



***A.niger*'den SAFLAŞTIRILMIŞ NARİNGİNAZIN VE
FARKLI PROBİYOTİK BAKTERİLERİN
GREYFURT SUYUNUN BAZI ÖZELLİKLERİ VE
ACILIK BİLEŞENLERİNDEN OLAN NARİNGİN
ÜZERİNE ETKİSİ**

Arzu İMECE

**Doktora Tezi
Gıda Mühendisliği
Prof. Dr. Memnune ŞENGÜL
2022
(Her hakkı saklıdır.)**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ

***A.niger*'den SAFLAŞTIRILMIŞ NARİNGİNAZIN VE FARKLI PROBİYOTİK
BAKTERİLERİN GREYFURT SUYUNUN BAZI ÖZELLİKLERİ VE ACILIK
BİLEŞENLERİNDEN OLAN NARİNGİN ÜZERİNE ETKİSİ**

(The Effect of Purified Naringinase From *A.niger* and Some Probiotic Bacteria on Some
Properties of Grapefruit Juice and Naringin, A Bitter Component)

DOKTORA TEZİ

Arzu İMECE

Danışman: Prof. Dr. Memnune ŞENGÜL

Erzurum
Ağustos, 2022

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

***A.niger*'den SAFLAŞTIRILMIŞ NARİNGİNAZİN VE FARKLI PROBİYOTİK
BAKTERİLERİN GREYFURT SUYUNUN BAZI ÖZELLİKLERİ VE ACILIK
BİLEŞENLERİNDEN OLAN NARİNGİN ÜZERİNE ETKİSİ**

Prof. Dr. Memnune ŞENGÜL danışmanlığında, Arzu İMECE tarafından hazırlanan bu çalışma, 23/08/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak oybirliği (5/5) ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Oktay YILDIZ Karadeniz Teknik Üniversitesi	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Memnune ŞENGÜL Atatürk Üniversitesi	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. M.Fatih ERTUGAY Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Bilal YILMAZ Atatürk Üniversitesi	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. İhsan Güngör ŞAT Atatürk Üniversitesi	Aslı Islak İmzalıdır

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof.Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN
Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Natural and
Applied Sciences

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak Prof. Dr. Memnune ŞENGÜL danışmanlığında sunulan “*A.niger*’den Saflaştırılmış Naringinazın ve Farklı Probiyotik Bakterilerin Greyfurt Suyunun Bazı Özellikleri ve Acılık Bileşenlerinden Olan Naringin Üzerine Etkisi” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	8	30
Kuramsal Temeller	11	30
Materyal ve Metot	20	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	5	20
Sonuçlar ve Öneriler	0	20
Tezin Geneli	8	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5’den büyük olmaması gerekir.

Sunulan bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ettiğimizi beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Arzu İMECE	Prof.Dr. Memnune ŞENGÜL
1.9.2022	1.9.2022
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Birlikte çalışmaya başladığımız ilk günden itibaren bütün bilgi ve tecrübelerini büyük bir sabırla benimle paylaşmaktan çekinmeyen doktora tezimin her aşamasında büyük katkısı, desteği ve emeği olan, aynı zamanda hayat tecrübelerini de bana aktararak hem akademik hem sosyal olarak olgunlaşmama yardımcı olan çok sevgili hocam, kıymetli danışmanım Sayın Sayın Prof. Dr. Memnune ŞENGÜL'e,

Mikrobiyolojik analizlerin yapılmasında laboratuvar imkânı sağlayan, sonuçların değerlendirilmesinde büyük emeği olan, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Bülent ÇETİN'e.

Enzim saflaştırma aşamasındaki desteklerinden dolayı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVOĞLU'na, Sayın Dr. Arzu ÖZTÜRK KESEBİR'e, değerli arkadaşım ve hocam Sayın Doç. Dr. Yeliz DEMİR'e

Tez analiz sürecimde yanımda olan ve bana yardım eden değerli arkadaşlarım Sayın Arş. Gör. Haktan AKTAŞ'a, Sayın İsa Arslan KARAKÜTÜK'e ve Sayın Dr. Sümeyra BAKIRCI IŞIK'a, aynı zamanda ön denemelerimde bana Bartın Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarında çalışma imkânı sağlayan Sayın Dr. Öğretim Üyesi Rizvan İMAMOĞLU'na,

Hayatımın her zorluğunda manevi desteğini hep hissettiğim anneme maddi ve manevi destekleri ile hayatımın her anında yanımda olan kıymetli aileme ve sevgili eşim Osman İMECE'ye tüm içtenliğimle teşekkür ederim

Arzu İMECE

ÖZET

DOKTORA TEZİ

A.NİGER'DEN SAFLAŞTIRILMIŞ NARİNGİNAZIN VE BAZI PROBİYOTİK BAKTERİLERİN GREYFURT SUYUNUN BAZI ÖZELLİKLERİ VE ACILIK BİLEŞENLERİNDEN OLAN NARİNGİN ÜZERİNE ETKİSİ

Arzu İMECE

Danışman: Prof. Dr. Memnune ŞENGÜL

Amaç: Narenciye suları arasında özellikle greyfurt suyunda önemli bir sorun olarak karşımıza çıkan acılık bileşeni naringinin azaltılması amacıyla naringinaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışılmıştır. Aynı zamanda naringinaz enzimi ve probiyotik mikroorganizmaların greyfurt suyuna ilave edildikten sonra greyfurt suyundaki fizikokimyasal değişimleri ve antioksidan aktivitesi araştırılmıştır.

Yöntem: Naringinaz enzimi ekstraselüler olarak *Aspergillus niger* ATCC 1688 mikroorganizmasından elde edilmiş, saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Bununla birlikte saflaştırılan enzimin greyfurt suyuna farklı konsantrasyonlarda (%0.1, %0.5, %1) ilave edilerek farklı sıcaklıklarda (25, 35, 45°C) bir ve beş saat bekletilerek naringin miktarının belirlenmesiyle birlikte greyfurt suyunda meydana gelen fizikokimyasal değişimler ve antioksidan aktivite belirlenmiştir. Bazı probiyotik bakterilerin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının greyfurt suyuna ilave edilerek bir aylık depolama süresi içerisinde belirli aralıklarda (1, 2, 3. günler ve 2 ve 4.haftalarda) greyfurt suyunda naringin miktarı, fizikokimyasal değişimler ile antioksidan aktivite belirlenmiştir.

Bulgular: Naringinaz enziminin optimum iyonik şiddeti 0,5 M, optimum pH değeri 5 ve optimum sıcaklığı ise 50°C olarak belirlenmiştir. Enzimin en az Mg^{+2} den etkilendiği bulunmuştur. Saflaştırılmış naringinaz enziminin ilave edildiği greyfurt suyu örneklerinde naringin miktarındaki en fazla azalma (%65,58), %1 enzim ilave edilmiş ve 45 °C'de inkübe edilmiş örnekte belirlenmiştir. Probiyotik bakteri ilave edilmiş greyfurt sularında ise mikroorganizmaların en aktif gelişim süreleri olan ilk üç gün greyfurt sularının fizikokimyasal özelliklerinde olumlu gelişmeler tespit edilmiştir. Daha sonraki süreçte ise fizikokimyasal özelliklerinde bir azalma belirlenmiştir. Antioksidan aktivitelerinde ise ilk üç günlük süreçte çok fazla değişim olmamakla birlikte 2. ve 4. haftalarda bir azalma tespit edilmiştir. Probiyotik bakterilerin ilave edildiği greyfurt suyu örneklerinde naringin miktarında en fazla azalma (%61,5), 37°C'de depolanan *L.plantarum* ACC 28'de belirlenmiştir. Her iki uygulamada da en yüksek fenolik bileşik kuinik asit olarak belirlenmiş olup, kuinik asit saflaştırılan enzimin ilave edildiği örneklerden en yüksek 25°C'de %0.5 enzim ilave edilen örnekte (13914,48 ppb), probiyotik bakterilerde ise 37°C'de depolanmış 3. KO'da (35768,88 ppb) tespit edilmiştir.

Sonuç: Yapılan bu çalışma naringinaz enziminin greyfurt suyuna uygulanması açısından geniş kapsamlı bir araştırma olup, bu kapsamda daha önce bir çalışmaya rastlanmadığından bu çalışmanın literatüre önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Naringinaz, naringin, probiyotik meyvesuyu, *Asperillus niger* ATCC 1688, Greyfurt suyu

Ağustos 2022, 236 sayfa

ABSTRACT

DOCTORAL THESIS

THE EFFECT OF PURIFIED NARINGINASE FROM *A.NIGER* AND SOME PROBIOTIC BACTERIA ON SOME PROPERTIES OF GRAPEFRUIT JUICE AND NARINGIN, A BITTER COMPONENT

Arzu IMECE

Supervizor: Prof. Dr. Memnune ŞENGÜL

Purpose: Purification and characterization of the enzyme naringinase was studied in order to reduce the bitterness component naringin, which is an important problem in citrus juices, especially in grapefruit juice. At the same time, after adding naringinase enzyme and probiotic microorganisms to grapefruit juice, physicochemical changes and antioxidant activity of grapefruit juice were investigated.

Method: Naringinase enzyme was extracellular obtained from the microorganism *Aspergillus niger* ATCC 1688, purified and characterized. However, by adding the purified enzyme to grapefruit juice at different concentrations (0.1%, 0.5%, 1%) and keeping it at different temperatures (25, 35, 45°C) for one hour and five hours, the physicochemical changes and antioxidant activity in grapefruit juice were determined by controlling the amount of naringin. By adding single, double and triple combinations of some probiotic bacteria to grapefruit juice, the amount of naringin, physicochemical changes and antioxidant activity were found in grapefruit juice at certain intervals (1, 2, 3 days and 2 and 4 weeks) within a month of storage.

Results: The optimum ionic strength of the naringinase enzyme was calculated as 0.5 M, the optimum pH value was 5 and the optimum temperature was 50°C. It was found that the enzyme was affected at least by Mg^{+2} . The highest decrease (65.58%) in the amount of naringin in the grapefruit juice samples to which the purified naringinase enzyme was added was determined in the sample that was added with 1% enzyme and incubated at 45°C. On the other hand, positive developments were found in the physicochemical properties of grapefruit juices in the first three days, which are the most active growth periods of microorganisms, in grapefruit juices to which probiotic bacteria were added. In the following process, a decline in physicochemical properties was calculated. Although there was not much change in antioxidant activities in the first three days, a decrease was detected in the 2nd and 4th weeks. The highest decrease (61.5%) in the amount of naringin in grapefruit juice samples to which probiotic bacteria were added was determined in *L. plantarum* ACC 28 stored at 37°C. In both applications, the highest phenolic compound was quinic acid. Among the samples to which the quinic acid purified enzyme was added, the highest was in the sample with 0.5% enzyme added at 25°C (13914.48 ppb), and in probiotic bacteria, the 3rd KO' was stored at 37°C was also detected (35768.88 ppb).

Conclusion: This study is a comprehensive study in terms of the application of the enzyme naringinase to grapefruit juice, and it is thought that this study will make an important contribution to the literature since no previous study has been found in this context.

Keywords: Naringinase, Naringin, Probiotic fruit juice, *Asperillus niger* ATCC 1688, grapefruit juice

August 2022, 236 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ	xix
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	7
Enzimlerin Genel Özellikleri ve Kimyasal Yapıları	7
Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması	8
Enzim Kinetiği	10
Michaelis-Menten hız eşitliği.....	11
Lineweaver-Burk ve Eadie-Hofstee hız eşitliği	12
Enzim Aktivitesine Etki Eden Faktörler	14
Substrat konsantrasyonu	14
Enzim konsantrasyonu	14
Ortam pH değeri.....	15
Sıcaklık.....	16
Su aktivitesi (a_w)	17
Enzim inhibitörleri ve aktivatörleri.....	18
Reaksiyon süresi	18
Enzimlerin Saflaştırılmasındaki Kromatografik Uygulamalar	19
İyon değişim kromatografisi	19
Jel filtrasyon kromatografisi	21
Afinite kromatografisi.....	22
Meyve Suyu Üretiminde Kullanılan Enzimler.....	23
Greyfurt ve Greyfurt Suyu	24
Fenolik Bileşikler	27

Flavonoidler	29
Naringinaz Enzimi	34
Naringinaz Üretimi İle İlgili Araştırmalar	39
<i>Aspergillus niger</i> 'in Genel Özellikleri	43
Probiyotik Bakteriler	44
Genel bilgiler.....	44
Probiyotik bakterilerin faydaları	44
Probiyotik meyve suları	45
Probiyotik bakteriler ve naringinaz	46
MATERYAL ve METOT	47
Materyal	47
Analizlerde kullanılan kimyasallar	47
Naringinaz enzimi için faydalanılan mikroorganizmalar.....	48
Analizlerde kullanılan cihaz ve aletler	48
Metot	49
Analizler için kullanılan çözeltilerin hazırlanması	49
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 1688 izolatının geliştirilmesi	51
Besiyeri optimizasyonu.....	51
Naringinaz enzim aktivitesinin ölçümü	51
Naringinaz enziminin saflaştırılması.....	53
Naringinaz enziminin kinetik ve karakteristik özelliklerinin belirlenmesi	55
Naringinaz enzimi aktivitesi üzerine bazı metallerin etkisinin belirlenmesi	55
Greyfurt suyuna uygulanan işlemler	56
Analitik analizler	57
Naringinaz Enzimi ilave edilmiş greyfurt sularında naringin ve naringenin konsantrasyonunun belirlenmesi	61
Probiyotik bakterilerin naringinaz üretimi için seçilmesi	62
Probiyotik bakterilerin greyfurt sularına aktarılması	63
Greyfurt suyundaki probiyotik mikroorganizmaların sayımı	64
İstatistiksel analizler.....	64
ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	65
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 1688 Besiyeri Optimizasyonu.....	65
Naringinaz Enzimi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu	69
Naringinaz enzimin saflaştırılması.....	69
Naringinaz enzim saflığının SDS-PAGE yöntemi ile kontrolü	71

Naringinaz enziminin karakterizasyonu.....	72
Naringinaz enziminin kinetik değerleri.....	74
Metal iyonlarının naringinaz üzerine etkileri.....	75
Enzim İlave Edilmiş Greyfurt Sularının Bazı Fizikokimyasal Özellikleri	76
Suda çözünür kuru madde (SÇKM) değişimi	76
pH değişimi	77
Titrasyon asitliği değişimi.....	83
Renk değerleri değişimi	86
Toplam Fenolik Madde değişimi	90
Antioksidan aktivite değişimi	93
LC-MS/MS ile belirlenen fenolik bileşen profili	98
Greyfurt suyunda HPLC ile belirlenen naringin miktarı.....	116
Probiyotik Bakteri İlave Edilmiş Greyfurt Sularının Bazı Fizikokimyasal Özellikleri ve Antioksidan Aktiviteleri.....	124
Probiotik bakterilerin besiyeri ortamına göre pH değişimi ve enzim aktivitesi	124
Probiyotik mikroorganizma sayıları.....	128
Probiyotik mikroorganizma ilave edilmiş greyfurt sularının fizikokimyasal özellikleri.....	132
SONUÇ VE ÖNERİLER	188
KAYNAKLAR.....	191
ÖZGEÇMİş.....	214

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1. Meyve Suyu Endüstrisinde Kullanılan Enzimler ve Kullanım Amaçları	24
Tablo 2. Naringinaz Üretimi Amacıyla Araştırılmış Mikroorganizmalar	36
Tablo 3. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar	48
Tablo 4. <i>Aspergillus niger</i> için pH 4.5 ve pH 6.5'e Ayarlanarak Hazırlanan Farklı Besiyeri Ortamları	51
Tablo 5. Saflaştırılmış Enzimin Uygulama Şartları	56
Tablo 6. <i>Lactobacillus</i> İçin Besiyeri Ortamları	62
Tablo 7. Mikroorganizmaların İnokülasyon Kombinasyonları ve Sıcaklıkları	63
Tablo 8. <i>A. niger</i> ATCC 1688'in pH Değeri 4.5 ve 6.5'e Ayarlanmış Farklı Besiyerlerinde Gelişim Süresince Farklı Günlerde pH ve Ekstraselüler Enzim Aktiviteleri	67
Tablo 9. <i>A. niger</i> ATCC 1688'in pH Değeri 4.5 ve 6.5'e Ayarlanmış Farklı Besiyerlerinde Gelişim Süresince Farklı Günlerde pH ve Ekstraselüler Enzim Aktiviteleri Varyans Analizi	68
Tablo 10. <i>A. niger</i> ATCC 1688'in pH Değeri 4.5 ve 6.5'e Ayarlanmış Farklı Besiyerlerinde Gelişim Süresince Farklı Günlerde pH ve Ekstraselüler Enzim Aktiviteleri ANOVA ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi.....	69
Tablo 11. <i>A. niger</i> ATCC 1688'den Naringinaz Enziminin 2 Basamakta Saflaştırma İşlemi Sonuçları	71
Tablo 12. Enzim Uygulanan Greyfurt Sularının İnkübasyondan Sonra Belirlenen Genel Özellikleri.....	78
Tablo 13. Enzim Uygulanan Greyfurt Sularının İnkübasyondan Sonraki Genel Özellikleri İçin Yapılan Varyans Analizi.....	81
Tablo 14. Enzim Uygulanan Greyfurt Sularının İnkübasyondan Sonraki Genel Özellikleri İçin Yapılan Tek Yönlü ANOVA ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi.....	82
Tablo 15. Enzim Uygulanan Greyfurt Sularının İnkübasyondan Sonraki Genel Özellikleri Arasında Korelasyonlar.....	84
Tablo 16. Enzim İlave Edilen Greyfurt Sularında İnkübasyondan Sonra Fenolik Bileşik Profili (pbb).....	100
Tablo 17. Enzim Uygulanan Greyfurt Sularının İnkübasyondan Sonraki Fenolik Bileşik Profili Varyans Analiz	102

Tablo 18. Enzim Uygulanan Greyfurt Sularının İnkübasyondan Sonraki Fenolik Bileşik Profili İçin ANOVA ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi	103
Tablo 19. Direkt Enzim Uygulanan Greyfurt Sularında Enzim Uygulama Süresi Boyunca Belirlenen Naringin Konsantrasyonları	117
Tablo 20. Direkt Enzim Uygulanan Greyfurt Sularında Enzim Uygulama Süresi Boyunca Belirlenen Naringin Konsantrasyonlarının Varyans Analizi	118
Tablo 21. Direkt Enzim Uygulanan Greyfurt Sularında Enzim Uygulama Süresi Boyunca Belirlenen Naringin Konsantrasyonlarının ANOVA ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi	119
Tablo 22. <i>Lactobacillus</i> Bakterilerinin Gelişim Süresindeki pH Değişimi ve Enzim Aktivitesi.....	125
Tablo 23. <i>Lactobacillus</i> Bakterilerinin Gelişim Süresindeki pH Değişimi ve Enzim Aktivitesi Varyans Analizi.....	126
Tablo 24. <i>Lactobacillus</i> Bakterilerinin Gelişim Süresindeki pH Değişimi ve Enzim Aktivitesi ANOVA ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi	127
Tablo 25. Probiyotik Mikroorganizmaların İlave Edildiği Greyfurt Sularının Depolama Süresi Boyunca Mikroorganizma Koloni Sayısı.....	130
Tablo 26. Probiyotik Bakteri Eklenmiş Greyfurt Sularının Depolama Süresince Belirlenen Genel Özellikleri	133
Tablo 27. Probiyotik Bakteri Eklenmiş Greyfurt Sularının Depolama Süresince Belirlenen Özelliklerinin Varyans Analizi	138
Tablo 28. Probiyotik Bakteri Eklenmiş Greyfurt Sularının Depolama Süresince Genel Özellikleri ANOVA ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi.....	139
Tablo 29. Probiyotik Bakteri Eklenmiş Greyfurt Sularının Depolama Süresince Genel Özelliklerinin Korelasyonu	140
Tablo 30. Probiyotik Bakteri İlave Edilmiş Greyfurt Sularında Depolama Süresinde LC-MS/MS ile Belirlenen Fenolik Bileşen Profili (ppb)	159
Tablo 31. Probiyotik Bakteri Eklenmiş Greyfurt Sularında Depolama Süresince LC-MS/MS ile Belirlenen Fenolik Bileşen Profili Varyans Analizi	163
Tablo 32. Probiyotik Bakteri Eklenmiş Greyfurt Sularında Depolama Süresince LC-MS/MS ile Belirlenen Fenolik Bileşik Profili ANOVA ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi	164
Tablo 33. Probiyotik Bakteri Eklenmiş Greyfurt Sularında Depolama Süresi Boyunca HPLC ile Belirlenen Naringin Konsantrasyonları	180

Tablo 34. Probiyotik Bakteri Eklenmiş Greyfurt Sularında Depolama Süresi Boyunca HPLC ile Belirlenen Naringin Varyans Analizi	182
Tablo 35. Probiyotik bakteri eklenmiş greyfurt sularının naringin içeriğine ait ANOVA ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi	182



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Enzimatik reaksiyonun gerçekleşmesini sağlayan lock and key modeli (a) ve induced fit modeli (b)	8
Şekil 2. Lineweaver-Burk hız grafiği.....	13
Şekil 3. Ortamda bulunan enzim ile gerçekleşen reaksiyonun serbest enerji diyagramı	13
Şekil 4. Enzim hızına substrat konsantrasyonunun etkisi	14
Şekil 5. Enzim konsantrasyonunun enzim hızına etkisi	15
Şekil 6. İki farklı enzime ait pH'nın enzim hızına etkisi	16
Şekil 7. Enzim hızına sıcaklığın etkisi	17
Şekil 8. İyon değişim kromatografisinin şematik gösterimi	20
Şekil 9. Jel filtrasyonun şematik olarak gösterimi	21
Şekil 10. Afinite kromatografisi çalışma prensibi.....	22
Şekil 11. Narenciye meyvelerinin yapısı.....	25
Şekil 12. Narenciye meyvelerindeki kese ve hücrel içyapısı.....	25
Şekil 13. Fenolik bileşiklerin genel kimyasal yapıları (a) Fenolik asitler, (b) Flavonoidler, (c) Lignanlar ve (d) Stilbenler	28
Şekil 14. Fenolik bileşiklerin serbest radikalleri delokalize etmesi	29
Şekil 15. Flavonoidlerin temel iskelet yapıları.....	30
Şekil 16. Naringin kimyasal yapısı	32
Şekil 17. Naringenin kimyasal yapısı.....	33
Şekil 18. Naringenin naringinaz enziminin etkisiyle naringenine hidrolize edilmesi	35
Şekil 19. Ramnoz ile kompleks halinde ramnosidazın (α Rha) üç boyutlu yapısı (a) α Rha- Rha'daki (şerit stereodiagram) monomerin genel yapısı.....	38
Şekil 20. Probiyotiklerin faydaları	45
Şekil 21. Naringinaz aktivitesi belirleme aşamaları	52
Şekil 22. Standart naringin grafiği	53
Şekil 23. Enzim ilave edilmiş greyfurt suları	57
Şekil 24. <i>L. plantarum</i> bakterilerinin enzim aktivitelerinin belirlenmesi	63
Şekil 25. Naringinaz enzimi saflaştırma grafiği.....	70
Şekil 26. <i>A. niger</i> ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü.....	71

Şekil 27. <i>A.niger</i> ATCC 1688 mikroorganizmasından elde edilen naringinaz enziminin optimum iyonik şiddet çalışması sonucu bağlı aktivitede meydana gelen değişimler	72
Şekil 28. <i>A.niger</i> ATCC 1688 mikroorganizmasından elde edilen naringinaz enziminin optimum pH çalışması sonucu bağlı aktivitede meydana gelen değişimler.....	73
Şekil 29. <i>A.niger</i> ATCC 1688 mikroorganizmasından elde edilen naringinaz enziminin optimum sıcaklık çalışması sonucu bağlı aktivitede meydana gelen değişimler ...	73
Şekil 30. <i>A.niger</i> ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enzimi Lineveawer-Burk grafiği..	74
Şekil 31. Bazı metallerin naringinaz aktivitesi üzerine etkileri.....	75
Şekil 32. <i>A.niger</i> ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu renk yoğunluğu (koyuluğu) (IC) değerlerindeki sıcaklık x konsantrasyon (A), sıcaklık x süre (B) ve konsantrasyon x süre (C) interaksiyonları.....	87
Şekil 33. <i>A.niger</i> ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu renk yoğunluğu (IC') değerlerindeki sıcaklık x konsantrasyon (A), sıcaklık x süre (B) ve konsantrasyon x süre (C) interaksiyonları.....	88
Şekil 34. <i>A.niger</i> ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu renk tonu değerlerindeki sıcaklık x süre interaksiyonu	89
Şekil 35. <i>A.niger</i> ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu sarı renk boyutu (%) değerlerindeki sıcaklık x süre interaksiyonu	89
Şekil 36. <i>A.niger</i> ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu mavi renk boyutu (%) değerlerindeki sıcaklık x süre (B) interaksiyonu	90
Şekil 37. Toplam fenolik madde miktarı tayini için gallik asit kullanılarak hazırlanan standart grafik	91
Şekil 38. <i>A.niger</i> ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde	

1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu TFM (mgGAE/kg) değerlerindeki sıcaklık x konsantrasyon (A), sıcaklık x süre (B) ve konsantrasyon x süre (C) interaksyonları.....	92
Şekil 39. DPPH• serbest radikali giderme aktivitesi için hazırlanmış standart grafik.....	94
Şekil 40. <i>A.niger</i> ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu DPPH• metodu ile belirlenen antioksidan aktivite değerlerindeki sıcaklık x konsantrasyon (A), sıcaklık x süre (B) ve konsantrasyon x süre (C) interaksyonları	95
Şekil 41. ABTS ^{•+} serbest radikali giderme aktivitesi için hazırlanmış standart grafik	96
Şekil 42. <i>A.niger</i> ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu ABTS ^{•+} metodu ile belirlenen antioksidan aktivite değerlerindeki sıcaklık x konsantrasyon (A), sıcaklık x süre (B) ve konsantrasyon x süre (C) interaksyonları	97
Şekil 43. <i>A.niger</i> ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu kuinik asit miktarındaki konsantrasyon x süre interaksyonu	101
Şekil 44. <i>A.niger</i> ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu fumarik asit miktarına etki eden sıcaklık x süre (A) ve konsantrasyon x süre (B) interaksyonları	105
Şekil 45. <i>A.niger</i> ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu kerasiyanin klorit miktarına etki eden sıcaklık x konsantrasyon (A), sıcaklık x süre (B) ve konsantrasyon x süre (C) interaksyonları.....	106
Şekil 46. <i>A.niger</i> ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu siyanidin-3-O-glikozit miktarına etki eden sıcaklık x konsantrasyon (A), sıcaklık x süre (B) ve konsantrasyon x süre (C) interaksyonları.....	107
Şekil 47. <i>A.niger</i> ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde	

1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu klorojenik asit miktarına etki eden sıcaklık x konsantrasyon (A), sıcaklık x süre (B) ve konsantrasyon x süre (C) interaksiyonları.....	108
Şekil 48. <i>A.niger</i> ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu hesperidin miktarına etki eden sıcaklık x süre (B) interaksiyonları	109
Şekil 49. <i>A.niger</i> ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu sinapik asit miktarına etki eden sıcaklık x konsantrasyon (A), sıcaklık x süre (B) ve konsantrasyon x süre (C) interaksiyonları.....	110
Şekil 50. <i>A.niger</i> ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu ferulik asit miktarına etki eden enzim konsantrasyonu x süre interaksiyonu	111
Şekil 51. <i>A.niger</i> ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu rosmarinik asit miktarına etki eden sıcaklık x konsantrasyon (A), konsantrasyon x süre (B) interaksiyonları.....	112
Şekil 52. <i>A.niger</i> ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu vanilin miktarına etki eden sıcaklık x konsantrasyon (A), konsantrasyon x süre (C) interaksiyonları.....	113
Şekil 53. <i>A.niger</i> ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu resveratrol miktarına etki eden sıcaklık x konsantrasyon (A) ve konsantrasyon x süre (B) interaksiyonları	114
Şekil 55. <i>A.niger</i> ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde e 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu naringin miktarına etki eden sıcaklık x konsantrasyon interaksiyonu.....	119
Şekil 56. <i>A.niger</i> ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde	

1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu naringin miktarına etki eden sıcaklık x süre interaksyonu	120
Şekil 57. <i>A.niger</i> ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu naringin miktarına etki eden konsantrasyon x süre interaksyonu	120
Şekil 58. <i>A.niger</i> ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin ilave edildiği 45 °C sıcaklıkta 5 saatlik inkübasyon sonucu naringin (A) ve naringenin (B) kromatogramı	121
Şekil 60. Probiyotik mikroorganizmaların farklı kombinasyonları ile inkübe edilen greyfurt sularının depolama süresi boyunca sıcaklık x mikoorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B), mikoorganizma suş x süre (C) interaksyonlarındaki SÇKM değişimi .	136
Şekil 61. Probiyotik mikroorganizmaların farklı kombinasyonları ile inkübe edilen greyfurt sularının depolama süresince pH değerindeki sıcaklık x mikoorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B), mikoorganizma suş x süre (C) interaksyonları	143
Şekil 62. Probiyotik mikroorganizmaların farklı kombinasyonları ile inkübe edilen greyfurt sularının depolama süresince titrasyon asitliği miktarındaki sıcaklık x mikoorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B), mikoorganizma suş x süre (C) interaksyonları	145
Şekil 63. Probiyotik mikroorganizmaların farklı kombinasyonları ile inkübe edilen greyfurt sularının depolama süresince renk koyuluğu (IC)'nin sıcaklık x mikoorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B), mikoorganizma suş x süre (C) interaksyonları ve renk tonunun sıcaklık x süre (D) interaksyonu	148
Şekil 64. Probiyotik mikroorganizmaların farklı kombinasyonları ile inkübe edilen greyfurt sularının depolama süresince renk yoğunluğundaki (IC') sıcaklık x mikoorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B), mikoorganizma suş x süre (C) interaksyonları	149
Şekil 65. Probiyotik mikroorganizmaların farklı kombinasyonları ile inkübe edilen greyfurt sularının depolama süresince kırmızı renk yoğunluğu (A), mavi renk yoğunluğu (B) ve sarı renk yoğunluğundaki (C) sıcaklık x süre interaksyonları	150
Şekil 66. Probiyotik mikroorganizmaların farklı kombinasyonları ile inkübe edilen greyfurt sularının depolama süresince TFM (mgGAE/L)'deki sıcaklık x mikoorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B), mikoorganizma suş x süre (C) interaksyonları	152
Şekil 67. Probiyotik mikroorganizmaların farklı kombinasyonları ile inkübe edilen greyfurt sularının depolama süresince antioksidan aktivitedeki (DPPH•) sıcaklık x	

mikoorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B), mikoorganizma suş x süre (C) interaksiyonları.....	155
Şekil 68. Probiyotik mikroorganizmaların farklı kombinasyonları ile inkübe edilen greyfurt sularının depolama süresince antioksidan aktivite deki (ABTS ⁺) sıcaklık x mikoorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B), mikoorganizma suş x süre (C) interaksiyonları.....	157
Şekil 69. Probiyotik mikroorganizmalar ve bunların kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde depolama süresince kuinik asit miktarındaki sıcaklık x mikoorganizma suşu (A), sıcaklık x süre (B) ve mikoorganizma suşu x süre (C) interaksiyonları	165
Şekil 70. Probiyotik mikroorganizmalar ve bunların kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerindeki depolama süresince fumarik asit miktarına etki eden sıcaklık x mikoorganizma suş (A) ve mikoorganizma suş x süre (C) interaksiyonları.....	167
Şekil 71. Probiyotik mikroorganizmalar ve bunların kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerindeki depolama süresince karasiyanin klorit miktarına etki eden sıcaklık x mikoorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B) ve mikoorganizma suş x süre (C) interaksiyonları.....	168
Şekil 72. Probiyotik mikroorganizmalar ve bunların kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık değerlerinde depolama süresince siyanidin-3-O-glikozit miktarına etki eden sıcaklık x mikoorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B) ve mikoorganizma suş x süre (C) interaksiyonları	169
Şekil 73. Probiyotik mikroorganizmalar ve bunların kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık değerlerinde depolama süresince klorojenik asit miktarına etki eden sıcaklık x mikoorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B) ve mikoorganizma suş x süre (C) interaksiyonları	171
Şekil 74. Probiyotik mikroorganizmalar ve bunların kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık değerlerinde depolama süresince hesperidin miktarındaki sıcaklık x mikoorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B) ve mikoorganizma suş x süre (C) interaksiyonları	172
Şekil 75. Probiyotik mikroorganizmalar ve bunların kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerindeki depolama süresince sinapik asit miktarına etki eden sıcaklık x mikoorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B) ve mikoorganizma suş x süre (C) interaksiyonları	173

- Şekil 76.** Probiyotik mikroorganizmalar ve bunların kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık değerlerinde depolama süresince ferulik asit miktarına etki eden sıcaklık x mikroorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B) ve mikroorganizma suş x süre (C) interaksyonları 174
- Şekil 77.** Probiyotik mikroorganizmalar ve bunların kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerindeki depolama süresince rosmarinik asit miktarına etki eden sıcaklık x mikroorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B) ve mikroorganizma suş x süre (C) interaksyonları 175
- Şekil 78.** Probiyotik mikroorganizmalar ve bunların kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerindeki depolama süresince vanilin miktarına etki eden sıcaklık x mikroorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B) ve mikroorganizma suş x süre (C) interaksyonları 176
- Şekil 79.** Probiyotik mikroorganizmalar ve bunların kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerindeki depolama süresince resveratrol miktarına etki eden sıcaklık x mikroorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B) ve mikroorganizma suş x süre (C) interaksyonları 177
- Şekil 80.** *L.plantarum* ACC 28 ilave edilmiş 37 °C’de 72 saat inkübe edilmiş probiyotik greyfurt suyu örneğinin fenolik profili kromatogramı (1: kuinik asit, 2: fumarik asit, 3: siyanidin-3-O-glikozit, 4: klorojenik asit, 5: kerasiyanin klorit, 6: hesperidin, 7: rosmarinik asit, 8: ferulik asit, 9: sinapik asit, 10: vanilin, 11: resveratrol) 177
- Şekil 81.** Probiyotik mikroorganizmalar ve bunların kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerindeki depolama süresince naringin miktarına etki eden sıcaklık x mikroorganizma suş interaksyonu 183
- Şekil 82.** Probiyotik mikroorganizmalar ve bunların kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerindeki depolama süresince naringin miktarına etki eden sıcaklık x süre interaksyonu 184
- Şekil 83.** Probiyotik mikroorganizmalar ve bunların kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerindeki depolama süresince naringenin miktarına etki eden süre x mikroorganizma suş interaksyonu 184
- Şekil 84.** *L.plantarum* 250 ilave edilen greyfurt suyunun 37 °C sıcaklıkta 72 saat depolama sonucu naringin (A) ve naringenin (B) kromatogramı..... 185

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

ABTS	2, 2'-azino-bis-(3-ethylenzthiazoline-6-sulfonic acid)
ANOVA	Analysis of variance
BHA	Butylated Hydroxyanisole
BHT	Butylated Hydroxytoluene
dk	Dakika
DNA	Deoksirübo Nükleik Asit
DPPH	2.2 Diphenyl 1 picrylhydrazyl
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E.Ü.	Enzim Ünitesi
F	İstatistiksel Önem Faktörü
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA	Food and Drug Administration
GC-MS	Gaz kromatografisi- Kütle spektrometresi
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GSH	Glutasyon
h	Saat
HPLC	High-performance liquid chromatography
kDa	Kilo dalton
kg	Kilogram
KM	Enzimin substrata ilgisini gösteren sabit
KO	Kareler Ortalaması
Kob	Koloni Oluşturan Birim
L	Litre
LAB	Laktik asit bakterileri
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografisi-Kütle /Kütle Spektrometresi
mg	Miligram
ml	Mililitre
o	Derece
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
R	Serbest Radikal

ROT	Reaktif Oksijen Türleri
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
SD	Standart deviasyon
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SOD	Süperoksit Dismutaz
TAK	Total Antioksidan Kapasitesi
TEMED	N,N,N',N'-tetrametietilendiamin
TFM	Toplam fenolik madde
TM	Erime sıcaklığı
Tris	Trihidroksimetil aminometan
USDA	United States Department of Agriculture UV Ultraviyole
UV	Ultraviyole
Vmax	Maksimum hız
WHO	World Health Organization
α	Alfa
β	Beta
μ l	Mikrolitre

GİRİŞ

Narenciye ya da turunçgiller olarak adlandırılan gıdalar; turunç, portakal, mandalina, greyfurt ve limon gibi ekonomik açıdan yüksek değere sahip olan *Citrus* cinsi meyve ağacı türlerini de içinde bulunduran bitki topluluğudur (Anonim, 2020). Narenciyenin ilk olarak nasıl farkedildiği hangi ülkede yetiştiği konusunda farklı hipotezler vardır. Genel olarak, narenciyenin Güneydoğu Asya'nın tropikal ve subtropikal bölgelerinde ilk olarak yetiştiği ve daha sonra diğer kıtalara yayıldığına inanılmaktadır (Webber 1967; Calabrese 1992). Narenciyenin nereden geldiği konusundaki belirsizlik bazı narenciye meyvelerinin çarpazlaşma ile elde edilmiş olmasından kaynaklanmaktadır. Bu durum türler arası melezleri içeren genotiplere sahip olduğu düşünülen; portakal, limon, greyfurt ve diğer türlerin sabit (arzu edilen) genotiplerinin üretilmesine yol açmıştır (Wu *et al.* 2018). Turunçgiller ve bileşimleri antioksidan ajanlar, böbrek taşı ve safra oluşumu ve anti-genotoksik etkiler gibi tıbbi amaçlar için yaygın olarak kullanılmaktadır (Patil, 2019).

Greyfurt, portakal ile tatlı bir pomelo arasında doğal çarpazlama ile meydana gelen hibrit bir türdür (Nicolosi *et al.* 2000; Anonim, 2020). Greyfurt dünyanın tropikal ve subtropikal bölgeleri boyunca 0-1800 m arasında değişen bir yükseklikte ve 13-35 °C arasında bir sıcaklıkta yetişebilmektedir (Baradas, 1994). USDA (2016) verilerine göre, 2015-2016 döneminde greyfurt üretiminin en yüksek olduğu ülkeler Çin, ABD, Meksika, Güney Afrika, Türkiye, İsrail'dir. Greyfurt üretimi, 2015-2016 yıllarında yaklaşık 6,4 milyon ton olarak gerçekleşerek dünya turunçgil üretiminde diğer turunçgiller içerisinde %7'lik pay almaktadır. Dünya greyfurt üretiminin önemli bir kısmını Çin (%68) gerçekleştirmektedir. Çin'den sonra ABD (%11) ve Meksika (%7) gelmektedir. Türkiye, 250 bin ton greyfurt üretimi ile 5. sıradadır (USDA, 2017). 2019 TÜİK verilerine göre ülkemizde greyfurt üretimi 249.185 bin ton olmuştur (Anonim, 2019).

Greyfurt meyvesinin kabuk kısmı, terpenler, seskiterpenler hidrokarbonlar, alkoller, aldehytler, esterler, oksitler ve diğer çeşitli bileşikler kapsayan yedi ana grupta sınıflandırılabilen çok sayıda bileşikten oluşmaktadır. Terpenler, kabuğun yaklaşık %80'ini oluşturan limonen, mirsen ve sitral en yaygın bileşiklerdir. Greyfurt suyu besleyici değere sahip olup, bununla ilgili az sayıda çalışma vardır. Greyfurt suyunun %36.5'e ulaşan yüksek uçucu yağ içeriğine %13.5 nem, % 8.5 lif ve % 4.1 diğer bileşiklere sahip olduğu, ayrıca lipidler, alkoller, yağ asitleri, tokoferol, flavonoidler, polifenoller ve aglikon limonoidleri içerdiği

bildirilmiştir. Yapılan bir araştırma, manuel ve endüstriyel olarak elde edilen greyfurt suyunun kimyasal bileşiminin benzer olmasına rağmen, bileşenlerinin miktarında farklılıklar olduğunu göstermiştir. Araştırmacılar greyfurt suyunda daha yüksek seviyelerde naringenin, hesperidin, neohesperidin, didimin, poncerin, limonin, askorbik ve sitrik asit seviyelerini bulurken, manuel olarak elde edilen meyve suyunda dihidroksibergamotin seviyesinin daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (Uckoo *et al.* 2012).

Turunçgil meyvelerinde bazı acılık bileşenleri de bulunmakta ve bu bileşenler turunçgil meyvelerinin meyve suyuna işlenmesine engel olmaktadır. Turunçgillere acılığını veren esas bileşikler, limonoid olarak bilinen “limonin” ve flavonon neohesperidosit olan “naringin” den oluşmaktadır. Turunçgillerden özellikle greyfurtta bulunan naringinden dolayı meyve suyu ekstraksiyonuna fazla basınç uygulanamamakta ve belli bir randıman düzeyinde tutulmaktadır. Bundan dolayı greyfurttan alınan randıman mevsimine göre %35-40 dolaylarında olmaktadır (Cemeroğlu, 2011). Acı algısına doğuştan gelen aşırı duyarlılık nedeniyle, bireylerin yaptıkları gıda seçimlerinde acı tat önemli bir rol oynamaktadır. Bu durum, tat algısındaki bireysel farklılıklara dikkat çekmektedir (Hayes *et al.* 2015). Bu nedendir ki meyve sularındaki acılık, bu ürünlerin lezzetini ve pazarlanabilirliğini olumsuz yönde etkilemektedir. Acı tat, gıdanın seçimini belirlemede önemli bir faktördür (Drewnowski and Gomez-Carneros, 2000). Özellikle greyfurttan elde edilen meyve sularının acılığı, meyve suyu endüstrisi için istenmeyen bir durumdur (Ribeiro, 2011). Suda çözünen naringin miktarının 20 µg/mL’nin üzerinde olması durumunda acı tat belirlenebilir. Fakat greyfurt sularında acılık naringin konsantrasyonu 300-400 µg/mL’den daha yüksek konsantrasyonlarda belirlenebilmektedir (Soares and Hotchkiss, 1988). Greyfurt suyunda naringin konsantrasyonu düşük olmasına rağmen, tüketicilere belirgin bir acı tat vermektedir (Ribeiro, 2011).

Meyve suyu prosesinde acılığı gidermek için fizikokimyasal ve biyoteknolojik yöntemler kullanılmaktadır (Puri and Banerjee, 2000; Cemeroğlu, 2011). Meyve suyu endüstrisinde adsorbent olarak; adsorpsiyon veya iyon değiştirme özelliği olan birçok farklı materyal kullanılmaktadır. Bunların başlıcaları; kömür ve kömür türevleri, PVPP (Polivinilpolipirrolidon), poliamidler ve çeşitli reçinelerdir. İyon değiştirici reçineler, kolay bir şekilde rejenere olabilmektedir, ancak meyve sularının mineral kompozisyonunu değiştirdiklerinden dolayı bu alanda kullanılmaları yasaklanmıştır. Reçinelerin kullanımında meyve suyu bileşiminde az da olsa bir değişim söz konusu olabilmektedir. Klasik proseslerin çoğunda fizikokimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Fakat bu yöntemler birçok dezavantaja sahiptir. Bunlar;

- Kullanılan materyalden meyve suyuna bir bulaşık olma durumu söz konusu olabilmektedir,
- Yöntemler kesikli sistem olduğundan dolayı zaman kaybı olmakta ve beraberinde verim düşebilmektedir,
- Fiziksel ve kimyasal adsorbsiyon sırasında meyve suyunun kimyasal yapısı değişebilmekte, tat, renk ve besin kaybı söz konusu olabilmektedir (Puri and Banerjee, 2000; Puri *et al.* 2010b).

Bu yüzden alternatif yöntem olarak enzim kullanımı üzerine araştırmalar yapılmıştır (de Araújo *et al.* 2013; Ko *et al.* 2013; Xu *et al.* 2013; İmamoğlu ve Gökçe, 2017). Gıda endüstrisinde enzimin diğer katalizörlere tercih edilmesinin sebepleri;

- İstenen reaksiyon, enzimlerle daha iyi sonuç verebilmektedir,
- Reaksiyon hızı; sıcaklık, pH, süre gibi parametrelerle kolaylıkla kontrol edilebilir,
- Enzim faaliyeti sıcaklık derecesi ile inaktive edilebilir,
- Enzimler doğal kaynaklardan elde edildikleri ve toksik olmadıkları için gıdalarda rahatlıkla kullanılabilir,
- Diğer katalizörlerle karşılaştırıldığında, enzimler spesifik özellikte olduklarından aktivitelerinin standardizasyonu kolaydır (Gürses, 1977; Uçan ve Akyıldız, 2012; Gao *et al.* 2014).

Enzimler, canlı organizmalarda tüm reaksiyonların fazla enerji gerektirmeden uygun koşullar altında hızlı bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan ve bu reaksiyonları koordine eden protein yapılı spesifik biyokatalizörlerdir. Canlı hücrelerde miktar olarak az bulunmalarına rağmen enzimler, birçok önemli reaksiyonda görev alırlar. Enzimlerin az bir kısmı hücre stoplazmasında serbest halde bulunurken, birçoğu hücre içi membranlarına veya hücre duvarına bağlı olarak bulunurlar (Cemeroğlu, 2011; İmamoğlu ve Gökçe, 2017). Endüstriyel enzimoloji modern biyoteknolojinin önemli bir alanı olup, gıda, kimya ve ilaç endüstrilerinin yoğun bir şekilde kullanımı için çalışmalar söz konusudur. Mevcut araştırmalar, mikroorganizmaların farklı verimlerde enzim üreten yüksek performanslı suşlarını bulmayı amaçlamaktadır (Borzova *et al.* 2018). Gıda işleme sırasında meydana gelen olumsuzlukları bertaraf etmek için üretim esnasında yardımcı maddeler olarak da kullanılan birçok enzim vardır. Gıda sanayinin birçok dalında olduğu gibi meyve suyu sanayinde de enzim kullanımı giderek artmaktadır. Son zamanlarda turunçgil sularında acılığın giderilmesi için enzim kullanımı yaygınlaşmıştır (Cemeroğlu, 2011). Bu amaçla, meyve suyu endüstrisinde naringinin, naringinaz enzimi ile parçalanması yoluna gidilmektedir (Puri and Banerjee, 2000; Puri *et al.* 2010b).

Naringinaz enzimi (EC 3.2.1.40) kullanılarak naringin, enzimatik hidroliz yoluyla işlenmiş ürünlerden uzaklaştırılmakta veya indirgenmektedir. Bu endüstriyel uygulamalar için son derece umut verici bir tekniktir (Habelt and Pittner, 1983; Puri and Banerjee, 2000; Chien *et al.* 2001; Ribeiro, 2011;Puri, 2012). Naringinaz, naringin, kuersetin, hesperidin gibi birçok glikozidi hidrolize edebilmektedir (Gattuso *et al.* 2007;Vila-Real *et al.* 2010).

Naringinaz, α -l-ramnosidaz (EC 3.2.1.40) ve β -D-glikozidaz (EC 3.2.1.21) enzimlerinin birlikte aktivite gösterdiği bir enzim kompleksi olup yapısındaki enzimlerin ayrı ayrı veya birlikte aktivite göstermesiyle tıp ve gıda alanında kullanılmaktadır (Barker *et al.* 1965; Habelt and Pittner, 1983; Elujoba and Hardman, 1987; Cheetham and Quail, 1991; Caldini *et al.* 1994; Puri and Banerjee, 2000; Yu *et al.* 2002; Manzanares *et al.* 2003;Erlund, 2004; González-Barrio *et al.* 2004; Busto *et al.* 2007; Chang *et al.* 2011; Puri, 2012). Naringin, naringinazın α -l-rhamnosidaz aktivitesi ile ramnoza ve prunin hidrolize edilebilmektedir. Daha sonra β -D-glikozidaz, prunini hidrolize ederek glikoza ve naringenine katalize etmektedir (Puri and Banerjee, 2000; Chang *et al.* 2011; Puri, 2012). Yani naringinaz enzimi ilavesiyle bir flavonoid olan naringin, iki aşamalı bir reaksiyon ile öncelikle α -L-ramnosidaz tarafından prunin'e parçalanmış bir şeker kompleksi naringin (4,5,7-trihidroksiflavonon 7-ramnoglikozit) üzerinde etkili olurken, β -D-glikozidaz, tatsız bir bileşik olan naringenin (4,5,7-trihidroksi-flavonon) üretmek için prunin üzerinde etki etmektedir (Borzova *et al.* 2018; Patil *et al.*2019).

Naringinaz uygulaması, ürünün sağlık üzerine olumlu özelliklerini korurken organoleptik özelliklerini arttırdığı için umut verici bir yöntemdir (Puri, 2012). Naringinazın hidrolize ürünlerinin sağlık üzerine faydalı etkilerinden dolayı, bu enzimden farmasötik, kozmetik ve gıda uygulamalarında da yararlanılabilmektedir (Busto *et al.* 2007). Naringenin son parçalanmış ürünü olan naringenin, naringenin acılığının yalnızca üçte birine sahip olup, gıda ve ilaç endüstrisinde, antioksidan, antitrombotik ve vazodilatör aktiviteleri gibi potansiyel antikanser ve diğer antiaterojenik etkiler göstermektedir (Puri and Banerjee, 2000; Borzova *et al.* 2018). Naringin hidrolizinde ara bileşik olan prunin'in diyabet hastalığında tatlandırıcı bir madde olarak potansiyel bir kullanımı olduğu ve antiviral, antiinflamatuvar aktivite, hipoglisemik etki ve hipokolesterolemik etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Choi, *et al.* 1991; Jeon *et al.* 2004). Aynı zamanda naringinazı oluşturan enzimlerden α -L-ramnosidaz, steroidlerin biyotransformasyonunda, ramnoz ve antibiyotiklerin hazırlanmasında ve prunin ve ginsenosidlerin üretiminde kullanılabilmektedir (Borzova *et al.*2018).

Naringinaz ayrıca, hesperidin'in hidrolize edilmesi (Manzanares *et al.* 1997), şarap ve çayın aromatik yoğunluğunun artırılması (Caldini *et al.* 1994), flavonoidlerin modifiye edilmesinde de (Rye and Withers 2000; Kren and Martinkova, 2001) kullanılmaktadır.

Mikroorganizmalar naringinaz enziminin ana kaynağıdır. Bununla beraber naringinazın, kereviz tohumu (Hall, 1938) ve greyfurt yaprakları (Thomas *et al.* 1958) gibi bitki kaynaklarından izole edilebildiği belirtilmiştir. Fakat mikrobiyal kaynaklı naringinaz aktivitesinin daha yüksek ve endüstriyel olarak uygulanabilir olduğu bildirilmiştir. Naringinaz üretiminde, asıl olarak birçok filamentöz küf (*Aspergillus*, *Circinella*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus* ve *Trichoderma*) kullanılması ile ilgili çalışmalar olmasının yanı sıra çoğu mikroorganizma tarafından üretimi araştırılmıştır (Puri, 2012). Bunlar arasında *Lasiodiplodia theobromae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus usamii*, *Aspergillus flavus*, *Cochiobolus miyabeanus*, *Coniothyrium diplodiella*, *Penicillium decumbens*, *Rhizoctonia solani* ve *Rhizopus nigricans* gibi birçok küfün naringinaz üretiminde kullanıldığı bilinmektedir (Ribeiro, 2011; Puri, 2012). Bunun yanı sıra bakteriler üzerine yapılmış sınırlı çalışmalar mevcut olup *Bacillus sp.* (Hashimoto *et al.* 2003), *Burkholderia cenocepacia* (Cardona *et al.* 2006), *Clostridium stercorarium* (Zverlov *et al.* 2000), *Lactobacillus acidophilus* (Beekwilder *et al.* 2009), *S. paucimobilis* (Hashimoto and Murata 1998), *Thermomicrobium roseum* (Jang and Kim 1996) ve *Bacillus amyloliquefaciens* 11568 (Zhu *et al.* 2017) çalışılan bakteriler arasındadır. *Sacchromyces cerevisiae*, *Hanshula anomala* ve *Debaryomyces polimorfu* gibi bazı mayalar üzerine çalışmalar, düşük düzeyde α -L-ramnosidaz aktivitesi olduğunu göstermiştir (McMahon *et al.* 1999). Maya suşları üzerinde yapılan diğer araştırmalarda da, düşük ramnosidaz aktivitesi tespit edildiği bildirilmiştir (Rodriguez *et al.* 2004). Bunun yanı sıra *Pichia angusta* X 349, α -L-ramnosidazın dikkate değer bir aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Yanai and Sato 2000). Naringinaz üretimi için kullanılan mikroorganizmalar daha detaylı bir şekilde kuramsal temeller bölümünde tablo halinde verilmiştir.

Yukarıda belirtilen mikroorganizmalar arasında naringinaz üretimi için *Aspergillus niger* fermantasyonu, endüstriyel olarak daha fazla üretim potansiyeli göstermektedir. Bu mikroorganizma, gıda sanayinde kullanılan enzimler (amilaz, pektinaz, proteinaz), gıda katkı maddeleri (sitrik asit) ve geleneksel fermente gıdalar açısından FDA'nın onaylı mikrobiyal kategorisinde listelenmiştir. Ayrıca, bu mikroorganizmanın üretilmesi işleminin endüstriyel uygulama için ölçeklendirilmesi kolay olup, geliştirilme parametreleri optimize edilerek naringinaz verimini arttırmak mümkündür (Puri *et al.* 2005).

Greyfurt meyvesinden meyve suyu üretilmesi, meyvedeki acılık bileşenlerinden naringinin varlığı sebebiyle oldukça sınırlıdır. Yapılan literatür taramasında turunçgil sularındaki acılığın giderilmesinde naringinaz enzimi uygulaması ile ilgili sınırlı sayıda araştırma yapıldığı, *Aspergillus niger*'in yüksek naringinaz enzim verimini sağladığı;

probiyotik *Lactobacillus* türlerinin meyve suyuna katılarak naringinaz aktivitesi konusunda yalnızca bir çalışma (Tran *et al.* 2020) yapıldığı belirlenmiştir. Bu sebeplerle planlanan bu araştırmada greyfurt suyu üretiminde önemli bir problem olan acılığın giderilmesinde uygulanmak amacıyla, *Aspergillus niger* ATCC 1688'den naringinaz enzimi üretim ve saflaştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla üretilen naringinaz enzimi greyfurt suyuna farklı konsantrasyonlarda (%1.0, 0.5 ve 0.1) ilave edilerek, farklı sıcaklıklarda (25, 35, 45 °C) ve farklı inkübasyon süreleri (1ve 5 saat) sonunda meyve suyunun naringin miktarı, fiziksel ve fizikokimyasal özelliklerinde meydana gelen değişimler araştırılmıştır. Aynı zamanda materyal ve metot kısmında belirtilen probiyotik *Lactobacillus* türlerinin, tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının eklendiği greyfurt suyunda, belirlenen depolama süresi (4 hafta) içerisinde belli aralıklarla greyfurt suyundaki naringin miktarı, bazı fiziksel ve fizikokimyasal değişimler analiz edilmiştir.

Ülkemizde mikroorganizmalardan naringinaz enzimi üretimi ile ilgili herhangi bir araştırma yapılmadığı için bu çalışmayla mikroorganizmadan naringinaz enzimi üretilmesi, *Aspergillus niger*'den farklı mikroorganizmalardan naringinaz aktivitesi tespit edilerek, daha fazla kaynak oluşturulması, ülkemizin turuncu suyu endüstrisine katkıda bulunulması, bu enzimin ülkemizde üretilerek dışa bağımlılığın giderilmesi, bu konuda harcanacak dövizin ülkemizde kalması ve böylece ülkemiz ekonomisine katkı sağlanması amaçlanmaktadır. Aynı zamanda hem probiyotik meyve suyu üretimi hem de acılık bileşeni olan naringin miktarının azaltılması ile ilgili literatüre katkı sağlaması hedeflenmektedir.

Daha önce bu çalışmada kullanılan *Lactobacillus* türleri ve üçlü kombinasyonlarının ve ayrıca *Aspergillus niger* ATCC 1688 suşundan elde edilen naringinaz enziminin greyfurt suyuna katılarak naringin miktarındaki azalma üzerine etkisinin incelenmesi ve besin değerlerinin araştırılması konusunda geniş kapsamlı bir çalışma yapılmadığı için, planlanan araştırmanın bu konuda ilk çalışma olması sebebiyle bilime katkı sağlaması hedeflenmektedir.

KURAMSAL TEMELLER

Enzimlerin Genel Özellikleri ve Kimyasal Yapıları

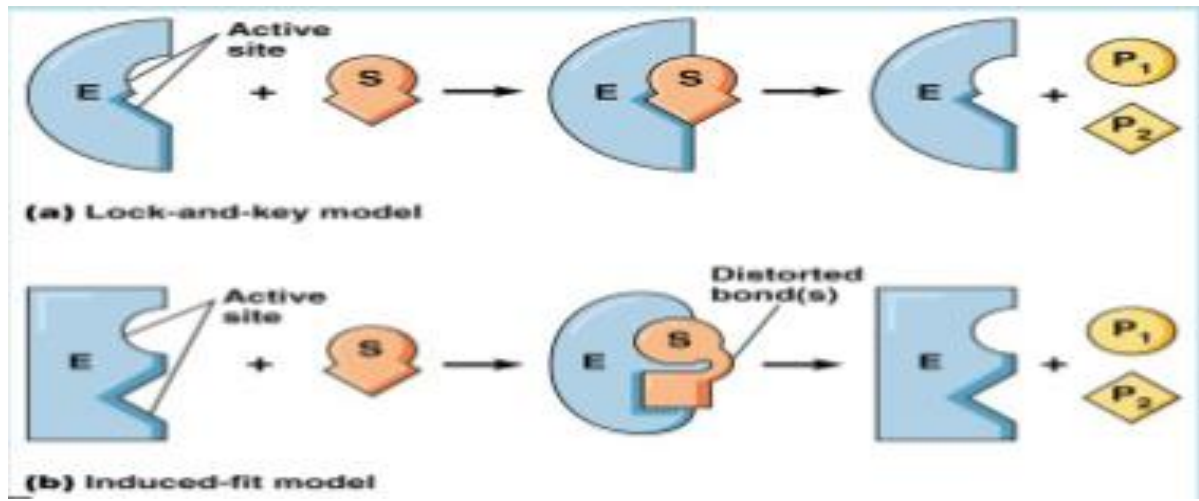
Enzimler; tüm reaksiyonların fazla enerji gerektirmeden uygun koşullar altında hızlı bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan ve bu reaksiyonları koordine eden protein yapılı spesifik biyokatalizörlerdir. Bitki, hayvan ve mikroorganizmaların canlı hücreleri tarafından sentezlenen enzimlerin az bir kısmı hücre stoplazmasında serbest halde bulunurken, birçoğu hücre içi membranlarına veya hücre duvarına bağlı olarak bulunurlar. Bu yüzden enzimler hücre içi ve hücre dışı aktivite gösteren enzim olarak ikiye ayrılmaktadır. Aktivitelerini hücre içinde gerçekleştiren enzimler, intraselüler (hücre içi) enzim olarak adlandırılmaktadır. Hücre içinde sentezlendikten sonra hücre dışına salınıp, burada aktivite gösteren veya serbest halde bulunan enzimlere ise ekstraselüler (hücre dışı) enzim denir. Enzimler, canlı hücrelerde az miktarlarda bulunmalarına rağmen, birçok önemli reaksiyonda görev almaktadırlar. Canlı organizmadaki biyodönüşümler, sentez ve katabolizma ile ilgili tüm reaksiyonlar, enzimlerin katalitik aktivitesi ile meydana gelmektedir (Saldamlı, 1998).

Enzimler, birçok bağ ve interaksiyonlarla bir arada tutulan aminoasit zinciri veya zincirlerinden oluşan protein yapılı yüksek moleküllü bileşiklerdir. Enzimlerin yapısında yüzlerce aminoasit bulunmasına rağmen, aktivitelerini yapısında bulunan sadece 10-12 aminoasidin oluşturduğu “aktif bölge” denilen kısma borçludurlar. Aktif bölge substratın enzime bağlandığı bölgedir ve aktivite görülmesi için bu bölgeyi oluşturan amino asitlerin uygun zincir yapısında dizilmeleri gerekmektedir. Bu durum enzimin aktif bölgesi dışında kalan büyük kısmın kendine has eğilip bükülmesi ve kıvrılmaları sonucu özel bir konformasyon almasıyla mümkün olmaktadır. Her enzimin normal sıcaklık ve pH değerlerinde sahip olduğu konformasyona “doğal form” denir. Enzimler sadece bir polipeptit zinciri ve bir tane aktif bölgeye sahip olan monomerler halinde bulunabilecekleri gibi birden fazla monomerin özel bağlarla bir araya gelmesiyle oluşan ve birden fazla aktif bölgeye sahip oligomerler halinde de bulunabilmektedirler. Bu oligomerler, benzer yapıdaki monomerler veya farklı yapıdaki monomerlerden oluşabilmektedirler. Bazı enzimlerin kimyasal reaksiyonları katalize edebilmeleri için yalnızca aktif bölgeleri yeterliyken birçok enzim koenzim, prostetik grup ve inorganik gibi “kofaktör” olarak adlandırılan bileşiklere ihtiyaç duymaktadır. Koenzim, enzim yapısına çok sıkı bağlı değildir ve kolayca ayrılabilir. Bunun aksine prostetik grup, enzime oldukça güçlü kovalent bağlarla bağlanmaktadır. İnorganik iyonlar ise enzim yapısına

bağlı olarak işlev görebildikleri gibi ortamda serbest halde de işlevlerini yerine getirebilmektedirler (Cemeroğlu, 2011).

Enzimlerin katalize ettiği reaksiyonlarda, reaksiyonun başında etki ettikleri ana madde ve madde gruplarına substrat denir. Enzimatik bir reaksiyonun gerçekleşmesini tanımlayan başlıca iki model vardır. Bu modeller;

- a. 1894 yılında Emil Fischer tarafından belirlenen, enzim ve substrat arasında anahtar-kilit düzeninde bir çalışma tanımlayan geleneksel model (lock and key model).
- b. 1958 Daniel Koshland tarafından ileri sürülmüş olan, enzim ve substratın birleşmesinin ardından geri dönüşümlü bir değişim geçirdiği model (induced fit model)



Şekil 1. Enzimatik reaksiyonun gerçekleşmesini sağlayan lock and key modeli (a) ve induced fit modeli (b)

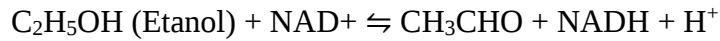
Enzimler substrata ve reaksiyona özgü olup, spesifikliğini yapılarında bulunan aktif bölge belirlemektedir. Tüm katalizörlerde olduğu gibi enzimler de tepkimenin daha hızlı bir şekilde gerçekleşmesini sağlamak için, reaksiyonun gerçekleşmesinde gerekli olan aktivasyon enerjisini düşürmektedir. Bu katalitik güçleri ve spesifik olmaları, enzimlerin en önemli iki özelliğidir (Whitehurst and Oort, 2010).

Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması

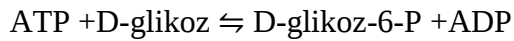
Enzimlerin varlığının tespit edildiği ilk zamanlarda rastgele bir adlandırma yapılmıştır. İlk adlandırılan enzim hidrojen peroksitin su ve oksijene parçalanmasını sağlayan katalazdır. Katalaz ismi, katalizör kelimesinin kök kısmına “az” eki getirilerek konulmuştur. İkinci isimlendirilen enzim diyastaz olup, bu enzim, ayırma anlamına gelen ve Yunanca bir kelime olan “dyastasis”den türemiştir. Üçüncü olarak adlandırılan enzim ise peroksidazdır. Bu adlandırmada enzimin etki ettiği substrat olan peroksit dikkate alınmıştır. Daha sonra birçok

enzim keşfedilmiş olup bu enzimlerin sistematik olarak adlandırılmaları ve sınıflandırılmaları ihtiyacı doğmuştur. Bu sebeple, Uluslararası Biyokimya Birliği (International Union of Biochemistry) Enzim Komisyonu (EC)'nin belirlediği prensiplere göre enzimler, genellikle etki ettikleri substrata veya reaksiyonun türüne göre adlandırılmaktadır. Örneğin; proteaz, izomeraz, laktaz, amilaz gibi enzim aktivitesini belirten kelimenin köküne veya sonuna “az” eki eklenerek adlandırılma yapılmıştır (Saldamlı, 1998). Fakat bunun yanısıra pepsin, rennin ve tripsin gibi enzimler de bu kurala istisna teşkil etmektedirler (Whitehurst and Oort, 2010). Uluslararası adlandırılıp- numaralandırılma sistemi zamanla değişmekte ve yenilenmektedir (Cemeroğlu, 2011). Enzimler katalizledikleri kimyasal reaksiyonun türüne bağlı olarak altı grupta sınıflandırılmaktadırlar. Bunlar,

Oksidoredüktazlar: Bu enzim grupları oksidasyon-redüksiyon tepkimelerini sağlayan enzimlerdir. Bu grupta yer alan “dehidrogenazlar” olarak adlandırılan alt gruplar, hidrojen transferiyle substratın dehidrasyonunu sağlamaktadırlar. Diğer bir grup olan “oksidazlar” ise, substratın oksidasyonunu sağlayarak reaksiyon oluşturmaktadır. Gıdalarda önemli tepkimeleri sağlayan oksidoredüktaz grubundaki enzimler; peroksidaz, katalaz, lipoksigenaz ve polifenol oksidazdır (Cemeroğlu, 2011). Organizma da karbonhidrat, protein ve yağlar enzimlerin etkisiyle kolaylıkla parçalanabilmektedirler. Aşağıda verilen hidrojen akseptörü olan nikotinamid adenin dinükleotit (NAD) ve etanolün girdiği tepkime reaksiyonu, etanol dehidrogenaz tarafından katalize edilmektedir (Saldamlı, 1998).



Transferazlar: Radikallerin veya fonksiyonel grupların transfer tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir. Başka bir ifadeyle; metil, amino ve fosfat gibi fonksiyonel olan birçok grubun bir molekülden diğer moleküle transferini sağlayan enzimlerdir. Buna örnek olarak fosforil transferaz, transaminaz, deaminaz ve fosfomutaz gösterilebilmektedir (Cufadar vd., 2007). Aşağıda örnek olarak verilen reaksiyonda glikokinaz enzimi, glikoz molekülüne ATP'den bir fosfat grubu transfer edilme reaksiyonunu katalize etmektedir (Bilişli, 2012).

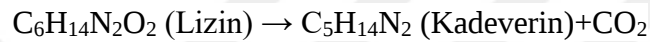


Hidrolazlar: Etki ettiği substratın yapısına göre (protein ve yağ vb.) ester, eter, peptid vb bağlarla hidrolitik parçalanmayı sağlamaktadır. Bu enzim grubunda C-N, C-O ve C-C bağları katalize edilmektedir. Bu grup enzimler esterazlar, karbonhidrazlar, amidazlar ve proteinazlar olarak değişik alt gruplara ayrılmaktadır. Meyve ve sebze işleme teknolojisinde önemli olan birçok enzim bu grupta yer almaktadır (Cemeroğlu, 2011). Aşağıdaki belirtilen birinci reaksiyonda üreaz, ürenin hidrolitik parçalanmasını katalize etmektedir. İkinci

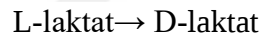
reaksiyonda ise laktaz, laktozun parçalanmasını katalize ederek galaktoz ve glikoz oluşumunu sağlamaktadır (Bilişli, 2012).

1. $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}_2$ (Üre) + $\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{NH}_3 + \text{CO}_2$
2. $\text{Laktoz} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \beta\text{-D-galaktoz} + \alpha\text{-D-glikoz}$

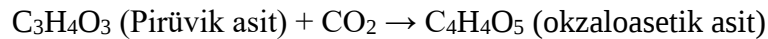
Liyazlar: Substrattan bazı grupları mekanik olmayan mekanizmalarla katalize etmektedir (Cemeroğlu, 2011). Yani bu enzimler C-O, C-C, C-N gibi bağların hidroliz veya oksidasyonundan farklı olarak parçalanması ve bu atomlar arasında çift bağ oluşmasını sağlamaktadırlar. Örneğin alışlagelmiş adlarıyla aldozlar, substrattan bir aldehit, dehidratazlar bir su molekülü ve dekarboksilazlar ise bir CO_2 'in ayrılmasını katalizlemektedir (Saldamlı, 1998). Aşağıda verilen reaksiyonda lizin dekarboksilaz enzimi lizin amino asitini kadeverin ve karbondioksite parçalanmasını sağlamaktadır (Bilişli, 2012).



İzomerazlar: Bu enzimler substratların izomerizasyonunu (molekülde geometrik veya yapısal yeni bir düzenleme) sağlamaktadır (Cemeroğlu, 2011). Bu gruptaki enzimler gerçekleştirdikleri izomerasyona göre adlandırılırlar. Bu gruptaki enzimlere, raseminaz, epimeraz, cis-trans izomeraz, sikloizomerazlar ve mutazlar örnek olarak verilebilmektedir. Aşağıda verilen reaksiyonda dönüşümü katalizleyen enzim laktat rasemazdır (Saldamlı, 1998).



Ligazlar: ATP veya diğer fosfat grupların pirofosfat bağlarının parçalandıktan sonra iki molekül arasında yeni bağların oluşup daha büyük bir molekül meydana gelmesi için metabolitlerin bağlanmasını katalize etmektedir (Saldamlı, 1998). Aşağıda verilen reaksiyonda pürivatkarboksilaz, pirüvik asitten okzaloasetik asit meydana gelmesini katalizlemektedir (Metin, 2012).



Enzim Kinetiği

Enzim kinetiği, ilk defa 1913 yılında Michaelis ve Menten tarafından açığa kavuşturulmuştur. Buna göre enzimatik reaksiyonun gerçekleşmesi için bir ES (enzim-substrat) aşağıdaki gibi meydana gelmektedir.



E₁: Ortamdaki serbest enzim

S: Substrat

ES: Enzim substrat kompleksi

P: Ürün

E: Ortamdaki Toplam enzim

k_1, k_2, k_3 : Hız sabitleri

Yukarıda belirtilen reaksiyonda $P + E$ oluşumu tersinir bir olaydır. Fakat $P + E$ 'den ES oluşumu çok düşük bir düzeyde olduğu için ihmal edilmiştir (Cemeroğlu, 2011).

Michaels-Menten hız eşitliği

Enzimin katalize ettiği reaksiyonların hızını belirleyen faktörler enzim kinetiği ile incelenmektedir. Reaksiyon hızı (V), enzimin katalizörlüğünde birim zamanda azalan substrat miktarı veya üretilen ürünün miktarının ölçülmesi ile belirlenmektedir. Enzimin moleküler aktivitesi ise uygun reaksiyon şartlarında, bir molekül enzimin katalizörlüğünde dakikada ürüne dönüşebilen substrat miktarını ifade etmektedir. Bir mg protein başına düşen enzim birim sayısı spesifik enzim aktivitesini göstermektedir. Optimum şartlarda, bir μmol substratın bir dakikada ürüne dönüşümünü katalizleyen enzim miktarı enzim birimi (unit) (EU) değerini vermektedir.

Hiperbolik bir eğri denklemi olan Michaels-Menten hız eşitliği aşağıdaki gibi formüle edilmiştir.

$$V = \frac{V_m (S)}{K_m + (S)}$$

Michaelis-Menten hız eşitliği denklemi kurulurken;

- Enzim konsantrasyonun $[E]$ Substrat konsantrasyonu $[S]$ 'dan çok daha azdır. Böylece belli bir zaman diliminde enzime bağlı substrat miktarı ihmal edilebilmektedir.
- Denge durumundayken reaksiyondaki ES kompleksinin meydana gelmesi ve parçalanma sürecinde sahip oldukları hızların birbirine eşit olduğu varsayımları göz önünde bulundurulmuştur.

$$ES \text{ oluşum hızı} = k_1[E][S]$$

$$ES \text{ parçalanma hızı} = (k_2+k_3)[ES] \text{ şeklinde ifade edilecek olursa;}$$

Denge durumundaki reaksiyonda; ES oluşma hızı, ES parçalanma hızına eşit olmaktadır. Yukarıda belirtilen denklem yerine koyulduğu zaman; K_m (Michaels-Menten sabiti) değeri belirlenebilmektedir.

$$k_1 [E][S] = [k_1+k_3][ES]$$

$$[ES] = \frac{[E][S]}{(k_1 + k_2)/k_3}$$

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

Belirlenen K_m değeri, bir enzime ve bu enzimin etki ettiği substratına spesifik olmaktadır. Bu değer enzimin substratına afinitesini (ilgisini) göstermekte olup, enzim-substrat ilişkisinde bir ölçü olarak kullanılmaktadır. Enzimin K_m 'sinin düşük olması demek, bu enzimin substratına yüksek afinite gösterdiği anlamına gelmektedir. Aksi durumda ise, K_m değerinin büyük olması, enzimin substratına afinitesinin düşük olduğunu göstermektedir. Enzimlerin birçoğu için K_m 10^{-3} - 10^{-5} mol/L değerleri arasında değişkenlik göstermektedir (Saldamlı, 1998).

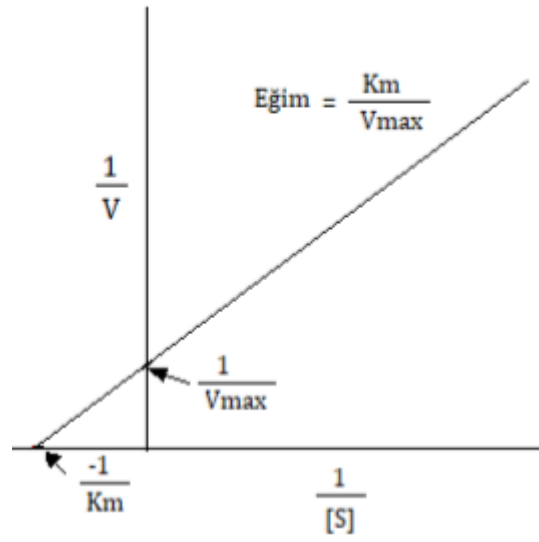
Lineweaver-Burk ve Eadie-Hofstee hız eşitliği

Michaels-Menten hız eşitliği hiperbolik bir eğri denklemdir. Enzimatik reaksiyonlardaki K_m ve V_{max} değerlerinin kesin ve doğru bir şekilde belirlenebilmesi için bir doğru denklemi üzerine kurulması gerekmektedir. Bunun için yukarıda belirtilen Michaels-Menten hiperbolik hız denkleminin bir doğru denklemine dönüşmesi sağlanabilmektedir. Lineweaver-Burk hız eşitliğini elde etmek için Michaels-Menten hız eşitliği ters çevrilip daha sonra faktörlerine ayrılır.

Lineweaver-Burk hız eşitliğini elde etmek Michaels-Menten hız eşitliği ters çevrildiğinde;

$$\begin{aligned}\frac{1}{V} &= \frac{K_m + [S]}{V_m[S]} \\ \frac{1}{V} &= \frac{K_m}{V_m[S]} + \frac{[S]}{V_m[S]} \\ \frac{1}{V} &= \frac{K_m}{V_m[S]} + \frac{1}{V_m}\end{aligned}$$

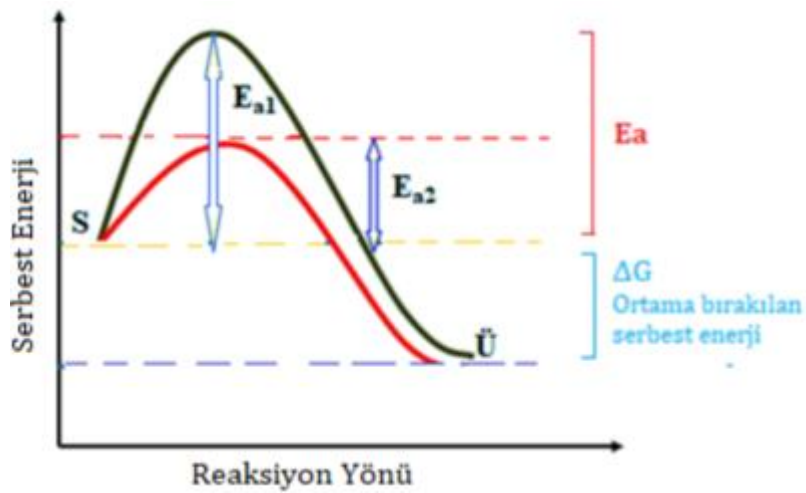
Şeklinde yazılabilen eşitlik bir doğru denklemdir ($y=ax+b$ gibi) $1/V$ 'ler $1/S$ 'e karşı grafik oluşturulduğunda Şekil 2'de belirtildiği gibi V_m ve K_m değerlerini belirlemek mümkün olacaktır. Doğrunun x eksenini kestiği nokta $1/V_m$ y eksenini kestiği nokta ise $-1/K_m$ 'yi verir.



Şekil 2. Lineweaver-Burk hız grafiği

Aktivasyon enerjisi (E_a), kimyasal bir tepkimenin meydana gelebilmesi için aşılması gereken enerji değeridir. İlk kez 1889 yılında ortaya atılan bu terim, Svante Arrhenius tarafından kullanılmıştır. Enzim aktivitesi denilince enzimin etki ettiği reaksiyonu ne kadar hızlandığı anlaşılmaktadır. Kimyasal tepkimelerin hepsi kendine özgü bir aktivasyon enerjisine sahiptir. Enzimler reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonun hızını artırırlar, yönünü değiştirmezler.

Şekil 3’de bir enzimatik reaksiyonuna ait serbest enerji diyagramı gösterilmiştir. Enzim varlığında gerçekleşen reaksiyona ait aktivasyon enerjisinin, enzim yokluğunda gerçekleştirilen reaksiyonun sahip olduğu aktivasyon enerjisinden daha düşük olduğu şekilde görülmektedir (Saldamlı, 1998).



Şekil 3. Ortamda bulunan enzim ile gerçekleşen reaksiyonun serbest enerji diyagramı

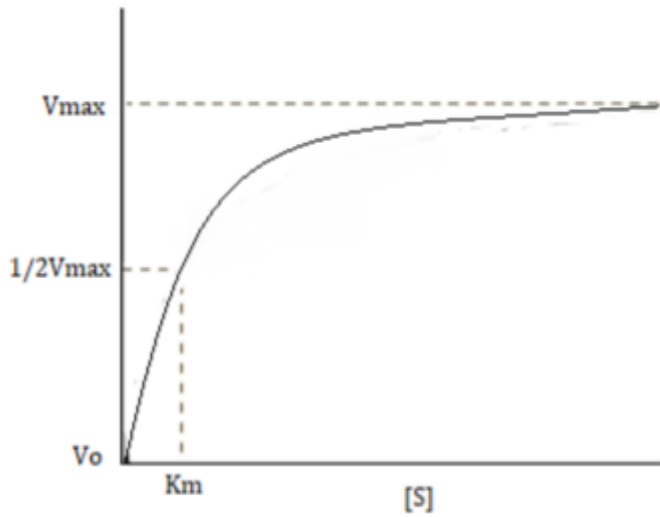
E_a : Aktivasyon enerjisi,
 E_{a1} : Reaksiyonun enzim yokluğundaki aktivasyon enerjisi,
 E_{a2} : Reaksiyonun enzim varlığındaki aktivasyon enerjisini
 ΔG : Ortamdaki serbest enerji

Enzim Aktivitesine Etki Eden Faktörler

Enzim aktivitesi birçok faktörden etkilenmektedir. Bu faktörler; enzim ve substrat konsantrasyonu, sıcaklık, pH, su aktivitesi, reaksiyon süresi, koenzim ve kofaktör konsantrasyonları, inhibitörler ve aktivatörler, basınç gibi fiziksel etkenler ve bunların yanı sıra bazı hormonlar şeklinde sıralanabilmektedir (Whitehurst and Oort, 2010). Reaksiyon hızı bu faktörlerin hepsinden farklı derecelerde etkilenmektedir. Fakat bu faktörlerin kendi aralarındaki etkileşimi de reaksiyon hızına etki edebilmektedir. Örneğin en iyi pH derecesindeki enzim farklı sıcaklıkta aynı etkiyi göstermeyebilir. Bu sebeple enzimatik reaksiyonlarda ortam koşullarını bütün halde göz önünde bulundurmak gerekmektedir. Enzim aktivitesini etkileyen bazı faktörler aşağıda belirtilmektedir (Saldamlı, 1998).

Substrat konsantrasyonu

Enzim konsantrasyonu ile birlikte diğer tüm faktörler standart düzeyde tutulduğunda substrat miktarının artmasıyla enzim hızı belli bir düzeye kadar artmakta ve maksimum düzeye ulaştıktan sonra sabit olarak hız devam etmektedir. Yani başlangıçta bu ilişki doğrusal bir yol almakta ve sonrasında hiperbolik bir eğri oluşturmaktadır (Şekil 4). Substrat konsantrasyonundaki düşüş veya artış enzim hızında azalma veya artmaya sebep olabilmektedir.



Şekil 4. Enzim hızına substrat konsantrasyonunun etkisi

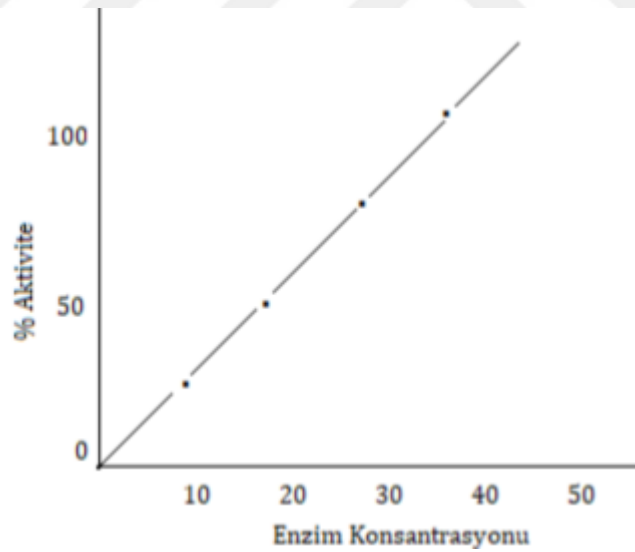
Enzim konsantrasyonu

Diğer parametreler sabit tutulduğunda, enzim konsantrasyonunun enzim hızına etkisi, doğrusal bir ilişki göstermektedir (Şekil 5). Bu ilişkiden yararlanılarak ortamdaki enzim konsantrasyonunu nicel olarak belirleyebilmek mümkün olmaktadır. Ancak bunun için ortam koşullarının standardize edilmesi ve daha önce konsantrasyonu belirlenen aynı enzimle kalibre

edilmesi gerekmektedir. Buna rağmen ortamdaki enzim konsantrasyonunu belirlemede bazı sapmalar olabilmektedir. Bu sapmaların olduğu beş durum şunlardır;

1. Sınırlı çözünürlüğe sahip olan substratların varlığı (O_2 gibi),
2. Karakteristik niteliğe sahip bir substrat olmaması,
3. Birbirine bağlı olan bir reaksiyon zincirinin varlığı (örneğin, birinci enzimatik reaksiyondaki ürünün ikinci enzimatik reaksiyonda substrat olması gibi bir durumda reaksiyon hızının belirlenmesinde birinci enzimatik reaksiyondan ziyade ikinci enzimatik reaksiyon üzerinden yapılır),
4. Suda Hg^{+2} , Ag^{+3} , Pb^{+3} gibi bir enzim inhibitörünün var olması veya farklı substrat veya tampon maddelerinin bulunması,
5. Enzim çözeltisinde çözünebilir elzem kofaktör varlığı şeklinde sıralanabilmektedir.

Bunların yanı sıra enzim konsantrasyonunun sabit tutulup, substrat konsantrasyonunun belirli bir miktarda artırılması durumunda maksimum hız noktası olan V_{max} değeri elde edilmektedir. Ortamda bulunan fazla oranda substrat varlığı enzimin inhibisyonuna neden olmaktadır. Reaksiyondaki enzim ve substrat miktarlarının belli bir oranlarda artırılması durumunda ise reaksiyon hızı devamlı bir artış gösterecektir.



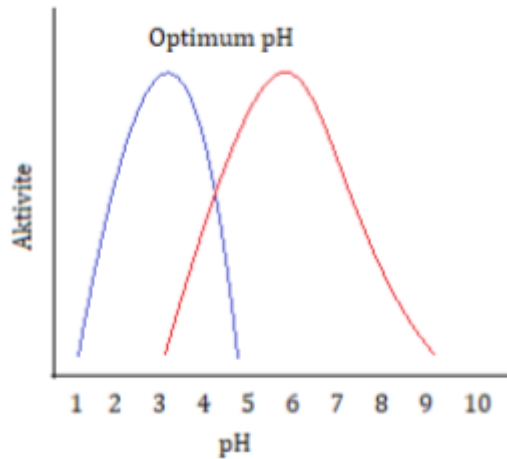
Şekil 5. Enzim konsantrasyonunun enzim hızına etkisi

Ortam pH değeri

Ortam pH değeri birçok enzimatik reaksiyonda en önemli faktörlerden biridir. Optimum pH, enzimin en çok aktivite gösterebildiği pH'ya denilmektedir. Bu optimum değer elde edildiği kaynağa göre değişiklik gösterdiği gibi her enzim için de farklılık göstermektedir. Ayrıca optimum pH değerinin altında veya üstündeki değerlerde, reaksiyon ortamındaki

tampon, sıcaklık, reaksiyon süresi, substrat ve kofaktör gibi faktörlerde değişimler meydana gelmekte ve reaksiyon hızı değişmektedir.

Belli bir çözeltideki çözünmüş hidrojen iyonları (H^+) konsantrasyonu pH değerini vermektedir. Bu sebeple pH'da meydana gelebilecek herhangi bir artma veya azalma, çözeltideki iyon konsantrasyonunda değişme meydana getirmektedir. İyonların konsantrasyonundaki değişiklik, var olan bağların kırılmasıyla beraber yeni bağların oluşmasına sebep olmaktadır. Bu durum enzimlerin ve bazen de substratın konformasyonel yapısının değişmesine neden olmaktadır. Enzim ve substratın kimyasal ve iyonik yapısında meydana gelen değişiklik, enzimin aktif bölgesinde değişikliğe neden olmaktadır. Bu, substratın enzimi tanıyamamasına ve reaksiyonun katalizlenememesine sebep olmaktadır (Saldamlı, 1998). Şekil 6'da farklı iki enzimin pH değerinin enzim hızına etkisini gösteren grafik gösterilmiştir.

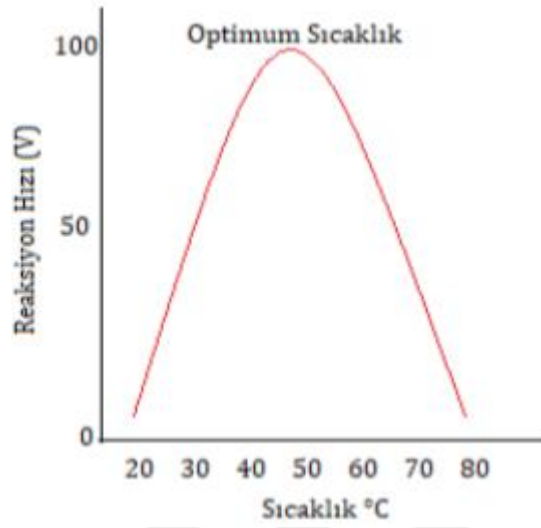


Şekil 6. İki farklı enzime ait pH'nın enzim hızına etkisi

Sıcaklık

Sıcaklık reaksiyonun hem hızını hem de stabilitesini etkileyen en önemli diğer bir faktördür. Özellikle tampon kullanılarak sabit tutulan pH değerinde ve diğer tüm faktörlerin standardize edildiği durumlarda, sıcaklığın artması ile reaksiyon hızı doğrusal bir ilişkide belli bir noktaya kadar artmaktadır. Belli bir noktadan sonra sıcaklıkta devam eden artış reaksiyon hızını düşürmektedir (Şekil 7). Reaksiyon hızının sıcaklık etkisiyle artması, reaksiyonda aşılması gereken belli bir enerji düzeyindeki molekül sayısı olduğundan kaynaklanmaktadır. Enzim etkisiyle gerçekleşen reaksiyonlarda bu durum söz konusu olmaktadır. Enzimler protein yapısında olduklarından dolayı yüksek sıcaklık uygulaması, enzimin hem aktivitesini hem de stabilitesini etkilemekte ve denatürasyona uğratmaktadır. Reaksiyonun hızının düşüşe doğru

döndüğü nokta reaksiyon için maksimum aktivite göstereceği optimum sıcaklık değerini vermektedir.



Şekil 7. Enzim hızına sıcaklığın etkisi

Enzim hızı düşük sıcaklık derecelerinden itibaren her 10 °C’de bir artmaktadır. Enzimlerin birçoğunun optimum olduğu sıcaklık derecesi 30-50 °C arasındadır. Aynı şekilde enzimlerin çoğu 60 °C’nin üzerinde denatüre olmaktadır. Genellikle hayvansal kaynaklı enzimlerin optimum sıcaklığı bitkisel kaynaklı olanlara göre daha düşük olup mikrobiyal kaynaklı enzimler için bu durum mikroorganizmaya göre değişiklik göstermektedir. Bazı termofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin optimum sıcaklık aralığı 70-72°C gibi yüksek bir değerdir. Bu sebeple bütün enzimler için geçerli bir optimum sıcaklık değerinden bahsetmek mümkün olmamaktadır. Çünkü optimum sıcaklık değeri, pH, elde edildiği kaynak, reaksiyon süresi, etki ettiği substrat gibi farklı birçok faktörden etkilenebilmektedir. Reaksiyon süresinin uzaması enzimin optimum sıcaklığında değişikliğe neden olmaktadır. Örneğin, yüksek sıcaklıkta uzun süre inkübe edilen enzim aktivitesi önemli ölçüde azalmaktadır (Saldamlı, 1998).

Su aktivitesi (a_w)

In vitro koşullardaki enzim aktivitesi genellikle sulu sistemler ile gerçekleştirilmektedir. *In vivo* koşullarda da yine sulu bir ortam olan hücre stoplazmasında reaksiyon gerçekleşmektedir. Enzimatik reaksiyonların bir kısmı da hücre membranlarındaki lipid depolarından ve elektron transport sisteminin (ETS) gerçekleştiği lipid matriksi içerisinde meydana gelmektedir.

Enzim hızına su aktivitesinin etkisi üç yöntem ile belirlenebilmektedir. Bu yöntemlerin ortak noktaları standart koşullarda su aktivitesinin artmasına karşılık gelen enzim hızlarının

belirlenmesi ve bu verilerin grafiğe dökülmesidir. Yöntemlerin birbirinden farkı ise birinci yöntemde sulu çözeltilerle çalışılırken diğer iki yöntemde reaksiyon çözeltisinde suyun yanısıra organik bir çözücüye yer verilmesidir. İkinci yöntemde çözeltideki suyun az bir oranı üçüncü yöntemde ise büyük bir oranı yerine organik çözücü kullanılmaktadır. Enzimin aktivitesini engellemek için ortamın toplam su içeriğinin %1-2'nin altında olması gerekmektedir (Saldamlı, 1998).

Enzim inhibitörleri ve aktivatörleri

Reaksiyon ortamına eklendiğinde enzim hızını azaltan doğal veya yapay kimyasal maddelere inhibitör denmektedir. Bu maddeler istenmeyen, aktivitesinin yavaşlanması veya kontrol altına alınması istenen enzimatik reaksiyonlar için kullanılmaktadır. Örneğin, bu maddeler kullanılarak gıdalardaki bazı enzimatik bozulmaların önüne geçilebilmektedir. Aynı şekilde bazı mikroorganizmaların elzem enzimi inhibe edilerek bunlar ve bu durumdan meydana gelebilecek olumsuz etkiler kontrol altına alınabilmektedir. Enzim inhibitörleri; tersinir, tersinmez ve allosterik inhibitörler olmak üzere üç grupta incelenmektedir. İnhibitör maddelere örnek olarak, kurşun, civa, bakır gibi ağır metaller örnek verilebilmektedir. Bunların yanısıra bazı işlem görmemiş gıdalarda doğal olarak bulunan doğal inhibitör maddeler vardır. Doğal inhibitörler bitki ve hayvan metabolizmalarında bazı fizyolojik olayları düzenlemek veya böcek ve zararlı mikroorganizmalara karşı korumak için üretilmektedir. Buna tripsin enzimi üzerinde etkili olan kunitz inhibitörü veya mikroorganizmalardaki düşük molekül ağırlıklı proteaz inhibitörü örnek olarak verilebilir (Saldamlı, 1998).

Bazı enzimler aktivitelerini arttırabilmek için “aktivatör” adı verilen metal iyonları veya moleküllere ihtiyaç duyabilmektedirler. Bunlara örnek olarak, potasyum, mangan, magnezyum ve kalsiyum gibi bazı metal iyonları gösterilebilir. Aktivatörler, genellikle kofaktörlerin aksine her zaman reaksiyona girmemektedir. Aktivatörlerin bir kısmı substrat ile diğer bir kısmı ise enzimle birleşerek reaksiyonu aktive etmektedir. Enzim ile birleşen aktivatörler enzimden kolayca ayrılabilirler (Saldamlı, 1998).

Reaksiyon süresi

Enzim reaksiyonu devam ederken; reaksiyonu inhibe eden maddelerin oluşması, enzimin zamanla inaktive olması ve substratın tükenmesi gibi birçok faktörden dolayı reaksiyonun hızı zamanla azalmaktadır. Bu faktörlerin göz önünde bulundurulması gerektiğinden dolayı, enzim çalışmaları çeşitli sebeplere bağlı olarak çoğunlukla reaksiyon başlangıcında yani ilk 1-5 dakika arasında gerçekleştirilmektedir (Saldamlı, 1998).

Enzimlerin Saflaştırılmasındaki Kromatografik Uygulamalar

Enzimler hücre içinde genellikle polisakkarit, nükleik asit, protein ve lipitler ile beraber bulunmaktadır. Bir enzimin spesifik aktivitesi o enzimin saflığının bir ölçüsü olarak kullanılmaktadır. Enzimin spesifik aktivitesini arttırmak ve saflaştırmak amacıyla ortamda bulunan diğer bileşenleri uzaklaştırmak için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Farklı birçok kaynaktan elde edilen protein, karbonhidrat, nükleik asit ve lipitleri ayırıştırıp saflaştırmada kullanılan ve en çok tercih edilen tekniklerden bir tanesi kromatografidir. Kromatografik yöntemin temel prensibi; bir tampon veya elektrolit çözeltisi gibi hareketli bir faz yardımıyla ayırıştırılmak istenen moleküllerin, durgun faz üzerindeki akışına dayanmaktadır. Ayırma işlemi, sabit bir fazdan sıvı veya gaz olabilen hareketli bir faz ile taşınma hızlarına bağlı olarak ayrıldığı bir tekniktir (Ghose and Kumpalume, 2003; Hedhammar *et al.* 2006). Dolayısıyla, bu tanımdan, aynı bileşenlerin aynı deney koşulları altında ve aynı hızda hareket edeceği sonucuna varılabilmektedir. Böylece, bilinmeyen bir numunenin kromatogramı ile bilinen numunelerin kromatogramı karşılaştırılarak, karışımların bileşenlerini tanımlamak ve belirlemek için kromatografi kullanılabilmektedir (Ghose and Kumpalume, 2003).

