



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKER BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

KOZAN YERLİ PORTAKALININ OLGUNLAŞMASI SÜRESİNCE
AROMA MADDELERİ VE BAZI ENZİM AKTİVİTELERİNDEKİ
DEĞİŞİMLERİN BELİRLENMESİ

Canan COŞKUN
YÜKSEK LİSANS



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKER BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

KOZAN YERLİ PORTAKALININ OLGUNLAŞMASI SÜRESİNCE
AROMA MADDELERİ VE BAZI ENZİM AKTİVİTELERİNDEKİ
DEĞİŞİMLERİN BELİRLENMESİ

Canan COŞKUN
YÜKSEK LİSANS

DANIŞMAN
Doç. Dr. Aysun Şener GEDÜK

ADANA 2021

Bu tezde yer alan tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik davranışa uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu beyan ederim. Ayrıca, bu kuralların ve davranışların gerektirdiği şekilde bu çalışmaya özgün olmayan tüm bilgiler için atıf verdiğimi ve kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

[İmza]

Canan COŞKUN

ÖZET

KOZAN YERLİ PORTAKALININ OLGUNLAŞMASI SÜRESİNCE AROMA MADDELERİ VE BAZI ENZİM AKTİVİTELERİNDEKİ DEĞİŞİMLERİN BELİRLENMESİ

Canan COŞKUN

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Aysun ŞENER GEDÜK

Ocak 2021, 60 sayfa

Bu çalışmada Akdeniz Bölgesi'nin önemli portakal çeşitlerinden biri olan Kozan Yerli portakal çeşidinde; yeşil, yeşil-sarı ve sarı olgunluk dönemlerindeki aroma profili belirlenmiş, bu olgunluk dönemlerinde β -glikozidaz ve alkol dehidrogenaz enzimlerinin spesifik aktiviteleri hesaplanarak serbest aroma maddeleri ile ilişkisi saptanmıştır. Kozan Yerli portakal suyu örneklerinde HS-SPME/GC-MS yöntemi ile 3 farklı olgunluk döneminde 14 monoterpen, 9 seskiterpen, 25 aromatik hidrokarbon, 10 aldehit, 2 yüksek alkol, 3 keton, 8 fenol bileşiği, 1 uçucu asit olmak üzere toplam 73 uçucu aroma bileşeni tespit edilmiştir. Sarı portakallardaki toplam uçucu aroma maddesi miktarının, yeşil portakallardaki toplam uçucu madde miktarının 3,5 katına ulaştığı belirlenmiştir. Son olgunluk döneminin en baskın serbest aroma bileşenleri l- limonen, valensen, α terpinolen, beta osimen, beta fellandren olarak kaydedilmiştir.

β -glikozidaz ve alkol dehidrogenaz enzimleri spesifik aktivite değerleri yeşil portakal örneklerinde en yüksek iken; yeşil- sarı portakal örneklerinde büyük oranda azalmış, sarı portakal örneklerinde ise kısmi azalış göstererek en düşük düzeye ulaşmıştır. Olgunlaşma dönemleri süresince bu enzimlerin tanımlanan uçucu aroma maddeleri miktarının artışına belirgin bir katkıda bulunmadığı olasıdır.

Anahtar Kelimeler: Kozan yerli ; portakal; uçucu aroma maddeleri; β -glikozidaz; alkol dehidrogenaz; olgunlaşma; GC/MS-FID

ABSTRACT

DETERMINATION OF CHANGES IN VOLATILE AROMA COMPOUNDS AND SOME ENZYME ACTIVITIES DURING THE MATURATION OF TURKISH cv. KOZAN ORANGE Canan COŞKUN

M.Sc., Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Aysun ŞENER GEDÜK

January 2020, 60 pages

In this study, the aroma profile of cv. Kozan yerli orange one of the most important orange varieties in the Mediterranean Region was determined in green, green-yellow and yellow maturity periods, the specific activities of β -glucosidase and alcohol dehydrogenase enzymes were calculated during these maturity periods and their relationship with free volatile compounds was determined. A total of 73 different volatile aroma components, including 14 monoterpenes, 9 sesquiterpenes, 25 aromatic hydrocarbons, 10 aldehydes, 2 high alcohol, 3 ketones, 8 phenol compounds and 1 volatile acid were detected in Kozan yerli orange juice samples by the HS-SPME / GC-MS method. It was determined that the total amount of volatile aroma compounds in yellow oranges reached 3.5 times of the total amount of volatile aroma components in green oranges. The most dominant free volatile components of last maturity period were recorded as l-limonene, valencene α terpinolene, beta ocimene, beta phellandrene.

While the specific activity of β -glucosidase and alcohol dehydrogenase enzymes were the highest level in green orange samples; it decreased substantially in the green-yellow orange samples, and reached the lowest level by showing a partial decrease in the yellow orange samples. These enzymes are probably not significant contributors to the increase in the amount of volatile aroma compounds identified during the ripening periods in Kozan yerli orange.

Keywords: cv. Kozan ; orange; volatile aroma compounds; β -glucosidase; alcohol dehydrogenase; maturation; GC/MS-FID

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni destekleyen, kendisi ile çalışma fırsatı tanıyan, engin bilgi ve tecrübesi ile bana yol gösteren, çalışma boyunca katkılarıyla beni yönlendiren, bilime yaklaşımını, başarı ve anlayışını örnek aldığım değerli danışman hocam Doç. Dr. Aysun ŞENER GEDÜK'e teşekkürlerimi sunarım.

Jüri üyesi olarak tezimi değerlendiren Prof. Dr. Haşim KELEBEK ve Doç. Dr. Adnan BOZDOĞAN'a

Öğrencilik hayatım boyunca ve laboratuvar çalışmalarım sırasında destek ve yardımlarını bir an olsun esirgemeyen yapıcı yaklaşımıyla hayata farklı bir açıdan bakmamı sağlayan hocam Dr.Selin YABACI KARAOĞLAN'a

Yüksek lisans eğitimim için beni teşvik eden bütün bir süreçte desteğini hissettiğim arkadaşım elektrik elektronik mühendisi Buğra ATALAY'a, tez çalışmamın düzenlenmesinde katkı ve desteğini esirgemeyen arkadaşım Şeref Can SERİN'e

Tez materyalim olan Kozan Yerli portakalını belirli periyotlarla temin etmemi sağlayan ve yardımlarını gördüğüm Esra ve Teoman ÖZDOĞAN'a

Hayat boyu maddi manevi desteklerini ve hoşgörülerini gördüğüm aile büyüklerim Ayşe ve Mustafa BULUT'a ; annem, babam ve kardeşime sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez 18332007 projesi numarası ile numarası ile Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Yüksek lisans projemizi destekleyerek uygun şekilde yürütülmesini sağlayan Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi BAP birimine ve çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
TABLolar LİSTESİ	x
KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
2.1. Türkiye’de Portakal Üretimi, Tüketimi ve Ağaç Sayısı	4
2.2. Portakal Meyve Yapısı.....	5
2.3. Meyvede Olgunlaşma Parametreleri	6
2.4. Meyvelerde Bulunan Aroma Bileşenleri, Aroma Bileşenlerinin Sentezlenmesi ve Tanımlanması	8
2.5. Portakalda Bulunan Uçucu Aroma Bileşikleri.....	10
2.5.1. Aldehitler ve Ketonlar	13
2.5.2. Alkoller.....	14
2.5.3. Terpenler.....	14
2.5.4. Esterler.....	15
2.6. Aroma Maddeleri İle İlgili Enzimler.....	15
2.6.1. Glikozidazlar (EC 3.2.1.21)	15
2.6.2. Alkol Açıl Transferaz (EC 2.3.1.84)	16
2.6.3. Alkol Dehidrogenaz (EC 1.1.1.1).....	17
2.6.4. Lipoksijenaz (EC 1.13.11.12).....	17
2.6.5. Hidroperoksit Liyaz (EC 4.1.2.92).....	18
2.6.6. Keto Açıl Coa Tiyoiaz (EC 2.3.1.16).....	19
2.6.7. Terpen Sentaz (EC 4.2.3.20)	19
2.6.8. Karotenoid Dioksijenaz (EC 1.13.11.51)	20
2.7. β -Glikozidaz Enzimi Mekanizması ve Özellikleri	20
2.8. ADH Enzimi Mekanizması ve Özellikleri.....	21
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	22

3.1. Serbest Aroma Maddeleri Ekstraksiyonu ve Tayini.....	24
3.1.1. Serbest Aroma Maddeleri Ekstraksiyonu ve Tayini için HS-SPME Koşulları..	24
3.1.2. Çalışma koşullarının seçimi ve optimizasyonu	25
3.1.3. Serbest Aroma Maddeleri Ekstraksiyonu ve Tayin Yöntemi.....	25
3.1.4. Protein Analizi.....	26
3.2. β -glikozidaz Ekstraksiyonu ve Aktivitesinin Ölçümü	27
3.2.1. β -glikozidaz Ekstraksiyonu	27
3.2.2. β -glikozidaz Aktivitesinin Ölçümü	27
3.3. ADH Ekstraksiyonu ve Aktivitesi Ölçümü	28
3.3.1. ADH Ekstraksiyonu.....	28
3.3.2 ADH Aktivitesi Ölçümü.....	30
3.4. İstatistiksel Analiz	30
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	30
4.1. Serbest Aroma Maddelerine İlişkin Bulgular.....	30
4.2. β -glikozidaz Aktivitesi Ölçümü Bulguları	38
4.3. ADH Aktivitesi Ölçümü Bulguları.....	41
5. SONUÇ	45
KAYNAKLAR.....	47
ÖZGEÇMİŞ	59

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Portakal Meyve Kesiti	5
Şekil 2.2.	Alkol dehidrogenaz enzimi faaliyeti	21
Şekil 3.1.	Kozan Yerli Portakal çeşidinin üç farklı olgunlukta dalında görünüşü	22
Şekil 3.2.	Kozan Yerli Portakal çeşidinin sırasıyla üç olgunluk seviyesindeki dış görünüşü ve kesiti.....	23
Şekil 3.3.	Aroma maddelerinin miktarının tespiti ve tanımlanması için kullanılan “Agilent 7890B” marka alev iyonlaşma dedektörlü (FID) gaz kromatografisi (GC) ve “Agilent 5977A MSD” kütle spektrometresi.....	26
Şekil 3.4.	β -glikozidaz enzimi ile p-nitrofenol- β -D-glikopiranozid hidrolizi	27
Şekil 3.5.	Analizlerde kullanılan Agilent Cary60 UV-VIS marka spektrofotometre.....	28
Şekil 3.6.	Absorbans ölçümü için hazırlanan örnekler.....	28
Şekil 4.1.	Kozan yerli portakal suyu örneğinin üçüncü olgunluk döneminde uçucu aroma bileşenlerinin GC-MS kromatogramı	35

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Türkiye’de 2019 yılı portakal ağaç sayısı ve üretim miktarı verileri (TUIK, 2019).....	5
Tablo 2.2. Portakalda Bulunan Uçucu Aroma Bileşikleri Kimyasal Formülleri ve Aroma Profili.....	12
Tablo 3.1 Kozan Yerli Portakalının olgunlaşma düzeyi ile değişen meyve çapı, meyve ağırlığı ve meyve suyu verimi ortalama değerleri.....	23
Tablo 4.1. Kozan yerli portakal suyu örneklerinin farklı olgunluk dönemlerindeki uçucu aroma bileşenlerinin miktarları ($\mu\text{g L}^{-1}$)	32
Tablo 4.2. Bazı portakal çeşitlerinde GC/MS ve GC-FID ile belirlenen uçucu aroma bileşenleri ve miktarları ($\mu\text{g L}^{-1}$) (Maccarone vd., 1998; Selli ve Kelebek, 2011*; Selli, Cabaroğlu ve Canbas, 2004**; Kelebek ve Selli, 2011***)	37
Tablo 4.3. Olgunlaşma boyunca Kozan yerli portakal çeşidinde β -glukozidaz enziminin spesifik aktivite (ünite/mgprotein) değişimi.....	39
Tablo 4.4. Olgunlaşma boyunca Kozan yerli portakal çeşidinde ADH enziminin spesifik aktivite (U/mgprotein) değişimi	41

KISALTMALAR

AAT	: Alkol Açıl Transferaz
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ADH	: Alkol Dehidrogenaz
CCD	: Karotenoid Dioksijenaz
DVB/CAR/PDMS	: divinylbenzene carboxen polydimethylsiloxane
GC-MS-FID	: Alev İyonlaşma Dedektörlü Gaz Kromatografisi
HPL	: Hidroperoksit Liyaz
HS	: Headspace (Tepe Boşluğu)
LOX	: Lipoksijenaz
LRI	: Alıkonma indeks değeri
RT	: Retention time/alıkonma zamanı
SPME	: Katı Faz Mikroekstraksiyon
THMF	: Keto Açıl Coa Tiyolaz

1. GİRİŞ

Turunçgiller dünya çapında yetiştirilen önemli meyve grupları arasında yer almaktadır. Tür ve çeşit olarak zengin oluşu, turunçgil meyvelerin ağaçta kalabilme sürelerinin uzun olması gibi nedenlerle de önemini daha da arttırmaktadır (Çimen, 2011).

Turunçgillerin dünyada oldukça geniş kullanım alanına sahip olmalarında besin değeri, tat, aroma ve kendilerine özgü tekstür ve renk gibi özellikleri etkilidir (Turhan vd., 2006). Turunçgillerin Rutaceae familyası, Citrus cinsinden olduğu; Çin ve Hindistan kökenli ağaççık şeklinde çift çenekli bitkiler olduğu bilinmektedir (Kaygısız ve Aybak, 2005). Dünyada en çok yetiştirilen turunçgiller; portakal (*Citrus sinensis*), mandarin (*Citrus reticulata*), limon (*Citrus limon*), altıntop (*Citrus paradisi*), turunç (*Citrus aurantium*) ve bergamot (*Citrus bergami*)'tur (Mendilcioğlu, 1996; Kaygısız ve Aybak, 2005). Turunçgil türlerinin kökenini ağaç kavunu (*Citrus medica*), mandarin (*Citrus reticulata*), şadok (*Citrus maxima*) adı verilen üç ana türün oluşturduğunu ve diğer türlerin bu temel türler arasındaki değişimlerle meydana geldiği belirtilmiştir (Barrett ve Rhodes 1976; Federici vd., 1998; Nicolosi vd, 2000; Barkley vd., 2006; Uzun vd., 2013).

Tarım ve Orman Bakanlığı verilerine göre Türkiye’de 2018 yılında toplam 3.758.1000 meyve veren ağaçtan 4.902.052 ton turunçgil üretimi yapılmış olup, Doğal bir mandarin ve şadok melezi olan portakal (Scora, 1975; Barrett ve Rhodes, 1976; Uzun vd, 2013) üretimi ise 13150000 meyve veren ağaçtan 1900000 ton olarak kaydedilmiştir. Ülkemiz portakal üretim payı yine Tarım ve Orman Bakanlığı verilerine göre oransal olarak il bazında değerlendirildiğinde sırasıyla Antalya (%28), Adana (%22) ve Hatay (%17) büyük oranda üretiminin gerçekleştirildiği illerdir. TÜİK’in 2019 yılı Bitkisel Üretim İstatistikleri verilerine göre 2019 yılı Türkiye’de portakal üretimi geçmiş sezona göre %11 düşüş göstererek, 1,70 milyon ton olarak gerçekleşmiştir.

Dünya çapında, meyve sebze pazarı oldukça önemli bir paya sahiptir ve organoleptik niteliklerin kalitesi, tüketim düzeyinde önemli bir konuyu temsil etmektedir. Bu kalite, genellikle olgunlaşma sürecinde koordine edilen spesifik metabolik yollarla ilişkili olan tatlılık, asitlik, aroma, renk ve sertlik gibi birçok özellik ile ilgilidir. Bu niteliklerin gelişimi, çeşitlilik, yetiştirme koşulları, hasat aşaması ve depolama koşulları gibi birçok faktöre

bağlıdır. Örneğin renk, tüketici algısını ve kabulünü etkileyen narenciye kalitesinde önemli bir özelliktir. Narenciye çeşitleri arasında oluşan meyve çeşitliliği büyük oranda karotenoid bileşimi ile doğrudan ilişkilidir (Kato, 2012; Rodrigo vd., 2013). Aroma, bir meyvenin kalitesi, doku ve rengi gibi satın almada tüketicinin değerlendirdiği en önemli kriterlerden biridir. Ticari olarak ve beslenme açısından büyük öneme sahip olan narenciyelerin aroma profillerinin de araştırılması gereklidir. Şimdiye kadar, turuçgillerin aroma profilini inceleyen bir çok araştırma yapılmıştır. Aroma bileşenlerinin meyvelerde olgunlaşma süreci boyunca farklılık gösterdiği bilinmektedir. Olgunlaşma döneminde meyvelerde oluşan renk, yumuşaklık, aroma, sertlik derecesi gibi meyvenin biyokimsal ve fiziki yapısını etkileyen değişimlerde hidrolitik enzimlerin etkili olduğu bilinmektedir. Hücre duvarındaki yapısal bileşenleri etkileyen hidrolitik enzimler hücre duvarını modifikasyona uğratarak meyvelerin yumuşamasına yol açmaktadır. Wong, (2003) meyvelerde hücre duvarı parçalayan değişimlerde β -glikozidaz (β -D-glikozid glikohidrolaz EC 3.2.1.21)'ın da etkili olduğunu bildirmiştir.

ADH ise bazı sebzelerin yeşil kokulu olarak adlandırılan bileşenleri olan belirli altı karbonlu alkollerin hekzanol, E-2-hekzenol ve Z-3-hekzenol biyosentezden sorumludur (Salas ve Sánchez, 1998).

Gıda piyasasında mevcut olan, gerek hammadde gerek son ürün olarak yetiştirilen ve satışa sunulan çok sayıda meyve ve sebze çeşidinde, aroma bağlantılı uçucu maddelerle ilgili genler ve enzimler tat ve aroma çeşitleri odaklı yetiştiricilik programlarını destekleyici çalışmalara kaynak sağlamaktadır. Gıdaların işlenmesi sırasında proses koşullarını optimize edebilmek, istenilen özellikleri ortaya çıkarıp istenmeyen özellikleri baskılamak için enzimlerin aktivitelerinden faydalanılmalıdır. Gıda işleme prosesinde hangi işlem aşamasında enzimin gıdaya ekleneceği veya aromaya ilişkin en verimli sonuçların hangi enzim aktivitesiyle sağlanacağı yukarıda bahsedilen enzimlerin aroma ile ilgileri arasındaki korelasyon ile tespit edilebilir.

Böylece günümüz tüketim toplumunda meyve sebze tüketicileri şeker oranı, asitlik, sertlik ve renk gibi geleneksel kalite özelliklerinin yanı sıra besin öğeleri, antioksidan miktarı ve aroma gibi diğer özelliklere de önem verdiklerinden aroma ile ilişkili enzimler alanındaki gelişmeler istenen ve istenmeyen tat ve aroma maddelerinin kontrol altına alınması konusunda ve sebze

meyve işlemede enzim kullanımı alanında gelişme sağlanmasına katkıda bulunacaktır. (Perez-Cacho ve Rouseff, 2008).

Portakal serbest aroma bileşiklerince zengin bir meyvedir. Kozan Yerli portakalının olgunlaşması süresince serbest aroma maddeleri ve β -glikozidaz, alkol dehidrogenaz enzimlerinin aktivitelerindeki değişimlerin belirlenmesi üzerine yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada Kozan Yerli portakalında üç farklı olgunlaşma döneminde serbest aroma maddeleri profili belirlenmiş ve bu olgunlaşma dönemlerinde β -glikozidaz ve alkol dehidrogenaz enzimlerinin aktiviteleri hesaplanarak serbest aroma maddeleri ile ilişkisi saptanmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Türkiye’de Portakal Üretimi, Tüketimi ve Ağaç Sayısı

Ülkemizde 1980 yılında portakal üretimi 679.000 ton iken, 2016 yılında 1.700.000 ton civarında olmuştur (FAO, 2016). Üretimi bölgesel olarak sınıflandırığımızda en büyük pay %83 ile Akdeniz bölgesindedir ve üretimin geri kalanı, %16 ile Ege Bölgesi’nden karşılanmaktadır. Öte yandan bölgesel bazdaki yaklaşımdan il bazında bir yaklaşıma geçecek olursak üretim yoğunluğuna göre Antalya, Adana, Hatay, Mersin ve Muğla illeri toplam üretimin %96’sını karşılamıştır.

