

**SOĞUK PLAZMA UYGULAMASININ VİTAMİNLER VE
POLİFENOL OKSİDAZ (PFO) ENZİMİ AKTİVİTESİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

**EFFECTS OF COLD PLASMA TREATMENT ON VITAMINS
AND POLYPHENOL OXIDASE (PPO) ENZYME ACTIVITY**

DİLARA BOZKURT

PROF. DR. MEHMET MUTLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2014

DİLARA BOZKURT'un hazırladığı “**Soğuk Plazma Uygulamasının Vitaminler Ve Polifenol Oksidaz (PFO) Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisi**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**' nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet ÖZKAN

Başkan

.....

Prof. Dr. Mehmet MUTLU

Danışman

.....

Prof. Dr. Yaşar Kemal ERDEM

Üye

.....

Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI

Üye

.....

Prof. Dr. Vural GÖKMEN

Üye

.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

../../2014

DİLARA BOZKURT

ÖZET

SOĞUK PLAZMA UYGULAMASININ VİTAMİNLER VE POLİFENOL OKSİDAZ (PFO) ENZİMİ AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Dilara BOZKURT

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet MUTLU

Ocak 2014, 83 sayfa

Tez kapsamında, genellikle sterilizasyon amacıyla gıda sanayisinde kullanım alanı bulması beklenen soğuk plazma uygulamasının vitamin ve enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla yağda çözünen E vitamini (tokoferol) ile ve suda çözünen C vitamini (askorbik asit) olmak üzere iki farklı vitamin solüsyonu ve polifenol oksidaz (PFO) enzimi kullanılmıştır. Ayrıca plazma uygulamasının model gıda olarak seçilen kuşburnu meyvesine de etkisi incelenmiştir.

Çalışmalar kapsamında iki farklı plazma sistemi kullanılmıştır. Bunlardan bir tanesi atmosferik plazma jet ve diğeri ise dielektrik bariyer boşalım (DBD) plazmasıdır. Plazma jet sistemi ile birçok plazma parametresi denenmiştir. Çalışma gazı olarak hava kullanılmıştır. Çalışmada en etkin plazma parametresinin belirlenmesi amacıyla 16-20-25 kHz frekans aralığı; 500-750-1000 L/saat gaz akış hızı ve 2-4-6-8 sn uygulama süresi denenmiştir.

Aktif plazma türleri ve plazma sırasında oluşan UV ışınlar mikroorganizmaların DNA' sı ve hücre duvarını etkilediği gibi, gıdalarda bulunan aktif bileşenlere de etki etmektedir. Bunun başlıca sebebi bu bileşenlerde bulunan ve reaktif türlere karşı afinitesi olan bağlardır. Bu bağlarda meydana gelmiş olabilecek herhangi bir değişim bu bileşenlerin kimyasal yapılarını etkilediği gibi enzim örneğinde olduğu gibi aktivitelerini de etkilemektedir.

Tez kapsamında çalışılan model vitaminlerin analizleri spektrofotometrik olarak gerçekleştirilerek vitaminlerde meydana gelen kayıplar yüzdesel olarak verilmiştir. Çalışmanın sonucunda atmosferik plazma jeti ile plazma uygulamasına tabi

tutulan askorbik asit çözeltilerinde kaybın en fazla 25 kHz'de, 1000 L/sa gaz akış hızında, 8 sn'lik plazma uygulaması sonucunda %83,5 oranında olduğu belirlenmiştir. DBD plazma sistemi ile yapılan çalışmada ise askorbik asit kaybının sadece He gazı kullanıldığında en fazla %30,4; He-O₂ kullanıldığında ise en fazla %28,6 olduğu tespit edilmiştir. Model gıda olarak seçilen kuşburnu meyvesindeki askorbik asit miktarının ise 25 kHz' de, 1000L/sa akış hızında 8 sn'lik plazma uygulaması sonucu en fazla %56,3 kayba uğradığı görülmüştür.

Plazmanın protein yapıdaki enzimlere etkisini belirlemek amacıyla ise polifenol oksidaz enzimi kullanılmıştır. PFO enzim aktivitesinin tayininde substrat olarak kateşol kullanılmıştır. Enzim aktivitesinin 8 sn'lik plazma uygulaması sonucu başlangıç aktivitesine göre %39,5'a kadar düştüğü belirlenmiştir. Ayrıca farklı konsantrasyonlardaki substrat çözeltileriyle yürütülen deneyler sonucunda 8 sn'lik plazma işlemi uygulanmış enzimlerin V_{max} değerinin 0,273 mM.dk⁻¹'dan 0,195 mM.dk⁻¹'e düştüğü K_m değerinin ise 5,77 mM'dan 25,86 mM'a yükseldiği gözlenmiştir.

Deneyler boyunca degradasyona sıcaklığın bir etkisi olup olmadığını belirlemek amacıyla, askorbik asit ve enzim çözeltilerinin plazma uygulaması öncesi ve sonrası sıcaklık ölçümleri yapılarak plazmanın çözeltilerde neden olduğu sıcaklık değişimi belirlenmiştir. Buna göre atmosferik plazma jeti ile yapılan deneylerde askorbik asit çözeltisinin sıcaklığının 31,1°C'yi, DBD plazma sistemi ile yapılan deneylerde ise sadece He gazı kullanıldığında 25,7°C'yi He-O₂ gaz karışımı kullanıldığında 23,5°C'yi geçmediği belirlenmiştir. Ayrıca atmosferik plazma jeti ile plazma uygulaması sonrası enzim çözeltilerinin sıcaklığının 26°C'yi geçmediği gözlenmiştir.

Tez kapsamında elde edilen sonuçlar doğrultusunda plazma işleminin gıdalarda belirli parametreler aralığında kontrollü şekilde yapılması gerektiği görülmektedir. Plazma uygulaması son yıllarda soğuk sterilizasyon yöntemleri arasında yerini almaya başlamıştır. Bu konuda özellikle gıda ve medikal sektörlere yönelik birçok çalışma yapılmış olup halen bu konudaki araştırmalar sürmektedir.

Anahtar Kelimeler: askorbik asit, tokoferol, polifenol oksidaz, kuşburnu, atmosferik plazma, DBD, enzim aktivitesi.

ABSTRACT

EFFECTS OF COLD PLASMA TREATMENT ON VITAMINS AND POLYPHENOL OXIDASE (PPO) ENZYME ACTIVITY

Dilara BOZKURT

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet MUTLU

January 2014, 83 pages

Within the scope of this thesis, effects of cold plasma application, expected to be used for sterilization purposes in food industry, on vitamins and enzyme activity were investigated. For this purpose two different vitamin solutions, the fat-soluble vitamin E (α -tocopherol) and the water-soluble vitamin C (L-ascorbic acid) solutions, and polyphenol oxidase (PPO) enzyme were used. Besides, the effects of plazma application on rose hip were investigated.

During studies, two different plasma systems were used. One of them is atmospheric plasma jet and the other one is dielectric barrier discharge (DBD) plasma. Many plasma parameters with the plasma jet system were tested. Air was used as the working gas. In order to determine the most efficient plasma parameter, 16-20-25 kHz frequency range; 500-750-1000 L/sa of gas flow rate and the 2-4-6-8 sec. applicaiton time were tested in the study.

Active plasma species and UV rays generated during plasma, affect the microorganisms DNA and cell walls, and also effects of the active ingredients found in foods. The main reason of this is bonds which are found in these components and have affinity to reactive species. Any changes that may have occurred in these bonds can effect the chemical structure and also effect the activity of enzymes.

Analysis of model vitamins used in the thesis, were performed spectrophotometrically and losses of vitamins were given as percentile. Analyses showed that the atmospheric plasma jet treatment subjected to the solution of

ascorbic acid caused 83,5 % maximum loss with 25 kHz and 1000 L/sa of gas flow rate and 8 sec. treatment time. In studies with DBD plasma system, ascorbic acid loss was found maximum 30,4% when only He gas is used and 28,6% when He-O₂ is used. Amount of ascorbic acid from rose hip fruit selected as food model, was found to have lost up to 56,3% after 8 sec plasma treatment of 25 kHz, 1000 L/sa at a flow rate.

In order to determine the effect of plasma on protein-structured enzymes, polyphenol oxidase enzymes were used. Catechol was used as substrate for the determination of enzyme activity. As a result of 8 sec plasma treatment, recent enzyme activity was found 39,5%. Additionally, as a result of the experiments which were carried out with different substrate concentrations, V_{max} decreased to 0,195 mM.min⁻¹ from 0,273 mM.dk⁻¹ and K_m value of plasma-applied enzymes increased to 25,86 mM from 5,77mM.

Throughout the experiments, for determine whether the temperature effects the degradation or not, the temperature of ascorbic acid and the enzyme solutions measured before and after the plasma treatment and the change in temperature caused by plasma treatment was determined. According to this, the maximum temperature of ascorbic acid solution at the end of atmospheric plasma jet treatment, the DBD plasma system treatment with He and with He-O₂ gas mixture were 31,1 °C, 25,7 °C and 23,5 °C, respectively. Also after the plasma treatment with atmospheric plasma jet, temperature of the enzyme solution did not exceed 26 °C.

The experimental results of this thesis showed that plasma treatment of food should be done in the range of certain parameters and in a controlled manner. In recent years cold plasma treatment has begun to take a place in cold sterilization methods. In this regard, many studies, especially for the food and medical industries, has already done and researches on this subject are still in progress.

Keywords: ascorbic acid, tocopherol, polyphenol oxidase, rose hip, atmospheric plasma, DBD, enzyme activity.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın oluşumundan sonuçlanmasına kadar her aşamasında, ilgi, destek ve bilgisini esirgemeyen, tez danışmanım ve değerli hocam sayın Prof. Dr. Mehmet Mutlu' ya,

Tez çalışmam boyunca çok büyük sabır gösteren, sevgisini, yardımını, engin bilgisini, desteğini esirgemeyen, her koşulda yanımda olduğunu hissettiren Yük. Müh. Yasin Şen'e

Tez çalışması kapsamında Polonya'da yapılan çalışmalarda maddi destek sağlayarak gerçekleştirilmesini mümkün kılan COST Aksiyonu'na,

Polonya'daki çalışmalar süresince bilgi ve desteğini esirgemeyen Prof. Henryka Danuta Stryczewska, Prof. Jacek Czerwiński, Dr. Joanna Pawlat, Dr. Jarosław Diatczyk ve Michał Kwiatkowski' ye,

Çalışmam süresince gösterdikleri sabır ve destekleri için Plazma Destekli Biyomühendislik ve Biyoteknoloji Araştırma Grubu'na, desteğini ve bilgisini esirgemeyen Yard. Doç. Dr. Baran Önal Ulusoy'a,

Tez çalışmam boyunca, yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen sevgili dostlarım Gıda Müh. Burcu Aydoğan'a, Gıda Müh. Nurhan Uslu'ya,

En önemlisi hayatım boyunca attığım her adımda destekleriyle yanımda olan, en zor şartlarda bile her türlü fedakârlığı gösteren sevgili aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER	ix
ŞEKİLLER	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Sterilizasyon	6
2.2. Plazma Sterilizasyon Tekniği	9
2.2.1. Plazmanın Yapısı	9
2.2.2. Reaktif Oksijen ve Azot Türleri	9
2.2.2.1. Reaktif Oksijen Türleri	10
2.2.2.2. Reaktif Azot Türleri	12
2.2.3. Serbest Radikallerin Etkileri	13
2.2.4. Plazma Sterilizasyonuna Etki Eden Parametreler	15
2.2.5. Plazmadaki İnaktivasyon Ajanları	17
2.2.5.1. UV Etkisi	17
2.2.5.2. Reaktif Türlerin Etkisi	18
2.2.5.3. Yüklü Parçacıkların Etkisi	18
2.2.6. Plazma Sterilizasyonunun Etki Mekanizması	18
2.2.7. Tekniğin Avantaj ve Kısıtlamaları	19
2.2.8. Plazma Sistemleri	20
2.2.8.1. Termodinamik Özelliklerine Göre Plazmalar	20
2.2.8.2. Çalışma Basıncına Göre Plazmalar	22
2.2.8.2.1. Düşük Basıncıta Çalışan Soğuk Plazma Sistemleri	22
2.2.8.2.1.1. Mikrodalga İle Çalışan Soğuk Plazma Sistemleri	23
2.2.8.2.1.2. Radyo Frekansı İle Çalışan Soğuk Plazma Sistemleri	23
2.2.8.2.2. Atmosferik Basıncıta Çalışan Soğuk Plazma Sistemleri	23
2.2.8.2.2.1. Korona Boşalım Plazması	24

2.2.8.2.2.2. Dielektrik Bariyer Boşalım (DBD) Plazması	24
2.2.8.2.2.3. Plazma Jeti	25
2.2.8.2.2.4. Ark Boşalım Plazması	26
2.2.8.2.2.5. Işıltılı Boşalım Plazması	26
2.2.8.2.2.6. Radyo Frekansı Plazmaları	27
2.3. Vitaminler	27
2.3.1. Vitaminlerin Sınıflandırılması	27
2.3.1.1. Yağda Çözünen Vitaminler	27
2.3.1.2. Suda Çözünen Vitaminler	28
2.3.2. Askorbik Asit	28
2.3.2.1. Askorbik Asidin Genel Özellikleri	28
2.3.2.2. Askorbik Asidin Kaynakları	30
2.3.2.3. Askorbik Asidin Kullanım Alanları	30
2.3.2.4. Askorbik Asit Analiz Yöntemleri	31
2.3.3. Tokoferol	32
2.3.3.1. Tokoferolün Genel Özellikleri	32
2.3.3.2. Tokoferolün Kaynakları	35
2.3.3.3. Tokoferolün Önemi ve Kullanım Alanları	35
2.4. Polifenol Oksidaz Enzimi	36
2.5. Model Gıda Olarak Kullanılan Kuşburnu Meyvesi	39
3. MATERYAL - METOT	42
3.1. Materyal	42
3.1.1. Kullanılan Gazlar, Kimyasallar ve Gıda Örnekleri	42
3.1.2. Plazma Sistem Özellikleri	43
3.1.2.1. Atmosferik Basınç Plazma Jet (Plasmatreat AS400)	43
3.1.2.2. DBD Plazma Sistemi	45
3.2. Metot	46
3.2.1. Atmosferik Plazma Jeti (Plasmatreat AS400 Sistemi) ile Gerçekleştirilen Deneyler	46
3.2.1.1. Sistem Parametrelerinin Optimizasyonu	46
3.2.1.2. Sıcaklık Ölçümleri	46
3.2.1.3. Askorbik Asit Analizleri	47
3.2.1.3.1. Askorbik Asit Çözeltisinin Hazırlanması	47
3.2.1.3.2. Askorbik Asit Çözeltisine Plazma İşleminin Uygulanması	47

