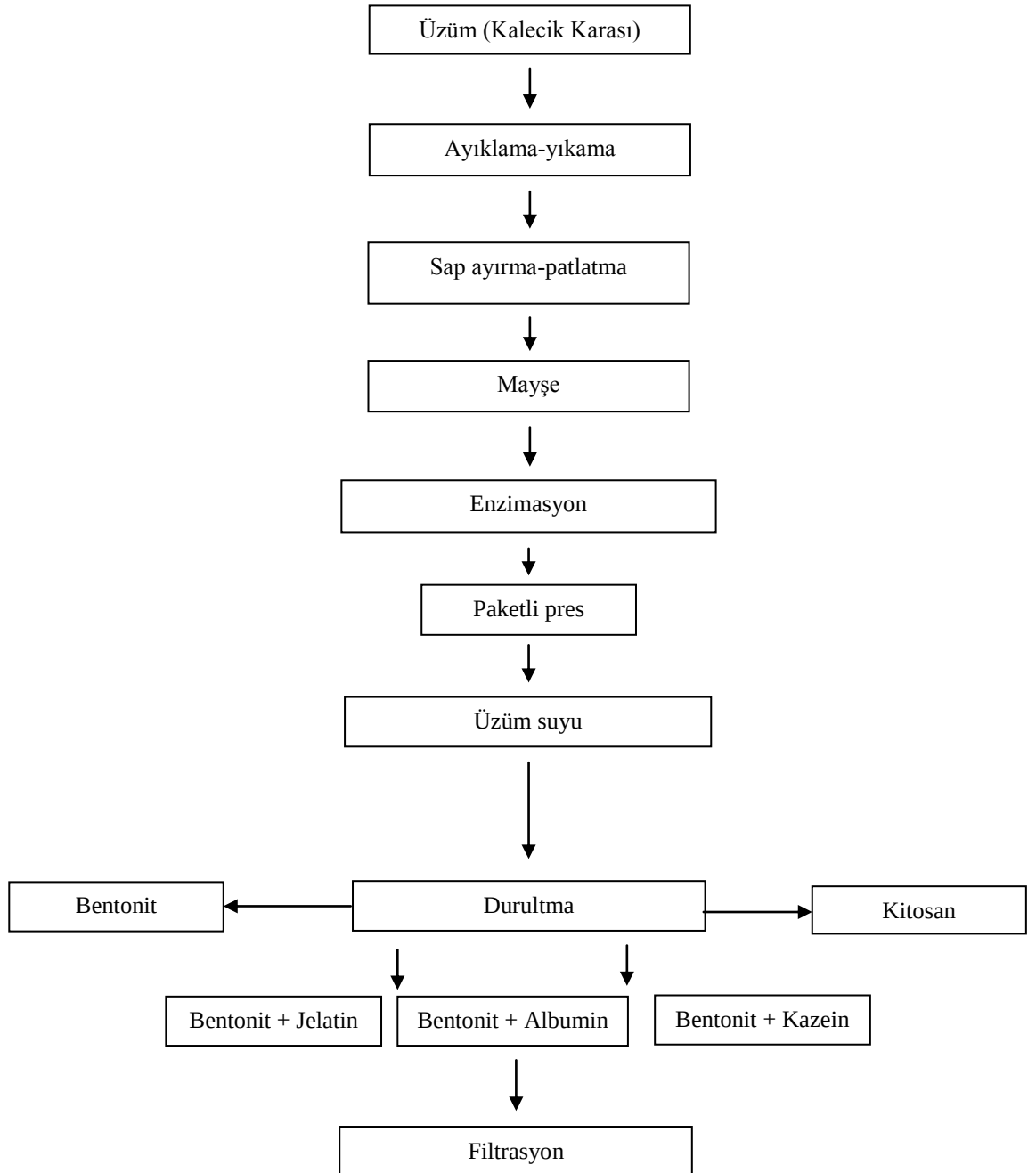
Üzümlerin üzüm suyuna işlenmesindeki aşamalar şekil 3.1'de gösterilmiştir.

3.2.2 Kırmızı üzüm suyu durultması

3.2.2.1 Durultma yardımcı maddelerinin hazırlanması

Bentonit: Begerow (Langenlonsheim, Almanya) firmasından temin edilen bu durultma yardımcı maddesi, tartıldığı miktarın 9 katı kadar saf su içine eklenmesi ve ardından sıvı içerisinde homojen olacak şekilde karıştırıldıktan sonra, oda sıcaklığında 1 gece bekletilip, iyice şişmesi sağlanarak hazırlanmıştır.

Jelatin: Jelatin (Seljel, Türkiye), %1 (w/v) çözelti olarak hazırlanmıştır. Bu amaçla, 1 g jelatin tartılmıştır ev tartılan bu jelatin, 40°C'deki 60 mL saf suya, topaklaşma olmaması için yavaş yavaş eklenmiştir. Daha sonra hacim 100 mL'ye tamamlanarak %1'lik (w/v) jelatin çözeltisi elde edilmiştir.



Şekil 3.1 Üzüm suyu üretim akış şeması

Kitosan: Kitosan (Aldrich, Saint Louis, MO, A.B.D.), %1 (w/v)'lik çözelti olarak hazırlanmıştır. Kitosan asidik ortamlarda çözünebildiği için, belirtilen oranda kitosan çözeltisi hazırlamak için, aynı oranda (%1, w/w) sitrik asit çözeltisi hazırlanmıştır. Bu amaçla, önce 1 g sitrik asit çözeltisi yaklaşık 100 mL suda çözündürülmüştür.

Bu çözelti üzerine, daha sonra 1 g kitosan eklenmiş ve bu karışım önce manyetik bir karıştırıcıda (IKALabortechnik, Rctbasic, Staufen, Almanya) karıştırılmış, daha sonra da yüksek devirli homojenizatörde (Heidolph SilentCrusher M, Schwabach, Almanya) 3 dak. süreyle 15 000 rpm'de karıştırılarak iyice çözünmesi sağlanmıştır. Bu çözelti 100 mL'lik ölçü balonuna aktarılmış ve su ile hacmine tamamlanmıştır. Son olarak, çözelti 60°C'ye getirilip, vakum altında (Knflab, Laboport, Freiburg, Almanya) ile filtre edilmiştir (Whatman 541, İngiltere).

Kazein ve albumin: Kazein (Laffort, Bordeaux, Fransa) ve albumin (Sigma, St. Louis, MO, A.B.D.) gibi protein bazlı durultma yardımcı maddeleri, alkali ortamlarda daha iyi çözünmektedir. Bu nedenle, çalışmamızda da, kazein ve albumin (%1, w/v) %1 (w/v)'lik sodyum karbonat çözeltisi içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır.

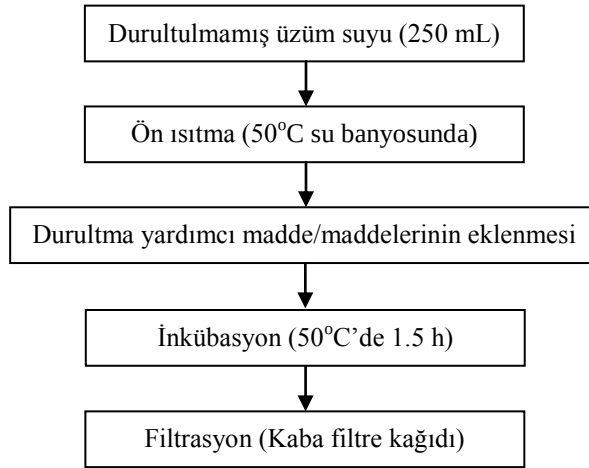
3.2.2.2 Durultma uygulaması

Durultmada amaç; kırmızı üzüm suyunda kolloidal olarak bulunan ve bulanıklığa neden olan polimerize tanenlerle, diğer yüksek molekül ağırlığındaki polifenollerin ve proteinlerin uzaklaştırılmasını sağlamaktır. Üzüm suyunun durultulması, soğuk durultma yöntemine göre, daha kısa sürdüğü ve daha ekonomik olduğu gerekçesiyle endüstri tarafından tercih edilen sıcak durultma yöntemiyle 50°C'de yapılmıştır. Kırmızı üzüm suyunun durultulması, önce sadece bentonit ile gerçekleştirilmiştir. Bunun yanında bentonitin; jelatin, kazein ve yumurta albumini ile kombinasyonları da uygulanarak, yüksek molekül ağırlıklı ve daha sonradan bulanıklığa neden olan polifenoller uzaklaştırılmaya çalışılmıştır. Son yıllarda önemi artan ve aynı zamanda polifenol yanında protein adsorbe etme özelliği olan kitosan ile de durultma

denemeleri yapılmıştır. Kitosanın etkisi, hem tek başına hem de bentonit ile kombinasyonu yapılarak gözlemlenmiştir.

Durultma işleminde kullanılacak dozajlar, kapsamlı ön denemeler ile belirlenmiştir. Bu amaçla öncelikle bentonit ile durultma ön denemesi yapılmış ve bu durultma yardımcı maddesinin dozajı belirlendikten sonra, jelatin, kazein, albumin ve kitosan ile kombinasyonları için ön denemeler yapılmıştır. Daha sonra, belirlenen dozajlar ile durultma denemeleri, 2 tekerrürlü olarak 250 mL üzüm suyunda gerçekleştirilmiştir. Durultma işlem aşamaları, şekil 3.2'deki akış diyagramında verilmiştir.

Durultma öncesi ve sonrasında kırmızı üzüm suyunda aşağıda verilen analiz yöntemleri 2 paralelli olarak uygulanarak durultmanın özellikle bulanıklık ve polifenollerin bir alt grubu olan ACN'ler üzerine etkisi saptanmıştır. Bu amaçla; bentonit, jelatin, kazein, yumurta albumini ve kitosan ile durultulan meyve sularında bulanıklık düzeyi, toplam monomerik ACN miktarı, polimerik renk, reflektans renk değeri tayinleri spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmiştir. Ayrıca, durultulan üzüm sularında ACN dağılımları da HPLC ile belirlenmiştir.



Şekil 3.2 Durultma işlem aşamaları

3.2.3 Fiziksel analizler

3.2.3.1 pH tayini

pH değeri, potansiyometrik olarak pH-metre (Mertler-Toledo SevenCompact pH/Ion S220, Schwerzenbach, İsviçre) ile saptanmıştır. Bu amaçla, üzüm suyu örneklerinden bir behere 10 mL alınarak üzerine, 10 mL damıtık su ilave edildikten sonra pH değeri belirlenmiştir. Meyve ve sebze suları gibi tampon niteliği yüksek olan gıdalarda sulandırma oranı fazla olsa bile, pH değeri değişmediği için (Cemeroğlu 2007), gerek meyve sularına gerekse de konsantre örneklerine pH ölçümlerini kolaylaştırmak için önemli miktarda su eklenebilmiştir. pH ölçümleri, 20°C’de yapılmıştır.

3.2.3.2 Bulanıklık düzeyinin ölçülmesi

Bulanıklık ölçümleri türbidimetre (HachCo., Loveland, CO, A.B.D) ile gerçekleştirilmiş ve sonuçlar "Nephelometric Turbidity Units (NTU)" olarak ifade edilmiştir. Ölçümler, örnek sıcaklığı 20°C’ye geldikten sonra yapılmıştır.

3.2.3.3 Reflektans renk tayini

Örneklerin rengi, reflektans spektrofotometresi (Minolta CM-3600d, Osaka, Japonya) kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla, L*, a* ve b* renk değerleri ölçülmüş ve, C* ve h° renk değerleri de a* ve b* değerlerinden aşağıda verilen eşitlikler (3.1 ve 3.2) kullanılarak hesaplanmıştır:

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (3.1)$$

$$h^{\circ} = \arctan (b^*/a^*) \quad (3.2)$$

3.2.4 Kimyasal analizler

3.2.4.1 Titrasyon asitliği

Titrasyon asitliği, pH-metre ile izlenerek yürütülen titrasyonla saptanıp ve bu amaçla IFU tarafından (1968) önerilen işlemler uygulanmıştır. Bu amaçla belli miktar üzüm

suyuna 0.1 *N* standardize edilmiş NaOH çözeltisi ile ve pH-metre yardımıyla, pH 8.1'e ulaşıncaya kadar titrasyon uygulanmıştır. Titrasyon asitliği, tartarik asit cinsinden "g/100 mL" olarak hesaplanmıştır.

3.2.4.2 Toplam monomerik antosiyanin tayini

Bu amaçla, Fuleki (1969) ve Francis (1985) tarafından önerilen, ve Giusti ve Wrolstad (2001) tarafından geliştirilen pH diferansiyel metodu kullanılmıştır. Bu metodun ilkesi, monomerik ACN'lerin pH 1.0'da renkli oksonium formunun, pH 4.5'de ise, renksiz hemiketal formunun egemen olmasına dayanmaktadır. Buna göre, ortamın pH 1.0 ve 4.5 olduğu zaman ölçülen absorbans değerlerinin farkı, doğrudan ACN konsantrasyonu ile orantılı bulunmaktadır.

Örnekler 9391 x *g*'de 10 dak. süreyle santrifüj (Sigma 3K 15, Postfach, Almanya) edilip, bulanıklık oluşturacak tortularından ayrılmıştır. Örnekler, potasyum klorür tampon çözeltisi (pH 1.0) ile seyreltilerek, üzüm suyunda bulunan ACN'lerin $\lambda_{vis-maks}$ dalga boyu olan 528 nm'de absorbans değeri 1.0 civarına getirilmiştir. Farklı durultma yardımcı maddeleri ile durultulmuş örnekler de aynı seyreltme oranlarına uyularak seyreltilmiş ve böylece analizler birçok spektrofotometrenin linear sınırı olan 1.2 absorbans değerinin (Özkan vd. 2007) altında yürütülmüştür. Potasyum klorür çözeltisi (pH 1.0) ile belirlenen bu seyreltme oranı, hem potasyum klorür hem de sodyum asetat tampon çözeltisi (pH 4.5) ile uygulanmış ve elde edilen seyreltikler, 15 dak. süreyle denge oluşması için kendi halinde bırakılmışlardır. Bekleme süresi sonunda, seyreltikler 0.45 μ m gözenek çapındaki PVDF (polyvinylidene fluoride) filtreden (Millipore, Bedford, MA, A.B.D.) filtre edildikten sonra, örneklerin absorbans değerleri, örnek ve şahidin (damıtık su) aynı anda konulabildiği çift huzmeli (double-beam) spektrofotometre (ThermoScientific Evolution 201, Cambridge, İngiltere) kullanılarak belirlenmiştir. Absorbans ölçümleri, damıtık suya karşı, üzüm ACN'lerinin $\lambda_{vis-maks}$ dalga boyu olan 528 nm'de ve ayrıca düşük düzeydeki bulanıklığın belirlenmesi için 700 nm'de 1 cm tabaka kalınlığındaki tek kullanımlık küvetlerde (Brand GmbH, Postfach, Wertheim, Almanya) yapılmıştır. Monomerik ACN miktarı, üzümde baskın bulunan malvidin-

3-glukozit cinsinden (Baiano vd. 2009, Púertolas vd. 2009) aşağıda verilen 3.3 No'lu eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$\text{Monomerik ACN miktarı (mg/kg veya L)} = \frac{(A) (MW) (Sf) 1000}{(\epsilon) (L)} \quad (3.3)$$

Burada:

A: Absorbans farkı (pH 1.0 ve 4.5 değerlerinde ölçülen absorbans farkı),

MW: Baz olarak alınacak antosiyaninin molekül ağırlığı (Dalton),

Sf: Seyreltme faktörü,

ϵ : Molar absorpsiyon katsayısı (L/cm mg),

L: Spektrofotometre küvetinin tabaka kalınlığı (cm).

Malvidin-3-glukozidin molar absorbans değeri $\epsilon=28\ 000$ L/cm mg ve molekül ağırlığı ise, MW=493.5 Da (Giusti ve Wrolstad 2001) alınarak hesaplama yapılmıştır.

3.2.4.3 Antosiyanin parçalanma ölçütlerinin belirlenmesi

Giusti ve Wrolstad (2001) tarafından önerilen yöntem uygulanmıştır. Bu amaçla, üzüm suyu örnekleri potasyum klorür çözeltisi (pH 1.0) ile seyreltilerek, üzüm suyunda bulunan ACN'lerin maksimum absorbans verdiği dalga boyundaki ($\lambda_{\text{vis-maks}}$) absorbans değeri (528 nm) 0.4–0.6 absorbans değerine getirilmiştir. Daha sonra bisülfite (%20 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$) çözeltisi eklenerek, örnekteki monomerik ACN'lerin renksiz "sulfonik asit kompleksi" oluşturması sağlanmıştır. Buna karşın, "polimerik ACN-tanen" kompleksleri ve "melanoidin" pigmentleri ise, bisülfite karşı direnç göstererek renklerini korumuşlardır. Bu esmer renkli pigmentlerin ortamdaki konsantrasyonu arttıkça, 420 nm'de okunan absorbans değerleri yükselmektedir. Bu nedenle; bisülfite uygulanmaksızın $\lambda_{\text{vis-maks}}$ dalga boyunda ve bisülfite uygulandıktan sonra 420 nm dalga boyunda yapılacak iki absorbans ölçümü ile; aşağıda ayrıntıları verilen "renk yoğunluğu," "polimerik renk" ve "polimerik renk yüzdesi" gibi üç nitelik belirlenmiştir.

- **Renk yoğunluğu**

Bu değer, "bisülfıt uygulanmamış küvette bulunan örneğın, $\lambda_{\text{vis-maks}}$ ve 420 nm dalga boylarındaki absorbansları toplamı" olarak tanımlanmaktadır. Aşağıdaki eşitlikle (3.4) hesaplanmıştır:

$$\text{Renk yoğunluğu} = [(\lambda_{\text{vis-maks}} - A_{700 \text{ nm}}) + (A_{420 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})] \times \text{SF} \quad (3.4)$$

Burada:

SF: seyreltme faktörü

- **Polimerik renk**

Bu değer, "bisülfıt uygulanmış küvette bulunan örneğın, $\lambda_{\text{vis-maks}}$ ve 420 nm dalga boylarındaki absorbansları toplamı" olarak tanımlanmaktadır. Aşağıdaki eşitlikle (3.5) hesaplanmıştır:

$$\text{Polimerik renk} = [(A_{\lambda_{\text{maks}}} - A_{700 \text{ nm}}) + (A_{420 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})] \times \text{SF} \quad (3.5)$$

- **Polimerik renk oranı**

Polimerik renk oranı; polimerik rengın, renk yoğunluğuna oranı olarak tanımlanmaktadır. Bu değer arttıkça, monomerik ACN'lerin parçalandığı ve esmer renkli pigmentlerin arttığı, kısaca doğal rengın bozulduğu anlaşılır. Bu değer, aşağıdaki eşitlikle hesaplanmıştır:

$$\text{Polimerik renk oranı (\%)} = \frac{\text{Polimerik renk}}{\text{Renk yoğunluğu}} \quad (3.6)$$

3.2.4.4 Antosiyanin dağılımının belirlenmesi

Üzüm suyu ACN kompozisyonu, HPLC yöntemiyle üç aşamadan (saflaştırma, tanımlama ve hesaplama) oluşan bir uygulama sonunda belirlenmiş olup, bu aşamalar aşağıda açıklanmıştır.

Saflaştırma

Meyve suyu örneğinden, şeker ve organik asit gibi unsurların uzaklaştırılması amacıyla saflaştırma işlemi uygulanmıştır (Skrede vd. 2000). Saflaştırma işleminin ilk aşamasında C-18 Sep-Pak kolonlarındaki dolgu maddesinin ACN'lerle reaksiyona girebilmesini sağlamak için şartlandırılma (conditioning) işlemi yapılmıştır. Bu işlemde kolondan sırasıyla; 5 mL etil asetat, 5 mL metanol (MeOH, %0.01 HCl içerecek şekilde asitlendirilmiş) ve son olarak da 2 mL %0.01 HCl içerecek şekilde asitlendirilmiş su geçirilmiştir. Ekstraksiyona hazır hale getirilen kolona, saflaştırılacak bileşeni içeren 0.5 mL ekstrakt yüklenmiş ve daha sonra 2 mL asitlendirilmiş suyla elüe edilmiştir. Böylece bu elüsyon ile organik asitler ve şekerler ile suda çözünür nitelikteki diğer bileşikler gibi analizi interfere eden bileşikler uzaklaştırılırken, ACN'ler ve diğer polifenolik bileşikler kolon üzerinde sorbente bağlanmıştır. Eşdüze bir saflaştırma işlemi için saflaştırma düzeneğinden (manifold) (Waters, Milford, MA, A.B.D.) yararlanılmıştır.