TÜİK verilerine göre; kişi başı portakal tüketimi 2015/2016 sezonunda 15,8 kg , 2016/2017 sezonunda 14,2 kg olarak gerçekleşmiştir. Akdeniz Bölgesi Portakal üretimi; 2016/2017 üretim sezonunda 1,85 milyon ton olarak gerçekleşmiş olup, Adana (%24) Türkiye’de en önemli ikinci portakal üreticisi olan il olarak kayda geçmiştir. Türkiye portakal üretimi önceki sezona göre %5 oranında artarak, 2017 yılında toplam 1,95 milyon ton olarak kaydedilmiş olup, Adana %21 üretim oranı ile yine ülke genelinde ikinci sırada yer almaktadır (Tarımsal Ekonomi Ve Politika Geliştirme Enstitüsü (Tepge), 2019).

Portakallar meyvenin morfolojik karakterlerine göre dört gruba ayrılmaktadırlar. Bunlar; göbekli portakallar, normal portakallar, kan portakalları ve şeker portakallarıdır. Washington ve Yafa cinsleri dışında kalan portakal çeşitleri toplam üretimi 430.279 ton olup üretiminin 233.588 tonu Adana’da yapıldığından Çukurova bölgesi ve Adana ili portakal üretim hacmi açısından önemlidir.

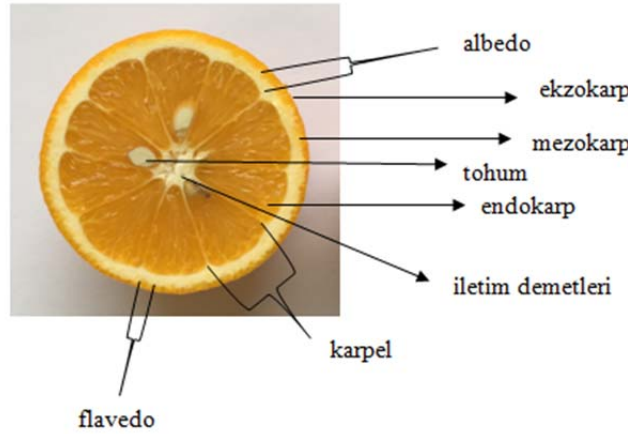
Kozan Yerli portakalı Türkiye’de özellikle Adana ilinin Kozan ilçesi çevresinde yetiştirilen yerli bir çeşittir. Meyvelerin dış görünüşü yuvarlak, meyve kabuğu orta kalınlıkta ve yüzeyi pürüzlüdür. Ortalama 8 çekirdeği vardır. Meyve eti turuncu renkli olup, meyve suyu verimi yüksek ve kuru maddece zengindir. Bu nedenle Türkiye’de sanayiye yönelik en önde gelen çeşitlerden biridir. Meyve verimi bir yıl yüksek bir yıl düşüktür ve meyveler orta geç mevsimde olgunlaşır.

Tablo 2.1. Türkiye’de 2019 yılı portakal ağaç sayısı ve üretim miktarı verileri (TUIK, 2019)

	Washington Portakal	Yafa Portakal	Diğer Portakallar
Meyve Veren Yaşta Ağaç Sayısı (adet)	9.246.743	518.552	3.219.945
Meyve Vermeyen Yaşta Ağaç Sayısı (adet)	457.280	28.635	380.030
Toplu Meyveliklerin Alanı(dekar)	348.361	17.540	136.563
Verim (Kg/Meyve Veren Ağaç)	134	110	125
Üretim Miktarı (Ton)	1.242.000	57.000	401.000

2.2. Portakal Meyve Yapısı

Portakal meyvesi tüketim aşamasına gelene kadar fiziksel ve kimyasal bir dizi değişikliğe uğramaktadır. Şekil 2.1’de görüldüğü gibi,hasat olgunluğuna ulaşmış portakal meyvesi farklı kısımlardan oluşmaktadır. Bu bölümlere flavedo, albedo, karpel, iletim demetleri ve tohumlar denir.Bu bölümler meyvenin olgunlaşma dönemleri boyunca değişim göstermektedir.



Şekil 2.1. Portakal Meyve Kesiti

Portakalın kendine özgü tadını oluşturan aroma bileşenleri daha çok meyve suyu kesecikleri ve flavedo kısımlarından elde edilmektedir.Flavedo, kromoplastları ve yağ keselerini içeren portakal kabuğunun dışındaki renkli tabakadır. Bu yağ keseleri, portakal kabuğu yağının kaynağıdır. Albedo, kabuğun iç beyaz kısmıdır ve doğası gereği süngerimsi bir yapıdadır. Daha çok meyve suyu kesecikleri veya posası olarak bilinen karpeller, ince cidarlı meyve suyu kesecikleri ve tohumları içerir. Tohumlar ticari olarak, narenciye tohumu yağı kaynağıdır. Karpelleri iletim demetleri ve çekirdekten ayıran lifli zarlar dilim zarı olarak adlandırılır. Albedo, dilim zarı, posa ve tohumların tümü, meyve suyu ekstraksiyonu sırasında

portakal aşırı sıkılırsa meyve suyuna geçebilecek acı bileşikler içerir (Kealey ve Kinsella 1979).

2.3. Meyvede Olgunlaşma Parametreleri

Narenciye ürünleri, benzersiz görünüm, organoleptik ve beslenme özellikleri sergileyen farklı türler ve çeşitlerle temsil edilir. Ancak, meyvelerin farklı çeşitleri, her çeşit için olgunlaşma indekslerini ve hasat süresini belirlemek için kritik faktörler olan büyüme, gelişme ve olgunlaşma sırasında ortak mekanizmaları ve birçok biyokimyasal yolu paylaşır. Hasat zamanı tespiti zorludur ve narenciye yetiştirme alanlarına ve pazar gereksinimlerine bağlıdır.

Gıda ve Tarım Örgütü'ne (FAO) göre, Çin, Brezilya, ABD, Hindistan, Meksika ve İspanya, küresel üretimin yaklaşık üçte ikisini temsil eden dünyanın önde gelen narenciye üreten ülkeleri iken AB, ABD, Rusya, Kanada, Çin ve Japonya ana hedef pazarlardır. Bu nedenle, yüksek kalitede ürünü meyve pazarlarına sağlamak için, meyve hasadı kararı üretici ülkelerin iklim koşulları, tarım ve hasat sonrası uygulamaları ile tüketici ülkeler veya müşteriler tarafından belirlenen standartlar arasında bir orta yol bulma ile sağlanır (Lado, 2014).

Olgunlaşma sırasında, meyve yapısında birçok değişiklik olur; Bunlar arasında pigmentlerin sentezi ve degradasyonu, organik asit ve şeker konsantrasyonlarındaki değişiklikler ve uçucu bileşiklerin birikimi sayılabilir. Bu değişiklikler, tüketicinin görünüm, doku ve lezzet içeren genel kalite algısına katkıda bulunur. Olgunlaşma düzeyinin belirlenmesinde bazı kriterler önem taşımaktadır. Dış meyve kalitesi ile ilgili olarak, kabuk renginin meyve lezzetliliği ile yüksek oranda ilişkili olduğu bulunmuştur (Sites vd., 1949,1950).

Turunçgillerin büyümesi ve gelişmesi sırasında şeker ve pigmentler birikirken, asit içeriği de azalmakta, olgunlaşma sırasında farklı şeker / asit oranları saptanmaktadır ve bu oran çoğunlukla ana bir olgunluk endeksi olarak kullanılmaktadır. Meyvenin bitkide daha uzun süre kalması durumunda, asit konsantrasyonu artan şeker birikimi ile belirgin bir şekilde azalır ve daha sonra meyvenin tipik tadı kaybolur, çürümeye daha yatkınlaşır (El-Otmani ve Zacarías, 2014).

Olgunlaşma sırasında toplam çözünebilir katı madde içeriği meyve kalitesinin çok pratik bir endeksi ve yetiştiricilerin genellikle nesnel olarak olgunluğu ölçmek için başka ekipmana

ihtiyaç duymadan hasat kararını vermede kesin ölçüttür. Bu ölçüm, portatif bir refraktometrenin kolaylıkla kullanılabileceği ve alandaki meyve olgunluğunun doğru bir şekilde ölçülmesini sağladığı için, narenciye yetiştiricileri arasında olgunluk endeksi için uzun süredir kullanılmaktadır (Davies ve Albrigo, 1994).

Meyve suyu miktarı da olgunlaşma süreciyle ilgilidir, çünkü meyve suyu miktarı tam olgunlukta maksimum değere ulaşır ve daha sonra azalır. Ticari olgunluk ile fiziksel olgunluğun farklılık göstereceği göz önünde bulundurulduğunda boyut veya ağırlık gibi diğer kolay ölçülebilir parametreler, genellikle meyve olgunluğunun iyi göstergeleri değildir; fakat meyve ticaretinde ve pazarlanabilirlikte çok önemli kalite parametreleridir. Belirli bir çeşitlilik için, karakteristik meyve büyüklüğü ve ağırlığı, bitkinin beslenme durumu ve tarımsal uygulamalarla daha fazla ilişkilidir ve bu nedenle, meyve olgunluğu ile doğrudan ilişkili değildir (Davies ve Albrigo, 1994).

İklim koşulları, olgunlaşma, bölge ve işleme tekniği işlenmiş ürünlerde ve meyvelerde genellikle düşük miktarlarda bulunan uçucu bileşiklerin konsantrasyonunu etkileyen başlıca etkenlerdir (Riu-Aumatell vd., 2004). Meyvelerde olgunlaşma süresince serbest aroma maddeleri miktarı ve enzim aktivitesinin değişkenlik göstermesi aroma ve enzimlerle ilgili bir çok çalışmaya konu olmuştur. Bağlı halde bulunan aroma maddeleri asit hidrolizi ile veya enzimatik yolla serbest duruma geçebilmektedir. Turunçgillerin uçucu bileşenleri taze meyve tüketicileri ve türevleri tarafından algılanan aroma ve lezzetten sorumludur ve buna ek olarak, bu uçucuların bazıları koku, ilaç ve zirai kimyasalların üretiminde endüstriyel olarak değerlidir.(Loza ve Tavera, 1999)

Valencia portakalı üzerine yapılan araştırmada sezonunun ortasından sonuna kadar yani Nisan ve Mayıs aylarında hasat edilen portakallar optimum çözünebilir katılar/titre edilebilir asitlik oranına sahip yüksek kaliteli meyve suyu ve daha iyi uçucu aroma maddesi profili için tercih edilebileceği saptanmıştır. Erken hasat edilen meyvenin meyve suyu verimi yüksektir, ancak aynı zamanda istenmeyen acı ve ekşi bileşikler ve düşük seviyelerde uçucu bileşen seviyeleri vardır. Optimal kaliteye ulaştıktan sonra, turunçgil benzeri aromaları temsil eden monoterpen bileşikler kabuk yağı ile birlikte azalmıştır, ancak meyveli kokuya sahip etil esterler sürekli olarak artmıştır (Bai vd., 2016).

2.4. Meyvelerde Bulunan Aroma Bileşenleri, Aroma Bileşenlerinin Sentezlenmesi ve Tanımlanması

Belirli bir aroma oluşumu yüzlerce farklı uçucu bileşenin ortak etkisi sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu bileşiklerin her birinin aroma profiline katkısı farklı düzeylerde olup, en çok sebze ve meyve çeşitlerinde aroma bileşeni bulunmaktadır. Lezzet bileşimi, şekerlerin, asitlerin ve uçucu bileşiklerin karışımlarının birincil rol oynadığı, kompleks bir özellik olarak tanımlanmıştır.

İnsanların meyve ve sebzelerde tanıyabildiği dört temel tada (tatlı, ekşi, tuzlu ve acı) ek olarak, aroma, tüketicinin son ürün kabulü üzerinde önemli bir etkiye sahiptir.

Meyve aromasını oluşturan çok çeşitli uçucu bileşikler üzerinde yapılan araştırmalar, alkoller, aldehitler ve esterlerin çeşitli meyvelerde yaygın olduğu görülen ana kimyasal gruplar olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Meyvenin aroması, alkoller, aldehitler ve esterler dahil olmak üzere çok sayıda uçucu bileşiğin karmaşık bir karışımı ile belirlenir. Meyve gelişimi sırasında, özellikle olgunlaşma sırasında, bu metabolitlerin sentezi, taşınması veya bozunması nedeniyle birçok değişiklik meydana gelir. Uçucuların konsantrasyonlarındaki değişiklikler aromayı etkileyebilir. Nispeten düşük konsantrasyonlarda, asetaldehit, etanol, etil asetat ve etil butirat, meyve aromasını artırabilir (Pesis vd., 1989).

Meyvelerin uçucu profilleri çeşidine, olgunluğa, hasat öncesi ve sonrası çevresel koşullara ve kullanılan analitik yöntemlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

Elma, kavun, muz, mango (*Mangifera indica*) ve papayada (*Carica papaya*) olgunlaşmada bulunan başlıca uçucu bileşenler alkoller, aldehidler ve özellikle esterlerdir (Beaulieu ve Grimm, 2001; Dixon ve Hewett, 2000; Zabetakis ve Holden, 1997). Elma ve kavunda benzer olarak, çileklerin uçucu profiline katkıda bulunabilecek 300'den fazla bileşik tanımlanmıştır. Çilek lezzetini oluşturan temel bileşenler arasında asitler, esterler, aldehitler, alkoller ve terpenler yer alır (Zabetakis ve Holden, 1997).

Diğer katkıda bulunan bileşikler ise kükürt bileşikler, asetaller, furanlar, fenoller, epoksitler ve hidrokarbonlardır. Bunlar arasında, metil, etil ester, furanonlar, C6 -bileşik aldehytler ve C6 türevli bileşiklerin, çilek aromasından sorumlu anahtar lezzet bileşikler olduğu düşünülmektedir (Pelayo vd., 2003; Schieberle ve Hofmann, 1997; Zabetakis ve Holden, 1997; Zabetakis, Gramshaw ve Robinson, 1999).

Çeşitli meyvelerde (elma, kavun ve armut) sentezlenen esterler, ilgili asit (C2–C8 asitleri) ve alkolün bağlanmasıyla enzimatik olarak oluşmaktadır. Elma aroması profiline katılan esterlerin çoğu, bir dizi enzim aracılı aşamada lipidlerden veya amino asit öncülerinden biyosentezlenir (Sanz vd., 1997). Ek olarak, ester biyosentezinin alkol konsantrasyonu ile sınırlı olduğu düşünülmektedir, çünkü alkol varlığının belirli bir kültivar içinde nihai aroma profilini değiştirebileceği gösterilmiştir (Berger ve Drawert, 1984).

Hekzenal, hekzenol, (E) -2-hekzenal, 3 (Z) -hekzenal, (E) -2-hekzenol ve 3 (Z) -hekzenol, taze yeşil bir karakter vermek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Tijet vd., 2000). Çeşitli ticari meyve sularının (armut, kayısı ve şeftali) uçucu profilleri tepe boşluğu-katı faz mikro ekstraksiyonu ve gaz kromatografisi / kütle spektrometrisi (HS-SPME ve GC / MS) ile belirlenmiş kolay ve ucuz bir prosedür olmakla birlikte bu yöntemin, çok çeşitli aroma bileşiklerinin (97 esterler, aldehytler, alkoller, terpenoidler, laktonlar ve izopren türevleri) analiz ettiği, ayrıca uçucu bileşikler vasıtasıyla, organik ve geleneksel üretimin suları ile tatlandırıcılar eklenmiş meyve suları arasında ayırım yapmanın mümkün olabileceği belirtilmiştir (Riu-Aumatell, Castellari, López-Tamames, Galassi ve Buxaderas, 2004).

Üç farklı Satsuma mandarin çeşidinden Guoqing 1, Miyagawa Wase ve Owari'nin meyve aroması GC-MS ile kombine edilen headspace katı faz mikro ekstraksiyonu (HS-SPME) ile araştırılmış; sonuçlar, üç çeşitte 73, 71 ve 66 aroma bileşeni olduğunu göstermiştir. Üç çeşitte toplam 29 bileşenin ağırlıklı olarak bulunduğu, ayrıca Guoqing 1, Miyagawa Wase ve Owari'nin sırasıyla 12, 5 ve 2 tane daha önce saptanmamış bileşene sahip olduğu bulunmuştur. Kilit aroma bileşenleri, üç meyvede limonen, linalool, γ -terpinen, p-mirsen, α -pinen ve oktanaldır. Guoqing 1, Miyagawa Wase ve Owari'den daha fazla kilit aroma bileşiği içerdiği belirtilmiştir (Yu, Xie, Zhang, Zhou ve Pan, 2007).

2.5. Portakalda Bulunan Uçucu Aroma Bileşikleri

Portakal suyu aromasına başlıca katkıda bulunanlar, ekstraksiyon sırasında meyve suyuna giren flavedo keselerinde (kabuk yağı) bulunan bazı yağda çözünür terpenler ve terpenoidlerdir; diğer lipofilik veya suda çözünür bileşenler endokarpın veziküllerinde bulunur (Nagy ve Shaw, 1990).

Portakalda bulunan uçucu aroma bileşikleri; terpenler, hidrokarbonlar, aldehitler, esterler ve alkollerdir. Portakal suyunda toplam ağırlığın %0.02'sini oluşturan aroma bileşiklerinin %75-98'lik kısmını hidrokarbonlar (özellikle d-limonen), %1-5 lik kısmını alkoller, 0.6–1.7'lik kısmını aldehitler, %1'erlik kısımlarını ise esterler ve ketonlar oluşturmaktadır (Sizer, Waugh, Edstam ve Ackermann, 1988). Portakal suyu aromasının başlıca bileşenleri asetaldehit, sitral, etil bütirat, limonen, linalol, oktanal ve α -pinendir (Ahmed vd.,1978). Oktanal ve dekanal portakal suyunda önemli aroma bileşikleridir (Arctander, 1969). Portakalların karakteristik aroması, asiklik alkoller ve aldehitlerin birbirlerine dönüşümü ile üretilen kabuk bileşenlerinden kaynaklanır. Portakal kabuğu yağı, bu monoterpenlerde d-limonenin olgun portakallarda aromanın suda çözünmeyen kısmının %90'ından fazlasını oluşturması nedeniyle yüksektir. (Attaway vd.,1968 ; Potty ve Bruemmer,1970). Terpen bileşenleri turuncgillerde her yerde bulunur, ancak ana seskiterpen olarak valencenin varlığı portakal yağını diğer turuncgil yağlarından ayırır (Attaway ve Oberbacher, 1968).

Feng vd. 2017 yılında yaptıkları çalışmada başlıca Valensiya portakal sularında koku aktif uçucu bileşenlerin ;Etil asetat, etil propanoat, α -pinen, etil butanoat, etil 2-metilbutanoat, hekzanal, (Z)-3-hekzenal, mirsen, limonen, β -felandren, etil hekzanoat, γ -terpinen, oktanal, 1-okten-3-on, ,6-metil-5-hepten-2-on, 1-hekzanol, 4-merkapt-4-metilpentan-2-on, Nonanal,(E) -2-oktenal, etil oktanoat, 1-okten-3-ol, Methional, sitronelal, α -kopaen, dekanal, (E) -2-nonenal, linalol, β -elemen,D-karvon, Perilil aldehit, β -damaskenon, geraniol, perilil asetat olduğunu belirtmiştir.

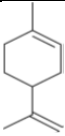
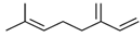
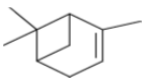
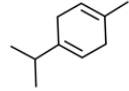
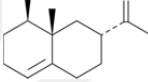
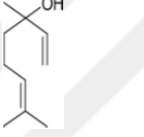
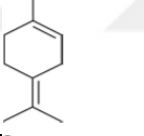
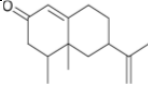
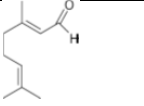
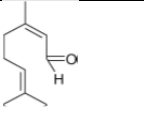
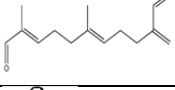
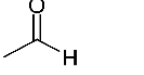
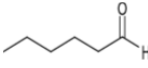
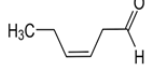
Portakal suyu aroması üzerinde etkili olan bazı bileşikler; Hekzanal, hekzanol, α -pinen , β -mirsen, DL-limonen, Linalol, α -tepineol α -sinensal (Ahmed vd., 1978), 4-vinil- guaiakol, 4-vinil-fenol, Vanilin, β -sitronelol (Berlinet vd., 2007), geraniol, (Guth vd., 1997), β -sinensal (+)-Notkaton olarak belirtilmiştir(Engel vd., 2002).

