T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİRKE FERMANTASYONU UYGULANAN ELMA VE ELMA POSASINDAN ELDE EDİLEN PEKTİNLERİN KARAKTERİZASYONU

Aslı MUSLU CAN

DOKTORA TEZİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Danışman

Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ

Eş Danışman

Öğr. Gör. Dr. Ruşen METİN YILDIRIM

Aralık, 2024

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİRKE FERMANTASYONU UYGULANAN ELMA VE ELMA POSASINDAN ELDE EDİLEN PEKTİNLERİN KARAKTERİZASYONU

Aslı MUSLU CAN tarafından hazırlanan tez çalışması 09.12.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ	Öğr. Gör. Dr. Ruşen METİN YILDIRIM
Yıldız Teknik Üniversitesi Danışman	Yıldız Teknik Üniversitesi Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Salih KARASU, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Fatih BOZKURT, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Esra ÇAPANOĞLU Üye
İstanbul Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Ayşen DEVELİOĞLU ARSLAN, Üye
İstinye Üniversitesi _____

Danışmanım Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "Sirke Fermantasyonu Uygulanan Elma ve Elma Posasından Elde Edilen Pektinlerin Karakterizasyonu" başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Aslı MUSLU CAN

İmza

Çalışma azmini, disiplinini, her ne olursa pes etmeden yola devam etmeyi öğreten
canım babacığım merhum İbrahim MUSLU'ya

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bana yol gösteren, bilgi ve tecrübeleriyle destek olan değerli tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ'a içtenlikle teşekkür ederim. Eş danışmanım Sayın Ruşen METİN YILDIRIM'a da sunduğu katkılar için minnettarım. Ayrıca, çalışmalarım sırasında desteğini esirgemeyen Arş. Gör. Öznur SAROĞLU ve Dr. Kübra ÖZKAN'a da teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince, Yıldız Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünün laboratuvarlarında çalışma imkanı sağlayan bölümümüzün değerli öğretim üyeleri ile asistanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Tez savunmamda yer alan değerli jüri üyesi hocalarım Prof. Dr. Salih KARASU, Prof. Dr. Esra ÇAPANOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Fatih BOZKURT ve Dr. Öğr. Üyesi Ayşen DEVELİOĞLU ARSLAN'a teşekkür ederim.

Doktora sürecim boyunca hep yanımda olan arkadaşlarım Öğr. Gör. Hülya ALGUR MARŞOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Gonca YILMAZ, Öğr. Gör. Dr. Kübra SAĞLAM, Öğr. Gör. Dr. Eda ŞENSU DEMİR, Öğr. Gör. Dr. Elif Şeyma BAĞDAT, Dr. Öğr. Üyesi Başak Ebru ÖZCAN, Öğr. Gör. Dr. Gülsüm UÇAK ÖZKAYA, Dr. Öğr. Üyesi Umay Sevgi VARDAR ve Müjde AKYÜZ'e ayrıca teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hep yanımda hissettiğim canım annem Ayşe MUSLU'ya, kardeşlerime ve ablalarıma sonsuz teşekkürlerimi iletiyorum.

En büyük teşekkürümü, her anımda bana güç veren eşim Mesut CAN'a sunuyorum. Son olarak, doktora sürecim boyunca canım oğlum Mustafa Alp'e verdiği enerji ve neşe için çok teşekkür ederim.

Aslı MUSLU CAN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR **iv**
İÇİNDEKİLER **v**
KISALTMA LİSTESİ **x**
ŞEKİL LİSTESİ **xiii**
TABLO LİSTESİ **xv**
ÖZET **xvi**
ABSTRACT **xviii**
1 GİRİŞ **1**
1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 4
1.3 Hipotez 4
2. GENEL BİLGİLER **5**
2.1 Atıkların Geri Kazanımı 5
2.2 Sirkenin Tarihçesi 5
2.3 Sirke Hakkında Genel Bilgi 6
2.4 Sirke Çeşitleri 7
2.4.1 Meyve Sirkeleri 7
2.4.2 Hububat Sirkerleri 7
2.4.3 Balzamik Sirkeleri 8
2.4.4 Diğer Sirkeler 8
2.5 Sirke Fermantasyonu 9
2.5.1 Alkol Fermantasyonu 9
2.6 Sirkenin Sağlık Üzerine Etkisi 10
2.7 Pektin 11
2.7.1 Pektinin Kimyasal Yapısı 11
2.7.2 Pektin Enzimleri 13
2.7.3 Pektin Kaynakları 14
2.7.4 Pektinin Kullanım Alanları 14
2.7.5 Pektin Ekstraksiyon Yöntemleri 15
2.7.6 Pektinin Sağlık Üzerine Etkisi 17
2.8 Fenolik Maddeler 17

2.8.1 Fenolik Bileşiklerin Yararları……... 18
3 MATERYAL ve METOT 19
3.1 Materyal ve Kimyasallar.....19
3.2. Kontrollü Şartlarda Sirke Fermantasyonu 20
3.3 Sirke Fermantasyonu Boyunca Yapılan Fizikokimyasal Analizler.....21
3.3.1 pH Tayini…….. 21
3.3.2 Titrasyon asitliği……21
3.3.3 Briks……..22
3.3.4 Alkol Tayini……..22
3.3.5 Organik Asit……..23
3.3.6 Şeker Tayini……..23
3.3.7 Toplam Fenolik Madde Miktarı……23
3.3.8 Toplam Flavonoid Madde Miktarı……24
3.3.9 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri……25
3.4 Sirke Fermantasyonu Sonrasında Posalarda Yapılan Fizikokimyasal Analizler.....28
3.4.1 Posaların Kurutulması……...28
3.4.2 Nem Tayini……28
3.4.3 Renk Parametrelerinin Belirlenmesi……28
3.5 Pektin Ekstraksiyonu 28
3.6 Pektinlerin Fizikokimyasal Karakterizasyonu 29
3.6.1 Metoksil Derecesi (% MD)……...29
3.6.2 Protein Tayini……29
3.6.3 Renk Parametrelerinin Belirlenmesi……30
3.6.4 Toplam Fenolik Madde……30
3.6.5 Monosakkarit Kompozisyonu……...30
3.7 Pektinlerin Yapısal Karakterizasyonu 31
3.7.1 Molekül Ağırlığı……31
3.7.2 NMR (Nükleer Manyetik Rezonans)…… 31
3.7.3 FTIR (Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopisi)……...31
3.7.4 XRD (X-Işını Difraksiyon)…….. 32
3.7.5 SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Görüntüleri 32
3.7.6 Termal Davranış Özellikleri 32
3.8 Reolojik Özellikler.....32
3.8.1 Solüsyonlarının Hazırlanması 32

3.8.2 Yatışkan Kesme Akış Davranış Özellikleri 32
3.8.3 Sıcaklık Taraması Özellikleri 33
3.8.4 Dinamik Özellikleri 33
3.10 İstatiksel Analizler 34
4 BULGULAR ve TARTIŞMA 35
4.1 Sirkelerin Fizikokimyasal Özellikleri 35
4.2 Elma Suyu ve Elma Sirkelerinin Şeker İçeriği 37
4.3 Elma Suyu ve Elma Sirkelerinin Organik Asit Analizi 37
4.4 Elma Suyu ve Elma Sirkelerinin TPC, TFC ve Antioksidan Aktiviteleri ... 38
4.5 Sirke Posalarının Fizikokimyasal Analizleri 39
4.6 Pektin Ekstraksiyonu 40
4.7 Fizikokimyasal Analiz Sonuçları 42
4.7.1 Metoksil Derecesi (% MD)..... 42
4.7.2 Protein..... 43
4.7.4 Renk Parametreleri..... 43
4.7.5 Pektinlerin Monosakkarit Kompozisyonu..... 44
4.8 Yapısal Karakterizasyon 47
4.8.1 FTIR..... 47
4.8.2 XRD..... 48
4.8.3 ^{1}H NMR ve ^{13}C NMR..... 49
4.8.4 Molekül Ağırlığı..... 51
4.8.5 SEM..... 53
4.9 Termal Analiz 55
4.10 Reolojik Karakterizasyon..... 59
4.10.1 Sabit Kesme Analizi..... 59
4.10.2 Sıcaklık Tarama Testi..... 67
4.10.2 Dinamik Viskoelastik Analiz..... 72
5 SONUÇ ve ÖNERİLER 78
KAYNAKÇA 80
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR 91

SİMGE LİSTESİ

N_2	Azot
D_2O	Ağır hidrojen izotopu
NH_4Ac	Amonyum asetat
N	Akış davranış indeksi
n′	Akış davranış indeksi
n″	Akış davranış indeksi
Ea	Aktivasyon enerjisi (kJ mol^{-1})
Ω	Açısal hız (1/s)
η_0	Arrhenius eşitlik sabiti (Pa.s)
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	Demir (III) klorür heksahidrat
R	Evrensel gaz sabiti (kJ mol^{-1} K^{-1})
G′ (Pa)	Elastik modül
H	Görünür viskozite (Pa.s)
HCl	Hidroklorik asit
v	Hacim
C	Karbon
CO_2	Karbondioksit
K	Kıvam katsayısı (Pa.s^n),
K′	Kıvam katsayısı (Pa.s^n)
σ	Kayma gerilimi (Pa)
γ	Kayma hızı (s^{-1})

K″	Kıvam katsayısı (Pa.s^n)
MeOH	Metil alkol
µm	Mikrometre
T	Mutlak sıcaklık (Kelvin)
Mm	Milimolar
µL	Mikrolitre
M	Molar
N	Normalite
Nm	Nanometre
O	Oksijen
$K_2S_2O_8$	Potasyum perdisülfat
Pa	Paskal
rad/s	Radiyan/saniye
NaOH	Sodyum hidroksit
Na_2CO_3	Sodyum karbonat
G″ (Pa)	Viskoz modül

KISALTMA LİSTESİ

ABTS	2,2′-azinobis (3-ethylbenzothiazolline-6-sulfonic acid)
Ara	Arabinoz
BSA	Sığır serum albümini
CUPRAC	Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasitesi
^{13}CNMR	Karbon nükleer manyetik rezonans
DPPH	2,2-diphenyl-1-pcyrylhydrazyl
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetre
DTG	Diferansiyel termal analiz
EP	Elma posası pektini
ESP	Elma sirkesi posası pektini
ESAP	Elma posası sirkesi posasının pektini
ET	Elma posası
EST	Elma sirkesi posası
ESAT	Elma posası sirkesi posası
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
Fuk	Fukoz
FRAP	Demir (III) indirgeyici antioksidan güç
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi
GulA	Glukoronik asit
GalA	Galaktronik asit

Gul	Glukoz
GRAS	Genel olarak güvenli olarak tanınan
GAE	Gallik asit eşdeğeri
Gal	Galaktoz
^{1}HNMR	Hidrojen nükleer manyetik rezonans
HG	Homogalakturonan
HPGPC	Yüksek performanslı jel kromatografisi
KM	Kuru madde
LVR	Lineer vikoelastik bölge
MD	Metilasyon derecesi
Ma	Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı
Ms	Sayıca ortalama molekül ağırlığı
Man	Mannoz
PE	Pektinestereaz
PG	Poligalakturonaz
PPase	Protopektinaz
PME	Pektin metil esteraz
PTFE	Politetrafluoroetilen
rpm	Dakikada devir
Rib	Riboz
Rha	Rhamnoz
RG-I	Rhmanogalakturonan-I
RG-II	Rhmanogalakturonan-II
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TPC	Toplam fenolik madde
TFC	Toplam flavonoid madde

TPTZ	2, 4, 6-tripiridil-s-triazin
TSE	Türk Standartları Enstitüsü
TG	Termogravimetrik
TE	Trolox eşdeğeri
UV-VIS	Ultraviyole-görünür
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
Xyl	Ksiloz
XRD	X-ray difraksiyonu
XGA	Ksilogalakturonan

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Balzamik sirkesi üretimi **8**
Şekil 2.2 Alkol ve asetik asit fermantasyonu **10**
Şekil 2.3 A. Düşük metoksilli pektin B. Yüksek metoksilli pektin **12**
Şekil 2.4 Meyve hücre duvarındaki pektin formu **12**
Şekil 2.5 Pektinin kimyasal yapısı **13**
Şekil 2.6 Pektin ekstraksiyon metotları **15**
Şekil 3.7 Çalışma için satın alınan Golden elmalar **19**
Şekil 3.8 Elma küpleri ve elma posasına uygulanan sirke fermantasyonu (0, 7 ve 30. gün) **20**
Şekil 3.9 Pektin üretiminde kullanılacak posaların elde ediliş aşamaları **21**
Şekil 3.10 Toplam fenolik madde gallik asit kalibrasyon grafiği **24**
Şekil 3.11 Toplam flavonoid madde kateşin kalibrasyon grafiği **24**
Şekil 3.12 FRAP -Troloks kalibrasyon grafiği **25**
Şekil 3.13 ABTS-Troloks kalibrasyon grafiği **26**
Şekil 3.14 CUPRAC-Troloks kalibrasyon grafiği **27**
Şekil 3.15 DPPH-Troloks kalibrasyon grafiği **27**
Şekil 3.16 Pektin ekstraksiyonu **29**
Şekil 3.17 Protein BSA kalibrasyon grafiği **30**
Şekil 4.18 EP, ESP ve ESAP'ın FTIR spektrumları **48**
Şekil 4.19 EP, ESP ve ESAP'ın XRD kromotogramları **49**
Şekil 4.20 EP, ESP ve ESAP'ın ^{1}H NMR ve ^{13}C NMR spektrumları **50**
Şekil 4.21 EP, ESP ve ESAP'ın molekül ağırlığı dağılımı **52**
Şekil 4.22 EP, ESP ve ESAP'ın fotoğrafları ve SEM görüntüleri **54**
Şekil 4.23 EP'nin TG/DTG eğrileri **56**
Şekil 4.24 ESP'nin TG/DTG eğrileri **57**
Şekil 4.25 ESAP'ın TG/DTG eğrileri **57**
Şekil 4.26 EP, ESP ve ESAP'ın DSC termogramı **58**
Şekil 4.27 %5 konsantrasyondaki EP, ESP ve ESAP'ın kayma hızına karşı kayma gerilimi **61**
Şekil 4.28 %7 konsantrasyondaki EP, ESP ve ESAP'ın kayma hızına karşı kayma gerilimi **61**
Şekil 4.29 %7 konsantrasyondaki EP, ESP ve ESAP'ın kayma hızına karşı kayma gerilimi **62**

Şekil 4.30 %5, %7 ve % 10 konsantrasyondaki EP'nin kayma hızına karşı kayma gerilimi **62**

Şekil 4.31 %5, %7 ve % 10 konsantrasyondaki ESP'nin kayma hızına karşı kayma gerilimi **63**

Şekil 4.32 %5, %7 ve % 10 konsantrasyondaki ESAP'nin kayma hızına karşı kayma gerilimi **63**

Şekil 4.33 %5 konsantrasyondaki EP, ESP ve ESAP'ın kayma hızına karşı viskozitesi **64**

Şekil 4.34 %7 konsantrasyondaki EP, ESP ve ESAP'ın kayma hızına karşı viskozitesi **64**

Şekil 4.35 %10 konsantrasyondaki EP, ESP ve ESAP'ın kayma hızına karşı viskozitesi **65**

Şekil 4.36 %5, %7 ve % 10 konsantrasyondaki EP'nin kayma hızına karşı viskozitesi **65**

Şekil 4.37 %5, %7 ve % 10 konsantrasyondaki ESP'nin kayma hızına karşı viskozitesi **66**

Şekil 4.38 %5, %7 ve % 10 konsantrasyondaki ESAP'ın kayma hızına karşı viskozitesi **66**

Şekil 4.39 %5 konsantrasyondaki EP, ESP ve ESAP'ın görünür viskozite değerinin ($\eta 70$) sıcaklıkla değişimi **67**

Şekil 4.40 %7 konsantrasyondaki EP, ESP ve ESAP'ın görünür viskozite değerinin ($\eta 70$) sıcaklıkla değişimi **68**

Şekil 4.41 %10 konsantrasyondaki EP, ESP ve ESAP'ın görünür viskozite değerinin ($\eta 70$) sıcaklıkla değişimi **68**

Şekil 4.42 %5, %7 ve % 10 konsantrasyondaki EP'nin görünür viskozite değerinin ($\eta 70$) sıcaklıkla değişimi **69**

Şekil 4.43 %5, %7 ve % 10 konsantrasyondaki ESP'nin görünür viskozite değerinin ($\eta 70$) sıcaklıkla değişimi **69**

Şekil 4.44 %5, %7 ve % 10 konsantrasyondaki ESAP'ın görünür viskozite değerinin ($\eta 70$) sıcaklıkla değişimi **70**

Şekil 4.45 %5 konsantrasyondaki EP'nin G′ ve G″ değerleri **72**

Şekil 4.46 %7 konsantrasyondaki EP'nin G′ ve G″ değerleri **73**

Şekil 4.47 %10 konsantrasyondaki EP'nin G′ ve G″ değerleri **73**

Şekil 4.48 %5 konsantrasyondaki ESP'nin G′ ve G″ değerleri **74**

Şekil 4.49 %7 konsantrasyondaki ESP'nin G′ ve G″ değerleri **74**

Şekil 4.50 %10 konsantrasyondaki ESP'nin G′ ve G″ değerleri **75**

Şekil 4.51 %5 konsantrasyondaki ESAP'ın G′ ve G″ değerleri **75**

Şekil 4.52 %7 konsantrasyondaki ESAP'ın G′ ve G″ değerleri **76**

Şekil 4.53 %10 konsantrasyondaki ESAP'ın G′ ve G″ değerleri **76**

TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1 Elma ve elma posası sirkelerinin fizikokimyasal analizi değerleri.....**36**

Tablo 4.2 Elma suyu, elma sirkesi ve elma posası sirkesinin şeker miktarı **37**

Tablo 4.3 Elma suyu, elma sirkesi ve elma posası sirkesinin organik asit miktarı **38**

Tablo 4.4 Elma suyu, elma sirkesi ve elma posası sirkesinin TPC, TFC ve antioksidan aktiviteleri.....**39**

Tablo 4.5 ET, EST ve ESAT'ın renk ve % nem değerleri.....**40**

Tablo 4.6 EP, ESP ve ESAP'ın fizikokimyasal analiz sonuçları.....**43**

Tablo 4.7 EP, ESP ve ESAP pektinlerinin monosakkarit bileşimleri.....**46**

Tablo 4.8 EP, ESP ve ESAP molekül ağırlığı.....**70**

Tablo 4.9 Oswald de waele modeline göre belirlenen kıvam katsayısı, akış davranış indeksi ve determinasyon katsayısı.....**60**

Tablo 4.10 Arrhenius modeline göre belirlenen determinasyon katsayısı, arrhenius denklem sabiti ve aktivasyon enerjisi değerleri **67**

Tablo 4.11 Power-law modeline göre belirlenen elastik viskoz modülü, determinasyon katsayısı ve kıvam katsayısı değerleri **77**

ÖZET

Sirke Fermantasyonu Uygulanan Elma ve Elma Posasından Elde Edilen Pektinlerin Karakterizasyonu

Aslı MUSLU CAN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ

Eş-Danışman: Öğr. Gör. Dr. Ruşen METİN YILDIRIM

Bu çalışmada, küp küp kesilmiş elma ve elma suyu işlemenin yan ürünü olan elma posası sirke fermantasyonuna tabi tutulmuştur. Fermantasyon süresince sirkelere pH, titrasyon asitliği, renk ve briks analizleri yapılmıştır. Titrasyon asitliği ve pH sonuçları elma sirkesi ve elma posası sirkesinde sırası ile % 1,01±0,11 - 3,45±0,03 ve % 0,59±0,04 - 3,60±0,03 olarak tespit edilmiştir. Fermantasyon tamamlandıktan sonra elma suyu, elma sirkesi ve elma posası sirkelerine şeker, organik asit, toplam flavonoid, toplam fenolik madde analizleri ve antioksidan aktivite tayini yapılmıştır. Sırası ile toplam fenolik madde miktarları; 20,02±3,20 - 25,29±1,97 ve 7,89±0,09 mg GAE/100 mL olarak tespit edilmiştir. Elma sirkesi ve elma posası sirkesinde baskın olarak asetik asit ve laktik asit tespit edilmiştir. Şeker içeriği ise fermantasyon ile azalmıştır.

Sirkeyle fermente edilmiş elma küpleri (ESP) ve elma posalarından (ESAP) elde edilen pektinler, fermente edilmemiş elma posasından (EP) elde edilen pektinlerle

karşılaştırılmıştır. Pektinlere fizikokimyasal, yapısal, termal ve reolojik karakterizasyon analizleri yapılmıştır. Sirke fermantasyonu pektin verimini arttırmıştır. Tüm örneklerin metilasyon dercesi % 50'den fazla olduğu için yüksek metoksil pektinler olarak sınıflandırılmışlardır. Daha düşük metilasyon derecesine sahip olan ESP aynı zamanda daha düşük termal stabilite sergilemiştir. Pektin yapısındaki değişiklikler hem fermantasyona hem de sirke üretmek için kullanılan hammaddenin özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Fermente posalardan ekstrakte edilen pektinler EP ile karşılaştırıldığında, ESP'de homogalakturonanların (HG) oranı artmış ve rhamnogalakturonan-I (RG-I) oranı azalarak daha yüksek doğrusallık meydana gelmiştir. ESAP'da RG-I bölgesi azalan doğrusallıkla daha baskın hale gelmiştir. Örneklerin moleküler ağırlık dağılımı, sirke fermantasyonu uygulanmış hammaddeden ekstrakte edilen pektinlerin EP'den elde edilen iki pikin (1255 ve 340 kDa) ortalama moleküler ağırlıklarını ve kütle fraksiyon oranlarını değiştirdiğini göstermiştir. ESP'de ilk pikin (1294 kDa) kütle oranı % 35'den % 89'a yükselirken, ESAP'da ikinci pikin (478 kDa) kütle oranı % 91'e yükselmiştir. ESAP daha yüksek viskozite ve daha belirgin bir kayma incelmesi davranışı göstermiştir. ESAP'daki G' ve G″ değerleri de aynı konsantrasyonlarda (% 5, % 7 ve % 10 a/h) EP ve ESP'den daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma, sırasıyla çözünür şeker oranı yüksek ve düşük olan elma küpleri ve elma posalarına sirke fermantasyonu uygulanmasının, ekstrakte edilen pektinin yapısal ve reolojik özelliklerini değiştirdiğini ortaya koymuştur. ESP ve ESAP, belirli özelliklerin gerekli olduğu durumlarda uygun gıda katkı maddeleri olarak kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: elma sirkesi, pektin, monosakkarit kompozsiyonu, viskozite

ABSTRACT

The Properties of Pectin Extracted From The Residues of Vinegar-Fermented Apple and Apple Pomace

Aslı MUSLU CAN

Department of Food Engineering

Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ

Co-supervisor: Öğr. Gör. Dr. Ruşen METİN YILDIRIM

In this study, apple slices and apple pomace, the by-product of apple juice processing, were subjected to vinegar fermentation. The pH, titration acidity, brix and color values of vinegar samples were followed during fermentation. The titration acidity and pH of vinegars produced from apple slices and pomace were 1.01±0.11 % 3.45±0.03 and 0.59±0.04 % 3.60±0.03, respectively. The phenolic content of apple juice, the vinegars produced from apple slices and pomace were 20,02; 25,29 and 7,89±0,09 mg GAE/100 mL, respectively. As expectedly, the sugar content of vinegars were lower than that of apple juice and the major organic acids of vinegars were acetic and lactic acids.

The pomaces of apple juice and both vinegars were used for pectin extraction. The pectins extracted from the solid residue of vinegar-fermented apple slices (ESP) and apple pomaces (ESAP) were compared to the pectins extracted from non-fermented apple pomace (EP). Pectin sampleswere subjected to physicochemical,

structural, thermal and rheological characterization analyses. All pectins were classified as high-methoxyl pectins. The pectin extraction yield and total carbohydrate content was higher in pectins obtained from vinegar-fermented sources. ESP, which had a lower degree of methylation, exhibited less thermal stability. The changes in the pectin structure were dependent on both fermentation and the state of the raw material used to produce vinegar. Compared to EP, the proportion of homogalacturonans (HG) increased, and the proportion of rhamnogalacturonan I (RG-I) decreased in ESP, providing higher linearity, whereas in ESAP, the RG-I region became more dominant with reduced linearity. The molecular weight distribution analysis showed that pectin samples from vinegar-fermented sources changed the average molecular weights and mass fraction ratios of two peaks (1255 and 339.7 kDa) eluted from EP of non-fermented sources. In ESP, the mass fraction of the first peak (1294 kDa) was increased from 35 to 89 %, whereas in ESAP, the mass fraction of the second peak (477.55 kDa) was elevated to 91 %. ESAP showed greater viscosity and a more noticeable shear-thinning behavior. The G' and G″ values in the ESAP were also higher than those of EP and ESP at the same concentrations (5 %, 7 %, and 10 % w/v). This study found that applying vinegar fermentation to apple slices and apple pomaces, which were high in and low in soluble sugars, respectively, altered the structural and rheological properties of the extracted pectin. ESP and ESAP could have been suitable food additives when certain properties were required.

Keywords: apple vinegar, pectin, monosaccharide composition, viscosity

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Küresel nüfus artışı ve modern endüstriyelleşmeyle birlikte, tarım-endüstriyel atıkların üretimi çevreyi etkileyen önemli bir sorun olarak ortaya çıkmıştır. İşlenmemiş yan ürünlerin çevreye uygunsuz şekilde atılması, ekosistemde toksik organik bileşiklerin birikmesine ve anaerobik ayrışma sonucu sera gazlarının üretilmesine yol açmaktadır; bu da insan sağlığı ve diğer canlılar için ciddi tehditler oluşturmaktadır [1], [2]. Son zamanlarda, çevre koruma, gıda güvenliği ve kaynakların sürdürülebilir yönetimi konularına artan bir ilgi söz konusudur. Bu nedenle, Birleşmiş Milletler tarafından 2030 yılına kadar küresel tarım-endüstriyel atıkların % 50 oranında azaltılması amacıyla çeşitli Sürdürülebilir Kalkınma Hedeflerinin (SDG'ler) uygulanması amaçlanmaktadır [3]. Bu atıkların hasat sonrası, işleme, perakende ve tüketim aşamalarında azaltılması da dahil olmak üzere sürdürülebilirliği sağlamak için çeşitli çabalar gösterilmektedir. Ancak, son birkaç yıl içinde tarım-endüstriyel atıkların yüksek değerli bileşiklerin geri kazanımı ve gıda zincirinde daha ileri kullanımı için hammadde olarak değerlendirilmesine geniş bir ilgi gösterilmektedir [2], [4]. Ayrıca, COVID dönemi itibarıyla pektin gibi bitki kökenli polisakkaritlere olan talep artmış ve bu nedenle fonksiyonel gıdaların hazırlanması için gelişmiş değerlendirme stratejilerinin geliştirilmesi konusunda yenilikler gerekmektedir [2].

Gelişmiş bitkilerin birincil hücre duvarında ve hücre içi tabakasında bulunan karmaşık bir polisakkarit olan pektin, özellikle elma, portakal ve limon gibi meyvelerde bol miktarda bulunmaktadır. Bitkilerin hücre duvarlarının yaklaşık % 30'u pektinden oluşmaktadır. Pektin ilk defa 1790 yılında elma posasında tanımlanmıştır [5]. Üretimi ise 1900'lerde Almanya'da başlamıştır (elma suyu üreticisi, yan ürünleri olan kuru elma posasını pişirmeyi denemiştir). 2009 yılında ise yapılan pektin üretimlerinin % 85,5'i narenciye kabuğundan, % 14'ü elma

posasından ve % 0,5'i de şeker pancarından olmuştur [6]. Meyve işleme endüstrisinin yan ürünü olan kabuk ve posalar pektin ekstraksiyonu ve çeşitli fonksiyonellikleri sayesinde biyoekonomi kavramına uyum sağlamaktadırlar [5].

Pektin yapısal olarak en karmaşık polisakkarit ailesidir. D-galakturonik asit (GalA) üniteleri birbirine α-(1-4) glikozidik bağları ile bağlanmaktadır. GalA pektinin yaklaşık olarak % 70'ini oluşturmaktadır. Pektin yapısı homogalaktorunan (HG), rhamnogalakturonan-I (RG-I), rhamnogalakturonan-II (RG-II), ksilogalakturonan (XGA) ve apiyogalakturonan (AP) dan oluşmaktadır. Pektinde yüksek (% 65) oranda HG bulunmaktadır [7].

Galakturonik asitlerin yapısında bulunan karboksil grupları ile metil gruplarının esterleşmelerine göre pektinler ikiye ayrılmaktadır. Metil esterleşme derecesi % 50'den büyük olan pektinler yüksek metoksilli (HM) pektin olarak adlandırılırken metil esterleşme derecesi % 50'den küçük olanlar düşük metoksilli (LM) pektin olarak adlandırılmaktadır. LM'nin sulu çözeltileri, HM'ye göre daha yüksek özgül viskoziteye sahiptir. Genel olarak, HM-pektinler düşük pH (2,5 - 3,5) ve sakkaroz varlığında jel oluştururken, LM-pektinler geniş bir pH aralığında (genellikle kalsiyum gibi poli/divalant metal katyonları varlığında) jel oluşturma yeteneğine sahiptir [8].

Pektin, dünya genelinde gıdalarda güvenli olarak kullanımı onaylanan bir katkı maddesidir. Pektin, GRAS statüsüne sahiptir ve Avrupa'da E440a (düşük ve yüksek metoksil pektin için) veya E440b (amidlenmiş pektinler için) kodlu onaylı bir gıda katkı maddesidir. Sindirilemeyen çözünür bir lif olduğundan, kullanım miktarı % 0,5 ile % 1,0 arasında sınırlandırılmıştır [6]. Pektinin en temel kullanım alanı gıdadır. Jel, marmelat, meyve suyu, şekerleme ve reçel gibi ürünlerin üretiminde jelleştirici, emülsifiye edici, stabilize edici ve/veya koyulaştırıcı olarak kullanılmaktadır [9]. Pektinlerin endüstriyel kullanımlarının yanı sıra insan sağlığı açısından da önemi oldukça fazladır. İnsanlarda pektini sindirecek enzim olmadığı için diyet lifi sınıfında yer almaktadır. Bu özelliği sayesinde kan kolestrol seviyesini düşürücü, sindirim sisteminde kurşun ve civa gibi ağır metalleri bağlamakta olup aynı zamanda da kanser önleyici etkisi bulunmaktadır [5].

Sirke, eski çağlarda şarabın hava ile temas ederek bozulması sonucu oluşan bir gıda ürünüdür. Sirkenin bilinen en eski kullanımı 10.000 yıl öncesine dayanmaktadır.

M.Ö 460-377 yılları arasında Hipokrat sirkeyi ülserin tedavisinde kullanmıştır. 8. yüzyılda Japonya'nın Samurai savaşçıları sirkeyi vücutlarına sürmüştür. Bunun onlara güç ve kuvvet verdiğine inanmışlardır. Çin'de 10 yüzyılda enfeksiyonları önlemek amacıyla el yıkama ajanı olarak sülfür ve sirkeyi kullanmışlardır [10]. 18 yüzyıldan bugüne kadar zehirli sarmaşık, kurup, mide ağrısı, yüksek ates, ödem, obezite ile mücadele, kardiyovasküler hastalıklar, kanser ile mücadele gibi birçok hastalığı tedavi etmek için sirke kullanılmıştır [10], [11].

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) gıda standartları programı tarafından sirke "nişasta, şekerler veya meyve, böğürtlen, tahıl taneleri, maltlanmış arpa, peynir altı suyu, bal gibi tarımsal kökenli uygun bir ham maddeden üretilen, insan tüketimi için uygun bir sıvı olup, alkol ve asetik asit olmak üzere çift fermantasyon işlemine tabi tutulmuş ve son üründe belli miktarda asetik asit içeren" bir ürün olarak tanımlanmıştır. Sirke ile ilgili düzenlemelerde bazı farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin; Kodeks sirkelerin 50 g/L'den az asetik asit ve % 0,5'ten fazla alkol içermemesi gerektiğini belirtmektedir [12], [13]. Benzer şekilde, Türk Standartları Enstitüsü (TSE) sirkelerin 50 g/L'den az asetik asit ve % 0,5'ten fazla alkol içermemesi gerektiğini belirtmektedir [14], [12], [13]. Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) son üründe sirkenin "100 mL başına 4 g asetik asit" içermesi gerektiğini öngörmektedir [12]. Sirke üretiminde birçok hammadde kullanılmaktadır. Bunlar; meyveler (elmalar, üzümler, hurmalar, incirler, erikler, kirazlar vb.) tahıllar (pirinç, sorgum, malt, mısır, çavdar, yulaf), şeker kamışı, bal, Hindistan cevizi, kök ve yumrular (tatlı patates gibi) peynir altı suyudur. Bunların haricinde içinde fermente veya hidrolize edilebilir karbonhidrat içeren tüm gıdalardan sirke yapılabilmektedir [15].

Sirke, yüzyıllardır sağlığa olan yararları bilinen ve sağlık destekleyici etkisi için kullanılmaktadır. Sağlığa olan yararları günümüzde bilimsel olarak araştırılmış, belgelenmiş ve vurgulanmıştır. Sirkenin sağlığa yararlı olmasının sebepleri ise içerdiği; asetik asit, fenolik asitler, flavonoidler, antosiyaninler, amino asitler, karotenoidler, alkaloidler, fitosteroller ve vitaminler gibi çeşitli biyoaktif bileşenlerin varlığından kaynaklanmaktadır. Bu bileşenlerin, insan vücudunda antioksidan, antidiyabetik, antimikrobiyal, antitümör, antiobezite, antihipertansif, antiinflamatuar, yaşlanma karşıtı ve kolesterol düzenleyici gibi etkileri

bulunmaktadır. Ayrıca sirkenin sindirimi kolaylaştırmakta, iştahı azaltmak ve yorgunluk durumlarının hafifletilmesi gibi etkileri de bulunmaktadır [15], [16].

1.2 Tezin Amacı

Gıda endüstrisinde birçok üretim artığı açığa çıkmaktadır. Bunlar hayvan yemi, gıda katkı maddesi ya da kompost yapılarak gübreleme de kullanılmaktadır. Bugüne kadar pektin meyve suyu artıklarından ya da şeker üretim artıklarından ekstrakte edilmiştir. Bu çalışma da elma ve elma posasına sirke fermantasyonu uygulanmıştır. Ardından sirke üretim artıklarından pektin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla;

1. Küp küp doğranmış elma ve meyve suyu artığı olan elma posasına kontrollü şartlarda öncelikle alkol fermantasyonu ardından asetik asit fermantasyonu uygulanmıştır. Daha sonra her iki sirkenin posaları süzülüp kurutulmuştur. Karşılaştırma da kullanmak için işlem görmemiş elmanın posası da kurutulmuştur.
2. Sirke fermantasyonu sırasında fizikokimyasal analizler yapılmıştır.
3. Fermantasyon sonrası sirkelerin şeker içeriği, organik asit, fenolik madde ve antioksidan aktivitesi tespit edilmiştir.
4. Elma posası, elma sirkesi posası ve elma posası sirkesi posasından pektin ekstraksiyonu yapılarak fizikokimyasal, yapısal, reolojik ve termal özellikleri karşılaştırılmıştır.

1.3 Hipotez

Bu çalışmanın hipotezi;

Elma pektini üretiminde, elma suyunun posası yerine, elmadan yapılan sirkenin posası ve elma suyu posasından yapılan sirkenin posası kullanıldığı zaman, elde edilen pektinin fizikokimyasal, yapısal, termal ve reolojik özelliklerinde kontrol pektine göre farklılık göstereceği şeklindedir.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Atıkların Geri Kazanımı

Meyvelerin israfı genellikle; yüksek miktarda üretim ve aynı zamanda ikinci veya üçüncü kalite sınıfında değerlendirilmesi şeklinde olmaktadır. FAO'ya göre dünya genelinde hasattan dağıtıma kadar geçen süreçte üretilen meyvelerin % 21,6'sı israf edilmektedir. Meyvelerin alternatif olarak kullanılacakları meyve suyu, reçel, meyve püresi gibi yerler olmasına rağmen çoğu zaman tarlada çürümeye bırakılmaktadır ya da atık olarak bertaraf edilmektedir. Bu tür durumlar ekolojik ve aynı zamanda ekonomik sorunlara yol açmaktadır. Bu durumları önlemek için üretim fazlası ya da 2. ve 3. kalite meyvelerin alternatif olarak değerlendirilmesi gerekmektedir. Sirke endüstrisi için bazı seçenekler şunlardır; meyvelerin sirke maserasyonu, sirkenin meyve lifleri ile zenginleştirilmesi veya meyvelerin sirke üretiminde kullanılmasıdır [17]. Ticari olarak mevcut pektin çoğunlukla üç ana kalıntıdan elde edilir: şeker pancarı posası, narenciye kabuğu ve elma posası. Narenciye ve elma işleme atıklarından elde edilen kalıntılar, pektin için zengin ve tercih edilen kaynaklardır [18].

Elma (Malus sp.) endüstrisi, posa, tohumlar ve kabuklar da dahil olmak üzere atık üretmektedir. Elma posası ve kabuk atıkları zengin ve çok yönlü pektin kaynakları olarak rapor edilmektedir. Yıllık olarak yaklaşık 84,7 milyon ton elma üretilmektedir. Bunun yaklaşık olarak % 25–30'u posadan oluşmaktadır. Elmadan çıkan yan ürünler, çözünmeyen karbonhidratlar (lifler), monosakkaritler ve disakkaritlerden oluşmaktadır. Bu atıkların öncelikle sirke üretiminde kullanılması ve ardından elde edilen sirke atıklarından pektin elde edilmesi döngüsel ekonomiye katkı sağlamaktadır [19].

2.2 Sirkenin Tarihçesi

Antik çağlardan bu yana insan beslenmesinin bir parçası olan sirke; koruyucu madde, baharat, aromatik katkı ve hatta sağlıklı bir içecek olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Tedavi edici özellikleri nedeniyle geleneksel olarak antik tıpta da kullanılmıştır [17]. Sirkenin tarihçesine bakıldığında dünyanın en eski asetik asit

ile seyreltilmiş ürünlerinden biri olduğu görülmektedir [20]. Antik çağlarda sirke, şarabın hava ile teması sonucu bozulmasıyla oluşan bir ürün olarak bilinmektedir [10]. 10.000 yıl öncesine dayanan bir kullanımı olduğu bilinmektedir. Babilliler meyve, bal ve arpa ile tatlandırılmış sirkeleri 6.yüzyıla kadar satmışlardır [16], [21]. Hipokrat yaraların tedavisinde M.Ö 460-377 yılları arasında sirkeyi kullanmıştır. 18.yüzyılda ABD'de doktorlar krup, karın ağrısı, yüksek ateş ve ödem gibi hastalıkların tedavisinde sirke kullanmıştır. 1999 yılında Amerika Birleşik Devletlerinde Uluslararası sirke müzesi açılmıştır [10].