3.2.1.3.3. Askorbik Asidin Spektrofotometrik Yöntemle Analizi	47
3.2.1.4. Tokoferol Analizleri	48
3.2.1.4.1. Tokoferol Çözeltilerinin Hazırlanması	48
3.2.1.4.2. Tokoferol Çözeltilerine Plazma İşleminin Uygulanması	48
3.2.1.4.3. Tokoferolün HPLC Yöntemi ile Analizi	49
3.2.1.5. Polifenol Oksidaz Enzimi Analizleri	49
3.2.1.5.1. Polifenoloksidaz Enziminin Ekstraksiyonu	49
3.2.1.5.2. Polifenoloksidaz Enzimine Plazma İşleminin Uygulanması	50
3.2.1.5.3. Polifenoloksidaz Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi	50
3.2.1.6. Model Gıda Üzerinde Plazma İşleminin Etkinliğinin Belirlenmesi	51
3.2.1.6.1. Plazma İşlemi Öncesi Ön Hazırlık Aşamaları	51
3.2.1.6.2. Model Gıda Örneklerine Plazma İşleminin Uygulanması	51
3.2.1.6.3. Askorbik Asit Analizi	51
3.2.2. DBD Plazma Sistemi İle Gerçekleştirilen Deneyler	52
3.2.2.1. Sistem Parametrelerinin Optimizasyonu	52
3.2.2.2. Sıcaklık Ölçümleri	53
3.2.2.3. Askorbik Asit Analizleri	53
3.2.2.3.1. Askorbik Asit Çözeltisinin Hazırlanması	53
3.2.2.3.2. Askorbik Asit Çözeltilerine DBD Plazma İşleminin Uygulanması	53
3.2.2.3.3. Askorbik Asidin Spektrofotometrik Yöntemle Analizi	54
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	55
4.1. Plazma İşleminin Askorbik Asit Çözeltisi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	56
4.1.1. Atmosferik Plazma Jeti ile Uygulanan Plazma İşleminin Askorbik Asit Çözeltileri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	56
4.1.2. DBD Plazma Sistemi ile Uygulanan Plazma İşleminin Askorbik Asit Çözeltileri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	61
4.2. Plazma İşleminin Tokoferol Çözeltisi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	67
4.3. Plazma İşleminin Polifenol Oksidaz Çözeltisi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi ...	70
4.4. Plazma İşleminin Model Gıda Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	73
KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ	83

ÇİZELGELER

Çizelge 1 Bazı bitkisel ve hayvansal gıdalarda bulunan askorbik asit miktarı [76]	30
Çizelge 2 Çalışmada kullanılan plazma parametreleri.....	44
Çizelge 3 Probtan 5 cm uzaklıkta farklı gaz akış hızlarında ölçülen sıcaklıklar	52
Çizelge 4 Plazma işlemi sonrası askorbik asit miktarındaki kayıp (%)	57
Çizelge 5 Atmosferik plazma uygulaması sonrası birinci dereceden inaktivasyon modeli için kinetik sabitler (k) ve D değerleri	57
Çizelge 6 Plazma uygulaması sonrası sıcaklık değişimleri	61
Çizelge 7 DBD plazma uygulaması sonrası birinci dereceden inaktivasyon modeli için kinetik sabitler (k) ve D değerleri	64
Çizelge 8 He gazı kullanıldığında askorbik asit çözeltisi sıcaklığındaki değişim...	65
Çizelge 9 He-O ₂ gaz karışımı kullanıldığında askorbik asit çözeltisi sıcaklığındaki değişim	66
Çizelge 10 Plazma uygulaması ile örneklerin K _m ve V _{max} değerlerindeki değişim	72
Çizelge 11 Atmosferik plazma uygulaması sonrası birinci dereceden inaktivasyon modeli için kinetik sabitler (k) ve D değerleri	72
Çizelge 12 Plazma uygulaması sonrası enzim çözeltisi sıcaklığındaki değişim ...	73
Çizelge 13 Farklı sürelerde plazma uygulamasının askorbik asit miktarı üzerine etkisi	74

ŞEKİLLER

Şekil 1 Sterilizasyon yöntemleri.....	6
Şekil 2 Plazmanın yapısı	9
Şekil 3 Reaktif oksijen türlerinin şematik gösterimi.....	10
Şekil 4 Hidroksil radikalının H atomu ayrılması ve çift bağ kopması etkilerinin şematik gösterimi	12
Şekil 5 Reaktif oksijen türlerinin kaynaklarının şematik olarak gösterimi	12
Şekil 6 Lipid radikalının şematik gösterimi	13
Şekil 7 Lipid peroksit radikali ve lipid peroksitin şematik gösterimi.....	14
Şekil 8 Askorbik asidin kimyasal yapısı	28
Şekil 9 L-askorbik asitten dehidroaskorbik asit ve diketogulonik asit oluşumu	29
Şekil 10 DCPIP- Askorbik asit reaksiyonu.....	31
Şekil 11 Tokoferolün kimyasal yapısı	32
Şekil 12 α -tokoferolün oksidasyon ürünleri ve α -CEHC.....	33
Şekil 13 Tokoferolün hidroperoksitle reaksiyonu	34
Şekil 14 α -tokoferolün peroksit radikalleriyle reaksiyonu [82]	34
Şekil 15 Enzimatik esmerleşme mekanizması.....	37
Şekil 16. Polifenol oksidaz enziminin bazı substratlarının yapısı.....	38
Şekil 17 Çalışmada kullanılan atmosferik plazma sisteminin şematik gösterimi...	43
Şekil 18 DBD plazma sisteminin şematik görünümü	45
Şekil 19 DBD plazma sisteminin genel görünümü.....	45
Şekil 20 Tez kapsamında gerçekleştirilen deney akım şeması	55
Şekil 21 Askorbik asit analizi için kalibrasyon eğrisi	56
Şekil 22 Plazma uygulaması sonrası askorbik asit miktarındaki değişim, (a)25 kHz,(b)20 kHz,(c)16 kHz	58
Şekil 23 Farklı plazma parametrelerinde askorbik asit üzerine etkisi (a)25 kHz,(b)20 kHz,(c)16 kHz	59

Şekil 24 He gazı ve He-O ₂ gazı ile yapılan deneyler için askorbik asit kalibrasyon eğrisi (a) He, (b) He-O ₂	61
Şekil 25 He gazı kullanıldığında oluşan askorbik asit kaybı (plazma probu ile örnek arasındaki mesafe 5 cm)	62
Şekil 26 He gazı kullanıldığında oluşan askorbik asit kaybı (plazma probu ile örnek arasındaki mesafe 3 cm)	62
Şekil 27 He gazı kullanıldığında oluşan askorbik asit kaybı (plazma probu ile örnek arasındaki mesafe 2 cm)	63
Şekil 28 He-O ₂ gazı karışımı kullanıldığında oluşan askorbik asit kaybı (plazma probu ile örnek arasındaki mesafe 3 cm)	63
Şekil 29 He-O ₂ gazı karışımı kullanıldığında oluşan askorbik asit kaybı (plazma probu ile örnek arasındaki mesafe 2 cm)	63
Şekil 30 Yüksek derişimdeki (10 mg/mL) tokoferol çözeltisinin 25 khz' de 2 sn'lik plazma uygulaması sonucu verdiği spektrum.....	68
Şekil 31 Yüksek derişimdeki (10 mg/mL) tokoferol çözeltisinin 16 khz' de 2 sn'lik plazma uygulaması sonucu verdiği spektrum.....	68
Şekil 32 Düşük derişimdeki (2 mg/mL) tokoferol çözeltisinin 25 kHz' de 2 sn'lik plazma uygulaması sonucu verdiği spektrum.....	69
Şekil 33 Düşük derişimdeki (2 mg/mL) tokoferol çözeltisinin 16 kHz' de 2 sn'lik plazma uygulaması sonucu verdiği spektrum.....	69
Şekil 34 Plazma uygulaması sonrası PPO aktivitesindeki değişim.....	71
Şekil 35 Plazma uygulamasının model gıdadaki askorbik asit miktarı üzerine etkisi	74

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

PFO	Polifenol Oksidaz
DBD	Dielectric Barrier Discharge
UV	Ultraviyole
DNA	Deoksiribonükelik asit
L	Litre
K	Sıcaklık, Kelvin
MO	Mikroorganizma
K_m	Michaelis-Menten Sabiti
V_{max}	Enzimin Maksimum Hızı
atm	Basınç, atmosfer
Pa	Basınç, Pascal
DCPIP	2,6-diklorofenolindofenol
VEA	Vurgulu Elektrik Alan
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
EtO	Etilen oksit
ROT	Reaktif oksijen türleri
RAT	Reaktif azot türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
PABB	Plazma Destekli Biyoteknoloji ve Biyomühendislik
NBBL	Negatif Basınç Biyogüvenlik Laboratuvarı

1. GİRİŞ

Önerilen tez kapsamında, belirli konsantrasyonlarda hazırlanan model solüsyonlara plazma işlemi uygulanıp literatürde çok fazla çalışılmamış olan plazmanın, gıda bileşenlerinin özellikleri üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Bu amaçla, Plazma Destekli Biyoteknoloji ve Biyomühendislik (PABB) Araştırma Grubumuz tarafından kullanılan ve x-y düzleminde hareket edebilen döner yapıda proba sahip atmosferik basınç plazma jet sistemi kullanılmıştır. Bunun yanında, COST (Bilim ve Teknolojide Avrupa İşbirliği) Aksiyonu' nun MP1101 projesi (Biomedical Applications of Atmospheric Pressure Plasma Technology) kapsamında gerçekleştirilen 1 aylık Kısa Süreli Bilimsel Çalışma süresince Polonya'da Lublin Teknoloji Üniversitesi' nde plazma laboratuvarında tasarlanmış olan DBD plazma sistemi de aynı amaçla kullanılmıştır.

Model solüsyonlar olarak bazı vitamin çözeltileri (α -tokoferol ve L-askorbik asit) kullanılmış olup ayrıca polifenol oksidaz (PFO) enziminin aktivitesi de incelenmiştir.

Özellikle birçok gıdada bulunabilecek olan C ve E vitaminlerinin çeşitli etkenlerle (sterilizasyon, depolama vs.) kimyasal yapıları bozulmakta ve besinsel değerlerini kaybetmektedirler. PFO enzimi ise gıdalarda özellikle gıda işleme ve depolama aşamasında esmerleşme reaksiyonlarına sebebiyet vererek sorun teşkil etmekte ve C vitamini de bu esmerleşme reaksiyonlarını engelleyen antioksidan görevi görmektedir.

Gıda işleme ve muhafaza teknikleri genellikle ürünün depolama süresi boyunca istenilen mikrobiyal ve enzimatik aktiviteye sahip olması hedefleriyle gerçekleştirilmektedir. Bu amaçla öncelikle mikrobiyal inaktivasyon hedeflenmekle birlikte depolamanın uzun süre sağlanabilmesi amacıyla enzimatik aktivitenin de minimum seviyelerde tutulması amaçlanmaktadır. Bununla birlikte uygulanan işlemler kapsamında özellikle insan sağlığı açısından gerekli olan bileşenlerin besinsel özelliklerinin de büyük oranda korunması hedeflenmektedir.

Geçtiğimiz yüzyıldan itibaren özellikle dünya nüfusundaki artış, bu artışı karşılayacak yeterli ve kaliteli gıda üretiminin gerçekleştirilememesi, gıda işleme ve depolama sistemlerinin etkin bir şekilde kullanılamaması gibi etkenler

araştırmacıları gıda işleme ve depolama sistemlerinin geliştirilmesi konusunda yeni yöntemler aramaya doğru yönelmiştir.

Pek çok gıda için mikroorganizmaların inaktivasyonunda kullanılan en yaygın yöntem ısı uygulamasıdır. Yalnız, ısı bir taraftan gıdanın mikrobiyal yükünü azaltırken diğer taraftan esansiyel gıda bileşenlerinin degradasyonuna ve buna bağlı olarak renk, tat ve aromada istenmeyen değişimlere yol açtığı için üreticiler tarafından kullanımından kaçınılmaktadır. Bu istenmeyen etkileri en alt düzeye indirmek için termal olmayan birçok yeni gıda muhafaza yöntemi geliştirilmiştir. Bu teknolojiler arasında yüksek hidrostatik basınç, yüksek basınçlı karbondioksit, mikrodalga, işınlama, vurgulu elektrik alan ve yüksek frekans uygulaması gibi yöntemler son on yıl içerisinde birçok gıda ürünün mikrobiyal yükünün azaltılmasında kullanılan metotlar arasında yer almaktadır. Ayrıca son zamanlarda zararlı kontaminantların inaktivasyonuna veya dekontaminasyonuna yönelik metotlar arasında plazma uygulamalarına büyük önem verilmektedir [1,6].

Bakteriler, sporlar, küfler, mayalar, virüsler ve hatta prion proteinlerinin plazma ile sterilizasyonunun gerçekleştirilebildiği literatürde yaygın olarak yer almaktadır. Plazmanın gıda güvenliğinde kullanımı oldukça yeni bir kavramdır. Critzer ve ark. [7] elma, kavun ve marul örneklerinde; Montegro ve ark. [8] elma sularında; Deng ve ark. [9] badem örneklerinde atmosferik basınçlı hava plazması ve Song ve ark. [10] peynir ve jambon örneklerinde atmosferik basınçlı helyum plazması kullanarak bakteri inaktivasyonunu sağlamışlardır.

Selçuk ve ark. [11] hububat ve baklagil tanelerinde bulunan küfler üzerine düşük basınçlı SF₆ plazma uygulamasının inhibisyon etkisini incelemişlerdir. Diğer bir çalışmalarında ise SF₆ ve hava plazması kullanarak düşük basınçlı sistemlerde fındık yüzeylerine inoküle edilmiş *Aspergillus parasiticus* türü küflerin dekontamine edildiğini ve bunun yanı sıra plazmanın aflatoksin miktarında da azalma sağladığını ortaya koymuşlardır [12].

Plazma Destekli Biyoteknoloji ve Biyomühendislik (PABB) Araştırma Grubumuz tarafından yapılan çalışmalarda, düşük basınçlı plazma sistemi kullanılarak gıda endüstrisinde kullanılan paslanmaz elik ve polietilen yüzeylerine kontrollü bir Şekilde inoküle edilmiş *E. coli* bakterisinin, yüzeyden dekontaminasyonu hava, N₂, O₂ ve su buharı plazması kullanılarak sağlanmıştır. Çalışma sonucunda yaklaşık 7

logaritmalk bir indirgenme elde edilmiştir [1,2]. Bu çalışmalarda düşük basınç, düşük sıcaklık plazma uygulamasının bakteri hücre duvarları üzerinde parçalayıcı etkisi kanıtlanmıştır. Bu çalışmalardan yola çıkarak, döner tamburlu sistem kullanılarak fındık ve kırmızı pul biber örneklerinde dekontaminasyon çalışmaları yapılmıştır [3-5]. Doğal ortamda kontamine olmuş kırmızı pul biber ve fındık örneklerine hava plazması uygulanmış ve toplam küf miktarında sırasıyla 6 ile 4 logaritmalk bir azalma sağlanmıştır [4,5].

Tez sonucunda elde edilen veriler ışığında biri yağda diğeri suda çözünen, birçok gıdada ortak olarak bulunabilen 2 farklı vitaminin ve gıdalarda enzimatik esmerleşme reaksiyonlarının birincil başlatıcısı olan PFO enzimlerinin plazma uygulaması sonrası miktar ve aktivitelerindeki değişim belirlenmiştir. Buradan elde edilen sonuçlar özellikle ısıl işleme çok duyarlı olan vitaminlerin yüzdesel kaybını belirlemekte, dolayısıyla plazma uygulamasının bu alanda kullanılabilirliği konusunda önemli bir çalışma niteliğindedir. Jijie ve ark. [13] plazma uygulanmış pepsin örneklerinin Bovine Serum Albumin üzerindeki etkilerini inceleyerek enzimatik aktivitedeki değişimin enzim substrat ilişkisi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Tez kapsamında yine PFO enzimlerinin bir substratı olan kateşol kullanılarak bu etki araştırılacaktır. PFO enzimlerinde meydana gelen değişimlerin özellikle gıda depolama ve muhafaza işlemleri açısından büyük önem arz edeceği düşünülmektedir.

Plazma-gıda etkileşimlerini incelemek amacıyla son zamanlarda gerçekleştirilen çalışmalar hep makro düzeyde kalmış olup sadece gıdaların organoleptik özellikleri üzerinde incelemelerde bulunulmuştur. Yapılan bazı çalışmalarda özellikle Grzegorzewski ve ark. yaptığı çalışmalarda bazı biyoaktif bileşenlerin plazma uygulamasıyla değişimine bakılmıştır [14,15].