Xiao vd., tarafından 2017 yılında yapılan başka bir çalışmada mandalina suyu örneklerinin türlerinin karakteristik aroma bileşiklerini araştırmak için GC – MS (gaz kromatografisi – kütle spektrometresi), GC – O (gaz kromatografisi – olfaktometri) analizi ve duyuşal değerlendirme başarılı bir şekilde kullanılmıştır. GC – MS verisine göre toplam 47 uçucu bileşik tanımlanmıştır. Mandalina suyu örnekleri, duyuşal özellikler ve uçucu maddeler arasındaki ilişkiler saptanmıştır. Ayrıca, GC – O analizine göre esterler, alkoller, aldehytler, ketonlar ve monoterpenler dahil 36 aroma aktif bileşik tespit edilmiş ve koku aktivite değerine göre 29 uçucu bileşik önemli koku kaynağı olarak tespit edilmiştir.

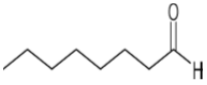
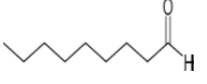
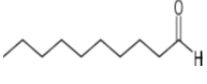
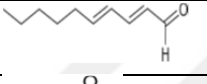
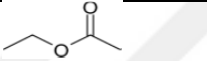
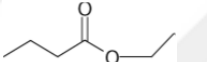
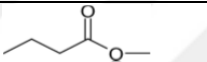
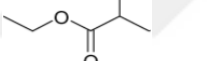
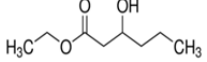
Portakal sularının uçucu aroma bileşiklerinin karakterizasyonunda üç dinamik ve statik headspace gaz kromatografisi tekniğı kullanılarak; taze ekstrakte edilmiş portakalların ve taze, ticari pastörize edilmemiş portakal suyunun aroma profilleri incelenmiş, büyük oranlarda ester ve aldehyt içeren sırasıyla 62 ve 55 aroma bileşiğı tespit edilmiştir. Sulandırılan portakal suyu örneklerinde ise, esas olarak terpenler olmak üzere yalnızca 41 ve 34 aroma bileşiğı tanımlanmıştır (Bylaite ve Meyer, 2006).

Çeşitli çalışmalardan derlenen başlıca portakal suyu uçucu aroma bileşenleri, kimyasal formülleri ve meydana getirdikleri aroma profili ile aşağıda Tablo 2.2’de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Portakalda Bulunan Uçucu Aroma Bileşikleri Kimyasal Formülleri ve Aroma Profili

Bileşen	Aroma	Kimyasal Formülü	Kaynak
limonen	Narenciye, limon, nane		(Hinterholzer ve Schieberle, 1998; Tonder vd., 1998; Bazemore vd., 1999; Buettner ve Schieberle, 2001; Rouseff vd., 2001; Rega vd., 2003; Arena vd., 2006)
β myrcene	Yosunlu, küflü, sardunya		Hinterholzer ve Schieberle, 1998; Tonder vd., 1998; Buettner ve Schieberle, 2001; Rega vd., 2003; Mahattanatawee vd., 2005; Mahattanatawee vd., 2005; Arena vd., 2006)
α pinen	Reçine, çam ağacı, eterik		(Hinterholzer ve Schieberle, 1998; Tonder vd., 1998; Buettner ve Schieberle, 2001; Rega vd., 2003; Arena vd., 2006)
γ terpinen	Tatlı, narenciye		(Perez-Cacho ve Rouseff, 2008)
valencene	Limon, çiçek		(Kealey ve Kinsella 1979; Perez-Cacho ve Rouseff, 2008)
linalool	Çiçeksi, meyveli, tatlı		Marin vd., 1992; Hinterholzer ve Schieberle, 1998; Tonder vd., 1998; Buettner ve Schieberle, 2001; Rega vd., 2003; Mahattanatawee vd., 2005; Arena vd., 2006)
α terpineol	Limon, nane, çam		Rega vd., 2003; Mahattanatawee vd., 2005 ; Arena vd., 2006)
nootkatone	Greyfurt, yeşil		(Hinterholzer ve Schieberle, 1998; Mahattanatawee vd., 2005)
geranial	Narenciye, nane, yeşil		(Marin vd., 1992; Mahattanatawee vd., 2005)
neral	Narenciye, limon, nane		Marin vd., 1992; Tonder vd., 1998; Mahattanatawee vd., 2005)
β sinensal	turunçgil, meyveli		(Perez-Cacho ve Rouseff, 2008)
asetaldehit	ferah, meyveli, rahatlatıcı		(Buettner ve Schieberle, 2001; Rega vd., 2003; Mahattanatawee vd., 2005)
hekzenal	Çimenli, yeşil, sabunlu		Hinterholzer ve Schieberle, 1998; Tonder vd., 1998; Buettner ve Schieberle, 2001; Rega vd., 2003; Mahattanatawee vd., 2005; Arena vd., 2006)
(Z) -3-hekzenal	Yeşil, çimenli		(Plotto, Margaria, Goodner ve Baldwin, 2008)

Tablo 2.2. devamı

oktanal	çiçeksi, turuncgil, yeşil		(Hinterholzer ve Schieberle, 1998; Tonder vd., 1998; Bazemore vd., 1999; Buettner ve Schieberle, 2001; Rouseff vd., 2001; Rega vd., 2003; Mahattanatawee vd., 2005; Arena vd., 2006)
nonanal	Narenciye, çiçek, sabunlu		(Hinterholzer ve Schieberle, 1998; Tonder vd., 1998; Bazemore vd., 1999; Buettner ve Schieberle, 2001; Rega vd., 2003; Mahattanatawee vd., 2005; Arena vd., 2006)
dekanal	Narenciye, yağlı, yeşil		(Hinterholzer ve Schieberle, 1998; Buettner ve Schieberle, 2001; Rouseff vd., 2001; Rega vd., 2003; Mahattanatawee vd., 2005; Arena vd., 2006)
(E,E)-2,4-dekadienal	Yağlı, mumsu, yeşil		Hinterholzer ve Schieberle, 1998; Buettner ve Schieberle, 2001; Mahattanatawee vd., 2005)
etil asetat	Meyveli, rahatlatıcı		(Tonder vd., 1998; Buettner ve Schieberle, 2001)
etil butanoat	Meyveli, ananas		(Marin vd., 1992; Tonder vd., 1998; Bazemore vd., 1999; Buettner ve Schieberle, 2001; Rega vd., 2003; Mahattanatawee vd., 2005; Arena vd., 2006)
metil butanoat	Meyveli, kızılçık - çilek		(Rega vd., 2003; Arena vd., 2006)
etil 2-metilbütanoat	Meyveli		(Buettner ve Schieberle, 2001; Rouseff vd., 2001; Mahattanatawee vd., 2005)
etil 3-hidroksiheksanoat	Narenciye		(Plotto, Margaría, Goodner ve Baldwin, 2008)

2.5.1. Aldehitler ve Ketonlar

Bir süredir aldehitlerin portakal aromasında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Toplam aldehit değerleri, ticari olarak 20 yıldan fazla bir süredir portakal yağı kalitesinin bir indeksi olarak kullanılmaktadır (Kealey ve Kinsella, 1979). Bununla birlikte, toplam aldehitler ve aroma kalitesi arasındaki ilişki için genelleme yapmak güçtür ; çünkü tüm aldehitler tüm konsantrasyonlarda pozitif olarak katkıda bulunmaz.. Aldehitler, taze portakal suyunda yüksek konsantrasyonda bulunur, ancak kimyasal olarak çok reaktif oldukları için, konsantrasyonları termal işlem后会 sonra değişir. Portakal suyunda, dört farklı tür koku aktif aldehit bulunabilir: bunlar doymuş alifatik aldehitler, doymamış alifatik aldehitler, terpenik aldehitler ve fenolik aldehitlerdir. Terpenik ve doymuş alifatik aldehit fraksiyonları neredeyse yalnızca kabuk yağından kaynaklanır ve meyvemsi (turuncgil benzeri) ve yeşil notalar verirken doymamış alifatik aldehitler portakal suyuna yeşil / yağlı / metalik kokular katar (Perez-Cacho ve Rouseff, 2008). Asetaldehit, taze portakal suyunda bulunan başlıca uçucu

aldehittir. Ek deneyler, taze sıkılmış portakal suyunun taze, keskin koku kalitesine önemli bir katkıda bulunduğunu göstermektedir (Ahmed vd, 1978; Buettner ve Schieberle, 2001)

Ticari portakal suyundaki yüksek keton konsantrasyonları da ısıtılma işlemin göstergesi olabilir (Averbeck ve Schieberle 2009). Schmutzer vd., (2016) yaptıkları çalışmada taze sıkılmış portakal suyu, ticari olarak işlenmiş portakal suyu ve portakal nektarı örneklerinde toplam keton konsantrasyonları belirlemişlerdir. Toplam keton konsantrasyonunun, işlenmemiş taze elle sıkılmış portakal suyu örneklerinde düşük olduğu tespit edilmiştir.

2.5.2. Alkoller

Alkol fermantasyonunun son aşamasında asetaldehit indirgenmesi ile, daha küçük aldehitler üreten doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ve ardından bunların alkollere indirgenmesi ile, normal yağ asidi metabolizması ile veya amino asitlerin dönüşümü ile oluşabilirler. (E) - Hexen-2-ol ve (Z) -Hexen-3-ol, en önemli alifatik alkollerdir ve taze sıkılmış portakal suyunun yeşil ve odunsu kokusuna katkıda bulunur (Shaw, 1991).

2.5.3. Terpenler

Terpenler doğada, esas olarak bitkilerde uçucu yağların bileşenleri olarak yaygındır. İzopren birimlerinden oluşurlar ve döngüsel, açık zincirli, doymuş, doymamış, oksitlenmiş vb. olabilirler. Bu bileşiklerin biyo-dönüşümü, gıda aroması endüstrisindeki uygulamalar için potansiyel olarak önemli bir alandır. Terpenler arasında, linalool, nerol, geraniol ve sitronellol, düşük duyuşal eşikleri nedeniyle aroma açısından en aktif olanlardır. (Longo ve Sanromán 2006).

Terpenler, portakal suyunun tadına önemli ölçüde katkıda bulunur (Cerdán-Calero, Sandra ve Sentandreu 2012). Portakal suyundaki baskın lezzet bileşenleri terpenlerdir ve portakal suyu örneklerinde en önemli terpen bileşeni DL-Limonen, ardından valencene olarak belirtilmiştir (Qiao vd., 2008; Kelebek ve Selli 2011)

Fan, Lu, Yao, Zhang, Wang, ve Pan (2009) çalışmalarında; portakal suyunda toplam konsantrasyonun% 91'ini oluşturan 17 terpen bulmuşlar ve D-Limonen, toplam uçucu bileşiklerin% 74'ünü temsil ettiği için portakal suyundaki baskın bileşik olarak belirtmişlerdir. Portakal suyunda bağlı uçucu bileşiklerin konsantrasyonu çok yüksek

olmadığı ve çoğunun serbest formda olmadığı tespit edilmiştir. Sadece etil 3-hidroksiheksanoat ve cis-karveol, hem serbest hem de bağlı formlarda bulunmuş, bu salınan bağlı uçucuların portakal suyu aromasında sınırlı bir rol oynayabileceği belirtilmiştir.

2.5.4. Esterler

Esterler, portakal dahil birçok meyvenin aroma profilinin önemli bir kategorisidir. (Perez-Cacho ve Rouseff, 2008). Buna göre, toplam ester konsantrasyonu, portakal sularının kalitesinin önemli bir ölçüsü olarak bildirilmiştir(Ahmed vd., 1978). Esterler, bozulmamış meyvede Açıl-CoA varlığında sentezlenir. Bununla birlikte, meyve suyu sıkma sırasında yumuşatıldığında, hidrolaz enzimlerinin etkisiyle bazı esterlerin konsantrasyonları azalır (Belitz vd., 2004). Etil bütanoat, portakal suyundaki en yoğun kokulardan biridir ve en önemli esterdir. Diğer tüm esterlerin toplamından çok veya daha fazla katkıda bulunur. Etil bütanoat, geç Hamlin, orta ve geç Valensiya, Pera, Navelina, Moro, Tarocco ve Washington Navel sularında bulunmuştur ve artan meyve olgunluğuyla konsantrasyonu artar (Kealey ve Kinsella, 1979; Buettner ve Schieberle, 2001; Rega vd., 2003; Arena vd., 2006)

‘Salustiana’ ve ‘Navelina’ portakal çeşitlerinde geleneksel ve organik yöntem yetiştiriciliğinin aroma profilinin karşılaştırıldığı çalışmada her iki çeşitte de en önemli ester etil butanoat ve ardından metil butanoat (‘Salustiana’ çeşidi) veya etil heksanoat (‘Navelina’ çeşidi) olarak belirtilmiştir. (Cuevas vd.,2017).

2.6. Aroma Maddeleri İle İlgili Enzimler

Enzimler, geleneksel gıda işlemeye göre verimli, güvenli ve çevre dostu bir alternatif olarak gıda endüstrisinde uygulanabilen biyokatalizörlerdir. Gıda işleme yardımcıları olarak kullanımlarının yanı sıra enzimler, hem arzu edilen hem de istenmeyen etkilerini ortaya çıkardıkları gıdalarda doğal olarak mevcuttur. Aşağıda gıdalarda doğal olarak bulunan bazı önemli enzimler ve bu enzimlerin katalizlediği reaksiyonlara değinilmiştir.

2.6.1. Glikozidazlar (EC 3.2.1.21)

Sistemik adı β -D-glikozid glikohidrolaz (EC 3.2.1.21) olan β glikozidazlar oligosakkaritlerdeki veya diğer glukoz bileşiklerindeki β -glukozid bağlarını hidroliz edebilen enzimlerdir (Esen, 1993). İndirgeyici olmayan D-glikoz kalıntısını ve terminal aglikonunu serbest bırakmak için D-glikozit bağının hidrolizini katalize eder. Glikozidazların

özelliklerinin temel olarak aroma maddelerinin serbest bırakılmasındaki rolleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Glikozidik aroma öncüler bitkinin farklı kısımlarında olduğu gibi: yeşil kısımlar, kökler, rizomlar ve tohumlarında bulunmaktadır(Winterhalter ve Skouroumounis, 1997).Bitki dokularında, aroma bileşiği uçucu olmayan şeker konjugatları olarak bağlanır. Şeker parçası genellikle glikoz (O- β -D-glukozitler) içerir, ancak pentoz, heksoz, disakkarit ve trisakkarit gibi başka glikonlar da vardır (Winterhalter ve Schreier, 1994).Glikozitlerin aglikon kısmı çoğunlukla monoterenler, C13-norizoprenoidler, benzen türevleri ve uzun zincirli alifatik alkoller ile temsil edilir.

Aroma bileşiklerinin, serbest halde ve / veya glikozit formunda meyvede mevcut olabildiği bilinmektedir. Çok sayıda meyvede, önemli aroma bileşiklerinin önemli bir kısmı, glikozidik aroma öncüsü olarak bilinen uçucu olmayan bir fraksiyon olarak birikmektedir.

Meyve sularında ve özellikle şarap işlenmesinde lezzet artırımı günümüzde ekzojen glikozidazlar kullanılarak mümkün hale gelir. β glikozidazlar, şarap veya içecek endüstrilerindeki önemlerinden ve aroma yoğunluğunu iyileştirme yeteneklerinden dolayı birçok çalışmanın konusu olmuştur (Su, Xia, Gao, Dai, ve Zhang, 2010).

2.6.2. Alkol Açıl Transferaz (EC 2.3.1.84)

Birçok meyvenin aromasına katkıda bulunan önemli bir bileşik sınıfı olan uçucu esterler, alkol açıltransferazlar ile sentezlenir.

inson, ve Mattheis, 2000), kayısı (*Prunus armeniaca* L.) (González-Agüero vd., 2009) muz (Harada, Ueda, ve Iwata, 1985, kavun (El-Sharkawy ve ark., 2005; Lucchetta vd., 2006; Yahyaoui vd., 2002) ve çilek (Perez vd., 1993) bazı detaylarıyla incelenen tek enzimdir.

Çilekteki AAT, saflaştırılmış, karakterize ve genetik olarak klonlanmış olan tek enzimdir Aharoni vd., 2000; Perez vd., 1993). Muz ve çilek kullanılarak yapılan deneyler, substrat spesifikliği ile her bir meyvenin aromasında mevcut olan uçucu esterler arasında bir korelasyon olduğunu göstermekte ve bu türlerde aroma biyoüretiminde AAT nin belirleyici bir rolü olduğu düşünülmektedir (Perez vd., 1996; Dixon ve Hewett, 2000). Asetil grubunun

asetil CoA'dan uygun alkole bağlanmasını katalize eden alkol açiltransferaz (AAT), olgun elmada incelenen başlıca aroma ilişkili enzimdir (Fellman vd., 2000).

2.6.3. Alkol Dehidrogenaz (EC 1.1.1.1)

Meyveler olgunlaşma sırasında asetaldehit ve etanol üretir. Piruvat dekarboksilaz (PDC; EC 4.1.1.1) ve alkol dehidrogenaz (ADH; EC 1.1.1.1), sırasıyla asetaldehit ve etanol üretiminden sorumlu iki önemli enzimdir. ADH, aldehitlerin alkollere tersinir dönüşümünde yer alan bir oksidoredüktazdır.

Alkol dehidrogenaz, lipitlerden ve amino asitlerden kaynaklanan aroma uçucuların aldehit ve alkol formlarının birbiri ile interkonversiyonu yoluyla gelişmeye katkıda bulunan önemli bir enzim olarak kabul edilmektedir (Sieso vd, 1976).

Domateste, iki ADH geni tanımlanmıştır. ADH1 polen, tohum ve genç fidanlarda bulunur ve ADH2, olgunlaşan domateste bulunur ve bu dönemde uçucuların sentezinde büyük bir artış meydana gelmektedir. Bu nedenle, ADH2'nin aroma gelişimde önemli bir rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Longhurst vd., 1990).

ADH, bitkilerin stres tepkisinde rol oynamaktadır ve anaerobik koşullar altında etanol üretiminden sorumludur. ADH'ler ayrıca diğer streslere, ve absisik aside karşı geniş çaplı tepkilere katılırlar (Matton vd., 1990; Peters ve Frenkel, 2004). Bununla birlikte, ADH gen ekspresyonunun özellikle meyve olgunlaşması sırasında dokuya özgü ve gelişimsel olarak düzenlendiği gösterilmiştir (Echeverria, Graell, López ve Lara, 2004 ; Van der Straeten vd., 1991).

2.6.4. Lipoksijenaz (EC 1.13.11.12)

Lipoksijenaz (LOX), meyvelerdeki ester üretimi için öncülerin bileşiminin belirlenmesinde yardımcı olabilir (Bate vd., 1998; Fellman vd., 2000).

Yağ asitleri ester öncülleri olarak görev yapar ve β - oksidasyon ve lipoksijenaz sistemi olmak üzere iki ana yoldan katabolize edilir.

LOX'lar, bitki aleminde geniş ölçüde yayılmış ve çeşitli fonksiyonlara sahip olan, bitkisel kaynaklı demir içeren deoksijenazlardır (Porta ve Rocha-Sosa, 2002).

Meyve olgunlaşmasıyla ilişkili roller arasında, LOX, domates gibi olgunlaşan meyvelerde başlıca uçucu aroma bileşenleri oluşturan C6 alkollerinin ve aldehitlerin üretilmesinde rol oynar (Chen vd., 2004), meyveye yeşil aroma karakteri kazandırır. Elmadaki yağ asidi öncüsü biyosentezi için düşük kapasite, olgunlaşmamış meyvelerin ester üretimi için önemli bir sınırlayıcı faktör olabilir (Song ve Bangerth, 1994).

Çoklu enzimatik sistem “lipoksijenaz yolu”, çoklu doymamış yağ asitlerinin bu bileşiklere dönüşümü için en yaygın olarak kabul edilen enzimatik yolu ortaya koymuştur.

Yeşil yaprak uçucu maddeler, lipoksijenaz yolu sonucunda oluşan C6-veya C9-aldehitler ve alkoller ile temsil edilir. Birçok yüksek bitkide, bu enzimatik yol, bitki dokularının kimyasal veya mekanik bir aşındırmanın ardından aktive edilir. Bitkideki 14 aldehit ve alkolün oluşumu bu nedenle, hücre tahribatı ile ilgilidir.

LOX yolu reaksiyonları ile uçucu aroma maddeleri arasındaki ilişkiyi izah etmek amaçlı yapılan in vitro çalışmalarda genellikle bazı bitki dokuları parçalandıktan sonra linoleik asit ile inkübe edilmiş ve oluşan uçucuların konsantrasyon değişimi incelenmiştir. Yapılan bu çalışmalarda doku ekstraktının kaynatılmasının veya H_2O_2 ile muamelesinin sentezi durdurduğu, $FeSO_4$ ve $CuCl_2$ katılımının da sentezi arttırdığı ispat edilmiştir. Ayrıca radyoaktif izotop işaretli substratlarla da ürünler izlenmiş ve enzimlerin uçucu aroma bileşenleri sentezlemede görevli oldukları belirlenmiştir (Matthew vd., 1972).