Kolon kromatografisinin başlıca türleri şunlardır;

- Düşük basınç sıvı kromatografisi (LPLC),
- Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC),
- Jel filtrasyon kromatografisi (GFC),
- İyon değişim kromatografisi (IEC),
- Afinite kromatografisi (AC),
- Hidrofobik interaksiyon kromatografisi (HIC),
- Ters-faz sıvı kromatografisi (RPLC).

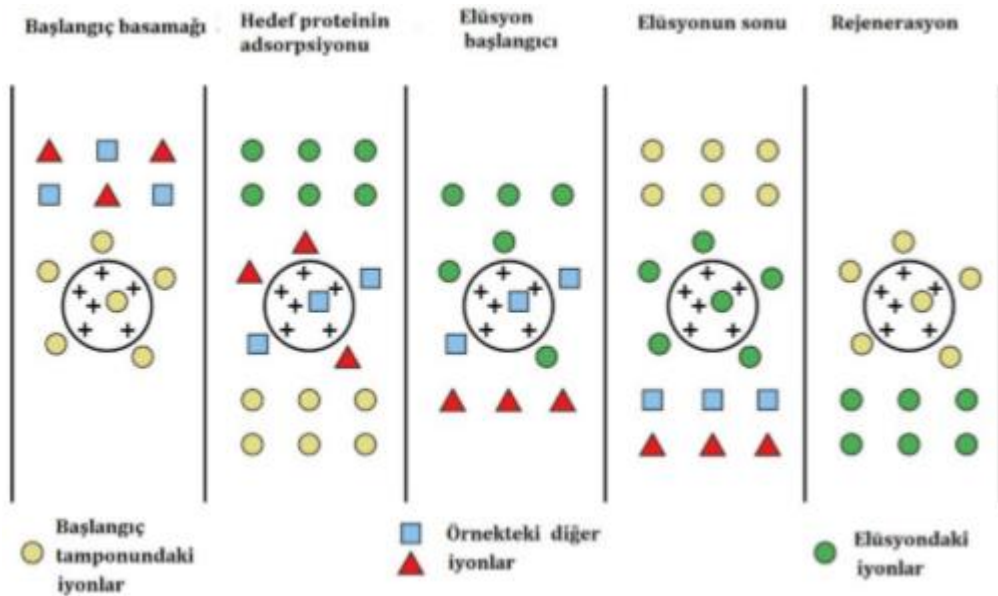
***Bu tez çalışmasında enzimin saflaştırılma işleminde, iyon değişim kromatografisi tekniği kullanılmıştır.

İyon değişim kromatografisi

Proteinlerin iyon değiştirme kromatografisi ile saflaştırılmasının temeli iyonik etkileşimlerdir. Ayırma işlemi, belli bir pH'daki iyon değiştirici adsorban üzerindeki yüklü grupların, zıt yüzey yüklerine sahip proteinler arasındaki çekim ile gerçekleşmektedir. Yani jel kromatografisindeki gibi matriks, nötral değildir ve iyonlaşabilen fonksiyonel gruplara sahip olmaktadır (Hedhammar *et al.* 2006). Proteinler ise yapılarındaki aminoasitlerin çözücülerle etkileşimini arttıran katyonik ve anyoniktir gruplara sahiptir. İyonik yük ayrımı iyon değişim kromatografisi ile gerçekleşmektedir. Kolon kromatografisinde yaygın bir şekilde kullanılan

yöntemlerden biri olan bu yöntem proteinlerin ayrışması ve saflaştırılması ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda kullanılmaktadır. Yüksek kapasitesi, nispeten düşük maliyetinden dolayı proteinlerin saflaştırılmasının başlangıç aşamasında bu bileşiklerin kolonda tutunması için iyon değişim kromatografisi ideal bir yöntemdir. Küçük ve 70 kDa kadar olan orta boyuttaki proteinler bu yöntem ile etkili bir şekilde ayrılabilir (Selkirk, 2004).

İyon değişim kromatografisinde ayırma işlemi, jel kromatografisinde kullanılan matrikslere dietilaminoetil (DEAE) ya da karboksimetil (CM) gruplarının ilavesiyle elde edilen immobilize iyon değiştirici gruplar ile bunlara zıt yüke sahip yüklü moleküller arasındaki tersinir adsorpsiyona bağlı olarak gerçekleşmektedir. Ayırma işleminin ilk aşamasında kolonun tampon çözelti ile yıkanması gerekmektedir. Bu durum reçinenin pH ve iyonik güç açısından dengelenmesi için zorunludur. Ardından kolona düşük iyonik güçte verilen örnek, protein ile matriks arasındaki etkileşimi maksimum seviyede gerçekleştirmektedir. Daha sonra kolon başlangıçta uygulanan sabit pH'ya sahip tampon çözeltisi ile yıkanmaktadır. Böylece matriks ile aynı yükü taşımakta olan bileşikler, iyon değiştiriciye tutunamamakta ve kolondan başlangıçta uzaklaştırılmaktadır. Ancak örnek içerisinde reçine ile farklı düzeyde etkileşim gösteren birçok protein bulunabilmektedir. Yıkamadaki tampon çözeltisinin iyonik gücü yavaş yavaş artırılarak reçineye zayıf düzeyde bağlanan proteinler kolondan ayırmak için kademeli yıkama yapılmaktadır. En son aşamada, artan iyonik güce sahip çözelti ile reçineye sıkı bir şekilde bağlanan proteinler kolondan ayrılmaktadır. Düzenli aralıklarla kolondan ayrılarak toplanan protein fraksiyonlarının absorbans veya floresans değerleri kaydedilip ilgili proteinin yerini belirlemek amacıyla bir elüsyon profili oluşturulmaktadır (Whitford, 2005). Şekil 1.7'de iyon değişim kromatografisinin çalışma prensibi şematize edilmiştir.



Şekil 8. İyon değişim kromatografisinin şematik gösterimi

Jel filtrasyon kromatografisi

Jel filtrasyon kromatografisi (GFC), çözünen maddelerin moleküler boyutlarına göre ayrıldığı ve protein saflaştırma için en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Her ne kadar ilk olarak çok küçük moleküllerin çok büyük moleküllerden, örneğin proteinlerden tuzlara ayrılmasına uygulanmış olsa da kısa süre sonra makromolekül karışımlarının analitik ve preparatif ayrılması ve karakterizasyonu için genel bir yöntem olarak kullanılmıştır (Funasaki, 1993; Zhang *et al.* 2015).

Jel filtrasyon ortamı, belirli bir boyutta boşlukları olan hassas şekilli boncuklardan oluşur. Bir proteinin bu boşluklara yayılma olasılığı, azalan protein boyutu ile artar, böylece daha küçük boyuttaki proteinler en uzun süre korunmaktadır (Nelson *et al.* 2008). Bu nedenle, bir protein karışımı, azalan büyüklük sırasına göre kolondan elüte edilmektedir. Yani ayrıştırılması istenen karışımın, tampon gibi bir hareketli faz ile kolona yüklenmesi sağlanmaktadır. Kolona giren örnek kolonda ilerlerken, jel içerisindeki gözeneklerden geçemeyecek büyüklükteki moleküller kolonun dışına atılmaktadır. Küçük moleküller ise, hareketli faz arasında dağılacak şekilde jel materyalin gözeneklerine girmektedir. Kolonu ilk terk eden büyük moleküllerin aksine bu gözenekler içine girebilecek boyuttaki küçük moleküller, bu kolonu en son terk etmektedir. Böylece kolondaki proteinlerin elüsyon hacmi ve moleküler ağırlıkları arasında logaritmik bir ilişki bulunduğu söylenebilmektedir (Konak *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2015). Şekil 9'da jel filtrasyon kromatografisinin çalışma prensibi şematize edilmiştir



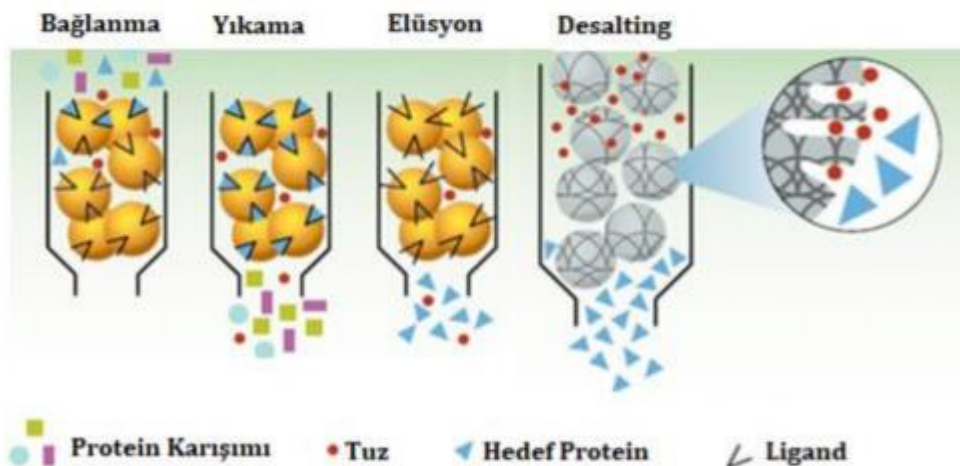
Şekil 9. Jel filtrasyonun şematik olarak gösterimi

Burada GFC'nin kararlılığı, ayırma ortamına (parçacık boyutu, tekdüzellik, boşluklar ve analit arasındaki boyutun eşleşmesi), kolon faktörleri (yatak yüksekliği, kolon paketleme kalitesi) ve akış oranı ve örnek hacmi gibi çeşitli birçok faktöre bağlıdır (Zhang *et al.* 2015).

Afinite kromatografisi

Afinite kromatografisi, bir protein ve onun aynı kökenli ligandı arasındaki (örneğin; bir enzimin substratı ile etkileşimi veya bir antikorun hedef antijeni ile bağlanması) tersinir ve spesifik bağlanmaya dayanan çok yönlü ve en seçici sıvı kromatografisidir. Adsorbsiyon kromatografisinin bir türü olan afinite kromatografisi sayesinde, çok kompleks olan bir karışımdaki bazı proteinler oldukça yüksek verimle ve tek basamakta saf halde elde edilebilmektedir.

Afinite kromatografisinde ayrıştırılacak olan karışım, sabit faz desteği olarak kolona kovalent bağlarla bağlanan ve “afinite ligandı” adı verilen ajanlar, geri dönüşümlü ve özgül bir şekilde adsorbe edilmektedir. Hedef protein, afinite ligandı üzerinde seçici emilim yoluyla kompleks bir karışımdan elüe edilmektedir. Hedef protein içeren kompleks karışım diğer bileşenler geçerken hedef proteinin afinite ligandı ile bağlanması için doğru bileşime ve pH'ya sahip bir mobil fazda uygulanmalıdır. Alıkonan hedef daha sonra kolondan elüe edilmektedir. Hedef protein elüsyonu için protein karışımı bu kolona uygulandığında tek başına kalması istenilen enzim proteinleri ligantın serbest ucuna kovalent olmayan bir bağ ile spesifik olarak bağlanmaktadır. Bunun dışındaki diğer proteinler ligantın serbest olan ucuna bağlanabilme özelliğine sahip değildirler ve bu sebeple kolondan kolaylıkla ayrılmaktadırlar. Hedef elüsyonu için tercih edilen yöntem, hedef protein ve ligand etkileşiminin afinitesine göre değişmektedir. Elüsyondan sonra, bir sonraki numunenin uygulanmasından önce kolonun rejenere olması sağlanmaktadır (Walters, 1985; Ayyar *et al.* 2012; Hage *et al.* 2012). Afinite kromatografisinin uygulanma prensibi Şekil 10’da şematize edilmiştir.



Şekil 10. Afinite kromatografisi çalışma prensibi

Meyve Suyu Üretiminde Kullanılan Enzimler

Meyveler, vitamin, mineral ve lif gibi önemli besin maddesi kaynaklarıdır. Taze meyveler % 80'den fazla nem içeriği nedeniyle kısa sürede bozulabilmektedirler. Meyvenin raf ömrünü uzatmak için meyve; meyve suları, marmelat, reçel ve jöle gibi ürünlere dönüştürülebilmektedir. Meyve suyu, olgun meyveden doğrudan işlenmiş ve en fazla tüketime sahip meyve ürünüdür. Meyve suyu, meyvenin hücrel içeriğinin ekstraksiyonu (presleme veya difüzyon) ile elde edilmektedir (Danalache *et al.* 2018).

Meyve suları, dünya çapında yaygın olarak tüketilen içeceklerdir. Beslenmede özellikle alkolsüz içecekler ve şekerli içecekler yerine sağlıklı, yüksek kaliteli, taze meyve sularının tüketimine olan farkındalık ile beraber bu ürünlere olan talep sürekli olarak artmaktadır (Ephrem *et al.* 2018). Meyve suları, içeriğindeki biyoaktif bileşikler ile beraber sağlık üzerine olumlu etkileri sayesinde beslenmeye önemli katkıda bulunmaktadır. Bu doğal biyoaktif bileşenler, normal kan basıncını ve cildi korumak (Cosgrove *et al.* 2007), kemikler (Mandadi *et al.* 2009), kardiyovasküler sistem (Chong *et al.* 2010; Dalgård *et al.* 2009; Grassi *et al.* 2009) ve sinir sistemi (Dai *et al.* 2006; Macready *et al.* 2009; Vafeiadou *et al.* 2009) üzerine olumlu etkileri gibi çok çeşitli yararlar sağlamaktadırlar.

Enzimler, farklı gıda ürünlerinin üretimi sırasında gerçekleşen birçok reaksiyonu katalize etmektedirler. Modern gıda endüstrisindeki önemli araçlardan biri olan enzimler, birçok ara işlemi basitleştirmişlerdir. Endüstriyel enzimlerin kullanımları farklı alanlara ayrılmaktadır. Bu alanlardan biri de meyve ve sebze işleme endüstrisidir. Meyve suyu endüstrisinde ticari olarak ilk uygulama 1930 yılında Kertesz tarafından ABD'de uygulanmıştır (Kertesz, 1930). Gelişen teknoloji ile birlikte meyve suyu endüstrisinde enzimlerin üretimi ve kullanımı artmıştır (Tablo 1). Bu alanda özellikle pektinaz enziminden oldukça fazla faydalanılmakla (Prathyusha and Suneetha, 2011; Tapre and Jain, 2014) birlikte son zamanlarda turuncgil sularında, özellikle greyfurt suyu üretiminde büyük bir problem olarak karşımıza çıkan acılık sorunu için naringinaz enziminin kullanımı giderek ilgi görmeye başlamıştır (Cemeroğlu, 2011; Puri, 2012).

Tablo 1. Meyve Suyu Endüstrisinde Kullanılan Enzimler ve Kullanım Amaçları (Cemeroğlu, 2011)

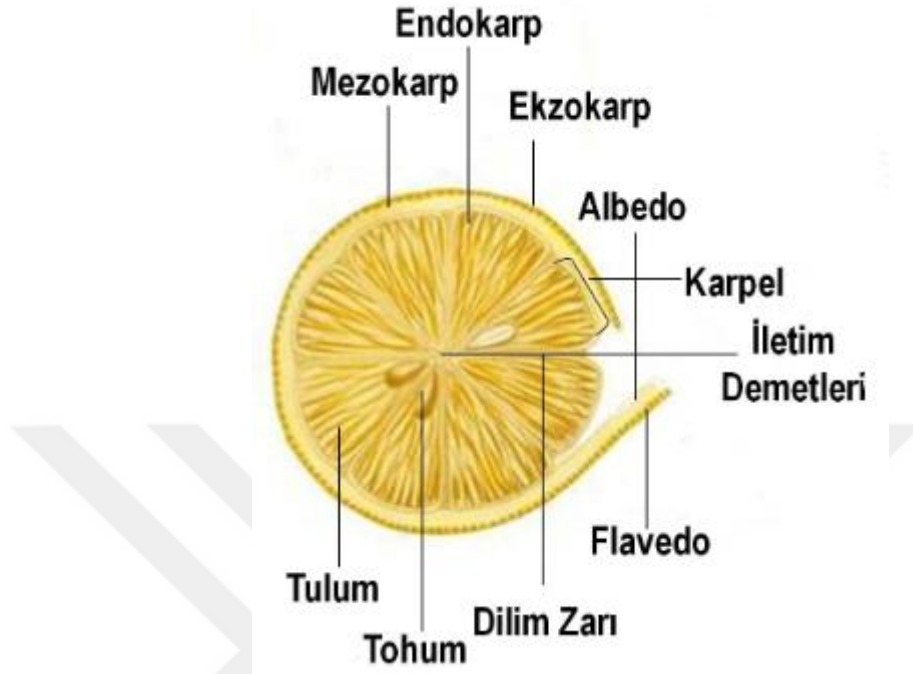
Enzimler	Kullanım amaçları
Lakkaz	Durultma (fenolik bileşiklerin uzaklaştırılması)
Pektolitik enzimler	Durultma, mayşe fermentasyonu, mayşe sıvılaştırma, mayşe şekerleştirme, mayşe maserasyon
Selülazlar	Mayşe sıvılaştırma, mayşe şekerleştirme
α -amilaz	Durultma (nişastanın parçalanması)
Arabanaz	Durultma (araban nedeniyle oluşan bulanıklığın önlenmesi)
Naringinaz	Turunçgil sularındaki acılık maddesi naringinin azaltılması
Oligomeraz, Hemiselülaz, Glikozidaz	Mayşe şekerlendirme

Greyfurt ve Greyfurt Suyu

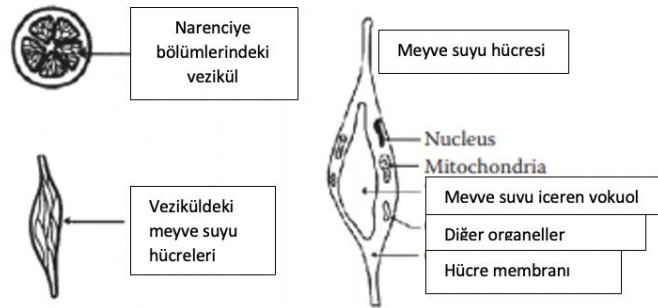
Greyfurt (*Citrus paradisi*), Rutaceae familyasına ait bir narenciye meyvesidir. İlk olarak 18. yy'da Barbados Adası'nda keşfedilmiş olup, tatlı portakal (*Citrus sinensis*) ve pomelo (*Citrus maxima* Burm) arasında meydana gelen doğal bir çarpazlaşma sonucu yetişen hibrid ürün olduğu bildirilmektedir (Nicolosi *et al.* 2000; Anonimus, 2020). Dünyanın tropikal ve subtropikal bölgeleri boyunca 0 -1800 m arasında değişen yükseklikte (Kelebek, 2010; Liu *et al.* 2012) ve 13°- 35°C arasındaki sıcaklıklarda yetişebilmektedir (Baradas, 1994). Birçok bölgede üretimi söz konusu olan greyfurtun, Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) verilerine göre, dünya çapında önde gelen üreticileri Çin ve ABD'dir. Çin'de 2018 yılında toplam 4,9 milyon ton greyfurt üretildiği bildirilmektedir (FAO, 2018).

Bir narenciye meyvesi olan greyfurtun çapı yaklaşık 15 cm, dıştan kalın bir epidermis tarafından oluşturulan kabuk tarafından korunmaktadır. İçeri doğru gittikçe sırasıyla, pigment ve yağ kesesini içinde bulunduran flavedo tabakası ve flavonoidleri, su, besin maddeleri ile gazları taşıyabilen ve depolayabilen albedo tabakasından oluşmaktadır (Mondello *et al.* 2005). Kabuk tarafından korunan yapı, her biri bir zar ile çevrili olan ve tohumların yanı sıra meyve suyu keselerini de (tulum) içeren yaklaşık 11 ile 14 segment (karpel veya dilim) bulundurmaktadır (Albrigo and Carter 1977; Ranganna *et al.* 1983). Subepidermal bölgedeki flavedo, meyveye yeşil, sarı veya turuncu renk veren kromoplastlar ve aromatik uçucu yağlarla dolu çok sayıda yağ kesecikleri içermektedir. Albedo ise, glikozitler (flavanonlar), acı maddeler, pektin ve pektik enzimler açısından zengin olup, süngerimsi dokuyu oluşturan hücre katmanlarından oluşmaktadır. Albedodan gelen iplik benzeri vasküler demetler, segmentlerin dış kısmı boyunca meyve eksenine paralel uzanan bir ağ oluşturmaktadırlar. Bunların

peroksidaz bakımından zengin olduğu bildirilmektedir (Ranganna *et al.* 1983). Şekil 11’da narenciye meyvelerinin sahip olduğu genel yapı şematize edilmiştir. Şekil 12’de ise karpel içerisinde bulunan meyve suyu kesesinin hücresel iç yapısı gösterilmiştir (Ye, 2017)



Şekil 11. Narenciye meyvelerinin yapısı



Şekil 12. Narenciye meyvelerindeki kese ve hücresel iç yapısı

Greyfurtun yaprak, çiçek ve meyvelerin boyutuna, şekline ve rengine bağlı olarak farklı çeşitleri bulunabilmektedir (Peterson *et al.* 2006). Greyfurta rengini veren madde likopendir. Farklı greyfurt çeşitleri, likopenin varlığına veya yoğunluğuna bağlı olarak beyazdan kırmızıya doğru değişen renk tonlarına sahiptir (Rao and Rao, 2007). Başlıca greyfurt çeşitleri arasında Pembe, Yakut Kırmızı, Yıldız Yakut, Thompson ve Beyaz Bataklik adı verilen çeşitler bulunmaktadır. Meyvenin kabuk kısmı, 7 ana grupta sınıflandırılabilen çok sayıda bileşikten oluşmaktadır. Bunlar; terpenler, seskiterpenler hidrokarbonlar, alkoller, aldehitler, esterler, oksitler ve diğer çeşitli bileşiklerdir. Terpenlerin kabuğun yaklaşık %80'ini oluşturan limonen, mirsen, sitral ve terpine sahip en yaygın bileşikler olduğu belirtilmiştir (Cristóbal-Luna *et al.*

2018). Greyfurt meyve kısmı, flavonoidler, karotenoidler, kumarinler ve organik asitler gibi çeşitli biyoaktif ve fitokimyasallar sayesinde antienflamatuar, kanser ve obezite gibi birçok sağlık problemi üzerine olumlu etkiye sahip olmaktadır (Chudnovskiy *et al.* 2014).

Beslenme ve sağlık ilişkisi ile güvenilir gıda açısından önemli kaynak olan narenciye'nin üretimi ve ihracatı birçok ülkede önemli gelir kaynağı olmaktadır. Nakliye ile paketleme maliyetleri düştükçe ve kalite iyileştikçe, narenciye işleme ürünlerine olan ilgi giderek artmakta ve güçlü bir pazar payı elde etmektedir (Liu *et al.* 2012). Narenciye meyvelerinden olan greyfurt suyu üretimi de aynı oranda ilgi görmektedir. Greyfurtun meyve suyuna işlenmesi ile greyfurtun sahip olduğu birçok besin ögesi meyve suyuna geçmektedir. Greyfurt suları, flavonoidler, C vitamini, folat, diyet lifi ve karotenoidler gibi yararlı fitokimyasalların iyi kaynaklarıdır (Wang *et al.* 2017).

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, manuel olarak edilen greyfurt suyunun kimyasal bileşimi, endüstriyel olarak işlenmiş meyve suyuna benzer olmasına rağmen, bileşenlerinin miktarında farklılıklar olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar, endüstriyel olarak üretilen greyfurt suyunda, yüksek seviyelerde naringenin, hesperidin, neohesperidin, didyminin, poncicinin, limonin, askorbik ve sitrik asit belirlerken, manuel olarak elde edilen greyfurt suyunda dihidroksisamamotinin seviyesini daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (Uckoo *et al.* 2012). Bunun yanı sıra farklı bölgelerde yetişen greyfurt çeşitleri arasında da kimyasal bileşim oranları değişiklik gösterebilmektedir. Ahmed *et al.* (2019) yaptıkları çalışmada, farklı greyfurt çeşitlerinden ekstrakte edilen meyve sularının ve yağının fizikokimyasal, antioksidan özellikleri ve uçucu profilleri arasında önemli farklılıklar olduğunu tespit etmişlerdir.

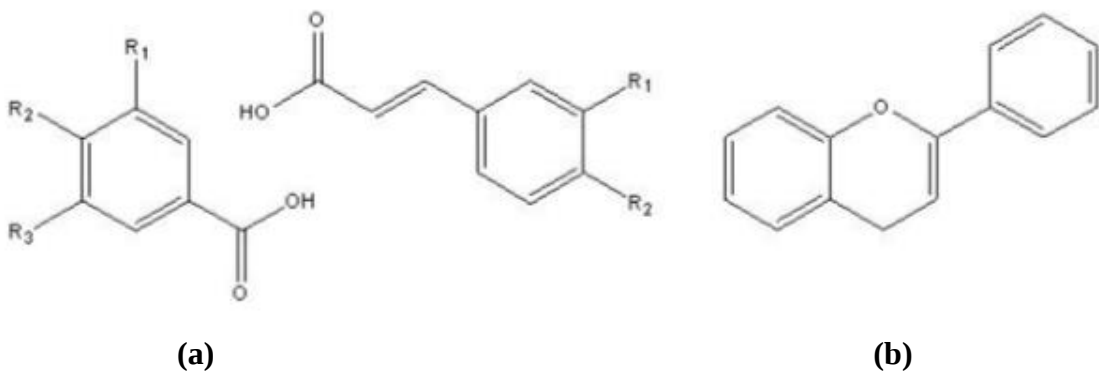
Narenciye suları, askorbik asit, karotenoidler, flavonoidler, limonoidler ve kumarin gibi bileşenleri içermesi dolayısıyla sağlık üzerine olumlu etki göstermektedir (Xu *et al.* 2008). Flavonoid grubundan bir flavanon diglikozit olan naringenin (4,5,7-trihidroksiflavanon-7-ramnoglikozit) greyfurt suyunda bulunan ve antioksidan, anti-ülser ve antienflamatuar aktiviteye sahip olduğu bildirilen bir bileşiktir (Chen *et al.* 2003). Ancak naringenin, neohesperidin ve poncicinin gibi acı flavanon glikozitleri, greyfurt suyunun lezzetinin olumsuz etkilemektedirler. Bu bileşiklerden naringenin, greyfurtta en baskın acı tadı veren bileşiktir (Hagen *et al.* 1966). Yapılan çalışmalarda, ticari ve taze greyfurt suyunda naringenin konsantrasyonunun, greyfurt çeşidine, yetiştirildiği bölgeye ve meyve suyu ekstraksiyon yöntemine bağlı olarak 104-867 µg mL⁻¹ (0.179-1.493 mM) arasında değiştiği bildirilmektedir (Zhang, 2007; Ribeiro and Ribeiro, 2008). Greyfurt suyunda naringenin konsantrasyonu düşük olmasına rağmen, tüketicilere algılanabilir acı bir tat vermektedir. Narenciye meyveleri, özellikle greyfurtta acı tat, meyve suları endüstrisi için istenmeyen bir lezzet unsuru olmaktadır

(Ribeiro, 2011). Bir gıda ürününün seçiminde önemli faktör olan acı tat, ticari greyfurt suyu üretiminde önemli ekonomik sorun olarak görülmektedir (Manlan *et al.* 1990).

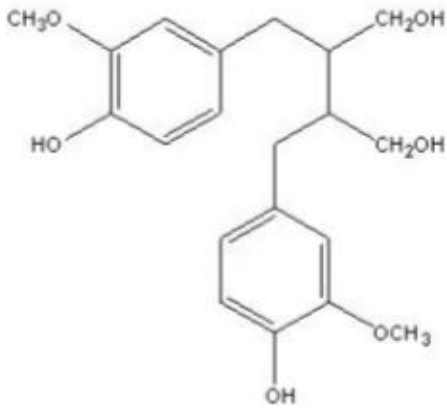
Greyfurt suyundaki naringin miktarı, adsorptif (Ribeiro, 2002) ve β -siklodekstrin polimer uygulaması (Mongkolkul *et al.* 2006) gibi farklı fiziksel ve kimyasal acılık giderme yöntemleriyle azaltılabilmektedir. Bununla birlikte bu acılık giderme yöntemleri teknolojilerinin çeşitli sınırlamaları nedeniyle naringinin enzimatik hidrolizi alternatif bir prosedür olarak kullanılabilmektedir. Greyfurt suyundaki naringin, naringinaz enzimi kullanılarak azaltılabilmekte ve acılık problemi için endüstriyel bir çözüm olabilmektedir. Naringinaz uygulaması, naringinin parçalanma ürünlerinin de naringin gibi yararlı etkileri bulunabildiğinden dolayı sağlık üzerine olumlu etkilerini korurken, organoleptik özellikleri geliştirebilmesi nedeniyle umut verici bir yöntem olmaktadır (Bodakowska-Boczniewicz and Garncarek, 2019).

Fenolik Bileşikler

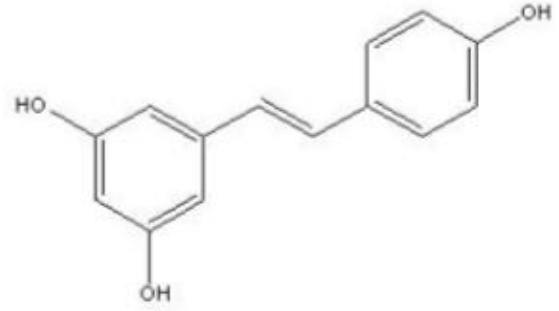
Fenolik bileşikler veya fenoller, hidroksil grubunun doğrudan bir aromatik hidrokarbon grubuna bağlı olduğu ve en az 10,000 farklı bileşikten oluşan büyük bir gruptur (Li *et al.* 2014). Fenoller, molekülde bulunan fenol ünitelerinin sayısına bağlı olarak basit fenoller veya polifenoller olarak sınıflandırılmalarının yanısıra genel olarak diyetle en çok bulunan polifenollerden; flavonoidler ve fenolik asitler, stilbenler ve lignanlar gibi alt sınıflara ayrılmaktadırlar (Araújo *et al.* 2011; Li *et al.* 2014). Şekil 113'de bu fenolik bileşiklerin temel kimyasal yapıları (Li *et al.* 2014) gösterilmiştir.



Şekil 13. Fenolik bileşiklerin genel kimyasal yapıları (a) Fenolik asitler, (b) Flavonoidler, (c) Lignanlar ve (d) Stilbenler (devamı)



(c)



(d)

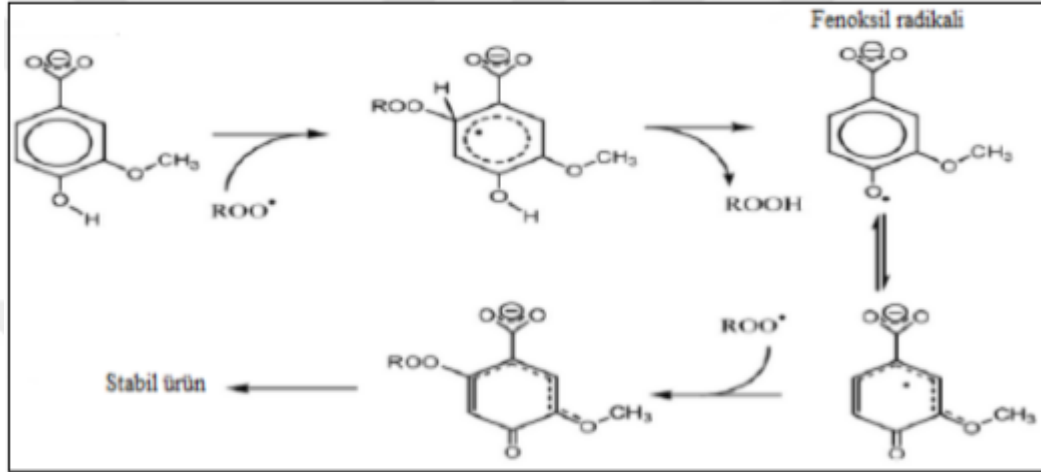
Şekil 13. Fenolik bileşiklerin genel kimyasal yapıları **(a)** Fenolik asitler, **(b)** Flavonoidler, **(c)** Lignanlar ve **(d)** Stilbenler

Polifenoller doğal olarak meyve, sebze, çay, tahıllar, tıbbi bitkiler, mikroalgler, yenilebilir çiçekler gibi birçok bitkide ve gıdada bulunmaktadır (Deng *et al.* 2013). Bazı yenilebilir yabani meyveler ile beraber üzüm, zeytin, yaban mersini, mango ve turuncgillerde polifenol içeriğinin yüksek oranda belirlendiği bildirilmiştir (Fu *et al.* 2010; Deng *et al.* 2012). Fenolik bileşikler, yüzyıllar boyunca biyolojik etkilerinden dolayı sağlık için kullanılmışlardır. Fakat özellikleri ve etki mekanizmaları hakkında bilgi, yakın zamana kadar oldukça sınırlı kalmıştır (Konczak and Zhang, 2004). Son zamanlara kadar tam olarak fonksiyonu bilinmeyen bu bileşiklerin, yapılan araştırmalar sonucunda; antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal aktiviteleri ile kardiyovasküler hastalıklar ile nörodejeneratif hastalıklardan kansere kadar birçok hastalığın tedavisinde etkili olduklarına dair birçok veri elde edilmiştir (Rao and Agarwal, 2000; Mojzer *et al.* 2016; Wu *et al.* 2016).

Polifenollerin antioksidan özellikleri, hidrojen iyonu veya elektron verme yetenekleri ile serbest radikalleri nötralize etmelerinden kaynaklanmakta olup, yağ asidi oksidasyonunu da önleyebilmektedirler. Bunların yanısıra fenolik bileşikler, çelat görevi görerek Fe^{2+} and Cu^{+} gibi geçiş metallerini çelatlamakta ve ortam redoks potansiyelini değiştirmektedirler (Balasundram *et al.* 2006). Antioksidan aktiviteleri sayesinde polifenollerin, birçok hastalığı önlediği ve ayrıca bu hastalıkların ilerlemesini baskıladığı, hatta iyileşme sürecine de katkıda bulunduğu (Ramos, 2008; González-Vallinas *et al.* 2013) ve bunun yanısıra bazı polifenollerin hormonal etki gösterebildiği ve kemik erimesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Hendric, 2006).

Fenolik bileşiklerin antioksidan etki mekanizması; serbest radikalın eşlenmemiş elektronunun fenolik bileşiklerin konjuge aromatik sistemleri ile delokalize edebilmesi durumu, fenolik hidroksil grupları tarafından bir serbest radikale (R) bir hidrojen atomu verilmesi

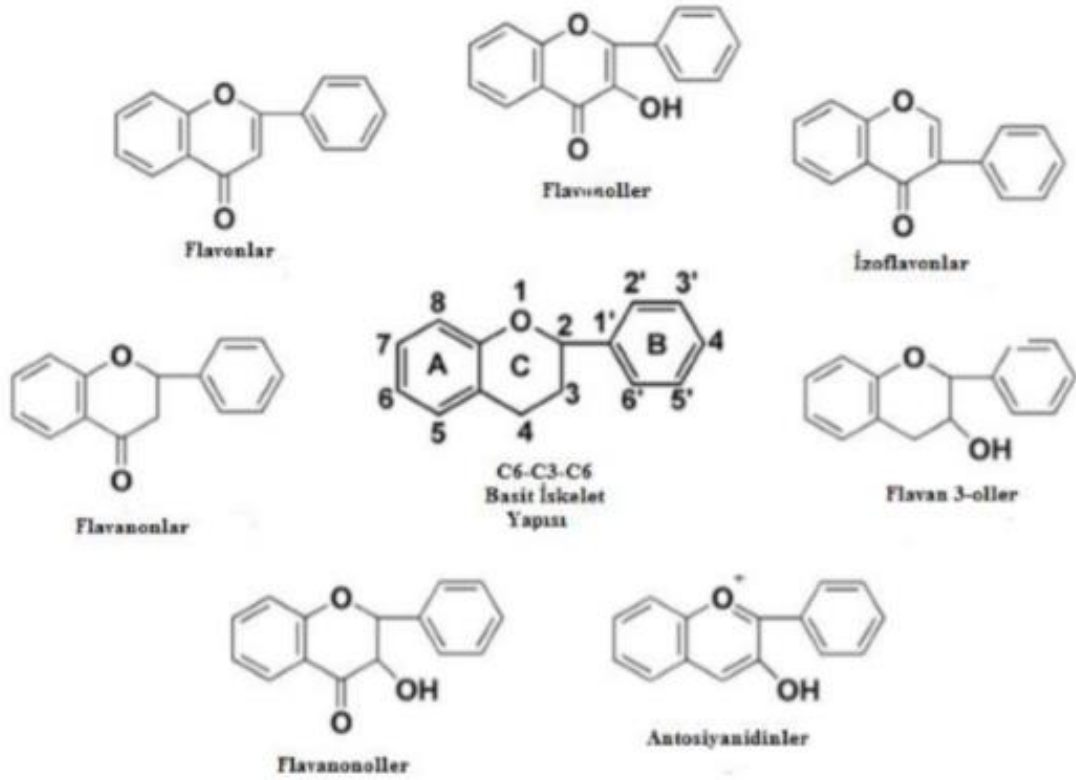
şeklinde gerçekleşmektedir. Fenolik bileşikler (POH) tarafından serbest radikale hidrojen atomu verilmesi sonucu fenoksil radikal ara ürünleri (PO.) oluşmakta ve bu ara ürünlerin yüksek stabiliteleri sayesinde serbest radikal zincir reaksiyonu baskılanabilmektedir (Şekil 14) (Altay *et al.* 2015). Ayrıca fenoksil radikal ara ürünleri diğer oluşan serbest radikallerle reaksiyona girerek yayılımı durdurabildiği belirtilmiştir (Scalbert *et al.* 2005; Dai and Mumper, 2010).



Şekil 14. Fenolik bileşiklerin serbest radikalleri delokalize etmesi

Flavonoidler

Flavonoidler; özellikle, meyveler, sebzeler ve bazı içeceklerde yaygın olarak bulunan polifenolik yapıya sahip önemli sekonder metabolitlerdir. Doğada yaklaşık olarak 6000'in üzerinde olduğu tahmin edilen flavonoidler, fenolik bileşiklerin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Flavonoidler, C₆-C₃-C₆ iskeletine sahip olan polifenollerdir ve iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşiminden oluşmaktadır. Bu bileşikler Şekil 15'te gösterildiği gibi B halkasının bağlı olduğu C halkasının karbonuna ve C halkasının doymamışlık ve oksidasyon derecesine bağlı olarak farklı alt gruplara ayrılabilir. B halkası C halkasının 4. pozisyona bağlandığında buna neoflavonoid; 3. pozisyonuna bağlandığında isoflavonoid; 2. pozisyonuna bağlandığında, C halkasının yapısal özelliklerine bağlı olarak birkaç alt gruba ayrılabilir. Bu alt gruplar; flavonlar, flavonoller, flavanonlar, flavanoller veya kateşinler, antosiyaninler ve kalkonlar olarak adlandırılmaktadır (Panche *et al.* 2016).



Şekil 15. Flavonoidlerin temel iskelet yapıları

Flavonoidler, bitkilerde, hayvanlarda ve bakterilerde çeşitli biyolojik aktivitelerde rol oynamaktadır. Bu bileşikler, antioksidan aktiviteleri ve biyokimyasal özellikleriyle kanser türleri, Alzheimer hastalığı ve ateroskleroz gibi çeşitli dejeneratif hastalıkların tedavisinde faydalı olabilmektedir (Lee *et al.* 2009; Panche *et al.* 2016; Perez-Vizcaino and Fraga, 2018). Flavonoidlerin sağlık üzerine etkileri, sahip oldukları hücresel enzim fonksiyonlarını ayarlama kapasitelerinin, antioksidan, anti-inflamatuar, antimutajenik ve antikanserojenik özellikleri ile birleşmesidir (Panche *et al.* 2016).

Narenciye flavonoidleri

Narenciye flavonoidleri, greyfurt, limon, mandalina, portakal gibi narenciye meyvelerinde bulunan terapötik açıdan önemli flavonoid sınıfıdır. Yaygın bir şekilde bu narenciye meyvelerinin flavonoidleri P Vitamini olarak adlandırılan bir grup biyoaktif flavonoid grubundaki flavanonlardır ve naringenin, naringin, quersetin, diosmetin, narirutin, diosmin, nobiletin, neohesperidin, rutin, hesperidin, tangeritin vb. olarak adlandırılmaktadır. Narenciye flavanonları glikozit veya aglikon olmak üzere iki formda bulunmaktadır. Glikozit formu spesifik bir tadı olmayan tatsız olarak değerlendirilen rutinosidler (didymin, narirutin, hesperidin) ve acı tat veren neohesperidosid (neohesperidin ve naringin) olarak tanımlanmaktadır. Aglikon formunda ise hesperetin ve naringenin önemli flavanonlar olarak

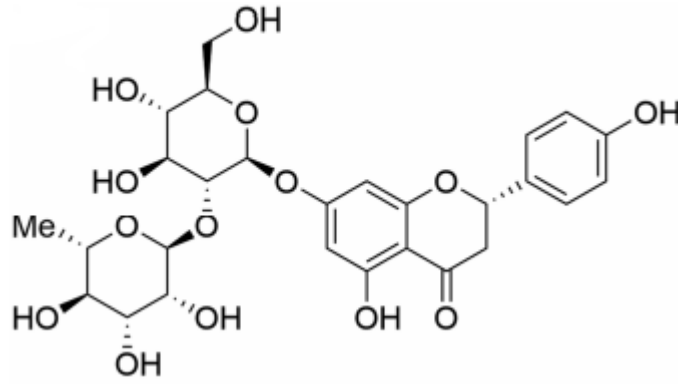
bilinmektedir (Joshi *et al.* 2018). Aglikonlar, lipofilik yapıları ve dolayısıyla sudaki düşük çözünürlükleri nedeniyle meyve sularında daha az görülmektedir (Gattuso *et al.* 2007).

Narenciye meyvelerinin kabuğu, meyve eti ve tohumları fenolik bileşiler açısından son derece zengin olup, kabuklarda bulunan flavonoidler, meyve eti ve tohumlara kıyasla daha zengindir ve farklı oranlarda bulunabilmektedir. Örneğin, turunçgillerin katı kısımları, özellikle albedo (beyaz süngerimsi kısım) ve segmentleri ayıran membranlar çok yüksek flavanon içeriğine sahip olmakta ve bir tam meyvenin bir bardak portakal suyundan 5 kata kadar daha fazla flavanon içerebildiği belirtilmiştir (Manach *et al.* 2004). Ayrıca, limon tohumlarının bulunan flavanonlar hesperidin ve eriocitrin iken, kabuklar neoeriocitrin, naringin ve neoheperidin bakımından zengindir. Bu nedenle, kabuk, meyve eti ve tohumun flavonoid içeriği, turunçgil meyvelerinde genellikle aynı olmamaktadır (Rani *et al.* 2016; Patel *et al.* 2018).

Narenciye meyvelerinin içerdikleri flavanonlar ile antioksidatif ve antienflamatuar aktivitelerinin yanısıra çeşitli yararlı etkilere sahiptirler. Ayrıca, bağırsak mikrobiyomunu etkileyebildikleri ve mikrobiyota tarafından da metabolize olmaları ile biyoyararlı bileşiklerdir (Stevens *et al.* 2019). Gattuso *et al.* (2007) yaptıkları çalışmada narenciye suyunda tanımlanmış ve miktarı belirlenmiş olan flavonoidlerini tablo halinde bildirmişlerdir.

Naringin

Naringin, 4',5,7-trihidroksi flavanon 7-ramnoglikozit, portakal (*Citrus sinensis*), greyluft (*Citrus paradisi*) ve mandalina (*Citrus reticulata*) gibi birçok narenciye meyvesinde yaygın olarak bulunan bir flavanon glikozittir (Şekil 1.15) (Shi *et al.* 2019). Molekül yapısı $C_{22}H_{32}O_{14} \cdot 2H_2O$ olan naringin, eter, kloroform ve benzen gibi çözücülerde çözünmemesine karşın su, alkol, aseton vb çözücülerde farklı derecelerde çözünmektedir (Altan, 1983). Greyfurtta bulunan flavonoidlerin önemli bir kısmını naringin oluşturmaktadır (Erlund, 2004). Mevcut bilimsel yayınlara dayanarak, ticari ve taze greyluft suyunda naringin konsantrasyonu greyluft çeşidi, olgunluğu (Altan, 1983) ve meyve suyu çıkarma yöntemine bağlı olarak 104-867 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (0.179-1.493 mM) arasında değişmektedir (Bodakowska-Boczniewicz and Garncarek, 2019). Greyfurt suyunda naringin konsantrasyonu düşük olmasına rağmen, tüketicilere algılanabilir acı bir tat vermektedir. Turunçgillerin acısı, özellikle greyluft suyu endüstrisi için istenmeyen bir kalitedir (Drewnowski and Gomez-Carneros, 2000; Patil and Dhake, 2014).



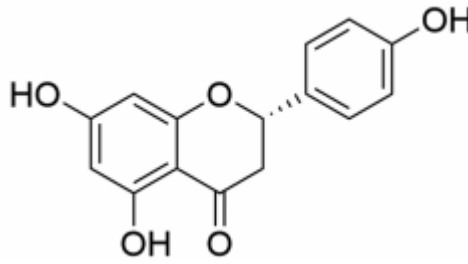
Şekil 16. Naringin kimyasal yapısı

Naringinin *Drynaria fortunei* (Kunze), *Citrus aurantium* L. ve *Citrus medica* L. gibi Çin bitkisel ilaçlarının ana maddesi olarak kullanıldığı belirtilmiştir (Zhang *et al.* 2009). Yapılan birçok çalışmada; naringinin, kardiyovasküler bozukluklar, oksidatif stres, genetik hasar ve nörolojik rahatsızlıklar üzerindeki etkileri gibi farmakolojik özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Ahmed *et al.* 2019; Bharti *et al.* 2014; Raja Kumar *et al.* 2019; Lavrador *et al.* 2018; Viswanatha *et al.* 2017). Bunların yanı sıra Luo *et al.* (2012) yaptıkları *in vivo* çalışmada, naringin ve naringenin çeşitli solunum yolu modellerinde solunum rahatsızlığı ve öksürük refleksini önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. Narenciye meyve kabuklarının flavonoid içeriğinin yüksek olması sebebiyle bazı tarımsal atıklara uygulanabilen basit ve verimli yöntemlerle naringinin ekstraksiyonu ve saflaştırılması gerçekleştirilebilmektedir. Böylece elde edilen saf haldeki naringin bazı ilaç formülasyonlarında kullanılabilmekte veya enkapsüle edilebilmektedir (Chen *et al.* 2016).

Naringenin

Naringenin (4,5,7-trihidroksi-flavanon), oksijenli bir heterosikle oluşturan, yani bu heterosikle yapıda doymuş 3-karbon zinciri ve karbon 4'te bir oksijen atomu içeren ve böylece doğrusal 3 karbon zinciriyle (C₆-C₃-C₆) birleştirilen 2 aromatik halkanın ortak yapısını paylaşan flavonoid grubu bir flavanondur (Şekil 17) (Den Hartogh and Tsiani, 2019). Kimyasal olarak 2,3-dihidro-5,7-dihidroksi-2- (4-hidroksifenil) -4H-1-benzopiran-4-on olarak adlandırılan naringenin, C₁₅H₁₂O₅ molekül yapısına sahiptir (Salehi *et al.* 2019). Suda çok az miktarda çözünebilen naringenin, etanol, dimetil formamid ve dimetil sülfoksit gibi organik çözücüler içinde serbestçe çözünmektedir (Joshi *et al.* 2018). Naringenin, naringin veya narirutin gibi flavanonların hidrolizinden türetilmektedir (Wilcox *et al.* 1999). Greyfurt ve limon gibi narenciye meyveleri naringenin bakımından oldukça zengindir. Önerilen günlük naringenin veya flavonoid alımı tam olarak belirlenmemiş olsa da Kuhnau (1976) tarafından yapılan bir araştırmaya göre ABD nüfusu arasında tahmini günlük flavonoid alımı 1 g /gün'dür. Bununla

birlikte, günlük alınması gereken flavonoid miktarı ile ilgili Chun *et al.* (2007) yaptıkları çalışmada naringenin dahil günlük flavonoid alım miktarının etnik kökene ve yerleşim yerlerine bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Esas olarak narenciye meyvelerinde bulunan ve miktarına bağlı olarak en yoğun sırasıyla greyfurt, portakal ve limon da belirlenen naringenin, çoğunluklu olarak meyve ve sebze bazlı gıdalardan alınabildiğinden dolayı Akdeniz diyetinde alımı fazladır (Totta *et al.* 2004). Bunun yanısıra naringin ve diğer naringenin glikozidlerinin, propolis (Choi *et al.* 1991) ve yabani şeftali olarak bilinen *Prunus davidiana* (Nagy *et al.* 1985) dahil olmak üzere farklı kaynaklarda da mevcut olduğu bildirilmiştir. Şekil 1.16'da naringenin kimyasal yapısı verilmiştir (Shi *et al.* 2019).



Şekil 17. Naringenin kimyasal yapısı

Naringenin genellikle β -glikozitlere (örneğin, naringin) bağlı olarak gıdalarda bulunduğu, başlangıçta diyetten alım ile emilimin olmayacağı düşünülmesine rağmen daha sonra yapılan birçok çalışma, oral dozlarda saf naringin veya greyfurt suyu ile alımdan sonra insan idrarında ve plazmada naringenin tespit edilmiştir (Fuhr and Kummert, 1995; Ameer *et al.* 1996; Lee and Reidenberg, 1998). Hem pasif difüzyon hem de aktif taşıyım ile gerçekleşen naringenin emilimi oral uygulamadan sonra, gastrointestinal sisteminde tam manasıyla emilemediği belirtilmiştir (Zang *et al.* 2015).

Naringenin'in çeşitli hayvan modellerinde ve hücre kültürleri üzerinde yapılan çalışmalarda antioksidan aktivitesi belirlenmiştir. Naringenin'in başlıca etkileri arasında ksantin oksidaz, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz, lipooksijenaz ve siklooksijenaz gibi prooksidan enzimlerin inhibisyonu ve en önemlisi serbest radikallerin temizlenmesi yer almaktadır. Ayrıca naringenin, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi çeşitli antioksidan enzimlerin fizyolojik seviyesini arttırmakta olup peroksinitrit ile taşınımı kolaylaştırılan protein nitrasyonunu ve oksidasyonu azalttığı da bilinmektedir (Wang *et al.* 2010). Naringin ile karşılaştırıldığında, naringenin daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmektedir. Aynı zamanda iyonik metallerin şelasyonunun ve lipidlerin neden olduğu oksidatif zarara karşı koruyucu etkisinin daha yüksek olduğu belirtilmektedir (Cavia-Saiz *et al.* 2010).

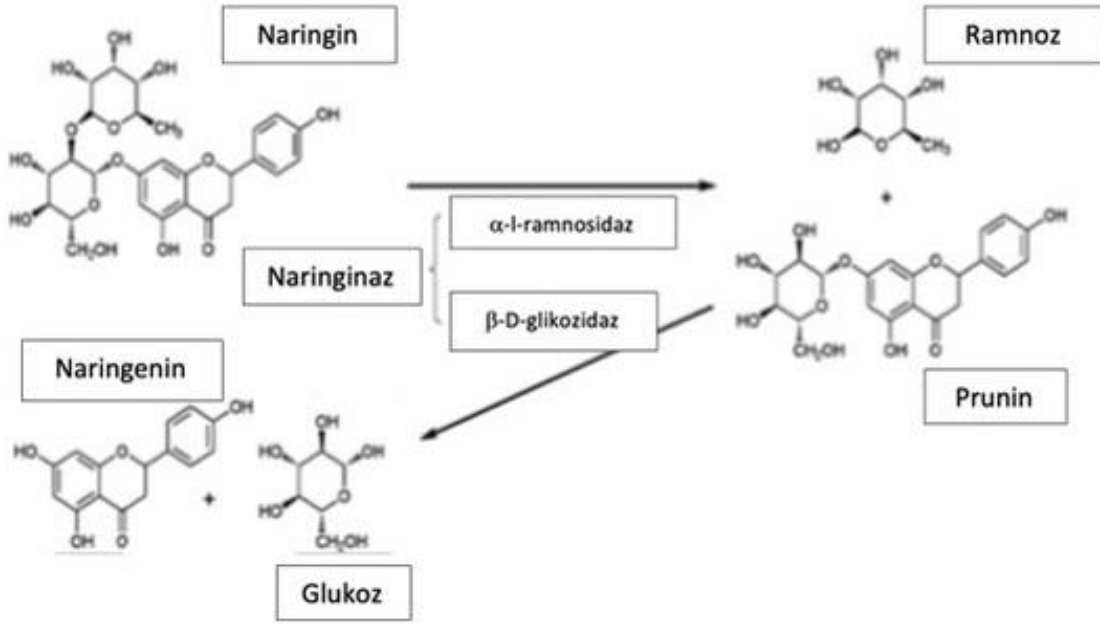
Bunların yanısıra naringenin antiinflamuar (Hollman and Arts, 2000), immunomodulator (Zeng *et al.* 2018), hepatoprotektif (Borradaile *et al.* 2003), nefroprotektif, nöroprotektif (Ding *et al.* 2019), anti-kanser (Totta *et al.* 2004), anti-aterosklerotik ve antidiyabetik (Den Hartogh and Tsiani, 2019) özellikleri üzerine çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Annadurai *et al.* (2012) yaptıkları çalışmada naringenin (50 mg /kg), glikosile hemoglobindeki açlık kan şekeri azaltması ve serumdaki insülin konsantrasyonunu arttırmasıyla antihyperglisemik etki gösterdiği ve bu antihyperglisemik etki ile standart bir antidiyabetik ilaç olan gliclazide'e benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir. Aynı şekilde Sahu *et al.* (2020) naringenin, sıçanlarda karaciğer ve böbrek hasarına bağlı antitüberküloz ilaçları hafiflettiğine dair yaptıkları çalışmanın sonucu olarak, naringenin antitüberküloz ilaçlarına bağlı hepatorenal hasara karşı koruyucu bir role sahip olduğunu tespit etmiş olup, bu ilaçların neden olduğu hepatorenal hasarı azaltmak için gıda olarak naringenin takviyesi almanın faydalı olabileceğini belirtmişlerdir. Naringenin ilaç aktivitesini arttırıcı veya etkin madde olarak kullanımını bildiren son zamanlarda yapılmış birçok çalışma mevcuttur (Burkina *et al.* 2016; Pinho-Ribeiro *et al.* 2016; Hernández-Aquino and Muriel, 2018; Wojnar *et al.* 2018; Bussmann *et al.* 2019; Liu *et al.* 2019; Zhao *et al.* 2019; Chin *et al.* 2020). Bitki genetiği, çevre koşulları (toprak ve ışık), çimlenme, olgunluk derecesi, işleme ve depolama gibi birçok faktörden etkilen naringenin, yapılan çalışmalarda minimum dozunun alınması bu bileşiğin sağlık üzerine etkili olabilmesi için gerekmektedir (Joshi *et al.* 2018).

Naringinaz Enzimi

Greyfurtun meyve suyuna işlenmesinde naringinden kaynaklanan acı tat, pazarlama sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Acılığın giderilmesinde bazı fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılabilir. Fakat bu yöntemler meyve suyuna işleme esnasında, giriş bölümünde de belirtildiği gibi bazı dezavantajlar sahip olup meyve suyu bileşiminde sınırlı da olsa bazı değişimler meydana getirmektedirler. Bu amaçla alternatif yöntem olarak enzim uygulaması araştırılmış ve naringenin, naringinaz enzimi ile parçalanmasından faydalanılmıştır (Soares and Hotchkiss, 1988; Puri and Banerjee, 2000; Birgisson *et al.* 2006; Puri *et al.* 2010b). Naringinaz uygulaması, greyfurt suyunun sağlık üzerine olumlu etkilerini korurken organoleptik özellikleri geliştirmesi nedeniyle umut verici bir yöntemdir (Caraveo *et al.* 2014). Naringinaz, α -L-rhamnosidaz (EC 3.2.1.40) ve β -D-glukosidaz (EC 3.2.1.21) enzimlerinin birlikte aktivite gösterdiği bir enzim kompleksidir (Puri, 2012). Naringinaz, naringenin yanısıra, hesperidin, kuersetin, diosgen ve rutin gibi birçok glikoziti hidrolize edebilmektedir (Gattuso *et al.* 2007; Vila-Real *et al.* 2010). Ayrıca, naringenin gibi hidrolize ürünlerin sağlığı geliştirici

özellikleri nedeniyle, farmasötik, kozmetik ve gıda uygulamalarında yararlı olabilmektedir (Vila-Real *et al.* 2010).

Naringinaz, naringinin, α -L-ramnosidaz aktivitesi ile ramnoz ve prunine, daha sonra, β -D-glukosidaz aktivitesi ile prunini glikoz ve naringenine hidrolizini katalize etmektedir. Şekil 18’de naringinin naringenin ve glikoza, naringinaz enziminin katalizörlüğünde hidrolize edilmesi şematize edilmiştir (Ribeiro, 2011; Puri, 2012; Caraveo *et al.* 2014). Yapılan çalışmalarda naringinaz, adlandırılmasında ramnosidaz adı olarak kullanılabilir.



Şekil 18. Naringinin naringinaz enziminin etkisiyle naringenine hidrolize edilmesi

Naringenin, naringine göre daha az acı olan bileşiktir. Naringinazın bu işlevi, başta greyfurt olmak üzere narenciye sularında acılığın giderilmesi ve tüketicilerin kabulünün yanı sıra sağlık özelliklerinin korunması için de kullanılabilir (Bodakowska-Boczniewicz and Garncarek, 2019)

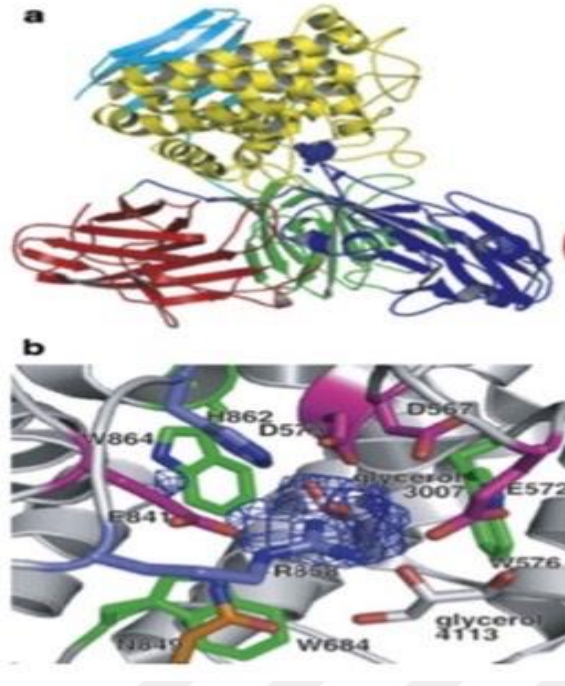
Naringinazın kereviz tohumları (Hall, 1938), greyfurt yaprakları (Thomas *et al.* 1958), cehri bitkisi (*Rhamnus daurica*) (Suzuki, 1962) ve karabuğday (*Fagopyrum esculentum*) (Bourbouze *et al.* 1976) gibi bitki kaynaklarından izole edilebildiğine dair çalışmalar mevcut olmasına rağmen sadece bitkisel kaynaklı naringinazın endistriyel üretim için uygun olmadığı bildirilmiştir (Puri, 2012). Tablo 2’de naringinaz enzimi üretimi amacıyla araştırılan mikroorganizmalar verilmiştir.

Tablo 2. Naringinaz Üretimi Amacıyla Araştırılmış Mikroorganizmalar

	Mikroorganizma	Kaynak
Küfler	<i>Aspergillus niger</i>	Bram and Solomons 1965
	<i>Penicillium sp.</i>	Young <i>et al.</i> 1989
	<i>Aspergillus niger</i>	Manzanares <i>et al.</i> 1997
	<i>A. aculeatus</i>	Manzanares <i>et al.</i> 2001
	<i>A. nidulans</i>	Orejas <i>et al.</i> 1999
	<i>Aspergillus terreus</i>	Gallego <i>et al.</i> 2001
	<i>Rhizopus nigricans</i>	Shanmugam and Yadav 1995
	<i>Aspergillus niger</i> (MTCC1344)	Puri <i>et al.</i> 2005
	<i>Penicillium decumbens</i>	Mamma <i>et al.</i> 2004
	<i>Aspergillus niger</i> (BCC 25166)	Thammawat <i>et al.</i> 2008
	<i>Aspergillus kawachii</i>	Koseki <i>et al.</i> 2008
	<i>Penicillium ulaiense</i>	Rajal <i>et al.</i> 2009
	<i>Aspergillus sojae</i>	Chang <i>et al.</i> 2011
	<i>Aspergillus oryzae</i> 11250	Zhu <i>et al.</i> 2017
	<i>Penicillium Purpurogenum</i>	Patil and Dhake, 2014
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> MTCC 1344	Shanmugaprakash <i>et al.</i> 2015
	<i>Rhizopus stolonifer</i>	Karuppaija <i>et al.</i> 2017
	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> ATCC 18648	Housseiny and Aboelmagd, 2019
Mayalar	<i>Aspergillus tubingensis</i> MN589840	Xia <i>et al.</i> 2021
	<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem MTCC 2425	Borkar <i>et al.</i> 2020
	<i>Hanshula anomala</i> , <i>Debaryomyces polymorphus</i>	McMahon <i>et al.</i> 1999
	<i>Pichia angusta</i> X349	Yanai and Sato 2000
Bakteriler	<i>Cryptococcus laurentii</i>	Lei <i>et al.</i> 2011
	<i>Cryptococcus albidus</i>	Borzova <i>et al.</i> 2018
	<i>Bacteriodes distasonis</i> , JY-1	Jang and Kim 1996
	<i>Thermomicrobium roseum</i>	Jang and Kim 1996
	<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	Miake <i>et al.</i> 2000
	<i>Clostridium stercorarium</i>	Zverlov <i>et al.</i> 2000
	<i>Bacillus sp.</i> GL1	Hashimoto <i>et al.</i> 2003
	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Hashimoto and Murata 1998; Miyata <i>et al.</i> 2005
	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Cardona <i>et al.</i> 2006
	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	Mazzaferro <i>et al.</i> 2008
	<i>Lactobacillus ulaiense</i>	Rajal <i>et al.</i> 2009
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Beekwilder <i>et al.</i> 2009
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Avila <i>et al.</i> 2009
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Puri <i>et al.</i> 2010a; Puri <i>et al.</i> 2011
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Michlmayr <i>et al.</i> 2011
	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	Mukund <i>et al.</i> 2014
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 11568	Zhu <i>et al.</i> 2017

Naringinazın biyokimyasal karakterizasyonu esas olarak *Aspergillus niger* (Manzanares *et al.* 1997; Puri *et al.* 2005; Puri, 2012), *Aspergillus terreus* (Gallezan *et al.* 2001; Puri *et al.* 2005), *Aspergillus nidulans* (Manzanares *et al.* 2007) gibi *Aspergillus* türlerinden ticari enzim preparatları üzerinden belirlenmiştir. Yapılan birçok çalışma sonucunda *Aspergillus niger*'in naringinaz aktivitesi için en yüksek verimi sağlayan mikroorganizma olduğu belirlenmiş olup, bu aktivite için uygun pH ve sıcaklık çalışılan mikroorganizmalarda farklılık gösterdiği görülmektedir (Puri, 2012). Chang *et al.* (2011)'un *Aspergillus sojae*'den naringinazın saflaştırılması ve karakterizasyonu amacıyla yaptıkları çalışmada, enzimin pH 5.5-8 aralığında kararlı olduğu, optimum pH 6'da ve 37°C'de en uygun aktivite gösterebildiğini belirlemişlerdir. Puri *et al.* (2011) bir reaktöründe *S. xylosus*'tan naringinaz üretmişlerdir ve uygulanan farklı fiziko-kimyasal parametrelerin etkisi ile optimum pH ve sıcaklık değerlerinin besiyeri ortamına Ca^{2+} ilavesi ile 5.5 ve 30 ° C'lik olduğunu bildirmişlerdir. Topraktan izole edilen *Bacillus amyloliquefaciens* 11568'den bir hücre içi naringinaz saflaştırılması ve karakterize edilmesi üzerine yapılan araştırmada naringinazın aktivasyonu için en uygun pH 7.5 ve sıcaklık 45 °C olarak belirlenmiş olup enzimin kararlılık gösterdiği pH 3.5-8.5 arasında ve 45 ° C'nin altındaki sıcaklıklarda kararlı olduğu belirtilmiştir (Zhu *et al.* 2017). Yukarıda belirtilen birçok mikroorganizma için de yapılan araştırmalarda enzimin optimum aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık aralıkları çok büyük olmamakla birlikte farklılık göstermiştir. Bu sebeple yapılan bu tez çalışmasında enzim, farklı sıcaklık ve pH değerlerinde uygulanmıştır.

Cui *et al.* (2006) yaptıkları çalışma da *Bacillus sp*'den elde edilen α -L-rhamnosidaz'ın önemli aktivitelerinden birinin 3D yapısını belirlemişlerdir. *Bacillus sp.* çökeltici olarak buhar difüzyon tekniği kullanılarak 20 °C'de kristalleştirmişlerdir. 1.9 Å çözünürlükte tek dalga boyu anormal kırılım ile ramnosidazın X-ışını kristal yapısı *Bacillus sp*'den çözülmüştür. Ramnosidazın, 1.908 amino asit, 43 gliserol molekülü, 4 kalsiyum iyonu ve 1.755 su molekülü içeren kristal yapıda bir homodimer oluşturduğunu belirlemişlerdir. Genel yapı beş alandan oluşmakta olup, bunların dördü N, D1, D2 ve C alanları olarak gösterilen β -sandviç yapılar ve ayrıca A alanı olarak gösterilen bir (α / α) 6-silindir şeklinde yapı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1.18). Ayrıca enzimin, glikozit hidrolaz (GH) ailesine ait 78 enzime özgü katalitik mekanizmaya uyabildiği bildirilmiştir.



Şekil 19. Ramnoz ile kompleks halinde ramnosidazın (α Rha) üç boyutlu yapısı **(a)** α Rha-Rha'daki (şerit stereodiyagram) monomerin genel yapısı

Kırmızı alan N, mavi alan D1, yeşil alan D2, sarı alan A, açık mavi alan C'dir. A alanındaki ramnoz molekülüne karşılık gelen N2.5σ'nın dahil edilmeyen kısmı ince mavi çizgiler olarak gösterilmektedir. **(b)** Ramnoz molekülünü çevreleyen amino asit kalıntıları (stereo diyagram). Alan A'daki ramnoz molekülüne karşılık gelen 3 sigmada şekillenmiş ve dahil edilmeyen bölge ince mavi çizgiler ile gösterilmiştir (Cui *et al.* 2007)

Son gelişmelerle birlikte, enzim teknolojisi hem enerji hem de malzeme tüketimini azaltan ve böylece atık oluşumunu en aza indiren kimyasal işlemlere bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu durum naringinazın biyoteknolojide endüstriyel kullanımlar için uygun olduğunu göstermektedir. Naringinaz uygulamaları, esas olarak naringinazın gıda ve ilaç endüstrisinde hidrolitik aktivitesine dayanmaktadır. Naringinazın genel olarak kullanılabildiği alanlar aşağıda özetlenmiştir.

- Gıda katkı maddelerinin üretimi ile ilgili olarak ramnosidaz, biyopolimerlerden gıda katkı maddelerinin hazırlanmasında ve ayrıca tatlandırıcı üretiminde kullanılabilmektedir (Giavasis *et al.* 2000).
- Domates posası sindirimi: *L. plantarum*'dan elde edilen ramnosidazların flavonoid rutinosidler (domatesden rutin gibi) iyi absorbe edilmiş glikozitlere dönüştürdüğü belirlenmiştir. Bu aktivite probiyotik laktobasillerin bağırsak mikroflorasında bulunduğu zaman flavonoid biyoyararlanımını artırabileceğini göstermektedir (Beekwilder *et al.* 2009).
- Pruninin hazırlanması: Prunin, DNA/RNA virüslerine karşı anti-enflamatuar ve antiviral aktiviteye sahip olduğu Kaul *et al.* (1985) tarafından bildirilmiş olup piruninin, diyabet tedavisinde bir tatlandırıcı ajan olarak kullanılabildiği aynı

şekilde naringinaz katalizörlüğünde elde edilen naringenin'in doğal flavonon glikozidinin, hayvan modellerinde gastrik mukozal ülserasyonu önlediği de bildirilmiştir (Puri, 2012). Naringenin'in yukarıda sağlık üzerine olumlu etkileri detaylı bir şekilde belirtilmiştir.

- Aroma arttırmada: Naringinazın ramnosidaz aktivitesinin şarap yapımı sırasında aromayı kuvvetlendirmek için uygun olduğu Gallego *et al.* (2001) tarafından bildirilmiş olup, yaptıkları çalışmada, şarap aromasının artırılması için enzimin katı bir taşıyıcıya sabitlenerek immobilizasyonunu sağlamışlardır.
- Enzim kullanılarak ilaç ön maddesinden ilaç üretimi gerçekleştirilebilmektedir. Örneğin, ilgili maddenin ramnoz ile kaplı olduğu durumlarda ramnosidaz enzimi maddenin aktive olabilmesi için etkili olabilmektedir (Robinson *et al.* 2004).
- Naringinaz, benzersiz özel yağ asitlerinin sentezini sağlayan glikolipidleri hidrolize etmek için kullanılmıştır. Bir di-ramnolipid, *P. decumbens*'ten üretilen naringinaz enzimi ile bir mono-ramnolipid ve L-ramnoza ayrılmaktadır (Magario *et al.* 2009).
- Ayrıca naringinaz enziminin meyve suyundaki acılığı gidermek için, naringini hidrolize ettikten sonra ortamdaki kolay bir şekilde uzlaştırılabilmesi ve kullanım kolaylığı için, enzimin immobilizasyonu üzerine birçok çalışma yapılmış olup araştırmalar halen devam etmektedir. (Puri and Banerjee 2000; Prakash *et al.* 2002; Busto *et al.* 2007; Ferreira *et al.* 2008; Puri *et al.* 2008; Puri *et al.* 2010b; Lei *et al.* 2011; Ribeiro, 2011; Awad *et al.* 2016; Huang *et al.* 2017; Bodakowska-Boczniewicz, 2019; Housseiny *et al.* 2019; Zhang *et al.* 2020).

Naringinaz Üretimi İle İlgili Araştırmalar

Bram and Solomon (1965) yaptıkları çalışmada, *Aspergillus niger*'den naringinaz enzimini elde etmiş ve enzim aktivitesini artıracak bazı faktörleri incelemişlerdir. *A. niger*'in malt özü ortamında mükemmel bir büyüme elde ettiği, fakat enzim veriminin yüksek olmadığını görmüşlerdir. Farklı bir ortam oluşturmak için Czapek-Dox besiyerini kullanan Bram and Solomon (1965), bu besiyerinde karbon kaynağı olarak glikoz, sakkaroz, laktat veya sitrat gibi tuzlar ve %0.1 oranında naringin ilavesinde büyüme meydana geldiğini, fakat yine enzimin aktivite göstermediğini belirtmişlerdir. Soya fasulyesi unu-maya özü ve mısır likör-maya özü ortamlarının her ikisinde de *A. niger*'in yüksek enzim aktivitesine sahip olduğunu belirtmişlerdir. İncelenen ortamların tümü mikroorganizmanın iyi gelişmesini desteklese de sadece karbon kaynağı olarak peptonlu ortamların ölçülebilir enzim aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca enzim üretiminin pH 4.5 ile 7.5 aralığında çok az etkilendiğini, ancak 4'ün altındaki pH değerlerinde verimin belirgin bir şekilde düştüğünü ifade etmişlerdir.

Puri (2012), naringinaz üzerine yapılan birçok çalışmayı bir araya getirip, enzimin bakteriyel üretimi ve potansiyel biyoteknolojik uygulamalarını tartışmıştır. Yapılan derlemede, çeşitli bakterilerden birçok ramnosidaz kodlayıcı gen tanımlanmasına rağmen, hiçbirinin enzim ticari üretimi için kullanılmadığı belirtilmiştir.

Manzaranes *et al.* (1997), *A. niger*'den α -L-ramnosidazın ticari olarak saflaştırılmasında anyon değişim kromatografisi kullanmışlardır. Yapılan çalışmada enzimin pH 4.5 ve 65 °C sıcaklıkta en iyi aktiviteyi gösterdiği belirtilmiştir.

Puri and Kalra (2005)'de *A. niger* 1344 suşundan naringinazın saflaştırılması ve karakterizasyonu üzerine çalışma yapmışlardır. Çalışmada enzimin saflaştırılmasında amonyum sülfat çöktürme, iyon değişim kromatografisi ve jel kromatografisi kullanılmıştır. Enzimin moleküler kütlesi, Sephadex G-200 kolonunda jel kromatografisi ile yaklaşık 168 kDa olduğu ve alt birimlerin moleküler kütlesinin, Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile 85 kDa olduğu yapılan çalışmada belirlenmiştir. Çalışmada naringinazın, 37 °C'de 72 saat boyunca stabil olduğu, 40 °C'de 96 saatlik inkübasyondan sonra %50 oranında inaktivasyona uğradığı belirlenmiştir. Bazı elementlerin farklı konsantrasyonlarda bulunmasıyla enzim aktivitesinde değişiklik görüldüğü, fakat Mg^{2+} gibi elementlerin varlığında, 20°C'de depolama ile bir yıl boyunca aktivitenin sabit kaldığı görülmüştür. Çalışma sonucunda enzim için en uygun çalışma ortamının pH 4.0 ve 50°C sıcaklık olduğu ve bu şartlar altında saflaştırılmış enzimin naringini başarıyla hidrolize ettiğini ancak hesperidini edemediğini bildirmişlerdir.

Busto *et al.* (2007)'deki çalışmalarında meyve sularındaki acılığı gidermek için *Aspergillus niger* CECT 2088'den naringinaz üretmiş ve enzimden biyokatalitik olarak aktif boncuklar elde etmek için sıvı nitrojen içinde kriyo-yapılandırılmış olan PVA (polivinilalkol) hidrojelinden oluşan polimerik bir matris içine immobilize etmişlerdir. Ardından yapay bir meyve suyu acı ortamı oluşturularak enzim ilave edilmiş ve immobilizasyon etkinliği üzerine pH ve matriks konsantrasyonunun etkisi araştırılmıştır. Sonuçta immobilize naringinaz enziminin, meyve sularında 20 °C'de 24 saat boyunca uygulanmasının, naringinin hidrolizasyonu için %36 etkinlik gösterdiği bildirilmiştir.

Aspergillus terreus'tan elde edilen alkali ve termostabil α -L-ramnosidaz üzerine çalışan Gerstorferová *et al.* (2007) çalışmalarında, *A. terreus*'tan alınan gen ile rekombinant olarak *Pishia pastoris* mayasına aktarmışlardır. α -L-ramnosidaz, *P. pastoris* mayasında üretilmiş ve saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Yapılan çalışmada amacın, enzim üretimini daha kısa sürede gerçekleştirmek, enzim veriminde dört kat artışa ve doğal üretim sistemine kıyasla

istenmeyen β -D-glukosidazın bulunmamasını sağlamak olduğu bildirilmiştir. Bu enzimin, çeşitli rhamnoz içeren yapıların sentezi/ hidrolizinde uygulanabilir olduğu ortaya konulmuştur.

Birgisson *et al.* (2007) yaptıkları çalışmada, rekombinant *Escherichia coli*'den elde edilen termostabil α -L-rhamnosidaz'ın immobilizasyonu yapılmıştır. Çalışma, *E. coli* hücrelerinin immobilizasyonu için Ca^{2+} alginat boncukları kullanılmıştır. Hücreler için en uygun pH'nın 7.8 ve sıcaklığın 60 °C olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmada ayrıca naringin hidrolizi ve naringinden L-rhamnoz üretimi için biyoreaktörde ortam oluşturulmuştur. Reaktörün 1 ml/dk ile 50 °C'de çalıştırılmasıyla 7.9 mM naringinin tam degradasyonunu sağlamışlardır.

Puri *et al.* (2010) yaptıkları çalışmada serbest ve immobilize edilmiş enzimlerin, mandalina suyunda naringinin %76'sını ve %67'sinin hidrolizini sağladığını görmüşlerdir. Immobilize rekombinant rhamnosidazın, aktivitesinde kayda değer bir kayıp olmadan dokuz defa hidrolize edebilmeye kadar yeniden kullanımına olanak sağladığını belirtmişlerdir.

Puri *et al.* (2005), *Aspergillus niger* MTCC 1344 ile naringinaz üretimi için proses parametrelerinin optimizasyonu üzerine çalışmışlardır. Yapılan çalışma ile kullanılan çeşitli karbon ve organik azot kaynakları arasında, melas ve peptonun enzim verimi etkinliği için en uygun olduğu bildirilmiştir. Ayrıca metal iyonları ortama eklendiğinde enzim üretim hızı artmıştır. Fermantasyon sırasında ortamdaki şeker konsantrasyonunda 6-10 gL⁻¹ arasındaki artış naringinaz sentezinde azalmaya sebep olduğu görülmüştür. Ortam pH değeri 4.5 ve sıcaklığı 30 °C enzim için en uygun olarak belirlenmiştir.

Chen *et al.* (2013) *Aspergillus aculeatus*'un ürettiği naringinazın, saflaştırılması ve karakterizasyonunu çalışmışlardır. Karakterizasyon sonucu, α -L-rhamnosidaz ve β -D-glukosidaz alt birimlerinin tümünün yaklaşık pH 4 ve 50 °C sıcaklıkta en uygun aktivitelere sahip olduğunu, ayrıca pH 3 ve pH 6 ile 50°C'nin altındaki sıcaklıklarda enzimlerin stabil olduğunu belirtmişlerdir.

Aspergillus niger'den naringinaz enziminin üretilmesi ve karakterize edilmesi üzerine yaptıkları çalışmada Ni *et al.* (2012), bu enzimin narenciye suyuna ilave edilip, acılığı gidermesi için ne kadar etkin olduğunu değerlendirmişlerdir. Çalışmada enzimin pH 4.5'te aktif, pH 5.0'te stabil olduğunu bildirmişlerdir. Optimum çalışma sıcaklığının ise 45-55 °C arasında olduğunu belirtmişlerdir. Üretilen enzime ayrıca dondurularak kurutma ve sprey kurutma işlemleri uygulanmış olup en iyi verimin sprey kurutmada görüldüğü bildirilmiştir.

Penicillium decumbens PTCC 5248'den naringinazın üretimi ve kısmi saflaştırılması üzerine Norouzian *et al.* (2000)'ün yaptıkları çalışmada, küf besiyerinde karbon kaynağı olarak naringinin kullanıldığı bir ortamda mikroorganizmanın naringinaz ürettiğini görmüşlerdir.

Naringinaz aktivitesi için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 4.5 ve 55 ° C olarak belirlenmiş olup sitrik asit, glikoz, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} ortamda bulunmasının naringinaz aktivitesini inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Ribeiro and Ribeiro (2008) HPLC metodu ile doğal ve ticari narenciye sularına naringinaz ilavesinden sonra, naringin ve naringenin miktarını belirlemiş ve kontrolünü sağlamışlardır. Naringinaz enzimi ilavesi ile gerçekleştirilen bu çalışma da enzim ilavesi sonucunda meyve suyuna acılık veren bu maddelerin önemli oranda azaldığı bildirilmiştir.

Aspergillus niger'den naringinaz enziminin üretimi için katı hal fermantasyonunu kullanan Shanmugaprakash *et al.* (2011), meyve sularındaki acılığı gidermede ve *Aspergillus niger* gelişimini sağlamada kullanılan substratlar arasında en uygununun pirinç kepeği olduğunu belirlemişlerdir.

Zhang *et al.* (2018) turunçgillerin üretildiği topraklardan izole edilen *Alternaria alternata* SK37.001'dan intraselüler α -L-ramnosidaz üretimi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Enzimin moleküler kütlesi SDS-PAGE ile bakıldığında 66 kDa, jel filtrasyon kullanıldığında 135 kDa olarak belirlenmiştir. Optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 5.5 ve 60 °C olduğu bildirilmiştir. Çalışmada enzim üretimi için uygulanan farklı pH ve sıcaklık değerleri sonucu, pH 4.0- pH 8.0 arasında enzimin nispeten kararlı olduğu, bununla birlikte 30-50 °C sıcaklık aralığında en uygun aktiviteyi gösterdiği belirlenmiştir. Üretilen α -L-ramnosidazın, kuersitrin, naringin, neohesperidin, hesperidin ve ramnoz içeren glikozitleri hidrolize edebildiği, ancak ginsenosid Rg2 veya saiko-saponin C gibi bileşikleri hidrolize edemediğini tespit etmişlerdir.

Soares and Hotchkiss (1998), yaptıkları çalışmada immobilize naringinaz ile iç yüzeyi muamele edilmiş ambalaj içine doldurulan greyfurt suyundaki acılığın azalma oranı tespit edilmiştir. Aynı şekilde greyfurt suyundaki naringin içeriğini düşürmek için Nobile *et al.* (2003) bir food-grade aktif film geliştirmişlerdir. Aktif film tümüyle immobilize naringinaz içeren çapraz bağlı bir matriks içerdiğini bildirmişlerdir. Bunlarla birlikte naringinazın acılık gidermesi üzerine aktif ambalaj kullanımı üzerine araştırmalar devam etmektedir.

Patil *et al.* (2019) potansiyel naringinaz üreten mikroorganizmalar için yeni bir tarama yöntemi geliştirmişlerdir. Yapılan araştırmada, naringinaz üretimi için çok sayıda mikroorganizmanın etkili bir şekilde taranması için basit bir plaka tespit yöntemi tasarlanmıştır.

Bodakowska-Boczniewicz and Garncarek (2019), greyfurt suyundaki acılığı gidermek için *Penicillium decumbens*'ten naringinaz enziminin elde edilmesi ve kitosan mikrosferi kullanılarak enzimin immobilizasyonu üzerine çalışmışlardır. Araştırma da hem serbest hem de immobilize naringinazın optimum aktiviteyi pH 4'de gösterdiğini ve serbest enzim için en

uygun sıcaklık değerinin 70 °C immobilize enzim için de 40 °C olduğunu tespit etmişlerdir. Enzimin immolizasyonu için kullanılan kitosan mikrosferinin optimum aktivite sıcaklığını düşürdüğü bildirilmiştir. Bu durumun, enzimin immobilizasyonunda kullanılan kitosan mikrosferinin protein konformasyonunda değişikliğe sebep olmasından kaynaklanabildiği belirtilmiştir. Ayrıca enzim uygulamasının naringin konsantrasyonunda %75 bir azalma sağladığı da bildirilmiştir.

Housseiny and Aboelmagd (2019) *Trichoderma longibrachiatum* tarafından naringinaz enziminin üretilmesi ve enzimin, narenciye sularında kullanılmak için termal stabil biyopolimerler olan kitosan ve aljinat ile nanoenkapsüle edilmesini araştırmışlardır. Sonuçta, aljinat biyopolimerine kıyasla kitosanın daha yüksek enzim aktivitesi sağlamış olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmada optimum pH değerleri serbest enzimde pH 5 olarak belirlenirken kitosan ve aljinat kaplı enzimler için sırasıyla pH 4 ve pH 5 olarak tesbit etmişlerdir. Aynı şekilde optimum sıcaklık değerleri, serbest enzim, aljinat ve kitosan kaplı enzimler için 40, 45, 55 °C olarak belirlendiğini bildirmişlerdir. Ayrıca bu kapsülasyonun enzimin tekrar kullanımına olanak sağladığını görmüşlerdir. Yapılan bu araştırmada kullanılan matriksin pH, sıcaklık gibi çevresel faktörlerden koruyucu etkisi olduğunu bildiren Housseiny and Aboelmagd (2019), endüstriyel kullanım ve pazarlama için faydalı sonuçlar gösterdiğini belirtmişlerdir.

Aspergillus niger’in Genel Özellikleri

A. niger, organik madde üzerinde aerobik olarak gelişen, siyah sporlar oluşturan filamentsi bir küftür. Doğada hemen hemen her yerde bulunmaktadır. *Aspergillus* türleri hem birincil hem ikincil metabolitleri üretebilmesi sebebiyle ticari önemi en büyük küf türü sayılabilmektedir. *A. niger*’in ilk endüstriyel ölçekli uygulaması 1919 yılında, satış hacmi bakımından glikonik asit gibi diğer metabolitlerden daha yüksek değere sahip, bir organik asit olan sitrik asit üretiminde kullanımıyla gerçekleşmiştir ve hala sitrik asit endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır. Uzun zamandan beri sitrik asit, *A. niger*’den ekstraselüler olarak üretilmekte ve gıda sanayinde yararlanılmaktadır. *A. niger*’den üretilen maddeler Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA) tarafından belirlenen güvenilir maddeler arasında yer almaktadır. *A. niger*, biyoteknolojik ürünlerin üretimlerinde kullanılan en önemli mikroorganizmalardan biridir. *A. niger*’in birçok organik asitleri, enzimleri, bitki büyüme düzenleyici maddelerini, mikotoksinleri ve antibiyotikleri sentezlediği bilinmektedir. *A. niger* ayrıca hem kendisine hem başka organizmalara ait glikoz oksidaz gibi enzimlerin üretimi için kullanılabilir (Schuster *et al.* 2002) Bu kullanımlarda kültür katı yüzey üzerinde değil, ekstraselüler elde edildiğinden dolayı sıvı ortam içinde, biyoreaktörde çoğaltılmaktadır. Bu

özelliklerine ek olarak diğer mikroorganizmalar arasında *A. niger* biyotransformasyonda ve atıkların değerlendirilmesinde önemli bir yer tutmaktadır. *A. niger*, özellikle protein üretimi ve salgılanması açısından günümüze kadar önemi giderek artmış ve en önemli konaklardan biri haline gelmiştir (Li *et al.* 2020).

Probiyotik Bakteriler

Genel bilgiler

Probiyotikler, bağırsak mikrobiyal dengesini koruyarak veya geliştirerek tüketicilerin sağlığına fayda sağlayan canlı mikrobiyal gıda takviyesi olarak tanımlanmaktadır (Fuller, 1989). Başka bir ifade ile probiyotikler, “yeterli miktarda uygulandığında konakçıya sağlık açısından yarar sağlayan canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlanmaktadır (FAO/WHO, 2002). Probiyotik mikroorganizmaların çoğu *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerine aittir. Hem laktobasiller hem de bifidobakteriler, hayvanlarda ve insanlarda normal bağırsak mikroflorasının büyük bir bölümünü oluşturan gram pozitif laktik asit üreten bakterilerdir. Laktobasiller, çubuk şeklinde spor oluşturmeyen bakterilerdir. Laktobasiller, insan ve hayvan mukozal membranları gibi zengin karbonhidrat içeren substratların mevcut olduğu çeşitli habitatlarda, bitki veya bitki kökenli malzemelerde ve bunların yanısıra fermente süt ürünleri ve fermente edici veya bozulan gıdalarda bulunmaktadır (de Vrese and Schrezenmeir, 2008). Bifidobakteriler, hareketsiz, spor oluşturmeyen, değişen bir görünüme sahip çubuk şeklinde bakterilerdir. Çoğu suşu anaerobiktir (Nagpal *et al.* 2012). Bifidobakteriler, insanların yaşamı boyunca normal bağırsak mikroflorasının önemli bir bölümünü oluşturmakta ve yeni doğan bebeklerin dışkılarında ortaya çıkmakta, daha sonra sayıları artmaktadır. Erişkinlerin kolonundaki bifidobakteri sayısı $\log 10^{10}$ - 10^{11} kob/gram arasında olmaktadır, ancak bu sayı yaşla birlikte azalmaktadır (de Vrese and Schrezenmeir, 2008).

Probiyotik bakterilerin faydaları

Probiyotikler, bağırsak mikrobiyotasının modülasyonu yoluyla hem hayvanların hem de insanların sağlığını iyileştirmek için kullanılmaktadır. Gastrointestinal enfeksiyon riskini azaltmak veya bu tür enfeksiyonları tedavi etmek için insan kullanımı için iyi karakterize edilmiş birkaç laktobasil ve bifidobakteri suşu mevcut olmaktadır. Mikrobiyotanın düzenlenmesiyle bağırsak sağlığının iyileştirilmesi, bağışıklık sisteminin uyarılması ve geliştirilmesi, gıdaların biyoyararlılığının artırılması, laktoz intoleransı semptomlarının azaltılması ve riskin azaltılması dâhil olmak üzere probiyotik tüketiminin yararlı etkileri üzerine çok sayıda çalışma bulunmaktadır. (Salminen *et al.* 2005; Kumar *et al.* 2009; Nagpal *et al.* 2010; Kumar *et al.* 2011; Nagpal and Kaur, 2011). Bunların yanı sıra insanlarda,

gastrointestinal (GI) mikrobiyotanın bileşimi ve çeşitliliği dahil olmak üzere bağırsak ve bağırsak dışı hastalıklarda (Cho and Blaser, 2012), kronik inflamasyon (Clemente *et al.* 2018), kardiyovasküler hastalık (Ettinger *et al.* 2014; Koopen *et al.* 2016), depresyon ve anksiyete (Foster and Neufeld, 2013) ve aşırı duyarlılık durumları (Pascal *et al.* 2018) ve metabolik sendromda (Madupu *et al.* 2013; Maruvada *et al.* 2017) önemli bir rol oynamaktadır. *Lactobacillus*, *Bifidobacteria*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactiplantibacillus*, *Limosilactobacillus*, *Lacticaseibacillus* ve *Levilactobacillus* cinslerine ait bakteri türlerinin yanı sıra çeşitli maya suşları probiyotik olarak onaylanmıştır (Rajoka *et al.* 2017). Probiyotik bir suş gastrointestinal kanalda yaşamalı, asit ve safra direnci yüksek olmalı, kolonizasyon için bağırsak epitel yüzeylerine yapışabilmeli, gastrointestinal sistemdeki patojenleri inhibe edebilmeli ve konakçı bağışıklık hücreleri ile ilişki kurabilmelidir (Akman *et al.* 2021). Şekil 20’de probiyotiklerin sağlık açısından faydaları şematize edilmiştir (Nagpal *et al.* 2012).



Şekil 20. Probiyotiklerin faydaları

Probiyotik meyve suları

Probiyotik içeren fermente sebze ve meyve suları, terapötik ürünler için yeni ve umut verici bir yaklaşım olmaktadır (Mattila Sandholm *et al.* 2002). Piyasadaki çoğu probiyotik ürün süt bazlı olduğundan, meyve veya sebze bazlı içecekler laktoz intoleransı veya süt alerjisi olan kişiler için ilgi çekici olmaktadır. Süt bazlı olmayan probiyotik ürünlere yönelik tüketici talebi büyük ölçüde artmıştır. Bu nedenle, sebze veya meyve suyu bazlı probiyotik içeceklerin kademeli olarak gelecekte önemli bir kategori haline geleceği öngörülmektedir. Probiyotik bakteriler, tüketicilere sağlık yararları sağlamak için uygun miktarda canlı olmaları

gerekmektedir. Probiyotik bakteriler, asitlik (pH), oksijen seviyesi, besin eksikliği ve üründe antimikrobiyal maddelerin varlığı gibi birtakım faktörler tarafından inhibe edilebilmektedirler. Meyve ve sebze içeceklerinde probiyotik bakterilerin büyümesi ve canlılığı, kullanılan bakterinin türüne ve suşuna, pH'a ve nihai ürünün laktik asit ve asetik asit konsantrasyonuna bağlı olmaktadır (Shori, 2016). Meyve ve sebzelerde bulunan; mineraller, vitaminler, diyet lifleri ve antioksidanlar probiyotiklerin büyümesi için meyve sularını ideal substratlar haline getirebilecek kaynaklar olmaktadır (Yoon *et al.* 2004). Probiyotikli fonksiyonel meyve suyu bazlı içeceklerin gelişimi, içerdiği geleneksel besinlerin ötesinde sağlığa yarar sağlamalarının yanı sıra tüm yaş grupları için uygun ürünler olduğundan kabul edilebilirlikleri giderek artmaktadır.

Probiyotik bakteriler ve naringinaz

Lactobacillus plantarum gibi bakteriler, yüzyıllardır lahana, salatalık gibi sebzelerin ve bunların yanısıra peynir, yoğurt gibi gıdaların fermentasyon süreçlerinde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca fermentasyon sırasında proteinleri ve lipidleri katabolize etmektedir (Park *et al.* 2021). *Laktobasiller* için özellikle bitki bazlı bir kısım substratların hücre duvarı, flavonoid, antioksidan gibi bileşenlere sahip olduğu gibi polifenollere konjuge bağlı ramnoz şekerler açısından da zengindir. Bu bileşiklerin *Laktobasiller* tarafından kullanılması, ramnoz hidrolitik salınımını katalize eden α -L-ramnosidazın sentezini de sağlamaktadır (Beekwilder *et al.* 2009). Bunun yanısıra *Lactobaciller* naringinaz enzimini de ürettikleri bilinmektedir. Probiyotik bakterilerin enzimleri intraselüler olarak ürettiği ve acılık gidermek için kısmen etkili olabildiği bildirilmiştir (Tran *et al.* 2020). Ancak özellikle *Aspergillus* türleri gibi bazı küf gruplarının ramnosilatlanmış bir flavonoid olan naringin varlığında α -L-rhamnosidazı ekstraselüler olarak ürettikleri yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (Pachl *et al.* 2018; Wang *et al.* 2019).

Gıda endüstrisinde, α -L-ramnosidaz ve β -D-glukosidaz enzimleri meyve sularının acısını gidermek ve karbonhidrat fermentasyonunun ana son ürünü olarak laktik asit üreten gram-pozitif bakteriler olan Laktik asit bakterilerinin (LAB) aromasını arttırmak için de uygulanmaktadır. LAB genellikle güvenli (GRAS) mikroorganizmalar olarak tanınmakta ve güvenli biyokatalizörler olarak kullanılabilir. LAB suşları, fermentasyon sırasında ikincil metabolitlerin deglikosilasyonunda yer alan α -L-ramnosidaz ve β -D-glikozidaz aktivitelerine sahip olmaktadır. Bu enzim aktivitelerine dayalı olarak flavonoid glikozitlerin hidrolizi için LAB kullanılarak biyotransformasyon uygulaması da yapılabilmektedir (Park *et al.* 2021).

MATERYAL ve METOT

Materyal

Çalışma da greyfurt suyu üretimi için kullanılan greyfurt meyveleri, Antalya'da yerel bir işletmeden uygun muhafaza şartları ile temin edilip, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Meyve ve Sebze İşleme Laboratuvarına getirilerek görünür kirlilikler yıkama ile uzaklaştırılmıştır. Daha sonra greyfurtlar hijyenik koşullarda kesilerek Philips HR1861-00 Alu katı meyve sıkacağı ile meyve suları elde edilmiş analizler taze meyve suyu pastörize edildikten hemen sonra yapılmıştır.