Bu çalışmanın temel amacı; dekontaminasyon amacıyla literatürde sıklıkla kullanılan hava plazmasının gıdalarda bulunan biyoaktif bileşenler üzerinde etkilerinin belirlenmesidir.

Gerçekleştirilen deneyler sonucunda tokoferolün plazma uygulamasıyla tamamen yapısını yitirdiği ve başka bir forma dönüştüğü görülmektedir. Askorbik asidin ise tokoferole göre plazmaya daha dayanıklı olduğu görülmektedir. Askorbik asit çözeltilerinde kaybın en fazla 25 kHz'de, 1000 L/sa gaz akış hızında, 8 sn'lik

plazma uygulaması sonucunda %83,5 oranında olduğu belirlenmiştir. Gerçekleştirilen deneyler solüsyonlar halinde olduğu için model bir gıdada herhangi bir vitamin bileşenin plazma işlemi sonrası davranışlarının tespit edilmesi amacıyla askorbik asit miktarınca yüksek olan kuşburnu meyvesi kullanılmıştır. Burada da gerçekleştirilen deneyler sonucunda maksimum 25 kHz' de, 1000L/sa akış hızında 8 sn'lik plazma uygulaması sonucu en fazla %56,3 'lük bir kayıp gözlenmiştir. Model gıdadaki askorbik asidin indirgenme oranı, direkt çözeltide gözlenen indirgenme oranından daha düşük bulunmuştur. Bunun başlıca sebepleri aktif plazma türlerinin direkt olarak meyve yapısındaki askorbik asitle muamele edilememiş olması ve gıdada bulunan diğer bileşenlerin aktif plazma türlerinin etkilerini azaltmış olmasından kaynaklanmaktadır.

PFO enzim aktivitesi de plazma uygulaması sonucu başlangıç aktivitesinin en fazla %39,5'una düşmüş olup bu konuda enzim kinetiğindeki değişimlerin daha detaylı olarak izlenebilmesi amacıyla Lineweaver-Burk eğrisi kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki substrat çözeltileriyle yürütülen deneyler sonucunda 8 sn'lik plazma işlemi uygulanmış enzimlerin V_{max} değerinin 0,273 mM.dk-1'dan 0,195 mM.dk-1'e düştüğü K_m değerinin ise 5,77 mM'dan 25,86 mM'a yükseldiği gözlenmiştir.

Polonya' da tasarlanmış olan dielektrik bariyer boşalım (DBD) plazması ile sadece askorbik asit analizleri gerçekleştirilmiştir. He gazı tek başına kullanıldığında %30,4; He-O₂ gaz karışımı kullanıldığında ise %28,6'lık bir kayıp gözlenmiştir.

Hem Türkiye hem Polonya bazında gerçekleştirilmiş olan deneylerde deneyler sırasında sürekli bir sıcaklık ölçümü yapılmıştır. Çözeltilerin sıcaklıkları atmosferik plazma jeti ile yapılan deneylerde 31,1°C'den, DBD plazma sistemi ile yapılan deneylerde ise sadece He gazı kullanıldığında 25,7°C'den He-O₂ gaz karışımı kullanıldığında 23,5°C'den daha düşük olarak tespit edilmiştir. Ayrıca atmosferik plazma jeti ile plazma uygulaması sonrası enzim çözeltilerinin sıcaklığının 26°C'yi geçmediği gözlenmiştir.

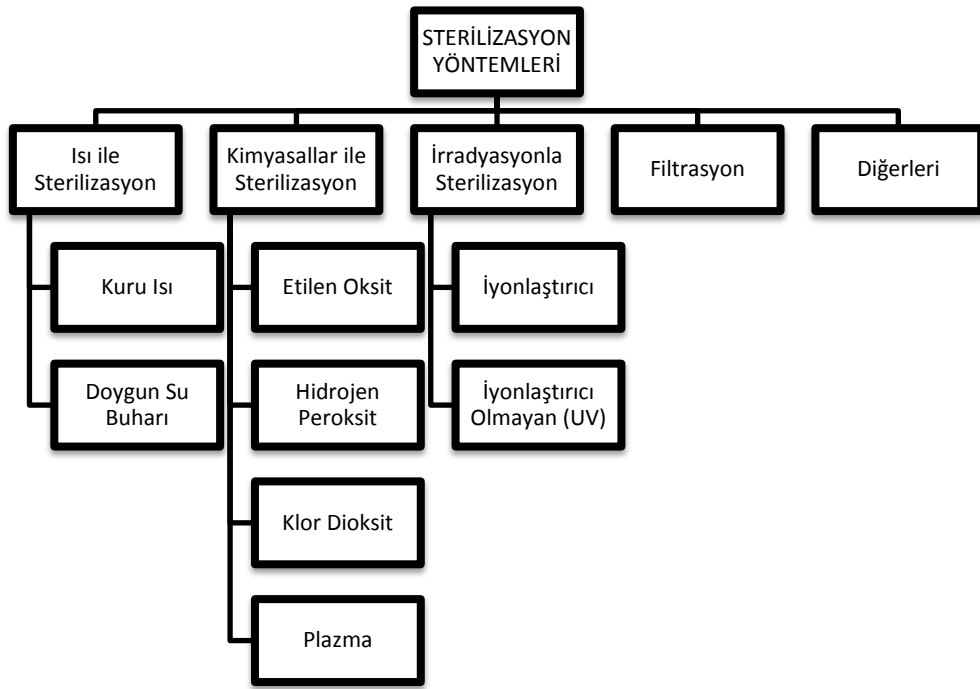
Plazma-gıda etkileşimlerinin moleküler düzeyde tespiti gıda yüzeylerine plazma uygulaması yapılırken incelenmesi gereken birincil konulardan biri olmasına rağmen bu konuda yapılan çalışmaların yetersizliği, plazma uygulamasının gıda sanayisinde aktif bir şekilde uygulanabilir mi düşüncesine bir cevap

bulunamamasına neden olmaktadır. Gerçekleştirilen tez ile birlikte aktif plazma türlerinin biyoaktif gıda bileşenleri üzerine etkileri araştırılmış olup, konu ile ilgili ileriye yönelik daha detaylı çalışmalar gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sterilizasyon

Sterilizasyon ortamdaki veya yüzeyden canlı mikroorganizmaların uzaklaştırılması veya öldürülmesi işlemidir. Sıcaklığa duyarlı materyallerin, özellikle polimer bazlı olanların kullanımlarının artması nedeniyle gaz plazma sterilizasyonu düşük sıcaklık aralıklarında etkin olabildiği için bu konuda kullanılabilirlik açısından ilgi çekmektedir [16].



Şekil 1 Sterilizasyon yöntemleri

Mikroorganizmaların inaktivasyonunda kullanılan en yaygın yöntem ısı uygulamasıdır. Bunun yanı sıra kimyasal, irradyasyon veya filtrasyon gibi yöntemler de sterilizasyon amaçlı kullanılmaktadır. Fakat bu yöntemlerin sterilize edilecek materyalin yapısında değişikliklere neden olma, materyalin yapısındaki maddelerle etkileşime girme, kalıntı bırakma, pahalı ekipman gibi dezavantajları vardır.

Gıdaların sterilizasyonunda ise genellikle ısı yöntemleri kullanılmaktadır. Yalnız, ısı bir taraftan gıdanın mikrobiyal yükünü azaltırken diğer taraftan esansiyel gıda

bileşenlerinin degradasyonuna ve buna bağlı olarak renk, tat ve aromada istenmeyen değişimlere yol açtığı için üreticiler tarafından kullanımından kaçınılmaktadır. Bu istenmeyen etkileri en alt düzeye indirmek için termal olmayan birçok yeni gıda muhafaza yöntemi geliştirilmiştir. Bu teknolojiler arasında yüksek hidrostatik basınç, yüksek basınçlı karbondioksit, vurgulu elektrik alan ve yüksek frekans uygulaması gibi yöntemler son on yıl içerisinde birçok gıda ürünün mikrobiyal yükünün azaltılmasında kullanılan metotlar arasında yer almaktadır. Ayrıca son zamanlarda zararlı kontaminantların inaktivasyonuna veya dekontaminasyonuna yönelik metotlar arasında plazma uygulamalarına büyük önem verilmektedir [1,6].

Bu yeni nontermal teknolojiler, gıda maddesinin renk, lezzet, tekstür ve besin değeri üzerine yüksek sıcaklığın yarattığı olumsuz etkilere yol açmadan, oda sıcaklıkları ve oda sıcaklıklarına yakın sıcaklıklarda mikroorganizmaları inaktive etme özelliğine sahiptirler [17].

Bu yeni teknolojilerden biri olan **yüksek hidrostatik basınç** uygulaması yeni bir yöntemdir ve özellikle ısıya duyarlı olan gıdaların korunması amacıyla kullanılmaktadır. Yüksek hidrostatik basınç (YHB) uygulaması, gıdaların 100-600 MPa aralığında yüksek basınca tabi tutulduğu yeni bir gıda işleme ve muhafaza metodudur. YHB uygulamaları, gıda maddeleri üretim proseslerinde mikroorganizma inaktivasyonu için sıcaklık uygulamalarına alternatif olarak kullanılan ve gıdalarda soğuk pastörizasyon yöntemi olarak son yıllarda ilgi uyandıran bir yöntem olarak büyük önem taşımaktadır [18]. Gıda sanayisi baz alındığında yığın haldeki sistemlere uygulandığında sadece pompalanabilen gıdalara uygulanır. Uygulamadan sonra kontaminasyon riski yüksektir. Bu nedenle aseptik boşaltma sistemine gereksinim vardır. Gıda ile temas eden tüm birimlerin aseptik tasarlanması gerekir. Yüksek basınç uygulaması gıdaların kalitesini geliştirmekle beraber, yüksek maliyeti nedeniyle gıda endüstrisinde kullanımını kısıtlıdır [19-22].

Ultrafiltrasyon yöntemi ise daha çok süt ve meyve sularında teknolojik amaçlarla uygulanan bir yöntemdir. Membran filtrasyon teknikleri işlem sırasında bakterilerin ayrılmasını ve ürünün konsantre edilmesini sağlar. Ultra ultrafiltrasyon ile 0,01µm por çapına sahip membran bakteri, virüs ve diğer mikroorganizmalardan için tam bir bariyer görevi görür [23].

Geleneksel ısı işlem yerine sıvı gıdaların pastörizasyonunda kullanılabilir en umut verici teknoloji olarak **vurgulu elektrik alan (VEA)** yöntemi görülmektedir. Vurgulu elektrik alan uygulamaları ABD’de Gıda ve İlaç İdaresi tarafından (FDA) tarafından 1996 yılında sıvı yumurta pastörizasyonu işlemi için onaylanmış olup Avrupa’da ise halen onay beklemektedir. Avrupa Birliği’nde (Novel Foods Regulation (EC) No 258/97 kapsamında) VEA uygulanmış ürünlerin daha detaylı olarak araştırılması gereklidir [24]. VEA uygulaması, bir seri elektrot arasına yerleştirilen ürüne μs -ms arasında değişen sürelerde elektrik vurguları uygulanması prensibine dayanır (etki şiddeti 2-80 kV/cm). VEA daha çok sıvı gıdalarda başarılı olmaktadır. VEA uygulaması tek başına kullanılabildiği gibi değişik koruma teknikleriyle birlikte de kullanılabilir [25,26]. Liang ve ark. [27], elma suyu örneklerinin karanfil yağı (3-5 ml/100 ml) varlığında işlendiğinde mikroorganizma sayısında sadece VEA uygulamasına kıyasla daha fazla azalma saptamışlardır (ilave 2 log çevrim) Yine aynı çalışmada, uygulanan ısı ve VEA uygulamasının polifenoloksidaz enzim aktivitesinde azalmalara neden olduğu ancak C vitamini değerlerinde önemli bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir.

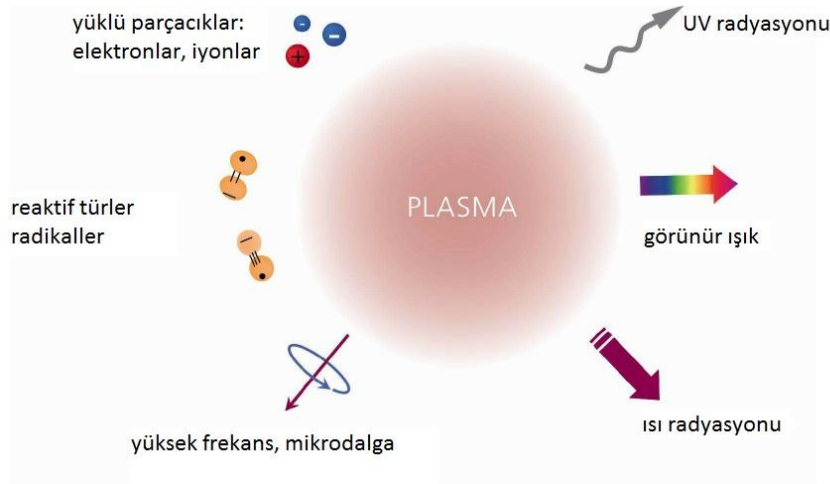
Yüksek ses dalgaları (Ultrasound) 20.000 Hz veya daha fazla ses dalgasının titreşimi ile oluşan enerji türü olarak tanımlanmaktadır. Ses dalgaları gıda sanayinde, oksidasyonun hızlandırılmasında, enzim aktivitesinin inhibisyonunda, emulsiyon, ekstraksiyon, kristalizasyon, filtrasyon ve “degassing” işlemlerinin gerçekleştirilmesinde kullanılmaktadır. Yüksek ses dalgalarının mikroorganizmalar üzerindeki öldürücü etkileri konusunda hücre membranlarının incilmesi ve geçirgenliğinin bozulması, lokal ısınma ve serbest radikallerin oluşumu gibi mekanizmaların olabileceği belirtilmiştir [28].

Plazma sterilizasyonu tekniğinin mekanizması ve etkinliğinin anlaşılması için öncelikle plazmanın oluşumu ve plazmanın ihtiva ettiği bileşenlerin etkilerini detaylı olarak kavramak gerekmektedir. Plazma sterilizasyonu tekniği bölüm 2.4’ te detaylı olarak anlatılmıştır.

2.2. Plazma Sterilizasyon Tekniği

2.2.1. Plazmanın Yapısı

Plazma; atom ve moleküllerin elektriksel yapısını yeniden düzenlemek ve uyarılmış türler ve iyonlar üretmek için bir gaza enerji uygulanması ile oluşturulur. Normalde gaz fazında her bir atomda eşit pozitif ve negatif yük bulunur. Madde gaz halinde iken maddeye verilen enerji, maddeyi oluşturan atomlar veya moleküller arasındaki nisbi boşluğu artırır, maddedeki elektronların serbest kalmasını sağlar. Bu olaya iyonizasyon adı verilir. Yeterince enerji verilmiş gaz içerisinde iyonlaşma defalarca tekrarlanır ve serbest elektron ve iyon bulutları oluşmaya başlar. Sonuçta pozitif yüklü parçacıklar yani elektronlarını kaybetmiş atomlar (iyonlar), negatif yüklü parçacıklar (elektron) ve yüksüz parçacıklar oluşur. Oluşan bu karışıma plazma adı verilir [29]. Aynı zamanda plazmada kullanılan gaza bağlı olarak serbest radikaller ve reaktif türler oluşur.



Şekil 2 Plazmanın yapısı

2.2.2. Reaktif Oksijen ve Azot Türleri

Ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller serbest radikal olarak tanımlanırlar. Serbest radikaller pozitif yüklü (katyon), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötral olabilirler.