C-18 Sep-Pak kolonu, N₂ gazı akımında tutularak kalıntının kuruması sağlanarak, kurutulmuş kolon 2 ml %0.01 HCl içerecek şekilde asitlendirilmiş metanol ile yıkanarak ACN'leri içeren ekstrakt elde edilmiştir. Elde edilen ACN fraksiyonu bir evaporasyon tüpüne alınarak, 35°C'deki bir su banyosuna yerleştirilip, bu fraksiyon N₂ gazı altında kurutulmuştur. Daha sonra evaporasyon tüpündeki kalıntı üzerine 2 mL asitlendirilmiş su eklenerek yeniden çözündürülmüştür. ACN'leri içeren bu çözelti 0.45 µm gözenek çapındaki membran filtreden filtre edilerek, HPLC'nin oto-örnekleme (auto-sampler) ünitesinde kullanılan amber renkli 2 mL'lik cam şişelere (vial) alınmış ve bekletilmeden HPLC'ye enjekte edilmiştir.

Tanımlama ve hesaplama

ACN'lerin tanımlanması ve miktarlarının hesaplanmasında aşağıda özellikleri verilen HPLC cihazından yararlanılmıştır.

Kromatografi koşulları

Kolon: Ters faz (reverse phase) C18 kolonu (250 x 4.6 mm, 5 µm), (Waters, Bridge Columns, Wexford, İrlanda)

Koruyucu kolon: C18 koruyucu kolonu (4 x 3 mm, 5 µm), (Phenomenex Inc.)

Akış hızı: 1 mL dak⁻¹,

Elüsyon süresi: 35 dak.,

Enjeksiyon hacmi: 50 µL,

Dalga boyu: 520 nm,

Hareketli faz (mobile phase): Asetonitril (%100) (A) ile *o*-fosforik asit:asetikasit:asetonitril:su (1:10:5:84; v/v/v/v) (B) karışımı. Gradyent akış söz konusu olup, Skrede vd. (2000) tarafından önerilen, tarafımızca modifiye edilen elüsyon profili uygulanmıştır (Çizelge 3.1).

Kromatogramlarda elde edilen ACN pikleri, standart maddelerin geliş süresi (retention time) ve PDA dedektöründe elde edilen UV spektrumlarının karşılaştırılmasıyla tanımlanmıştır. Bunun yanında bu çalışmada 4 tane ticari olarak üretilen ACN standardı kullanılmıştır. Bunlar; malvidin-3-glikozit (mv-3-glu), peonidin-3-glikozit (pn-3-glu), delfinidin-3-glikozit (dp-3-glu) ve siyanidin-3-glikozittir (cy-3-glu). Örnekteki ACN'lerin miktarı; standart maddelerinin her biri için oluşturulan en az 5 veriye dayalı olarak hazırlanmış standart eğriden hesaplanmıştır. HPLC ile toplam ACN miktarının belirlenmesi, materyaldeki standardı olmayan piklerin alanları hesaplandıktan sonra, başat pike ait standart eğri esas alınmak suretiyle yapılmıştır (Yemiş vd. 2010).

Çizelge 3.1 Antosiyaninler için uygulanacak elüsyon profili

Süre (dak.)	%A	%B
0	1	99
10	12	88
16	22	78
25	50	50
30	1	99
35	1	99

3.2.4.4.1 Üzüm suyu antosiyaninleri için geri kazanım (recovery) analizi

Analiz süresindeki muhtemel kayıpları belirlemek amacıyla geri kazanım testi yürütülmüştür. Bu amaçla Yemiş ve Özkan (2007) tarafından önerilen yöntem uygulanmıştır. Bu yöntemin temeli, örneğe belli miktarda eklenen standardın analiz sonunda “% kaçının” geri kazanıldığının tespitine dayanır. Bunun için 2 ayrı deney yürütülmüştür:

1. Eklenecek standardın örnekteki miktarını belirlemek için “örneğin analizi”
2. Eklenen standardın, örnekte standarda ait olan pik alanını “%” ne kadar artırdığını belirlemek amacıyla “standart eklenmiş örneğin analizi”

Bu amaçla standart; örneğe analizin başlangıcında, yani ekstraksiyondan önce eklenmiştir. Böylece geri kazanım deneyinin, analizde çok önemli bir aşama olan ekstraksiyon işlemini kapsamı da sağlanmıştır.

Ekstraksiyon için kullanılan 2 mL örnek üzerine, üç konsantrasyonda (örnekteki miktar, örnekte bulunan miktarın yarısı ve çeyreği) ACN standardından eklenip, iyice karıştırılmıştır. Daha sonra “**3.2.4.4 Antosiyanin dağılımının belirlenmesi**” bölümünde anlatıldığı şekilde ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri yapılmış ve elde edilen ekstraktlar 0.45 µm gözenek çapındaki teflon filtrelerden filtre edildikten sonra HPLC’ye enjekte edilmiştir. Elde edilen kromatogramlarda oluşan pik alanları integre edilerek hesaplama yapılmıştır. Saptanmış standart madde miktarlarından yararlanılarak aşağıda verilen 3.4 ve 3.5 No’lu eşitlikler yardımıyla "geri kazanım" ve "tekrarlanabilirlik" (reproducibility, varyasyon katsayısı) değerleri hesaplanmıştır.

$$\text{Geri kazanım (\%)} = \frac{A_2 - A_1}{A_3} (100) \quad (3.7)$$

Burada:

A_1 : Standart eklenmemiş materyaldeki bileşen miktarı,

A_2 : Standart eklenmiş materyaldeki bileşen miktarı,

A₃: Eklenen standart miktarı.

$$\text{Varyasyon katsayısı, CV (\%)} = \frac{\text{Geri kazanım testinin standart sapması}}{\text{Geri kazanım değerlerinin ortalaması}} (100) \quad (3.8)$$

3.2.4.5 Fenolik dağılımın belirlenmesi

Üzüm suyunda bulunan fenolik maddelerin saflaştırma işlemi, “**3.2.4.4. Antosiyanin dağılımının belirlenmesi**” bölümünde açıklandığı gibi yapılmıştır. Bu işlemde farklı olarak sadece fenolik bileşikler kartuştan 5 mL etil asetat ile yıkanarak elüe edilmiştir.

Tanımlama ve hesaplama

Fenolik bileşiklerin tanımlanması ve miktarlarının hesaplanmasında da “3.2.4.4. Antosiyanin dağılımının belirlenmesi” bölümünde özellikleri verilen HPLC cihazından yararlanılmıştır.

Kromatografi koşulları

Kolon: Ters faz (reverse phase) C18 kolonu (250 x 4.6 mm, 5 µm), (Phenomenex Inc.)

Koruyucu kolon: C18 koruyucu kolonu (4 x 3 mm, 5 µm), (Phenomenex Inc.)

Akış hızı: 0.700 mL dak⁻¹,

Elüsyon süresi: 85 dak.,

Enjeksiyon hacmi: 30 µL,

Dalga boyu: 280, 306, 320 ve 365 nm,

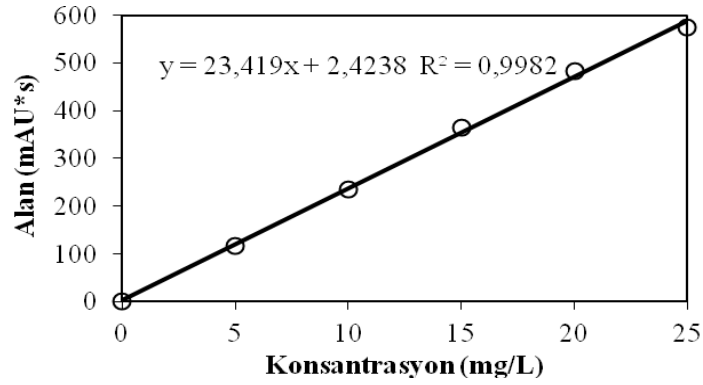
Hareketli faz (mobile phase): Asetonitril (%100) (A) ile formik asit: su (1:99 v/v) (B) karışımı. Gradyent akış söz konusu olup, Skrede vd. (2000) tarafından önerilen, tarafımızca modifiye edilen elüsyon profili uygulanmıştır (Çizelge 3.2).

Kromatogramlarda elde edilen pikler, standart maddelerin geliş süresi (retention time) ve PDA dedektöründe elde edilen UV spektrumlarının karşılaştırılmasıyla tanımlanmıştır. Bu çalışmada kullanılan standart maddeler; kafeik asit (Sigma),

vanilik asit (Fluka, Seelze, Almanya), klorojenik asit (Aldrich, St. Louis, MO, A.B.D.), ferulik asit (Fluka, Seelze, Almanya), (+)-kateşin (Sigma) ve (-)-epikateşindir (Sigma). Örnekteki “toplam fenolik madde miktarı” ile “bireysel fenolik maddelerin miktarı” epikateşine ait 5 veriye dayalı olarak hazırlanmış standart eğriden (Şekil 3.3) hesaplanmıştır (Yemiş vd. 2010).

Çizelge 3.2 Fenolik madde dağılımı için uygulanan elüsyon profili

Süre (dak.)	%A	%B
0	2.5	97.5
45	25	75
50	50	50
55	100	0
68	100	0
70	80	20
85	2.5	97.5



Şekil 3.3 Epikateşin standart eğrisi

3.2.4.6 Antioksidan aktivite tayini

ABTS (2,2'- azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)'in oksidasyonu ile üretilen ABTS^{•+} radikal çözeltisi üzerine, antioksidan içeren bir örneğin eklenmesi sonucu

radikalin indirgenmesi temeline dayanmaktadır. Mavi/yeşil renkli ABTS^{•+} radikali, antioksidan bir bileşik ile reaksiyona girdiğinde radikal, ABTS'nin renksiz formuna çevrilmiştir. Reaksiyon sonucu harcanan ABTS^{•+} miktarı ise, troloks (sentetik bir antioksidan) eşdeğeri olarak hesaplanmakta ve sonuç “TEAC değeri” (Trolox equivalent antioksidant capacity) olarak ifade edilmektedir. Eğer örnekte, antioksidant aktiviteye sahip bileşik varsa, radikal çözeltisinin rengi gittikçe açılacak ve okunan absorbans değerleri zamana bağlı olarak gittikçe düşecektir (Kırca ve Özkan 2010).

Antioksidan aktivite tayini analizlerinde öncelikle 2.45 mM potasyum persülfat içeren 7 mM'lık ABTS^{•+} çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti, 20°C'ye ayarlı sıcaklık kontrollü bir inkübatörde (Sanyo MIR 153, Osaka, Japonya) 12–16 h arasında bekletilerek, ABTS^{•+} radikalinin oluşması sağlanmıştır. Bunun dışında; radikal çözeltisinin, örneklerin ve troloks standardının seyreltilmesinde kullanılacak olan PBS (phosphate buffer saline) çözeltisi hazırlanmıştır. Bu amaçla, hazırlanan 0.1M fosfat tamponu üzerine 8.77 g sodyum klorür (NaCl) eklenerek 1 L'ye damıtık suyla tamamlanmış ve böylece pH'sı 7.4 olan PBS çözeltisi elde edilmiştir.

Analize başlamadan önce ABTS^{•+} radikal çözeltisi, PBS çözeltisi ile 734 nm'de 0.700 (±0.010) absorbans değeri verecek şekilde seyreltilmiştir. Spektrofotometrede küvetlerin bulunduğu bölümün sıcaklığı sirkülasyonlu su banyosu (PolyScience 9106, Niles, IL, A.B.D) ile 30°C'de sabit tutulmuştur. Absorbans ölçümleri 734 nm'de 1.5 mL hacimde 1 cm ışık yolu uzunluğunda tek kullanımlık mikro küvetlerde (Brand Gmbh) yapılmıştır. Mikro küvete seyreltilmiş ABTS^{•+} radikal çözeltisinden 990 µL alınmıştır. Mikro küvet, spektrofotometreye yerleştirilmiş ve başlangıç absorbans değeri kaydedilmiştir. Mikro küvet içindeki radikal çözeltisi üzerine 10 µL seyreltik örnek ilave edilerek, o anda kronometre çalıştırılmış ve 6 dak. sonundaki absorbans değeri kaydedilmiştir. Bu süre sonunda, saptanmış olan absorbans değeri esas alınarak, başlangıç değerine göre “% azalma oranı (inhibisyon oranı)” 3.9 no'lu eşitliğe uygun olarak hesaplanmıştır. Bu işlem üç kez tekrarlanmış ve inhibisyon oranları hesaplanarak bu değerlerin ortalamaları saptanmıştır.

$$\text{İnhibisyon (\%)} = \frac{AB - AS}{AB} (100) \quad (3.9)$$

Burada:

AB: Başlangıç absorbans değeri,

AS: Son absorbans değeri.

Daha sonra 10 µL ve 20 µL örnek hacimleri için aynı işlemler tekrarlanmıştır. Her bir örnek hacmi için, küvet içindeki toplam hacim 1000 µL olacak şekilde küvete seyreltik örnek çözeltisi eklenmiştir. Yine her örnek miktarına bağlı olarak, 6 dak. sonundaki absorbans değerleri, inhibisyon oranları ve bunların ortalamaları hesaplanmıştır. Böylece 6 dak. sonunda saptanmış ortalama yüzde inhibisyon değerleri seyreltik örnek miktarlarına (hacimlerine) karşı bir grafiğe aktarılıp doğrusal regresyon analizi uygulanmak suretiyle, örneğe ait eğriye ve bu eğriyi tanımlayan eşitliğe ulaşılmıştır.

Örneğe ait olan eğrinin eğimi, troloks ile hazırlanmış olan standart eğrinin eğimine oranlanarak örneğin TEAC değeri hesaplanmıştır. Bu hesaplamada, örneğe ait seyreltme faktörü de dikkate alınmıştır.

3.3 İstatistik Değerlendirme

Farklı durultma yardımcı maddeleri ve kombinasyonları ile yapılan üzüm suyu durultma işlemleri, üzüm suyunun fiziksel ve kimyasal özellikleri için, her durultma uygulaması sonunda elde edilen veriler iki tekerrürlü faktöriyel düzende varyans analiz tekniği kullanılarak değerlendirilmiştir. Varyans analizi sonucuna göre, gerekli olduğu durumda Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılarak faktörlerin hangi seviyeleri arasındaki farklılığın önemli olduğu araştırılmıştır. İstatistik analizler için "Minitab for Windows (ver. 15.1)" ve "MSTAT" paket programları kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1 Durultma Ön Deneme Sonuçları ve Durultma Yardımcı Maddesi Dozlarının Belirlenmesi

Meyve suyu üretiminin, önemli bir aşaması olan durultmada kullanılan durultma yardımcı maddesinin çeşit ve kombinasyonları, üründen ürüne değişiklik göstermektedir. Bunun nedeni, meyve sularındaki bulanık etmeni bileşiklerin birbirinden farklı olmasından kaynaklanmasıdır (Dıblan ve Özkan 2013). Örneğin, protein içeriği çok düşük olan nar sularında, bulanıklık etmeni bileşenlerden biri olan proteinleri uzaklaştırmanın, berraklık düzeyini etkilemediği laboratuvarımızda yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir (Turfan vd. 2011). Ancak, diğer meyvelere kıyasla, üzüm suyunda polisakkarit ve polifenollerden sonra en yüksek miktarda bulunan makromolekül proteinlerdir. Üzümün ve dolayısıyla üzüm suyunun içerdiği bu proteinlerin bazılarının, bulanıklık reaksiyonlarına katıldıkları için üründen mutlaka uzaklaştırılmaları gerekmektedir (Le Bourse vd. 2010).

Durultma işlemi sadece, ürüne göre belirlenen, doğru durultma yardımcı maddesi seçimi ile başarıya ulaşmamaktadır. Çünkü materyalin içerdiği bulanıklık etmeni bileşenlerin konsantrasyonu, üründen ürüne, çeşitten çeşitte, hatta aynı çeşit için, yıldan yıla bile değişiklik göstermektedir. Bu nedenle, durultmadan istenen sonucun alınması, durultma yapılacak materyal için kullanılacak olan durultma yardımcı maddesi dozajının, durultmadan önce, ön denemeler ile belirlenmesine bağlıdır.

Durultma ön denemeleri ile durultma yardımcı maddesi dozajı belirlemedeki diğer bir amaç, bulanıklık düzeyini düşürürken, üzüm suyu için önemli bir kalite kriteri olan, ACN miktarını en az seviyede etkilemektir. Yaptığımız çalışmada; “bentonit,” “kitosan,” “bentonit+kitosan,” “bentonit+jelatin,” “bentonit+albumin” ve “bentonit+kazein”den oluşan durultma yardımcı maddeleri ve kombinasyonları kullanılmıştır. Çalışmamızda tercih edilen bu uygulamalar için yapılan seri doz denemeleri sonunda, ACN’lerde görülen azalma, durultma işlemi yapılmayan kontrol örneği ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Durultmada temel amaç; bir yandan en düşük bulanıklık düzeyine ulaşmak iken, diğer yandan da en az düzeyde ACN

kaybının gerçekleştiği minimum durultma yardımcı madde/maddelerinin dozajının bulunması olmuştur.

4.1.1 Üzüm suyunun bentonit ile durultulması

Üzüm sularının durultulmasında, ilk önce uygulanması önerilen durultma yardımcı maddesi bentonittir (Cemeroğlu ve Karadeniz 2009). Bu nedenle, bu çalışmada, durultma yardımcı maddesi olarak öncelikle bentonit ile denemeler yapılmıştır. Üründen protein moleküllerinin uzaklaştırılması amacıyla, farklı teknikler (proteolitik enzim ilavesi gibi) hâlihazırda kullanılsa da, protein stabilizasyonu için kullanılan bentonit ile durultma yöntemi günümüzde, uygulama kolaylığı ve düşük maliyet gibi nedenlerden dolayı, en çok tercih edilen yöntemdir (Ferreira vd. 2002). Bu durultma yardımcı maddesi ile yapılan ön deneme dozları ve sonuçları Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Bentonit ile durultma ön deneme sonuçları

Doz (g/L)	Bulanıklık (NTU)	Monomerik ACN miktarı (mg/L)*
Kontrol	28	231
0.2	12	216
0.4	14	196
0.6	18	200
1.0	8	197
1.4	12	178
2.0	14	177

*Malvidin-3-glikozit cinsinden hesaplanmıştır.

Bentonit ile durultma ön denemelerinde doz olarak, kırmızı şaraplarda kullanılması uygun görülen 0.2–1.5 g/L dozları denenmiştir (Ferreira vd. 2002, Balık 2003, Ribéreau-Gayon vd. 2006c). Çizelge 4.1’de de görüldüğü gibi, artan bentonit dozu ile birlikte monomerik ACN miktarında daha çok kayıp olmaktadır. Balık (2003), kırmızı ve rosé şaraplarının ACN konsantrasyonu ve renk yoğunluğu üzerine

bentonit ile durultmanın etkisini incelemiştir. Araştırmada bentonit 0.5, 1.0 ve 1.5 g/L dozlarında uygulanmış ve ACN miktarında görülen azalmanın doz ile birlikte arttığı saptanmıştır. Araştırmada kullanılan 1.5 g/L bentonit dozu ile durultma sonucunda, ACN konsantrasyonunda %19 azalma meydana geldiği görülmüştür. Çizelge 4.1 incelendiğinde, verilen çalışma ile paralel olarak, en iyi bulanıklık düzeyinin 1 g/L dozunda elde edildiği görülse de, bu doz ile monomerik ACN miktarında %15 oranında azalma meydana gelmiştir. Ayrıca, monomerik ACN miktarı bakımından en iyi doz 0.2 g/L'dir. Sonuç olarak, hem bulanıklık açısından hem de toplam monomerik ACN miktarı açısından en iyi sonuçlar 0.2 g/L dozunda durultmada elde edilmiştir. Bu nedenle, yapılan ön deneme sonucunda bentonitin çalışmamızda 0.2 g/L oranında kullanılmasına karar verilmiştir.