2.3 Sirke Hakkında Genel Bilgi

Sirke; üretimde herhangi bir karbonhidrat kaynağından (nişasta veya serbest şeker) iki aşamalı fermantasyon ile üretilmektedir. Birincisi alkol fermantasyonu olup diğeri asetik asit fermantasyonudur [17]. Codex Alimentarius Komisyonu'na göre, sirke, insan tüketimi için uygun olan ve nişasta veya şeker içeren uygun ürünlerden çift fermantasyon süreçleri olan alkolik ve asetik asit fermantasyonu ile üretilen bir sıvıdır. Sirke, % 0,5'ten fazla alkol içermemelidir ve Avrupa yasalarına göre fermantasyon sirkesi için stabilizatör kullanımına izin verilmemektedir. Sirke kendisi en az 50 g/L (a/h) oranında asetik asit içermelidir [13].

FDA, Federal Gıda, İlaç ve Kozmetik Yasası altında sirke için açıklayıcı standartları bulunmadığını belirtmektedir. Ancak, FDA doğal sirke türleri için tatmin edici bir kılavuzun, 100 mL başına 4 g'dan fazla asetik asit içermeleri gerektiğini düşünmektedir [19].

TSE 1880 EN 13188 [14] sirke standardına göre sirke; " tarım kökenli sıvılar veya diğer maddelerden, iki aşamalı alkol ve asetik asit fermantasyonuyla, biyolojik yolla üretilen kendine özgü ürün" olarak tanımlanmaktadır. Sirke standardına göre çeşitleri, kullanılan hammaddelere göre; meyve sirkesi, meyve şarabı sirkesi, şarap sirkesi, elma şarabı sirkesi, tahıl sirkesi, alkol sirkesi, malt sirkesi, aromalı sirke ve diğer sirkeler olarak verilmiştir.

Sirke, ketçaplar, salata soslarında kullanıldığı gibi aynı zamanda suyla karıştırılarak içecek olarak da kullanılmaktadır [21]. Sirke dünya genelinde en yaygın kullanılan ürünlerden bir tanesidir. Her ülkede farklı çeşitleri mevcuttur. Birçok hammadde kullanılarak farklı fermantasyon yöntemleriyle üretilebilmektedir. Üretilen sirkenin organoleptik ve kimyasal özellikleri birçok faktöre göre değişkenlik

göstermektedir. Üretilen sirkeler kullanılan ham maddeye göre 3 kategoriye ayrılmaktadır. Bunlar; meyve sirkeleri (elma sirkesi, mango sirkesi ve ananas sirkesi), sebze sirkeleri (pirinç sirkesi, soğan sirkesi ve domates sirkesi) ve hayvansal sirkeler (bal sirkesi ve peynir altı suyu sirkesi) [20]. Geleneksel sirke üretiminde içinde şeker bulunan hammaddelerden sirke yapılmaktadır. Süreç iki aşamadan oluşmaktadır. Başlangıçta alkol fermantasyonu olur ve daha sonra asetik asit fermantasyonu başlar. Starter kültür olarak da genellikle doğal sirke kullanılır. Endüstriyel sirke üretimi ise oldukça kısa sürmektedir. Genellikle bir gün içinde üretilir [16]. Üzüm sirkesi dünya genelinde en çok üretilen sirke olmak üzere, onun haricinde pirinç, sake sirkesi, malt sirkesi veya üzüm dışındaki diğer meyveler onu takip etmektedir. Elma sirkesi günümüzde oldukça popüler sirkedir. Birçok yararı bulunmaktadır. Bunlardan bazıları; kilo kaybı, tip 2 diyabeti olanlarda kan glukoz seviyelerinin düşürülmesi ve kalp hastalıkları riskinin azaltılmasıdır [17].

Sirke türlerinin aroma profilleri birbirinden farklıdır. Aromayı etkileyen faktörler; sirkenin üretildiği bölgenin ortamı, hammadde, mikroorganizma türü (başlangıç kültürü), modern ya da geleneksel yöntem ile üretilmesi, olgunlaştırma süresi, üretim sırasında kullanılan kaplardır [22].

2.4 Sirke Çeşitleri

2.4.1 Meyve Sirkeleri

Popüler ve doğal ürünlerden biri olan meyve sirkeleri birçok insanın günlük diyetinde önemli yer tutmaktadır. Meyve sirkesi fermantasyonu sırasında organik asitler, polifenoller, melanoidinler ve tetrametilpirazin gibi fonksiyonel maddeler üretilmektedir. Özellikle asetik asit gibi organik asitler başta olmak üzere ve polifenoller meyve sirkesinin yararını arttırmaktadır [23]. Meyve sirkesi üzüm, ananas, kızılcık, muz ve üzüm gibi birçok meyveden yapılmaktadır. Dünya çapında balzamik sirkesi ve şeri sirkesi gibi tanınmış meyve sirkeleri bulunmaktadır. Ayrıca şeri sirkesi Avrupa'da coğrafi işaretli ürün olarak bilinmektedir [21].

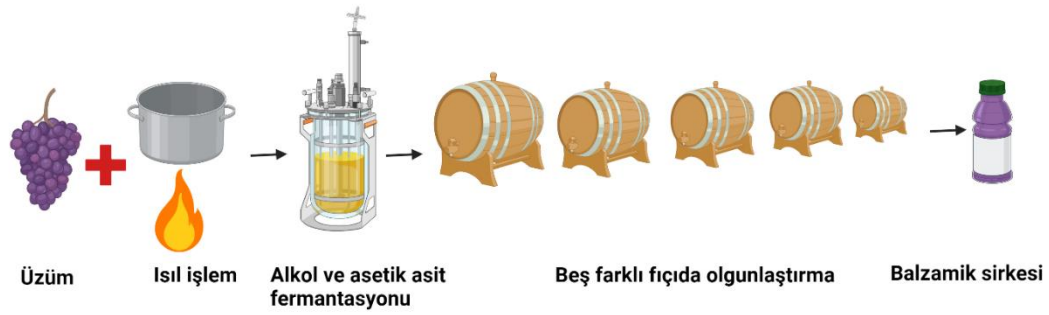
2.4.2 Hububat Sirkerleri

Tahıl sirkelerinin hammaddeleri; sorgum, pirinç, buğday, mısır, arpa ve diğer nişastaca zengin malzemelerdir. Tahıl sirkesinin diğerlerinden farklı olarak fermantasyonu 3 aşamadan oluşmaktadır. İlk aşaması nişastanın fermente edilebilir şekerlere sakkarifikasyonudur. Ardından alkol fermantasyonu ve son olarak da

asetik asit fermantasyonu yapılmaktadır. Mikrobiyotası da diğerlerinden farklı olarak *Aspergillus* spp., laktik asit bakterileri, asetik asit bakterileri ve çeşitli *Saccharomyces ve Saccharomyces* olmayan mayalardan oluşmaktadır. Dünya genelinde tahıl sirkesi çoğunlukla pirinçten yapılmaktadır. Asya ülkelerinde tahıl sirkesi oldukça yaygındır [15].

2.4.3 Balzamik Sirkeleri

Avrupa kıtasında en çok bilinen sirke türlerinden biridir. İtalyanın Modena ve Reggio Emilia bölgelerinde üretilmektedir. Adını tıbbi merhem anlamına gelen "balm" dan almıştır. Veba gibi önemli hastalıkların mücadelesinde kullanılmıştır. 2000 yılında ürünü korumak için belge alınmıştır ve sadece 2 eyalette üretilmesine izin verilmiştir. Bunlar; Modena geleneksel balzamik sirkesi veya Reggio Emilia geleneksel balzamik sirkesi adları ile üretim izni verilmiştir. Üretim aşaması diğerlerinden farklı olarak başlangıçta üzüm bir miktar ısıtılmaktadır. Fermantasyon sürecinde ise diğerleri gibi iki aşamalı alkol ve asetik asit fermantasyonu gerçekleşmektedir (Şekil 2.1). Bu işlem sırasında 5 ahşap fıçı kullanılmaktadır. Kullanılan fıçıların hammaddeleri dut, kiraz, kestane, meşe veya ardıç olabilir. Kullanılan fıçının özelliği ile sirke başka bir aromatik özellik kazanmaktadır. Fermantasyon süresi en az 12 yıldır [24].



Şekil 2.1 Balzamik sirkesi üretimi

2.4.4 Diğer Sirkeler

Sirke meyve, sebze, tahıllardan elde edildiği gibi aynı zamanda peynir altı suyundan ve baldan da üretilebilmektedir. Peynir endüstrisinin yan ürünü olan peynir altı suyundan sirke üretimi alkol ve asetik asit olmak üzere iki aşamalı fermantasyon ile yapılmaktadır. Meyve sirkesi üretiminden farklı olarak alkol fermantasyonu

sırasında doğrudan laktozu fermente eden *Kluyveromyces marxianus* kullanılmaktadır [25].

2.5 Sirke Fermantasyonu

Sirke iki aşamalı fermantasyon ile üretilmektedir. Bunlar alkol fermantasyonu ve asetik asit fermantasyonudur. Alkol fermantasyonu sırasında *Saccharomyces* türleri fermente edilebilir şekerleri etanole dönüştürür (Şekil 2.2). Ardından *Acetobacter* türleri etanolü asetik aside çevirir. Bu süreçte meyvenin yapısında doğal olarak bulunan birçok uçucu bileşik, polifenoller, organik asitler ve diğer maddelerde değişimler meydana gelmektedir [17].

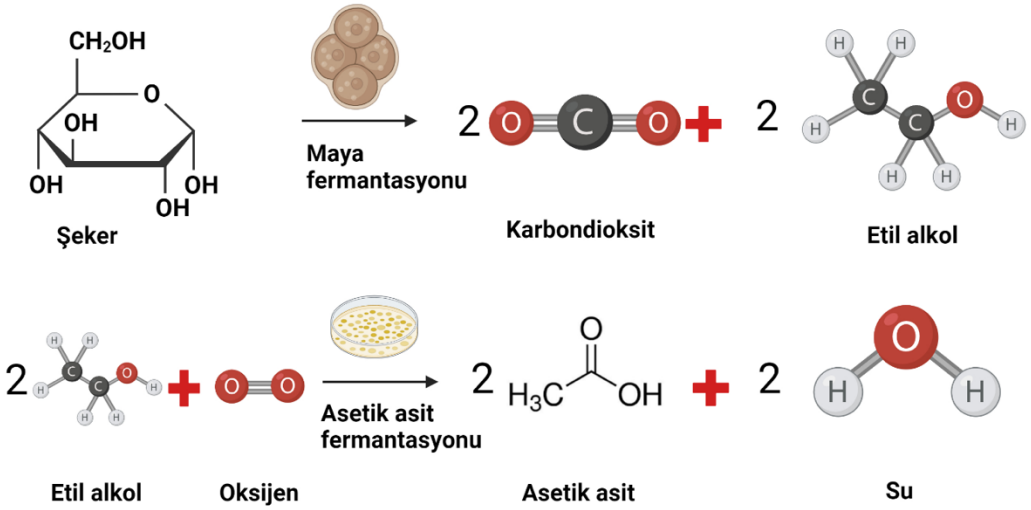
2.5.1 Alkol Fermantasyonu

Alkol fermantasyonu sirke üretiminde kritik rol oynamaktadır. Alkol fermantasyonunun süresi; kullanılan meyveye, şeker düzeyine ve meyvenin ezilmiş, doğranmış olması gibi durumlara bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Aynı zamanda substrat bileşimi, kullanılan mayanın alkol toleransı, pH, şeker konsantrasyonu ve sıcaklık alkol fermantasyonunu etkileyen önemli parametrelerdir. Genellikle sıcaklık ve şeker konsantrasyonunu arttırmak fermantasyonun hızını arttırmaktadır. pH değeri genellikle kullanılan meyveye göre 3,5 - 5 arasında değişmektedir. Yüksek şeker konsantrasyonu osmatik basıncı ve ortamın viskozitesini arttırmaktadır. Bu durum mayanın çoğalmasını ve etanol üretimini olumsuz etkileyebilmektedir. Mayaların iyi bir şekilde çalışabilmesi için ortamdaki şeker konsantrasyonunun % 20 'yi geçmemesi önerilir [17]. Alkol fermantasyonu anerobik ortamda 20 - 30 ºC'de gerçekleştirilir. Geleneksel üretimlerde genellikle spontan alkol fermantasyonu, endüstriyel ölçeklerde ise starter kültür kullanımı uygulanır [20]. Alkol fermantasyonunda yaygın olarak kullanılan maya türü *Saccharomyces cerevisiae'*dır. Alkol fermantasyonu sırasında *Saccharomyces cerevisiae* haricinde, laktik asit bakterileri (*Lactobacillus fermentum, L. plantarum, L. buchneri, L. casei), Candida* spp.*, Cryptococcus* spp. *ve Debaryomyces* spp gibi türler de bulunmaktadır [21].

2.5.1 Asetik Asit Fermantasyonu

Asetik asit fermantasyonu, etanolün asetik aside aerobik şartlarda okside olmasıdır. Bu biyotransformasyon asetik asit bakterileri tarafından gerçekleştirilir. Sirke üretiminin en önemli sürecidir. Sirkenin baskın aromasının oluşması ve toplam

asitliğinin üretilmesinde bu aşamanın rolü büyüktür. Kullanılan hammadde ve uygulanan fermantasyon yöntemine göre mikrobiyal çeşitlilik farklılık göstermekte olup en yaygın izole edilen asetik asit bakterileri *Acetobacter, Gluconacetobacter ve Gluconobacte*r cinslerdir. *Gluconobacterler* glukozu glukonik aside ve daha sonra etanole çevirme görevinde oldukları için hem alkol hem de asetik asit fermantasyonunda görev almaktadır [20].



Şekil 2.2 Alkol ve asetik asit fermantasyonu

2.6 Sirkenin Sağlık Üzerine Etkisi

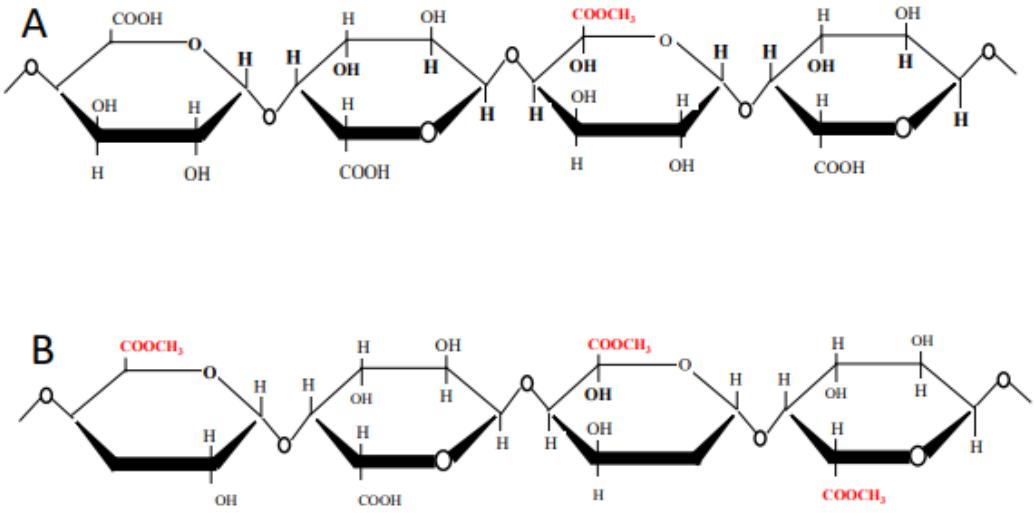
Flavonoidler, antosiyaninler ve diğer fenolikleri içeren polifenol açısından zengin gıdalar ile beslenmek birçok hastalığı önleyici etkide bulunmaktadır. Sirke yüksek antioksidan aktivite ve antimikrobiyal özellikleri sayesinde beslenmemizde önemli bir yere sahiptir [10]. Fenolik bileşikler, flavonoidler, antosiyaninler, asetik asit, karotenoidler, amino asitler, fitosteroller ve vitamin gibi biyoaktif bileşikleri yapısında bulunduran sirke birçok hastalığa iyi gelmektedir [15]. Her sirke çeşidinin farklı bir işlevi bulunmaktadır. Bazı kaynaklar sirke türlerinin geleneksel Çin tıbbında kullanıldığını göstermektedir. Sirkenin etki ettiği hastalıklar; yorgunluğu azaltma, kan basıncını ve kan glikozunu dengelemek, obeziteyi önlemek [20], sindirim sistemi yardımcısı, iştah uyarımı etkileri de bulunmaktadır [26].

2.7 Pektin

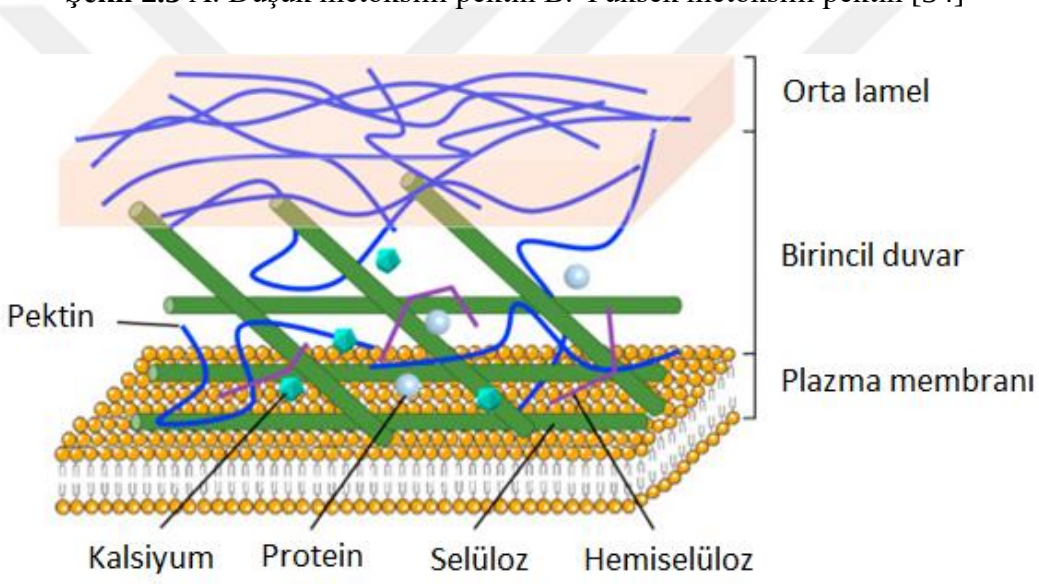
2.7.1 Pektinin Kimyasal Yapısı

Pektinler son derece kompleks biyopolimerler olup yüksek yapısal çeşitliliğe sahiptirler (Şekil 2.5). D-galaktronik asit (GalA) açısından zengin polimerlerden oluşmaktadır. [27]. Pektinde toplamda 17 farklı şeker bulunmaktadır [28]. Pektinin ana zincirini oluşturan GalA'lar birbirine α-(1,4) glikozidik bağlar ile bağlanıp galakturononlar olarak adlandırılırlar [29]. Bitkilerin hücre duvarında homogalakturonan (HG), rhamnogalakturonan I (RG I), rhamnogalakturonan II (RG II) ve ksilogalakturonan (XGA) şeklinde dört tip galakturonan bulunmaktadır. HG, pektinde en çok bulunan bölge olup düz bölge olarak adlandırılır. RG-I, RG-II ve XGA ise karmaşık yapılarından dolayı dallanmış bölge olarak adlandırılmaktadır. HG pektinin yaklaşık % 65'lik kısmını oluşturmaktadır. RG-I % 20 - %35'ni oluştururken, XGA ve RG-II % 10'nun altında minör bileşenleri oluşturmaktadır. HG bölgesinde GalA'a O-Asetil, O-Metil, XGA; GalA'a D-Ksiloz, O-Asetil, O-Metil, RG-II'de GalA'a D-Apiose, L-Galaktoz, L-fruktoz, D-Glukoronik asit, D-Ksiloz, L-Arabinoz, L-Asetik asit, L-fukoz, borat, O-Asetil, O-Metil, RG-I'de ise GalA'a D-Galaktoz, L-Arabinoz, L-Galaktoz, O-Asetil şekerleri bağlanmaktadır [18], [28], [30]. HG = GalA (% mol) − Rha (% mol); RG-I = 2Rha (% mol) + Ara (% mol) + Gal (% mol) formülleri kullanılmaktadır [30]. HG, kısmen metil esterleştirilmiş GalA'den oluşan lineer bir polimerdir. Metil grupları C-6 pozisyonunda esterleşmiştir. C-2 ve C-3 ise O-asetillenebilir. RG-I meyve ve sebzelerin primer hücre duvarında yüksek miktarda bulunmaktadır. RG-I bölgesi, GalA ve Rha omurgasından oluşur. Rha omurgasında O-4 ve O-3 pozisyonuna bağlı nötr yan zincirler bulunur. RG-I'in diğer bölgelere göre prebiyotik, immünomodülatör ve anti-apoptatik etkisi yüksektir. Son zamanlarda pektin ekstrakte edilirken HG bölgesi düşük, RG-I bölgesi yüksek pektinler elde edilmeye çalışılmaktadır [31]. RG-II ise yaklaşık dokuz adet 1,4-bağlı α-D-GalA asitten oluşan HG omurgasını içermektedir ve bu omurgaya bağlı farklı hetero-oligomerik yan zincirlerden meydana gelmektedir [32].

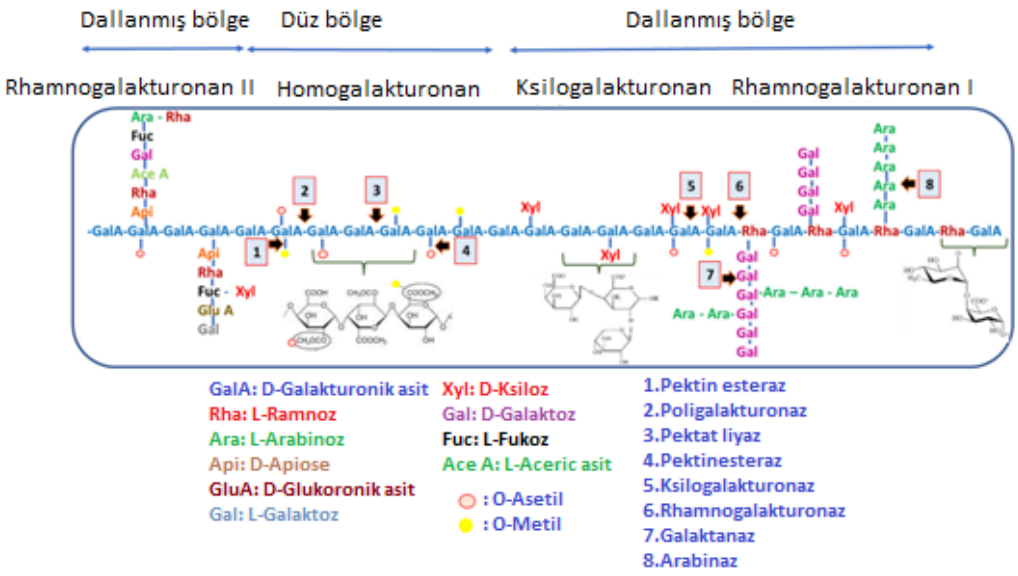
Pektin, bitkilerin toplam taze ağırlığının % 0,5 ila % 4,0' ünü oluşturmaktadır [33]. Orta lamella içinde bulunan bir makromolekül olan pektin, primer hücre duvarının kuru kütlesinin % 30 kadarını oluşturmaktadır (Şekil 2.4) [32].



Şekil 2.3 A. Düşük metoksilli pektin B. Yüksek metoksilli pektin [34]



Şekil 2.4 Meyve hücre duvarındaki pektin formu [34]



Şekil 2.5 Pektinin kimyasal yapısı [18], [35]

2.7.2 Pektin Enzimleri

Pektin maddelerinin de-esterifikasyon ve depolimerizasyon reaksiyonlarıyla parçalanmasını katalize eden kompleks ve heterojen enzim grubu pektinazlar olarak tanımlanmaktadır. Bitki hücre duvarlarının parçalanmasında endüstriyel olarak kullanılmaktadır [36]. De-esterifikasyon enzimleri; pektin metil esteraz ve pektin asetil esteraz enzimleridir. Bu enzimler metoksil ve asetil kalıntılarını parçalamaktadırlar. Pektin metil esteraz enzimi metil ester gruplarını GalA'lardan ayırmaktadır [37]. Pektin asetil esteraz enzimi ise pektin asetil esteriniz hidrolize ederek pektik asit ile asetat oluşturmaktadır [38]. Depolimerizasyon enzimi ise homogalakturonanları parçalar. Poligalakturonaz, pektin liyaz ve pektat liyaz depolimerazasyon enzimleridir. Poligalakturonaz α-(1,4) glikozidik bağlarını hidroliz etmektedir. Pektat liyaz poligalakturonik asitteki glikozidik bağları transeliminasyon reaksiyonu olacak şekilde kesmektedir. Pektin liyaz ise esterleşmiş homogalakturonan üzerine etki etmektedir [18]. Saçlı bölgede yer alan XGA'ları parçalamak için ksilogalakturonaz enzimi kullanılmaktadır. Bu enzim ksiloz-galakturonik asit arasındaki glikozidik bağları parçalayarak ksiloz ve galakturonat dimerleri oluşturmaktadır. RG-I'in parçalanmasında birçok enzim çalışmaktadır. Asetil grupların parçalanmasında rhamnogalakturonan asetilesteraz, arabinozun parçalanmasında arabinaz, galaktoz için galaktaz, arabinogalaktoron için arabinagalaktaz görev almaktadır. Omurganın parçalanmasında endo ve egzo

enzimler görev almaktadır. Endo olarak göre alan enzimler; rhamogalakturonan hidrolaz ve rhamnogalakturonan liyazlardır. Egzo olarak görev alan enzimler ise rhamnogalakturonan α-1,2-galakturonohidrolaz, rhamnogalakturonan α-L-rhamnopyranohidrolaz doymamış rhamnogalakturonil hidrolaz ve egzo-rhamnogalakturonan liyazdır. RG-II'nin parçalanmasında görev alan enzimler ise β-d-glukuronidaz , β-l-arabinofuranozidazdır [39].

2.7.3 Pektin Kaynakları

Ticari pektinler asidik ekstraksiyon yöntemiyle ekstrakte edilmektedir. Genellikle pH 1,5 - 3 ve 60 - 100 ºC aralığında ekstraksiyon yapılmaktadır. Ticari olarak kullanılan pektin kaynakları genellikler; limon, portakal kabuğu, elma posası ve şeker pancarı küspesidir [34]. Ticari üretilen pektinin % 58,5'i narenciye kabuklarından % 14'ü elma posasından % 0,5'i de şeker pancarından elde edilmektedir. Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan pektin E440 kodu ile etiketlenmektedir [40]. Elma posası kuru maddede % 10 - 15 oranında pektin içerirken narenciye kabukları % 20 - 30 oranında pektin içermektedir. Bunların haricinde son zamanlarda farklı kaynaklardan da pektin ekstarkte edilmektedir. Bunlar karpuz kabukları (% 13 - 30) [34], pomela kabukları (% 3,11) [41], ponkan kabuğu (% 25,6) [42], nar kabuğu, havuç posası, domates kabukları, nohut kabukları, yeşil fıstık kabukları, şeftali posası [43], kakao kabukları, mango kabukları, çarkıfelek kabuğu, jak meyvesi kabuğu patlıcan kabuğu, papatya atığıdır [44].

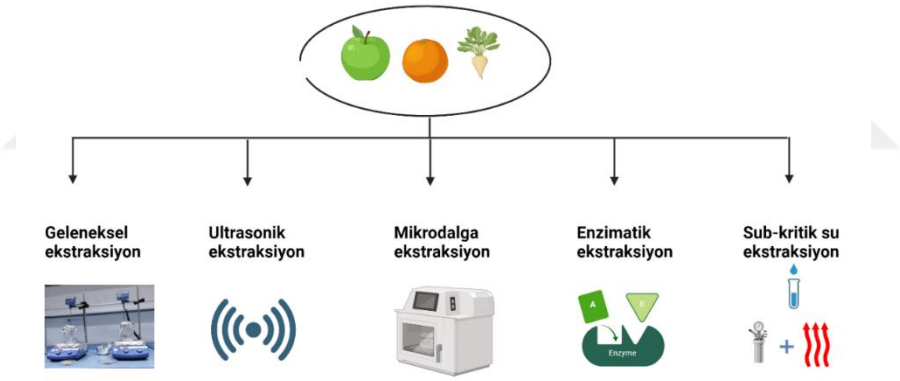
2.7.4 Pektinin Kullanım Alanları

Yüksek metoksilli pektin gıda endüstrisinde genellikle jelleştirici ajan olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda stabilizatör, emülsifiye edici ve kalınlaştırıcı görevleride bulunmaktadır. Düşük metoksilli pektin ise kaloriyi düşürmek için dondurma ya da fırıncılık ürünlerinde yağ yerine kullanılmaktadır. Pektin gıda endüstrisinde; reçeller, jöleler, tatlılar, asitli süt bazlı içecekler, şekerlemeler, kompostolar, dondurulmuş ürünler, et ürünleri, soslar, düşük kalorili gıdalar (yağ ve şeker alternatifi olarak) ve yenilebilir film üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır [44], [45]. Çözünür katı miktarı düşük olan konservelerde pektin, çözünür katı miktarını artırmak için kullanılmaktadır [45], [46]. Pektin emülsifiye ürünlerde stabilizatör olarak kullanılmaktadır [44], [45]. Fırın ürünlerinde (bazı

fırın ürünleri jel içerebilir) jelin ısınma sırasında yağlanmaması, hamur ve jel arasındaki sınır tabakasının korunması için önemlidir. Yüksek metoksilli pektin, yoğurt veya süt/meyve içecekleri gibi düşük pH'lı protein dispersiyonlarının stabilizatörü olarak görev alarak kazein çökelmesinden kaynaklanan çökme sorunlarını önlemektedir [45], [46]. Pektin dondurulmuş gıdalarda, dondurulma sırasında buz kristallerinin büyümesini önlemekte ve gıdanın kalitesini korumaktadır. Ayrıca çözünme sırasında salınan su miktarını önemli ölçüde azaltmaktadır [44], [45].

2.7.5 Pektin Ekstraksiyon Yöntemleri

Pektin farklı kaynaklardan ekstrakte edilmektedir (Şekil 2.6). Pektin verimi elde edildiği kaynağa ve uygulanan ekstraksiyon yöntemine göre değişkenlik göstermektedir. Verimin yanında kullanılan ekstraksiyon yöntemi pektinin esterleşme derecesi, molekül ağırlığı, kompozisyonu, saflık derecesi ve renginde de farklılıklar meydana getirmektedir [18].



Şekil 2.6 Pektin ekstraksiyon metotları

Geleneksel Ekstraksiyon

Geleneksel ekstraksiyon yönteminde asitler ve/veya şelatlayıcılar kullanılmaktadır. Ayrıca alkali koşullar altında da ekstraksiyon yapılmaktadır. Ancak verim oldukça düşüktür. Bu yöntemde hammaddeler asitlendirilmiş sıvıların içinde karıştırılarak ekstraksiyonun gerçekleşmesi sağlanmaktadır. Genellikle hidroklorik asit, nitrik asit, fosforik asit ve sülfürik asit gibi güçlü mineral asitler yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca organik asit olarak; asetik, sitrik, oksalik ve tartarik asitlerde yaygın olarak kullanılmaktadır [18]. Ca^{+2} pektinin hücre duvarının oluşumunu sağlayan mineraldir. Sitrik asit, okzalik asit, amonyum oksalat, sodyum

heksametafosfat, sikloheksandiamin tetraasetik asit veya etilendiamintetraasetik asit gibi şelatlayıcı ajanların varlığı, Ca^{2+} iyonlarını yakalamaya ve pektini serbest bırakmaya yardımcı olabilmektedir [47]. Şelatlayıcı ajan içeren ekstraksiyon çözücüleri, sadece asidik çözeltilerden daha fazla miktarda pektin çıkarabilmektedir [48]. Asit ekstraksiyonu pH 1 - 3, sıcaklık 80 - 100 ºC, süre 0,5 - 6 saat olacak şekilde, sürekli karıştırılarak gerçekleşmektedir. İşlemin mekanizması kullanılan asit hücre duvarındaki karmaşık çapraz bağları hidroliz ederek pektinin çözünmesini ve buna bağlı olarak salınımının olmasını teşvik etmektedir. Uygulanan yüksek sıcaklık ise bu işlemi kolaylaştırmaktadır. Kullanılan asit türü (organik-güçlü asit) ekstraksiyon sıcaklığı, katı-sıvı oranı, ekstraksiyon süresi ve kullanılan asit konsantrasyonu pektin verimini etkileyen önemli parametreler arasındadır. Alkali ortamda ekstraksiyonda pH 9 - 13 sıcaklık 32 - 80 ºC arasındadır. Ekstraksiyon sürekli karıştırılarak gerçekleştirilmektedir. İşlemin mekanizması alkali çözeltilerdeki hidroksil iyonları selüloz ve diğer polisakkaritler arasındaki hidrojen bağlarını bozmaktadır. Alkali ortamlar, selüloz ve hemiselülozun çapraz bağlı yapılarının parçalanmasına yardımcı olarak pektinin açığa çıkmasını sağlamaktadır [32].

Ultrasonik Ekstraksiyon

Ultrasonik ekstraksiyonda frekans aralığı 20 - 100 kHz'dir [34]. Ultrason dalgaları kavitasyon baloncukları oluşturmaktadır. Oluşan balonlar hücre duvarının bütünlüğünü bozarak çözücünün hücre duvarına nüfusunu kolaylaştırmaktadır. Bu yöntemin en büyük avantajlarından biri düşük miktarda çözücü kullanılmasıdır. Aynı zamanda düşük sıcaklık ve düşük enerji tüketimi sağlamaktadır [45].

Mikrodalga Ekstraksiyon

Mikrodalga destekli ekstraksiyonda, iyonlaştırıcı olmayan radyasyon kullanılır. Bu radyasyon, iyonik iletim ve dipol dönüşüme neden olmaktadır. Bu iki mekanizma sinerjik olarak hızlı bir ısınmaya yol açmaktadır. Isı, küçük moleküllerin transferini hızlandırarak pektin/selüloz/hemiselüloz ağını çökertmeye yardımcı olarak pektinin çözünmesine ve salınmasına katkıda bulunmaktadır [32]. Ekstraksiyon verimini etkileyen en önemli iki parametre mikrodalga gücü ve ışınlama süresidir. Geleneksel yöntem ile karşılaştırıldığında, mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminde daha homojen sıcaklık uygulanır ve daha kısa sürelerde yüksek

verimlerde pektin elde edilebilmektedir. Aynı zamanda bu yöntem ile düşük enerji tüketimi ve az çözücü kullanılması avantaj sağlamaktadır [31].

Enzimatik Esktraksiyon

Enzimatik ekstraksiyonda sıcaklık 35 - 60 ºC, pH 3,5 - 4,5 süre ise 4 - 24 saat aralığında gerçekleşmektedir. Ekstraksiyonun mekanizması kullanılan enzimin bitki hücre duvarını parçalaması, selüloz ve hemiselülozları hidroliz etmesidir. Böylece selüloz/hemiselüloz ağı içinde olan pektin serbest kalmaktadır. Bu yöntemde en çok kullanılan enzimler; selülaz, protopektinaz, hemiselülaz ve ksilanazdır [32].

Sub-Kritik Su Ekstraksiyon

Sub-kritik ekstraksiyonda sıcaklık pektin verimini etkileyen önemli bir parametredir. Uygulanan sıcaklık ile H bağları zayıflar ve ekstraksiyon kolaylaşmaktadır. Burada dikkat edilmesi gereken önemli parametreler sıcaklık ve süredir. Yüksek sıcaklıklar pektini tamamen parçaladığı için verimi düşürebilmektedir. Aynı şekilde yüksek sıcaklıklarda uzun süreli ekstraksiyon pektin verimini düşürmektedir [49].

2.7.6 Pektinin Sağlık Üzerine Etkisi

Pektinin yapılan araştırmalar neticesinde birçok sağlık sorununa iyi geldiği tespit edilmiştir. Bunlar; bağırsakta yavaş çözünmesi sayesinde ishali önleme, kolon kanserini azaltıcı etki, prebiyotik özelliği ile mikrobiyota popülasyonunu güçlendirme, kan kolesterolünü azaltma, karaciğer yağını azaltma, higroskopik özelliği sayesinde bağırsak aktivitesini kolaylaştırma, glikoz emilimini geciktirme, kan basıncını dengeleme, toksik bileşiklerin ve ağır metallerin vücuttan atılmasını sağlama, pankreatik eksojen hormonlar üzerinde etki gösterme ve patojenik bakterilere ve toksinlerine bağlanma faaliyetlerinin önlenmesidir [45].

2.8 Fenolik Maddeler

Fenolik bileşikler, bitkilerdeki ikincil metabolitler olarak sınıflandırılan, çeşitli yapılar ve işlevler sergileyen geniş bir molekül grubunu oluşturmaktadır. Suda çözünebilen bileşikler (fenolik asitler, fenilpropanoidler, flavonoidler ve kinonlar) ve suda çözünemeyen bileşikler (kondanse tanenler, ligninler ve hücre duvarına bağlı hidroksisinnamik asitler) olarak iki gruba ayrılmaktadırlar [50].

Meyvelerdeki fenolik bileşik miktarı, diğer faktörlerin yanı sıra olgunluk derecesine, çeşide, iklime, toprak bileşimine, coğrafi konuma ve depolama koşullarına büyük ölçüde bağlıdır. Fenolik bileşikler içerdikleri fenol halkalarının sayısına göre fenolik asitler, stilbenler, flavonoidler, lignanlar ve tanenler olarak sınıflandırılırlar. Fenolik asitler: P-kumarik asit, kafeik asit, klorojenik asit, ferrulik asit, gallik asit, vanilik asit, siyringik asit olarak Flavonoidler: kuarestin, kaemfenol, myrisetin, rutin, hesperetin, narigenin, epikateşin, kateşin, apigenin, luteolin, delphinidin, siyanidin, malvidin, peonidin, pelargonidin, petunidin olarak stilbenler ise: resvaratrol olarak sınıflandırılmaktadırlar [51].

2.8.1 Fenolik Bileşiklerin Yararları

Polifenollerin biyolojik etkileri (antioksidan, antiviral, antimikrobiyal, anti-tümör ve antibakteriyel aktiviteler) açısından, zararlı etkilere karşı koruma sağlamada rol oynadığı bilinmektedir [51]. Yapılan araştırmalarda biyoaktif bileşiklerin antioksidan etkilerinin tip 1 ve tip 2 diyabetli kişiler üzerinde olumlu etkisi olduğu görülmüştür [52]. Aynı zamanda kanser, alzheimer gibi kronik dejenaratif hastalıklara da iyi geldiği tespit edilmiştir [53].