Analizlerde kullanılan kimyasallar

İn vitro toplam fenolik analizinde; gallik asit ($C_7H_6O_5$, %97,5- 102,5 (Sigma), sodyum karbonat (Na_2CO_3 , %99,5, Sigma S2127) ve Folin & Ciocalteu's reaktifi (Sigma F9252) kullanılmıştır.

ABTS^{•+} serbest radikal giderme aktivitesi metodunda; 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid) diammonium salt (ABTS^{•+}, ≥98%, Sigma), potasyum peroksidisülfat (Merck), etanol (sigma,) ve standart antioksidantlar; bütillenmiş hidroksi anisol (BHA, Sigma), bütillenmiş hidroksi toluen (BHT, Sigma), 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit (Troloks, Aldrich 23881-3)'den yararlanılmıştır. DPPH• serbest radikal giderme aktivitesi metodunda ise; 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma) ile birlikte yine aynı şekilde etanol (sigma,) ve standart antioksidantlar; bütillenmiş hidroksi anisol (BHA, Sigma), bütillenmiş hidroksi toluen (BHT, Sigma), 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit (Troloks, Aldrich 23881-3) bileşikleri kullanılmıştır.

Mikrobiyal gelişimde kullanılan besiyerleri için; Tween 20 ($C_{58}H_{114}O_{20}$, Merck), DMSO (Dimethyl sülfoksid, ≥99,9%, Merck), nutrient agar (Merck), sabouraud dextrose broth (Merk, 108339), potato dextrose agar (Meck), potato dextrose broth (Meck), MRS broth (Merck), MRS agar (Merck), Pepton (Merck), KH_2PO_4 (Merck), $MgSO_4$ (Sigma), KCl (Merck), $NaNO_3$ (Sigma), Yeast extract (Merck), K_2HPO_4 (Merck), $MnSO_4$ (Merck), glikoz (Merck), sodyum asetat (CH_3COONa , Sigma), amonyum sitrat ($C_6H_{17}N_3O_7$, Merck), kullanılmıştır. HPLC ile naringin ve naringenin konsantrasyonunu belirleme analizi için naringin (Sigma for HPLC) ve naringenin (Sigma for HPLC) standartları kullanılmıştır.

Naringinaz enziminin aktivitesini belirlemek için dietilen glikol (Tekkim), sodyum asetat (CH₃COONa, Sigma), asetik asit (CH₃COOH, Sigma) sodyum hidroksit (NaOH, Sigma) ve saflaştırmada ise Sodyum dodesil sülfat (Sigma-Aldrich), Amonyum persülfat (Sigma-Aldrich), Coomassie brilliant blue G-250 (Sigma-Aldrich), Akrilamid- Bisakrilamid (merck), protein ladder (ABCAM), DEAE Sepharose Fast Flow (Sigma), likid kromatografi kolonu (Supelco) kullanılmıştır.

Naringinaz enzimi için faydalanılan mikroorganizmalar

Naringinaz enziminin ekstraselüler olarak elde edildiği küf ve intraselüler olarak kullanılan probiyotik bakteriler Tablo 3’de belirtilmiştir. Analizlerde kullanılan bu mikroorganizmalar Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji laboratuvarında muhafaza edilen mikroorganizma kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

Tablo 3. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

	Mikroorganizma adı
Küf	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 1688
Probiyotik Bakteriler	<i>Lactobacillus plantarum</i> ACC 54 <i>Lactobacillus plantarum</i> ACC 28 <i>Lactobacillus plantarum</i> 250

Analizlerde kullanılan cihaz ve aletler

Cihaz/Alet Adı	Marka, Model
Isı kontrollü çalkalamalı inkübatör	Edmund Bühler GmbH KS-15
Buzdolabı	Arçelik 5231NF, Türkiye
Çalkalamalı Termostatlı Su Banyosu	JSR, JSSB-30T, Korea
Derin Dondurucu	Arçelik, Türkiye
Etüv Binder	B28,Germany
Hassas Terazi Denver	Instrument TP214, Germany
İnvert Floresan Mikroskop	ebq100-04 Leica ebq 100-04, Germany
Magnetik Karıştırıcı	Hanna Instruments HI 190M-1, UK
Mikro Plaka Okuyucu Spektrofotometre	Biotek Instruments Inc.VT05404-0998,USA
Otomatik Pipetler	Eppendorf, UK
Santrifüj	Beckman Coulter Allegra X-30R, USA
Steril Filtre (0,20-0,45 µm)	Corning, Wiessbaden, Almanya

Steril Kabin	Class I, Hepa Filtreli
Otoklav	Lisa 300B, Italy
Ultra Saf Su Cihazı	Minipure Destup, Korea
Vis-Spektrofotometre	PG Instruments T60V, UK
Vorteks Heidolph	D-91126, Germany
Agaroz jel elektroforezi	Thermo EC 135-90 (yatay)
Mikrodalga Fırın	Beko MD-1500
Soğutmalı santrifüj	Hermle Z 323 K(Germany)
pH metre	Mettler Toledo
Elektroforez Tankı	Bio Rad (dikey)
Derin dondurucu (-85°C'ye kadar)	Sanyo Ultra Low

Metot

Analizler için kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Besiyeri pH değerini ayarlamak için kullanılan çözeltilerin hazırlanması

0,1 M HCl çözeltisi: $M = \% \times d. 10 / MA$ formülünden %37'lik olan HCl molaritesi belirlenmiştir. Daha sonra, $M1 \times V1 = M2 \times V2$ formülünden ne kadar hacim alınacağını belirledikten sonra alınan miktara göre deiyonize su ile hacme tamamlanarak hazırlanmıştır (Cemeroğlu, 2013).

0,1 M NaOH çözeltisi: $M = m / V.MA$ formülünden çözelti için gereken miktar belirlenmiştir. İstenilen deiyonize su hacmi içerisinde belirlenen miktar çözündürülerek 0.1 M NaOH çözeltisi elde edilmiştir (Cemeroğlu, 2013).

Tampon çözeltiler ve naringinaz enzimi aktivite testi için kullanılan çözeltilerin hazırlanması

%0,1 naringin içeren 0.1 M pH 4 asetat tamponu: Molekül ağırlığı 136.08 olan sodyum asetatın 100 ml çözelti hazırlamak için 1.3608 gram tartılıp 90 ml deiyonize saf su da çözündürülmüştür. Daha sonra pH glacial asetik asit ile 4'e ayarlanmıştır. 0,1 gram naringin tartılıp çözelti içerisine katılmış ve mikrodalgada sıcaklık etkisi ile çözündürülmüştür. Çözeltinin üzeri deiyonize su ile 100 ml ye tamamlanmıştır (Puri and Kalra, 2005)

0,02 M pH 4 sodyum asetat tamponu: $M = m / V.MA$ formülünden gereken miktar belirlenmiştir. Belirlenen miktar 100 ml'lik hacim için öncelikle 90 ml deiyonize su da çözündürülmüştür. Daha sonra glacial asetik asit ile pH 4'e ayarlanmıştır. Çözelti deiyonize su ile 100 ml ye tamamlanmıştır (Tran et al. 2020).

Dietilen glikol (%90): 90 ml dietilen glikol alınarak 10 ml deiyonize su ile karıştırılmıştır.

4 M NaOH çözeltisi: $M = m / V$ MA formülünden gereken miktar belirlenmiştir. 100 ml için belirlenen miktar 100 ml deiyonize su içerisinde çözündürülmüştür.

Sepharose 4B-L-Tirozin p-Amino benzoik asit afinite kolonu çözeltileri

Dengeleme ve Yıkama Çözeltisi (0,05 M Na₂HPO₄ pH 5,0): 3,55 gr Na₂HPO₄ tartıldı, 400 mL saf suda çözüldü, pH metre ile pH değeri 5 olarak ayarlandı. Daha sonra toplam hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlanmıştır.

Elüsyon Çözeltisi (Tris/HCl 0,8 M Askorbik asit pH 8,5): 2,42 gr tris ve 3,96 gr askorbik asit tartılıp 15 mL saf suda çözüldü, pH 7 olarak ayarlandı. Ardından toplam hacim saf su ile 25 mL'ye tamamlanmıştır.

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) çözeltileri

SDS PAGE için Ayırma Jeli: 5 mL 1M Tris-HCl (pH: 8,8), 4,4 mL %30 akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,2 mL %10'luk SDS, 0,13 mL %5'lik TEMED, 0,1 mL %1,5'lik PER ve 3,15 mL saf su karıştırılmıştır.

SDS PAGE için Yığılma Jeli: 0,41 mL 1 M Tris-HCl (pH: 6,8), 0,44 mL %30 akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,03 mL %10'luk SDS, 0,03 mL %5'lik TEMED, 0,1 mL %1,5'lik PER ve 2,450 mL saf su karıştırılmıştır.

Gümüş Boyama Tespit Çözeltisi: 60 mL saf su, 30 mL %90'luk etanol ve 10 mL asetik asit karıştırılmıştır.

Gümüş Boyama Redüksiyon Çözeltisi: 4,8 gr sodyum asetat, 45 mL etanol ve 80 mL saf su karıştırılmış, CH₃COOH ile pH 6'ya ayarlanmıştır. 150 mg sodyumtiyosülfat 3 mL glutraldehit eklenmiştir.

Gümüş Boyama Gümüş Nitrat Çözeltisi: 150 mg AgNO₃, 150 mL saf su, 3 µL formaldehit karıştırılarak boyamadan hemen önce hazırlanmıştır.

Gümüş Boyama Yıkama 1 Çözeltisi: 3,75 g Na₂CO₃, 270 mL saf su 120 µL formaldehit karıştırılarak hazırlanmıştır. **Gümüş Boyama Yıkama 2 Çözeltisi:** 12,5 mL asetik asit, 1 mL gliserin saf su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır.

Gümüş Boyama Yıkama 2 Çözeltisi: 12,5 mL asetik asit, 1 mL gliserin saf su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır.

***Aspergillus niger* ATCC 1688 izolatının geliştirilmesi**

-80°C’de muhafaza edilen saf küf izolatı %0,1 oranında naringin eklenerek hazırlanan Potato Dextrose Agar (PDA) besiyerine öze yardımıyla çizilmiştir. Çizim sonrası küfler 30-32°C’de 72-96 saat süre ile inkübe edilmiştir. Gelişim sonunda yapılan reizolasyon işlemi ile saf kültür tazelenmiştir.

Besiyeri optimizasyonu

Gelişim sağlandıktan sonra katı besiyerinden alınan bir ful lop kültür aşağıda belirtilen özel olarak hazırlanan ve 0,1 M HCl ve 0,1 M NaOH çözeltisi ile pH 4.5 ve pH 6.5’e ayarlanan farklı besiyeri ortamlarına aktarılmıştır (Tablo 4). Daha sonra inkübasyon süresi boyunca her gün pH ve aktivite testi yapılmıştır. Böylece en uygun ekstraselüler enzim aktivitesi gösteren besiyeri ortamı belirlenmeye çalışılmıştır.

Tablo 4. *Aspergillus niger* için pH 4.5 ve pH 6.5’e Ayarlanarak Hazırlanan Farklı Besiyeri Ortamları

1. ortam	g/L	2. ortam	g/L	3. ortam	g/L
KH ₂ PO ₄	1	KH ₂ PO ₄	1	KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄	0,5	MgSO ₄	0,5	MgSO ₄	0,5
KCl	0,5	KCl	0,5	KCl	0,5
NaNO ₃	2	NaNO ₃	2	NaNO ₃	2
Pepton	1	Pepton	1	Yeast Extract	1
Yeast Extract	1	Naringin	1	Naringin	1
Naringin	1				

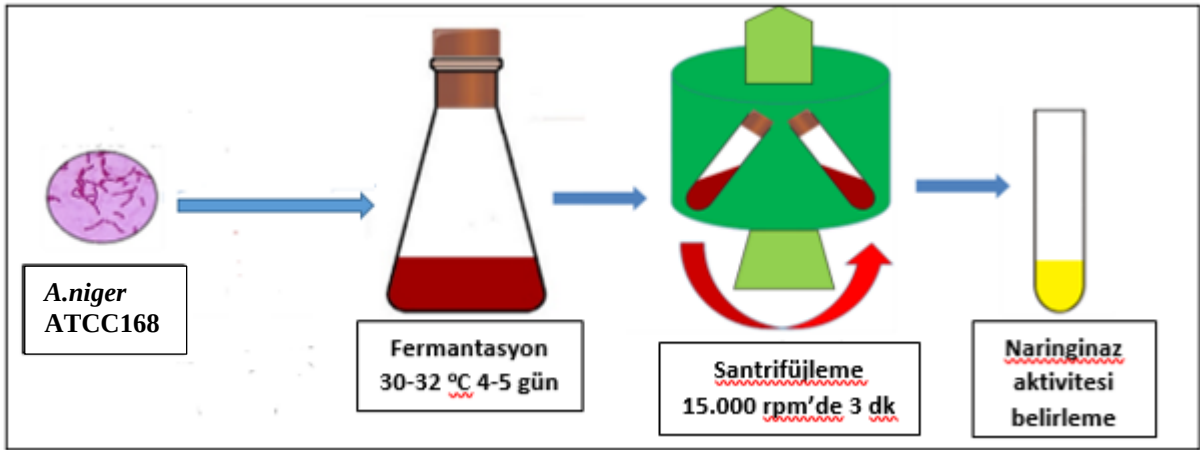
4. ortam	g/L	5. ortam	g/L
KH ₂ PO ₄	1	SDB	30
MgSO ₄	0,5	Naringin	1
KCl	0,5		
NaNO ₃	2		
Naringin	1		

Naringinaz enzim aktivitesinin ölçümü

Enzim aktivitesinin belirlenmesi

Fermentasyondan sonra besiyeri 15000 rpm’de 3 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant, naringinaz aktivitesinin belirlenmesi için toplanmıştır (Şekil 21). Naringinaz aktivitesi için,

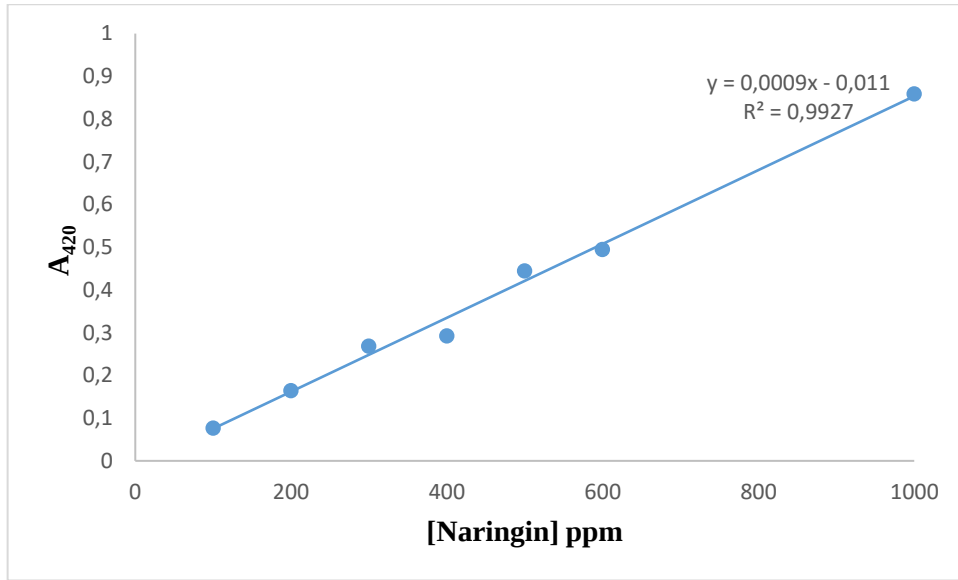
Davis'in (Davis, 1947) spektrofotometrik yöntemine dayalı olarak Puri and Kalra (2005)'in modifiye yöntemi kullanılmıştır. İçinde 0.8 mL %0.1 naringin çözümü 0.1 M asetat tamponu (pH 4.0) ve 0.2 mL kültür filtratı içeren süpernatant, 40 °C'de 60 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra, 2.5 mL %90 dietilen glikole 50 uL inkübe edilen çözeltiden ve ardından 50 uL 4N NaOH ilave edilerek karıştırılmış ve oda sıcaklığında 10 dakika tutulmuştur. Substrat (naringin) ve hidrolize ürünler (prunin, naringenin) reaktif ile reaksiyona girerek sarı renk oluşturur, ancak bunların renk yoğunluğu farklıdır. Sarı kalkonlar spektrofotometrede 420 nm absorbanans dalga boyunda ölçülmüştür.



Şekil 21. Naringinaz aktivitesi belirleme aşamaları

Enzim aktivitesinin belirlenmesi, standart olarak saf naringin kullanılarak hesaplanmıştır. Bir ünite (IU) naringinaz aktivitesi, analiz şartlarında dakikada 1 µmol naringin/ml'yi hidrolize edebilen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Naringin, Davis yöntemiyle hesaplanmıştır (1947). Analizde kullanılmak üzere standart naringin çözeltileri (1000 ppm stok çözelti) hazırlanmıştır. Stok çözelti, 100 mg naringinin 100 ml çözelti (50/50 ml etanol/deiyonize su) içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. 100, 200, 300, 400, 500 ve 600 ppm standart çözeltiler deiyonize su ile hazırlanmıştır. 50 uL numune veya naringin çözeltisine 2.5 mL %90 dietilen glikol ve ardından 50 uL 4N NaOH ilave edilerek karıştırılmıştır. Daha sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir. Elde edilen sarı rengin optik yoğunluğu 420 nm'de ölçülmüştür (Sahota and Kaur 2015). Sonuçlar Şekil 22'de verilen grafiğe göre hesaplanmıştır.



Şekil 22. Standart naringin grafiği

Naringinaz enziminin saflaştırılması

Amonyum sülfat çöktürmesi ile saflaştırma ve diyaliz

Proteinler yapılarında çok sayıda pozitif ve negatif yüklü aminoasit bulundurdıkları için iyonlara benzer şekilde hareket ederler. Proteinleri sulu çözeltilerde çözünür halde tutan, etrafını çevreleyen su molekülleridir. Yüksek tuz konsantrasyonunda proteinlerin etrafını çevreleyen su molekülleri iyonlar tarafından çekilmekte ve böylece proteinler çökmektedir (salting-out). Çökme olayında proteinin iyonik şiddet değeri ve molekül ağırlığı etkilidir. Farklı tuz konsantrasyonlarında farklı proteinler çöker (Lehninger *et al.* 2000; Keha ve Küfrevioğlu 2004). Amonyum sülfat ile kısmi saflaştırma işlemi proteinlerin bu özelliğinden faydalanarak gerçekleştirilmiştir.

Uygun besiyeri ortamında büyütülen ve naringinaz üretimi aktivite ölçümü ile kontrol edilen bakteriler 13000 g'de 1 saat santrifüj edilerek besiyeri ortamından uzaklaştırılmıştır. Süpernatant ile amonyum sülfat çöktürmesi deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla %0-20, %20-40, %40-60 ve %60-80 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Çözünen tuzlu hemolizat 13000 g'de 30 dakika santrifüj edilmiş, çöken kısım minimum miktarda 20 mM pH 6,0 olan sitrat tamponu ile çözülmüştür. Daha sonra her aralık için çöken kısımda aktivite ölçümü yapılmıştır.

Çöktürmede kullanılan katı amonyum sülfat miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

$$g(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = \frac{1,77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3,54 - S_2}$$

V: Enzim çözeltisinin hacmi

S₁: 1'in kesri olarak çözeltideki amonyum sülfat doygunluğu

S₂: 1'in kesri olarak istenen amonyum sülfat doygunluğu

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda yüksek aktivite veren tuzlu çözelti 20 mM pH 6,0 olan sitrat tamponuna karşı 12 saat diyaliz edilmiştir. Diyaliz sonrası aktivite ölçümü ve kantitatif protein tayini yapılmıştır.

Bradford yöntemi ile kantitatif protein tayini

Coomassie brilliant blue G-250 boyası negatif yüklüdür, proteindeki pozitif yüklü aminoasitlere bağlanır. Boyanın proteine bağlanması boyanın kırmızı formunun (λ_{max} 465) mavi forma (λ_{max} 595) dönüşmesini sağlamaktadır. Bu değişim spektrofotometre ile ölçülüp değerlendirilebilir. Yöntemin hassasiyeti oldukça düşüktür (1-100 μg), 2 dakikada gerçekleştirilir, tekrarlanabilir ve renk stabilitesi yaklaşık 2 saat sürmektedir (Bradford 1976).

Naringinaz enziminin iyon değişim kromatografi tekniği ile saflaştırılması

Amonyum sülfat çöktürmesinden sonra diyaliz edilen numune iyon değişim kolonuna (DEAE-Sepharose Fast Flow column) uygulanmıştır. Bu amaçla önce kolon materyali hazırlanmıştır. DEAE-Sepharose Fast Flow bir anyon değiştirici kolondur. Önce kolon materyali homojen oluncaya kadar alt üst edilmiş ve 30 mL kadar alınmıştır. Dibe çökmesi beklenen jelin üstünde kalan sıvı kısım dikkatlice atılmış ve birkaç kere saf su eklenerek aynı işleme devam edilmiştir. Yıkandığı düşünülen jel, kolona doldurulmuş (1,6 x 20 cm), peristaltik pompaya bağlanarak saf su ile yıkanmaya devam edilmiştir. 20 mM pH 6,0 olan sitrat tamponu kolon dengeleninceye kadar uygulanmıştır. Kolondan alınan çözeltinin pH değeri pH 6,0'ya eşitleninceye kadar yıkama işlemine devam edilmiştir. Kolon yıkanıp dengelendikten sonra diyalizden alınan numune kolona uygulanmıştır. Elüsyon işlemi 20 mM pH 6,0 sitrat tamponu içinde gradientli NaCl çözeltisi (0- 1 M) ile gerçekleştirilmiştir. Elüsyon 3 mL'lik fraksiyonlarla tüplere alınmış ve her tüp için A₂₈₀ ve enzim aktivite değeri ölçülmüştür (Chen *et al.* 2013).

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel (SDS-PAGE) elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü

Naringinaz saflaştırıldıktan sonra %3-8 kesikli SDS-PAGE yöntemi Laemmli metoduna göre yapılarak enzimin saflığı kontrol edilmiştir (Laemmli 1970). Bunun için öncelikle

elektroforez plakaları alkol ve su ile yıkanmıştır. Önce ayırma jeli hazırlanarak enjektör yardımıyla üst kısımda 2 cm kalıncaya kadar plakaların arasına doldurulmuştur. Jel polimerize olması beklenmiştir. Yığma jeli hazırlanıp polimerize olan jelin üst kısmında bulunan boşluğa doldurulmuştur ve numunenin koyulacağı kuyucuklarının oluşması için bir tarak dikkatlice yerleştirilmiştir. Yığma jelinin katılaşmasının beklenmesi süresince ıslatılmış bir süzgeç kâğıdı sistemin üzerine kapatılarak jelin kuruması önlenmiştir. Yığma jeli iyice katılaştıktan sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkartılmış ve ardından jel plakalarla birlikte dikkatli bir şekilde elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Elektroforez tankının hem alt hem de üst kısmına yürütme tamponu doldurulmuştur. Daha sonra enzim örnekleri yaklaşık 20 dg protein olacak şekilde hazırlanmıştır. En son toplam hacim 50 dl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katılarak 3 dakika kaynar su banyosunda inkübe edilmiştir. Daha sonra elektroforez tankı kapatılmıştır ve elektroforez tankının alt tarafından (+) anot, üst tarafından ise (-) katot yerleştirilmiş. Numuneler jelin alt sınırına gelinceye kadar önce 80 voltta 20 dakika daha sonra 100 volt'ta yürütülmüştür. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarılmış ve sabitleştirme çözeltisine konulmuştur. Sabitleştirme çözeltisi içerisinde 20 dakika bekletilen jel, daha sonra çıkarılarak çalkalayıcı üzerindeki boyama çözeltisinde 2 saat bekletilmiştir. Süre sonunda boyama çözeltisinden alınan jel, daha sonra yıkama çözeltisine alınıp rengi açılıp, protein bantları belirginleşene kadar çalkalayıcıda bekletilmiştir. Ardından belirginleşen jel fotoğrafı çekilmiştir.

Naringinaz enziminin kinetik ve karakteristik özelliklerinin belirlenmesi

Saflaştırma işlemlerinden sonra elde edilen naringinaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin ölçülmesi amacıyla en az 5 farklı substrat miktarıyla aktivite ölçümü yapılmış, elde edilen sonuçlar ile Lineveawer-Burk grafiği çizilip, hesaplamalar gerçekleştirilmiştir.

Ardından enzimin optimum iyonik şiddet değerinin araştırılması amacıyla 0,01 M, 0,05 M, 0,1 M, 0,5 M ve 1,0 M konsantrasyonlarında asetat tamponu hazırlanarak aktivite ölçümü yapılmıştır.

Naringinaz enziminin optimum pH değeri pH 3,0 ile pH 8,0 arasında aranmış, optimum sıcaklık değeri için ise 20°C ile 70 °C arasında 10'ar derecelik aralıklarla aktivite ölçümü gerçekleştirilmiştir.

Naringinaz enzimi aktivitesi üzerine bazı metallerin etkisinin belirlenmesi

Aspergillus niger ATCC 1688'den saflaştırılan naringinaz enziminin aktivitesi üzerine Mn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , KCl ve $KClO_3$ ' ün etkisini araştırmak amacıyla aktivite

ölçümünde 0,7 mL 0,1 M pH 4,0 olan asetat tamponuna 0,1 mL 1 mM metal çözeltisi eklendi. 0,2 mL enzim çözeltisi ilave edilen karışımın aktivite ölçümü gerçekleştirildi. (Tran *et al.* 2020)

Greyfurt suyuna uygulanan işlemler

Taze sıkılmış greyfurt suyunun pastörizasyonu

Greyfurt suları, pektolitik enzimlerden dolayı bulanıklık kaybına ve içeriğindeki pektinden kaynaklı jel oluşumuna meyillidirler. Ayrıca greyfurt suyunun mikrobiyal olarak bozulmasının engellenmesi gerekmektedir. Bu yüzden greyfurt suyu pastörize edilmelidir. Bu çalışma da taze sıkılmış ve pH değeri 3.40 olan greyfurt suyu cam şişelere doldurulmuş, termostatlı su banyosunda greyfurt suyu sıcaklığı 85-90 °C'ye kadar getirilmiştir. Sıcaklık ölçümü cam şişenin içerisine yerleştirilen termometre ile ölçülmüştür. Greyfurt suyu bu sıcaklıkta yaklaşık 2 dk tutularak pastörize edilmiştir (Cemeroğlu, 2013).

Saflaştırılan naringinaz enziminin meyve suyuna işlenmesi

Taze sıkılmış ve pastörize edilmiş 50 ml greyfurt suyunun sıcaklığı 45-50 °C'ye getirilerek saflaştırılmış enzimden Tablo 5'te verilen üç farklı konsantrasyonda ilave edilmiş ve ardından üç farklı sıcaklıkta enzim aktivitesi için inkübe edilmiştir. Enzim uygulamasından sonra meyve suyunda bazı fizikokimyasal özellikleri ve antioksidan aktivite değişimlerinin belirlenmesi için 1 ve 5 saat olmak üzere iki farklı inkübasyon süresi sonunda greyfurt sularının analizleri yapılmıştır.

Tablo 5. Saflaştırılmış Enzimin Uygulama Şartları

Uygulanan konsantrasyon (ml/50 ml)	İnkübasyon sıcaklığı (°C)	İnkübasyon sıcaklığı (°C)
0.1	25 (1 saat)	25 (5 saat)
	35 (1 saat)	35 (5 saat)
	45 (1 saat)	45 (5 saat)
0.5	25 (1 saat)	25 (5 saat)
	35 (1 saat)	35 (5 saat)
	45 (1 saat)	45 (5 saat)
1	25 (1 saat)	25 (5 saat)
	35 (1 saat)	35 (5 saat)
	45 (1 saat)	45 (5 saat)



Şekil 23. Enzim ilave edilmiş greyfurt suları

Analitik analizler

Suda çözünür kurumadde

Örneklerin naringinaz enzim uygulaması öncesinde ve sonrasında suda çözünür kurumaddesi Abbe refraktometre (WYA-2 W, Shanghai Precision & Scientific Instrument Co. Ltd., Çin) ile Brix olarak belirlenmiştir. (Cemeroğlu, 2013).

pH tayini

Örneklerin naringinaz enzim uygulaması öncesinde ve sonrasında pH ölçümü pH metre (Mettler Toledo Seven Compact™S210) ile ölçülmüştür. pH metre daha önceden pH 4.01, 7.00, 10.00 olan buffer çözeltileri ile standardize edilmiştir.

Titrasyon asitliği tayini

Örneklerin naringinaz enzim uygulaması öncesinde ve sonrasında titrasyon asitliği, Cemeroğlu (2013)'e göre uygulanmış olup, örneklerden 10 ml alınarak 30 ml deiyonize su ile seyreltilmiştir. Seyreltilen örneklere indikatör olarak 3-4 damla fenolfitaleyn ilave edilmiştir. Daha sonra 4 N NaOH çözeltisi ile renk dönünceye kadar titre edilmiştir. Renk dönüşümünün görüldüğü noktada harcanan NaOH miktarı belirlenmiş olup aşağıda verilen formülde sonuç sitrik asit cinsinden hesaplanmıştır.

$$\text{Titrasyon asitliği (\%)} = \frac{(V) \times (f) \times (E)}{(M)}$$

V: Harcanan 0.1 N NaOH miktarı (mL)

f: Titrasyonda kullanılan baz çözeltisinin normalitesi. (Çözeltinin normalitesi tam olarak 0.1 olduğundan f değeri hesaplamalarda 1 olarak alınmıştır)

E: 1 mL 0.1 N NaOH'ın eşdeğeri asit miktarı

M: Titre edilen örneğin gerçek miktarı

Renk değerleri

Taze sıkılmış ve pastörize edilmiş greyfurt sularının başlangıç, enzim uygulanmış ve probiyotik bakteri inoküle edilerek depolanmış örneklerinde renk, Sudraud'un (1958) renk yoğunluğunu (IC), 420 ve 520 nm'de ölçülen absorbans değerlerinin toplamı ve renk tonu, 420 nm'deki absorbansın 520 nm'deki absorbansa oranı olarak kullanılan yöntem ile ölçülmüştür. Kalkan Yildirim (2009)'a göre renk yoğunluğunu (IC') 420, 520 ve 620 nm'de absorbans toplamı olarak tanımlanan metot kullanılmıştır. Aynı zamanda kırmızı, sarı ve mavi renk boyutları, Kalkan Yildirim (2009)'da tanımlanan, L*, a* ve b* tarafından oluşturulan tek tip üç boyutlu bir uzay olan CIELAB uzayı kullanılarak belirlenmiştir. Kolorimetrik koordinatlarda dikey eksen L*, tamamen opak (0) ile tamamen şeffaf (100) arasında bir açıklık ölçüsüdür, ton dairesinde a*, kırmızılık (veya a*: yeşillik) ve b* sarılık ölçüsüdür (veya b*: mavilik). Yani pastörize edilmiş greyfurt sularının renk ölçümleri Kalkan Yildirim (2009)'daki modifikasyonlara göre yapılmıştır. Analiz, microplate spektrofotometre kullanılarak A420 nm, A520 nm, A620 nm absorbans değerlerinde 1 mm hücre yolu uzunluğu kullanılarak spektrofotometrik ölçümler ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizde renk yoğunluğu, renk tonu, kırmızı renk oranı, sarı renk oranı ve mavi renk oranı değerleri;

$$\text{Renk yoğunluğu (IC')} = A420 + A520 + A620$$

$$\text{Renk tonu (T)} = \frac{A420}{A520}$$

$$\text{Kırmızı renk oranı (\%R)} = \frac{A520 \times 100}{IC'}$$

$$\text{Sarı renk oranı (\%Y)} = \frac{A420 \times 100}{IC'}$$

$$\text{Mavi renk oranı (\%B)} = \frac{A620 \times 100}{IC'}$$

Formülleri kullanılarak belirlenmiştir.

Antioksidan aktivite

Naringinaz enzimi ilave edilmiş greyfurt sularında DPPH• serbest radikal giderme aktivitesinin belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlarda naringinaz enzimi ilave edilen greyfurt sularında DPPH• serbest radikal giderme aktiviteleri Balaydın *et al.* (2010)'a göre belirlenmiştir. Etanolde

hazırlanan 1 mM'lık DPPH• çözeltisi serbest radikal çözeltisi olarak kullanılmıştır. Deney tüplerine 25, 50 ve 75 µg/µl konsantrasyon oluşturulacak şekilde örnek (naringinaz enzimi ilave edilen ve edilmeyen) çözeltilerinden üç paralelli olarak aktarılmıştır. Daha sonra toplam hacim etanol ile 2.5 ml'ye tamamlanmıştır. Stok DPPH• çözeltisinden her bir tüpe 1'er ml eklenmiş ve tüpler vortekslenerek karanlık ortamda yarım saat inkübasyona bırakılmışlardır. Absorbanslar 517 nm dalga boyunda köre karşı ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Azalan absorbans değerleri kalan DPPH• çözeltisi miktarını veya farklı bir deyişle serbest radikal giderme aktivitesini vermiştir. Kontrol: 2 ml etanol ve 0,5 ml DPPH• çözeltisinden oluşturulmuştur.

Ayrı ayrı BHA, BHT, Troloksu 25, 50 ve 75 µg/ml konsantrasyonlarda içeren çözeltilerin 517 nm dalga boyunda belirlenen absorbans değerleri kullanılarak % inhibisyon değerleri belirlenmiştir.

$$\% \text{İnhibisyon} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{EKSTRAKT}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

A_{DPPH} ; DPPH• şahit örneğinin absorbans değeri

A_{EKSTRAKT} ; Örnek ekstraktının absorbans değerini ifade etmektedir.

Belirlenen %inhibisyon değerlerine karşı örnek konsantrasyonları bir grafiğe aktarılmış ve lineer regrasyon analizi uygulanarak örneklerle ilişkin eğriler ve denklemlerine ulaşılmıştır. Eşitlikler yardımıyla örnekler ve standart antioksidanların IC₅₀ değerleri (radikalin %50'sinin inhibisyonunu sağlayan konsantrasyon) hesaplanmıştır.

Naringinaz enzimi ilave edilmiş greyfurt sularında ABTS^{•+} giderme ativitesinin belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlarda naringinaz enzimi ilave edilen greyfurt sularında ABTS^{•+} radikali giderme aktiviteleri Köksal *et al.* (2009)'a göre belirlenmiştir. ABTS^{•+} radikalleri; saf su ile 2 mM konsantrasyonda hazırlanan ABTS (2,2'-Azino-bis(3-etilbenzttiyazolin-6-sülfonik asit)) çözeltisine, 2,45 nM potasyum persülfat çözeltisinin ilavesiyle 1 gece oda sıcaklığında ve karanlıkta karıştırarak üretilmiştir. Yüksek antioksidan özellik gösteren greyfurt sularının renk dönüşümünü doğrusal olarak daha kolay belirlenmesi için deney tüplerine 10, 20 ve 30 µg/µl konsantrasyonlarda 3'er paralelli olarak örnek çözeltilerinden aktarılmış daha sonra toplam hacim etanol ile birlikte 1,5 ml'ye tamamlanmıştır. Ardından her bir tüpe 0,5'er ml ABTS^{•+} çözeltisi ilave edilmiştir. Vortekslenip oda sıcaklığında ve karanlıkta yarım saat inkübe edilen numunelerin absorbansları 734 nm dalga boyunda köre karşı ölçülerek kaydedilmiştir. Kontrol: 0,5 ml ABTS^{•+} üzerine 1,5 ml etanol eklenerek hazırlanan çözeltilerden oluşmaktadır.

BHA, BHT, Troloksu 10, 20 ve 30 µg/ml konsantrasyonlarda içeren çözeltilerin 734 nm dalga boyunda belirlenen absorbans değerleri kullanılarak % inhibisyon değerleri belirlenmiştir.

$$\% \text{İnhibisyon} = [(A_{\text{ABTS}} - A_{\text{EKSTRAKT}}) / A_{\text{ABTS}}] \times 100$$

Burada, A_{ABTS} ; ABTS⁺ şahit örneğinin absorbans değeri ve A_{EKSTRAKT} ; Örnek ekstraktının absorbans değerini ifade etmektedir.

Belirlenen %inhibisyon değerlerine karşı örnek konsantrasyonları bir grafiğe aktarılmış ve lineer regrasyon analizi uygulanarak örneklerle ilişkin eğriler ve denklemlerine ulaşılmıştır. Eşitlikler yardımıyla örnekler ve standart antioksidanların IC₅₀ değerleri (radikalin %50'sinin inhibisyonunu sağlayan konsantrasyon) hesaplanmıştır.

Naringinaz enzimi ilave edilmiş greyfurt sularında toplam fenolik madde miktarlarının belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlarda naringinaz enzimi ilave edilen greyfurt suyundaki toplam fenolik madde miktarı Folin & Ciocalteu reaktifi kullanılarak Singleton *et al.* (1999)'a göre belirlenmiştir. Stok çözeltiden 1000 µg alınarak ultra saf su ile 23 ml'ye tamamlanmıştır. Çözelti üzerine 0,5 ml Folin&Ciocalteu reaktifi ilave edilmiştir. Karışım 3 dk bekletildikten sonra 1,5 ml %2'lik Na₂CO₃ çözeltisinden ilave edilmiş ve 2 saat karanlık bir ortamda oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra absorbanslar 760 nm dalga boyunda köre karşı okunmuştur. Gallik asit standart fenolik bileşik olarak kullanılmış ve hazırlanan standart grafik yardımıyla sonuçlar µg GAE (Gallik Asit Ekvivalenti)/mg ekstrakt olarak verilmiştir. Analiz her bir örnek için 3 kere tekrarlanmıştır.

LC-MS/MS ile fenolik bileşen profilinin tespiti

Greyfurt sularının fenolik bileşenleri, Agilent 6464 LC-MS/MS cihazında analiz edilmiştir. Analizde 3.5 µm partikül boyutlu, ZORBAXTB C18 4.6x100 mm kolon kullanılmıştır. Mobil faz olarak %0.1 formik asit içeren deiyonize su (A) ve asetronitril (B) kullanılmıştır. Mobil faz programı; 0-4 dk aralığında 95:5 A:B'den 5:95 A:B'ye lineer gradiyent, 4-7 dk 80:20 A:B'den 20:80 A:B'ye 7-14 dk 10:90 A:B'den 90:10 A:B'ye 14-15 dk 10:90 A:B'den 90:10 A:B'ye 15-15.10 dk 5:95 A:B'den 95:5 A:B'ye mobil faz akış hızı 0.4 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Çalışma boyunca kolon sıcaklığı 30°C'de tutulmuştur. Nebulizer gaz akışı 12 L/dk, kurutucu gaz akışı 5 L/dk, dedektör sıcaklığı 350°C, hava bloğu sıcaklığı 250°C şeklinde ayarlanmıştır. Moleküllerin iyonlaştırılmasında ESI (Elektrosprey iyonlaşma) ve Agilent Jet Stream (Agilent jet akış) iyonlaştırıcılar kullanılmıştır. Moleküllerin tanımlanmasında MRM (Çoklu reaksiyon görüntüleme) modu kullanılmıştır. Kolonsuz olarak

her bir fenolik madde için MRM optimizasyonu yapıldıktan sonra standartların 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 500 ppb derişimlerini içeren karışım analiz edilerek kalibrasyon eğrileri çizilmiştir.

Naringinaz Enzimi ilave edilmiş greyfurt sularında naringin ve naringenin konsantrasyonunun belirlenmesi

Standart madde hazırlanması

Standart naringin çözeltisi (%0.1), Ribeiro and Ribeiro (2008) yönteminde belirtildiği gibi HPLC’de analiz edilmek üzere absolute etanol:sodyum asetat tamponu (0.02 M, pH 4.0) ile (1:1) (v:v) karışımı ile 1000 ppm olarak hazırlanmıştır. Aynı şekilde standart naringenin (%0.1) çözeltisi naringin çözeltisinde olduğu gibi absolute etanol:sodyum asetat tamponu (0.02 M, pH 4.0) ile (1:1) (v:v) karışımı ile 1000 ppm olarak hazırlanmıştır. Daha sonra bu çözeltiler 0.02 M, pH 4.0 sodyum asetat tamponu ile seyreltilerek naringin çözeltisinden 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 ppm çözeltiler naringenininden ise 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 ppm’lik toplamda 11 standart çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler örnek hazırlamada (2.2.9.b) belirtilen HPLC şartlarında analiz edilmiş ve standart kurve çizilmiştir.

Örneklerin hazırlanması

Naringinaz aktivitesini araştırmak için enzim ile muamele edilmiş greyfurt sularındaki naringin ve naringenin içerikleri HPLC yöntemi ile tespit edilmiştir. HPLC yöntemi ile, naringin ve naringenin içeriklerindeki değişiklikleri belirlemek için Ribeiro ve Ribeiro (2008) yönteminde modifikasyonlar uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan HPLC sistemi (Thermal Scientific Corporation, ABD) dörtlü bir pompa, bir otomatik örnekleyici, bir fotodiyot dizisi (PDA) detektörü ve bir Supelcosil TM LC-18 sütunundan (250 x 4.6 mm, 5 µm) oluşmaktadır. Mobil faz, asetonitril (A) ve deiyonize sudan (B) oluşturulmuştur. Ayırma, bir gradyan programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir: 0-8 dak. %23 A; 8-15 dk 23 %65 A lineer; 15-20 dk %65-70 A lineer; 20-21 dakika %70-23 A lineer; 21-22 dakika %23 A. Kromatogram 280 nm’de belirlenmiştir. Örnekler ise aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

Santrifüjlenmiş naringinaz enzimi ilave edilmiş greyfurt suları 0,45 µm por çapına sahip enjektör filtrelerinden geçirilmiştir ve 1:4 (v:v) oranında sodyum asetat tamponu ile 0.02 M, pH 4.0 ile seyreltilmiştir, ardından yukarıda belirtilen şartlardaki HPLC yöntemiyle analiz edilmiştir.

Probiyotik bakterilerin naringinaz üretimi için seçilmesi

Lactopacillus bakteri izolatlarının getirilmesi

-80°C’de muhafaza edilen 5 saf probiyotik bakteri izolatları % 0,1 oranında naringin eklenerek hazırlanan MRS agar besiyerlerine öze yardımıyla çizilmiştir. Çizim sonrası 37 °C sıcaklıkta 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra gelişen bakterilerden 1 ful lop alınarak % 0,1 oranında naringin eklenerek hazırlanan MRS broth besiyerlerine aktarılmış ve 37 °C sıcaklıkta 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda naringinaz enziminin aktivite testi yapılarak en iyi naringinaz aktivitesi gösteren üç suş seçilmiştir.

Lactobacillus bakterileri için besiyeri optimizasyonu

Seçilen üç suş Tablo 6’da verilen, beş farklı ortama %1 oranında inoküle edilmiş ve 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda pH değişimi gözlemlenmiş ve aktivite ölçümü yapılarak en iyi enzim aktivitesi gösteren besiyeri ortamı belirlenmiştir.

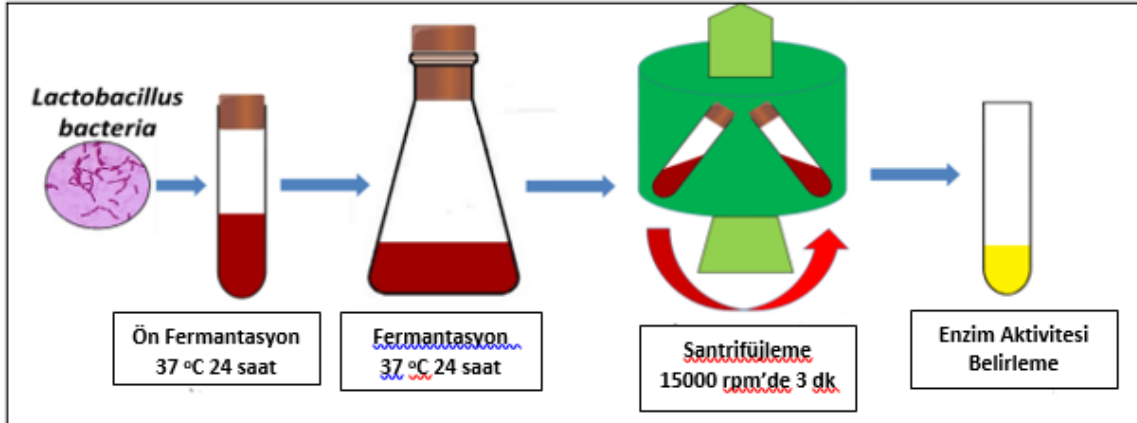
Tablo 6. *Lactobacillus* İçin Besiyeri Ortamları

1. ortam	g/L	2. ortam	g/L	3. ortam	g/L
Pepton	5	Pepton	5	Pepton	5
K ₂ HPO ₄	2	K ₂ HPO ₄	2	K ₂ HPO ₄	2
MgSO ₄	0,2	MgSO ₄	0,2	MgSO ₄	0,2
MnSO ₄	0,05	MnSO ₄	0,05	MnSO ₄	0,05
Yeast Extract	5	Yeast Extract	5	Glikoz	3
Glikoz	3	Sodyum Asetat	5	Sodyum Asetat	5
Sodyum Asetat	5	Amonyum Sitrat	2	Amonyum Sitrat	2
Amonyum Sitrat	2	Naringin	1	Naringin	1
Naringin	1				

4. ortam	g/L	5. ortam	g/L
K ₂ HPO ₄	2	MRS broth	52,2
MgSO ₄	0,2	Naringin	1
MnSO ₄	0,05		
Yeast Extract	5		
Glikoz	3		
Sodyum Asetat	5		
Amonyum Sitrat	2		
Naringin	1		

***Lactobacillus plantarum* bakterilerinin Naringinaz Enzim aktivitesinin belirlenmesi**

Fermentasyondan sonra daha önceden probiyotik oldukları belirlenmiş *L. plantarum* bakterilerinin inkübasyonu sonunda besiyerleri 15000 rpm’de 3 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant, naringinaz aktivitesinin belirlenmesi için toplanmıştır (Şekil 24). Naringinaz aktivitesi 24’de belirtildiği gibi besiyerinde bulunan naringindeki azalma miktarını belirleme ile gerçekleştirilmiştir. Bir ünite naringinaz aktivitesi, deney koşullarında mL ve dakika başına 1 µg naringini hidrolize edebilen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.



Şekil 24. *L. plantarum* bakterilerinin enzim aktivitelerinin belirlenmesi

Probiyotik bakterilerin greyfurt sularına aktarılması

Belirlenen probiyotik bakteriler yapılan bir araştırma (Tran *et al.* 2020) sonucunda en yüksek aktivite gösteren oranda (%4), tekli, ikili ve üçlü kültür kombinasyonları şeklinde greyfurt suyuna inoküle edilerek 4 hafta boyunca fermentasyona tabi tutulmuştur. Fermantasyon süresi boyunca bazı fizikokimyasal özellikleri, antioksidan kapasitesi ve fenolik bileşik içeriğindeki değişimler belirlenmiştir. İnoküle edilen bakteriler farklı sıcaklık şartlarında 14 farklı kombinasyonu ile Tablo 7’de belirtildiği gibidir.

Tablo 7. Mikroorganizmaların İnokülasyon Kombinasyonları ve Sıcaklıkları

Mikroorganizma Kombinasyonları		Sıcaklık
1. <i>L.plantarum</i> ACC 54		25 °C
2. <i>L.plantarum</i> ACC 28		
3. <i>L.plantarum</i> 250		
4. <i>L.plantarum</i> ACC 54- <i>L.plantarum</i> ACC 28		
5. <i>L.plantarum</i> ACC 54- <i>L.plantarum</i> 250		
6. <i>L.plantarum</i> ACC 28- <i>L.plantarum</i> 250		
7. <i>L.plantarum</i> ACC 54- <i>L.plantarum</i> 65- <i>L.plantarum</i> 250		
8. <i>L.plantarum</i> ACC 54		37 oC
9. <i>L.plantarum</i> ACC 28		
10. <i>L.plantarum</i> 250		
11. <i>L.plantarum</i> ACC 54- <i>L.plantarum</i> ACC 28		
12. <i>L.plantarum</i> ACC 54- <i>L.plantarum</i> 250		
13. <i>L.plantarum</i> ACC 28- <i>L.plantarum</i> 250		
14. <i>L.plantarum</i> ACC 54- <i>L.plantarum</i> ACC 28- <i>L.plantarum</i> 250		

Greyfurt suyundaki probiyotik mikroorganizmaların sayımı

Çalışmamızda mikroorganizmalar ve oluşturulan kombinasyonları greyfurt sularına eklendikten sonra meyve suyunda toplam bakteri sayımı yapılmış olup meyve suyunun probiyotik özellik taşıyıp taşımadığı belirlenmiştir. Bunun için; *L.plantarum* ACC 54, *L.plantarum* ACC 28 ve *L.plantarum* 250 bakterilerinin sayımı ile birlikte *L.plantarum* ACC 54- *L.plantarum* ACC 28, *L.plantarum* ACC 54- *L.plantarum* 250, *L.plantarum* ACC 28- *L.plantarum* 250 ve *L.plantarum* ACC 54-*L.plantarum* ACC 28-*L.plantarum* 250 bakterilerinin kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularında hem 25 °C'lik hem de 37 °C'lik sıcaklıklarda depolamanın ilk üç günü ve daha sonra 2 ve 4. haftanın sonlarında sayım yapılmıştır. Greyfurt sularındaki probiyotik bakteri kolonilerinin sayımı için klasik yayma kültür yöntemi kullanılmıştır. Analiz için 8,5 g NaCl 1 L saf su içerisinde çözündürülerek hazırlanan %85'lik fizyolojik su 9'ar ml miktarda tüplere aktararak hermetik olarak kapatılmıştır. Hazırlanan tüpler 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Aseptik koşullar altında örneklerden içerisinde 9 ml steril fizyolojik su bulunan tüplere 1'er ml alınarak aktarılmış ve 10^{-6} 'e kadar dilüsyonlara seyreltilmiştir. Daha sonra seyreltilmiş örneklerden 0,1 ml alınarak MRS Agar üzerine 2 paralel olarak yayma kültür yöntemi ile yayılmıştır. İnkübatörde 30-32 °C'de mikroorganizmalar 2-3 gün inkübe edildikten sonra oluşan koloniler (kob/ml) sayılmıştır. Bakterilerin sayımı depolama boyunca 1. gün, 2. hafta ve 4. hafta'da bakılmıştır. Probiyotik bakteri sayım sonuçları logaritmik değerleri hesaplanarak kaydedilmiştir (Tran *et al.* 2020).

İstatistiksel analizler

Araştırma, 1 Greyfurttan taze sıkılmış meyve suyu *Aspergillus niger* ATCC 1688'den elde edilen 3 farklı enzim konsantrasyonu (%0.1, %0.5, %1) x 3 farklı sıcaklık uygulaması (25 °C, 35 °C, 45 °C) x 2 farklı inkübasyon süresi (1 saat ve 5 saat) bununla birlikte 3 probiyotik bakterinin 7 farklı kombinasyonu (2.2.13'te belirtilen) x 2 farklı depolama sıcaklığı olarak gerçekleştirilmiştir. Tüm veriler IBM SPSS Statistics Version 20.0 paket programı kullanılarak istatistiki değerlendirmeye tabi tutulmuştur. Varyans analizi sonucunda önemli çıkan farklılıklara One-way ANOVA Çoklu Karşılaştırma testlerinden Duncan testi uygulanmıştır. Sonuçlar $\pm$ standart sapma olarak verilmiş ve $p < 0,05$ ve $p < 0,01$ olan tüm değerler istatistiki olarak anlamlı kabul edilmiştir.

ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Aspergillus niger ATCC 1688 Besiyeri Optimizasyonu

Aspergillus niger ATCC 1688'den naringinaz üretimi için hazırlanan besiyeri ortamları ve gelişim süresi içerisinde pH değişimleri ve ekstraselüler enzim aktiviteleri Tablo 3.1'de gösterilmiştir. Besiyerlerinin başlangıç pH'ları 0.1 M NaOH ve 0.1 M HCl ile 4.5 ve 6.5 olmak üzere iki farklı pH'ya ayarlanmıştır.

Yapılan çalışmada *Aspergillus niger* ATCC 1688'in 5 farklı besiyeri ortamında inkübasyon süresi boyunca (5 gün) her gün ölçülen pH değerlerinin fermentasyon sonucunda başlangıca göre artış gösterdiği belirlenmiştir. Buna paralel olarak enzim aktivitesinde de artış tespit edilmiştir. Enzim aktivitesindeki artışın fermentasyonun 3.gününden sonra büyük bir oranda gerçekleştiği 4. ve 5.günlerde bu aktivitenin miktarında diğer günlerdeki kadar çok artış olmadığı görülmektedir. Başlangıç pH değeri 4.5'a ayarlanan besiyerleri arasında naringinaz enzim artışı en çok (0.06 EÜ/mL'den 1.47 EÜ/mL'e) 1. ortamda gerçekleşmiş olup, bu ortamda pH değeri 4.5'ten 8.03'e kadar bir yükselme ile 5.günün sonunda belirlenmiştir. Başlangıç ortam pH değeri 4.5 olan besiyerlerinde naringinaz enzimindeki en az artış (0.53 EÜ/mL) ise hazır besiyeri olan PDA'nın kullanıldığı 5.ortamda gerçekleşmiş olup, bu ortamda pH değeri 4.5'ten 4.67'ye kadar yükselmiştir. Başlangıç ortam pH değeri 6.5 olan besiyerlerinde ise en çok artış 1.ortamda belirlenmiş olup pH değeri 6.5'ten 8.45'e kadar çıkmıştır. Bunun yanı sıra başlangıç pH değeri 6.5 olan besiyerinde 5. Ortamda düşüş görülmüş olup değer 6.5'ten 5.21'e düşmüştür (Tablo 8). Bu durumda mikroorganizmanın hazır besiyeri kullanılan 5.ortamda besiyerinde bulunan glikozdan sitrik asit üretmelerinden (de Olivera *et al.* 2022) dolayı pH'da bir düşme olduğu düşünülmektedir. Ayrıca enzim aktivitesi incelendiğinde 5. ortamda 3.gün sonunda bir artış tespit edilmiş ve sonra tekrar bir düşüş ile 5. günün sonunda başlangıca göre çok fark olmadığı görülmüştür. Yapılan bazı çalışmalarda glikoz ve sakarozun enzim aktivitesini baskıladığı bildirilmiştir (Puri *et al.* 2005; Mukund *et al.* 2013). Bu durumda hazır besiyerinde bulunan glikozun enzim aktivitesini olumsuz etkilediği düşünülmektedir. Başlangıç pH değeri 6.5'a ayarlanan besiyerleri arasında naringinaz enzim artışı en çok (0 EÜ/mL'den 1.47 EÜ/mL'e) 1. ortamda inkübasyonun son gününde (5.gün) görülmüştür. Fermentasyonun 5.gününün 1. ortamında pH değeri 4.5'tan 8.03'e yükselirken diğer pH 6.5'tan 8.45'e yükselmiştir. Aynı şekilde fermentasyonun 4.gününde 1.ortamda pH 4.5'ten 7.96'a yükselmiştir.

Yapılan istatistiki analiz sonucunda fermentasyon süresi, besiyeri ortamı ve başlangıç pH değerinin; pH'daki değişim üzerine çok önemli ($p<0.01$) etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Fermentasyon süresi ve besiyeri ortamının enzim aktivitesindeki (EÜ/ml) değişim üzerine çok anlamlı bir etkiye ($p<0.01$) sahip olduğu başlangıç pH değerinin ise önemsiz olduğu tespit edilmiştir. İkili interaksiyonları incelendiğinde fermentasyon süresi ve besiyeri ortamının hem enzim aktivitesi (EÜ/ml) hem de besiyerinde değişen pH değeri üzerine çok önemli ($p<0.01$) bir etki oluşturduğu belirlenmiştir. Fermentasyon süresi ve başlangıç pH değerinin interaksiyonuna bakıldığında; değişimlerin enzim aktivitesi (EÜ/ml) üzerine etkili olmadığı, ama pH değişiminde çok anlamlı ($p<0.01$) bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Besiyeri ortamı ve başlangıç pH değeri interaksiyonu ise enzim aktivitesi (EÜ/ml) üzerine etkili olmadığı fakat pH değişiminde çok anlamlı ($p<0.01$) bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.



Tablo 8. *A. niger* ATCC 1688’in pH Değeri 4.5 ve 6.5’e Ayarlanmış Farklı Besiyerlerinde Gelişim Süresince Farklı Günlerde pH ve Ekstraselüler Enzim Aktiviteleri

<i>Süre</i>	<i>1. Gün</i>										<i>2. Gün</i>									
<i>Besiyeri Ortamı</i>	<i>1.Ortam</i>		<i>2.Ortam</i>		<i>3. Ortam</i>		<i>4.Ortam</i>		<i>5.Ortam</i>		<i>1.Ortam</i>		<i>2.Ortam</i>		<i>3.Ortam</i>		<i>4.Ortam</i>		<i>5.Ortam</i>	
<i>Başlangıç pH</i>	4.5	6.5	4.5	6.5	4.5	6.5	4.5	6.5	4.5	6.5	4.5	6.5	4.5	6.5	4.5	6.5	4.5	6.5	4.5	6.5
<i>EÜ/mL</i>	0,06	0	0	0,06	0	0	0,35	0,28	0,13	0,25	0,37	0,23	0,35	0,15	0,26	0,19	0,56	0,35	0,22	0,33
<i>pH</i>	5,30	5,13	4,69	6,07	4,64	5,64	5,70	6,58	4,47	5,39	5,17	5,56	4,50	5,63	6,34	5,93	5,96	5,01	4,05	4,60

Tablo 8. (devam)

<i>Süre</i>	<i>3. Gün</i>										<i>4. Gün</i>									
<i>Besiyeri Ortamı</i>	<i>1.Ortam</i>		<i>2.Ortam</i>		<i>3. Ortam</i>		<i>4.Ortam</i>		<i>5.Ortam</i>		<i>1.Ortam</i>		<i>2.Ortam</i>		<i>3.Ortam</i>		<i>4.Ortam</i>		<i>5.Ortam</i>	
<i>Başlangıç pH</i>	4.5	6.5	4.5	6.5	4.5	6.5	4.5	6.5	4.5	6.5	4.5	6.5	4.5	6.5	4.5	6.5	4.5	6.5	4.5	6.5
<i>EÜ/mL</i>	0,78	1,33	1,30	1,08	0,97	1,14	1,14	0,71	0,61	1,15	1,37	1,30	0,62	0,63	1,19	0,83	0,47	0,52	0,46	0,40
<i>pH</i>	6,34	6,64	6,14	6,46	6,80	6,41	6,08	6,26	4,11	4,44	7,96	8,11	6,48	6,82	7,08	7,52	6,32	6,59	4,11	4,44

Tablo 8. (devam)

<i>Süre</i>	<i>5. Gün</i>									
<i>Besiyeri Ortamı</i>	<i>1.Ortam</i>		<i>2.Ortam</i>		<i>3. Ortam</i>		<i>4.Ortam</i>		<i>5.Ortam</i>	
<i>Başlangıç pH</i>	4.5	6.5	4.5	6.5	4.5	6.5	4.5	6.5	4.5	6.5
<i>EÜ/mL</i>	1,47	1,47	0,60	0,80	1,13	1,10	0,67	0,65	0,53	0,43
<i>pH</i>	8,03	8,45	6,97	7,32	7,16	7,79	6,48	7,24	4,67	5,21

Tablo 9. *A. niger* ATCC 1688'in pH Değeri 4.5 ve 6.5'e Ayarlanmış Farklı Besiyerlerinde Gelişim Süresince Farklı Günlerde pH ve Ekstraselüler Enzim Aktiviteleri Varyans Analizi

Varyans Kaynakları	Gün (A)		Ortam (B)		Başlangıç pH (C)		AXB		AXC		BXC		
SD	4		4		1		16		4		4		50
Özellikler	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	Ortalama Standart Hatası
EÜ/mL	3,234	141,150**	0,405	17,666**	0,002	0,100	0,255	11,127**	0,041	1,769	0,047	2,059	0,023
pH	11,605	1465,856**	13,055	1648,942**	4,215	532,375**	1,529	193,166**	0,349	244,109**	0,182	22,960**	0,008

SD: Serbestlik derecesi

*p<0,05 **p<0,01

AxB: Gün ve ortam etkileşimi

AxC: Gün ve başlangıç pH etkileşimi

BxC: Ortam ve başlangıç pH etkileşimi

Tablo 10. *A. niger* ATCC 1688'in pH Değeri 4.5 ve 6.5'e Ayarlanmış Farklı Besiyerlerinde Gelişim Süresince Farklı Günlerde pH ve Ekstraselüler Enzim Aktiviteleri ANOVA ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi

		EÜ/mL	pH
Gün	1. Gün	0,08±0,17 ^e	5,36±0,65 ^d
	2. Gün	0,30±0,13 ^d	5,17±0,80 ^e
	3. Gün	1,02±0,31 ^a	5,97±0,90 ^c
	4. Gün	0,78±0,37 ^c	6,60±1,20 ^b
	5. Gün	0,88±0,39 ^b	6,93±1,16 ^a
Ortam	1. Ortam	0,82±0,63 ^a	6,57±1,47 ^a
	2. Ortam	0,55±0,44 ^c	6,11±0,91 ^c
	3. Ortam	0,67±0,51 ^b	6,53±0,93 ^a
	4. Ortam	0,57±0,29 ^c	6,22±0,58 ^b
	5. Ortam	0,45±0,30 ^d	4,60±0,42 ^d
pH	pH 1	0,62±0,45	5,80±1,20 ^b
	pH 2	0,61±0,48	6,21±1,11 ^a

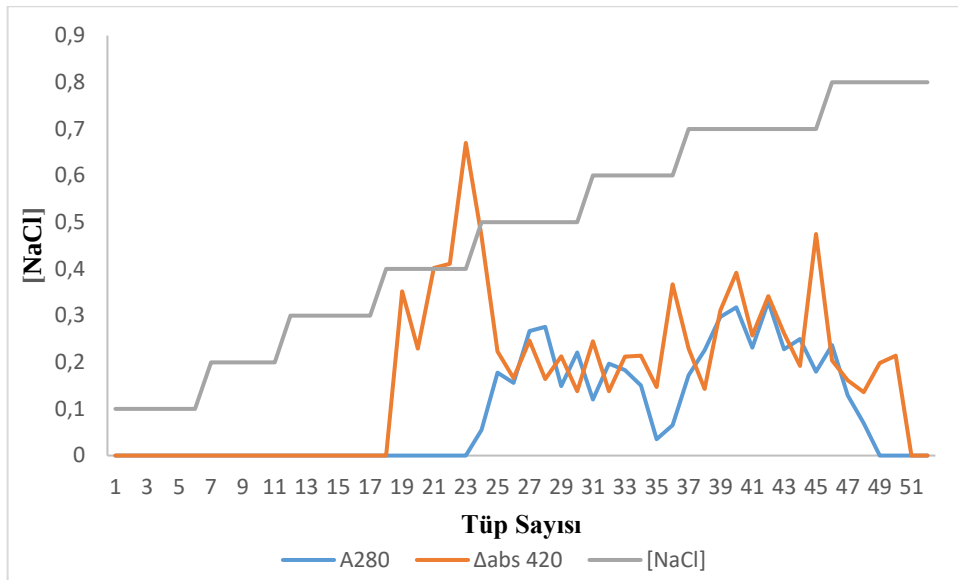
* Her sütun için istatistiki analiz kendi içerisinde yapılmış ve aynı harfle gösterilen ortalamalar önem seviyesi aynı olarak kabul edilmiştir.

Yapılan literatür taraması sonucunda *Aspergillus niger* 1688'in geliştirildiği farklı besiyeri ortamlarında pH ölçümü ve enzim aktivite karşılaştırılmasının yapıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda enzim üretimi için en uygun besiyeri ortamı araştırılmış olup başlangıç pH değeri ayarlanmış besiyerlerinde inkübasyon süresi boyunca pH değişimi ve mikroorganizmanın besiyerindeki en yüksek enzim üretimi için besiyeri pH değerini 8.03-8.45'e getirdiği belirlenmiştir.

Naringinaz Enzimi Saflaştırılması ve Karakterisasyonu

Naringinaz enzimin saflaştırılması

Besiyeri ortamında geliştirilen naringinaz enzimi önce amonyum sülfat çöktürmesine tabi tutulmuş ve %40-80 aralığında çöktüğü tespit edilmiştir. 12 saat 20 mM pH 6,0 olan sitrat tamponunda diyaliz edildikten sonra DEAE-Sepharose Fast Flow iyon değişim kolonunda 0-0,8 M arasında değişen NaCl gradienti ile elüe edilmiş ve her tüp 280 nm'de protein miktarı ölçümü ile aktivite ölçümüne tabi tutulmuştur. Aşağıdaki şekilde mavi çizgi A280, turuncu çizgi ise Δ Abs 420 değerini vermektedir. Gri çizgi NaCl konsantrasyonunu göstermektedir (Şekil 25).



Şekil 25. Naringinaz enzimi saflaştırma grafiği

Saflaştırma işleminden sonra her basamakta alınan numuneler için Bradford yöntemi ile protein tayini gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar ile saflaştırma tablosu çizilmiştir. Bu sonuçlara göre naringinaz enzimi 2 basamakla %26,44 verimle 10 kat saflaştırılmıştır (Tablo 11).

Zhu ve arkadaşların 2017 yılında *Aspergillus oryzae* 11250'den amonyum sülfat çöktürmesi, Q-sepharose kolon ve Sephacryl S200 kolon kullanarak %32 verimle 26,78 kat saflaştırma ile 2194,62 U/mg spesifik aktivite ile naringinaz elde etmişlerdir. *Cryptococcus albidus*'dan amonyum sülfat çöktürmesi ve 3 basamaklı kısmi saflaştırma yöntemleri uygulanarak %72 verimle 12,5 U/mg spesifik aktivite ile 42 kat naringinaz elde edilmiştir (Borzova *et al.* 2017). 2018 yılında Zhanhg ve çalışma grubu *Alternaria alternata* SK37.001'den intraselüler L-rhamnoz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi ve 3 farklı kolon yöntemi kullanarak %13,3 verimle 21,7 U/mg spesifik aktivite ile 63,8 kat saflaştırmışlardır. 2020 yılında *Aspergillus niger van Tieghem* MTCC 2425'den izole edilen naringinaz enzimi ise ultrafiltrasyon, amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değişim kolonu kullanılarak %17 verimle 5460 U/mg spesifik aktivite ile 9,92 kat saf halde elde edilmiştir (Borkar *et al.* 2020).

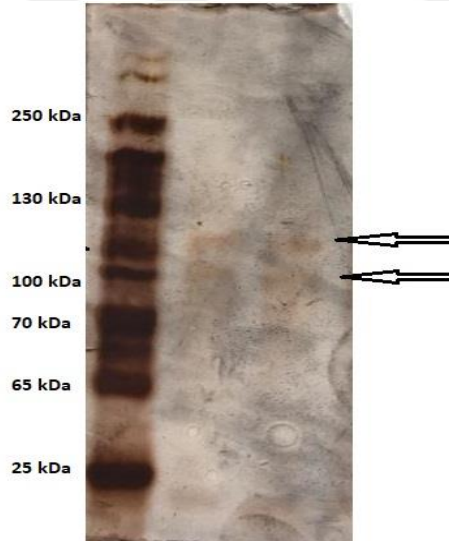
Yapılan çalışmalar incelendiği zaman naringinaz enzimi farklı kısmi saflaştırma yöntemlerinin bir arada kullanılarak izole edildiği görülmektedir. Yöntemin hassasiyetine bağlı olarak elde edilen enzimin spesifik aktivite değeri değişmektedir.

Tablo 11. A. niger ATCC 1688'den Naringinaz Enziminin 2 Basamakta Saflaştırma İşlemi Sonuçları

Saflaştırma Basamakları	Hacim (mL)	Aktivite (EÜ/mL)	Protein (enzim) (mg)	Toplam Protein (toplam enzim) (mg)	Toplam Aktivite (EÜ)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
Homojenat	20	0,59	20,3	406	11,8	0,029	100	1
Amonyum Sülfat Çöktürmesi	5	0,76	14,5	72,5	3,8	0,052	32,2	1,79
2'5'-ADP-Sepharose	2	1,56	5,57	11,14	3,12	0,28	26,44	10

Naringinaz enzim saflığının SDS-PAGE yöntemi ile kontrolü

Önce amonyum sülfat çöktürmesi daha sonra DEAE- Sepharose Fast Flow iyon değişim kolonu ile saflaştırılan naringinaz enziminin saflık kontrolü sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. Enzimin 2 alt birimden meydana geldiği ve 60 kDa ile 200 kDa arasında 2 bant görmemiz gerektiği önceki literatür örneklerinde rapor edilmiştir (Puri and Benerjee, 2000; Borkar *et al.* 2020). Jel fotoğrafı Şekil 26'de görüldüğü gibidir.



Şekil 26. A. niger ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü (PageReguler™ Prestained Protein Ladder)

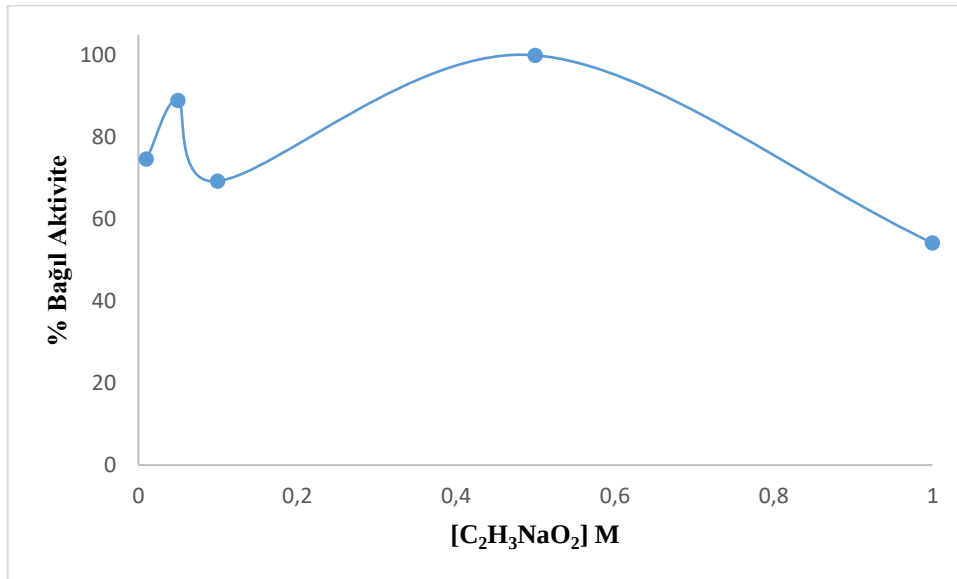
Çalışmamızda 80-130 kDa aralığında iki bant belirlenmiştir. Yapılan literatür araştırması sonucu naringinaz enziminin bu aralıkta olduğunu bildiren birçok kaynak bulunmaktadır (Puri and Kalra, 2005; Ni *et al.* 2011; Puri, 2012; Li *et al.* 2015; Wang *et al.* 2019).

Benzer şekilde Li *et al.* (2015) yaptıkları çalışmada *A.niger*'den saflaştırdıkları α -L-ramnosidaz'ın molekül ağırlığını 90 kDa olarak belirlemişlerdir. Aynı zamanda Ni *et al.* (2011) *A.niger*'den saflaştırdıkları α -L-ramnosidaz SDS-PAGE elektroforezi ile belirledikleri molekül ağırlığını 87 kDa olarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Puri, 2012 yılında hazırlamış olduğu derleme çalışmasında naringinaz enzimini genel özellikleri ile belirtmiştir. Bununla birlikte aynı araştırmada farklı mikroorganizmalardan saflaştırılan naringinaz enizminin molekül ağırlıkları 74-120 kDa arasında değişiklik gösterdiği bazı çalışmaların ise molekül ağırlığını belirleyemediklerini ifade etmiştir.

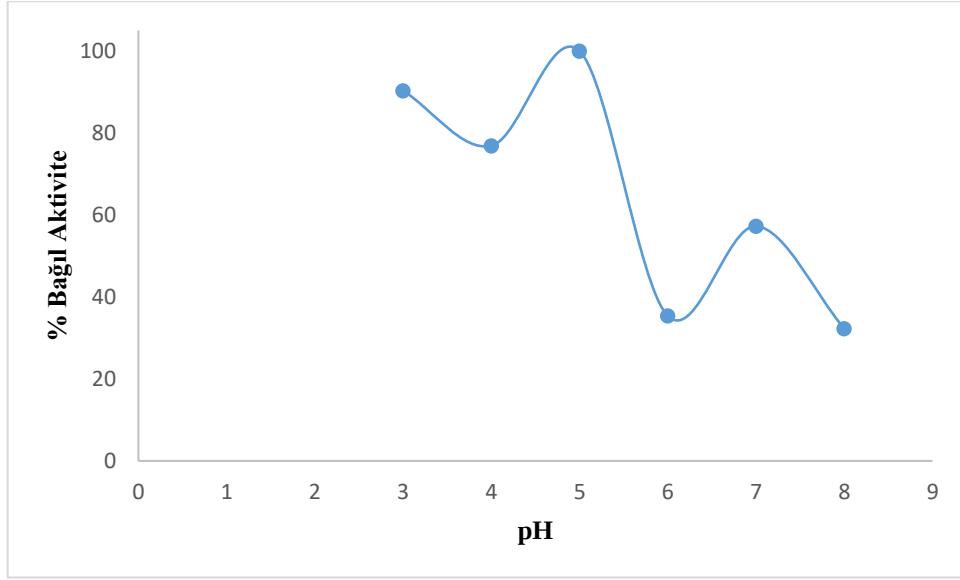
A.niger 1344'den saflaştırılan naringinaz enziminin karakterizasyonunun araştırıldığı bir çalışmada (Puri and Kalra, 2005), enzimin molekül ağırlığı bir Sephadex G-200 kolonu üzerinde jel filtrasyon kromatografisi ile belirlendiğinde 168 kDa değeri bulunurken SDS-PAGE ile belirleme sonucunda bu değeri 85 kDa olarak belirlemişlerdir. Wang *et al.* (2019), *A. niger* CTCCC M 2018240'tan *Pichia pastoris*'e Rekombinant α -L-Rhamnosidaz üretimi için yapılan çalışmada SDS-PAGE analizi ile enzim molekül ağırlığını 100 kDa olarak tespit etmişlerdir.

Naringinaz enziminin karakterizasyonu

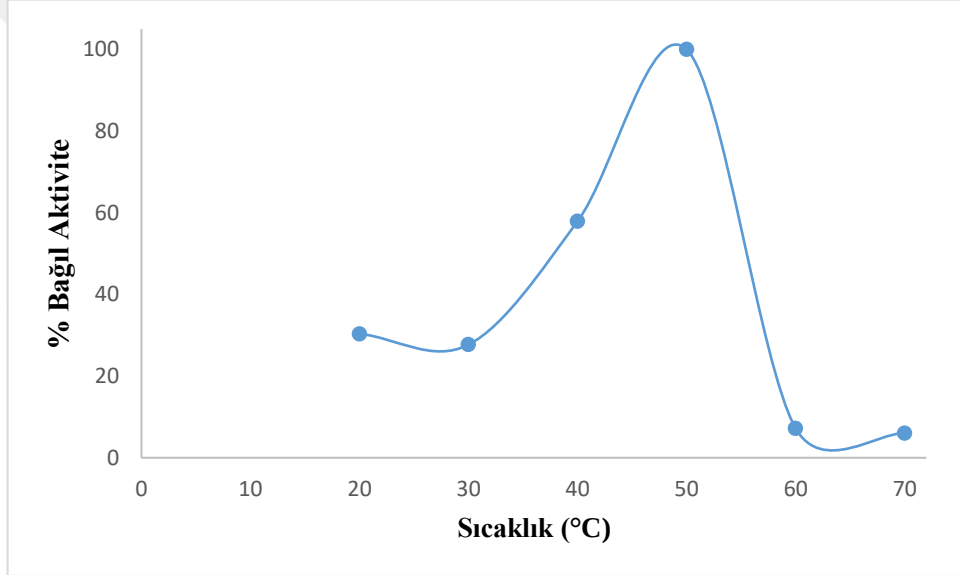
Naringinaz enziminin optimum iyonik şiddet değeri 0,01 M ile 1,0 M aralığında aranmış ve 0,5 M olarak bulunmuştur (Şekil 27). Optimum pH değeri pH 3,0 ile pH 8,0 aralığında aranmış ve pH 5,0 olarak belirlenmiştir (Şekil 28). Optimum sıcaklık değeri ise 20 °C ile 70 °C aralığında çalışılmış ve 50 °C olarak belirlenmiştir (Şekil 29).



Şekil 27. *A.niger* ATCC 1688 mikroorganizmasından elde edilen naringinaz enziminin optimum iyonik şiddet çalışması sonucu bağli aktivitede meydana gelen değişmeler



Şekil 28. A.niger ATCC 1688 mikroorganizmasından elde edilen naringinaz enziminin optimum pH çalışması sonucu bağıl aktivitede meydana gelen değişimler



Şekil 29. A.niger ATCC 1688 mikroorganizmasından elde edilen naringinaz enziminin optimum sıcaklık çalışması sonucu bağıl aktivitede meydana gelen değişimler

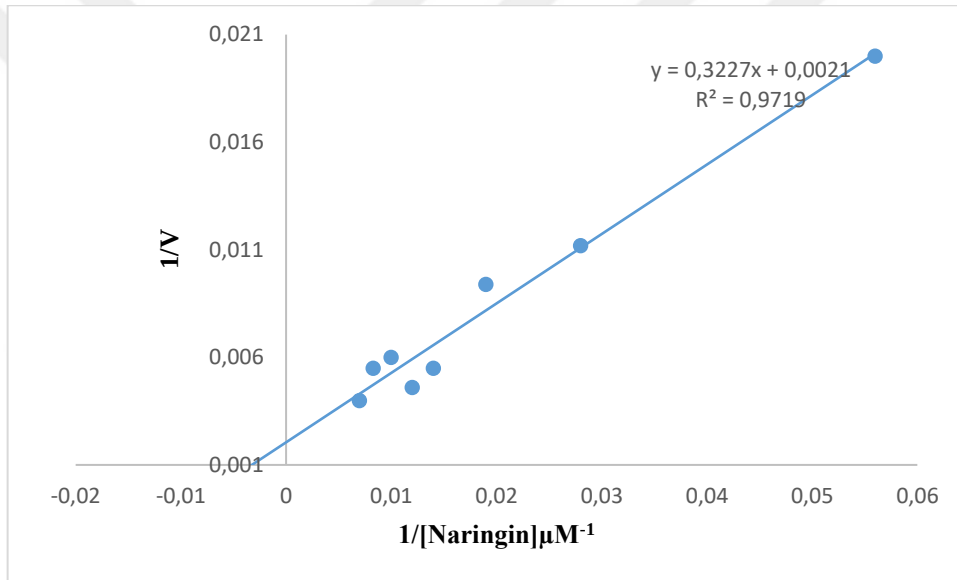
Borkar *et al.* (2020), Naringinazın *Aspergillus niger* van Tieghem MTCC 2425'ten narenciye atıklarını kullanarak fermentatif üretimini araştırdıkları çalışmada optimum naringinaz için optimum pH değerini 5,0 olarak, optimum sıcaklık değerini ise 50 °C olarak belirlemişlerdir.

Yapılan bir çalışmada *P. decumbens* kaynaklı naringinazın 55 °C'de optimum stabilite gösterdiği bildirilmiştir. (Norouzian *et al.* 2000). Aynı zamanda *A. niger*'den elde edilen naringinaz aktivitesi için 45 °C'nin optimum sıcaklık olduğuda belirtilmiştir (Puri and Banerjee, 2000).

Ni *et al.* (2015) yaptıkları çalışmada greyfurt suyunda acılık gidermek için *A.niger*'den ekstraselüler olarak saflaştırdıkları naringinaz enziminin aktif ve stabil pH aralıklarının sırasıyla 4.5 ile 5.0 arasında olduğunu, aynı zamanda enzim optimum sıcaklığının 45 ile 55 °C aralığında gösterdiğini belirtmişlerdir. Yine aynı şekilde Puri and Kalra (2005)'te saflaştırdıkları naringinazın optimum pH ve sıcaklık değerlerini 4 ve 50 °C olarak tespit etmişlerdir.

Naringinaz enziminin kinetik değerleri

A.niger ATCC 1688'den elde ettiğimiz naringinaz enziminin K_M ve V_{max} değerini öğrenmek amacıyla en az 5 farklı substrat konsantrasyonunda aktivite ölçümü gerçekleştirilmiş ve Lineveawer-Burk grafiği (Şekil 30) çizilmiştir. Grafik üzerinden yapılan hesaplamalarda K_M değeri 0,015 μM , V_{max} değeri ise 476,19 EU/dk olarak bulunmuştur.



Şekil 30. *A.niger* ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enzimi Lineveawer-Burk grafiği

Lactobacillus plantarum ve *Lactobacillus acidophilus*'den elde edilen Rhamnosidaz enziminin iki alt birimi için K_M değerleri $6,3 \cdot 10^{-5} M$ ve $7 \cdot 10^{-4}$ olarak belirlenmiş, elde edilen sonuçlara bakılarak substratın ilk alt birime olan ilgisinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Beekwilder *et al.* 2009).

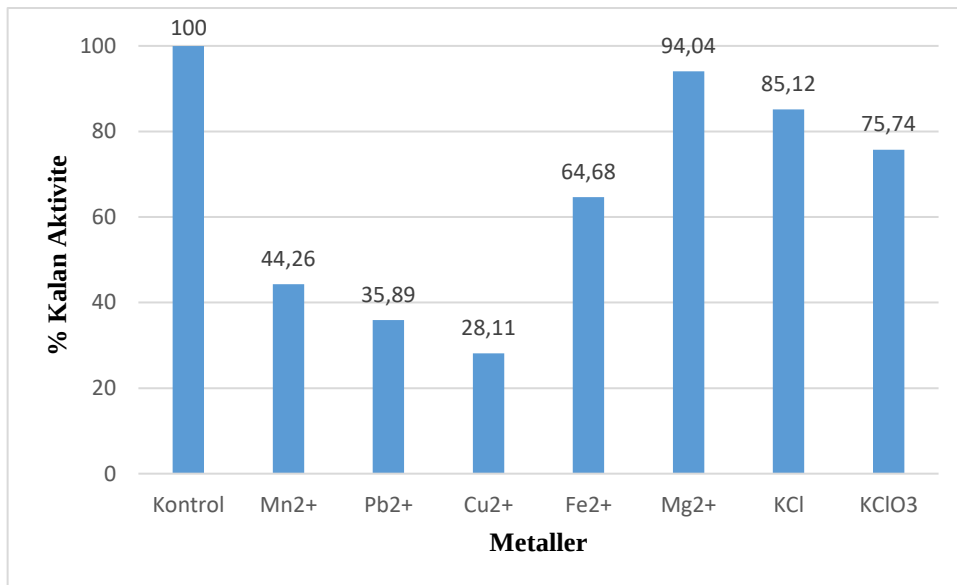
Cryptococcus albidus'dan izole edilen L-Rhamnoz enziminin K_M değeri 4,5 mM V_{max} değeri ise 15 μM /dk.mg olarak belirlenmiş, naringinazın K_M değeri 0,77 mM V_{max} değeri 36 μM /dk.mg olarak belirlenmiştir. Substratın naringinaza ilgisinin daha yüksek olduğu görülmüştür, V_{max} değerinin de naringinaz lehine olduğu görülmektedir, bu sonuçlara dayanarak *Cryptococcus albidus*'dan izole edilen naringinazın L-Rhamnoz'dan daha aktif olduğu sonucuna varılmıştır (Borzova *et al.* 2017).

Zhu ve çalışma grubunun *Aspergillus oryzae* 11250'dan elde ettiği naringinaz, rhamnosidaz ve d-glikozidaz enzimleri için K_M değerleri sırasıyla yaklaşık 1,6 mM, 0,63 mM ve 1,5 mM; V_{max} değerleri ise sırasıyla yaklaşık 126,2 U/mg, 711,57 U/mg ve 940,01 U/mg olarak belirlenmiştir. Substratın en yüksek ilgisinin Rhamnosidaz'a karşı olduğu sonucuna varılmıştır. Kinetik aktivitenin ise D-glikozidaz enzimi için en yüksek değerde olduğu görülmüştür (Zhu *et al.* 2017).

Yaptığımız çalışmada belirlediğimiz K_M değerinin oldukça düşük olduğu görülmüştür, bu değerden substratın enzime olan ilgisinin yüksek olduğu sonucunu çıkarabiliriz. K_M değerinin düşük olması, substratın enzime olan ilgisinin yüksek olduğunu gösteren bir sonuçtur (Saldamlı, 1998). 476,19 EU/dk V_{max} değeri de elde ettiğimiz naringinazın oldukça iyi bir kinetik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.

Metal iyonlarının naringinaz üzerine etkileri

Enzimler metal iyonlarının ve katalitik özelliklerini etkileyen diğer maddelerin varlığında fiziksel ve kimyasal özelliklerinde değişikliklere uğrama eğilimindedir (Li *et al.* 2016). Çalışmamızda bazı metal iyonlarının naringinaz enzimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Mn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , KCl ve $KClO_3$ 'ün naringinaz aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla aktivite ölçüm ortamına metal çözeltileri ilave edildikten sonra bir saat sonraki sonuçlar Şekil 31'de verilmiştir. Naringinaz aktivitesini en çok düşüren metalin Cu^{2+} olduğu, en az etkileyen metalin ise Mg^{2+} olduğu görülmüştür.



Şekil 31. Bazı metallerin naringinaz aktivitesi üzerine etkileri

Puri ve Kalra (2005) *A.niger*'den saflaştırılan naringinaz enziminin aktivitesi üzerine metal iyonlarının ve organik bileşiklerin etkisini araştırmışlardır. Çalışmada 10-50 mM

konsantrasyon aralığında Cu^{2+} ve Mn^{2+} 'ın enzim aktivitesini tamamen inhibe ederken, bu konsantrasyonda Fe^{2+} ve Ni^{2+} 'ın %40 inhibisyon gösterdiğini belirlemişlerdir. Ayrıca Ca^{2+} , Co^{2+} ve Mg^{2+} , 'un 10–100 mM'de bile çok az inhibisyon gösterdiği, aynı zamanda 50 mM'lik bir konsantrasyonda Zn^{2+} , 'nın %20 inhibisyon gösterdiği bildirilmiştir. Enzim aktivitesinin, bir sülfidril reaktifi (p-CMB) ve sülfhidril oksidan metal (Hg^{2+}) tarafından önemli ölçüde inhibe edildiğinde belirtilmiştir.

Li *et al.* (2016), yaptıkları araştırmada *A.niger*'den rekombinant çalıştıkları α -L-ramnosidaz üzerine metal iyonlarının etkisini belirlemişlerdir. Çalışmada Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} ve Ni^{2+} 'ın 100 mM konsantrasyonları Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Na^+ ve K^+ 'nın hem 1 mM hem de 10 mM konsantrasyonlarına göre α -L-ramnosidaz enzim aktivitesi üzerine neredeyse 1.5 kat daha fazla etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca α -L-ramnosidaz'ın enzimatik aktivitesi, hem Fe^{2+} hem de Fe^{3+} olmak üzere ferrik iyonlar tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildiği de belirtilmiştir.

Enzim İlave Edilmiş Greyfurt Sularının Bazı Fizikokimyasal Özellikleri

Suda çözünür kuru madde (SÇKM) değişimi

A. niger ATCC 1688'den saflaştırılan naringinaz enziminin ilave edildiği greyfurt sularının 1 ve 5 saat bekleme sonucu belirlenen suda çözünür kuru madde değerleri Tablo 12'da verilmiştir.

Çalışma da suda çözünür kuru madde miktarında en fazla değişim %1 enzim ilave edilmiş ve 45 °C'lik sıcaklıkta inkübe edilen örnekte belirlenmiştir. SÇKM miktarı 1. saat sonucunda 9.95'ten 9.50'ye düşmüştür ve 5. saat sonunda bu miktar değişmemiştir. Yapılan varyans analizi, sıcaklık ve konsantrasyon faktörlerinin örnekler üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olmadığı, süre faktörünün ise çok önemli olduğu ($p<0.01$) belirlenmiştir. İkili interaksiyonlar incelendiğinde sıcaklık x konsantrasyon faktörünün SÇKM üzerine önemli bir etki ($p<0.05$) oluşturduğu tespit edilmiştir. Sıcaklık x süre ikili interaksiyonunun örneklerin SÇKM üzerine önemli bir etkiye sahip olmadığı fakat konsantrasyon x süre ikili interaksiyonunun ise SÇKM üzerine önemli ($p<0.05$) düzeyde etkili olduğu belirlenmiştir (Tablo 13).

Yapılan literatür taramasında acılık bileşenlerinden naringin miktarını azaltmak amacıyla naringinaz enzimi ilave edilmiş greyfurt sularında SÇKM miktarını belirleyen yalnızca bir kaynağa rastlanmıştır. Gonzalez-Temino *et al.* (2021), yaptıkları çalışmada, acılığını gidermek için naringinaz ilave edilen greyfurt suyunda uygulama öncesi ve sonrasında SÇKM (°Brix) belirlemişlerdir. Çalışmada, taze greyfurt suyunda °Brix değeri 9.6 olarak

belirlenmiş olup, enzim ilavesinden sonra değerin 9.3'e düştüğü tespit etmişlerdir. Bu düşüşün de önemli olmadığını bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra greyfurt sularına uygulanan farklı yöntemler için SÇKM miktarı belirlenmiş olan bazı çalışmalar mevcuttur. Igual *et al.* (2010) greyfurt suyunun fonksiyonel özellikleri ve organik asit stabilitesi üzerine termal uygulama ve depolamanın etkisini araştırdıkları çalışmalarında başlangıç °Brix değerlerini 9.9-10.01 aralığında belirlemişlerdir. Depolama süresince bu miktarın önemli bir değişiklik göstermediğini bildirmişlerdir. Aadil *et al.* (2013) greyfurt suyunun kalite değerleri üzerine ultrasonik uygulamanın etkisini araştırdıkları çalışmada, greyfurt suyunun °Brix miktarını 9.60 olarak belirlemiş olup uygulama sonucunda °Brix miktarının 9.53 ve 9.50 ye düştüğü bunun da çok önemli bir azalma olmadığını bildirmişlerdir.

pH değişimi

Taze sıkılarak 85-90 °C'de pastörize edildikten sonra enzim ilave edilen greyfurt sularının inkübasyonunun 1. ve 5. saatlerinde ölçülen pH değerleri Tablo 12'de verilmiştir.

Enzimin aktivite süresince greyfurt sularında pH değerlerinde 0.05-0.09 arasında bir yükselme gerçekleştiği, en az değişimin 25 °C'de 5. saat sonuna kadar bekletilen %1 enzim ilave edilmiş greyfurt suyu örneğinde meydana geldiği ve değerin 3.40'tan 3.45'e kadar çıktığı tespit edilmiştir. En fazla değişimin ise 3.40'tan 3.49'a kadar olduğu ve her üç sıcaklık değerinin farklı konsantrasyonlarında belirlendiği görülmektedir (Tablo 12).

Tablo 12. Enzim Uygulanan Greyfurt Sularının İnkübasyondan Sonra Belirlenen Genel Özellikleri

Sıcaklık	Konsantrasyon	Süre	SÇKM (°brix)	pH	TA (%)	Renk yoğunluğu (Koyuluğu) (IC)	Renk tonu (T)	Renk Yoğunluğu (IC')	Kırmızı Renk Boyutu (%)	Sarı renk Boyutu (%)	Mavi Renk Boyutu (%)	TFM (mgGAE/L)	DPPH [•] (IC50)	ABTS ^{•+} (IC50)
25 °C	% 0,1	0. Saat	9,90	3,40	0,86	4,39	1,25	5,94	32,86	41,01	26,13	519,82	33,47	17,82
		1. Saat	9,50	3,48	0,88	4,91	1,24	6,62	33,11	41,11	25,78	618,62	36,06	20,41
		5. Saat	9,50	3,47	0,90	5,46	1,25	7,32	33,21	41,37	25,42	553,12	32,98	16,85
	% 0,5	0. Saat	9,90	3,40	0,86	4,39	1,25	5,94	32,86	41,01	26,13	519,82	33,47	17,82
		1. Saat	9,50	3,49	0,89	4,82	1,25	6,52	32,95	41,10	25,95	575,21	37,73	21,40
		5. Saat	9,50	3,46	0,90	5,04	1,25	6,78	32,99	41,36	25,66	549,01	28,76	13,76
	% 1	0. Saat	9,90	3,40	0,86	4,39	1,25	5,94	32,86	41,01	26,13	519,82	33,47	17,82
		1. Saat	9,00	3,48	0,91	4,66	1,25	6,30	32,84	41,13	26,02	573,71	36,53	20,08
		5. Saat	9,50	3,45	0,89	4,84	1,25	6,52	32,92	41,28	25,81	516,45	27,94	13,79
	% 0,1	0. Saat	9,90	3,40	0,86	4,39	1,25	5,94	32,86	41,01	26,13	519,82	33,47	17,82
		1. Saat	9,50	3,48	0,89	4,83	1,25	6,52	32,93	41,13	25,94	580,82	33,65	17,12
		5. Saat	9,50	3,46	0,91	4,61	1,26	6,22	32,79	41,24	25,97	528,80	29,21	14,83
35 °C	% 0,5	0. Saat	9,90	3,40	0,86	4,39	1,25	5,94	32,86	41,01	26,13	519,82	33,47	17,82
		1. Saat	9,50	3,47	0,87	4,61	1,25	6,24	32,89	41,03	26,08	574,46	32,58	16,58
		5. Saat	9,50	3,49	0,90	4,15	1,23	5,64	33,04	40,55	26,41	533,29	31,96	14,91
	% 1	0. Saat	9,90	3,40	0,86	4,39	1,25	5,94	32,86	41,01	26,13	519,82	33,47	17,82

Tablo 12. (devamı)

45 °C	% 0,1	1. Saat	9,50	3,50	0,89	4,79	1,26	6,46	32,82	41,32	25,86	568,84	35,00	19,31
		5. Saat	9,50	3,47	0,90	4,70	1,26	6,34	32,83	41,34	25,83	476,03	26,27	11,98
		0. Saat	9,90	3,40	0,86	4,39	1,25	5,94	32,86	41,01	26,13	519,82	33,47	17,82
		1. Saat	9,50	3,47	0,88	4,61	1,25	6,23	32,90	41,06	26,04	578,95	32,67	16,88
		5. Saat	9,50	3,47	0,92	4,73	1,26	6,37	32,78	41,45	25,77	536,28	30,13	14,81
		0. Saat	9,85	3,40	0,86	4,39	1,25	5,94	32,86	41,01	26,13	519,82	33,47	17,82
	% 0,5	1. Saat	9,50	3,46	0,89	4,55	1,25	6,15	32,86	41,08	26,06	568,10	30,01	14,10
		5. Saat	9,50	3,48	0,89	4,61	1,26	6,21	32,81	41,39	25,79	520,19	27,82	11,91
		0. Saat	9,95	3,40	0,86	4,39	1,25	5,94	32,86	41,01	26,13	519,82	33,47	17,82
	% 1	1. Saat	9,50	3,49	0,90	4,68	1,26	6,32	32,84	41,24	25,91	580,45	33,40	17,42
		5. Saat	9,50	3,49	0,87	4,56	1,26	6,14	32,78	41,43	25,79	560,24	27,68	12,45

TA: Toplam titrasyon asitliği (%)

SÇKM: Suda çözünür kuru madde (°Brix)

TFM: Toplam fenolik madde miktarı (mgGAE/mL)

Yapılan varyans analizi sonucu sıcaklık ve konsantrasyon parametrelerinin pH üzerine bir etkiye sahip olmadığı, süre parametresinin ise çok anlamlı ($p<0.01$) bir etki gösterdiği belirlenmiştir. İkili interaksiyonlar incelendiğinde sıcaklık x süre interaksiyonunun pH üzerine önemli ($p<0.05$) bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Tablo 13).