Durultmada kullanılacak bentonit dozu belirlendikten sonra sırasıyla, jelatin, albumin, kazein ve kitosan ön denemeleri, hem bentonit ile birlikte, hem de, bu durultma yardımcı maddelerinin tek başlarına durultma etkinliklerini görmek amacıyla, tek başlarına kullanılmasıyla yapılmıştır.

4.1.2 Üzüm suyunun jelatin, albumin ve kazein ile durultulması

Meyve sularının durultulmasında jelatin, polifenoller bağlama özelliği nedeniyle, yaygın olarak kullanılan bir durultma yardımcı maddesidir. Ancak, sığır jelatini üretiminin yeterli düzeyde olmaması ve durultmanın ardından üründen yeterince uzaklaştırılamayan jelatinin, ürünün depolanması sürecinde sonradan bulunma gibi sorunlara yol açması nedeniyle, gıda endüstrisi son yıllarda, alternatif durultma yardımcı maddelerinden olan, albumin ve kazeine yönelmiştir. Yapılan ön denemelerin sonuçları çizelge 4.2'de özetlenmiştir.

Bu çalışmada kullanılan durultma yardımcı maddelerinden olan jelatin, kazein ve albumin protein kaynaklı durultma yardımcı maddelerindendir. Çizelge 4.2 incelendiğinde, bu durultma yardımcı maddeleri ile yapılan denemelerde bulanıklık düzeyinin, ister bentonit ile olsun ister jelatin ve albumin ile olsun (kazein hariç) uygulanan doz ile birlikte sürekli arttığı görülmektedir. Bilindiği gibi, protein bazlı

bu maddeler polifenollerı uzaklaştırmaktadır. Bu nedenle, materyale eklenen yeterli dozdaki durultma yardımcı maddesi, polifenoller ile interaksıyona girmekte ve dispers partiküller oluşturmaktadır. Oluşan bu partiküller, dolayısı ile polifenoller, kaba filtrasyon ile üründen uzaklaştırılabilmektedir. Ancak, daha yüksek düzeyde eklenen durultma yardımcı maddeleri, ortamda bağlanabilecek polifenol bulunmadığı için serbest halde dolaşmakta ve kaba filtrasyonla bile üründen ayrılamamaktadır. İşte bu kolloid halde bulunan proteinler, ürüne gönderilen ışığı yansıtarak ürünün bulanıklık düzeyini artırmaktadır (Poncet-Legrand vd. 2006c). Ayrıca, yüksek miktarda kullanılan durultma yardımcı maddeleri, ürünün depolanmasında, diğerk serbest halde bulunan proteinler ile birleşerek çökelti oluşturmak suretiyle, sonradan bulunmaya ve tortu oluşumuna da neden olmakta ve tüketici tercihini olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle, daha öncede değinildiğı gibi, bu gibi sorunların başlıca çözümü, optimum düzeyde durultma yardımcı maddesi kullanmaya özen göstermek olup, bunun için de ön denemeler gerçekteştirilerek, esas durultma denemesinde kullanılacak doz miktarları belirlenmelidir.

Kazein ile yapılan durultma ön denemelerinde, bu çalışmada yapılan ön denemelerin en başarılı sonuçları elde edilmiştir. Yapılan ön denemeler ile üzüm suyunun bulanıklık düzeyi, kazeinin, hem tek başına uygulandığı, hem de bentonit ile kullanıldığı denemelerde, 2 NTU seviyesine kadar düşmüştür. Bu çalışmada üretilen ve durultulan üzüm sularında depolama çalışması yapılmamıştır. Ancak, çalışmamızda tercih edilen durultma tekniğı endüstriyel üretim örnek alınarak oluşturulmuştur. Bu nedenle, kazein, durultma işleminde, bentonit ile birlikte ve mümkün olan en düşük doz seviyesinde kullanılmıştır. Ön denemeler sonucunda elde edilen, 0.05 g/L kazein (0.2 g/L bentonit kombinasyonu) miktarı ile ulaşılan 4.4 NTU bulanıklık düzeyinin kaba filtrasyon ile elde edildiğı ve endüstriyel üretimde, ultrafiltrasyon gibi gelişmiş filtrasyon teknikleri ile birlikte, bu NTU düzeyinin daha da düşebileceğı göz önünde bulundurulmalıdır. Bu durultma yardımcı maddesi ile durultulan örneklerin bulanıklık düzeyi, diğerklerinin aksine, kullanılan doz ile birlikte sürekli artmamıştır. Çalışmamızda kullanılan kazein, Laffort firması tarafından üretilmiş olup, “Casei plus” olarak adlandırılmakta ve firma tarafından yüksek dozlarda eklendiğı takdirde bile (en fazla 0.6 g/L) ürünün bulanıklık düzeyini artmayacak şekilde geliştirildiğı belirtilmektedir.

Çizelge 4.2 Jelatin, albumin ve kazein durultma yardımcı maddeleri ve bentonit kombinasyonları ile yapılan durultma ön deneme sonuçları *

Jelatin				
Doz (g/L)	0.2 g/L bentonit ile birlikte		Tek başına	
	Bulanıklık (NTU)	Toplam mono. ACN (mg/L)	Bulanıklık (NTU)	Toplam mono. ACN (mg/L)
0.05	12.0	199.6	7.3	213.0
0.10	6.3	201.3	–	–
0.20	6.3	194.8	8.0	208.8
0.40	5.4	179.6	19.0	180.1
0.50	15.0	165.2	23.0	152.2
Albumin				
Doz (g/L)	0.2 g/L bentonit ile birlikte		Tek başına	
	Bulanıklık (NTU)	Toplam mono. ACN. (mg/L)	Bulanıklık (NTU)	Toplam mono ACN. (mg/L)
0.05	5.7	202.7	6.1	198.7
0.10	11.5	191.6	16.0	184.7
0.20	6.8	201.6	9.3	201.6
0.40	25.0	190.6	21.0	166.3
0.50	30.0	171.5	34.5	164.6
Kazein				
Doz (g/L)	0.2 g/L bentonit ile birlikte		Tek başına	
	Bulanıklık (NTU)	Toplam mono ACN. (mg/L)	Bulanıklık (NTU)	Toplam mono ACN. (mg/L)
0.05	4.4	202.3	4.0	210.0
0.10	3.2	198.7	5.6	210.5
0.20	2.4	199.3	4.6	210.3
0.30	3.0	197.6	2.7	209.7
0.40	2.6	194.0	3.6	203.0
0.50	2.0	195.9	2.2	198.2

*Çizelge’de verilen toplam monomerik ACN miktarları, malvidin-3-glikozit cinsinden hesaplanmıştır.

Bentonit ile beraber kullanılarak ve tek olarak kullanılan durultma yardımcı maddeleri ile durultulmuş örneklerin, toplam monomerik ACN miktarları arasında fark olup olmadığı, her durultma yardımcı maddesi için yapılan istatistik analiz ile ortaya konulmuştur. Bentonit ile ve tek başına kullanılmış durultma yardımcı maddelerinin, toplam monomerik ACN miktarları arasında önemli farklar olduğu görülmüştür ($p<0.01$). Bununla birlikte, üzüm suyu içerisinde bulunan ve durultma ile uzaklaştırılmayan proteinler, üründe daha sonra görülebilecek tortu oluşumu ve bulanma gibi sorunlara neden olabilirler. Bu nedenle, yüksek protein içeriği bilinen üzüm suyunun, durultma işlem basamaklarında, protein stabilizasyonu işleminin, yani bentonit ile de durultulmasının da, yapılması önerilmektedir (Cemeroğlu ve Karadeniz 2009).

Yapılan ön denemeler sonucunda, bulanıklık ve monomerik ACN miktarında görülen azalma göz önünde bulundurularak, bu bölümde verilen tüm durultma yardımcı maddeleri için 0.05 g/L dozu (0.2 g/L bentonit ile birlikte), esas durultma denemesinde tercih edilmiştir.

4.1.3 Üzüm suyunun kitosan ile durultulması

Çalışmamızda kullanılan diğer bir durultma yardımcı maddesi olan kitosan, selülozdan sonra doğada en fazla miktarda bulunan, $\beta(1\rightarrow4)$ bağı içeren bir biyopolimerdir. Durultma işlemi sırasında, pozitif yük içeren kitosan, meyve suyu pH'sında negatif yük içeren polifenollerden üründen uzaklaştırmaktadır. Çizelge 4.3'de görüldüğü gibi, artan doz ile birlikte ürünün NTU düzeyi de artmıştır. Bu biyopolimer, polikasyonik bir yapıda olup, içerdiği birden fazla amin grubu sayesinde güçlü pozitif yük kazanmıştır (Shadidi vd. 1999). Durultma amacıyla yeterli miktarda ürüne eklenen kitosan ile polifenoller birleşerek agregasyona uğramaktadır. Yüksek dozlarda kitosanın neden bulanıklık düzeyini arttırdığına dair literatürde bir veri bulunmamaktadır. Bununla birlikte, yüksek dozlarda eklenen ve ortamdaki uzaklaştırılmayan kitosan moleküllerinin aynı elektriksel yüke sahip olmaları onların üzüm suyu içerisinde bir kolloid olarak davranmasına neden olmuş olabileceği ve ayrıca meyve suyu içerisinde bağlanabilecek yeterli polifenol

bulunmaması nedeniyle de, kitosanın agregat oluşturmadağı düşünölmektedir. Bunların sonucu olarak, artan dozlarda eklenen kitosanın, ürünün bulanmasına neden olduğu düşünölmektedir.

Çizelge 4.3 Kitosan ile yapılan durultma ön deneme sonuçları*

Kitosan				
Doz (g/L)	0.2 g/L bentonit ile birlikte		Tek başına	
	Bulanıklık (NTU)	Toplam mono ACN. (mg/L)	Bulanıklık (NTU)	Toplam mono ACN. (mg/L)
0.05	15.0	201.6	8.7	212.7
0.10	21.0	193.4	36.3	209.6
0.20	15.5	192.1	12.1	208.2
0.40	42.0	176.2	59.0	179.9
0.50	66.0	168.2	158.0	172.4

*Çizelge’de verilen toplam monomerik ACN miktarları, malvidin-3-glikozit cinsinden hesaplanmıştır.

Kitosan ile yapılan ön deneme sonuçlarına göre, tek başına ve bentonit kombinasyonu denemelerinde, en iyi durultmanın 0.05 g/L kitosan dozu ile elde edildiğı ortaya konulmuştur. Bu nedenle, kitosan durultmasında esas durultma denemeleri 0.05 g/L dozu ile gerçekleştirilmiştir.

4.1.4 Durultma sonrası bulanıklık değeri ve fenolik dağılımının bulanıklık üzerine etkisi

Önceki bölümlerde detaylı olarak anlatılan durultma ön deneme sonuçlarına göre, üzüm suyu durultma denemesinde kullanılacak olan esas dozlar, bentonit için 0.2 g/L, diğeri durultma yardımcı maddelerinin (kitosan, kazein ve albumin) hepsi için 0.05 g/L olarak belirlenmiştir. Bu dozlar ile esas durultma denemesi 2 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Durultma işlemi sonrasında üzüm suyunun bulanıklık düzeyindeki değışimler çizelge 4.4’te verilmiştir.

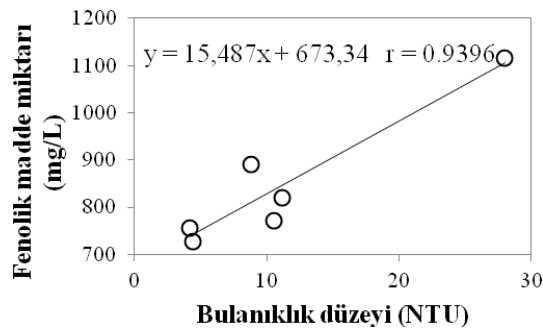
Çizelge 4.4 Durultma işleminin bulanıklık düzeyi üzerine etkisi*

	Kombinasyon	Bulanıklık düzeyi (NTU)
<i>Durultulmamış</i>		
Kontrol	—	28.0±5.66 A**
<i>Durultulmuş</i>		
0.2 g/L Bentonit	—	5.7±0.14 B
0.05 g/L Kitosan	—	11.2±5.45 B
0.2 g/L Bentonit	0.05 g/L Jelatin	8.8±1.70 B
	0.05 g/L Kazein	4.2±1.49 B
	0.05 g/L Albumin	4.4±0.78 B
	0.05 g/L Kitosan	10.5±2.12 B

*Değerler, aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

**Değişik harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir (p<0.01)

Durultma sonucu elde edilen bulanıklık düzeyi verileri, varyans analiz yöntemine göre istatistik olarak değerlendirilmiş ve uygulamalar arasındaki farkın, tesadüften ileri gelmediği, örnekler arasındaki farkın önemli olduğu saptanmıştır (p<0.01, EK 1, Çizelge 19). Bilindiği gibi, üzüm sularında bulanıklık oluşturan temel unsurlar; protein ve polifenollerdir. Şekil 4.1’de de görüldüğü gibi, durultma sonucu ulaşılan bulanıklık düzeyleri ile fenolik madde miktarı arasında yüksek korelasyon (r=0.9396) bulunmaktadır.



Şekil 4.1 Bulanıklık düzeyi ve fenolik madde miktarları arasında görülen doğrusal ilişki

Çizelge 4.4 incelendiğinde, en iyi bulanıklık düzeyine ulaşılan durultma uygulamalarının, “bentonit”, “bentonit+jelatin”, “bentonit+kazein” ve “bentonit+albumin” kombinasyonları olduğu görülmektedir. En yüksek bulanıklık düzeyine ise, “kitosan” ve “bentonit+kitosan” kombinasyonu ile ulaşılmıştır. Örneklerin bulanıklık değerleri arasındaki bu farkın, kullanılan durultma yardımcı maddelerinin farklı fenolik grupları üzerine daha etkili olmasının yanında bunların göstermiş oldukları esterleşme reaksiyonlarının da farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle, “durultma sonucu ulaşılan bulanıklık düzeyi” ile örneklerin içerdiği “bireysel fenoliklerin miktarı” arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla, çalışmamızda örneklerin fenolik madde içerikleri ve dağılımı HPLC yöntemi ile belirlenmiştir (Çizelge 4.5-4.6, Şekil 4.2).

Kalecik Karası üzüm ham sularının toplam fenolik madde miktarı 1117 mg/L’dir. Bu örnekteki başat fenolik maddenin epikateşin olduğu bunu sırasıyla, pirokateşol, ferulik asit, kafeik asit, vanilik asit, kateşin ve klorojenik asidin izlediği ortaya konulmuştur. Diğer üzüm çeşitlerinde olduğu gibi Kalecik Karası üzümlerde de başat olarak bulunan flavan-3-ol’ler kateşin ve epikateşin olarak saptanmıştır (Yılmaz ve Toledo 2004, Iacopini vd. 2008). Bu iki fenolik maddenin bulunma oranları çeşide bağlı olarak değişmektedir. Nitekim Kalecik Karası üzüm suyunda, toplam fenolik madde içeriğinde epikateşin oranı %31 iken, bu oran kateşin için sadece %1’dir. Kalecik Karası üzüm suyu örneklerinde en yüksek miktarda bulunan fenolik asit ise ferulik asittir (213–252 mg/L). Yapılan araştırmalarda, kafeik asidin üzüm suyu içerisinde çoğunlukla tartarik asit ile esterleşmiş yapısı olan kaftarik asit olarak bulunduğu, ferulik asidin ise, daha çok serbest halde bulunduğu ve bu nedenle ürün içerisinde daha yüksek miktarlarda bulunduğu belirlenmiştir (Adams 2006, Rózek vd. 2007).

Durultma yardımcı maddelerinin fenolik dağılımı ve miktarı üzerine etkisi incelendiğinde, durultma sonunda örneklerin içerdiği toplam fenolik madde miktarları ile fenolik dağılımları arasında önemli farklılıklar belirlenmiştir ($p < 0.01$). Beklendiği gibi, en yüksek toplam fenolik madde içeriği “kontrol” grubunda saptanmıştır. Durultma sonunda ise, en yüksek toplam fenolik madde miktarı

“bentonit” ile durultulan örnekte; en düşük değer ise “bentonit+albümin” ile durultulan örnekte belirlenmiştir.

Çizelge 4.5 Farklı durultma yardımcı maddeleri ve kombinasyonları ile durultulan üzüm sularının fenolik madde miktarında* görülen değişim

	Kombinasyon	Fenolik madde miktarı (mg/L)**	Azalma(%)
<i>Durultulmamış</i>			
Kontrol	–	1116.6±14.7 A***	–
<i>Durultulmuş</i>			
0.2 g/L Bentonit	–	1062.0±17.8 AB	5
0.05 g/L Kitosan	–	820.7±72.3 BC	26
0.2 g/L bentonit	0.05 g/L Jelatin	890.9±14.9 ABC	16
	0.05 g/L Kazein	755.0±13.1 C	29
	0.05 g/L Albumin	726.2±26.1 C	32
	0.05 g/L Kitosan	770.5±46.5 BC	27

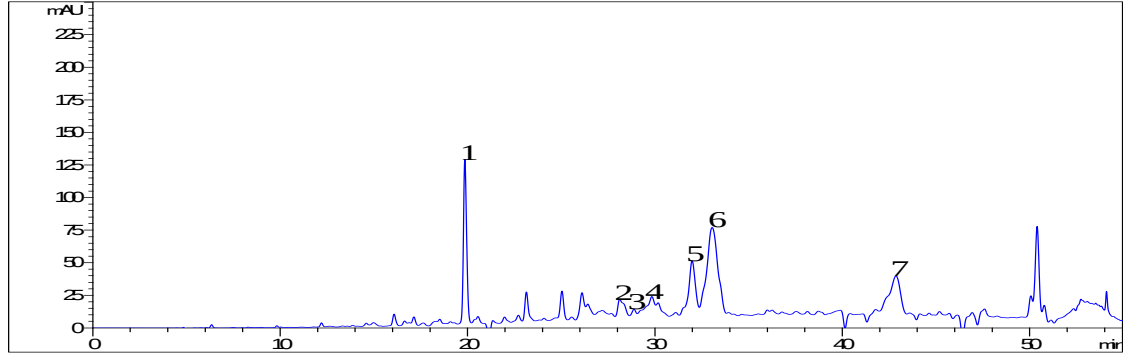
*Değerler, aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

**Çizelge’de verilen fenolik madde miktarı “epikateşin” cinsinden hesaplanmıştır.

***Değişik harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir (p<0.01)

“Bentonit” kullanılarak yapılan durultma sonucunda, toplam fenolik madde miktarında önemli azalma olmamasının nedeni; bentonitin berrak meyve suyu üretiminde esas olarak proteinleri uzaklaştırmasıdır. Ancak, bentonitler bazı polifenoller absorbe edebilirler (Gomez-Plaza vd. 2000). Örneğin, yapılan fenolik dağılım analizi sonunda, bentonitin kafeik asiti yüksek oranda uzaklaştırdığı (%26), ancak diğer fenolikler üzerine etkili olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.6). Bununla birlikte, en düşük toplam fenolik madde miktarı, iki farklı durultma maddesinin bir arada kullanıldığı (“bentonit+kazein”, “bentonit+albumin” ve “bentonit+kitosan”) uygulamalar sonunda belirlenmiştir. Ancak, “bentonit+kitosan” uygulaması ile meydana gelen azalmanın, “bentonit” uygulamasına eşdeğer olduğu yapılan Duncan çoklu karşılaştırma testi sayesinde ortaya konulmuştur. Özetle, fenolik madde miktarında en yüksek azalmaya, %29 ve 32 oranları ile “bentonit+kazein” ve

“bentonit+albumin” uygulamaları neden olmuştur. Ayrıca, en düşük bulanık düzeyleri de yine bu örneklerle aittir (4.2–4.4 NTU).



Şekil 4.2 Üzüm suyundaki fenolik maddelerin HPLC kromatogramı

1.Pirokateşol, 2. Kateşin, 3. Klorojenik asit, 4. Vanilik asit,
5. Kafeik asit, 6. Epikateşin 7. Ferulik asit

“Bentonit+kazein” ve “bentonit+albumin” kullanılarak yapılan durultmanın fenolik dağılımı üzerine etkisi incelendiğinde ise; kazeinin en çok (%51) kateşin üzerine etki ettiği görülmektedir (Çizelge 4.6). Bu durum; “prolyl” ünitesi oranı %20 olan kazeinin durultmada polifenolleri etkin bir şekilde uzaklaştırmasından kaynaklanabilir.