3
MATERYAL ve METOT

3.1 Materyal ve Kimyasallar

2023 yılı Eylül ayında 50 kg (hasat zamanında) golden elma satın alınmış, ezilmiş ve zarar görmüş olanlar ayrılmış ve kalan (yaklaşık 48 kg) sağlam elma yıkanmış, doğranmış ve elma sirkesi fermantasyonu için kullanılmıştır (Şekil 3.7). Elmaların bir kısmının ise suyu ayrılmış ve kalan posasının bir kısmı sirke yapımı için diğer kısmı ise kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrılan elma posası elma sirkesi üretmek için fermantasyona maruz bırakılmıştır. Her iki sirke üretiminin fermantasyon koşulları aynıdır. Kontrol olarak ayrılan elma posası hava akımlı bir etüvde (55 ºC) 9 saat kurutulmuş (ET) ve ulaşılan son nem içeriği % 7,30±0,22 olarak kaydedilmiştir. Sirke üretimi sonrası kalan posalar elma sirkesi posası (EST) ve elma posası sirkesi posası (ESAT) da aynı koşullarda kurutulmuş ve ulaşılan son nem içerikleri sırasıyla % 10,18±0,01 ve % 5,37±0,14 olarak ölçülerek kaydedilmiştir.



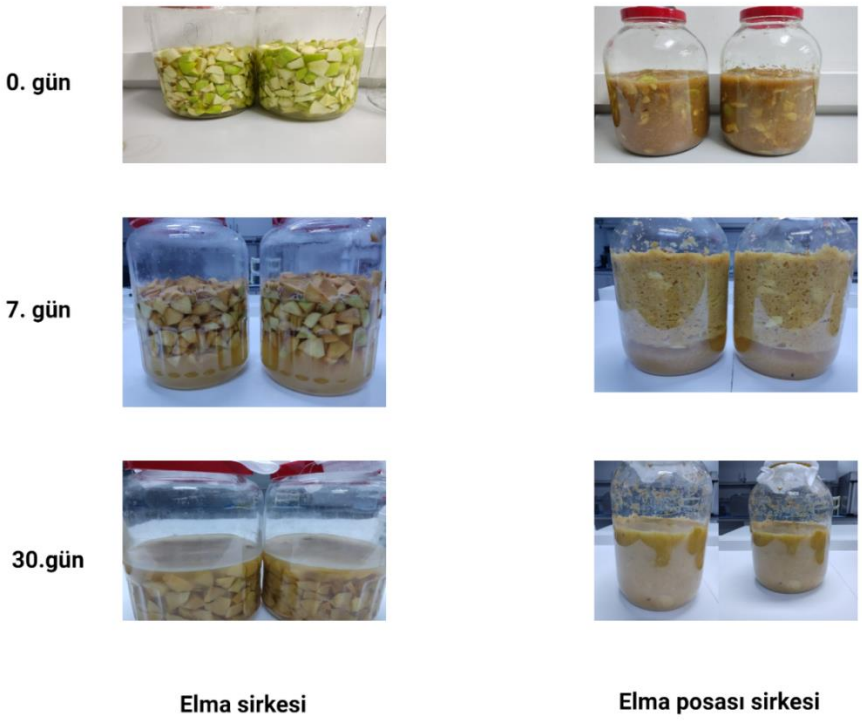
Şekil 3.7 Çalışma için satın alınan Golden elmalar

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar; monosakkarit asit standartları: D-mannoz (Man), D-riboz (Rib), L-rhamnoz (Rha), D-galaktronik asit (GalA), D-glukoz (Glc), D-galaktoz (Gal), L-arabinoz (Ara), D-ksiloz (Xyl) ve L-fukoz (Fuk), ve ayrıca 1-fenil-3-metil-5-pirazolon (PMP), PMMA (polimetilmetakrilat)

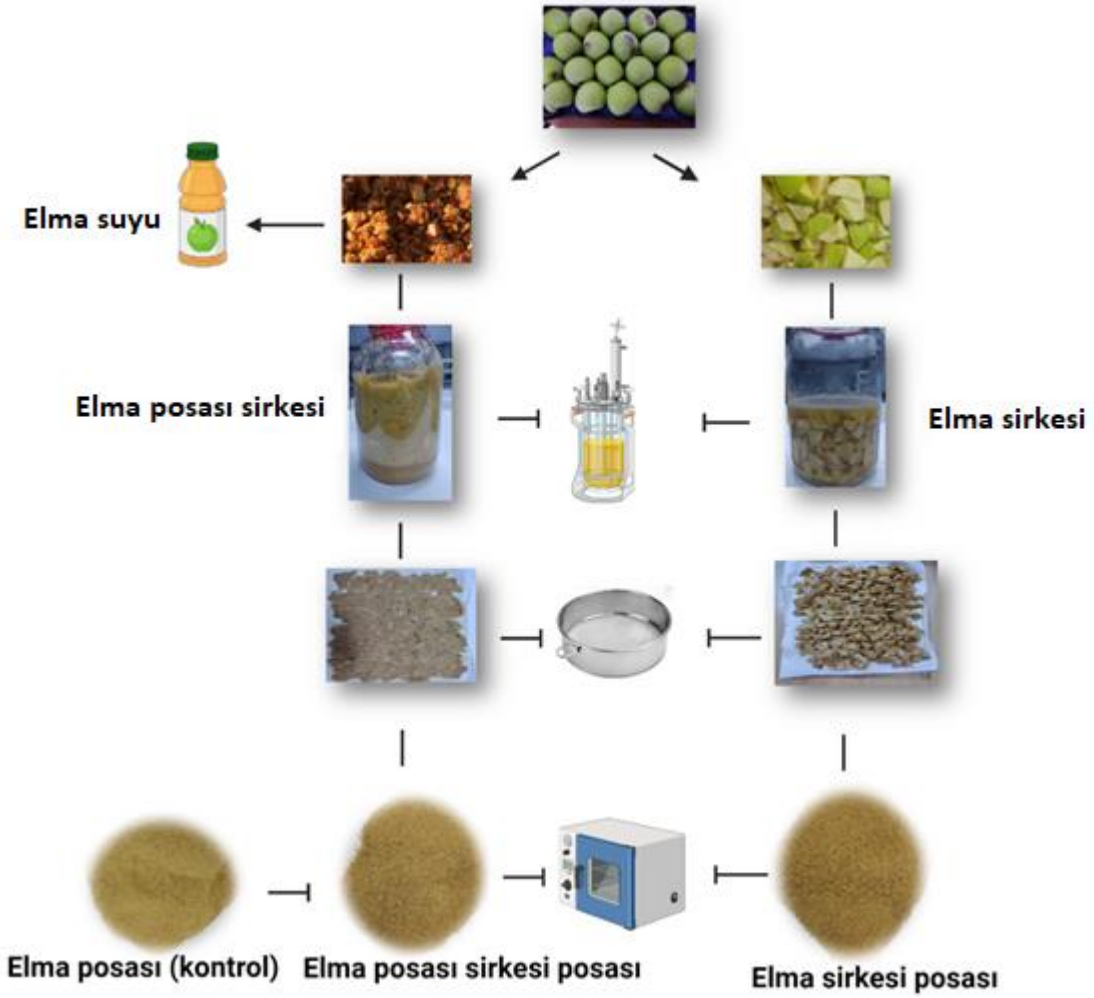
standartları, D_2O (Ağır su), Folin–Ciocalteau reaktanı, sığır serumu albumini (BSA), m-hidroksil bifenil, triflorasetik asit (TFA), hidroklorik asit (HCl), NaOH, aseton, kloroform, etanol şeklinde olup Sigma-Aldrich Ltd. (Steinheim, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

3.2. Kontrollü Şartlarda Sirke Fermantasyonu

Elma sirkesi fermantasyonu için yaklaşık 2 kg elma, 1,5 × 1,5 cm boyutlarında, küp şeklinde doğranmıştır. Elma posasından sirke fermantasyonunda ise yaklaşık 3 kg elma katı meyve sıkacağında sıkılması (Vestel Enerjik, KMS600, Manisa, Türkiye) sonrası ayrılan posa hammadde olarak kullanılmıştır. Küp küp doğranan elmalar ve suyu uzaklaştırılan elma posası 10 L'lik cam kavanozlora yerleştirilmiştir. Daha sonra sırasıyla kavanozlara 5 L su, 10 g bal, 3 g nohut ve 100 mL elma sirkesi eklenmiştir. Alkol fermantasyonu, anaerobik koşullarda 30 ºC'de 7 gün süreyle gerçekleştirilmiş, ardından asetik asit fermantasyonu, aerobik koşullarda 30 ºC'de 23 gün devam etmiştir (Şekil 3.8-3.9). Bu işlemler üç tekrarda aynı şekilde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.8 Elma küpleri ve elma posasına uygulanan sirke fermantasyonu (0, 7 ve 30. gün)



Şekil 3.9 Pektin üretiminde kullanılacak posaların elde ediliş aşamaları

3.3 Sirke Fermantasyonu Boyunca Yapılan Fizikokimyasal Analizler

3.3.1 pH Tayini

Sirke fermantasyonu boyunca 1., 3., ve 4. haftalarda pH değerleri pH metre (Mettler Toledo S-220-K SevenCompactTM, Ohio, ABD) ile ölçülmüştür. Her örnekte en az 3 kez okuma yapılmıştır.

3.3.2 Titrasyon asitliği

Sirke fermantasyonu boyunca 1., 3., ve 4. haftalarda titrasyon asitliği asetik asit cinsinden analiz edilmiştir. Bunun için; 10 mL örnek erlene alınmış % 1'lik fenolfitalein çözeltisinden 3 damla damlatılmıştır. 0,1 N NaOH çözeltisi ile pembe

renk oluşuncaya kadar titre edilmiştir. Sarfiyat not edilmiştir. Titrasyon asitliği aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır. Her örnekten 3 kez ölçüm yapılmıştır.

$$(VxFxEx100)/M \quad (3.1)$$

F: Titrasyonda kullanılan baz çözeltisinin faktörü

V: Harcanan 0,1 N NaOH miktarı, mL

M: Titre edilen örneğin miktarı mL veya g

E:1 mL 0,1 N NaOH'ın eşdeğeri asit miktar, g (asetik asit cinsinden)

3.3.3 Briks

Suda çözünür kuru madde (Briks) tayini için el refraktometresi (Schmidt Haensch, Hr32b) kullanılmıştır. Örnekler analiz edilmeden önce el refraktometresi saf su ile sıfırlanarak kalibre edilmiştir. Sirkeler filtre edildikten sonra prizma üzerine aktarılıp briks değerleri tespit edilmiştir [54]. Her örnekte 3 kez ölçüm yapılmıştır.

3.3.4 Alkol Tayini

Etil alkolün miktarsal olarak tespitinde gaz kromatografisi kütle spektroskopisi tekniğinden yararlanılmıştır. GCMS-QP2010 (Shimadzu, Japonya) gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi cihazı kullanılmıştır. Bileşen doğruluk testi için cihazın sahip olduğu ticari kütüphaneler (NIST27 ve WILEY7) kullanılmıştır. GCMS-QP2010 birlikteliğinde CTC-Combi-PAL-oto örnekleyici kullanılmıştır. Uçucu bileşen analizlerinde kromatografik ayırmanın sağlanması için Restec (Bellefonte, USA) Rtx-5MS silika kapiler kolon (30 m × 0,25 mm (iç çap) x 0,25 μm) kullanılmıştır. Sistemdeki taşıyıcı gaz 1 mL/dk akış hızı ile helyum olup enjektör ve dedektör sıcaklıkları 250 ºC olarak ayarlanmıştır. Kolon sıcaklık programı 45 ºC değerinde 10 dk süre olacak şekilde ayarlanmıştır. İyonizasyon voltaj değeri 35 - 375 amu kütle tarama aralığında 70 eV olarak tercih edilmiştir. Analizde gaz kromatografisine uygun saflıkta (GC-grade) etil alkol standardı (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. Alkol tayini yapılacak sirke örnekleri 0,45 μm'lik polietilen politetrafluoroetilen (PTFE) filtrelerden (Membran Solutions) süzülmüştür. Sonuçlar % olarak ifade edilmiştir.

3.3.5 Organik Asit

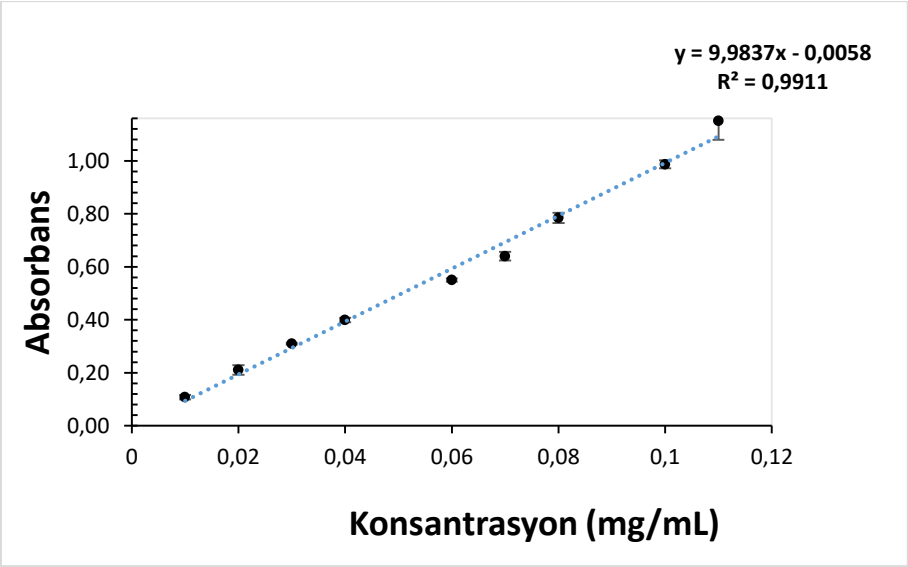
Elma suyu ve sirkelerin organik asit miktarının tayin edilebilmesi için örnekler 0,45 µm PTFE filtre ile süzülmüştür. Analiz HPLC cihazı ile (LC-20A pompa, DGU20A5R degazör, SIL-20A HT autosampler, CTO-10ASVP kolon fırını, SPD-20A UVVIS dedektör ve CMB-20A iletişim modülü; Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) yapılmıştır. Ayırmalar, bir InertSustain C-18 ters fazlı kolonda (250 × 4.6 mm, 5 µm partikül boyutu) gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak 0,2 M KH_2PO_4 (pH 2,4) çözeltisi kullanılmış olup akış hızı 0,8 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 10 µL olacak şekildedir [55] .

3.3.6 Şeker Tayini

Elma suyu ve sirkelerde bulunan şekerin miktarsal olarak tayin edilebilmesi için HPLC cihazında (LC-20A pompa, DGU-20A5R degazör, SIL-20A HT autosampler, CTO-10ASVP kolon fırını, RID-20A refraktif index dedektör (RID) ve CMB-20A iletişim modülü; Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) analiz gerçekleştirilmiştir. Ayırmalar, bir Agilent Zorbax NH_2 kolonda (5 µm, 4,6 × 250 mm) yapılmıştır. Mobil faz olarak asetonitril tampon çözeltisi (83/17 h/h) kullanılmış olup akış hızı 0,2 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 10 µL olacak şekilde bir program oluşturulmuştur. Kantitatif analiz ve tanımlama işlemleri, alıkonma zamanı ve standart eğrileri baz alınarak gerçekleştirilmiştir [55].

3.3.7 Toplam Fenolik Madde Miktarı

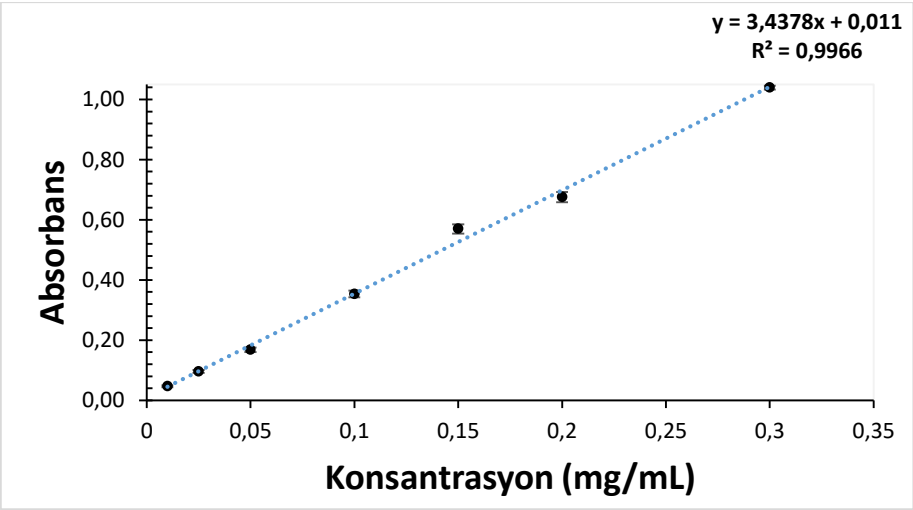
Elma suyu ve sirkelerin toplam fenolik madde tayini için örnekler % 80'lik etil alkol çözeltisi ile seyreltilmiştir. 0,5 mL seyreltilen ekstrakt üzerine 0,2 N 2,5 mL folin ciocalteau reaktifi eklenmiştir. Bu karışımın üzerine 2 mL % 7,5 Na_2CO_3 çözeltisi eklenerek fenolik hidroksil gruplarının hidrojenlerini suya vermeleri sağlanmıştır. Ardından 30 dk oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletilmiştir. Örneklerin absorbansı UV-VIS spektrofotometrede 760 nm'de okunmuştur. Kör çözeltisi için ekstrakt yerine aynı miktarda % 80'lik etil alkol kullanılmıştır. Toplam fenolik madde içeriğinin hesaplanmasında kullanılan gallik asit standart kalibrasyon eğrisi Şekil 3.10'da verilmiştir. Sonuçlar mg GAE/100 mL olarak verilmiştir [56].



Şekil 3.10 Toplam fenolik madde gallik asit kalibrasyon grafiği

3.3.8 Toplam Flavonoid Madde Miktarı

Elma suyu ve sirkelerin toplam flavonoid madde miktarı tayini için belirli oranlarda seyreltilen örneklerden 1 mL alınıp 4 mL distile su ile karıştırılmıştır. % 5'lik $NaNO_2$ çözeltisinden 0,3 mL ilave edilmiştir. % 10'luk $AlCl_3$ çözeltisinden 0,3 mL ilave edilip ardından 6 dk beklenmiştir. 1 M NaOH çözeltisinden 2 mL ilave edilmiştir. Son hacim 10 mL distile su ile tamamlanmıştır. Örneklerin absorbansı UV-VIS spektrofotometrede 510 nm'de okunmuştur. Kalibrasyon eğrisi Şekil 3.11'de verilmiştir. Sonuçlar mg KE/100 mL olarak verilmiştir [57].

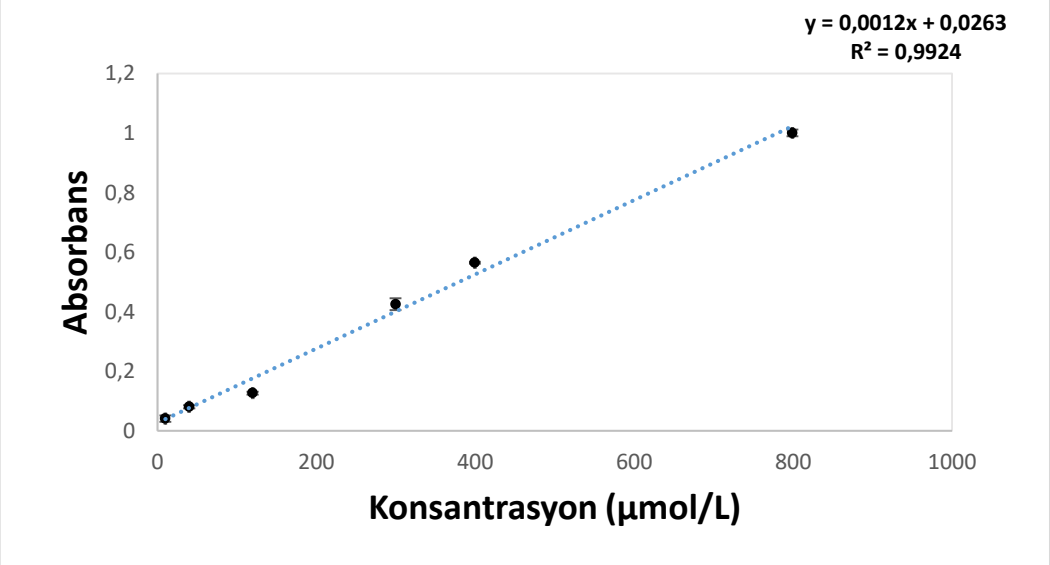


Şekil 3.11 Toplam flavonoid madde kateşin kalibrasyon grafiği

3.3.9 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet (FRAP) Yöntemi

Elma suyu ve sirkelerin antioksidan aktivite tayini için FRAP yöntemi kullanılmıştır. FRAP reaktifi kullanılmadan önce 10:1:1 (h/h/h) oranında 300 mM asetat tamponu (pH 3,6), 10 mM 2, 4, 6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) çözeltisi ve 20 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ karıştırılarak hazır duruma getirilmiştir. Daha sonra 300 mM asetat tamponu, 0,31 g sodyum asetat trihidrat ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$) 1,6 mL asetik asit ile karıştırılıp son hacim 100 mL'ye gelinceye kadar saf su ile seyreltilmiştir. TPTZ çözeltisi, 40 mM HCI içerisinde 10 mM TPTZ'nin çözdürülmesiyle hazır hale getirilmiştir. 100 µL örnek, önce 900 µL saf su ve daha sonra 2 mL FRAP reaktifi ile karıştırılıp karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 dk bekletilmiştir. Süre sonunda örneklerin absorbansı UV-VIS spektrofotometrede 563 nm'de okunmuştur. FRAP yöntemi için Şekil 3.12'de verilen troloks standart kalibrasyon eğrisi kullanılmış ve sonuçlar µmol/100 mL olarak verilmiştir [58].

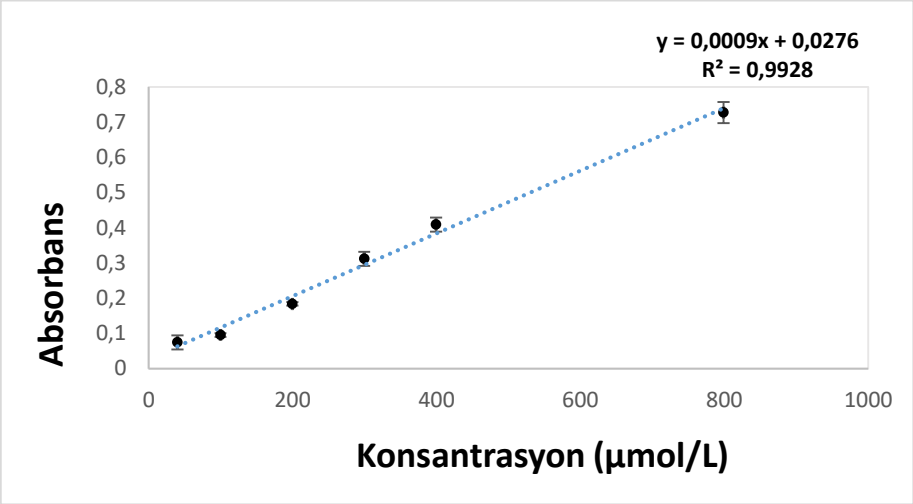


Şekil 3.12 FRAP -Troloks kalibrasyon grafiği

ABTS Radikalini Temizleme Yöntemi

Elma suyu ve sirkelerin antioksidan aktivite tayini için ABTS radikalini temizleme yöntemi kullanılmıştır. Yönteme göre 2,2-azinobis-(3-etilbenzothiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) ile potasyum persülfatın ($K_2S_2O_8$) oksidasyon reaksiyonu sonucu oluşturulan ABTS radikali katyonunun (ABTS•+), ortama ilave edilen antioksidan maddelerle inhibisyonu gerçekleşmektedir. ABTS solventinin

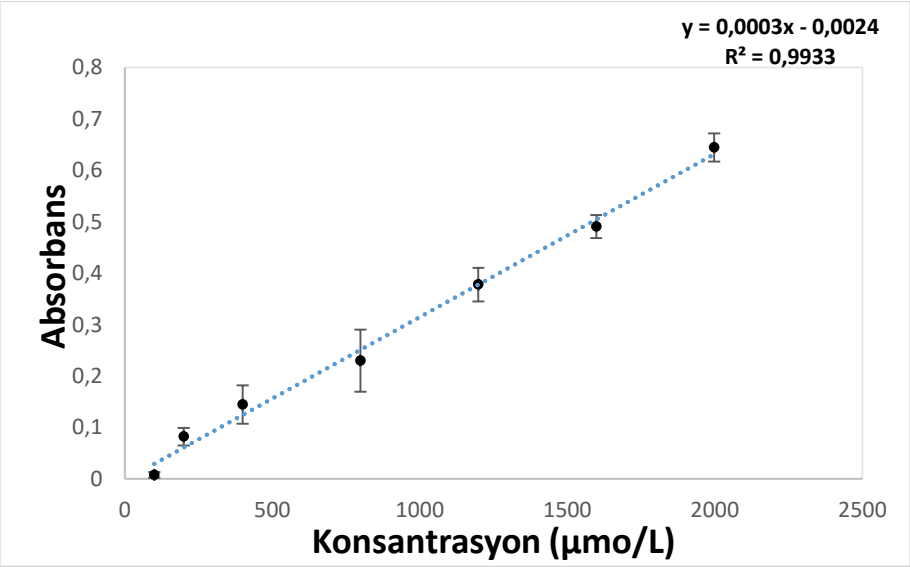
absorbans değeri 0,70 olacak şekilde spektrofotometre cihazında ayarlama yapılmıştır. Ardından örneğin analizinde kullanılmıştır. Örnekten 100 µL alınmış ardından üzerine ayarı yapılmış 2 mL ABTS solventi ilave edilip 6 dk 30 ºC'de bekletilmiştir. Örneklerin absorbansı UV-VIS spektrofotometrede 734 nm'de okunmuştur. ABTS yöntemi için Şekil 3.13'de verilen troloks standart kalibrasyon eğrisi kullanılmış ve sonuçlar µmol/100 mL olarak verilmiştir [59].



Şekil 3.13 ABTS-Troloks kalibrasyon grafiği

CUPRAC Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini

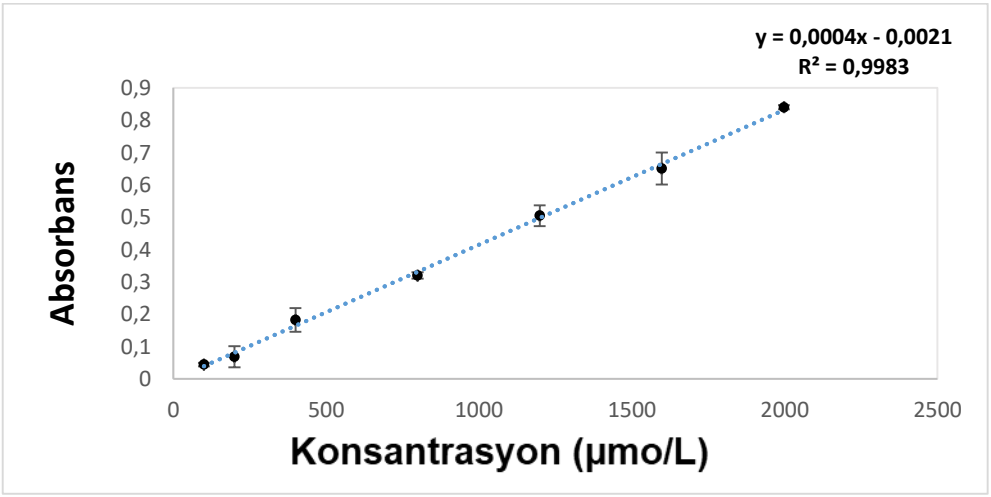
Elma suyu ve sirkelerin antioksidan aktivite tayini için CUPRAC yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde temel olarak 2,9 dimetil-1, 10-fenantrolin (Neokuproin, Nc)'in Cu (II) ile oluşturduğu bakır (II)- neokuproin kompleksinin (Cu (II)-Nc), 450 nm' de maksimumu absorbans veren bakır (I) neokuproin (Cu(I)-Nc) jelatına indirgenme yeteneğinden yararlanılarak antioksidan kapasite hesaplanmıştır. CUPRAC analizi yapılacak örneklerden her bir tüpe 0,1 mL alınmıştır. Her tüpe sırasıyla 1'er mL $CuCl_2$ (10 mM), Neokuproin (alkolik, 7,5 mM), NH_4Ac tamponu (1 M, pH 7,0) ve damıtık su ilave edilmiştir. Karanlık bir ortamda, oda sıcaklığında 1 saat süreyle bekletilmiştir. UV-VIS spektrofotometre ile örneklerin absorbans değerleri ölçülmüştür. CUPRAC yöntemi için hazırlanan troloks standart kalibrasyon eğrisi Şekil 3.14'de verilmiştir. Sonuçlar µmol/100 mL olarak verilmiştir [60].



Şekil 3.14 CUPRAC-Troloks kalibrasyon grafiği

DPPH Serbest Radikal Yakalama Aktivitesi

Elma suyu ve sirkelerin antioksidan aktivite tayini için DPPH yöntemi kullanılmıştır. Belirlenen oranda seyreltilen her bir örnekten 0,1 mL alınıp 4,9 mL DPPH (2,2-diphenyl-1-pcyrylhydrazyl) ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 20 dk karanlık ortamda bekletilmiştir. Örneklerin absorbansı UV-VIS spektrofotometrede 517 nm'de okunmuştur. DPPH yöntemi için hazırlanan troloks standart kalibrasyon eğrisi Şekil 3.15'de verilmiştir. Sonuçlar µmol/100 mL olarak verilmiştir [61].



Şekil 3.15 DPPH-Troloks kalibrasyon grafiği

3.4 Sirke Fermantasyonu Sonrasında Posalarda Yapılan Fizikokimyasal Analizler

3.4.1 Posaların Kurutulması

Fermantasyonun 4. haftasının sonunda sirkeler süzülerek posaları fanlı bir etüvde (Memmert UF-110, Almanya) 55 ºC de yaklaşık 9 saat boyunca kurutulmuştur. Kurutulan posalar mesh no: 50 delik çapı olan elekten geçecek boyuta kadar öğütülmüştür. Analizler yapılana kadar 4 ºC'de saklanmıştır.

3.4.2 Nem Tayini

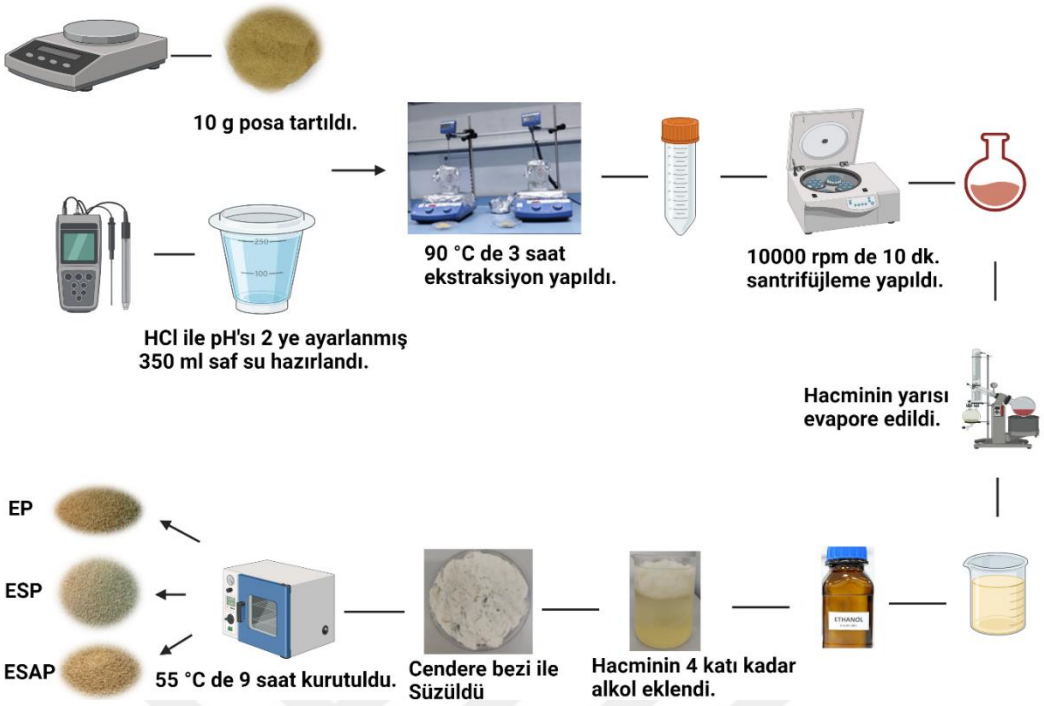
Tüm posaların nem tayini 105 ºC'de etüvde (Memmert UF-110, Almanya) örnekler sabit tartıma gelinceye kadar (5 saat) gerçekleştirilmiştir.

3.4.3 Renk Parametrelerinin Belirlenmesi

Sirke fermantasyonu tamamlandıktan sonra kurutulan posaların renk ölçümleri Hunter kolorimetresi (Konica Minolta CR-400, NJ, USA) kullanılarak yapılmıştır. Renk sonuçlarına göre L* (beyazlık - siyahlık), a* (+ kırmızılık - yeşillik), ve b* (+ sarılık - mavilik) olarak tanımlanmaktadır.

3.5 Pektin Ekstraksiyonu

Kurutulmuş posalar (ET, EST ve ESAT) 1 M HCl çözeltisi pH=2'ye ayarlanan deiyonize su ile (1/35, a/h) 90 ºC'de 3 saat manyetik karıştırıcıda (100 rpm) ekstrakte edilmiştir. Sonrasında örnekler 4 ºC'de 13,416 × g hızla 10 dk santrifüj edilmiş, üst sıvı faz (süpernatant), bir evaporatörde vakum altında 40 ºC'de, toplam hacmi ilk hacminin yarısına ulaşıncaya kadar konsantre edilmiştir. Daha sonra, hacminin dört katı kadar etanol (% 96, h/h) eklenmiş ve karışım yaklaşık 16 saat 4 ºC'de bekletilmiştir. Sonrasında santrifüj (2147 × g, 30 dk) işlemi ile ayrılan pektin, üç kez etanol ve son olarak da aseton ile yıkanmıştır. Daha sonra ham pektin örneği 55 ºC'de hava sirkülasyonlu bir etüvde kurutulmuştur [62] (Şekil 3.16).



Şekil 3.16 Pektin ekstraksiyonu

3.6 Pektinlerin Fizikokimyasal Karakterizasyonu

3.6.1 Metoksil Derecesi (% MD)

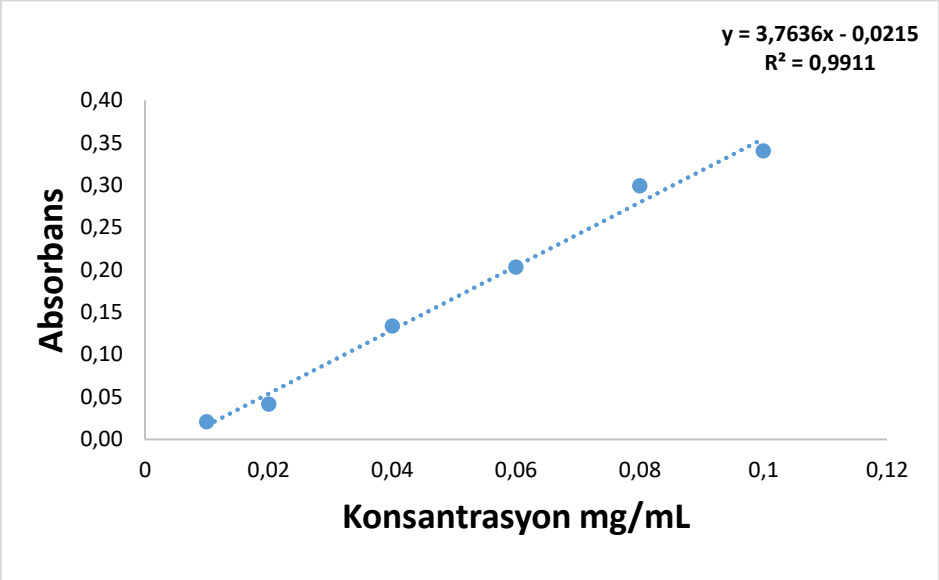
Metilasyon derecesi tayini için 0,5 g pektin tartılarak 250 mL erlene alınmıştır. Üzerine 5 mL etanol ilave edilip karıştırılmıştır. Karışıma sırası ile 1 g NaOH ve 100 mL saf su ilave edilmiştir. Daha sonra 6 damla fenol kırmızısı ilave edilip 0,1 N NaOH çözeltisi ile titre edilmiştir. Sarfiyat (V_1, mL) kaydedilmiştir. Ardından 25 mL 0,25 N NaOH çözeltisi eklenerek iyice çalkalanıp ağzı kapatılarak erlen içinde 30 dk süreyle oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu süre sonunda karışıma 25 mL 0,25 N HCI çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra 0,1 N NaOH çözeltisi ile titre edilerek sarfiyat not edilip eklenen HCI'nin fazlası hesaplanmıştır (V_2, mL) [63].

$$\% \text{ MD} = V_2*100/(V_1+V_2) \qquad (3.2)$$

3.6.2 Protein Tayini

Protein tayini için 50 mg pektin balon jojeye tartılmış, üzerine 50 mL saf su ilave edilmiştir. Ultrasonik su banyosunda 50 ºC de 1 saat disperse edilmiştir. 0,5 mL

alınan örnek üzerine 0,75 mL saf su eklenmiştir. Kör ve disperse edilen pektinlerden eppendorf tüplere her birinden 100 µL alınıp üzerine 1 mL blue reagant eklenmiştir. Mikroplakaya 230 µL hazırlanan karışımdan koyulmuştur ve 595 nm'de okuma yapılmıştır. Protein tayini için kullanılan kalibrasyon eğrisi Şekil 3.17'de verilmiştir. Sonuç kalibrasyon eğrisi çizilen BSA proteini eşdeğeri cinsinden belirlenmiştir [64].



Şekil 3.17 Protein BSA kalibrasyon grafiği

3.6.3 Renk Parametrelerinin Belirlenmesi

Tüm pektinlerin renk ölçümlerinde 3.4.3'de belirtilen metot kullanılmıştır.

3.6.4 Toplam Fenolik Madde

Tüm pektinlerin toplam fenolik madde tayininde 3.3.7'de belirtilen metot kullanılmıştır.

3.6.5 Monosakkarit Kompozisyonu

Monosakkarit kompozisyonunu belirlemek için 30 mg pektin 12 mL triflorasetik asit (TFA) (10/4, a/h) ile 120 ºC'de 4 saat hidroliz edilmiştir. Ardından evaporatörde tamamen TFA uzaklaştırılmıştır. 2 mL methanol eklenerek hidrolize edilen pektinler yıkanmış ardından evaporatorle methanol uzaklaştırılmıştır. Bu işlem iki kez tekrar edilmiştir. 3 mL saf su ilave edilip 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatanttan türevlendirme için 400 µL alınmıştır. Üzerine 400 µL 0,6 M NaOH ve 800 µL 1-fenil-3-metil-5-pirazolon çözeltisi ilave edilmiştir. 100 dk

70 ºC'de bekletilmiştir. Ardından soğutulup 0,3 M HCl çözeltisi ile pH nötürlenmiştir. Tüm sıvı kısım evaporatöre edilmiştir. Daha sonra 1,5 mL ultra saf su 1,5 mL kloroform eklenerek üst faz alınmıştır. Ardından 0,22 mikronluk filtreden geçirilerek viyale koyulmuştur. C18 kolonda, mobil faz 0,1 M fosfat buffer (pH 6,7) ve asetonitril karışımı 83/17 (h/h) ile akış hızı 1 mL/dk olacak şekilde HPLC cihazında ölçümler 250 nm'de gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrisi için mannoz (Man), riboz (Rib), rhamnoz (Rha), glukoronik asit (GulA), galaktronik asit (GalA), glukoz (Glu) , galaktoz (Gal), ksiloz (Xyl), araboniz (Ara), fukoz (Fuk) ile 25-250 ppm arasında kullanılmıştır [65], [66], [67].