2.6.5. Hidroperoksit Liyaz (EC 4.1.2.92)

Yağ asidi hidroperoksitlerin (LOX ürünleri) metabolizması aldehitlere, alkollere ve diğer türevlere dönüşümü içerir ve bu reaksiyonlar sıklıkla sitokrom P450 enzimleri tarafından katalize edilir (Tijet vd., 2000).

HPL, ilk önce yeşil biberlerden klonlanmıştır ve CYP74B olarak adlandırılmıştır (Matsui ve diğerleri, 1996). HPL-kodlanmış enzimler klonlanmış ve domates (Howe vd., 2000), guava meyvesi (*Psidium guajava* L.) (Tijet vd., 2000), ve kavun (Tijet vd., 2001) salatalık (*Cucumis sativus* L.) dahil olmak üzere çeşitli türlerde karakterize edilmiştir. (Matsui vd., 2000)

Guava meyvesinde ve salatalıkta, HPL etkinliği sonucu üretilen başlıca aldehit 3 (Z) – heksenaldir, 3 (Z)–nonenale ise daha çok kavunda rastlanmıştır.

Linolenik asidin 13S-hidroperoksidinden oluşturulan birincil aldehit ürünü, 3 (Z) -heksenal bitkinin zedelenmeye tepkisi ve patojen saldırısında farklı fizyolojik fonksiyonlara sahip olduğu ifade edilir. Ayrıca, 3(Z)-heksenal den türetilen C6 aldehit ve alkollerini kapsayan bu aile aroma endüstrisinde önemli bileşikler içerir (Tijet vd, 2001).

2.6.6. Keto Açıl Coa Tiyolaz (EC 2.3.1.16)

Yağ asitleri ve trigliseritlerdeki değişiklikler, meyve olgunlaşması sırasında aroma, ve uçucu aroma maddeleri üretimindeki değişikliklerle ilişkilendirilmiştir (Bojorquez ve Gomez-Lim, 1995).Bu nedenle, yağ asitleri ile ilişkili enzimler, aroma uçucu bileşiklerin üretimi için önemli olabilir; Bu olgunlaşma sırasında indüksiyonlarını açıklayabilir.

Tiyolaz (THMF; EC 2.3.1.16), yağ asidindeki β -oksidasyon yolundaki son enzimdir. THMF, β -ketoaçıl-CoA substrat karbon zincirinin CoA-SH (sülfidril grubu) tarafından tiyolitik bölünmesini katalize ederek, asetil-CoA ve iki karbon atomu ile daha kısa olan doymuş açıl-CoA esterini verir (Bojorquez ve Gomez-Lim, 1995).

Bölünme reaksiyonunda oluşan açıl-CoA, meyvenin ester oluşumu için biyosentetik yolun son aşamasında kullanılabilir. Bugüne kadar, bu enzim birkaç türde saptanmış, fakat aroma biyosentezindeki rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Bir peroksisomal 3-keto açıl CoA tiyolaz (pTHMF1), mangoda tanımlanmıştır ve karakterize edilmiştir ve salatalık THMF (CsTHMF) ile yüksek benzerlik göstermektedir; özellikle, protein mangonun olgunlaşması süresince artış göstermiştir(Bojorquez ve Gomez-Lim, 1995).

2.6.7. Terpen Sentaz (EC 4.2.3.20)

Belirli üzüm çeşitleri gibi bazı meyvelerin tat ve aroması, uçucu aldehitler ve uçucu monoterpenler tarafından karakterize edilir(Martin ve Bohlmann, 2004). Monoterpenler, terpen ailesinin C10 kolunu içerir ve iki baştan sona bağlı izopren biriminden (C5) meydana gelir. Monoterpenler, otçul hayvanlar ve bitki patojenlerine karşı savunma yaptıklarından veya polen taşıyıcılar için çekici etki göstererek bitkilere fayda sağlarlar.

Ayrıca,monoterpenler, serbest uçucu maddeler ve monoterpen alkollerin glikozid bağlayıcıları formunda nihai üzüm ve şarap aroması ve tadına katkıda bulunur.

Aroma bakımından zengin üzüm çeşitlerinin tipik monoterpenol bileşenleri S-linalool, geraniol, nerol, citronellol ve α -terpineoldür.

Domates ayrıca esas olarak terpenlerden oluşan uçucu organik bileşiklerin bir karışımını yayar. Bu türlerdeki, özellikle domatesteki gelişmeler, transgenik yaklaşımların kullanılmasıyla büyük ölçüde desteklenmiştir (Davidovich-Rikanati vd., 2008; Lewinsohn vd., 2001). Bu bileşikleri sentezleyen enzimler çeşitlidir ve üretilen substrat ve uçucu bileşiklere bağlıdır.

2.6.8. Karotenoid Dioksijenaz (EC 1.13.11.51)

Potansiyel olarak karotenoidlerden türetilen uçucu terpenoid bileşikler, birçok meyve, sebze ve süs bitkisinde tat ve aromanın önemli bileşenleridir. Önemlerine rağmen, bu uçucuları üretmekten sorumlu olan enzimler hakkında çok az şey bilinmektedir.

Son zamanlarda, çeşitli çift bağlarda karotenoid substratları parçalayan karotenoid parçalama dioksijenazların aileleri (CCD; EC 1.13.11.51) belirlenmiştir.Ailenin ilk üyesi, 9-cis-epoksikrotenoid deoksijenaz VP14 olarak mısırdan tanımlan fitohormon absisik asidin sentezinde yer alır (Tan vd., 1997).

2.7. β -Glikozidaz Enzimi Mekanizması ve Özellikleri

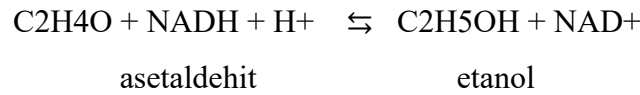
β -glukozidazlar β -D-glikozu serbest bırakan aril ve alkil β -D-glikozitlerin hidrolizini katalizler (Terefe, 2014).Bu enzimler β -D-glikozidler için geniş bir spesifikliğe sahiptir ve β -glikozidik bağları hidrolize ederek bitki savunma kimyasallarının (fitoantisipinler) ve bitki büyüme düzenleyicilerinin konjugatlarının aktivasyonunda yer alır (Morant vd., 2008). Ayrıca, meyve ve sebzelerde glikozidik öncüllerinden birçok uçucu bileşiğin salınmasında önemli bir rol oynarlar.(Orruno vd., 2001). Bitkilerde, β -glikozidazlar farklı anahtar metabolik olaylarla ve büyümeyle ilgili tepkimelerle, örneğin siyanojenez yoluyla patojenlere karşı savunma (Itoh- Nashida, Hırawa, ve Uda, 1987; Poulton, 1990) ve β -glikozidik bağların hidrolizi yoluyla bitki büyüme düzenleyicilerinin konjugatlarının aktivasyonu ile ilgilidir. Meyve ve sebzelerde glikozidik öncülerinden çok çeşitli uçucu bileşiklerin

salınmasında glikozidazların oynadığı önemli rol vurgulanmalıdır (Orruño, Apenten, ve Zabetakis, 2001).

Bu enzimler giderek daha fazla gıda işlemede uygulama alanı bulmaktadır. Örnekler arasında meyve suları ve fermente edilmiş içeceklerin (bira, şarap, vb.) (Shoseyov vd., 1989), bazı meyve sularında acı flavonon glikozidlerinin acı olmayan aglikonlara dönüştürülmesiyle acılık giderme (Perera ve Baldwin, 2000) ve izoflavon glikozitleri biyoaktif aglikonlara hidrolize ederek soya ürünlerinde izoflavonların biyoyararlanımının artırılması bulunmaktadır.

2.8. ADH Enzimi Mekanizması ve Özellikleri

Alkol fermantasyonun son aşamasında, asetaldehit, NADH ile etanole indirgenir. Gliseraldehitlerden türetilen 3-fosfat dehidrojenasyonu, alkol dehidrogenazın etkisiyle indirgeme gücü sağlar (Okamura-Matsui, Tomoda, Fukuda, ve Ohsugi, 2003). Meyvelerde ADH, uçucu aromaların aldehit ve alkol formları ve meyvenin olgunlaşması sırasında uçucu aromaların birikimiyle ilişkilidir (Chen ve Chase, 1993; Speirs vd., 1998).



Şekil 2.2. Alkol dehidrogenaz enzimi faaliyeti

Bir çalışmada domates meyvesini soğuk depolamanın farklı sıcaklıklarda aroma ve alkol dehidrogenaz aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir, 6 gün depolamadan sonra uçucu aroma maddelerinde kantitatif ve kalitatif modifikasyonlar olduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen ana değişiklikler arasında, 3-metilbutanal / 3-metilbutanol ve hekzanal / hekzanol oranının artması ve trans-3-hekzenol düzeylerinde bir artış gözlenmiştir. Bu değişiklikler, soğuk depolanmış domatest 6 günde gözlemlenen ADH enzim aktivitesindeki bir azalma ile açıklanabilir. Domates meyvesinin soğuk depolanması sırasında trans-3-hekzenol düzeyindeki artış ve çeşitli tanımlayıcıların algıdaki değişimlerle korelasyonu, bu uçucunun domates aromasının modifikasyonundaki düşük sıcaklıkların etkisinin bir göstergesi olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Pérez-Flores vd., 2009).

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Kozan Yerli portakal çeşidi kullanılmıştır. Portakallar, Adana'nın Kozan ilçesinden üç farklı olgunluk döneminde aynı ağaçlardan, sırasıyla 28 Eylül 2018, 14 Kasım 2018 ve 9 Ocak 2019 tarihlerinde temin edilmiştir. Örnekler -18°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. Kozan Yerli Portakal çeşidinin üç farklı olgunlukta dalında görünüşü



Şekil 3.2. Kozan Yerli Portakal çeşidinin sırasıyla üç olgunluk seviyesindeki dış görünüşü ve kesiti

Tablo 3.1. Kozan Yerli Portakalının olgunlaşma düzeyi ile değişen meyve çapı, meyve ağırlığı ve meyve suyu verimi ortalama değerleri

Olgunlaşma düzeyi	Meyve çapı (cm)	Meyve ağırlığı (g)	Meyve Suyu Verimi (%)
Olgunluk 28 Eylül 2018	6,5	150,9	13,6
Olgunluk 14 Kasım 2018	6,4	151,6	35
Olgunluk 9 Ocak 2019	6,7	165,6	31,5

Kimyasal Maddeler

Kullanılan kimyasallar Sigma (Sigma Chemical Company, MO, USA) ve Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) firmalarından temin edilmiştir.

Yöntem

3.1.Serbest aroma maddeleri ekstraksiyonu ve tayini

3.2. Protein Analizi

3.3. β -glukozidaz ekstraksiyonu ve β -glukozidaz aktivite ölçümü

3.4.ADH ekstraksiyonu ve ADH aktivite ölçümü

3.5.İstatistiksel analiz

3.1. Serbest Aroma Maddeleri Ekstraksiyonu ve Tayini

3.1.1. Serbest Aroma Maddeleri Ekstraksiyonu ve Tayini için HS-SPME Koşulları

Katı faz mikro ekstraksiyonu (SPME), geniş bir kaynama noktası aralığına sahip uçucu bileşiklerin analizi için basit, düşük maliyetli, çözücü içermeyen ve hassas bir teknik olduğu için aroma analizinde kullanılan popüler bir tekniktir (Reineccius,2007). SPME, uçucu bileşiklerin polimerik bir faz ile kaplı silika fiber üzerine ekstraksiyonunu içerir. Bu nedenle, fiber ve SPME ekstraksiyon koşullarının seçimi, SPME analizinin hassasiyetini ve doğruluğunu etkileyebilir (Ma, Hamid, Bekhit, Robertson ve Law,., 2013).

HS-SPME (tepe boşluğu-katı faz mikro ekstraksiyonu), bu teknik GC-MS'deki algılama sınırlarını artırabilir ve benzer matrikslere sahip örneklerin karşılaştırmalı çalışmaları için uygundur (Spietelun, Kloskowski, Chrzanowski ve Namiesnik, 2013). Bu günlerde birçok yeni aroma ekstraksiyon yöntemi kullanılmasına rağmen, yine de geleneksel headspace katı faz mikro-ekstraksiyon (HS-SPME) yöntemi uygulanmakta ve optimum koşullar altında iyi sonuçlar vermektedir (Pinho, Ferreira ve Santos, 2006; Parker , Elmore ve Methven, 2015). Ancak HS-SPME, ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi, numune hacmi, uçucuların konsantrasyonu ve numune matriksi ve daha fazla optimizasyon gerektiren düzenlilikler gibi deneysel koşulların dengesine bağlı bir tekniktir (Mirhosseini, Salmah, Nazimah ve Tan 2007) HS-SPME mekanizması, analitlerin üç faz arasındaki dengesine (fiber kaplama, tepe boşluğu ve numune) dayandığından, HS-SPME yöntemiyle uçucu bileşiklerin analizi, vialdeki uçucu aromaların buhar basıncından büyük ölçüde etkilenir (Ma vd.,2013). Karşılaştırmalı (Alim vd., 2018) bir çalışmada HS yöntemlerinin herhangi bir yapay oluşum

olmaksızın çeşitli kaynama noktalarına sahip maya ekstraktlarında çok çeşitli aroma bileşiklerini yakalayabildiğini belirtmişlerdir. Ekstraksiyon sıcaklığı, inkübasyon süresi ve ekstraksiyon süresinin tepe boşluğundaki uçucu bileşenlerin buhar basıncını ve dengesini etkileyen ana değişkenler olduğu bildirilmiştir (Zhang, Gao, Zhang, Shi, ve Xu,2009). Ekstraksiyon sürecini etkileyen diğer parametreler arasında tuzluluk, pH ve sudaki organik çözücü içeriği yer alır.Tuz konsantrasyonu ve örnek pH'sının kontrolü ekstraksiyonu arttırmak için kullanılabilir.Prensibi solvent ekstraksiyonu prosedürüne benzerdir.Belirli bir cihaza ihtiyaç duyulmadan doğrudan numuneye uygun bir tuz veya tampon eklenir.Optimizasyon için çok önemli diğer bir parametre ekstraksiyon sıcaklığıdır.Yüksek sıcaklıkta analitler matriksten etkili bir şekilde ayrılabilir ve bunları fiber kaplama aracılığıyla hızlı ekstraksiyon için tepe boşluğuna taşıyabilir. (Pawliszyn, 1997)

Bu çalışmada hızlı ve uygun bir analiz için bir yöntemi olan HS-SPME/GC-MS kullanılmış, uçucu bileşenlerin profili farklı fiberler denenerek gözlemlenmiştir (50/30 µm divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane ve 65µm PDMS/DVB) ve 50/30 µm DVB/CAR/PDMS fiber kullanımı ile istenen sonuçların elde edildiği belirlenmiştir.

3.1.2. Çalışma Koşullarının Seçimi ve Optimizasyonu

Metod standardizasyonu sağlanması amacı ile, çalışma koşulları değiştirilerek farklı NaCl miktarı (1, 2, 3 g) , farklı doymuş NaCl çözeltisi miktarı (1, 2 ml) , farklı ekstraksiyon sıcaklıkları (40, 60 ve 80 °C) ve farklı ekstraksiyon süreleri (10, 20, 30, 40 dk) denenmiştir ve serbest aroma maddeleri tayini için en uygun koşulların 2g NaCl kullanılarak, 30 dk ekstraksiyon süresinde, 40°C de sağlandığı tespit edilmiştir.

3.1.3. Serbest Aroma Maddeleri Ekstraksiyonu ve Tayin Yöntemi

5 ml portakal suyu örneği 2 g NaCl ile 1µl iç standart (4-nonanol) ilave edilerek 20 ml 'lik viallere konulmuştur. Vial teflon septa ile hermetik olarak kapatılmıştır. Örnekler SPME fiber (50/30 µm divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) uygulanmadan önce, 20 dk, 40 °C'e ısıtılmış, tepe boşluğu örnekleme / ekstraksiyon süreleri sürekli karıştırılarak (500 dev / dak) 30 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. Fiber enjektörde 250°C'de 1 dakika boyunca desorbe olmuştur. Örnekte bulunan aroma bileşenlerinin miktarın belirlenmesi ve tanımlanması "Agilent 7890B" marka alev iyonlaşma dedektörlü (FID) gaz kromatografisi (GC) ve buna bağlı "Agilent 5977A MSD" kütle spektrometresinde

gerçekleşmiştir. Aroma maddelerinin ayrımı DB-WAX kapiler kolon ($30\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Enjektör sıcaklığı 220, dedektör sıcaklığı 250 °C, kolon sıcaklığı 40 °C, ‘da 4 dakika beklemeden sonra, dakikada 2 °C artarak 90 °C ‘ye ve daha sonra dakikada 3 °C artarak 130 °C ‘ye ve en son 4 °C artarak 240 °C çıkartılmış ve bu sıcaklıkta 12 dakika sabit kalacak şekilde programlanmıştır. Taşıyıcı gaz olarak He kullanılmış ve akış hızı 3 ml/dakika olarak ayarlanmıştır. Kütle spektrometresinin iyonlaşma enerjisi 70eV, iyon kaynağı sıcaklığı 250 °C, kuadropol sıcaklığı 120 °C tutularak, 1 saniye aralıklarla 29-350 kütle/yük(m/e) arasında tarama yapılmıştır. Aroma maddelerinin tanımlanmasında GC-MS’in hafızasında bulunan Wiley 7.0 ve NIST aroma maddeleri kütüphanesi, standart maddeler ve Kovats İndeks değerleri kullanılmıştır. Analizler üç paralelli olacak şekilde tekrarlanmıştır.



Şekil 3.3. Aroma maddelerinin miktarının tespiti ve tanımlanması için kullanılan “Agilent 7890B” marka alev iyonlaşma dedektörlü (FID) gaz kromatografisi (GC) ve “Agilent 5977A MSD” kütle spektrometresi

3.1.4. Protein Analizi

Protein içeriğini belirlemede standart olarak sığır serum albumini kullanılmış, Bradford metoduyla yapılmıştır (Dunn, 1989). Önce boya çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 50 ml % 95 etil alkol içerisinde çözündürülerek üzerine 100 mL % 85’lik fosforik asit eklenmiş ve karıştırılmıştır. Sonra, karışım saf su ile 1 litreye

tamamlanıp sonrasında filtre edilmiştir. Protein çözeltilerinden hazırlanan uygun dilüsyonlardan 0.8 mL alınarak üzerine 0.2 mL boya çözeltisi eklenip karıştırılmış ve karışım oda sıcaklığında 15 dakika bekletildikten sonra 595 nm dalga boyunda absorbans ölçümü kaydedilmiştir. Önceden sığır serum albumini kullanılarak hazırlanan standart eğri kullanılarak örneklerin protein miktarı saptanmış ve mg/ml olarak belirtilmiştir.

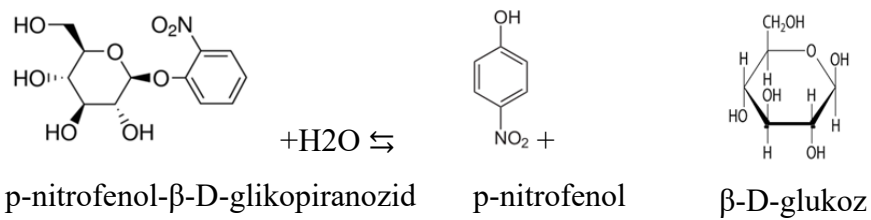
3.2. β -glikozidaz Ekstraksiyonu ve Aktivitesinin Ölçümü

3.2.1. β -glikozidaz Ekstraksiyonu

Enzim ekstraktının hazırlanırken kabuğu soyulmuş ve çekirdeği çıkarılmış 300 g portakal örneği 3.33 g polietilen glikol içeren 400 mL -25 °C’de aseton içerisinde 2 dakika düşük hızda homojenize edilmiş, homojenat vakum filtreden geçirilerek filtre üzerinde kalan kısım yeniden 200 mL soğuk aseton ile ekstrakte edilmiştir. Ekstrakte etme işlemi beyaz renkli aseton tozu elde edilene kadar tekrarlanarak elde edilen aseton tozu kuruması için bir gece oda sıcaklığında bekletilmiştir.