Bilindiği gibi, çalışmamızda bentonit ile birlikte kullanılan “kazein” ve “albümin” protein yapısındadır. Yapılan çalışmalarda, protein-polifenol interaksiyonun iki faktöre bağlı olduğu belirtilmektedir. Bunlar;

- 1)“Binding affinity” olarak adlandırılan ve hidrojen bağı yardımıyla gerçekleşen bağ yapma kapasitesinin yüksekliği,
- 2) Bu bileşiklerin içerdiği hidrofobik yapıların oranıdır.

Protein kaynaklı durultma yardımcı maddelerinin “prolyl” ünite oranı arttıkça, yani prolin oranı arttıkça, proteinlerin hidrobik özelliklerinin de arttığı ve flavan-3-ol’lerin (kateşin, epikateşin) hidrofobik üniteleri ile daha kolay etkileşime girdiği saptanmıştır (He vd. 2006). Bununla birlikte, “prolyl” ünite oranı sadece %4 olmasına rağmen albuminde meyve suyu bulanıklığının önemli düzeyde azalmasına neden olmuştur (4.2 NTU). Bunun nedeni, bu durultma yardımcı maddesinin etki mekanizmasının, hidrofobik etkileşimden çok, hidrojen bağı uygunluğuna bağlı

olmasıdır (He vd. 2006). Yapılan fenolik dağılım analizi sonucunda, albuminin %54, 48 ve 36 düzeyinde kateşin, klorojenik asit ve epikateşini etkin bir şekilde uzaklaştırdığı belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

Protein bazlı diğer bir durultma yardımcı maddesi olan jelatinin “prolyl” ünitesi oranı ise %16.8’dir. Buna rağmen; jelatin, durultma işlemi sonrasında üzüm sularının fenolik madde içeriğinde, kazein ve albumine göre daha düşük seviyede (%16) azalmaya neden olmuştur. Yapılan araştırmalarda, “haze aktif” özelliğe sahip olan polifenollerin, proteinler ile interaksiyona girmesinin bazı koşullara bağlı olduğu gözlemlenmiştir. Örneğin, bir protein olan ve haze-aktif özellikteki prolini yüksek oranda içeren jelatin ile epigallokateşinin interaksiyona girmediği; epigallokateşin gallat’ın ise, jelatin ile güçlü bağ oluşturduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, jelatinin polifenoller ile kompleks oluşturması için polifenollerin molekül ağırlığının 500 Da’dan büyük olması gerekmektedir (Turfan vd. 2011). Yapılan bir çalışmada, yumurta albumini, monomer flavan-3-ol’lerden kateşin ve epikateşin (290 Da) miktarında sırasıyla, %72 ve 73 oranında azalmaya neden olurken, bu değerlerin jelatin için, %0 ve 3 olduğu belirlenmiştir (Balık vd. 2007).

Protein yapısındaki durultma yardımcı maddelerinden (kazein, albumin ve jelatin) farklı olarak, kitosan uygulamaları ile ulaşılan bulanıklık düzeyleri ise, çok daha yüksektir (Çizelge 4.4). Bir polisakkarit olan kitosan, pozitif yükü ile, iyonik bağ ve bunun yanında hidrojen köprüsü yardımıyla polifenollere etki etmektedir (Kurtbay vd. 2008, Quintela vd. 2012). Gallik asit ve türevlerinden meydana gelen gallotanenin, protein, fosfolipit ve şeker gibi gıda bileşenleri ile oluşturdukları komplekslerin hangi faktörlere bağlı olduğunu belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, “gallotanenin ile polisakkaritlerin bağlanma kapasitesi”nin, “gallotanenin ile proteinlerin bağlanma kapasitesi”nden daha düşük seviyede olduğu saptanmıştır (He vd. 2006). Buna ek olarak, bulanıklık açısından önemli olan ve gallik asit ve türevlerinin oluşturduğu, hidrolize olabilen tanenlerin, galloyl esterleri arttıkça proteinlerle bağlanma kapasitenin arttığı belirtilmektedir (Poncet-Legrand vd. 2006). Bunun nedeni, galloyl esterleri artan polifenollerin çözünürlüklerinin düşmesi sonucu hidrofobik yapı oluşturması ve bunun sonucu olarak proteinlerin

alifatik grubunda bulunan hidrofobik yapılar ile daha iyi bağ yapabilmesi olarak açıklanmaktadır (He vd. 2006). Ancak hidrofobik özelliği artan bu polifenollerin, hidrofil niteliği olan polisakkaritler ile, dolayısıyla kitosan ile, bağlanma kapasitesi de aynı şekilde azalmaktadır. Çalışmamızda yapılan fenolik dağılım analizi sonucuna göre, hidrofilik yapıdaki kitosan durultma yardımcı maddesi, hidrofobik yapı içeren kateşin, epikateşin gibi (Adams 2006) fenolikleri az miktarda uzaklaştırabilirken, bir sinamik asit olan kafeik asidi yüksek oranda uzaklaştırmıştır (%43) (Çizelge 4.6).

4.2 Üzüm Suyu Antosiyanin İçeriklerinin HPLC Yöntemiyle Belirlenmesinde Kullanılan Standart Eğriler

Üzüm suyunda HPLC yöntemi ile ACN miktarlarının tayininde yapılacak hesaplamalar için gerekli olan malvidin-3-glikozit (mv-3-glu), peonidin-3-glikozit (pn-3-glu), delfinidin-3-glikozit (dp-3-glu), siyanidin-3-glikozit (cy-3-glu) ve siyanidin-3,5-diglikozit (cy-3,5-diglu) standart eğrileri hazırlanmış ve bu eğriler sırasıyla Şekil 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 ve 4.7’te verilmiştir. Standart eğrilerin oluşturulmasında analizlerde elde edilen verilere doğrusal regresyon analizi uygulanmış ve bu eğrileri tanımlayan eşitlikler belirlenmiştir. Bu eşitlikler yardımı ile üzüm suyunda bulunan ACN’in miktarı hesaplanmıştır.

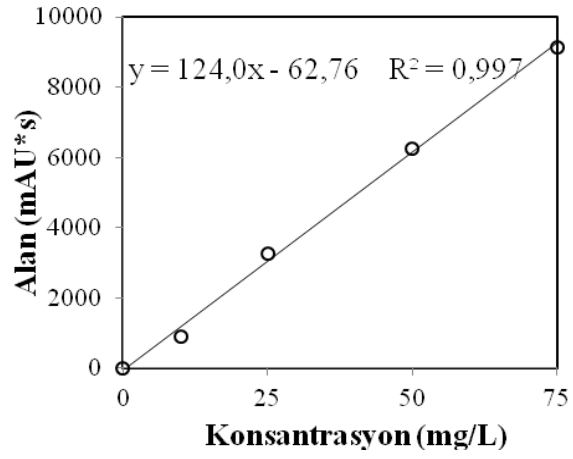
4.3 Durultmanın Üzüm Suyu Renk Özellikleri Üzerine Etkisi

Durultma işleminin üzüm suyu rengi üzerine etkisini incelemek amacıyla, toplam monomerik ACN tayini, ACN dağılım analizi (HPLC yöntemi ile) polimerik renk ile reflektans renk analizleri, durultma işlemi yapılmamış kontrol örneğinde ve her durultma işleminden sonra durultulmuş örneklerde yapılmıştır. Analiz sonuçlarını takip eden bölümde, başlıklar halinde verilmiştir.

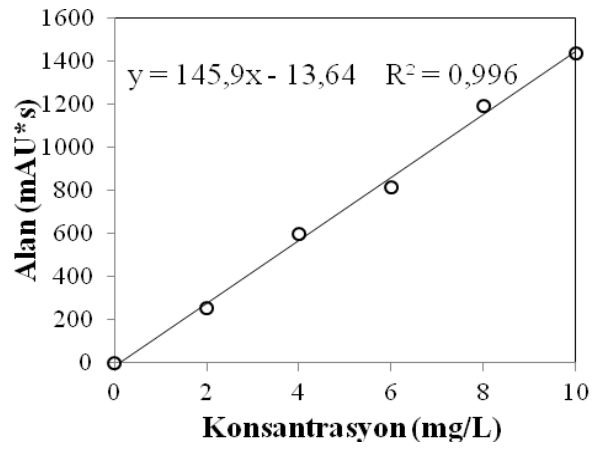
Çizelge 4.6 Farklı durultma yardımcı maddeleri ve kombinasyonları ile durultulan üzüm suyunun farklı fenoliklerinin miktarlarında görülen değişim*

		Fenolik madde miktarı (mg/L)					
	Kombinasyon	Epikateşin	Kateşol	Kateşin	Ferulik asit	Kafeik asit	Klorojenik asit
<i>Durultulmamış</i>							
Kontrol	–	350.8±39.1	164.4± 6.6	49.5± 0.7	252.4± 8.1	155.4±54.1	71.0± 0.5
<i>Durultulmuş</i>							
0.2 g/L Bentonit	–	358.6± 8.2	149.0± 3.5	46.4± 0.5	265.9± 6.0	114.6± 3.5	66.8± 2.0
0.05 g/L Kitosan	–	283.9± 9.4	140.5±43.0	34.9±15.0	223.3±25.1	88.3±27.9	46.9± 6.8
0.2 g/L Bentonit	0.05 g/L Jelatin	302.1± 8.5	147.7± 5.1	34.5±15.7	246.2±32.6	95.7±30.5	52.5±10.5
	0.05 g/L Kazein	230.8± 7.0	139.4±27.1	22.9± 2.5	213.4± 9.6	72.6± 1.6	37.3± 1.2
	0.05 g/L Albumin	231.0± 2.9	142.8±15.2	21.3± 1.9	217.2± 4.2	70.5± 0.7	34.8± 1.3
	0.05 g/L Kitosan	278.4± 8.5	149.3± 3.6	34.4±16.7	229.3±36.1	91.4±32.0	48.2±10.7

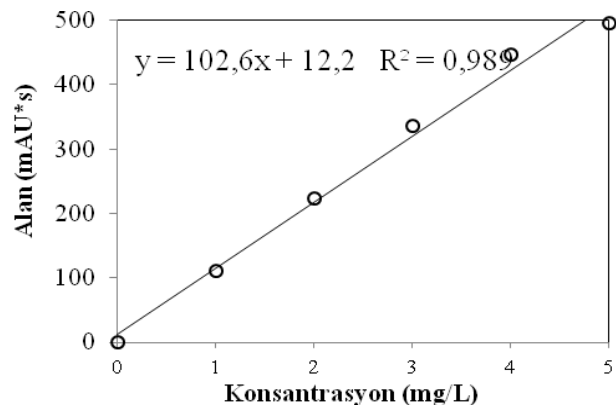
*Değerler, aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir.



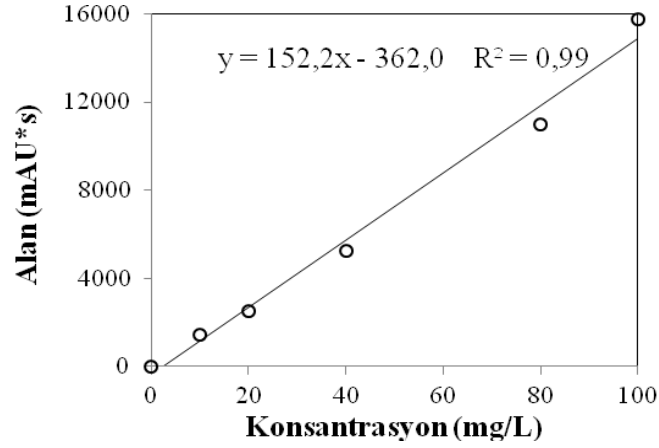
Şekil 4.3 Malvidin-3-glikozit standart eğrisi



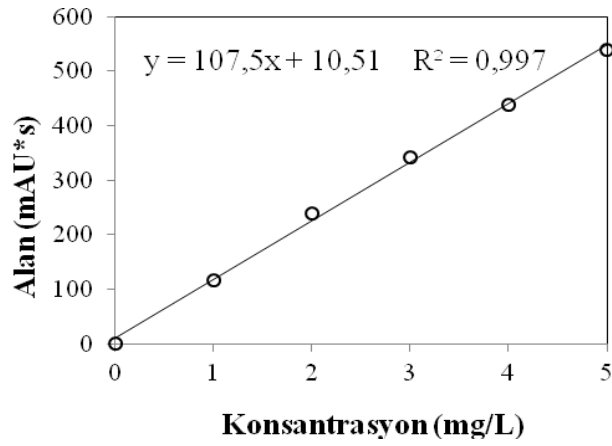
Şekil 4.4 Peonidin-3-glikozit standart eğrisi



Şekil 4.5 Delphinidin-3-glikozit standart eğrisi



Şekil 4.6 Siyanidin-3-glikozit standart eğrisi



Şekil 4.7 Siyanidin-3,5-diglikozit standart eğrisi

4.3.1 Toplam monomerik antosiyanin miktarları

Durultulmamış (kontrol) ve durultma yardımcı maddeleri ile berraklaştırılmış örneklerin toplam monomerik ACN tayini sonuçları çizelge 4.7'te verilmektedir.

Toplam monomerik ACN tayin sonuçları, varyans analiz yöntemi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve bu değerlendirme sonucunda, üzüm suyu örnekleri arasındaki farkın tesadüften ileri gelmediği, bu farkın önemli düzeyde olduğu belirlenmiştir ($p < 0.01$, EK 1, Çizelge 1). Daha sonra, yapılan Duncan çoklu karşılaştırma testi ile, tüm örneklerin kontrol örneklerinden farklı olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.7 Farklı durultma yardımcı maddeleri ve kombinasyonları ile durultulan üzüm suyunun toplam monomerik ACN miktarları*

Kombinasyon		Toplam monomerik ACN (mg/L)**	
<i>Durultulmamış</i>			
Kontrol	—	233±3.75	A***
<i>Durultulmuş</i>			
0.2 g/L Bentonit	—	220±0.14	BC
0.05 g/L Kitosan	—	205±1.70	E
0.2 g/L bentonit	0.05 g/L Jelatin	219±2.69	BC
	0.05 g/L Kazein	223±0.14	B
	0.05 g/L Albumin	215±0.21	CD
	0.05 g/L Kitosan	208±1.48	DE

*Değerler, aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

**Toplam monomerik ACN miktarları, mv-3-glu cinsinden hesaplanmıştır.

***Değişik harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir (p<0.01).

Bentonit ile durultma işleminden sonra, ACN miktarı %6 oranında azalmıştır. Bentonit, durultmada proteinleri adsorbe etme özelliğinden dolayı, meyve suları veya şarap gibi alkollü içeceklerde protein stabilizasyonu için kullanılmaktadır. Ancak, bunun yanında bentonit, aynı zamanda elektrostatik yük taşıması nedeniyle de önemlidir. Bilindiği üzere, bentonit negatif yüklü olup, bu özelliği nedeni ile, “bluefining” olarak da bilinen yöntemle, demir ve bakır gibi metalleri uzaklaştırmak için kullanılabilen bir durultma yardımcı maddesidir. Bu olumlu etkilerinden farklı olarak, bentonit, aynı zamanda pozitif yüklü ACN’lerle, negatif yükleri sayesinde, interaksiyona girip, ACN’lerin ortamdan uzaklaşmasına neden olabilmektedirler (Gómez-Plaza vd. 2000, Ribéreau-Gayon vd. 2006c). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ile paralel olarak, Pinot-Noir üzüm çeşidinden üretilmiş, 6 ay olgunlaştırılmış kırmızı şarapların, 0.3, 0.6 ve 1 g/L dozlarında bentonit ile durultulması sonucunda, toplam ACN miktarında %14–23 düzeyinde azalma gözlemlenmiştir (Stankovic vd. 2012).

Sadece kitosan kullanılarak durultulan üzüm sularında, toplam monomerik ACN miktarında, çalışmamızda görülen en yüksek azalma (%12) belirlenmiştir. Son yıllarda yapılan çeşitli araştırmalarda, kitosanın, güçlü pozitif yük taşıdığı, asit bağlayıcı özellikte ve kolloidal-dispers partiküllerin uzaklaştırılmasında etkili olduğu görülmüştür. Kitosanın, sıvılardaki katı partikülleri sararak çöktürebilme niteliğine sahip olması, meyve sularında, etkili bir durultma yardımcı maddesi olarak kullanılabileceğini göstermiştir (No vd. 2007). Üzüm suyunun kitosan ile durultulması sonucunda, berrak (11 NTU) bir meyve suyu elde edilmiştir. Ancak çalışmamızda kullanılan diğer durultma yardımcı maddelerine göre, kitosanın ACN'ler üzerine olumsuz etkisi daha fazla olmuştur. Kitosanın, çeşitli etki mekanizmaları bulunmaktadır. Bunların başında içerdiği pozitif yük sayesinde, negatif yüklü bileşiklere iyonik bağ ile bağlanarak etki etmesidir. Ancak, bunun yanında kitosanın, hidrojen köprüsü (bağı) veya Van-der waals bağı yardımıyla bileşikler adsorbe etme yeteneği de bulunmaktadır (Kurtbay vd. 2008, Quintela vd. 2012). Bu duruma örnek olarak, protein gibi pozitif yüklü bileşiklerin, kitosan ile durultma işleminden sonra azalması verilebilir. Laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada, nar suları 0.5 g/L kitosan ile soğuk durultma tekniği kullanılarak berraklaştırılmış ve bu işlem sonucunda monomerik ACN miktarında %12 oranında azalma saptanmıştır (Koç 2013).

Jelatin, kazein, albumin ve kitosanın, ACN miktarı üzerine etkisi belirlenirken, bu durultma yardımcı maddeleri bentonit ile birlikte kullanıldığı için, kontrol olarak, sadece bentonit ile durultulan üzüm suyu dikkate alınmıştır. Buna göre, uygulamalar sonucunda, kazein ve jelatin ile durultulan örneklerin ACN miktarı ile bentonit örneği arasındaki fark gözlemlenmemiştir. Albumin ise, ACN miktarında %2 düzeyinde bir azalmaya neden olsa da, bu farkın kontrol örneğine eşdeğer olduğu belirlenmiştir ($p>0.01$). Buna karşın, “bentonit+kitosan” kombinasyonu ile bentonit örneği arasında görülen farkın (%10.5) tesadüfen ileri gelmediği, bu farkın istatistiksel olarak önemli derecede olduğu bulunmuştur ($p<0.01$).

Fang vd. (2007) yaptıkları çalışmada, bayberry meyve suyu rengi ve fenolik madde içeriği üzerine, durultma işleminin etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada, “ksantan

(0.3 g/L)+kitosan (0.1 g/L)” kombinasyonları ile durultulan bayberry sularında, toplam monomerik ACN miktarının %11 oranında azaldığı gözlemlenmiştir.

4.3.2 Antosiyanin dağılım ve miktar analiz sonuçları

Durultma yardımcı maddelerinin ACN’ler üzerine olan etkilerini incelemek amacıyla, toplam monomerik ACN miktarı yanında, HPLC yöntemi ile de ACN analizi yapılmıştır. Üzüm suyunda hakim olan ACN malvidin-3-glikozit olmasından dolayı, kromatogramlarda elde edilen piklerin alanları toplanarak, “toplam ACN miktarı” “mv-3-glu” olarak hesaplanmıştır. Çizelge 4.8’de toplam ACN miktarı verilirken, çizelge 4.9’de ise, üzüm suyundaki 5 farklı ACN miktarı ile farklı durultma yardımcı maddeleri ile yapılan durultma sonucunda bu ACN’lerdeki değişimler verilmektedir.

Durultulmuş üzüm suyu örneklerinin toplam ACN miktarı için yapılan varyans analizler sonuçlarına göre, durultma yardımcı maddelerinin arasındaki farkın, istatistik olarak önemli düzeyde olduğu saptanmıştır ($p<0.01$, EK 1, Çizelge 3). Bu nedenle; elde edilen verilere Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmış ve kontrol örneği ile bentonit arasında görülen farkın önemli düzeyde olmadığı, buna karşın kitosan ile durultulan örnek ile kontrol örneklerinin birbirlerinden önemli seviyede farklı olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.8). Bunun yanında, bentonit ile durultulan örnek ile, “bentonit+kazein” ve “bentonit+albumin” kombinasyonları ile durultulan örnekler arasında fark bulunmazken, “bentonit+jelatin” ve “bentonit+kitosan” kombinasyonları ile durultulan örnekler arasındaki farkın önemli olduğu görülmüştür.