Gonzalez-Temino *et al.* (2021) yaptıkları çalışmada, taze greyfurt sularında pH değerini 2.94 olarak belirlerken enzim inkübasyonu sonucunda bu değer 3.08'e yükseldiğini belirtmişlerdir. Çalışmalarında pH değişiminin önemli olmadığını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda pH değişimi literatür ile benzerlik göstermiş olup değişimin gözardı edilebileceği şeklinde yorumlanabilir. Ayrıca diğer çalışmalarda, Igual *et al.* (2010), taze sıkılmış greyfurt suyunun pH değerini 3.00 olarak belirlemişlerdir. Ferrentino *et al.* (2009) greyfurt suyunun pastörizasyonu üzerine yaptıkları bir araştırmada, greyfurt suyunun başlangıç pH değerini 3.34 olarak belirlemişlerdir. Ferrentino *et al.* (2009) kullanılan greyfurt sularının mevsiminin dışında olması, uzun süreli depolama işlemine tabi tutulması gibi faktörler sebebi ile pH'nın değişiklik gösterebileceğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda başlangıç pH değeri 3.40 olarak belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada bulduğumuz sonuçlar literatür ile paralellik göstermektedir.

Tablo 13. Enzim Uygulanan Greyfurt Sularının İnkübasyondan Sonraki Genel Özellikleri İçin Yapılan Varyans Analizi

Varyans Kaynakları	Sıcaklık (A)		Konsantrasyon (B)		Süre (C)		AXB		AXC		BXC		
SD	2		2		2		4		4		4		54
Özellikler	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	Ortalamanın Standart Hatası
SÇKM (°Brix)	0,028	2,308	0,020	1,685	1,668	138,554**	0,033	2,723*	0,028	2,308	0,033	2,723*	0,012
pH	0,000	1,167	0,000	1,207	0,051	277,147**	0,000	1,467	0,001	3,237*	0,000	2,317	0,000
TA (%)	8,557	0,170	0,000	0,325	0,009	18,693**	0,000	0,566	0,000	0,524	0,001	1,631	0,001
Renk yoğunluğu (koyuluğu) (IC)	0,455	45,424**	0,161	16,109**	1,078	107,591**	0,103	10,281**	0,297	29,673**	0,067	6,707**	0,010
Renk tonu (T)	0,000	5,054**	0,000	5,860**	0,000	5,698**	0,000	3,617*	0,000	4,107**	0,000	2,818*	0,000
Renk Yoğunluğu (IC')	0,770	49,797**	0,269	17,374**	1,798	116,213**	0,165	10,690**	0,497	32,101**	0,112	7,269**	0,015
Kırmızı Renk Boyutu (%)	0,095	5,334**	0,041	2,304	0,017	0,930	0,031	1,733	0,036	2,003	0,016	0,908	0,018
Sarı renk Boyutu (%)	0,094	2,808	0,134	3,993*	0,444	13,203**	0,097	2,881*	0,132	3,935**	0,062	1,851	0,034
Mavi Renk Boyutu (%)	0,175	2,988	0,092	1,573	0,606	10,361**	0,093	1,588	0,149	2,539*	0,032	0,540	0,058
TFM (mgGAE/L)	1323,430	10,775**	1245,922	10,144**	27789,193	226,243**	1239,082	10,088**	684,578	5,573**	525,898	4,282**	122,829
DPPH' (IC50)	28,427	23,175**	5,564	4,536*	196,431	160,137**	4,358	3,553*	13,883	11,318**	13,812	11,260**	1,227
ABTS ⁺ (IC50)	29,710	76,095**	6,017	15,412**	149,258	382,290**	2,727	6,983**	12,060	30,889**	8,883	22,752**	0,390

*p<0,05 **p<0,01

AxB: Sıcaklık ve konsantrasyon interaksyonu

AxC: Sıcaklık ve süre interaksyonu

BxC: Konsantrasyon ve süre interaksyonu

Tablo 14. Enzim Uygulanan Greyfurt Sularının İnkübasyondan Sonraki Genel Özellikleri İçin Yapılan Tek Yönlü ANOVA ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi

		SÇKM (°brix)	pH	TA (%)	Renk yoğunluğu (koyuluğu) (IC)	Renk tonu (T)	Renk Yoğunluğu (IC')	Kırmızı Renk Boyutu (%)	Sarı renk Boyutu (%)	Mavi Renk Boyutu (%)	TFM (mgGAE/L)	DPPH [•] (IC50)	ABTS ^{•+} (IC50)
	25	9,58±0,32	3,45±0,04	0,88±0,03	4,77±0,35 ^a	1,25±0,00 ^b	6,43±0,45 ^a	32,96±0,12 ^a	41,15±0,15	25,89±0,24	549,51±35,92 ^a	33,38±3,30 ^a	17,75±2,70 ^a
Sıcaklık (°C)	35	9,63±0,20	3,45±0,04	0,88±0,03	4,54±0,22 ^b	1,25±0,01 ^b	6,14±0,29 ^b	32,88±0,20 ^b	41,07±0,33	26,05±0,37	535,74±33,27 ^b	32,12±2,76 ^b	16,47±2,17 ^b
	45	9,63±0,20	3,45±0,04	0,88±0,03	4,54±0,18 ^b	1,25±0,01 ^a	6,14±0,22 ^b	32,84±0,05 ^b	41,19±0,22	25,97±0,18	544,85±26,28 ^a	31,35±2,55 ^c	15,67±2,33 ^c
	% 0,1	9,63±0,20	3,45±0,04	0,88±0,03	4,70±0,34 ^a	1,25±0,01 ^b	6,35±0,43 ^a	32,92±0,14	41,16±0,17 ^{ab}	25,92±0,23	550,67±35,63 ^a	32,79±2,13 ^a	17,15±1,73 ^a
Konsantrasyon	% 0,5	9,63±0,19	3,45±0,04	0,88±0,02	4,55±0,26 ^b	1,25±0,01 ^b	6,15±0,34 ^b	32,90±0,12	41,06±0,29 ^b	26,04±0,23	542,19±25,28 ^b	32,14±3,02 ^b	16,24±2,81 ^b
	% 1	9,58±0,32	3,45±0,05	0,88±0,03	4,60±0,21 ^b	1,25±0,01 ^a	6,21±0,27 ^b	32,85±0,17	41,20±0,25 ^a	25,95±0,36	537,24±34,43 ^b	31,92±3,62 ^b	16,50±2,89 ^b
	0. Saat	9,90±0,08 ^a	3,40±0,00 ^c	0,86±0,03 ^b	4,39±0,02 ^b	1,25±0,00 ^b	5,94±0,02 ^b	32,86±0,04	41,01±0,05 ^c	26,13±0,02 ^a	519,82±5,68 ^c	33,47±1,44 ^b	17,82±0,28 ^b
Süre	1. Saat	9,44±0,21 ^b	3,48±0,02 ^a	0,89±0,02 ^a	4,72±0,13 ^a	1,25±0,01 ^b	6,37±0,16 ^a	32,90±0,18	41,13±0,19 ^b	25,96±0,34 ^b	579,91±17,46 ^a	34,18±2,32 ^a	18,15±2,36 ^b
	5. Saat	9,5±0,00 ^b	3,47±0,01 ^b	0,90±0,02 ^a	4,75±0,37 ^a	1,25±0,01 ^a	6,40±0,48 ^a	32,90±0,17	41,27±0,33 ^a	25,83±0,29 ^c	530,38±26,74 ^b	29,20±2,15 ^c	13,92±1,59 ^a

*Her sütun için istatistiki analiz kendi içerisinde yapılmış ve aynı harfle gösterilen ortalamalar P<0,05 önem seviyesinde aynı olarak kabul edilmiştir

Titrasyon asitliği değişimi

Yapılan araştırmada greylurt sularında titrasyon asitlik miktarı sitrik asit cinsinden hesaplanmış olup (Igual *et al.* 2010; Sicari *et al.* 2018) naringinaz enzimi ilave edilmiş greylurt sularının 1. ve 5. saatler sonucunda ölçülen titrasyon asitliği miktarları Tablo 12’de verilmiştir. Farklı sıcaklık ve konsantrasyonlarda enzim uygulanmış greylurt suyu örneklerinde en fazla %0.06 fark belirlenmiş olup süre parametresinin titrasyon asitliği miktarı üzerinde çok etkili ($p<0.01$) olduğu tespit edilmiştir. İkili interaksiyonların hiçbirinin titrasyon asitliği üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığı bulunmuştur (Tablo 13).

Kelebek *et al.* (2008) iki çeşit greylurt suyunda yaptıkları araştırma da greylurt sularının toplam asitliğini 11.3 ve 11.4 g/L olarak bulmuşlardır. Aadil *et al.* (2013) çalışmalarında taze greylurt suyunun titrasyon asitliği miktarını %0.16 olarak belirlemişlerdir. Sicari *et al.* (2018) farklı greylurt çeşitlerinden elde edilen taze sıkılmış greylurt sularında titrasyon asitliği miktarını 0.58-1.03 g/100 ml olarak belirlemişlerdir. Gonzalez-Temino *et al.* (2021) immobilize edilmiş naringinazın ilave edildiği greylurt suyunun titrasyon asitliği miktarının 1.57 g/L’den 1.49 g/L’ye düştüğünü bildirmiş olup, naringinaz enziminin greylurt suyunun titrasyon asitliği miktarında önemli bir değişikliğe sebep olmadığını belirtmişlerdir.

Kundu *et al.* (2022), çalışmalarında turunçgil sularının acılığını gidermek amacıyla enzim ilavesi sonucu biyokimyasal özelliklerini araştırmışlardır. Enzim uygulama öncesi ve sonrasında titrasyon asitliği miktarını sırasıyla %0.40 ve %0.41 olarak belirlemişlerdir.

Kullanılan greylurt sularının mevsiminin dışında olması, uzun süreli depolama işleme tabi tutulması gibi faktörler sebebi ile titrasyon asitliği miktarında değişiklik gösterebileceği bildirilmiştir (Kelebek *et al.* 2008). Çalışmamızda taze sıkılmış greylurt suyunda titrasyon asitliği miktarı %0.86 olarak belirlenmiştir (Tablo 12). Bulunan bu değer literatür ile paralel bir sonuç göstermiştir. Enzim uygulaması sonrası titrasyon asitliği en fazla %0.92’ye çıkmış olup, bu farkın önemli olmadığı yapılan varyans analizi ile belirlenmiştir (Tablo 13).

Tablo 15. Enzim Uygulanan Greyfurt Sularının İnkübasyondan Sonraki Genel Özellikleri Arasında Korelasyonlar

	SÇKM	pH	TA	Renk koyuluğu	Renk Yoğunluğu	Renk tonu	Kırmızı Renk Boyutu	Sarı renk Boyutu	Mavi Renk Boyutu	TFM	DPPH*	ABTS ⁺
pH	-0,878**											
TA	-0,825**	0,768**										
Renk koyuluğu	-0,533**	0,535**	0,548**									
Renk Yoğunluğu	-0,537**	0,538**	0,548**	1000**								
Renk tonu	-0,118	0,151	0,214	0,217	0,204							
Kırmızı Renk Boyutu	-0,143	0,194	0,127	0,540**	0,548**	-0,648**						
Sarı renk Boyutu	-0,396*	0,405*	0,459*	0,678**	0,664**	0,793**	-0,175					
Mavi Renk Boyutu	0,457*	-0,491**	-0,508**	-0,915**	-0,906**	-0,453*	-0,315	-0,879**				
TFM	-0,542**	0,607**	0,264	0,427*	0,438*	-0,163	0,355	0,073	-0,248			
DPPH*	0,127	-0,145	-0,277	-0,060	-0,043	-0,397*	0,268	-0,467*	0,314	0,455*		
ABTS ⁺	0,173	-0,210	-0,303	-0,034	-0,018	-0,325	0,223	-0,400*	0,273	0,402*	0,980**	
Kuinik Asit	-0,470*	0,476*	0,489**	0,302	0,293	0,146	0,040	0,463*	-0,460*	-0,172	-0,726**	-0,728**
Fumarik Asit	0,064	-0,135	0,172	-0,137	-0,137	0,228	-0,292	-0,045	0,185	-0,359	-0,210	-0,207
Kerasiyanin Klorit	-0,250	0,356	0,294	0,434*	0,436*	0,179	0,179	0,208	-0,289	0,328	0,105	0,092
Siyanidin-3-O-glikozit	0,102	-0,148	-0,063	0,082	0,094	-0,160	0,172	-0,158	0,067	0,040	0,557**	0,616**
Klorogenik Asit	-0,017	-0,055	0,269	0,263	0,259	0,268	-0,055	0,342	-0,293	-0,436*	-0,429*	-0,332
Hesperidin (ppb)	0,116	-0,198	-0,233	-0,088	-0,072	-0,410*	0,232	-0,393*	0,263	0,216	0,653**	0,692**
Sinapik Asit	-0,486*	0,462*	0,573**	0,240	0,231	0,221	-0,049	0,454*	-0,413*	-0,319	-0,694**	-0,709**
Ferulik Asit	-0,446*	0,526**	0,523**	0,254	0,244	0,167	0,044	0,436*	-0,438*	-0,219	-0,760**	-0,779**
Rosmarinik Asit	-0,523**	0,473*	0,510**	0,332	0,335	0,037	0,124	0,192	-0,249	0,304	-0,048	-0,102
Vanillin	-0,214	0,111	0,232	0,120	0,126	0,150	-0,092	0,081	-0,038	0,318	0,160	0,187
Resveratrol	-0,323	0,415*	0,443*	0,370	0,374	0,397*	-0,081	0,381	-0,335	0,361	0,275	0,296

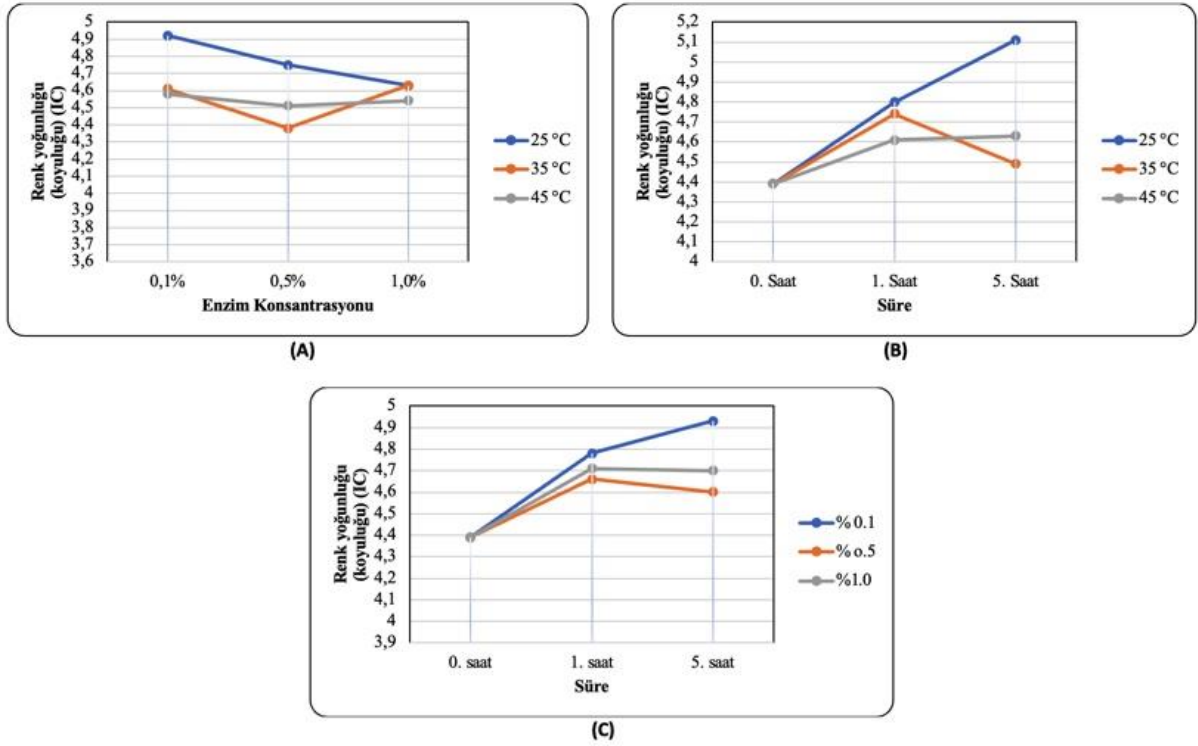
Tablo 15. (devam)

	Kuinik Asit	Fumarik Asit	Kerasiyanin Klorit	Siyanidin-3-O-glikozit	Klorogenik Asit	Hesperidin	Sinapik Asit	Ferulik Asit	Rosmarinik Asit	Vanillin	Resveratrol
Fumarik Asit	-0,106										
Kerasiyanin Klorit	-0,133	0,294									
Siyanidin-3-O-glikozit	-0,274	-0,263	0,071								
Klorogenik Asit	0,364	0,323	-0,023	-0,005							
Hesperidin	-0,335	-0,313	-0,326	0,779**	-0,187						
Sinapik Asit	0,890**	0,033	-0,145	-0,187	0,368	-0,338					
Ferulik Asit	0,931**	-0,105	-0,084	-0,336	0,341	-0,461*	0,915**				
Rosmarinik Asit	0,367	0,022	0,387*	0,182	0,012	0,022	0,279	0,294			
Vanillin	-0,184	0,097	-0,142	0,094	0,283	0,338	-0,231	-0,272	0,175		
Resveratrol	-0,210	0,252	0,270	0,070	0,152	0,004	-0,030	-0,135	0,000	0,336	

Renk değerleri değişimi

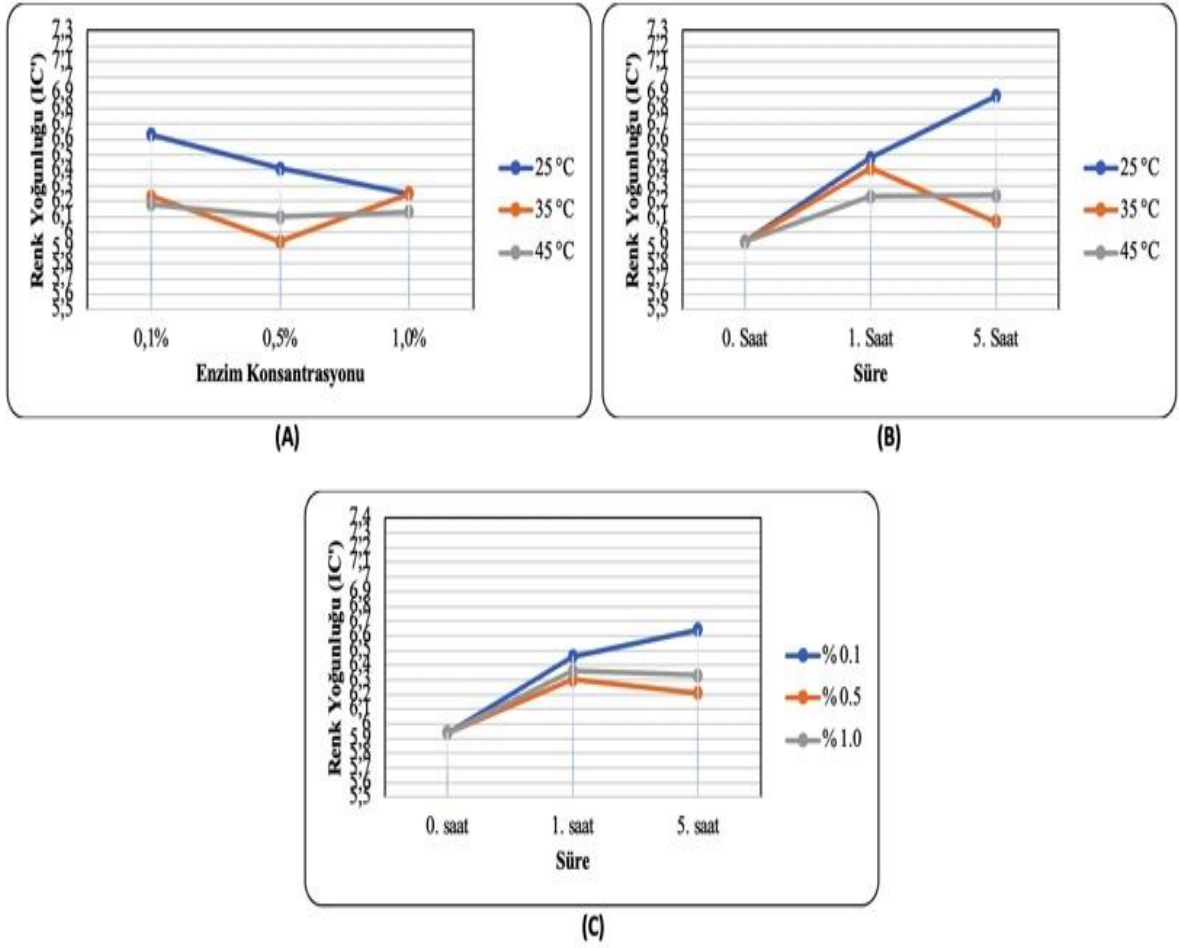
Greyfurt sularının 420, 520 ve 620 nm’de ölçülen absorbans değerlerinin renk koyuluğu (IC), renk yoğunluğu (IC’), renk tonu ile sarı renk, kırmızı renk ve mavi renk boyutları Tablo 12’te verilmiştir. Yapılan istatistiki analiz sonucunda örneklerin IC, IC’ ve renk tonu değerlerinin enzim uygulaması sonucunda sıcaklık, konsantrasyon ve süre parametrelerine bağlı değişimlerin çok anlamlı ($p>0.01$) olduğu bulunmuştur. Sıcaklık ve konsantrasyon interaksyonu IC ve IC’ değerleri üzerine çok önemli ($p>0.01$), renk tonu üzerine ise önemli ($p<0.05$) etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Konsantrasyon ve süre interaksyonunun ise yine IC ve IC’ değerleri üzerine çok önemli ($p>0.01$), renk tonu üzerine önemli ($p<0.05$) etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Sıcaklık x süre interaksyonunun ise her üç değer üzerine etkisi çok anlamlı ($p>0.01$) olarak belirlenmiştir. Sıcaklık parametresi sarı ve mavi renk boyutlarında önemli bir değişime neden olmamasına rağmen kırmızı renk boyutunda önemli ($p<0.05$) bir değişime sebep olmuştur. Konsantrasyon parametresi ise kırmızı ve mavi renk boyutlarında önemli bir değişime neden olmamıştır. Sarı renk boyutunda ise önemli ($p<0.05$) düzeyde değişim belirlenmiştir. Süre parametresi incelendiğinde kırmızı renk boyutunda değişim önemsiz bulunmuş olup sarı ve mavi renk boyutunda çok anlamlı ($p>0.01$) bulunmuştur. Sıcaklık ve konsantrasyon interaksyonu kırmızı ve mavi renk boyutlarında etkili iken sarı renk boyutunda etki göstermemiştir. Sıcaklık ve süre interaksyonuna bakıldığından kırmızı renk boyutunda önemsiz bir değişim tespit edilmişken mavi renk boyutunda önemli, sarı renk boyutunda çok önemli ($p>0.01$) bir değişim bulunmuştur. Konsantrasyon ve süre interaksyonunda her üç değerdeki değişim önemli bulunmamıştır (Tablo 13).

şekil 32 ve şekil 33, IC ve IC’ değerlerinin ikili interaksyonlarını göstermektedir. şekil 32 (B)’de süre ile birlikte renk koyuluğu (IC) 25 ve 45 °C’de artış gösterirken 35 °C’de 1. saatten sonra bir azalma belirlenmiştir. Bu azalma %0.5 enzim konsantrasyonu ilave edilen greyfurt suyunda meydana gelmiştir (şekil 32 (A)). Bunun yanı sıra diğer iki konsantrasyonda greyfurt suyunun IC değeri artmıştır (şekil 32 (C)).



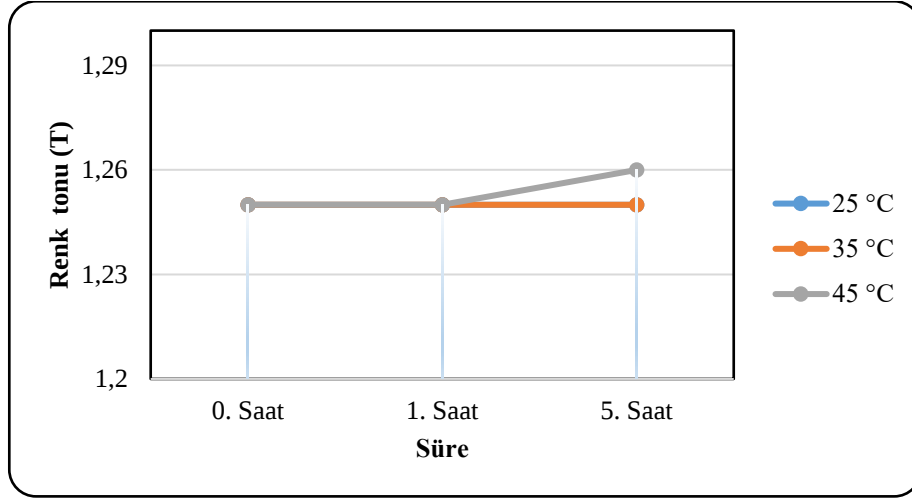
Şekil 32. *A.niger* ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu renk yoğunluğu (koyuluğu) (IC) değerlerindeki sıcaklık x konsantrasyon (A), sıcaklık x süre (B) ve konsantrasyon x süre (C) interaksiyonları

Greyfurt sularının sıcaklık x konsantrasyon, sıcaklık x süre ve konsantrasyon x süre interaksiyonlarının renk yoğunluğu (IC') üzerine etkileri, bu interaksiyonların greyfurt suyunun IC değeri üzerine etkileri ile benzerlik göstermiştir (Şekil 33).



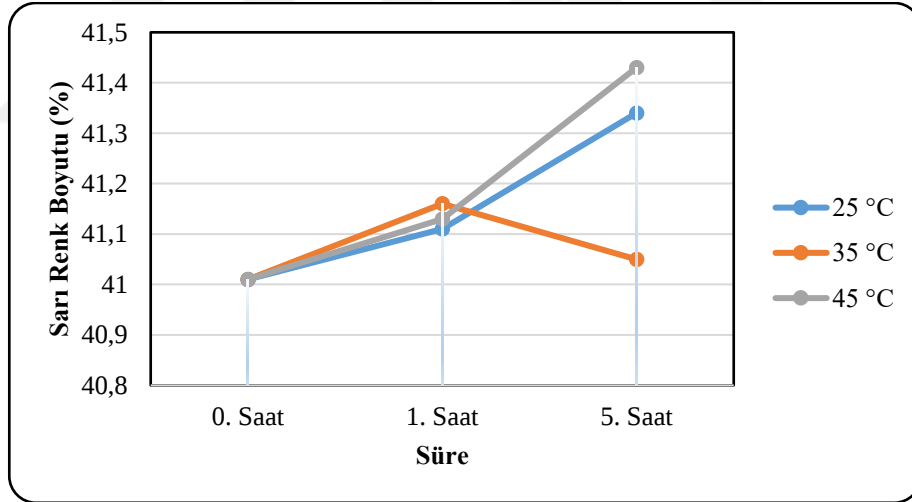
Şekil 33. *A.niger* ATCC 1688’den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu renk yoğunluğu (IC’) değerlerindeki sıcaklık x konsantrasyon (A), sıcaklık x süre (B) ve konsantrasyon x süre (C) etkileşimleri

Şekil 34’de naringinaz enzimi ilave edilmiş greyfurt sularının sıcaklık x süre ikili etkileşimi verilmiştir. Greyfurt suyu örneklerinde diğer sıcaklık derecelerindeki örneklerin renk tonları sabit kalırken, 45 °C’lik sıcaklıktaki greyfurt suyunun 1. saatten 5. saate doğru renk tonunda bir artış meydana gelmiştir.



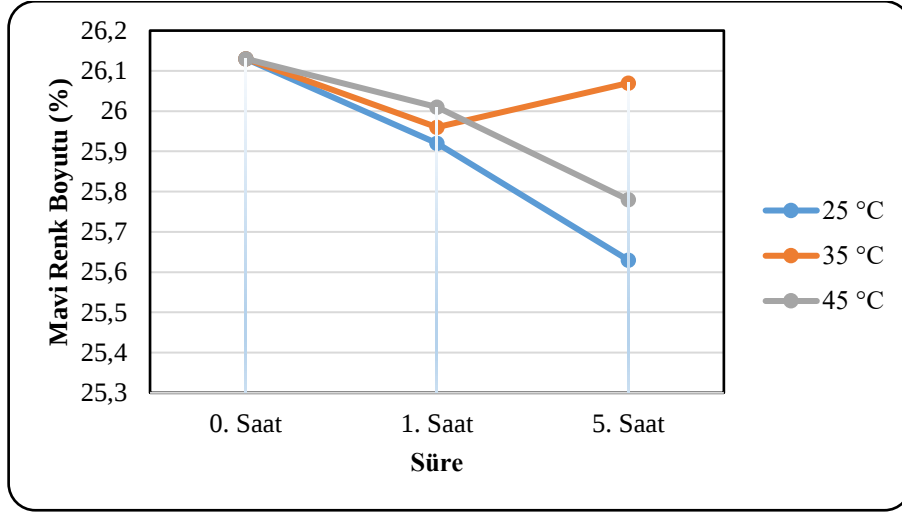
Şekil 34. *A.niger* ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu renk tonu değerlerindeki sıcaklık x süre interaksyonu

Naringinaz enzimi ilave edilmiş greyfurt suyu örneklerinin 25 ve 45 °C'lik sıcaklık dercelerindeki sarı renk yoğunluğu 5. saatin sonuna kadar bir artış göstermiştir. 35 °C'deki greyfurt suyu örneklerinin sarı renk yoğunluğunda ise, 1 ve 5 saat arasında bir azalma meydana gelmiştir (Şekil 35).



Şekil 35. *A.niger* ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu sarı renk boyutu (%) değerlerindeki sıcaklık x süre interaksyonu

Greyfurt sularının mavi renk yoğunluğu üzerine yalnızca sıcaklık x süre interaksyonlarının önemli olduğu bulunmuştur. Şekil 36'da 25 ve 45 °C'lik sıcaklık dercelerindeki greyfurt suyu örneklerinin mavi renk yoğunluğunda 5. saatin sonuna doğru bir düşüş belirlenmiş, 35 °C'lik sıcaklıktaki örneklerin mavi renk yoğunluğunda ise 1 ve 5 saat arasında bir artış tespit edilmiştir.



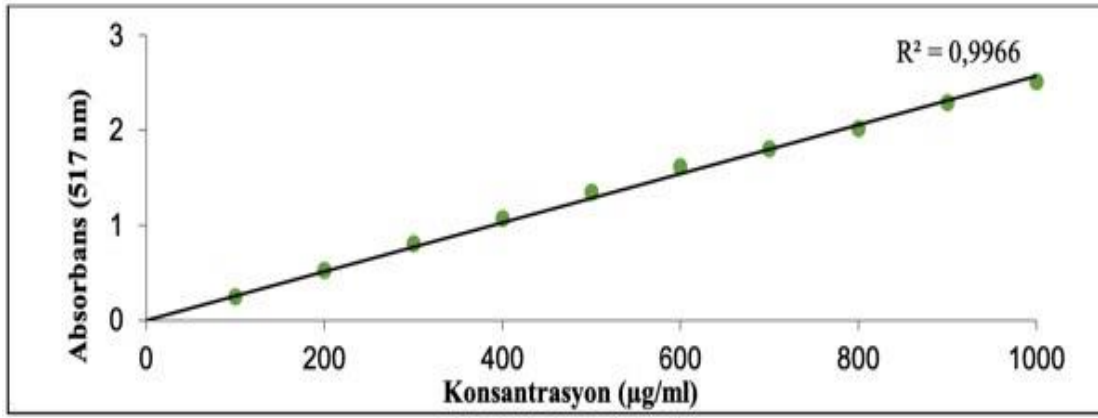
Şekil 36. *A.niger* ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greylırt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu mavi renk boyutu (%) değerlerindeki sıcaklık x süre (B) interaksyonu

Çalışmamızdaki renk ölçümü, Glories (1984) metodunun Kalkan Yildirim (2006) modifikasyonuna göre yapılmıştır. Kalkan Yildirim (2006), meyve şaraplarının renk değerleri üzerine yaptığı çalışmada karadut, böğürtlen, ayva, elma, kayısı, kavun, kırmızı ahududu, yaban mersini, vişne ve çilekten yapılan farklı meyve şarapları arasında en yüksek değerlerin yaban mersininde bulunduğunu bildirmiştir. Yapılan literatür taraması sonucu naringinaz enzimi ilave edilmiş greylırt suyunda renk ölçümü ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yönüyle çalışmamız alanında bir ilk olacaktır.

Kelebek *et al.* (2008) 'de kan portakalı sularında (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) yaptıkları renk ölçümlerinde Moro ve Sanguinello çeşitlerinde IC değerlerini sırasıyla; 1.40 ± 0.12 ile 0.84 ± 0.10 , renk tonu değerlerini sırasıyla; 59 ± 0.01 ile 1.23 ± 0.02 , %sarı renk boyutu değerlerini sırasıyla; 32.6 ± 0.04 ile 41.9 ± 0.12 , %kırmızı renk boyutu değerlerini sırasıyla; 55.0 ± 0.16 ile 34.1 ± 0.08 , ve mavi renk boyutu değerlerini sırasıyla; 12.4 ± 0.04 ile 24.0 ± 0.02 olarak belirlemişlerdir. Renk değerleri greylırt çeşitlerine göre farklılık gösterebilmektedir. Bu durumda çalışmamızda başlangıçta greylırt sularında belirlediğimiz renk değerleri Kelebek *et al.* (2008)'in araştırması sonucu belirlediği renk değerlerine göre biraz farklılık gösterebileceği muhtemeldir.

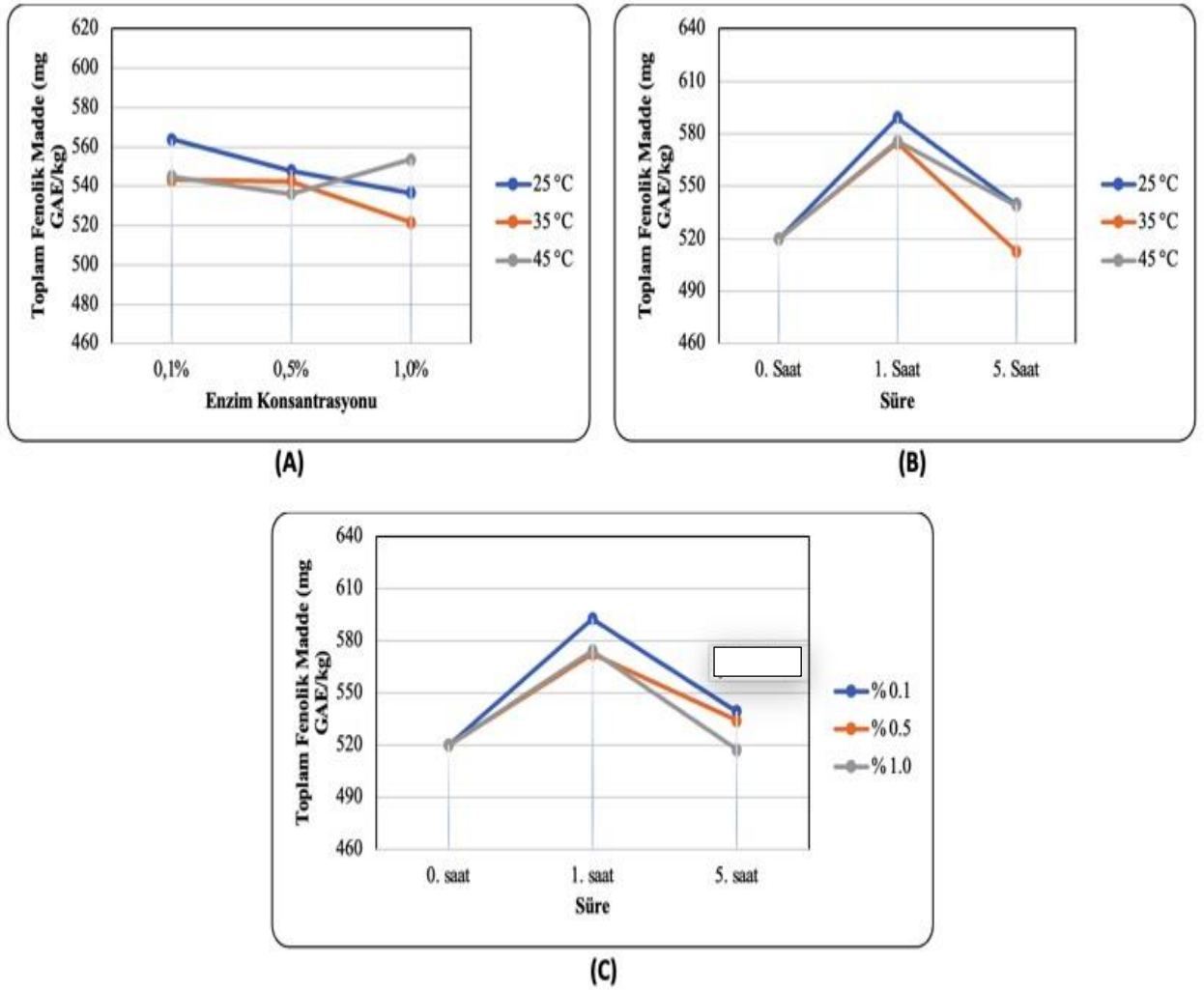
Toplam Fenolik Madde değişimi

Toplam fenolik madde analizi sonucu gallik asit eşdeğeri olarak belirlenmiştir. Analiz için hazırlanan standart gallik asit grafiği Şekil 37'de verilmiştir. Standart grafikten elde edilen denklem ($y=0,0009x+0,0755$ $R^2 = 0,993$) yardımıyla toplam fenolik madde miktarı gallik asit ekivaleni (GAE) olarak hesaplanmıştır.



Şekil 37. Toplam fenolik madde miktarı tayini için gallik asit kullanılarak hazırlanan standart grafik

Enzim uygulanmış greyfurt sularının 1. ve 5. saatler sonunda belirlenen toplam fenolik madde içerikleri Tablo 12’de belirtilmiştir. İnkübasyon süresi boyunca en yüksek TFM miktarı 25 °C’de 1 saat inkübe edilmiş %0.1 enzim ilaveli örnekte tespit edilmiştir. En düşük miktar ise 35 °C’de 5 saat inkübe edilmiş %1 enzim ilave edilmiş örnekte belirlenmiştir. Yapılan varyans analizi sonucu sıcaklık, konsantrasyon ve süre parametrelerinin TFM üzerine çok önemli ($p < 0.01$) bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. İkili interaksiyonlardan sıcaklık x konsantrasyon, sıcaklık x süre ve konsantrasyon x süre interaksiyonlarında TFM üzerine çok anlamlı ($p < 0.01$) bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 13). Şekil 38 (A)’da belirtildiği üzere 25 °C’de enzim konsantrasyonu arttıkça TFM miktarında bir düşüş gerçekleşmiştir. Diğer taraftan 35 °C’de %0.5 enzim ilave edilmiş greyfurt suyu örneklerindeki TFM miktarı %0.1 enzim ilave edilmiş örneklerin TFM miktarından daha yüksek bir miktarda belirlenmiş olup, %1 enzim ilave edilmiş örneklerin TFM miktarında ise bir düşüş görülmüştür. 45 °C’de ise %0.5 enzim ilave edilmiş örneklerin TFM miktarında bir düşüş görülürken %1 enzim konsantrasyonunda bu miktarda bir artış meydana gelmiştir. Bu durumda enzimin optimum sıcaklığına yakın bir sıcaklık olan 45 °C’de naringin miktarındaki azalma %1 enzim konsantrasyonunda naringenin ve diğer bileşiklere daha fazla oranda dönüşmesinden kaynaklı olarak TFM miktarında bir artış olduğu düşünülmektedir. Şekil 38 (A)’da %0.1 enzim içeren greyfurt suyunda belirlenen TFM miktarının 25 °C’de farklılık gösterdiği belirlenmiştir. %0.5 enzim içeren greyfurt sularında her üç sıcaklık derecesinde birbirine yakın TFM miktarı tespit edilmiştir. %1 enzim içeren greyfurt sularında ise en yüksek TFM miktarı 45 °C’de belirlenmiştir. Şekil 38 (B)’de her üç sıcaklık derecesinde TFM miktarının bir saatin sonunda arttığı 5. saate doğru azaldığı görülmüştür. Yine aynı şekilde Şekil 38 (C)’de her üç enzim konsantrasyonunu içeren greyfurt sularında TFM miktarının birinci saatin sonunda arttığı daha sonra azaldığı bulunmuştur.



Şekil 38. *A.niger* ATCC 1688’den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu TFM (mgGAE/kg) değerlerindeki sıcaklık x konsantrasyon (A), sıcaklık x süre (B) ve konsantrasyon x süre (C) etkileşimleri

Cavia-Saiz *et al.* (2011), Amberlite IRA-400 ile fiziksel adsorpsiyona tabi tutulan greyfurt suyuna kıyasla, naringinaz enzimi ile acılığı giderilen greyfurt suyunun antioksidan kapasitesi ve oksidatif strese karşı koruyucu rolü üzerine etkisini araştırmışlardır. *Folin-ciocalteu* ayırıcı ile toplam fenol içeriği belirlenen çalışmada, en yüksek toplam fenol içeriği naringinaz işlemine tabi tutulan meyve suyunda tespit edildiği bildirilmiştir. Buna karşılık, Amberlite IRA-400 ile fiziksel adsorpsiyona tabi tutma işlemi, taze meyve suyu örneklerine kıyasla toplam fenol konsantrasyonunda bir azalmaya (%21) yol açtığını belirlemişlerdir.

Naringinaz ile muamele edilen greyfurt suyu örneklerinde inkübasyondan bir saat sonra tespit edilen toplam fenollerdeki artış, naringinden bir metabolit olan naringenin hidroksil gruplarına bağlı olabilir. Enzimatik kataliz ürünü olan naringenin, naringinden ziyade bir hidroksil grubuna sahiptir. Ayrıca, spektrofotometrik yöntemin, sadece fenollerle değil, aynı zamanda karbonhidrat (örn. glikoz) gibi diğer indirgeyici bileşiklerle de reaksiyona giren

Folin–Ciocalteu reaktifinin seçici olmaması nedeniyle polifenol içeriğini olduğundan daha fazla tespit edildiği bildirilmiştir (Escarpa and González, 2001). Ama bunun yanı sıra Cemeroğlu (2010), toplam fenolik madde'nin *folin ciocalteu* ayıracı ile belirlenmesinde ortamda bulunan askorbik asitin analizi olumsuz etkileyebildiğinden dolayı belirlenmiş olan toplam fenolik bileşik değerleri greyfurt sularında *folin ciocalteu* ayıracı ile belirlenen değerlerden daha düşük çıkabileceği belirtilmiştir. Bu durumda farklı teori ve bulgular bulunmaktadır. Bununla birlikte, bu yöntemin polifenollerin rutin analizi için yararlı bir analitik araç olmakta ve meyve ve sebzeler ile ürünleri arasındaki farklılıkların belirlenmesi için birçok laboratuvar da yaygın olarak kullanılmaktadır.

Antioksidan aktivite değişimi

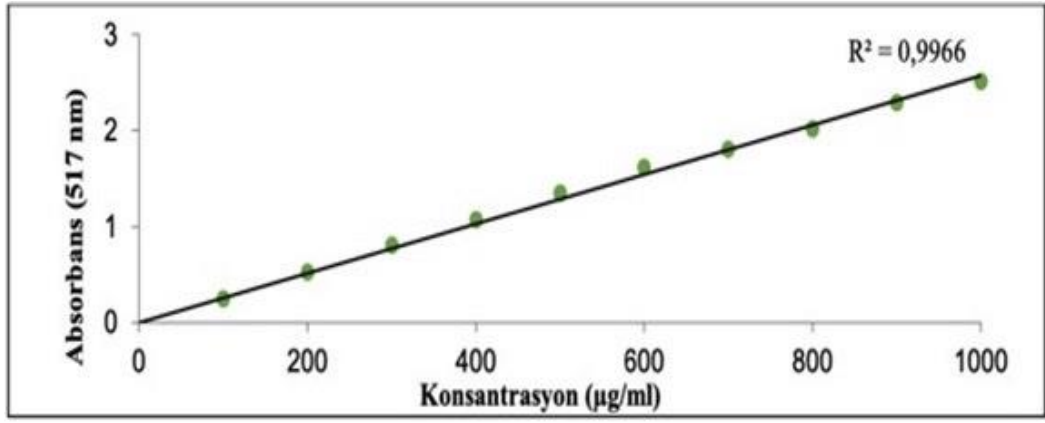
Antioksidanlar; serbest radikal oluşumunu sağlayan oksijen ve katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etkiye sahiptirler. Bununla birlikte radikallere karşı temizleyici (scavenging), bastırıcı (quencher) ve zincir kırıcı (chain breaking) etkiler de göstermektedirler (Mao *et al.* 2006). Antioksidanların etkinliğini belirlemek için çeşitli analitik yöntemler ve farklı substratlar kullanılmaktadır. Araştırmada kullanılan DPPH[•] ve ABTS^{•+} metotları, meyve suyu örneklerinde antioksidan aktivitenin belirlenmesinde genel olarak kullanılan yöntemlerdir.

DPPH[•] metodu

Farklı sıcaklık ve konsantrasyonlarda enzim ilave edilmiş greyfurt sularının 1. ve 5. saatler sonucunda DPPH[•] metodu ile antioksidan aktiviteleri Tablo 12'da belirtilmiştir.

DPPH[•] radikali giderme kapasitesi analizi, ortamda oluşan DPPH[•] serbest radikallerine antioksidanların proton transferi yapması sonucu 517 nm'de okunan absorbans değerlerinin azalmasına dayanmaktadır (Albayrak 2010). Metot, oldukça basit, hızlı ve birçok örneğin aynı anda radikal giderme aktivitelerinin belirlenebilmesini sağladığı için tercih edilmektedir. Ancak, ışık, oksijen ve kirliliğe karşı oldukça hassas olan bu metodun uygulanması sırasında dikkat edilmelidir (Mot *et al.* 2011).

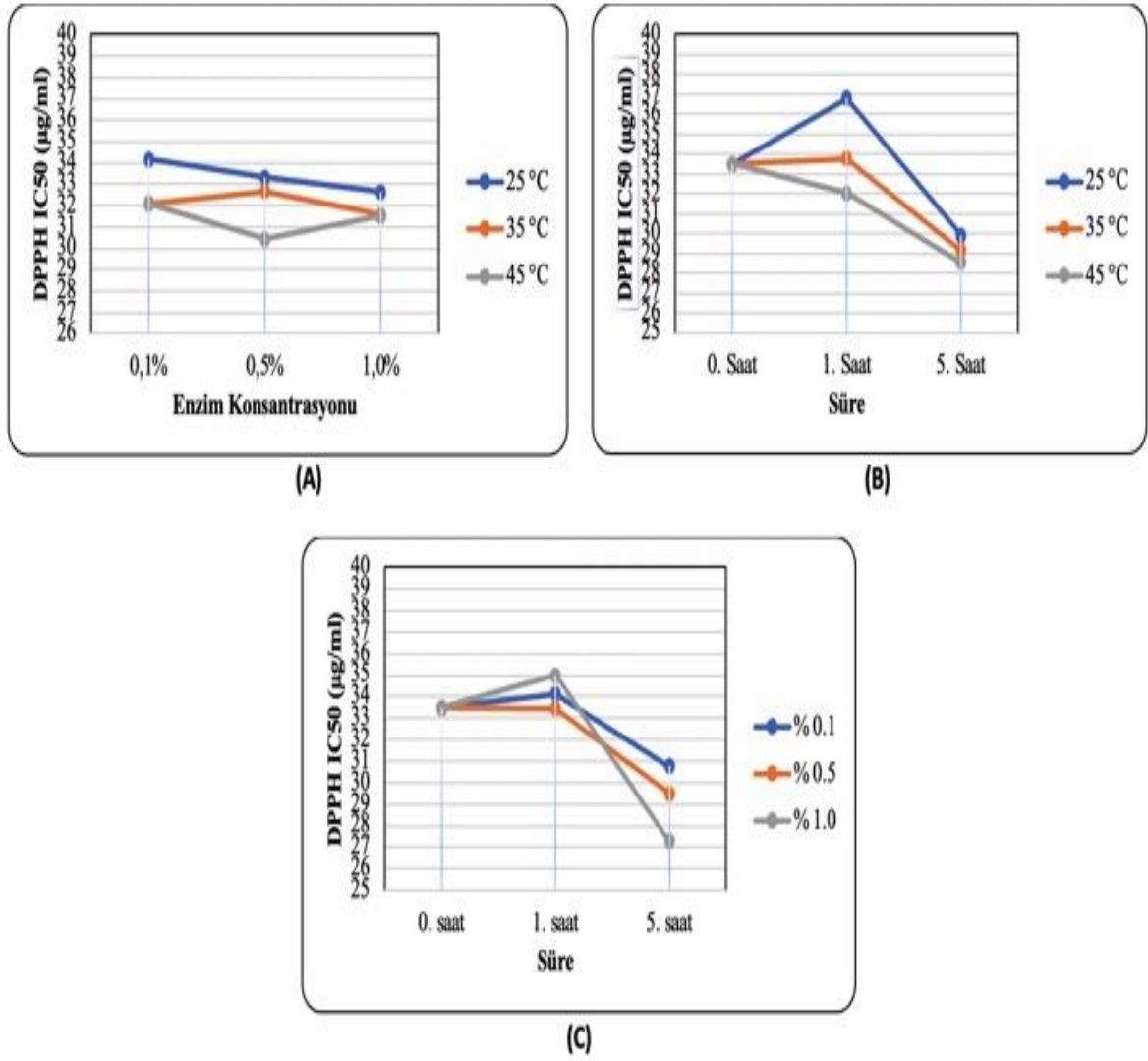
Şekil 39'da DPPH[•] serbest radikali giderme aktivitesi için hazırlanmış standart grafik yer almaktadır.



Şekil 39. DPPH• serbest radikali giderme aktivitesi için hazırlanmış standart grafik

Genel olarak uygulama süresi boyunca IC₅₀ değerlerinde bir yükselme meydana gelmiştir. IC₅₀ değeri “ortamdaki DPPH• radikalının %50’sini inhibe eden antioksidan maddenin konsantrasyonu” olarak tanımlanmaktadır. Bu değer ne kadar küçük olursa antioksidan aktivitenin o kadar yüksek olacağı anlaşılmaktadır. Bu durumda Tablo 16’da yer alan düşük IC₅₀ değerleri yüksek antioksidan kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. Çünkü reaksiyon ortamındaki DPPH• radikalının %50’sinin yok edilmesi için gereken etkili antioksidan konsantrasyonu olarak bilinen IC₅₀ değeri ile radikal giderme aktivitesi ters orantılıdır (İşbilir 2008). Yani aynı miktardaki serbest radikali daha düşük konsantrasyonda süpürebilmektedir.

Çalışmamızda en yüksek IC₅₀ değeri yani en düşük antioksidan aktivite değeri 25 °C’de inkübe edilen %0.5 enzim konsantrasyonlu örnekte belirlenmiştir. Bunun yanı sıra en yüksek antioksidan aktivite değeri ise 35 °C’deki sıcaklıkta inkübe edilen %1 enzim konsantrasyonlu örnekte tespit edilmiştir (Tablo 12). Yaptığımız varyans analizi sonucunda; sıcaklık ve süre parametrelerinin DPPH• metodu ile belirlenen antioksidan kapasite üzerine çok önemli bir etkiye (p<0.01) sahip olduğu enzim konsantrasyonu parametresinin ise önemli (p<0.05) bir etki oluşturduğu belirlenmiştir. Parametreler arasındaki interaksiyonlar incelendiğinde sıcaklık x konsantrasyon interaksiyonunun önemli (p<0.05) bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Tablo 13). Genel olarak 45 °C’deki sıcaklıkta inkübe edilen örneklerin diğer sıcaklıklara göre daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği görülmektedir (Şekil 40 (A)). Sıcaklık x süre interaksiyonunun p<0.01 düzeyinde çok önemli bir etkiye sahip olduğu (Tablo 13) bulunmuş ve her üç sıcaklık derecesinde genel olarak en yüksek antioksidan aktivite 5 saatlik inkübasyon sonucunda belirlenmiştir (Şekil 40 (B)). Konsantrasyon ve süre interaksiyonunun ise yine p<0.01 düzeyinde çok anlamlı olduğu belirlenmiş olup (Tablo 13) en yüksek antioksidan aktivite %1 enzim ilave edilmiş greyfurt sularının 5 saatlik inkübasyonu sonucunda tespit edilmiştir (Şekil 40 (C)).



Şekil 40. *A.niger* ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu DPPH* metodu ile belirlenen antioksidan aktivite değerlerindeki sıcaklık x konsantrasyon (A), sıcaklık x süre (B) ve konsantrasyon x süre (C) interaksiyonları

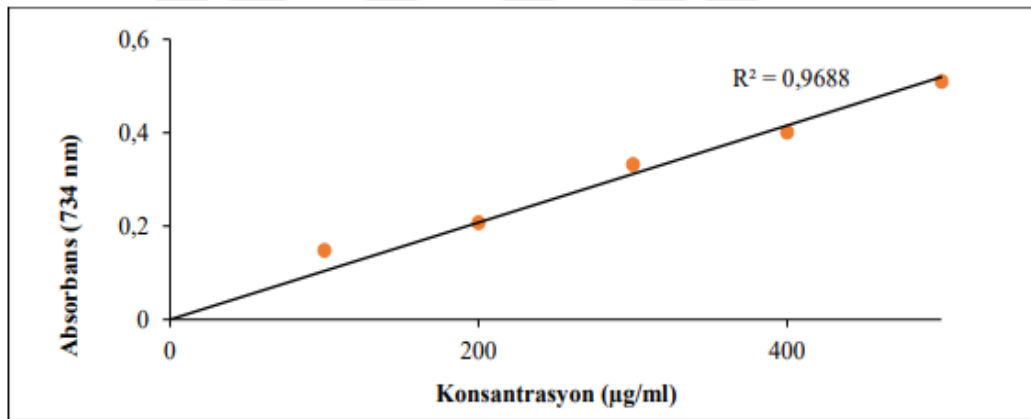
Yapılan literatür araştırması sonucu naringinaz enzimi uygulanmış greyfurt suyunda DPPH* radikali giderme metodu ile antioksidan tayinine rastlanmamıştır. Fakat bunun yanı sıra greyfurt suyunda DPPH* radikali giderme metodunun IC₅₀ sonucu ile belirlenmiş antioksidan aktivite çalışmaları sınırlıdır. Kelebek (2010) yaptığı bir çalışmada Türkiye'de yetiştirilen Greyfurt (*Citrus paradisi*) çeşitlerinin antioksidan aktivitelerini DPPH* metodu ile belirlemiş ve antioksidan aktivitenin 34.51 ile 128.37×10^{-3} arasında değişiklik gösterdiğini belirtmişlerdir. Bunun yanı sıra turuncgil sularına acılık gidermek amacıyla enzim ilave edilmesi üzerine çalışan Kundu *et al.* (2022), çalışmalarında turuncgil sularının enzim ilave edilmeden ve enzim ilave edildikten sonraki DPPH* antioksidan aktivitelerini sırasıyla 245.67 ve 382.33 µg GAE/ml olarak belirlemişlerdir.

ABTS^{•+} Metodu

Farklı sıcaklık ve konsantrasyonlarda enzim ilave edilmiş greyfurt sularının 1. ve 5. saatler sonucunda ABTS^{•+} antioksidan aktiviteleri Tablo 12’de verilmiştir. Antioksidan aktivite belirleme yönteminden biri olan ve oksidan olarak kullanılan K₂S₂O₈ (potasyum peroksidisülfat) tarafından yükseltgenen ABTS^{•+}, ABTS^{•+} radikale dönüşmektedir (Eşitlik 1). Antioksidan kapasitenin belirlenmesi, test edilen maddenin direkt ABTS^{•+} radikali ile etkileşime girmesi ile azalan rengin 734 nm dalga boyunda spektroskopik olarak ölçülmesi ile gerçekleşmektedir. ABTS^{•+} ile antioksidan kapasite belirleme, geniş pH aralıklarında kullanılabilen (Gülçin, 2012) ve hem lipofilik hemde hidrofilik bileşenlere uygulanabilen (Ali *et al.* 2008) kullanışlı bir metottur.



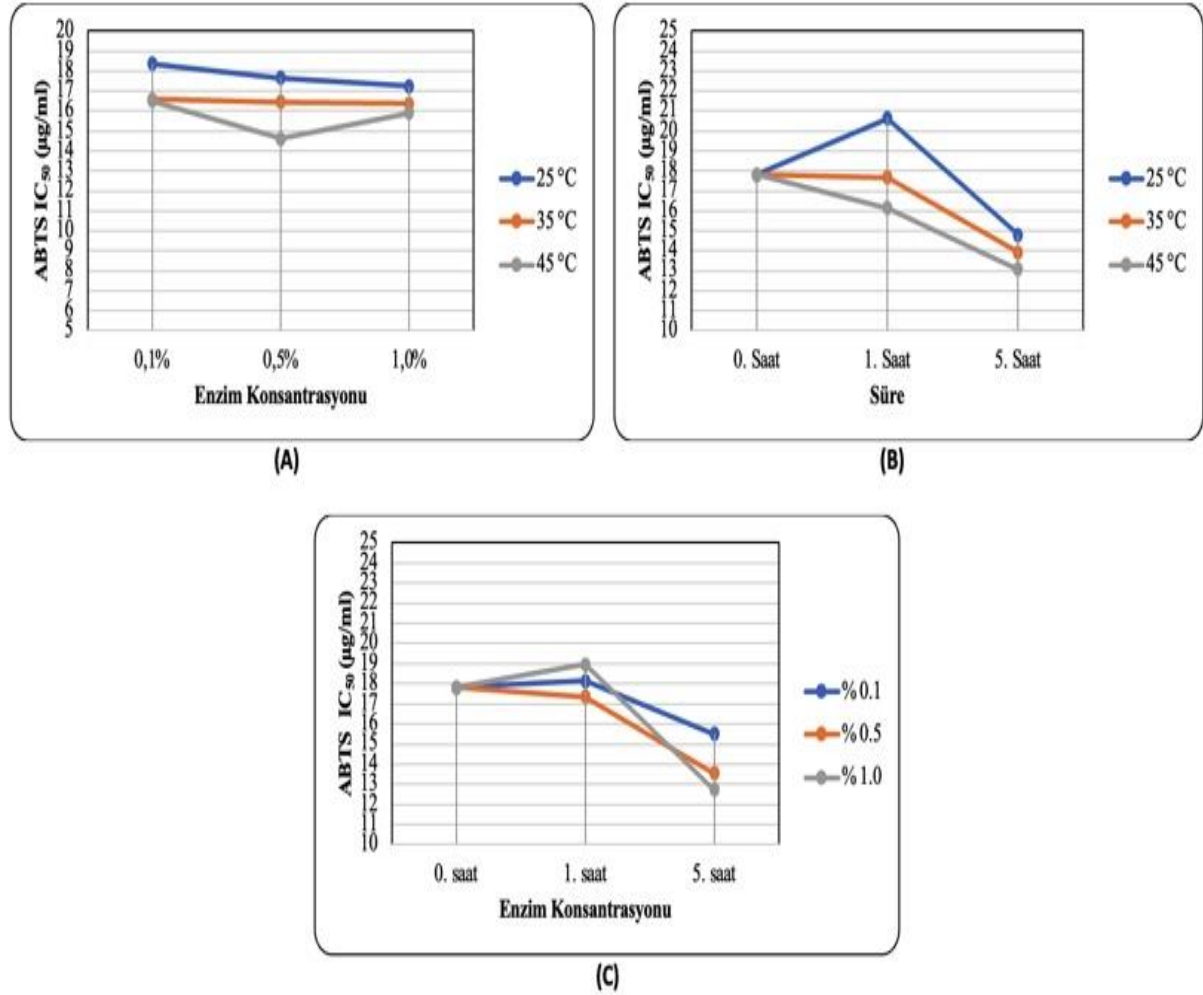
ABTS^{•+} serbest radikali giderme aktivitesi için hazırlanmış olan farklı konsantrasyondaki kontrol ABTS^{•+}’ler için 734 nm’deki ölçülen absorbans sonuçlarının standart grafiği verilmiştir (Şekil 41)



Şekil 41. ABTS^{•+} serbest radikali giderme aktivitesi için hazırlanmış standart grafik

Yaptığımız çalışmada ABTS^{•+} metodu ile belirlenen en yüksek IC₅₀ değeri yani en düşük antioksidan aktivite değeri 25 °C’de inkübe edilen %0.5 enzim konsantrasyonlu örneğin 1 saat inkübasyonu sonucu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra en yüksek antioksidan aktivite değeri ise 35 °C’deki sıcaklıkta inkübe edilen %1 enzim konsantrasyonlu ve 45 °C’de 5 saat inkübe edilen %0.5 enzim konsantrasyonlu örneklerde tespit edilmiştir (Tablo 12). Yaptığımız varyans analizi sonucunda; sıcaklık, süre ve konsantrasyon parametrelerinin ABTS^{•+} metodu ile belirlenen antioksidan kapasite üzerine p<0.01 düzeyinde çok önemli bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Parametreler arasındaki interaksiyonlar incelendiğinde her üç interaksiyonda antioksidan aktivitedeki değişim p<0.01 düzeyinde çok önemli olarak tespit edilmiştir (Tablo 13). Şekil 42(A), Şekil 42(B) ve Şekil 42(C)’de belirlenen değişimler DPPH[•] metodu belirlenen

sonuçlarla elde edilen grafiklerle benzerlik göstermektedir. Bu durumda her iki antioksidan belirleme yönteminde sonuçların birbiri ile pozitif korelasyon (0.980**) gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 15).



Şekil 42. *A. niger* ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu ABTS⁺⁺ metodu ile belirlenen antioksidan aktivite değerlerindeki sıcaklık x konsantrasyon (A), sıcaklık x süre (B) ve konsantrasyon x süre (C) interaksiyonları

Yapılan literatür araştırması sonucu naringinaz enzimi ilave edilmiş greyfurt suyunda ABTS⁺⁺ radikali giderme metodu ile antioksidan aktivite belirleme için bazı çalışmalar bulunmaktadır (Cavia-Saiz *et al.* 2011; Gonzalez-Temino *et al.* 2021). Fakat IC₅₀ değeri olarak belirlenen ABTS⁺⁺ radikali giderme metodu ile antioksidan tayini için herhangi bir literatüre rastlanmamıştır. Gonzalez-Temino *et al.* (2021) naringinazın asimetrik organik zarlar üzerinde immobilizasyonu ve greyfurt suyunun acısını gidermek için uygulanması üzerine yaptıkları çalışmada ABTS⁺⁺ antioksidan aktivite için, muamelenin taze ve işlenmiş meyve sularında sırasıyla 3.69 ± 0.20 ve 3.35 ± 0.04 mM trolox olarak tespit edildiğini ve meyve suyunun antioksidan kapasitesi üzerinde minimum etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Cavia-Saiz *et al.*

(2011) alışmalarında naringinaz ile enzimatik uygulamanın, naringenin içeriğindeki artışa bağlı olarak greyfurt suyunun toplam antioksidan kapasitesini arttırdığını belirtmişlerdir. Bununla birlikte, greyfurt veya portakal suyunun acılık giderme işleminin için Amberlite IR400 (Cavia-Saiz *et al.* 2011) veya Lewait VPOC 1064 (Stinco *et al.* 2013) ile muamele işleminin, antioksidan kapasitesinde yaklaşık %25'lere kadar kayıplara neden olduğu bildirilmiştir.

LC-MS/MS ile belirlenen fenolik bileşen profili

Greyfurt, sağlıklı yaşam için gerekli birçok besin maddesinin kaynağı olmakla birlikte fenolik bileşiklerin de iyi bir kaynağıdır. Bu fenolik bileşiklerin yapısı ve konsantrasyonu greyfurtun tat karakteristiğini ve organoleptik kalitesini büyük ölçüde etkilemektedir (Gattuso *et al.* 2007; Ribeiro and Ribeiro, 2008). Fenolik bileşikler antioksidan kapasitesi yüksek olan bileşiklerdir (Majo *et al.* 2005; Xu *et al.* 2008).

Fenolik asitler ve flavanolar, narenciye sularındaki iki ana fenolik bileşik grubudur (Rapisarda *et al.* 1999). Greyfurt suyu, yüksek flavanon içeriğine sahiptir (Gorinstein *et al.* 2004; Gattuso *et al.* 2007). Greyfurttaki flavanonlar, esas olarak glikozit formları altında meydana gelmekte, bu glikozilasyon, rutinoz veya neohesperidoz tarafından 7. pozisyonda gerçekleşmektedir (Aturki *et al.* 2004). Naringin ve narirutin, greyfurt sularındaki ana flavanonlar olarak bilinmektedir (Gorinstein *et al.* 2004; Gattuso *et al.* 2007). Greyfurt sularında hesperidin, neohesperidin, didymin ve poncirin gibi başka flavanon glikozitleri de tanımlanmıştır (Vanamala *et al.* 2006). Greyfurt flavononları, anti-inflamatuar, antihipertansif, diüretik, analjezik ve hipolipidemik aktiviteler gibi çok çeşitli terapötik özellikler göstermektedir (Aturki *et al.* 2004; Majo *et al.* 2005; Xu *et al.* 2008).

Yaptığımız araştırmada greyfurt suyuna enzim ilave edilmeden önce ve farklı konsantrasyonlarda ve sıcaklıklarda enzim ilave edilmiş greyfurt suları örneklerine ait fenolik bileşen profilleri LC-MS/MS cihazı ile kantitatif olarak belirlenmiştir. Analizde, 32 adet fitokimyasal bileşik araştırılmış olup, bu bileşikler;

➤ **Fenolik asitlerden;** 4-OH-Benzoic Acid, Vanillik Asit, Ellagik Asit, Gallik Asit, Ferulik Asit, Rosmarinik Asit, Klorogenik Asit, Sinapik Asit, p-Kumarik Asit, Fumarik Asit, Kafeik Asit, Quinik Asit

➤ **Fitoaleksin:** Resveratrol

➤ **Flavanoidlerden;**

• **Flavonlar:** Apigenin, Luteolin

• **Flavonoller:** Kuersetin, Mirisetin, Izorhamnetin

- **Antosiyanidinler:** Peonidin-3-O-glukozit, Siyanidin-3-O-glikozit, Kerasiyanin Klorit
- **Flavanonlar:** Hesperidin, Taksifolin
- **Flavanoller:** Kateşin, Epikateşin, Epigallokateşin Gallat, Krisin, Viteksin, Vanillin, Galangin, Kurkumin'dir.

Ancak bu bileşiklerin hepsi greyfurt suyu örneklerinde belirlenememiş olup, belirlenen bileşikler Tablo 16'da verilmiştir.

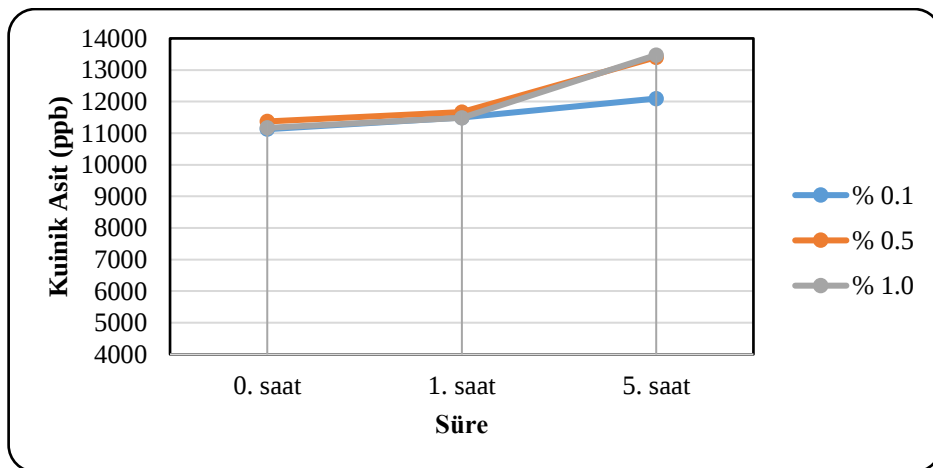


Tablo 16. Enzim İlave Edilen Greyfurt Sularında İnkübasyondan Sonra Fenolik Bileşik Profili (pbb)

Sıcaklık	Konsantrasyon	Süre	Kuink Asit	Fumarik Asit	Kerasiyanin Klorit	Siyanidin-3-O-glikozit	Klorogenik Asit	Hesperidin	Sinapik Asit	Ferulik Asit	Rosmarinik Asit	Vanillin	Resveratrol
25 °C	% 0,1	0. Saat	11126,09	1070,52	31,64	73,90	399,62	1860,09	9,43	119,33	17,53	68,63	2,03
		1. Saat	11685,73	413,75	33,47	86,01	385,45	2065,42	14,42	179,20	18,14	69,50	2,74
		5. Saat	11748,81	955,27	76,75	72,94	408,91	1726,52	27,30	270,22	18,72	67,39	2,80
	% 0,5	0. Saat	11370,59	1156,44	31,07	75,53	407,73	1861,04	13,39	110,69	18,08	68,68	2,56
		1. Saat	11921,77	538,09	34,28	88,12	397,99	2007,94	18,68	205,23	18,95	69,59	2,95
		5. Saat	13914,48	1084,19	31,83	64,52	423,29	1757,58	37,08	375,97	18,71	69,43	2,07
	% 1	0. Saat	11167,76	909,80	31,70	75,90	399,39	1833,15	14,16	150,39	17,95	67,02	2,15
		1. Saat	11881,88	978,80	31,23	78,26	397,25	1916,41	32,72	168,55	19,45	70,93	2,83
		5. Saat	13503,32	1140,67	30,08	69,38	432,48	1800,40	52,55	459,67	18,83	68,25	2,55
	% 0,1	0. Saat	11126,09	1070,52	31,64	73,90	399,62	1860,09	9,43	119,33	17,53	68,63	2,03
		1. Saat	11757,63	1182,20	103,94	81,05	405,63	1815,84	16,73	195,30	20,92	68,52	2,42
		5. Saat	12277,81	1285,05	76,92	77,99	408,58	1793,64	25,91	259,41	19,73	70,91	2,21
	% 0,5	0. Saat	11370,59	1156,44	31,07	75,53	407,73	1861,04	13,39	110,69	18,08	68,68	2,56
		1. Saat	11736,66	1144,26	30,04	71,84	386,19	1903,73	17,70	149,30	18,53	69,01	2,12
		5. Saat	12890,26	1093,42	31,15	67,77	394,60	1787,37	44,96	452,91	18,86	66,09	1,86
	% 1	0. Saat	11167,76	909,80	31,70	75,90	399,39	1833,15	14,16	150,39	17,95	67,02	2,15
		1. Saat	11506,75	1279,07	85,41	72,00	407,68	1734,11	24,54	179,54	17,51	67,53	4,39
		5. Saat	13384,88	1155,46	33,55	77,97	439,99	1788,00	62,32	508,87	17,60	67,61	2,47
45 °C	% 0,1	0. Saat	11126,09	1070,52	31,64	73,90	399,62	1860,09	9,43	119,33	17,53	68,63	2,03
		1. Saat	11051,95	1110,04	76,26	63,05	380,53	1676,57	1,92	157,86	17,56	64,06	2,57
		5. Saat	12261,16	1081,72	30,92	73,96	407,90	1747,84	42,02	327,92	18,55	67,67	3,68
	% 0,5	0. Saat	11370,59	1156,44	31,07	75,53	407,73	1861,04	13,39	110,69	18,08	68,68	2,56
		1. Saat	11348,66	1010,43	32,45	64,67	406,86	1749,30	17,91	153,96	17,47	72,84	2,53
		5. Saat	13410,82	1079,66	34,75	67,68	377,36	1748,06	61,61	452,86	18,95	65,15	2,38
	% 1	0. Saat	11167,76	909,80	31,70	75,90	399,39	1833,15	14,16	150,39	17,95	67,02	2,15
		1. Saat	11057,09	1294,29	35,73	65,83	409,98	1827,07	10,17	182,23	18,82	74,97	4,26
		5. Saat	13531,44	424,29	29,96	61,84	399,73	1648,45	38,32	493,58	18,81	67,54	1,70

Örneklerde kuinik asit (11051,95-13914,48 ppb), majör bileşen olarak tespit edilmiştir. %0.5 enzim konsantrasyonu ile 25 °C’de 5 saat inkübe edilen örneğin, en yüksek miktarda kuinik asit içerdiği, %0.1 enzim konsantrasyonu ile 45 °C’de 1 saat inkübe edilen örneğin ise en düşük miktarda kuinik asit içerdiği bulunmuştur (Tablo 16). Varyans analizi sonuçları değerlendirildiğinde, konsantrasyon ve süre parametrelerinin ayrı ayrı kuinik asit üzerine çok önemli düzeyde ($p<0.01$) etkili olduğu belirlenmiş olup, sıcaklık x süre interaksiyonunun önemli ($p<0.05$) ve konsantrasyon x süre interaksiyonlarının ise çok önemli ($p<0.01$) düzeyde etkili olduğu tespit edilmiştir (Tablo 17). Şekil 43’te örneklerin kuinik asit miktarında 1. saatte çok az bir değişim meydana gelirken 5. saate doğru %0.5 ve %1 enzim ilave edilmiş greyfurt sularında %0.1 enzim ilave edilmiş greyfurt sularına göre daha fazla bir artış meydana gelmiştir. Yapılan literatür araştırması sonucu naringinaz enzimi ilave edilmiş greyfurt sularında kuinik asit miktarı ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak enzim konsantrasyonunun artmasıyla birlikte en yüksek miktarda belirlenen fenolik bileşiğin daha çok etkilenebileceği bildirilmiştir (Ruviano *et al.* 2019). Akyıldız *et al.* (2022), çalışmalarında iyon değişim reçineleri ile muamele edilmiş portakal sularında değişim parametrelerini belirlemişlerdir. Yaptıkları çalışma sonucunda kuinik asit içeriğini (667.14-1,171.26 mg/L) olarak belirlemiş ve Amberlite FPA53 reçinesi ile muamele edilmiş meyve sularındaki kuinik asit miktarında %10.46 artış olduğunu bildirmişlerdir.

Kuinik asitin meme kanseri hücrelerinde apoptoz aracılı sitotoksikite yoluyla antikanser aktivite gösteren bir antioksidan olduğu, ayrıca meme kanseri dokusunda artmış anjiyogenez faktörleri olan selektinlere güçlü bir afinite gösterdiği belirtilmiştir (Samimi *et al.* 2021). Aynı zamanda kuinik asitin anti-HIV-1 aktivitesi olduğu da bildirilmiştir (Yazdi *et al.* 2019).



Şekil 43. *A.niger* ATCC 1688’den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu kuinik asit miktarındaki konsantrasyon x süre interaksiyonu

Tablo 17. Enzim Uygulanan Greyfurt Sularının İnkübasyondan Sonraki Fenolik Bileşik Profili Varyans Analiz

Varyans Kaynakları	Sıcaklık (A)		Konsantrasyon (B)		Süre (C)		AXB		AXC		BXC	
SD	2		2		2		4		4		4	
Özellikler	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F
Kuinik Asit	221893,269	1,994	1681284,971	15,109**	15956704,121	143,395**	139454,081	1,253	308452,582	2,772*	1050731,384	9,442**
Fumarik Asit	229798,314	10,566**	9740,649	0,448	12772,972	0,587	71259,757	3,277*	241883,953	11,122**	159319,498	7,326**
Kerasiyanin Klorit	1105,453	1353,002**	2526,436	3092,193**	1791,771	2193,010**	373,291	456,884**	900,293	1101,900**	757,019	926,541**
Siyanidin -3-O-glikozit	246,106	100,784**	44,978	18,419**	116,276	47,617**	15,995	6,550**	205,200	84,032**	50,509	20,684**
Klorogenik Asit	282,047	7,860**	515,783	14,374**	755,168	21,046**	207,979	5,796**	460,843	12,843**	467,663	13,033**
Hesperidin	42740,754	9,938**	5873,037	1,366	57653,046	13,405**	1735,519	0,404	31288,329	7,275**	896,594	,208
Sinapik Asit	22,748	2,545	689,402	77,124**	5083,785	568,730**	195,861	21,911**	162,843	18,217**	96,707	10,819**
Ferulik Asit	741,530	1,240	26944,027	45,062**	383678,120	641,668**	156,028	0,261	2391,936	4,000*	20005,752	33,458**
Rosmarinik Asit	0,592	3,563*	0,108	0,652	4,129	24,831**	2,750	16,536**	,654	3,934*	,703	4,225**
Vanillin	1,637	,983	1,236	,742	18,133	10,882**	10,231	6,140**	5,584	3,351*	16,629	9,979**
Resveratrol	0,161	1,561	,553	5,382*	2,655	25,816**	0,433	4,209**	0,110	1,065	2,112	20,541**

*p<0,05 **p<0,01

AxB: Sıcaklık ve konsantrasyon etkileşimi

AxC: Sıcaklık ve süre etkileşimi

BxC: Konsantrasyon ve süre etkileşimi

Tablo 18. Enzim Uygulanan Greyfurt Sularının İnkübasyondan Sonraki Fenolik Bileşik Profili İçin ANOVA ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi

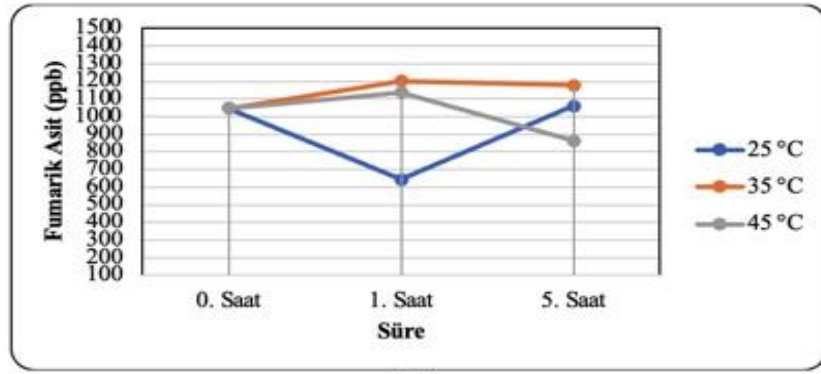
	Sıcaklık (°C)	Kuiniik Asit	Fumarik Asit	Kerasiyanin Klorit	Siyaniidin-3-O-glikozit	Klorogenik Asit	Hesperidin	Sinapik Asit	Ferulik Asit	Rosmarinik Asit	Vanillin	Resveratrol
Sıcaklık	25	12035,60±1013,77	916,39±278,23 ^c	36,89±14,57 ^b	76,06±7,29 ^a	405,79±14,56 ^a	1869,84±115,54 ^a	24,41±13,95	226,58±117,82	18,49±0,64 ^a	68,82±1,45	2,52±0,42
	35	11913,16±797,41	1141,80±155,2 ^a	50,60±28,58 ^a	74,88±4,05 ^b	405,49±15,09 ^a	1819,66±58,99 ^b	25,46±16,97	236,19±143,03	18,52±1,17 ^a	68,22±1,67	2,47±0,77
	45	11813,95±994,73	1015,24±259,72 ^b	37,17±14,35 ^b	69,15±5,61 ^c	398,79±12,48 ^b	1772,40±98,90 ^c	23,21±19,15	238,76±144,2	18,19±0,66 ^b	68,51±3,49	2,65±0,82
Konsantrasyon	% 0,1	11573,48±490,60 ^b	1026,62±282,04	54,8±27,62 ^a	75,19±6,15 ^a	399,54±11,15 ^b	1822,90±122,99	17,40±11,97 ^c	194,21±77,47 ^c	18,47±1,16	68,21±2,09	2,50±0,58 ^b
	% 0,5	12148,27±1012,25 ^a	1046,6±214,10	31,97±1,68 ^c	72,35±7,36 ^b	401,05±13,52 ^b	1837,45±93,32	26,45±17,10 ^b	235,81±145,15 ^b	18,41±0,59	68,68±2,37	2,40±0,33 ^b
	% 1	12040,96±1102,75 ^a	1000,22±263,54	37,90±17,38 ^b	72,55±5,73 ^b	409,47±16,16 ^a	1801,54±84,33	29,23±18,30 ^a	271,51±158,05 ^a	18,32±0,75	68,66±2,66	2,74±0,98 ^a
Süre	0. Saat	11221,48±219,79 ^c	1045,58±210,37	31,47±0,59 ^c	75,11±1,80 ^a	402,25±7,99 ^b	1851,43±26,60 ^a	12,32±4,27 ^c	126,8±35,09 ^c	17,85±0,48 ^b	68,11±1,58 ^b	2,24±0,47 ^b
	1. Saat	11549,79±327,69 ^b	994,55±305,48	51,42±27,91 ^a	74,53±9,07 ^a	397,50±11,03 ^c	1855,15±139,08 ^a	17,20±8,32 ^b	174,57±19,01 ^b	18,60±1,12 ^a	69,66±3,10 ^a	2,98±0,78 ^a
	5. Saat	12991,44±803,89 ^a	1033,3±238,56	41,77±19,36 ^b	70,45±5,56 ^b	410,32±18,83 ^a	1755,32±69,31 ^b	43,56±12,89 ^a	400,16±92,13 ^a	18,75±0,55 ^a	67,78±1,72 ^b	2,41±0,57 ^b

* Her sütun için istatistiki analiz kendi içerisinde yapılmış ve aynı harfle gösterilen ortalamalar P<0,05 önem seviyesinde aynı olarak kabul edilmiştir.

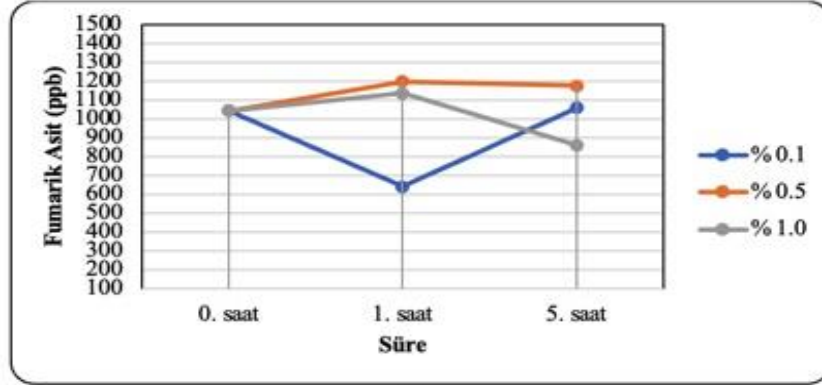
Greyfurt sularında fumarik asit miktarı en düşük 45 °C'lik sıcaklıkta %1 enzim ilave edilen örneğin 5 saat inkübasyonu sonucunda 424.29 ppb olarak belirlenmiştir. En yüksek miktar ise 35 °C'de %0.1 enzim ilave edilmiş greyfurt suyunun 5 saat inkübasyonu sonucunda 1285.05 olarak bulunmuştur (Tablo 16). Yapılan varyans analizi ile sıcaklık parametresinin fumarik asit miktarı üzerine $p<0.01$ düzeyinde çok önemli bir etkiye sahip olduğu, konsantrasyon ve süre parametrelerinin ise önemli bir etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. İnteraksiyonlar incelendiğinde sıcaklık x enzim konsantrasyonu intaraksiyonunun önemli ($p<0.05$), sıcaklık x süre ve enzim konsantrasyonu x süre parametrelerinin çok önemli ($p<0.01$) etki gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 17). 35 ve 45 °C sıcaklık derecesindeki greyfurt suyu örneklerinin fumarik asit miktarının 0-1 saatleri arasında arttığı, 1-5 saatleri arasında ise bir azalma gösterdiği, bunun yanı sıra 25 °C'lik sıcaklıktaki örneğin, 0-1 saatleri arasında azaldığı 1-5 saatleri arasında bir artış gösterdiği Şekil 44 (A)'da verilmiştir. Şekil 44 (B)'de %0.1 enzim içeren greyfurt sularını 0-1 saatleri arasında azaldığı, 1-5 saatleri arasında fumarik asit miktarının arttığı bulunmuştur. Bununla birlikte %0.5 ve %1 enzim içeren örneklerin fumarik asit miktarı 1. saate kadar artmış daha sonra azalmıştır.

Cserhalmi *et al.* (2006), çalışmalarında darbeli elektrik alanı ile muamele edilmiş narenciye suları üzerine yaptıkları çalışmada, greyfurt suyundaki fumarik asit miktarını 0.11 mg/L olarak belirlemişlerdir.

Fumarik asit, trikarboksilik asit döngüsünün bir ara metaboliti olarak görev yapan organik bir asittir. Yaygın olarak kullanılan bir gıda katkı maddesidir (FEEDAP *et al.* 2013). Siyanobakteriler üzerinde fumarik asitin etkisi olduğu da bildirilmiştir (Bai *et al.* 2015).



(A)

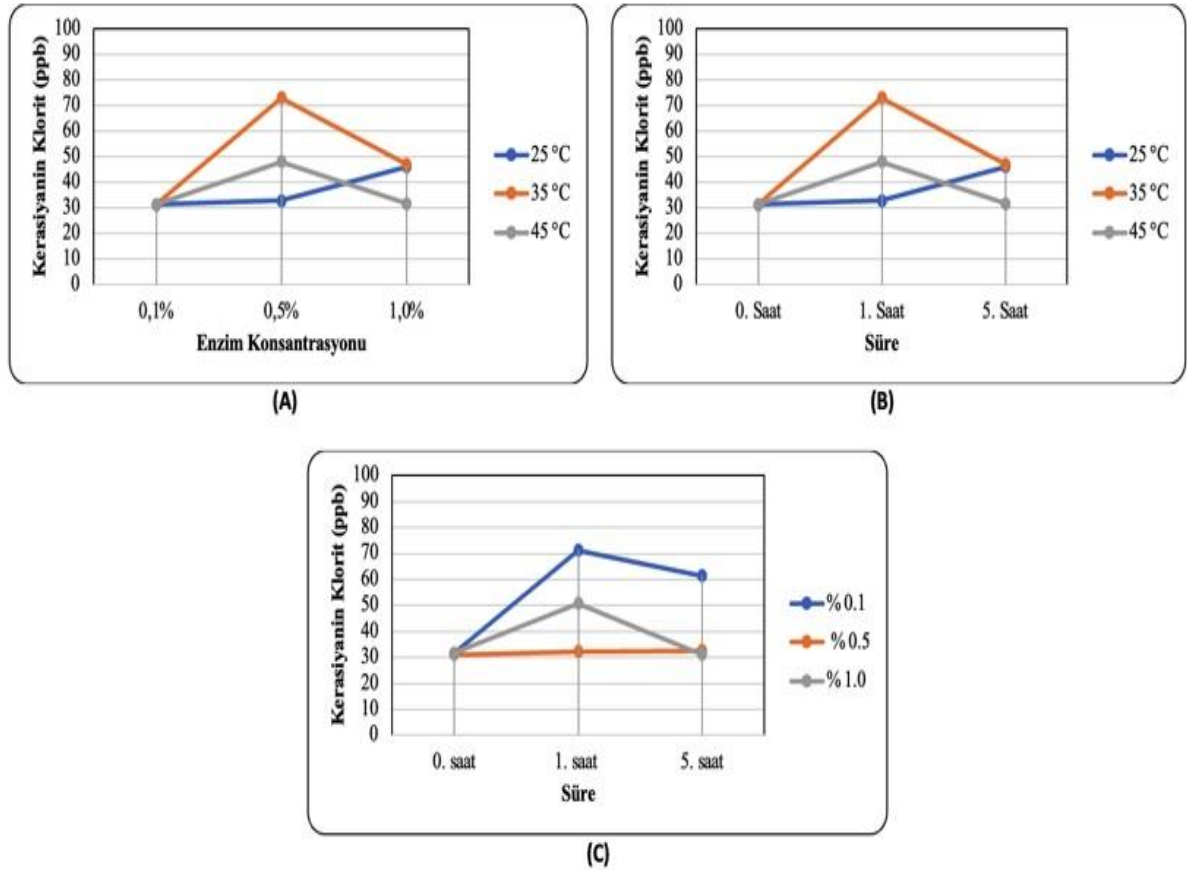


(B)

Şekil 44. *A.niger* ATCC 1688’den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu fumarik asit miktarına etki eden sıcaklık x süre (A) ve konsantrasyon x süre (B) interaksiyonları

Kerasiyanin klorit miktarı 29,96-103,94 ppb arasında değişiklik göstermiş olup (Tablo 16), değişim üzerine sıcaklık, süre ve konsantrasyon parametreleri ve bunların birbirleri ile olan interaksiyonlarının çok önemli ($p < 0.01$) etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Tablo 17). Şekil 45(B) ve Şekil 45(C) ‘de 35 ve 45 °C’lik sıcaklık derecelerinde %0.1 ve %0.5 enzim ilave edilmiş greyfurt sularının kerasiyanin klorit miktarında 1-5 saatleri arasında azalma görülürken 25 °C’lik sıcaklıkta artış meydana gelmiştir. Enzim konsantrasyonu ve uygulanan sıcaklık derecelerinin kerasiyanin klorit miktarı üzerindeki etkisi doğru orantılı bulunmuştur (Şekil 45 (A)). Yapılan literatür taraması sonucu narenciye sularında kerasiyanin klorit ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

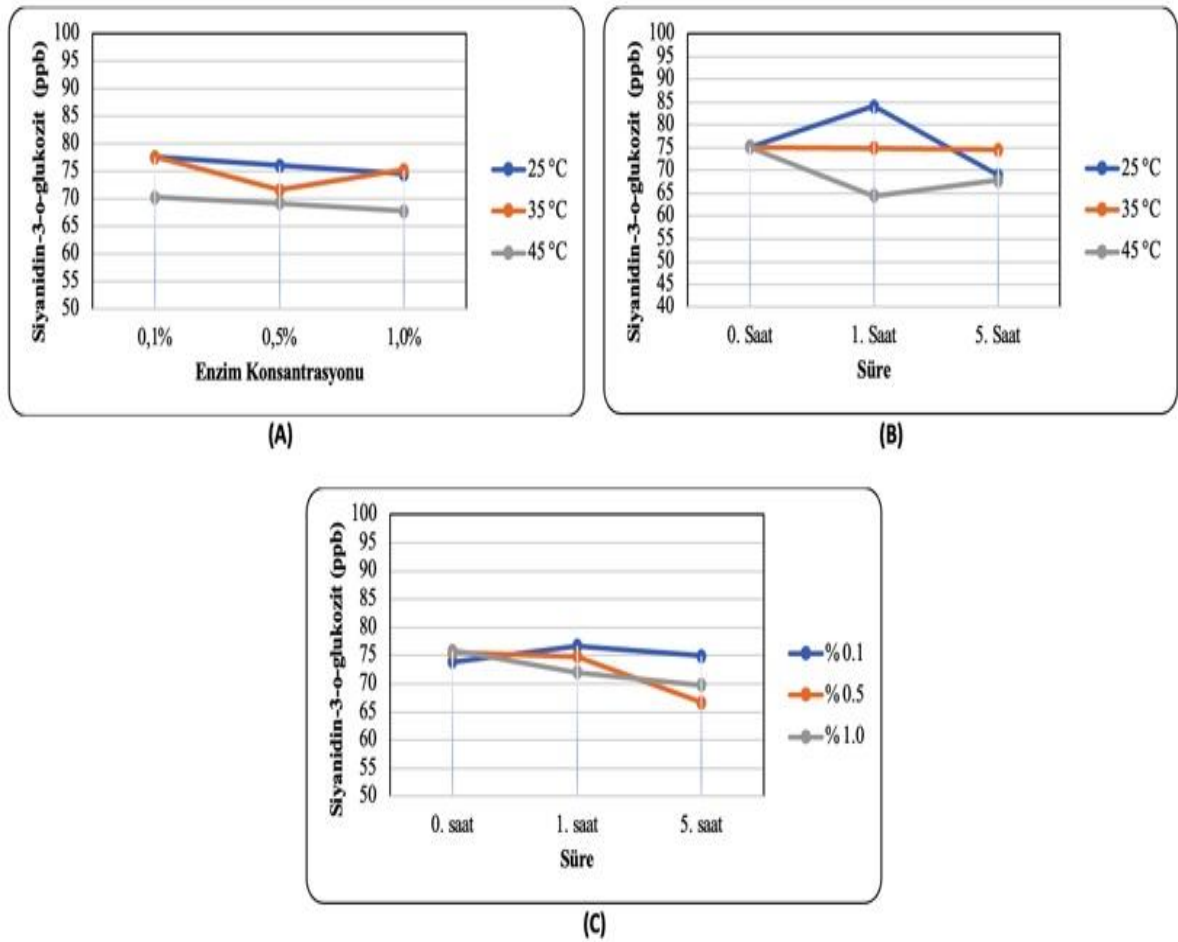
Kerasiyanin klorit bir antosiyanidin aglikonudur (Talpur *et al.* 2017). Antosiyaninler, güçlü serbest radikal süpürücüleri ve *in vitro* antioksidan yapıları nedeniyle oral, özofagus ve kolon kanserine karşı etkili olup, aynı zamanda antihipertansif (Rodriguez-Saona and Wrolstad, 2001) özellik gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 45. *A.niger* ATCC 1688’den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu kerasiyanin klorit miktarına etki eden sıcaklık x konsantrasyon (A), sıcaklık x süre (B) ve konsantrasyon x süre (C) interaksiyonları

Siyanidin-3-O-glukosit değeri 61,84-88,12 ppb arasında değişiklik göstermiştir (Tablo 16). Her üç parametre ve bunların interaksiyonlarının değişim üzerine çok anlamlı ($p < 0.01$) bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 17). Siyanidin-O-glikozit miktarında en çok değişiklik %0.5 enzim konsantrasyonlu greyfurt suyu örneklerinde ve 45 °C sıcaklık derecesinde 1 saatlik inkübasyon sonunda meydana gelmiştir. 1 ve 5 saat arasında en çok artış %1 enzim ilave edilen örneklerde (Şekil 46 (A)) ve 25 °C sıcaklık derecesindeki örneklerde (Şekil 46 (B)) belirlenmiştir. Yapılan literatür taraması sonucu enzim ilave edilmiş greyfurt suyunda siyanidin-O-glikozit miktarı belirlenmiş bir çalışmaya rastlanmamıştır.