3.2.2. β -glikozidaz Aktivitesinin Ölçümü

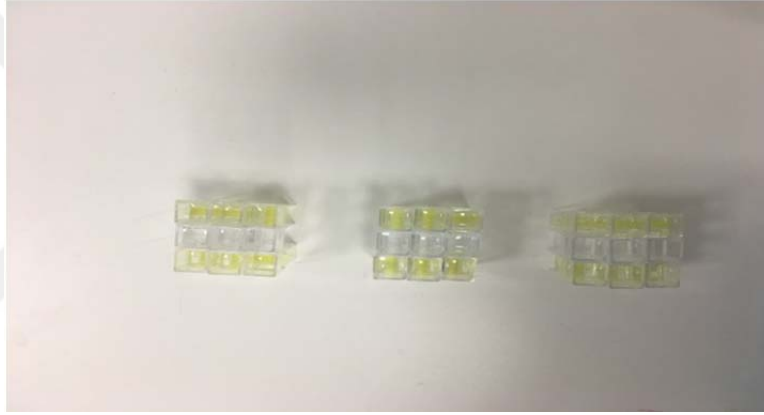
β -glikozidaz enzim aktivitesi p-nitrofenol- β -D-glikopiranozid’den serbest kalan p-nitrofenol’ün 400 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülmesiyle belirlenmiştir. 0.1 M fosfat-sitrat tamponunda hazırlanan 0.9 mL 5 mM p-nitrofenol- β -D-glikopiranozid üzerine 0.1 mL enzim çözeltisi ilave edilerek 50 °C’deki su banyosunda 15 dakika boyunca bekletilerek, sonrasında 1.0 mL 1.0 M sodyum karbonat çözeltisi ilave edilip tepkime sonlandırılmış, 400 nm’de absorbans ölçümü kaydedilmiştir. Absorbans ölçümlerinde kör olarak fosfat-sitrat tamponu ile hazırlanan 0.9 mL 5 mM substrat, 0.1 mL 0.1 M fosfat-sitrat tamponu, 1.0 mL 1.0 M sodyum karbonat karışımı kullanılmış, enzim aktivitesi 20-160 μ M p-nitrofenol ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi kullanılarak saptanmıştır. Ölçümler üç paralelli olarak kaydedilmiş olup 1 ünite β -glikozidaz aktivitesi dakikada 1 μ M p-nitrofenölü serbest bırakan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. (Lecas vd.,1991)



Şekil 3.4. β -glikozidaz enzimi ile p-nitrofenol- β -D-glikopiranozid hidrolizi



Şekil 3.5. Analizlerde kullanılan Agilent Cary60 UV-VIS marka spektrofotometre



Şekil 3.6. Absorbans ölçümü için hazırlanan örnekler

3.3. ADH Ekstraksiyonu ve Aktivitesi Ölçümü

3.3.1. ADH Ekstraksiyonu

Enzim ekstraktının hazırlanması için kabuğu soyulmuş ve çekirdeği çıkarılmış dilimlenmiş 3 g portakal örneği 2 mM ditiyotreitol ve % 1 (w/v) polivinilpirolidon içeren 10 ml 100 mM 2-(N-morfolino)-etansülfonik asit (MES) tamponu (pH 6.5) içinde homojenize edilmiştir. Homojenat dört tabakalı süzme bezi ile filtre edilmiş ve 4 ° C'de 10 dakika boyunca 27,000x g'de santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatant enzim aktivitesi ölçümlerinde kullanılmıştır.

3.3.2 ADH Aktivitesi Ölçümü

ADH aktivitesi, 0.8 ml 100 mM MES (2 - (N-morfolino)-etansülfonik asit) tamponu (pH 6.5), 0.05 ml 1.6 mM NADH, 0.1 ml enzim ekstraktı ve 0.05 ml 80 mM asetaldehit karıştırılarak ölçülmüştür. Süreç boyunca NADH oksidasyonu, spektrofotometre ile 340 nm dalga boyunda absorbanstaki azalma kaydedilmiştir. Enzim aktivitesi, dakikada oluşan milimol ürün veya kullanılmış substrat gram taze ağırlık başına olarak ifade edilmiştir. Enzim kinetiğinin in vitro çalışmalarında birkaç farklı pH değeri kullanılmıştır. ADH faaliyetlerindeki değişiklikleri incelemek için pH 4.5 ila 7.5 için 100 mM MES tamponu kullanılmıştır. 100 mM pH 7.5 ila 8.0 için tris tamponu kullanılmıştır.

3.4. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler Tek Yönlü Varyans Analizine göre değerlendirilmiş ve gruplar arasındaki farkları belirlemek için Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Bu amaçla, SPSS 18.0 İstatistik Paket Programı testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Serbest Aroma Maddelerine İlişkin Bulgular

HS-SPME /GC-MS ve GC-FID ile 3 farklı olgunluk döneminde Kozan Yerli portakalından alınan portakal suyu örneklerinde 14 monoterpen bileşiğinden en baskın olanı L- Limonene olup bu monoterpen bileşiklerinin miktarı 0 ile 30462,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ arasında değişmektedir. 3 olgunluk aşamasında tanımlanan toplam 9 seskiterpenden en düşük konsantrasyon 0 $\mu\text{g L}^{-1}$, en yüksek konsantrasyon 551,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ ile valensene aittir. 25 aromatik hidrokarbon bileşiğinin miktarlarının 0 ile 609,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ arasında değiştiği kaydedilmiş olup, en yüksek miktarda olan Benzene,1-Methyl-2-(2-Propenyl)bileşiğidir.

Kozan Yerli portakalında tanımlanan 10 farklı aldehit bileşiğinin miktarları 0 ile 181,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ arasında değişmektedir ve bu aldehit bileşiklerinden en yüksek konsantrasyon Octanal bileşiğidir. Tespit edilen 2 yüksek alkolden baskın olanı Cyclopentanol,1,2-Dimethyl-3-1-Methylethanyl olup olgunluk dönemleri boyunca saptanan en yüksek miktarı 166,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ 'dir.

3 ketondan en baskın olanı 2-Methylindanone olup yeşil, yeşil sarı ve sarı olgunlaşma aşamalarında tespit edilen en düşük keton konsantrasyon 0 $\mu\text{g L}^{-1}$, en yüksek keton konsantrasyonu 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ dir. 8 fenol bileşiği arasında en belirgin bileşik Phenol, 2-Methyl dir. En düşük ve en yüksek fenol bileşiği miktarı sırasıyla 0 $\mu\text{g L}^{-1}$ ve 4,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ dir. Tanımlanan tek uçucu asit olan octanoic asit konsantrasyonu en düşük yeşil olgunluk döneminde 0 $\mu\text{g L}^{-1}$ olarak kaydedilmiş, en yüksek ise sarı olgunluk döneminde 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Yeşil, yeşil sarı ve sarı olgunlaşma aşamalarında toplam 73 uçucu aroma bileşeni tanımlanmıştır. Yeşil, yeşil sarı ve sarı olgunluk dönemlerinde belirlenen uçucu aroma maddeleri ve bu bileşenlerin miktarları aşağıda Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Reinhard, Sager ve Zoller, (2008) SPME-GC-MS ile narenciye suyu sınıflandırması ve elektronik burun ile ölçümler konulu çalışmalarında en iyi sonuçların DVB/CAR/PDMS (50/30 μm), fiber ile elde edildiği belirtilmiş olup, genellikle kromatogramların 25 ila 98 tepe noktası içerdiği saptanmıştır. 196 narenciye suyu numunesinden 311 bileşik bulunmuş ve bir veritabanına toplanmıştır.

Katı fazlı mikro ekstraksiyon headspace analizi için portakallı içecek emülsiyonunda kilit uçucu bileşikler limonen, 94.9%; mirsen, 1.2%; etil bütirat, 1.1%; γ -terpinen, 0.41%; linalool, 0.36%; 3-carene, 0.16%; dekanal, 0.12%; etil asetat, 0.1%; 1-oktanol, 0.06%; geranial, 0.05%; β -pinen, 0.04%; oktanal, 0.03%; α -pinen, 0.03%; ve neral, 0.03% olarak hesaplanmıştır (Mirhosseini, Salmah, Nazimah ve Tan, 2007).



Tablo 4.1. Kozan yerli portakal suyu örneklerinin farklı olgunluk dönemlerindeki uçucu aroma bileşenlerinin miktarları($\mu\text{g L}^{-1}$)

RT		Yeşil*	Yeşil Sarı*	Sarı*	Tanımlama
	Monoterpenler				
11,389	Ocimene	158 ^b ±18	215,2 ^a ±28	233,8 ^a ±0,6	1, 2
12,439	L- Limonene	8716,7 ^c ±353	27257,7 ^b ±158	30462,6 ^a ±2138	1, 2, 3
12,889	Beta Phellandrene	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	116,3 ^a ±6	1, 2
14,92	Trans isolimonene	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	41,5 ^a ±3	1, 2
15,987	Alpha Terpinolene	50,4 ^b ±7	67,6 ^b ±13	152,7 ^a ±30	1, 3
20,076	Beta Ocimene	38,9 ^c ±4	120,4 ^b ±11	137,1 ^a ±9	1, 2
20,864	1,3,8,-P-Menthatriene	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	24,9 ^a ±0,7	1
21,079	Neo-Allo-Ocimene	44,3 ^c ±5	91,1 ^b ±4	109,1 ^a ±12	1
23,074	Limonene Oxide	0,0 ^c ±0,0	16,4 ^b ±3	27,2 ^a ±4	1
27,379	Linalool	46 ^a ±6	23,3 ^c ±1	35,3 ^b ±2	1, 3
32,409	Alpha Terpineol	28,2 ^b ±0,7	26,6 ^b ±3	40,9 ^a ±4	1, 2,3
37,986	Trans-(+)- Carveol	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	7,3 ^a ±0,5	1
40,501	2-Methylenebornane	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	1,6 ^a ±0,1	1
41,057	Beta Terpinene	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	2,5 ^a ±0,2	1, 2
	Seskitерpenler				
30,431	Aromadendrene	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	8,07 ^a ±2	1
31,703	Alpha Amorphene	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	2,7 ^a ±1	1
33,135	Valencene	0,0 ^c ±0,0	80 ^b ±8	551,4 ^a ±33	1
33,27	Alpha Selinene	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	20,8 ^a ±15	1
33,768	Ledene	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	9,4 ^a ±4	1
34,731	Delta Cadinene	5,7 ^b ±6	16,9 ^a ±0,1	10,5 ^{ab} ±2	1
34,847	(-)-Alpha Panasinsen	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	15,2 ^a ±0,4	1
36,902	Alpha Curcumen	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	7,4 ^a ±1	1
37,667	Calamenene	0,0 ^c ±0,0	8,5 ^a ±0,1	6,3 ^b ±1	1
	Aromatik Hidrokarbonlar				
9,875	1,3-Cyclopentadiene,1,2,3,4,5- Pentamethyl	406,6 ^a ±5	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	1
13,3	Benzene,1-Ethyl-3,-Methyl	101 ^b ±8	122,8 ^b ±17	150,5 ^a ±5	1
13,459	Benzene, 1,2-Diethyl	0,0 ^c ±0,0	77,7 ^b ±7	87,3 ^a ±1	1
14,344	O-Diethyl Benzene	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	62,9 ^a ±12	1
14,644	Cycloheptene, 5-Ethylidene-1-Methyl	96 ^c ±6	133,3 ^b ±16	253,9 ^a ±15	1

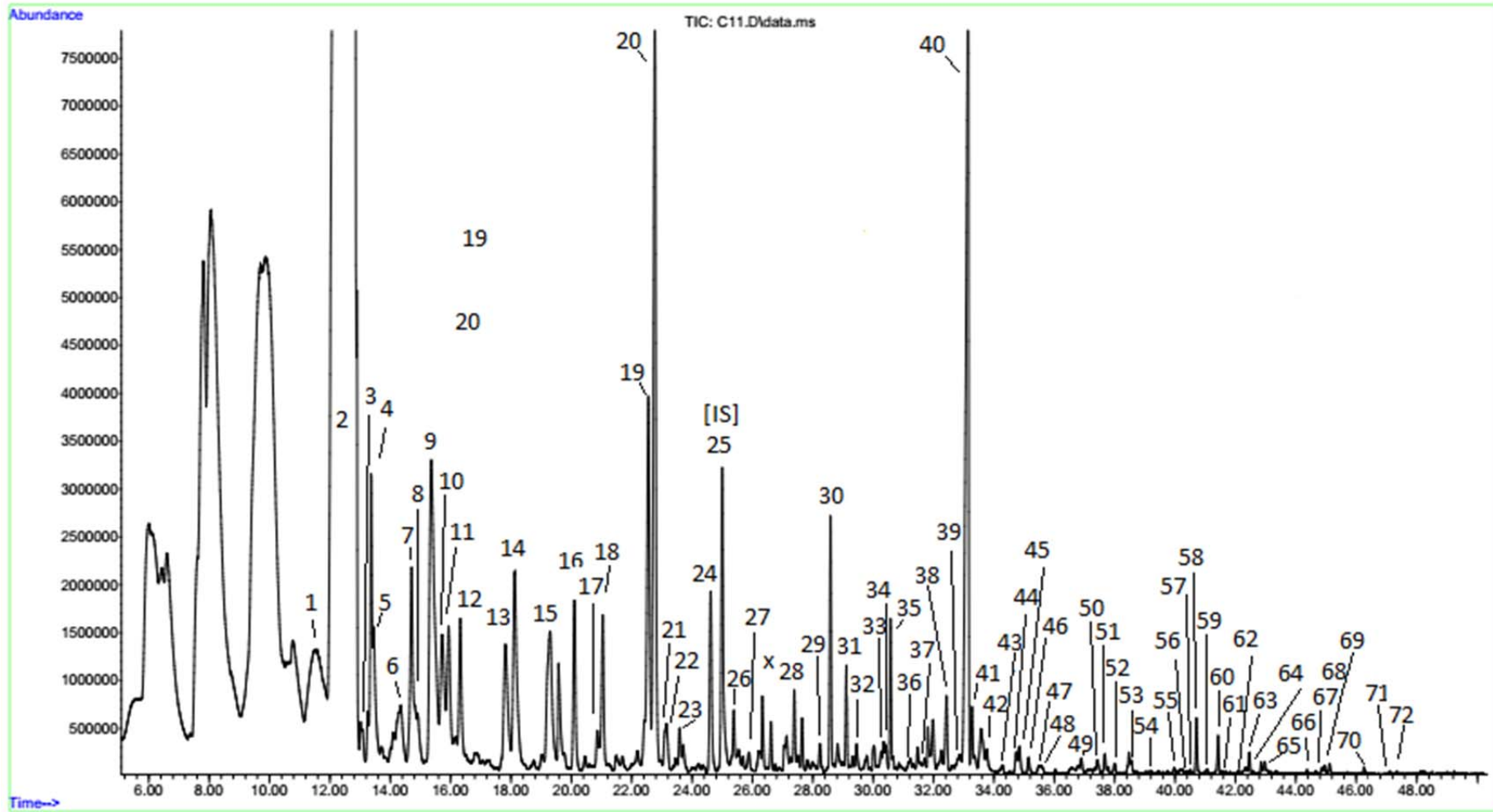
Tablo 4.1. devamı

15,326	Benzene, 1-Methyl-2-(1-Methylethyl)	113,2 ^c ±10	312,6 ^b ±11	419,8 ^a ±48	1
15,694	Benzene, 1,2,4-Trimethyl	40,4 ^c ±3	0,0 ^b ±0,0	155,3 ^a ±15	1
17,788	Benzene, 1-Ethyl-3,5-Dimethyl	41,1 ^a ±4	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	1
17,802	Benzene, 1-Ethyl-2,4-Dimethyl	41,1 ^c ±4	112,7 ^b ±12	161 ^a ±30	1
18,097	Benzene, 1,2,3-Trimethyl	73,1 ^c ±5	202,8 ^b ±11	257,3 ^a ±18	1
19,548	Benzene, Ethylmethyl	24,5 ^b ±3	0,0 ^b ±0,0	199,4 ^a ±23	1
22,523	Benzene, 1,2,3,5-Tetramethyl	77,3 ^c ±11	172 ^b ±22	263,3 ^a ±44	1
22,741	Benzene, 1-Methyl-2-(2-Propenyl)	179,6 ^c ±16	448,3 ^b ±5	609,6 ^a ±21	1
23,133	Benzene, 1-Ethenyl-4-Ethyl	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	33,7 ^a ±9	1
23,582	Benzene, 1-Methyl-4-(2-Propenyl)	0,0 ^b ±0,0	21,7 ^a ±1	20,5 ^a ±4	1
24,598	Benzene, 1,2,3,4-Tetramethyl	44,8 ^c ±3	70 ^b ±4	81,3 ^a ±6	1
28,23	Benzene, 1,3-Diethenyl	8 ^c ±2	0,0 ^b ±0,0	14,2 ^a ±1	1
29,115	Terpinen-4-ol	50 ±5	43,9 ±40	49,5 ±2	1
30,576	2,6,6-Trimethyl-3-Methylenecyclohexene	93,3 ^a ±8	39,7 ^c ±3	61,4 ^b ±6	1
31,161	2,6-Octadiene, 2,6-Dimethyl	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	2,5 ^a ±0,3	1
35,480	Benzene, 1,3-Diethyl-5methyl	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	6,9 ^a ±4	1
39,185	2-Methyl Naphthalene	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,8 ±0,7	1
41,555	2,7-Dimethyl Naphthalene	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,7 ±0,7	1
42,469	5-Ethylindan	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	8,4 ^a ±0,7	1
42,567	2,6-Dimethyl Naphthalene	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,6 ±0,6	1
	Aldehitler				
16,303	Octanal	158,7 ^c ±3	115,3 ^b ±4	181,9 ^a ±4	1, 3
25,386	Decanal	88,8 ^b ±9	28,5 ^b ±1	26 ^a ±4	1, 3
25,885	Benzaldehyde	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	11,8 ^a ±3	1, 3
29,449	4-Methyl Benzaldehyde	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	17,4 ^a ±2	1
30,252	3-Methyl Benzaldehyde	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	5,6 ^a ±2	1
32,878	Dodecanal	14,4 ^b ±1	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^a ±0,0	1
35,567	2,6 Dimethyl Benzaldehyde	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	9,1 ^a ±2	1
37,434	Ethenyl Benzaldehyde	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	8 ^a ±2	1
38,561	Trans Cinnamaldehyde	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	4,7 ^a ±1	1
39,974	Benzeneacetaldehyde, Alpha-Ethylidene- (2 Phenyl-2-Butenal)	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	2,4 ^a ±1	1
40,699	Alpha-Methyl Cinnamic Aldehyde	6,7 ^b ±0,4	14,3 ^a ±1	19,7 ^a ±5	1

Tablo 4.1. devamı

	Yüksek Alkoller				
28,588	Cyclopentanol,1,2-Dimethyl-3-1-Methylethanyl	166,7 ^a ±14	72,6 ^c ±5	120,4 ^b ±8	1
42,111	4-Ethyl Benzene methanol	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	2 ^a ±0,1	1
	Ketonlar				
34,281	Ethanone, 1-(4-Methylphenyl)	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	4,3 ^a ±2	1
35,161	Methyl Acetophenone	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	11,1 ^a ±1	1
41,415	2-Methylindanone	0,0 ^c ±0,0	4,4 ^b ±0,4	15 ^a ±1	1
	Fenoller				
40,235	2,6 Dimethyl Phenol	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	1,3 ^a ±0,3	1
42,972	Phenol, 2-Methyl	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	4,7 ^a ±0,4	1
44,864	2,4 Dimethyl Phenol	0,0 ^b ±0,0	2 ^a ±1	2,4 ^a ±1	1
44,951	2,3 Dimethyl Phenol	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	3,6 ^a ±1	1
45,115	3 Methyl Phenol (M-Cresol)	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	3,9 ^a ±0,4	1
47,113	3,5 Dimethyl Phenol	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	1,8 ^a ±0,4	1
47,509	2 Methyl-5-(1-Methyl Ethyl) Phenol	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	1 ^a ±0,2	1
47,887	2,3,6 Trimethyl Phenol	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	0,7 ^a ±0,1	1
	Uçucu Asit				
44,665	Octanoic Acid	0,0 ^b ±0,0	0,0 ^b ±0,0	2,5 ^a ±0,4	1, 3
	TOPLAM	10913,4±520	30029,4 ±405	35386,8 ±2578	
	Tanımlama; 1, MS Library; 2, LRI; 3, Standart madde *; konsantrasyon(µg L ⁻¹) Yeşil, Yeşil Sarı, Sarı; olgunluk dönemleri				

^{a,b,c}; Aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir (p<0,05).