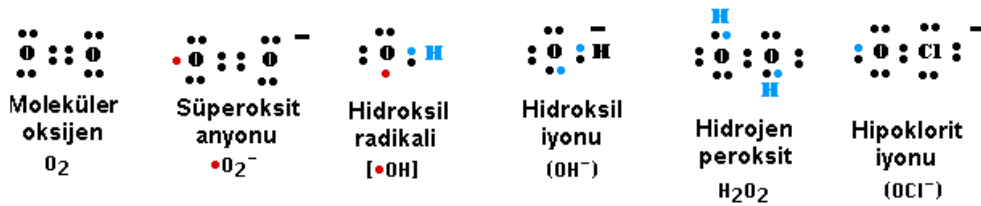
OZON: Oksijen doğada iki oksijen atomundan meydana gelen bir molekül olarak bulunur. İki atomun bir oksijen molekülü, çok özel şartlar altında oluşan bir

oksidasyon süreci sonucunda, üçüncü bir oksijen atomunu alarak, üç atomlu bir ozon molekülü (O_3) oluşturur. Bu üçüncü oksijen atomu, çok zayıf bir bağ ile bağlandığından her fırsatta molekülden ayrılmaya meyillidir. Molekülden ayrıldığından tek başına kalan oksijen atomu, son derece aktiftir ve ortamda bulunduğu her maddeyi oksitler. Havada uçuşan mikroorganizmalara yapışarak hücre duvarlarının parçalanmasına ve böylece ölmelerine neden olur. Ozon çözündüğünde reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Ozon, proteinler, doymamış yağlar ve hücre membranlarındaki solunum enzimleri, hücre zarlarındaki peptidoglikanlar, sitoplazmadaki enzimler ve nükleik asitler ile spor ceketleri ve virüs kapsidlerindeki peptidoglikanı da içeren birçok yapıya zarar verir.

MOLEKÜLER OKSİJEN: Moleküler oksijen (O_2), paralel spin durumlu iki ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektrona sahiptir. Serbest radikal tanımına göre moleküler oksijen, bir biradikal (diradikal) olarak değerlendirilir. Biradikal oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer. Moleküler oksijen, biradikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede reaktif oksijen türleri (ROT) oluşturma eğilimindedir.

2.2.2.1. Reaktif Oksijen Türleri

Reaktif oksijen türleri (ROT), normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^{\cdot})' dir. Reaktif oksijen türlerinin şematik gösterimi Şekil 3' te detaylı olarak verilmiştir.



Şekil 3 Reaktif oksijen türlerinin şematik gösterimi

Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikallerin olduğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller (R^{\cdot}),

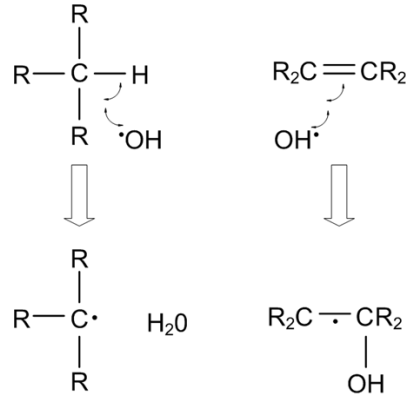
peroksit radikalleri (ROO^\bullet), alkoksi radikalleri (RO^\bullet), tiyol radikalleri (RS^\bullet), sülfenil radikalleri (RSO^\bullet), tiyol peroksit radikalleri (RSO_2^\bullet) gibi çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar.

Süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\bullet-}$) hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. İndirgenmiş geçiş metallere otoksidasyonu süperoksit radikali meydana getirebilir. Süperoksit radikalleri hücrede enerji metabolizmasında oksidasyon sırasında ya da oksidazlar gibi bazı enzimlerin aktivitesi sonucu oluşurlar. Süperoksit radikali direk olarak toksik olabilir fakat lipidler üstüne direk olarak etki edemezler. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır [30]. Süperoksit radikali hem oksitleyici hem indirgeyici özelliğe sahiptir.

Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksidin iki proton (H^+) ile birleşmesi sonucu meydana gelir. Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi, süperoksidin ($\text{O}_2^{\bullet-}$) dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü, süperoksidin dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar. Bu reaksiyon, radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir, ya spontan gerçekleşir ya da süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenir.

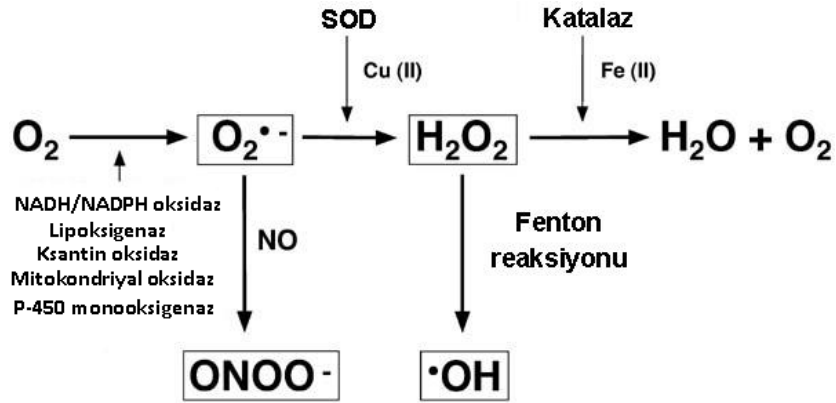
Süperoksit radikalının lipid içerisindeki çözünürlüğü sınırlı olduğu halde hidrojen peroksit lipid içerisinde çözünebilmektedir. Bu nedenle hidrojen peroksit kendisinin olduğu yerden uzakta olan fakat Fe^{+2} içeren membranlarda hasar oluşturabilir.

Hidroksil radikali (OH^\bullet), Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda oluşur. Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikaldir, yarılanma ömrü çok kısadır. Hidroksil radikali olasılıkla reaktif oksijen türlerinin (ROT) en güçlüsüdür. Oluştığı yerde yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur. Hidroksil radikalleri hücre üzerindeki etkilerini özellikle yağ asidi zincirindeki karbon atomlarına bağlı hidrojen atomlarının birinin ayrılmasına veya çift bağların ayrılmasına neden olmaktadır.



Şekil 4 Hidroksil radikalinin H atomu ayrılması ve çift bağ kopması etkilerinin şematik gösterimi

Şekil 4' ten de görüleceği gibi hidroksil radikali yapıdaki H ile birleşerek su açığa çıkmasına neden olabilir ya da yapıda bulunan çift bağların ayrılıp radikal bileşiklerin oluşmasına neden olabilir. Bu olay özellikle çoklu doymamış yapılarda daha fazla meydana gelmektedir.



Şekil 5 Reaktif oksijen türlerinin kaynaklarının şematik olarak gösterimi

2.2.2.2. Reaktif Azot Türleri

Süperoksit radikalinin fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit (NO^{\bullet}) ile birleşmesi sonucu bir reaktif oksijen türü olan peroksinitrit (ONOO^{-}) meydana gelir. Peroksinitrit, nitrit (NO_2^{-}) ve nitrat (NO_3^{-}) oluşturmak üzere metabolize edilir. Peroksinitrit, azot dioksit (NO_2^{\bullet}), hidroksil radikali (OH^{\bullet}), nitronyum iyonu (NO_2^{+}) gibi toksik ürünlere dönüşebilir ki nitrik oksitin (NO^{\bullet}) zararlı etkilerinden peroksinitrit sorumludur. Peroksinitritin proteinlere doğrudan zararlı etkileri vardır.

Bir diğerk reaktif azot türü olan nitrik oksit ise oksitleme fonksiyonu zayıf olduğundan çok reaktif bir tür değildir. Süperoksit radikali ile reaksiyon vermesi ile açığa çıkan peroksinitrit (ONOO^-) oldukça reaktiftir ve oksidasyona ve nitrasyona aracılık eder[31].

Nitrik oksitin süperoksit dismutaz (SOD) enzimiyle yarışmaya girmesi ve süperoksit (O_2^-) radikaliyle etkileşmesi sonucu peroksinitrit (ONOO^-) oluşur. Böylece nitrik oksitin fizyolojik etkisi inhibe edilir, oksidatif etkisi ortaya çıkar.

2.2.3. Serbest Radikallerin Etkileri

Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar (Şekil 6). Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri (L^\bullet) ve lipid peroksit radikallerinin (LOO^\bullet) oluşması, reaktif oksijen türlerinin (ROT) neden olduğu hasarın önemli bir özelliği olarak kabul edilir (Şekil 7). Serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna "enzimatik olmayan lipid peroksidasyonu" denir.

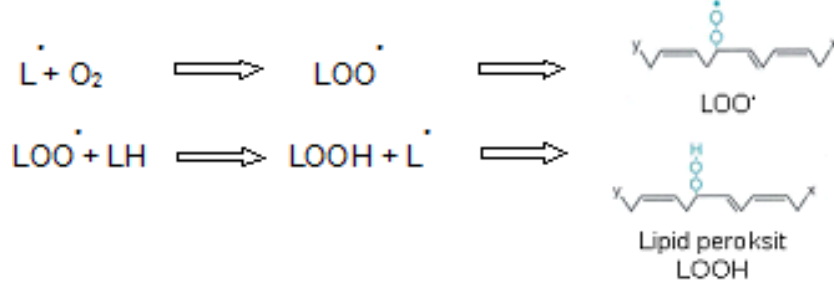
Hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna uğrayan başlıca yağ asitleri poliansatüre yağ asitleridir. Lipid peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanmasıyla başlar.



Şekil 6 Lipid radikalinin şematik gösterimi

Lipid radikali (L^\bullet) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipid radikallerinin (L^\bullet) moleküler oksijenle (O_2) etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri (LOO^\bullet) oluşur. Lipid peroksit radikalleri (LOO^\bullet), membran yapısındaki

diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid peroksitlerine (LOOH) dönüştürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder.



Şekil 7 Lipid peroksit radikali ve lipid peroksitin şematik gösterimi

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid peroksitleri (LOOH), lokal olarak hidrojen peroksitten (H_2O_2) fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikali (OH^\bullet) oluşması zincir reaksiyonunu başlatabilir.

Lipid peroksitleri (LOOH) yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar.

Nonenzimatik lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece doku hasarına ve birçok hastalığa neden olur [32].

Proteinler ise serbest radikallere karşı poliansatüre yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme derecesi amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur.

Protein molekülleri temel olarak düz aminoasit zincirlerinden oluşmaktadırlar ve atomik veya metastabil oksijen türlerinden (süperoksit) kolayca etkilenebilmektedirler.

2.2.4. Plazma Sterilizasyonuna Etki Eden Parametreler

- Plazma frekansı

Direkt akım (DC) ve alternatif akım düşük frekans (LF, 40 kHz), radyo frekansı (RF, 13.56 MHz) veya mikrodalga (MW, 2.45 GHz) kullanılabilen yük boşalım sistemleridir [33]. MW plazmasının RF plazmaya kıyasla üstünlükleri saptanmıştır. Bu durumun, Lerouge ve ark.'ın [34] yaptığı çalışmada da anlatıldığı gibi, MW plazması ile daha etkin bir aşındırma (etching) yapılabilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. MW plazması yapısında reaktif, atomik, iyonik ve uyarılmış moleküler plazması oluşumundan sorumlu olan yüksek enerjili elektron sayısının oldukça fazladır. Buna karşın RF plazması, yapısındaki yüksek enerjili elektron sayısı çok daha azdır. Bu durum, MW plazması ile kıyaslandığında, RF plazma sisteminde uygulanan oksijen plazması sırasında ortamda daha az O atomu bulunması durumunu açıklamaktadır.

- Gazın kimyasal yapısı

Literatürde sık sık belirtildiği gibi kullanılan gaz kompozisyonu plazma etkinliği açısından önemli bir faktördür. Örneğin oksijen bazlı plazmalar argon bazlı plazmalardan daha etkilidir [35]. Oksijen plazmaya azot gazı ilavesi O verimliliğine katkıda bulunmakta ve UV emisyonunun yoğunluğunu arttırmakta dolayısıyla sterilizasyon etkinliğini de arttırmaktadır [36].

- Gaz akış hızı

Gaz akış hızı F (cm^3/dk) da önemli parametrelerden birisidir. Çünkü gaz akış hızı kuvvetli bir şekilde oluşan reaktif türleri etkilemektedir. Literatürde yapılan çalışmalara bakılacak olunursa F iki katına çıkartmak 5 dakika sterilizasyon parametresinde öldürülen sporların 3 kat daha arttığını göstermektedir [37].

- Basınç

Basınç plazma ortamının yapısını dolayısıyla polimerizasyon hızı ve yüzeyde biriken polimer yapısını etkileyen önemli bir parametredir. Sistem basıncı direkt olarak alıkonma süresini ve ortalama elektron enerjisini etkiler. Yüksek basınç birikim hızının homojenliğini olumsuz yönde etkilediği için plazma süreçleri genellikle düşük basınçta (10-100 Pa) gerçekleştirilmektedir [38]. Son yıllarda atmosferik plazma teknolojisi düşük maliyeti ve sürekli sistemlerde kullanım

olanağı nedeniyle tercih edilmektedir [39,40]. Ancak atmosferik plazmada partikül yoğunluğu ve gaz sıcaklığı vakum plazmaya kıyasla daha fazladır. Benzer şekilde moleküllerin çarpışma hızı daha yüksektir. Buna karşın, atmosferik plazmada elektron yoğunluğu, iyonizasyon derecesi ve elektron sıcaklığı vakum plazmaya kıyasla daha düşüktür.

- Plazma gücü

P' nin artırılması elektron yoğunluğunu (n_e) arttırmakta bununla birlikte plazmadaki aktif türlerin konsantrasyonunu (N) arttırmaktadır. Bu nedenle Boucher ve Khomisch basıncı arttırdıklarında sporların inaktivasyonunun arttığını gözlemlemişlerdir [41,42]. Sterilize olacak materyal ve gazın fazla ısınması, plazma etkinliği ve materyalin yapısında değişikliğe neden olacağı için P' nin ayarlanması gerekmektedir.

- Geometrik faktörler:

Reaktör dizaynı plazmadaki aktif türlerin konsantrasyonunu başlı başına etkileyen parametrelerin önünde gelmektedir. Örneğin, sterilize edilecek örnekler plazma ile direk muamele edilebileceği gibi; ışıltılı boşalım plazma sistemi ile de akışlı bir sistemde steril edilebilir. Bununla birlikte sistemin geometrisine bağlı olarak boşalımdan yayılan fotonların bir kısmı hatta bazen tamamı sterilizasyon ünitesine ulaşmamaktadır [37].

- Substrat sıcaklığı (T_s):

Hury ve ark. T_s ' nin plazma sterilizasyonunun etkinliğini etkilediğini bildirmişlerdir fakat T_s etkisiyle sterilizasyon etkinliği düzenli bir artış göstermemektedir [43]. (+60 °C > -15 °C > +15 °C) +15 °C ve +60 °C arasındaki T_s ' nin artışıyla sterilizasyonun etkinliğinin artması arasındaki ilişki klasik Arrhenius yasası ile açıklanabilmektedir.

- Paketleme:

Paketleme materyalinden geçen aktif materyal sayısı plazma ile sterilizasyon işleminin gerçekleştirilmesi için yeterli değildir. Plazma sistemi kullanılarak sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmek istendiğinde uygulanacak en uygun işlem plazmayı paket materyalinin içinde oluşturmaktır, fakat bu işlem de beraberinde yeni işlemlerin uygulanmasını gerektirmektedir. En uygun işlem kapanabilir bir paketleme materyalinin içinde materyalin sterilize edilip sonra steril bir ortamda

paketin kapatılması işlemidir. Bu işlem de hastane ortamında kullanım için pratik değildir.