Jelatin, meyve suyu ve şarap gibi alkollü içeceklerde, bulanıklığa neden olan polifenoller uzaklaştırmak için kullanılmaktadır. Daha öncede değinildiği üzere, jelatin yüksek moleküllü polifenollere etkili olup, özellikle polifenollerin polimerizasyon etkisi arttıkça, jelatinle interaksiyona girerek uzaklaşma olasılığı da artmaktadır (Cemeroğlu ve Karadeniz 2009). Jelatin, meyve suyu pH aralığında pozitif yüklü olup, negatif yüklü polifenollerle, iyonik bağ yardımıyla etkileşime

girmekte ve flok oluşturmaktadır. Oluşan bu floklar büyüdükçe, yer çekimi ile çökelmektedir. İşte oluşan bu floklar sürüklenirken, bir kısım ACN’i de beraberlerinde sürükleyerek, ortamdan uzaklaşmasını sağlamaktadır. Floklar büyüdükçe, sürüklenen ACN miktarı, yani kayba uğrayan ACN miktarı da artmaktadır (Turfan vd. 2011, Türkyılmaz vd. 2012). Kısaca jelatin, ACN’lere doğrudan olmasa da, dolaylı olarak etki etmektedir.

Çalışmamızda, “bentonit+jelatin” kombinasyonu ile durultulan üzüm sularının ACN miktarında, sadece bentonit ile durultulan örneğe göre, %20 oranında daha fazla azalma meydana gelmiştir. Buna karşın, bentonitin, kazein ve albumin ile olan kombinasyonunda bu düzeyde (%0.067–0.12) bir azalma gözlemlenmemiştir. Bunun nedeni, jelatinin oluşturduğu flokların, diğer protein bazlı durultma yardımcı maddelerine göre daha büyük olması olarak düşünülmektedir. Nitekim üzüm suyunda bulunan polifenollerin, özellikle flavan-3-ol’lerin, büyük kısmı polimerik yapıda olup (Fuleki vd. 2003, Monagas vd. 2003, Harbertson vd. 2003), jelatinle güçlü bir interaksiyona girerek, büyük floklar oluşturabilmektedir (Poncet- Legrand vd. 2006).

Turfan vd. (2011), iki farklı proses ile üretilen nar suyunun (danelenmiş narın preslenmesi ve bütün meyvenin preslenmesi ile), ACN içeriklerinin, üretim prosesinden nasıl etkilendiğini, HPLC yöntemi ile yaptıkları ACN analizi ile ortaya koymuşlardır. Çalışmada, durultma aşamasında nar suları, 0.4 g/L (daneden üretilen meyve suyu), 2 g/L (bütün meyveden üretilen meyve suyu) dozlarında jelatin ile berraklaştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda durultma işleminin, danelenmiş nar suyunun ACN miktarında %4 düzeyinde azalmaya neden olduğu, buna karşı bütün meyveden üretilmiş meyve suyunda ACN kaybının %19 düzeyine ulaştığı saptanmıştır. Kabukları ile preslenerek üretilen nar suyunun polifenol içeriği, diğer nar suyuna göre yüksek olup, aynı zamanda bu meyve suyunun içerdiği fenolik bileşiklerin molekül ağırlığı da aynı şekilde yüksektir. Bu nedenle, bütün meyveden üretilen meyve suyunun durultmasında jelatin, daha büyük floklar oluşturmuş ve bunun sonucunda da daha yüksek miktarda ACN’in sürüklenmesine neden olmuştur (Turfan vd. 2011).

Durultmada kullanılan jelatin kombinasyonu, ACN miktarında yüksek düzeyde azalmaya neden olurken, albumin ve kazein durultma yardımcı maddelerinin etki mekanizması, jelatin ile aynı olmasına rağmen, albumin ve kazein bu düzeyde azalmaya neden olmamıştır. Yapılan çalışmalarda albuminin, yüksek düzeyde polimerize olmuş tanenler üzerine etkili olduğu belirlenmiştir (Sarni-Machado vd. 1999, Ribéreau-Gayon vd. 2006c). Ancak son yıllarda yapılan araştırmalarda, albuminin aynı zamanda, flavan-3-ol'lerin monomerlerinden olan kateşin ve de epikateşin ile de güçlü interaksyonlar gerçekleştirdiği görülmüştür.

Çizelge 4.8 Farklı durultma yardımcı maddeleri ve kombinasyonları ile durultulan üzüm suyunun ACN miktarları*

Kombinasyon		ACN miktarı (mg/L)
<i>Durultulmamış</i>		
Kontrol	–	357±1.91 A**
<i>Durultulmuş</i>		
0.2 g/L Bentonit	–	332±19.7 AB
0.05 g/L Kitosan	–	240±3.32 C
0.2 g/L bentonit	0.05 g/L Jelatin	267±7.28 C
	0.05 g/L Kazein	333±1.13 AB
	0.05 g/L Albumin	314±1.34 B
	0.05 g/L Kitosan	247±4.81 C

*Değerler, aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

**Değişik harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir (p<0.01).

Çizelge 4.9 Farklı durultma yardımcı maddeleri ve kombinasyonları ile durultulan üzüm suyunun farklı ACN miktarlarında görülen değişim*

		ACN miktarı (mg/L)				
	Kombinasyon	Mv-3-glu	Pn-3-glu	Dp-3-glu	Cy-3-glu	Cy-3,5-diglu
<i>Durultulmamış</i>						
Kontrol	–	151.95 A**	31.3 A	14.3 A	20.5 A	2
<i>Durultulmuş</i>						
0.2 g/L Bentonit	–	141.45B	29.2 B	13.3 A	19.6 AB	1.9
0.05 g/L Kitosan	–	104.67C	21 C	7.9C	17.5 C	1.45
0.2 g/L bentonit	0.05 g/L Jelatin	110.35 C	22.3 C	10.1 B	17.8 C	1.8
	0.05 g/L Kazein	142.55 B	28.9 B	13.6 A	19.5 AB	1.9
	0.05 g/L Albumin	137 B	28.1 B	10.9 B	19.3 B	2.1
	0.05 g/L Kitosan	107.15 C	21.9 C	8.2 C	17.6 C	1.7

*Değerler, aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

**Değişik harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark, önemlidir (p<0.01).

Puškaš ve Miljić (2012) yaptıkları çalışmada, şarap üretim tekniğinin, Cabernet Sauvignon kırmızı şarabının, fenolik madde ve renk içeriklerine olan etkilerini incelemişlerdir. Araştırmada, durultma işlemi 0.2 g/L albumin ve 0.2 g/L jelatin ile gerçekleştirilmiştir. Araştırma sonunda, albumin, flavan-3-ol’lerde %56 azalmaya neden olurken, kateşin miktarında %28, epikateşin miktarında ise, %30 düzeyinde azalma görülmüştür. Bunun yanında, albumin ile durultmada ACN miktarında %11 düzeyinde azalma meydana gelmiştir. Jelatin ise, ACN miktarında %30 düzeyinde azalmaya neden olmuştur. Bu araştırma sonucunda, jelatinin, albuminin oluşturduğu floktan daha büyük floklar oluşturarak daha fazla ACN sürüklediği iddia edilmiştir.

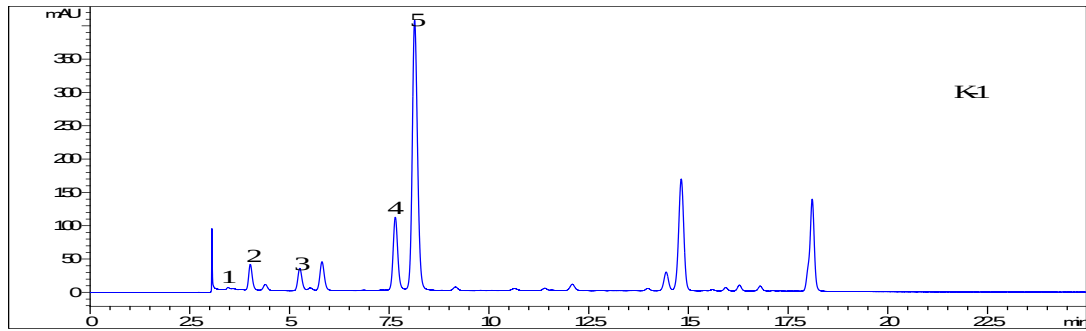
Yapılan başka bir çalışmada ise, yumurta albumini, kateşin ve epikateşin miktarında sırasıyla, %72 ve 73 oranında azalmaya neden olurken, bu değerler jelatin için, %0 ve 3 olduğu belirlenmiştir (Balík vd. 2007). Bu araştırma sonuçlarına göre, jelatin yüksek molekül ağırlıklı polifenollere bağlanabilirken, albumin molekül ağırlığı az, monomer yapıdaki polifenollere bağlanarak, daha küçük floklar oluşturduğu sonucu çıkarılmaktadır. Albumin gibi protein bazlı olan kazeinin de ACN’lerde azalma meydana getirmemesinin nedeni olarak, aynı şekilde oluşturduğu flok boyutlarının küçük olması olduğu düşünülmüştür.

Çalışmamızda sadece kitosan ile durultulan örnekteki ACN miktarında durultma işlemi yapılmamış kontrol örneğine göre %38 oranında azalma görülürken, “bentonit+kitosan” kombinasyonunda, bentonit örneğine göre, %26 oranında azalma meydana gelmiştir. Laboratuvarımızda yapılan, nar sularının fiziksel ve kimyasal özellikleri üzerine durultma işleminin etkisinin incelendiği bir çalışmada, nar suları, soğuk durultma tekniği uygulanarak, 0.5 g/L dozunda kitosan ile berraklaştırılmıştır. Kitosan ile durultulan nar sularında, HPLC yöntemi ile belirlenen ACN miktarında, başlangıç örneğine göre, %15 oranında azalma saptanmıştır (Koç 2013).

Aşağıda verilen şekil 4.8’te üzüm suyuna ait ACN dağılım kromatogramı verilmiştir. Kromatogramda verilen piklerden 5 tanesi, ticari olarak üretilen standart maddeler yardımıyla tanımlanmıştır. Şekil 4.8’de belirlenmiş olan ACN pikleri sırasıyla; cy-3,5-diglu, cy-3-glu, dp-3-glu, pn-3-glu ve mv-3-glu olduğu belirlenmiştir.

Tanımlanmayan diğer piklerin ise, pt-3-glu ve üzümde bulunan tüm bu ACN'lerin *p*-kumarik ve kafeik asitle açılmış formları olabileceği düşünülmektedir (Garía-Beneytez vd. 2003).

Durultulmuş üzüm suyu örneklerinin çeşitli ACN miktarları için yapılan varyans analizler sonuçlarına göre, durultma yardımcı maddelerinin arasındaki farkın, istatistik olarak önemli düzeyde olduğu saptanmıştır ($p < 0.01$, EK 1, Çizelge 5, 6, 7, 8). Bu nedenle; elde edilen verilere Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmış ve örnekler arasında, sadece kitosan ve bentonitin kontrol örneğinden farklı olduğu görülmüştür. Ayrıca, kitosan ve jelatinin, bentonit ile olan kombinasyonu, bentonit örneğinden farklı iken, diğer kombinasyon örneklerinde fark görülmemiştir. (Çizelge 4.9).



Şekil 4.8 Üzüm suyundaki ACN'lerin HPLC kromatogramı (520 nm)

1.Cy-3,5-diglu, 2. Cy-3-glu, 3. Dp-3-glu, 4. Pn-3-glu, 5. Mv-3-glu

Sadece bentonit kullanılarak yapılan durultma sonucunda; mv-, pn- ve dp-3-glu miktarlarında %7–8 oranında azalma saptanırken, sadece kitosan ile durultulan örneklerde, bu ACN'lerde yaklaşık %30–45 oranında azalma saptanmıştır. Bentonit kombinasyonları ile durultulan örneklerden jelatin ve kitosan; mv-, pn- ve dp-3-glu miktarında önemli seviyede azalmaya neden olmuştur. “Bentonit+kitosan” kombinasyonu, bu ACN'lerde sırasıyla, %24, 25 ve 39 oranında azalma meydana getirmiştir. Jelatin ile durultmada ise, mv-, pn- ve dp-3-glu miktarında ortalama %23 oranında azalma görülmüştür. Bunun yanında “bentonit+albumin” kombinasyonu, dp-3-glu’i yüksek oranda (%18) uzaklaştırmıştır.

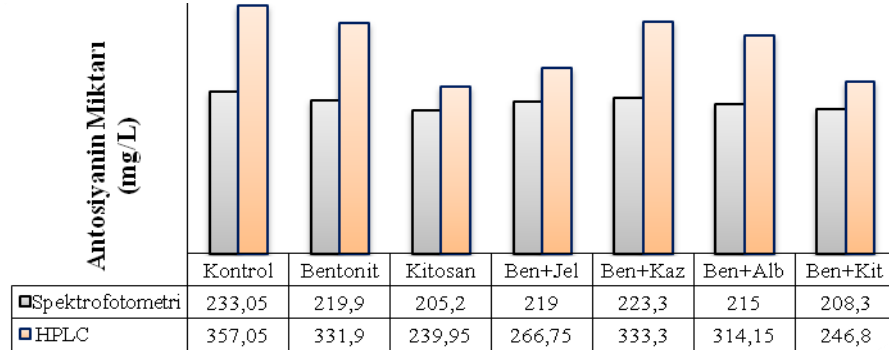
Toplam ACN miktarında mv-3-glu, yaklaşık olarak %57 oranında paya sahiptir. Mv-3-glu'ı, %10 oranında pay ile pn-3-glu takip etmektedir. Kırmızı üzümlerde yapılan çalışmalarda benzer sonuçlar bulunmuştur. Bu çalışmalarda kırmızı üzümün başat ACN'in mv-3-glu (%60–67) olduğu belirtilirken, bunu pn-3-glu'nın (%9–10) izlediği ve pn-3-glu'nın kırmızı üzümde bulunan ikinci önemli ACN olduğu ortaya konulmuştur (Castillo- Sánchez vd. 2008).

4.3.3 Spektrofotometrik ve HPLC yöntemleri ile yapılan toplam monomerik antosiyanin analizlerinin karşılaştırılması

Çalışmamızda, durultmanın ACN'ler üzerine etkisini belirlemek amacıyla, iki farklı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemler, spektrofotometrik (pH-differansiyel) ve HPLC yöntemleridir. pH-differansiyel yöntemi; basit, hızlı ve de aynı zamanda duyarlı bir yöntem olarak tanımlanmaktadır. HPLC yönteminde ise, ters faz Kromatografi ile, PDA dedektör sayesinde, ACN'ler, polarite farklarından yararlanarak, bireysel olarak ayrılabilmekte ve standartlar yardımıyla her bir ACN ayrı ayrı tanımlanabilmektedir (Lee vd. 2008).

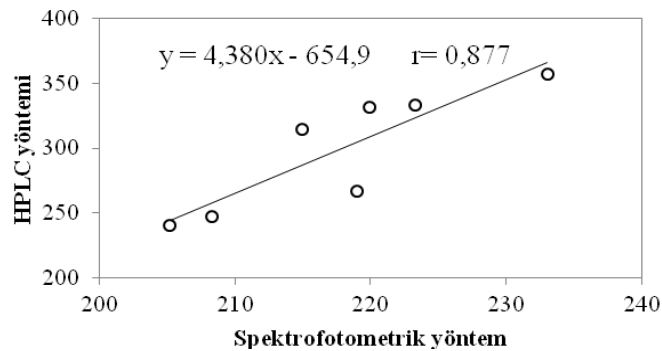
Birçok araştırmacı daha yüksek ACN miktarı elde edilmesi nedeniyle, HPLC yöntemini daha kesin ve güvenilir bulmaktadır (Sánchez-Moreno vd. 2003, Wu vd. 2006). Çalışmamızda da, iki yöntem arasında yüksek fark bulunmuş olup, HPLC yöntemi ile daha fazla ACN miktarı hesaplanmıştır (Şekil 4.9). Nitekim kontrol örneği ile kıyaslandığında, iki yöntem arasında %35'lik bir fark görülmektedir.

Lee vd. (2008), yaptıkları çalışmada, bu iki yöntemi karşılaştırmak için, ticari olarak üretilen çeşitli kırmızı meyve sularında (nar, yabanmersini, üzüm suyu vb.) toplam monomerik ACN miktarlarını belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda, HPLC yöntemi ile analiz edilen örneklerin ACN miktarlarının çok daha yüksek olduğu gözlemlenirken, üzüm sularında iki yöntem arasında, %78 oranında fark bulunmuştur. İki yöntem arasındaki farkın, yöntemlerde kullanılan çözgenlerin farklı olmasından kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Lee vd. 2002, Lee ve Finn 2007).



Şekil 4.9 Farklı yöntemlerle durultulan üzüm sularındaki antosiyeninlerin spektrofotometrik ve HPLC yöntemleri ile hesaplanan miktarları

Şekil 4.10’de, iki yöntem arasındaki korelasyon grafiği verilmiştir. Bilindiği gibi, korelasyon, iki değişken arasındaki doğrusal ilişkinin yönünü ve gücünü belirtir ve +1 ile -1 arasında değişir. İncelenen iki değişken arasında bulunan korelasyon katsayısı (r) 0.5–1 arasında ise, bu durum, iki değişken arasında yüksek korelasyon olduğunu gösterir. Buna göre, araştırmamızda ACN’leri belirlemek için kullandığımız iki yöntem arasında yüksek korelasyon olduğu görülmektedir ($r=0.877$). Benzer olarak, bu iki yöntemi karşılaştırmak için yapılan bir çalışmada, kırmızı üzüm suyu kullanılmış ve iki yöntem arasındaki “ r ” değerinin 0.948 olduğu belirlenmiştir (Lee vd. 2008). Amerika kökenli “elderberry” ve Avrupa kökenli “elderberry” meyvelerinin içerdikleri ACN’lerin incelendiği bir çalışmada, ACN analizi spektrofotometrik pH-differansiyel ve HPLC yöntemi ile gerçekleştirilmiş ve bu iki yöntem arasındaki “ r ” değerinin, 0.98 olduğu belirtilmiştir (Lee ve Finn 2007).



Şekil 4.10 Spektrofotometrik ve HPLC yöntemleri ile belirlenen ACN miktarları arasındaki doğrusal ilişki

4.3.4 Polimerik renk değerleri

Kontrol örnekleri ve durultulmuş üzüm sularında, polimerik renk ve polimerik renk oranları belirlenmiş ve sonuçlar, Çizelge 4.10’da verilmiştir.

Çizelge 4.10 Farklı durultma yardımcı maddeleri ve kombinasyonları ile durultulan üzüm suyunun polimerik renk değeri ve oranı *

Kombinasyon		Polimerik renk (Abs)	Polimerik renk oranı (%)
<i>Durultulmamış</i>			
Kontrol	–	1.29±0.02	30±0.71AB**
<i>Durultulmuş</i>			
0.2 g/L Bentonit	–	1.28±0.1	30±0.64AB
0.05 g/L Kitosan	–	1.32±0.03	31±0.14A
0.2 g/L bentonit	0.05 g/L Jelatin	1.21±0.04	28±0.7 B
	0.05 g/L Kazein	1.22±0.03	30±0.35 AB
	0.05 g/L Albumin	1.38±0.02	31±0 A
	0.05 g/L Kitosan	1.31±0.03	31±0 A

*Değerler, aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

**Değişik harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark, önemlidir (p<0.01).

Durultulmuş üzüm suyu örneklerinin polimerik renk ve polimerik renk oranı değerleri için yapılan varyans analizleri sonuçlarına göre, polimerik renk açısından durultma yardımcı maddelerinin arasında görülen farkın kontrol örneğine eşdeğer olduğu saptanırken (p>0.01), polimerik renk oranı değerleri arasındaki farkın istatistik olarak önemli düzeyde olduğu tespit edilmiştir (p<0.01, EK 1, Çizelge 10). Bu nedenle; elde edilen verilere Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmış ve kontrol örnekleri ile durultma uygulanmış örnekler arasında görülen farkın önemli düzeyde olmadığı, tespit edilen farkın ise, “bentonit+jelatin” ile “bentonit+albumin” uygulamaları arasındaki farktan kaynaklandığı belirlenmiştir (Çizelge 4.10).