3.7 Pektinlerin Yapısal Karakterizasyonu

3.7.1 Molekül Ağırlığı

Tüm pektinlerin molekül ağırlığı Jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) kullanılarak analiz edilmiştir. Analizler, Tosoh EcoSEC HLC-8320-RI-UV GPC sistemi (Tosoh Bioscience, Tokyo, Japonya) ve HQ-806 M ile HQ-807 M kolonları ile yapılmış, deteksiyon için ise WYATT HELEOS-II MALS DynaPro DLS dedektörü kullanılmıştır. Örnekler, fosfat tamponlu salin ile çözündürülmüş ve 0,45 µm membran filtreden (Millipore Co., Milford, MA, ABD) geçirilmiştir. Deneysel koşullar olarak, 0,5 mL/dk akış hızı, 25 ºC kolon sıcaklığı ve 100 µL enjeksiyon hacmi kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisi, 800 Da ile 1.600,000 Da arasında (R^2> 0,999) PMMA (polimetil metakrilat) standardı kullanılarak çizilmiştir [68].

3.7.2 NMR (Nükleer Manyetik Rezonans)

Tüm pektinler ^{1}H NMR, ^{13}C NMR (Agilent NMR 400/54/ASC, Santa Clara, CA, USA) kullanılarak analiz edilmiştir. Pektin örnekleri % 99,9 D_2O içinde tamamen çözündürülmüştür. 25 ºC de 256 kez tarama yapılmıştır [69].

3.7.3 FTIR (Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopisi)

Fonksiyonel gruplarının tespiti için ATR-FTIR spektrofotometre (Bruker Tensor 27, Bremen, Almanya) ile her bir pektin örneği analiz edilmiştir. 1600 - 1800 cm^{-1} arasındaki bölge pektinin spesifik bölgesi olup pektinin tanımlanmasında kullanılmıştır. Ölçümlerin her biri havaya göre arka plan alınarak yapılmıştır. Ölçümler 400 - 4000 cm^{-1} absorbans aralığında oda sıcaklığında yapılmıştır. Çözünürlük değeri 4 cm^{-1}'dir [70].

3.7.4 XRD (X-Işını Difraksiyon)

Tüm pektinlerin XRD (Malvern Panalytical Empyrean MultiCore, Almelo, The Netherlands) analizi Cu-K-Alfa dalga boyu kullanılarak 25 ºC de yapılmıştır. Kırınım açısı (2 θ) 5°– 80° arasındadır. Tarama 50 dk sürmüştür [71].

3.7.5 SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Görüntüleri

Toz haline getirilen pektin örneklerinden bir miktar alınıp stamblar üzerine yerleştirilmiştir. Stamblardan görüntü elde etmek için altın kaplama cihazıyla 2 dk altın tozuyla kaplanmıştır. Ardından SEM (QUANTA FEG-250, Hillsboro, OR, USA) altında 200 x, 2000 x ve 10000 x boyutunda görüntü alınmıştır [72].

3.7.6 Termal Davranış Özellikleri

Pektin örneklerinin termal davranışı termogravimetrik (TG), diferansiyel termal analiz (DTG) (Exstar 6300 TG/DTA, Seiko Instruments SII) ve diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) (TA Q100, Thermo DSC Q2, New Castle, ABD) ile incelenmiştir. Örnekleri tutmak için kullanılan alüminyum kaplar azot atmosferi altında TG/DTG için 25 ºC'den 600 ºC'ye ve DSC analizi için 10 ºC'den 500 ºC'ye kadar ısıtılmıştır. Boş alüminyum kap referans olarak kullanılmıştır.

3.8 Reolojik Özellikler

3.8.1 Solüsyonların Hazırlanması

% 5, % 7 ve % 10 (a/h) oranlarında hazırlanan pektin çözeltileri oda sıcaklığında 18 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Pektin çözeltileri için sabit ve dinamik kayma ölçümleri, peltier ısıtma sistemi ile donatılmış gerilim ve gerinim kontrollü salınımlı ve rotasyonel reometre (Anton Paar, MCR 302, Avusturya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.8.2 Yatışkan Kesme Akış Davranış Özellikleri

Pektinlerin yatışkan akış davranış özellikleri paralel plaka konfigürasyonunda, (çap 50 mm, boşluk 0,5 mm) 25 ºC'de 1 - 100 s^{-1} kayma hızı aralığında

gerçekleştirilmiştir. Her ölçüm üç kez tekrarlanmıştır. Numunenin görünür viskozitesi, kayma hızının bir fonksiyonu olarak belirlenmiştir.

Kayma hızı ve kayma gerilimi arasındaki ilişki aşağıdaki denkleme dayanan Ostwald de Waele modeli ile açıklanmıştır.

$$\sigma = K(\gamma)^{n} \quad (3.3)$$

σ; kayma gerilimi (Pa), K; kıvam katsayısı ($Pa.s^n$), γ kayma hızı (s^{-1}) and n; akış davranış indeksi

3.8.3 Sıcaklık Taraması Özellikleri

Sıcaklık tarama testi 5 - 70 ºC sıcaklık aralığında 0,5 Pa'da gerçekleştirilmiştir. Sıcaklığa karşı ölçülen η70 değerleri aşağıdaki Arrhenius denklemine göre hesaplanmıştır.

$$\eta 70 = \eta_0 e^{(Ea/RT)} \quad (3.4)$$

η70 görünür viskozite (Pa.s), η_0 arrhenius eşitlik sabiti (Pa.s), Ea aktivasyon enerjisi (kJ/mol), R evrensel gaz sabiti (kJ/mol K) ve T mutlak sıcaklık (Kelvin)

3.8.4 Dinamik Özellikleri

Pektin solüsyonlarının viskoelastik özelliklerini belirlemek amacıyla örneklere önce genlik tarama testi ardından da frekans tarama testi uygulanmıştır.

Genlik Tarama Testi

Lineer viskoelastik (LVR) bölgeyi bulmak için pektin solüsyonlarına genlik tarama testi yapılmıştır. Bu amaçla pektin solüsyonları % 0,1 - 100 Pa aralığında ve 20 ºC'de sabit 10 rad/s frekansta strese maruz bırakılmış ve örnekte meydana gelen deformasyon incelenmiştir. Böylelikle örneklerin lineer viskoelastik bölgesi belirlenerek frekans tarama testinin gerçekleştirileceği basınç tespit edilmiştir. Analizler her örnek için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.

Frekans Tarama Testi

Frekans tarama testi, 25 ºC'de 0,1 - 100 rad/s aralığında LVR içinde belirlenen % 0,5 gerinimde gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, aşağıdaki denkleme dayanan power-law modeli kullanılarak hesaplanmıştır.

$$G'=K'(\omega)^{n'} \; ; \; G''= K''(\omega)^{n''} \qquad (3.5)$$

G′ (Pa) elastik modül, G″ (Pa) viskoz modül, ω açısal hız (1/s), K′ kıvam katsayısı (Pa.s^n) ,K″ kıvam katsayısı (Pa.s^n), n′ akış davranış indeksi, n″ akış davranış indeksi

3.10 İstatiksel Analizler

Tüm analizler üç tekrarlı örneklerde üç paralelli olarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama değer ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. Sonuçlar istatiksel olarak varyans analizi (ANOVA) ve Tukey testi kullanılarak % 95 güven aralığında ($p < 0.05$), JMP 6,0 istatistik yazılımı (SAS Institute, Inc., Cary, ABD), kullanılarak yapılmıştır. Şekiller Origin 9,0 programı (OriginLab Co., Northampton, Ma, USA) kullanılarak çizilmiştir.

4
BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 Sirkelerin Fizikokimyasal Özellikleri

Sirke fermantasyonu boyunca 1.,3., ve 4. haftalarda pH, titrasyon asitliği, briks ve renk parametreleri ölçülmüş ve sonuçlar Tablo 4.1'de verilmiştir. 4. haftanın sonunda pH değeri elma sirkesinde 3,45±0,03, elma posası sirkesinde ise 3,60±0,03 olmuştur. Elma sirkesinin ve elma posası sirkesinin titrasyon asitliği değerleri sırasıyla % 1,01±0,11 ve % 0,59±0,04 olarak tespit edilmiştir. Kahraman vd. [73] geleneksel ev sirkeleri yaptığı çalışmasında elma sirkesinin pH değerini 3,03±0,23 ve titrasyon asitliği değerini % 0,99±0,05 olarak belirlemiştir. Hasan vd. [74] ise farklı elma sirkeleri üretmiş ve pH değerlerinin 3,1 - 4,00 arasında değiştiğini bildirmiştir. Melkis vd. [75] piyasadan topladığı elma sirkelerinin pH değerlerinin 3,34 - 3,42 arasında değiştiğini analizlemiştir. Elma sirkesi ve elma posası sirkesinin briks değerleri fermantasyonun başlangıcında sırasıyla 4,10±0,00 ve 1,85±0,05'dir. Beklendiği üzere alkol fermantasyonu sırasında mayaların ortamda bulunan çözünür şekerleri tüketmesi ile 4. haftanın sonunda briks değerleri azalmış ve örneklerde sırasıyla 1,90±0,00 ve 1±0,00 olmuştur.

4. haftanın sonunda elma sirkesinin L*, a* ve b* renk değerleri sırasıyla 69,50±4,12, - 0,92±0,08 ve - 0,9± 0,08 şeklindedir. Elma posası sirkesi ise daha düşük parlaklık (L=57,78 ± 3,62), benzer değerde kırmızılık (a= -1,08 ± 0,20) ve oldukça yüksek değerde sarılık (14,68±0,50) değerlerine sahip olmuştur. 4. haftada her iki sirke örneğinde de alkol kalıntısı tespit edilememiştir.

Tablo 4.1 Elma ve elma posası sirkelerinin fizikokimyasal analiz değerleri

		Elma sirkesi			Elma posası sirkesi		
Yapılan analizler		1.hafta	3. hafta	4. hafta	1.hafta	3. hafta	4. hafta
pH		3,56± 0,01^{Aa}	3,42±0,0^{Cb}	3,45±0,03^{Bb}	3,57±0,02A^{Ba}	3,53±0,04^{Ba}	3,60±0,03^{Aa}
Titrasyon asitliği (%)		0,23±001^{Ba}	0,94±0,07^{Aa}	1,01±0,11^{Aa}	0,19±0,01^{Cb}	0,70±0,08^{Ab}	0,59±0,04^{Bb}
Briks		4,10±0,0^{Aa}	1,93±0,07^{Ba}	1,90±0,0^{Ba}	1,85±0,05^{Ab}	1±0,00^{Bb}	1±0,00^{Bb}
Renk	L*	23,10±0,67^{Bb}	71,13±2,99^{Aa}	69,50±4,12^{Aa}	30,88±0,75^{Ca}	48,80±3,41^{Bb}	57,78±3,62^{Ab}
	a*	2,08±0,18^{Aa}	-1,66±0,06^{Cb}	-0,92±0,08^{Ba}	0,13±0,17^{Ab}	-0,82±0,36^{Ba}	-1,08±0,23^{Ba}
	b*	-1,00±0,28^{Bb}	8,39±0,86^{Ab}	8,38±1,15^{Ab}	3,24±0,20^{Ca}	15,73±0,5^{Aa}	14,68±0,5^{Ba}

Veriler ortalama ± S.D. olarak ifade edilmiştir. Aynı satırdaki A-C harfleri elma sirkesi ve elma posası sirkesinin 1.,3. ve 4. haftalarda kendi aralarında fizikokimyasal analiz sonuçlarının istatiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir. Aynı satırdaki a-c harfleri elma sirkesi ve elma posası sirkesinin fizikokimyasal analiz sonuçlarının istatiksel olarak birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir *(p<0,05).*

4.2 Elma Suyu ve Elma Sirkelerinin Şeker İçeriği

Elma suyu, elma sirkesi ve elma posası sirkesine şeker analizi yapılmış ve sonuçlar Tablo 4.2'de verilmiştir. Maltoz ve laktoz hiçbir örnekte tespit edilmemiştir. Fruktoz, glukoz ve sakkaroz elma suyunda sırası ile 13793,45±35,11-4336,04±41,85 ve 3855,45±0,29 mg/100 mL olarak tespit edilmiştir. Elma sirkesinde ve elma posası sirkesinde sakkaroz tespit edilmemiştir. Elma sirkesinde fruktoz ve glukoz miktarları sırasıyla 11,33±1,50 ve 155,15±3,15 mg/100 mL, elma posası sirkesinde ise 16,58±1,02 ve 36,16±0,33 mg/100 mL olarak tespit edilmiştir. Alkol fermantasyon boyunca mayaların şekeri kullanmasından dolayı her iki sirkede şeker miktarları azalmıştır. Elma posası sirkesinde tespit edilen glukoz ve toplam şeker miktarı, elma sirkesinden daha düşüktür.

Tablo 4.2 Elma suyu, elma sirkesi ve elma posası sirkesinin şeker miktarı (mg/100 mL)

Örnek Adı	Fruktoz	Glukoz	Sakkaroz	Maltoz	Laktoz	Toplam
Elma suyu	13793,45±35,11^{A}	4336,04±41,85^{A}	3855,45±0,29	T.E	T.E	21984,93±41,84^{A}
Elma sirkesi	11,33±1,50^{B}	155,15±3,15^{B}	T.E	T.E	T.E	166,48±1,84^{B}
Elma posası sirkesi	16,58±1,02^{B}	36,16±0,33^{C}	T.E	T.E	T.E	52,74±0,78^{C}

Veriler ortalama ± S.D. olarak ifade edilmiştir. Aynı sütündaki farklı harfler elma suyu, elma sirkesi ve elma posası sirkesinin şeker içeriğinin istatiksel farkını göstermektedir *($p<0.05$).* T.E: tespit edilemedi

4.3 Elma Suyu ve Elma Sirkelerinin Organik Asit Analizi

Elma suyu, elma sirkesi ve elma posası sirkesinde organik asit analizi yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 4.3'de verilmiştir. Asetik asit, elma suyunda bulunmazken, laktik asit az miktarda (11,06 mg/100 mL) tespit edilmiştir. Elma ve elma posası sirkelerinde ise her iki organik asit de tespit edilmiştir. Kahraman vd.'nin [73] yaptığı çalışmada ev yapımı elma ve üzüm sirkelerinde tartarik asit, malik asit, laktik asit, asetik asit, sitrik asit ve süksinik asit tespit edilmiştir. Liu vd.'nin [76] yaptığı çalışmada piyasadan 23 farklı sirke toplanmış ve analiz edilmiştir.

Bunlardan 14 tanesi elma sirkesidir. Bu 14 sirkenin sadece iki tanesinde bizim çalışmamızda olduğu gibi laktik asit tespit edilmiştir. Yildiz vd. [25], [77] yaptığı çalışmada farklı meyve sirkelerinin organik asitlerini analiz etmişler ve elma sirkesinde laktik ve asetik asit varlığını bildirmişlerdir.

Tablo 4.3 Elma suyu, elma sirkesi ve elma posası sirkesinin organik asit miktarı (mg/100 mL)

Parametreler	Elma suyu	Elma sirkesi	Elma posası sirkesi
Malik asit	1495,07±1,36	T.E	T.E
Asetik asit	T.E	$501,33±2,20^{A}$	$357,90±12,93^{B}$
Laktik asit	$11,06±0,24^{C}$	$61,40±0,57^{A}$	$53,42±1,24^{B}$
Sitrik asit	38,55±1,44	T.E	T.E

Veriler ortalama ± S.D. olarak ifade edilmiştir. Aynı satırdaki farklı harfler elma suyu, elma sirkesi ve elma posası sirkesinin organik asit içeriğinin istatiksel farkını göstermektedir *($p<0,05$).* T.E: tespit edilemedi

4.4 Elma Suyu ve Elma Sirkelerinin TPC, TFC ve Antioksidan Aktiviteleri

Elma suyu, elma sirkesi ve elma posası sirkesinin toplam fenolik madde (TPC), toplam flavonoid madde (TFC) miktarları ve antioksan aktiviteleri spektrofotometrik yöntemlerle analiz edilmiş ve sonuçlar Tablo 4.4'de verilmiştir. Toplam fenolik madde sonuçları elma suyu, elma sirkesi ve elma posası sirkesinde sırası ile 20,02±3,20 - 25,29±1,97 ve 7,89±0,09 mg GAE/100 mL olarak tespit edilmiştir. Bakir vd.'nin [78] yaptığı çalışmada 18 farklı meyve sirkesi analiz edilmiştir. Bunlardan iki tanesi elma sirkesi olup toplam fenolik madde içeriğini 17 mg GAE/100 mL, 31 mg GAE/100 mL olarak tespit etmişlerdir. Bordiga vd. [79] yaptığı çalışmada farklı mikroorganizmalar ile 9 farklı sirke üretimi gerçekleştirmişler ve biyoaktif özelliklerine bakmışlar. Ürettikleri tüm sirkelerde toplam fenolik madde miktarında artış tespit edilmiştir. Sonuçlar bizim çalışmamız ile uyumludur. Toplam flavonoid madde miktarı elma suyu, elma posası ve elma posası sirkesinde sırasıyla 2,68±0,2 - 5,06±0,2 - 2,07±0,1 KE/100 mL olarak tespit edilmiştir. Yine Bakir vd.'nin yapmış olduğu çalışmadaki elma sirkeleri ile sonuçlar uyumlu çıkmıştır. ABTS sonuçları elma suyu, elma sirkesi ve elma posası sirkesinde sırası ile 49,35±0,66 - 63,86±0,71 ve 28,03±3,66 μmol TE/100 mL olarak tespit edilmiştir. Kelebek vd.'nin [80] yapmış olduğu çalışmada ABTS

değerleri analiz edilmiştir. Sonuçlar 4.05±0.05 - 17.96±1.34 arasındadır. Tespit edilen sonuçlara göre bizim çalışmamızda ABTS daha yüksektir. FRAP sonuçları sırası 26,01±0,55 - 62,83±1,62 ve 33,23±0,75 µmol/100 mL olarak tespit edilmiştir. CUPRAC da ise sırasıyla 118,38±4,58 - 146,78±4,16 ve 78,97±2,17 olarak tespit edilmiştir. Elma suyunun DPPH antioksidan kapasitesi 12,90±0,63 elma sirkesinin ise 27,03±2,01 olarak tespit edilmiştir. Ajila vd. [81] yaptığı çalışmada elma *Phanerocheate chrysosporium* ile fermente edilmiş ve DPPH aktivitesi analiz edilmiştir. Tespit edilen sonuca göre DPPH aktivitesi artmıştır. TPC, TFC, ABTS, FRAP ve CUPRAC analizlerinden alınan sonuçlara göre fermantasyon biyoaktif madde içeriğini etkilemiştir. Elma suyu ve elma sirkesi karşılaştırıldığında; istatiksel olarak fermantasyonun biyoaktif madde içeriğini yükselttiği tespit edilmiştir. Elma suyu ve elma posası sirkesi karşılaştırıldığında ise biyoaktif madde içeriğinde azalma olduğu istatiksel olarak görülmektedir. Bunun sebebi ise posa elde edilirken suyuyla beraber fenoliklerinde ayrılması olabilir.

Tablo 4.4 Elma suyu, elma sirkesi ve elma posası sirkesinin TPC, TFC ve antioksidan aktiviteleri

Parametreler	Birimi	Elma suyu	Elma sirkesi	Elma posası sirkesi
TPC	mg/100 mL	$20,02±3,20^{B}$	$25,29±1,97^{A}$	$7,89±0,09^{C}$
TFC		$2,68±0,2^{B}$	$5,06±0,2^{A}$	$2,07±0,1^{C}$
ABTS	µmol/100 mL	$49,35±0,66^{B}$	$63,86±0,71^{A}$	$28,03±3,66^{C}$
FRAP		$26,01±0,55^{C}$	$62,83±1,62^{A}$	$33,23±0,75^{B}$
CUPRAC		$118,38±4,58^{B}$	$146,78±4,16^{A}$	$78,97±2,17^{C}$
DPPH		$12,90±0,63^{B}$	$27,03±2,01^{A}$	T.E

Veriler ortalama ± S.D. olarak ifade edilmiştir. Aynı satırdaki farklı harfler elma suyu, elma sirkesi ve elma posası sirkesinin TPC, TFC ve antioksidan aktiviteleri arasındaki istatiksel farkı göstermektedir *(p<0,05)*. TPC: Toplam fenolik madde, TFC: Toplam flavonoid madde, ABTS: 2,2′-azinobis (3-ethylbenzothiazolline-6-sulfonic acid), CUPRAC: Bakır (II) İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi, DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, FRAP: Demir (III) İndirgeyici Antioksidan Güç, GAE: Gallik Asit Eşdeğeri, TE: Trolox Eşdeğer T.E:Tespit edilemedi

4.5 Sirke Posalarının Fizikokimyasal Analizleri

ET, EST ve ESAT posalarının renk ve kuru madde değerleri analiz edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.5'de verilmiştir. Renk değeri L*, a*, b* sırasıyla; ET'de 69,36±0,38 - 2,76±0,07 ve 27,10±0,09, EST'de 63,84±0,54 - 5,34±0,10 ve 10,18±0,01, ESAT'da 62,18±0,36 - 4,42±0,18 ve 27,13±0,23 olarak tespit

edilmiştir. Sırası ile ET, EST ve ESAT'ın % nem oranları 7,30±0,22, 10,18±0,01 ve 5,37±0,14 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.5 ET, EST ve ESAT'ın renk ve % nem değerleri

Parametreler		ET	EST	ESAT
Renk	L*	$69,36±0,38^{A}$	$63,84±0,54^{B}$	$62,18±0,36^{C}$
	a*	$2,76±0,07^{C}$	$5,34±0,10^{A}$	$4,42±0,18^{B}$
	b*	$27,10±0,09^{B}$	$24,39±0,07^{C}$	$27,13±0,23^{A}$
% Nem		$7,30±0,22^{B}$	$10,18±0,01^{A}$	$5,37±0,14^{C}$

Veriler ortalama ± S.D. olarak ifade edilmiştir. Aynı satırdaki farklı harfler ET, EST ve ESAT'ın fizikokimyasal özelliklerinin istatiksel farkını göstermektedir *($p<0,05$).* ET: Elma posası, EST: Elma sirkesi posası ESAT: Elma posası sirkesi posası

4.6 Pektin Ekstraksiyonu

Fermantasyon uygulanmayan elma posasının pektin verimi % 23,22 ±1,31 olarak tespit edilmiştir. Bhat vd.'nin [82] yaptığı çalışmada gold elmanın pektin verimi % 22,22 Falicent türünün pektin verimi % 23,26 olarak tespit edilmiştir. Sirke fermantasyonu sonrası posalarda pektin verimi artmıştır ve verim değerleri % 30,16 (ESP) ve 32,37 (ESAP) olarak ölçülmüştur. (Tablo 4.6).

Xu vd. [83] nin *S. cerevisiae* ile alkol fermantasyonuna maruz bırakılan elma ve üzüm şarap posalarından ekstrakte edilen pektinin fizikokimyasal ve yapısal özelliklerini fermente olmayan kaynaklardan elde edilen kontrol pektinlere karşılaştırdığı çalışmasında fermantasyonun pektin verimini azalttığını bildirmiştir. Bunun sebebinin ise bazı pektin bileşenlerinin (örn; oligosakkaritlerin) parçalanmış olabileceği ve maya fermantasyonu sırasında pektinolotik enzimlerin çalışmış ve pektini parçalamış olabileceğini belirtmiştir. Bizim çalışmamızda ise, şarap değil sirke fermantasyonu uygulanmış ve pektin verimi artmıştır. Sirke fermantasyonu toplamda 4 hafta sürmüştür ve bu süreçte sirkede asetik asit miktarı sürekli olarak artmıştır. Bu süreçte asetik asit ile doğal olarak ekstrakte olan posaların yapılarından bir miktar selüloz ve hemiselüloz ayrılmış olabilir ve ayrıca asit ekstraksiyonu ile çözünür durumda olmayan protopektin kısmen çözünür hale geçmiş olabilir.

Asidik koşullarda pektin ekstraksiyonunun, birbiriyle örtüşen ve eş zamanlı yürüyen iki reaksiyonu içerdiği bildirilmiştir; Bunlardan ilki çözünmeyen protopektinin hücre duvarından çözünmesini ve ikincisi ise bu çözünen pektinin ekstraksiyon ortamında parçalanarak hidrolize olmasıdır. İlk reaksiyon, pektinin tamamı bitki hücre duvarından ekstrakte edilene kadar hakimdir. Eğer ekstraksiyona ikinci reaksiyon hakim olursa bu durum pektin veriminde bir azalmaya yol açacaktır [84]. Pektin ekstraksiyonunda pH'nın ayarlanmasında genelde güçlü mineral asitler (HCl, HNO_3 ve H_2SO_4) kullanılmaktadır. Ancak bu durum yukarıda anlatılan ikinci reaksiyonun baskın olması ve pektin veriminin azalmasına sebep olma riskine sahiptir. Bundan dolayı son yıllarda ikinci reaksiyonun baskın gelmemesi için ekstraksiyon işleminde asetik asit gibi zayıf organik asitlerin kullanılması önerilmektedir. Asetik asit yüksek mol konsantrasyonu, zayıf elektrolit ve ayrışma dengesi özellikleri nedeniyle ortama çok daha kararlı ve yeterli miktarda hidrojen iyonu temini sağlayabilir. Artan hidrojen iyonları elma posasından pektin gibi büyük molekülleri ekstrakte edilmesine fayda sağlayabilir. Sirke fermantasyonu sırasında (4 hafta) asetik asit açısından zengin olan bu ortam, elma hücre duvarlarının daha geçirgen hale gelmiş olmasına sebep olmuş ve bunun neticesinde pektinin selüloz ve hemiselüloz yapılarından ayrılmasını kolaylaştırmış olabilir. Bu durum takip eden HCl-asidik ekstraksiyon aşamasında daha fazla protopektinin çözünür hale gelmesini sağlamış olabilir [85].

Şarap fermantasyonunun aksine sirke fermantasyonunda hakim mikroorganizmaların salgıladığı enzimler pektin depolimerizasyon aktivitelerine de sahip olmayabilir. Scarf vd.'nin [86] yaptığı çalışmada dereotu, soğan, hardal tohumu ve sirkenin poligalakturonaz (PG) aktivitesi incelenmiştir ve sirke örneginde Endo/Exzo-PG, pektinesteraz (PE) ve pektin liyaz aktivitesi tespit edilmemiştir.

Suda çözünmeyen protopektinin, protopektinaz (PPase) enzimleri ile parçalanarak çözünebilir pektin polimerleri oluşturabildiği rapor edilmiştir. Her ne kadar yapılmış herhangi bir çalışma sirkede PPase aktivitesi rapor etmemişse de, *Trichosporon penicillatum, Bacillus subtilis, Kluyveromyces fragilis, Galactomyces reesei* L., *Trametes* sp. [87], ve *Aspergillus oryzae* gibi maya ve mayaya benzeyen mantar kültürlerinde PPase aktivitesi tespit edilmiştir.

Örneğin Sakai ve Okushima'nın [88], narenciye kabuklarını protepektin çözücü enzim salgılayan *Trichosporon penicillatum* ile inoküle ettikleri zaman, konvensiyonel yollarla elde edilen pektine göre verimde artış ve elde edilen pektinde yüksek molekül ağırlığı, artan vizkozite ve daha fazla nötr şeker içeriği bildirmişlerdir. A-tipi PPase enzimlerinin fazlaca HG içeren daha düz protopektin bölgesi ile interaksiyona girdigi bildirilirken B-tip PPase enzimlerinin ise protopektinin nötral şekerlerden oluşan bölgesi ve daha çok RG içeren dallı bölgesi ile interaksiyona girdiği rapor edilmiştir. Bu durumda her ne kadar analizi gerçekleştirilmese de, sirke florasında mevcut olan mikroorganizmaların salgıladığı çeşitli enzimlerin çözünmez formdaki protopektini daha fazla miktarda çözünür hale getirmiş olabileceği speküle edilebilir. Ancak bu konu ile ilgili sonuçların daha net değerlendirmesini sağlayacak calışmaların yapılması gerekmektedir.

4.7 Fizikokimyasal Analiz Sonuçları

4.7.1 Metoksil Derecesi (% MD)

Metoksil derecesi FTIR ve titrimetrik yöntemler ile belirlenmiştir. Her iki yöntem ile elde edilen sonuçlar birbiri ile uyumludur. Sonuçlar Tablo 4.6'da verilmiştir. En düşük % MD değeri ESP'ye aittir. Tüm pektinlerin % MD değeri 50'nin üzerinde olduğundan yüksek metoksilli pektin olarak sınıflandırılabilirler. ESP, elmanın küp küp kesilip fermente edilmesiyle elde edilen posadan ekstrakte edilen pektin iken, ESAP ise elma posasından elde edilen posadan ekstrakte edilen pektindir. İstatiksel olarak bakıldığında EP ve ESAP'ın değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Sirke fermantasyonu hem başlangıçtaki anaerobik maya fermantasyonu hem de aerobik koşullar altında alkolün *Acetobakter* sp. tarafından aside dönüştürülmesini içermektedir. Başlangıçtaki şarap fermantasyonunun sınırlı süresinde, mayalar tarafından salgılanan pektin metil esteraz (PME), HG bölgesinde bir ester bağıyla bağlı karboksil gruplarına bağlı metil gruplarının bölünmesine neden olabilmektedir [87]. ESAP'ın posasında başlangıçta serbest halde daha az şeker mevcuttur, bu durumda mayanın aktivitesi elma posası sirkesinde muhtemelen daha düşük seviyede kalmıştır. Bu nedenle, pektinin metil grupları üzerinde etkili olacak yeterli miktarda PME üretimi gerçekleştirilememiş olacağından dolayı ESAP'ın % MD değeri ESP'den bir miktar yüksek kalmış \ çıkmış olabilir.

4.7.2 Protein

Protein içeriği 1,25 - 0,70 g/100 g arasında ölçülmüş ve sonuçlar Tablo 4.6'da sunulmuştur. Fermente kaynaklardan elde edilen pektinin protein değerinde bir azalma gözlemlenmiştir; bunun nedeni sirkenin asitliği nedeniyle proteinlerin denatüre olması ile de ilişkili olabilir.

4.7.4 Renk Parametreleri

Tablo 4.6'da EP, ESP ve ESAP'ın L*, a* ve b* parametreleri verilmiştir. Elmada bulunan polifenoller, EP ve ESAP'ın hammaddesi hazırlanması yani suyunun uzaklaştırılması işleminde endojen enzimlerin oksidasyonuna maruz kalmış olabilir. Ayrıca ESAP'ın elde edildiği hammaddenin (elma posası) sirke fermantasyonuna maruz kaldığı yüzey alanı ESP'ninkinden (elma küpleri) daha yüksektir. Hem hammaddenin hazırlanması hem de oksijen varlığındaki sirke fermantasyonu sırasında ESP'nin hammaddesi polifenol degredasyonundan daha az etkilenmiş olabilir ve bu da hammaddeden üretilen pektinlerin renk değerlerine yansımış olabilir. Elde edilen pektinlerin EP, ESP ve ESAP'ın toplam fenolik madde içerikleri sırasıyla; 1,10±0,02, 1,36±0,07 ve 0,97±0,17 mg GAE/100 g olarak tespit edilmiştir. ESP en parlak, en az kırmızılık ve sarılık değerine sahip pektin iken EP ve ESAP daha az parlak, daha koyu kırmızı ve sarı renk değerlerine sahip olmuştur.

Tablo 4.6 EP, ESP ve ESAP'ın fizikokimyasal analiz sonuçları

Parametreler	Birim	EP	ESP	ESAP
Verim	%	$23,22±1,31^{b}$	$32,37±1,95^{a}$	$30,16±2,10^{a}$
MD[1]	%	$57,21±0,56^{a}$	$50,01±0,11^{b}$	$57,88±0,6^{a}$
MD[2]		$58,53±0,1^{a}$	$55,21±0,2^{b}$	$58,51±0,1^{a}$
Protein içeriği	g/100 g	$1,25±0,21^{a}$	$0,76±0,08^{b}$	$0,70±0,02^{b}$
Toplam fenolik madde	mg GAE/100g	$1,10±0,02^{b}$	$1,36±0,07^{a}$	$0,97±0,17^{b}$
Renk				
L*		$72,18±1,39^{b}$	$88,07±0,63^{a}$	$72,97±0,28^{b}$
a*		$6,63±0,22^{a}$	$2,86±0,31^{b}$	$6,59±0,08^{a}$
b*		$17,68±0,31^{b}$	$12,19±0,41^{c}$	$21,08±0,51^{a}$

Veriler ortalama ± S.D. olarak ifade edilmiştir. Aynı satırdaki farklı harfler EP, ESP ve ESAP'ın fizikokimyasal özelliklerinin istatiksel farkını göstermektedir *(p<0,05)*. MD: Titrasyon[1] ve FTIR[2] ile ölçülen metilasyon derecesi. GAE: gallik asit eşdeğeri, EP: fermente edilmemiş elma posasından ekstrakte edilen pektin; ESP: sirke fermantasyonuna maruz bırakılan elma küplerinin posasından ekstrakte edilen pektin; ESAP: sirke fermantasyonuna maruz bırakılan elma posasının kalıntısından ekstrakte edilen pektin

4.7.5 Pektinlerin Monosakkarit Kompozisyonu

Pektin, bir dizi monosakkaritten oluşan kompleks bir polisakkarittir. Genellikle galakturonik asit (GalA), galaktoz (Gal), arabinoz (Ara) ve diğer şekerlerin kombinasyonlarını içermektedir. Monosakkarit analizi, pektin molekülündeki bu monosakkaritlerin oranlarını ve dağılımlarını belirlemeye yardımcı olmaktadır. Bu analiz, pektinin yapısal özelliklerini ve bileşimini anlamak için kritik öneme sahiptir [89].

Pektinlerin monosakkarit kompozisyonu % mol olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.7'de verilmiştir. Elmaların sirke fermantasyonuna maruz kalması elde edilen pektinlerin monosakkarit kompozisyonunu etkilemiştir. GalA içeriği tüm pektinlerde en yüksek değerde tespit edilen bileşen olmuştur. En yüksek GalA içeriği ESP'de (% 80,10) en düşük ise ESAP'da (% 61,94) tespit edilmiştir. Elde edilen pektinlerin yan zincirlerinin ana bileşenlerini Ara ve Gal'dan oluşmaktadır. GalA sonrası EP ve ESAP'da Gal>Ara şeklinde iken, ESP'de ise Ara>Gal şeklindedir. EP'ye göre fermente pektinlerde Ara oranı artmıştır yine de bu artış ESAP'da daha yüksektir.

EP ile karşılaştırıldığında ESAP'da Gal, Rha ve Xyl oranları az miktarda artış gösterirken, ESP'de ise hepsinin oranı azalmıştır. Bu da yan zincirdeki monosakkarit oranlarının sirke fermantasyonu ile değişiminin hammaddenin özelliğine göre değiştiğini göstermektedir. Xu vd.'nin [83] elma ve üzüm ile şarap fermantasyonu uyguladığı posalarından elde ettikleri pektinlerde kontrol pektinlere göre daha yüksek oranda Ara, Gal, Rha, Xyl ve Man daha az oranda ise GalA, Glc ve Fuk tespit etmişlerdir.

Homogalaktronlar (HG) pektinin lineer zincirini oluşturmaktadır. GalA üniteleri birbirine α-1,4 glikozidik bağı ile bağlanmaktadır. C6 pozisyonunda methanol ile kısmen esterleşirler ve bu esterleşen birimlerin toplam GalA'a oranı metilasyon derecesi olarak ifade edilmektedir. Rhamnogalakturonanlar I (RG-I) Rha, Gal, Ara ve arabinogalaktanlar gibi çeşitli şekerlerden ve dallanmış oligasakkaritlerden oluşan yan zincirlere sahiptir [90]. RG-II yapısal olarak karmaşık bir pektindir.

Zincirin yapısında GalA, Rha, Gal ve nadir şeker kalıntıları bulunur ve Xyl varlığı ise ksilogalakturanlara atfedilir [83]. Pektine yan zincirlerle bağlı olan ancak pektik polisakkarit olmayan (örn., hemiselülöz) yapıların kalıntıları Man ve Xyl varlığı ile ilişkilendirilebilir.

Bütün pektin örneklerinde HG bölgeleri hâkim olup RG-I açısından zengindirler (Tablo 4.7). HG (% mol) EP, ESP ve ESAP'da sırasıyla % 70,41 - 77,40 ve 59,60; RG-I (% mol) EP, ESP ve ESAP'da sırasıyla % 27,85 - 20,65 ve 35,64 şeklindedir. HG/RG-I oranı EP, ESP ve ESAP'da sırasıyla: 2,54 - 3,78 ve 1,67 olarak tespit edilmiştir. Rha/GalA oranı ESAP'da 0,04, EP ve ESP'de 0,03'tür. Bu oran Rha kalıntıları başına GalA kalıntılarının sayısını temsil etmektedir. Aynı zamanda HG içeriğine göre RG-I omurgasının bir göstergesidir. Bu değerin yüksek çıkması örnekte RG-I bölgesinin zenginliğini ifade etmektedir.

Pektinin yapısında sirke fermantasyonuna bağlı değişimler, sirke yapımında kullanılan hammaddenin durumuna (elma küpleri, suyu uzaklaştırılmış elma posası) göre farklı olmuştur. Fermente olmayan kontrol pektin EP'ye göre, ESP'de HG bölgesinin büyüklüğü artmış RG-I ise azalmıştır. Bu durum, ESP'de dallanmış bölgelerin miktarının azaldığını ve dolayısıyla düz bölgelerin daha baskın hale geldiğini göstermektedir. Ancak sirke yapımında hammadde olarak suyu uzaklaştırılmış elma posası kullanıldığı ve fermantasyon sonrasında bu posadan pektin elde edildiğinde (ESAP) ise, aksine HG bölgesinin büyüklüğünün azaldığı ve RG-I ise arttığı gözlenmiştir. Xu vd.'nin [83] yaptığı çalışmada elma ve üzüme şarap fermantasyonu uyguladıktan sonra elde edilen posalarından ekstrakte edilen pektinlerin RG-I bölgeleri daha baskın çıkmıştır. HG ve RG-I bölgelerinin pektin yapısında kovalent olarak bağlı olduğu ve zincir parçalayıcı enzimler olmadan ayrılamamaktadır [91].