- Steril edilecek materyalin yapı ve kalitesi:

Steril edilecek materyalin yapı ve kalitesinin mikroorganizmanın D-değerinin üzerinde etkisi olduğu belirtilmektedir [44]. Bu durum tam olarak açıklanamamakla birlikte dört farklı mekanizmadan bahsedilmektedir:

- Substrat materyaline uygulanan dielektrik ısıtma işlemi
- Mikroorganizmaların farklı substratlara farklı düzeyde bağlanması
- Mikroorganizmaların yüzeylerden aşındırılması sırasında polimer yüzeyleri de bu işlem sırasında zarar görür ve yeni aktif türlerin oluşmasına neden olabilirler. Burada oluşan yeni aktif türler mikroorganizmaların yok olmasını hızlandırabilir veya engelleyebilir.
- Substrat katalitik bir etkiye neden olabilir (metal, seramik).
 - Mikroorganizmaların türleri ve substrat yüzeylerini tutuşları:

Mikroorganizma türü plazma sterilizasyonunda en önemli bileşenlerin başında gelmektedir. Bunun nedeni farklı türde mikroorganizmalar plazma sterilizasyonuna farklı şekilde direnç göstermektedir [45,46].

2.2.5. Plazmadaki İnaktivasyon Ajanları

2.2.5.1. UV Etkisi

UV bakterilerin DNA' sında timin-timin dimerlerinin oluşmasını tetikler. Bu da hücrenin replikasyon yeteneğini engeller. Isıl olmayan plazmalar farklı dalgaboylarındaki UV kaynaklarıdır. [47] Fakat UV nin antiseptik etkisi sadece dalga boyu 220-280 nm arasında ise ve dozu yeteri kadar yüksekse görülmektedir. Bu nedenle eğer UV bu şartları desteklemiyorsa UV radyasyonunun önemli bir etkisi olmamaktadır [48].

2.2.5.2. Reaktif Türlerin Etkisi

Yüksek basınçta, denge halinde olmayan boşalımda, elektron yakalama uyarımı ve kopmasıyla oluşturulan reaktif türlerin plazmanın antiseptik özellikleri üzerinde oldukça önemli bir rol oynadığı bilinmektedir.

Kuzmichev ve ark.ın [49] çalışmasında ise bakteri öldürücü etkinin en en iyi nemli oksijen ve havada başarıldığını belirtmiştir. Nem varlığında hidroksil radikali bakteri hücrelerinin dış yapılarına kimyasal olarak etki ederek önemli bir rol oynamaktadır. Ve ayrıca O₂ nin hava plazmasındaki veya boşalımlardaki varlığı ozon (O₃) oluşumu ile sonuçlanmaktadır ki ozonun hücresel solunumu engelleyerek bakteri öldürücü etkisinin varlığı bilinmektedir.

2.2.5.3. Yüklü Parçacıkların Etkisi

Yüksek basınçta ve düşük enerjide bakteriyel hücrelerin yüklü parçacıklarla bombardıman edilmesi mikroorganizmaların yıkımında önemli bir rol oynamamaktadır. Buna rağmen Mendis ve ark. [50] bakteriyel hücrelerin dış zarlarının kopmasında yüklü parçacıkların etkisinin olabileceğini öngörmüştür. Yaptıkları çalışmada bu durumun daha çok düzensiz bir yüzeye sahip olan gram negatif bakterilerde görüldüğünü belirtmiştir. Bu durum dış zarı olmayan fakat daha kalın mürein tabakası olan dolayısıyla daha sağlam bir yapısı olan gram pozitif bakterilerde geçerli değildir.

2.2.6. Plazma Sterilizasyonunun Etki Mekanizması

Plazma sterilizasyonunun etki mekanizması üç temel aşamadan meydana gelmektedir.

- UV ışınması etkisiyle mikroorganizmanın genetik materyalinde hasar oluşması. DNA iplikleri üzerinde yeterli miktarda hasar oluşmasını gerektiren istatistiksel bir süreçtir.
- Işıma etkisiyle mikroorganizmalarda atomik düzeyde ara yüzeylerde kopmaların artması sonucu mikroorganizmanın yüzeyden aşındırılması.
- Yüzeyden kopma “etching” etkisi sonucu mikroorganizmanın atomik düzeyde erozyonu[51].

Bu belirtilen etkiler UV nin çok etkili olmadığı yüksek basınçta çalışan plazma sistemleri için geçerli değildir. Montie ve ark. [52] yüksek basınç plazmaları için üç inaktivasyon mekanizmasından bahsetmektedir.

- Yağ peroksidasyonu: Doymamış yağ asitlerinin hidroksil radikalleri ile etkileşimi sonucu gerçekleşen yağ peroksidasyonu.
- Protein oksidasyonu: Aminoasitlerin oksidasyona karşı duyarlılığı sonucu oluşan oksidasyon.
- DNA oksidasyonu: Oksijen radikalleri ile gerçekleşen tepkimeler ile baz eklentilerinin oluşumu sonucu gerçekleşen DNA oksidasyonu.

Bu belirtilen mekanizmalar gaz karışımında oksijenin ve nemin varlığı söz konusu olduğunda geçerlidir.

Montie ve ark. [52] çalışmasında gram negatif bakterinin zarının hızlıca parçalanmasının nedeninin hücre zarındaki yağların peroksidasyona uğraması olduğunu belirtmiştir [48].

2.2.7. Tekniğin Avantaj ve Kısıtlamaları

Plazma sterilizasyonun birçok avantaj ve kısıtlamaları aşağıda kısaca belirtilmektedir.

- Plazma sterilizasyonu ile kısa sürede mikroorganizma inaktivasyonu sağlanabilmektedir.
- Çalışılan sıcaklık düşük olduğundan özellikle sıcaklığa duyarlı materyallerin sterilizasyonunda kullanılabilir.
- Tehlikeli veya toksik bir ajan kullanılmamaktadır ve sterilizasyon süresince tehlikeli veya toksik bir ürün oluşmamaktadır. Oluşan yan ürünler genelde sudur.
- Sterilizasyon sonrası ek bir işlem (havalandırma) gerekmemektedir.
- Paketleme materyalleri üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmamaktadır.
- Reaktif türler elektrik alan kapatıldığında milisaniyeler içinde yok olduğu için personel için tehlike teşkil etmemektedir [51]
- Plazma sterilizasyon üniteleri genelde küçük kapasiteli oldukları için geniş kullanım alanı gerektiren materyallerin sterilizasyonunda kullanımlarında kısıtlamalar meydana gelmektedir.

- Vakum ortamında gerçekleştirilen plazma sistemlerinde sıvı ürünler ve vakum ortamında yapılarında bozukluk olabilecek ürünler steril edilemez.
- Plazma sterilizasyonunun başlıca kısıtlaması plazma türlerinin zayıf penetrasyon özelliği göstermesidir. Organik kalıntı varlığında, paketleme materyali kullanımında, karmaşık bir geometriye sahip substrat yüzey kullanıldığında ve plazma ünitesindeki substrat sayısı fazla olduğunda plazma etkinliği azalmaktadır. Bu sorunları çözmek için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunların en önemlisi plazmanın etkisinin 254 nm dalga boyunda UV ışınımı yapmasını sağlamaktır. Paketleme materyalinden penetrasyonu sağlamak için de 254 nm deki dalga boyundaki UV ışınlarını geçirebilen paketleme materyali seçildiğinde bu problem de kısmen çözülmüş olacaktır. Paketleme problemi atmosferik plazma kullanılarak da çözülebilmektedir. Çünkü atmosferik plazma sistemleri plazmayı paketin içinde oluşturabilmektedir ve pahalı vakum sistemlerine ihtiyaç duyulmamaktadır [37].

2.2.8. Plazma Sistemleri

2.2.8.1. Termodinamik Özelliklerine Göre Plazmalar

Plazmaları ilk olarak ısı plazmalar (termodinamik denge plazmaları) ve ısı olmayan plazmalar (denge dışı plazmalar) olarak termodinamik özelliklerine göre sınıflandırabiliriz:

- Isıl Plazmalar

Bu sınıf plazmalar 10^3 Pa' dan yüksek basınçta ve 10^4 K'den yüksek elektron sıcaklığında olan plazmaları kapsar. İyonlaşma derecesi (toplam plazma parçacıklarından iyon olanların sayısı) %100 veya %100' e yakındır.

- Isıl Olmayan Plazmalar

Bu plazma termodinamik açıdan denge halinde değildir. Bu nedenle farklı plazma türlerinde farklı sıcaklıklarla karşılaşmak mümkündür. Plazma uygulamasında tipik durum 10^4 K ($T_e \sim 10^4$ K) düzeyindeki nispeten sıcak elektronlar ve yaklaşık çevre sıcaklığındaki ($T_i \sim T_n \sim 10^4$ K) soğuk iyonlardan ve nötr atomlardan oluşur. İyonlaşma derecesi sıcak plazmaya göre düşük olup 10^{-4} – 10^{-1} aralığındadır [53].

Düşük sıcaklık plazması da iki başlık altında incelenebilir:

- Sıcak plazma; gaz sıcaklığı 1000 K' den daha fazladır, normal şartlarda 10^4 K civarındadır. Lamba ışınması, elektrik arkı ve diğer yüksek-güç boşalımları sıcak plazmaya örnek olarak verilebilir.
- Soğuk plazma; gaz sıcaklığı 1000 K' den daha düşüktür, normal şartlarda 10^2 K civarındadır. Düşük basınçta gerçekleşen yük boşalım plazmaları soğuk plazmaya örnektir ($1\text{eV}=11600\text{ K}$) [1].

Herhangi bir gaz kullanıldığında plazmanın sıcaklığı plazma parçacıklarının (nötr ve yüklü) ortalama enerjileri ve bunların ilgili serbestlik dereceleri (dönüşümsel, rotasyonel, titreşimsel) ile tanımlanır. Bu nedenle çok-bileşenli sistemler; plazmalar, birden çok sıcaklıkta bulunabilirler. Elektronlar ortalama serbest yolda ilerlerken elektrik alandan enerji aldıklarında ağır bir parçacıkla çarpıştığında bu enerjinin sadece küçük bir kısmını kaybederler. Bu durum, plazmadaki elektron sıcaklığının neden ağır parçacıklardan daha yüksek olduğunu açıklamaktadır. Daha sonra bu çarpışmalar, eğer zaman ve enerjinin yeterli olmadığı bir durum (korona ve vurgulu boşalımda olduğu gibi) söz konusu değilse veya ortamdaki tüm gazın sıcaklığının artmasını engelleyici bir soğutma mekanizması yoksa parçacıkların sıcaklığını dengelenmektedir. Böyle çarpışmalar sonucu ısıtma ile elektronlar ve ağır parçacıklar arasında oluşan sıcaklık farkı elektrik alanın (E) basınca (p) oranıyla orantılıdır. Sadece küçük E/p değerlerinde sıcaklık değerleri birbirine yaklaşır. Bu durum plazmalarda yerel termodinamik denge için gerekli bir durumdur. Bu şekilde olan plazmalarda her noktada tek bir sıcaklık söz konusudur. Kutuplardaki plazmalar bu plazmalara örnektir.

Bazı plazmalar ise termodinamik dengeden çok uzaktadır ve plazma parçacıklarına ve bunların serbestlik derecelerine bağlı olarak birçok farklı sıcaklık değeri göstermektedir. Elektronların sıcaklığı genellikle ağır parçacıkların sıcaklığından fazla olmaktadır. Böyle denge halinde olmayan plazmalarda iyonlaşma ve kimyasal prosesler direk olarak elektron sıcaklığına bağlıdır bu nedenle termal prosesden ve gazın sıcaklığından etkilenmemektedir. Bu şekildeki denge halinde olmayan plazmalara ısı olmayan plazmalar denmektedir. Isıl olmayan plazmalara örnek ise kuzey ışıklarıdır [54].

Düşük sıcaklık plazma sistemleri düşük basınçlı sistemlerde oluşturulmaktadır ve modern teknolojide geniş bir kullanım alanına sahiptir. Plazma saçılımı, plazma modifikasyonu, plazma ile yüzey aşındırma, plazma ile kimyasal buhar birikimi yapılması ve plazma polimerizasyonu plazmanın kullanımına örnek olarak verilebilir [1].

2.2.8.2. Çalışma Basıncına Göre Plazmalar

Çalışılan ortam basıncına göre sınıflandırılacak olunursa plazma sterilizasyon yöntemleri basitçe 2 ana gruba ayrılmaktadır. Bunlar düşük basınçta elde edilen plazma ve atmosferik basınçta elde edilen plazma sistemleri olarak sınıflandırılmaktadırlar. Literatürde yapılan araştırmalarda genellikle atmosferik basınç plazma sistemleri kullanılmaktadır. Tez kapsamında kullanılacak olan plazma sistemleri atmosferik basınç düşük sıcaklık plazma sistemleridir [1].

2.2.8.2.1. Düşük Basınçta Çalışan Soğuk Plazma Sistemleri

Herhangi bir gaz karışımında iyonlaştırma voltajı elektrotlar arasındaki uzaklık (açıklık genişliği) ve aralarındaki gaz basıncı ile belirlenir [55,56]. Gazın basıncını düşürmek, gazı iyonlaştırmak için gerekli voltajı düşürür. Bu nedenle düşük basınçta çalışan soğuk plazma sistemleri antimikrobiyal olarak aktif plazma meydana getirmek için daha düşük güce ihtiyaç duyarlar [57].

Düşük basınçlı soğuk plazma teknolojisi vakum plazma teknolojisi olarak da adlandırılmaktadır. Soğuk plazma teknolojisinde ilk endüstriyel boyuttaki uygulamalar düşük basınçta yapılmıştır. Bunun nedeni atmosferik basınçtakine kıyasla düşük basınçta, bu tip boşalimleri stabilize etmenin daha kolay olmasıdır. Düşük basınçta büyük hacimlerde homojen plazma boşalımı üretmek oldukça doğrudur. Bu durumun sıkıntısı ise büyük ölçekli, düşük basınçta, ısı olmayan rekatif plazma meydana getirmek büyük boyutta metal vakum haznesinin ve karışık vakum ekipmanlarının (vakum pompası, gaz akışı kontrol üniteleri vb.) kullanımını gerektirir. Düşük basınçta plazma prosesi kesikli proses olarak uygulanmaktadır ki bu proses örneklerin gruplar halinde vakum haznesine yüklenmesini ve işlem sona erdikten sonra boşaltılmasını gerektirir [53]. Ayrıca

unutulmamalıdır ki kesikli proses dezavantajının yanı sıra vakum plazma her gıda için uygun değildir çünkü her gıda vakuma dayanıklı değildir [57].

Düşük basınçta elde edilen plazma sterilizasyon sistemleri genellikle yüksek frekanslı (RF/MW) jeneratörlere sahip olan sistemlerdir. Mikrodalga ve radyo frekansı yayıcı sistemine sahip plazmalarda yayıcı gazın da içinde hapsedildiği reaktörün içinde bulunmaktadır. Gaza enerji verilerek plazma haline geçmesi sağlanmaktadır.

2.2.8.2.1.1. Mikrodalga İle Çalışan Soğuk Plazma Sistemleri

Gazı iyonlaştırmak için mikrodalgaları (MW) kullanan soğuk plazma sistemlerinin kullanım teknolojisi mikrodalga fırınlardakine benzemektedir.