Durultma uygulamaları sonunda görülen en düşük polimerik renk oranı, bentonit-jelatin kombinasyonu ile durultulan örnekte saptanmıştır. Jelatin ile durultma işlemi

sonucunda polimerik renk oranı azalışının, durultma işlemi sırasında meyve suyundan esmer renkli bileşiklerin uzaklaşması nedeniyle meydana geldiği düşünülmektedir. Türkyılmaz vd. (2012), siyah havuç suyunda, toplam monomerik ACN ve polimerik renk oranı üzerine, pastörizasyon ve durultmanın (bentonit 0.715 g/L–jelatin 7.5 mL/L–kizelsol 2.6 mL/L) etkisini incelemişlerdir. Araştırma sonucunda, durultma işleminden sonra polimerik renk oranının önemli derecede azaldığı görülmüştür.

Polimerik renk oranının, bazı ürünler hariç, hiçbir işlem görmemiş meyve sularında %10 değerine yakın olması gerektiği belirtilmektedir (Cemeroğlu vd. 2010). Polimerik renk oranının artması, bir yandan ACN'lerin parçalandığını, diğer yandan da esmerleşme reaksiyonları sonucunda kahverengi melanoidin pigmentlerinin oluştuğunu göstermektedir (Giusti ve Wrolstad 2001).

Antosiyaninler, pH başta olmak üzere, sıcaklık, ışık, enzim, kopigmentler, oksijen, enzim, askorbik asit gibi birçok faktörden etkilenmektedir (Cevallos-Casals ve Cisneros-Zevallos 2004, Cavalcanti vd. 2011). Bunun yanında ACN'lerin stabilite, önemli derecede yapılarına, oluştukları matrikse bağlı olduğu belirtilmektedir (Wrolstad vd. 2005). Çalışmamızda, üzüm üretiminin proses aşamalarından biri olan enzimasyon işlemi sırasında, üzüm mayşesi, kullanılan enzimin optimum çalışma sıcaklığı olan 50°C'ye 2 h süre ile maruz bırakılmıştır. Bu işlem ile, bir yandan üzüm suyunda bulunan ve ACN'lerin parçalanmasına neden olan diğer enzimler inaktif hale getirilmiş, diğer yandan da kabukta bulunan ACN'lerin üzüm suyuna geçmesi sağlanmıştır. Yapılan bu işlem, ürünün polimerik renk oranının yükselmesine (%28.5–31) neden olmuştur.

Literatürde, ısıtma sırasında ACN'lerin hangi mekanizma ile parçalandığı ile ilgili kesin bir açıklama bulunmamaktadır. Bununla birlikte, termal degradasyonun ilk aşamasının ACN'lerin heterosiklik halkasının açılması ile başladığı, ACN'in yapısında bulunan ve onun stabilitesini artıran glikozitin kaybolması sonucunda, renksiz çalkon moleküllerinin oluştuğu belirtilmektedir (Rodríguez-Saona vd. 1999).

Yapılan bir çalışmada, üzümden ekstrakte edilen ACN ekstraktında, polimerik renk oranı tayini yapılmış ve polimerik renk oranının %22 olduğu bildirilmiştir (Cevallos-Casals ve Cisneros-Zevallos 2004, Reyes ve Cisneros-Zevallos 2007). Bu yöntemin temeli, polimerik moleküllerin, bisülfid çözeltisine dirençli olmasına, buna karşın ACN'lerin bisülfid ile reaksiyona girerek ortamdan uzaklaşmasına dayanmaktadır (Wrolstad 1976). Cevallos-Casals ve Cisneros-Zevallos (2004) yaptıkları çalışmada, kırmızı tatlı patates ve mor mısır ACN'lerinin stabiliteyi ile ticari doğal (ACN) ve sentetik renk katkılarının stabiliteyi karşılaştırmışlardır. Çalışmada kırmızı üzümde elde edilen ACN içeren ticari renk katkısının termal stabilitesini saptamak amacıyla ürün, 99°C'de 2 h süreyle ısıya maruz bırakılmış ve bu ısıtma sonunda polimerik renk oranı %29 olarak belirlenmiştir.

Yabanmersini suyu üretim basamaklarının, yabanmersini renk özellikleri üzerine etkisini incelemek amacıyla, pastörizasyon ve depektinizasyon aşamalarından sonra, polimerik renk oranı belirlenmiştir (Hager vd. 2008). Bu çalışmada, depektinizasyon (40°C 1 h) aşamasından sonra, ürünün polimerik renk oranı %20 artarak, %10.5'ten %13.2'ye yükselmiştir

4.3.5 Reflektans renk değerleri

Üzüm sularının durultma işleminde önce ve sonra renklerinde oluşan değişimler, materyalin renginin reflektans spektrofotometresi ile CIE L*, a*, b*, C* (kroma) ve h° (hue) değerlerinin ölçülmesi ile izlenmiştir. Bu ölçümlere ilişkin veriler Çizelge 4.11’de verilmiştir.

Bilindiği gibi, CIE L*a*b* sisteminde L* değeri aydınlık derecesi (lightness) olarak tanımlanmakta ve bu değer 0 (siyah) ile 100 (beyaz) arasında değişmektedir. CIE a* değeri, 0 ile 60 arasında değişmekte olup, pozitif a* değerleri kırmızı, negatif a* değerleri ise, yeşil rengi göstermektedir. CIE b* değerleri de, 0 ile 60 arasında değişmekte; pozitif b* değerleri sarı, negatif b* değerleri ise, mavi rengi göstermektedir. a* ve b* değerlerinin 0 olması, cismin renksiz (akromatik) olduğunu göstermektedir. CIE C* (kroma, chroma) değeri, renk doygunluğu veya renk yoğunluğu (saturation) ile ilgili bir nitelik olup 0 ile 60 arasında değişmekte ve renk düzleminin merkezinde 0 (mat, dull) ve merkezden uzaklaştıkça parlak (vivid) tonlar artmaktadır. h° (hue) değeri ise, renk tonu veya renkle ilgili bir nitelik olup, 0°–360° arasında değişmekte; 0° ve 360° kırmızı, 90° sarı, 180° yeşil ve 270° mavi olarak değerlendirilmektedir (Wrolstad vd. 2005).

Durultulmuş üzüm suyu örneklerinin reflektans renk değerleri için yapılan varyans analizler sonuçları, durultma yardımcı maddelerinin aralarındaki farkın, istatistik olarak önemli düzeyde olmadığını göstermiştir ($p>0.01$). Bununla birlikte, h° değerinde ise, %95’lik önem düzeyinde örnekler arasında fark olduğu görülmüştür ($p<0.05$, EK 1, Çizelge 12). Bu nedenle, Duncan çoklu karşılaştırma testi sonucunda, “bentonit+kitosan” kombinasyonu ve sadece kitosan ile durultulan örneklerin kontrol örneklerinden önemli seviyede farklı olduğu belirlenmiştir (EK 1, Çizelge 13).

Sadece kitosan ile durultulan örneğin h° değerinde 7°’lik artış görülürken, “bentonit+kitosan” kombinasyonunda 4.5° düzeyinde artış saptanmıştır. ACN içeren gıdalarda h° değerinde görülen artış, ACN’lerin parçalandığının ve sarı renk oluştuğunun göstergesidir. Ancak durultma işleminde, bu azalış, ACN’lerin floklar

ile birlikte ortamdan uzaklaşması ile meydana gelen ACN kaybı olarak yorumlanmaktadır (Turfan 2008).

Çizelge 4.11 Farklı durultma yardımcı maddeleri ve kombinasyonları ile durultulan üzüm suyunun reflektans renk değerleri

	Kombinasyon	L*	a*	b*	C*	h°
<i>Durultulmamış</i>						
Kontrol	–	25.95	5.03	0.48	5.06	5.5
<i>Durultulmuş</i>						
0.2 g/L Bentonit	–	25.72	4.62	0.65	4.66	8.0
0.05 g/L Kitosan	–	26.1	4.25	0.94	4.35	12.5
0.2 g/L bentonit	0.05 g/L Jelatin	25.58	5.03	0.50	5.06	5.8
	0.05 g/L Kazein	25.87	4.39	0.76	4.46	9.9
	0.05 g/L Albumin	26.06	5.09	0.50	5.10	6.2
	0.05 g/L Kitosan	25.67	4.23	0.93	4.33	12.5

Toplam monomerik ACN miktarları ile reflektans renk değerleri arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacıyla, iki analiz yöntemi arasında korelasyon aranmıştır. C* ve a* değeri ile, ACN miktarı arasında orta derecede korelasyon görülürken (sırasıyla $r=0.576$ ve $r=0.582$), h° değeri ile yüksek düzeyde korelasyon ($r=0.728$) olduğu belirlenmiştir.

4.4 Geri Kazanım (Recovery) Testi

Geri kazanım testi üzüm suyunda başat ACN olan, mv-3-glu standardı kullanılarak belirlenmiştir. Geri kazanım testinde elde edilen değerler, çizelge 4.12’de verilmiştir. Bu değerler, ekstraksiyon işleminden önce örneğe ilave edilen mv-3-glu’in, yaklaşık %97’sinin geri kazanıldığını göstermektedir. Bu değer, ACN’lerin analiz sürecindeki kayıplarının kabul edilebilir düzeylerde olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.12 Üzüm suyu ACN'lerinin geri kazanımları

ACN standardı	Örnekteki ACN miktarı (mg)	Eklenen ACN miktarı (mg)	Hesaplanan ACN miktarı (mg)	Geri kazanım (%)	Geri kazanım ortalaması (%)	Ortalama (%)
Mv-3-glu	72.77	134	191.45	89	86.5	97.2
	72.77	134	185.97	84		
	100.82	67	166.43	98	97.0	
	100.82	67	165.36	96		
	120.36	33.5	156.10	106	108.0	
	120.36	33.5	157.65	110		

Üzümsü meyveler ve kırmızı şarapta bulunan antosiyanidinlerin, HPLC yöntemi ile tanımlandığı bir araştırmada; çilek, kırmızı lahana, bilberry ve Cabernet Sauvignon kırmızı şarabı kullanılmıştır (Nyman ve Kumpulainen 2001). Araştırmada kullanılan antosiyanidinlerden, çilek örneğinde bulunan siyanidinde %96, pelargonidinde %79 oranında geri kazanım elde edilmiştir. Kırmızı şarapta ise, siyanidinden ve peonidinden sırasıyla %99 ve 103 kazanım görülürken, bu değer malvidinde ise, %67 düzeyinde olmuştur. Zhang vd. (2004) yaptıkları çalışmada, ACN tayinlerinde kullanılan HPLC yöntemlerini, bilberry meyvesi kullanarak karşılaştırmışlardır. Araştırmada yapılan geri kazanım analizi sonucunda, siyanidin glikozitinin geri kazanımı %102 olarak belirlemişlerdir.

4.5 Durultmanın Üzüm Suyunun Antioksidan Aktivitesi Üzerine Etkisi

Spektrofotometrik yöntemle antioksidan aktivite tayininde gerekli olan troloks standart eğrisi hazırlanmış ve elde edilen verilere doğrusal regresyon analizi uygulanmış ve troloks eğrisini tanımlayan eşitlik belirlenmiştir (Şekil 4.11). Bu eşitlik kullanılarak üzüm sularında, antioksidan aktivite düzeyi hesaplanmıştır.

Üzüm sularının antioksidan aktivitesi, durultma aşamalarında belirlenmiş ve sonuçlar çizelge 4.13'de verilmiştir.

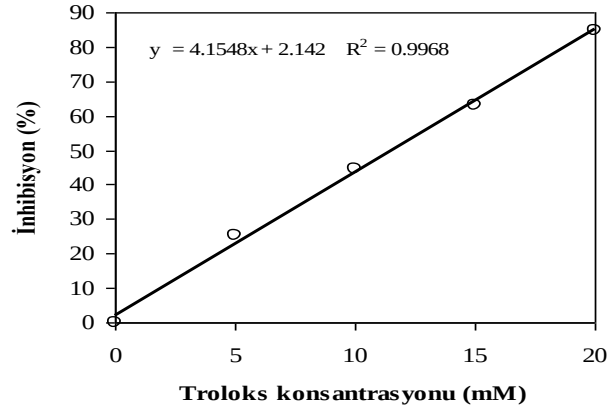
Çizelge 4.13 Farklı durultma yardımcı maddeleri ve kombinasyonları ile durultulan üzüm sularının antioksidan aktivitesinde görülen değişim

	Kombinasyon	Antioksidan aktivite (mM/mL)
<i>Durultulmamış</i>		
Kontrol	–	15.3±0.7
<i>Durultulmuş</i>		
0.2 g/L Bentonit	–	15.2±0.14
0.05 g/L Kitosan	–	14.4±0.6
0.2 g/L bentonit	0.05 g/L Jelatin	14.6±0
	0.05 g/L Kazein	14.3±0.3
	0.05 g/L Albumin	14.5±0.1
	0.05 g/L Kitosan	15.1±0.4

Durultulmuş üzüm suyu örneklerinin antioksidan aktivite değerleri için yapılan varyans analizler sonuçları, durultma yardımcı maddelerinin arasındaki farkın, istatistik olarak önemli düzeyde olmadığını göstermiştir ($p>0.01$, EK 1, Çizelge 14). Villaño vd. (2006) yaptıkları çalışmada, şarap üretim prosesinin şarap fenolik madde içeriği ve antioksidan aktivite üzerine etkisini incelemişlerdir. Çalışmada, durultma işleminde, albumin (0.05 g/L) ve jelatinin (0.05 g/L), bentonit (0.4 g/L) ile kombinasyonundan yararlanılmışlardır. Araştırma sonunda, durultma yapılmamış örnekler ile, durultma yapılmış örneklerin antioksidan aktivitesi arasındaki farkın önemli olmadığı belirlenmiştir.

Son yıllarda yapılan birçok araştırmada, ACN'lerin önemli düzeyde antioksidatif etkilerinin bulunduğu saptanmıştır (Tsuda vd. 1994, Kalt vd. 2000) ve sahip oldukları antioksidan etki nedeniyle ACN'lerin birçok kronik hastalığı önleyici etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Gil vd. 2000). Bu nedenlerden dolayı, çalışmamızda, durultma yapılmış ve yapılmamış üzüm sularının ACN miktarları ile antioksidan aktivite değerleri arasında bir ilişki olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. Ancak

yapılan doğrusal regresyon analizi sonucu, düşük korelasyon katsayısı ($r=0.350$) elde edilmiş ve üzüm sularındaki ACN miktarı ile antioksidan aktivite arasında ilişkinin olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.11 Troloks standart eğrisi

4.6 Durultmanın Üzüm Suyunun Bazı Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Etkisi

Üzüm suyunda bulunan başlıca suda çözünür kuru maddeler; glukoz, fruktoz, tartarik asit ve malik asittir. Tartarik ve malik asit dışında, üzümde bulunan diğer organik asitler ise, sitrik, galaktronik, suksinik, laktik, fumarik ve okzalik asit olduğu belirtilmektedir (Buglione ve Lozano 2002). Durultma işleminin üzüm suyunun; pH, titrasyon asitliği, briks ve bulanıklık düzeyi üzerine etkisi ortaya koymak için analizler yapılmış ve bu analizlerin sonuçları çizelge 4.14’de verilmiştir.

Durultulmuş üzüm suyu örneklerinin briks, pH ve titrasyon asitliği sonuçları için yapılan varyans analizler sonuçlarına göre, durultma yardımcı maddelerinin arasındaki farkın, briks ve titrasyon asitliği için önemli olmadığı tespit edilirken ($p>0.01$, EK 1, Çizelge 15, Çizelge 18), pH sonuçları arasındaki farkın istatistik olarak önemli düzeyde olduğu saptanmıştır ($p<0.01$, EK 1, Çizelge 16). Bu nedenle; pH verilerine Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmış ve pH değerleri arasında, kitosan ile kontrol örneklerinin ve “bentonit+kazein” ile “bentonit+jelatin” örneklerinin pH’larının farklı olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.14 Durultulmamış ve durultulmuş örneklerin bazı analitik özellikleri*

	Kombinasyon	pH		Titrasyon asitliği*(g/L)	Briks(%)
<i>Durultulmamış</i>					
Kontrol	—	3.79±0	AB**	0.59±0	26.87±0
<i>Durultulmuş</i>					
0.2 g/L Bentonit	—	3.79±0.01	AB	0.6±0.01	26.84±0.04
0.05 g/L Kitosan	—	3.74±0.01	C	0.56±0	26.70±0.01
0.2 g/L bentonit	0.05 g/L Jelatin	3.77±0	B	0.57±0.02	26.77±0.01
	0.05 g/L Kazein	3.80±0.02	A	0.55±0.02	26.77±0.2
	0.05 g/L Albumin	3.78±0.01	AB	0.55±0.01	26.69±0.01
	0.05 g/L Kitosan	3.79±0	AB	0.57±0.01	26.70±0.1

*Değerler, aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

*Titrasyon asitliği, tartarik asit cinsinden hesaplanmıştır.

**Değişik harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark, önemlidir (p<0.01).

3.2.2.1 başlıklı, durultma yardımcı maddelerinin hazırlanması bölümünde de belirtildiği gibi, kitosan sitrik asit çözeltisi içinde çözündürülerek hazırlanmıştır. Bu şekilde, durultma işlemi amacıyla ürüne eklenen kitosan, ürünün pH seviyesinde azalmaya neden olabileceği düşünülmüştür. Bunun yanında, “bentonit+kazein” kombinasyonu ile durultulmuş örnek ile, “bentonit+jelatin” ile durultulmuş üzüm suyunun pH’larının farklı olduğu belirlenmiştir. Bu durumun, durultma yardımcı maddesinin hazırlanması ile bağlantılı olduğu olasılığı bulunmaktadır. Çünkü kazein sodyum karbonat çözeltisi içerisinde hazırlanmış ve bu şekilde kullanılmıştır. Bunun sonucu olarak, pH seviyesinin yükseldiği sanılmaktadır.

5. SONUÇLAR

Araştırma sonunda elde edilen sonuçlar, maddeler halinde aşağıda sunulmuştur.

1. Üzüm suyu ACN'leri üzerine, kullanılan durultma yardımcı maddesinin dozundan çok, türü daha fazla etkiye sahiptir.
2. Üzüm suyunun durultulmasında, ACN'leri en iyi düzeyde koruyup, en düşük bulanıklık düzeyini (4.2–4.4 NTU) sağlayan “bentonit+kazein” ve “bentonit+albumin” uygulamaları önerilmektedir.
3. Üzüm suyunun durultulmasında, albümin ve kazeinin, jelatine göre daha başarılı sonuçlar sağladığı belirlenmiştir.
4. Durultma sırasında yüksek ACN kaybına neden olduğu için üzüm suyu üretiminde kitosan kullanımı önerilmemektedir.
5. Farklı durultma yardımcı maddelerinin fenolik maddeler üzerine etki düzeyi farklıdır.
 - Bentonit, kafeik ve klorojenik asitin,
 - Kazein ve albumin, kateşin, kafeik asit, klorojenik asit ve epikateşinin,
 - Jelatin, kafeik, kateşin ve klorojenik asitin,
 - Kitosan ise, kafeik ve klorojenik asitin meyve suyundan uzaklaştırılmasında daha etkilidir.
6. Kalecik karası üzüm çeşidinin başat ACN'inin, mv-3-glu (%57) olduğu, bunu pn-3-glu'in (%10) takip ettiği belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Adams, D. 2006. Phenolics and ripening in grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 249–256.
- Anaga, A., Georgiev, V., Ochieng, J., Phills, B. and Tsoleva, V. 2013. Production of anthocyanins in grape cell cultures: A potential source of raw material for pharmaceutical, food, and cosmetic industries. *In: The Mediterranean Genetic Code- Grapevine and Olive*, Poljuha, D. and Saldonja, B. (ed.), The Florida A&M University College of Agriculture and Food Science, 247– 287, Florida.
- Anomin, 2008. Web Sitesi: http://www.meyed.org.tr/userfiles/file/sektor_istatistikler/turkiye_meyve_suyu_endustrisi_istatistiki_degerlendirme_2000_08.pdf, Erişim Tarihi: 14.07.2013.
- Anonymous, 2011. Web Sitesi: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>, Erişim Tarihi: 15.07.2013.
- Balík, J. 2003. Effect of bentonite clarification on concentration of anthocyanins and colour intensity of red and rosè wines. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 30, 135–141.
- Balík, J., Kyseláková, M., Veverka, J., Třířka, J., Vrchotová, N., Totuřek J. and Lefnerová, D. 2007. The effect of clarification on colour, concentration of anthocyanins and polyphenols in red wine. *Acta Horticulturae*, 754, 563–568.
- Barón, R., Mayen, M., Merida, J. and Medina, M. 1997. Changes in phenolic compounds and colour in pale Sherry wines subjected to fining treatments. *Zeitschrift fuer Lebensmittel–Untersuchung und –Forschung*, 205, 474–478.
- Brouillard, R. 1983. The in vivo expression of anthocyanin color in plants. *Phytochemistry*, 22, 1311–1323.
- Bosanek, C.A., Silliman, K., Kirk, L.L. and Frankel, E.N., 1996. Total phenolic content and antioxidant potential of commercial grape juice. *Journal of the American Dietetic Association*, 96, 9–35.
- Boulton, R. 2001. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 67–87.
- Buglione, M. and Lozano, J. 2002. Nonenzymatic browning and chemical changes during grape juice storage. *Journal of Food Science*, 67, 1538–1543.