(Gal+Ara)/Rha değeri, RG-I omurgasına bağlı nötr yan zincirlerin ortalama boyutunu temsil eder ve yüksek değer daha fazla dallanmayı veya daha uzun yan zincirleri temsil eder. GalA/(Fuk+Rha+Ara+Gal+Xyl) değeri ise pektinin lineerliğini ifade etmektedir. Kontrol EP'ye göre, ESP daha lineer bir yapıya sahip olup, RG-I omurgasına bağlı nötral yan zincirlerin uzunluğu önemli miktarda daha azdır. ESAP'da ise durum tersine olmuştur. Benzer şekilde Xu vd.'nin [83] şarap fermantasyonu uygulanmış elma ve üzüm posalarından ekstrakte edilen pektinlerde kontrollerine göre doğrusallığında azalış olmuştur. Ancak yan zincirlerin ortalama

boyutu ise hammaddenin üzüm veya elma olmasına göre değişmiştir. Bu yan zincirlerin ortalama boyutu fermente üzüm pektininde daha düşük iken, elmada bu durum söz konusu olmamıştır. Bu farklılıkların hem endojen enzimler hem de maya enzimlerinden kaynaklandığı düşünülmüştür. ESP ve ESAP'ın sirke fermantasyonuna maruz bırakılan hammaddeleri birbirinden farklıdır. ESP serbest şekerler açısından zengin iken, ESAP'da ise serbest şekerler azdır. Sirke fermantasyonu sırasında mikrobiyota için farklı miktarda çözünür serbest halde şeker bulunmaktadır. Bu da pektin yapısı üzerinde etkili olan enzimlerin farklı miktarda salgılanmasına sebebiyet vermiş ve elde edilen pektinlerde yapısal farklılıklar oluşmuş olabilir. Yine fermantasyon sırasında ESP ve ESAP'ın hammaddelerinin maruz kaldığı asetik asit konsantrasyonları farklıdır, ESP daha yüksek asetik asit konsantrasyonuna maruz kalmıştır. RG-I bölgesindeki nötral monosakkaritlerin glikozit bağlarının asitle hidrolize karşı daha duyarlı olduğu bilinmektedir.

Tablo 4.7 EP, ESP ve ESAP pektinlerinin monosakkarit bileşimi

Parametreler	Birim	EP	ESP	ESAP
Mannoz (Man)	% mol	0,25±0,02^{c}	0,89±0,00^{a}	0,83±0,01^{b}
Rhamnoz (Rha)		2,00±0,01^{b}	2,69±0,13^{c}	2,34±0,03^{a}
Glukoronik asit (GulA)		0,03±0,01^{c}	0,39±0,02^{a}	0,12±0,01^{b}
Galakturonik asit (GalA)		72,21±0,03^{b}	80,10±0,57^{a}	61,94±0,05^{c}
Galaktoz (Gal)		15,88±0,02^{b}	6,43±0,07^{c}	16,79±0,08^{a}
Ksiloz (Xyl)		0,69±0,01^{b}	0,37±0,02^{c}	1,70±0,14^{a}
Arabinoz (Ara)		7,89±0,01^{c}	8,84±0,44^{b}	14,18±0,12^{a}
Fukoz (Fuk)		1,06±0,08^{b}	0,29±0,02^{c}	2,10±0,04^{a}
Homogalakturonan (HG)		70,41±0,19^{b}	77,40±0,71^{a}	59,60±0,08^{c}
Rhamnogalakturonan I (RG-I)		27,85±0,09^{b}	20,65±0,64^{c}	35,64±0,26^{a}
GalA / (Fuk+Rha+Ara+Gal+Xyl)		2,62±0,01^{b}	4,30±0,16^{a}	1,67±0,01^{c}
(Gal+Ara)/Rha		11,87±0,03^{a}	5,68±0,14^{c}	13,20±0,10^{b}
(Man/Xyl)		0,38±0,01^{b}	2,42±0,15^{a}	0,49±0,04^{b}
Rha/GalA		0,03±0,00^{b}	0,03±00^{b}	0,04±0,00^{a}

Veriler ortalama ± S.D. olarak ifade edilmiştir. Aynı satırdaki farklı harfler EP, ESP ve ESAP'ın monosakkarit kompozisyonunun istatiksel farkını göstermektedir *(p<0,05)*. (%) = GalA (% mol) - Rha (% mol); RG-I = 2Rha (% mol) + Ara (% mol) + Gal (% mol). EP: fermente edilmemiş elma posasından ekstrakte edilen pektin; ESP: sirke fermantasyonuna maruz bırakılan elma küplerinin posasından ekstrakte edilen pektin; ESAP: sirke fermantasyonuna maruz bırakılan elma posasının kalıntısından ekstrakte edilen pektin

4.8 Yapısal Karakterizasyon

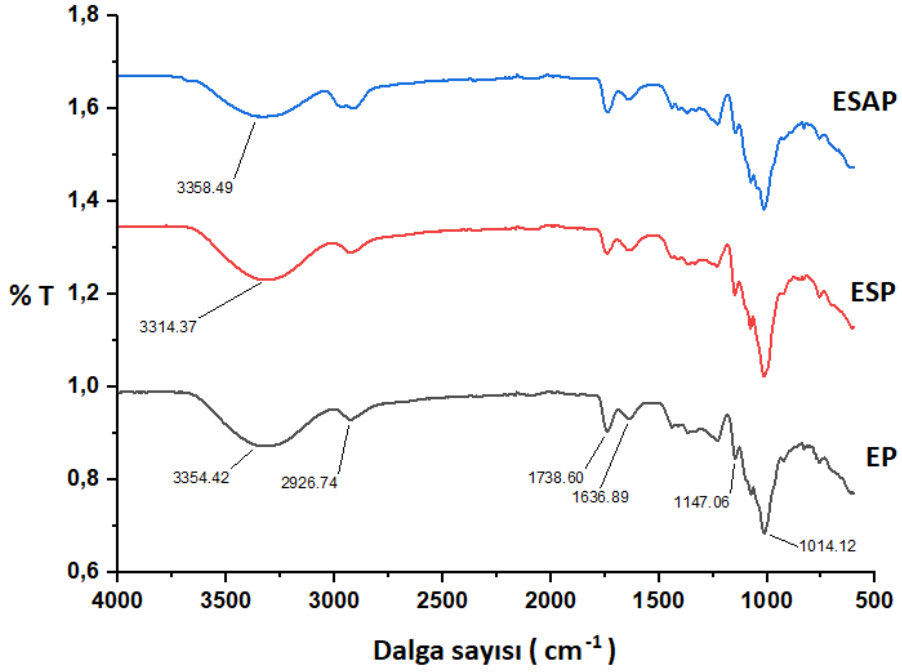
4.8.1 FTIR

Maddeyi oluşturan atomlar arasındaki bağların titreşimi ile meydana gelen frekanslar sonucu oluşan absorpsiyon pikleriyle, maddenin organik veya inorganik bileşiklerin karakterize edilmesini sağlayan önemli bir enstrümental analiz yöntemi olan FTIR spektroskopisi, her maddenin kendine özgü, parmak izi olarak adlandırılan spektrumunu oluşturmaktadır. Pektinin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir [92].

EP, ESP ve ESAP arasındaki fonksiyonel grup farklılıklarını ve bunların bağlanma konfigürasyonlarını belirlemek için kullanılan FTIR spektrumları (Şekil 4.18) pektin örneklerindeki kimyasal bağların sadece küçük farklılıklarla benzer olduğunu göstermektedir. Tüm örneklerde 3358 cm^{-1} ve 3314 cm^{-1}'deki geniş ve belirgin pikler moleküller arası ve molekül içi hidroksil gruplarına bağlı OH germe absorpsiyonunu ifade etmektedir [93]. 2928 cm^{-1} tüm örneklerde ortak bir pik olup CH, CH_2 ve CH_3 gruplarının C-H bağlarını ifade etmektedir. Tüm pektin örnekleri, sırasıyla GalA birimlerinin esterleşmiş ve serbest karboksil gruplarına karşılık gelen 1738 cm^{-1} ve 1634 cm^{-1}'de karakteristik sinyaller vermiştir [94].

ESP, 1738 cm^{-1} de daha düşük bir metilasyon derecesine (%MD) işaret eden daha düşük bir ester karbonil bandı vermiştir. Bununla birlikte, karboksilat iyonu gerilmesine karşılık gelen 1634 cm^{-1}'deki geniş pik, tüm pektin örneklerinde tutarlılık göstermiştir. 1350 - 1450 cm^{-1} bölgesindeki bantların tüm pektinlerde esterleşmiş CH_3 gruplarıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir, CH_3'ün sırasıyla simetrik ve asimetrik gerilmesine atfedilen 1371 cm^{-1} ve 1440 cm^{-1}'de pikler tüm örneklerde gözlenmiştir. 1014 cm^{-1}'deki güçlü pikler yüksek homogalakturonan (HG) içeriğine işaret etmektedir [95] ve tüm pektin örneklerinde HG bölgeleri tespit edilmiştir [96]. EP ve ESP, ESAP'a kıyasla Ara, Xyl ve Gal gibi nötr şekerlerle ilişkili 1045 cm^{-1} ve 1076 cm^{-1} deki omuz piklerinde daha düşük sinyal vermiştir

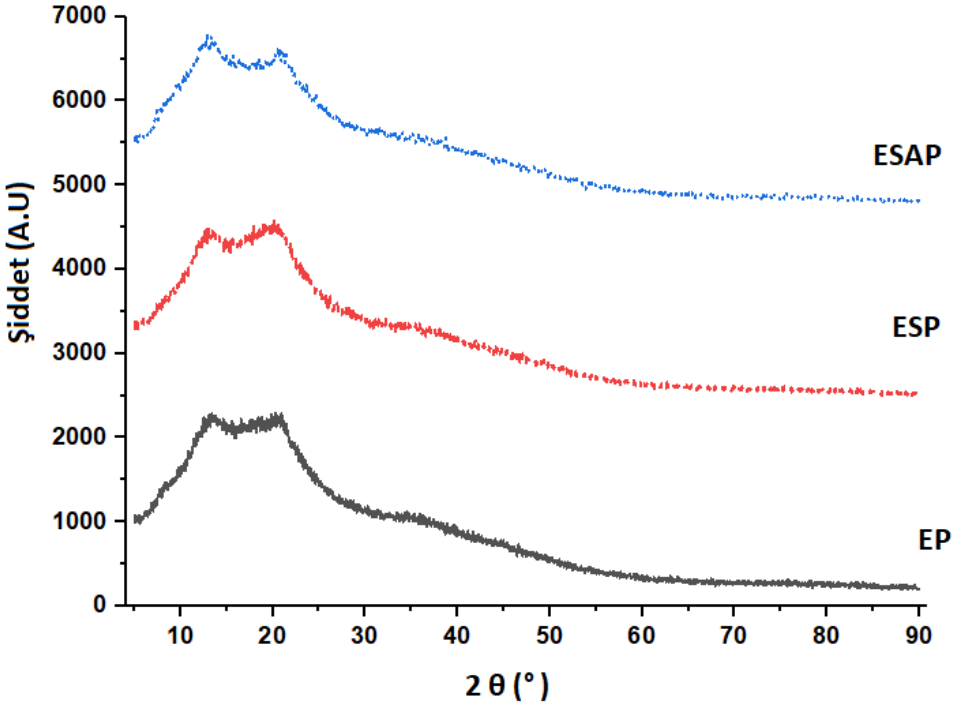
[97]. ESAP, monosakkarit kompozisyon analizinde (Tablo 4.7) görülebileceği gibi daha yüksek oranda nötr şeker içermektedir.



Şekil 4.18 EP, ESP ve ESAP'ın FTIR spektrumları

4.8.2 XRD

XRD analizi polimerlerin amorf ya da kristal yapıda olup olmadığı hakkında bilgi veren bir yöntemdir. Tüm örnekler büyük ölçüde amorf yapıdadır ancak aynı zamanda 10° ve 25° arasında kristal bölgeye de sahiptirler (Şekil 4.19). Literatürdeki çalışmalarla uyumlu olarak kristal sinyalleri 2 θ nın yaklaşık 13° ve 21° değerlerinde tüm örneklerde gözlemlenmiştir. Karboksilik grupların sırasının önemli olduğu ve bunun daha kristalli bir polimere yol açtığı bildirilmiştir [98]. ESP ve ESAP kırınım grafikleri, kristal piklerin genişliği ve büyüklüğü açısından kontrol EP'den farklıdır. İkinci zirve (21° civarında), ESP'de daha belirgin hale gelirken, ESAP'da ise pikin büyüklüğünün azalmasıyla birlikte daralmıştır. Pik büyüklüğünün azalması polisakkarit polimer ağındaki hidrojen bağlarının parçalanmasından kaynaklı olabilir [83].



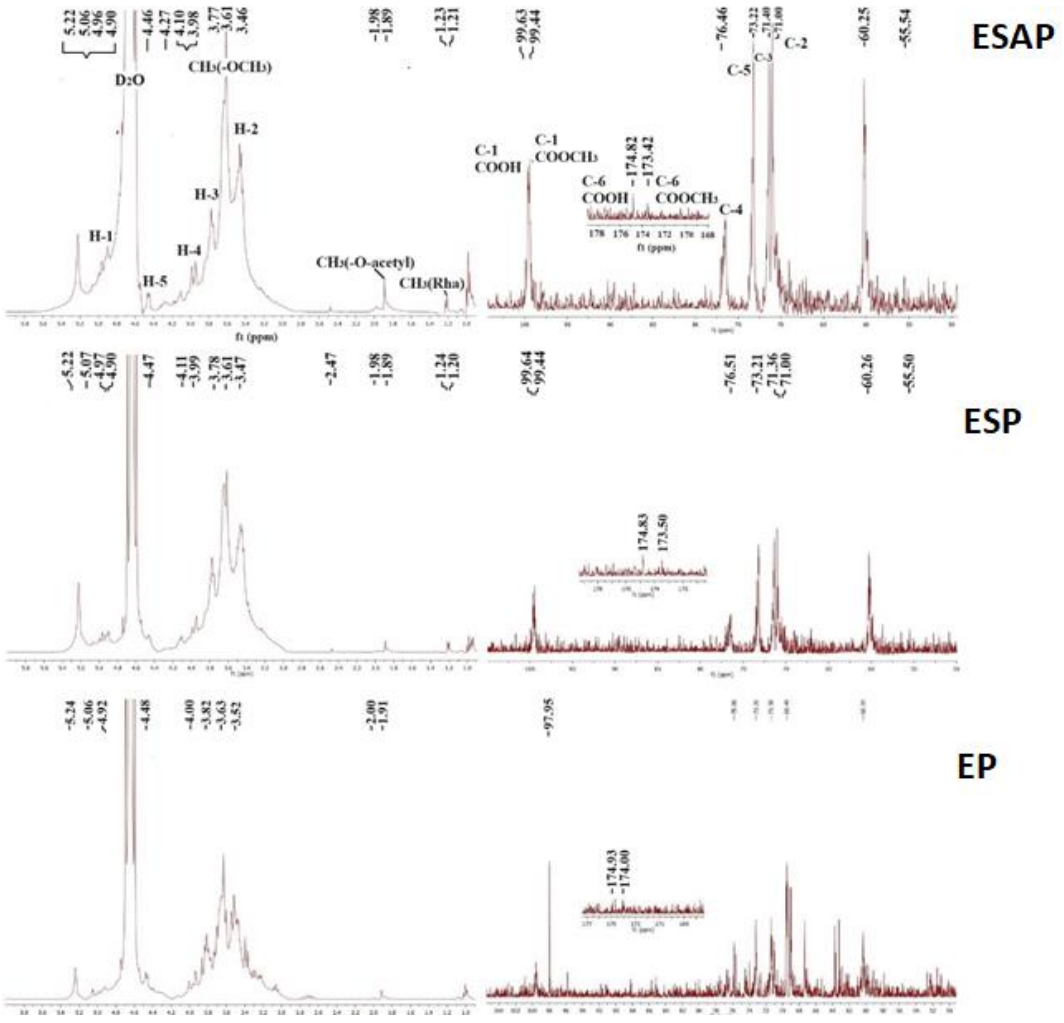
Şekil 4.19 EP, ESP ve ESAP'ın XRD kromotogramları

4.8.3 ^{1}H NMR ve ^{13}C NMR

^{1}H NMR ve ^{13}C NMR spekturumları şekil 4.20'de verilmiştir. 4,70 ppm'de gelen sinyaller kullanılan çözücüyle (D_2O) ilgilidir. 1,0 ppm'deki sinyal pektinin çöktürülmesi için kullanılan etanole ait kalıntıdır (CH_3- CH_2OH). 1,21 ve 1,23 ppm'deki sinyaller Rha'nın metil gruplarına bağlantısıdır. 1,98 ve 1,89 ppm'de ki sinyaller sırasıyla 2-O ve 3-O'dan GalA'ya bağlanan asetil gruplarını göstermektedir. Yaklaşık 5 ppm civarındaki yüksek proton sinyalleri, anomerik H-1 (5,07 ppm) ve H-5 (4,96 ppm) gibi, esterifikasyona uğramamış GalA kalıntılarını göstermektedir [99], Ara'nın anomerik protonu 5,22 ppm'de gözlenmiştir [120]. Her üç örnekte 3,61 ppm'deki geniş ve keskin sinyal esterleşmiş metoksil gruplarını ($-OCH_3$) ifade etmektedir. Şekildeki beş ana sinyal esterleşmiş GalA'yı ifade etmektedir. Bunlar önceki çalışmalarla da [83], [100], [101] uyumlu olacak şekilde 4,90 ppm'de H-1 protonu; 3,46 ppm'de H-2 protonu; 3,77 ppm'de H-3 protonu; 3,98 ppm'de H-4 protonu ve 4,46 ppm'de H-5 protonuna aittir.

Anomerik karbon bölgesi aralığında, 99,6 ve 99,4 ppm'deki sinyaller sırasıyla esterleşmiş ve esterleşmemiş birimlerin C-1'e bağlandığını ifade etmektedir [122],[123].

60,31 ppm'deki sinyal piranosidik halkanın C-6 O (O-Me) metil ester grubunu ifade etmektedir [100]. 71,0, 71,4, 76,5 ve 73,2 ppm'deki sinyaller GalA'nın C 2-5'i ile ilgilidir [104], [105]. EP nin spektrumu, ESP ve ESAP'dan daha karmaşıktır. Bunun sebebi yapısında bulunan diğer doğal bileşenlerin varlığı ile ilişkili olabilir. Ek olarak, sirke fermentasyonuna ugramis hammaddelerden elde edilen pektin örneklerinde pikler daha belirgin ve net hale gelmiştir. Örneğin; Rha'nın metil gruplarının (1.2 ppm) pikleri EP'de ayırt edilemezken, fermente kaynaklardan elde edilenlerde kendisini daha belirgin ve güçlü olarak göstermektedir.



Şekil 4.20 EP, ESP ve ESAP'ın ^{1}H NMR ve ^{13}C NMR spektrumları

4.8.4 Molekül Ağırlığı

EP, ESP ve ESAP'ın moleküler ağırlık dağılımı Şekil 4.21'de verilmiştir. Fermente edilmemiş elma posasından elde edilen pektinin kromatogramında iki pik gözlenmiştir. Birinci pik 1255 kDa ağırlığa ve % 34,88 kütle oranına sahiptir. Daha düşük moleküler ağırlığına (339,7 kDa) sahip olan ikinci pik ise daha yüksek (% 65,2) kütle oranına sahiptir (Tablo 4.8). İlk büyük pik GalA bakımından zengin pektin bileşenlerine karşılık gelirken, ikinci küçük pik muhtemelen nötr şekerleri ve daha sonra ayrılan diğer bileşenleri (iyonlar, asitler, vb.) temsil edebilir. Daha önceki bir calışmada ekstraksiyon çözücüsü sitrik asit olduğunda, farklı elma çeşitlerinden üretilen pektinlerin moleküler ağırlığının >805 kDa olduğu bildirilmiştir [106]. Zhou vd. [106] öğütülmüş taze elmalardan pektin ekstrakte ettiklerinde, pektinlerin moleküler ağırlığı ekstraksiyon çözücüsüne bağlı olarak 592 ila 1787 kDa arasında değişmiştir. Pektin ekstraksiyonunun hammaddesi sirke fermantasyonuna uğrayan elma küpleri olduğunda, molekül ağırlığı daha yüksek olan ilk pikin (1294 kDa Ma) kütle fraksiyonu da daha yüksek (% 89) olmuştur. Bu durum, fermantasyonun, düşük molekül ağırlığı bileşenlerin hidrolizini arttırdığını ve ana pikin saflığını arttırdığını gösterebilir. Pektin ekstraksiyonunun hammaddesi fermente elma posası olduğunda, birinci pik daha erken ayrılmış dolayısıyla molekül ağırlığı önemli miktarda yüksek olmuştur (6851 kDa), ancak bu pikin kütlece oranı sadece % 8,6'dir. İkinci gelen ve daha düşük molekül ağırlığına sahip (477,5 kDa) olan bileşeninin ise kütle oranı % 91,4 olmustur.

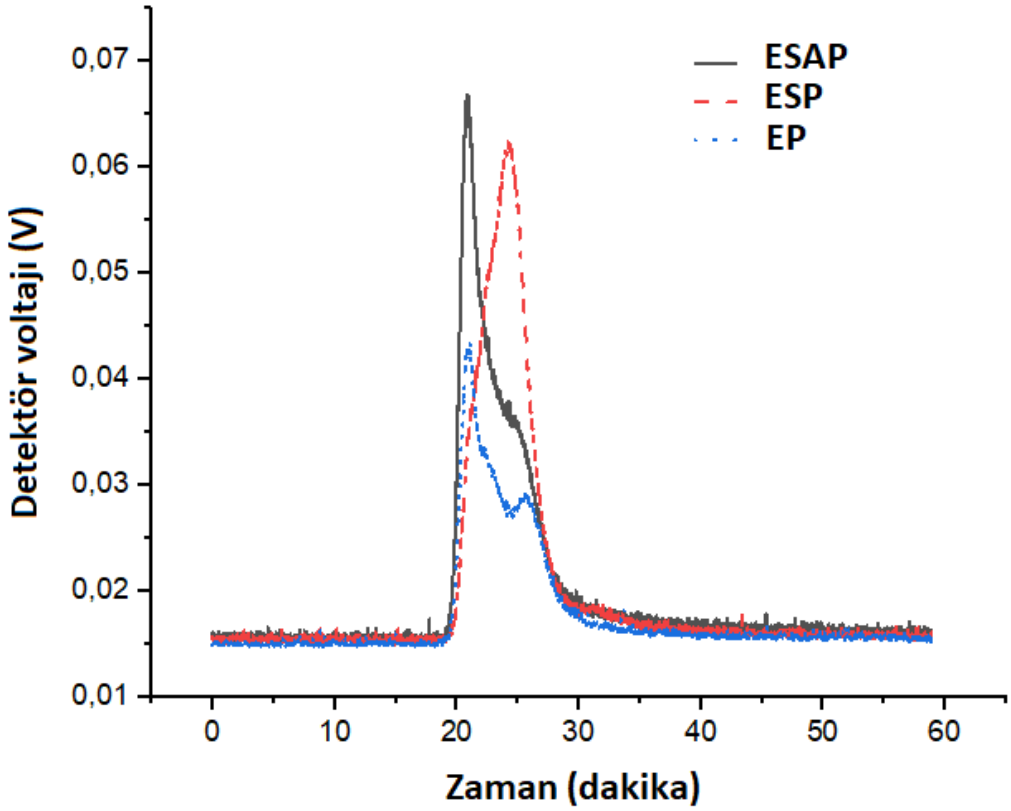
Xu vd.'nin [83] yaptığı çalışmada, elma pektininin molekül ağırlığı değeri şarap fermantasyonu ile 1859,64'ten 1925,31 kDa'na artmıştır. Elma şarabı posasından elde edilen pektinlerine benzer şekilde, bizim örneklerimizde de en yüksek molekül ağırlığı ESAP'da gözlenmiştir. Yine bu örnek en düşük büyüklükte HG bölgesine sahiptir ve RG-I omurgasına bağlı nötr yan zincirlerinin ortalama uzunluğu da en büyüktür. Polidispersite indeksi (Ma/Ms) değerinin 1,2'den düşük ve 2'den yüksek olması sırasıyla dar ve geniş ağırlık dağılımı olarak kabul edilmektedir [106]. EP ve ESAP'ın Ma/Ms değeri benzer olup ESP'ninki ise en düşük olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.8). Bu da ESP'nin en dar polimer fraksiyonları dağılımına ve daha homojen bir molekül ağırlığı dağılımına sahip olduğunu göstermektedir. Pektin ekstraksiyonunda kullanılan hammaddelere uygulanan kurutma, sirke fermantasyonu (inkübasyon sıcaklığı ve süresi) ve pektin ekstraksiyonu dahil

olmak üzere her işlem koşulu aynı şartlarda yapılmıştır; bu nedenle, moleküler ağırlık dağılımında gözlenen farklılık, pektin üretimi için kullanılan hammaddelerin (fermente olmamış elma posası, elma sirkesi posası, elma posasından yapılan sirkenin posası) özelliklerine bağlı olabilir.

Tablo 4.8 EP, ESP ve ESAP molekül ağırlığı

Örnekler	Pik 1				Pik 2			
	Ma (kDa)	Ms (kDa)	Ma /Ms	Kütle fraksiyonu %	Ma (kDa)	Ms (kDa)	Ma /Ms	Kütle fraksiyonu %
EP	1255	547,7	2,291	34,8	339,7	329,4	1,031	65,2
ESP	1294	858,7	1,507	89	574,5	552,9	1,039	11
ESAP	6851	2820	2,429	8,6	477,5	455,4	1,049	91,4

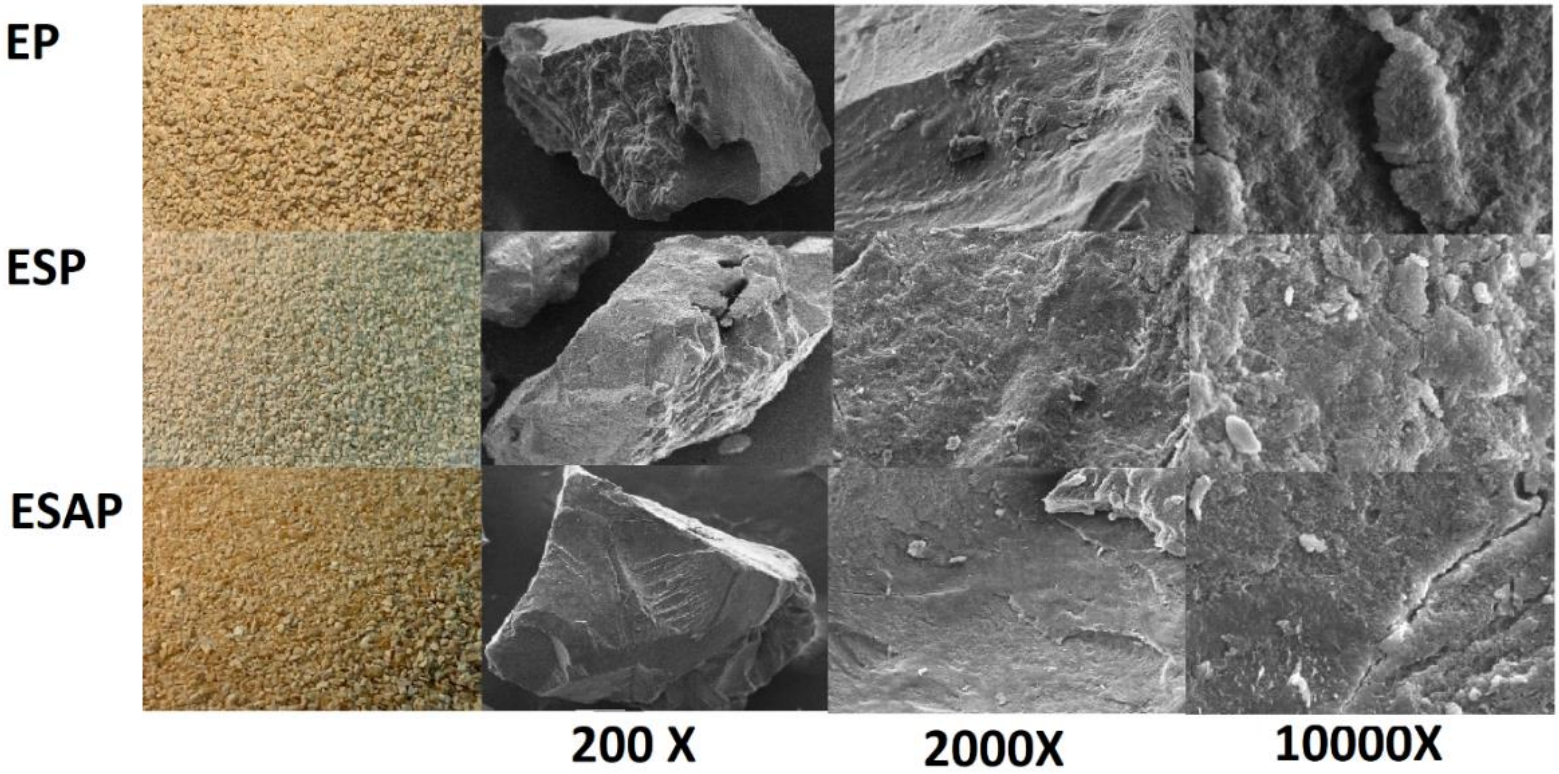
EP: fermente edilmemiş elma posasından ekstrakte edilen pektin; ESP: sirke fermantasyonuna maruz bırakılan elma küplerinin posasından ekstrakte edilen pektin; ESAP: sirke fermantasyonuna maruz bırakılan elma posasının kalıntısından ekstrakte edilen pektin Ma: molekül ağırlığı; Ms: molekül sayısı



Şekil 4.21 EP, ESP ve ESAP'ın molekül ağırlığı dağılımı

4.8.5 SEM

Sirke fermantasyonunun pektinin morfolojik özellikleri üzerindeki etkisini gözlemlemek için SEM analizi yapılmıştır. Şekil 4.22'de gösterildiği gibi, fermente pektinlerin yüzeyi daha pürüzsüzdür. ESAP'a göre ESP daha az pürüzsüz bir yüzeye sahiptir. EP ise daha pürüzlü bir yüzeye sahiptir.



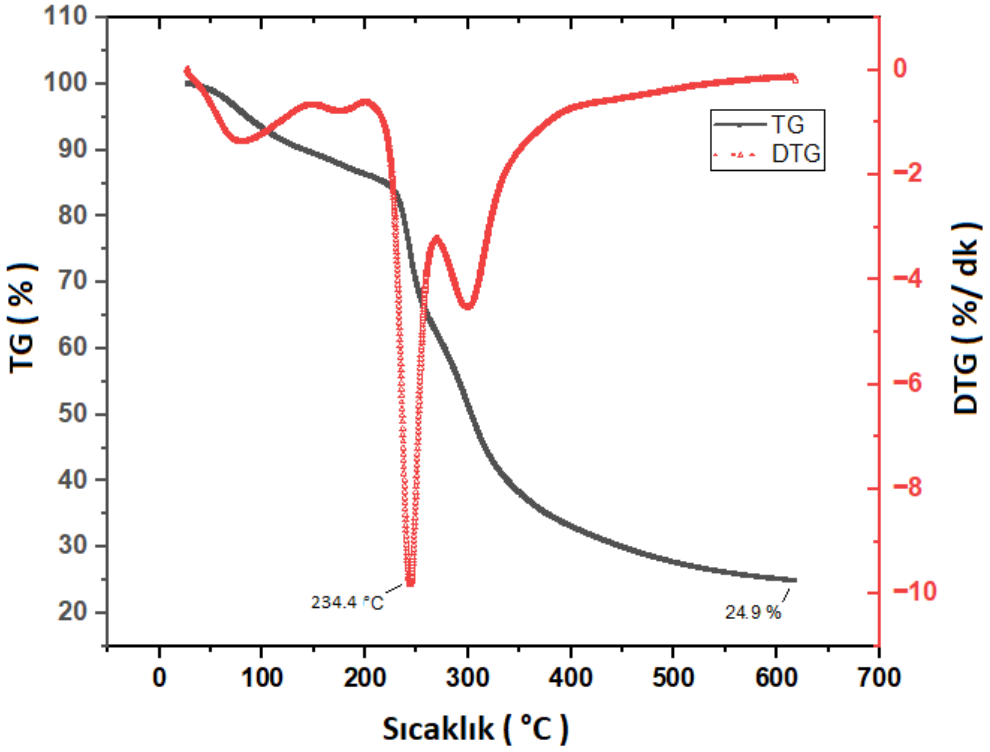
Şekil 4.22 EP, ESP ve ESAP'ın fotoğrafları ve SEM görüntüleri

4.9 Termal Analiz

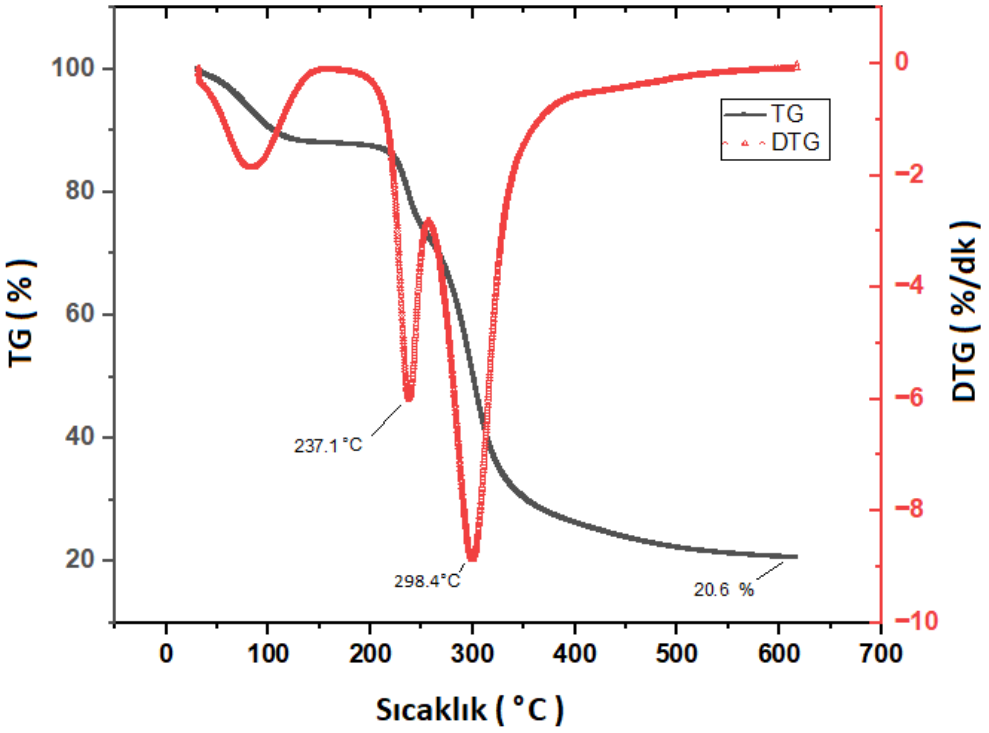
Bir numunenin ağırlığının kontrollü bir sıcaklık programı altında sürekli olarak ölçüldüğü analiz; termogravimetrik analiz (TGA) olarak ifade edilmektedir. TGA eğrisinden faydalanılarak, örneğin ağırlığının sıcaklığa veya zamana göre değişimine bağlı olan türev termogravimetrik (DTG) eğrisi elde edilmektedir [107]. Diferansiyel tarama kalorimetri analizi (DSC), camsı geçiş sıcaklıklarını belirlemek ve termal geçişlerde yer alan ısıyı ölçmek için kullanılan bir yöntemdir [108].

EP, ESP ve ESAP'ın termal davranışı TGA, DTG ve DSC kullanılarak incelenmiştir. Şekil 4.23'te gösterilen TGA eğrileri, önceki çalışmalarla tutarlı olarak 50 - 190 ºC, 190 - 400 ºC ve 400 - 600 ºC'de üç farklı bölümle benzer davranış sergilemiştir [109], [110]. 25 - 200 ºC aralığında hem serbest hem de bağlı su buharlaşmıştır. Bu ilk aşamada, ağırlık kaybı ESAP>EP>ESP sırasında gerçekleşmiştir. İkinci aşamada kimyasal bağların ve fonksiyonel grupların bozulması, metoksil ve hidroksil grupların kırılmasıyla pektin parçalanmıştır. GalA zincirlerinde önemli ölçüde bozulma meydana gelirken, yan grupların ve karbon halka yapılarının dekarboksilasyonu gaz salınımına ve kömür oluşumuna yol açmıştır [111]. EP, ESP ve ESAP örnekleri ağırlıklarının sırasıyla % 67, % 73 ve % 70'ini kaybetmiştir. Yavaş kütle kaybına karşılık gelen üçüncü sıcaklık aralığında (400 - 600 ºC), kalan pektin içeriği EP, ESP ve ESAP için sırasıyla % 24,90, % 20,63 ve % 23,50 olmuştur. Piroliz sıcaklığı arttıkça, alifatik ve ketonik gruplarla birleşmiş polisiklik aromatik yapılardan oluşan katı ürün kısmi olarak ayrışmış ve yapısal sıkışmaya uğrayarak yoğunlaşmıştır [109]. TG sinyalinden türetilen DTG eğrisi (Şekil 4.23 - 4.25) hem termal kararlılığı hem de ağırlık kaybı oranını göstermektedir [112]. Tüm örneklerde üç kütle kaybı olayı gözlenmiştir. İlk endotermik pik (yaklaşık 75 - 80 ºC) suyun buharlaşmasına karşılık gelir. EP ve ESAP için 243 ºC'de ve ESP için 237 ºC'de gözlemlenen ve % 9,82, % 5,98 ve % 11,41'lık toplam kütle kaybına denk gelen ikinci ve üçüncü pikler, pektin zincirinin bozulmasını ifade etmektedir [103]. ESP, diğer numunelere kıyasla daha düşük bir pik sıcaklığı ve daha düşük pik yüksekliği göstermiştir. DTG grafiğindeki düşük başlangıç sıcaklığı malzemenin kararsızlığını gösterir ve pik yüksekliği ise maksimum bozulma hızını yansıtır. Üçüncü bölgede, pikler aynı alanda

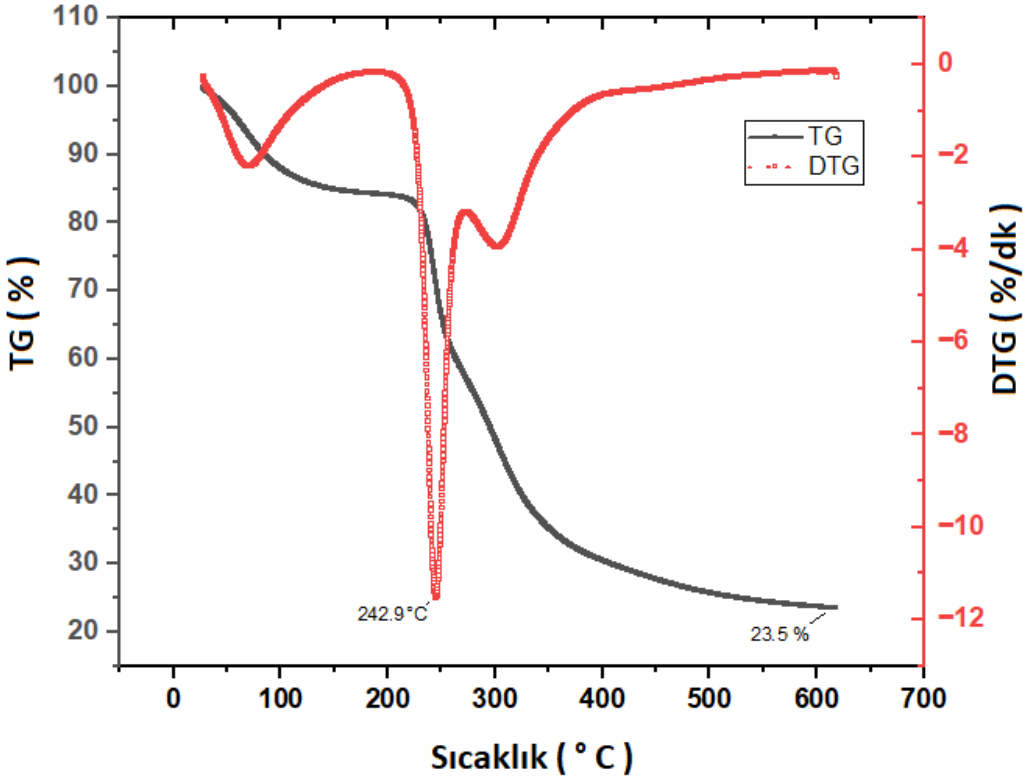
gözlenmiştir, ancak EP ve ESAP'ın pik yükseklikleri daha fazla olduğundan yüksek bozunma hızlarına işaret etmektedir. Pektin örneklerinin DTG eğrilerindeki farklı davranışları MD değerlerindeki farklılıklara da bağlanabilir. Daha düşük MD değerine sahip ESP, kendine özgü bir DTG eğrisi sergilemiştir. Einhorn Stoll vd. [112], [113] termal stabilitenin MD ile korelasyon gösterdiğini belirtmiş olup pektinde -COOH ile bağlanan hidrojen bağlarının termal bozunmayı arttırdığı belirtilmiştir. ESAP'ın ESP'ye kıyasla termal bozunmaya karşı daha dirençli olduğu söylenebilir.