2.2.8.2.1.2. Radyo Frekansı İle Çalışan Soğuk Plazma Sistemleri

Radyo frekansı (RF) ile çalışan sistemler gazları çeşitli güç ve voltaj değerlerinde çalışarak hızlı periyodik elektriksel impulslar kullanarak iyonlaştırırlar. Mikrodalga temelli sistemler gibi bu tip sistemler de uzun yıllardır kullanılmaktadır. Bu sistemler için Hz değerlerinden, yüksek MHz değerlerine kadar değişen aralıkta frekans değerleri kullanılabilir.

2.2.8.2.2. Atmosferik Basınçta Çalışan Soğuk Plazma Sistemleri

Atmosferik basınçta ve ortam sıcaklığında plazma oluşturmak için birçok yöntem bulunmaktadır [58]. Arasında yüksek potansiyel fark oluşturulan elektrotlar arasında atmosferik basınçta gaz gönderilmektedir. Bu yüzden elektronik, kimyasal ve fotonik olaylar iki iletken arasında meydana gelmektedir. Düşük basınçtaki plazmalara zıt olarak burada oluşturulan plazma heterojen yapıdadır ve aktif türler ortam sıcaklığında fazla miktarda oluşturulabilmektedir [1].

Bu tip plazma sistemleri herhangi bir vakum haznesine veya ekipmanına gerek kalmadan sürekli bir sistemde işlem görecektür ürünün plazma bölgesine konveyörler yardımıyla taşınmasına olanak sağlar. Fakat dış ortam basıncı nedeniyle

iyonlaşma zorlaştığından daha yüksek voltaj kullanılması gibi farklı zorunluluklar ortaya çıkar [57].

Düşük basınçta çalışan plazma sistemlerinde kullanılan vakum ekipmanları bu sistemleri oldukça pahalı bir hale getirmektedir ve kesikli sistemler oldukları için zaman kaybına neden olmaktadır. Ayrıca aktif parçacıkların yoğunluğu da düşük olmaktadır. Bu durum son zamanlarda atmosferik basınçta çalışan fakat düşük basınç plazmasının özelliklerini de taşıyan yeni plazma kaynaklarının araştırılması ihtiyacını doğurmuştur. 1 atm' de çalışmanın ekonomik ve işlevsel avantajları, bilimsel ve endüstriyel alanda birçok yeni atmosferik plazma kaynağının geliştirilmesini sağlamıştır [59].

2.2.8.2.2.1. Korona Boşalım Plazması

İlk olarak Siemens, suyu dezenfeksiyonunda kullanılacak ozonu üretmek için korona boşalımını önermiştir [60]. Bu çalışma mikroorganizmaların inaktivasyonu için plazmanın ilk kullanımınıdır. Menashi atmosferik basınçta plazma oluşturmak için RF ile çalışan korona boşalımı kullanmıştır [61].

Korona boşalım plazmaları elektrik boşalım plazmaları içinde en çok çalışılan çeşitlerden biridir. Korona zayıf ışıltılı boşalımdır ve genellikle atmosferik basınçta gözlenmektedir. Korona boşalımı yüksek voltajda elde edilmektedir ve elektrotların çevresinde oluşmaktadır [58] Bu tip sistemlerde boşalım bir iğne ucundan ya da tel elektrottan genişleyerek elektrik alanının gittikçe azaldığı ve en sonunda artık boşalımı destekleyemeyen dış ortama (düzlemsel elektroda doğru) çıkar [62]. Bu nedenle tek tip plazma oluşamaz daha çok karışık yapılar bulunur.

Morar ve ark. [63] korona plazmasının hava kullanılarak sterilizasyon amacıyla kullanımını ilk olarak rapor etmişlerdir. Bitkilerde bulunan iki parazit, *Tetranicus urticae* ve *Phorodum humuli*, direk boşalığa maruz bırakılmış veya önceden boşalığa maruz bırakılmış havada inkübe edilmiştir.

2.2.8.2.2.2. Dielektrik Bariyer Boşalım (DBD) Plazması

Dielektrik bariyer boşalım plazmaları boşalım alanında elektrik akımını durduran ve kıvılcımların oluşmasını engelleyen dielektrik bariyerin kullanılması esasına

dayanmaktadır. DBD boşalım plazmaları, bazen “sessiz boşalım” olarak da adlandırılmaktadır. Bunun nedeni çalışma frekansının 0.05 ve 500 kHz gibi çok düşük değerlerde olmasıdır [58].

Dielektrik bariyer boşalımını atmosferik basınç altında, çok yüksek olmayan gaz sıcaklığında güçlü termodinamik ve denge halinde olmayan plazma oluşturan bir çeşit AC boşalımıdır. Dielektrik tabakası elektrotlar arasındaki akım yolunda olacak şekilde en az bir tanesi dielektrik tabakayla kaplanmış iki elektrottan oluşur. İki elektrodun üzerinde veya arasında bir ya da daha fazla yalıtıcı tabakanın varlığı denge halinde olmayan atmosferik basınç plazması oluşturma için en kolay yoldur. DBD’ lerde elektrot ve boşalım dielektrik bariyerle birbirinden ayrıldığından elektrotlar aşınma ve korozyona maruz kalmaz. DBD, DC voltajla çalışmaz çünkü dielektriğin kapasitif bağlantısı, sürülme akımını sağlamak için AC voltajı gerektirir [59].

Bu plazmaların endüstride kullanım alanları çok geniştir, çünkü bu plazmalar atmosferik basınçta denge dışı koşullarda ek bir güç ünitesi gerektirmeden yüksek güçlerde çalışma imkanı sağlamaktadır [58]. Gelişmiş teknoloji ile birlikte DBD plazmaları biyoloji alanında kendine iyi bir yer sağlamaktadır; özellikle medikal alanda bakterilerin yok edilmesi amacıyla kullanımları artmıştır. Boudam ve ark. [64], 2006 *B. subtilis* sporlarının N₂/N₂O gaz karışımı kullanılarak; 5 logaritmik birim indirgenmenin 10 dakika içerisinde gerçekleştirildiğini bildirmiştir.

2.2.8.2.2.3. Plazma Jeti

Başka bir boşalım türü ise atmosferik basınç plazma jetidir (APPJ). APPJ, ilk olarak Jeong ve ark. [65] ve Park ve ark. [66] işbirliği ile oksijen, helyum ve diğer gazların aktığı eş merkezli iki elektrot kullanılarak geliştirilmiştir. Bu sistemde içteki elektrot 13.56 MHz’lik radyo frekansı ve 100-250 V arası voltaja bağlanmış, dıştaki elektrot ise topraklanmıştır. RF’ in uygulanması ile boşalım ateşlenir; iç ve dış elektrot arasından geçen gaz plazma fazına geçirilir. Bu, oldukça reaktif kimyasal türlerin yüksek hızda akışını sağlar. Bu sistem atmosferik basınçta stabil, homojen ve tek tip boşalım oluşturur [67]. Herrman ve ark. [67] *Bacillus globigii* nin sporlarını inaktive etmek için plazma jetini kullanmıştır.

2.2.8.2.2.4. Ark Boşalım Plazması

Ark boşalımları oldukça reaktiftir ve genellikle kimyasal proseslerde yüksek seçicilikleri vardır. Bu plazmaların kullanım nedeni hem geniş elektron yoğunluğu, akım ve güç gibi ısı plazma özelliklerinin olması hem de düşük gaz sıcaklığı gibi ısı olmayan plazma özelliklerini sağlayabilmesidir. Bir gaz (genellikle nemli hava) elektrotlar arasındaki boşluğa enjekte edilir. Boşalım elektrotların birbirine en yakın olduğu noktada ateşlenir. Gaz akışı nedeniyle boşalım yukarı doğrudur ve plazma sütunu yukarı gittikçe genişler. Elektrotlar arasındaki kısa mesafede oluşan ark savrulur ve bir plazma bulutu içine dağılına kadar elektrotlar boyunca atlar. Hemen ardından yeni bir çevrim için yeni bir ark oluşur. Bu genişleme kolondaki ısı kaybının artmasına neden olur [62]. Korona boşalımlarının aksine, bu teknik yüksek güç kullanımına ve sonuç olarak kısa ömürlü aktif türlerin büyük miktarda oluşumuna neden olur. Bu tekniğin bir diğer avantajı da başlangıçta gaz modifikasyonu için geliştirilmesine rağmen yüzey ve sıvı modifikasyonlarına da kolaylıkla uygulanabilir olmasıdır.

Test edilen ilk sıvı örnekleri suda bulunan kimyasal kirliliklerdir. Bununla birlikte ark boşalımı yoluyla üretilen plazma sıvıların bakteriyel dekontaminasyonunu oldukça hızlı gerçekleştirir. Ark boşalımı çok yüksek elektrik gücü kullanımına uyumlu olduğundan reaktif türlerin oldukça fazla olmasına sebep olur. Günümüze kadar Vitrac'ın çalışmaları haricinde ark boşalımıyla elde edilen plazmanın antibakteriyel aktivitesi üzerine yapılan çalışmalar oldukça azdır.

2.2.8.2.2.5. Işıltılı Boşalım Plazması

Klasik düşük basınç ışıltılı boşalım yıllardır çalışılmaktadır. Bu boşalım genellikle 1 cm'den 1 m'ye kadar bir uzaklıkta yerleştirilmiş iki elektrodun arasında düşük basınçta gaz kullanılarak oluşturulur. Bu boşalım ışık emisyon şablonu, katot ışıltısı, karanlık katot bölgesi, negatif ışıltı, Faraday karanlık bölgesi, pozitif kolon, karanlık anot bölgesi ve anot ışıltısı bölümlerinden oluşmaktadır.

Işıltılı boşaltım düşük basınçta kolayca oluşturulabilmesine karşın basıncın artmasıyla boşalım kararsız olma eğilimine girer. Bu nedenle atmosferik basınçta özel dizaynlı elektrotların kullanılması gerekmektedir. Ayrıca ark oluşumu ısı olmayan atmosferik basınç plazması meydana getirebilmek için bir engeldir [62].

2.2.8.2.2.6. Radyo Frekansı Plazmaları

Radyo-frekansı boşalımlar gazların elektromanyetik alana maruz bırakılmayıyla elde edilmektedir. Bu alan reaktörü saran endüksiyon bobini sayesinde (Etkileşik Çiftlenmiş Plazma-ICP) elde edilmekte veya dış yüzeyde birbirinden ayrı elektrotlar tarafından (Kapasitif Çiftlenmiş Plazma- CCP) elde edilmektedir. RF plazmaların etkinliği çok hızlıdır fakat çalışma koşulları çok hassastır. Örneğin; Nelson and Berger *B. Subtilis'* in RF oksijen plazma ile 3.5 logaritmik birimlik indirgenmeye 5 dakikada ulaştığını bildirmiştir [68]. Fakat bu sistemle aynı özelliklere sahip başka bir sistemle yapılan deneylerde ise aynı inaktivasyonun 15 dakikada elde edildiğini belirtmiştir [69] . Plazma uygulamasının etkinliği kullanılan gaz çeşidine ve boşalım gücüne bağlıdır [70]. RF plazmaların detaylı analizleri yapıldığında kısa ömürlü reaktif türlerin primer olarak ve UV ve bölgesel sıcaklık etkisinin ikincil bir etkiye sahip olduğu belirtilmektedir [71]. RF plazmalar günümüzde polietilen terafitalat şişeler gibi hassas materyallerin sterilizasyonunda kullanılabilmektedir [72].

2.3. Vitaminler

Vitaminler, hücre ve organların normal işlevleri ve sağlıklı gelişim için gereksinim duydukları, diyet yoluyla belirli düzeylerde alınması gereken, yüksek biyolojik etkinliğe sahip organik bileşiklerdir. Bu nedenle yeteri kadar vitamin alınmadığı takdirde sağlık sorunları ortaya çıkmaktadır.

2.3.1. Vitaminlerin Sınıflandırılması

Vitaminler yağda eriyen ve suda eriyen vitaminler olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır. Vitaminler ayrıca koenzim fonksiyonu olan ve koenzim fonksiyonu olmayan vitaminler olarak da sınıflandırılabilir.

2.3.1.1. Yağda Çözünen Vitaminler

Yağlarla alınan ve safranın etkisi ile bağırsaklardan emilen vitaminlere yağda eriyen vitaminler denilmektedir. A, D, E, K vitaminleri bu sınıfa girmektedir. Yağ emilimini etkileyen her hastalık veya bozukluk bu vitaminlerin eksikliğine neden

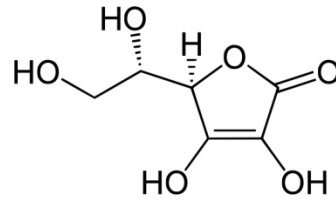
olur. Dolaşıma geçtikten sonra karaciğer dokusuna taşınırlar. Bu vitaminler karaciğer ve yağ deposunda depolanırlar. A, D, K vitaminleri karaciğer dokusunda depolanırken; E vitamini vücudun yağ dokularına dağılır.

2.3.1.2. Suda Çözünen Vitaminler

Suda çözünen vitaminler bağırsakta emildikten sonra kullanılacakları dokuya kan dolaşımı ile taşınır. Her birinin suda çözünürlük derecesi farklıdır. Bu çözünürlük farkı vücuttaki dağılımlarını da etkiler. Bu vitaminlerin fazlası vücuttan dışarı atılmaktadır. B ve C vitamini bu sınıfa girmektedir.

2.3.2. Askorbik Asit

2.3.2.1. Askorbik Asidin Genel Özellikleri

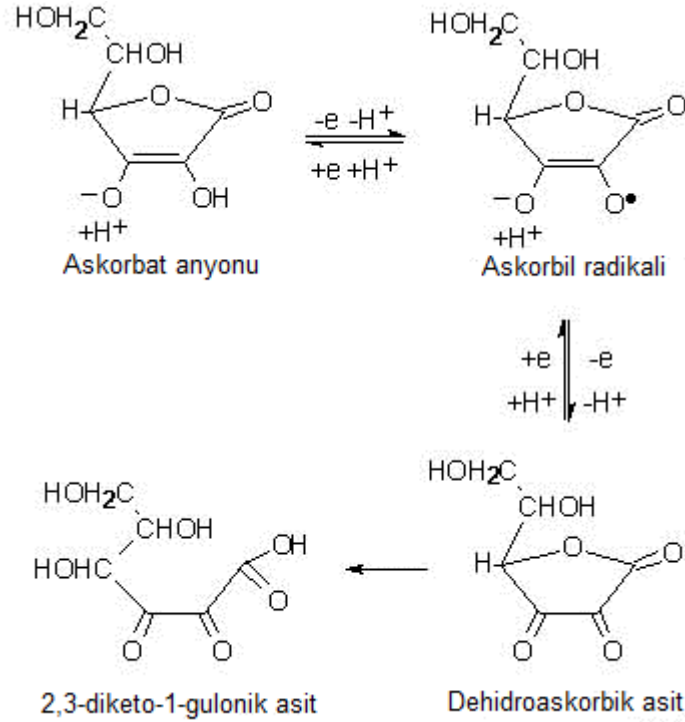


Şekil 8 Askorbik asidin kimyasal yapısı

Askorbik asit bir monosakkarit türevi olup yapı olarak glikoza ve diğer altı karbonlu monosakkaritlere benzer. Renksiz, kokusuz, suda kolay çözünen dikdörtgen kristallerden oluşmaktadır. Optikçe aktiflik bakımından L(+)- ve D(+)- askorbik asit olmak üzere iki izomeri vardır. D izomeri L izomerinin %10' u kadar aktiviteye sahiptir. Diğer bir izomer olan D-izo-askorbik asit ise vitamin aktivitesine sahip değildir. Fakat gıda redoks sistemlerinde L-askorbik asit gibi davrandığı için antioksidant olarak kullanılmaktadır. L(+)- askorbik asit Vitamin C olarak adlandırılır. Su ile karışabilen organik çözücülerde çözünebilir [73]. Eter, aseton, kloroform, benzen, petrol eteri, bitkisel ve hayvansal yağlarda çözünmez. Hem asit hem de kuvvetli indirgen özelliktedir. Bu özellikleri, lakton halkasındaki karbonil grubu ile konjuge olan enediol yapıdan kaynaklanmaktadır [74]. İnsan için esansiyel bir vitamindir.