- Castillo-Sánchez, J.X., García-Falcón, M.S., Martínez-Carballo, E., Martins-Dias, L.R. and Mejuto, X.C. 2008. Phenolic compound and colour stability of Vinhão wines: Influence of wine-making protocol and fining agents. *Food Chemistry*, 106, 18–26.
- Cavalcanti, R.N., Santos, D.T. and Meireles, M.A.A. 2011. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems-An overview. *Food Research International*, 44, 499–509.
- Cemeroğlu, B. ve Karadeniz, F. 2009. Meyve suyu üretim teknolojisi, Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi, Cilt I. Cemeroğlu, B. (ed.), Bizim Büro Basımevi, 391–692, Ankara.
- Cemeroğlu, B., Yemenicioğlu, A. ve Özkan, M. 2009. Meyve ve sebzelerin bileşimi, Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi, Cilt I. Cemeroğlu, B. (ed.), Bizim Büro Basımevi, 1–236, Ankara.
- Cevallos-Casals, B.A. and Cisneros-Zevallos, L. 2004. Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. *Food Chemistry*, 86, 69–77.
- Charlton, A.J., Nicola, J.B., Khan, M.L., Moir, A.J.G., Haslam, E., Davies, A.P. and Williamson, M.P. 2002. Polyphenol/peptide binding and precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1593–1601.
- Chatterjee, S., Chatterjee, S., Chatterjee, B.P. and Guha, A.K. 2004. Clarification of fruit juice with chitosan. *Process Biochemistry*, 39, 2229–2232.
- Cuyckens, F. and Claeys, M. 2004. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39, 1–15.
- Çelik, H., Çelik, S., Marasalı Kunter, B., Söylemezoglu, G., Boz, Y., Özer ve C., Atak, A. 2005. Bağcılıkta Gelişme ve Üretim Hedefleri, Türkiye Ziraat Mühendisliği IV. Teknik Kongresi. Bildiri Özetleri Kitabı, Cilt II, 565-588.
- Dávalos, A., Bartolomé, B. and Cordovés, C.G., 2004. Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars. *Extending Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 48–54.
- Dıblan, S. ve Özkan, M. 2013. Çeşitli durultma yardımcı maddelerinin kırmızı şarap antosiyaninleri üzerine etkisi. *Gıda*, 38, 47–54.
- Doner, L.W., Bécard, G. and Irwin, P.L. 1993. Binding of flavonoids by polyvinylpyrrolidone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 753–757.

- Fang, Z., Zhang, M., Du, W. and Sun, J. 2007. Effect of fining and filtration on the haze formation in bayberry (*Myrica rubra* Sieb.Et.Zucc.) juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 113–119.
- Ferreira, R.B., Piçarra- Pereira, M.A., Monteiro, S., Loureiro, V.B. and Teixeira, A.R. 2002. The wine proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 12, 230–239.
- Francis, F.J. 1985. Blueberries as a colorant ingredient in food products. *Journal of Food Science*, 50, 754–756.
- Fuleki, T. 1969. The anthocyanins of strawberry, rhubarb, radish and onion. *Journal of Food Science*, 34, 365–369.
- García- Beneytez, E., Cabello, F. and Revilla, E. 2003. Analysis of grape and wine anthocyanins by HPLC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5622–5629.
- Gil, M.I., Tomas-Barberan, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M. and Kader, A.A. 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4581–4589.
- Giusti, M.M. and Wrolstad, R.E. 2001. Unit F1.2. Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy, *In: Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. Wrolstad, R.E. and Schwartz, S.J. (eds.), John Wiley & Sons, 1-13, New York, NY
- González-Paramás, A.M., Lopes da Silva, F., Martín-López, P., Macz-Pop, G., González-Manzano, S., Alcalde-Eon, C., Pérez-Alonso, J.J., Escribano-Bailón, T., Rivas-Gonzalo, J.C. and Santos-Buelga, C. 2006. Flavanol-anthocyanin condensed pigments in plant extracts. *Food Chemistry*, 94, 428–436.
- Gómez-Plaza, E., Gil-Muñoz, R., López-Roca, J.M., De La Hera-Orts, M.L. and Martínez-Cuñillas, A. 2000. Effect of the addition of bentonite and polyvinylpolypyrrolidone on the colour and long-term stability of red wines. *Journal of Wine Research*, 11, 223–231.
- Gülcü, M. 2008. Durultma yardımcı maddelerinin üzüm suyu kalitesi üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi (Basılmamış). Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 144, Tekirdağ.
- He, Q., Shi, B. and Yao, K. 2006. Interactions of gallotannins with proteins, amino acids, phospholipids and sugars. *Food Chemistry*, 95, 250–254.

- Hager, T., Howard, L.R. and Prior, R.L. 2008. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blackberry products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 689–695.
- Harbertson, J.F., Picciotto, E.A. and Adams, D.O. 2003. Measurement of polymeric pigments in grape berry extracts and wines using a protein precipitation assay combined with bisulphate bleaching. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, 301–306.
- Iacopini, P., Baldi, M., Storch, P. and Sebastiani, L. 2008. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 589–598.
- Kalt, W., McDonald, J.E. and Donner, H. 2000. Anthocyanins, phenolics and antioxidant capacity of processed lowbush blueberry products. *Journal of Food Science*, 65, 390-393.
- Kerio, L.C., Wachira, F.N., Wanyoko, J.K. and Rotich, M.K. 2012. Characterization of anthocyanins in Kenyan teas: Extraction and identification. *Food Chemistry*, 131, 31–38.
- Kırca, A. ve Özkan, M. 2010. Değişik amaçlı bazı test ve analiz yöntemleri, Gıda Analizleri, Cemeoğlu B. (Ed.), Bizim Büro Basım evi, 168–178, Ankara.
- Koç, B. 2013. Nar sularının çeşitli durultma yardımcı maddeleri ile durultulması ve konsantrelerin depolanması sürecinde bileşimdeki değişimler. Doktora Tezi (basılmamış), Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 238, Ankara.
- Kurtbay, H.M., Bekci, Z., Merdivan, M. and Yurdakoc, K. 2008. Reduction of ochratoxin A levels in red wine by bentonite, modified bentonite, and chitosan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2541–2545.
- Le Bourse, D., Jégou, S., Conreux, A., Villaume, S. and Jeandet, P. 2010. Review of preparative and analytical procedures for the study of proteins in grape juice and wine. *Analytica Chimica Acta*, 667, 33–42.
- Lee, J., Durst, R.W. and Wrolstad, R.E. 2002. Impact of juice processing on blueberry anthocyanins and polyphenolics: comparison of two pretreatment. *Journal of Food Science*, 67, 1660-1667.
- Lee, J. and Finn, C.E. 2007. Anthocyanins and other polyphenolics in American elderberry (*Sambucus canadensis*) and European elderberry (*S. nigra*) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 2665–2675.

- Lee, J., Rennaker, C. and Wrolstad, R.E. 2008. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, 110, 782–786.
- Lee, W.C., Yusof, S., Hamid, N.S.A. and Baharin, B.S. 2007. Effects of fining treatment and storage temperature on the quality of clarified banana juice. *Food Science and Technology*, 40, 1755–1764.
- Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Laureano, O. and Ricardo da Silva, J.M. 2003. Monomeric, oligomeric and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo and Cabernet Sauvignon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6475–6481.
- Morris, J.R. and Main, G.L. 1995. Fining agents for wine. Proc.14th NM Conf.1995, (<http://www.uark.edu/depts/ifse/grapeprog/articles/nmc14wg.pdf>).
- Nyman, N.A. and Kumpulainen, J.T. 2001. Determination of anthocyanidins in berries and red wine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4183–4187.
- Özkan, M., Kırca, A. ve Cemeroğlu, B. 2010. Gıdalara uygulanan bazı özel analiz yöntemleri, Gıda Analizleri. Cemeroğlu, B. (ed.), Bizim Grup Basımevi, 85–155, Ankara.
- Patras, A., Brunton, N.P., O'Donnell, C. and Tiwari, B.K. 2010. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in food: mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science and Technology*, 21, 3–11.
- Poncet- Legrand, C., Edelmann, A., Putaux, J.-L., Cartalade, D., Sarni- Manchado, P. and Vernhet, A. 2006. Poly (L-proline) interaction with flavan-3-ols units: Influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. *Food Hydrocolloids*, 20, 687–697.
- Puškaš, V.S. and Miljić, U.D. 2012. Effects of fining on phenolic compounds and colour of red wine obtained with addition of increased amounts of grape solid phase in pomace. *Hemijska Industrija*, 66, 727–734.
- Reyes, L.F. and Cisneros-Zevallos, L. 2007. Degradation kinetics and colour of anthocyanins in aqueous extracts of purple- and red-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Food Chemistry*, 100, 885–894.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. and Dubourdieu, D. 2006a. Nitrogen Compounds, *In: Handbook of Enology*, Vol. 2. Aquitaine Traduction, 109–139, Bordeaux, France.

- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. and Dubourdieu, D. 2006b. Phenolic Compounds, *In: Handbook of Enology*, Vol. 2. Aquitaine Traduction, 141–203, Bordeaux, France.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. and Dubourdieu, D. 2006c. Clarification and stabilization treatments: Fining wine, *In: Handbook of Enology*, Vol. 2. Aquitaine Traduction, 301–332, Bordeaux, France.
- Rodríguez- Saona, L.E., Guisti, M.M. and Wrolstad, R.E. 1999. Color and pigment stability of red radish and red-fleshed potato anthocyanins in juice model systems. *Journal of Food Science*, 64, 451–456.
- Rózek, A., Achaerandio, I., Almajano, M.P., Güell, C., López, F. and Ferrando, M. 2007. Solid foodstuff supplemented with phenolics from grape: Antioxidant properties and correlation with phenolic profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5147–5155.
- Sánchez- Moreno, C., Cao, G., Ou, B. and Prior, R.L. 2003. Anthocyanin and proanthocyanidin content in selected white and red wines. Oxygen radical absorbance capacity comparison with nontraditional wines obtained from highbush blueberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4889–4896.
- Sarni- Manchado, P., Cheynier, V. and Moutounet, M. 1997. Reactions of polyphenoloxidase generated caftaric acid o-quinone with malvidin-3-O-glucoside. *Phytochemistry*, 45, 1365–1369.
- Shahidi, F., Arachchi, J.K.V. and Jeon, Y.J. 1999. Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 37–51.
- Siebert, K.J., Troukhanova, N.V. and Lynn, P.Y. 1996. Nature of polyphenol-protein interaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 80–85.
- Siebert, K. J. 2006. Haze formation in beverages. *Food Science and Technology*, 39, 987–994.
- Skrede, G., Wrolstad, R.E. and Durst, R.W. 2000. Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Food Science*, 65, 357–364.
- Soleas, G.J., Diamandis, E.P. and Goldberg, D.M. 1997. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 11, 287–313.
- Soyer, Y., Koca, N. and Karadeniz, F. 2003. Organic acid profile of Turkish white grapes and grape juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 629–636.

- Stankovic, S., Jovic, S., Zivkovic, J. and Pavlovic, R. 2012. Influence of age on red wine colour during fining with bentonite and gelatin. *International Journal of Food Properties*, 15, 326–335.
- Quintela, S., Villarán, M.C., De Armentia, I.L. and Elejalde, E. 2012. Ochratoxin A removal from red wine by several oenological fining agents: bentonite, egg albumin, allergen-free adsorbents, chitin and chitosan. *Food Additives and Contaminants*, 29, 1168–1174.
- Tiwari, B.K., Patras, A., Brunton, N., Cullen, P.J. and O'Donnell C.P. 2010. Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17, 598–604.
- Tsuda, T., Ohshima, K., Kawakishi, S. and Osawa, T. 1994. Antioxidative pigments isolated from the seeds of *phaseolus vulgaris* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 248–251.
- Turfan, Ö. 2008. Nar suyu konsantresi üretimi ve depolama sürecinde antosiyaninlerdeki değişimler. Yüksek Lisans Tezi (basılmamış), Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 140, Ankara.
- Turfan, Ö., Türkyılmaz, M., Yemiş, O. and Özkan, M. 2011. Anthocyanin and colour changes during processing of pomegranate (*Punica granatum* L., cv. Hicaznar) juice from sacs and whole fruit. *Food Chemistry*, 129, 1644–1651.
- Türkyılmaz, M. 2009. Siyah havuç konsantresi üretimi ve depolama sürecinde renklerdeki değişimler. Doktora Hazırlık Çalışması (basılmamış), Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 119, Ankara.
- Türkyılmaz, M., Yemiş, O. and Özkan, M. 2012. Clarification and pasteurization effects on monomeric anthocyanins and percent polymeric colour of black carrot (*Daucus carota* L.) juice. *Food Chemistry*, 134, 1052–1058.
- Valls, J., Millán, S., Pilar Martí, M., Borrás, E. and Arola, L. 2009. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *Journal of Chromatography A*, 1216, 7143–7172.
- Villaño, D., Fernández- Pachón, M.S., Troncoso, A.M. and García- Parrilla, M.C. 2006. Influence of enological practices on the antioxidant activity of wines. *Food Chemistry*, 95, 394–404.
- Wrolstad, R.E., Durst, R.W. and Lee, J. 2005. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 423–428.

- Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E. and Prior, R.L. 2006. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4069–4075.
- Yeh, Y.A., Herenyiora, M. and Weber, G. 1995. Quercetin synergistic action with carboxyamidotriazole in human breast carcinoma cells. *Life Sciences*, 57, 1285–1292.
- Yılmaz, Y. and Toledo, R.T. 2004. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 255–260.
- Zhang, Z., Kou, X., Fugal, K. and McLaughlin, J. 2004. Comparison of HPLC methods for determination of anthocyanins and anthocyanidins in bilberry extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 688–691.

EKLER

EK 1 Varyans Analizi ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi Sonuçları

EK 2 Üzüm Suyu ACN Kromatogramları

EK 1 Varyans Analizi ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi Sonuçları

Çizelge 1 Üzüm sularının durultulmasıyla meydana gelen monomerik ACN miktarındaki değişime ilişkin varyans analizi

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F	P
Durultma	6	1053.79	175.63	46.51	0.000*
Hata	7	26.43	3.78		
Genel Toplam	13	1080.22			

*: $p < 0.01$

Çizelge 2 Üzüm suyu durultma işleminin toplam monomerik ACN* etkisinin Duncan testi ile karşılaştırılması

	Kombinasyon	Toplam mono. ACN (mg/L)
<i>Durultulmamış</i>		
Kontrol	–	233.1±3.75 A**
<i>Durultulmuş</i>		
0.2 g/L Bentonit	–	219.9±0.14 BC
0.05 g/L Kitosan	–	205.2±1.70 E
0.2 g/L bentonit	0.05 g/L Jelatin	219.0±2.69 DE
	0.05 g/L Kazein	223.3±0.14 BC
	0.05 g/L Albumin	215.0±0.21 B
	0.05 g/L Kitosan	208.3±1.48 CD

*Toplam monomerik ACN değerleri, aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

**Değişik harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p < 0.01$).

Çizelge 3 Üzüm sularının durultulmasıyla meydana gelen ACN miktarındaki (HPLC yöntemi) değişime ilişkin varyans analizi

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F	P
Durultma	6	26217.3	436966	63.67	0.000*
Hata	7	480.4	68.6		
Genel Toplam	13	26697.7			

*: p<0.01

Çizelge 4 Üzüm suyu durultma işleminin ACN miktarı* (HPLC yöntemi) etkisinin Duncan testi ile karşılaştırılması

	Kombinasyon	ACN miktarı (mg/L)	
<i>Durultulmamış</i>			
Kontrol	–	357.1±1.91	A**
<i>Durultulmuş</i>			
0.2 g/L Bentonit	–	331.9±9.66	AB
0.05 g/L Kitosan	–	240.0±3.32	C
0.2 g/L bentonit	0.05 g/L Jelatin	266.8±7.28	C
	0.05 g/L Kazein	333.3±1.13	AB
	0.05 g/L Albumin	314.2±1.34	B
	0.05 g/L Kitosan	246.8±4.81	C

*ACN miktarları, aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

**Değişik harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir (p<0.01).

Çizelge 5 Üzüm sularının durultulmasıyla meydana gelen mv-3-glu miktarındaki değişime ilişkin varyans analizi

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F	P
Durultma	6	4620.12	770.02	126.32	0.000*
Hata	7	42.67	6.6		
Genel toplam	13	4662.79			

*: p<0.01

Çizelge 6 Üzüm sularının durultulmasıyla meydana gelen pn-3-glu miktarındaki değişime ilişkin varyans analizi

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F	P
Durultma	6	212.829	35.471	101.14	0.000*
Hata	7	2.455	0.351		
Genel toplam	13	215.284			

*: p<0.01

Çizelge 7 Üzüm sularının durultulmasıyla meydana gelen dp-3-glu miktarındaki değişime ilişkin varyans analizi

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F	P
Durultma	6	82.817	13.803	124.67	0.000*
Hata	7	0.775	0.111		
Genel toplam	13	83.592			

*: p<0.01

Çizelge 8 Üzüm sularının durultulmasıyla meydana gelen cy-3-glu miktarındaki değişime ilişkin varyans analizi

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F	P
Durultma	6	14.3886	2.3981	83.93	0.000*
Hata	7	0.2000	0.0286		
Genel toplam	13	14.5806			

*: p<0.01

Çizelge 9 Üzüm suyu durultma işleminin mv-, pn-, dp- ve cy-3-glu miktarlarına* etkisinin Duncan testi ile karşılaştırılması

		ACN miktarı (mg/L)				
<i>Durultulmamış</i>						
Kontrol	–	151.95 A**	31.3 A	14.3 A	20.5 A	2
<i>Durultulmuş</i>						
0.2 g/L Bentonit	–	141.45 B	29.2 B	13.3 A	19.6 AB	1.9
0.05 g/L Kitosan	–	104.67 C	21 C	7.9 C	17.5 C	1.45
0.2 g/L bentonit	0.05 g/L Jelatin	110.35 C	22.3 C	10.1 B	17.8 C	1.8
	0.05 g/L Kazein	142.55 B	28.9 B	13.6 A	19.5 AB	1.9
	0.05 g/L Albumin	137 B	28.1 B	10.9 B	19.3 B	2.1
	0.05 g/L Kitosan	107.15 C	21.9 C	8.2 C	17.6 C	1.7

*Değerler, aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

**Değişik harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir (p<0.01).

Çizelge 10 Üzüm sularının durultulmasıyla meydana gelen polimerik renk oranı değişimine ilişkin varyans analizi

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F	P
Durultma	6	10.479	1.75	7.89	0.008*
Hata	7	1.55	0.2214		
Genel Toplam	13	12.029			

*: p<0.01

Çizelge 11 Üzüm suyu durultma işleminin polimerik renk oranı üzerine etkisinin* Duncan testi ile karşılaştırılması

	Kombinasyon	Polimerik renk oranı (%)	
<i>Durultulmamış</i>			
Kontrol	—	30.0±0.71	AB**
<i>Durultulmuş</i>			
0.2 g/L Bentonit	—	29.9±0.64	AB
0.05 g/L Kitosan	—	31.0±0.14	A
0.2 g/L bentonit	0.05 g/L Jelatin	28.5±0.71	B
	0.05 g/L Kazein	30.2±0.35	AB
	0.05 g/L Albumin	31.0±0	A
	0.05 g/L Kitosan	31.0±0	A