Şekil 4.23 EP'nin TG/DTG eğrileri

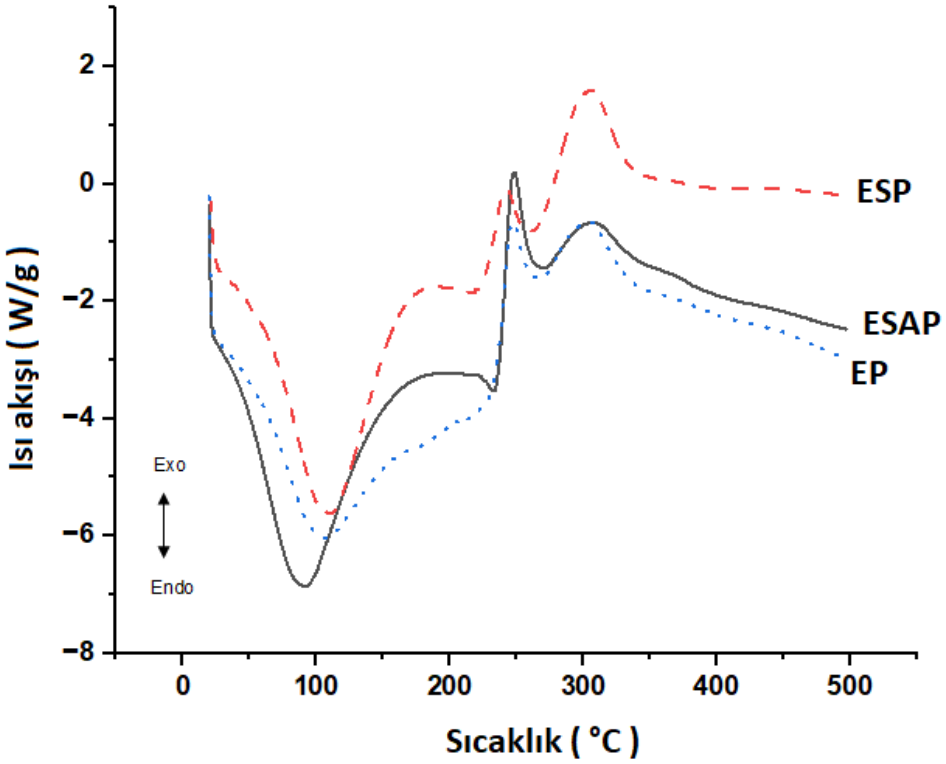


Şekil 4.24 ESP'nin TG/DTG eğrileri



Şekil 4.25 ESAP'ın TG/DTG eğrileri

DSC termogramı EP, ESP ve ESAP'ın sırasıyla 110,40 ºC, 108,91 ºC ve 91,09 ºC'de endotermik piklere sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 4.26). ESAP için daha düşük bir sıcaklığa doğru hafif bir kayma olması, daha yüksek su içeriği ve konformasyonel bir değişiklikten kaynaklanıyor olabilir. Endotermik pikler GalA birimleri arasındaki hidrojen bağının, su varlığının veya galakturonan halkasının kompakt 4C1 konformasyonundan daha gergin bir 1C4 konformasyonuna değişmesine neden olan konformasyonel bir kaymanın sonucu olabilmektedir [109], [114]. Ayrıca, her pektin benzer sıcaklıklarda iki ekzotermik pik göstermiştir. EP, ESP ve ESAP için ilk ekzotermik pikler sırasıyla 251 ºC, 246 ºC ve 250 ºC'de tespit edilmiştir. İkinci ekzotermik pik EP için 313 ºC'de, ESP ve ESAP için 311 ºC'de tespit edilmiştir. Bu ekzotermik pikler, belirli bağların veya fonksiyonel grupların kırılmasına, yapısal depolimerizasyona ve polisakkarit içindeki zincir kırılmasına atfedilebilir [111].



Şekil 4.26 EP, ESP ve ESAP'ın DSC termogramı

4.10 Reolojik Karakterizasyon

4.10.1 Sabit Kesme Analizi

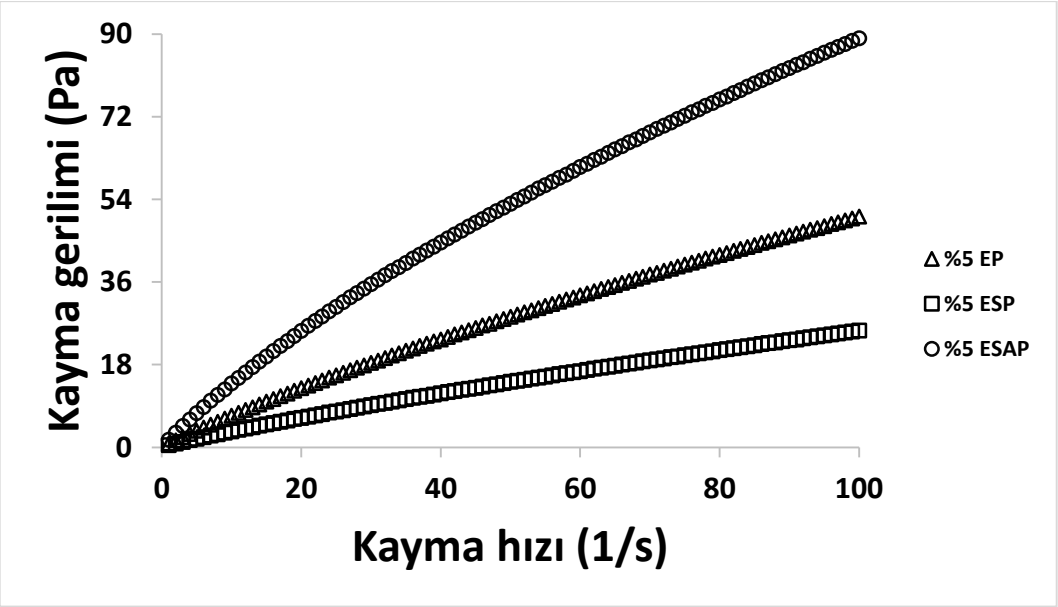
Şekil 4.27 - 4.38'da EP, ESP ve ESAP'ın farklı konsantrasyonlardaki (% 5, 7 ve 10, a/h) akış davranışları gösterilmektedir. Kayma hızı arttıkça, tüm pektin çözeltilerinin viskozitesi tüm konsantrasyonlarda azalmıştır. Bu da polimer zincirindeki çözülme nedeniyle sulu ortamda kayma inceltici sıvı davranışlarını göstermektedir. Sonuçları hesaplamak için Oswalde-wale modeli kullanılmış (Eşitlik 3) ve 0,99'luk bir R^2 determinasyon katsayısı elde edilmiştir (Tablo 4.9). Beklendiği gibi, kıvam katsayısı artan konsantrasyonla birlikte artmıştır. Daha yüksek polimer konsantrasyonlarının varlığı, hidrojen bağında bir artışa yol açarak pektin moleküllerinin birbirine daha sıkı bağlanmasına neden olmuştur. Bu kısıtlı hareket, daha yüksek viskozite ve kesme inceltme davranışı ile sonuçlanmıştır [115]. Şekil 4.27 - 4.38'de görüldüğü gibi, sirkeyle fermente edilmiş elma posasından (ESAP) elde edilen pektin, fermente edilmemiş elma posasından (EP) ve sirkeyle fermente edilmiş elmadan (ESP) ekstrakte edilen pektinlere kıyasla daha yüksek viskoziteye ve daha belirgin kesme inceltme akışına sahip olduğu belirlenmiştir. Pektin örnekleri arasındaki viskozite farklılıkları, esas olarak galakturonik asit içeriği ve moleküler ağırlıklarındaki değişikliklerinden kaynaklanmaktadır [116]. ESAP diğer örneklere göre daha büyük molekül ağırlığı ve düşük GalA'ya sahiptir. Düşük konsantrasyonlarda bile daha yüksek viskozite davranışı sergilemiştir. Wang vd. [117] yaptıkları çalışmada, daha düşük GalA içeriğine sahip ancak daha büyük Ma'ya sahip pektinin çok daha yüksek viskoziteye sahip olduğunu bildirmiştir. Azalan moleküler ağırlıkla birlikte, molekül başına bağlantı bölgesi sayısında bir azalma olmaktadır. Bu da çapraz bağlanmanın azalması nedeniyle daha zayıf bir jel ile sonuçlanmaktadır [9]. Pektin çözeltisinin viskozitesi sadece moleküler ağırlıkla değil, aynı zamanda kimyasal yapı gibi diğer faktörlerle de ilgilidir [118]. Bu çalışmada, sirke fermantasyonuna tabi tutulan farklı hammaddelerden (ESP ve ESAP) elde edilen pektinin, fermente edilmemiş hammaddeden (EP) elde edilen pektine kıyasla farklı davranışlar sergilediği gözlemlenmiştir. ESP tüm konsantrasyonlarda en düşük viskoziteye sahipken, ESAP'ın önemli ölçüde daha yüksek viskozitede olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, fermantasyon sırasında enzim salgılanmasındaki farklılıktan kaynaklanıyor olabilir. Pektin ekstraksiyonu için kullanılan hammaddedeki farklı

başlangıç şeker içeriği de bu sonucu etkilemiş olabilir. EP, elma suyunun çıkarılmasından sonra taze elma posasından elde edilmiştir. ESP, fermantasyon sırasında meyve suyu içeren fermente elma küplerinin posasından elde edilirken, ESAP, fermantasyondan önce meyve suyunun atıldığı fermente elma posasından ekstrakte edilmiştir. Bu nedenle, fermantasyon sırasında mayaların ESP üzerinde daha etkili bir şekilde çoğalarak enzim salgısının artmasına yol açmış olması mümkündür. PME enzimi potansiyel olarak ESP'deki metil ester bağlarını bozarak reolojik özelliklerde değişikliklere yol açmış olabilir. Ayrıca şeker, mayalar tarafından alkol üretiminin artmasına yol açarak fermantasyon sırasında enzimleri potansiyel olarak inaktive etmiş olabilir [118]. Ek olarak, enzim etkileri pektinde (RG-1) yan zincir azalmalarına neden olmuş olabilir. Daha önce de belirtildiği gibi, EP ile karşılaştırıldığında, RG-I omurgasına bağlı doğal yan zincirlerin uzunluğu ESP'de önemli ölçüde düşükken, ESAP'da yükselmiştir. ESP'nin yan dallarındaki nötr şeker seviyelerinin azalması, hidrojen bağları oluşturma ve üç boyutlu bir çerçeve oluşturma kabiliyetini sınırlayabilir. Benzer şekilde, Schmelter vd. [119] pektin ana zincirinin kırılmasının ve yan zincirlerin azaltılmasının viskozitede bir azalmaya yol açtığını belirtmişlerdir.

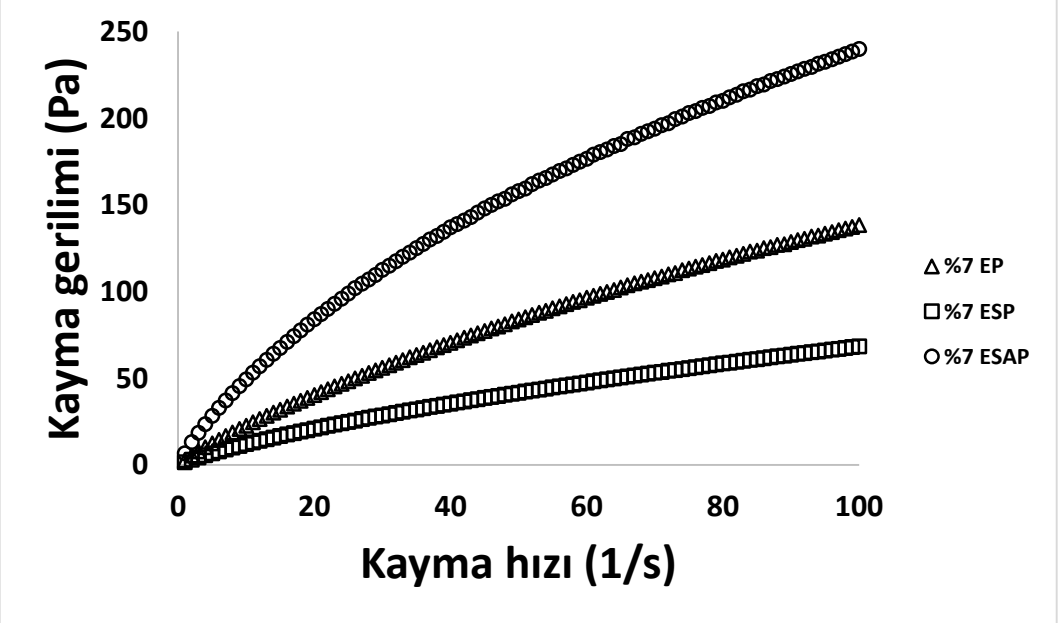
Tablo 4.9 Oswald de waele modeline göre belirlenen kıvam katsayısı, akış davranış indeksi ve determinasyon katsayısı

		R^2	K (Pa.s^n)	n
% 5	EP	0,99	$1,05\pm0,01^{Bc}$	$0,84\pm0,006^{Aa}$
	ESP	0,99	$0,51\pm0,01^{Cc}$	$0,85\pm0,010^{Aa}$
	ESAP	0,99	$2,50\pm0,06^{Ac}$	$0,78\pm0,004^{Ba}$
% 7	EP	0,99	$4,21\pm0,10^{Bb}$	$0,76\pm0,007^{Ab}$
	ESP	0,99	$2,31\pm0,05^{Cb}$	$0,74\pm0,01^{Bb}$
	ESAP	0,99	$11,87\pm0,27^{Ab}$	$0,66\pm0,005^{Cb}$
% 10	EP	0,99	$35,78\pm0,31^{Ba}$	$0,53\pm0,003^{Bc}$
	ESP	0,99	$20,10\pm0,10^{Ca}$	$0,54\pm0,004^{Ac}$
	ESAP	0,99	$78,38\pm1,24^{Aa}$	$0,45\pm0,006^{Cc}$

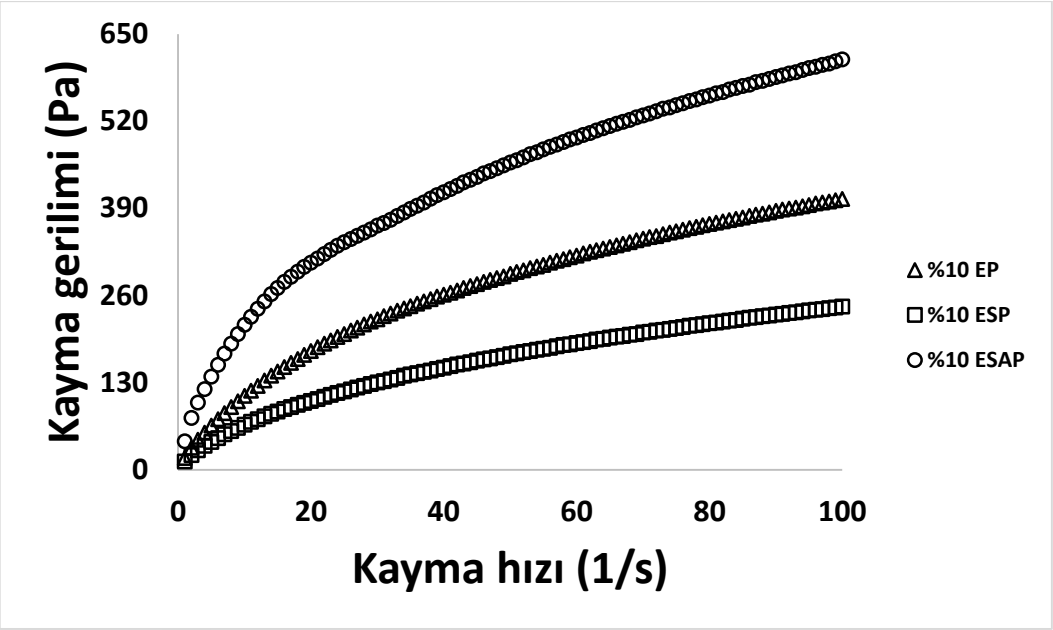
Veriler ortalama ± S.D. olarak ifade edilmiştir. Aynı sütundaki a-c harfleri pektin örneklerinin farklı konsantrasyonlardaki istatiksel farkını göstermektedir. Aynı sütundaki A-C harfleri aynı konsantrasyondaki pektin örneklerinin istatiksel farkını göstermektedir*($p<0.05$)*. EP: fermente edilmemiş elma posasından ekstrakte edilen pektin; ESP: sirke fermantasyonuna maruz bırakılan elma küplerinin posasından ekstrakte edilen pektin; ESAP: sirke fermantasyonuna maruz bırakılan elma posasının kalıntısından ekstrakte edilen pektin



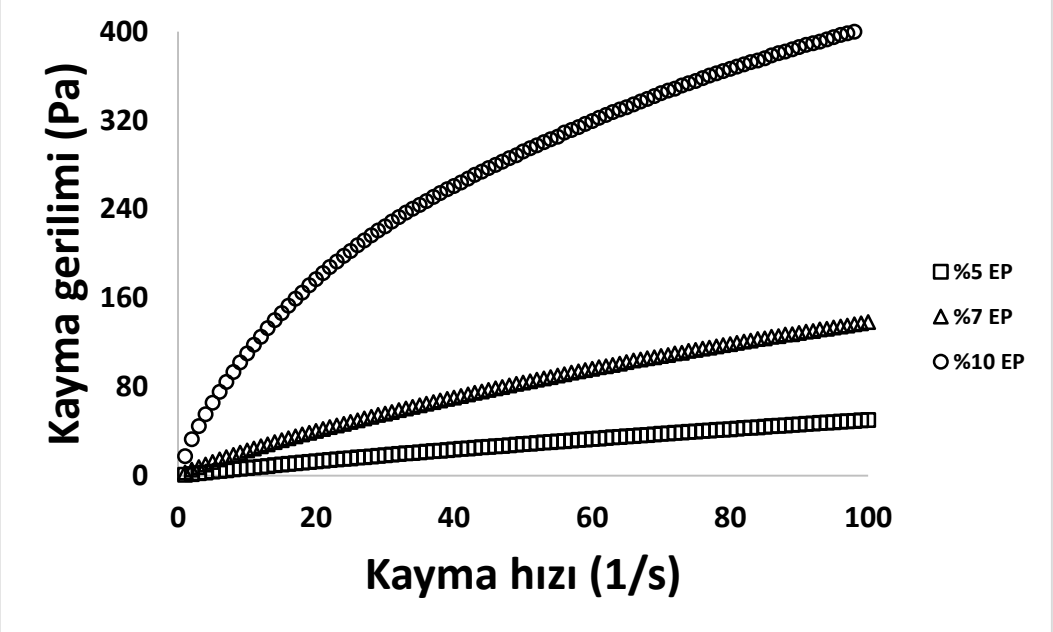
Şekil 4.27 %5 konsantrasyondaki EP, ESP ve ESAP'ın kayma hızına karşı kayma gerilimi



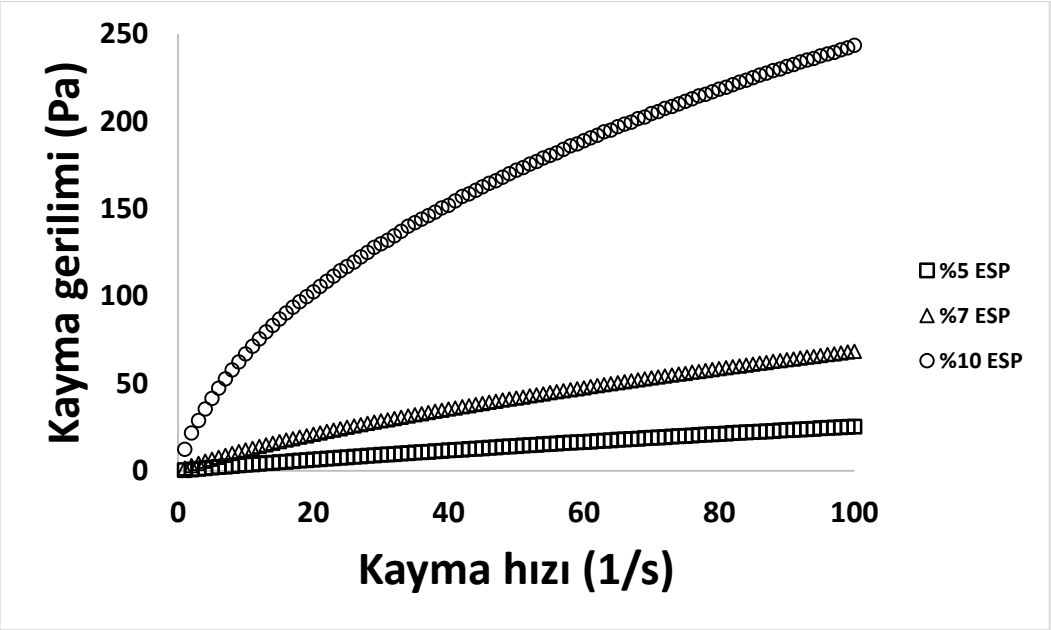
Şekil 4.28 %7 konsantrasyondaki EP, ESP ve ESAP'ın kayma hızına karşı kayma gerilimi



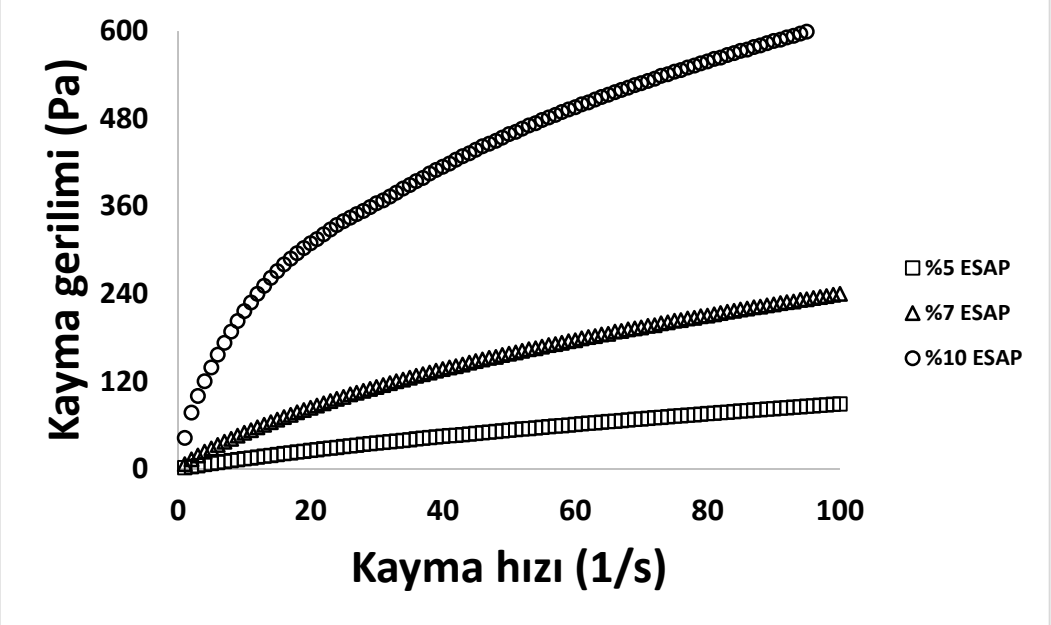
Şekil 4.29 %7 konsantrasyondaki EP, ESP ve ESAP'ın kayma hızına karşı kayma gerilimi



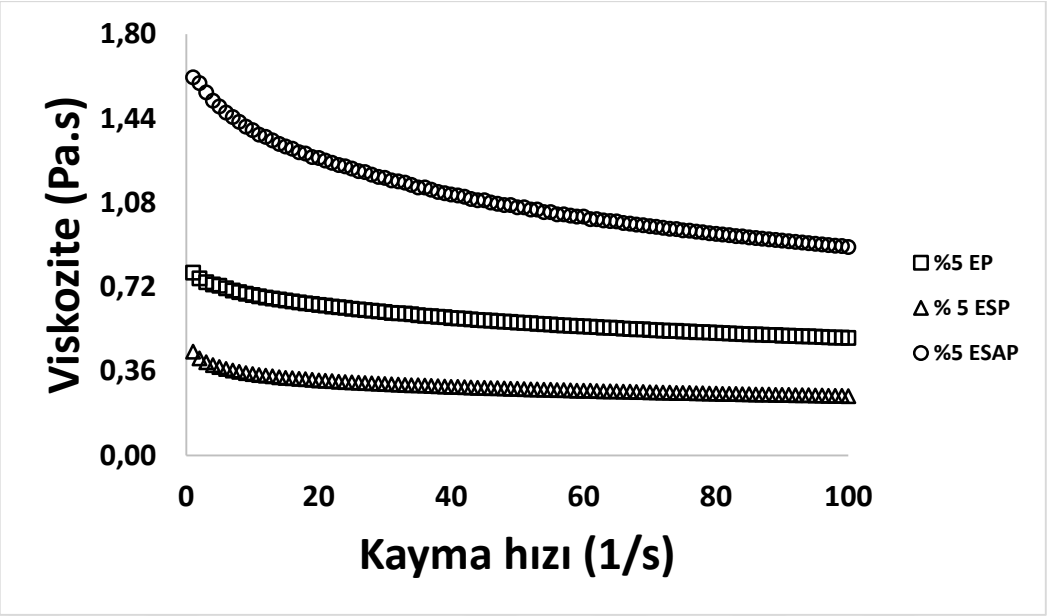
Şekil 4.30 %5, %7 ve % 10 konsantrasyondaki EP'nin kayma hızına karşı kayma gerilimi



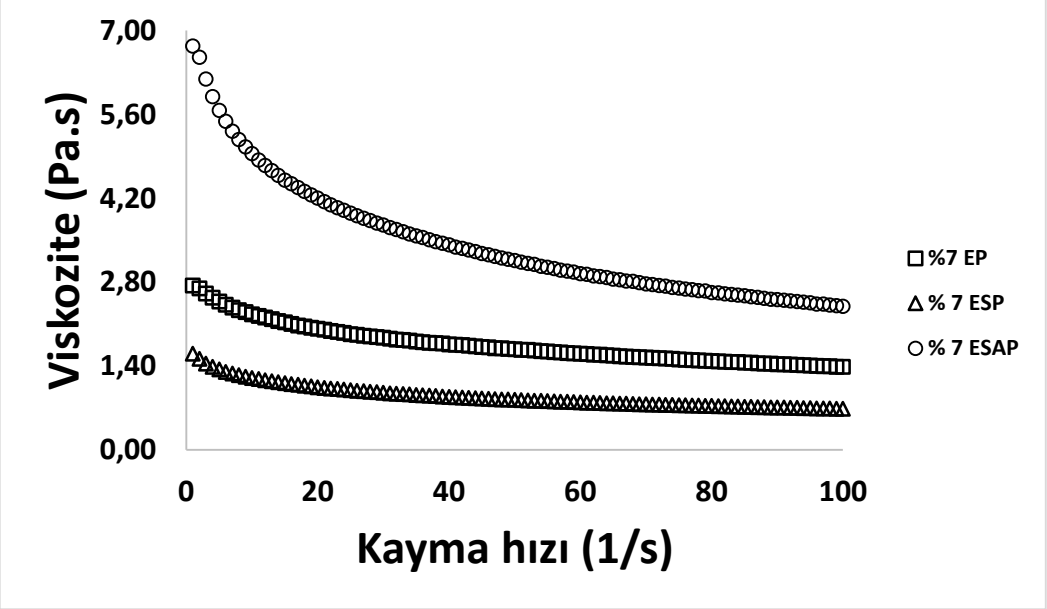
Şekil 4.31 %5, %7 ve % 10 konsantrasyondaki ESP'nin kayma hızına karşı kayma gerilimi



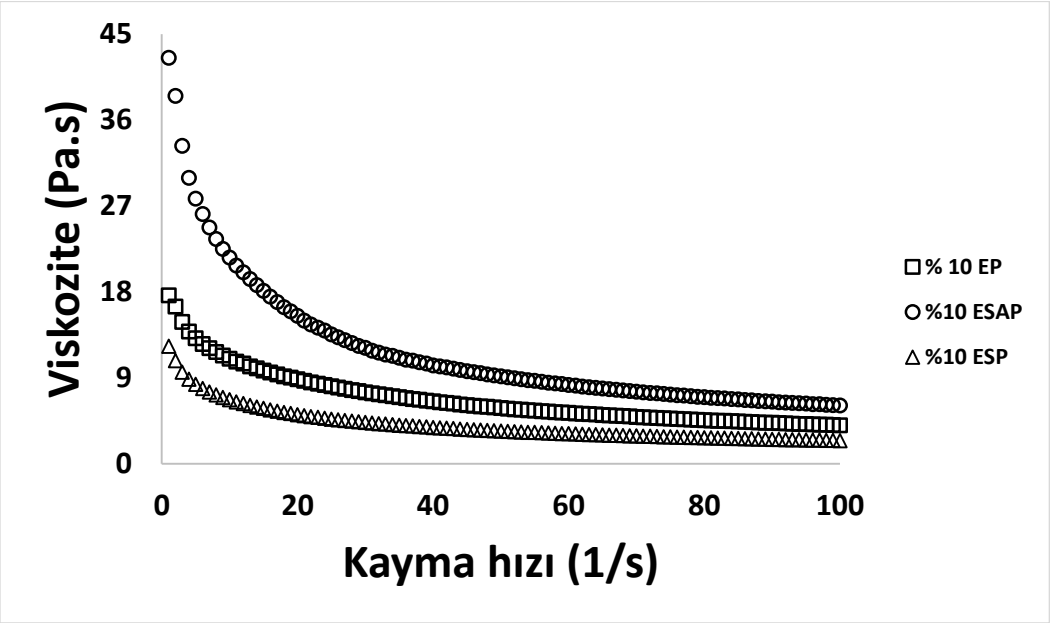
Şekil 4.32 %5, %7 ve % 10 konsantrasyondaki ESAP'nin kayma hızına karşı kayma gerilimi



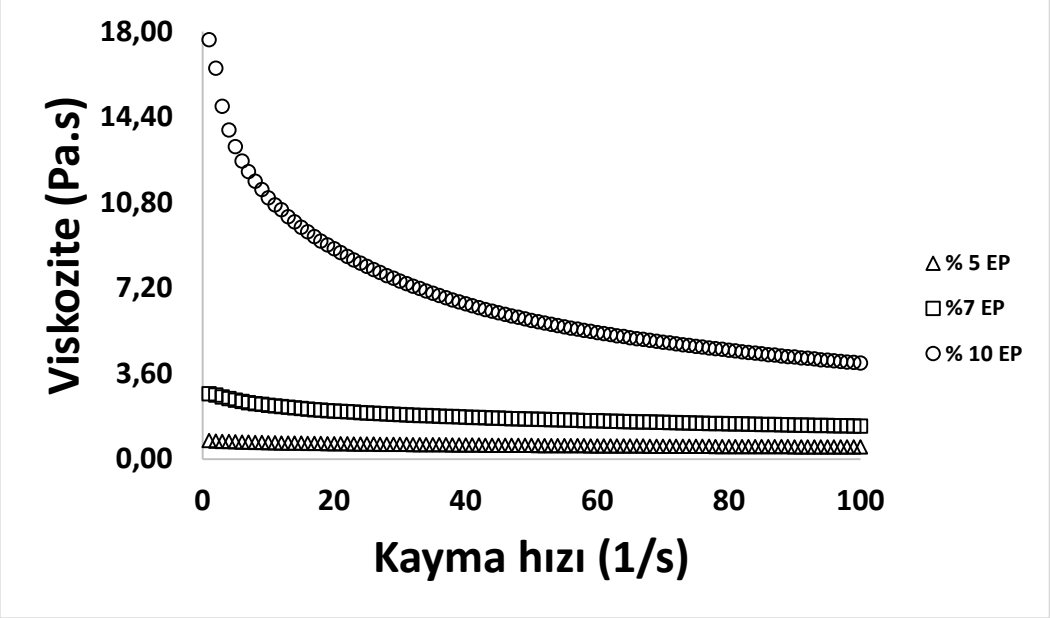
Şekil 4.33 %5 konsantrasyondaki EP, ESP ve ESAP'ın kayma hızına karşı viskozitesi



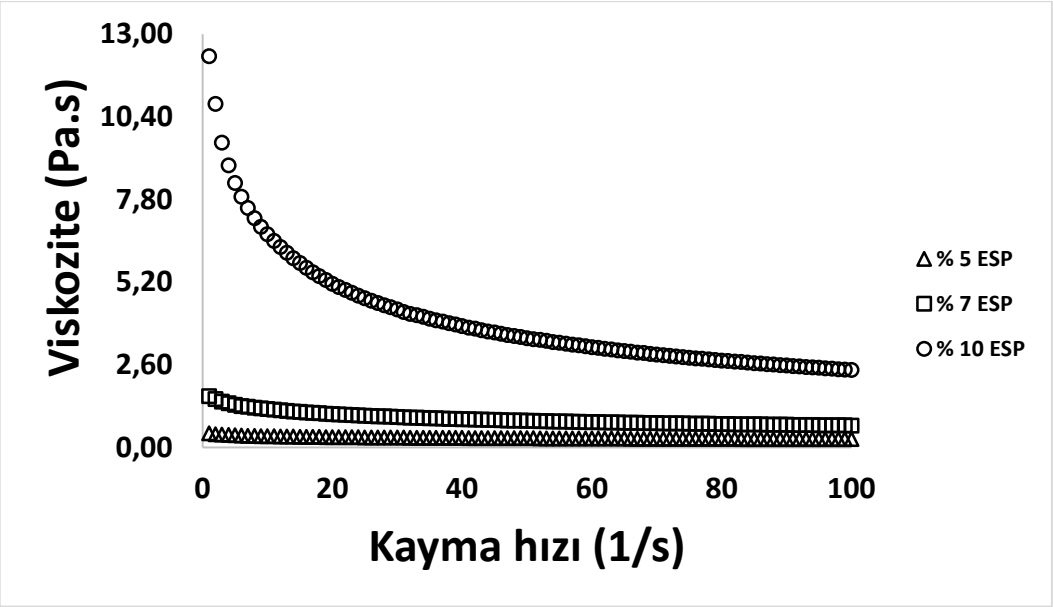
Şekil 4.34 %7 konsantrasyondaki EP, ESP ve ESAP'ın kayma hızına karşı viskozitesi



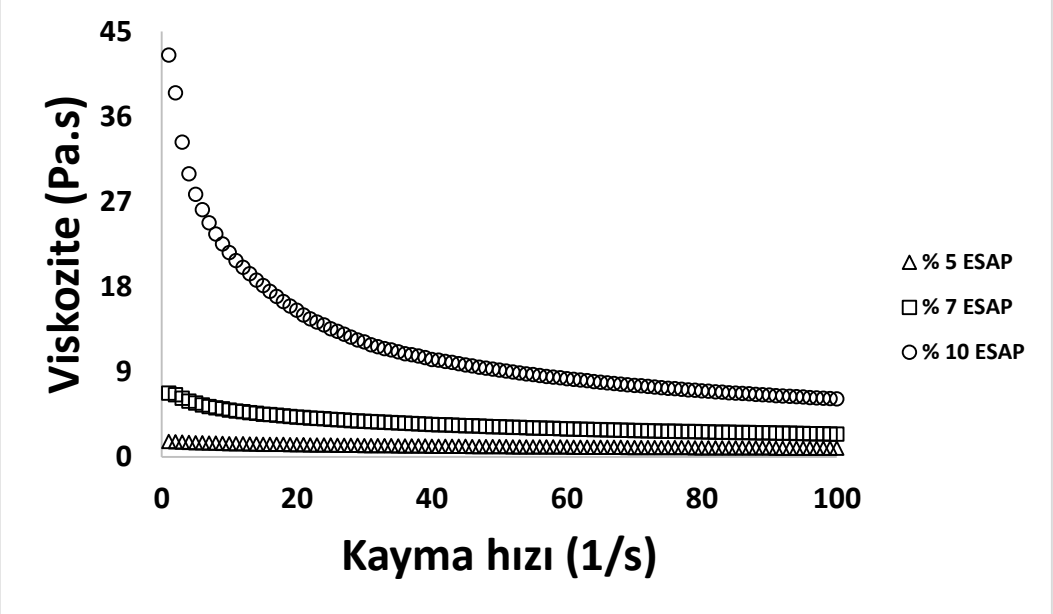
Şekil 4.35 %10 konsantrasyondaki EP, ESP ve ESAP'ın kayma hızına karşı viskozitesi



Şekil 4.36 %5, %7 ve % 10 konsantrasyondaki EP'nin kayma hızına karşı viskozitesi