Şekil 4.1. Kozan yerli portakal suyu örneğinin üçüncü olgunluk döneminde uçucu aroma bileşenlerinin GC-MS kromatogramı

(Sırasıyla tanımlanan pikler; 1 "ocimene"; 2 "l-limonene"; 3 "Beta-Phellandrene"; 4 "benzene,1-ethyl-3,-methyl"; 5 "Benzene, 1,2-diethyl"; 6 "o-Diethyl benzene"; 7 "Cycloheptene, 5-ethylidene-1-methyl"; 8 "transislimonene"; 9 "Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)"; 10 "Benzene, 1,2,4-trimethyl"; 11 "alpha-terpinolene"; 12 "Octanal"; 13 "Benzene, 1-ethyl-2,4-dimethyl"; 14 "benzene,1,2,3-trimethyl "; 15 "benzene,ethylmethyl"; 16 "Alloocimene"; 17 "1,3,8,-p-Menthatriene"; 18 "2,4,6-octatriene,2,6-dimethyl"; 19 "benzene,1,2,3,5-tetramethyl"; 20 "benzene,1-methyl-2-(2-propenyl)"; 21 "Limonene oxide"; 22 "Benzene, 1-ethenyl-4-ethyl"; 23 "Benzene, 1-methyl-4-(2-propenyl)"; 24 "benzene,1,2,3,4-tetramethyl"; 25 "4-Nonanol (İç Standart)"; 26 "Decanal"; 27 "Benzaldehyde"; 28 "linalool"; 29 "Benzene, 1,3-diethenyl"; 30 "cyclopentanol,1,2-dimethyl-3-1-methylethanyl"; 31 "Terpinen-4-ol"; 32 "4-methyl benzaldehyde"; 33 "3-methyl benzaldehyde"; 34 "Aromadendrene"; 35 "2,6,6-Trimethyl-3-methylenecyclohexene"; 36 "2,6-octadiene, 2,6-dimethyl"; 37 "alpha amorphen"; 38 "alpha terpineol"; 39 "Dodecanal"; 40 "Valencene"; 41 "alpha selinene"; 42 "Ledene"; 43 "Ethanone, 1-(4-methylphenyl)"; 44 "delta.-Cadinene"; 45 "(-)-alpha .,Panasinsen"; 46 "Methyl acetophenone"; 47 "Benzene,1,3-diethyl-5methyl"; 48 "2,6 dimethyl benzaldehyde"; 49 "Alpha curcumen"; 50 "ethenyl benzaldehyde"; 51 "Calamenene"; 52 "trans-(+)- Carveol"; 53 "trans Cinnamaldehyde"; 54 "2-methyl,Naphthalene"; 55 "Benzeneacetaldehyde,alpha-ethylidene-(2 phenyl-2-butenal)"; 56 "2,3- dimethyl phenol"; 57 "2-Methylenebornane"; 58 ".alpha.-methyl cinnamic aldehyde"; 59 "gama Terpinene"; 60 "2-Methylindanone"; 61 "2,7-dimethyl Naphthalene"; 62 "4-ethyl benzenemethanol"; 63 "5-Ethylindan"; 64 "2,6-dimethyl naphthalene"; 65 "Phenol, 2-methyl"; 66 "Octanoic acid"; 67 "2,3 dimethyl phenol"; 68 "2,4 dimethyl phenol"; 69 "3 methyl phenol (m-cresol)"; 70 "3,5 dimethyl phenol"; 71 "2 methyl-5-(1-methyl ethyl) phenol"; 72 "2,3,6 trimethyl phenol")

Kelebek ve Selli, (2011) GC-FID ve GC-MS ile Dörtüol yerli portakalının 58 uçucu aroma bileşenini tanımladıkları çalışmalarında aroma maddelerinin ayrımı DB-Wax (30 m × 0.25 mm × 0.5 µm) kolon ile yapılmış olup; diğer bir çalışmada Selli ve Kelebek, (2011) Moro ve Sanguinello kan portakalı çeşitlerinin aromatik profillerini incelemişler; GC-FID ve GC-MS ile alkoller, esterler, terpenler, terpenoller, aldehitler, asitler, ketonlar, uçucu fenoller ve laktonlar dahil 78'i aroma bileşeni olmak üzere 83 bileşik tanımlamışlardır. Uçucu aroma maddelerinin ayrımı DB-Wax (30m × 0.25mm × 0.5 µm) kolon kullanılarak yapılmıştır. Selli, Cabaroglu ve Canbas, (2004) Kozan Yerli portakalından elde edilen portakal suyunun uçucu aroma bileşenlerinin belirlendiği çalışmalarında uçucu bileşiklerin GC analizi, DB Wax (30m x 0.32mm x 0.5 µm) kapiler kolon ile donatılmış Varian 3400 Kromatografi ile gerçekleştirilmiştir. GC-MS ve GC-FID ile 7 esterler, 2 aldehit, 5 alkol, 5 terpen, 12 terpenol ve 3 keton dahil 34 bileşen tanımlanmış ve miktarları belirlenmiştir. Bu 3 çalışmada tanımlanan uçucu aroma bileşenleri ve miktarları (µg L⁻¹) aşağıda Tablo 4.2'de verilmiştir. Maccarone, Campisi, Fallico, Rapisarda ve Sgarlata, (1998) İtalya'da yetiştirilen en yaygın sarı portakal ve kan portakalı çeşitlerinden elde edilen 72 portakal suyunda 19 aromatik bileşeni GC / MS ile tanımlanmış ve GC-FID ile miktarlarını belirlemiştir. CP Wax 52 CB (50 m x 0.25 mm, df= 0.2) kolon kullanılmıştır. Belirlenen uçucu aroma bileşenleri ve miktarları aşağıda Tablo 4.2.' de belirtilmiştir.

Tablo 4.2. Bazı portakal çeşitlerinde GC/MS ve GC-FID ile belirlenen uçucu aroma bileşenleri ve miktarları($\mu\text{g L}^{-1}$) (Maccarone vd., 1998; Selli ve Kelebek, 2011* ; Selli, Cabaroglu ve Canbas, 2004**; Kelebek ve Selli, 2011***)

Bileşen adı	Navel	Valensiya	Washington	Ovale calabrese	Tarocco	Sanguinello	Moro	Kozan Yerli**	Dörtüol Yerli***
Limonen	7050	17270	10080	38380	1900	14400-14310*	16060-10670*	18400	19245
Mirsen	91	200	98	380	24	140-319,7*	150-177,9*	356	71,8
Valensen	72	32	170	110	23	530-166,6*	430-60,5*	-	1490
Linalool	36	56	61	290	10	71-1842*	110-2009*	3290	1956
Terpinen-4-Ol	80	140	90	110	120	250-868,2*	220-608,4*	969	485
α -terpineol	11	10	26	12	4	41-1259*	30-1766*	524	240
1-butanol	58	47	47	38	47	44-13,1*	54-112,7*	-	-
2-metil-1-propanol	38	62	60	32	43	25	53	-	-
2-metil-1-butanol	330	370	290	400	310	340	350	-	-
4-metil-2-pentanol	27	44	37	36	30	45	33	-	-
1-penten-3-ol	180	110	130	86	130	98- 6,5*	130- 9,7*	-	-
3-penten-2-ol	10	11	10	100	6	7- 44,7*	7- 47,8*	-	-
Trans-2-Hekzenol	140	42	110	34	47	60-24,9*	39-26,6*	21	-
Cis-3-Hekzenol	71	9	55	32	20	15	23	127	21,6
Hekzanol	21	5	24	9	5	10-160,3*	6-104,6*	65	-
Oktanöl	12	8	26	17	4	9-1,9*	20-2,9*	110	135
Asetoin(3Hidroksibutanon)	49	74	63	25	77	68-333,5*	99-795,8*	-	-
Hekzanal	100	86	79	55	91	44-30,9*	68-9,8*	-	-
Hekzanoik Asit	35	17	25	16	22	25-142*	13-69,7*	-	8,8
Nootkaton	-	-	-	-	-	167,3*	177,1*	283	501
B-Fellandren	-	-	-	-	-	-	-	2760	-

HS-SPME /GC-MS ve GC-FID ile Kozan Yerli portakal örneklerinde 3 farklı olgunluk aşamasında hesaplanan uçucu aroma bileşenleri toplam miktarı yeşil portakal örneklerinde $10913,4 \pm 520 \mu\text{g L}^{-1}$, yeşil sarı olgunluk döneminde $30029,4 \pm 405 \mu\text{g L}^{-1}$, sarı olgunluk aşamasında ise $35386,8 \pm 2578 \mu\text{g L}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Toplam aroma maddesi miktarı ve uçucu aroma bileşenleri sayısı olgunlaşma boyunca artış göstermiştir. Bu aroma maddeleri miktarı istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde; 1- limonene; Beta Ocimene; Neo-Allo-Ocimene; Limonene oxide; linalool; Valencene; Calamenene; Benzene, 1,2-diethyl; Cycloheptene, 5-ethylidene-1-methyl; Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl) ; Benzene, 1,2,4-trimethyl; Benzene, 1-ethyl-2,4-dimethyl; Benzene, 1,2,3-trimethyl; Benzene, 1,2,3,5-tetramethyl; Benzene, 1-methyl-2-(2-propenyl) ; Benzene, 1,2,3,4-tetramethyl; Benzene, 1,3-diethenyl; 2,6,6-Trimethyl-3-methylenecyclohexene; Octanal; cyclopentanol, 1,2-dimethyl-3-1-methylethanyl; 2-Methylindanone uçucu aroma bileşikleri bakımından yeşil, yeşil sarı ve sarı olgunluk dönemleri arasında istatistiksel olarak önemli farklılık bulunmuştur ($p < 0,05$).

Kozan yerli portakal çeşidinde Beta Phellandrene; Trans isolimonene; Alpha terpinolene; 1,3,8,-p-Menthatriene; Alpha Terpeneol; trans-(+)- Carveol; 2-Methylenebornane; Beta Terpinene; Aromadendrene; alpha amorphene; alpha selinene; Ledene; (-)-alpha Panasinsen; Alpha curcumen; 1,3-cyclopentadiene, 1,2,3,4,5- pentamethyl; Benzene, 1-ethyl-3,-methyl; o-Diethyl benzene; Benzene, 1,2,3-trimethyl; benzene, 1-ethyl-3,5-dimethyl; benzene, ethylmethyl; Benzene, 1-ethenyl-4-ethyl; 2,6-octadiene, 2,6-dimethyl; Benzene, 1,3-diethyl-5methyl; 5-Ethylindan; Decanal ; Benzaldehyde; 4-methyl benzaldehyde; 3-methyl benzaldehyde; Dodecanal; 2,6 dimethyl benzaldehyde; ethenyl benzaldehyde; trans Cinnamaldehyde; Benzene acetaldehyde, alpha-ethylidene-(2 phenyl-2-butenal) ; 4-ethyl benzenemethanol; Ethanone, 1-(4-methylphenyl) ; Methyl acetophenone; 2,6- dimethyl phenol; Phenol, 2-methyl; 2,3 dimethyl phenol; 3 methyl phenol (m-cresol) ; 3,5 dimethyl phenol; 2 methyl-5-(1-methyl ethyl) phenol; 2,3,6 trimethyl phenol; Octanoic acid uçucu aroma bileşikleri bakımından yeşil ve yeşil sarı olgunluk dönemleri arasında istatistiksel açıdan fark yok iken, yeşil sarı ve sarı olgunluk dönemleri arasında istatistiksel olarak önemli farklılık bulunmuştur ($p < 0,05$).

Yeşil sarı ve sarı olgunluk aşamaları arasında Ocimene; Benzene, 1-methyl-4-(2-propenyl); Alpha methyl cinnamic aldehyde; 2,4 dimethyl phenol bileşikleri bakımından istatistiksel

olarak fark yokken, yeşil ve yeşil sarı olgunluk aşamaları arasında istatistiksel olarak önemli fark tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Kozan yerli portakalında tüm olgunluk dönemleri arasında delta Cadinene uçucu aroma bileşiği bakımından istatistiksel açıdan fark vardır ($p<0,05$). En büyük değer yeşil sarı olgunluk aşamasında, en küçük değer ise yeşil olgunluk döneminde kaydedilmiştir.

4.2. β -glikozidaz Aktivitesi Ölçümü Bulguları

Absorbans değerleri 400nm dalga boyunda Agilent Cary60 UV-VIS marka spektrofotometre ile kaydedilmiştir. 1 ünite β -glikozidaz aktivitesi dakikada 1 μ M p-nitrofenolü serbest bırakan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. β -glikozidaz enzimi aktivite değerleri (U/mg) aşağıda Tablo 4.3.'te belirtilmiştir.

Tablo 4.3. Olgunlaşma boyunca Kozan yerli portakal çeşidinde β -glikozidaz enziminin spesifik aktivite (ünite/mgprotein) değişimi

1.Olgunluk (Yeşil)	2.Olgunluk (Yeşil-Sarı)	3.Olgunluk (Sarı)
18,5 ^a $\pm$ 0,2	12,3 ^b $\pm$ 0,3	11,6 ^c $\pm$ 0,2

^{a,b,c} ; Aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir ($p<0,05$).

Bu çalışmada henüz olgunlaşmamış yeşil portakal örneklerinde β -glikozidaz spesifik aktivite değerinin en yüksek olduğu, yeşil sarı olgunluk dönemine kadar belirgin düşüş gösterdiği, olgunlaşmış sarı portakal örneklerinde ise kısmi azalarak olgunlaşma boyunca en düşük değerde olduğu tespit edilmiştir. Olgunlaşma boyunca β -glikozidaz spesifik aktivitesinde azalma kaydedilirken uçucu aroma bileşenleri miktarının artış göstermiştir.

Gerardi vd., (2001) kiraz meyvesinde β -glikozidaz enzimini saflaştırmış, ham ekstraktta β -glikozidaz spesifik aktivitesi 4,05 U mg⁻¹ protein olarak hesaplanmıştır. Bir yüksek lisans tez çalışmasında (Ergöçen, 2013) Kayısı çekirdeklerinden β -glikozidaz enziminin saflaştırılmış, ham ekstraktın β -glikozidaz spesifik aktivitesi 5 U/ml protein bulunmuştur.

Cameron vd., (2001) yaptığı Valensiya portakal cinsinde β -glikozidaz saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmasında enzim aktivitesi p-nitrofenil- β -D-glikopiranozid'den serbest kalan p-nitrofenil enzim iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri

kombinasyonu ile saflaştırılmış, spesifik aktivite $0,0217 \mu\text{Mol PNPmin}^{-1} \mu\text{L}^{-1}$ olarak kaydedilmiştir.

(Hartmann-Schreier ve Schreier, 1986) β -glikozidazın Papaya meyvesinden saflaştırılması ve kısmi karakterizasyonu konulu bir araştırmada 3 farklı olgunluk döneminde papaya meyve özütünde β -glikozidaz aktivitesi hesaplanmış ve olgunlaşmamış meyve özütünde 300-470 nkat/kg olgunlaşmış meyve özütünde 330-500 nkat/kg aşırı olgunlaşmış meyve özütünde 300-500 nkat/kg olarak hesaplanmıştır.

Sicilya kan portakallarından elde edilen β -glikozidazın antosiyanin bozunması ile ilişkisi konulu araştırmada (Barbagallo, Palmeri, Fabiano, Rapisarda, ve Spagna, 2007) en yaygın Sicilya kan portakalı olan Tarocco cinsinde taze sıkılmış meyvede β - D-glikozidaz aktivitesi $1.5 \times 10^{-3} \text{Ug}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. β - D-glikozidaz aktivitesinin, meyvenin son olgunlaşma aşamasında antosiyaninlerin parçalanmasıyla ilişkili olduğu belirtilmiştir.

Gerardi vd., (2001) 4 farklı olgunlaşma döneminde kiraz meyvesinde β -glikozidaz aktivitesinin değişimini kaydettikleri çalışmalarında kiraz meyvesinin β -glikozidaz aktivitesinin olgunlaşmamış halden yarı olgunluğa geçiş döneminde ham olgunluğa göre artış gösterdiğini fakat tam olgunluk ve aşırı olgunluk döneminde aktivitenin azaldığını saptamışlardır.

Bir hasat dönemi boyunca 4 farklı olgunluk evresinde zeytin meyvesinde olgunlaşma sırasında β -glikozidaz enziminin hücre ve dokularda yerleşimini ve aktivitesini inceledikleri bir çalışmada (Mazzuca vd., 2006) yeşil ve çekirdeği olgunlaşmamış, yeşil ve çekirdekleri odunsulaşmış, olgunlaşmış yeşil haldeki ve yeşil kahverengi aşırı olgun durumda zeytin örneklerinin β -glikozidaz aktivite değeri karşılaştırılmış, β -glikozidaz aktivitesinin olgun olmayan meyvelerde en yüksek düzeyde olduğunu bildirilmiştir.

Orruño vd., (2001) çilekte 2,5 - dimetil - 4 - hidroksi - 3 (2H) -furanon biyosentezinde β - glikozidazın rolü hakkında yaptıkları çalışmada β -glikozidaz enzim aktivitesi olgunlaşmamış yeşil çileklerde yüksekken ($0,05$ - $0,06 \text{ U.mg}^{-1}\text{protein düzeyinde}$), olgunlaşma sırasında hafifçe arttığı fakat sonra olgunlaşmış kırmızı meyvede ($0,04$ - $0,05 \text{ U.mg}^{-1}\text{protein düzeyinde}$) önceki olgunlaşma seviyeleri altına düştüğü vurgulanmıştır. 2,5-dimetil - 4-hidroksi-3 (2H) -

furanon'un glukozid ve aglikon formlarında bir artış saptanmış ancak olgunlaşma sırasında bu formların biyosentezinde β -glukozidazın hız sınırlayıcı basamak olamayacağı belirtilmiştir.

Şener, (2012) olgunlaşma boyunca 3 farklı kayısı çeşidinin , 2 farklı yılda, 3 farklı olgunluk döneminde β -glukozidaz spesifik aktivitelerinin değişimini incelemiş ve karşılaştırmış; tüm çeşitlerin spesifik aktivite değerlerinde olgunlaşma boyunca düşüş gözlemlenmiştir.

Biles vd., (1997) tarafından Şili biberlerinde 3 farklı olgunluk döneminde β -glukozidaz aktivitesini incelenmiş ve β -glukozidaz aktivitesini yeşil, yeşil-kırmızı, kırmızı biberlerde sırasıyla 0,21; 0,28 ; 0,16 (nKat mg protein⁻¹) olarak kaydedilmiştir. Henüz olgunlaşmamış yeşil biberlerde belirli bir düzeyde olan β -glukozidaz aktivitesi renk geçiş döneminde artış göstermiş ve biberlerin kırmızı olduğu tam olgunluk döneminde ise olgunlaşmamış yeşil haldeki aktivitenin de altında bir değer belirlemişlerdir. *Actinidia chinensis* türünden "Hort16A" adlı kivi meyvesinde olgunlaşma boyunca bağlı aroma profilindeki değişikliklerin araştırıldığı bir çalışmada (Garcia vd., 2013), β -glukozidaz aktivitesinin olgunlaşmamış meyvelerde en yüksek seviyede olduğu, olgunlaşmış ve aşırı olgunlaşmış meyvelerde hafifçe azaldığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak kivi aroma gelişimi için ne β -glukozidaz aktivitesinin ne de glukozit içeriğinin sınırlayıcı bir faktör olmadığı, ancak diğer glukozidazların ve glukozil transferazların uçucu aroma bileşenleri üzerinde bir etkiye sahip olabileceği veya bu enzimler arasında rekabet bulunabileceği olasılığından bahsedilmiştir.

Bu çalışmada saptanan olgunlaşma boyunca β -glukozidaz spesifik aktivitesinin azalışı literatürde incelenen araştırma sonuçları ile bağdaşmaktadır.

4.3. ADH Aktivitesi Ölçümü Bulguları

Absorbans değerleri 340 nm dalga boyunda Agilent Cary60 UV-VIS marka spektrofotometre ile saptanmış olup üç farklı olgunlaşma döneminde ADH aktivite değerleri (U/mg) aşağıda Tablo 4.4'te belirtilmiştir.

Tablo 4.4. Olgunlaşma boyunca Kozan yerli portakal çeşidinde ADH enziminin spesifik aktivite (U/mgprotein) değişimi

1. Olgunluk (Yeşil)	2. Olgunluk (Yeşil-Sarı)	3. Olgunluk (Sarı)
46,4 ^a ±0,3	18,7 ^b ±0,2	17,6 ^c ±0,3

^{a,b,c} ; Aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir (p<0,05).

Bu çalışmada henüz olgunlaşmamış yeşil portakal örneklerinde ADH spesifik aktivite değerinin en yüksek olduğu, yeşil sarı olgunluk dönemine kadar ciddi düzeyde düşüş gösterdiği, olgunlaşmış sarı portakal örneklerinde ise kısmi azalarak olgunlaşma boyunca en düşük değerde olduğu kaydedilmiştir. Literatürde meyvenin olgunlaşması boyunca ADH spesifik aktivitesinin değişimini inceleyen sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır.