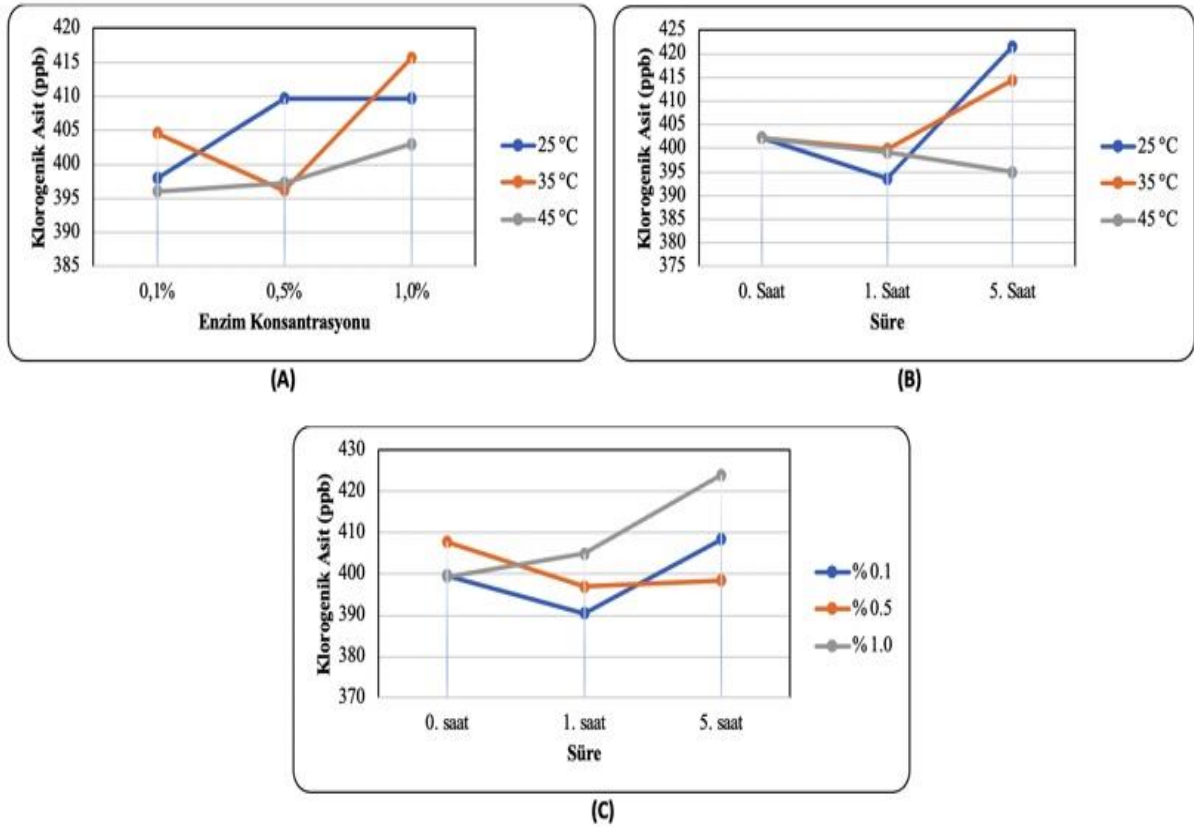
Siyanidin-3-O-glukozit bir antosiyanidin aglikonudur aynı zamanda nöroprotektif bir antioksidandır. Bununla birlikte, Siyanidin-3-O-glukozit’in öğrenme ve hafıza bozukluğuna karşı koruyucu olduğu, ancak normal öğrenme ve hafızanı gelişimi üzerinde hiçbir etkisi olmadığı belirlenmiştir (Qin *et al.* 2013).



Şekil 46. *A.niger* ATCC 1688’den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu siyanidin-3-O-glikozit miktarına etki eden sıcaklık x konsantrasyon (A), sıcaklık x süre (B) ve konsantrasyon x süre (C) etkileşimleri

Klorojenik asit değeri çalışmamızda 380,53-439,99 ppb arasında değişiklik göstermiş olup (Tablo 16), sıcaklık, enzim konsantrasyonu ve süre parametreleri ve bunların etkileşimlerinin klorojenik asit miktarındaki değişim üzerinde etkisi çok önemli ($p < 0.01$) bulunmuştur (Tablo 16). Klorojenik asit miktarları 1 ve 5 saat arasında en çok artış %1 enzim ilave edilen örneklerde (Şekil 47 (A)) ve 25 °C sıcaklık derecedeki örneklerde (Şekil 47 (B)) belirlenmiştir. Yapılan literatür araştırmasında enzim ilave edilmiş greyfurt suyunda belirlenmiş klorojenik asit miktarı ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Fenolik bileşiklerin büyük bir sınıfı, hemen hemen her bitkide bulunan hidroksisinamik asitlerdir. Hidroksisinamik asitlerin başlıca temsilcisi, gıdalarda esas olarak klorojenik asitin (5-kafeoilkuinik asit) kuinik asit ile bir ester olarak oluşturduğu kafeik asittir. Klorojenik asit, in vitro antioksidanlardır ve bu nedenle kardiyovasküler hastalıkların önlenmesine katkıda bulunabilmektedir (Olthof *et al.* 2001).



Şekil 47. *A.niger* ATCC 1688’den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu klorojenik asit miktarına etki eden sıcaklık x konsantrasyon (A), sıcaklık x süre (B) ve konsantrasyon x süre (C) interaksiyonları

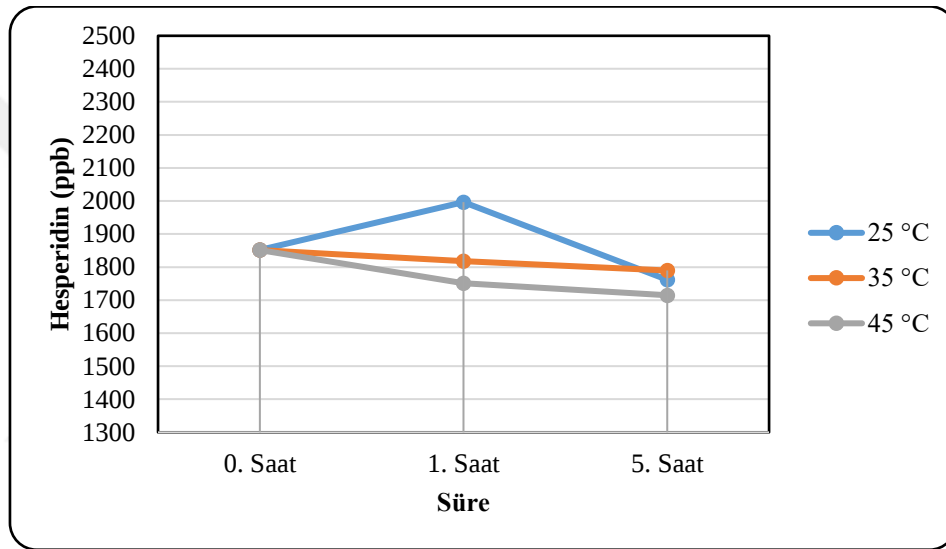
Hesperidin miktarında 1648,45-2065,42 ppb arası değişiklik tespit edilmiş olup (Tablo 16), varyans analizi sonucu, enzim konsantrasyonunun değişim üzerinde önemli ($p < 0.05$) bir etkiye sahip olmadığı, süre ve sıcaklık parametrelerinin ise çok önemli ($p < 0.01$) bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Sıcaklık x enzim konsantrasyon interaksiyonunun hesperidin miktarındaki değişimde herhangi bir etkiye sahip olmadığı fakat sıcaklık x süre ve enzim konsantrasyonu x süre interaksiyonlarının hesperidin miktarındaki değişimde çok anlamlı ($p < 0.01$) bir etki gösterdiği bulunmuştur (Tablo 17). Şekil 3. 48’de 0-1 saatleri arasında hesperidin miktarında bir artış görülmüşken, 1-5 saatleri arasında hesperidin miktarında bir azalma meydana gelmiştir.

Ruviaro *et al.* (2019), çalışmalarında çeşitli turuncgil meyvelerine enzim uygulamasını araştırmışlardır. Araştırma sonucunda turuncgil sularında; narirutin, naringin, hesperidin, naringenin, hesperetin, tangeritin ve diosmetin fenolik bileşiklerini bulmuşlardır. Çalışma da 24 saatlik inkübasyon sonucunda hesperidin miktarında önemli ölçüde azalma tespit etmişlerdir.

Kelebek *et al.* (2008), çalışmalarında greyfurt sularındaki en yüksek bileşiği hesperidin olarak belirlemişlerdir. Araştırmada hesperidin miktarının 143.20 ± 6.38 mg/l ve 112.98 ± 0.99 mg/l olduğunu bildirmişlerdir. Ruviaro *et al.* (2019), turuncgil sularına enzim uygulamasının 6.

saatinde hesperidin miktarını, 106.6 mg/100g, 12. saatinde, 116.8 mg/100g ve 24. saatinde 58.7 mg/100g olarak belirlemişlerdir. Çalışmamızda naringinaz enzimi ilave edilmiş greyfurt sularının hesperidin miktarında 1 saate kadar bir artış, 1-5 saatleri arasında bir azalma belirlenmiştir.

Hesperidin, turunçgillerde bulunan doğal olarak oluşan bir flavonoiddir ve özellikle portakal meyvesinde ve suyunda yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Hesperidinin kardiyovasküler risk faktörleri üzerindeki yararlı etkileri olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte sıçanlarda hesperidin tüketiminin lipid profili ve glikoz seviyeleri üzerindeki yararlı etkileri olduğu, ancak insanlar üzerindeki çalışmaların sonuçlarının hala belirsiz olduğu bildirilmiştir (Pla-Pagà *et al.* 2019).



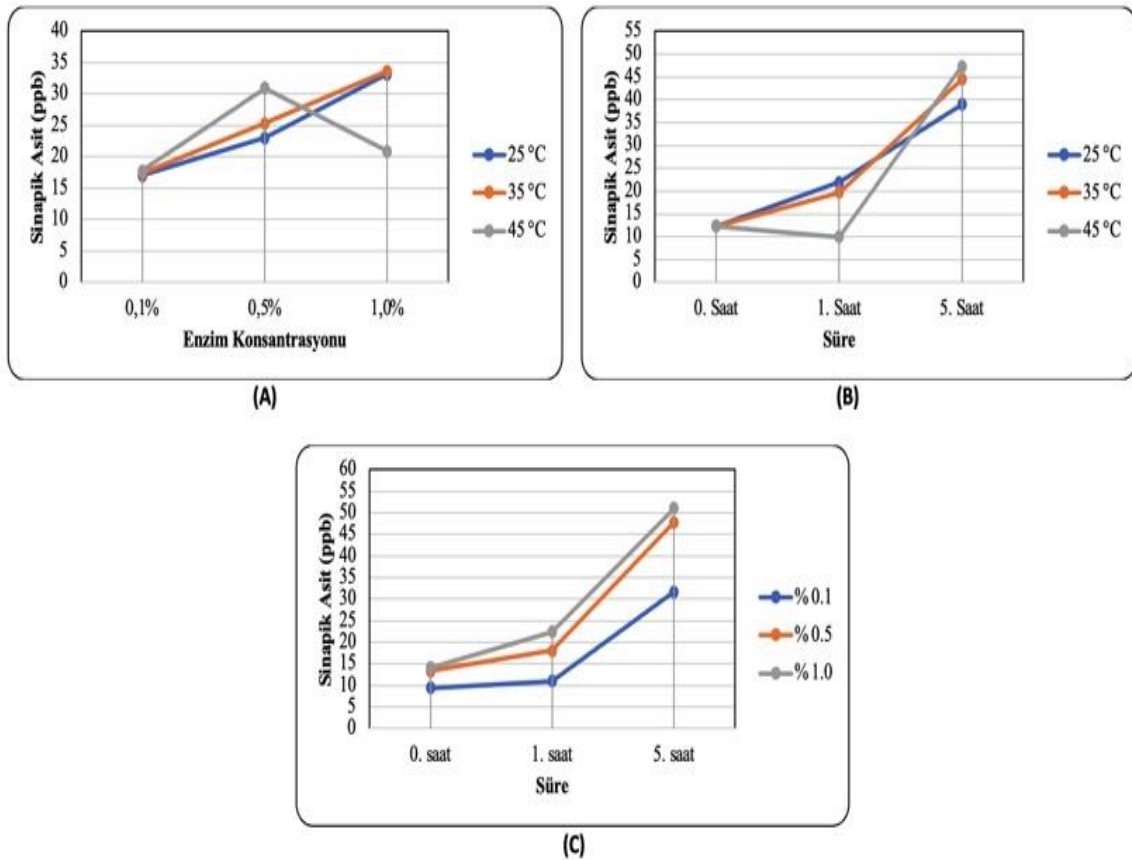
Şekil 48. *A.niger* ATCC 1688’den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu hesperidin miktarına etki eden sıcaklık x süre (B) interaksiyonları

Sinapik asit ve Ferulik asit miktarları sırasıyla 1,92-62,32 ve 110,69-493,58 ppb arasında değişkenlik göstermiştir (Tablo 16). Her iki fenolik asitin miktarlarındaki değişim üzerine sıcaklığın önemli bir etkisi olmamıştır. Fakat değişim üzerine süre ve enzim konsantrasyonunun çok önemli ($p<0.01$) bir etkisi olmuştur. Değişimlerde sıcaklık x konsantrasyon interaksiyonu sinapik asit miktarında çok önemli ($p<0.01$) bir etkiye sahip olurken, ferulik asit miktarında etkisi önemsiz bulunmuştur. Sıcaklık x süre interaksiyonu ise sinapik asitte çok önemli ($p<0.01$) etki gösterirken ferulik asit miktarlarında önemli ($p<0.05$) bir etki göstermiştir. Süre ve konsantrasyon interaksiyonunun ise her iki fenolik asite çok anlamlı ($p<0.01$) bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Tablo 17). Sinapik asit miktarı 5. Saatin sonuna kadar enzim konsantrasyonuna bağlı olarak bir artış göstermiştir (Şekil 49 (B), Şekil 49 (C)). Aynı şekilde ferulik asit miktarında da bir artış meydana gelmiştir (Şekil 50).

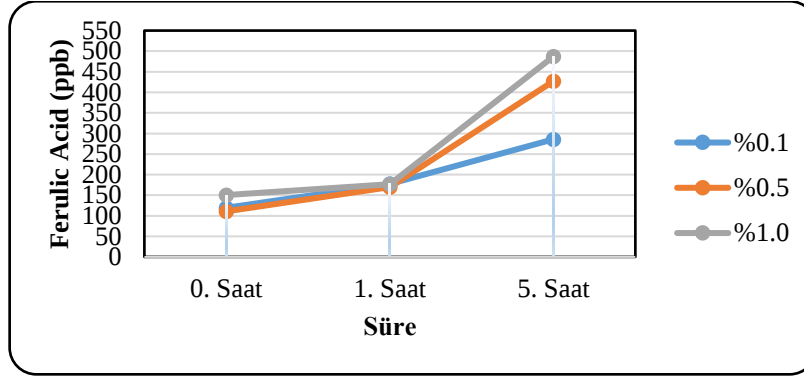
Stinco *et al.* (2013), Endüstriyel bir acılık giderme işleminin portakaldaki besinsel ve biyoaktif bileşikler üzerindeki etkisini araştırdıkları çalışmada, ferulik asit miktarının uygulama sonrası 5.44 mg/L'den 4.04 mg/L'ye düştüğünü bildirmişlerdir. Aynı çalışmada sinapik asit miktarının ise 3.70 mg/L'den 2.52 mg/L'ye düştüğünü belirtmişlerdir. Kelebek *et al.* (2009) çalışmalarında ferulik asit miktarını 51.26 mg/L, sinapik asit miktarını ise 8.60 mg/L olarak tespit etmişlerdir.

Ferulik asidin kimyasal adı 4-hidroksi-3-metoksisinamik asittir. Doğal bir antioksidan olarak ferulik asit, çoğunlukla cilt bakım ürünlerinde aynı zamanda sağlık alanında kullanılmıştır (Kumar and Pruthi, 2014). Çeşitli çalışmalar, ferulik asitin yaşlanma karşıtı (Brito *et al.* 2019), antitümör aktivitesi (Yang *et al.* 2015), nöroprotektif etkiler (Sung *et al.* 2014) ve kardiyovasküler hastalıklarla mücadele (Alam *et al.* 2013) dahil olmak üzere çok çeşitli terapötik etkilere sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Sinapik asit, serbest radikaller üzerine etkili bir antioksidan özellik göstermekle beraber, antiinflamatuvar, anti-kanserojen ve anti-UV özellikleri gibi birçok biyolojik özelliklere de sahiptir (Reungoat, *et al.* 2021).



Şekil 49. *A.niger* ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu sinapik asit miktarına etki eden sıcaklık x konsantrasyon (A), sıcaklık x süre (B) ve konsantrasyon x süre (C) interaksiyonları

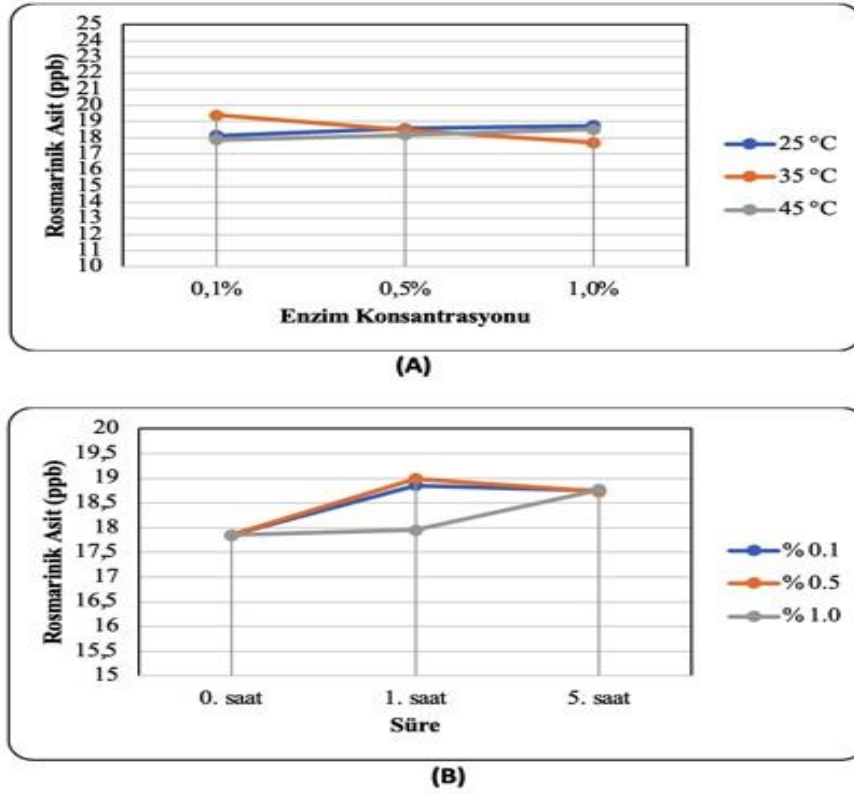


Şekil 50. *A.niger* ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu ferulik asit miktarına etki eden enzim konsantrasyonu x süre interaksyonu

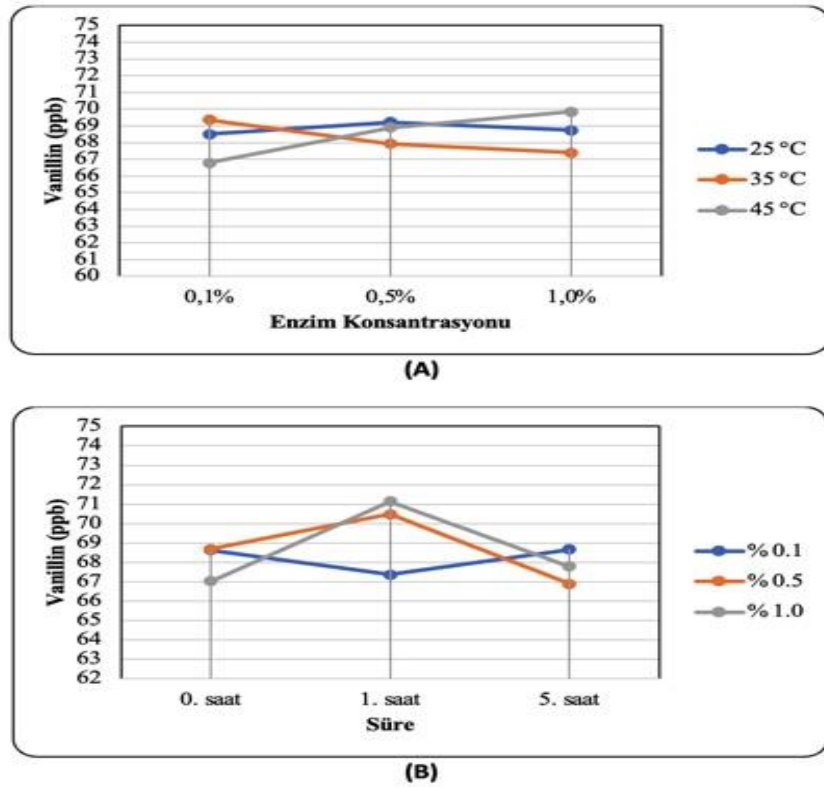
Rosmarinik asit miktarı 17,47-20,92 ppb arasında değişiklik gösterirken, Vanilin miktarı 67,02-74,97 ppm arasında değişiklik göstermiştir (Tablo 16). Rosmarinik asit ve vanilin için enzim konsantrasyonu değişime direkt etki etmemekle birlikte, süre çok önemli bir etki ($p<0.01$) göstermiştir. Sıcaklık, rosmarinik asit miktarlarında önemli bir etki ($p<0.05$) gösterirken vanilin miktarlarında örnekler üzerinde önemli bir etkiye sahip olmamıştır. Her iki fenolik bileşik için sıcaklık x konsantrasyonu ve süre x konsantrasyon interaksyonları çok önemli bir etki ($p<0.01$) gösterirken sıcaklık x süre interaksyonu önemli bir etki ($p<0.05$) göstermiştir (Tablo 17). Şekil 51 (A)'da rosmarinik asit miktarı %0.5 enzim ilaveli greyfurt suyu örnekleri için her üç sıcaklık derecesinde de aynı olarak bulunmuşken, greyfurt suyu örneklerinden %1 enzim konsantrasyonu içerenlerin rosmarinik asit miktarı en yüksek 35 °C sıcaklık derecesinde belirlenmiştir. Şekil 51 (B)'de rosmarinik asit miktarı %0.5 ve %0.1 enzim içeren örneklerde 0-1 saatleri arasında bir artış göstermiş olup, 1-5 saatleri arasında bir azalma meydana gelmiştir. Şekil 52 (A)'da 35 °C sıcaklık derecesindeki örneklerden vanilin miktarı en düşük %0.5 ve %1 enzim içeren örneklerde belirlenmiştir. Şekil 52 (B)'de ise 0-1 saatleri arası %0.5 ve %1 enzim içeren örneklerde rosmarinik asit miktarı artış gösterirken, 1-5 saatleri arasında azalma meydana gelmiştir. %0.1 enzim içeren örneklerde ise rosmarinik asit miktarı 0-1 saatleri arasında azalma göstermişken, 1-5 saatleri arasında artış meydana gelmiştir.

Yapılan literatür araştırması sonucunda enzim ilave edilmiş greyfurt suyunda rosmarinik asit ve vanilin içeriğine rastlanmamıştır. Moulehi *et al.* (2012), çalışmalarında mandalina ve acı portakalların antioksidan ve fenolik içeriklerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda rosmarinik asit miktarı mandarin ve acı portakalda sırasıyla 0.6-0.90 µg/g ve 3.35-4.09 µg/g olarak belirlenmiş, vanilin miktarını ise sırasıyla 0.26-1.61 µg/g ve 0.62-1.08 µg/g olarak tespit etmişlerdir.

Rosmarinik asit bir kafeik asit esteridir. Antiviral, antibakteriyel, antioksidan (Ivanov *et al.* 2022) ve antiinflamatuvar aktiviteler gibi birçok biyolojik aktiviteye sahiptir (Luo *et al.* 2020). Vanilinin antiosteoporotik olduğu belirlenmiştir (Tanaka *et al.* 2019).



Şekil 51. *A.niger* ATCC 1688’den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu rosmarinik asit miktarına etki eden sıcaklık x konsantrasyon (A), konsantrasyon x süre (B) interaksiyonları

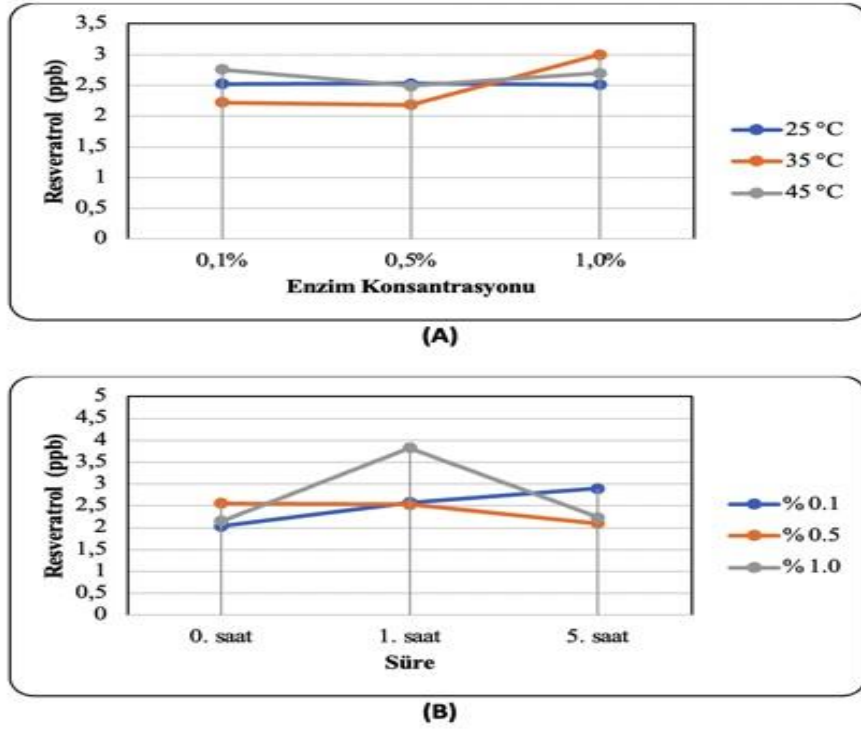


Şekil 52. *A.niger* ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu vanilin miktarına etki eden sıcaklık x konsantrasyon (A), konsantrasyon x süre (C) interaksiyonları

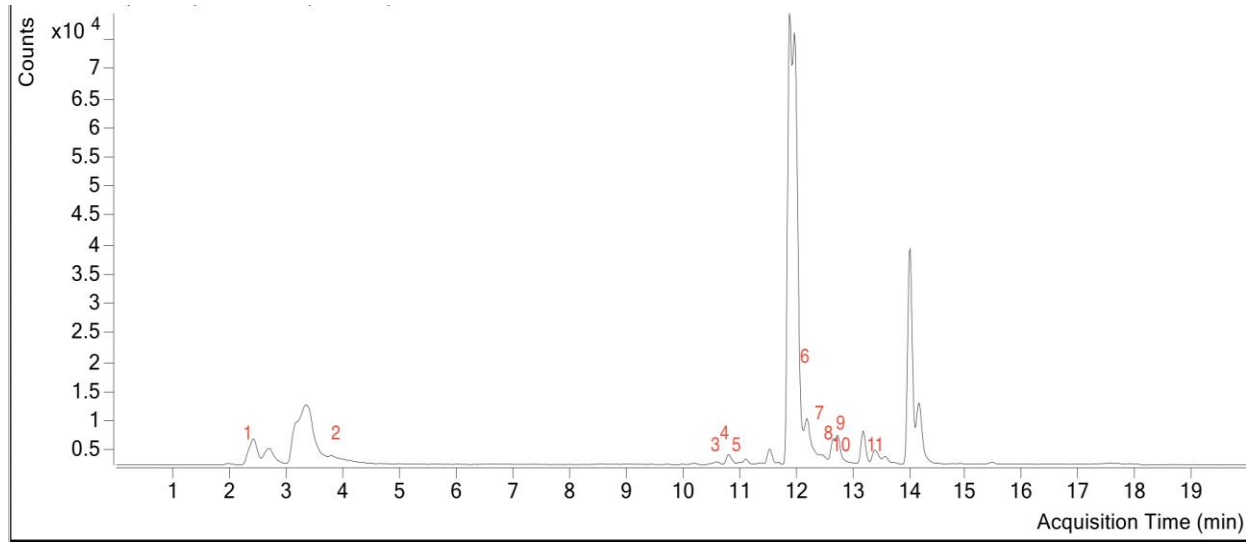
Greyfurt sularında en düşük düzeyde bulunan fenolik bileşiğin ise resveratrol (1.70-4.36 ppb) olduğu belirlenmiştir (Tablo 16). Şekil 53 (A)'da görüldüğü gibi 45 °C'lik inkübasyonda %0.5 enzim konsantrasyonlu örnekte resveratrol miktarında bir düşüş belirlenmiş, enzim konsantrasyonu arttıkça resveratrol miktarı tekrar artmıştır. Şekil 53 (B)'de 5. saatin sonunda %0.5 enzim konsantrasyonu içeren greyfurt sularındaki resveratrol miktarında artış gözükmemektedir.

Yapılan literatür araştırması sonucu enzim ilaveli greyfurt suyunda resveratrol ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bir polifenol olan resveratrol (trans-3, 5, 4'-trihidroksistilben), yaşa bağlı hastalıkları önlemek amacıyla ilgi uyandıran bir ajan olarak araştırılmıştır (Pollack *et al.* 2017). İn vitro ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda resveratrolün glukoz metabolizması, vasküler fonksiyon üzerinde yararlı etkileri olduğunu, ayrıca antiinflamatuvar ve antioksidan özellikleri olduğunu bildirmişlerdir (Baur *et al.* 2006). Resveratrolün mitokondriyal biyogenezi desteklediği ve böylece mitokondriyal fonksiyonu iyileştirdiği de çalışmalarda belirtilmiştir (Baur *et al.* 2006; Lagouge *et al.* 2006). Bu faydaların yanı sıra, resveratrolün diyabet ve kardiyovasküler hastalık gibi kronik hastalıkların önlenmesi ve tedavisinin insan üzerindeki rolünü belirlemek için yapılan araştırmalar, sınırlıdır ve net bir sonuç

belirtilmemiştir (Ghanim *et al.* 2010; Timmers *et al.* 2011; Bhat *et al.* 2012 ; Yoshino *et al.* 2012; Poulsen *et al.* 2013).



Şekil 53. *A.niger* ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu resveratrol miktarına etki eden sıcaklık x konsantrasyon (A) ve konsantrasyon x süre (B) interaksiyonları



Şekil 54. *A.niger* ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin ilave edildiği greyfurt suyunun 45 °C sıcaklıkta 5 saatlik inkübasyon sonucu fenolik profili kromatogramı (1: kuinik asit, 2: fumarik asit, 3: siyanidin-3-O-glikozit, 4: kerasiyanin klorit, 5: klorojenik asit, 6: heperidin, 7: sinapik asit, 8: ferulik asit, 9: vanilin, 10: rosmarinik asit, 11: resveratrol)

Yapılan literatür araştırması sonucu greylort suyuna acılık gidermek amacıyla naringinaz enzimi ilave edilmesiyle fenolik madde profilinde meydana gelen değişiklikle ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yönüyle yapılan bu çalışma bir ilk olacaktır.

Gattuso *et al.* (2007), turungillerdeki fenolik bileşikler üzerine yaptıkları araştırmada greylort sularının türlerine göre farklı fenolik bileşik kompozisyonuna sahip olduğunu bildirmişlerdir. Genel olarak greylort sularında flavanonlardan; didimin, eriositrin, hesperidin, naringin, narirutin, neohesperidin, neoeriositrin, poncirin flavonlardan; rutin, rhoifolin polimetoksiflavonlardan; heptametoksiflavon, nobiletin, tangeretin, aglikonları; hesperetin, naringenin, taxifolin, kuersetin olarak belirlenmekle birlikte bir flavanon olan naringenin her zaman greylort suyunda ayırt edici bir bileşen olarak kabul edildiğini bildirmişlerdir. Aynı zamanda Narirutinin de iyi miktarlarda bulunduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, beyaz greylort suyunun flavonoidler açısından pembe ve kırmızı çeşitlerden biraz daha zengin olduğunu ifade etmişlerdir. Bununla birlikte ticari greylort suları elle sıkılan muadillerinden daha da konsantre olma eğiliminde olduğu ve bu durumda ana bileşenler olan naringin, naringenin ve narirutinin daha da yüksek bir konsantrasyonda bulunduğu yapılan bazı çalışmalarda bildirilmiştir (Belajova and Suhaj, 2004; Vanamala *et al.* 2006; Lee and Kim, 2003; Ross *et al.* 2000).

Kelebek *et al.* (2008) kan portakallarından elde edilen meyve sularında yaptıkları çalışmada, hidroksibenzoik asitlerden gallik asit protokatekuik asit hidroksisinamik asitlerden kaffeik asit klorojenik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, sinapik asit flavanonlardan; narirutin, naringin hesperidin, neohesperidin, didimin, anthosianinlerden; delphinidin 3-glukosit, siyanidin-3-O-glucoside, delphinidin 3-(600-malonil glukosit), siyanidin 3-(600-malonil glukosit) siyanidin 3-O-(600-dioksalil glukosit), peonidin 3-(600-malonil glukosit) fenolik bileşiklerini belirlemişlerdir. Belirlenen bileşikler arasında Moro and Sanguinello eşidi portakallardan elde edilen meyve sularında en yüksek sırasıyla 143.20 ± 6.38 ve 112.98 ± 0.99 mg/l ile hesperidin belirlenmiştir. En düşük ise yine sırasıyla 0.51 ± 0.14 0.22 ± 0.08 mg/l ile neohesperidin olarak tespit etmişlerdir.

Kelebek (2010), Türkiye’de yetişen greylortların fenolik bileşik kompozisyonunu incelemiştir. Çalışma sonucunda, Hidroksibenzoik asitlerden; gallik asit protokatekuik asit hidroksibenzoik asit vanillik asit hidroksisinnamik asitlerden; kaffeik asit klorojenik asit p-kumarik asit ferulik asit sinapik asit flavanonlardan; narirutin, naringin, hesperidin, neohesperidin, didimin, poncirin bileşiklerini belirlemiştir. Farklı eşitlerdeki en yüksek değeri naringinde belirlemiş olup, bu değerlerin 320.41 ± 1.70^c , 464.13 ± 1.37^a , 270.21 ± 1.86^d , 352.67 ± 0.57^b mg/L olarak bulunduğunu bildirmiştir. Naringinden sonraki en yüksek değer ise

narirutinde tespit edilmiş olup bu değerleri 96.12 ± 1.91^c , 120.06 ± 0.99^b , 63.80 ± 0.70^d , 102.75 ± 0.12^a mg/L olarak belirtmiştir.

Sicari *et al.* (2018), iki farklı çeşitten elde edilen greyfurt (*Citrus paradisi*) suyunun fizikokimyasal özellikleri ve antioksidan kapasitelerini belirledikleri çalışmada, fenolik bileşik kompozisyonunu, poncirin, narirutin, naringin, neohesperidin, hesperidin, rutin, hesperetin, naringenin ve kuersetin olarak belirlediklerini bildirmişlerdir. Sicari *et al.* (2018), greyfurt suyunda en yüksek miktarda bulunan bileşiğin naringin (287.15 ve 197.10 mg/l) olduğunu ve bunu narirutinin (37.07 ve 38.87 mg/l) izlediğini belirtmişlerdir.

Yaptığımız araştırmada greyfurt suyunda belirlenen fenolik bileşiklerin bazılarının önceki çalışmalardan farklı olması, narenciye çeşidine, endüstriyel atık türüne ve kullanılan ekstraksiyon yöntemine göre toplam fenolik içeriğinin değişebilmesinden (Ruviano *et al.* 2019) kaynaklandığı düşünülmektedir.

Greyfurt suyunda HPLC ile belirlenen naringin miktarı

Naringin (4,5,7-trihidroksi flavanon-7- β -L-ramnoglikozit-(1,2)- α -D-glukopiranozit), çeşitli turuncgillerde, özellikle greyfurtlarda bulunan acı bir flavonoiddir (Puri and Banerjee, 2000). Naringinin, ülser önleyici, iltihap önleyici, antioksidan gibi çeşitli biyolojik faaliyetler gösterdiği bilinmektedir (Chen *et al.* 2003). Meyve suyu endüstrisinde ise acılık nedeniyle istenmeyen naringin, işlenmiş ürünlerden uzaklaştırılması veya seviyeleri önemli ölçüde düşürülmesi istenen bir maddedir (Yusof *et al.* 1990; Puri *et al.* 2005).

Çalışmamızda *A.niger* ATCC 1688'den saflaştırılan naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda (%0.1, %0.5 ve %1) greyfurt suyu örneklerine ilave edilerek farklı sıcaklık derecelerinde (25, 35 ve 45 °C) inkübasyonu ile acılık bileşiklerinden olan naringinin miktarındaki azalması HPLC ile belirlenmiştir. Şekil 55'te greyfurt suyu örneklerindeki naringin miktarı her üç sıcaklık derecesinde bir azalma göstermiştir. Greyfurt sularındaki naringin miktarında her üç enzim konsantrasyonu ilave edilen örneklerde 1. saatin sonunda önemli bir azalma meydana gelmiştir. Sürenin daha da uzatılması ile 5. saatin sonunda %0.1 ve %0.5 enzim konsantrasyonu eklenmiş greyfurt suları örneklerinde önemli bir azalma belirlenmemekle birlikte %1 enzim konsantrasyonu eklenmiş örneklerde naringin miktarının daha da düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 57). Greyfurt sularının başlangıç naringin miktarları 279,22 ppm olarak belirlenmiştir. Greyfurt suyu örneklerinin 1 saat inkübasyonu sonucu en çok azalma 35 °C'de %0.5 enzim ilave edilmiş örnekte (142,43 ppm) gerçekleşmiştir. En az değişim ise 25 °C'de %0.1 enzim ilave edilmiş örnekte (173,87 ppm) tespit edilmiştir. Enzim ilave edilmesi ve 5 saat inkübasyon sonucu en fazla değişim %1 enzim konsantrasyonu eklenmiş 45

°C’lik inkübasyon sonucunda (96,12 ppm) belirlenmiştir. (Tablo 19). Ribeiro and Ribeiro, (2008) çeşitli greyfurt ve portakal sularında naringin ve naringenin belirlemek amacıyla yaptıkları araştırma da naringin miktarını 55-95 µg/mL (ppm) aralığında tespit etmişlerdir. Başlangıç naringin miktarının farklı çıkmasının greyların yetiştirildiği bölgeye ve cinsine göre bileşimlerinin değişkenlik gösterebileceğinden (Ruviano *et al.* 2019) kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tablo 19. Direkt Enzim Uygulanan Greyfurt Sularında Enzim Uygulama Süresi Boyunca Belirlenen Naringin Konsantrasyonları

İnkübasyon sıcaklığı		25 °C				
Enzim Konsantrasyonu		%0.1		%0.5		%1
	Süre	Naringin (ppm)	Süre	Naringin (ppm)	Süre	Naringin (ppm)
	0. Saat	279,22	0. Saat	279,22	0. Saat	279,22
	1. Saat	173,87	1. Saat	159,69	1. Saat	158,89
	5. Saat	173,40	5. Saat	161,86	5. Saat	132,11
İnkübasyon sıcaklığı		35 °C				
Enzim Konsantrasyonu		%0.1		%0.5		%1
	Süre	Naringin (ppm)	Süre	Naringin (ppm)	Süre	Naringin (ppm)
	0. Saat	279,22	0. Saat	279,22	0. Saat	279,22
	1. Saat	162,80	1. Saat	142,43	1. Saat	155,26
	5. Saat	156,91	5. Saat	146,18	5. Saat	128,69
İnkübasyon sıcaklığı		45 °C				
Enzim Konsantrasyonu		%0.1		%0.5		%1
	Süre	Naringin (ppm)	Süre	Naringin (ppm)	Süre	Naringin (ppm)
	0. Saat	279,22	0. Saat	279,22	0. Saat	279,22
	1. Saat	164,34	1. Saat	149,91	1. Saat	164,00
	5. Saat	160,13	5. Saat	131,52	5. Saat	96,12

Yapılan istatiki analiz sonucunda sıcaklık, enzim konsantrasyonu ve süre parametrelerinin her birinin naringin üzerinde $p<0.01$ düzeyinde çok önemli etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 20).

Parametreler arasındaki interaksiyonlar incelendiğinde, sıcaklık x enzim konsantrasyonu interaksiyonunun greyların sularındaki naringin miktarı üzerine önemli ($p<0.05$) bir etki gösterdiği bulunmuştur. Sıcaklık x süre interaksiyonunun ve enzim konsantrasyonu x süre interaksiyonlarının greyların sularındaki naringin miktarı üzerine çok anlamlı bir etki gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 20).

Tablo 20. Direkt Enzim Uygulanan Greyfurt Sularında Enzim Uygulama Süresi Boyunca Belirlenen Naringin Konsantrasyonlarının Varyans Analizi

Varyans Kaynakları	Sıcaklık (A)		Konsantrasyon (B)		Süre (C)		AXB		AXC		BXC		
SD	2		2		2		4		4		4		27
Özellikler	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	Ortalamanın Standart Hatası
Naringin	520,511	28,315**	1393,281	75,792**	99791,338	5428,504**	51,972	2,827*	355,234	19,324**	1017,244	55,337**	18,383

*p<0,05 **p<0,01

SD: Serbestlik derecesi

AXB: Sıcaklık ve konsantrasyon interaksyonu

AXC: Sıcaklık ve süre interaksyonu

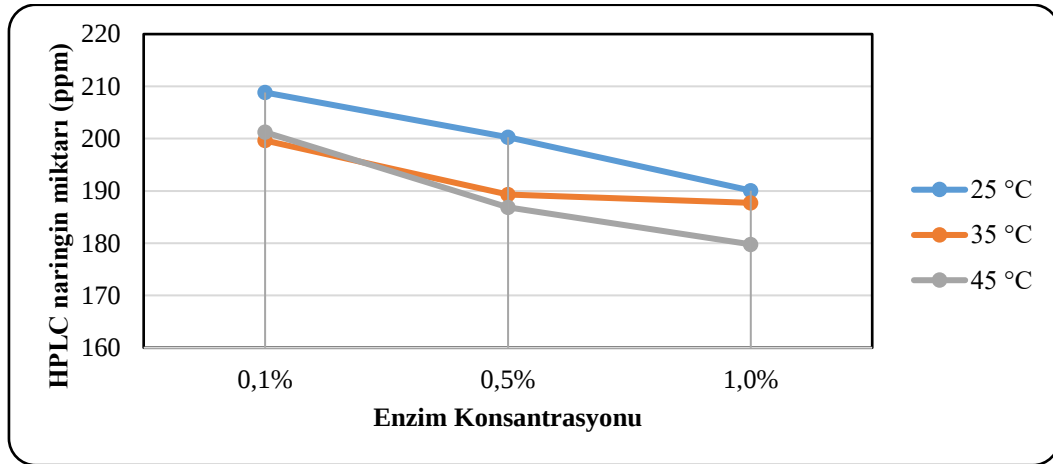
BxC: Konsantrasyon ve süre interaksyonu

Tablo 21. Direkt Enzim Uygulanan Greyfurt Sularında Enzim Uygulama Süresi Boyunca Belirlenen Naringin Konsantrasyonlarının ANOVA ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi

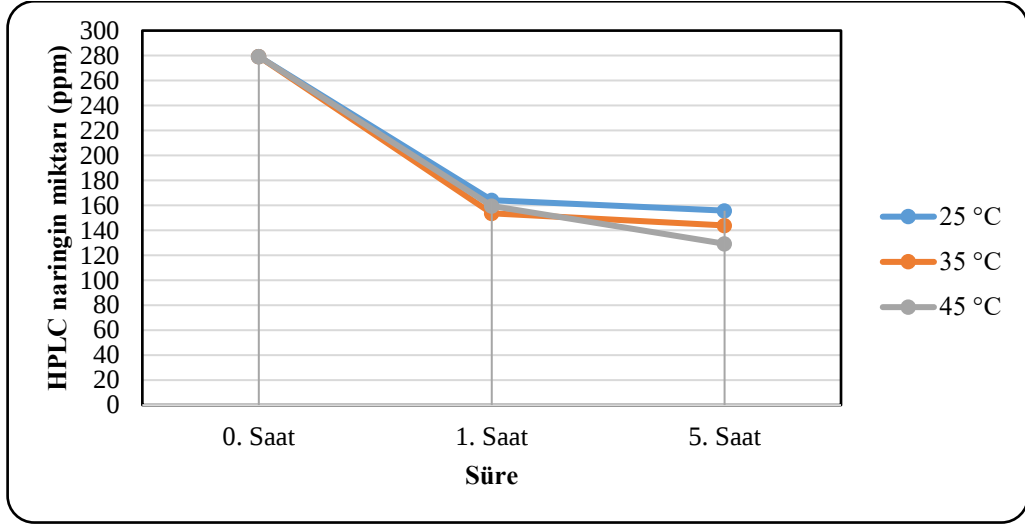
Naringin		
Sıcaklık	25	199,72±59,04 ^a
	35	192,21±64,08 ^b
	45	189,30±68,67 ^b
Konsantrasyon	% 0,1	203,23±55,57 ^a
	% 0,5	192,14±63,97 ^b
	% 1	185,86±70,88 ^c
Süre	0. Saat	279,22±0,66 ^a
	1. Saat	159,02±10,08 ^b
	5. Saat	142,99±22,93 ^c

*Her sütun için istatistiki analiz kendi içerisinde yapılmış ve aynı harfle gösterilen ortalamalar P<0,05 önem seviyesinde aynı olarak kabul edilmiştir.

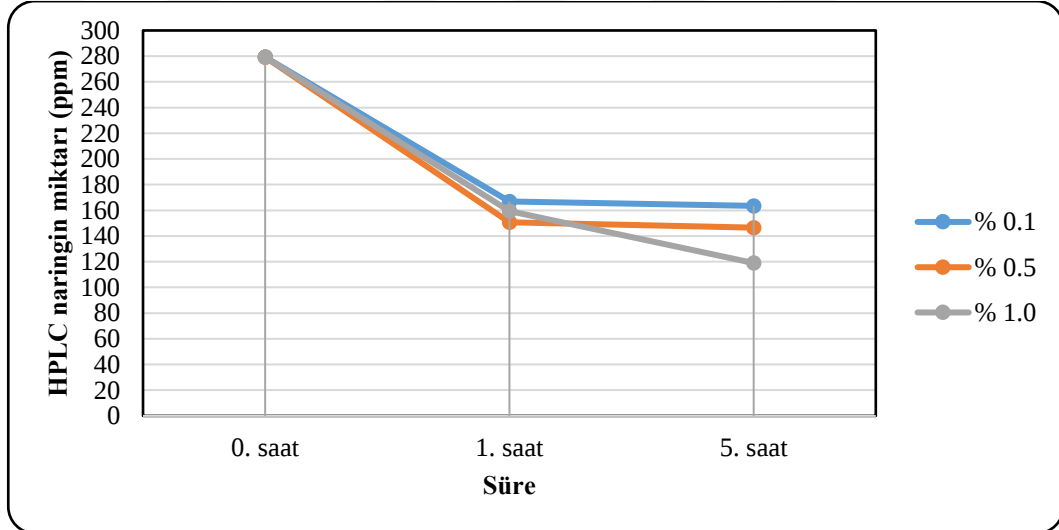
Şekil 55’de greyfurt sularındaki naringin miktarının 5 saatlik inkübasyon süresince düşüş gösterdiği, en fazla değişimin ise 45 °C’lik greyfurt sularında belirlendiği gösterilmiştir. Şekil 56’de her üç sıcaklık derecesinde greyfurt sularındaki naringin miktarının 0-1 saatler aralığında düştüğü, 0-5 saatleri arasındaki azalmanın ise ilk aralığa (0-1 saatleri) göre daha az olduğu gösterilmektedir. Yine en fazla değişim 45 °C’lik inkübasyon sıcaklığında belirlenmiştir. Şekil 57’de ise her üç enzim konsantrasyonunu içeren greyfurt sularında 0-1 saatleri arasında bir azalma meydana gelmiş, 0-5 saatleri arasında ise ilk süreye göre daha az değişim bulunmuştur. En fazla değişim ise %1 enzim ilave edilmiş greyfurt sularında tespit edilmiştir.



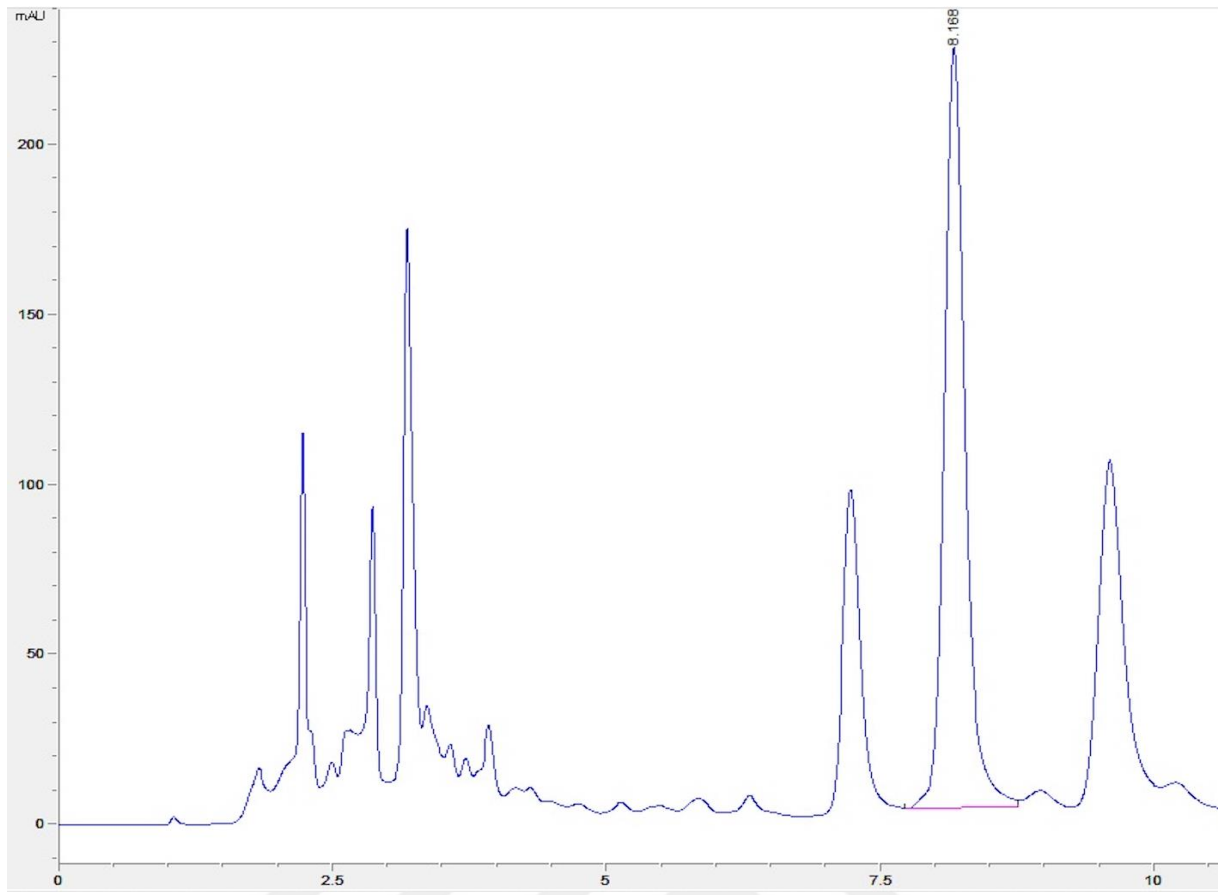
Şekil 55. *A.niger* ATCC 1688’den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu naringin miktarına etki eden sıcaklık x konsantrasyon interaksiyonu



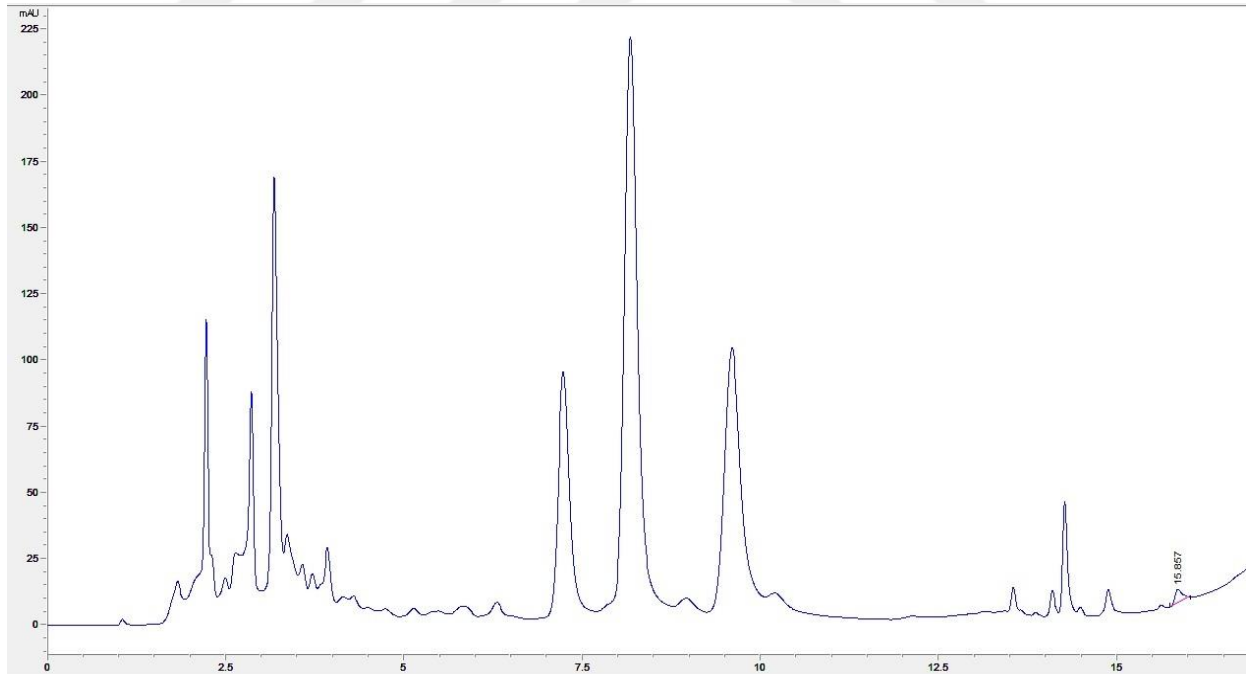
Şekil 56. *A.niger* ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu naringin miktarına etki eden sıcaklık x süre interaksyonu



Şekil 57. *A.niger* ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde 1. ve 5. saat inkübasyonu sonucu naringin miktarına etki eden konsantrasyon x süre interaksyonu



(A)

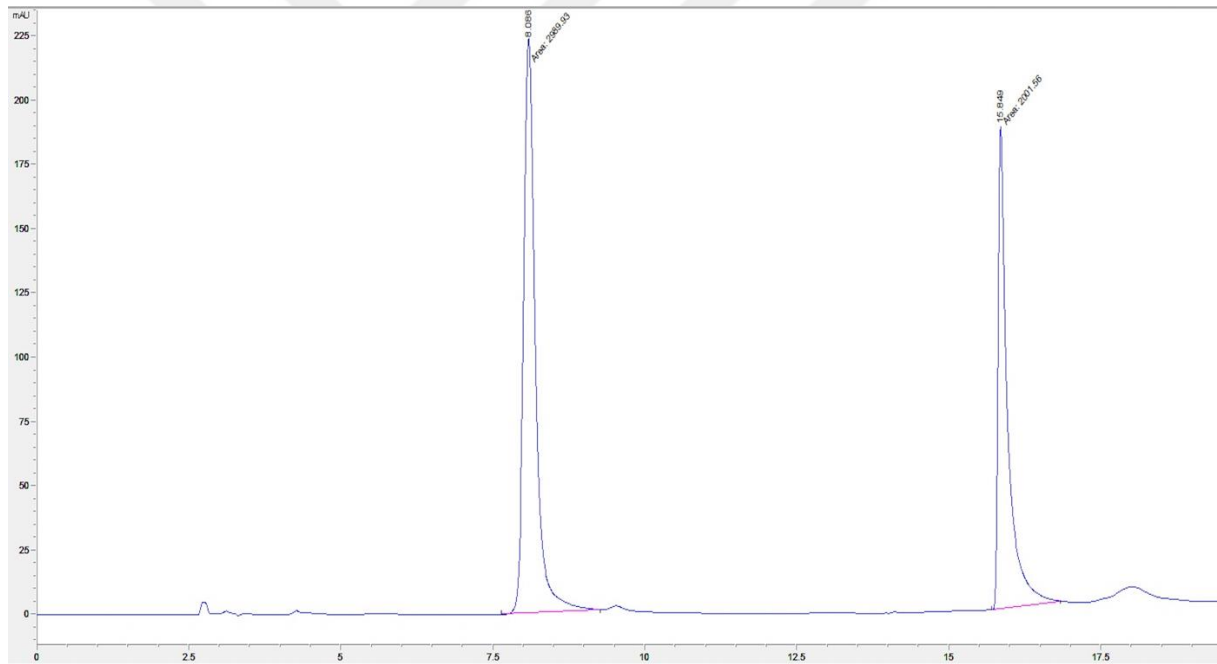


Şekil 58. *A.niger* ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin ilave edildiği 45 °C sıcaklıkta 5 saatlik inkübasyon sonucu naringin (A) ve naringenin (B) kromatogramı

Bu çalışmada HPLC ile naringenin miktarıda belirlenmeye çalışılmış, fakat naringenin miktarı HPLC ile tespit edilebilir sınırın altında kalmıştır. Yapılan literatür taraması sonucunda greyfurt suyuna *A.niger* ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enzimi uygulaması sonucu

meydana gelen naringenin miktarı ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Araştırmalar genellikle naringin miktarındaki azalma ve naringenin meydana gelmesi ile ilgili olup *A.niger* ve diğer *Aspergillus* türlerinden elde edilen naringinaz enziminin aktivitesi ile ilgili olmaktadır (Busto *et al.* 2007; Chen *et al.* 2010; Chang *et al.* 2011; Ni *et al.* 2011; Chen *et al.* 2013). Bunun yanısıra Ribeiro and Ribeiro, (2008) çeşitli greyfurt ve portakal sularında naringin ve naringenin belirlemek amacıyla yaptıkları araştırma da naringenin miktarını 10-60 µg/mL (ppm) aralığında lineer olarak belirlemişlerdir. Gattuso *et al.* (2007), turunc meyvelerinde fenolik profili ile ilgili yaptıkları araştırmada greyfurt suyunda bulunan naringenin miktarının 2-4.20 mg/100 mL olarak belirtmişlerdir. Sicari *et al.* (2018) iki farklı greyfurt cinsinden elde edilmiş greyfurt suyundaki fenolik bileşikleri araştırdıkları çalışmada naringenin miktarını 31.25 ve 24.32 mg/L olarak belirlemişlerdir.

Çalışmamızda naringin ve naringenin için standart maddelerinin HPLC ile belirlenen kromatogramları Şekil 59’da verilmiştir.



Şekil 59. Naringin ve naringenin standart bileşikler kromatogramı

Narenciye suyunda doğal olarak çok sayıda antioksidan bulunur ve bu meyve sularının belirli dejeneratif hastalıklara karşı potansiyel koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir (Cemeroğlu, 2013). Naringenin enzimatik hidrolizinin ürünü olan naringenin, antioksidan, antiinflamatuvar, antitrombotik ve vazodilatör gibi bir dizi antiaterojenik aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Bununla birlikte naringenin aterosklerozun tedavisinde veya önlenmesinde antikanser olarak ve aynı zamanda farmakolojik ajan olarak potansiyel faydalara sahip olabileceği belirtilmiştir (Chen *et al.* 2003). Naringinaz, naringenin prunin (4,5,7-trihidroksi flavovone-7-glikozit) ve ramnoza hidrolizinden sorumlu α -ramnosidaz aktivitesine ve prunini

naringenin (40,5,7- trihidroksiflavanon) ve glikoza hidrolize eden β -glukosidaz aktivitesine sahiptir. Pruninin, üçte biri naringin acılığına sahiptir ve naringenin neredeyse tatsız olduğu (Puri *et al.* 1996) daha öncede belirtilmiştir.

Çalışmamızda *A.niger* ATCC 1688'den elde edilen naringinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda ilave edildiği greyfurt sularındaki naringin miktarında azalma oranının tespit edilmesi hedeflenmiş olup, aynı zamanda greyfurt suyunun diğer fizikokimyasal özellikleri ve antioksidan kapasitesindeki değişimlerinde belirlenmesi amaçlanmıştır.

Greyfurt sularındaki naringin miktarındaki en fazla değişim %1 enzim ilave edilen ve 45 °C'de 5 saat inkübasyona bırakılan örnekte belirlenmiş olup, naringin miktarı 279,22 ppm'den 96,12 ppm'e düşmüştür. Greyfurt suyundaki acılık bileşeni olarak bilinen naringin miktarında naringinaz enziminin ilave edilmesiyle %65,58'lik bir azalma meydana gelmiştir. Naringinaz enzimin greyfurt suyuna uygulanması ve greyfurt suyundaki naringin miktarındaki azalma için sınırlı sayıda araştırma yapılmıştır.

Prakash *et al.* (2002), ticari olarak satın aldıkları naringinaz enzimini greyfurt suyuna farklı konsantrasyon (0.25, 0.5, 1 g/L) ve farklı sıcaklıklarda (25, 30, 40 °C) ilave ederek naringin miktarındaki azalmayı belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada ticari olarak alınan enzimin naringini %75 azalttığını belirlemişlerdir.

Cavia-Saiz *et al.* (2011) acılık bileşeninin naringinaz enzimi ve reçine üzerine absorpsiyonu ile giderilmesinin karşılaştırılması ile ilgili yaptıkları çalışmada, naringinaz enziminin %64.5 oranında naringini azalttığını bildirmişlerdir. Patil ve Dhake (2014)'de yaptıkları çalışmada *P. Purpureogenum* küfünü kullanarak saflaştırdıkları naringinaz enziminin greyfurt suyundaki naringini %74 azalttığını tespit etmişlerdir.

Naringinaz enzimi aynı zamanda immobilize edilerek greyfurt suyuna uygulanabilmektedir. Bu durumda daha uzun süre kullanımının söz konusu olduğu bildirilmiştir. González-Temiño *et al.* (2021) organik bir mebran üzerinde naringini immobilize ederek greyfurt suyunda acılık bileşeni olan naringenin azalma miktarını tespit etmişlerdir. Yaptıkları çalışma sonucunda naringin miktarında %73'lük bir azalma olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda greyfurt suyunda belirlenen naringin miktarındaki azalma literatür ile uyum göstermektedir.

Probiyotik Bakteri İlave Edilmiş Greyfurt Sularının Bazı Fizikokimyasal Özellikleri ve Antioksidan Aktiviteleri

Probiotik bakterilerin besiyeri ortamına göre pH değişimi ve enzim aktivitesi

Çalışmamızda kullanılan bakteriler Atatürk Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji laboratuvarında probiyotik olduğu kanıtlanmış olan bakteriler olup burdan temin edilmiştir. Bu çalışma da beş *Lactobacillus plantarum* suşu beş farklı ortamda geliştirilerek bakterilerin ekstraselüler naringinaz aktivitesi gösterip göstermedikleri naringinaz enzim aktivitesi belirleme yöntemiyle (Davis, 1974) araştırılmış ve bu bakterilerden yalnızca *L.plantarum* ACC 54, *L.plantarum* 250 ve *L.plantarum* ACC 28 suşlarının az da olsa ekstraselüler enzim aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir. Seçilen üç probiyotik bakterinin gelişim sürecindeki pH değişimi ve ekstraselüler enzim üniteleri Tablo 22’de verilmiştir.

Yaptığımız araştırma sonucunda mikroorganizmaların ekstraselüler enzim aktivitesi en yüksek *L. plantarum* 250 suşunda belirlenmiştir. Bu suşun en iyi ekstraselüler enzim aktivitesi (0.65 EÜ/mL) gösterdiği besiyeri ortamı 3. ortam olarak adlandırdığımız ve pepton, K₂HPO₄, MgSO₄, MnSO₄, glikoz, sodyum asetat, amonyum sitrat ve naringin’den oluşan besiyeri ortamıdır. Besiyeri ortamının pH değeri naringinaz enzim aktivitesi ile 6.65’ten 5.27’ye düşmüştür. Diğer ortamlardan farklı olarak 3.ortam besiyerine yeast extract eklenmemiş olup, diğer bileşikler sabit tutulup glikoz ilave edilmiştir. Bu durumda *Lactobacillus plantarum* 250’nin glikoz ortamında yüksek ekstraselüler aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bunu takiben 1. besiyeri ortamı (0.45 EÜ/mL) ve 5. besiyeri ortamında (0.44 EÜ/mL) aktiviteler gözlemlenmiştir. Diğer mikroorganizmalar incelendiğinde *L. plantarum* ACC 28 3. besiyeri ortamı (0.35 EÜ/mL) ve 5. besiyeri ortamında (0.36 EÜ/mL), *L. plantarum* ACC 54’nin ise 2. besiyeri ortamı (0.34 EÜ/mL) ve 5. besiyeri ortamında (0.42 EÜ/mL) diğer hazırlanan besiyeri ortamlarına göre yüksek aktivite gösterdikleri belirlenmiştir (Tablo 22).

Yapılan varyans analiz sonucunda besiyeri ortamının pH değeri mikroorganizma suşu, besiyeri ortamı ve mikrobiyal gelişim süresince çok önemli olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda besiyerindeki ekstraselüler enzim miktarı mikrobiyal gelişim süresinde çok önemli ($p<0.01$) bulunmakla beraber mikroorganizma suşuna göre önemli ($p<0.05$) bulunmuş olup pH’ya göre anlamlı bulunmamıştır (Tablo 23). Besiyeri ortamının enzim miktarı üzerine etkisi duncan analizinde 3. besiyeri ortamı ($0,20\pm0,27$) dışındaki diğer ortamlarda çok farklı bir değişikliğe sebep olmadığı belirlenmiştir (Tablo 24). Bu durum pH’nın enzim miktarı üzerine etkisi olmadığını göstermektedir.

Tablo 22. *Lactobacillus* Bakterilerinin Gelişim Süresindeki pH Değişimi ve Enzim Aktivitesi

<i>L. plantarum</i> ACC 54											<i>L. plantarum</i> 250									
	1. Ortam		2. Ortam		3. Ortam		4. Ortam		5. Ortam		1. Ortam		2. Ortam		3. Ortam		4. Ortam		5. Ortam	
	0. Gün	1. Gün	0. Gün	1. Gün	0. Gün	1. Gün	0. Gün	1. Gün	0. Gün	1. Gün	0. Gün	1. Gün	0. Gün	1. Gün	0. Gün	1. Gün	0. Gün	1. Gün	0. Gün	1. Gün
<i>pH</i>	6.61	6.00	6.57	6.11	6.65	6.34	6.62	5.92	5.87	3.89	6.61	5.33	6.57	6.08	6.65	5.27	6.62	5.17	5.87	3.83
<i>EÜ/mL</i>	0.00	0.24	0.00	0.15	0.00	0.35	0.00	0.24	0.00	0.36	0.00	0.45	0.00	0.44	0.00	0.65	0.00	0.35	0.00	0.36

Tablo 22. (devam)

<i>L. plantarum</i> ACC 28										
	1. Ortam		2. Ortam		3. Ortam		4. Ortam		5. Ortam	
<i>Gün</i>	0. Gün	1. Gün	0. Gün	1. Gün	0. Gün	1. Gün	0. Gün	1. Gün	0. Gün	1. Gün
<i>pH</i>	6.61	5.06	6.57	5.90	6.65	5.13	6.62	5.17	5.87	3.94
<i>EÜ/mL</i>	0.00	0.25	0.00	0.34	0.00	0.21	0.00	0.21	0.00	0.42

EÜ: Enzim ünitesi

Tablo 23. *Lactobacillus* Bakterilerinin Gelişim Süresindeki pH Değişimi ve Enzim Aktivitesi Varyans Analizi

Varyans Kaynakları	Mikroorganizma Suş'u (A)		Ortam (B)		Gün (C)		AXB		AXC		BXC		
SD	2		4		1		8		2		4		30
Özellikler	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	Ortalamanın Standart Hatası
pH	0,545	1050,955**	3,857	7441,415**	21,135	40774,023**	0,083	160,907**	0,545	1050,955**	0,800	1542,865**	0,001
EÜ/mL	0,050	4,442*	0,009	0,825	1,671	148,612**	0,011	0,949	0,050	4,442*	0,009	0,825	0,011

*p<0,05 düzeyinde önemli **p<0,01 düzeyinde önemli

AxB: Mikroorganizma Suş ve ortam interaksyonu

AxC: Mikroorganizma Suş ve gün interaksyonu

BxC: Ortam ve Gün interaksyon

Tablo 24. *Lactobacillus* Bakterilerinin Gelişim Süresindeki pH Değişimi ve Enzim Aktivitesi ANOVA ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi

Ortam	Gün	pH	EÜ/mL
Mikroorganizma Suş'u	<i>L.plantarum</i> ACC 54	6,06±0,80 ^a	0,13±0,17 ^b
	<i>L.plantarum</i> 250	5,80±0,89 ^b	0,22±0,25 ^a
	<i>L.plantarum</i> ACC 28	5,75±0,89 ^c	0,14±0,17 ^b
Ortam	1. Ortam	6,03±0,67 ^c	0,16±0,19
	2. Ortam	6,30±0,29 ^a	0,15±0,19
	3. Ortam	6,12±0,69 ^b	0,20±0,27
	4. Ortam	6,02±0,68 ^c	0,13±0,18
	5. Ortam	4,87±1,04 ^d	0,19±0,21
Gün	0. Gün	6,46±0,31 ^a	0,00±0,00 ^b
	1. Gün	5,27±0,82 ^b	0,33±0,16 ^a

*Her sütun için istatistikî analiz kendi içerisinde yapılmış ve aynı harfle gösterilen ortalamalar $P<0,05$ önem seviyesinde aynı olarak kabul edilmiştir.

Lactobacillus türlerinden naringini parçalayan naringinaz veya naringinazı oluşturan enzimlerden biri olan α -L-ramnosidaz enziminin üretimi ile ilgili bazı çalışmalar bulunmaktadır (Avila *et al.* 2009; Beekwilder *et al.* 2009; Tran *et al.* 2020; Park *et al.* 2021). Yapılan literatür araştırması sonucu probiyotik bakterilerin gelişim süresinde besiyeri ortamındaki pH ve enzim ünitesi (EÜ) belirleme üzerine yalnızca bir çalışma olduğu bulunmuştur. Tran *et al.* (2020) yaptıkları çalışmada 16 laktik asit bakterisi ve 20 bifidobakterin, naringinaz enzim aktivitesini belirlemek için modifiye edilmiş MRS broth ortamını incelemişlerdir. Gelişim süresi sonunda besiyerlerin pH ları ölçülmüş ve laktik asit bakterilerinde 5.22-5.63 arasında olmak üzere değişkenlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Yapılan çalışmada yalnızca *Lactobacillus plantarum* 01 ve *Bifidobacterium longum* B6.1 mikroorganizmalarında başlangıç pH belirtmişlerdir. Çalışma da Tran *et al.* (2020), besiyerlerindeki enzim aktivitelerinin ise 0.00-4.27 EÜ/mL arasında değişkenlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Aynı zamanda *Lactobacillus lactis* B02121'in naringinaz enzimini üretmediğini de bildirmişlerdir.

Çalışmamızda *Lactobacillus plantarum* 56 ve *Lactobacillus plantarum* 4 mikroorganizmalarında farklı besiyerlerinde sifıra yakın veya hiç aktivite tespit edilmemiştir. Bu sebeple bu mikroorganizmalar çalışmada kullanılmamıştır.

Probiyotik mikroorganizma sayıları

Greylfurt sularına (başlangıç pH 3.58) *L.plantarum* ACC 54 (ACC54), *L.plantarum* 250, *L.plantarum* ACC 28 (ACC 28) ve bunların *L.plantarum* ACC 54 + *L.plantarum* ACC 28 (1.KO), *L.plantarum* ACC 54 + *L.plantarum* 250 (2.KO), *L.plantarum* ACC 28 + *L.plantarum* 250 (3.KO) ve *L.plantarum* ACC 54 + *L.plantarum* ACC 28 + *L.plantarum* 250 (4.KO) kombinasyonları ilave edildikten sonra, 25 °C ve 37 °C'lik iki farklı sıcaklık derecesinde 4 haftalık bir depolamaya alınmıştır. İlk depolama sıcaklığı olan 25 °C greylfurt suları için oda sıcaklığında bekletilebilme sıcaklığı, ikinci sıcaklık olan 37°C ise çalışmamızda kullanılan probiyotik bakteriler için en uygun gelişme sıcaklığı aynı zamanda naringinaz enzimi için optimum sıcaklığa yakın bir sıcaklık derecesi olarak düşünülmüş olup depolama sıcaklık dereceleri bu amaçla seçilmiştir. Depolama süresi içerisinde 1, 2, 3. gün ve 2. ve 4. haftalarda greylfurt sularında probiyotik bakterilerin koloni sayımı yapılmış olup, meyve sularının probiyotik özellik taşıyıp taşımadıkları belirlenmeye çalışılmıştır. Probiyotiklerin, vücutta etkili olabildikleri minimum konsantrasyon ile ilgili bilgiler hala yetersiz olmakla birlikte, genellikle bu bakterilerin probiyotik ürünlerde en az $\log 10^6$ - 10^7 kob/g-ml düzeyinde bulunması gerektiği ve probiyotik etki için günlük olarak yaklaşık $\log 10^6$ - 10^9 kob/ml düzeyinde probiyotik alınması gerektiği kabul edilmektedir (Bilginer ve Çetin, 2019).

Çalışmamızda 25 °C'lik sıcaklıkta muhafaza edilen greylfurt sularında 2. haftaya kadar mikroorganizma yükü $\log 10^6$ - 10^9 kob/ml'in üzerinde belirlenmiş olup 4. haftada probiyotiklik için yeterli sayı tespit edilememiştir. 37°C'lik depolama sıcaklığında ise 2. haftadan itibaren probiyotiklik için gereken sayı belirlenememiştir. Sıcaklığın 25 °C olduğu greylfurt sularında mikroorganizma sayılarının ilk üç gün birbirine çok yakın olduğu belirlenmiştir (Tablo 25). Depolama sıcaklığının 25 °C olduğu ortamda ACC 54, ACC 28, *L.plantarum* 250, 1.KO, 2.KO, 3.KO, 4.KO ilave edilmiş greylfurt sularında mikroorganizma sayısı ilk üç gün sırasıyla 9.51-9.63, 9.39-9.40, 8.99-8.93, 9.42-9.45, 9.19-9.27, 9.46, 9.57-9.59 $\log$ kob/ml arasında bulunmuştur. 2. haftada ise bu değerler sırasıyla 8.59, 9.08, 8.81, 8.91, 8.98, 8.78, 8.79, 8.83 $\log$ kob/ml'ye olarak tespit edilmiş, 4.haftada ise ACC 28 hariç sadece 2.KO ve 4. KO'larda belirlenmiş fakat gelişen mikroorganizma koloni sayısı probiyotik sayı ($\log 10^6$ kob/ml) için yeterli olmadığından dolayı gözardı edilmiştir. ACC 28 de ise bu değer 6.85 $\log$ kob/ml olarak belirlenmiştir. Sıcaklığın 37°C olduğu ortamda ise yine ACC 54, ACC 28, *L.plantarum* 250, 1.KO, 2.KO, 3.KO, 4.KO ilave edilmiş greylfurt sularında mikroorganizma sayısı ilk üç gün sırasıyla 9.19-9.24, 9.01-9.96, 8.91-9.00, 9.43-9.50, 9.19-9.28, 9.46-9.59, 9.57-9.68 $\log$ kob/ml arasında belirlenmiştir (Tablo 25). Bu sıcaklıkta mikroorganizmalar 2. hafta ve 4. haftada gelişim göstermemişlerdir. Bu durum sıcaklık ve pH faktörü probiyotik mikroorganizmaların

gelişimi için önemli olduğundan (Bilginer ve Çetin, 2019) dolayı çalışmamızda kullandığımız mikroorganizmaların 37°C sıcaklıkta ve greyfurt suyu pH değerinde 2 haftaya kadar yaşayamadıklarını göstermiştir. Çalışmamızda yüksek sıcaklığın ikinci haftaya kadar mikroorganizmaları etkilediği, oda sıcaklığı olan 25 °C’de ise mikroorganizmaların 2. haftadan sonra ilk günlere göre daha az olsa da hala greyfurt suyunda probiyotik özellik gösterebildikleri, fakat 4. haftaya kadar gelişme gözlenmediği için meyve suyunun probiyotik özelliğini kaybettiği belirlenmiştir. Ayrıca probiyotikler laktik asit üreterek ortamın pH değerini daha da düşürdüğü bilinmektedir. Greyfurt suyunun probiyotik bakterilerle depolanması üzerine literatürde sadece bir araştırmaya rastlanmıştır (Tran *et al.* 2020).

Tran *et al.* (2020), çalışmalarında hem *L. fermentum* D13 hem de *B. bifidum* B7.5 suşunun, greyfurt sularının (başlangıç pH 6.3 olarak ayarlanmış) depolanması sırasında canlı hücre sayımlarında azalma gösterdiğini bildirmişlerdir. İncelenen suşlar arasında en yüksek hücre sayısına ($\log 4.22 \times 10^9$ kob/mL) ulaşmasına rağmen *L. fermentum* D13 suşunun depolama sırasında en düşük stabiliteye sahip olduğunu ve *L. fermentum* D13 suşunun hücre sayılarının, depolamanın 4. haftasından itibaren azalmaya başladığını da belirtmişlerdir.

Probiyotik kültürlerin canlılığını etkileyen faktörler arasında asitlik (pH), oksijen seviyesi, besin eksikliği ve üründe antimikrobiyal madde bulunması sayılabilmektedir (Shah, 2001). Çalışmamızda greyfurt suyunun pH değerine müdahale edilmemiştir. Amaç greyfurt suyunun tüketiciye ulaşabilir formda olmasıdır. Bu sebeple düşük pH’nin probiyotik bakterilerin uygun sıcaklığı ile birlikte depolama süresince daha da düşmesi sonucunda 4.haftanın sonunda probiyotiklerin gelişmediği düşünülmektedir.

Tablo 25. Probiyotik Mikroorganizmaların İlave Edildiği Greyfurt Sularının Depolama Süresi Boyunca Mikroorganizma Koloni Sayısı

Sıcaklık	25 °C																			
Mikoorganizma suşları	<i>L.plantarum</i> ACC 54					<i>L.plantarum</i> ACC 28					<i>L.plantarum</i> 250					<i>L.plantarum</i> ACC 54+ <i>L.plantarum</i> ACC 28				
Süre	1. Gün	2. Gün	3. Gün	2. Hafta	4. Hafta	1. Gün	2. Gün	3. Gün	2. Hafta	4. Hafta	1. Gün	2. Gün	3. Gün	2. Hafta	4. Hafta	1. Gün	2. Gün	3. Gün	2. Hafta	4. Hafta
Log kob/ml	9.51	9.53	9.63	8.59	<2	9.39	9.40	9.39	9.08	6.85	8.99	8.95	8.93	8.81	<2	9.42	9.43	9.45	8.98	<2

Tablo 25. (devam)

Sıcaklık	25 °C														
Mikoorganizma suşları	<i>L.plantarum</i> ACC 54+ <i>L.plantarum</i> 250					<i>L.plantarum</i> ACC 28+ <i>L.plantarum</i> 250					<i>L.plantarum</i> ACC 54+ <i>L.plantarum</i> ACC 28+ <i>L.plantarum</i> 250				
Süre	1. Gün	2. Gün	3. Gün	2. Hafta	4. Hafta	1. Gün	2. Gün	3. Gün	2. Hafta	4. Hafta	1. Gün	2. Gün	3. Gün	2. Hafta	4. Hafta
Log kob/ml	9.19	9.23	9.27	8.78	3.30	9.46	9.46	9.46	8.79	5.85	9.57	9.58	9.59	8.83	3.30

Tablo 25. (devam)

Sıcaklık	37 °C																			
Mikoorganizma suşları	<i>L.plantarum</i> ACC 54					<i>L.plantarum</i> ACC 28					<i>L.plantarum</i> 250					<i>L.plantarum</i> ACC 54+ <i>L.plantarum</i> ACC 28				
Süre	1. Gün	2. Gün	3. Gün	2. Hafta	4. Hafta	1. Gün	2. Gün	3. Gün	2. Hafta	4. Hafta	1. Gün	2. Gün	3. Gün	2. Hafta	4. Hafta	1. Gün	2. Gün	3. Gün	2. Hafta	4. Hafta
Log kob/ml	9.19	9.23	9.24	<2	<2	9.01	9.96	9.03	<2	<2	8.91	9.00	8.95	<2	<2	9.43	9.46	9.50	<2	<2

Tablo 25. (devam)

Sıcaklık	25 °C														
Mikoorganizma suşları	<i>L.plantarum</i> ACC 54+ <i>L.plantarum</i> 250					<i>L.plantarum</i> ACC 28+ <i>L.plantarum</i> 250					<i>L.plantarum</i> ACC 54+ <i>L.plantarum</i> ACC 28+ <i>L.plantarum</i> 250				
Süre	1. Gün	2. Gün	3. Gün	2. Hafta	4. Hafta	1. Gün	2. Gün	3. Gün	2. Hafta	4. Hafta	1. Gün	2. Gün	3. Gün	2. Hafta	4. Hafta
Log kob/ml	9.19	9.24	9.28	<2	<2	9.46	9.55	9.59	<2	<2	9.57	9.50	9.68	<2	<2

Probiyotik mikroorganizma ilave edilmiş greyfurt sularının fizikokimyasal özellikleri

Suda çözünür kuru madde (SÇKM) değişimi

Greyfurt sularına farklı kombinasyonlarda inoküle edilen probiyotik bakterilerin greyfurt sularının depolama süresinin 1, 2, 3. günü ve 2 ve 4. haftalarında meyve suyu örnekleri steril şartlarda alınarak abbe refraktometresi ile belirlenen SÇKM miktarları Tablo 26'da verilmiştir.

ACC 54, ACC 28, *L.plantarum* 250, 1. KO, 2. KO, 3.KO ve 4.KO eklenmiş greyfurt sularının 25°C'lik depolama süresi boyunca SÇKM'sinde genel olarak bir düşüş belirlenmiştir. Depolama sıcaklığı 25 °C'de en fazla düşüş 1. KO'da bulunmuştur. 1.KO'nun eklendiği greyfurt suyunda başlangıçta belirlenen SÇKM °brix miktarı 9.10 bulunmuştur. 4. haftanın sonunda bu miktarın 8.20'e kadar düştüğü tespit edilmiştir. Enzimlerin çalışma sıcaklığına uygun olan ve çalışma da kullanılmış olan mikroorganizmaların gelişim sıcaklıkları için de uygun olan 37 °C'de depolanmış greyfurt sularında benzer oranda bir düşüş belirlenmiştir (Tablo 26).

Yapılan varyans analizi sonucu sıcaklık, mikroorganizma suş ve süre parametrelerinin SÇKM miktarı üzerine çok önemli ($p<0.01$) bir etki gösterdiği bulunmuştur. Bununla birlikte parametreler arası interaksiyonlar incelendiğinde, her üç interaksiyonunda SÇKM miktarında $p<0.01$ düzeyinde anlamlı bir etki oluşturduğu tespit edilmiştir (Tablo 27).

Tablo 26. Probiyotik Bakteri Eklenmiş Greyfurt Sularının Depolama Süresince Belirlenen Genel Özellikleri

Sıcaklık	Mikroorganizma Suş'u	Süre	SÇKM	PH	TA (%)	Renk yoğunluğu (koyuluğu) (IC)	Renk tonu (T)	Renk Yoğunluğu (IC')	Kırmızı Renk Boyutu (%)	Sarı renk Boyutu (%)	Mavi Renk Boyutu (%)	TFM (mgGAE/L)	DPPH [•] (IC50)	ABTS ^{•+} (IC50)
25 °C	<i>L.plantarum</i> ACC 54	0. Gün	9,13	3,58	0,79	3,98	1,28	5,44	32,18	41,02	26,80	643,32	16,41	7,45
		1. Gün	8,50	3,49	1,08	4,68	1,22	6,38	32,98	40,33	26,70	480,14	16,58	8,83
		2. Gün	8,70	3,34	1,20	4,61	1,23	6,31	32,81	40,29	26,90	480,14	16,42	8,10
		3. Gün	8,80	3,33	1,23	4,94	1,22	6,75	33,06	40,18	26,76	467,79	19,01	8,39
		2. Hafta	8,60	3,21	1,44	5,63	1,25	7,57	33,06	41,28	25,66	300,50	26,80	9,66
		4. Hafta	8,40	3,21	1,47	5,15	1,34	6,86	32,01	42,98	25,02	318,84	28,88	12,79
	<i>L.plantarum</i> ACC 28	0. Gün	9,13	3,58	0,79	3,98	1,28	5,44	32,18	41,02	26,80	643,32	16,41	7,45
		1. Gün	8,50	3,34	1,15	4,61	1,22	6,30	32,95	40,22	26,83	470,04	16,98	11,27
		2. Gün	8,90	3,25	1,27	4,03	1,25	5,52	32,52	40,58	26,91	478,27	15,23	8,88
		3. Gün	8,80	3,22	1,31	5,21	1,22	7,08	33,10	40,41	26,49	485,76	16,51	9,42
		2. Hafta	8,60	3,05	1,63	5,34	1,25	7,20	32,97	41,12	25,91	320,71	29,38	9,32
		4. Hafta	8,60	3,02	1,67	5,26	1,34	7,03	31,96	42,90	25,14	343,54	27,17	10,72
	<i>L.plantarum</i> 250	0. Gün	9,13	3,58	0,79	3,98	1,28	5,44	32,18	41,02	26,80	643,32	16,41	7,45
		1. Gün	8,50	3,40	1,11	4,68	1,23	6,38	32,97	40,44	26,59	478,27	18,83	8,54
		2. Gün	9,00	3,30	1,18	4,71	1,23	6,41	32,86	40,54	26,60	460,31	15,02	9,88
		3. Gün	8,80	3,28	1,20	5,06	1,23	6,88	33,04	40,59	26,37	502,97	16,46	9,46
		2. Hafta	8,80	3,10	1,56	5,02	1,26	6,77	32,85	41,23	25,92	357,76	28,23	9,23
		4. Hafta	8,80	3,11	1,49	5,27	1,34	7,04	32,04	42,83	25,14	358,88	25,83	10,31
	<i>L.plantarum</i> ACC 54+ <i>L.plantarum</i> ACC 28	0. Gün	9,13	3,58	0,79	3,98	1,28	5,44	32,18	41,02	26,80	643,32	16,41	7,45
		1. Gün	8,50	3,34	1,15	4,75	1,22	6,50	33,00	40,18	26,82	476,03	16,93	8,51
		2. Gün	9,30	3,25	1,24	4,53	1,23	6,21	32,74	40,18	27,09	484,26	14,75	10,33
		3. Gün	8,60	3,21	1,32	5,19	1,22	7,08	33,12	40,22	26,66	493,62	17,29	9,94
		2. Hafta	8,60	3,04	1,69	5,96	1,25	7,96	33,28	41,56	25,16	325,20	29,03	9,61
		4. Hafta	8,20	3,02	1,68	5,28	1,21	7,14	33,53	40,24	26,24	313,97	30,94	12,13

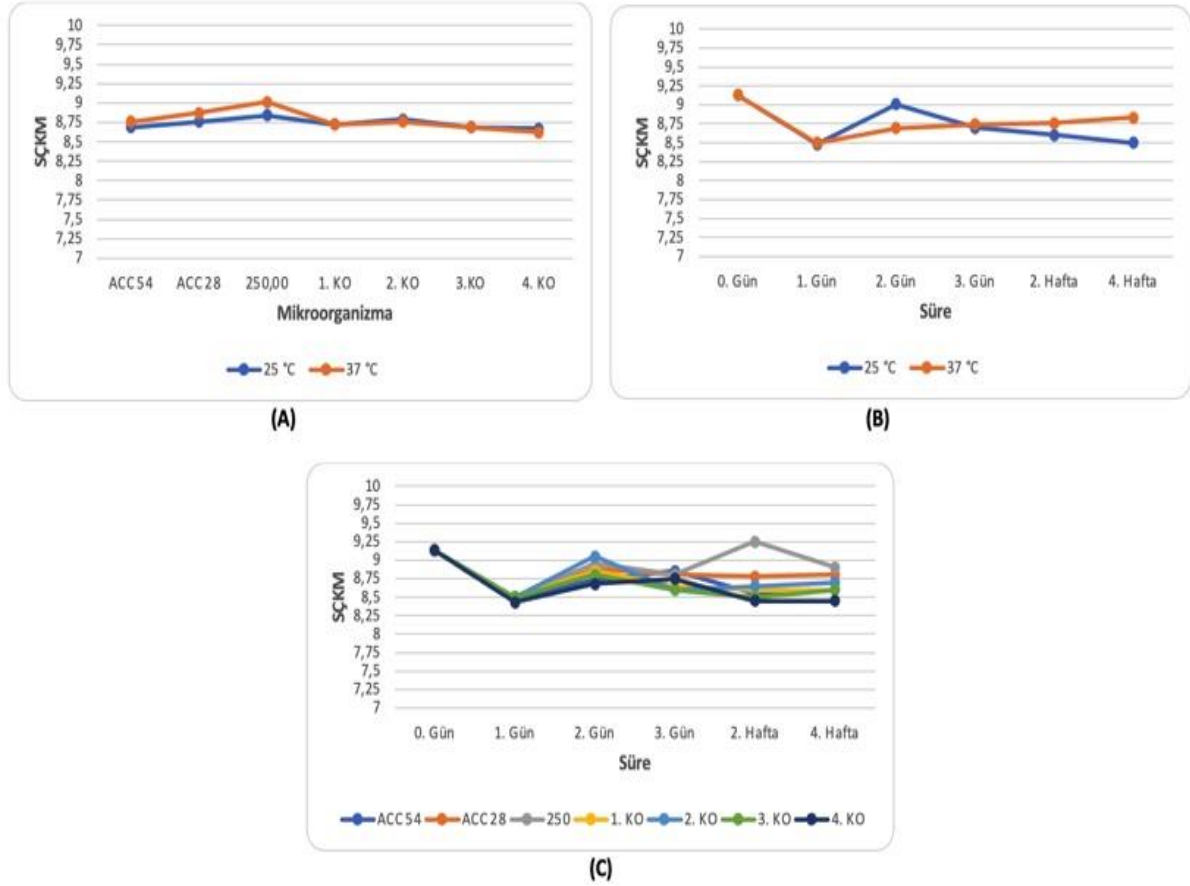
Tablo 26. (devam)

37 °C	<i>L.plantarum</i> ACC 54+ <i>L.plantarum</i> 250	0. Gün	9,13	3,58	0,79	3,98	1,28	5,44	32,18	41,02	26,80	643,32	16,41	7,45
		1. Gün	8,50	3,39	1,13	4,77	1,22	6,51	33,03	40,24	26,72	464,42	17,39	6,85
		2. Gün	9,40	3,29	1,17	4,65	1,22	6,36	32,86	40,23	26,91	483,89	14,90	7,82
		3. Gün	8,60	3,30	1,18	5,13	1,22	6,99	33,12	40,26	26,62	498,11	19,08	9,20
		2. Hafta	8,60	3,08	1,65	5,17	1,25	6,99	32,91	41,05	26,04	353,27	24,29	9,68
		4. Hafta	8,50	3,19	1,52	4,58	1,24	6,20	33,00	40,76	26,24	304,99	28,56	11,67
	<i>L.plantarum</i> ACC 28+ <i>L.plantarum</i> 250	0. Gün	9,13	3,58	0,79	3,98	1,28	5,44	32,18	41,02	26,80	643,32	16,41	7,45
		1. Gün	8,50	3,35	1,13	4,67	1,22	6,39	32,94	40,22	26,85	473,78	17,39	9,39
		2. Gün	8,90	3,23	1,18	4,86	1,23	6,63	32,91	40,38	26,71	480,52	15,09	7,91
		3. Gün	8,60	3,24	1,26	5,10	1,22	6,95	33,08	40,38	26,54	496,24	17,99	8,71
		2. Hafta	8,50	3,06	1,69	5,44	1,24	7,33	33,13	41,07	25,80	352,15	29,85	10,99
		4. Hafta	8,50	3,03	1,68	4,99	1,35	6,69	31,76	42,79	25,45	259,33	29,79	11,81
	<i>L.plantarum</i> ACC 54+ <i>L.plantarum</i> ACC 28+ <i>L.plantarum</i> 250	0. Gün	9,13	3,58	0,79	3,98	1,28	5,44	32,18	41,02	26,80	643,32	16,41	7,45
		1. Gün	8,35	3,33	1,15	4,75	1,22	6,49	32,96	40,17	26,87	464,80	17,42	8,06
		2. Gün	8,85	3,23	1,21	4,60	1,22	6,31	32,81	40,16	27,04	494,74	15,00	7,55
		3. Gün	8,70	3,21	1,31	5,15	1,22	7,02	33,12	40,28	26,61	483,51	17,89	9,02
		2. Hafta	8,50	3,04	1,70	5,41	1,24	7,31	33,02	41,03	25,96	361,13	28,80	9,56
		4. Hafta	8,50	3,04	1,72	5,15	1,35	6,89	31,81	42,91	25,28	316,59	31,68	11,50
	<i>L.plantarum</i> ACC 54	0. Gün	9,13	3,58	0,79	3,98	1,28	5,44	32,18	41,02	26,80	643,32	16,41	7,45
		1. Gün	8,50	3,33	1,13	4,38	1,21	6,00	33,00	39,94	27,06	502,60	17,81	8,57
		2. Gün	8,75	3,24	1,26	4,57	1,22	6,25	32,83	40,18	26,98	458,06	15,85	9,56
		3. Gün	8,90	3,23	1,23	4,85	1,22	6,63	32,96	40,26	26,78	470,04	19,20	8,08
		2. Hafta	8,50	3,35	1,04	5,06	1,30	6,80	32,43	42,05	25,52	346,91	27,25	9,64
		4. Hafta	8,80	3,29	0,97	5,75	1,28	7,70	32,78	41,84	25,39	327,82	36,21	11,01
	<i>L.plantarum</i> ACC 28	0. Gün	9,13	3,58	0,79	3,98	1,28	5,44	32,18	41,02	26,80	643,32	16,41	7,45
		1. Gün	8,50	3,30	1,25	4,68	1,22	6,40	32,93	40,19	26,88	474,53	16,74	8,46
		2. Gün	8,85	3,18	1,30	4,67	1,23	6,39	32,78	40,33	26,89	443,09	15,37	8,36
		3. Gün	8,80	3,14	1,45	5,07	1,23	6,91	32,92	40,43	26,66	411,65	20,60	9,67
		2. Hafta	8,95	3,14	1,45	5,31	1,30	7,12	32,48	42,11	25,41	305,36	28,57	9,92
		4. Hafta	9,00	3,07	1,44	4,36	1,29	5,88	32,36	41,73	25,91	316,22	32,72	13,22
	<i>L.plantarum</i> 250	0. Gün	9,13	3,58	0,79	3,98	1,28	5,44	32,18	41,02	26,80	643,32	16,41	7,45
		1. Gün	8,50	3,35	1,15	4,60	1,22	6,27	33,02	40,28	26,70	470,41	16,49	8,63
		2. Gün	8,90	3,22	1,29	4,37	1,23	5,97	32,72	40,38	26,90	452,07	15,50	8,48
		3. Gün	8,80	3,20	1,38	4,79	1,23	6,53	32,90	40,45	26,66	403,05	20,48	10,27
		2. Hafta	9,70	3,17	1,32	5,19	1,29	6,96	32,52	42,08	25,39	332,31	26,24	10,10
		4. Hafta	9,00	3,12	1,31	5,24	1,28	7,03	32,67	41,86	25,48	340,54	32,15	10,40

Tablo 26. (devam)

<i>L.plantarum</i> ACC 54+ <i>L.plantarum</i> ACC 28	0. Gün	9,13	3,58	0,79	3,98	1,28	5,44	32,18	41,02	26,80	643,32	16,41	7,45
	1. Gün	8,50	3,28	1,23	4,48	1,18	6,19	33,16	39,20	27,63	463,30	15,63	8,18
	2. Gün	8,40	3,19	1,34	4,45	1,22	6,11	32,76	40,05	27,19	449,83	14,70	10,63
	3. Gün	8,70	3,15	1,50	4,67	1,19	6,44	33,07	39,41	27,52	455,44	20,67	9,28
	2. Hafta	8,60	3,11	1,43	5,16	1,28	6,94	32,58	41,68	25,73	319,58	28,99	9,77
	4. Hafta	9,00	3,08	1,40	5,20	1,27	7,00	32,74	41,45	25,82	309,48	35,60	13,42
<i>L.plantarum</i> ACC 54+ <i>L.plantarum</i> 250	0. Gün	9,13	3,58	0,79	3,98	1,28	5,44	32,18	41,02	26,80	643,32	16,41	7,45
	1. Gün	8,50	3,34	1,17	4,52	1,22	6,18	32,89	40,16	26,96	468,92	16,58	9,17
	2. Gün	8,70	3,22	1,33	4,67	1,23	6,39	32,83	40,20	26,98	458,81	14,88	8,63
	3. Gün	8,60	3,23	1,35	4,94	1,22	6,75	32,95	40,32	26,73	445,71	19,11	9,68
	2. Hafta	8,70	3,19	1,35	5,17	1,28	6,95	32,60	41,84	25,56	335,68	24,55	9,67
	4. Hafta	8,90	3,15	1,28	5,78	1,28	7,74	32,78	41,87	25,35	340,17	37,02	13,10
<i>L.plantarum</i> ACC 28+ <i>L.plantarum</i> 250	0. Gün	9,13	3,58	0,79	3,98	1,28	5,44	32,18	41,02	26,80	643,32	16,41	7,45
	1. Gün	8,50	3,29	1,21	4,74	1,22	6,47	32,91	40,27	26,82	461,43	16,00	8,50
	2. Gün	8,70	3,18	1,38	4,69	1,23	6,41	32,75	40,33	26,92	450,20	15,25	9,64
	3. Gün	8,60	3,16	1,49	4,94	1,23	6,75	32,88	40,32	26,80	421,01	21,12	9,61
	2. Hafta	8,50	3,13	1,43	5,31	1,30	7,09	32,56	42,30	25,14	308,73	25,05	9,44
	4. Hafta	8,70	3,08	1,42	5,89	1,27	7,84	33,17	41,98	24,89	302,74	35,14	12,07
<i>L.plantarum</i> ACC 54+ <i>L.plantarum</i> ACC 28+ <i>L.plantarum</i> 250	0. Gün	9,13	3,58	0,79	3,98	1,28	5,44	32,18	41,02	26,80	643,32	16,41	7,45
	1. Gün	8,50	3,28	1,23	4,56	1,21	6,26	32,95	39,91	27,14	453,20	16,80	9,63
	2. Gün	8,50	3,19	1,37	4,68	1,23	6,42	32,78	40,15	27,08	440,47	14,77	9,23
	3. Gün	8,80	3,17	1,55	4,92	1,23	6,73	32,87	40,26	26,87	441,22	19,68	9,44
	2. Hafta	8,40	3,13	1,41	5,41	1,30	7,25	32,42	42,15	25,43	301,99	27,15	9,47
	4. Hafta	8,40	3,09	1,37	5,56	1,26	7,47	32,98	41,51	25,51	322,95	36,03	13,23

Şekil 60 (A)'da 37 °C'de depolama sıcaklığındaki örneklerin SÇKM miktarı tekli probiyotik bakteri içeren greyfurt sularında 25 °C'de depolanan tekli probiyotik bakteri içeren örneklerle göre daha yüksek bulunmuştur. Mikroorganizma ve kombinasyonlarını içeren greyfurt suyu örneklerinde ise her iki depolama sıcaklığındaki SÇKM miktarında benzer bir değişim belirlenmiştir. Şekil 60 (B)'de başlangıçtaki SÇKM miktarları 37 °C sıcaklıkta 1. günden itibaren artış gösterirken 25 °C'lik sıcaklıkta 1-2 gün aralığında artış daha sonra bir azalış meydana gelmiştir.