Ultraviyole absorpsiyonu pH ve çözücüye bağlıdır. Asidik çözeltilerde 245 nm' de, nötral çözeltilerde 265 nm'de, metanolde 244 nm' de ve etanolde 245 nm'de maksimum absorbans gösterir.

Askorbik asit, serbest oksijeni gıdadaki okside olabilen yapılardan daha önce yakalayarak koruma sağlar, H iyonu vererek serbest radikal zincirini inhibe eder. Dehidro-L-askorbik asite dönüşür. Tepkime çift yönlüdür. Dehidro-L-askorbik asit indirgenerek tekrar L-askorbik asite dönüşür. Her iki molekülde Vit C aktivitesi gösterir. Ancak, dehidro-L-askorbik asit, L-askorbik asitin %80'i kadar aktivite gösterir. Dehidro-L-askorbik asit asit nötral ya da hafif bazik ortamda tekrar okside olursa tersinir olmayan bir biçimde biyolojik açıdan etkin olmayan 2,3 diketogulonik aside dönüşür, L-diketogulonik asit tekrar dehidro-L-askorbik asite indirgenmez ve molekül vitamin aktivitesini kaybeder [75] (Şekil 9).



Şekil 9 L-askorbik asitten dehidroaskorbik asit ve diketogulonik asit oluşumu

L-askorbik asitin önemli fonksiyonlarından biri de oksijen türevi olan hidroksil, singlet oksijen, süperoksit gibi serbest radikallerin yıkımında da rol oynamasıdır.

C vitaminin koenzim şekli yoktur, vitamin şekliyle etkisini gösterir. Oldukça güçlü bir asittir ve güçlü bir indirgendir, anyon halinde ise indirgeme gücü artar. Bu

nedenle metabolizmada antioksidan olarak etkindir. Yükseltgenmiş hali olan L-dehidroaskorbik asitte ise bu etki çok azdır.

2.3.2.2. Askorbik Asidin Kaynakları

C vitaminin en zengin kaynaklarını taze meyve ve sebzeler oluşturur. Meyveler arasında en çok askorbik asit içerenler limon, portakal, greycourt, kivi, ananas, çilek ve frenk üzümüdür. 1920' li yıllarda parça etlerin ve balıkların da insanlar için C vitamini kaynağı olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 1 Bazı bitkisel ve hayvansal gıdalarda bulunan askorbik asit miktarı [76]

Meyve ve Sebze Adı	Miktarı (mg/100g)
Kuşburnu	450
Maydanoz	180
Yeşil Biber	100
Kara Lahana	94
Kivi	90
Karnabahar	80
Olgun çilek	17
Ham Çilek	148
Kırmızı Biber	93
Portakal	50
Kızılıcık	55
Dana Ciğeri	450
Keçi Sütü	180
Kuzu Ciğeri	100
İstiridye	94
Domuz ciğeri	90
Sığır Ciğeri	80
Kuzu Beyni	50

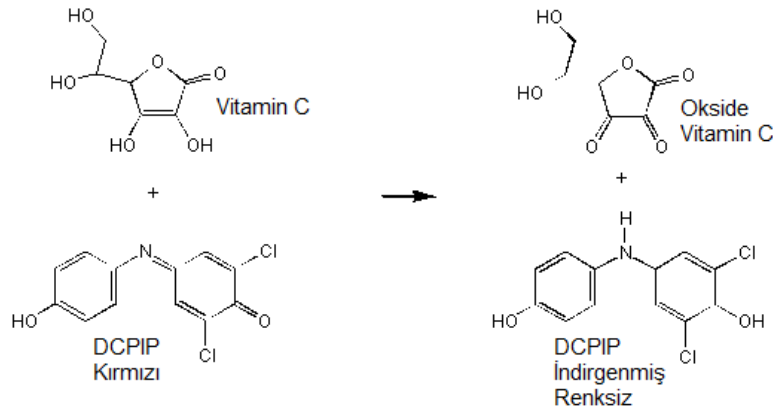
2.3.2.3. Askorbik Asidin Kullanım Alanları

Askorbik asit besin ve içeceklerin vitamince zenginleştirilmesinde kullanılır. Askorbik asit oksijen tutma özelliğine sahip olduğundan dolayı antioksidan olarak kullanılır. Yağların ve yağlı besinlerin uzun süre saklanabilmesi, beyaz renkteki

sebze ve meyvelerin kararmasını önlemek için kullanılır [77]. Askorbik asitçe zengin besinler indirgen ortamdan ötürü teneke kutularda daha iyi saklanabilmektedir. Teneke kutularda saklanan meyve sularının askorbik asit miktarı çok fazla eksilmezken; plastik kutulardaki meyve sularının askorbik asit miktarında fazla miktarda kayıp gözlenmiştir [78].

2.3.2.4. Askorbik Asit Analiz Yöntemleri

- Kimyasal Yöntemler: Bu yöntemler genellikle askorbik asidin yüksek indirgenme yeteneğine dayanır. En çok uygulanan yöntemler 2,6-diklorofenolindofenol, N-bromosuksinimid ve iyot çözeltisiyle oksidimetrik titrim, diazolanmış 2-nitroanilin ve 2,4- dinitrofenilhidrazin ile kolorimetrik yöntemdir. Bunlar arasında 2,6- diklorofenolindofenol, N-bromosuksinimid yöntemi en sık kullanılanlardandır [79].



Şekil 10 DCPIP- Askorbik asit reaksiyonu

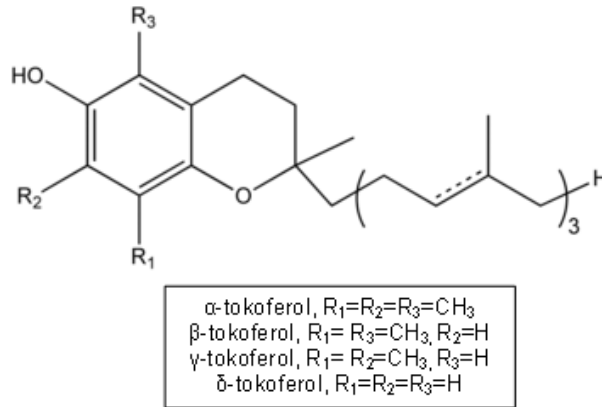
- Fluorometrik Yöntem: Bu yöntem, fluoresans quinoxalin türevini veren dehidroaskorbik asidin cis hidroksil gruplarına karşılık o-fenilendiamin reaksiyon çifti vermesi üzerine kurulmuştur.
- HPLC Yöntemi: Bu yöntemle sadece askorbik asit tayini yapılabildiği gibi total C vitamini (AA ve DHAA) tayini de yapılabilmektedir. Dehidroaskorbik asit askorbik aside göre daha zayıf bir UV absorpsiyonuna sahip olduğu için analizden önce DHAA, AA' ya indirgenmelidir.

2.3.3. Tokoferol

2.3.3.1. Tokoferolün Genel Özellikleri

E vitamini yağda çözünen bir vitamin olarak doğada tokoferol ve tokotrienol formunda bulunur. Tokoferoller arasında 3-metil grubu taşıyan α -tokoferol en etkili olanıdır ve E vitamini denildiği zaman, α -tokoferol anlaşılır. Sentetik olarak elde edilen α -tokoferol asetat, α -tokoferol'deki $-OH$ grubunun yerine asetat kökünün bağlı halidir [79].

Hem α -tokoferol, hem de α -tokoferil asetat, berrak, kokusuz, viskoz, açık sarı yağlardır. α -Tokoferil asetat, E vitamininin başlıca ticari formudur. Yiyeceklerin dayanıklılığını arttırmada, diyetek ek olarak, ilaçlarda ve vitamin kaynağı olarak evcil hayvanlarda kullanılır. Tokoferoller yiyecek teknolojisinde yağların acılaşmasını engellemek için, antioksidant olarak ve diyet gıdalarına ek madde olarak kullanılır.



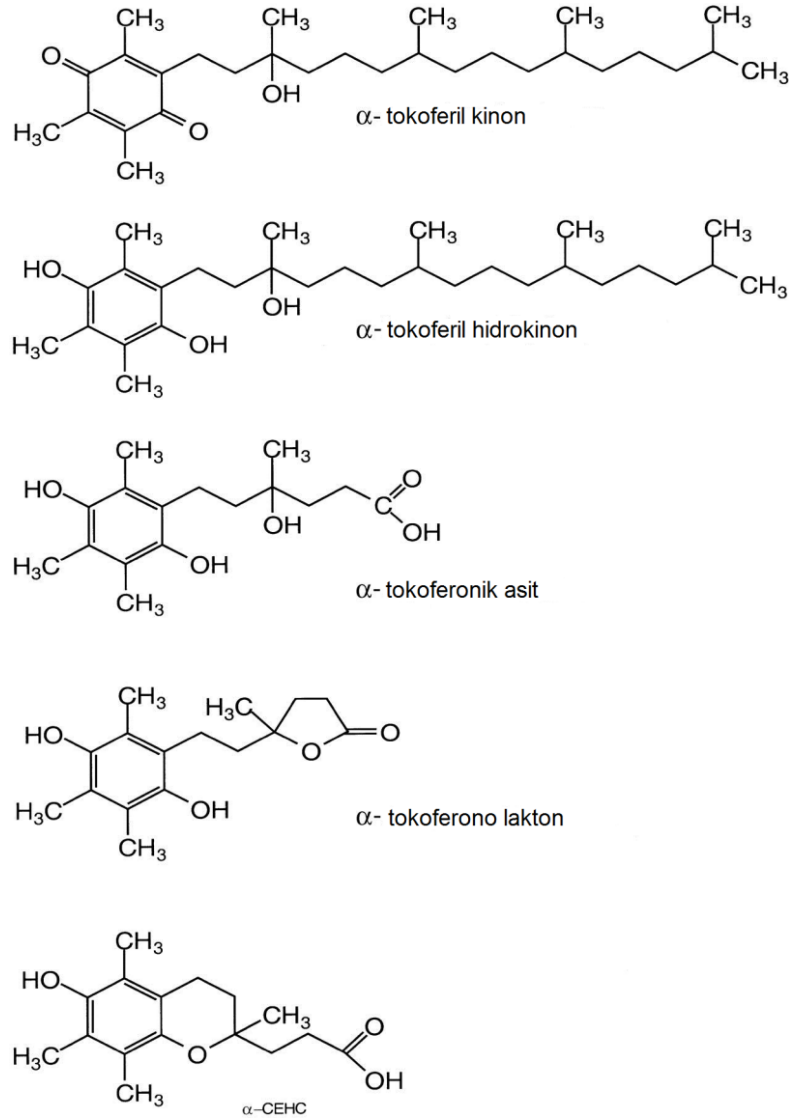
Şekil 11 Tokoferolün kimyasal yapısı

Tokoferoller, alkol grubu ve halka grubu yapısı (benzen + piran halkası) gösteren maddelerdir. Piranlar, altılı halkada bir tek oksijen atomu ile, iki çift bağ ihtiva ederler. Piron'daki $C=O$ grubunun teorik olarak $(-CH_2-)$ 'ye indirgenmesinden piranlar oluşur.

Benzopiron türevlerine bitkilerde sık sık rastlanır. E vitamini olarak da bilinen tokoferoller benzopiron türevlerinden biridir. Benzopiranlara "kromenler" denir. Bunların dihidro türevi ise, "kroman"dır. Tokoferollerin yapısında kroman halka sistemi ve bir izoprenoid yan zincir (fitil) bulunur. α -tokoferol antioksidan aktivitesini

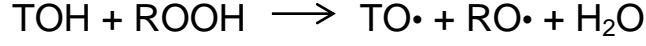
göstermeye başladığında α -tokoferoksil radikalinin oluşmasıyla kroman halkası açılır ve Simon metabolitleri oluşur [80].

Tokoferollerin hepsi doymuş C16 yan halka içermekte, 2',4' ve 8' pozisyonlarında asimetrik merkezler yer almakta ve R₁, R₂, R₃' te çeşitli eklentiler yer almaktadır (Şekil 11). Tokoferol ya da E vitamininin fenolik hidroksil grubu olan aromatik halka vitaminin kimyasal olarak aktif bölümünü simgelemektedir. Alifatik yan halkası ise apolar olup molkeülü suda çözünmez kılmaktadır. Bu vitaminin bir antioksidan olarak kabul edilmesinin nedeni bu bileşiğin kolayca okside olarak diğer oksidasyona duyarlı grupların oksidasyonunu engellemesidir [81]. Şekil 12'de α -tokoferolün oksidasyon ürünleri gösterilmektedir.

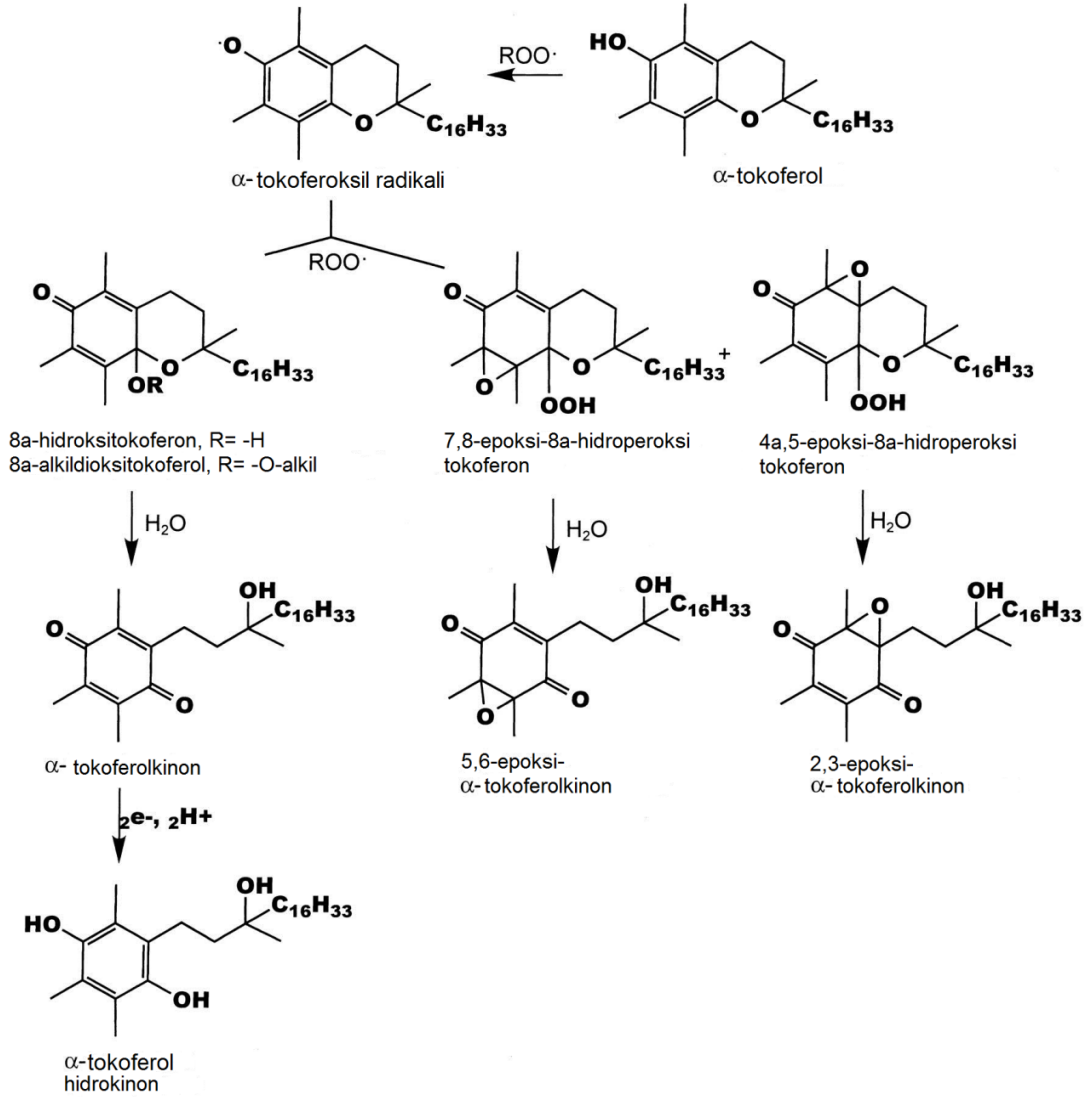


Şekil 12 α -tokoferolün oksidasyon ürünleri ve α -CEHC

Tokoferoller hidroperoksitlerle doğrudan reaksiyona girebilirler. (Şekil 13) Şekil 14'te ise tokoferolün peroksit radikalleriyle verdiği reaksiyon sonucu oluşan ürünler görülmektedir.