*Polimerik renk oranları, aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

**Değişik harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir (p<0.01).

Çizelge 12 Üzüm sularının durultulmasıyla meydana gelen h° değerine ilişkin varyans analizi

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F	P
Durultma	6	110.39	18.40	5.87	0.017*
Hata	7	21.95	3.14		
Genel Toplam	13	132.34			

*: p<0.05

Çizelge 13 Üzüm suyu durultma işleminin h^0 üzerine etkisinin Duncan testi ile karşılaştırılması

Kombinasyon			h^0
<i>Durultulmamış</i>			
Kontrol	–	5.51±0.64	B**
<i>Durultulmuş</i>			
0.2 g/L Bentonit	–	7.95±1.00	B
0.05 g/L Kitosan	–	12.5±0.04	A
0.2 g/L bentonit	0.05 g/L Jelatin	5.81±3.08	B
	0.05 g/L Kazein	9.86±2.08	AB
	0.05 g/L Albumin	6.21±0	B
	0.05 g/L Kitosan	12.5±2.56	A

* h^0 değerleri, aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

**Değişik harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p<0.05$).

Çizelge 14 Üzüm sularının durultulmasıyla meydana gelen antioksidan aktivite değişimine ilişkin varyans analizi

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F	P
Durultma	6	1.930	0.322	2.14	0.187*
Hata	7	1.105	0.158		
Genel Toplam	13	3.035			

*: $p>0.01$

Çizelge 15 Üzüm sularının durultulmasıyla meydana gelen briks değişimine ilişkin varyans analizi

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F	P
Durultma	6	0.06394	0.01066	1.09	0.449*
Hata	7	0.06835	0.00976		
Genel Toplam	13	0.13229			

*: $p>0.01$

Çizelge 16 Üzüm sularının durultulmasıyla meydana gelen pH değişimine ilişkin varyans analizi

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F	P
Durultma	6	0.005086	0.000848	7.42	0.009*
Hata	7	0.000800	0.000114		
Genel Toplam	13	0.005886			

*: $p < 0.01$

Çizelge 17 Üzüm suyu durultma işleminin pH* üzerine etkisinin Duncan testi ile karşılaştırılması

Kombinasyon		pH
<i>Durultulmamış</i>		
Kontrol	—	3.79±0 AB**
<i>Durultulmuş</i>		
0.2 g/L Bentonit	—	3.79±0.01 AB
0.05 g/L Kitosan	—	3.74±0.01 C
0.2 g/L bentonit	0.05 g/L Jelatin	3.77±0 B
	0.05 g/L Kazein	3.80±0.02 A
	0.05 g/L Albumin	3.78±0.01 AB
	0.05 g/L Kitosan	3.79±0.14 AB

*pH değerleri, aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

**Değişik harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p < 0.01$).

Çizelge 18 Üzüm sularının durultulmasıyla meydana gelen titrasyon asitliği değişimine ilişkin varyans analizi

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F	P
Durultma	6	0.004871	0.000812	3.30	0.07*
Hata	7	0.0017	0.000243		
Genel Toplam	13	0.006571			

*: $p > 0.01$

Çizelge 19 Üzüm sularının durultulmasıyla ulaşılan bulanıklık değerlerine (NTU) değişimine ilişkin varyans analizi

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F	P
Durultma	6	821.3	136.9	13.33	0.002*
Hata	7	71.9	10.3		
Genel Toplam	13	893.1			

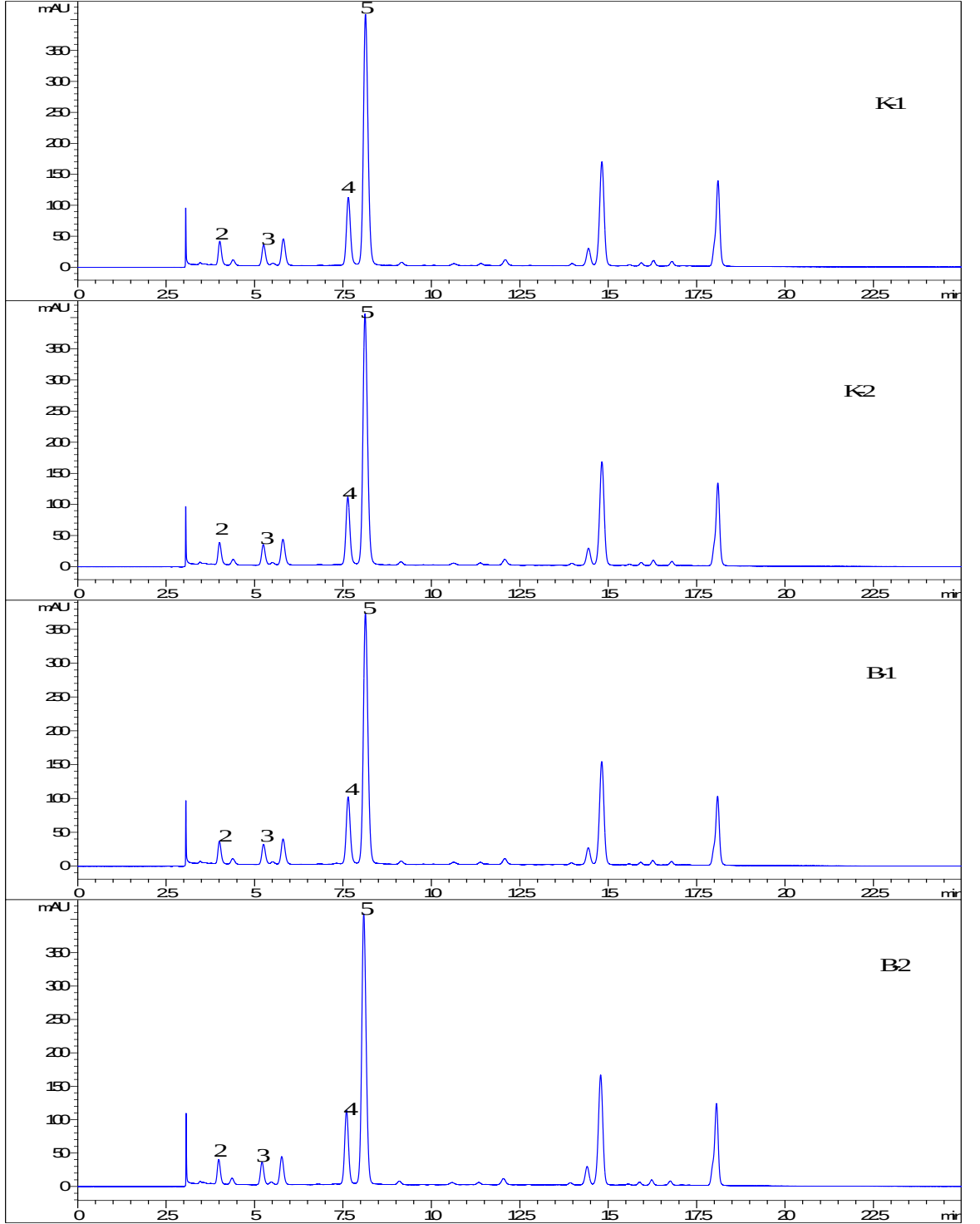
*: $p < 0.01$

Çizelge 20 Üzüm sularının durultulmasıyla meydana gelen fenolik madde içeriğinin değişimine ilişkin varyans analizi

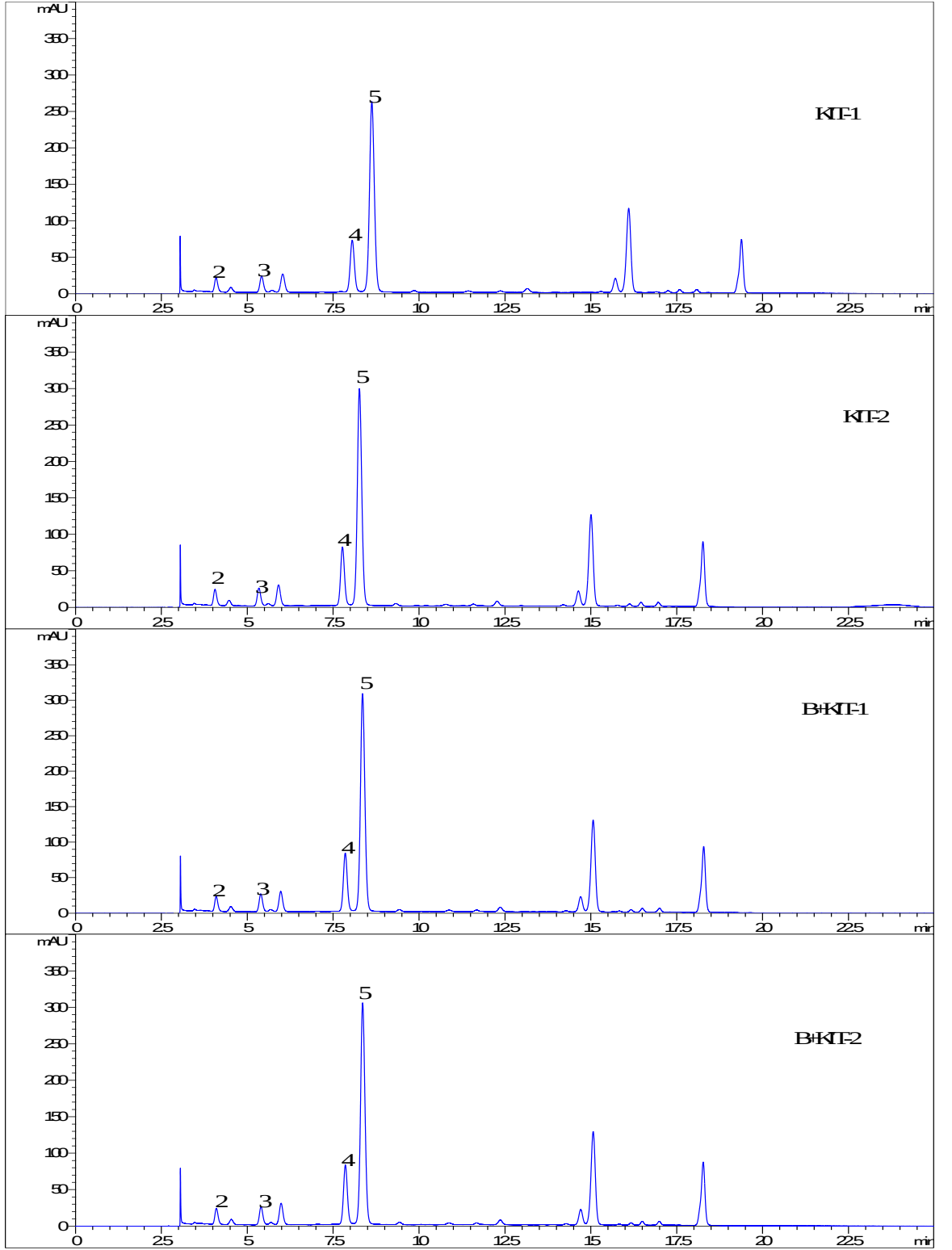
Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F	P
Durultma	6	287956	47993	7.65	0.008*
Hata	7	43912	6273		
Genel Toplam	13	331868			

*: $p < 0.01$

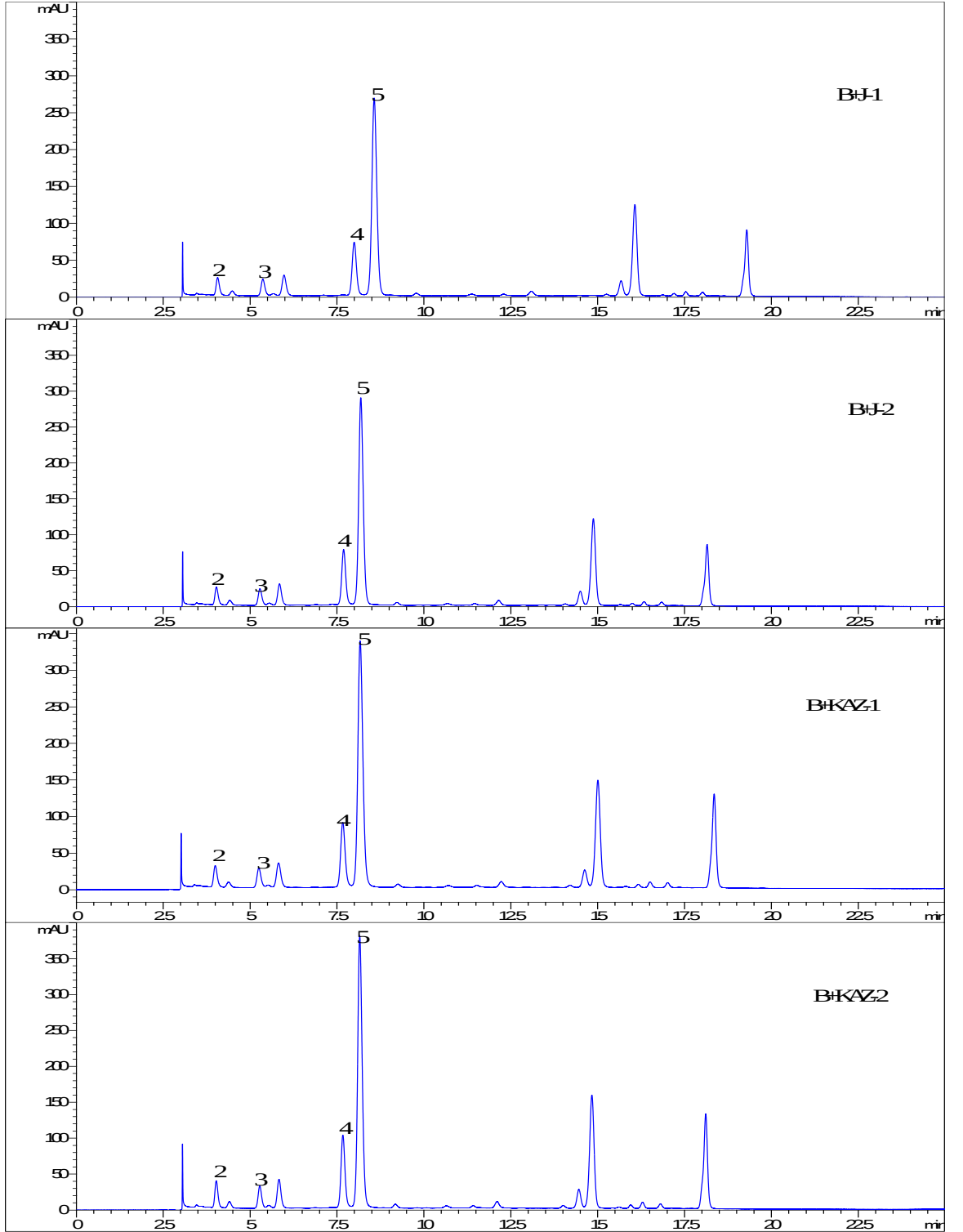
EK 2 Üzüm suyu ACN kromatogramları



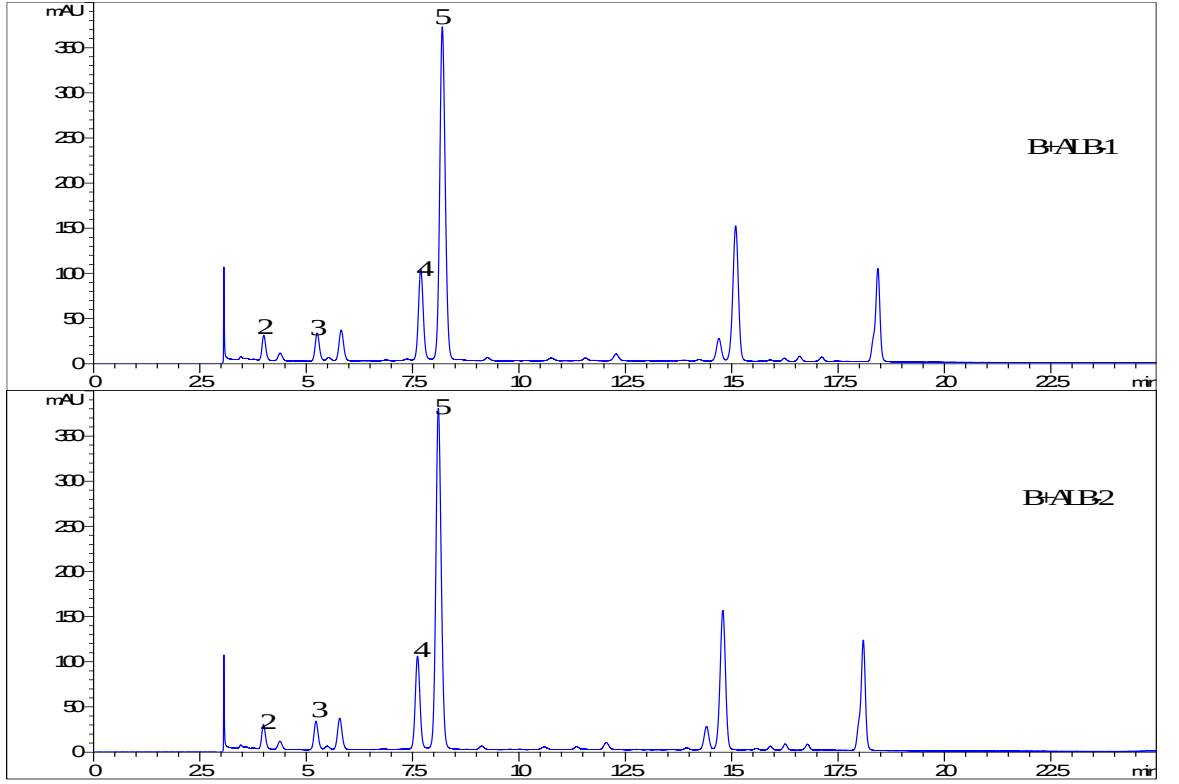
Şekil 1 Üzüm suyu ACN'lerin HPLC kromatogramları
K-1 ve K-2: Durultma yapılmamış,
B-1 ve B-2: 0.2 g/L bentonit ile durultulmuş



Şekil 2 Üzüm suyundaki ACN'lerin HPLC kromatogramları
KIT-1 ve KIT-2: 0.05 g/L kitosan ile durultulmuş,
B+KIT-1 ve B+KIT-2: 0.2 g/L bentonit- 0.05 g/L kitosan ile durultulmuş



Şekil 3 Üzüm suundaki ACN'lerin HPLC kromatogramları
B+J-1 ve B+J-2: 0.2 g/L bentonit- 0.05 g/L jelatin ile durultulmuş
B+KAZ-1 ve B+KAZ-2: 0.2 g/L bentonit- 0.05 g/L kazein ile durultulmuş.



Şekil 4 Üzüm suyundaki ACN'lerin HPLC kromatogramları
B+ALB-1 ve B+ALB-2: 0.2 g/L bentonit- 0.05 g/L albumin ile durultulmuş

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sevgin DIBLAN

Doğum Yeri : Antakya /Hatay

Doğum Tarihi : 1988

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu :

Lise : Düziçi Atatürk Lisesi (2002–2005)

Lisans : Süleyman Demirel Üniversitesi Mühendislik–Mimarlık Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü (2006–2011)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği
Ana Bilim Dalı (2011–2013)

Hakemli Dergiler:

- ✓ **Dıblan, S., Özkan, M.** 2013. Çeşitli durultma yardımcı maddelerinin kırmızı şarap antosiyaninleri üzerine etkisi. Gıda, 38, 47–54.

Ulusal Kongreler:

- ✓ **Dıblan, S., Özkan, M.** Çeşitli durultma yardımcı maddelerinin şarap antosiyaninleri üzerine etkisi. Türkiye 11. Gıda Kongresi, s. 527, 10–12 Ekim, 2012, Hatay. (**Sevgin Dıblan** tarafından sunulmuştur.)

Uluslararası Kongreler:

- ✓ **Dıblan, S., Erbay B., Küçüköner E.** 2011. Physicochemical and antioxidant properties of cornelian cherry juices from different types cornelian cherries (*Cornus mas* L.) grown in Isparta. International Food Congress “Novel Approaches in Food Industry”, 26–29 Mayıs, 2012, Çeşme, İzmir. (**Sevgin Dıblan** tarafından sunulmuştur.)