Şekil 60. Probiyotik mikroorganizmaların farklı kombinasyonları ile inkübe edilen greyfurt sularının depolama süresi boyunca sıcaklık x mikroorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B), mikroorganizma suş x süre (C) etkileşimindeki SÇKM değişimi

Porto *et al.* (2018), yaptıkları çalışmada liyofilize *Lactobacillus acidophilus* probiyotik kültürünün eklendiği karışık pancar ve portakal sularının değerlendirmişlerdir. Hazırlanan örnekler, 4°C'de 28 gün depolanmış ve örneklerin özelliklerini değerlendirmişlerdir. Örneklerin 7 gün aralıklarla ölçülen SÇKM °brix miktarındaki değişikliğin anlamlı bulunmadığını bildirmişlerdir.

Probiyotik olarak üretilen greyfurt suyunda SÇKM'de meydana gelen değişiklik ile ilgili yapılan literatür taraması sonucu herhangi bir veriye rastlanmamıştır. Fakat narenciye suları ile ilgili yapılan bazı çalışmalar mevcuttur. Yuasa *et al.* (2021), probiyotik laktik asit

bakterileri (*Lactobacillus plantarum* SI-1 ve *L. pentosus* MU-1) kullanarak üç çeşit fermente narenciye suyu hazırlamışlardır ve narenciye sularında incelenen özellikler arasında meyve suyunun SÇKM miktarında bir günlük inkübasyon sonucunda değişim olmadığını belirlemişlerdir.

Ding and Shah (2008), altı hafta boyunca depolanan serbest ve mikrokapsüllü probiyotik bakteri içeren elma suyunda ve portakal suyundaki SÇKM miktarlarındaki değişiklikleri incelemişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda depolama süresince direkt inokülasyon yapılan elma suyunda SÇKM miktarı 12'den 10.5'e kadar portakal suyunda ise 10'dan 8.4'e kadar bir düşüş meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Literatürde probiyotik ilaveli meyve sularında fermentasyon süresince meydana gelen azalma bizim çalışmamız ile paralellik göstermektedir.



Tablo 27. Probiyotik Bakteri Eklenmiş Greyfurt Sularının Depolama Süresince Belirlenen Özelliklerinin Varyans Analizi

Varyans Kaynakları	Sıcaklık (A)		Mikoorganizma Kombinasyonları (B)		Süre (C)		AXB		AXC		BXC		
SD	1		6		5		6		5		30		168
Özellikler	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	Hata
SÇKM	0,097	35,640**	0,298	109,080**	1,989	728,967**	0,060	21,895**	0,486	178,043**	0,090	32,825**	0,003
PH	0,011	121,786**	0,065	714,143**	1,300	14309,842**	0,001	7,840**	0,049	537,070**	0,006	60,717**	9,087
TA	0,087	181,528**	0,138	287,312**	2,745	5732,564**	0,017	34,732**	0,413	862,798**	0,018	36,931**	0,000
Renk yoğunluğu (koyuluğu) (IC)	0,106	3,986*	0,128	4,803**	10,576	396,856**	0,171	6,424**	0,396	14,858**	0,093	3,490**	0,027
Renk tonu (T)	1,400	0,000	0,003	2,151*	0,044	37,254**	0,000	0,341	0,007	6,228**	0,001	0,645	0,001
Renk Yoğunluğu (IC')	0,172	4,234*	0,239	5,880**	17,037	419,099**	0,264	6,506**	0,712	17,513**	0,155	3,814**	0,041
Kırmızı Renk Boyutu (%)	0,068	0,450	0,250	1,656	4,041	26,746**	0,107	0,705	1,072	7,097**	0,110	0,731	0,151
Sarı renk Boyutu (%)	0,020	0,039	1,306	2,481*	25,611	48,652**	0,218	0,413	2,105	3,998**	0,362	0,687	0,526
Mavi Renk Boyutu (%)	0,163	1,207	0,508	3,761**	18,764	139,007**	0,231	1,713	0,519	3,848**	0,142	1,051	0,135
TFM	16461,615	37,619**	864,557	1,976	584425,953	1335,557**	1532,397	3,502**	5482,960	12,530**	775,686	1,773*	437,590
DPPH•	70,789	159,286**	4,157	9,354**	1992,452	4483,322**	1,501	3,377**	77,793	175,046**	6,598	14,846**	0,444
ABTS ^{•+}	4,433	17,893**	1,646	6,642**	93,079	375,673**	1,564	6,313**	1,287	5,195**	1,863	7,520**	0,248

*p<0,05 **p<0,01

AxB: Sıcaklık ve mikoorganizma suşları kombinasyon etkileşimi

AxC: Sıcaklık ve süre etkileşimi

BxC: Mikoorganizma suşları ve süre etkileşimi

Tablo 28. Probiyotik Bakteri Eklenmiş Greyfurt Sularının Depolama Süresince Genel Özellikleri ANOVA ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi

Özellikler		SÇKM	PH	TA(%)	Renk yoğunluğu (koyuluğu) (IC)	Renk tonu (T)	Renk Yoğunluğu (IC')	Kırmızı Renk Boyutu (%)	Sarı renk Boyutu (%)	Mavi Renk Boyutu (%)	TFM (mgAE/L)	DPPH [•] (IC50)	ABTS [•] IC50)
Sıcaklık (°C)	25	8,74±0,29 ^b	3,28±0,18 ^a	1,27±0,29 ^a	4,81±0,52 ^a	1,25±0,06	6,54±0,67 ^a	32,73±0,63	40,89±1,15	26,38±0,70	456,85±111,21 ^a	20,62±5,82 ^b	9,22±1,55 ^b
	37	8,78±0,29 ^a	3,26±0,16 ^b	1,23±0,23 ^b	4,77±0,54 ^b	1,25±0,03	6,48±0,68 ^b	32,69±0,31	40,87±0,87	26,47±0,75	440,69±110,81 ^b	21,68±7,22 ^a	9,48±1,66 ^a
Kombinasyon	ACC 54	8,73±0,24 ^d	3,35±0,13 ^a	1,13±0,21 ^e	4,80±0,55 ^{bc}	1,25±0,04 ^a	6,51±0,69 ^{bc}	32,69±0,38	40,95±0,93 ^a	26,45±0,76 ^{abc}	453,29±112,80	21,40±6,51 ^a	9,13±1,57 ^d
	ACC 28	8,81±0,22 ^b	3,24±0,18 ^{de}	1,29±0,27 ^b	4,71±0,54 ^d	1,26±0,04 ^a	6,39±0,70 ^d	32,61±0,37	41,00±0,84 ^a	26,36±0,72 ^{bc}	444,65±113,16	21,01±6,35 ^{bc}	9,51±1,73 ^{ab}
	250	8,92±0,31 ^a	3,28±0,16 ^c	1,21±0,23 ^d	4,74±0,46 ^{cd}	1,26±0,04 ^a	6,43±0,58 ^{cd}	32,66±0,35	41,06±0,80 ^a	26,38±0,62 ^{bc}	453,60±104,38	20,67±5,72 ^d	9,18±1,11 ^{cd}
	1.KO	8,72±0,33 ^d	3,24±0,18 ^{de}	1,30±0,28 ^a	4,80±0,59 ^{bc}	1,23±0,07 ^b	6,54±0,74 ^{ab}	32,86±0,79	40,52±1,51 ^b	26,28±0,62 ^c	448,11±114,59	21,45±7,30 ^a	9,72±1,79 ^a
	2.KO	8,77±0,29 ^c	3,29±0,16 ^b	1,22±0,25 ^c	4,78±0,52 ^{bcd}	1,24±0,05 ^{ab}	6,49±0,66 ^{bc}	32,78±0,58	40,75±1,07 ^{ab}	26,62±0,97 ^a	453,38±108,70	20,76±6,53 ^{cd}	9,20±1,78 ^{cd}
	3.KO	8,69±0,24 ^e	3,24±0,18 ^{de}	1,29±0,29 ^{ab}	4,88±0,54 ^a	1,25±0,04 ^a	6,62±0,68 ^a	32,70±0,43	41,01±0,87 ^a	26,48±0,66 ^{ab}	441,06±120,57	21,29±6,74 ^{ab}	9,41±1,54 ^{bc}
	4.KO	8,65±0,27 ^f	3,24±0,18 ^{de}	1,30±0,29 ^a	4,85±0,52 ^{ab}	1,25±0,04 ^a	6,59±0,66 ^{ab}	32,67±0,41	40,88±0,91 ^a	26,29±0,75 ^{bc}	447,27±111,53	21,50±7,15 ^a	9,30±1,67 ^{bcd}
Süre	0. Gün	9,13±0,10 ^a	3,58±0,01 ^a	0,79±0,03 ^f	3,98±0,08 ^e	1,27±0,01 ^b	5,44±0,12 ^e	32,18±0,06 ^d	41,02±0,16 ^c	26,80±0,10 ^{ab}	643,32±39,50 ^a	16,41±0,16 ^e	7,45±0,12 ^e
	1. Gün	8,49±0,04 ^e	3,34±0,06 ^b	1,16±0,05 ^e	4,63±0,19 ^d	1,22±0,02 ^c	6,34±0,24 ^d	32,98±0,10 ^a	40,12±0,41 ^d	26,90±0,34 ^b	471,56±12,13 ^b	16,97±0,84 ^d	8,76±1,11 ^d
	2. Gün	8,85±0,26 ^b	3,23±0,05 ^c	1,26±0,07 ^d	4,58±0,23 ^d	1,23±0,01 ^c	6,26±0,31 ^d	32,78±0,10 ^b	40,28±0,17 ^d	26,93±0,17 ^a	465,33±17,92 ^b	15,19±0,54 ^f	8,93±1,07 ^d
	3. Gün	8,72±0,11 ^c	3,22±0,06 ^d	1,34±0,12 ^c	5,00±0,17 ^c	1,22±0,02 ^c	6,82±0,21 ^c	33,01±0,12 ^a	40,27±0,41 ^d	26,72±0,36 ^b	462,58±34,17 ^b	18,93±1,59 ^c	9,30±0,65 ^c
	2. Hafta	8,68±0,32 ^d	3,13±0,08 ^e	1,49±0,18 ^a	5,33±0,27 ^a	1,27±0,03 ^b	7,16±0,35 ^a	32,77±0,30 ^b	41,61±0,52 ^b	25,62±0,36 ^c	330,09±21,44 ^c	27,44±1,88 ^b	9,72±0,58 ^b
	4. Hafta	8,66±0,25 ^d	3,11±0,08 ^f	1,46±0,20 ^b	5,24±0,47 ^b	1,29±0,08 ^a	7,04±0,59 ^b	32,54±0,94 ^c	41,97±1,60 ^a	25,49±0,74 ^c	319,72±24,81 ^d	31,98±3,68 ^a	11,95±1,15 ^a

*Her sütun için istatistiki analiz kendi içerisinde yapılmış ve aynı harfle gösterilen ortalamalar önem seviyesi aynı olarak kabul edilmiştir.

Tablo 29. Probiyotik Bakteri Eklenmiş Greyfurt Sularının Depolama Süresince Genel Özelliklerinin Korelasyonu

	SÇKM	PH	TA	Renk yoğunluğu (koyuluğu)	Renk Yoğunluğu	Renk Tonu	Kırmızı Renk Boyutu	Sarı renk Boyutu	Mavi Renk Boyutu	TFM	DPPH	ABTS ⁺⁺
PH	0,466**											
TA	-0,535**	-0,959**										
Renk koyuluğu	-0,456**	-0,798**	0,741**									
Renk Yoğunluğu	-0,473**	-0,800**	0,745**	0,998**								
Renk Tonu	0,264*	0,005	-0,019	0,060	-0,002							
Kırmızı Renk Boyutu	-0,462**	-0,383**	0,370**	0,448**	0,496**	-0,842**						
Sarı renk Boyutu	0,100	-0,253*	0,218*	0,372**	0,311**	0,940**	-0,618**					
Mavi Renk Boyutu	0,139	0,534**	-0,484**	-0,720**	-0,672**	-0,690**	0,198	-0,893**				
TFM	0,500**	0,903**	-0,863**	-0,840**	-0,827**	-0,161	-0,290**	-0,439**	0,714**			
DPPH*	-0,217*	-0,624**	0,560**	0,717**	0,681**	0,487**	-0,009	0,698**	-0,864**	-0,777**		
ABTS ⁺⁺	-0,345**	-0,716**	0,654**	0,637**	0,619**	0,232*	0,139	0,434**	-0,619**	-0,778**	0,771**	
Quinik Asit	0,091	-0,155	0,003	0,232*	0,201	0,434**	-0,245*	0,495**	-0,477**	-0,252*	0,478**	0,330**
Fumarik Asit	0,355**	0,681**	-0,631**	-0,620**	-0,612**	-0,121	-0,203	-0,317**	0,510**	0,708**	-0,565**	-0,674**
Gallik Asit	-0,154	-0,461**	0,366**	0,524**	0,492**	0,449**	-0,102	0,596**	-0,685**	-0,567**	0,726**	0,579**
Kerasiyanin Klorit	-0,144	-0,070	0,100	0,120	0,143	-0,235*	0,233*	-0,209	0,128	0,039	-0,165	-0,057
Siyanidin-3-O-glucosid	-0,270*	-0,054	0,131	-0,144	-0,122	-0,350**	0,208	-0,356**	0,326**	0,005	-0,403**	-0,250*
Klorogenik Asit	0,437**	0,629**	-0,559**	-0,590**	-0,594**	0,048	-0,304**	-0,147	0,358**	0,690**	-0,476**	-0,550**
Hesperidin	0,159	0,439**	-0,385**	-0,342**	-0,338**	-0,005	-0,171	-0,132	0,263*	0,417**	-0,314**	-0,342**
Sinapik Asit	0,456**	0,174	-0,228*	-0,114	-0,162	0,751**	-0,705**	0,655**	-0,413**	0,049	0,342**	0,111
Ferulik Asit	0,045	-0,498**	0,377**	0,479**	0,444**	0,488**	-0,166	0,622**	-0,680**	-0,577**	0,781**	0,622**
Rosmarinik Asit	0,008	-0,050	0,065	-0,037	-0,034	-0,073	0,036	-0,067	0,064	0,010	-0,036	-0,048
Vanillin	-0,150	-0,543**	0,471**	0,523**	0,487**	0,418**	-0,027	0,593**	-0,723**	-0,674**	0,784**	0,668**
Resveratrol	-0,082	-0,008	0,048	0,014	0,038	-0,313**	0,255*	-0,313**	0,244*	0,044	-0,183	-0,187

Tablo 29. (devam)

	Quinik Asit	Fumarik Asit	Kerasiyanin Klorit	Siyanidin-3-O-glucozit	Klorogenik Asit	Hesperidin	Sinapik Asit	Ferulik Asit	Rosmarinik Asit	Vanillin	Resveratrol
Fumarik Asit	-0,099										
Kerasiyanin Klorit	-0,223*	-0,048									
Siyanidin-3-O-glucozit	-0,307**	0,038	0,122								
Klorogenik Asit	-0,194	0,410**	0,037	0,054							
Hesperidin	-0,330**	0,145	0,076	0,081	0,423**						
Sinapik Asit	0,454**	0,041	-0,323**	-0,422**	0,107	0,026					
Ferulik Asit	0,522**	-0,390**	-0,296**	-0,476**	-0,497**	-0,336**	0,518**				
Rosmarinik Asit	-0,099	0,049	-0,057	0,225*	0,061	0,084	-0,160	-0,026			
Vanillin	0,331**	-0,644**	-0,127	-0,286**	-0,311**	-0,239*	0,241*	0,672**	0,022		
Resveratrol	-0,127	0,062	0,162	0,094	-0,065	-0,181	-0,182	-0,119	-0,079	-0,248*	

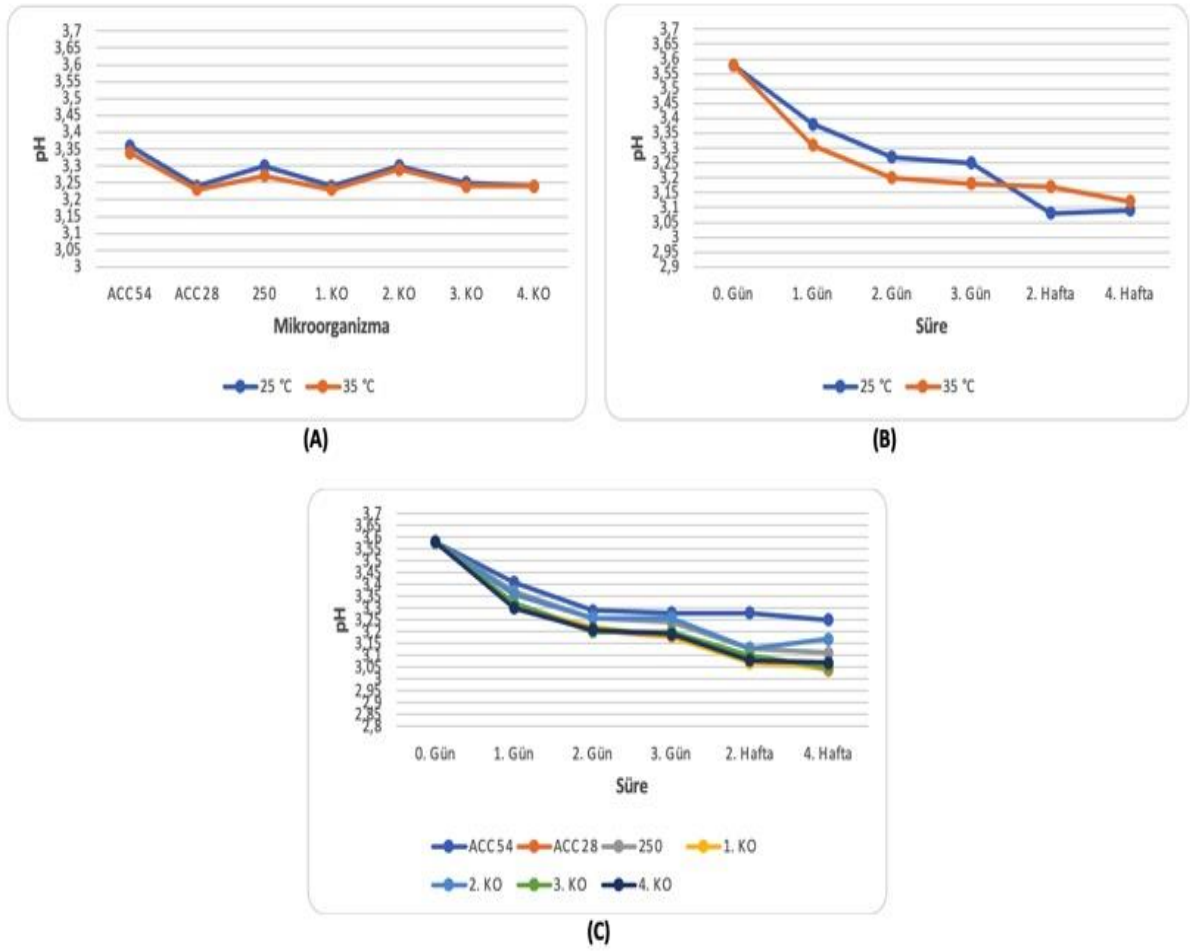
pH değışimi

Yerel bir satıcıdan temin edilen greyfurt suları sıkılarak patörize edildikten sonra farklı kombinasyonlarda inoküle edilen probiyotik bakterilerin greyfurt sularında pH değışimine sebep olup olmadığını görebilmek için fermentasyon süresi boyunca belli aralıklarda (1, 2, 3. günü ve 2 ve 4. haftalarında) örnekler steril şartlarda alınarak pH ölçümü gerçekleştirilmiştir. Belirlenen pH değerleri Tablo 26'daki verilmiştir.

ACC 54, ACC 28, *L.plantarum* 250, 1. KO, 2. KO, 3.KO ve 4.KO eklenmiş greyfurt sularının 25°C'lik depolama süresi boyunca pH'larda genel bir düşüş belirlenmiştir. Depolama sıcaklığı 37 °C'de aynı kombinasyonların inoküle edildiği greyfurt sularında da benzer bir düşüş tespit edilmiştir. Depolama sürecinde 25 °C'de en fazla düşme ACC 28 ve 1.KO'da meydana gelmiş ve pH değeri 3.58'den 3.02'e kadar düşmüştür. En az değışim ise ACC 54'de 3.58'den 3.21'e kadar bir düşüş olarak meydana gelmiştir. Diğer depolama sıcaklığı olan 37°C'de en düşük pH 3.58'den 3.07'ye ACC 28'de meydana geldiği tespit edilmiştir. En az değışim ise ACC 54'de 3.58'den 3.29'a kadar düştüğü belirlenmiştir (Tablo 26). *L.plantarum* bakterileri laktik asit üretme yeteneği sayesinde (Yuasa *et al.* 2021), depolama süresi boyunca pH değerinde düşmeye sebep olduğu düşünülmektedir.

Yapılan varyans analizi sonucunda sıcaklığın ve farklı mikroorganizmaların greyfurt suyunun depolama süresi boyunca pH değeri üzerindeki etkisi çok anlamlı bulunmuştur ($p<0.01$). Aynı şekilde greyfurt suyu pH değeri üzerine süreninde etkisinin çok anlamlı ($p<0.01$) olduğu belirlenmiştir ($p<0.01$). Bu çalışmada kullanılan mikroorganizma suş x sıcaklık interaksyonu istatistiksel olarak çok önemli ($p<0.01$) bulunmuştur. Aynı şekilde kullanılan mikroorganizma suş x süre ve sıcaklık x süre interaksyonları da istatistiki olarak çok önemli ($p<0.01$) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 27).

Şekil 61 (B)'de greyfurt sularının pH değerleri depolama süresi boyunca her iki sıcaklık derecesinde de azalmıştır. Şekil 61 (C)'de probiyotik bakteriler ve kombinasyonlarının inoküle edildiği greyfurt sularının pH değerleri depolama süresi boyunca yine her iki depolama sıcaklığında düşüş gösterdiği belirtilmiştir.



Şekil 61. Probiyotik mikroorganizmaların farklı kombinasyonları ile inkübe edilen greyfurt sularının depolama süresince pH değerindeki sıcaklık x mikroorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B), mikroorganizma suş x süre (C) interaksiyonları

Yuasa *et al.* (2021), çalışmalarında narenciye sularındaki pH'yı 3.70 olarak belirlemiş ve %100 konsantre olmayan haruka suyunun fermantasyonu sonucu pH değerinin değişmediğini belirtmişlerdir. %100 konsantre olmayan satsuma mandalina suyunda ise, *L. plantarum* SI-1 kullanıldığında laktik asit fermantasyonu sırasında asitliğin arttığı, ancak iki bakteri tarafından 24 saatlik bir fermentasyonun ardından pH değerinin değişmediğini bildirmişlerdir. Porto and Okina (2017), *Lactobacillus acidophilus* eklenen pancar ve portakal sularının karışık olarak iki farklı oranda kullanıldığı meyve sularının pH değerlerini incelemişlerdir. Araştırma sonunda daha yüksek konsantrasyonda portakal suyu içeren meyve suyunun (1:2), 4 °C'de 28 günlük depolama süresi boyunca değerlendirilen diğer meyve suyuna (1:1) kıyasla daha düşük pH değeri gösterdiğini tespit etmişlerdir. 1:2 oranında karıştırılan meyve suyunun daha yüksek asitliği, gıdayı bozan mikroorganizmaların gelişmesini engellemekte, böylece raf ömrünün uzamasını sağlayacağını bildirmişlerdir. Ancak bu durumun ürünlerin duyuusal kabulünü ve probiyotik kültürlerin canlılığını azaltabileceğini de belirtmişlerdir.

Asitlik ve suda çözünür maddelerdeki varyasyonlar, kullanılan meyve ve sebzelerin özellikleri ve bunların ilaveleri ile ilgili olduğundan (Pimentel *et al.* 2015; Costa *et al.* 2017) pH'daki düşüş gıdaya ve uygulamaya göre değişkenlik gösterebileceğinden çalışmamızdaki probiyotik greyfurt sularının pH'sındaki düşüşün yapılan çalışmalar doğrultusunda muhtemel olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bu çalışma da kullanılan sıcaklık derecelerinin mikrobiyal gelişme için uygun olduğu fakat meyve suyunun uzun süreli saklanması için uygun olmadığı düşünüldüğünden gelişim sürecinde probiyotik bakterilerin ne kadar süre dayanabileceği ve bu süreç içerisinde meyve suyunun diğer özellikleri ve özellikle naringin içeriğinde meydana getirdiği azalma miktarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

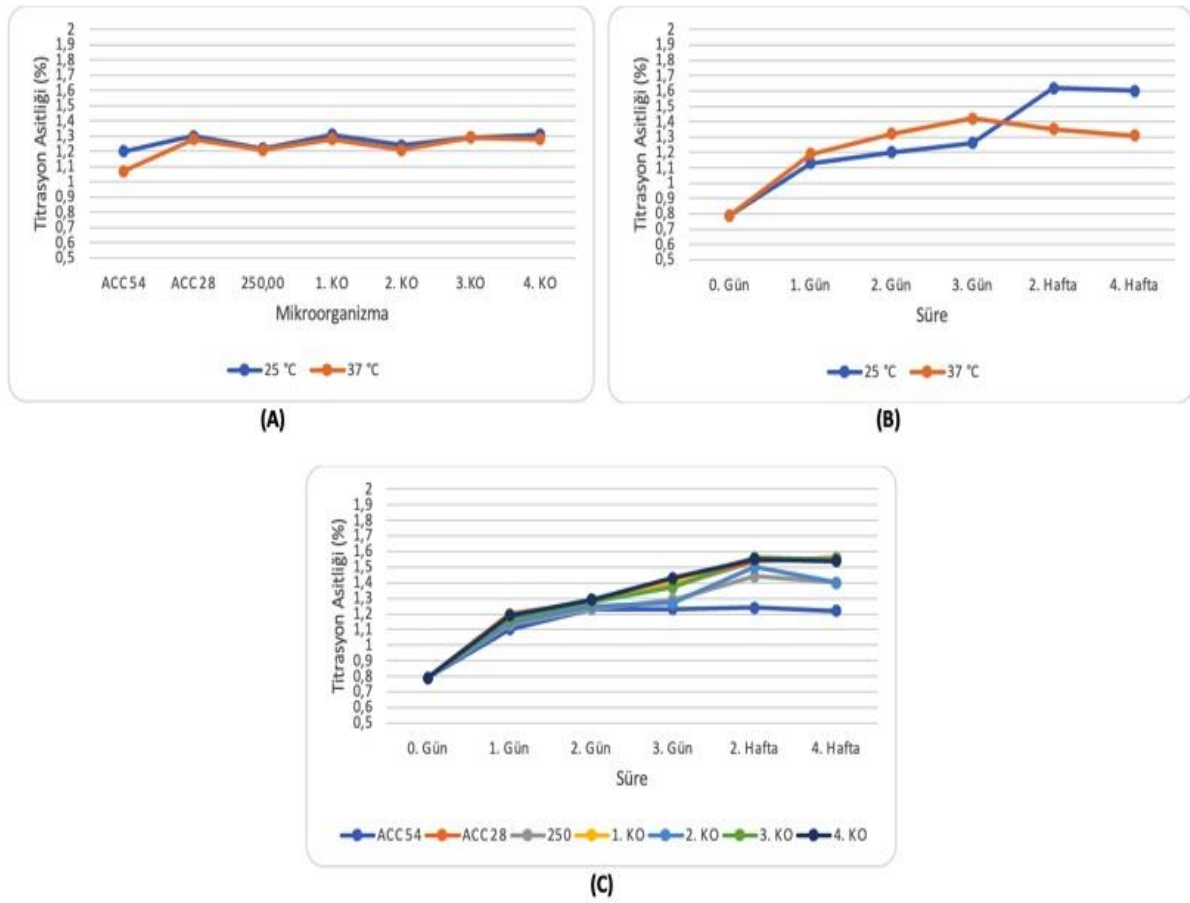
Titrasyon asitliği değişimi

Probiyotik greyfurt suyu örneklerinin titrasyon asitliği belirlenen miktarları Tablo 26'da verilmiştir.

ACC 54, ACC 28, *L.plantarum* 250, 1. KO, 2. KO, 3.KO ve 4.KO eklenmiş greyfurt sularında 25°C'lik depolama süresi boyunca titrasyon asitliği miktarında bir yükselme belirlenmiştir. En fazla artış %0.79'dan %1.72'e kadar 4.KO'da bulunmuştur. Bunun yanı sıra en az artış %0.79'dan %1.47'e kadar ACC 54'de tespit edilmiştir. Diğer depolama sıcaklığı olan 37°C'de ise en fazla artış %0.79'dan %1.44'e kadar ACC 28'de bulunmuştur. En az artış ise ACC 54'de belirlenmiş olup %0.79'den %0.97'e kadar bir yükselme gerçekleşmiştir. Her iki sıcaklık değerinde de depolama sonucu titrasyon asitliğinde en az değişimin ACC 54'de bulunmuştur (Tablo 26). Yapılan varyans analizi sonucunda sıcaklık, kullanılan mikroorganizma suşu ve süre parametrelerinin, bütün örneklerin titrasyon asitliği üzerine istatistiki olarak çok anlamlı ($p<0.01$) bir etki gösterdiği tespit edilmiştir. Parametreler arası etkileşimler incelendiğinde, sıcaklık x mikroorganizma suşu etkileşimi istatistiki olarak çok önemli ($p<0.01$) bulunmuştur. Aynı zamanda sıcaklık x süre ve mikroorganizma suşu x süre etkileşimleri de greyfurt suyu örneklerinin titrasyon asitliğindeki değişim üzerine çok anlamlı ($p<0.01$) bir etki oluşturduğu tespit edilmiştir (Tablo 27). Probiyotik mikroorganizmaların 37°C'de 2. Haftadan itibaren gelişmedikleri Tablo 25'de verilmiştir. Probiyotik kültürlerin canlılığını etkileyen faktörler arasında asitlik miktarı, pH, oksijen seviyesi, besin eksikliği ve üründe antimikrobiyal maddelerin varlığı sayılmaktadır (Shah, 2001). Bu durumda probiyotik mikroorganizmaların gelişimi 37°C'de 25 °C'ye göre daha hızlı gerçekleşmiş olup ortamda artan asit miktarı ve azalan pH'dan dolayı mikroorganizmaların bu sıcaklıkta 2. haftadan sonra koloni sayımı için yapılan ekimde gelişemedikleri düşünülmektedir. Böylece 25 °C laktik asit bakterileri için optimum sıcaklığın altında oldundan

dolayı gelişim daha yavaş gerçekleşmiş olup mikroorganizma gelişimi 37°C sıcaklıktaki mikroorganizmalara göre 4. haftaya kadar biraz daha artmıştır.

Şekil 62 (A)'da *L. plantarum* ACC54 greyfurt suyu örneklerinin titrasyon asitliği miktarı diğer örneklerle göre daha düşük belirlenmiştir. Şekil 62 (B)'de her iki sıcaklık derecesinde greyfurt suyundaki titrasyon asitliği miktarlarında depolama süresince bir artış meydana gelmiştir. Şekil 62 (C)'de bütün mikroorganizma suşlarının inoküle edildiği greyfurt sularının titrasyon asitliği miktarları depolama süresince artış göstermiş olup, en fazla değişim 4. KO 'da bulunmuştur.



Şekil 62. Probiyotik mikroorganizmaların farklı kombinasyonları ile inkübe edilen greyfurt sularının depolama süresince titrasyon asitliği miktarındaki sıcaklık x mikroorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B), mikroorganizma suş x süre (C) etkileşimleri

Yoon *et al.* (2005), *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum* olmak üzere 4 yararlı laktik asit bakterisi tarafından kırmızı pancar suyunu fermente etmiş ve kırmızı pancar suyunun genel özellikleri arasında titrasyon asitliği miktarına baktıklarında 4°C'lik bir sıcaklıkta 72 saatlik bir depolama sonucunda *L. acidophilus*'un %0.13-0.98, *L. plantarum*'un %0.13-0.56, *L. casei*'nin 0.13-0.25 ve *L. delbrueckii*'nin 0.13-0.23 arasında değişim gösterdiğini bildirmişlerdir.

Porto and Okina (2017), farklı oranlarda pancar ve portakal suları karışımına ekledikleri liyofilize *L.acidophilus*'un bu meyve sularının genel özelliklerinde meydana getirdiği değişikliği araştırmışlardır. Çalışma sonunda 4°C'de 28 günlük bir depolama sonucunda liyofilize *L.acidophilus* 'un 1:1 ve 1:2 oranında karıştırılmış meyve sularının sitrik asit cinsinden belirlenmiş olan toplam asitlik içeriğinde herhangi bir değişikliğe sebep olmadığını belirtmişlerdir.

Yuasa *et al.* (2021) probiyotik laktik asit bakterileri kullanılarak fermente edilmiş narenciye suyunun kimyasal bileşimi ve duyuşal özellikleri araştırdıkları çalışmalarında titrasyon asitliği miktarının *L. plantarum* HJ'nin *L. plantarum* SI-1'inde kontrol grubuna göre önemli bir fark oluşmadığı, *L. plantarum* MU-1'de bir düşüş olduğunu (0.07) bildirmişlerdir. Aynı zamanda *Lactobacillus plantarum* SMJ grubunda *L. plantarum* SI-1'de kontrol grubuna göre bir artış (0.17) olurken *L. plantarum* MU-1'de bir değişme olmadığı ve OJ grubunda ise *L. plantarum* SI-1 ve *L. plantarum* MU-1'de kontrole göre sırasıyla 0.19 ve 0.6'lık bir artış tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Renk değerlerindeki değişim

Greyfurt sularına farklı kombinasyonlarda inoküle edilen probiyotik bakterilerin fermentasyon süresi boyunca, belli aralıklarda steril şartlarda alınmış greyfurt suları örneklerinin renk değerlerinin spektrofotometrik sonuçları Tablo 26'da verilmiştir.

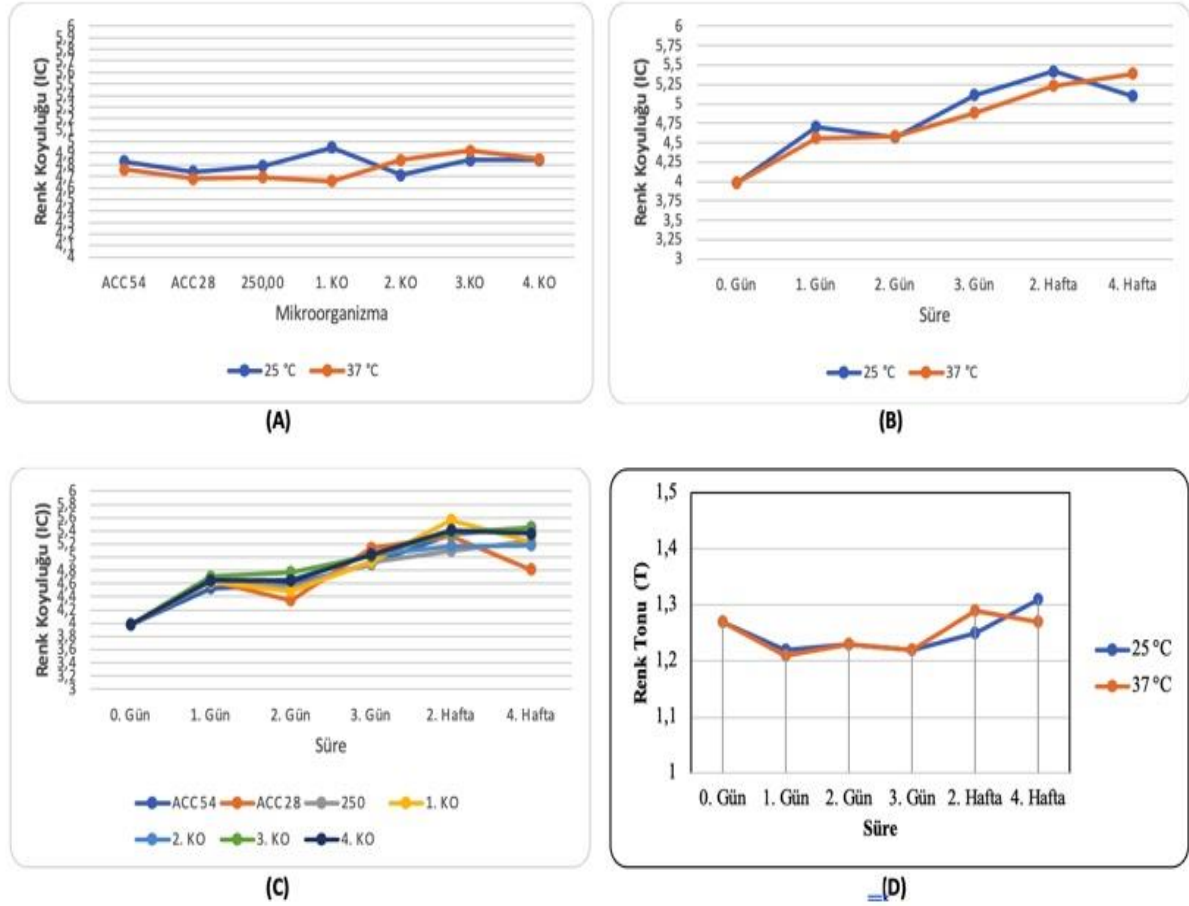
Gıdalardaki renk maddeleri; klorofil, antosiyanin, karotenoid ve betalainler olmak üzere dört grup fenolik bileşikten kaynaklanmaktadır. Turunçgillerde renkler antosiyaninlerden kaynaklanmaktadır. Greyfurt turunçgil ailesi içerisinde sınıflandırıldığından dolayı, greyfurt suyunun rengine antosiyanidinlerin etken rol oynamaktadır. Bu antosiyaninlerin bileşimlerindeki antosiyanidinlerin farklı miktar ve oranda olmaları renk ve tonlarının oluşumunu sağlamaktadır. Antosiyanidinlerden siyanidin ve delfinidin kan portakalının renk oluşumunda rol almaktadır (Cemeroğlu, 2013). Greyfurt sularında bulunan fenolik yapıların değişimi, aynı zamanda ısı, sıcaklık, mikrobiyal yük gibi etken faktörler renk değişiminde etkili olabilmektedir.

Çalışmamızda, ACC 54, ACC 28, *L.plantarum* 250, 1. KO, 2. KO, 3.KO ve 4.KO eklenmiş greyfurt sularının IC değerlerinin 25°C'lik depolama sıcaklığında en fazla değişimi 1.KO'yu içeren greyfurt sularının 2 hafta depolanması sonucu meydana gelmiş olup, IC değeri, 3.98'den 5.96'ya yükselmiştir. IC'nin 37°C'lik depolama sıcaklığında ise en fazla değişimi 3.KO'nun ilave edildiği greyfurt suyu örneğinin 4 hafta depolanması sonucu (3.98'den 5.89'a) belirlenmiştir. IC' değerinin 25°C'lik depolama sıcaklığındaki en fazla değişimi yine 1. KO'yu

içeren greyfurt suyu örnekleğinin 2 hafta depolaması sonucu (5.44'den 7.96'ya) bulunmuştur. IC' değerinin 37°C'lik depolama sıcaklığındaki en fazla değişimi ise 4 hafta depolama sonucu (5.44'den 7.84'e) tespit edilmiştir. Renk tonunun 25°C ve 37°C'lik depolama sıcaklıklarındaki en fazla değişim 3.KO'da belirlenmiş olup (1.28'den 1.35 ve 1.28'den 1.30'a), greyfurt suyu örneklerinin 4 hafta depolanması sonucu belirlenmiştir. Kırmızı renk tonunda 25°C'lik depolama sıcaklıklarındaki en fazla değişim 1. KO eklenmiş greyfurt sularının 4 hafta depolanması sonucunda (%32.18'den %33.53'e) belirlenmiştir. 37 °C'deki depolama sıcaklıklarındaki en fazla değişim (%32.18'den 33.17'e) 3.KO ilave edilmiş greyfurt sularının 4 hafta depolanması sonucu bulunmuştur. Sarı renk tonunda 25°C'lik depolama sıcaklıklarındaki en fazla değişim *L. plantarum* ACC54 eklenmiş greyfurt sularının 4 hafta depolanması sonucunda (%41.02'den %42.98'e) belirlenmiştir. 37 °C'deki depolama sıcaklıklarındaki en fazla değişim (%41.02'den 42.15'e) 4.KO ilave edilmiş greyfurt sularının 2 hafta depolanması sonucu tespit edilmiştir. Mavi renk tonunda 25°C'lik depolama sıcaklıklarındaki en fazla değişim 1. KO eklenmiş greyfurt sularının depolama süresinin 1. gününde (%26.80'den %27.09'e) belirlenmiştir. 37 °C'deki depolama sıcaklıklarındaki en fazla değişim (%26.80'den %27.63'e) 1.KO ilave edilmiş greyfurt sularının depolama süresinin 1. gününde tespit edilmiştir (Tablo 26).

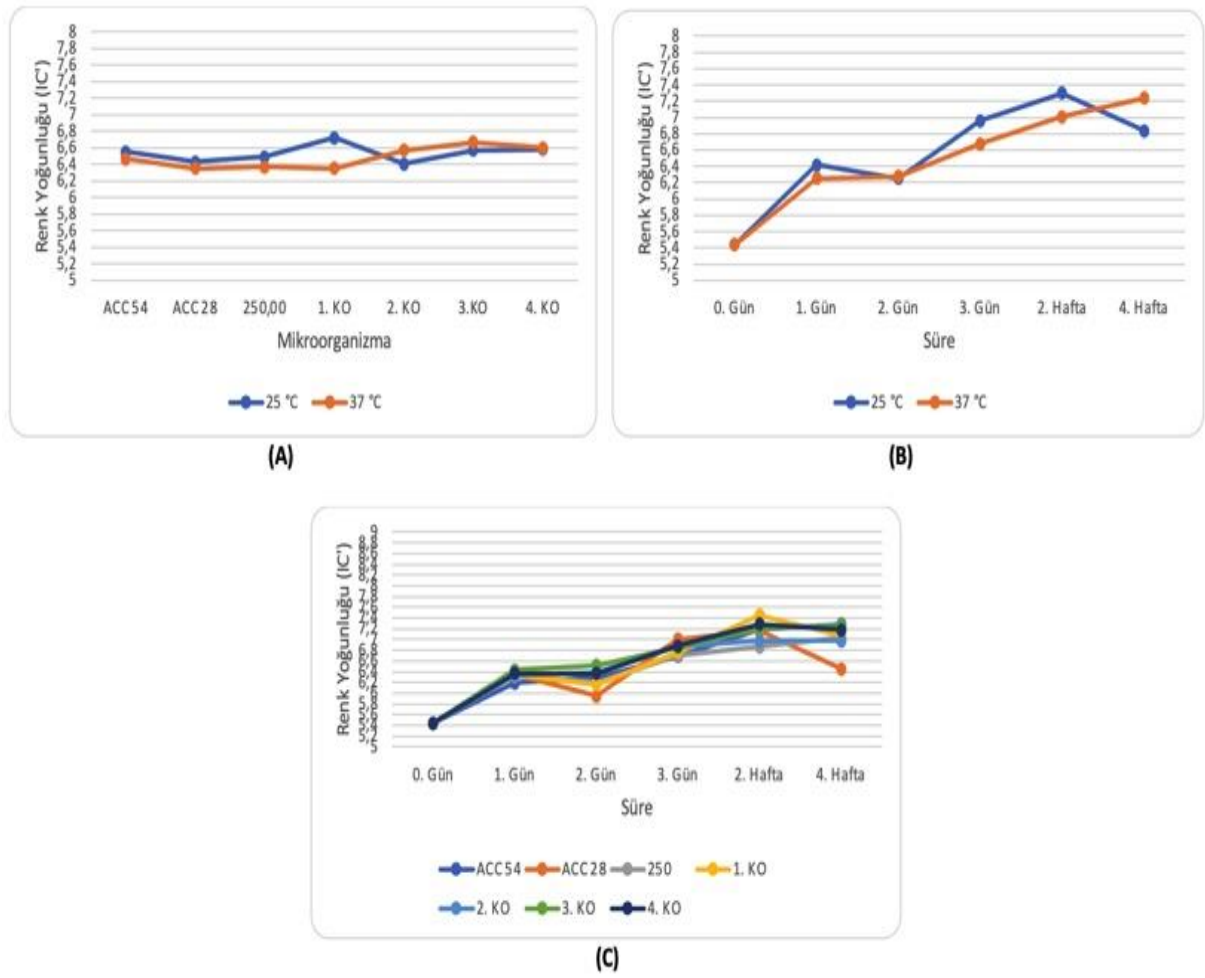
Yapılan istatistiki analiz sonucuna göre depolama süreci boyunca IC ve IC' değerleri üzerine sıcaklık parametresi önemli ($p<0.05$) bulunmuşken, mikroorganizma suşları ve süre parametrelerinin çok önemli ($p<0.01$) etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Renk tonu üzerine sıcaklık parametresinin önemli olmadığı bulunmuşken, mikrobiyal suş ve sürenin ise çok önemli ($p<0.01$) olduğu tespit edilmiştir. Sıcaklık parametresinin kırmızı, sarı ve mavi renk boyutları üzerine istatistiki olarak önemli bir etkiye sahip olmadığı bulunmuştur. Mikroorganizma suş parametresinin kırmızı renk boyutu için istatistiki olarak önemsiz, sarı renk boyutunda önemli ($p<0.05$), mavi renk boyutunda ise çok önemli ($p<0.01$) olduğu tespit edilmiştir. Süre parametresi ise her üç renk boyutu için istatistiki olarak anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur. Parametreler arasındaki interaksiyonlar incelendiğinde, her üç interaksiyonun IC ve IC' değerleri üzerine çok önemli ($p<0.01$) olduğu bulunmuştur. Renk tonu üzerine ise sadece sıcaklık x süre interaksiyonunun çok anlamlı ($p<0.01$) etki gösterdiği belirlenmiştir. Renk tonu üzerine sıcaklık x mikroorganizma suş ve mikroorganizma suş x süre interaksiyonlarının önemli bir etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir. Kırmızı, sarı ve mavi renk boyutları üzerine ise sadece sıcaklık x süre interaksiyonunun çok önemli ($p<0.01$) bir etki gösterdiği, diğer interaksiyonların anlamlı bir etki göstermediği belirlenmiştir (Tablo 27).

Greyfurt suyu örneklerinin IC değerleri, 25 °C ve 37 °C depolama sıcaklıklarında 4 haftalık depolama süresinin sonuna kadar genel bir artış göstermiştir (Şekil 63 (B)). Aynı şekilde mikroorganizma suşlarının ilave edildiği tüm örneklerinde IC değerleri 4 haftalık depolamanın sonuna doğru bir yükselme belirlenmiştir (Şekil 63 (C)). Şekil 63 (D)'de depolamanın 4. haftasında 25 °C sıcaklıktaki örneklerin, 37 °C sıcaklıktaki greyfurt suyu örneklerine göre daha yüksek renk tonu belirlenmiştir.



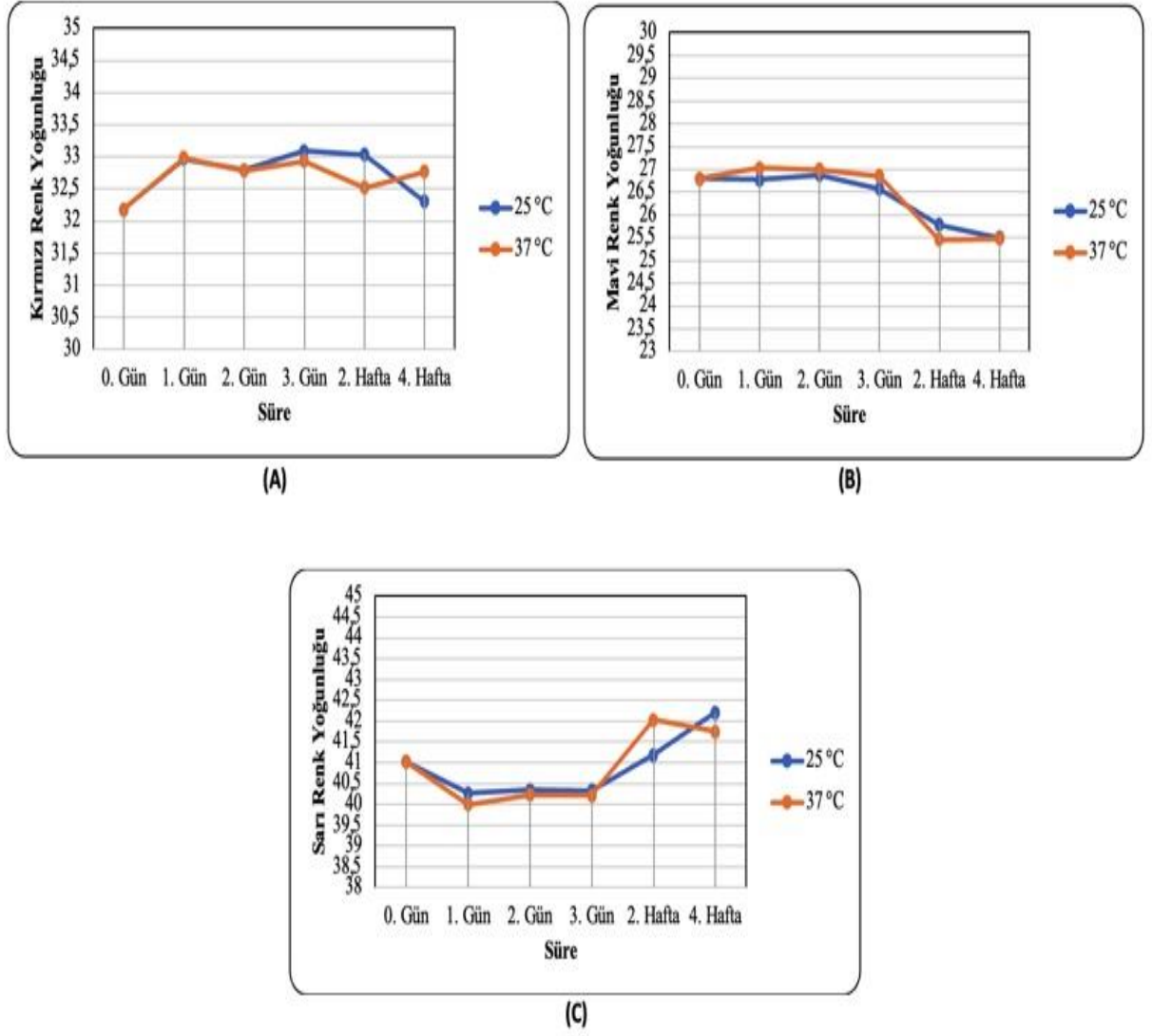
Şekil 63. Probiyotik mikroorganizmaların farklı kombinasyonları ile inkübe edilen greyfurt sularının depolama süresince renk koyuluğu (IC)'nin sıcaklık x mikoorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B), mikoorganizma suş x süre (C) interaksiyonları ve renk tonunun sıcaklık x süre (D) interaksiyonu

Greyfurt suyu örneklerinin IC' değerleri, her iki sıcaklık derecesinde depolama süresince artış göstermiştir (Şekil 64 (B)). Şekil 64 (A)'da ise ACC 54, ACC 28, *L.plantarum* 250, 1. KO, 2. KO, 3.KO ve 4.KO eklenmiş greyfurt sularının 25 °C ve 37 °C'deki IC' değerleri birbirine yakın olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda ACC 54, ACC 28, *L.plantarum* 250, 1. KO, 2. KO, 3.KO ve 4.KO eklenmiş greyfurt sularının IC' değerlerleri depolama süresi boyunca bir artış gösterdiği Şekil 64 (C)'de belirtilmiştir.



Şekil 64. Probiyotik mikroorganizmaların farklı kombinasyonları ile inkübe edilen greyfurt sularının depolama süresince renk yoğunluğundaki (IC') sıcaklık x mikoorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B), mikoorganizma suş x süre (C) etkileşimleri

Şekil 65 (A)'da kırmızı renk tonunda 0-1 gün aralığında bir artış meydana gelmiş, 4. haftanın sonunda 37 °C örneklerin kırmızı renk tonu 25 °C'deki örneklerle göre daha yüksek bulunmuştur. Şekil 65 (B)'de her iki sıcaklık derecesindeki greyfurt suyu örneklerinde mavi renk tonu 3. günün sonuna kadar çok az değişiklik göstermiş olup 3. günden sonra bir azalma meydana gelmiştir. Şekil 65 (C)'de 25°C sıcaklıktaki örneklerin sarı renk tonunda 3. günden sonra bir artış görülürken, 37 °C sıcaklıktaki greyfurt suyu örneklerinin sarı renk tonunda 3. gün ve 2. hafta aralığında önce bir artış, daha sonra 2. ve 4. hafta aralıklarında bir azalış tespit edilmiştir.



Şekil 65. Probiyotik mikroorganizmaların farklı kombinasyonları ile inkübe edilen greyfurt sularının depolama süresince kırmızı renk yoğunluğu (A), mavi renk yoğunluğu (B) ve sarı renk yoğunluğundaki (C) sıcaklık x süre interaksiyonları

Bu çalışmada renk değerleri Glories (1984) metodunun, Kalkan Yildirim (2006) modifikasyonuna göre ölçülmüştür. Yapılan literatür taraması sonucu probiyotik meyve suyunun bu yöntemle belirlenmiş renk değerlerine rastlanmamıştır. Yapılan bu çalışma bu açıdan alanında bir ilk olacaktır.

Kalkan Yildirim (2006)'da yaptıkları çalışmada meyve şaraplarının renk parametrelerini değerlendirmiştir. Meyvelerin farklı renkleri ve farklı şarap yapım prosedürlerinin, meyve şaraplarının toplam fenolik içeriğini etkilediği bu durumunda IC', IC, renk tonu, %sarı, kırmızı ve mavi renk boyutlarında farklılığa neden olduğunu bildirmiştir.

Kelebek *et al.* (2008), kan portakalı sularında (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) yaptıkları renk ölçümlerinde Moro ve Sanguinello türlerinde IC, renk tonu, %sarı, kırmızı ve mavi renk boyutlarını sırasıyla; 1.40 ± 0.12 - 0.84 ± 0.10 , 0.59 ± 0.01 - 1.23 ± 0.02 , 32.6 ± 0.04 - 41.9 ± 0.12 ,

55.0 ± 0.16-34.1 ± 0.08, 12.4 ± 0.04-24.0 ± 0.02 olarak belirlemişlerdir. Yapılan çalışma ile karşılaştırıldığında belirlenen renk değerleri turuncgillerin türlerine göre farklılık gösterdiği (Cemeroğlu, 2013) anlaşılmaktadır. Bu durumda bizim çalışmamızda bulunan değerler belirtilen lıretatüre göre uyum sağlamaktadır

Toplam fenolik madde değışimi

Greyfurt sularına farklı kombinasyonlarda inoküle edilen probiyotik bakterilerin greyfurt sularındaki depolama süresince belli aralıklarda meyve suyu örnekleri steril şartlarda alınmış ve *folin ciocalteu* ayırıcı ile toplam fenolik madde (TFM) miktarları belirlenmiştir. Belirlenen TFM miktarları Tablo 26’da verilmiştir.

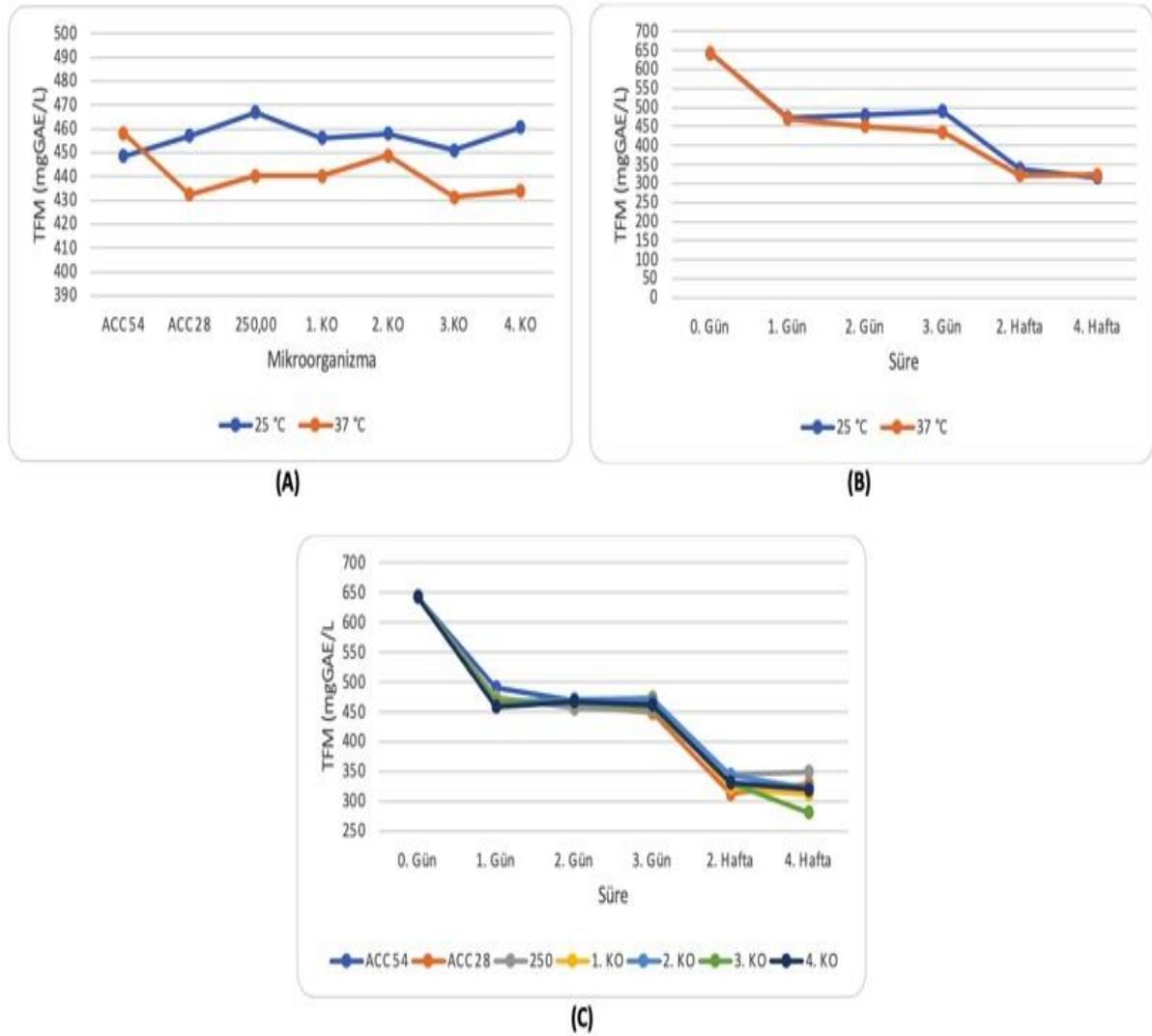
Greyfurt suyu zengin bir biyoaktif bileşik kaynağıdır (Vanamala *et al.* 2006; Zhang, 2007). Meyve suyunun laktik fermentasyonu, bağırsak mikroflorasının dengesini destekleyen lif, oligosakkaritler ve bakteriler gibi biyoaktif bileşikler içerdiğinden “fonksiyonel gıda” olarak tanımlanabilmektedir (Perricone *et al.* 2015). Bunların yanı sıra greyfurt suyunun laktik asit fermentasyonu ile üretilen potansiyel içecek, sağlık üzerine daha çok olumlu etki sağlayacaktır çalışmamızda hem probiyotik greyfurt suyu üretimi hem de probiyotik ilave edilen greyfurt sularında acılığa neden olan naringin miktarının azaltılması amaçlanmıştır.

Depolama sırasında genel olarak greyfurt suyunun toplam fenolik madde (TFM) içeriğı azalmıştır. Bir günlük fermentasyon süresi içerisinde en yüksek TFM 37 °C’de depolanan ACC 54’de belirlenmiştir. Başlangıç miktarı 643,32 mgGAE/L ‘den 502,60 mgGAE/L’ye düştüğü tespit edilmiştir. Fermentasyon süresinde en düşük TFM ise 643,32 mgGAE/L’den 453.20’ye kadar 37 °C’de depolanan 4. KO’da belirlenmiştir. Depolama süresince en fazla düşüş 25 °C’de 3. KO’da tespit edilmiştir. Bu miktar 643,32 mgGAE/L’den 4 haftalık depolama sonucunda 259,33 mgGAE/L’e düşmüştür. Depolama süresi sonunda 25 °C’de en az değışim ise 643,32 mgGAE/L’den 358,88 mgGAE/L’e kadar düşüş ile 250’de görülmüştür (Tablo 26).

Yapılan istatistiki analiz sonucu sıcaklık ve sürenin TFM üzerine çok önemli (p<0.01) bir etkiye sahip olduğu, mikoorganizma suşlarının ise bu değışimde etkili olmadığı belirlenmiştir. İkili interaksiyonlar incelendiğinde sıcaklık x mikoorganizma suşu ve sıcaklık x süre interaksiyonunun TFM üzerine çok anlamlı (p<0.01) bir etkiye sahip olduğu mikoorganizma suş x süre interaksiyonunun ise anlamlı (p<0.05) bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Tablo 27). Yapılan Duncan Çoklu Karşılaştırma Testinde sıcaklığın TFM üzerine 25 °C’de 456,85±111,21^a mgGAE/L kadar 37 °C’de ise 440,69±110,81^b mgGAE/L kadar bir değışikliğe sebep olduğu belirlenmiştir (Tablo 28). Bu durum 25 °C’de mikroorganizmalar uzun süre canlılığını koruduğundan dolayı TFM’yi besin maddesi olarak daha uzun süre

kullandığı, böylece TFM’de daha büyük bir azalmaya sebep olduğu şeklinde yorumlanabilir. Sürenin etkisi ise en çok 1 günlük fermentasyonun sonunda görüldüğü ve bunu takiben 3. gün sonunda gerçekleştiği tespit edilmiştir. Buna karşın 2. hafta ve 4. haftalardaki değişimin Tablo 26’da daha az olduğu belirlenmiştir. Bu durumun mikrobiyal yükteki azalma ile doğru orantılı olduğu düşünülmektedir.

Şekil 66 (A)’da *L. plantarum* ACC54 içeren örnek hariç olmak üzere diğer greyfurt suyu örneklerinin 37 °C sıcaklıktaki TFM miktarları 25 °C sıcaklıktaki örneklerin TFM miktarından daha düşük belirlenmiştir. Şekil 66 (B)’de her iki sıcaklık derecesindeki greyfurt suyu örneklerinin TFM miktarının depolama süresinin sonuna kadar azaldığı gösterilmiştir. Şekil 66 (C)’de mikroorganizmaların hepsinde 0-1 gün aralığındaki depolama sürelerinde TFM miktarlarının düştüğü 1-3 gün aralığında TFM miktarında çok az değişiklik olduğu daha sonra tekrar bir düşüş gösterdikleri belirtilmiştir.



Şekil 66. Probiyotik mikroorganizmaların farklı kombinasyonları ile inkübe edilen greyfurt sularının depolama süresince TFM (mgGAE/L)’deki sıcaklık x mikroorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B), mikroorganizma suş x süre (C) etkileşimleri

Yapılan literatür araştırması sonucu probiyotik greyfurt suyunun TFM miktarı ile ilgili yalnızca bir çalışmaya rastlanmıştır. Tran *et al.* (2020) yaptıkları çalışmada probiyotik greyfurt sularının 4 °C depolama süresi boyunca TFM’lerde çok önemli düzeyde bir azalma belirlemişlerdir. Multari *et al.* (2020), çalışmalarında tatlı portakal suları üzerinde laktik asit bakterilerin etkisini araştırmışlardır. Araştırma da laktik asit bakterilerinin fenolik bileşikler üzerindeki etkilerinin matrikse özgü olduğu, örneğin, *L. rhamnosus*, washington çeşidinin suundaki fenolik seviyelerini arttırırken (36.8 ± 1.51 mg/L), Tarocco çeşidindeki fenolikleri azalttığını (18.8 ± 0.7 mg/L) belirtmişlerdir. Miranda *et al.* (2019), çalışmalarında *Lactobacillus casei* eklenen portakal suyunun 28 günlük bir depolama süresince bazı kalite değerlerini araştırmışlardır. Çalışmada mikroorganizmanın meyve suyuna farklı formülasyonlarda ilave edildiğini ifade etmişlerdir. Portakal suyuna direkt eklenen *Lactobacillus casei*’nin depolama süresi sonuna kadar toplam fenolik madde içeriğinde 493.9 ± 78.8 mgGAE/L’den 516.2 ± 18.6 mgGAE/L’e kadar bir değişim olduğunu belirtmişlerdir. Aynı zamanda Miranda *et al.* (2019), fenolik bileşiklerin bozunmanın oksijen varlığı, yüksek sıcaklıklar, ışığa maruz kalma, düşük pH gibi çeşitli faktörler nedeniyle meydana gelebildiğini de belirtmişlerdir.

Fenolik bileşikler aynı zamanda antioksidan bileşikler olduğundan dolayı TFM miktarındaki azalma antioksidan bileşiklerde azalma ile doğru orantılıdır. Ama antioksidan aktivite IC₅₀ olarak belirlendiğinden ve bu değerin yükselmesi daha düşük antioksidan aktivite göstergesi olduğundan dolayı TFM miktarı hem ABTS⁺⁺ ile antioksidan aktivite (-0.777*) hem de DPPH* ile antioksidan aktivite (-0.0778*) arasında negatif bir korelasyon bulunmuştur (Tablo 29).

Antioksidan aktivite değişimi

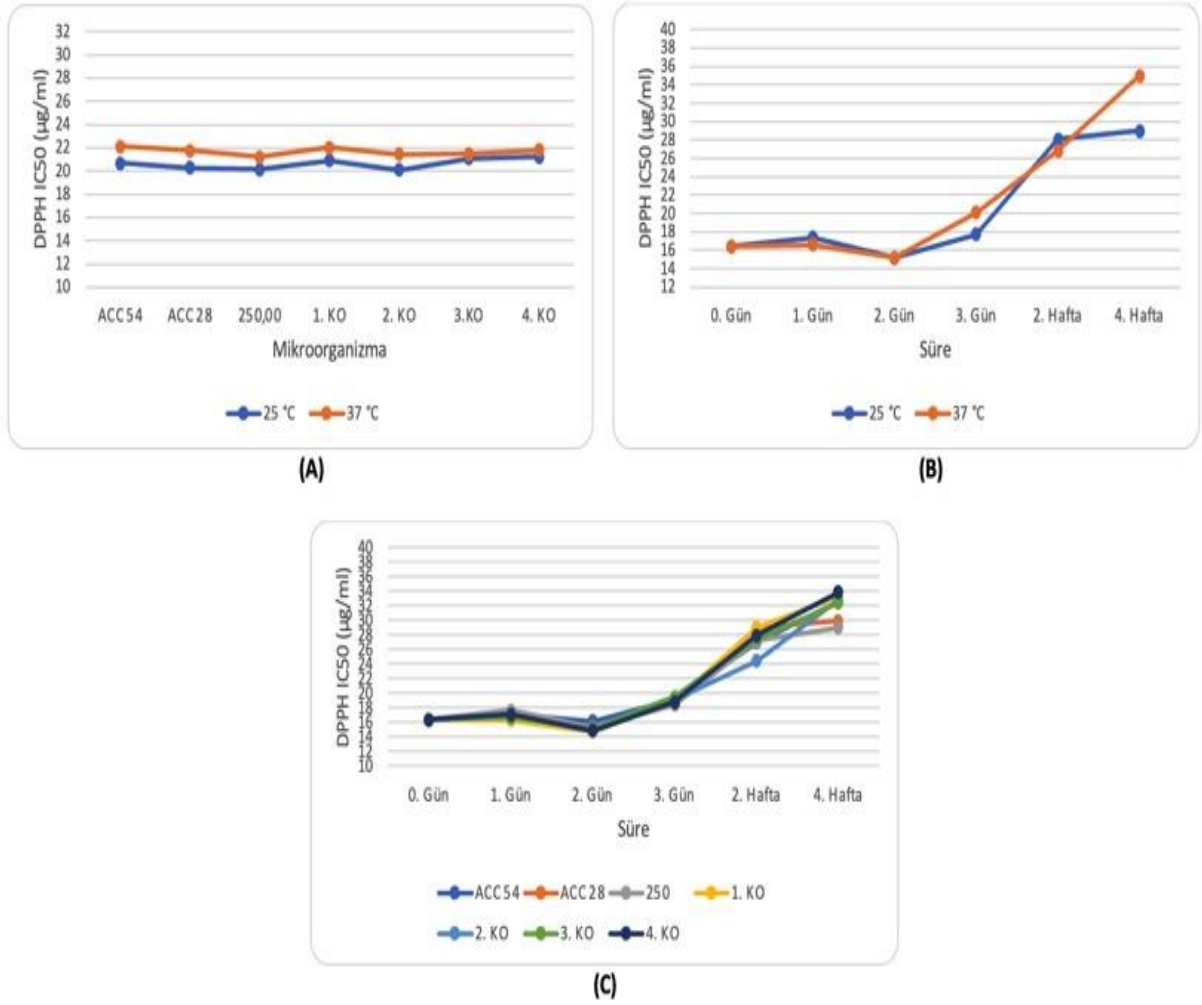
Antioksidanlar; serbest radikal oluşumunu sağlayan oksijen ve katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etkiye sahiptirler. Bunun yanı sıra radikallere karşı temizleyici (scavenging), bastırıcı (quencher) ve zincir kırıcı (chain breaking) etkiler de göstermektedirler (Mao *et al.* 2006). Antioksidanların etkinliğini belirlemek için çeşitli analitik yöntemler ve farklı substratlar kullanılmaktadır. Çalışmamızda probiyotik greyfurt sularında DPPH* ve ABTS⁺⁺ ile antioksidan aktivite belirlenmiştir. Bu yöntemler meyve suyu örneklerinde antioksidan aktivitenin belirlenmesinde genel olarak kullanılan yöntemlerdir (Cemeroğlu, 2013).

DPPH* metodu

Probiyotik bakterilerin inoküle edildiği greyfurt sularının depolama süresi boyunca belli aralıklarda steril şartlarda alınarak DPPH* antioksidan aktivite IC₅₀ değerleri Tablo 26’da verilmiştir.

Yaptığımız çalışmada greyfurt suyu örneklerinde depolama süresinin sonuna kadar antioksidandaki en fazla değişim 37 °C’de depolanan 2. KO’da belirlenmiş olup IC50 değeri 16.41’den 37.02’e kadar yükselmiştir. En az değişim ise 25 °C’de depolanan *L.plantarum* 250 suşunun bulunduğu örnekte tespit edilmiş olup, bu değer 16.41’den 25.83’e kadar olduğu belirlenmiştir (Tablo 26). Yapılan varyans analizi sonucu sıcaklık, mikroorganizma suşu ve süre parametrelerinin hepsinin depolama süresince greyfurt suyu örneklerinin DPPH• ile belirlenen antioksidan aktivitesi üzerine çok önemli ($p<0.01$) bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Parametreler arasındaki interaksiyonlara bakıldığında sıcaklık x mikroorganizma suşları, sıcaklık x süre ve mikroorganizma suşu x süre interaksiyonlarının hepsinin depolama süresince DPPH• ile belirlenen antioksidan aktivite üzerine çok önemli ($p<0.01$) bir etki gösterdiği bulunmuştur (Tablo 27).

Şekil 67 (A)’da greyfurt suyu örneklerinde DPPH• ile belirlenen antioksidan aktiviteler her iki sıcaklık derecesinde de yakın değerlerde bulunmuştur. Şekil 67 (B)’de yine her iki sıcaklık derecesinde depolama süresince belirlenen DPPH• ile antioksidan aktivite ilk iki gün yüksek bulunmuşken daha sonra azalma meydana gelmiştir. 2. ve 4. hafta arasında 37 °C’deki greyfurt suyunun DPPH• ile antioksidan aktivitesi 25 °C’deki örneklere göre daha yüksek bir azalma göstermiştir. Şekil 67 (C)’de bütün greyfurt suyu örneklerinin DPPH• antioksidan aktivitesinin 2. günden itibaren depolamanın son haftasına kadar azaldığı gösterilmiştir.



Şekil 67. Probiyotik mikroorganizmaların farklı kombinasyonları ile inkübe edilen greyfurt sularının depolama süresince antioksidan aktivitedeki (DPPH•) sıcaklık x mikoorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B), mikoorganizma suş x süre (C) etkileşimleri

Yapılan literatür taraması sonucunda depolanmış probiyotik greyfurt suyunda antioksidan madde miktarı için yapılan bir çalışmaya rastlanmıştır. Tran *et al.* (2020) probiyotik greyfurt sularında FRAP yöntemi ile antioksidan kapasite ölçmüşlerdir. Yaptıkları çalışmada greyfurt suyunun özellikle *L. rhamnosus* B01725 suşu tarafından fermentasyonun diğer tüm örneklerdeki antioksidan kapasitesine göre önemli düşüş gösterdiğini ve burada en düşük antioksidan kapasitesinin 7.72 mM olarak ölçüldüğü bildirmişlerdir. Probiyotik bakterilerle fermente edilmiş greyfurt suyundaki antioksidan aktivite, 4 °C'de depolama sırasında önemli ölçüde azaldığını da belirtmişlerdir. Bujna *et al.* (2018) yaptıkları çalışmada kayısı suyunun probiyotik *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşlarının mono ve karışık kültürleri ile laktik asit fermentasyonu sırasında antioksidan kapasitesini belirlemişlerdir. FRAP yöntemi ile belirlenen antioksidan kapasitesinin fermentasyon sırasında biraz arttığını bildirmişlerdir. Bu durumun anaerobik şartlarda 37°C'de gerçekleştirilen fermentasyon sırasında probiyotiklerin glutatyon,

bütirat, folat vb. gibi antioksidan aktiviteye sahip çeşitli metabolitler üretebildiğinden kaynaklı olabildiğini belirtmişlerdir.

Nazzaro *et al.* (2008), *Lactobacillus* spp, inulin ve fruktooligosakkaritler ile takviye edilmiş havuç suyunun sinbiyotik potansiyelini belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda 4 °C'de 4 haftalık depolamadan sonra meyve suyundaki iki *lactobacill*'in canlı hücre sayıları belirlenmiş ve yalnızca bu iki suşun düşük pH'da hayatta kalabildiğini bildirmişlerdir. Fermente meyve suyunun β -karoten içeriği ve antioksidan aktivite gibi bazı biyokimyasal özelliklerinin de korunduğu, bunun da *Lactobacillus* spp. tarafından 4 °C'de 4 haftalık depolamadan sonra bile takviye besin bileşenlerinin bozulmadığını belirtmişlerdir.

Wang *et al.* (2009), Laktik asit bakterileri ve bifidobakterilerle fermente edilmiş noni suyunun probiyotik potansiyelini incelemişlerdir. Çalışma da *Lactobacillus casei*'nin, 4 haftalık depolama sürecinin 3. haftasından sonra hiçbir hücre canlılığı sergilemediğini, ayrıca, *Bifidobacteri longum* ile fermente edilen noni suyunun, laktik asit bakterilerinden önemli ölçüde farklı olmayan yüksek bir antioksidan kapasiteye sahip olduğunu belirtmişlerdir.

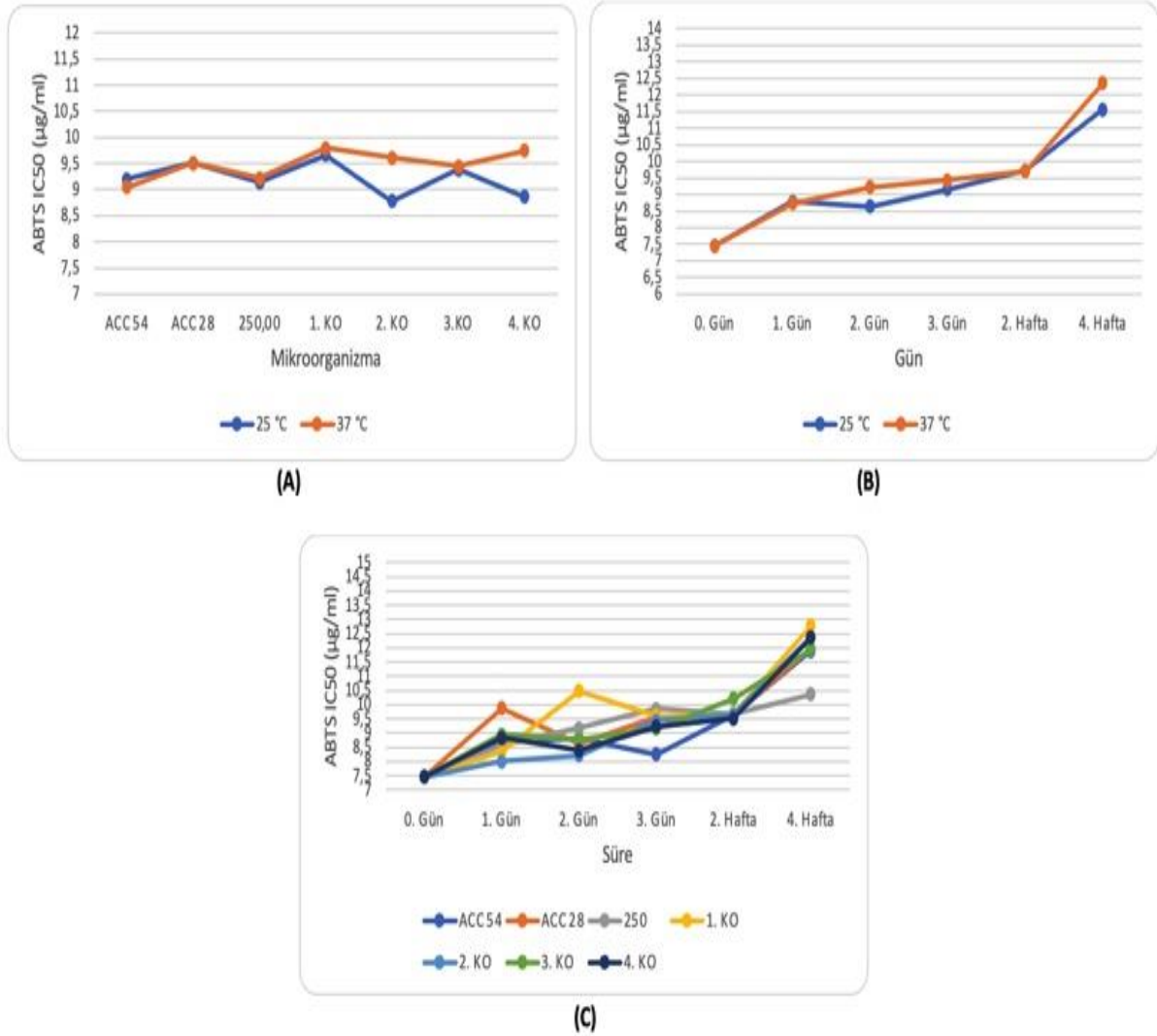
ABTS^{•+} metodu

Greyfurt sularındaki depolama süresi boyunca belli aralıklarda meyve suyu örnekleri steril şartlarda alınarak ABTS^{•+} ile antioksidan aktivite IC50 değerleri belirlenmiştir (Tablo 26).

Örneklerden depolama süresi boyunca en fazla değişim 37°C'de 1.KO'da belirlenmiş olup ABTS^{•+} radikali gidermede IC50 değeri 7.45'ten 13.42'ye çıkmıştır. En az değişim ise 25 °C'de depolanan *L.plantarum* 250 suşunun bulunduğu örnekte meydana gelmiş olup, bu değer 7.45'ten 10.31'e yükselmiştir (Tablo 26). Yapılan istatistiki analiz sonucunda sıcaklık, mikoorganizma suşu ve süre parametrelerinin hepsinin depolama sürecindeki ABTS^{•+} ile belirlenen antioksidan aktivitedeki değişim üzerine çok önemli ($p<0.01$) etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Aynı şekilde ikili interaksiyonlar incelediğinde sıcaklık x mikoorganizma suşu, sıcaklık x süre ve mikoorganizma suşu x süre interaksiyonlarının hepsinin ABTS^{•+} ile belirlenen antioksidan miktarındaki değişim üzerine çok etkili ($p<0.01$) olduğu bulunmuştur (Tablo 27). ABTS^{•+} ile antioksidan aktivite için belirlenen sonuçlar DPPH[•] ile belirlenen antioksidan kapasitesindeki değişim ile paralellik göstermektedir. Tablo 29'da da belirtildiği üzere ABTS^{•+} ile DPPH[•] pozitif korelasyon (0.771**) göstermiştir.

Şekil 68 (A)'da her iki sıcaklık derecesinde mikoorganizma suşları içeren greyfurt sularındaki ABTS^{•+} ile belirlenen antioksidan aktivite sonuçları 2.KO ve 4.KO hariç olmak üzere diğer tüm örneklerde benzerlik göstermektedir. Şekil 68 (B)'de her iki sıcaklık derecesinde belirlenen ABTS^{•+} antioksidan aktivite depolama süresinde azalmıştır. Şekil 68

(C)'de *L. plantarum* ACC28, 1.KO ve 2.KO hariç olmak üzere diğer tüm örneklerde depolama süresinde ABTS⁺⁺ ile belirlenen antioksidan aktivitede bir azalma meydana geldiği gösterilmiştir. Diğer taraftan *L. plantarum* ACC28, 1-2 gün arasında 1.KO ve 2.KO'da ise, 2-3. gün arsında antioksidan aktivitesinde bir artış belirtilmiştir.



Şekil 68. Probiyotik mikroorganizmaların farklı kombinasyonları ile inkübe edilen greyfurt sularının depolama süresince antioksidan aktivite deki (ABTS⁺⁺) sıcaklık x mikroorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B), mikroorganizma suş x süre (C) interaksiyonları

Yapılan literatür taraması sonucunda probiyotik greyfurt suyunun ABTS⁺⁺ ile belirlenen antioksidan aktivitesi ile bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bunun yanı sıra probiyotik meyve suyunun antioksidan kapasitesi ile yapılan sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır (Nazzaro *et al.* 2008; Wang *et al.* 2009).

Yapılan literatür taraması sonucu probiyotik meyve sularının antioksidan kapasitesinin belirlenmesi ile ilgili yapılan çalışmalarda probiyotik meyve sularının antioksidan kapasitesinde azalma, değişmeme ve artma gibi farklı sonuçlara rastlanmıştır. Bu durumun en başta fermentasyon süresi, daha sonra meyve suyunun yapısı, özellikleri ve kullanılan

mikroorganizmalarla ilgili (Multari *et al.* 2020) olduğu düşünülmektedir. Ayrıca iki farklı depolama sıcaklıklarındaki antioksidan değişiminde, kullanılan probiyotik mikroorganizmaların depolama süresi sonuna kadar varlıklarını sürdürebilme ile ilişkili olabileceği tahmin edilmektedir.

LC-MS/MS ile belirlenen fenolik bileşen profili

Probiyotik bakteri ilave edilen greyfurt sularından depolama süresince belli aralıklarla steril şartlarda alınan örneklerin LC-MS/MS cihazı ile fenolik bileşen profilleri kantitatif olarak belirlenmiştir. Meyve sularında 31 adet fenolik bileşiğin varlığı araştırılmıştır. Bu bileşikler aşağıda verilmiştir;

- **Fenolik asitlerden;** 4-OH-Benzoic Acid, Vanillik Asit, Ellagik Asit, Gallik Asit, Ferulik Asit, Rosmarinik Asit, Klorogenik Asit, Sinapik Asit, p-Kumarik Asit, Fumarik Asit, Caffeic Acid, Kuinic Asit
- **Fitoaleksin:** Resveratrol
- **Flavanoidlerden;**
 - **Flavonlar:** Apigenin, Luteolin
 - **Flavonoller:** Kuersetin, Mirisetin, Izorhamnetin
 - **Antosiyanidinler:** Peonidin-3-O-glikozit, Siyanidin-3-O-glikozit, Kerasiyanin Klorit
 - **Flavanonlar:** Hesperidin, Taxifolin
 - **Flavanoller:** Kateşin, Epikateşin, Epigallokateşin Gallate, Krisin, Vitexin, Vanillin, Galangin, Kurkumin

Ancak bu bileşiklerin hepsi greyfurt suyu örneklerinde belirlenememiş olup, belirlenen bileşikler Tablo 30'da verilmiştir.