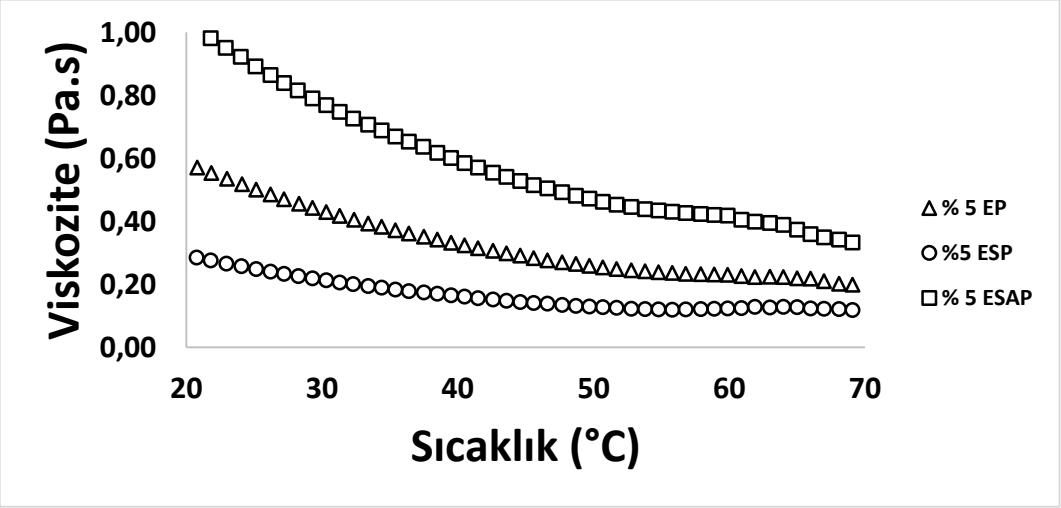
Şekil 4.37 %5, %7 ve % 10 konsantrasyondaki ESP'nin kayma hızına karşı viskozitesi



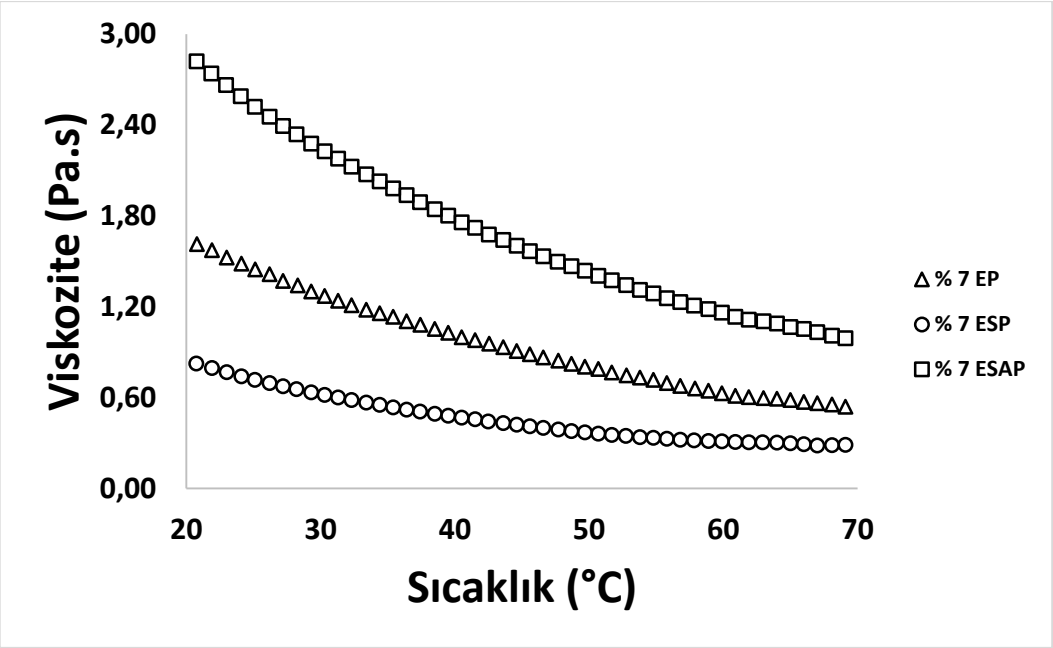
Şekil 4.38 %5, %7 ve % 10 konsantrasyondaki ESAP'ın kayma hızına karşı viskozitesi

Sıcaklık Tarama Testi

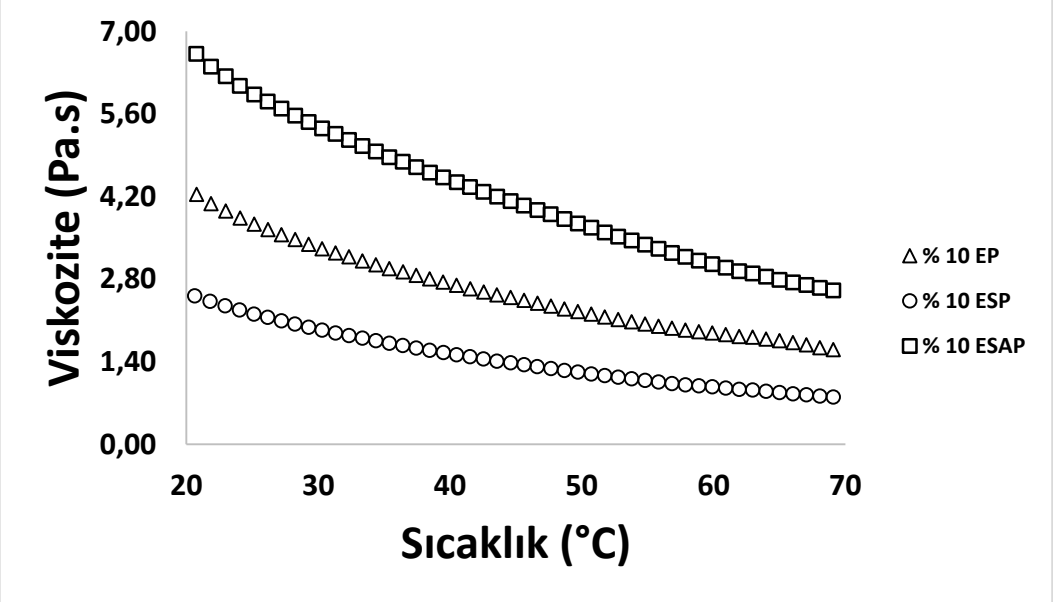
Şekil 4.39 - 4.44'de sıcaklığın bir fonksiyonu olarak η70 değerlerindeki değişim verilmiştir. Bu eğilim, artan sıcaklıkların doğrudan bir sonucu olan termal genleşmeye bağlanabilmektedir. Daha yüksek sıcaklıklarda, moleküller arası kuvvetlerin azalması moleküllerin birbirinden uzaklaşmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak, yapıyı parçalamak için daha az enerji gerekmektedir. Bu da viskozitenin azalmasına yol açmaktadır [120], [121]. Bu çalışmada, Arrhenius denklemi, R^2 değerlerinin de gösterdiği gibi, n70 değerlerini hesaplamak için başarıyla kullanılmıştır (Tablo 4.10). Aktivasyon enerjisi (Ea) viskozitenin sıcaklık değişimlerine nasıl tepki verdiğini tanımlamak için kullanılmıştır. % 5 konsantrasyonda Ea, EP ve ESAP'da benzer, ESP'de ise daha düşüktür. Bununla birlikte, konsantrasyon arttıkça, EP ve ESP'nin Ea'sı benzer olurken, ESAP'ınki daha düşük seviyelerde kalmıştır. ESAP'ın aktivasyon enerjisi artan konsantrasyonla azalmıştır; % 5'te 194,33, % 7'de 181,66 ve % 10'da 157,41 olarak tespit edilmiştir. Pektin konsantrasyonundaki azalma Ea'da bir artışla sonuçlanmıştır. Bu da sıcaklığın düşük konsantrasyonlarda daha derin bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. ESP için konsantrasyon arttıkça Ea sabit kalmıştır. Bununla birlikte, EP için Ea % 5 ve % 7 konsantrasyonlarda tutarlıyken % 10'a ulaştığında azalma olmuştur.



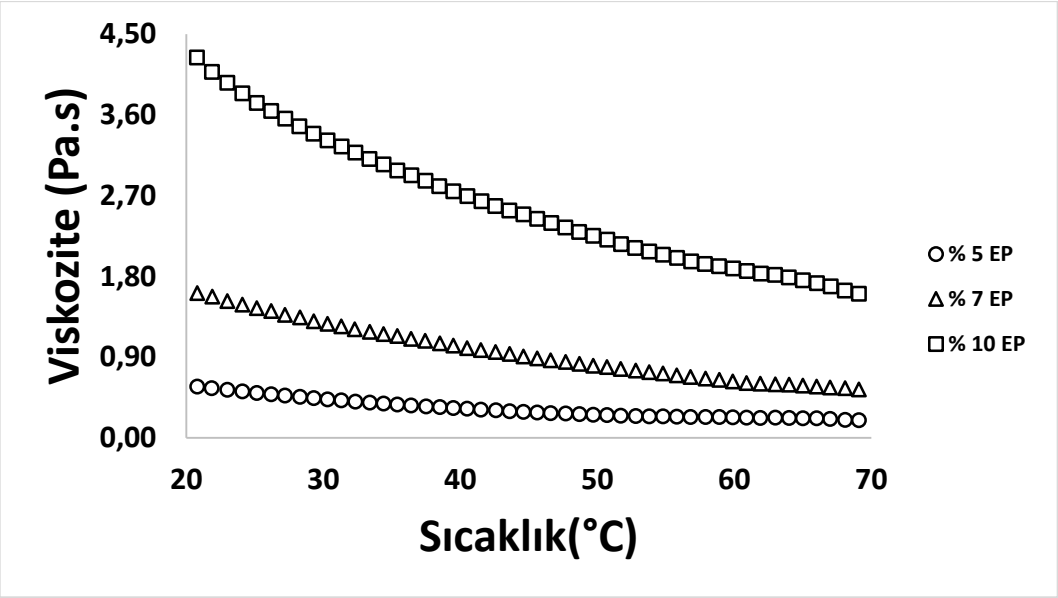
Şekil 4.39 %5 konsantrasyondaki EP, ESP ve ESAP'ın görünür viskozite değerinin (η70) sıcaklıkla değişimi



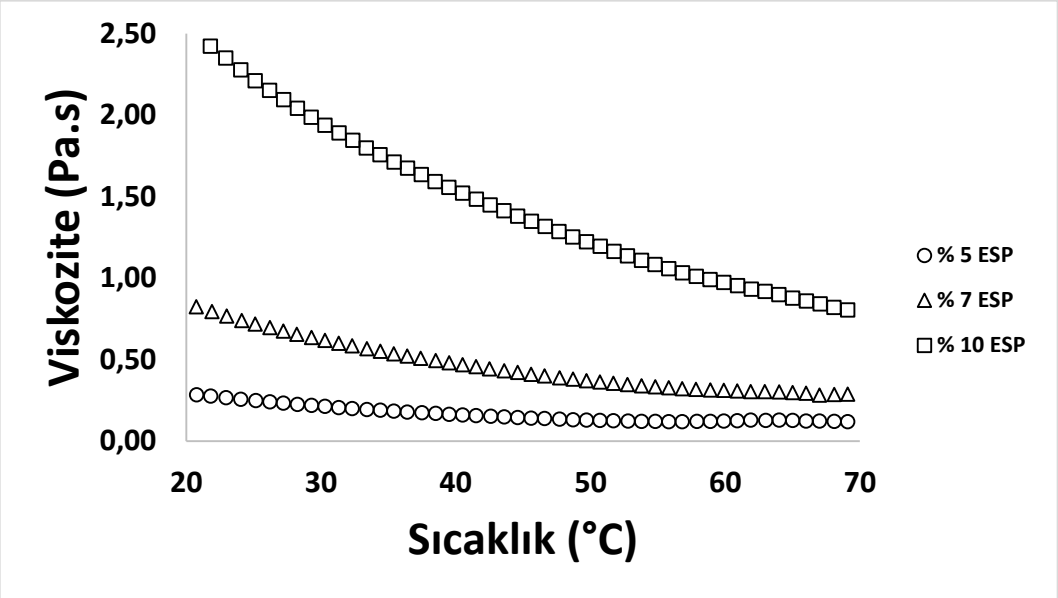
Şekil 4.40 %7 konsantrasyondaki EP, ESP ve ESAP'ın görünür viskozite değerinin (η70) sıcaklıkla değişimi



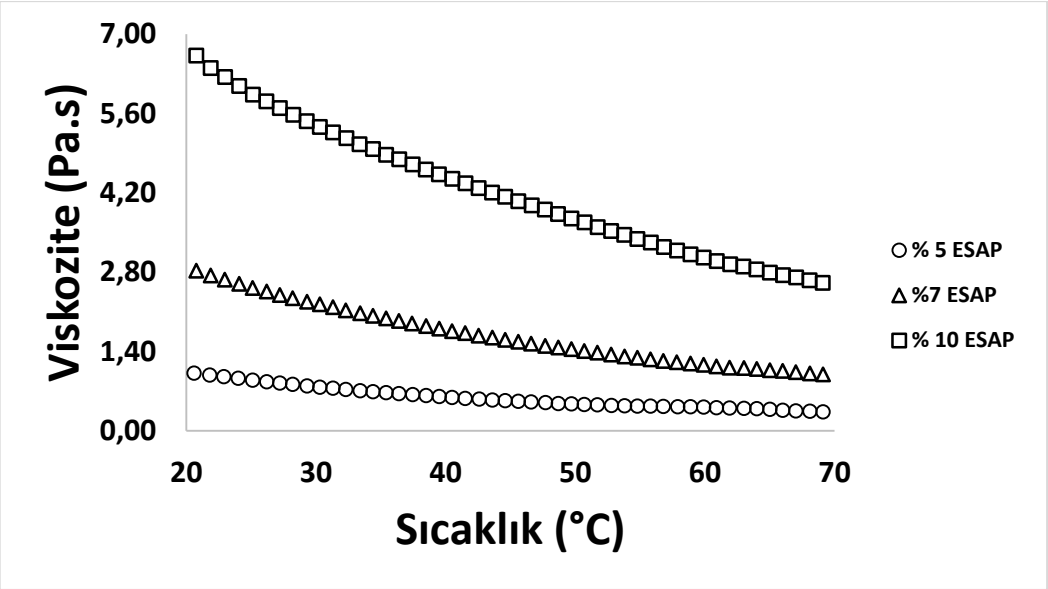
Şekil 4.41 %10 konsantrasyondaki EP, ESP ve ESAP'ın görünür viskozite değerinin (η70) sıcaklıkla değişimi



Şekil 4.42 %5, %7 ve % 10 konsantrasyondaki EP'nin görünür viskozite değerinin (η70) sıcaklıkla değişimi



Şekil 4.43 %5, %7 ve % 10 konsantrasyondaki ESP'nin görünür viskozite değerinin (η70) sıcaklıkla değişimi



Şekil 4.44 %5, %7 ve % 10 konsantrasyondaki ESAP'ın görünür viskozite değerinin (η70) sıcaklıkla değişimi

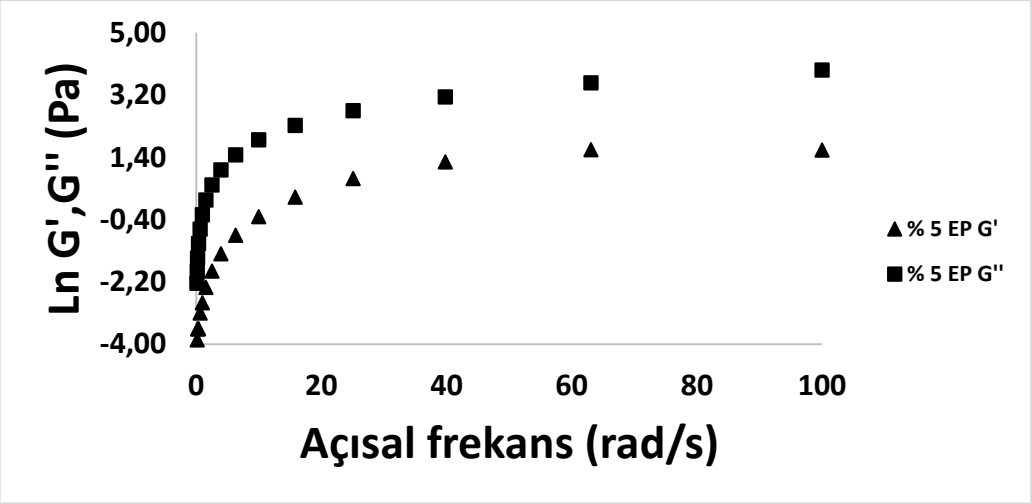
Tablo 4.10 Arrhenius modeline göre belirlenen determinasyon katsayısı,arrhenius denklem sabiti ve aktivasyon enerjisi değerleri

		R^2	Ao	**Ea (kJ/mol)**
% 5	EP	0,99	$0,0000189^{Ab}$	$194,80\pm0,49^{Aa}$
	ESP	0,94	$0,000232^{Ab}$	$176,49\pm12,50^{Ab}$
	ESAP	0,99	$0,000353^{Ac}$	$194,33\pm4,04^{Aa}$
% 7	EP	0,99	$0,000527^{Bb}$	$195,90\pm1,33^{Aa}$
	ESP	0,99	$0,00022^{Bb}$	$200,37\pm3,98^{Aa}$
	ESAP	0,99	$0,001764^{Ab}$	$181,66\pm6,31^{Bb}$
% 10	EP	0,99	$0,004714^{Ba}$	$166,36\pm5,18^{Bb}$
	ESP	0,99	$0,000839^{Ca}$	$195,16\pm1,99^{Aab}$
	ESAP	0,99	$0,01037^{Aa}$	$157,41\pm0,42^{Cc}$

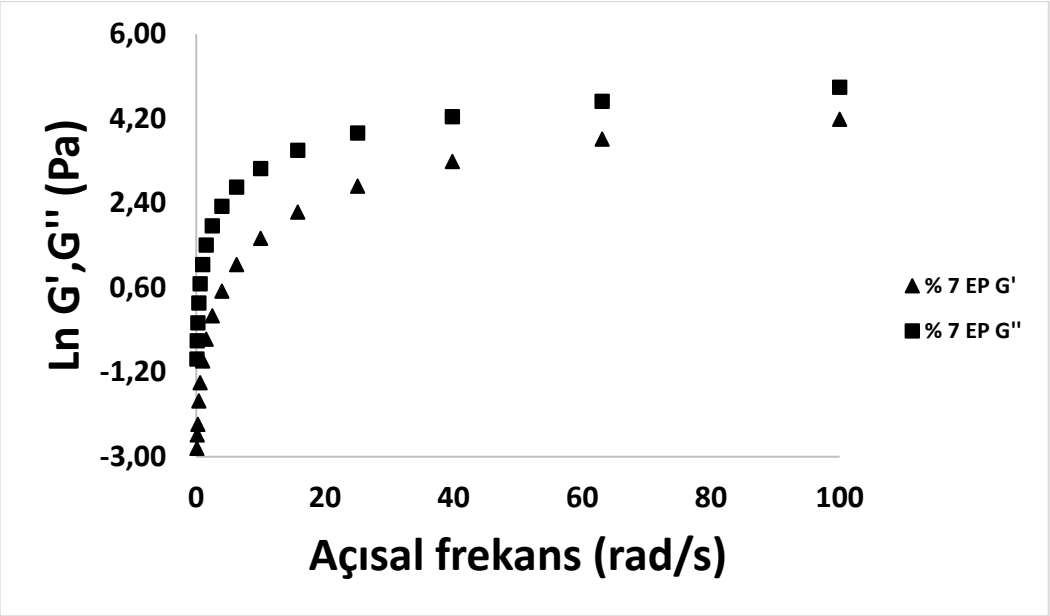
Veriler ortalama ± S.D. olarak ifade edilmiştir. Aynı sütundaki a-c harfleri pektin örneklerinin farklı konsantrasyonlardaki istatiksel farkını göstermektedir. Aynı sütundaki A-C harfleri aynı konsantrasyondaki pektin örneklerinin istatiksel farkını göstermektedir *($p<0.05$).* EP: fermente edilmemiş elma posasından ekstrakte edilen pektin; ESP: sirke fermantasyonuna maruz bırakılan elma küplerinin posasından ekstrakte edilen pektin; ESAP: sirke fermantasyonuna maruz bırakılan elma posasının kalıntısından ekstrakte edilen pektin

10.2 Dinamik Viskoelastik Analiz

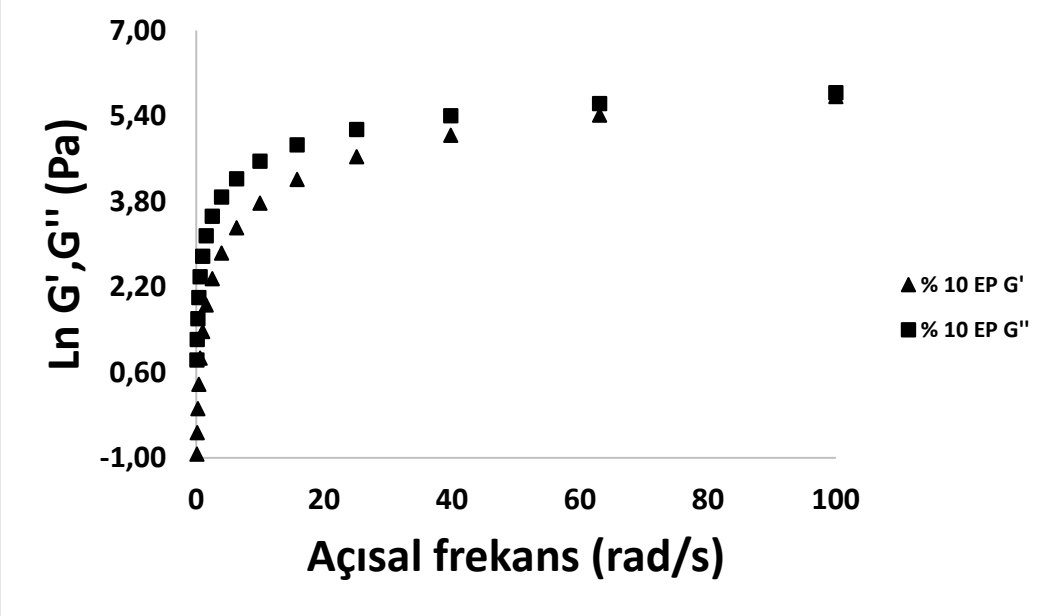
Frekans tarama testi, frekansın bir fonksiyonu olarak farklı konsantrasyonlardaki pektin çözeltilerinin viskoelastik özelliklerini analiz etmek için kullanılmış ve pektin çözeltilerinin modülü (G′ ve G″) ile açısal frekans arasında bir korelasyon olduğunu göstermiştir. Tablo 4.11'de tüm konsantrasyonlar için G′ ve G″ sonuçları verilmiştir. Sonuçlar, tüm pektinlerde artan konsantrasyonlarda daha yüksek K′ ve K″ değerleriyle sonuçlandığını ve daha belirgin bir viskoelastik yapıya işaret ettiğini ortaya koymuştur (Şekil 4.45 - 4.53). Ayrıca, tüm konsantrasyonlardaki her bir pektin örneğinin viskoz modülü (K"), elastik modülünden (K') yüksek değerde olduğu için tüm pektinlerde viskoz özellik baskındır. Sabit kesme akış özellikleri ile uyumlu olarak, G' ve G" değerlerinin ESAP'da aynı konsantrasyondaki EP ve ESP'ye göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, elma posasına uygulanan sirke fermantasyonu işleminin Ma ve nötr şeker yan zincirlerinde değişime neden olarak pektin zincirlerinin karşılıklı bağlanmasının artmasına, G′ ve G″ değerlerinin yükselmesine yol açmasıyla açıklanabilir [117]. Frekans tarama testi, bir malzemenin reolojik özelliklerinin farklı kayma hızlarında (kısa süreler için yüksek frekanslar ve uzun süreler için düşük frekanslar) gözlemlenmesine olanak tanır [122]. Sonuç olarak, sirkeyle fermente edilmiş elma posasından elde edilen pektinin, açısal frekansı arttıkça (özellikle yüksek kesme hızı durumlarında) daha fazla esnekliğe sahip olduğu görülmüştür; bu da ESAP'ın daha güçlü ağ oluşumuna bağlanabilir.



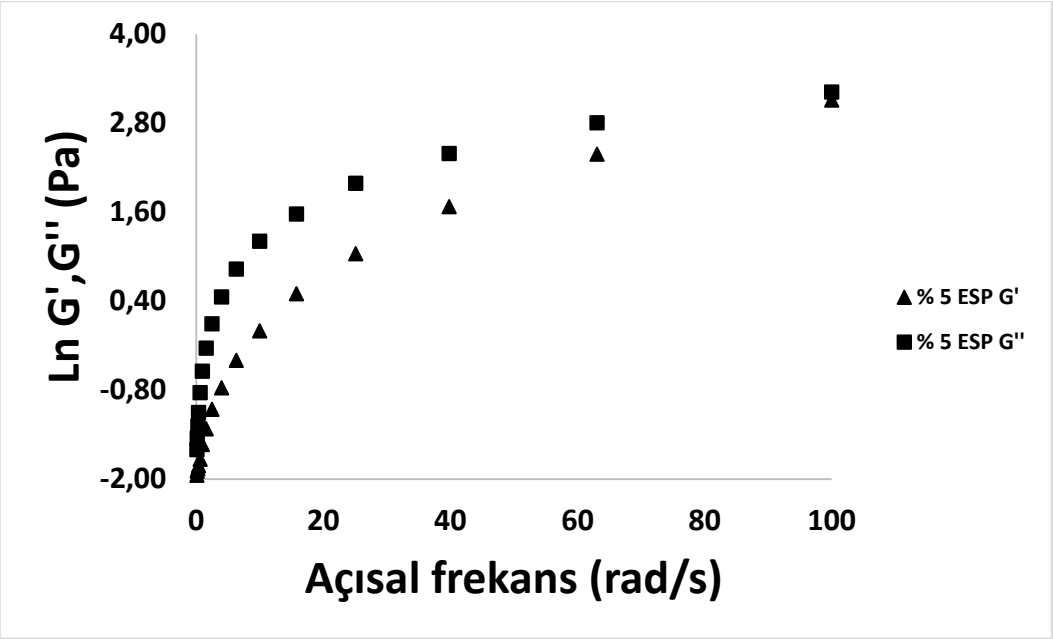
Şekil 4.45 %5 konsantrasyondaki EP'nin G′ ve G″ değerleri



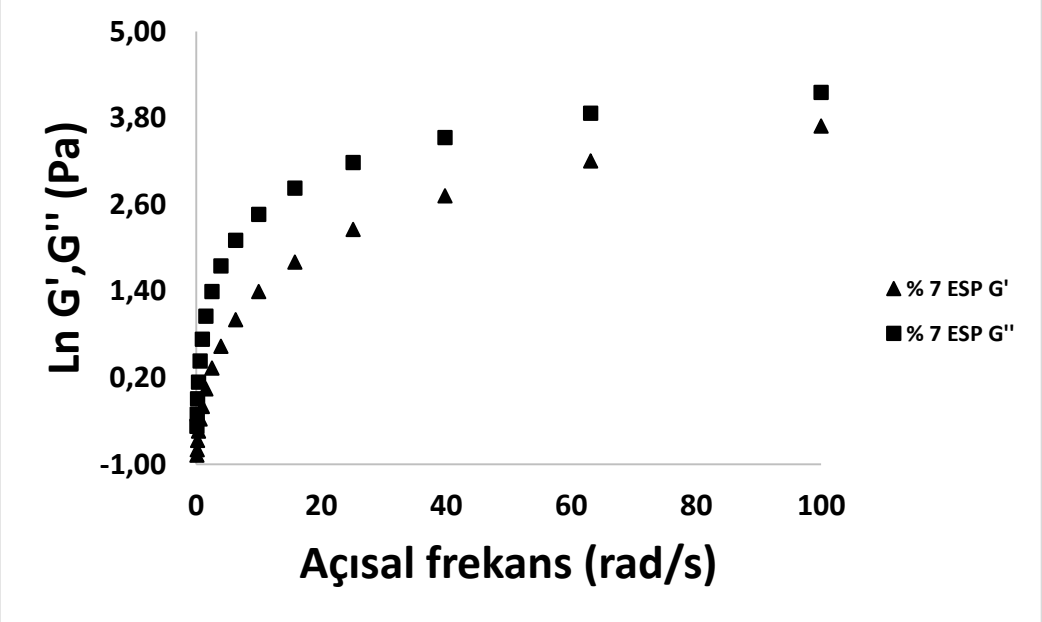
Şekil 4.46 %7 konsantrasyondaki EP'nin G′ ve G″ değerleri



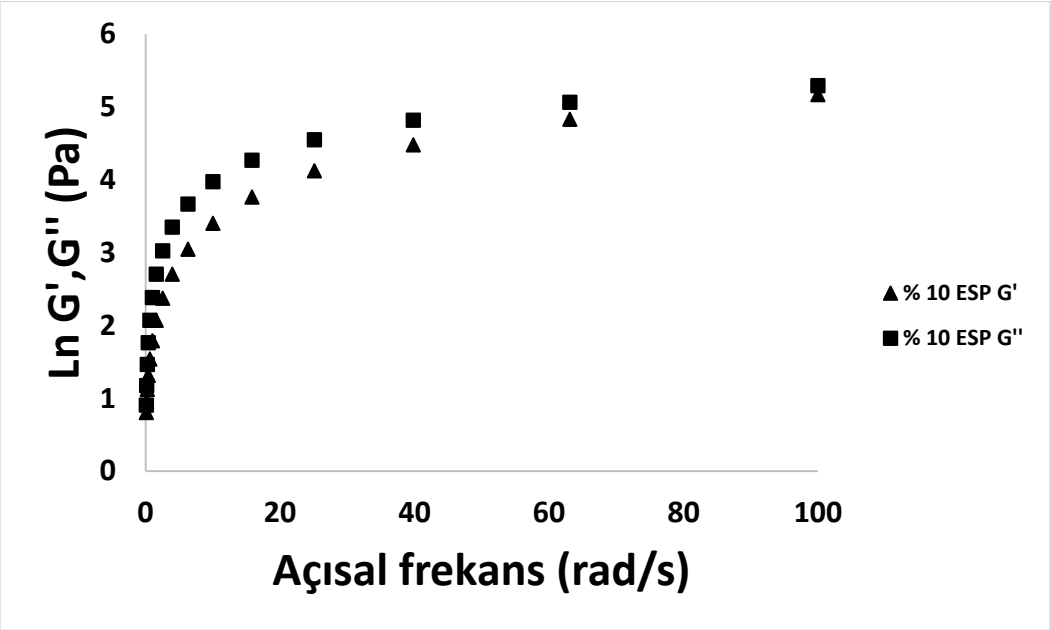
Şekil 4.47 %10 konsantrasyondaki EP'nin G′ ve G″ değerleri



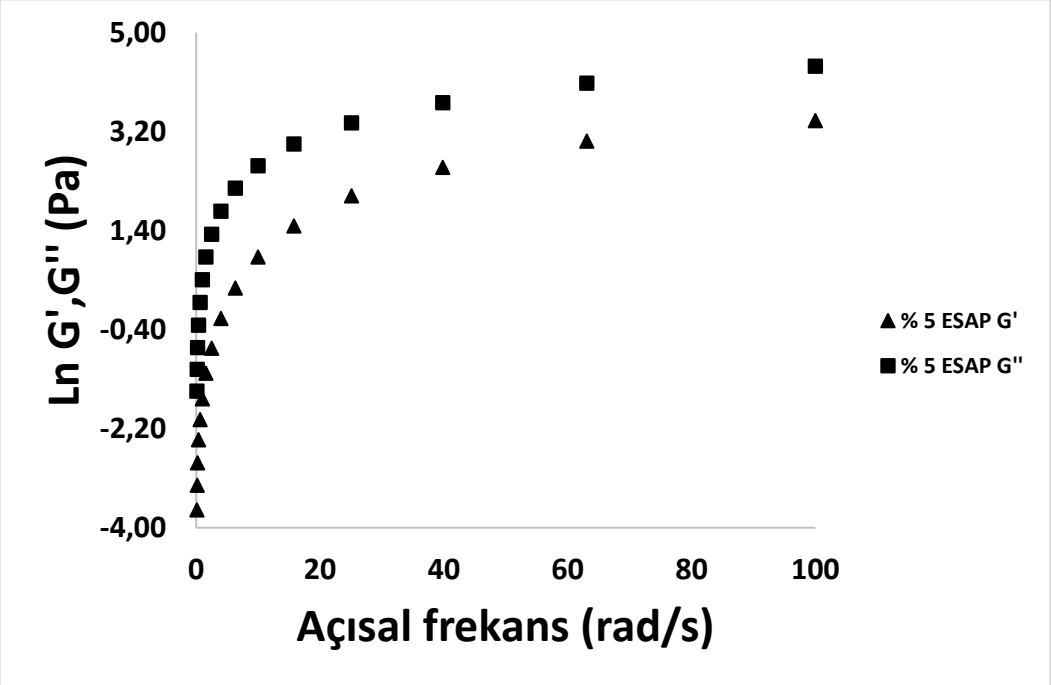
Şekil 4.48 %5 konsantrasyondaki ESP'nin G′ ve G″ değerleri



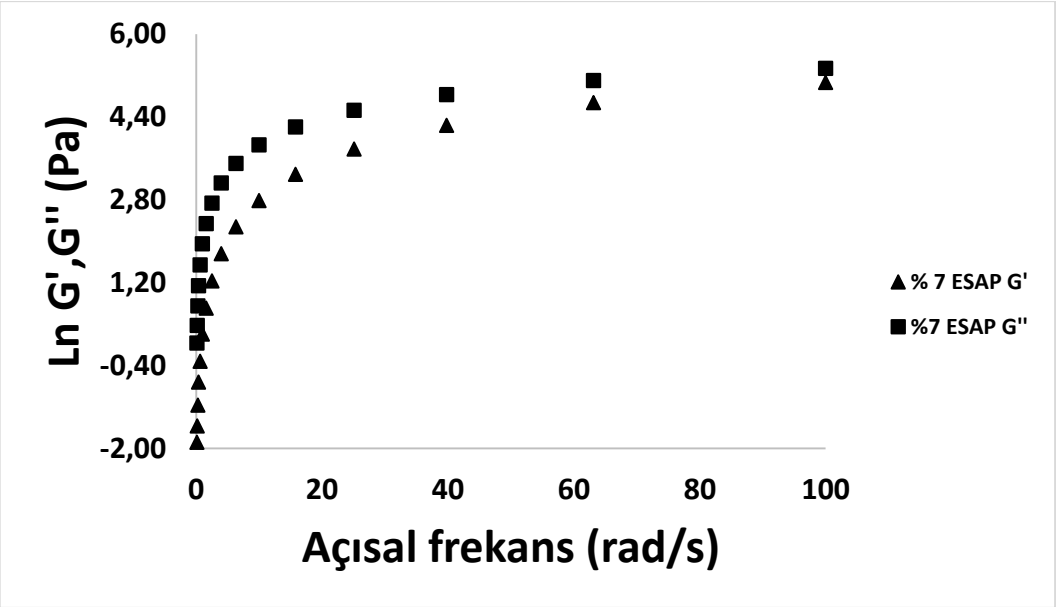
Şekil 4.49 %7 konsantrasyondaki ESP'nin G′ ve G″ değerleri



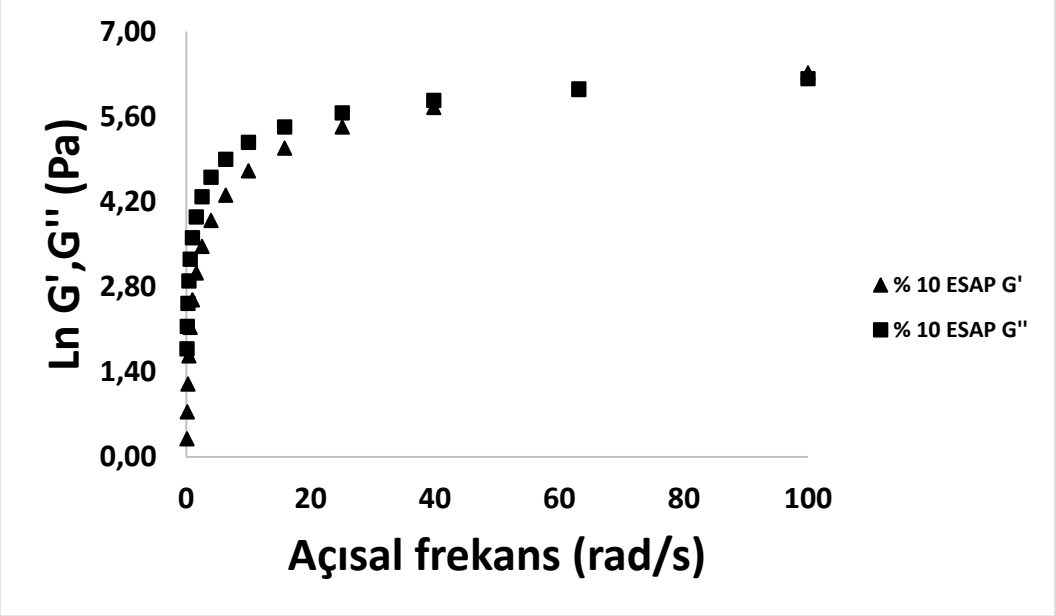
Şekil 4.50 %10 konsantrasyondaki ESP'nin G′ ve G″ değerleri



Şekil 4.51 %5 konsantrasyondaki ESAP'ın G′ ve G″ değerleri



Şekil 4.52 %7 konsantrasyondaki ESAP'ın G′ ve G″ değerleri



Şekil 4.53 %10 konsantrasyondaki ESAP'ın G′ ve G″ değerleri

Tablo 4.11 Power-law modeline göre belirlenen elastik viskoz modülü, determinasyon katsayısı ve kıvam katsayısı değerleri

		R′	K′	n′	R″	K″	n″
% 5	EP	0,97	0,20±0,01^{Bb}	0,73±0,01^{Cc}	0,99	0,94±0,03^{Bc}	0,87±0,01^{Aa}
	ESP	0,99	0,02±0,00^{Cc}	1,49±0,09^{Aa}	0,99	0,43±0,01^{Cc}	0,88±0,01^{Aa}
	ESAP	0,99	0,31±0,01^{Ac}	0,99±0,01^{Ba}	0,99	2,32±0,08^{Ac}	0,77±0,0^{1Ba}
% 7	EP	0,99	0,36±0,04^{Cb}	1,17±0,04^{Aa}	0,99	4,35±0,16^{Bb}	0,74±0,01^{Ab}
	ESP	0,99	0,62±0,08^{Bb}	0,84±0,08^{Bb}	0,99	2,33±0,18^{Cb}	0,72±0,02^{Ab}
	ESAP	0,99	2,05±0,15^{Ab}	0,95±0,02^{Bb}	0,99	10,88±0,18^{Ab}	0,65±0,01^{Bb}
% 10	EP	0,99	6,70±0,26^{Ba}	0,84±0,02^{Ab}	0,99	24,74±0,03^{Ba}	0,58±0,02^{Bc}
	ESP	0,99	5,38±0,32^{Ca}	0,76±0,01^{Bb}	0,99	13,77±0,08^{Ca}	0,59±0,01^{Ac}
	ESAP	0,99	22,79±0,54^{Aa}	0,70±0,01^{Cc}	0,99	53,17±0,45^{Aa}	0,50±0,01^{Cc}

Veriler ortalama ± S.D. olarak ifade edilmiştir. Aynı sütundaki a-c harfleri pektin örneklerinin farklı konsantrasyonlardaki istatiksel farkını göstermektedir. Aynı sütundaki A-C harfleri aynı konsantrasyondaki pektin örneklerinin istatiksel farkını göstermektedir*($p<0.05$)*.EP: fermente edilmemiş elma posasından ekstrakte edilen pektin; ESP: sirke fermantasyonuna maruz bırakılan elma küplerinin posasından ekstrakte edilen pektin; ESAP: sirke fermantasyonuna maruz bırakılan elma posasının kalıntısından ekstrakte edilen pekt

5
SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında elmaya ve elma posasına kontrollü şartlarda sirke fermantasyonu uygulanmıştır. Fermantasyon boyunca pH, titrasyon asitliği, briks ve renk analizi yapılmış olup son aşamada alkol tayini yapılmıştır. Elma sirkesinin pH'sı 4. haftanın sonunda 3,45±0,03, elma posası sirkesinin pH'sı ise 3,60±0,03 olarak tespit edilmiştir. Elma sirkesinin titrasyon asitliği % 1,01±0,11, elma posası sirkesinin % 0,59±0,04 olarak analiz edilmiştir. Sirke fermantasyonu sonunda posalar süzülüp kurutulmuştur. Elma suyu, elma sirkesi ve elma posası sirkesine şeker, organik asit ve fenolik madde (TPC, TFC, ABTS, CUPRAC, DPPH ve FRAP) analizleri yapılmıştır.