Speirs vd., (2002) yaptıkları çalışmada altı domates çeşidinde, olgunluk ilerleyen aşamalarında hasat edilerek perikarp dokusundaki meyve yumuşaklığı ve alkol dehidrogenaz (ADH) enzimi aktivitesini ölçmüşlerdir. Olgunlaşan meyvede ADH aktivitesindeki artış oranının ($r = 0.970$) meyvenin yumuşama oranı ile büyük ölçüde korele olduğu bulunmuştur, bu da meyvedeki ADH aktivitesinin indüksiyonu doğrudan olgunlaşmanın bir işlevi olmaktan ziyade muhtemelen meyvenin yumuşamasının bir işlevi olduğu belirtilmiştir.

Hasat sonrası 2 ay -1°C 'de depolanan Packham's ve Triumph armutlarında 3 farklı oksijen basıncında olgunlaştırma denemesi yapılmış, farklı olgunlaşma düzeylerinde örnekler -75°C 'de dondurulduktan sonra örneklerden elde edilen özütlerde etanol ve asetaldehit içeriği ve ADH ve PDC enzim aktiviteleri araştırılmıştır. ADH aktivitesi, atmosferik havalı ortamda depolanan örneklerde taze kütle bazında, meyvenin soğuk hava deposundan çıkarılmasıyla $0,5 \mu \text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{dk}^{-1}$ olarak hesaplanmış, daha sonra deney boyunca yavaş yavaş azalmıştır. Sonuçlar, ADH'ın armut olgunlaşması sırasında etanol birikimi için sınırlayıcı faktör olmadığını göstermektedir. ADH bazı aroma ile ilişkili bileşiklerin dengesine dahil olsa da olgunlaşan meyvede aroma gelişimini etkileyip etkilemeyeceğinin belirlenemediği belirtilmiştir (Chervin, Truett ve Speirs, J. 1999).

Longhurst, Tung, ve Brady, (1990) tarafından yapılan çalışmada incelenen 5 domates (*Lycopersicon esculentum*) çeşidinin her birinde, alkol dehidrogenaz spesifik aktivitesi olgunlaşmanın erken aşamalarında azalmış ve daha sonra postklimakterik dönemde arttığı tespit edilmiştir. Meyvenin perikarp dokusunun ekstraksiyonu ile elde edilen süpernatant enzim olarak kullanılmış; ADH 'ın etanol oksidasyonu sırasında NADH birikimine bağlı olarak 340 nm'de absorbanstaki artış ölçülerek 20°C 'de spektrofotometrik olarak test edilmiştir. Bir ADH birimi, dakikada bir μmol NADH üretmek için gereken enzim miktarı olarak hesaplanmıştır. ADH aktivitesi, olgun yeşil hasat edilmiş 20°C 'de olgunlaşmaya bırakılmış 5 domates çeşidinde de izlenmiş ve tüm meyvelerde aktivite tespit edilmiştir.

Spesifik aktivitenin, kırılma aşamasında hafifçe azaldığı ve meyveler olgunlaştıkça birkaç kata kadar arttığı, en yüksek aktivite çok olgun meyvelerde tespit edildiği ve en büyük artış oranı meyvenin tam rengine ulaşmasında veya hemen sonrasında saptandığından olgunlaşma sırasında artan ADH aktivitesinin, lezzet gelişimine katkıda bulunabileceği belirtilmiştir.

Muz kabuk renginine yeşilden aşırı olgun kahverengi benekli formuna kadar numara verilmiş, yeşil renkten kahverengiye doğru gidildikçe ADH aktivitesi ve etanol birikimi artış göstermiştir. ADH indüksiyonun, muz meyvesindeki etanol oluşumundan büyük ölçüde sorumlu olduğu belirtilmiştir (Hyodo, Ikeda, Nagatani ve Tanaka, 1983).

İki hasat dönemi boyunca Hamlin portakalının pürivat metabolizmasının araştırıldığı bir çalışmada ilk hasat döneminde elde edilen verilere göre ADH seviyesi Eylül Ekim Kasım Aralık Ocak Şubat aylarında sırasıyla; 79 ± 1 , 122 ± 7 , 133 ± 2 , 172 ± 5 , 126 ± 4 , 20 ± 2 , 15 ± 1 U/mg olarak hesaplanmıştır (U: 25 °C’de dakikada reaksiyonda tüketilen n mol substrat olarak tanımlanır(Roe, Davis ve Bruemmer, 1984).

Olgunlaşma ile turunçgillerdeki, enzim aktivitesi ve asetaldehit-etanol birikiminin incelendiği bir çalışmada; ADH, Hamlin portakalının meyve suyu keseciklerinde Ekim’den Aralık’a kadar artışın olduğu saptanmış ve olgunlaşma boyunca en büyük artışın ise Kasım ayından Ocak ayına kadar geçen sürede meydana geldiği belirtilmiştir. ADH düzeyini $77,2 \pm 1,2$ U/mg ile $143,3 \pm 4,1$ U/mg arasında değişerek Ocak ayında yaklaşık 2 katına çıktığı daha sonra Şubat ayında bir miktar azaldığı kaydedilmiş ($127,5 \pm 2,5$ U/mg); Aralık ayında ($112,5 \pm 2,5$ U/mg) Ekim ayına göre daha yüksek hesaplanan ADH seviyesinin, etanolün asetaldehite göre olan yüksek konsantrasyon oranını açıkladığı belirlenmiştir. Olgunlaşmanın NADH / NAD oranını artırdığı tespit edilmiştir (Roe vd., 1984; Bruemmer, 1986). Lara, Miró, Fuentes, Sayez, Graell, ve López (2003) tarafından uzun süreli kontrollü atmosfer koşullarında depolanan armut meyvesindeki uçucu aroma bileşiklerinin biyosentezinin incelendiği çalışmada depolama süresi boyunca ADH spesifik aktivitesi değişkenlik göstermiş meyvenin etanol üretimi, ADH aktivitesi ile iyi korelasyon göstermese de enzim aktivitesinin geri besleme inhibisyonu veya asetaldehite oksidasyon olasılıklarından bahsedilmiştir.

Başka bir araştırmada, hasatta olgunluk aşamasının aroma kalitesi üzerindeki etkisini araştırmak için, olgunlaşma sırasında "Fuji" elma meyvesinde bazı uçucu bileşiklerin biyosentezini incelenmiş; ADH aktivitesi, asetaldehit, etanol birikimi ve diğer uçucu aroma bileşiklerin üretimi değerlendirilmiş asetaldehit konsantrasyonu sadece küçük fark göstermiştir. Aynı dönemde etanol konsantrasyonu kademeli olarak arttığı için asetaldehitten üretiliyor olma ihtimali ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte, ADH aktivitesinin Eylül ayı başından Ekim sonuna kadar hem meyve kabuğunda hem de özütünde sürekli olarak azalışı tespit edilmiştir. Etanol konsantrasyonu ile ADH aktivitesinin ters orantılı olduğu, olgunlaşma ile ADH aktivitesinin azaldığı, olgunlaşmamış örnek grubunda daha yüksek seviyelerde ADH aktivitesi karakterize edilmiştir(Echeverria vd., 2004).

Villatoro vd., (2008) tarafından yapılan bir çalışmada farklı örneklem tarihlerinde Pink Lady elmalarının kabuğunda ve meyve özütünde alkol dehidrogenaz spesifik aktivitesi hesaplanmış ve aylara göre değişimi izlenmiş, ADH aktivitesi Eylül ayı boyunca artış gösterdiği, Ekim ayında önce azalıp sonra arttığı ve Kasım ayı boyunca azalışa geçtiği kaydedilmiştir. Artan asetaldehit miktarının ADH ile katalize edilen alkol fermantasyonunun ters reaksiyonu olan etanolün enzimatik oksidasyonu ile elde edilmiş olabileceği belirtilmiştir. Bu nedenle olgunlaşma boyunca etanol üretimindeki düşüşün, asetaldehit üretimine yönlendirildiğinin göstergesi olabileceği bildirilmiştir.

Bu çalışmada belirlenen 3 farklı olgunluk aşamasında kaydedilen ADH spesifik aktivitelerinin olgunlaşma ile azalışı literatürde incelenen sonuçlar ile bağdaşmaktadır.

Kozan yerli portakal çeşidinde yeşil, yeşil sarı ve sarı olgunluk aşamaları arasındaki farklılık β -glukozidaz ve ADH spesifik aktivitesi bakımından istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

5. SONUÇ

- Kozan Yerli portakal suyu örneklerinde HS-SPME/GC-MS yöntemi ile gerçekleştirilen analizler doğrultusunda 3 farklı aroma kütüphanesi taranarak en az %85 benzerlik ile 73 farklı aroma bileşeni tespit edilmiştir.
- Her üç olgunlaşma döneminde de tanımlanan bileşenler arasında hasat dönemlerine göre aroma bileşenleri profili ve miktarları bakımından farklılıklar tespit edilmiştir.
- Yeşil olgunluk döneminde tanımlanan 28 uçucu aroma bileşeninin toplam miktarı $10913,4 \pm 520 \mu\text{g L}^{-1}$ olup; en baskın olanları limonene ($8716,7 \mu\text{g L}^{-1}$), linalool ($46 \mu\text{g L}^{-1}$), α terpineol ($28,2 \mu\text{g L}^{-1}$), octanal ($158,7 \mu\text{g L}^{-1}$) ve decanal ($88,8 \mu\text{g L}^{-1}$) olarak kaydedilmiştir.
- İkinci olgunluk dönemi olan yeşil sarı olgunluk aşamasında tanımlanan 29 uçucu aroma bileşeninin toplam miktarı $30029,4 \pm 405 \mu\text{g L}^{-1}$ olarak hesaplanmış, limonene miktarı $27257,7 \mu\text{g L}^{-1}$ olarak kaydedilmiş, yeşil olgunluk aşamasının 3 katı konsantrasyona ulaşmıştır. beta ocimene ($120,4 \mu\text{g L}^{-1}$) alpha terpinolene ($67,6 \mu\text{g L}^{-1}$) ise diğer öne çıkan bileşiklerdir.
- Üçüncü olgunluk döneminde toplam 70 uçucu aroma bileşeni kaydedilmiş, tanımlanan bu bileşiklerin toplam miktarı $35386,8 \pm 2578 \mu\text{g L}^{-1}$ 'dir. Beta phellandrene ($116,3 \mu\text{g L}^{-1}$), α selinene ($20,8 \mu\text{g L}^{-1}$) ve valencene ($551,4 \mu\text{g L}^{-1}$) ilk iki olgunluk dönemine göre baskın hale dönüşen, tam olgunlaşma ile serbest hale geçen uçucu aroma bileşikleridir.
- Bu çalışmada, Kozan Yerli portakal çeşidi kullanılarak olgunlaşma boyunca aroma maddelerinin ve β -glikozidaz ve ADH enzim aktivitelerindeki değişimler araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, aşağıda özet olarak verilmiştir.
- 3 farklı olgunluk döneminde β -glikozidaz enziminin spesifik aktivitesindeki değişim izlenmiştir. Olgunlaşmamış yeşil Kozan Yerli portakal örneklerinde spesifik aktivite en yüksek değerde kaydedilmiş olup, yeşil sarı olgunluk döneminde spesifik aktivite değerinde azalış kaydedilmiştir. En düşük düzeyde β -glikozidaz spesifik aktivitesi ise son olgunluk aşaması olan sarı portakal örneklerinde tespit edilmiştir. β -glikozidaz spesifik aktivitesi uçucu aroma maddeleri gelişimi üzerinde sınırlayıcı bir faktör olmamakla birlikte, serbest aroma içeriğinde diğer glikozidazların etkili olması mümkündür.

- Yeşil portakal örneklerinde sarı-yeşil ve sarı portakal örneklerinden daha yüksek β -glikozidaz bulunması, savunma gibi bitki hücresi işlevlerindeki hayati rolü ile tutarlıdır. Hücre duvarı değişimine ve meyvelerin yumuşamasına etki eden β -glikozidaz işlevini gerçekleştirdikçe aktivite değerinde düşüş gözlemlenmiştir.
- Olgunlaşmamış yeşil Kozan Yerli portakalından elde edilen numunelerde daha yüksek ADH spesifik aktivite seviyesi tanımlanmış olup, ilerleyen olgunluk ile ADH spesifik aktivite değeri azalmıştır. Olgunlaşmış Kozan Yerli portakalında düşük ADH aktivitesinin uçucu aroma biyosentezi üzerine sınırlayıcı bir faktör olmadığı düşünülmektedir. Bu sonuçlar, ilerleyen olgunluk aşamalarında uçucu aroma bileşenleri üretiminin diğer aroma ilişkili enzim faaliyetlerine dayalı olması olasıdır.
- Bu sonuçlar Kozan Yerli portakalında düşük β -glikozidaz ve ADH enzim aktivitelerinin uçucu aroma biyosentezinin kendine özgü gereksinimleri için yeterli olduğu anlamına gelir ve substrat mevcudiyetinin olgunlaşması sırasında aroma gelişimi için enzim aktivitesinden daha önemli bir faktör olduğunu gösterir.
- Olgunlaşma sürecinin sonunda β -glikozidaz ve ADH aktivitelerinde hafif düşüş, olgunluk sırasında proteazlara bağlı hücre proteinlerinin proteolizi kaynaklı olabilir.

KAYNAKLAR

- Aharoni, A., Keizer, L. C. P., Bouwmeester, H. J., Sun, Z. K., Alvarez-Huerta, M., Verhoeven, H. A., ... & Voet, H. (2000). van der, Jansen RC, Guis M, Mol J, Davis RW, Schena M, van Tunen AJ, O'Connell AP: Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell*, 12, 647-661
- Ahmed, E. M., Dennison, R. A., & Shaw, P. E. (1978). Effect of selected oil and essence volatile components on flavor quality of pumpout orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(2), 368-372.
- Ahmed, E. M., Dennison, R. A., Dougherty, R. H., & Shaw, P. E. (1978). Flavor and odor thresholds in water of selected orange juice components. *Journal of agricultural and food chemistry*, 26(1), 187-191.
- Alim, A., Song, H., Liu, Y., Zou, T., Zhang, Y., & Zhang, S. (2018). Flavour-active compounds in thermally treated yeast extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(10), 3774-3783.
- Arctander, S. (1969). *Perfume and Flavor Chemicals* (vol. 1). Montclair, NJ: Steffen Arctander.
- Arena, E., Guarrera, N., Campisi, S., & Asmundo, C. N. (2006). Comparison of odour active compounds detected by gas-chromatography–olfactometry between hand-squeezed juices from different orange varieties. *Food Chemistry*, 98(1), 59-63.
- Arthur, C. L., & Pawliszyn, J. (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical chemistry*, 62(19), 2145-2148.
- Attaway, J. A., & Oberbacher, M. F. (1968). Studies on the aroma of intact Hamlin oranges. *Journal of Food Science*, 33(3), 287-289.
- Attaway, J. A., Pieringer, A. P., & Buslig, B. S. (1968). The origin of citrus flavor components—IV: The terpenes of “Valencia” orange leaf, peel, and blossom oils. *Phytochemistry*, 7(9), 1695-1698.
- Averbeck, M., & Schieberle, P. H. (2009). Characterisation of the key aroma compounds in a freshly reconstituted orange juice from concentrate. *European Food Research and Technology*, 229(4), 611-622.
- Bai, J., Baldwin, E. A., McCollum, G., Plotto, A., Manthey, J. A., Widmer, W. W., ... &

- Cameron, R. (2016). Changes in volatile and non-volatile flavor chemicals of “Valencia” orange juice over the harvest seasons. *Foods*, 5(1), 4.
- Barbagallo, R., Palmeri, R., Fabiano, S., Rapisarda, P., & Spagna, G. (2007). Characteristic of β -glucosidase from Sicilian blood oranges in relation to anthocyanin degradation. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(5), 570-575.
- Barkley, N. A., Roose, M. L., Krueger, R. R., & Federici, C. T. (2006). Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theoretical and applied genetics*, 112(8), 1519-1531.
- Barrett, H.C., Rhodes, A.M. (1976). A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. *Syst. Bot.* 1: 105-136.
- Beaulieu, J. C. and Grimm, C. C. (2001). Identification of volatile compounds in cantaloupe at various developmental stages using solid phase microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 1345–1352.
- Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2004). Aroma compounds. In *Food chemistry* (pp. 342-408). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Berger, R. G., & Drawert, F. (1984). Changes in the composition of volatiles by post-harvest application of alcohols to red delicious apples. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35(12), 1318-1325.
- Biles, C. L., Bruton, B. D., Russo, V., & Wall, M. M. (1997). Characterisation of β -galactosidase isozymes of ripening peppers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75(2), 237-243.
- Bojorquez, G., & Gómez-Lim, M. A. (1995). Peroxisomal thiolase mRNA is induced during mango fruit ripening. *Plant Molecular Biology*, 28(5), 811-820.
- Bruemmer, J. H. (1986). Regulation of acetaldehyde and ethanol accumulation in citrus fruit.
- Buettner, A., & Schieberle, P. (2001). Application of a comparative aroma extract dilution analysis to monitor changes in orange juice aroma compounds during processing.
- Bylaite, E., & Meyer, A. S. (2006). Characterisation of volatile aroma compounds of orange juices by three dynamic and static headspace gas chromatography techniques. *European Food Research and Technology*, 222(1-2), 176.
- Cameron, R. (2016). Changes in volatile and non-volatile flavor chemicals of “Valencia” orange juice over the harvest seasons. *Foods*, 5(1), 4.
- Cerdán-Calero, M., Sendra, J. M., & Sentandreu, E. (2012). Gas chromatography coupled to mass spectrometry analysis of volatiles, sugars, organic acids and aminoacids in

- Valencia Late orange juice and reliability of the Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System for their automatic identification and quantification. *Journal of Chromatography A*, 1241, 84-95.
- Chervin, C., Truett, J. K., & Speirs, J. (1999). Alcohol dehydrogenase expression and alcohol production during pear ripening. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124(1), 71-75.
- Çimen, B. (2011). Farklı Turunçgil Anaçları Üzerine Aşılı Navelina Göbekli Portakalının Demir (Fe) Klorozuna Toleransının Fizyolojik Yönden İncelenmesi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Yüksek Lisans Tezi. Adana 101 s.
- Cuevas, F. J., Pereira-Caro, G., Moreno-Rojas, J. M., Muñoz-Redondo, J. M., & Ruiz-Moreno, M. J. (2017). Assessment of premium organic orange juices authenticity using HPLC-HR-MS and HS-SPME-GC-MS combining data fusion and chemometrics. *Food Control*, 82, 203-211.
- Davidovich-Rikanati, R., Lewinsohn, E., Bar, E., Iijima, Y., Pichersky, E., & Sitrit, Y. (2008). Overexpression of the lemon basil α -zingiberene synthase gene increases both mono- and sesquiterpene contents in tomato fruit. *The Plant Journal*, 56(2), 228-238.
- Davies, F. S., & Albrigo, L. G. (1994). *Crop production science in horticulture 2: citrus*. Wallingford: CAB International.
- Dixon, J., & Hewett, E. W. (2000). Factors affecting apple aroma/flavour volatile concentration: a review. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 28(3), 155-173.
- Dunn, M. J. (1989). Determination of Total Protein Concentration (E.L.V. Haris and S. Angal Editör). In *Protein Purification Methods*, IRL Press, Oxford, 317.
- Echeverria, G., Graell, J., López, M., & Lara, I. (2004). Volatile production, quality and aroma-related enzyme activities during maturation of 'Fuji' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 31(3), 217-227.
- El-Sharkawy, I., Manríquez, D., Flores, F. B., Regad, F., Bouzayen, M., Latche, A., & Pech, J. C. (2005). Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity. *Plant Molecular Biology*, 59(2), 345-362.
- Esen, A. (1993). β -Glucosidases: biochemistry and molecular biology: ACS Publications.