Tablo 30. Probiyotik Bakteri İlave Edilmiş Greyfurt Sularında Depolama Süresinde LC-MS/MS ile Belirlenen Fenolik Bileşen Profili (ppb)

Sıcaklık	Mikoorganizma Kombinasyonları	Süre	Kuinitik Asit	Fumarik Asit	Kerasyanın Klorit	Siyanidin-3-O-glucosid	Klorogenik Asit	Hesperidin	Sinapik Asit	Ferulik Asit	Rosmarinik Asit	Vanillin	Resveratrol
25 °C	<i>L.plantarum</i> ACC 54	0. Gün	10424,24	803,17	32,08	70,79	326,41	1294,73	15,24	167,45	18,04	69,24	4,54
		1. Gün	9256,19	613,30	30,79	92,65	257,48	1326,76	0,00	0,00	18,69	69,74	5,34
		2. Gün	7324,00	634,27	30,71	77,43	211,66	1167,10	0,00	5,56	17,55	69,40	8,01
		3. Gün	2043,49	644,44	32,48	78,64	254,76	1354,01	0,00	10,21	17,37	67,73	5,26
		2. Hafta	1944,95	278,18	30,84	72,66	193,51	1090,40	2,98	232,37	17,52	70,77	8,52
		4. Hafta	1776,44	107,76	28,57	84,17	289,55	1237,08	7,68	271,39	19,24	110,79	2,29
	<i>L.plantarum</i> ACC 28	0. Gün	10424,24	803,17	32,08	70,79	326,41	1294,73	15,24	167,45	18,04	69,24	4,54
		1. Gün	9239,94	388,98	30,54	79,74	278,76	1256,52	0,00	46,26	17,63	73,52	2,11
		2. Gün	9067,80	571,90	30,56	85,87	227,43	1155,04	0,00	145,21	18,74	81,86	2,46
		3. Gün	9190,69	573,10	61,65	75,49	333,56	1280,25	0,00	233,05	17,61	70,51	3,11
		2. Hafta	9521,84	545,53	28,53	73,38	200,10	1191,70	0,08	379,06	20,15	70,34	8,02
		4. Hafta	39810,62	398,73	30,81	83,36	233,52	1258,11	27,72	424,66	17,38	72,78	5,90
	<i>L.plantarum</i> 250	0. Gün	10424,24	803,17	32,08	70,79	326,41	1294,73	15,24	167,45	18,04	69,24	4,54
		1. Gün	8928,72	598,89	63,74	80,45	277,23	1333,90	0,00	3,59	17,49	79,84	1,88
		2. Gün	8391,98	584,24	29,90	81,40	263,88	1185,85	0,00	60,47	17,42	63,71	1,71
		3. Gün	7773,53	323,50	76,65	73,87	262,44	1367,23	0,00	44,57	18,40	82,60	7,18
		2. Hafta	8468,71	602,07	30,69	92,55	282,23	1007,90	0,00	183,45	18,55	98,82	2,52
		4. Hafta	6519,17	242,62	30,41	70,69	269,43	1156,46	28,60	307,72	17,25	99,47	4,44
	<i>L.plantarum</i> ACC 54+ <i>L.plantarum</i> ACC 28	0. Gün	10424,24	803,17	32,08	70,79	326,41	1294,73	15,24	167,45	18,04	69,24	4,54
		1. Gün	9011,07	662,22	29,74	82,19	269,36	1276,27	0,00	33,44	18,55	72,60	7,92
		2. Gün	8070,91	555,72	71,64	81,52	308,60	1318,11	0,00	53,53	18,30	73,31	7,61
		3. Gün	6250,56	433,08	76,45	76,71	288,77	1322,93	0,00	55,65	18,43	73,42	3,37
		2. Hafta	6172,11	469,79	52,64	77,42	259,37	1177,66	0,00	388,93	17,54	90,70	5,09
		4. Hafta	6803,19	496,36	29,60	72,72	244,52	1270,44	8,66	392,59	18,21	101,41	4,39

Tablo 30. (devam)

37 °C	<i>L.plantarum</i> ACC 54+ <i>L.plantarum</i> 250	0. Gün	10424,24	803,17	32,08	70,79	326,41	1294,73	15,24	167,45	18,04	69,24	4,54	0,00
		1. Gün	8903,36	617,78	52,60	85,70	271,65	1245,73	0,00	0,00	17,55	70,08	9,37	123,78
		2. Gün	7565,65	213,24	30,49	86,52	292,29	1367,81	0,00	4,75	17,63	68,65	7,47	203,69
		3. Gün	4543,57	568,97	31,50	68,65	303,86	1260,92	0,58	70,41	17,71	70,06	4,80	210,13
		2. Hafta	5015,29	122,31	56,47	73,69	261,76	1071,44	8,61	192,46	17,50	87,34	7,67	257,71
		4. Hafta	1465,53	134,46	30,51	77,71	259,74	1274,04	4,33	226,46	17,18	114,78	3,50	426,10
	<i>L.plantarum</i> ACC 28+ <i>L.plantarum</i> 250	0. Gün	10424,24	803,17	32,08	70,79	326,41	1294,73	15,24	167,45	18,04	69,24	4,54	0,00
		1. Gün	8510,32	465,40	61,38	84,29	271,31	1268,04	0,00	29,23	17,44	69,76	6,81	143,80
		2. Gün	8253,52	195,41	29,65	83,80	283,88	1334,02	0,00	104,84	17,42	67,75	2,34	156,43
		3. Gün	8276,27	479,17	32,86	74,37	311,46	1340,41	0,00	129,56	18,35	69,62	4,53	207,58
		2. Hafta	7551,86	186,03	30,32	64,67	318,52	1255,85	0,52	275,81	19,44	103,55	9,74	238,09
		4. Hafta	12244,66	120,55	28,19	81,65	223,75	1165,21	20,90	444,90	17,16	86,92	2,71	287,99
	<i>L.plantarum</i> ACC 54+ <i>L.plantarum</i> ACC 28+ <i>L.plantarum</i> 250	0. Gün	10424,24	803,17	32,08	70,79	326,41	1294,73	15,24	167,45	18,04	69,24	4,54	0,00
		1. Gün	8268,91	464,96	71,80	77,55	266,31	1176,48	0,00	8,71	17,39	75,22	12,06	148,60
		2. Gün	7741,52	543,77	30,82	76,18	301,72	1342,51	0,00	51,64	19,79	72,87	2,79	192,90
		3. Gün	6221,86	472,83	56,63	91,68	252,77	1086,60	0,00	33,40	19,38	62,48	7,96	234,78
		2. Hafta	5337,18	488,82	32,43	84,40	271,42	1206,58	2,84	329,81	18,21	81,44	3,05	229,52
		4. Hafta	6321,91	326,71	72,43	73,36	208,76	1155,49	9,68	294,52	19,17	93,68	3,28	229,49
	<i>L.plantarum</i> ACC 54	0. Gün	10424,24	803,17	32,08	70,79	326,41	1294,73	15,24	167,45	18,04	69,24	4,54	0,00
		1. Gün	9372,03	585,48	28,84	93,43	243,49	1235,59	6,78	102,69	17,73	73,74	7,05	153,80
		2. Gün	8406,04	742,47	28,75	79,53	215,61	1027,76	5,87	336,63	17,65	71,86	9,11	278,81
		3. Gün	8541,05	691,64	69,55	78,19	230,36	1093,45	0,00	333,87	17,78	69,42	10,44	275,25
		2. Hafta	23218,59	644,89	30,39	71,64	251,26	1253,45	9,87	198,67	15,72	66,61	3,73	486,53
		4. Hafta	24563,21	128,81	31,66	67,93	226,73	1159,41	23,91	602,58	18,25	111,52	8,55	318,80
	<i>L.plantarum</i> ACC 28	0. Gün	10424,24	803,17	32,08	70,79	326,41	1294,73	15,24	167,45	18,04	69,24	4,54	0,00
		1. Gün	8916,40	653,36	30,41	88,37	271,67	1230,25	0,00	75,63	23,85	66,73	2,53	18,77
		2. Gün	8365,35	521,71	31,64	76,85	247,66	1067,20	0,65	149,58	17,83	78,71	4,53	51,70
		3. Gün	8472,41	625,10	70,42	79,90	232,34	1108,52	1,29	174,77	17,54	80,61	1,69	31,64
		2. Hafta	16661,58	508,23	31,38	83,77	277,82	1282,40	13,53	407,86	21,31	102,81	4,84	128,77
		4. Hafta	22473,02	181,80	31,16	71,54	290,42	979,41	19,83	625,23	17,30	108,77	5,13	347,10
	<i>L.plantarum</i> 250	0. Gün	10424,24	803,17	32,08	70,79	326,41	1294,73	15,24	167,45	18,04	69,24	4,54	0,00
		1. Gün	9144,69	734,75	36,66	83,75	227,57	1180,90	0,00	196,07	17,41	76,65	8,46	78,52
		2. Gün	8371,22	633,09	30,63	87,16	229,51	1106,20	0,00	292,37	22,73	80,41	3,74	156,55
		3. Gün	8229,57	640,27	29,06	67,56	214,13	1156,95	15,57	506,60	17,53	75,82	4,55	200,65
		2. Hafta	11891,17	624,51	30,72	69,54	247,75	1133,24	26,59	487,70	18,06	99,80	5,18	257,68
		4. Hafta	19182,45	136,69	30,08	74,64	233,33	1081,22	17,55	757,12	18,11	117,41	1,89	318,90

Tablo 30. (devam)

	0. Gün	10424,24	803,17	32,08	70,79	326,41	1294,73	15,24	167,45	18,04	69,24	4,54	0,00
	1. Gün	8824,03	642,02	32,91	87,87	264,76	1230,60	2,67	73,57	18,62	73,71	4,47	118,69
<i>L.plantarum</i> ACC 54+	2. Gün	7684,14	621,92	29,66	84,58	227,79	1049,06	0,00	192,30	18,36	66,43	5,54	151,77
<i>L.plantarum</i> ACC 28	3. Gün	7660,79	605,96	34,77	78,53	226,68	1062,33	1,63	187,52	17,50	70,54	8,73	174,52
	2. Hafta	15956,62	493,27	29,60	74,76	234,24	1141,08	15,45	416,44	18,46	90,41	3,86	248,21
	4. Hafta	22286,50	244,31	28,18	53,81	203,33	1235,63	3,97	545,71	19,09	109,62	3,76	285,71
	0. Gün	10424,24	803,17	32,08	70,79	326,41	1294,73	15,24	167,45	18,04	69,24	4,54	0,00
	1. Gün	8624,41	480,84	57,50	84,55	240,69	1132,88	0,00	110,76	19,58	68,57	4,00	136,51
<i>L.plantarum</i> ACC 54+	2. Gün	7570,59	528,42	29,86	88,61	251,90	1027,56	0,00	351,43	18,28	69,72	13,56	285,74
<i>L.plantarum</i> 250	3. Gün	7561,36	556,14	43,74	52,48	210,34	1033,94	5,48	358,16	18,03	70,46	9,69	228,92
	2. Hafta	10713,18	763,56	28,55	87,23	200,12	1028,74	12,79	329,69	18,43	68,59	5,58	382,24
	4. Hafta	15730,62	208,66	28,65	51,52	86,40	1184,37	21,51	753,21	17,12	88,73	1,71	444,66
	0. Gün	10424,24	803,17	32,08	70,79	326,41	1294,73	15,24	167,45	18,04	69,24	4,54	0,00
	1. Gün	8461,12	571,84	58,71	87,76	250,62	1163,75	0,00	66,28	17,52	72,41	3,21	53,90
<i>L.plantarum</i> ACC 28+	2. Gün	8278,29	571,48	29,58	79,33	241,69	1028,66	6,68	106,15	17,41	72,45	3,79	73,59
<i>L.plantarum</i> 250	3. Gün	8264,79	550,02	65,90	77,32	239,65	1157,97	6,00	199,43	17,64	75,66	6,92	46,57
	2. Hafta	15512,23	467,44	33,35	75,39	188,26	1194,14	7,68	459,09	17,20	122,57	2,61	269,47
	4. Hafta	35768,88	156,67	29,35	59,55	233,39	252,41	6,93	380,80	17,41	103,25	5,06	418,33
	0. Gün	10424,24	803,17	32,08	70,79	326,41	1294,73	15,24	167,45	18,04	69,24	4,54	0,00
	1. Gün	7958,70	411,34	32,68	82,71	236,65	1185,87	0,00	124,78	17,52	68,66	2,73	127,72
<i>L.plantarum</i> ACC 54+	2. Gün	7746,62	505,92	30,66	85,40	220,43	1074,68	0,00	197,40	17,53	73,80	12,25	182,90
<i>L.plantarum</i> ACC 28+	3. Gün	7513,34	533,10	32,32	77,23	248,60	1029,68	0,00	215,80	17,51	69,46	8,25	158,19
<i>L.plantarum</i> 250	2. Hafta	15378,86	418,76	31,63	62,89	214,35	1150,32	0,00	455,45	17,09	107,70	1,91	273,07
	4. Hafta	20441,37	376,53	29,56	68,68	164,29	1245,04	3,83	550,56	18,49	108,45	2,00	240,25

M.O : Mikroorganizma

Yapılan varyans analizi sonucu probiyotik mikroorganizmaların ilave edildiği greyfurt suyu örneklerinde belirlenen kuinik asit, fumarik asit, kerasiyanin klorit, siyanidin-3-O-glikozit, klorojenik asit, hesperidin, sinapik asit, ferulik asit, rosmarinik asit, vanilin ve resveratrol bileşiklerinin sıcaklık, mikroorganizma suşu ve süre parametrelerinden çok önemli düzeyde ($p<0.01$) etkilendiği tespit edilmiştir. Bunlar arasında sadece fumarik asit sıcaklık parametresinden anlamlı ($p<0.05$) düzeyde etkilenmiştir. Aynı zamanda bu parametrelerin ikili interaksiyonları incelendiğinde, sıcaklık x mikroorganizma suş, sıcaklık x süre, mikroorganizma suşu x süre interaksiyonlarının da belirlenen bütün fenolik bileşikler üzerine çok anlamlı ($p<0.01$) bir etki gösterdiği bulunmuştur. Yalnızca sıcaklık x süre interaksiyonunun fumarik asit üzerine anlamlı bir etki ($p<0.05$) gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 31).

Tablo 31. Probiyotik Bakteri Eklenmiş Greyfurt Sularında Depolama Süresince LC-MS/MS ile Belirlenen Fenolik Bileşen Profili Varyans Analizi

Varyans Kaynakları	Sıcaklık (A)		Mikoorganizma Kombinasyon (B)		Süre (C)		AXB		AXC		BXC		
SD	1		6		5		6		5		30		84
Özellikler	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	Hata
Kuinik Asit	624532629,934	44578,832**	74026868,626	5284,001**	334759348,932	23894,958**	60351657,456	4307,872**	209981432,579	14988,371**	38535038,231	2750,612**	14009,623
Fumarik Asit	76795,797	5,410*	76544,170	5,392**	992345,564	69,903**	67935,079	4,786**	44309,074	3,121*	50228,298	3,538**	14195,958
Kerasiyanin Klorit	1116,056	8139,144**	113,825	830,104**	1721,360	12553,486**	670,764	4891,731**	68,331	498,320**	300,332	2190,251**	,137
Siyanidin-3-O-glukozit	253,112	289,112**	38,167	43,596**	985,079	1125,186**	18,068	20,637**	261,836	299,077**	95,041	108,559**	,875
Klorogenik Asit	45440,719	2156,944**	2360,650	112,053**	30601,478	1452,567**	2518,136	119,529**	3399,428	161,361**	2054,312	97,512**	21,067
Hesperidin	499486,119	1049,849**	14362,169	30,187**	111147,463	233,616**	32186,132	67,651**	80209,696	168,589**	35864,270	75,382**	475,769
Sinapik Asit	272,019	1965,031**	88,741	641,054**	1289,458	9314,874**	46,242	334,045**	115,195	832,153**	43,235	312,321**	,138
Ferulik Asit	815854,312	700116,650**	11651,613	9998,707**	618901,750	531103,916**	53071,776	45542,977**	60368,716	51804,768**	7094,856	6088,375**	1,165
Rosmarinik Asit	601027,173	4904590,283**	598880,765	4887074,849**	600376,056	4899276,944**	598937,139	4887534,878**	599052,696	4888477,863**	599161,759	4889367,856**	,123
Vanillin	497,375	279,756**	195,449	109,933**	4952,518	2785,614**	238,599	134,203**	137,528	77,355**	203,384	114,396**	1,778
Resveratrol	,813	18,528**	21,375	487,154**	22,142	504,620**	4,487	102,261**	30,146	687,037**	11,414	260,126**	,044

SD: Serbestlik derecesi

AxB: Sıcaklık ve mikoorganizma kombinasyon etkileşimi

AXC: Sıcaklık ve süre etkileşimi

BxC: Mikoorganizma suş ve süre etkileşimi

Tablo 32. Probiyotik Bakteri Eklenmiş Greyfurt Sularında Depolama Süresince LC-MS/MS ile Belirlenen Fenolik Bileşik Profili ANOVA ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi

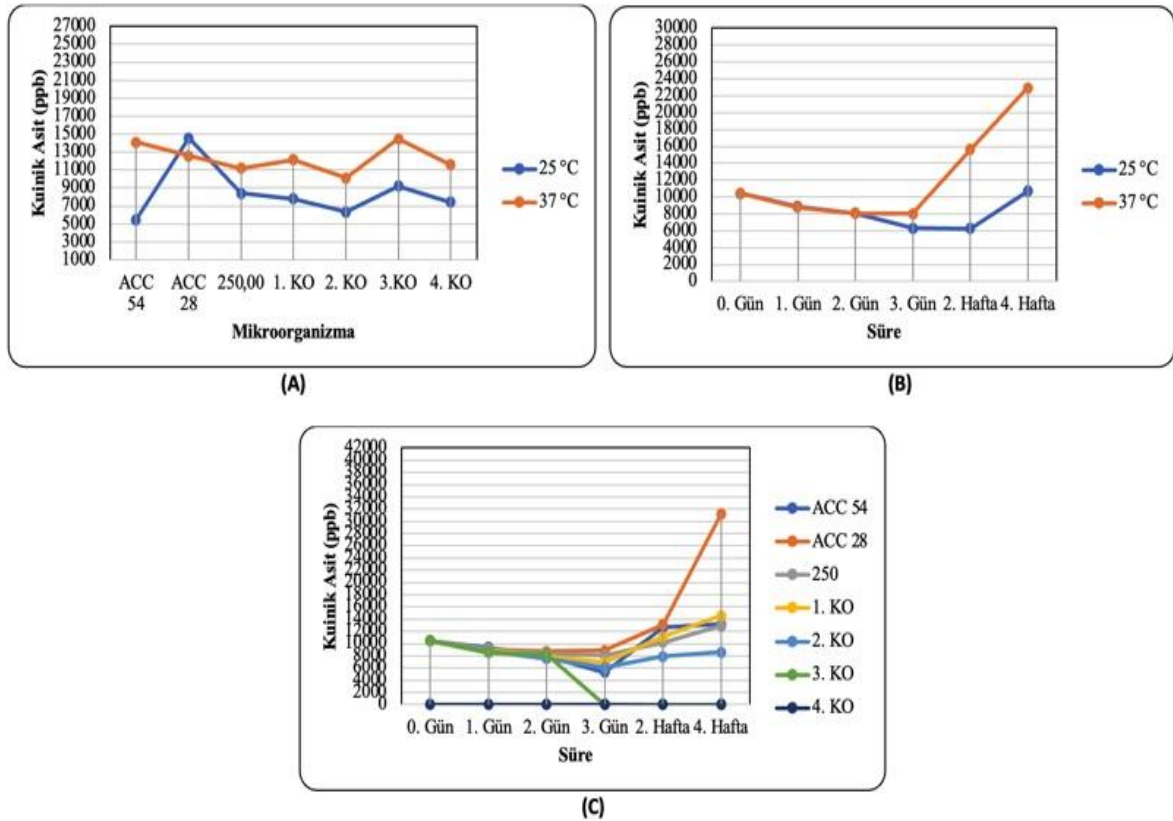
Özellikler	Quinik Asit	Fumarik Asit	Kerasiyanin Klorit	Siyanidin-3-O-glucosiz	Klorogenik Asit	Hesperidin	Sinapik Asit	Ferulik Asit	Rosmarinik Asit	Vanillin	Resveratrol
25°C	8446,59±5537,94 ^b	483,03±238,94 ^b	40,47±16,01 ^a	77,92±6,79 ^a	278,34±38,30 ^a	1246,38±87,15 ^a	5,47±8,11 ^b	158,10±131,50 ^b	18,09±0,77 ^b	77,91±13,16 ^b	5,17±2,46 ^b
37°C	12302,74±6157,44 ^a	525,79±250,81 ^a	35,31±11,23 ^b	75,46±10,01 ^b	245,45±48,30 ^b	1137,33±169,01 ^b	8,02±7,92 ^a	297,48±186,07 ^a	137,71±769,54 ^a	81,35±16,78 ^a	5,31±2,82 ^a
ACC 54	9774,54±7194,02 ^d	573,13±266,89 ^a	33,89±11,06 ^f	78,15±8,20 ^a	252,27±41,91 ^d	1211,20±102,25 ^{ab}	7,30±7,48 ^c	202,40±169,44 ^s	436,13±1416,66 ^a	76,67±15,88 ^e	6,45±2,46 ^a
ACC 28	13547,34±9072,17 ^a	547,90±191,00 ^{ab}	36,77±13,53 ^e	78,32±6,02 ^a	278,84±44,53 ^a	1199,91±101,61 ^{bc}	7,80±9,70 ^b	249,68±168,23 ^b	18,78±1,98 ^b	78,76±13,29 ^d	4,12±1,80 ^e
250	9812,47±3196,54 ^d	560,58±226,29 ^a	37,72±15,19 ^d	76,93±7,82 ^b	263,36±35,70 ^c	1191,61±108,13 ^{cd}	9,90±10,89 ^a	264,54±217,08 ^a	18,25±1,46 ^c	84,42±15,70 ^a	4,22±2,06 ^e
1.KO	9964,03±4597,19 ^c	430,92±289,10 ^c	39,95±16,84 ^b	75,97±8,63 ^c	265,02±39,79 ^c	1222,80±94,27 ^a	5,24±6,43 ^f	222,88±167,13 ^d	18,26±0,50 ^c	80,05±14,01 ^c	5,32±1,75 ^c
2.KO	8211,84±3534,71 ^f	483,39±263,87 ^{bc}	37,84±11,17 ^d	74,85±12,58 ^d	252,63±64,63 ^d	1184,74±119,95 ^d	6,98±7,40 ^d	227,69±201,60 ^c	17,92±0,70 ^d	76,29±13,83 ^e	6,37±3,23
3.KO	11830,87±7701,98 ^b	447,53±247,40 ^c	38,62±13,95 ^c	75,81±8,20 ^c	267,95±44,69 ^b	1145,83±289,30 ^e	6,10±7,27 ^e	210,92±143,29 ^f	17,76±0,68 ^d	81,87±17,83 ^b	4,73±2,13 ^d
4.KO	9481,56±4255,82 ^e	487,42±207,52 ^{bc}	40,43±16,11 ^a	76,80±8,01 ^b	253,18±47,97 ^d	1186,89±94,96 ^{cd}	3,90±5,89 ^g	216,41±162,88 ^e	18,18±0,88 ^c	79,35±15,21 ^{cd}	5,45±3,68 ^b
0. Gün	10424,24±9,32 ^c	803,17±209,15 ^a	32,08±0,47 ^e	70,79±1,61 ^e	326,41±8,07 ^a	1294,73±37,17 ^a	15,24±0,63 ^a	167,45±1,88 ^d	18,04±0,40 ^c	69,24±2,27 ^d	4,54±0,33 ^e
1. Gün	8815,70±401,53 ^d	549,37±104,06 ^b	44,17±15,43 ^b	85,07±4,53 ^a	259,11±16,16 ^b	1231,68±58,57 ^b	0,68±1,86 ^f	62,21±56,02 ^f	18,35±1,69 ^b	72,23±3,51 ^c	5,57±3,06 ^c
2. Gün	8059,83±463,16 ^e	487,40±196,20 ^b	33,18±10,89 ^d	82,44±4,03 ^b	251,72±32,46 ^c	1160,83±126,50 ^d	0,94±2,23 ^e	146,56±113,04 ^e	18,33±1,41 ^b	72,21±5,16 ^c	6,06±3,67 ^b
3. Gün	7181,66±1866,13 ^f	549,81±96,55 ^b	51,00±18,45 ^a	75,04±8,42 ^d	257,84±37,22 ^b	1189,66±123,83 ^c	1,75±4,17 ^d	182,36±140,17 ^c	17,91±0,58 ^c	72,03±5,13 ^c	6,18±2,61 ^a
2. Hafta	10953,16±5712,02 ^b	403,04±259,12 ^c	34,11±8,63 ^c	76,00±8,25 ^c	242,91±38,49 ^d	1156,06±82,59 ^d	7,21±7,76 ^c	338,34±103,93 ^b	376,80±1315,86 ^a	90,10±16,64 ^b	5,16±2,42 ^d
4. Hafta	16813,40±11639,66 ^a	233,67±135,73 ^d	32,80±11,25 ^f	70,81±9,92 ^e	233,37±58,74 ^e	1118,17±257,11 ^e	14,65±8,94 ^b	469,82±169,76 ^a	17,95±0,83 ^c	101,97±12,33 ^a	3,90±1,85 ^f

1. KO: birinci kombinasyon 2. KO: ikinci kombinasyon 3. KO: üçüncü kombinasyon 4. KO: dördüncü kombinasyon

*Her sütun için istatistiki analiz kendi içerisinde yapılmış ve aynı harfle gösterilen ortalamalar önem seviyesi aynı olarak kabul edilmiştir

Probiyotik bakterilerin tekli ve çoklu kombinasyonlarının eklendiği greyfurt sularında kuinik asit en yüksek miktarda belirlenmiştir. Greyfurt suyu örneklerinde en düşük kuinik asit miktarı 1465,53 ppb olup, 25 °C’de bu değer 2. KO’da tespit edilmiştir. Greyfurt suyu örneklerindeki en yüksek kuinik asit miktarı ise *L.plantarum* ACC 28’ de bulunmuş olup, 25 °C’de bu değer 39810,62 ppb olarak belirlenmiştir (Tablo 30). Yapılan varyans analizi sonucu; mikroorganizma suşu, sıcaklık ve süre parametrelerinin kuinik asit üzerine $p<0.01$ düzeyinde çok önemli etki ($p<0.01$) gösterdiği, aynı zamanda bu parametreler arasındaki interaksiyonların da çok anlamlı ($p<0.01$) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 31).

Depolama süresince, greyfurt suyunda mikroorganizma suş x sıcaklık interaksiyonunun bulunan kuinik asit miktarları üzerine değişimi Şekil 69 (A)’da verilmiştir. Greyfurt suyu örneklerinin kuinik asit miktarında 37 °C’de 3. güne kadar çok az bir azalma meydana gelirken 3. günden 4. haftaya kadar bir artış meydana gelmiştir. Aynı şekilde 25 °C’de 2. haftaya kadar bir düşüş belirlenmiş, 2. haftadan 4. haftaya kadar bir artış tespit edilmiştir (Şekil 69 (B)). Şekil 69 (C)’de 3. KO’nun ilave edildiği greyfurt suyunda 3. günün sonunda kuinik asit miktarının en düşük değere ulaştığı görülmektedir. *L. plantarum* ACC28’in ilave edildiği greyfurt suyunda ise 3. günden itibaren kuinik asit miktarında artış belirlenmiş 4. haftanın sonunda en yüksek miktarına ulaşmıştır.



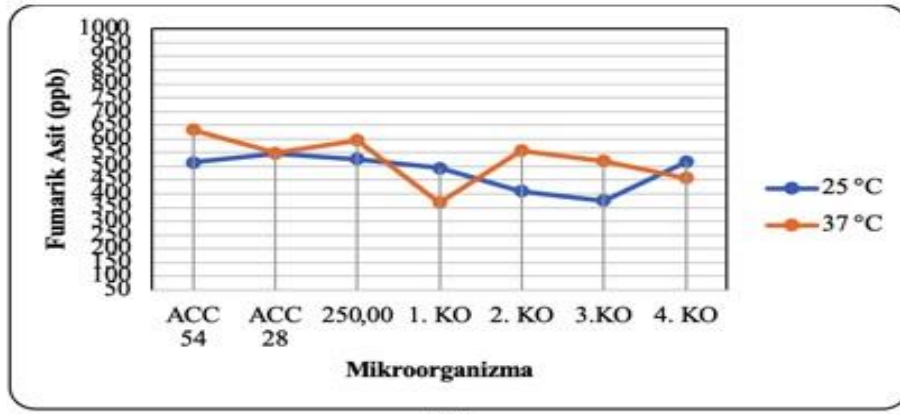
Şekil 69. Probiyotik mikroorganizmalar ve bunların kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerinde depolama süresince kuinik asit miktarındaki sıcaklık x mikroorganizma suşu (A), sıcaklık x süre (B) ve mikroorganizma suşu x süre (C) interaksiyonları

Yapılan literatür taraması sonucu probiyotik bakteri ilave edilmiş greyfurt sularında fenolik bileşen profili belirleme ve bununla birlikte greyfurt suyunda kuinik asit ile ilgili bir araştırmaya rastlanmamıştır.

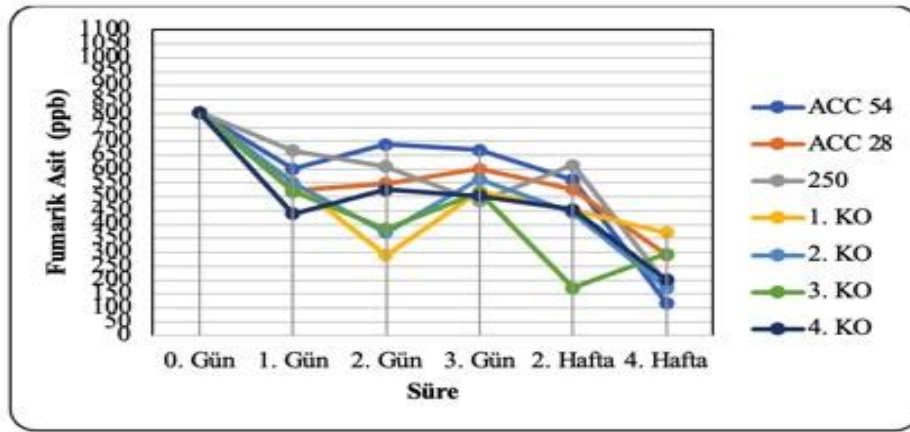
dos Santos Filho *et al.* (2019), çalışmalarında probiyotik kakao suyunun üretiminde fenolik bileşen profili belirlemiş ve kakao suyunun fermantasyonu süresince kuinik asit miktarının $1,64 \pm 0,03$ 'ten $1,43 \pm 0,01$ g/L'ye düştüğünü bildirmişlerdir. Aynı zamanda kuinik asitin, *Lactobacillus* suşları tarafından kullanılabilen bir fenolik bileşik olduğunu belirtmişlerdir. Fritsch *et al.* (2016), ayrıca laktik asit bakterileri ile fermente edilmiş ayçiçeği substratlarında kuinik asitte bir azalma olduğunu bildirmişlerdir. Pereira *et al.* (2017), probiyotik cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) içeceğinin 18 saatlik fermantasyonu sonunda kuinik asitte %58,73'lük bir azalma olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda kuinik asitte *Lactobacillus* suşları tarafından kullanılabildiğinden kaynaklı bir azalma olduğu düşünülmektedir.

Probiyotik greyfurt suyu örneklerinde fumarik asit miktarında en fazla azalma 25 °C'lik sıcaklıkta ve 4 haftalık depolamanın sonunda *L. plantarum* ACC54 içeren örnekte (803.17 ppb'den 107,76 ppb'ye) belirlenmiştir. En az değişim ise sıcaklığın 37 °C olduğu 4. KO'nun ilave edildiği greyfurt sularının 4 haftalık depolanması sonucu (803.17 ppb'den 376.53 ppb'ye) bulunmuştur (Tablo 30). Yapılan istatistiki analiz sonucu fumarik asit üzerine sıcaklık parametresinin etkisi önemli ($p < 0.05$) olarak bulunmuştur. Süre ve mikroorganizma suş parametreleri ise $p < 0.01$ düzeyinde çok önemli olarak belirlenmiştir. İnteraksiyonlara bakıldığında sıcaklık x süre interaksiyonunun fumarik asit üzerinde anlamlı ($p < 0.05$), diğer interaksiyonların ise çok önemli ($p < 0.01$) düzeyde etkili olduğu bulunmuştur (Tablo 31).

Şekil 70 (A)'da 37 °C'de depolanan greyfurt suyu örneklerinde en düşük fumarik asit miktarı 1. KO'da, 25 °C depolama sıcaklığında ise en düşük fumarik asit miktarı 3.KO'da bulunmuştur. Şekil 70 (B)'de greyfurt sularının fumarik asit miktarında depolamanın sonuna doğru genel bir azalma meydana gelmiştir.



(A)

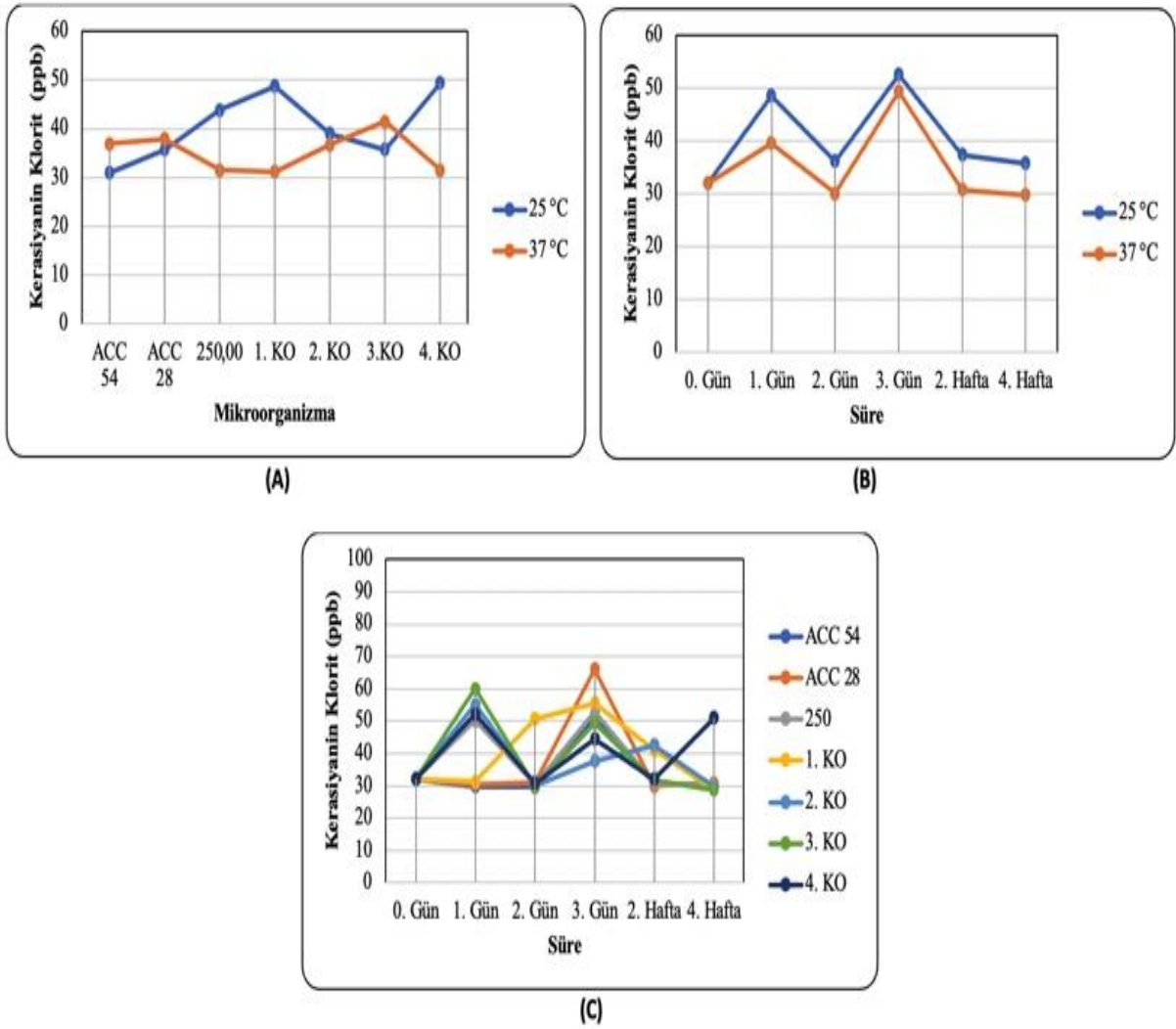


(B)

Şekil 70. Probiyotik mikroorganizmalar ve bunların kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerindeki depolama süresince fumarik asit miktarına etki eden sıcaklık x mikroorganizma suş (A) ve mikroorganizma suş x süre (B) interaksiyonları

Yapılan literatür araştırması sonucunda probiyotik greyfurt suyunda fumarik asit içeriği üzerine çalışılmış herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Li *et al.* (2021) probiyotik hünnap suyunda fenolik bileşik profili belirlemişlerdir. Çalışma sonunda probiyotik hünnap suyunda eser miktarda fumarik asit olduğunu bildirmişlerdir.

Probiyotik ilave edilen greyfurt sularındaki kerasiyanin klorit miktarının 25°C'lik depolama sıcaklığında *L. plantarum* ACC54'te 37 °C'lik depolama sıcaklığında ise *L. plantarum* 250 ve 1. KO'da çok az bir değişime uğradığı tespit edilmiştir (Tablo 30). Yapılan istatistiki analiz sonucunda sıcaklık süre ve mikroorganizma suş parametrelerinin, aynı zamanda bu parametreler arasındaki tüm interaksiyonların greyfurt suyu örneklerindeki kerasiyanin klorit miktarı üzerine $p < 0.01$ düzeyinde önemli bir etkiye sahip olduğu Tablo 31'te belirtilmiştir. Şekil 71 (A)'da mikroorganizma suşlarının ilave edildiği greyfurt suyu örneklerindeki kerasiyanin klorit miktarı her iki sıcaklık derecesinde farklılık göstermiştir. Şekil 71 (B)'de greyfurt suyu örneklerindeki kerasiyanin klorit miktarı 1. gün ve 3. gün artış göstermiş diğer zamanlarda düşüş gözlenmiştir.



Şekil 71. Probiyotik mikroorganizmalar ve bunların kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerindeki depolama süresince karasiyanin klorit miktarına etki eden sıcaklık x mikroorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B) ve mikroorganizma suş x süre (C) etkileşimleri

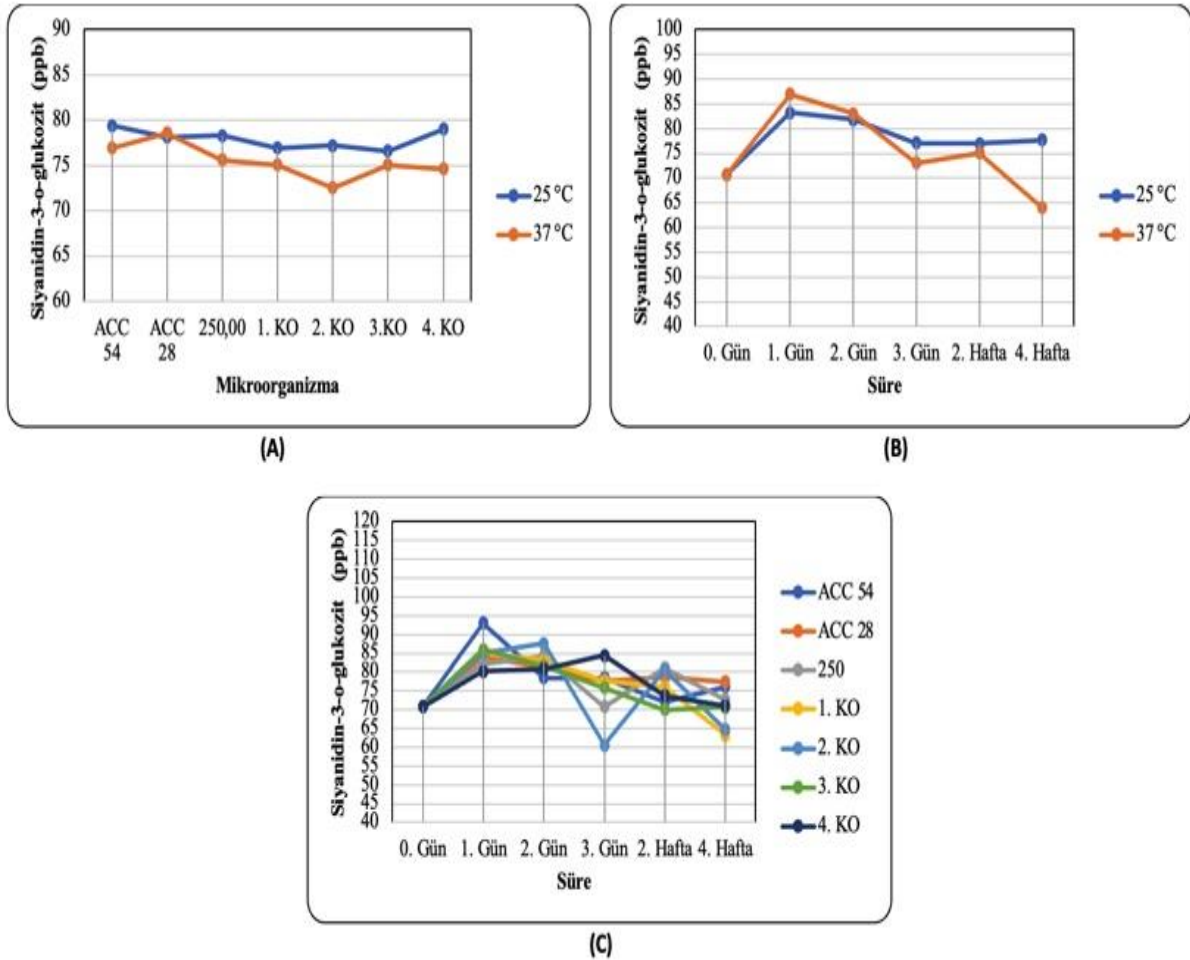
Yapılan literatür araştırmasında probiyotik greyfurt sularında kerasiyanin klorit (Cyanidin-3-O-rutinoside chloride) miktarı ile ilgili yapılmış herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Aynı zamanda probiyotik narenciye suları üzerine yapılan araştırmalarda da kerasiyanin klorit içeriği ile ilgili bir çalışmaya da rastlanmamıştır.

Kerasiyanin kloritin antikanserojenik (Qin *et al.* 2010) özellik gösteren önemli diyet bileşikleri arasında olduğu bildirilmiştir. Kerasiyanin kloritin bir antosiyanidin aglikonu olduğu belirtilmiştir (Talpur *et al.* 2017). Antosiyaninlerin de kalp hastalıklarına karşı koruyucu rol oynadığı (Kähkönen and Heinonen, 2003) belirlenmiştir.

Probiyotik greyfurt sularındaki siyanidin-3-O-glikozit miktarı en düşük 37 °C'lik depolama sıcaklığında 2.haftanın sonunda 4.KO'da belirlenmiş olup, 62.89 ppm olarak tespit edilmiştir. En yüksek miktar ise 93.43 ppb olup, *L. plantarum* ACC54'ün 37 °C'lik depolama sıcaklığında 1. günün sonunda belirlenmiştir (Tablo 30). Yapılan istatistiki analiz sonucunda

tüm parametre ve bu parametrelerin interaksiyonlarının greyfurt suyu örneklerindeki siyanidin-3-O-glikozit miktarı üzerine $p<0.01$ düzeyinde çok önemli etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Tablo 31).

Şekil 72 (A)'da *L. plantarum* ACC28 hariç diğer mikroorganizma ve kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularında her iki depolama sıcaklığında farklı siyanidin-3-O-glikozit miktarı belirlenmiştir. Mikroorganizma ve kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularının siyanidin-3-O-glikozit miktarının depolama süresince değişim miktarları da farklılık göstermiştir (Şekil 72 (C)). Her iki depolama sıcaklığında 1. günün sonuna kadar siyanidin-3-o-glikozit miktarında bir artış belirlenmiş, daha sonra depolama süresinin sonuna kadar bir azalma belirlenmiştir. Fakat 25 °C'lik depolama sıcaklığında siyanidin-3-O-glikozit miktarında çok fazla olmamakla birlikte 2. haftadan sonra bir artış belirtilmiştir (Şekil 72 (B)).

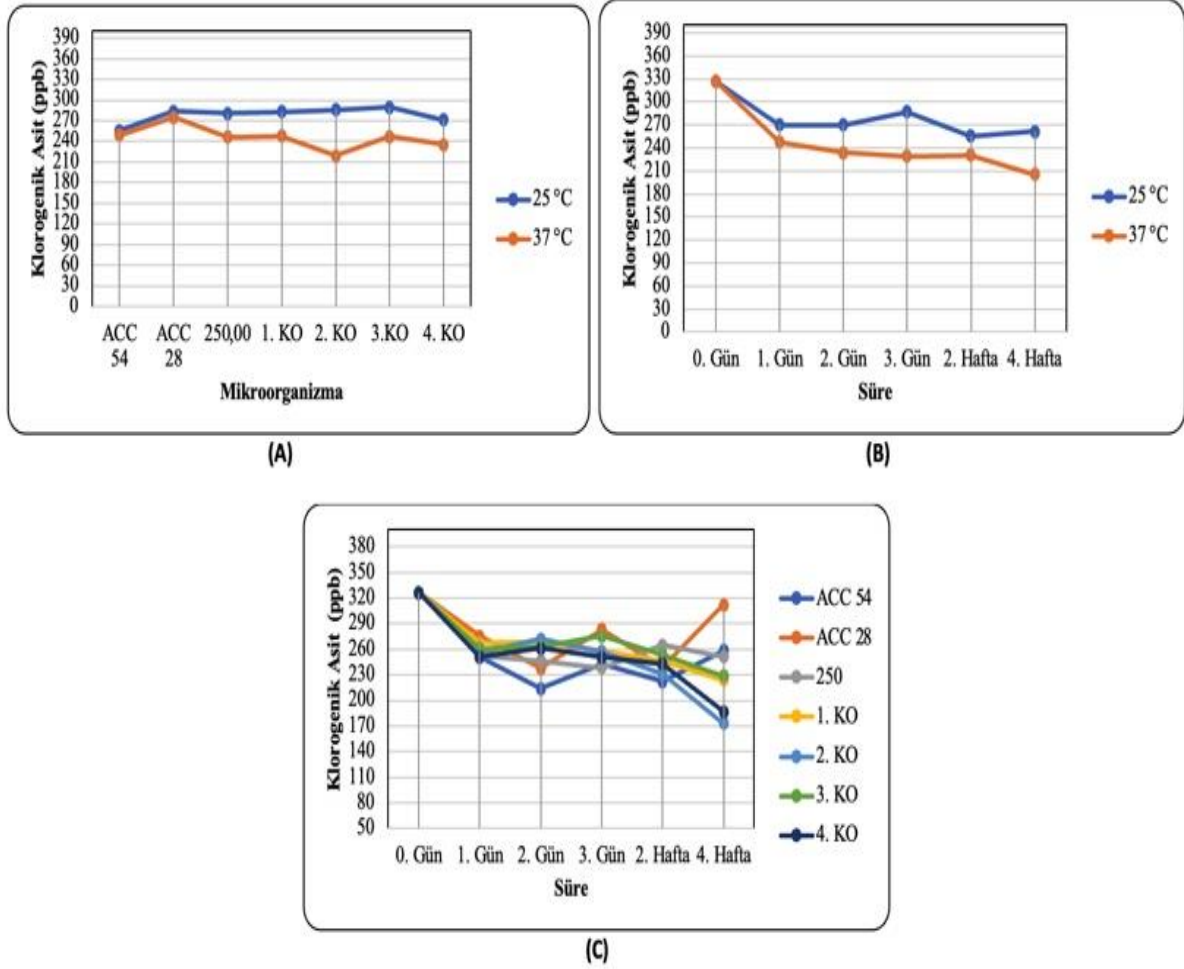


Şekil 72. Probiyotik mikroorganizmalar ve bunların kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık değerlerinde depolama süresince siyanidin-3-O-glikozit miktarına etki eden sıcaklık x mikroorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B) ve mikroorganizma suş x süre (C) interaksiyonları

Yapılan literatür taramasında probiyotik greyfurt sularında siyanidin-3-O-glikozit miktarı ile ilgili yapılmış herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bunun yanı sıra Wang *et al.* (2022), çalışmalarında dut suyunun laktik asit fermentasyonunun meyve suyunun bazı özelliklerine etkisini araştırmışlardır. Araştırmada siyanidin-3-O-glukozit miktarının laktik asit bakteri fermentasyonu ile önemli ölçüde azaldığını belirtmişlerdir. Bununla birlikte yaban mersini ve böğürtlen sularının *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus* ve *Bifidobacterium bifidum* kullanılarak fermentasyonu ile meyve sularının fenolik bileşik metabolizması üzerine Wu *et al.* (2021) yaptıkları çalışmada, fermentasyon sonunda siyanidin-3-O-rutinosit miktarının azaldığını bildirmişlerdir.

Probiyotik greyfurt sularındaki klorojenik asit miktarı en düşük 86.40 ppb olarak belirlenmiş olup, bu değer 37 °C'deki 3. KO'nun ilave edildiği greyfurt suyunun 4 hafta depolaması sonucu tespit edilmiştir. En yüksek miktar ise 326.41 ppb olarak başlangıçtaki greyfurt sularında olduğu bulunmuştur (Tablo 30). Yapılan varyans analizi sonucunda tüm parametre ve parametreler arasındaki interaksiyonların probiyotik greyfurt suyu örneklerindeki klorojenik asit miktarı üzerine çok önemli ($p<0.01$) etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Tablo 31).

37 °C' depolama sıcaklığındaki greyfurt suyu örneklerinde belirlenen klorojenik asit miktarı 25 °C depolama sıcaklığındaki örneklerle göre daha düşük belirlenmiştir (Şekil 73(A)). Şekil 73(B)'de her iki depolama sıcaklığı derecesinde greyfurt suyu örneklerindeki klorojenik asit miktarının genel olarak düştüğü bulunmuştur. Şekil 73 (C)'de *L. plantarum* ACC54 ve *L. plantarum* ACC28 içeren örnekler hariç diğer örneklerin 4 haftalık depolama sonuna kadar bir düşüş gösterdiği tespit edilmiştir.



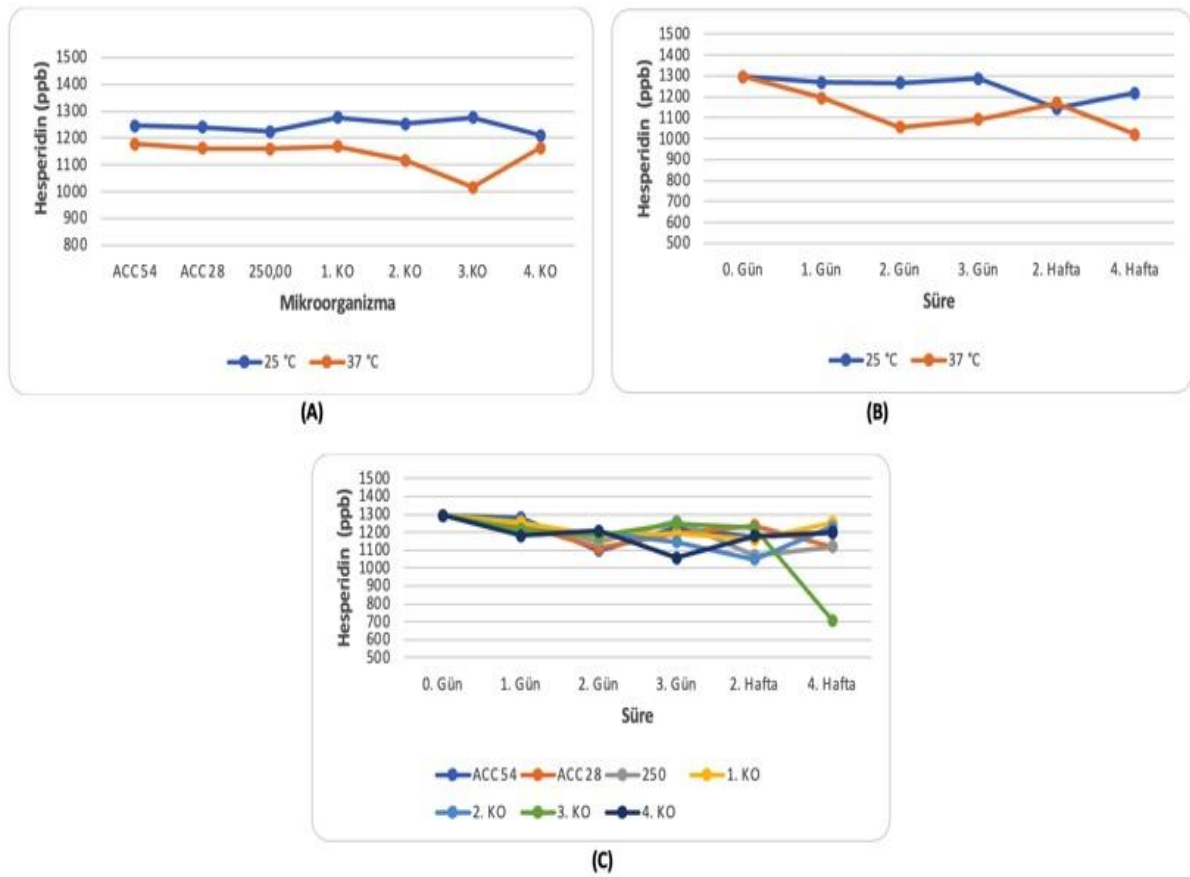
Şekil 73. Probiyotik mikroorganizmalar ve bunların kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık değerlerinde depolama süresince klorojenik asit miktarına etki eden sıcaklık x mikoorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B) ve mikoorganizma suş x süre (C) interaksiyonları

Wu *et al.* (2020), laktik asit fermentasyonuna dayalı biyotransformasyonun elma suyunun fenolik profilleri, antioksidan kapasitesi ve aroma maddeleri üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada, elma suyundaki klorojenik asit miktarının fermentasyonla birlikte azaldığını belirtmişlerdir. Wang *et al.* (2022), iki çeşit probiyotik kivi suyunun fermentasyonu ile biyoaktif fenolik bileşiklerini araştırdıkları çalışmada, örneklerin klorojenik asit miktarının birinci örneğe ilave edilen mikroorganizmalarda 5.99-13.41, 5.99-8.52, 5.99-10.18 mg/L arasında değiştiği, ikinci örnekte ise 2.62-4.55, 2.62-4.96, 2.62-1.67 mg/L arasında değişiklik gösterdiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda depolama süresi sonundan klorojenik asit miktarında azalma belirlenmiş olup, literatür ile paralellik göstermektedir.

Greyfurt sularında en yüksek miktarlarda belirlenen fenolik bileşiklerden, hesperidinin örnekler arasında en düşük miktarı 37 °C’de 4 hafta depolama sonucunda belirlenmiş olup bu miktar 252.41 ppb olarak 3. KO’nun ilave edildiği greyfurt suyunda bulunmuştur. En yüksek miktar ise 1367,81 ppb olarak 25 °C’de 2. KO’nun ilave edildiği greyfurt suyunun 2 gün

depolanması sonucu tespit edilmiştir (Tablo 30). Varyans analizi sonucu her üç parametre ve bunlar arasındaki interaksiyonların greyluft suyu örneklerindeki hesperidin miktarı üzerine $p < 0.01$ düzeyinde çok anlamlı bir etki gösterdiği bulunmuştur (Tablo 31).

Şekil 74 (A)'da 37 °C'de depolanan örneklerin hesperidin miktarının 25 °C'de depolanan örneklerle göre daha düşük miktarda belirlenmiştir. Şekil 74 (B)'de 2 haftalık depolama sonunda 37 °C depolama sıcaklığındaki örneklerin hesperidin miktarı ile 25 °C depolama sıcaklığındaki greyluft suyu örneklerinin hesperidin miktarına yaklaştı, 4. haftaya doğru 37 °C'deki örneklerdeki hesperidin miktarı daha da düşmüştür. Şekil 74 (C)'de 4 haftalık depolama sonucunda en düşük hesperidin miktarı 3. KO'da belirlenmiştir.

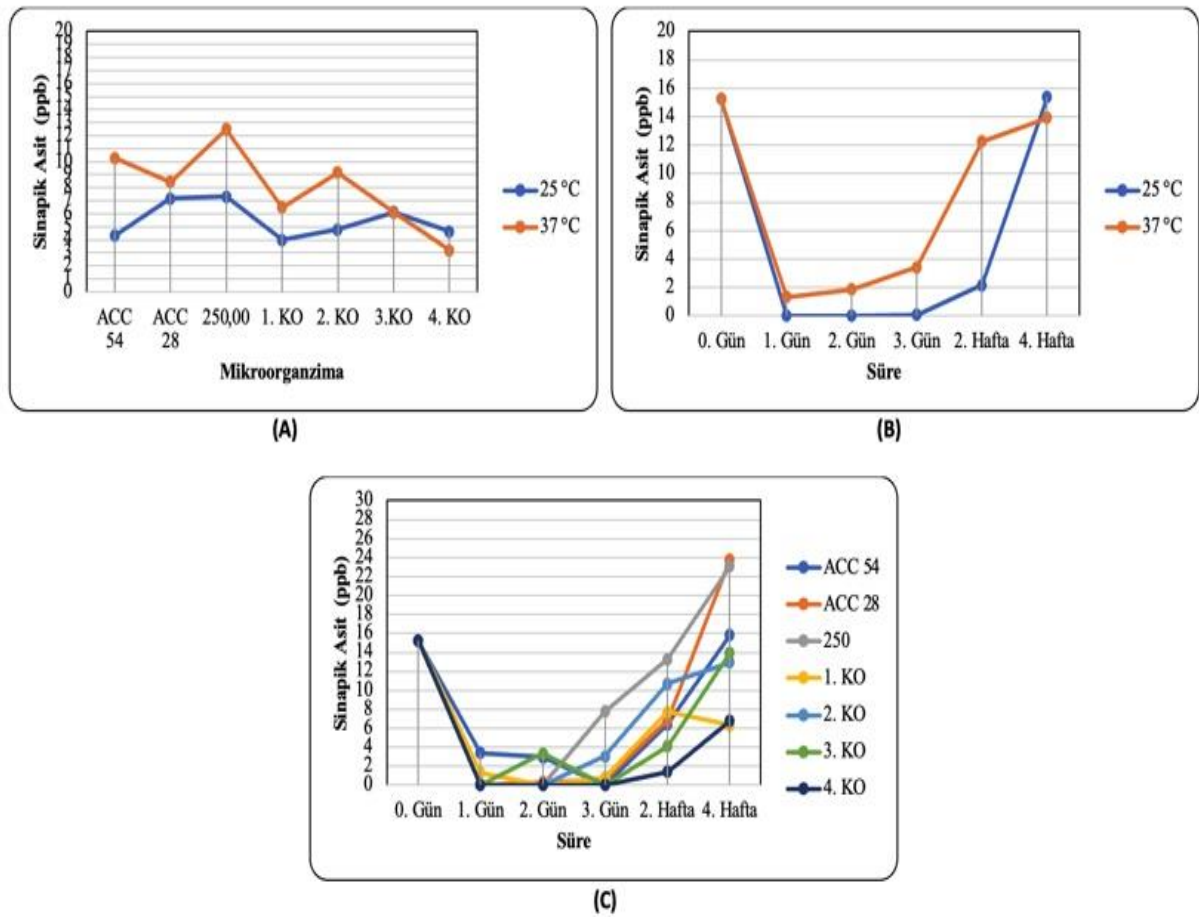


Şekil 74. Probiyotik mikroorganizmalar ve bunların kombinasyonlarının ilave edildiği greyluft sularının farklı sıcaklık değerlerinde depolama süresince hesperidin miktarındaki sıcaklık x mikroorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B) ve mikroorganizma suş x süre (C) interaksiyonları

Hu *et al.* (2022), çalışmalarında narenciye suyu fermentasyonunu araştırmış ve narenciye sularındaki hesperidinini 0.54-4.96 mg/g arasında farklı miktarlarda belirlemişlerdir. Tang *et al.* (2022), karışık kültür probiyotik ilave edilmiş turuncgil sularındaki hesperidin 0. saat ile karşılaştırıldığında, 24 saatte örneklerin hesperidin miktarlarının önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda hesperidin miktarının başlangıç miktarına göre bir azalma gösterdiği belirlenmiştir.

Bazı çalışmalar hesperidini hipotansif (Homayouni *et al.* 2018; Wunpathe *et al.* 2018) hipolipemi (Shen *et al.* 2015), antiinflamatuvar (Homayouni *et al.* 2018) ve antioksidan (Maneesai *et al.* 2018) etkileriyle ilişkilendirmiştir.

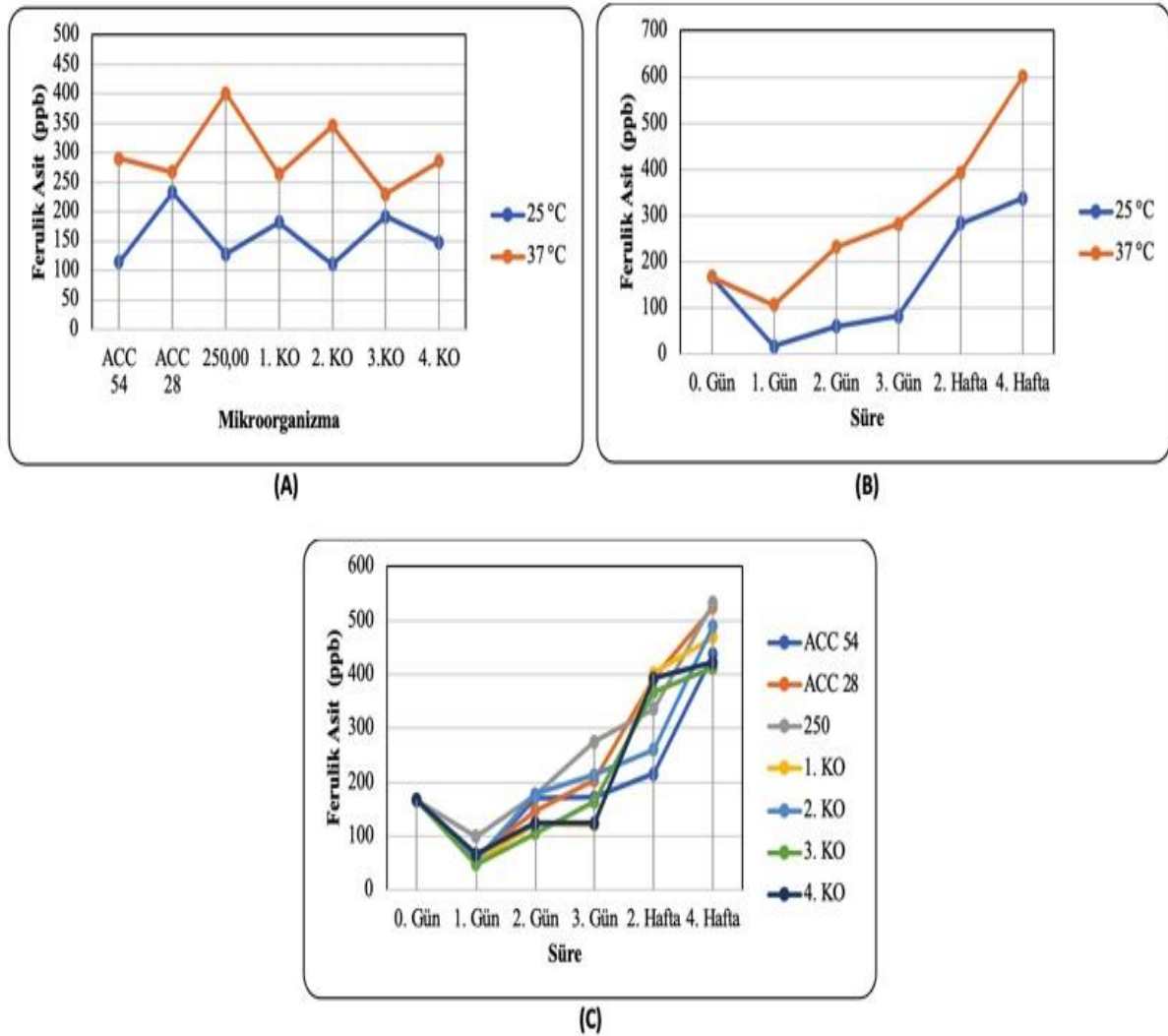
Şekil 75 (A)'da probiyotik greyfurt suları örnekleri arasında en yüksek sinapik asit miktarı 37 °C sıcaklıkta depolanan *L. plantarum* 250 suşunun inoküle edildiği greyfurt suyu örneğinde tespit edilmiştir. Bununla birlikte 4. KO hariç diğer tüm örneklerde 37 °C sıcaklıkta depolama da daha yüksek sinapik asit miktarı belirlenmiştir. Şekil 75 (B)'de greyfurt suyu örneklerinin sinapik asit miktarı mikroorganizmaların 0-1 günlük fermentasyon süresinde düşüş göstermiş daha sonra 25 °C'de depolanan örneklerde 3. günden, 37 °C'lik sıcaklıktaki greyfurt suyu örneklerinde ise 2. günden sonra bir artış belirlenmiştir. Şekil 75 (C)'de greyfurt suyu örnekleri sıcaklık x süre interaksiyonundaki değişime benzer bir değişim göstermiştir.



Şekil 75. Probiyotik mikroorganizmalar ve bunların kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerindeki depolama süresince sinapik asit miktarına etki eden sıcaklık x mikroorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B) ve mikroorganizma suş x süre (C) interaksiyonları

Şekil 76 (A)'da probiyotik greyfurt suyu örneklerinin ferulik asit miktarları 37 °C depolama sıcaklığında daha yüksek belirlenmiştir. Şekil 76 (B)'de her iki depolama sıcaklığında greyfurt sularının ferulik asit miktarında 0-1 gün aralığında azalmış, daha sonra

depolama süresinin sonuna kadar bir artış göstermiştir. Şekil 76 (C)'de tüm greyfurt suyu örneklerinde ferulik asit miktarı her iki depolama sıcaklığında da 0-1 gün aralığında bir azalma gösterirken 1. günden sonra örneklerin ferulik asit miktarında artış meydana gelmiştir.



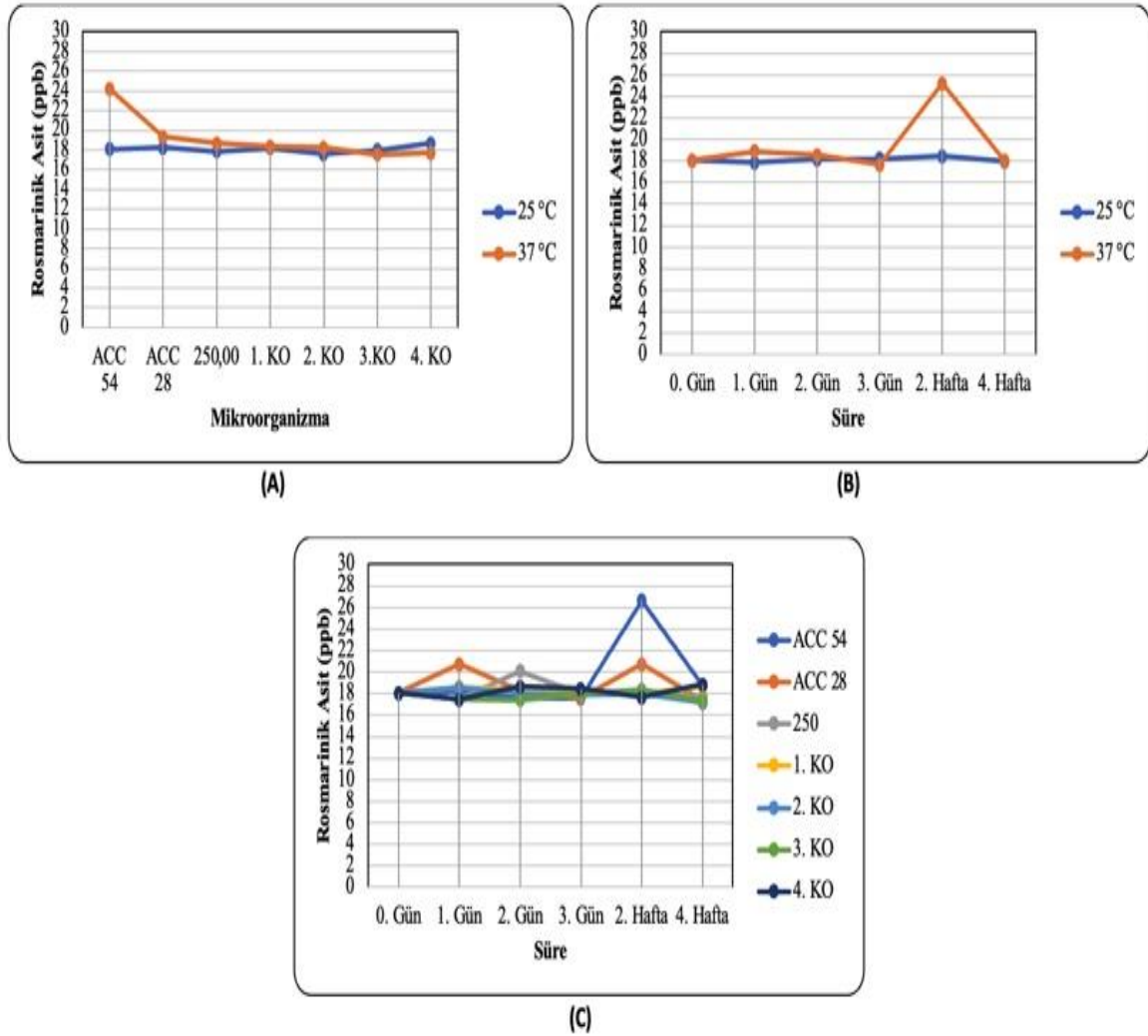
Şekil 76. Probiyotik mikroorganizmalar ve bunların kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık değerlerinde depolama süresince ferulik asit miktarına etki eden sıcaklık x mikroorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B) ve mikroorganizma suş x süre (C) etkileşimleri

Szutowska *et al.* (2021), kıvırcık lahana suyunun kontrollü fermentasyonu üzerine yaptıkları çalışmada ferulik ve sinapik asit miktarlarının düştüğünü bildirmişlerdir. Çalışmada aynı zamanda fenolik bileşiklerin biyodönüşümünün kullanılan suşa bağlı olarak değişiklik gösterebildiği bildirilmiştir. Rodrigue *et al.* (2021), meyve bazlı fonksiyonel içeceklerin geliştirilmesinde laktik asit fermentasyonu üzerine yaptıkları çalışmada ellagin tanenlerinin hidrolizi, antioksidan özelliklere sahip gallik, ferulik, kinik, kafeik ve ellagik asitler gibi daha basit fenolik formlara yol açabildiğini belirtmişlerdir. Bu durumda yaptığımız çalışmada da ferulik asitin başka bileşiklerin hidrolizasyonu ile oluşabildiği düşünülmektedir. Aynı zamanda

Rodríguez *et al.* (2021), antosiyanin ve flavonol profillerinin probiyotik meyve suyundaki suşa göre değişiklik gösterdiğini belirtmişlerdir.

Ferulik asitin, reaktif moleküllerin (hidroksil, süperoksit serbest radikaller, nitrik oksit ve peroksitler gibi) temizlenmesinde ve lipid peroksidasyonunun önlenmesinde önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir (Dulong *et al.* 2018).

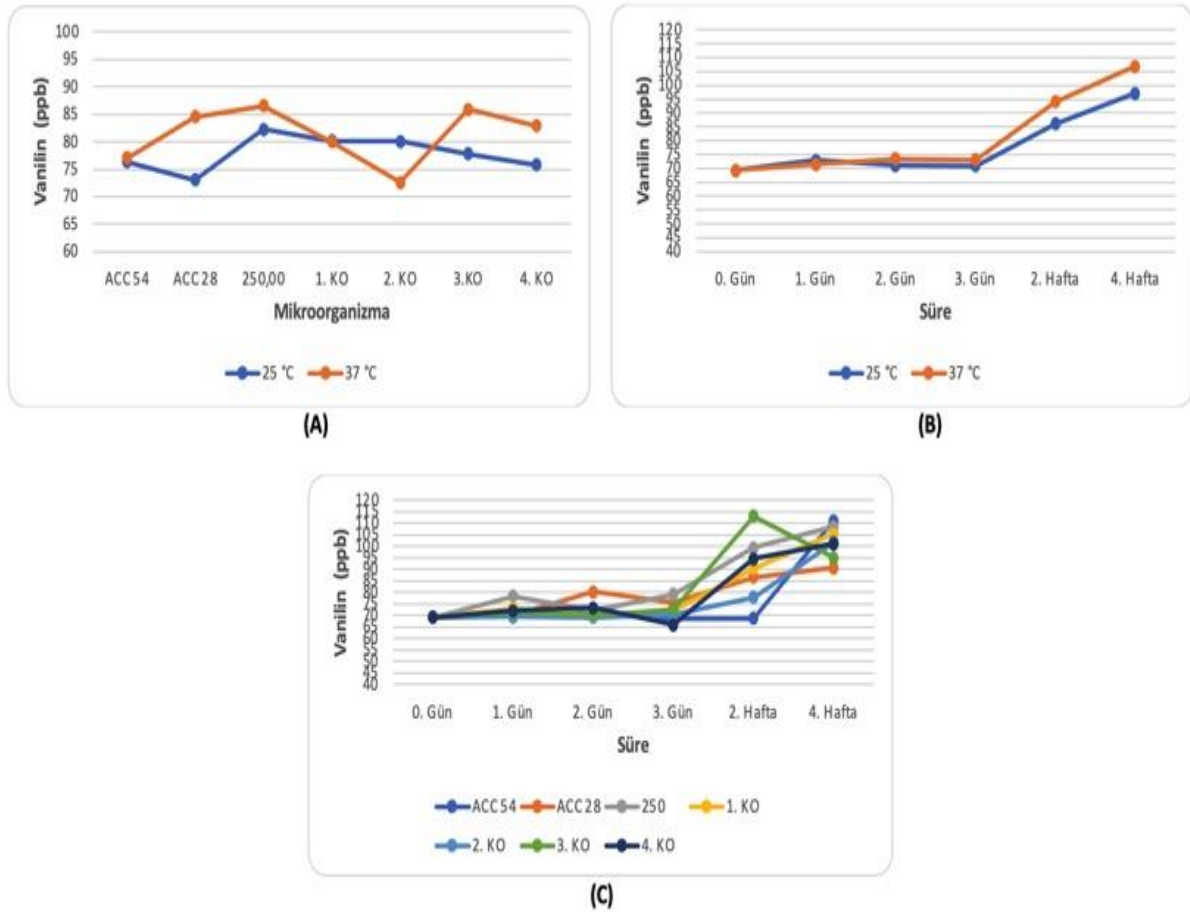
Şekil 77 (A)'da *L. plantarum* ACC54 içeren greyfurt suyunun rosmarinik asit miktarı 37 °C depolama sıcaklığında muhafaza edilen örnekte daha yüksek bulunmuş olup, her iki sıcaklık derecesinde diğer tüm probiyotik greyfurt suyu örneklerinin rosmarinik asit miktarı birbirine yakın olarak belirlenmiştir. Şekil 77 (B)'de 37 °C'deki greyfurt suyu örnekleri depolamanın 2. haftasında bir artış göstermiş, 4. haftasına doğru tekrar azalmıştır. Şekil 77 (C)'de 2.KO içeren greyfurt suyu örneklerinin 2 haftalık depolama sonucunda diğerlerine göre daha yüksek rosmarinik asit miktarı belirlenmiştir.



Şekil 77. Probiyotik mikroorganizmalar ve bunların kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerindeki depolama süresince rosmarinik asit miktarına etki eden sıcaklık x mikroorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B) ve mikroorganizma suş x süre (C) interaksiyonları

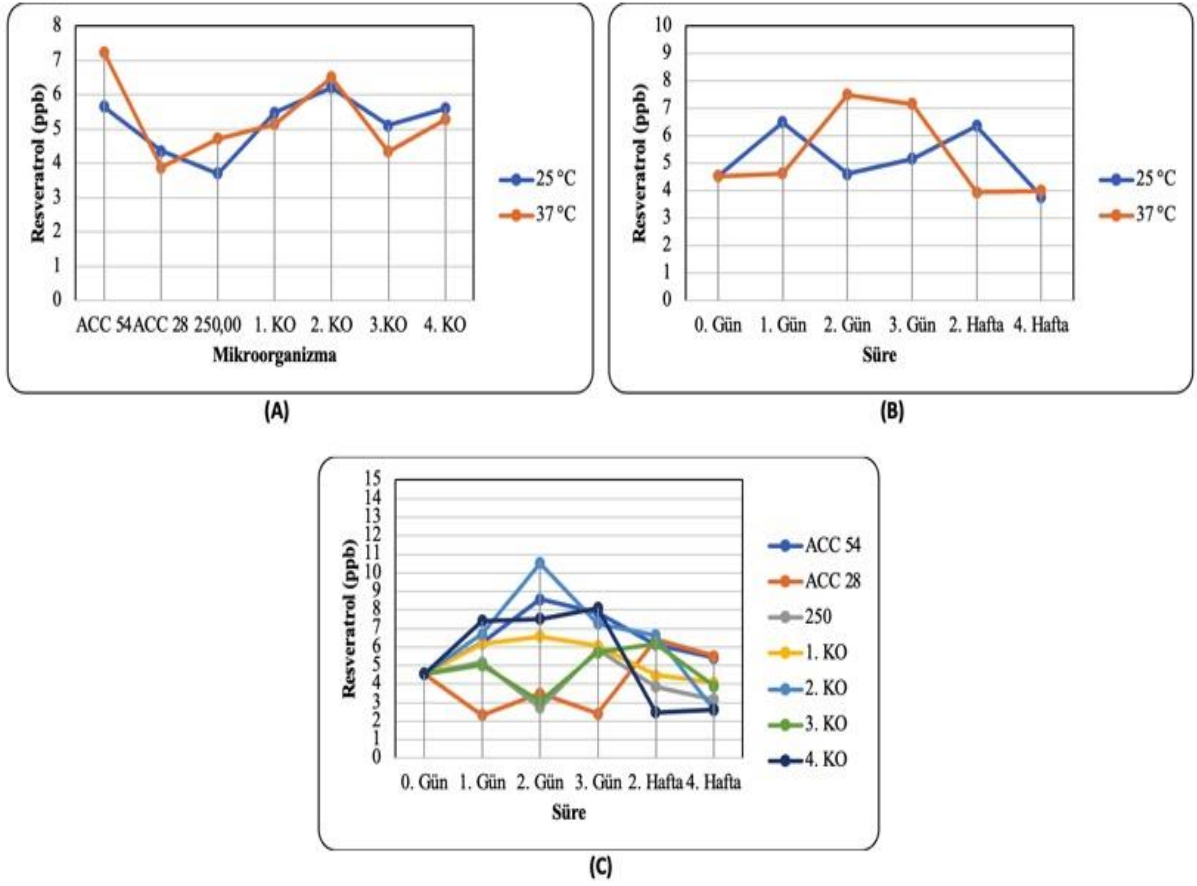
Probiyotik greyfurt sularında en düşük vanilin miktarı 25 °C’lik depolama sıcaklığında *L.plantarum* 250 suşunun ilave edildiği örneğin 2 gün depolanması sonucu 63.71 ppb olarak belirlenmiştir. En yüksek vanilin miktarı ise, 122.57 ppb olarak 37 °C’lik depolama sıcaklığındaki 3.KO’nun eklendiği örneğin 2 hafta depolanması sonucu tespit edilmiştir (Tablo 30). Vanilin miktarındaki değişimler üzerinde tüm parametre ve interaksiyonların çok anlamlı ($p<0.01$) bir etkiye sahip olduğu yapılan istatistiki analiz sonucu bulunmuştur (Tablo 31).

Şekil 78 (B)’de her iki depolama sıcaklığı derecesinde vanilin miktarının süreye göre artış gösterdiği bulunmuştur. Şekil 78 (C) de 3. KO hariç olmak üzere diğer tüm örneklerin vanilin miktarının 3 günlük fermentasyon süresinden sonra bir artış gösterdiği 3. KO’nun ilave edildiği örneklerde 2 haftalık depolamadan sonra vanilin miktarında bir azalma olduğu tespit edilmiştir.

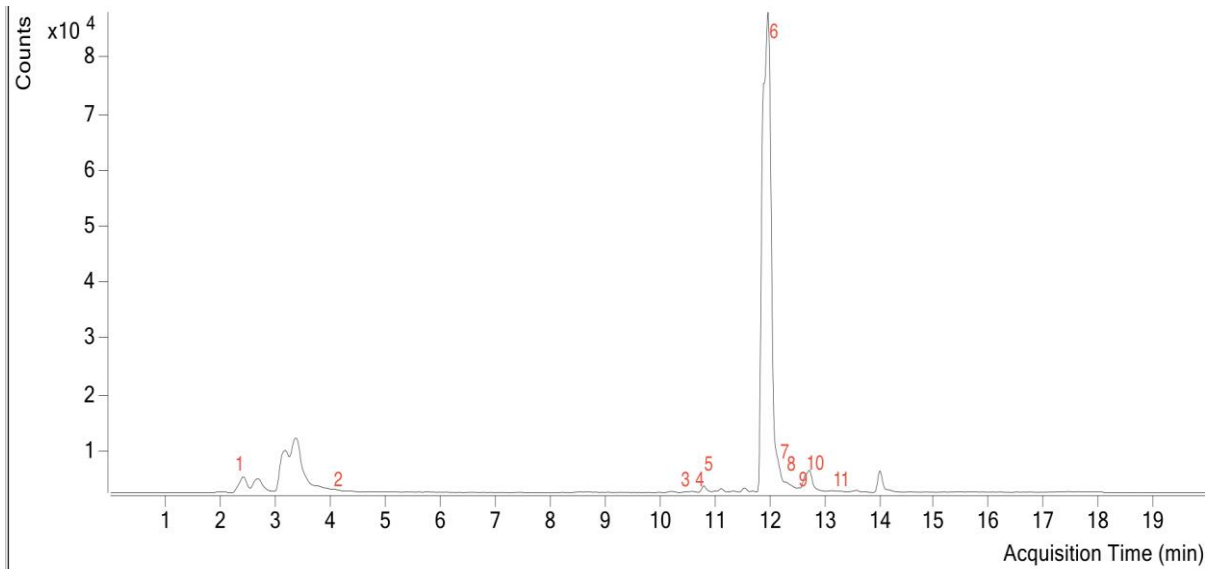


Şekil 78. Probiyotik mikroorganizmalar ve bunların kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerindeki depolama süresince vanilin miktarına etki eden sıcaklık x mikroorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B) ve mikroorganizma suş x süre (C) interaksiyonları

Enzimin doğrudan ilave edildiği greyfurt suyu örneklerinde olduğu gibi, probiyotik mikroorganizma ve kombinasyonlarının ilave edildiği örneklerde de resveratrol miktarları çok düşük tespit edilmiştir. En yüksek resveratrol miktarı 37 °C depolamada 13.56 ppb olarak 2.KO’nun 2.gününün sonunda belirlenmiştir (Tablo 30).



Şekil 79. Probiyotik mikroorganizmalar ve bunların kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerindeki depolama süresince resveratrol miktarına etki eden sıcaklık x mikroorganizma suş (A), sıcaklık x süre (B) ve mikroorganizma suş x süre (C) interaksiyonları



Yapılan literatür taraması sonucu probiyotik greyfurt suyu veya probiyotik narenciye suyunda rosmarinik asit, vanilin ve resveratrol miktarı ile ilgili yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Genel olarak probiyotik turunçgil sularında fenolik bileşik profili ile ilgili sınırlı çalışma yapılmıştır. Tang *et al.* (2022), çalışmalarında karışık laktik asit anaerobik fermentasyona dayalı biyotransformasyonun turunçgil sularındaki fenolik profilleri ve antioksidan aktivitesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda probiyotik turunçgil sularında, naringin, hesperidin, naringenin, hesperetin, neohesperidin, eriocitri, diosmin, sinensetin, narirutin, dihidrokafeik asit, hippurik asit, 4-hidroksifenilasetik asit, floretik asit, 3-(3-hidroksifenil) propanoik asit, izoferulik asit, 3-fenilpropionik asit, 4 hidroksibenzoik asit, ferulik asit, vanillik asit, p-kumarik asit, gallik asit fenolik bileşiklerini belirlemişlerdir. Hu *et al.* (2022), probiyotik narenciye posaları üzerine yaptıkları çalışmada, naringin, naringenin, hesperidin ve nobiletin bileşiklerin miktarlarını belirlemişlerdir. Bunların yanı sıra greyfurt sularında yapılan fenolik bileşik profili üzerine de sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (Kelebek, 2008; Kelebek, 2010; Sicari *et al.* 2018).

Türkiye’de yetişen greyfurtların fenolik bileşik kompozisyonunu belirlemek amacıyla Kelebek (2010) yaptığı araştırmada, greyfurt sularında; gallik asit, protokatekuik asit, vanillik asit, kafeik asit, klorojenik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, sinapik asit, narirutin, naringin, hesperidin, neohesperidin, didimin, poncirin bileşiklerini belirlemiştir. Farklı çeşitlerdeki en yüksek miktardaki fenolik bileşiği naringin, naringinden sonra en yüksek narirutin olarak belirlemiştir. Naringin miktarının 270-464 mg/L arasında, narirutin miktarının ise 63-120 mg/L arasında değişiklik gösterdiğini bildirmiştir.

Çalışmamızın probiyotik greyfurt suyunda depolama süresince belirlenen fenolik bileşik profilinin ilk kez yapıldığı ve bunun literatüre önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Probiyotik mikroorganizma ve kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularında HPLC ile belirlenen naringin miktarı

Yapılan bu araştırmada greyfurt sularında en önemli acılık bileşeni olan naringenin, intraselüler olarak azaltılması için probiyotik bakteri ilave edilmesi hedeflenmiştir. Aynı zamanda mikroorganizmalar ikili ve üçlü kombinasyon yapılarak etkinliğin artıp artmayacağını belirlemek amaçlanmıştır. Greyfurt sularının başlangıç naringin miktarları 279,22 ppm olarak belirlenmiştir. Depolama sıcaklığının 25 °C olduğu şartlarda en fazla azalma 1.KO’da (*L.plantarum* ACC 28 + *L.plantarum* 250) belirlenmiş olup, 72 saatin (3 gün) sonunda miktar 122,39 ppm’e düşmüştür. Bu durumda 25 °C depolama sıcaklığında en iyi

naringinaz aktivitesi 3. günün sonunda naringinde %56,17'lik bir azalma ile belirlenmiştir. 37 °C'lik depolama sıcaklığında ise en çok azalma *L.plantarum* ACC28 ilave edilmiş greyfurt suyunda meydana gelmiş olup, miktar, 3.günün sonunda 107,48 olarak tespit edilmiştir. Bu durum 37 °C'lik depolama mikroorganizmaların inkübasyon süresi olan 3 günün sonunda naringin miktarında %61,5'lik bir azalma gerçekleştirebildiğini göstermiştir (Tablo 33).



Tablo 33. Probiyotik Bakteri Eklenmiş Greyfurt Sularında Depolama Süresi Boyunca HPLC ile Belirlenen Naringin Konsantrasyonları

25 °C													
<i>L.plantarum</i> ACC 54		<i>L.plantarum</i> ACC 28		<i>L.plantarum</i> 250		<i>L.plantarum</i> ACC 54 + <i>L.plantarum</i> ACC 28		<i>L.plantarum</i> ACC 54 + <i>L.plantarum</i> 250		<i>L.plantarum</i> ACC 28 + <i>L.plantarum</i> 250		<i>L.plantarum</i> ACC 54 + <i>L.plantarum</i> ACC 28 + <i>L.plantarum</i> 250	
Depolama süresi	Naringin miktarı (ppm)	Depolama süresi	Naringin miktarı (ppm)	Depolama süresi	Naringin miktarı (ppm)	Depolama süresi	Naringin miktarı (ppm)	Depolama süresi	Naringin miktarı (ppm)	Depolama süresi	Naringin miktarı (ppm)	Depolama süresi	Naringin miktarı (ppm)
0. Saat	279,22	0. Saat	279,22	0. Saat	279,22	0. Saat	279,22	0. Saat	279,22	0. Saat	279,22	0. Saat	279,22
12. Saat	243,59	12. Saat	255,77	12. Saat	259,95	12. Saat	225,78	12. Saat	240,24	12. Saat	230,55	12. Saat	227,18
24. Saat	170,24	24. Saat	167,57	24. Saat	174,68	24. Saat	171,80	24. Saat	175,09	24. Saat	164,56	24. Saat	168,42
48. Saat	158,77	48. Saat	165,93	48. Saat	165,22	48. Saat	163,35	48. Saat	153,27	48. Saat	164,73	48. Saat	158,04
72. Saat	151,58	72. Saat	161,56	72. Saat	157,26	72. Saat	154,20	72. Saat	148,40	72. Saat	122,39	72. Saat	162,20
2. Hafta	172,86	2. Hafta	165,90	2. Hafta	163,69	2. Hafta	179,41	2. Hafta	163,29	2. Hafta	166,14	2. Hafta	179,69
4. Hafta	185,14	4. Hafta	185,49	4. Hafta	183,21	4. Hafta	163,69	4. Hafta	167,40	4. Hafta	171,61	4. Hafta	169,97

Tablo 33. (devam)

37 °C													
<i>L.plantarum</i> ACC 54		<i>L.plantarum</i> ACC 28		<i>L.plantarum</i> 250		<i>L.plantarum</i> ACC 54 + <i>L.plantarum</i> ACC 28		<i>L.plantarum</i> ACC 54 + <i>L.plantarum</i> 250		<i>L.plantarum</i> ACC 28 + <i>L.plantarum</i> 250		<i>L.plantarum</i> ACC 54 + <i>L.plantarum</i> ACC 28 + <i>L.plantarum</i> 250	
Depolama süresi	Naringin miktarı (ppm)	Depolama süresi	Naringin miktarı (ppm)	Depolama süresi	Naringin miktarı (ppm)	Depolama süresi	Naringin miktarı (ppm)	Depolama süresi	Naringin miktarı (ppm)	Depolama süresi	Naringin miktarı (ppm)	Depolama süresi	Naringin miktarı (ppm)
0. Saat	279,22	0. Saat	279,22	0. Saat	279,22	0. Saat	279,22	0. Saat	279,22	0. Saat	279,22	0. Saat	279,22
12. Saat	173,11	12. Saat	182,94	12. Saat	193,42	12. Saat	250,29	12. Saat	228,53	12. Saat	256,68	12. Saat	218,99
24. Saat	167,97	24. Saat	161,11	24. Saat	170,99	24. Saat	161,09	24. Saat	161,14	24. Saat	156,42	24. Saat	150,03
48. Saat	147,52	48. Saat	164,90	48. Saat	170,37	48. Saat	160,11	48. Saat	156,70	48. Saat	149,63	48. Saat	146,47
72. Saat	119,66	72. Saat	107,48	72. Saat	126,93	72. Saat	152,03	72. Saat	148,10	72. Saat	142,97	72. Saat	136,11
2. Hafta	196,14	2. Hafta	188,26	2. Hafta	177,40	2. Hafta	179,52	2. Hafta	171,34	2. Hafta	176,01	2. Hafta	174,62
4. Hafta	187,47	4. Hafta	186,75	4. Hafta	191,02	4. Hafta	191,26	4. Hafta	188,94	4. Hafta	177,64	4. Hafta	192,16

L. plantarum : *Lactobacillus plantarum*

Yapılan istatistiki analiz sonucunda, sıcaklık ve mikroorganizma suş parametrelerinin naringin miktarındaki değişim üzerine önemli bir etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. Fakat süre parametresinin naringin miktarındaki değişim üzerine $p<0.01$ düzeyinde çok anlamlı bir etki gösterdiği belirlenmiştir. Parametreler arasındaki interaksiyonlara bakıldığında sıcaklık x süre interaksiyonunun naringin miktarı üzerine önemli ($p<0.05$) düzeyde etki gösterdiği, fakat sıcaklık x mikroorganizma suş ve mikroorganizma suş x süre interaksiyonların naringin üzerine anlamlı bir etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 34).



Tablo 34. Probiyotik Bakteri Eklenmiş Greyfurt Sularında Depolama Süresi Boyunca HPLC ile Belirlenen Naringin Varyans Analizi

Varyans Kaynakları	Sıcaklık (A)		Kombinasyon (B)		Süre (C)		AXB		AXC		BXC		
SD	1		6		6		6		6		6		98
Özellikler	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	Ortalamanın Standart Hatası
Naringin	1171,131	2,332	125,503	0,250	63002,376	125,450**	543,102	1,081	1371,566	2,731*	200,939	,400	502,212

SD: Serbestlik derecesi

AXB: Sıcaklık ve Kombinasyon etkileşimi

AXC: Sıcaklık ve Süre etkileşimi

BXC: Kombinasyon ve Süre etkileşimi

Tablo 35. Probiyotik bakteri eklenmiş greyfurt sularının naringin içeriğine ait ANOVA ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi

Özellikler	25 °C	37 °C	<i>L. Plantarum</i> ACC 54	<i>L. Plantarum</i> ACC 28	<i>L. Plantarum</i> 250	<i>L.plantarum</i> ACC 54 + <i>L.plantarum</i> ACC 28	<i>L.plantarum</i> ACC 54 + <i>L.plantarum</i> 250
Naringin	192,54±48,08	187,65±49,38	188,03±49,77	189,44±50,64	192,33±48,51	193,64±48,49	190,06±47,58

Tablo 35. (devam)

<i>L.plantarum</i> ACC 28 + <i>L.plantarum</i> 250	<i>L.plantarum</i> ACC 54 + <i>L.plantarum</i> ACC 28 + <i>L.plantarum</i> 250	0. Gün	12. Saat	24. Saat	48. Saat	72. Saat	2. Hafta	4. Hafta
188,41±52,81	188,74±47,77	279,22±0,66 ^a	227,65±27,13 ^b	165,79±7,64 ^{de}	158,93±7,72 ^e	142,20±17,39 ^f	175,30±32,96 ^{cd}	181,55±29,41 ^c

*Her sütun için istatistiksel analiz kendi içerisinde yapılmış ve aynı harfle gösterilen ortalamalar önem seviyesi aynı olarak kabul edilmiştir.

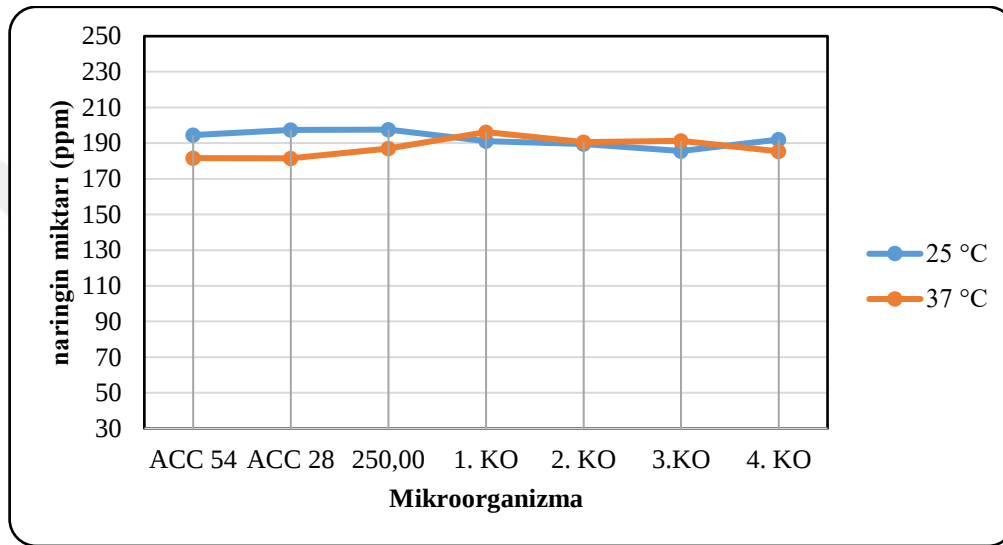
1.KO: birinci kombinasyon

2.KO: ikinci kombinasyon

3.KO: üçüncü kombinasyon

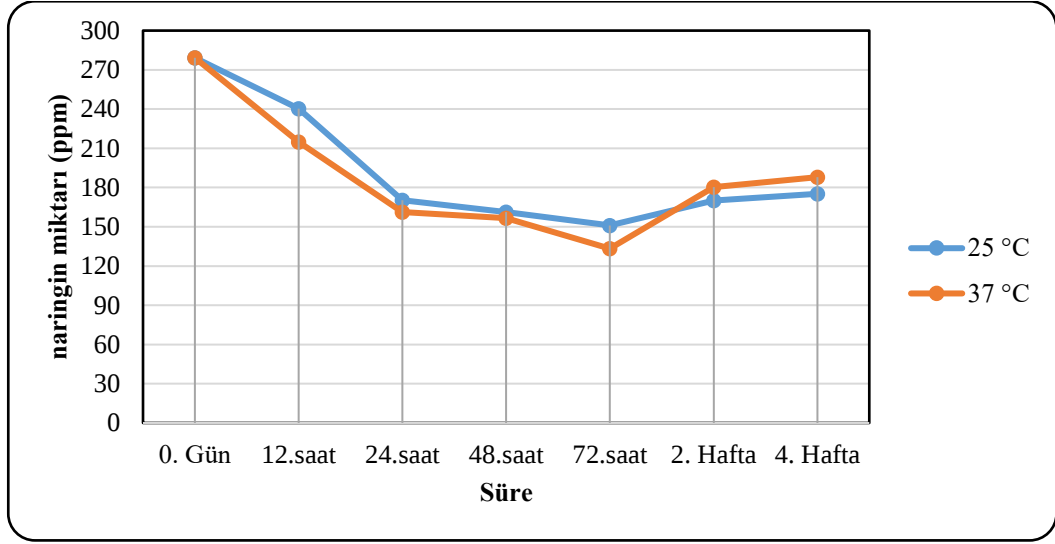
4.KO: dördüncü kombinasyon

Naringinin azalma miktarı, tek mikroorganizma eklenmiş greyfurt sularında çok az farklılık göstermiş olup, 37°C'lik depolama sıcaklığındaki tek mikroorganizma ilave edilmiş greyfurt sularındaki naringin azalması 25 °C'lik depolama sıcaklığına göre daha fazla meydana gelmiştir. Diğer kombinasyonların eklendiği greyfurt sularındaki naringin miktarındaki azalma ise sıcaklığa bağlı olarak benzerlik göstermiştir (Şekil 81). Bu durum sıcaklığın mikroorganizmaların naringini hidrolize etme kabiliyetinde anlamlı bir etkiye sahip olmadığını açıklamaktadır. Yapılan istatistiki analiz sonucunda da bu interaksyonun naringin üzerine önemli bir etki oluşturmadığı da (Tablo 34) tespit edilmiştir.