Posalardan kontrollü şartlarda pektin ekstrakte edilmiştir. Sonuçlar, sirke fermantasyonunun ve kullanılan hammaddenin pektinin fizikokimyasal ve yapısal özelliklerini değiştirmede önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Özellikle, fermantasyon elma posasından pektin ekstraksiyon verimini önemli ölçüde artırmış ve sirke fermantasyonunun pektin verimini artırmadaki potansiyel faydalarını vurgulamıştır. Elma posasının sirke fermantasyonu ile muamelesi, molekül ağırlığında, nötr şeker yan zincirlerde ve monosakkarit bileşiminde değişikliğe neden olmuştur. Tüm pektinler (EP, ESP ve ESAP), % 50'den fazla metilasyon derecesi (MD) ile yüksek metoksil (HM) pektinler olarak karakterize edilmiştir. EP ile karşılaştırıldığında, ESAP daha yüksek dallanma derecesi ile daha düşük doğrusallığa sahipken, ESP daha düşük yan zincir yüzdesi ile daha doğrusal bir yapı göstermiştir. ESAP daha iyi ısı direnci göstermiştir. Sirke fermantasyonuna tabi tutulan farklı posalardan elde edilen pektin, fermente edilmemiş hammaddeden elde edilen pektine kıyasla farklı reolojik davranışlar sergilemiştir. ESP tüm konsantrasyonlarda (% 5, % 7, % 10) en düşük viskozite karakteristiğini gösterirken, ESAP önemli ölçüde daha yüksek viskoziteye sahiptir. Bu nedenle,

ESP ve ESAP farklı viskoelastik davranışlar gerektiren gıda uygulamaları için kullanılabilir.

Bu çalışma, elma ve elma posasından elde edilen pektinlerin sirke fermantasyonu ile fizikokimyasal, yapısal, termal ve reolojik özelliklerindeki değişiklikleri ortaya koymuştur. Özellikle, fermantasyonun pektin verimi ve özellikleri üzerindeki olumlu etkileri, tarımsal atıkların yüksek katma değerli ürünlere dönüştürülmesi için umut vadetmektedir. Gelecekteki çalışmalarda, farklı starter kültürlerin kullanımıyla sirke fermantasyonu koşullarının pektin kalitesi ve fonksiyonelliği üzerindeki etkilerinin detaylı bir şekilde incelenmesi, bu alanın daha da derinleştirilmesini sağlayabilir. Bu çalışmadaki sirke fermantasyonunun spontane fermantasyon ile gerçekleştirildiği göz önünde bulundurulduğunda, ileriki çalışmalarda kontrollü koşullar altında pektin özelliklerinin nasıl etkilendiği araştırılabilir. Ayrıca diğer kaynaklar ve atık malzemeler kullanılarak sirke fermantasyonu ile pektin özellikleri gelecekteki çalışmalara araştırma konusu olabilir. Bu bağlamda, çalışmanın sonuçları, bilimsel literatüre değerli katkılar sağlarken endüstriyel ölçekte uygulanabilir çözümlere de ışık tutmaktadır.

KAYNAKÇA

[1] A. Nayak ve B. Bhushan, "An overview of the recent trends on the waste valorization techniques for food wastes", *Journal of Environmental Management*, c. 233, ss. 352-370, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.jenvman.2018.12.041.

[2] D. Panwar, P. S. Panesar, ve H. K. Chopra, "Ultrasound-assisted extraction of pectin from Citrus limetta peels: Optimization, characterization, and its comparison with commercial pectin", *Food Bioscience*, c. 51, s. 102231, Şub. 2023, doi: 10.1016/j.fbio.2022.102231.

[3] "United Nations Environment Programme: Annual report". 2015. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: https://www.unep.org/resources/annual-report/united-nations-environment-programme-annual-report-2015

[4] D. Panwar, P. S. Panesar, ve H. K. Chopra, "Recent Trends on the Valorization Strategies for the Management of Citrus By-products", *Food Reviews International*, c. 37, sy 1, ss. 91-120, Oca. 2021, doi: 10.1080/87559129.2019.1695834.

[5] A. Zdunek, P. M. Pieczywek, ve J. Cybulska, "The primary, secondary, and structures of higher levels of pectin polysaccharides", *Comp Rev Food Sci Food Safe*, c. 20, sy 1, ss. 1101-1117, Oca. 2021, doi: 10.1111/1541-4337.12689.

[6] R. Ciriminna, N. Chavarría-Hernández, A. Inés Rodríguez Hernández, ve M. Pagliaro, "Pectin: A new perspective from the biorefinery standpoint", *Biofuels Bioprod Bioref*, c. 9, sy 4, ss. 368-377, Tem. 2015, doi: 10.1002/bbb.1551.

[7] D. Mohnen, "Pectin structure and biosynthesis", *Current Opinion in Plant Biology*, c. 11, sy 3, ss. 266-277, Haz. 2008, doi: 10.1016/j.pbi.2008.03.006.

[8] O. Zaitseva, A. Khudyakov, M. Sergushkina, O. Solomina, ve T. Polezhaeva, "Pectins as a universal medicine", *Fitoterapia*, c. 146, s. 104676, Eki. 2020, doi: 10.1016/j.fitote.2020.104676.

[9] S. Y. Chan, W. S. Choo, D. J. Young, ve X. J. Loh, "Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology", *Carbohydrate Polymers*, c. 161, ss. 118-139, Nis. 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.12.033.

[10] C. W. Ho, A. M. Lazim, S. Fazry, U. K. H. H. Zaki, ve S. J. Lim, "Varieties, production, composition and health benefits of vinegars: A review", *Food Chemistry*, c. 221, ss. 1621-1630, Nis. 2017, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.10.128.

[11] A. Samad, A. Azlan, ve A. Ismail, "Therapeutic effects of vinegar: a review", *Current Opinion in Food Science*, c. 8, ss. 56-61, Nis. 2016, doi: 10.1016/j.cofs.2016.03.001.

[12] C. Cavdaroglu ve B. Ozen, "Authentication of Vinegars with Targeted and Non-targeted Methods", *Food Reviews International*, c. 39, sy 1, ss. 41-58, Oca. 2023, doi: 10.1080/87559129.2021.1894169.

[13] "Draft European regional standard for vinegar". Codex Alimentarius Commission., 1987. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: https://www. fao. org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en.

[14] "TS 1880 EN 13188,Sirke- Tarım Kökenli Sıvılardan Elde Eedilen Ürün - Tarifler, Özellikler ve İşaretleme." TSE, 2003.

[15] P. Kandylis, A. Bekatorou, D. Dimitrellou, I. Plioni, ve K. Giannopoulou, "Health Promoting Properties of Cereal Vinegars", *Foods*, c. 10, sy 2, s. 344, Şub. 2021, doi: 10.3390/foods10020344.

[16] N. H. Budak, E. Aykin, A. C. Seydim, A. K. Greene, ve Z. B. Guzel-Seydim, "Functional Properties of Vinegar", *Journal of Food Science*, c. 79, sy 5, May. 2014, doi: 10.1111/1750-3841.12434.

[17] L. M. Luzón-Quintana, R. Castro, ve E. Durán-Guerrero, "Biotechnological Processes in Fruit Vinegar Production", *Foods*, c. 10, sy 5, s. 945, Nis. 2021, doi: 10.3390/foods10050945.

[18] A. Roman-Benn *vd.*, "Pectin: An overview of sources, extraction and applications in food products, biomedical, pharmaceutical and environmental issues", *Food Chemistry Advances*, c. 2, s. 100192, Eki. 2023, doi: 10.1016/j.focha.2023.100192.

[19] "The United States of America Food and Drug Administration. CPG Sec. 525.825 Vinegar, Definitions – Adulteration with Vinegar Eels." USA: USFDA., 1977.

[20] S. Li, P. Li, F. Feng, ve L.-X. Luo, "Microbial diversity and their roles in the vinegar fermentation process", *Appl Microbiol Biotechnol*, c. 99, sy 12, ss. 4997-5024, Haz. 2015, doi: 10.1007/s00253-015-6659-1.

[21] G.-L. Chen *vd.*, "Vinegar: A potential source of healthy and functional food with special reference to sugarcane vinegar", *Front. Nutr.*, c. 10, s. 1145862, Mar. 2023, doi: 10.3389/fnut.2023.1145862.

[22] S. Al-Dalali, F. Zheng, B. Xu, M. Abughoush, L. Li, ve B. Sun, "Processing Technologies and Flavor Analysis of Chinese Cereal Vinegar: a Comprehensive Review", *Food Anal. Methods*, c. 16, sy 1, ss. 1-28, Oca. 2023, doi: 10.1007/s12161-022-02328-w.

[23] D. Ousaaid *vd.*, "Fruits Vinegar: Quality Characteristics, Phytochemistry, and Functionality", *Molecules*, c. 27, sy 1, s. 222, Ara. 2021, doi: 10.3390/molecules27010222.

[24] M. Kašpar ve P. Česla, "Characterization of Balsamic Vinegars Using High-Performance Liquid Chromatography and Gas Chromatography", *Applied Sciences*, c. 12, sy 18, s. 8946, Eyl. 2022, doi: 10.3390/app12188946.

[25] S. Yıldız, N. Erbil, ve V. Düzgüner, "Production of vinegar from kashar cheese whey and volatile component profile, antibacterial effect, and antioxidant potential of whey vinegar", *Food Bioscience*, c. 56, s. 103309, Ara. 2023, doi: 10.1016/j.fbio.2023.103309.

[26] S. Taweekasemsombut, J. Tinoi, P. Mungkornasawakul, ve N. Chandet, "Thai Rice Vinegars: Production and Biological Properties", *Applied Sciences*, c. 11, sy 13, s. 5929, Haz. 2021, doi: 10.3390/app11135929.

[27] F. Naqash, F. A. Masoodi, S. A. Rather, S. M. Wani, ve A. Gani, "Emerging concepts in the nutraceutical and functional properties of pectin—A Review", *Carbohydrate Polymers*, c. 168, ss. 227-239, Tem. 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.03.058.

[28] J.-P. Vincken *vd.*, "If Homogalacturonan Were a Side Chain of Rhamnogalacturonan I. Implications for Cell Wall Architecture", *Plant Physiology*, c. 132, sy 4, ss. 1781-1789, Ağu. 2003, doi: 10.1104/pp.103.022350.

[29] B. L. Ridley, M. A. O'Neill, ve D. Mohnen, "Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling", *Phytochemistry*, c. 57, sy 6, ss. 929-967, Tem. 2001, doi: 10.1016/S0031-9422(01)00113-3.

[30] J. Harholt, A. Suttangkakul, ve H. Vibe Scheller, "Biosynthesis of Pectin", *Plant Physiology*, c. 153, sy 2, ss. 384-395, Haz. 2010, doi: 10.1104/pp.110.156588.

[31] G. Mao *vd.*, "Reconsidering conventional and innovative methods for pectin extraction from fruit and vegetable waste: Targeting rhamnogalacturonan I", *Trends in Food Science & Technology*, c. 94, ss. 65-78, Ara. 2019, doi: 10.1016/j.tifs.2019.11.001.

[32] J. Cui *vd.*, "Pectins from fruits: Relationships between extraction methods, structural characteristics, and functional properties", *Trends in Food Science & Technology*, c. 110, ss. 39-54, Nis. 2021, doi: 10.1016/j.tifs.2021.01.077.

[33] M. C. N. Picot-Allain, B. Ramasawmy, ve M. N. Emmambux, "Extraction, Characterisation, and Application of Pectin from Tropical and Sub-Tropical Fruits: A Review", *Food Reviews International*, c. 38, sy 3, ss. 282-312, Nis. 2022, doi: 10.1080/87559129.2020.1733008.

[34] A. Belkheiri *vd.*, "Extraction, Characterization, and Applications of Pectins from Plant By-Products", *Applied Sciences*, c. 11, sy 14, s. 6596, Tem. 2021, doi: 10.3390/app11146596.

[35] H. V. Scheller, J. K. Jensen, S. O. Sørensen, J. Harholt, ve N. Geshi, "Biosynthesis of pectin", *Physiologia Plantarum*, c. 129, sy 2, ss. 283-295, Şub. 2007, doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00834.x.

[36] S. Shrestha, Md. S. Rahman, ve W. Qin, "New insights in pectinase production development and industrial applications", *Appl Microbiol Biotechnol*, c. 105, sy 24, ss. 9069-9087, Ara. 2021, doi: 10.1007/s00253-021-11705-0.

[37] F. Amin, H. N. Bhatti, ve M. Bilal, "Recent advances in the production strategies of microbial pectinases—A review", *International Journal of Biological Macromolecules*, c. 122, ss. 1017-1026, Şub. 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.048.

[38] Q. Li *vd.*, "Systematic Analysis and Functional Validation of Citrus Pectin Acetylesterases (CsPAEs) Reveals that CsPAE2 Negatively Regulates

Citrus Bacterial Canker Development", *IJMS*, c. 21, sy 24, s. 9429, Ara. 2020, doi: 10.3390/ijms21249429.

[39] D. Ndeh *vd.*, "Complex pectin metabolism by gut bacteria reveals novel catalytic functions", *Nature*, c. 544, sy 7648, ss. 65-70, Nis. 2017, doi: 10.1038/nature21725.

[40] F. Dranca ve M. Oroian, "Extraction, purification and characterization of pectin from alternative sources with potential technological applications", *Food Research International*, c. 113, ss. 327-350, Kas. 2018, doi: 10.1016/j.foodres.2018.06.065.

[41] Q. Chen, Z. Hu, F. Y.-D. Yao, ve H. Liang, "Study of two-stage microwave extraction of essential oil and pectin from pomelo peels", *LWT - Food Science and Technology*, c. 66, ss. 538-545, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.lwt.2015.11.019.

[42] C. Colodel, L. C. Vriesmann, R. F. Teófilo, ve C. L. De Oliveira Petkowicz, "Extraction of pectin from ponkan (Citrus reticulata Blanco cv. Ponkan) peel: Optimization and structural characterization", *International Journal of Biological Macromolecules*, c. 117, ss. 385-391, Eki. 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.048.

[43] E. Şen, S. Özdemir, ve E. Uğuzdoğan, "Extraction and characterization of pectin from waste of fruit peels", *Pamukkale J Eng Sci*, c. 27, sy 7, ss. 863-872, 2021, doi: 10.5505/pajes.2021.91033.

[44] C. Mellinas, M. Ramos, A. Jiménez, ve M. C. Garrigós, "Recent Trends in the Use of Pectin from Agro-Waste Residues as a Natural-Based Biopolymer for Food Packaging Applications", *Materials*, c. 13, sy 3, s. 673, Şub. 2020, doi: 10.3390/ma13030673.

[45] A. Zoghi, S. Vedadi, Z. H. Esfahani, H. A. Gavlighi, ve K. Khosravi-Darani, "A review on pectin extraction methods using lignocellulosic wastes", *Biomass Conv. Bioref.*, c. 13, sy 7, ss. 5577-5589, May. 2023, doi: 10.1007/s13399-021-02062-z.

[46] T. Vanitha ve M. Khan, "Role of Pectin in Food Processing and Food Packaging", içinde *Pectins - Extraction, Purification, Characterization and Applications*, M. Masuelli, Ed., IntechOpen, 2020. doi: 10.5772/intechopen.83677.

[47] J. Huang, Z. Hu, L. Hu, G. Li, Q. Yao, ve Y. Hu, "Pectin-based active packaging: A critical review on preparation, physical properties and novel application in food preservation", *Trends in Food Science & Technology*, c. 118, ss. 167-178, Ara. 2021, doi: 10.1016/j.tifs.2021.09.026.

[48] R. Begum, M. G. Aziz, M. B. Uddin, ve Y. A. Yusof, "Characterization of Jackfruit (Artocarpus Heterophyllus) Waste Pectin as Influenced by Various Extraction Conditions", *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, c. 2, ss. 244-251, 2014, doi: 10.1016/j.aaspro.2014.11.035.

[49] S. Q. Liew, W. H. Teoh, C. K. Tan, R. Yusoff, ve G. C. Ngoh, "Subcritical water extraction of low methoxyl pectin from pomelo (Citrus grandis (L.) Osbeck) peels", *International Journal of Biological Macromolecules*, c. 116, ss. 128-135, Eyl. 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.013.

[50] M. Thériault, S. Caillet, S. Kermasha, ve M. Lacroix, "Antioxidant, antiradical and antimutagenic activities of phenolic compounds present in maple products", *Food Chemistry*, c. 98, sy 3, ss. 490-501, Oca. 2006, doi: 10.1016/j.foodchem.2005.05.079.

[51] C. W. I. Haminiuk, G. M. Maciel, M. S. V. Plata-Oviedo, ve R. M. Peralta, "Phenolic compounds in fruits – an overview", *Int J of Food Sci Tech*, c. 47, sy 10, ss. 2023-2044, Eki. 2012, doi: 10.1111/j.1365-2621.2012.03067.x.

[52] M. D. Baldissera *vd.*, "Antihyperglycemic, antioxidant activities of tucumã oil (Astrocaryum vulgare) in alloxan-induced diabetic mice, and identification of fatty acid profile by gas chromatograph: New natural source to treat hyperglycemia", *Chemico-Biological Interactions*, c. 270, ss. 51-58, May. 2017, doi: 10.1016/j.cbi.2017.04.001.

[53] Y. J. S. Santos, C. Malegori, L. A. Colnago, ve F. M. Vanin, "Application on infrared spectroscopy for the analysis of total phenolic compounds in fruits", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, c. 64, sy 10, ss. 2906-2916, Nis. 2024, doi: 10.1080/10408398.2022.2128036.

[54] Cemeroğlu, B, *Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi.*, 236. bs. Ankara: Bizim Grup Basımevi, 2013.

[55] S. Yıkmış, H. Ozer, O. Levent, B. G. Çöl, ve B. Erdal, "Effect of thermosonication and thermal treatments on antidiabetic, antihypertensive, mineral elements and in vitro bioaccessibility of bioactive compounds in freshly squeezed pomegranate juice", *Food Measure*, c. 16, sy 4, ss. 3023-3041, Ağu. 2022, doi: 10.1007/s11694-022-01402-5.

[56] V. L. Singleton ve J. A. Rossi, "Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents", *Am J Enol Vitic.*, c. 16, sy 3, ss. 144-158, 1965, doi: 10.5344/ajev.1965.16.3.144.

[57] J. Zhishen, T. Mengcheng, ve W. Jianming, "The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals", *Food Chemistry*, c. 64, sy 4, ss. 555-559, Mar. 1999, doi: 10.1016/S0308-8146(98)00102-2.

[58] I. F. F. Benzie ve J. J. Strain, "The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of 'Antioxidant Power': The FRAP Assay", *Analytical Biochemistry*, c. 239, sy 1, ss. 70-76, Tem. 1996, doi: 10.1006/abio.1996.0292.

[59] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, ve C. Rice-Evans, "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay", *Free Radical Biology and Medicine*, c. 26, sy 9-10, ss. 1231-1237, May. 1999, doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3.

[60] R. Apak, K. Güçlü, M. Özyürek, ve S. E. Karademir, "Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method", *J. Agric. Food Chem.*, c. 52, sy 26, ss. 7970-7981, Ara. 2004, doi: 10.1021/jf048741x.

[61] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, ve C. Berset, "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", *LWT - Food Science and*

Technology, c. 28, sy 1, ss. 25-30, 1995, doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.

[62] M. T. Yilmaz, A. Muslu, S. Karasu, F. Bozkurt, ve E. Dertli̇, "Portakal Posasından Modifiye Pektin Eldesi ve Optimizasyonu, Kompozisyonel ve Yatışkan Faz Özelliklerinin Karakterizasyonu".

[63] Sucheta, N. N. Misra, ve S. K. Yadav, "Extraction of pectin from black carrot pomace using intermittent microwave, ultrasound and conventional heating: Kinetics, characterization and process economics", *Food Hydrocolloids*, c. 102, s. 105592, May. 2020, doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.105592.

[64] M. M. Bradford, "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding".

[65] J. Dai *vd.*, "Sugar compositional determination of polysaccharides from Dunaliella salina by modified RP-HPLC method of precolumn derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone", *Carbohydrate Polymers*, c. 82, sy 3, ss. 629-635, Eki. 2010, doi: 10.1016/j.carbpol.2010.05.029.

[66] G. Chen, F. Bu, X. Chen, C. Li, S. Wang, ve J. Kan, "Ultrasonic extraction, structural characterization, physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides from bamboo shoots (Chimonobambusa quadrangularis) processing by-products", *International Journal of Biological Macromolecules*, c. 112, ss. 656-666, Haz. 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.02.013.

[67] A. Karadag *vd.*, "Optimisation of green tea polysaccharides by ultrasound-assisted extraction and their *in vitro* antidiabetic activities", *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, c. 11, sy 5, ss. 479-490, Eyl. 2019, doi: 10.3920/QAS2019.1579.

[68] A. S. Matharu, J. A. Houghton, C. Lucas-Torres, ve A. Moreno, "Acid-free microwave-assisted hydrothermal extraction of pectin and porous cellulose from mango peel waste – towards a zero waste mango biorefinery", *Green Chem.*, c. 18, sy 19, ss. 5280-5287, 2016, doi: 10.1039/C6GC01178K.

[69] A. Kozioł, K. Środa-Pomianek, A. Górniak, A. Wikiera, K. Cyprych, ve M. Malik, "Structural Determination of Pectins by Spectroscopy Methods", *Coatings*, c. 12, sy 4, s. 546, Nis. 2022, doi: 10.3390/coatings12040546.

[70] S. M. T. Gharibzahedi, B. Smith, ve Y. Guo, "Pectin extraction from common fig skin by different methods: The physicochemical, rheological, functional, and structural evaluations", *International Journal of Biological Macromolecules*, c. 136, ss. 275-283, Eyl. 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.06.040.

[71] K. Ponmurugan *vd.*, "Ultrasound assisted pectic polysaccharide extraction and its characterization from waste heads of Helianthus annus", *Carbohydrate Polymers*, c. 173, ss. 707-713, Eki. 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.06.018.

[72] J. Wang *vd.*, "Characteristics and stabilization of Pickering emulsions constructed using myosin from bighead carp (Aristichthys nobilis)", *Food Chemistry*, c. 456, s. 140033, Eki. 2024, doi: 10.1016/j.foodchem.2024.140033.

[73] H. A. Kahraman, H. Tutun, E. Keyvan, ve B. M. Balkan, "Bioactive components, antibacterial and antiradical properties of home-made apple and grape vinegar", *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, c. 69, sy 2, ss. 139-148, Mar. 2022, doi: 10.33988/auvfd.865309.

[74] A. N. Hasan, U. Antony, G. V. Bala, D. T. Prabha, C. Kavya, ve A. F. Malik, "Study on Production Vinegar from Apple", *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.*, c. 761, sy 1, s. 012125, May. 2021, doi: 10.1088/1755-1315/761/1/012125.

[75] K. Melkis ve K. Jakubczyk, "The Chemical Profiles and Antioxidant Properties of Live Fruit or Vegetable Vinegars Available on the Polish Food Market", *Foods*, c. 13, sy 10, s. 1488, May. 2024, doi: 10.3390/foods13101488.

[76] Q. Liu, G.-Y. Tang, C.-N. Zhao, R.-Y. Gan, ve H.-B. Li, "Antioxidant Activities, Phenolic Profiles, and Organic Acid Contents of Fruit Vinegars", *Antioxidants*, c. 8, sy 4, s. 78, Mar. 2019, doi: 10.3390/antiox8040078.

[77] H. N. Budak, B. Ertekin Filiz, E. Sesli Çetin, ve Ç. Gökirmakli, "Antimicrobial activity of different kinds of traditional vinegar and its relationship with antioxidant properties", *AUDJG - Food Technology*, c. 46, sy 1, ss. 140-154, Mar. 2022, doi: 10.35219/foodtechnology.2022.1.11.

[78] S. Bakir, D. Devecioglu, S. Kayacan, G. Toydemir, F. Karbancioglu-Guler, ve E. Capanoglu, "Investigating the antioxidant and antimicrobial activities of different vinegars", *Eur Food Res Technol*, c. 243, sy 12, ss. 2083-2094, Ara. 2017, doi: 10.1007/s00217-017-2908-0.

[79] M. Bordiga *vd.*, "Characterisation of Diospyros kaki (persimmon) vinegars produced with different microorganisms", *Food Bioscience*, c. 55, s. 102987, Eki. 2023, doi: 10.1016/j.fbio.2023.102987.

[80] H. Kelebek, P. Kadiroğlu, N. B. Demircan, ve S. Selli, "Screening of bioactive components in grape and apple vinegars: Antioxidant and antimicrobial potential: Screening of bioactive components in grape and apple vinegars: Antioxidant and antimicrobial potential", *J. Inst. Brew.*, c. 123, sy 3, ss. 407-416, Tem. 2017, doi: 10.1002/jib.432.

[81] C. M. Ajila, S. K. Brar, M. Verma, R. D. Tyagi, ve J. R. Valéro, "Solid-state fermentation of apple pomace using Phanerocheate chrysosporium – Liberation and extraction of phenolic antioxidants", *Food Chemistry*, c. 126, sy 3, ss. 1071-1080, Haz. 2011, doi: 10.1016/j.foodchem.2010.11.129.

[82] M. I. Bhat *vd.*, "Comparative study on thermo-mechanical, structural and functional properties of pectin extracted from immature wasted apples and commercial pectin", *International Journal of Biological Macromolecules*, c. 254, s. 127658, Oca. 2024, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.127658.

[83] F. Xu *vd.*, "Yeast fermentation of apple and grape pomaces affects subsequent aqueous pectin extraction: Composition, structure, functional

and antioxidant properties of pectins", *Food Hydrocolloids*, c. 133, s. 107945, Ara. 2022, doi: 10.1016/j.foodhyd.2022.107945.

[84] S. H. Jong, N. Abdullah, ve N. Muhammad, "Effect of acid type and concentration on the yield, purity, and esterification degree of pectin extracted from durian rinds", *Results in Engineering*, c. 17, s. 100974, Mar. 2023, doi: 10.1016/j.rineng.2023.100974.

[85] J. Luo, Y. Xu, ve Y. Fan, "Upgrading Pectin Production from Apple Pomace by Acetic Acid Extraction", *Appl Biochem Biotechnol*, c. 187, sy 4, ss. 1300-1311, Nis. 2019, doi: 10.1007/s12010-018-2893-1.

[86] S. Scharf, A. Kersten, P. Lentzsch, ve P. Meurer, "Analysis of pectolytic enzymes and *Alternaria spp* . in fresh dill, mustard seeds, onions, and vinegar, and their influence on the softening of pickled cucumbers", *Journal of Food Science*, c. 87, sy 2, ss. 808-818, Şub. 2022, doi: 10.1111/1750-3841.16041.

[87] R. S. Jayani, S. Saxena, ve R. Gupta, "Microbial pectinolytic enzymes: A review", *Process Biochemistry*, c. 40, sy 9, ss. 2931-2944, Eyl. 2005, doi: 10.1016/j.procbio.2005.03.026.

[88] T. Sakai ve M. Okushima, "Microbial Production of Pectin from Citrus Peel", *Appl Environ Microbiol*, c. 39, sy 4, ss. 908-912, Nis. 1980, doi: 10.1128/aem.39.4.908-912.1980.

[89] J. Wu, K. Zhu, J. Li, X. Ye, ve S. Chen, "An optimize adaptable method for determining the monosaccharide composition of pectic polysaccharides", *International Journal of Biological Macromolecules*, c. 277, s. 133591, Eki. 2024, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.133591.

[90] N. Babbar, W. Dejonghe, M. Gatti, S. Sforza, ve K. Elst, "Pectic oligosaccharides from agricultural by-products: production, characterization and health benefits", *Critical Reviews in Biotechnology*, c. 36, sy 4, ss. 594-606, Tem. 2016, doi: 10.3109/07388551.2014.996732.

[91] D. Gawkowska, J. Cybulska, ve A. Zdunek, "Structure-Related Gelling of Pectins and Linking with Other Natural Compounds: A Review", *Polymers*, c. 10, sy 7, s. 762, Tem. 2018, doi: 10.3390/polym10070762.

[92] M. A. Monsoor, U. Kalapathy, ve A. Proctor, "Determination of polygalacturonic acid content in pectin extracts by di use re¯ectance Fourier transform infrared spectroscopy".

[93] N. Muñoz-Almagro, L. Valadez-Carmona, J. A. Mendiola, E. Ibáñez, ve M. Villamiel, "Structural characterisation of pectin obtained from cacao pod husk. Comparison of conventional and subcritical water extraction", *Carbohydrate Polymers*, c. 217, ss. 69-78, Ağu. 2019, doi: 10.1016/j.carbpol.2019.04.040.

[94] Z. Rahmani, F. Khodaiyan, M. Kazemi, ve A. Sharifan, "Optimization of microwave-assisted extraction and structural characterization of pectin from sweet lemon peel", *International Journal of Biological Macromolecules*, c. 147, ss. 1107-1115, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.079.

[95] A. Fellah, P. Anjukandi, M. R. Waterland, ve M. A. K. Williams, "Determining the degree of methylesterification of pectin by ATR/FT-IR:

Methodology optimisation and comparison with theoretical calculations", *Carbohydrate Polymers*, c. 78, sy 4, ss. 847-853, Kas. 2009, doi: 10.1016/j.carbpol.2009.07.003.

[96] E. E. Santos, R. C. Amaro, C. C. C. Bustamante, M. H. A. Guerra, L. C. Soares, ve R. E. S. Froes, "Extraction of pectin from agroindustrial residue with an ecofriendly solvent: use of FTIR and chemometrics to differentiate pectins according to degree of methyl esterification", *Food Hydrocolloids*, c. 107, s. 105921, Eki. 2020, doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.105921.

[97] A. Baum *vd.*, "Prediction of Pectin Yield and Quality by FTIR and Carbohydrate Microarray Analysis", *Food Bioprocess Technol*, c. 10, sy 1, ss. 143-154, Oca. 2017, doi: 10.1007/s11947-016-1802-2.

[98] R. Lutz, A. Aserin, L. Wicker, ve N. Garti, "Structure and physical properties of pectins with block-wise distribution of carboxylic acid groups", *Food Hydrocolloids*, c. 23, sy 3, ss. 786-794, May. 2009, doi: 10.1016/j.foodhyd.2008.04.009.

[99] Y. Lin, F. An, H. He, F. Geng, H. Song, ve Q. Huang, "Structural and rheological characterization of pectin from passion fruit (Passiflora edulis f. flavicarpa) peel extracted by high-speed shearing", *Food Hydrocolloids*, c. 114, s. 106555, May. 2021, doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.106555.

[100] A. C. Barbosa Ribeiro *vd.*, "Cashew apple pectin as a carrier matrix for mangiferin: Physicochemical characterization, in vitro release and biological evaluation in human neutrophils", *International Journal of Biological Macromolecules*, c. 171, ss. 275-287, Şub. 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.01.001.

[101] T. Zhang *vd.*, "Effects of pH and temperature on the structure, rheological and gel-forming properties of sugar beet pectins", *Food Hydrocolloids*, c. 116, s. 106646, Tem. 2021, doi: 10.1016/j.foodhyd.2021.106646.

[102] E. Westerlund, P. Åman, R. Andersson, R. E. Andersson, ve S. M. M. Rahman, "Chemical characterization of water-soluble pectin in papaya fruit", *Carbohydrate Polymers*, c. 15, sy 1, ss. 67-78, Oca. 1991, doi: 10.1016/0144-8617(91)90020-D.

[103] M. V. Marcon, P. I. B. Carneiro, G. Wosiacki, E. Beleski-Carneiro, ve C. L. O. Petkowicz, "Pectins from Apple Pomace – Characterization by 13C and 1H NMR Spectroscopy", c. 4, sy 3, 2005.

[104] X. Ma *vd.*, "Effects of ultrasound pretreatment on the enzymolysis of pectin: Kinetic study, structural characteristics and anti-cancer activity of the hydrolysates", *Food Hydrocolloids*, c. 79, ss. 90-99, Haz. 2018, doi: 10.1016/j.foodhyd.2017.12.008.

[105] E. Taboada *vd.*, "Isolation and characterisation of pectic substances from murta (Ugni molinae Turcz) fruits", *Food Chemistry*, c. 123, sy 3, ss. 669-678, Ara. 2010, doi: 10.1016/j.foodchem.2010.05.030.

[106] J. Zhou, D. Liu, W. Xia, Y. Guo, Y. Luo, ve J. Xue, "Physicochemical and functional properties of RG-I enriched pectin extracted from thinned-young apples", *International Journal of Biological Macromolecules*, c. 236, s. 123953, May. 2023, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123953.

[107] Q.-V. Bach ve W.-H. Chen, "Pyrolysis characteristics and kinetics of microalgae via thermogravimetric analysis (TGA): A state-of-the-art review", *Bioresource Technology*, c. 246, ss. 88-100, Ara. 2017, doi: 10.1016/j.biortech.2017.06.087.

[108] C. Schick, "Differential scanning calorimetry (DSC) of semicrystalline polymers", *Anal Bioanal Chem*, c. 395, sy 6, ss. 1589-1611, Kas. 2009, doi: 10.1007/s00216-009-3169-y.

[109] W. Wang *vd.*, "Characterization of pectin from grapefruit peel: A comparison of ultrasound-assisted and conventional heating extractions", *Food Hydrocolloids*, c. 61, ss. 730-739, Ara. 2016, doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.06.019.

[110] A. M. M. Combo *vd.*, "Characterization of sugar beet pectic-derived oligosaccharides obtained by enzymatic hydrolysis", *International Journal of Biological Macromolecules*, c. 52, ss. 148-156, Oca. 2013, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2012.09.006.

[111] J. Aburto, M. Moran, A. Galano, ve E. Torres-García, "Non-isothermal pyrolysis of pectin: A thermochemical and kinetic approach", *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, c. 112, ss. 94-104, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.jaap.2015.02.012.

[112] L. Liang *vd.*, "Heterointerface Engineering in Electromagnetic Absorbers: New Insights and Opportunities", *Advanced Materials*, c. 34, sy 4, s. 2106195, Oca. 2022, doi: 10.1002/adma.202106195.

[113] U. Einhorn-Stoll, H. Kunzek, ve G. Dongowski, "Thermal analysis of chemically and mechanically modified pectins", *Food Hydrocolloids*, c. 21, sy 7, ss. 1101-1112, Eki. 2007, doi: 10.1016/j.foodhyd.2006.08.004.

[114] U. Einhorn-Stoll ve H. Kunzek, "Thermoanalytical characterisation of processing-dependent structural changes and state transitions of citrus pectin", *Food Hydrocolloids*, c. 23, sy 1, ss. 40-52, Oca. 2009, doi: 10.1016/j.foodhyd.2007.11.009.

[115] A. Karadag, K. Ozkan, ve O. Sagdic, "Development of microencapsulated grape juice powders using black 'Isabel' grape peel pectin and application in jelly formulation with enhanced in vitro bioaccessibility of anthocyanins", *Journal of Food Science*, c. 89, sy 4, ss. 2067-2083, Nis. 2024, doi: 10.1111/1750-3841.16999.

[116] Y. Jiang ve J. Du, "Properties of high-methoxyl pectin extracted from 'Fuji' apple pomace in China", *J Food Process Engineering*, c. 40, sy 3, s. e12497, Haz. 2017, doi: 10.1111/jfpe.12497.

[117] C. Wang, W.-Y. Qiu, T.-T. Chen, ve J.-K. Yan, "Effects of structural and conformational characteristics of citrus pectin on its functional properties", *Food Chemistry*, c. 339, s. 128064, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.128064.

[118] Y. Jiang, J. Du, L. Zhang, ve W. Li, "Properties of pectin extracted from fermented and steeped hawthorn wine pomace: A comparison", *Carbohydrate Polymers*, c. 197, ss. 174-182, Eki. 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2018.06.001.

[119] T. Schmelter, “Enzymatic modifications of pectins and the impact on their rheological properties”, *Carbohydrate Polymers*, c. 47, sy 2, ss. 99-108, Şub. 2002, doi: 10.1016/S0144-8617(01)00170-9.

[120] S. Karasu, O. S. Toker, M. T. Yilmaz, S. Karaman, ve E. Dertli, “Thermal loop test to determine structural changes and thermal stability of creamed honey: Rheological characterization”, *Journal of Food Engineering*, c. 150, ss. 90-98, Nis. 2015, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2014.10.004.

[121] Nurhan arslan, “Pektinin Fizikokimyasal Özellikleri, Üretimi ve Gıdalarda Kullanımı”. dergipark, 1994. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: https://dergipark.org.tr/en/pub/gida/issue/6983/93065

[122] B. Min, J. Lim, S. Ko, K.-G. Lee, S. H. Lee, ve S. Lee, “Environmentally friendly preparation of pectins from agricultural byproducts and their structural/rheological characterization”, *Bioresource Technology*, c. 102, sy 4, ss. 3855-3860, Şub. 2011, doi: 10.1016/j.biortech.2010.12.019.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Muslu Can, A., Metin Yildirim, R., & Karadag, A. "Elma Sirkesi Üretim Artığından Pektin Ekstraksiyonu" International Maldia Health Sciences Congress, 14-16 Ekim, 2022, Malatya, Turkey, oral presentation, p.p. 70.

Makaleler

1. Muslu Can, A., Metin Yildirim, R., & Karadag, A. (2024). The Properties of Pectin Extracted from the Residues of Vinegar-Fermented Apple and Apple Pomace. *Fermentation*, *10*(11), 556.