- Fan, G., Lu, W., Yao, X., Zhang, Y., Wang, K., & Pan, S. (2009). Effect of fermentation on free and bound volatile compounds of orange juice. *Flavour and fragrance journal*, 24(5), 219-225
- Federici, C. T., Fang, D. Q., Scora, R. W., & Roose, M. L. (1998). Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 96(6-7), 812-822.
- Fellman, J., Miller, T., Mattinson, D., & Mattheis, J. (2000). Factors that influence biosynthesis of volatile flavor compounds in apple fruits. *HortScience*, 35(6), 1026-1033.
- Feng, S., Suh, J. H., Gmitter, F. G., & Wang, Y. (2018). Differentiation between flavors of sweet orange (*Citrus sinensis*) and mandarin (*Citrus reticulata*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(1), 203-211.
- Flores, F., El Yahyaoui, F., De Billerbeck, G., Romojaro, F., Latche, A., Bouzayen, M., ... & Ambid, C. (2002). Role of ethylene in the biosynthetic pathway of aliphatic ester aroma volatiles in Charentais Cantaloupe melons. *Journal of Experimental Botany*, 53(367), 201-206
- Galliard, T., Matthew, J. A., Wright, A. J., & Fishwick, M. J. (1977). The enzymic breakdown of lipids to volatile and non-volatile carbonyl fragments in disrupted tomato fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28(9), 863-868.
- Gang, D. R., Wang, J., Dudareva, N., Nam, K. H., Simon, J. E., Lewinsohn, E., & Pichersky, E. (2001). An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. *Plant Physiology*, 125(2), 539-555.
- Garcia, C. V., Stevenson, R. J., Atkinson, R. G., Winz, R. A., & Quek, S. Y. (2013). Changes in the bound aroma profiles of 'Hayward' and 'Hort16A' kiwifruit (*Actinidia* spp.) during ripening and GC-olfactometry analysis. *Food Chemistry*, 137(1-4), 45-54.
- Gerardi, C., Blando, F., Santino, A., & Zacheo, G. (2001). Purification and characterisation of a β -glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. *Plant Science*, 160(5), 795-805.
- González-Agüero, M., Troncoso, S., Gudenschwager, O., Campos-Vargas, R., Moya-León, M. A., & Defilippi, B. G. (2009). Differential expression levels of aroma-related genes during ripening of apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(5), 435-440.

- Harada, M., Ueda, Y., & Iwata, T. (1985). Purification and some properties of alcohol acetyltransferase from banana fruit. *Plant and cell physiology*, 26(6), 1067-1074.
- Hartmann-Schreier, J., & Schreier, P. (1986). Purification and partial characterization of β -glucosidase from papaya fruit. *Phytochemistry*, 25(10), 2271-2274.
- Howe, G. A., Lee, G. I., Itoh, A., Li, L. and DeRocher, A. E. (2000). Cytochrome P450-dependent metabolism of oxylipins in tomato. Cloning and expression of allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase. *Plant Physiology* 123, 711–724.
- Hyodo, H., Ikeda, N., Nagatani, A., & Tanaka, K. (1983). The increase in alcohol dehydrogenase activity and ethanol content during ripening of banana fruit. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 52(2), 196-199.
- Itoh-Nashida, T., Hiraiwa, M., & Uda, Y. (1987). Purification and properties of β -D-glucosidase (linamarase) from the butter bean, *Phaseolus lunatus*. *The Journal of Biochemistry*, 101(4), 847-854.
- Kato M. Mechanism of Carotenoid Accumulation in Citrus Fruit. *Journal of Japanese Society of Horticultural Science*; 2012: 81: 219–233.
- Kaygısız H., Aybak H. Ç.,(2005), Narenciye Yetiştiriciliği, Hasad Yayıncılık /İstanbul, 14.
- Ke, D., et al. (1994). "Mode of oxygen and carbon dioxide action on strawberry ester biosynthesis." *Journal of the American Society for Horticultural Science* 119(5): 971-975.
- Kealey, K. S., Kinsella, J. E., & Nagy, S. (1979). Orange juice quality with an emphasis on flavor components. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 11(1), 1-40.
- Kelebek, H., & Selli, S. (2011). Determination of volatile, phenolic, organic acid and sugar components in a Turkish cv. Dortyol (*Citrus sinensis* L. Osbeck) orange juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(10), 1855-1862.
- Lara, I., Miro', R. M., Fuentes, T., Sayez, G., Graell, J. and Lo'pez, M. L. (2003). Biosynthesis of volatile aroma compounds in pear fruit stored under longterm controlled-atmosphere conditions. *Postharvest Biology and Technology* 29, 29–39.
- Lecas, M., Gunata, Z. Y., Sapis, J. C., & Bayonove, C. L. (1991). Purification and partial characterization of β -glucosidase from grape. *Phytochemistry*, 30(2), 451-454.
- Lewinsohn, E., Schalechet, F., Wilkinson, J., Matsui, K., Tadmor, Y., Nam, K.-H., Amar, O., Lastochkin, E., Larkov, O., Ravid, U., Hiatt, W. Gepstein, S. et al. (2001). Enhanced levels of the aroma and flavor compound S-Linalool by metabolic engineering of the terpenoid pathway in tomato fruits. *Plant Physiology* 127, 1256–1265.

- Longhurst, T., Tung, H., & Brady, C. (1990). Developmental regulation of the expression of alcohol dehydrogenase in ripening tomato fruits. *Journal of Food Biochemistry*, 14(6), 421-433.
- Longo, M. A., & Sanromán, M. A. (2006). Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies. *Food Technology and Biotechnology*, 44(3), 335-353.
- Loza-Tavera, H. (1999). Monoterpenes in essential oils. In *Chemicals via higher plant bioengineering* (pp. 49-62). Springer, Boston, MA.
- Lucchetta, L., Manriquez, D., El-Sharkawy, I., Flores, F. B., Sanchez-Bel, P., Zouine, M., & Latché, A. (2007). Biochemical and catalytic properties of three recombinant alcohol acyltransferases of melon. Sulfur-containing ester formation, regulatory role of CoA-SH in activity, and sequence elements conferring substrate preference. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5213-5220.
- Ma, Q. L., Hamid, N., Bekhit, A. E. D., Robertson, J., & Law, T. F. (2013). Optimization of headspace solid phase microextraction (HS-SPME) for gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) analysis of aroma compounds in cooked beef using response surface methodology. *Microchemical Journal*, 111, 16-24.
- Maccarone, E., Campisi, S., Fallico, B., Rapisarda, P., & Sgarlata, R. (1998). Flavor components of Italian orange juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(6), 2293-2298.
- Martin, D. M., Fäldt, J., & Bohlmann, J. (2004). Functional characterization of nine Norway spruce TPS genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the TPS-d subfamily. *Plant physiology*, 135(4), 1908-1927.
- Matsui, K., Ujita, C., Fujimoto, S., Wilkinson, J., Hiatt, B., Knauf, V., Kajiwar, T. and Feussner, I. (2000). Fatty acid 9- and 13-hydroperoxide lyases from cucumber. *FEBS Letters* 481, 183–188.
- Matton, D. P., Constabel, P., & Brisson, N. (1990). Alcohol dehydrogenase gene expression in potato following elicitor and stress treatment. *Plant molecular biology*, 14(5), 775-783.
- Mazduca, S., Spadafora, A., & Innocenti, A. M. (2006). Cell and tissue localization of β -glucosidase during the ripening of olive fruit (*Olea europaea*) by in situ activity assay. *Plant Science*, 171(6), 726-733.
- Mendilcioğlu, K., 1996, Subtropik iklim meyveleri (Turunçgiller). E.Ü. Ziraat Fakültesi Ofset Basımevi, Bornova / İzmir.

- Mirhosseini, H., Salmah, Y., Nazimah, S. A. H., & Tan, C. P. (2007). Solid-phase microextraction for headspace analysis of key volatile compounds in orange beverage emulsion. *Food Chemistry*, 105(4), 1659-1670.
- Morant, A. V., Jørgensen, K., Jørgensen, C., Paquette, S. M., Sánchez-Pérez, R., Møller, B. L., & Bak, S. (2008). β -Glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry*, 69(9), 1795-1813.
- Moshonas, M. G., & Shaw, P. E. (1995). Fresh orange juice flavor: a quantitative and qualitative determination of the volatile constituents. In *Developments in Food Science* (Vol. 37, pp. 1479-1492). Elsevier.
- Nagy, S., & Shaw, P. E. (1990). Factors affecting the flavour of citrus fruit. *Developments in food science*.
- Nicolosi E., Deng, Z.N., Gentile, A., La Malfa, S. Continella, G. and Tribulato, E. (2000). Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1155-1166.
- Okamura-Matsui, T., Tomoda, T., Fukuda, S., & Ohsugi, M. (2003). Discovery of alcohol dehydrogenase from mushrooms and application to alcoholic beverages. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 23(2-6), 133-144
- Orruño, E., Apenten, R. O., & Zabetakis, I. (2001). The role of β -glucosidase in the biosynthesis of 2, 5-dimethyl-4-hydroxy-3 (2H)-furanone in strawberry (*Fragaria* × *ananassa* cv. Elsanta). *Flavour and Fragrance Journal*, 16(2), 81-84.
- Parker, J. K. (2015). Introduction to aroma compounds in foods. In *Flavour development, analysis and perception in food and beverages* (pp. 3-30). Woodhead Publishing.
- Pawliszyn, J. (1997). *Solid phase microextraction: theory and practice*. John Wiley & Sons.
- Pelayo, C., Ebeler, S. E. and Kader, A. A. (2003). Postharvest life and flavor quality of three strawberry cultivars kept at 5 degrees C in air or air + 20 kPa CO₂. *Postharvest Biology and Technology* 27, 171–183.
- Perera, C. O., & Baldwin, E. A. (2000). Biochemistry of fruits and its implications on processing. *Fruit processing: nutrition, products and quality management*.
- Perez, A. G., Sanz, C., & Olias, J. M. (1993). Partial purification and some properties of alcohol acyltransferase from strawberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(9), 1462-1466.

- Pérez, A. G., Sanz, C., Olías, R., Ríos, J. J., & Olías, J. M. (1996). Evolution of strawberry alcohol acyltransferase activity during fruit development and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(10), 3286-3290.
- Perez-Cacho, P. R., & Rouseff, R. L. (2008). Fresh squeezed orange juice odor: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(7), 681-695.
- Pesis, E., & Avissar, I. (1989). The post-harvest quality of orange fruits as affected by pre-storage treatments with acetaldehyde vapour or anaerobic conditions. *Journal of horticultural science*, 64(1), 107-1
- Peters, J. S., & Frenkel, C. (2004). Relationship between alcohol dehydrogenase activity and low-temperature in two maize genotypes, Silverado F1 and Adh1–Adh2–doubly null. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(10), 841-846.
- Pinho, O., Ferreira, I. M., & Santos, L. H. (2006). Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction. *Journal of chromatography A*, 1121(2), 145-153.
- Plotto, A., Margaría, C. A., Goodner, K. L., & Baldwin, E. A. (2008). Odour and flavour thresholds for key aroma components in an orange juice matrix: esters and miscellaneous compounds. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(6), 398-406.
- Porta, H., & Rocha-Sosa, M. (2002). Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant physiology*, 130(1), 15-21.
- Potty, V. H., & Bruemmer, J. H. (1970). Limonene reductase system in the orange. *Phytochemistry*, 9(11), 2319-2321.
- Poulton, J. E. (1990). Cyanogenesis in plants. *Plant physiology*, 94(2), 401-405.
- Qiao, Y., Xie, B. J., Zhang, Y., Zhang, Y., Fan, G., Yao, X. L., & Pan, S. Y. (2008). Characterization of aroma active compounds in fruit juice and peel oil of Jincheng sweet orange fruit (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) by GC-MS and GC-O. *Molecules*, 13(6), 1333-1344.
- Rega, B., Fournier, N., & Guichard, E. (2003). Solid phase microextraction (SPME) of orange juice flavor: odor representativeness by direct gas chromatography olfactometry (D-GC-O). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(24), 7092-7099.
- Reineccius, G. A. (2007). Flavour-isolation techniques. In *Flavours and fragrances* (pp. 409-426). Springer, Berlin, Heidelberg.

- Reinhard, H., Sager, F., & Zoller, O. (2008). Citrus juice classification by SPME-GC-MS and electronic nose measurements. *LWT-Food Science and Technology*, 41(10), 1906-1912.
- Ren, J. N., Yang, Z. Y., Tai, Y. N., Dong, M., He, M. M., & Fan, G. (2015). Characteristics of β -glucosidase from oranges during maturation and its relationship with changes in bound volatile compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(11), 2345-2352.
- Riu-Aumatell, M., Castellari, M., López-Tamames, E., Galassi, S., & Buxaderas, S. (2004). Characterisation of volatile compounds of fruit juices and nectars by HS/SPME and GC/MS. *Food Chemistry*, 87(4), 627-637.
- Rodrigo MJ., Alquézar B., Alós E., Lado J. & Zacarías L. (2013). Biochemical bases and molecular regulation of pigmentation in the peel of Citrus fruit. *Scientia Horticulturae*; 2013: 163: 42–62.
- Roe, B., Davis, P. L., & Bruemmer, J. H. (1984). Pyruvate metabolism during maturation of Hamlin oranges. *Phytochemistry*, 23(4), 713-717.
- Salas, J. J., & Sánchez, J. (1998). Alcohol dehydrogenases from olive (*Olea europaea*) fruit. *Phytochemistry*, 48(1), 35-40.
- Sanz, C., Oli'as, J. M. and Pe'rez, A. G. (1997). Aroma biochemistry of fruits and vegetables. In "Phytochemistry of fruit and vegetables" (F. A. Toma's Barbera'n and R. J. Robins, eds.), pp. 125–155. New York, Oxford University Press.
- Schieberle, P. and Hofmann, T. (1997). Evaluation of the character impact odorants in fresh strawberry juice by quantitative measurements and sensory studies on model mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 227–232.
- Schmutzer, G. R., Dehelean, A., Magdas, D. A., Cristea, G., & Voica, C. (2016). Determination of stable isotopes, minerals, and volatile organic compounds in Romanian orange juice. *Analytical letters*, 49(16), 2644-2658.
- Schwab, W., Davidovich-Rikanati, R., & Lewinsohn, E. (2008). Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal*, 54(4), 712-732.
- Scora R.W. 1975. On the history and origin of Citrus. *Bull. Torr. Bot. Club*, 102: 369-375.
- Selli, S., & Kelebek, H. (2011). Aromatic profile and odour-activity value of blood orange juices obtained from Moro and Sanguinello (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Industrial Crops and Products*, 33(3), 727-733.

- Selli, S., Cabaroğlu, T., & Canbas, A. (2004). Volatile flavour components of orange juice obtained from the cv. Kozan of Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17(6), 789-796.
- Shaw, P. E. (1991). Fruits ii. In: *Volatile compounds in foods and beverages*. pp. 305–327 Maarse, H., Eds. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Sheung, S.K., 1995. Sorption of Orange Juice Flavor Compound in to Polymeric Packaging Materials
- Shoseyov, O., Chet, I., Bravdo, B.-A. and Ikan, R. (1989). Flavour and fragrance enhancing enzymes. Patent [EP 0 307 071 A2].
- Sieso, V., Nicolas, M., Seck, S., & Crouzet, J. (1976). Tomato volatile components: enzymatic formation of trans-2-hexenal. *Agricultural and Biological Chemistry* (Tokyo), 40(12), 2349-2353.
- Sites, J. W., & Reitz, H. J. (1949). The variation in individual Valencia oranges from different locations of the tree as a guide to sampling methods and spot-picking for quality. Part I. Soluble solids in the juice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 1949: 54: 110
- Sites, J. W., & Reitz, H. J. (1950). The variation in individual Valencia oranges from different locations of the tree as a guide to sampling methods and spot-picking for quality. Part II. Titratable acid and the soluble solids/titratable acid ratio of the juice. *Proc ser. Soc. hort. Sci.*, 55, 73-1.
- Sizer, C. E., Waugh, P. L., Edstam, S., & Ackermann, P. (1988). Maintaining flavor and nutrient quality of aseptic orange juice. *Food technology* (Chicago), 42(6), 152-159.
- Song, H., Eom, M. H., Lee, S., Lee, J., Cho, J. H., & Seung, D. (2010). Modeling of batch experimental kinetics and application to fed-batch fermentation of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced butyric acid production. *Biochemical Engineering Journal*, 53(1), 71-76.
- Speirs, J., Correll, R., & Cain, P. (2002). Relationship between ADH activity, ripeness and softness in six tomato cultivars. *Scientia Horticulturae*, 93(2), 137-142.
- Spietelun, A., Kloskowski, A., Chrzanowski, W., & Namieśnik, J. (2013). Understanding solid-phase microextraction: key factors influencing the extraction process and trends in improving the technique. *Chemical reviews*, 113(3), 1667-1685.

- Su, E., Xia, T., Gao, L., Dai, Q., & Zhang, Z. (2010). Immobilization of β -glucosidase and its aroma-increasing effect on tea beverage. *Food and Bioproducts Processing*, 88(2-3), 83-89.
- Şener, A. (2012). Bazı Kayısı Çeşitlerinde Polifenol Oksidaz, Pektin Metilesteraz, B-Glikozidaz Ve Karotenaz Enzimlerinin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. Adana 183 s.
- Tan, B. C., Schwartz, S. H., Zeevaart, J. A. D. and McCarty, D. R. (1997). Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 94, 12235–12240.
- Tarımsal Ekonomi Ve Politika Geliştirme Enstitüsü (Tepge),(2019) Erişim Adresi: <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge>
- Terefe, N. S., Buckow, R., & Versteeg, C. (2014). Quality-related enzymes in fruit and vegetable products: effects of novel food processing technologies, part 1: high-pressure processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(1), 24-63.
- Tijet, N., Schneider, C., Muller, B. L. and Brash, A. R. (2001). Biogenesis of volatile aldehydes from fatty acid hydroperoxides: Molecular cloning of a hydroperoxide lyase (CYP74C) with specificity for both the 9- and 13-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 386, 281–289.
- Tijet, N., Waspi, U., Gaskin, D. J., Hunziker, P., Muller, B. L., Vulfson, E. N., Slusarenko, A., Brash, A. R. and Whitehead, I. M. (2000). Purification, molecular cloning, and expression of the gene encoding fatty acid 13-hydroperoxide lyase from guava fruit (*Psidium guajava*). *Lipids* 35, 709–720.
- TUIK Merkezi Dağıtım Sistemi (2019) Erişim Adresi: <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>
- Turhan, İ., Tetik, N. ve Karhan, M., (2006), Turunçgil Kabuk Yağlarının Elde Edilmesi ve Gıda Endüstrisinde Kullanımı, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3: 71-77.
- Uzun, A., Seday U., Kafa, G. (2013). Bazı turunçgil anaçlarının ‘Valencia Late’ portakalında meyve kalite özellikleri üzerine etkileri. *Meyve Bilimi*, 1(1): 18-22.
- Van Der Straeten, D., Rodrigues-Pousada, R. A., Goodman, H. M., & Van Montagu, M. (1991). Plant enolase: gene structure, expression, and evolution. *The Plant Cell*, 3(7), 719-735.

- Villatoro, C., Altisent, R., Echeverría, G., Graell, J., López, M. L., & Lara, I. (2008). Changes in biosynthesis of aroma volatile compounds during on-tree maturation of 'Pink Lady®' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 47(3), 286-295.
- Winterhalter, P., & Schreier, P. (1994). C13-Norisoprenoid glycosides in plant tissues: An overview on their occurrence, composition and role as flavour precursors. *Flavour and Fragrance Journal*, 9(6), 281-287.
- Winterhalter, P., & Skouroumounis, G. K. (1997). Glycoconjugated aroma compounds: occurrence, role and biotechnological transformation. In *Biotechnology of aroma compounds* (pp. 73-105): Springer.
- Wong, D. W., Voragen, A. G., & Whitaker, J. R. (2003). *Handbook of Food Enzymology*.
- Xiao, Z., Wu, Q., Niu, Y., Wu, M., Zhu, J., Zhou, X., ... & Kong, J. (2017). Characterization of the key aroma compounds in five varieties of mandarins by gas chromatography–olfactometry, odor activity values, aroma recombination, and omission analysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(38), 8392-8401.
- Yu, Q. I. A. O., Xie, B. J., Zhang, Y., Zhou, H. Y., & Pan, S. Y. (2007). Study on aroma components in fruit from three different Satsuma mandarin varieties. *Agricultural Sciences in China*, 6(12), 1487-1493.
- Zabetakis, I. and Holden, M. A. (1997). Strawberry flavour: Analysis and biosynthesis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 74, 421–434.
- Zabetakis, I., Gramshaw, J. W. and Robinson, D. S. (1999). 2,5-dimethyl-4-hydroxy- 2H-furan-3-one and its derivatives: Analysis, synthesis and biosynthesis – A review. *Food Chemistry* 65, 139–151.
- Zhang, B., Chen, K., Bowen, J., Allan, A., Espley, R., Karunairetnam, S., & Ferguson, I. (2006). Differential expression within the LOX gene family in ripening kiwifruit. *Journal of experimental botany*, 57(14), 3825-3836.
- Zhang, Y., Gao, B., Zhang, M., Shi, J., & Xu, Y. (2009). Headspace solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry analysis of the volatile components of longan (*Dimocarpus longan* Lour.). *European Food Research and Technology*, 229(3), 457-465.
- Zhang, Z., Pang, X., Xuwu, D., Ji, Z., & Jiang, Y. (2005). Role of peroxidase in anthocyanin degradation in litchi fruit pericarp. *Food Chemistry*, 90(1-2), 47-52.