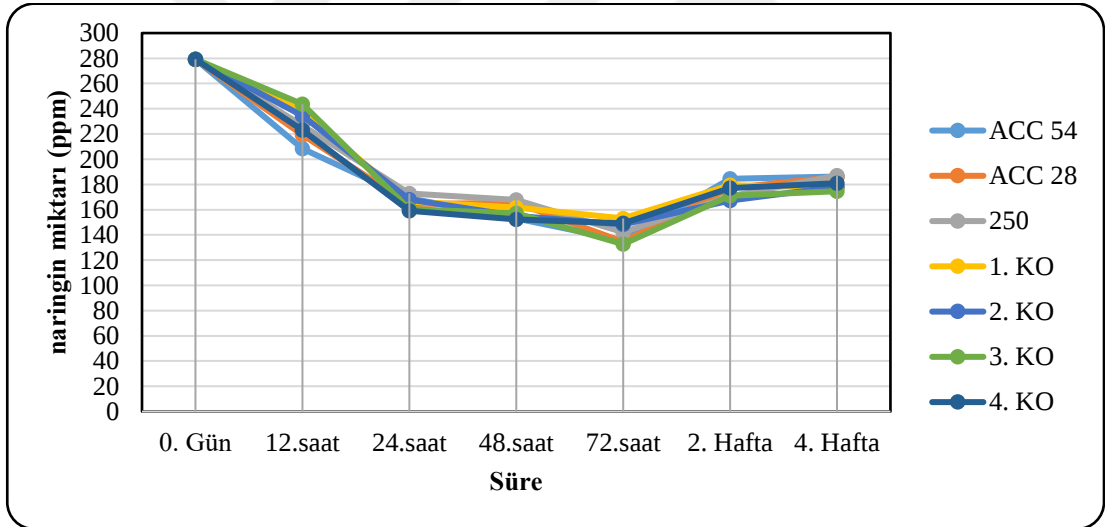
Şekil 81. Probiyotik mikroorganizmalar ve bunların kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerindeki depolama süresince naringin miktarına etki eden sıcaklık x mikroorganizma suş interaksyonu

Depolama süresinde özellikle ilk üç gün çalışmada kullanılan probiyotik bakteriler için inkübasyon süresi yani mikrobiyal gelişimin en fazla olduğu süre tespit edilmiştir (Tablo 25). Bu durumda mikroorganizmaların bu süreçte daha aktif olarak substrat kullandığı böylece naringini daha fazla hidrolize edebildiği söylenebilmektedir. Naringindeki en fazla düşüş tüm mikroorganizmalar ve kombinasyonları için 72. saatin (3.gün) sonunda tespit edilmiştir (Şekil 82). Sıcaklığın naringin miktarındaki azalmada önemli bir etkiye sahip olmadığı daha öncede belirtilmiş olup, (Tablo 34) burada süreye bağlı olarak naringin miktarındaki azalma önem derecesini belirlemektedir. Yapılan varyans analizi sonucu sıcaklık x süre interaksyonunun naringin miktarı üzerine önemli ($p < 0.05$) düzeyde etki ettiği bulunmuştur (Tablo 34).

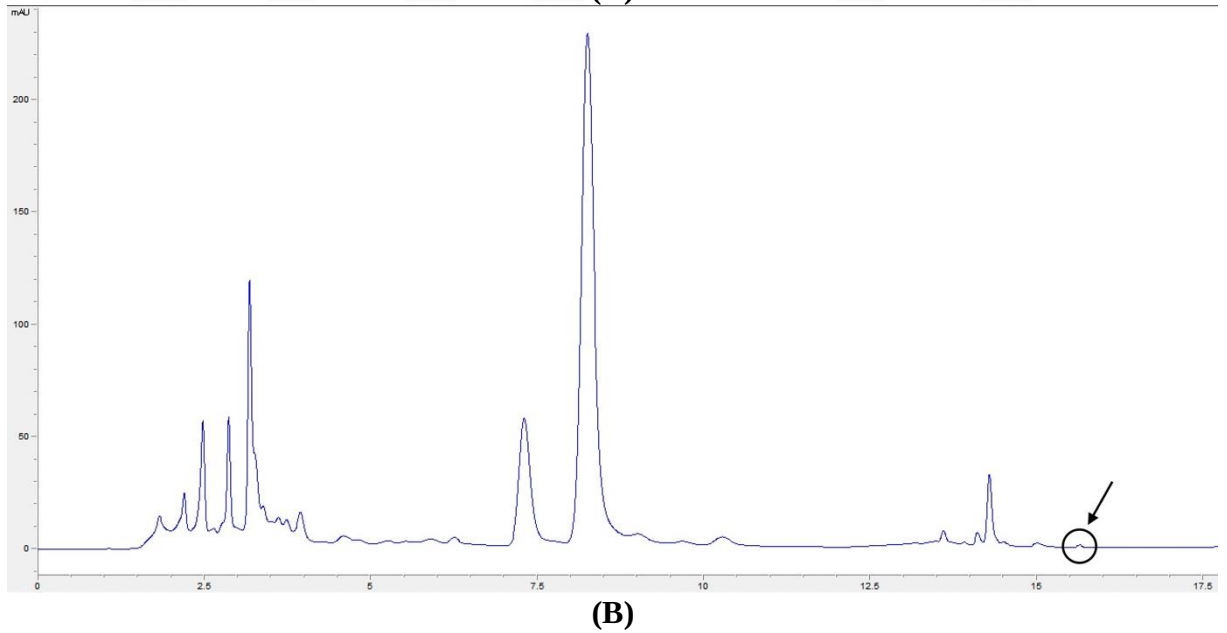
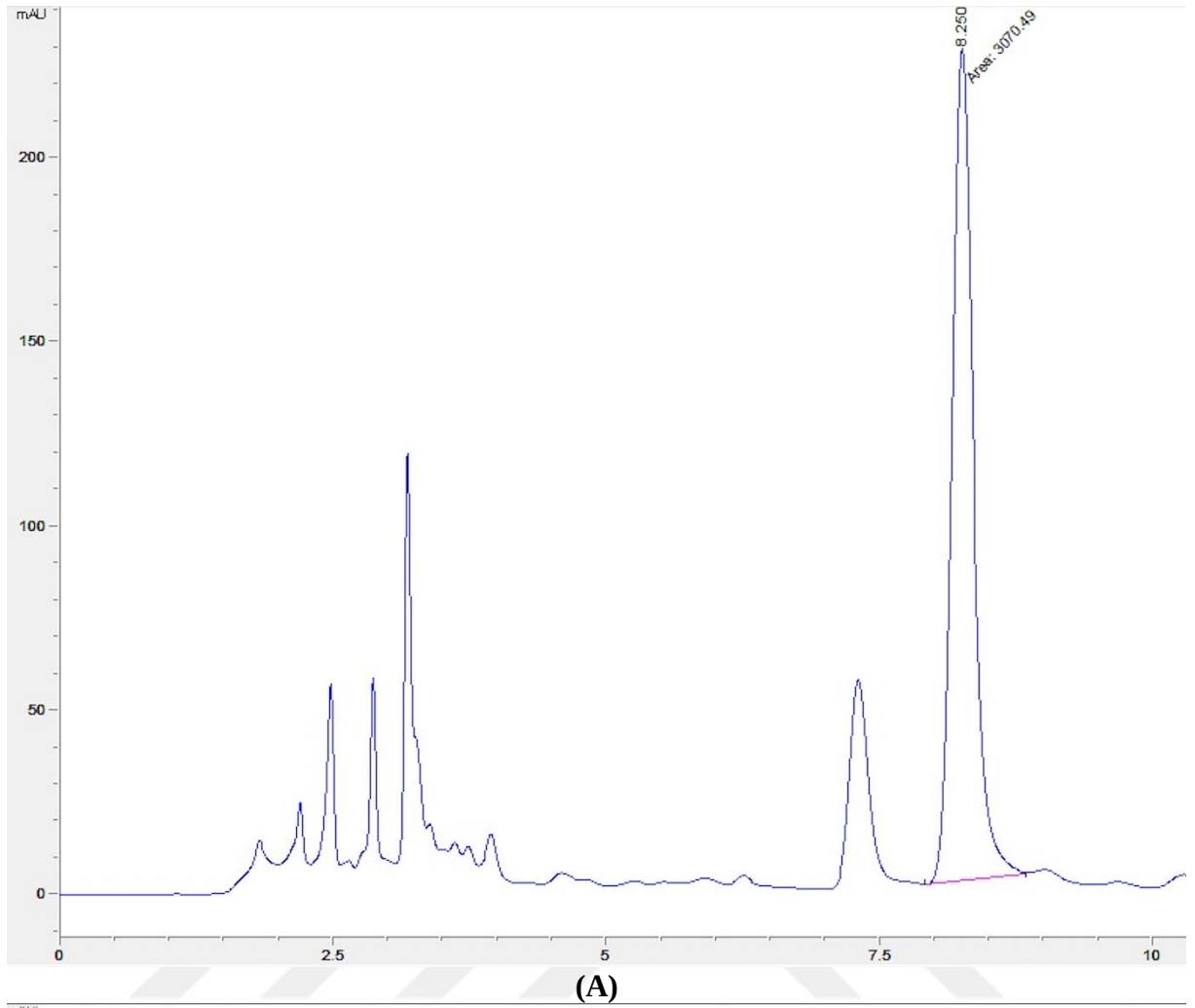


Şekil 82. Probiyotik mikroorganizmalar ve bunların kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerindeki depolama süresince naringin miktarına etki eden sıcaklık x süre interaksyonu

Şekil 83’de *L.plantarumun* kullanılan tüm suşlarının naringin miktarında yakın oranda bir azalma gerçekleştirdiği, en çok azalmanın 72. saatin sonunda belirlendiği gösterilmektedir.



Şekil 83. Probiyotik mikroorganizmalar ve bunların kombinasyonlarının ilave edildiği greyfurt sularının farklı sıcaklık derecelerindeki depolama süresince naringenin miktarına etki eden süre x mikroorganizma suş interaksyonu



Şekil 84. *L.plantarum* 250 ilave edilen greyfurt suyunun 37 °C sıcaklıkta 72 saat depolama sonucu naringin (A) ve naringenin (B) kromatogramı

Bu araştırmada probiyotik mikroorganizma suşları ve bunların kombinasyonlarının ilave edildiği ve depolandığı greyfurt sularındaki naringin ve naringenin miktarını belirlemek amacıyla HPLC metodu kullanılmıştır. Fakat yapılan analiz sonucunda HPLC ile naringenin

miktarı tespit edilebilir sınırın altında kalmıştır. Greyfurt suyu örnekleri LS-MS/MS ile analiz edildiğinde naringenin miktarının mikroorganizma suşlarının ilave edildiği greyfurt sularında depolama süresince artış gösterdiği tespit edilmiştir. *L. plantarum* suşlarının intraselüler enzim aktivitesi sonucu naringeni naringenine dönüştürdüğü (Tran *et al.* 2020) bilinmektedir. Yapılan literatür taraması sonucunda probiyotik greyfurt sularında depolama süresince naringenin miktarının belirlenmesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Yapılan literatür taraması sonucunda probiyotik bakterilerin greyfurt suyundaki naringinaz aktivitesi üzerine sadece bir çalışmaya rastlanmıştır. Tran *et al.* (2020) yaptıkları araştırma da 16 probiyotik bakterinin naringinaz aktivitesini belirlemiş bunlardan en iyisini seçerek, bu bakteri ve seçtikleri diğer bazı bakterilerin ikili kombinasyonlarının acılık bileşiği olan naringin üzerine etkisini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışma sonunda Tran *et al.* (2020), naringindeki en fazla azalma miktarını %28 olarak belirlemiş olup, bu verimin acılık gidermede yeterli olmadığını fakat probiyotik meyve suyu üretiminde bir miktar da olsa acılık giderilebildiğini belirtmişlerdir. Yaptığımız araştırmada *Lactobacillus* suşlarının naringin miktarını %61.5 azalttığı belirlenmiştir. Böylece greyfurt suyunda probiyotik olarak kullanmış olduğumuz mikroorganizmaların greyfurt suyundaki en önemli acılık bileşenlerinden naringin üzerine önemli bir düzeyde etkili olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada Atatürk Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde fermente bir ürün olan turşudan daha önceden izole edilmiş olan *Lactobaciller* kullanılmıştır. Bu sonuç, *L. plantarum* suşunun kökeni ile açıklanabilir. Çürüten bitki materyali ve fermente edilmiş sebze substratları üzerindeki *Laktobasillerin* sık görülmesi göz önüne alındığında, genomlarının ramnosilatlanmış bileşikleri kullanabilen enzimleri kodlayan bir veya daha fazla gen taşıdığı tahmin edilebildiği bildirilmiştir (Beekwilder *et al.* 2009)

Yaptığımız araştırmada mikroorganizma suşları ve bunların ikili ve üçlü kombinasyonlarının naringeni hidroliz etmede birbirinden çok farklı bir etkiye sahip olmadığı bulunmuştur. Fakat mikroorganizmaların intraselüler enzim aktivitelerinin yüksek olduğu anlaşılmaktadır.

Daha önce yapılan bir araştırmada biyoteknolojik potansiyelde naringinaz üreten *Clavispora lusitaniae* mayasının, düşük alkollü, doğal olarak karbonatlı, acılığı giderilmiş, fermente edilmiş bir içecek olan mandalina ve limonun işlenmesi için kullanılmıştır (Pandove *et al.* 2017). Soğuk ortamda üç aylık depolama sonucu fermente edilmiş mandalina ve limon karışımı içecekteki naringin içeriğinin 443.20 ppm'den 176.4 ppm'ye düştüğünü belirtmişlerdir. Yaptığımız araştırmada greyfurt suyunun laktik asit bakterileri tarafından intraselüler olarak üretilen naringinaz ile direkt *A.niger* ATCC 1880'den saflaştırdığımız enzim

ile karşılaştırıldığında direkt enzime yakın bir oranda naringin üzerine etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu durumda hem probiyotik meyve suyu elde etmek hem de acılık bileşeni olan naringini azaltılmak için bu uygulamanın uygun olabileceği ve yaptığımız çalışmanın bu açıdan literatüre önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.



SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada greyfurt suyu üretiminde önemli bir problem olan acılığın giderilmesinde uygulanmak amacıyla, *Aspergillus niger* ATCC 1688'den naringinaz enzimi saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzim, greyfurt suyuna farklı konsantrasyonlarda (%1.0, 0.5 ve 0.1) ilave edilerek, farklı sıcaklıklarda (25, 35, 45 °C), bir ve beş saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürelerinin sonunda greyfurt sularının naringin miktarı, fizikokimyasal özelliklerinde ve antioksidan aktivitelerinde meydana gelen değişimler analiz edilmiştir. Aynı zamanda bazı probiyotik *Lactobacillus* türlerinin, tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının eklendiği greyfurt suyunda, belirlenen depolama süresi (4 hafta) içerisinde belli aralıklarla greyfurt suyundaki naringin miktarı, bazı fizikokimyasal özellikleri ve antioksidan aktivitelerindeki değişimler araştırılmıştır. Çalışma sonucunda naringinaz aktivitesinin, naringin üzerine etkisi, doğrudan enzim uygulamasıyla ve probiyotik bakterilerin greyfurt suyuna ilave edilmesiyle araştırılmış ve greyfurt sularındaki değişimler incelenmiştir. Araştırma ile şu sonuçlara varılmıştır;

Aspergillus niger ATCC 1688'den ekstraselüler naringinaz enzimi üretimi için en uygun besiyeri ortamı KH_2PO_4 , MgSO_4 , KCl, NaNO_3 , pepton, yeast extract, naringin ve aynı şekilde KH_2PO_4 , MgSO_4 , KCl, NaNO_3 , pepton, yeast extract, naringin bileşiklerini içeren 1. ve 5. ortam olduğu belirlenmiştir. Puri *et al.* (2005) ve Mukund *et al.* (2013), çalışmalarında glikoz ve sakarozun naringinaz enzim aktivitesini baskıladığını belirtmişlerdir. Bu durumda ortamdaki yeast extract varlığının enzim üretimini teşvik ettiği, bununla birlikte hazır besiyerinde ise içeriğinde bulunan glikozdan kaynaklı olarak enzim üretiminin baskılandığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada elde edilen naringinazın, pH 5'te ve 50 °C'lik sıcaklıkta optimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca Mg^{2+} varlığı enzimatik aktivite üzerinde en az etki oluştururken, Cu^{2+} varlığının enzimi önemli derecede olumsuz etkilediği belirlenmiştir. Çalışmada naringinazın optimum iyonik şiddeti 0.5 M olarak bulunmuştur.

Saflaştırılan enzimin greyfurt suyuna ilavesi ile inkübasyon sonucunda yapılan HPLC analizi ile naringin miktarında önemli bir düzeyde azalma (%61.5) tespit edilmiştir. Bu durumda greyfurt suyunda acılığın önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir.

Saflaştırılan naringinaz enzimi ilave edilmiş olan greyfurt sularında yapılan analizlerde meyve suyu özelliklerini tüketime uygun olmayan ve olumsuz etkileyebilecek seviyede önemli bir değişim olmadığı belirlenmiştir. Gerçekleşen değişim üzerine ise enzimin etkili olduğu kadar sıcaklığında etkili olduğu tahmin edilmektedir.

Çalışmamızda daha önce probiyotik özellikleri kanıtlanmış laktik asit bakterileri kullanılmıştır. Probiyotik meyve suyu için kullanılan bakterilerin, besiyerinde ekstraselüler enzim aktivitesi gösterip göstermedikleri araştırılmış ve aktivite testi sonucunda *L. plantarum* ACC 54 ve *L. plantarum* ACC 28 bakterileri için en uygun ekstraselüler aktivite MRS broth, naringin içeren 5. ortam'da en yüksek belirlenmiş, *L. plantarum* 250 için ise pepton, K₂HPO₄, MgSO₄, MnSO₄, glikoz, sodyum asetat, amonyum sitrat ve naringin bileşiklerinden hazırlanan 3. ortamda tespit edilmiştir. Greyfurt suyuna mikroorganizma ve kombinasyonlarının ilave edilmesinden sonra yapılan HPLC analizi sonucunda naringin miktarının önemli bir oranda azaldığı bulunmuştur. Bu durum mikroorganizmaların besiyeri ortamı olarak greyfurt suyunda yüksek bir intraselüler enzim aktivitesi gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Probiyotik greyfurt suyunda en yüksek naringin azalması (%61.5) monokültür ortamında (*L. plantarum* ACC28) 37 °C'de 72 saatlik fermentasyon sonucunda belirlenmiştir. *L. plantarum* ACC 54, *L. plantarum* ACC 28 ve *L. plantarum* 250 mikroorganizmalarının monokültür besiyeri ortamı (greyfurt suyu) ve karışık kültür ortamlarında gelişimleri arasında çok önemli bir değişiklik olmamıştır. Bu durum mikroorganizmaların besiyeri ortamında gerekli besin ihtiyacını karşılayabilmek için birbirlerinin gelişimlerini baskıladıkları şeklinde açıklanabilmektedir. Böylece naringin konsantrasyonu üzerine monokültürlerin tek başına etkili olabileceği görülmüştür. Karışık kültür ortamında ise naringin konsantrasyonunda en fazla azalma 3. KO'da (*L. plantarum* ACC 28 + *L. plantarum* 250) olmuş ve azalma oranı %56,1 olarak belirlenmiştir. Karışık kültür kullanımı, hem acılık oranı azaltılmış hem de farklı probiyotik kültür içeren greyfurt suyu üretimi için tercih edilebilir.

Probiyotik greyfurt suyunun depolama süresi boyunca meyve suyu özelliklerinde mikrobiyal gelişimden kaynaklı olarak 4. haftaya kadar besin miktarında azalmalar meydana geldiği tespit edilmiştir. Özellikle 37 °C'lik depolama süresi için 2. haftadan sonra mikrobiyal gelişim de gerçekleşmediğinden probiyotik özelliğin kaybolduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada 37 °C'lik sıcaklık mikrobiyal gelişim için en uygun ve enzimin optimum sıcaklığına yakın bir sıcaklık olduğundan aynı zamanda mikroorganizmaların bu sıcaklık derecesinde ve greyfurt suyu pH değerinde ne kadar süre dayanabileceği belirlenmeye çalışılmıştır. Yüksek sıcaklık ve uzun sürenin meyve suyunun besin değerini olumsuz yönde etkilediği de (Igual *et al.* 2010) göz önünde bulundurularak probiyotik meyve suyunda naringin miktarının en fazla düşürülebildiği süre olarak tespit edilen 72. saatin sonunda meyve sularının düşük sıcaklıklara getirilerek muhafazası önerilmektedir.

Bu çalışma ile, naringinaz enziminin acılık gidermek için kullanılması amacıyla saflaştırılması ve bu enzimin Türkiye'de üretimi için bir kaynak olabileceği, aynı zamanda

belirlenen probiyotik bakterilerin kullanılması ile hem probiyotik greyfurt suyu üretimi hem de naringin miktarının azaltılmasından kaynaklı greyfurt suyunun acılığının giderilmesi konusunda önemli bir kaynak olabileceği düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- Aadil, R. M., Zeng, X. A., Han, Z., & Sun, D. W. (2013). Effects of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice. *Food Chemistry*, 141(3), 3201-3206.
- Ahmed, S., Khan, H., Aschner, M., Hasan, M. M., & Hassan, S. T. (2019). Therapeutic potential of naringin in neurological disorders. *Food and Chemical Toxicology*, 110646.
- Ahmed, S., Rattanpal, H. S., Gul, K., Dar, R. A., & Sharma, A. (2019). Chemical composition, antioxidant activity and GC-MS analysis of juice and peel oil of grapefruit varieties cultivated in India. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(7), 1634-1642.
- Akman, P. K., Ozulku, G., Tornuk, F., & Yetim, H. (2021). Potential probiotic lactic acid bacteria isolated from fermented gilaburu and shalgam beverages. *LWT*, 149, 111705.
- Akyıldız, A., Önür, E., Ağçam, E., Kirit, B. D., & Türkmen, F. U. (2022). Changes in quality parameters of orange juice deacidified by ion exchange resins. *Food Chemistry*, 375, 131837.
- Alam, M. A., Sernia, C., & Brown, L. (2013). Ferulic acid improves cardiovascular and kidney structure and function in hypertensive rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 61(3), 240-249.
- Albayrak S., Sağdıç O., Aksoy A., 2010. Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 26(4),401-409.
- Albrigo, L.G., Carter, R.D. 1977. Structure of citrus fruits in relation to processing. In: Nagy, S., Shaw, P.E., Veldhuis, M.K.(Ed). Citrus science and technology, Vol 1, Westport, Conn: AVI Publishing Company. pp 33-73.
- Ali, S.S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., 2008. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*, 41(1), 1– 15.
- Altan, A. (1983). Turunçgil Sularında Acılık Ögesi Olarak Naringin. *Gıda Dergisi*, 8(1).
- Altay, A. (2015). Antioxidant and cytotoxic properties of *Salvia fruticosa* M. and its effects on gene expression of some CYP450 and antioxidant enzymes in HT-29 cell line. *Middle East Technical University*.
- Ameer, B., Weintraub, R. A., Johnson, J. V., Yost, R. A., & Rouseff, R. L. (1996). Flavanone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 60(1), 34-40.
- Annadurai, T., Muralidharan, A. R., Joseph, T., Hsu, M. J., Thomas, P. A., & Geraldine, P. (2012). Antihyperglycemic and antioxidant effects of a flavanone, naringenin, in streptozotocin–nicotinamide-induced experimental diabetic rats. *Journal of physiology and biochemistry*, 68(3), 307-318.
- Anonim, 2020. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Narenciye>
- Anonimus, 2020. <https://en.wikipedia.org/wiki/Grapefruit>
- Araújo, J. R., Gonçalves, P., & Martel, F. (2011). Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutrition Research*, 31(2), 77-87.

- Araújo, M. E. M. B., Franco, Y. E. M., Alberto, T. G., Sobreiro, M. A., Conrado, M. A., Priolli, D. G., Franklan Savaya, A.C.H., Ruiz, A.L.T.G., de Carvalho, J.H., deOliveira Carvalho, P. (2013). Enzymatic de-glycosylation of rutin improves its antioxidant and antiproliferative activities. *Food chemistry*, 141(1), 266-273.
- Aturki, Z., Brandi, V., & Sinibaldi, M. (2004). Separation of flavanone-7-O-glycoside diastereomers and analysis in citrus juices by multidimensional liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(17), 5303-5308.
- Avila, M., Jaquet, M., Moine, D., Requena, T., Pelaez, C., Arigoni, F., & Jankovic, I. (2009). Physiological and biochemical characterization of the two α -L-rhamnosidases of *Lactobacillus plantarum* NCC245. *Microbiology*, 155(8), 2739-2749.
- Awad, G. E., El Aty, A. A. A., Shehata, A. N., Hassan, M. E., & Elnashar, M. M. (2016). Covalent immobilization of microbial naringinase using novel thermally stable biopolymer for hydrolysis of naringin. *3 Biotech*, 6(1), 14.
- Bai, S., Dai, J., Xia, M., Ruan, J., Wei, H., Yu, D., ... & Qiu, D. (2015). Effects of intermediate metabolite carboxylic acids of TCA cycle on *Microcystis* with overproduction of phycocyanin. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(7), 5531-5537.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99(1), 191-203.
- Balaydın, H.T., Gülçin, I., Menzek, A., Göksu, S., Sahin, E., 2010. Synthesis and antioxidant properties of diphenylmethane derivative bromophenols including a natural product. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 25, 685– 695.
- Baradas, M. W. (1994). Crop requirements of tropical crops. *Handbook of agricultural meteorology*. JF Griffiths Editor. Oxford Univ. Press. New York, USA, 189-202.
- Barker, S. A., Somers, P. J., Stacey, M., & Hopton, J. W. (1965). Arrangement of the L-rhamnose units in *Diplococcus pneumoniae* type II polysaccharide. *Carbohydrate Research*, 1(2), 106-115.
- Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L., Jamieson, H. A., Lerin, C., Kalra, A., ... & Lakatta, E. G. (2006). Le C outeur. D., Shaw, RJ, Navas, P., Puigserver, P., Ingram, DK, deCabo, R. and Sinclair, DA, 337-342.
- Beekwilder, J., Marcozzi, D., Vecchi, S., de Vos, R., Janssen, P., Francke, C., ... & Hall, R. D. (2009). Characterization of rhamnosidases from *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and environmental microbiology*, 75(11), 3447-3454.
- Belajova, E., & Suhaj, M. (2004). Determination of phenolic constituents in citrus juices: Method of high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 86(3), 339-343.
- Bharti, S., Rani, N., Krishnamurthy, B., & Arya, D. S. (2014). Preclinical evidence for the pharmacological actions of naringin: a review. *Planta medica*, 80(06), 437-451.
- Bhatt, J. K., Thomas, S., & Nanjan, M. J. (2012). Resveratrol supplementation improves glycemic control in type 2 diabetes mellitus. *Nutrition research*, 32(7), 537-541.
- Bilginer, H., & Çetin, B. (2019). Probiyotikler ve Belirlenmelerinde Kullanılan in vitro Testler. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 50(3), 312-325.
- Bilişli, A., 2012. Gıda Biyokimyası, 380, Çanakkale.

- Bodakowska-Boczniewicz, J., & Garncarek, Z. (2019). Immobilization of naringinase from *Penicillium decumbens* on chitosan microspheres for debittering grapefruit juice. *Molecules*, 24(23), 4234.
- Borkar, V., Chakraborty, S., & Gokhale, J. S. (2020). Fermentative Production of Naringinase from *Aspergillus niger* van Tieghem MTCC 2425 Using Citrus Wastes: Process Optimization, Partial Purification, and Characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(5), 1321-1337.
- Borradaile, N. M., de Dreu, L. E., Barrett, P. H. R., Behrsin, C. D., & Huff, M. W. (2003). Hepatocyte apoB-containing lipoprotein secretion is decreased by the grapefruit flavonoid, naringenin, via inhibition of MTP-mediated microsomal triglyceride accumulation. *Biochemistry*, 42(5), 1283-1291.
- Borzova, N., Gudzenko, O., & Varbanets, L. (2018). Purification and Characterization of a Naringinase from *Cryptococcus albidus*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 184(3), 953-969.
- Bourbouze, R., Percheron, F., & Courtois, J. E. (1976). α -L-Rhamnosidase de *Fagopyrum esculentum*: Purification et quelques proprietes. *European journal of biochemistry*, 63(2), 331-337.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248.
- Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž., & Bren, U. (2016). Polyphenols: extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules*, 21(7), 901.
- Brito, L. G., Leite, G. Q., Duarte, F. Í. C., Ostrosky, E. A., Ferrari, M., de Lima, A. A. N., ... & Gomes, A. P. B. (2019). Thermal behavior of ferulic acid employing isoconversional models and artificial neural network. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 138(5), 3715-3726.
- Bujna, E., Farkas, N. A., Tran, A. M., Dam, M. S., & Nguyen, Q. D. (2018). Lactic acid fermentation of apricot juice by mono-and mixed cultures of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Food science and biotechnology*, 27(2), 547-554.
- Burkina, V., Zlabek, V., Halsne, R., Ropstad, E., & Zamaratskaia, G. (2016). In vitro effects of the citrus flavonoids diosmin, naringenin and naringin on the hepatic drug-metabolizing CYP3A enzyme in human, pig, mouse and fish. *Biochemical pharmacology*, 110, 109-116.
- Bussmann, A. J., Borghi, S. M., Zaninelli, T. H., Dos Santos, T. S., Guazelli, C. F., Fattori, V., Talita P Domiciano, T.P., Pinho-Ribeiro, F.A., Ruiz-Miyazawa, K.W., Antonio M B Casella, A.M.B., Vignoli, J.A., Camilios-Neto, D., Casagrande, R., Verri, W.A., (2019). The citrus flavanone naringenin attenuates zymosan-induced mouse joint inflammation: induction of Nrf2 expression in recruited CD45+ hematopoietic cells. *Inflammopharmacology*, 27(6), 1229-1242.
- Busto, M. D., Meza, V., Ortega, N., & Perez-Mateos, M. (2007). Immobilization of naringinase from *Aspergillus niger* CECT 2088 in poly (vinyl alcohol) cryogels for the debittering of juices. *Food chemistry*, 104(3), 1177-1182.
- Calabrese, F. (1992). The history of citrus in the Mediterranean countries and Europe. In *Proc Int Soc Citricult* (Vol. 1, pp. 35-38). 1: 35–38.

- Caldini C, Bonomi F, Pifferi P, Lanzarini C, Galante YM. 1994. Kinetic and immobilization studies on fungal glycosidase for aroma enhancement in wine. *Enzyme Microb Technol* 16:286–91.
- Caraveo, L., Medina, H., Rodríguez-Buenfil, I., Montalvo-Romero, C., & Evangelista-Martínez, Z. (2014). A simple plate-assay for screening extracellular naringinase produced by streptomycetes. *Journal of microbiological methods*, 102, 8-11.
- Cardona, S. T., Mueller, C. L., & Valvano, M. A. (2006). Identification of essential operons with a rhamnose-inducible promoter in *Burkholderia cenocepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(4), 2547-2555.
- Cavia-Saiz, M., Busto, M. D., Pilar-Izquierdo, M. C., Ortega, N., Perez-Mateos, M., & Muñoz, P. (2010). Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(7), 1238-1244.
- Cavia-Saiz, M., Muniz, ~ P., Ortega, N., & Busto, M. D. (2011). Effect of enzymatic debittering on antioxidant capacity and protective role against oxidative stress of grapefruit juice in comparison with adsorption on exchange resin. *Food Chemistry*, 125, 158–163.
- Cemeroğlu, B.S. 2011. Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi. Nobel Akademik Yayıncılık.
- Cemeroğlu, B.S. 2013. Gıda Analizleri. Bizim Grup Basımevi.
- Chang, H. Y., Lee, Y. B., Bae, H. A., Huh, J. Y., Nam, S. H., Sohn, H. S., Lee, H.J., Lee, S. B. (2011). Purification and characterisation of *Aspergillus sojae* naringinase: The production of prunin exhibiting markedly enhanced solubility with in vitro inhibition of HMG-CoA reductase. *Food chemistry*, 124(1), 234-241.
- Cheetham, P. S., & Quail, M. A. (1991). *U.S. Patent No. 5,077,206*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Chen Y., Ni H., Chen F., Cai H., Li L., Su W. Purification and Characterization of a Naringinase from *Aspergillus aculeatus* JMUdb058. [dx.doi.org/10.1021/jf303512q](https://doi.org/10.1021/jf303512q) | J. Agric. Food Chem. 2013, 61, 931–938.
- Chen, R., Qi, Q. L., Wang, M. T., & Li, Q. Y. (2016). Therapeutic potential of naringin: an overview. *Pharmaceutical biology*, 54(12), 3203-3210.
- Chen, Y. C., Shen, S. C., & Lin, H. Y. (2003). Rutinoside at C7 attenuates the apoptosis-inducing activity of flavonoids. *Biochemical Pharmacology*, 66(7), 1139-1150.
- Chien, P., Sheu, F., & Shyu, Y. (2001). Monitoring the enzymatic debittering in grapefruit juice by high performance liquid chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis*, 9, 115–120.
- Chin, L. H., Hon, C. M., Chellappan, D. K., Chellian, J., Madheswaran, T., Zeeshan, F., Awasthi, R., Aljabalie, A., Tambuwalaf, M.M., Durejag, H., Negih, P., Kapoor, D.N., Goyal, R., Paudelm, K.R., Satijai, S., Gupta, G., Hsuk, A., Warkk, P., Mehtai, M., Wadhwal, R., Hansbrok, P.M., Dua, K. (2020). Molecular mechanisms of action of naringenin in chronic airway diseases. *European Journal of Pharmacology*, 173139.
- Cho, I., & Blaser, M. J. (2012). The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 260-270.
- Choi, J. S., Yokozawa, T., & Oura, H. (1991). Improvement of hyperglycemia and hyperlipemia in streptozotocin-diabetic rats by a methanolic extract of *Prunus davidiana* stems and its main component, prunin. *Planta medica*, 57(03), 208-211.

- Choi, J.S., Yokozawa, T., Oura, H. (1991). Antihyperlipidemic effect of flavonoids from *Prunus davidiana*. *J Nat Prod*, 54:218–224.
- Chong, M. F. F., Macdonald, R., & Lovegrove, J. A. (2010). Fruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies. *British Journal of Nutrition*, 104(S3), S28-S39.
- Chudnovskiy, R., Thompson, A., Tharp, K., Hellerstein, M., Napoli, J. L., & Stahl, A. (2014). Consumption of clarified grapefruit juice ameliorates high-fat diet induced insulin resistance and weight gain in mice. *PloS one*, 9(10).
- Chun, O. K., Chung, S. J., & Song, W. O. (2007). Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of US adults. *The Journal of nutrition*, 137(5), 1244-1252.
- Clemente, J. C., Manasson, J., & Scher, J. U. (2018). The role of the gut microbiome in systemic inflammatory disease. *Bmj*, 360.
- Cosgrove, M. C., Franco, O. H., Granger, S. P., Murray, P. G., & Mayes, A. E. (2007). Dietary nutrient intakes and skin-aging appearance among middle-aged American women. *The American journal of clinical nutrition*, 86(4), 1225-1231.
- Costa, G.M., Silva, J.V.C., Mingotti, J.D., Barão, C.E., Klososki, S.J. and Pimentel, T.C. (2017), “Effect of ascorbic acid or oligofructose supplementation on *L. paracasei* viability, physicochemical characteristics and acceptance of probiotic orange juice”, *LWT-Food Science and Technology*, Vol. 75, pp. 195-201.
- Cristóbal-Luna, J. M., Álvarez-González, I., Madrigal-Bujaidar, E., & Chamorro-Cevallos, G. (2018). Grapefruit and its biomedical, antigenotoxic and chemopreventive properties. *Food and chemical toxicology*, 112, 224-234.
- Cserhalmi, Z., Sass-Kiss, A., Tóth-Markus, M., & Lechner, N. (2006). Study of pulsed electric field treated citrus juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 7(1-2), 49-54.
- Cui, Z., Maruyama, Y., Mikami, B., Hashimoto, W., & Murata, K. (2006). Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the family GH78 α -L-rhamnosidase RhaB from *Bacillus* sp. GL1. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 62(7), 646-648.
- Cui, Z., Maruyama, Y., Mikami, B., Hashimoto, W., & Murata, K. (2007). Crystal structure of glycoside hydrolase family 78 α -L-rhamnosidase from *Bacillus* sp. GL1. *Journal of molecular biology*, 374(2), 384-398.
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
- Dai, Q., Borenstein, A. R., Wu, Y., Jackson, J. C., & Larson, E. B. (2006). Fruit and vegetable juices and Alzheimer’s disease: the Kame Project. *The American journal of medicine*, 119(9), 751-759.
- Dalgård, C., Nielsen, F., Morrow, J. D., Enghusen-Poulsen, H., Jonung, T., Hørdér, M., & de Maat, M. P. (2008). Supplementation with orange and blackcurrant juice, but not vitamin E, improves inflammatory markers in patients with peripheral arterial disease. *British journal of nutrition*, 101(2), 263-269.
- Danalache, F., Mata, P., Alves, V. D., & Moldão-Martins, M. (2018). Enzyme-assisted extraction of fruit juices. In *Fruit Juices* (pp. 183-200). Academic Press.
- Davis, W. (1947). Determination of flavanones in citrus. *Analytical Chemistry*, 19, 476–478.
- De Vrese, M., & Schrezenmeir, A. J. (2008). Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Food biotechnology*, 1-66.

- De Oliveira, P. Z., de Souza Vandenberghe, L. P., Rodrigues, C., de Melo Pereira, G. V., & Soccol, C. R. (2022). Exploring cocoa pod husks as a potential substrate for citric acid production by solid-state fermentation using *Aspergillus niger* mutant strain. *Process Biochemistry*, 113, 107-112.
- Den Hartogh, D. J., & Tsiani, E. (2019). Antidiabetic properties of naringenin: A citrus fruit polyphenol. *Biomolecules*, 9(3), 99.
- Deng, G. F., Shen, C., Xu, X. R., Kuang, R. D., Guo, Y. J., Zeng, L. S., Gao, L. L., Lin, X., Xie, J.F., Xia, E.Q., Li, S., Wu, S., Chen, F., Ling, W.H., Li, H.B. (2012). Potential of fruit wastes as natural resources of bioactive compounds. *International journal of molecular sciences*, 13(7), 8308-8323.
- Deng, G. F., Xu, X. R., Zhang, Y., Li, D., Gan, R. Y., & Li, H. B. (2013). Phenolic compounds and bioactivities of pigmented rice. *Critical reviews in food science and nutrition*, 53(3), 296-306.
- Di Majo, D., Giammanco, M., La Guardia, M., Tripoli, E., Giammanco, S., & Finotti, E. (2005). Flavanones in Citrus fruit: Structure–antioxidant activity relationships. *Food Research International*, 38(10), 1161-1166.
- Ding, S., Qiu, H., Huang, J., Chen, R., Zhang, J., Huang, B., Zou, X., Cheng, O., Jiang, Q. (2019). Activation of 20-HETE/PPARs involved in reno-therapeutic effect of naringenin on diabetic nephropathy. *Chemico-biological interactions*, 307, 116-124.
- Ding, W. K., & Shah, N. P. (2008). Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. *Int Food Res J*, 15(2), 219-32.
- dos Santos Filho, A. L., Freitas, H. V., Rodrigues, S., Abreu, V. K. G., de Oliveira Lemos, T., Gomes, W. F., ... & Pereira, A. L. F. (2019). Production and stability of probiotic cocoa juice with sucralose as sugar substitute during refrigerated storage. *LWT*, 99, 371-378.
- Drewnowski, A., & Gomez-Carneros, C. (2000). Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. *The American journal of clinical nutrition*, 72(6), 1424-1435.
- Dulong, V., Kouassi, M. C., Labat, B., Le Cerf, D., & Picton, L. (2018). Antioxidant properties and bioactivity of Carboxymethylpullulan grafted with ferulic acid and of their hydrogels obtained by enzymatic reaction. *Food chemistry*, 262, 21-29.
- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). (2013). Scientific Opinion on the safety and efficacy of fumaric acid as a feed additive for all animal species. *EFSA Journal*, 11(2), 3102.
- Elujoba, A. A., & Hardman, R. (1987). Diosgenin production by acid and enzymatic hydrolysis of fenugreek. 58 (5), 299-303.
- Ephrem, E., Najjar, A., Charcosset, C., & Greige-Gerges, H. (2018). Encapsulation of natural active compounds, enzymes, and probiotics for fruit juice fortification, preservation, and processing: An overview. *Journal of Functional Foods*, 48, 65-84.
- Erlund, I. (2004). Review of the flavonoids kuersetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition research*, 24(10), 851-874.
- Escarpa, A., & González, M. C. (2001). Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Analytica Chimica Acta*, 427(1), 119-127.
- Ettinger, G., MacDonald, K., Reid, G., & Burton, J. P. (2014). The influence of the human microbiome and probiotics on cardiovascular health. *Gut microbes*, 5(6), 719-728.

- Fellers, P. J., Carter, R. D., & De Jager, G. (1988). Influence of the ratio of degrees Brix to percent acid on consumer acceptance of processed modified grapefruit juice. *Journal of food science*, 53(2), 513-515.
- Ferreira, L., Afonso, C., Vila-Real, H., Alfaia, A., & Ribeiro, M. H. L. (2008). Debitting of grapefruit juice with naringinase. *Food Technol Biotechnol*, 46, 144-148.
- Ferrentino, G., Plaza, M. L., Ramirez-Rodrigues, M., Ferrari, G., & Balaban, M. O. (2009). Effects of dense phase carbon dioxide pasteurization on the physical and quality attributes of a red grapefruit juice. *Journal of Food Science*, 74(6), E333-E341.
- Fischer, E. (1894). Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 27(3), 2985-2993.
- Flórez, A. B., Álvarez-Martín, P., López-Díaz, T. M., & Mayo, B. (2007). Morphotypic and molecular identification of filamentous fungi from Spanish blue-veined Cabrales cheese, and typing of *Penicillium roqueforti* and *Geotrichum candidum* isolates. *International dairy journal*, 17(4), 350-357.
- Food and Agriculture Organization of United Nations STAT (FAOSTAT). (2018). <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>.
- Food, J., & Agriculture Organization/World Health Organization Working Group. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. *Report of a Joint FAO/WHO: London, ON, Canada*.
- Foster, J. A., & Neufeld, K. A. M. (2013). Gut–brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends in neurosciences*, 36(5), 305-312.
- Fritsch, C., Heinrich, V., Vogel, R. F., & Toelstede, S. (2016). Phenolic acid degradation potential and growth behavior of lactic acid bacteria in sunflower substrates. *Food microbiology*, 57, 178-186.
- Fu, L., Xu, B. T., Xu, X. R., Qin, X. S., Gan, R. Y., & Li, H. B. (2010). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 wild fruits from South China. *Molecules*, 15(12), 8602-8617.
- Fuhr, U., & Kummert, A. L. (1995). The fate of naringin in humans: A key to grapefruit juice-drug interactions?. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 58(4), 365-373.
- Fuller, R. (1989). Pruholics in inall| 1 ‘l mmuals—J. *Appl Bal’IPriol*, 66, 365.
- Funasaki, N. (1993). Gel filtration chromatographic study on the self-association of surfactants and related compounds. *Advances in colloid and interface science*, 43(1), 87-136.
- Gallego Custodio, M. V., Pinaga Otamendi, F., D Vidal, R. A. M. O. N., & Vallés Alventosa, S. (1996). Production and characterization of an *Aspergillus terreus* α -L-rhamnosidase of oenological interest. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 203(6), 522-527.
- Gallego, M.V., Pinaga, F., Ramon, D., Valles, S. (2001) Production and characterization of an *Aspergillus terreus* α -L-rhamnosidase of oenological interest. *J Food Sci* 66, 204–209.
- Gao, Q. F., Ni, H., Li, L. J., Chen, F., Xiao, A. F., & Cai, H. N. (2014). Characterization of extracellular enzymes from *Aspergillus niger* for debittering citrus juice. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 14(4), 156-163.
- Gattuso, G., Barreca, D., Gargiulli, C., Leuzzi, U., & Caristi, C. (2007). Flavonoid composition of citrus juices. *Molecules*, 12(8), 1641-1673.
- Ghanim, H., Sia, C. L., Abuaysheh, S., Korzeniewski, K., Patnaik, P., Marumganti, A., ... & Dandona, P. (2010). An antiinflammatory and reactive oxygen species suppressive

- effects of an extract of *Polygonum cuspidatum* containing resveratrol. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(9), E1-E8.
- Ghose, S., & Kumpalume, P. (2003). Chromatography: the high-resolution technique for protein separation. In *Isolation and Purification of Proteins* (pp. 44-69). CRC Press.
- Giavasis, I., Harvey, L. M., & McNeil, B. (2000). Gellan gum. *Critical reviews in biotechnology*, 20(3), 177-211.
- Gillot, G., Jany, J. L., Poirier, E., Maillard, M. B., Debaets, S., Thierry, A., Coton, E. & Coton, M. (2017). Functional diversity within the *Penicillium roqueforti* species. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 141-150.
- Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges. *Connaissance Vigne Vin*, 18, 253–271.
- González-Barrio, R., Trindade, L. M., Manzanares, P., de Graaff, L. H., Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2004). Production of bioavailable flavonoid glucosides in fruit juices and green tea by use of fungal α -L-rhamnosidases. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(20), 6136-6142.
- González-Temiño, Y., Ruíz, M. O., Ortega, N., Ramos-Gómez, S., & Busto, M. D. (2021). Immobilization of naringinase on asymmetric organic membranes: Application for debittering of grapefruit juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 73, 102-790.
- González-Vallinas, M., González-Castejón, M., Rodríguez-Casado, A., & Ramírez de Molina, A. (2013). Dietary phytochemicals in cancer prevention and therapy: a complementary approach with promising perspectives. *Nutrition reviews*, 71(9), 585-599.
- Gorinstein, S., Haruenkit, R., Park, Y. S., Jung, S. T., Zachwieja, Z., Jastrzebski, Z., ... & Belloso, O. M. (2004). Bioactive compounds and antioxidant potential in fresh and dried Jaffa® sweeties, a new kind of citrus fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(12), 1459-1463.
- Grassi, D., Desideri, G., Croce, G., Tiberti, S., Aggio, A., & Ferri, C. (2009). Flavonoids, vascular function and cardiovascular protection. *Current pharmaceutical design*, 15(10), 1072-1084.
- Gülçin, İ., (2012). Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Archives of Toxicology*, 86, 345-391.
- Gürses, Ö. L. 1977. Gıda ve Enzim. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Bilimi ve Teknolojisi, GIDA, 2(3).
- Habelt, K., Pittner, F. (1983). A rapid method for the determination of naringin, prunin, and naringenin applied to the assay of naringinase. *Analytical Biochemistry*, 134, 393–397.
- Hage, D. S., Anguizola, J. A., Bi, C., Li, R., Matsuda, R., Papastavros, E., Pfaunmiller, E., Vargas, J., Zheng, X. (2012). Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: recent trends and developments. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 69, 93-105.
- Hagen, R. E., Dunlap, W. J., & Wender, S. H. (1966). Seasonal variation of naringin and certain other flavanone glycosides in juice sacs of Texas Ruby Red grapefruit. *Journal of Food Science*, 31(4), 542-547.
- Hall, D. H. (1938). A new enzyme of the glycosidase type. *Nature*, 142(3586), 150-150.
- Hashimoto, W., & Murata, K. (1998). α -L-Rhamnosidase of *Sphingomonas* sp. R1 producing an unusual exopolysaccharide of sphingan. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 62(6), 1068-1074.

- Hashimoto, W., Miyake, O., Nankai, H., & Murata, K. (2003). Molecular identification of an α -L-rhamnosidase from *Bacillus* sp. strain GL1 as an enzyme involved in complete metabolism of gellan. *Archives of biochemistry and biophysics*, 415(2), 235-244.
- Hayes, J. E., Feeney, E. L., Nolden, A. A., & McGeary, J. E. (2015). Quinine bitterness and grapefruit liking associate with allelic variants in TAS2R31. *Chemical senses*, 40(6), 437-443.
- Hedhammar, M., Karlström, A. E., & Hober, S. (2006). Chromatographic methods for protein purification. *Stockholm: Royal Institute of Technology*, 1-31.
- Hendrich, A. B. (2006). Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds 1. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27(1), 27-40.
- Hernández-Aquino, E., & Muriel, P. (2018). Beneficial effects of naringenin in liver diseases: Molecular mechanisms. *World journal of gastroenterology*, 24(16), 1679.
- Hollman, P. C. H., & Arts, I. C. W. (2000). Flavonols, flavones and flavanols—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1081-1093.
- Homayouni, F., Haidari, F., Hedayati, M., Zakerkish, M., & Ahmadi, K. (2018). Blood pressure lowering and anti-inflammatory effects of hesperidin in type 2 diabetes; a randomized double-blind controlled clinical trial. *Phytotherapy Research*, 32(6), 1073-1079.
- Housseiny, M. M., & Aboelmagd, H. I. (2019). Nano-encapsulation of naringinase produced by *Trichoderma longibrachiatum* ATCC18648 on thermally stable biopolymers for citrus juice debittering. *Journal of Microbiology*, 57(6), 521-531.
- <http://www.ars.usda.gov/services/docs.htm?docid=8964>. Accessed January 11 2016.
- Hu, X., Zeng, J., Shen, F., Xia, X., Tian, X., & Wu, Z. (2022). Citrus pomace fermentation with autochthonous probiotics improves its nutrient composition and antioxidant activities. *LWT*, 113076.
- Huang, W., Zhan, Y., Shi, X., Chen, J., Deng, H., & Du, Y. (2017). Controllable immobilization of naringinase on electrospun cellulose acetate nanofibers and their application to juice debittering. *International journal of biological macromolecules*, 98, 630-636.
- Igual, M. G. M. E., García-Martínez, E., Camacho, M. M., & Martínez-Navarrete, N. (2010). Effect of thermal treatment and storage on the stability of organic acids and the functional value of grapefruit juice. *Food Chemistry*, 118(2), 291-299.
- Ivanov, M., Kostić, M., Stojković, D., & Soković, M. (2022). Rosmarinic acid—Modes of antimicrobial and antibiofilm activities of common plant polyphenol. *South African Journal of Botany*, 146, 521-527.
- İmamoğlu, R., Gökçe, İ. 2017. Meyve sularındaki acılığı gidermek için rekombinant olarak naringinaz enziminin üretilmesi. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi.
- İşbilir, Ş.S., 2008. Yaprakları Salata-Baharat Olarak Tüketilen Bazı Bitkilerin Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi. Doktora Tezi. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü Kimya Anabilim Dalı.
- Jang, I. S., & Kim, D. H. (1996). Purification and characterization of α -L-rhamnosidase from *Bacteroides* JY-6, a human intestinal bacterium. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 19(12), 1546-1549.
- Joshi, R., Kulkarni, Y. A., & Wairkar, S. (2018). Pharmacokinetic, pharmacodynamic and formulations aspects of Naringenin: An update. *Life sciences*, 215, 43-56.

- Kähkönen, M. P., & Heinonen, M. (2003). Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(3), 628-633.
- Kalkan Yildirim, H. (2006). Evaluation of colour parameters and antioxidant activities of fruit wines. *International journal of food sciences and nutrition*, 57(1-2), 47-63.
- Karuppaija, S., Kapilan, R., & Vasantharuba, S. (2017). Kinetic Properties of Extracellular Thermophilic Naringinase Produced by *Rhizophus Stolonifer* Isolated from Palmyrah Fruit Pulp. 4(1), 009-018.
- Kaul, T. N., Middleton Jr, E., & Ogra, P. L. (1985). Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *Journal of medical virology*, 15(1), 71-79.
- Keha, E.E., Kufrevioğlu, O.İ. (2004). Biyokimya, Safak Yayınevi, Erzurum.
- Kelebek, H. (2010). Sugars, organic acids, phenolic compositions and antioxidant activity of Grapefruit (*Citrus paradisi*) cultivars grown in Turkey. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 269-274.
- Kelebek, H., Canbas, A., & Selli, S. (2008). Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of blood orange juices obtained from cvs. Moro and Sanguinello (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) grown in Turkey. *Food Chemistry*, 107(4), 1710-1716.
- Kertesz, Z. I. (1930). new method for enzymic clarification of unfermented apple juice.
- Ko, J. A., Ryu, Y. B., Kwon, H. J., Jeong, H. J., Park, S. J., Kim, C. Y., Wee, Y.J., Kim, D., Lee W.S. and Kim, Y.M. (2013). Characterization of a novel steviol-producing β -glucosidase from *Penicillium decumbens* and optimal production of the steviol. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(18), 8151-8161.
- Konak, Ü. İ., Turhan, İ., & Certel, M. (2014). Proteinlerin Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması. *Academic Food Journal/Akademik GIDA*, 12(2), 79-87.
- Konczak, I., & Zhang, W. (2004). Anthocyanins—more than nature's colours. *BioMed Research International*, 2004(5), 239-240.
- Koopen, A. M., Groen, A. K., & Nieuwdorp, M. (2016). Human microbiome as therapeutic intervention target to reduce cardiovascular disease risk. *Current opinion in lipidology*, 27(6), 615-622.
- Koseki, T., Mese, Y., Nishibori, N., Masaki, K., Fujii, T., Handa, T., Yamane Y, Shiono Y, Murayama T, Iefuji H. (2008). Characterization of an α -L-rhamnosidase from *Aspergillus kawachii* and its gene. *Applied microbiology and biotechnology*, 80(6), 1007.
- Koshland, D. E. (1958). Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 44(2), 98-104.
- Köksal, E., Gülçin, İ., Öztürk, S.B., Bursal, E., 2009. On the in vitro antioxidant activity of silymarin. *Journal of Enzym Inhibition Medicine Chemistry*, 24, 395–405.
- Kren V, Martinkova L. 2001. Glycosides in medicine: the role of glycosidic residue in biological activity. *Curr Med Chem* 8:1303–28.
- Kuhnau, J. (1976). Flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. *World review of nutrition and dietetics*. 24,117.
- Kumar, M., Behare, P. V., Mohania, D., Arora, S., Kaur, A., & Nagpal, R. (2009). Health-promoting probiotic functional foods. *Focus Diet. Fibres*, 20, 1-5.
- Kumar, M., Verma, V., Nagpal, R., Kumar, A., Gautam, S. K., Behare, P. V., ... & Aggarwal, P. K. (2011). Effect of probiotic fermented milk and chlorophyllin on gene expressions

- and genotoxicity during AFB1-induced hepatocellular carcinoma. *Gene*, 490(1-2), 54-59.
- Kumar, N., & Pruthi, V. (2014). Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports*, 4, 86-93.
- Kundu, D., Karmakar, S., & Banerjee, R. (2022). Simultaneous debittering and clarification of enzyme mediated mixed citrus juice production. *Applied Food Research*, 2(1), 100031.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature*, London, 227,680.
- Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., ... & Auwerx, J. (2006). Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell*, 127(6), 1109-1122.
- Lavrador, P., Gaspar, V. M., & Mano, J. F. (2018). Bioinspired bone therapies using naringin: applications and advances. *Drug discovery today*, 23(6), 1293-1304.
- Lee, H. S., & Kim, J. G. (2003). Effects of debittering on red grapefruit juice concentrate. *Food Chemistry*, 82(2), 177-180.
- Lee, Y. K., Yuk, D. Y., Lee, J. W., Lee, S. Y., Ha, T. Y., Oh, K. W., Yun, Y.P., Hong, J. T. (2009). (–)-Epigallocatechin-3-gallate prevents lipopolysaccharide-induced elevation of beta-amyloid generation and memory deficiency. *Brain research*, 1250, 164-174.
- Lee, Y. S., & Reidenberg, M. M. (1998). A method for measuring naringenin in biological fluids and its disposition from grapefruit juice by man. *Pharmacology*, 56(6), 314-317.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., Principles of Biochemistry, Worth Publishers, Inc., New York, Second Edition, (2000).
- Lei, S., Xu, Y., Fan, G., Xiao, M., & Pan, S. (2011). Immobilization of naringinase on mesoporous molecular sieve MCM-41 and its application to debittering of white grapefruit. *Applied Surface Science*, 257(9), 4096-4099.
- Li, C., Zhou, J., Du, G., Chen, J., Takahashi, S., & Liu, S. (2020). Developing *Aspergillus niger* as a cell factory for food enzyme production. *Biotechnology Advances*, 107630.
- Li, T., Jiang, T., Liu, N., Wu, C., Xu, H., & Lei, H. (2021). Biotransformation of phenolic profiles and improvement of antioxidant capacities in jujube juice by select lactic acid bacteria. *Food Chemistry*, 339, 127-859.
- Liu, J., Liu, H., & Zeng, Q. (2019). The effect of naringenin on the pharmacokinetics of ibrutinib in rat: A drug–drug interaction study. *Biomedical Chromatography*, 33(5), e4507.
- Liu, Y., Heying, E., & Tanumihardjo, S. A. (2012). History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. *Comprehensive reviews in Food Science and Food safety*, 11(6), 530-545.
- Luo, C., Zou, L., Sun, H., Peng, J., Gao, C., Bao, L., ... & Sun, S. (2020). A review of the anti-inflammatory effects of rosmarinic acid on inflammatory diseases. *Frontiers in pharmacology*, 11, 153.
- Luo, Y. L., Zhang, C. C., Li, P. B., Nie, Y. C., Wu, H., Shen, J. G., & Su, W. W. (2012). Naringin attenuates enhanced cough, airway hyperresponsiveness and airway inflammation in a guinea pig model of chronic bronchitis induced by cigarette smoke. *International immunopharmacology*, 13(3), 301-307.

- Macready, A. L., Kennedy, O. B., Ellis, J. A., Williams, C. M., Spencer, J. P., & Butler, L. T. (2009). Flavonoids and cognitive function: a review of human randomized controlled trial studies and recommendations for future studies. *Genes & nutrition*, 4(4), 227-242.
- Madupu, R., Szpakowski, S., & Nelson, K. E. (2013). Microbiome in human health and disease. *Science progress*, 96(2), 153-170.
- Magario, I., Vielhauer, O., Neumann, A., Hausmann, R., & Syltatk, C. (2009). Kinetic analysis and modeling of the liquid-liquid conversion of emulsified di-rhamnolipids by Naringinase from *Penicillium decumbens*. *Biotechnology and bioengineering*, 102(1), 9-19.
- Mamma, D., Kalogeris, E., Hatzinikolaou, D. G., Lekanidou, A., Kekos, D., Macris, B. J., & Christakopoulos, P. (2004). Biochemical characterization of the multi-enzyme system produced by *Penicillium decumbens* grown on rutin. *Food biotechnology*, 18(1), 1-18.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727-747.
- Mandadi, K., Ramirez, M., Jayaprakasha, G. K., Faraji, B., Lihono, M., Deyhim, F., & Patil, B. S. (2009). Citrus bioactive compounds improve bone quality and plasma antioxidant activity in orchidectomized rats. *Phytomedicine*, 16(6-7), 513-520.
- Maneesai, P., Bunbupha, S., Potue, P., Berkban, T., Kukongviriyapan, U., Kukongviriyapan, V., ... & Pakdeechote, P. (2018). Hesperidin prevents nitric oxide deficiency-induced cardiovascular remodeling in rats via suppressing TGF- β 1 and MMPs protein expression. *Nutrients*, 10(10), 1549.
- Manlan, M., Matthews, R. F., Rouseff, R. L., Littell, R. C., Marshall, M. R., Moye, H. A., & Teixeira, A. A. (1990). Evaluation of the properties of polystyrene divinylbenzene adsorbents for debittering grapefruit juice. *Journal of food science*, 55(2), 440-445.
- Manzanares, P., de Graaff, L. H., & Visser, J. (1997). Purification and characterization of an α -L-rhamnosidase from *Aspergillus niger*. *FEMS microbiology letters*, 157(2), 279-283.
- Manzanares, P., Orejas, M., Gil, J. V., De Graaff, L. H., Visser, J., & Ramón, D. (2003). Construction of a genetically modified wine yeast strain expressing the *Aspergillus aculeatus* rhaA gene, encoding an α -L-rhamnosidase of enological interest. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(12), 7558-7562.
- Manzanares, P., Vallés, S., Ramón, D., & Orejas, M. (2007). α -L-Rhamnosidases: old and new insights. In *Industrial enzymes* pp. 117-140.
- Manzanares, P., van den Broeck, H. C., de Graaff, L. H., & Visser, J. (2001). Purification and Characterization of Two Different α -l-Rhamnosidases, RhaA and RhaB, from *Aspergillus aculeatus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(5), 2230-2234.
- Mao, L.C., Pan, X., Que, F., Fang, X.H., 2006. Antioxidant properties of water and ethanol extracts from hot air-dried and freeze dried daylily flowers. *European Food Research and Technology*, 222, 236–241.
- Maruvada, P., Leone, V., Kaplan, L. M., & Chang, E. B. (2017). The human microbiome and obesity: moving beyond associations. *Cell host & microbe*, 22(5), 589-599.
- Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., & Saarela, M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 173-182.
- Mazzaferro, L. S., Orrillo, G. A., Ledesma, P., & Breccia, J. D. (2008). Dose-dependent significance of monosaccharides on intracellular α -l-rhamnosidase activity from *Pseudoalteromonas* sp. *Biotechnology letters*, 30(12), 2147.

- McMahon, H., Zocklein, B. W., Fugelsang, K., & Jasinski, Y. (1999). Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 23(3), 198-203.
- Metin, M., 2012, Süt Teknolojisi, Ege Üniversitesi Basımevi, 802, İzmir.
- Miake, F., Satho, T., Takesue, H., Yanagida, F., Kashige, N., & Watanabe, K. (2000). Purification and characterization of intracellular α -L-rhamnosidase from *Pseudomonas paucimobilis* FP2001. *Archives of microbiology*, 173(1), 65-70.
- Michlmayr, H., Brandes, W., Eder, R., Schumann, C., Andrés, M., & Kulbe, K. D. (2011). Characterization of two distinct glycosyl hydrolase family 78 α -L-rhamnosidases from *Pediococcus acidilactici*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(18), 6524-6530.
- Miranda, R. F., de Paula, M. M., da Costa, G. M., Barão, C. E., da Silva, A. C. R., Raices, R. S. L., ... & Pimentel, T. C. (2019). Orange juice added with *L. casei*: is there an impact of the probiotic addition methodology on the quality parameters?. *Lwt*, 106, 186-193.
- Miyata, T., Kashige, N., Satho, T., Yamaguchi, T., Aso, Y., & Miake, F. (2005). Cloning, sequence analysis, and expression of the gene encoding *Sphingomonas paucimobilis* FP2001 α -L-rhamnosidase. *Current microbiology*, 51(2), 105-109.
- Mondello, L., Casilli, A., Tranchida, P. Q., Dugo, P., & Dugo, G. (2005). Comprehensive two-dimensional GC for the analysis of citrus essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 20(2), 136-140.
- Mongkolkul, P., Rodart, P., Pipatthitkorn, T., Meksut, L., & Sa-Nguandeeikul, R. (2006). Debittering of tangerine *Citrus reticulata* Blanco juice by β -cyclodextrin polymer. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, 56(1-2), 167-170.
- Mot, C.A., Dumitrescu, S.R., Sarbu, C., 2011. Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH[•] bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV-VIS spectroscopic data. *Journal of Food Composite and Analysis*, 24, 516-522.
- Moulehi, I., Bourgou, S., Ourghemmi, I., & Tounsi, M. S. (2012). Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts. *Industrial Crops and Products*, 39, 74-80.
- Mukund, P., Belur, P. D., & Saidutta, M. B. (2014). Production of naringinase from a new soil isolate, *Bacillus methylotrophicus*: isolation, optimization and scale-up studies. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 44(2), 146-163.
- Multari, S., Carafa, I., Barp, L., Caruso, M., Licciardello, C., Larcher, R., ... & Martens, S. (2020). Effects of *Lactobacillus* spp. on the phytochemical composition of juices from two varieties of *Citrus sinensis* L. Osbeck: 'Tarocco' and 'Washington navel'. *Lwt*, 125, 109205.
- Nagpal, R., & Kaur, A. (2011). Synbiotic effect of various prebiotics on in vitro activities of probiotic lactobacilli. *Ecology of food and nutrition*, 50(1), 63-68.
- Nagpal, R., Kumar, A., & Arora, S. (2010). In vitro probiotic potential of lactobacilli isolated from indigenous fermented milk products. *International Journal of Probiotics & Prebiotics*, 5(2), 105.
- Nagpal, R., Kumar, A., Kumar, M., Behare, P. V., Jain, S., & Yadav, H. (2012). Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS microbiology letters*, 334(1), 1-15.

- Nagpal, R., Kumar, A., Kumar, M., Behare, P. V., Jain, S., & Yadav, H. (2012). Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS microbiology letters*, 334(1), 1-15.
- Nagy, E., Papay, V., Litkei, G., Dinya, Z. (1985). Investigation of the chemical constituents, particularly the flavonoid components, of propolis and populi gemma by the GC/MS method. In: Farkas L, Gabor M, Kallay F, eds. *Flavonoids and Bioflavonoids*. Elsevier. 223–232.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Sada, A., & Orlando, P. (2008). Synbiotic potential of carrot juice supplemented with *Lactobacillus* spp. and inulin or fructooligosaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(13), 2271-2276.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., and Lehninger (2008) *Principles of Biochemistry*, W.H. Freeman and Company, New York.
- Ni, H., Cai, H., Xiao, A., Chen, F., You, Q., & Wang, Y. (2011). Improved purification of α -L-rhamnosidase from *Aspergillus niger* naringinase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(11), 2539-2544.
- Nicolosi, E., Deng, Z. N., Gentile, A., La Malfa, S., Continella, G., & Tribulato, E. (2000). Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(8), 1155-1166.
- Norouzian, D., Hosseinzadeh, A., Inanlou, D. N., & Moazami, N. (2000). Production and partial purification of naringinase by *Penicillium decumbens* PTCC 5248. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(5), 471-473.
- Olthof, M. R., Hollman, P. C., & Katan, M. B. (2001). Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *The Journal of nutrition*, 131(1), 66-71.
- Orejas, M., Ibáñez, E., & Ramón, D. (1999). The filamentous fungus *Aspergillus nidulans* produces an α -L-rhamnosidase of potential oenological interest. *Letters in applied microbiology*, 28(5), 383-388.
- Pachl, P., Škerlová, J., Šimčíková, D., Kotik, M., Křenková, A., Mader, P., ... & Řezáčová, P. (2018). Crystal structure of native α -L-rhamnosidase from *Aspergillus terreus*. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 74(11), 1078-1084.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5(47), 1- 15.
- Pandove, G., Sahota, P., Gupta, N., & Singh, P. (2017). Biotechnological approach for production of fermented debittered blended beverage from Kinnow: Lemon using *Clavispora lusitaniae*. *Vegetos: An International Journal of Plant Research*, 30, 69-75.
- Park, C. M., Kim, G. M., & Cha, G. S. (2021). Biotransformation of flavonoids by newly isolated and characterized *Lactobacillus pentosus* NGI01 strain from kimchi. *Microorganisms*, 9(5), 1075.
- Park, C. M., Kim, G. M., & Cha, G. S. (2021). Biotransformation of Flavonoids by Newly Isolated and Characterized *Lactobacillus pentosus* NGI01 Strain from Kimchi. *Microorganisms*, 9(5), 1075.
- Pascal, M., Perez-Gordo, M., Caballero, T., Escribese, M. M., Lopez Longo, M. N., Luengo, O., ... & Mayorga, C. (2018). Microbiome and allergic diseases. *Frontiers in immunology*, 9, 1584.
- Patel, K., Singh, G. K., & Patel, D. K. (2018). A review on pharmacological and analytical aspects of naringenin. *Chinese journal of integrative medicine*, 24(7), 551-560.

- Patil, M. B., & Dhake, A. B. (2014). Debittering of citrus fruit juice by naringinase of *Penicillium purpurogenum*. *Int. J. Engg. Res. Sci. Tech*, 3(2), 266-270.
- Patil, S. V., Koli, S. H., Mohite, B. V., Patil, R. P., Patil, R. R., Borase, H. P., & Patil, V. S. (2019). A novel screening method for potential naringinase-producing microorganisms. *Biotechnology and applied biochemistry*, 66(3), 323-327.
- Pereira, A. L. F., Feitosa, W. S. C., Abreu, V. K. G., de Oliveira Lemos, T., Gomes, W. F., Narain, N., & Rodrigues, S. (2017). Impact of fermentation conditions on the quality and sensory properties of a probiotic cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) beverage. *Food Research International*, 100, 603-611.
- Perez-Vizcaino, F., & Fraga, C. G. (2018). Research trends in flavonoids and health. *Archives of biochemistry and biophysics*, 646, 107-112.
- Perricone, M., Bevilacqua, A., Altieri, C., Sinigaglia, M., & Corbo, M. (2015). Challenges for the production of probiotic fruit juices. *Beverages*, 1, 95-103. doi: 10.3390/beverages1020095
- Peterson, J. J., Beecher, G. R., Bhagwat, S. A., Dwyer, J. T., Gebhardt, S. E., Haytowitz, D. B., & Holden, J. M. (2006). Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of food composition and analysis*, 19, S74-S80.
- Pimentel, T.C., Madrona, G.S. and Prudencio, S.H. (2015), "Probiotic clarified apple juice with oligofructose or sucralose as sugar substitutes: sensory profile and acceptability", *LWT – Food Science and Technology*, Vol. 62 No. 1, pp. 838-846.
- Pinho-Ribeiro, F. A., Zarpelon, A. C., Fattori, V., Manchope, M. F., Mizokami, S. S., Casagrande, R., & Verri Jr, W. A. (2016). Naringenin reduces inflammatory pain in mice. *Neuropharmacology*, 105, 508-519.
- Pla-Pagà, L., Companys, J., Calderón-Pérez, L., Llauradó, E., Solà, R., Valls, R. M., & Pedret, A. (2019). Effects of hesperidin consumption on cardiovascular risk biomarkers: a systematic review of animal studies and human randomized clinical trials. *Nutrition Reviews*, 77(12), 845-864.
- Pollack, R. M., Barzilai, N., Anghel, V., Kulkarni, A. S., Golden, A., O’Broin, P., ... & Crandall, J. P. (2017). Resveratrol improves vascular function and mitochondrial number but not glucose metabolism in older adults. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 72(12), 1703-1709.
- Porto, M. R. A., Okina, V. S., Pimentel, T. C., Garcia, S., & Prudencio, S. H. (2018). Beet and orange mixed juices added with *Lactobacillus acidophilus*. *Nutrition & Food Science*, 48(1), 76-87.
- Poulsen, M. M., Vestergaard, P. F., Clasen, B. F., Radko, Y., Christensen, L. P., Stødkilde-Jørgensen, H., ... & Jørgensen, J. O. L. (2013). High-dose resveratrol supplementation in obese men: an investigator-initiated, randomized, placebo-controlled clinical trial of substrate metabolism, insulin sensitivity, and body composition. *Diabetes*, 62(4), 1186-1195.
- Prakash, S., Singhal, R. S., & Kulkarni, P. R. (2002). Enzymic debittering of Indian grapefruit (*Citrus paradisi*) juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(4), 394-397.
- Prathyusha, K., & Suneetha, V. (2011). Bacterial pectinases and their potent biotechnological application in fruit processing/juice production industry: a review. *Journal of Phytology*.

- Puri, M. (2012). Updates on naringinase: structural and biotechnological aspects. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(1), 49-60.
- Puri, M., & Banerjee, U. C. (2000). Production, purification, and characterization of the debittering enzyme naringinase. *Biotechnology Advances*, 18(3), 207-217.
- Puri, M., & Kalra, S. (2005). Purification and characterization of naringinase from a newly isolated strain of *Aspergillus niger* 1344 for the transformation of flavonoids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(5), 753-758.
- Puri, M., Banerjee, A., & Banerjee, U. C. (2005). Optimization of process parameters for the production of naringinase by *Aspergillus niger* MTCC 1344. *Process Biochemistry*, 40(1), 195-201.
- Puri, M., Kaur, A., Barrow, C. J., & Singh, R. S. (2011). Citrus peel influences the production of an extracellular naringinase by *Staphylococcus xylosus* MAK2 in a stirred tank reactor. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(3), 715-722.
- Puri, M., Kaur, A., Singh, R. S., & Singh, A. (2010b). Response surface optimization of medium components for naringinase production from *Staphylococcus xylosus* MAK2. *Applied biochemistry and biotechnology*, 162(1), 181-191.
- Puri, M., Kaur, A., Singh, R. S., Schwarz, W. H., & Kaur, A. (2010a). One-step purification and immobilization of His-tagged rhamnosidase for naringin hydrolysis. *Process biochemistry*, 45(4), 451-456.
- Puri, M., Kaur, A., Singh, R., & Kanwar, J. (2008). Immobilized enzyme technology for debittering citrus fruit juices. *Food enzymes: Application of new technologies*, 91-103.
- Puri, M., Marwaha, S. S., & Kothari, R. M. (1996). Studies on the applicability of alginate-entrapped naringinase for the debittering of kinnow juice. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(4), 281-285.
- Qin, C., Li, Y., Niu, W., Ding, Y., Zhang, R., & Shang, X. (2010). Analysis and characterisation of anthocyanins in mulberry fruit. *Czech Journal of Food Sciences*, 28(2), 117-126.
- Qin, L., Zhang, J., & Qin, M. (2013). Protective effect of cyanidin 3-O-glucoside on beta-amyloid peptide-induced cognitive impairment in rats. *Neuroscience Letters*, 534, 285-288.
- Raja Kumar, S., Ramli, M., Suhana, E., Nasir, A., Alimah, N., Ismail, N. H. M., ... & Azlina, N. (2019). Preventive effect of Naringin on metabolic syndrome and its mechanism of action: a systematic review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Rajal, V. B., Cid, A. G., Ellenrieder, G., & Cuevas, C. M. (2009). Production, partial purification and characterization of α -L-rhamnosidase from *Penicillium ulaiense*. *World journal of microbiology and biotechnology*, 25(6), 1025-1033.
- Ramos, S. (2008). Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Molecular nutrition & food research*, 52(5), 507-526.
- Ranganna, S., Govindarajan, V. S., Ramana, K. V. R., & Kefford, J. F. (1983). Citrus fruits—Varieties, chemistry, technology, and quality evaluation. Part II. Chemistry, technology, and quality evaluation. A. Chemistry. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 18(4), 313-386.
- Rani, N., Bharti, S., Krishnamurthy, B., Bhatia, J., Sharma, C., Amjad Kamal, M., Ojha, S., Singh Arya, D. (2016). Pharmacological properties and therapeutic potential of naringenin: a citrus flavonoid of pharmaceutical promise. *Current pharmaceutical design*, 22(28), 4341-4359.

- Rao, A. V., & Agarwal, S. (2000). Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *Journal of the American College of Nutrition*, 19(5), 563-569.
- Rao, A. V., & Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological research*, 55(3), 207-216.
- Rapisarda, P., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Bonina, F., De Pasquale, A., & Saija, A. (1999). Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(11), 4718-4723.
- Redondo, C., Cubero, J., & Melgarejo, P. (2009). Characterization of *Penicillium* species by ribosomal DNA sequencing and BOX, ERIC and REP-PCR analysis. *Mycopathologia*, 168(1), 11-22.
- Reungoat, V., Mouterde, L. M., Chadni, M., Couvreur, J., Isidore, E., Allais, F., ... & Ioannou, I. (2021). Simultaneous extraction and enzymatic hydrolysis of mustard bran for the recovery of sinapic acid. *Food and Bioproducts Processing*, 130, 68-78.
- Ribeiro, I. A., & Ribeiro, M. H. (2008). Kinetic modelling of naringin hydrolysis using a bitter sweet alfa-rhamnopyranosidase immobilized in k-carrageenan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 51(1-2), 10-18.
- Ribeiro, I. A., & Ribeiro, M. H. (2008). Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by a validated HPLC method. *Food Control*, 19(4), 432-438.
- Ribeiro, M. H. (2011). Naringinases: occurrence, characteristics, and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(6), 1883.
- Ribeiro, M. H., Silveira, D., & Ferreira-Dias, S. (2002). Selective adsorption of limonin and naringin from orange juice to natural and synthetic adsorbents. *European Food Research and Technology*, 215(6), 462-471.
- Robinson, M. A., Charlton, S. T., Garnier, P., Wang, X. T., Davis, S. S., Perkins, A. C., Frier, M., Duncan, R., Savage, T.J., Wyatt, D.A., Watson, S.A., Davis, B.G. (2004). LEAPT: lectin-directed enzyme-activated prodrug therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(40), 14527-14532.
- Rodríguez, L. G. R., Gasga, V. M. Z., Pescuma, M., Van Nieuwenhove, C., Mozzi, F., & Burgos, J. A. S. (2021). Fruits and fruit by-products as sources of bioactive compounds. Benefits and trends of lactic acid fermentation in the development of novel fruit-based functional beverages. *Food Research International*, 140, 109854.
- Rodríguez, M. E., Lopes, C. A., Van Broock, M., Valles, S., Ramón, D., & Caballero, A. C. (2004). Screening and typing of Patagonian wine yeasts for glycosidase activities. *Journal of Applied Microbiology*, 96(1), 84-95.
- Rodríguez-Saona, L. E., & Wrolstad, R. E. (2001). Extraction, isolation, and purification of anthocyanins. *Current protocols in food analytical chemistry*, (1), F1-1.
- Ross, S. A., Ziska, D. S., Zhao, K., & ElSohly, M. A. (2000). Variance of common flavonoids by brand of grapefruit juice. *Fitoterapia*, 71(2), 154-161.
- Ruviaro, A. R., Barbosa, P. D. P. M., & Macedo, G. A. (2019). Enzyme-assisted biotransformation increases hesperetin content in citrus juice by-products. *Food Research International*, 124, 213-221.
- Rye CS, Withers SG. 2000. Glycosidase mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* 4:573–80. Scope RK. 1993. Protein purification: principles and practice, 3rd ed. New York: SpringerVerlag. 46–48 p.
- Saldamlı, İ. (1998). Gıda kimyası, Hacettepe Üniv. *Gıda Müh., Ankara*.

- Salehi, B., Fokou, P. V. T., Sharifi-Rad, M., Zucca, P., Pezzani, R., Martins, N., & Sharifi-Rad, J. (2019). The therapeutic potential of naringenin: a review of clinical trials. *Pharmaceuticals*, 12(1), 11.
- Salminen, S. J., Gueimonde, M., & Isolauri, E. (2005). Probiotics that modify disease risk. *The Journal of nutrition*, 135(5), 1294-1298.
- Samimi, S., Ardestani, M. S., & Dorkoosh, F. A. (2021). Preparation of carbon quantum dots-quinic acid for drug delivery of gemcitabine to breast cancer cells. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 61, 102287.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), 287-306.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. C., & Van Dijck, P. W. (2002). On the safety of *Aspergillus niger*—a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(4), 426-435.
- Selkirk, C. (2004). Ion-exchange chromatography. In *Protein Purification Protocols* (pp. 125-131). Humana Press.
- Shah, N. (2001). Functional foods from probiotics and prebiotics. 46-53.
- Shah, N. P. (2001). Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food Technology*, 55(11), 46-53.
- Shanmugam, V., & Yadav, K. D. (1995). Extracellular production of alpha-rhamnosidase by *Rhizopus nigricans*. *Indian journal of experimental biology*, 33(9), 705-707.
- Shanmugaprakash, M., Vinothkumar, V., Ragupathy, J., & Reddy, D. A. (2015). Biochemical characterization of three phase partitioned naringinase from *Aspergillus brasiliensis* MTCC 1344. *International journal of biological macromolecules*, 80, 418-423.
- Shato PP, Kavur N. Characterization of enzyme naringinase and the production of debittered low alcoholic kinnow (*Citrus raticulata blanco*) beverage. *International Journal of Advanced Research* (2015), Volume 3, Issue 6, 1220-1233.
- Shen, J., Wilmot, K. A., Ghasemzadeh, N., Molloy, D. L., Burkman, G., Mekonnen, G., ... & Sperling, L. S. (2015). Mediterranean dietary patterns and cardiovascular health. *Annual review of nutrition*, 35, 425-449.
- Shi, R., Xu, J. W., Xiao, Z. T., Chen, R. F., Zhang, Y. L., Lin, J. B., Cheng, K. L., Wei, G. Y., Li, P. B., Zhou, W. L., Su, W. W. (2019). Naringin and Naringenin Relax Rat Tracheal Smooth by Regulating BKCα Activation. *Journal of medicinal food*, 22(9), 963-970.
- Shori, A. B. (2016). Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. *Food Bioscience*, 13, 1-8.
- Sicari, V., Pellicanò, T. M., Giuffrè, A. M., Zappia, C., Capocasale, M., & Poiana, M. (2018). Physical chemical properties and antioxidant capacities of grapefruit juice (*Citrus paradisi*) extracted from two different varieties. *International Food Research Journal*, 25(5), 1978-1984.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods In Enzymology*, 299, 152-178.
- Soares, N. F. F., & Hotchkiss, J. (1998). Bitterness reduction in grapefruit juice through active packaging. *Packaging Technology and Science*, 11, 9-18.

- Stevens, Y., Rymenant, E. V., Grootaert, C., Camp, J. V., Possemiers, S., Masclee, A., & Jonkers, D. (2019). The intestinal fate of citrus flavanones and their effects on gastrointestinal health. *Nutrients*, 11(7), 1464.
- Stinco, C. M., Fernández-Vázquez, R., Hernanz, D., Heredia, F. J., Meléndez-Martínez, A. J., & Vicario, I. M. (2013). Industrial orange juice debittering: Impact on bioactive compounds and nutritional value. *Journal of Food Engineering*, 116(1), 155-161.
- Sudraud P. (1985). Interpretations des courbes d'absorption des vins rouges. *Ann Technol Agric* 7, 203-208
- Sung, J. H., Gim, S. A., & Koh, P. O. (2014). Ferulic acid attenuates the cerebral ischemic injury-induced decrease in peroxiredoxin-2 and thioredoxin expression. *Neuroscience Letters*, 566, 88-92.
- Suzuki, H. (1962). Hydrolysis of flavonoid glycosides by enzymes (Rhamnodiastase) from Rhamnus and other sources. *Archives of biochemistry and biophysics*, 99(3), 476-483.
- Szutowska, J., Gwiazdowska, D., Rybicka, I., Pawlak-Lemańska, K., Biegańska-Marecik, R., & Gliszczynska-Świgło, A. (2021). Controlled fermentation of curly kale juice with the use of autochthonous starter cultures. *Food Research International*, 149, 110674.
- Talpur, M. K., Talpur, F. N., Balouch, A., Nizamani, S. M., Surhio, M. A., Shah, M. R., ... & Afridi, H. I. (2017). Analysis and characterization of anthocyanin from phalsa (*Grewia asiatica*). *MOJ Food Process Technol*, 5(3), 00127.
- Tanaka, T., Onuma, H., Shigihara, T., Kimura, E., Fukuta, Y., Shirasaka, N., ... & Homma, Y. (2019). Anti-osteoporotic effects of syringic acid and vanilic acid in the extracts of waste beds after mushroom cultivation. *Journal of bioscience and bioengineering*, 128(5), 622-629.
- Tang, R., Yu, H., Qi, M., Yuan, X., Ruan, Z., Hu, C., ... & Liu, Q. (2022). Biotransformation of citrus fruits phenolic profiles by mixed probiotics in vitro anaerobic fermentation. *LWT*, 113087.
- Tapre, A. R., & Jain, R. K. (2014). Pectinases: Enzymes for fruit processing industry. *International Food Research Journal*, 21(2).
- Tayar, M. & Hecer, C., (2013). Gıda Mikrobiyolojisi, Bursa, Dora Basım Yayın Dağıtım Ltd. Şti., 39.
- Thammawat, K., Pongtanya, P., Juntharasri, V., & Wongvithoonyaporn, P. (2008). Isolation, preliminary enzyme characterization and optimization of culture parameters for production of naringinase isolated from *Aspergillus niger* BCC 25166. *Kaestsart J Nat Sci*, 42, 61-72.
- Thomas, D. W., Smythe, C. V., & Labbee, M. D. (1958). Enzymatic Hydrolysis Of Naringin, The Bitter Principle Of Grapefruit a. *Journal of Food Science*, 23(6), 591-598.
- Timmers, S., Konings, E., Bilet, L., Houtkooper, R. H., van de Weijer, T., Goossens, G. H., ... & Schrauwen, P. (2011). Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell metabolism*, 14(5), 612-622.
- Totta, P., Acconcia, F., Leone, S., Cardillo, I., & Marino, M. (2004). Mechanisms of Naringenin-induced Apoptotic Cascade in Cancer Cells: Involvement of Estrogen Receptor α and β Signalling. *IUBMB life*, 56(8), 491-499.
- Tran, A. M., Nguyen, T. B., Nguyen, V. D., Bujna, E., Dam, M. S., & Nguyen, Q. D. (2020). Changes in bitterness, antioxidant activity and total phenolic content of grapefruit juice

- fermented by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Acta Alimentaria*, 49(1), 103-110.
- Uckoo, R. M., Jayaprakasha, G. K., Balasubramaniam, V. M., & Patil, B. S. (2012). Grapefruit (*Citrus paradisi* Macfad) phytochemicals composition is modulated by household processing techniques. *Journal of food science*, 77(9), C921-C926.
- Uçan, F., Akyıldız, A. (2012). Meyve Suyu Sanayiinde Enzimaktik Uygulamalar. *Gıda*, 37(6), 363-370.
- United States Department of Agriculture (USDA), (2015). National nutrient database for standard reference. *Agricultural Research Service. National Agricultural Library*.
- USDA (2017). Citrus: World Markets and Trade, United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service July 2017.
- Vafeiadou, K., Vauzour, D., Lee, H. Y., Rodriguez-Mateos, A., Williams, R. J., & Spencer, J. P. (2009). The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signalling in glial cells and protects against neuroinflammatory injury. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 484(1), 100-109.
- Vanamala, J., Reddivari, L., Yoo, K. S., Pike, L. M., & Patil, B. S. (2006). Variation in the content of bioactive flavonoids in different brands of orange and grapefruit juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(2-3), 157-166. doi: 10.1016/j.jfca.2005.06.002
- Vila-Real, H.; Alfaia, A.J.; Rosa, M.E.; Calado, A.R.; Ribeiro, M.H.L. An innovative sol-gel naringinase bioencapsulation process for glycosides hydrolysis. *Process Biochem.* 2010, 45, 841–850.
- Viswanatha, G. L., Shylaja, H., & Moolemath, Y. (2017). The beneficial role of Naringin-a citrus bioflavonoid, against oxidative stress-induced neurobehavioral disorders and cognitive dysfunction in rodents: A systematic review and meta-analysis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, 909-929.
- Walters, R. R. (1985). Affinity chromatography. *Analytical chemistry*, 57(11), 1099A-1114A.
- Wang, C. Y., Ng, C. C., Su, H., Tzeng, W. S., & Shyu, Y. T. (2009). Probiotic potential of noni juice fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(sup6), 98-106.
- Wang, K., Qi, J., Jin, Y., Li, F., Wang, J., & Xu, H. (2022). Influence of fruit maturity and lactic fermentation on physicochemical properties, phenolics, volatiles, and sensory of mulberry juice. *Food Bioscience*, 101782.
- Wang, N., Li, D., Lu, N. H., Yi, L., Huang, X. W., & Gao, Z. H. (2010). Peroxynitrite and hemoglobin-mediated nitrative/oxidative modification of human plasma protein: effects of some flavonoids. *Journal of Asian natural products research*, 12(4), 257-264.
- Wang, S., Yang, C., Tu, H., Zhou, J., Liu, X., Cheng, Y., Luo, J., Deng, X., Zhang, H., Xu, J. (2017). Characterization and metabolic diversity of flavonoids in citrus species. *Scientific reports*, 7(1), 1-10.
- Wang, Z., Feng, Y., Yang, N., Jiang, T., Xu, H., & Lei, H. (2022). Fermentation of kiwifruit juice from two cultivars by probiotic bacteria: Bioactive phenolics, antioxidant activities and flavor volatiles. *Food Chemistry*, 373, 131-455.
- Webber, H. J. (1967). History and development of the citrus industry. *The citrus industry*, 1-37.

- Whitehurst, R. J., & Van Oort, M. (Eds.). (2010). *Enzymes in food technology*. John Wiley & Sons.
- Whitford, D. (2005). Protein expression, purification and characterization. *Proteins Structure and Function*, 314.
- Wilcox, L. J., Borradaile, N. M., & Huff, M. W. (1999). Antiatherogenic properties of naringenin, a citrus flavonoid. *Cardiovascular drug reviews*, 17(2), 160-178.
- Wojnar, W., Zych, M., & Kaczmarczyk-Sedlak, I. (2018). Antioxidative effect of flavonoid naringenin in the lenses of type 1 diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 108, 974-984.
- Wu, C., Li, T., Qi, J., Jiang, T., Xu, H., & Lei, H. (2020). Effects of lactic acid fermentation-based biotransformation on phenolic profiles, antioxidant capacity and flavor volatiles of apple juice. *Lwt*, 122, 109064.
- Wu, G. A., Terol, J., Ibanez, V., López-García, A., Pérez-Román, E., Borredá, C., Domingo, C., Tadeo, F.R., Caballero, J., Alonso, R., Curk F., Du, D., Ollitrault, P., Roose, M.L., Dopazo, J., Gmitter, F.G., Rokhsar, D.S., Talon, M.(2018). Genomics of the origin and evolution of Citrus. *Nature*, 554(7692), 311-316.
- Wu, J. C., Lai, C. S., Lee, P. S., Ho, C. T., Liou, W. S., Wang, Y. J., & Pan, M. H. (2016). Anti-cancer efficacy of dietary polyphenols is mediated through epigenetic modifications. *Current opinion in Food science*, 8, 1-7.
- Wu, Y., Li, S., Tao, Y., Li, D., Han, Y., Show, P. L., ... & Zhou, J. (2021). Fermentation of blueberry and blackberry juices using *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus* and *Bifidobacterium bifidum*: Growth of probiotics, metabolism of phenolics, antioxidant capacity in vitro and sensory evaluation. *Food chemistry*, 348, 129083.
- Wunpathe, C., Potue, P., Manesai, P., Bunbupha, S., Prachaney, P., Kukongviriyapan, U., ... & Pakdeechote, P. (2018). Hesperidin suppresses renin-angiotensin system mediated NOX2 over-expression and sympathoexcitation in 2K-1C hypertensive rats. *The American Journal of Chinese Medicine*, 46(04), 751-767.
- Xia, X. K., Zhang, Y. E., Lei, S. J., Hu, B., & Fu, C. X. (2021). Identification and iterative combinatorial mutagenesis of a new naringinase-producing strain, *Aspergillus tubingensis* MN589840. *Letters in Applied Microbiology*, 72(2), 141-148.
- Xu, G., Liu, D., Chen, J., Ye, X., Ma, Y., & Shi, J. (2008). Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food chemistry*, 106(2), 545-551.
- Xu, M. S., Chen, S., Wang, W. Q., & Liu, S. Q. (2013). Employing bifunctional enzymes for enhanced extraction of bioactives from plants: flavonoids as an example. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(33), 7941-7948
- Yadav, V., Yadav, P. K., Yadav, S., & Yadav, K. D. S. (2010). α -L-Rhamnosidase: a review. *Process Biochemistry*, 45(8), 1226-1235.
- Yanai, T., & Sato, M. (2000). Purification and characterization of an α -L-rhamnosidase from *Pichia angusta* X349. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 64(10), 2179-2185.
- Yang, G. W., Jiang, J. S., & Lu, W. Q. (2015). Ferulic acid exerts anti-angiogenic and anti-tumor activity by targeting fibroblast growth factor receptor 1-mediated angiogenesis. *International journal of molecular sciences*, 16(10), 24011-24031.
- Yazdi, S. E., Prinsloo, G., Heyman, H. M., Oosthuizen, C. B., Klimkait, T., & Meyer, J. J. M. (2019). Anti-HIV-1 activity of quinic acid isolated from *Helichrysum mimetes* using

NMR-based metabolomics and computational analysis. *South African journal of botany*, 126, 328-339.

- Ye, X. (2017). *Phytochemicals in citrus: Applications in functional foods*. CRC Press.
- Yoon, K. Y., Woodams, E. E., & Hang, Y. D. (2004). Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria. *Journal of microbiology*, 42(4), 315-318.
- Yoshino, J., Conte, C., Fontana, L., Mittendorfer, B., Imai, S. I., Schechtman, K. B., ... & Klein, S. (2012). Resveratrol supplementation does not improve metabolic function in nonobese women with normal glucose tolerance. *Cell metabolism*, 16(5), 658-664.
- Young, N. M., Johnston, R. A., & Richards, J. C. (1989). Purification of the α -L-rhamnosidase of *Penicillium decumbens* and characterisation of two glycopeptide components. *Carbohydrate research*, 191(1), 53-62.
- Yu, H., Gong, J., Zhang, C., & Jin, F. (2002). Purification and characterization of ginsenoside- α -L-rhamnosidase. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 50(2), 175-178.
- Yuasa, M., Shimada, A., Matsuzaki, A., Eguchi, A., & Tominaga, M. (2021). Chemical composition and sensory properties of fermented citrus juice using probiotic lactic acid bacteria. *Food Bioscience*, 39, 100810.
- Yusof, S., Ghazali, H. M., & King, G. S. (1990). Naringin content in local citrus fruits. *Food Chemistry*, 37(2), 113-121.
- Zeng, W., Jin, L., Zhang, F., Zhang, C., & Liang, W. (2018). Naringenin as a potential immunomodulator in therapeutics. *Pharmacological research*, 135, 122-126.
- Zhang, J. (2007). Flavonoids in Grapefruit and commercial grapefruit juices: concentration, distribution, and potential health benefits. In *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 120, 288-294.
- Zhang, L., Song, L., Zhang, P., Liu, T., Zhou, L., Yang, G., Lin, R., Zhang, J. (2015). Solubilities of naringin and naringenin in different solvents and dissociation constants of naringenin. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 60(3), 932-940.
- Zhang, P., Dai, K. R., Yan, S. G., Yan, W. Q., Chen, D. Q., & Xu, Z. W. (2009). Effects of naringin on the proliferation and osteogenic differentiation of human bone mesenchymal stem cell. *European Journal of Pharmacology*, 607(1-3), 1-5.
- Zhang, W., Cao, Y., Xu, L., Gong, J., & Sun, M. (2015). A laboratory exercise for visible gel filtration chromatography using fluorescent proteins. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 43(1), 33-38.
- Zhang, Y. H., Ru, Y., Jiang, C., Yang, Q. M., Weng, H. F., & Xiao, A. F. (2020). Naringinase-catalyzed hydrolysis of naringin adsorbed on macroporous resin. *Process Biochemistry*, 93, 48-54.
- Zhao, Z., Jin, G., Ge, Y., & Guo, Z. (2019). Naringenin inhibits migration of breast cancer cells via inflammatory and apoptosis cell signaling pathways. *Inflammopharmacology*, 27(5), 1021-1036.
- Zhu, Y., Jia, H., Xi, M., Li, J., Yang, L., & Li, X. (2017). Characterization of a naringinase from *Aspergillus oryzae* 11250 and its application in the debitterization of orange juice. *Process Biochemistry*, 62, 114-121.
- Zhu, Y., Jia, H., Xi, M., Xu, L., Wu, S., & Li, X. (2017). Purification and characterization of a naringinase from a newly isolated strain of *Bacillus amyloliquefaciens* 11568 suitable for the transformation of flavonoids. *Food chemistry*, 214, 39-46.

Zverlov, V. V., Hertel, C., Bronnenmeier, K., Hroch, A., Kellermann, J., & Schwarz, W. H. (2000). The thermostable α -L-rhamnosidase RamA of *Clostridium stercorarium*: biochemical characterization and primary structure of a bacterial α -L-rhamnoside hydrolase, a new type of inverting glycoside hydrolase. *Molecular microbiology*, 35(1), 173-179.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Arzu İMECE
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Karayazı lisesi
Lisans:	Atatürk Üniversitesi
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi
Doktora:	Atatürk Üniversitesi
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	
Almanca:	-
Rusça:	-
Diğer	
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
Tezden Üretilmiş Yayınlar	