Şekil 13 Tokoferolün hidroperoksitle reaksiyonu



Şekil 14 α-tokoferolün peroksit radikalleriyle reaksiyonu [82]

Tokoferoller suda çözünmezler, hekzan, kloroform, eter gibi lipit çözücülerinde çözünürler. E vitamini ısıtma işlemlerine karşı stabildir fakat bu stabilite O₂ varlığında

azalmaktadır. Oksijen bulunmadığı zaman, 200 °C'ye kadar varan ısıya bile dayanıklıdır ve anorganik asitlerden 100 °C'ye kadar etkilenmezler.

Tokoferoller ısıya oldukça dayanıklı olduklarından pişirme, dondurma, kurutma ve bunları içeren yağların alkali ile muamelesi ve hidrojenlenme sırasında bunlara bir şey olmamaktadır. Fakat havada ışık ve özellikle mor ötesi ışınları etkisinde bozunurlar.

Erime noktası ve yağda çözünbilmesi karakteristik bir özelliğidir. Hem α -tokoferol, hem de α - tokoferol asetat, aseton, kloroformda, etanolde, gliserid yağlarda serbest bir şekilde çözünür. Fakat suda çözünmez.

Tokoferoller, aynı zamanda etkili antioksidanlardır. Bu özellikleri E vitamin etkisinin tersine olarak α 'dan γ 'ya doğru gittikçe artar. Bütün tokoferoller ve tokotrienoller esterleşmedikleri sürece antioksidan aktiviteye sahiptirler [81].

2.3.3.2. Tokoferolün Kaynakları

Hayvansal gıdalarda en yüksek E vitamini aktivitesine sahip olan α -tokoferol en yüksek oranda bulunurken, bitkilerde diğer tokoferoller ile tokotrienoller bulunur. E vitaminince zengin olan gıdalar; tohum, tohum yağları, bitkisel yağlar, koyu yeşil yapraklı sebzeler, bazı hayvansal gıdalar, sert kabuklu meyveler (fındık, ceviz), tahıl ve kuru baklagiller ve bitkisel yağlardan özellikle mısır, soya ve yer fıstığı yağdır. E vitamininin sütteki miktarı çok düşüktür [81].

2.3.3.3. Tokoferolün Önemi ve Kullanım Alanları

Vitamin E'nin esas işlevi hücre içi membran bütünlüğünün korunması ve hücresel membranlardaki fosfolipidlerin içerdiği doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunu önlemektir. E vitamini ayrıca sinir ve kas fonksiyonunun korunması ve gelişebilmesi açısından önemlidir [81]. E vitamini eksikliği kısırlığı artırır. Ayrıca E vitamini eksikliği insanlarda, yağlı besin absorpsiyonunun bozulduğu durumlarda görülür. Sonucu olarak eritrositler kolay hemoliz olur ve kas dokusu bozuklukları ortaya çıkar. Primer E vitamini yetmezliği bebeklik döneminde, özellikle bebeğe verilen mamaların çok miktarda doymamış yağ içerdiği durumlarda görülebilmektedir [79]. İnsanda E vitamini günlük gereksinimi 20-30 ünite kadardır. (1 ünite: 1 mg)

2.4. Polifenol Oksidaz Enzimi

Polifenol oksidaz (PFO), bitki ve hayvan dokularında yaygın olarak görülen oksidoredüktaz enzim grubuna dahil olan bir enzim grubudur. Bitkisel dokularda öncelikle latent (inaktif) formlar halinde sentezlenmekte ve zamanla çeşitli etkenlerle, örneğin dokuda doğal olarak bulunan proteazlar veya etilen gibi birtakım solunum metabolitlerince aktif hale getirilmektedirler [83]

Bitkilerdeki PFO' nun görevi henüz tam olarak bilinmemektedir. Fakat bağışıklık reaksiyonlarında, bitki bileşenlerinin biyosentezinde ve fotosentez yapan dokularda serbest radikal süpürücü olarak davrandığı [84] hasar görmüş yaprak yüzeylerinde çürümede ve ayrıca böceklere ve bitki patojenlerine karşı savunmada görevli olduğu ileri sürülmektedir [85].

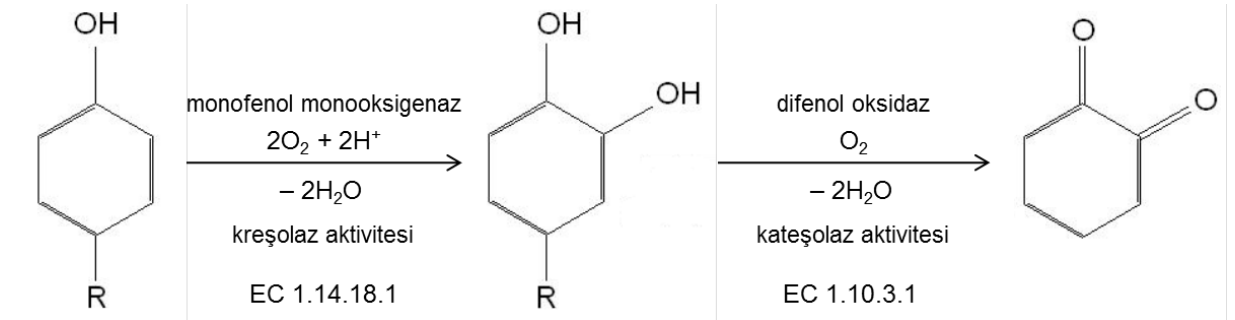
Enzim ve substratlarının bitkisel hücrenin farklı kısımlarında yer almaları nedeniyle zarar görmemiş sağlıklı meyve ve sebze dokularında, PFO enzimlerinin substratları olan fenolik bileşiklerle teması, yok denecek kadar sınırlıdır. PFO enzimlerinin bir kısmı sitoplazmada serbest halde bulunurken, bir kısmı ise hücrenin tilakoid ve kloroplast gibi bölgelerinde, membrana bağlı olarak bulunmaktadır. Buna karşın, fenolik bileşiklerin neredeyse tamamı vakuollerde yoğunlaşmış halde bulunmaktadır. Ancak doku olgunlaşmasının ileri aşamalarında hücredeki pektinazların faaliyetiyle, doku kontrollü ve sınırlı bir şekilde doğal olarak değişimlere uğrar ve hasat, taşıma ve işleme sırasındaki etkiler veya uygulanan çeşitli işlemlerle hücre ve buna bağlı olarak da doku bütünlüğü bozulmaktadır. Böylece, PFO enzimleri kendi substratları olan fenolik bileşiklerle ve havadaki oksijen ile bir araya gelmektedirler [86]. Sonuç olarak da enzimatik esmerleşme denilen bir reaksiyon gerçekleşmektedir. Bu reaksiyon hem polifenol oksidaz aktivitesi hem de fenolik madde konsantrasyonu ile ilgilidir [87].

PFO' lar buğday, çay, patates, salatalık, enginar, marul, armut, papaya, üzüm, şeftali, mango ve elma ile kakao gibi tohumlarda bulunmaktadır [88]. Muz, şeftali, kayısı, elma, üzüm, çilek ve bazı tropik meyveler ve suları ayrıca patates, marul ve diğer yapraklı sebzelerde esmerleşme görülmektedir. Buna karşılık çay, kahve, kakao, siyah üzüm ve siyah incirlerde PFO aktivitesi istenen bir durumdur [89].

PFO tirozinaz, fenolaz, kateşoloksidaz, kateşolaz, o-difenoloksidaz, mono fenoloksidaz, klorojenik asit oksidaz ve kreşolaz olarak da bilinir ve ilk olarak

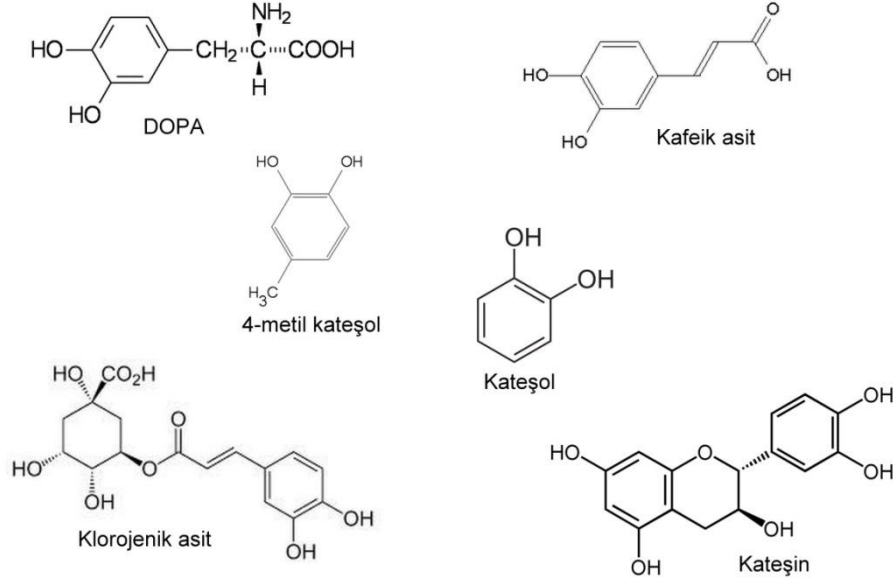
Schoenbein tarafından 1856'da keşfedilmiştir. PFO' nun aktif bölgesi iki adet bakır atomundan oluşur [90]. Bitki polifenoloksidazının molekül ağırlığına dair raporlar çok çeşitli ve değişkendir. Bu çeşitlilik enzimin izolasyonu aşamasında gerçekleşen kısmi parçalanmadır. Ayrıca PFO' yu kodlayan birden fazla gen olduğu için bu molekül ağırlığında görülen çeşitliliğin genetik çeşitlilikten kaynaklandığı da söylenebilir [91,92,93].

PFO Uluslararası Biyokimya Birliği'nin sınıflandırmasına iki kez girmiştir: EC 1.14.18.1 (monofenol, monofenol monooksijenaz, L-dopa: oksijen oksidoredüktaz) monohidroksifenolü o-pozisyonuna hidroksile eder yani kreşolaz aktivitesi göstererek monofenolik bileşiklerin o-difenollere hidroksilasyonunu katalizler. EC 1.10.3.1 (1,2- benzendiol, difenol oksidaz: oksijen oksidoredüktaz) o-dihidroksifenolleri okside edip hidroksil grubundan hidrojenleri uzaklaştırır ve benzokinonları oluşturur yani kateşolaz aktivitesi göstererek o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonunu katalizler [94] (Şekil 15).



Şekil 15 Enzimatik esmerleşme mekanizması

Bitki PFO' larının mono, di, ya da polifenollerden oluşan geniş bir substart yelpazesi vardır (Şekil 16). Yapısal olarak bir ya da daha fazla hidroksil grubu ve diğer grupları bir arada taşıyan aromatik halka içerirler. PFO substratlarının bazıları doğal olarak meyve ve sebzelerde bulunmaktadır; örneğin, klorojenik asit, kateşin ve epikateşin açısından zengin olan elma, enzimatik esmerleşme için oldukça uygundur [90].



Şekil 16. Polifenol oksidaz enziminin bazı substratlarının yapısı

Yemenicioğlu ve ark. [95], yaptıkları çalışmada “Hale Haven” şeftalilerinde polifenol oksidaz (PFO) enziminin niteliklerini araştırmışlardır. Ham, yarı olgun ve tam olgun şeftalilerden öncelikle aseton tozu hazırlanmıştır. Aseton tozundan hazırlanan enzim çözeltisinde optimum pH, Michaelis sabiti (K_m), maksimum hız (V_m) ve enzim aktivitesinin termal inaktivasyonu incelenmiştir. Olgunluk durumuna göre enzimin optimum pH derecesi 6.0-6.5 arasında bulunmuştur. Tam olgun şeftalilerde elde edilmiş enzimin pH 6.2 de K_m değerinin 14.3 mM ve V_m değerinin 1.25 Abs.dk⁻¹. mL⁻¹ olduğu saptanmıştır. Enzimin termal inaktivasyon kinetiği 70°C’de araştırılmıştır. Her enzim ekstraktının termal inaktivasyon kurvesinin, başlangıçta dik bir doğru, sonra daha yatık bir doğru olmak üzere iki bölümden oluştuğu belirlenmiştir. Bu nedenle şeftali PFO enziminin ısıya dirençli farklı iki izoenzimden oluştuğu sonucuna varılmıştır.

Ünal [96], Anamur muzundan polifenol oksidaz enzimini saflaştırıp, enzimin karakteristik özelliklerini belirlemiştir. PFO’nun muz için optimum sıcaklığı 30°C bulunmuştur. Enzimin optimum pH derecesi 7.0 olarak bulunmuştur. İnhibitör testlerinde ise askorbik asit ve sodyum metabisülfid en etkili inhibitör olarak tespit edilmiştir.

Doğan ve ark. [97], kurutma işlemleri için en uygun patlıcan çeşidini tanımlamak için, farklı patlıcan çeşitlerinden elde edilen PFO enziminin biyokimyasal özelliklerini araştırmışlardır. PFO kateşol, 4-metilkateşole karşı aktivite göstermiş, fakat L-tirozin ile aktivite göstermemiştir. eşit I ($V_m=3333.3 \text{ EUdk}^{-1} \text{ ml}^{-1}$, $K_{max}=8.7 \text{ mM}$ ve $V_m/K_{max}= 384.9 \text{ dk}^{-1}$) ve çeşit III ($V_m 1000 \text{ EU dk}^{-1} \text{ ml}^{-1}$, $K_{max}=9.3 \text{ mM}$ ve $V_m/K_{max}= 107.5 \text{ dk}^{-1}$) için en iyi substrat kateşol bulunurken, çeşit II için ($V_m=5000 \text{ EU dk}^{-1} \text{ ml}^{-1}$, $K_{max}=35.5 \text{ mM}$ ve $V_m/K_{max}= 140.8 \text{ dk}^{-1}$) en iyi substrat 4-metilkateşoldür. Kateşol için optimum pH 7, 4-metilkateşol için optimum pH 6'dır. Isıl inaktivasyon çalışmalarına göre 40°C'nin üzeri sıcaklıklarda enzim aktivitesi düşmüştür. Kateşol ve 4-metil kateşol substratları için maksimum aktivite elde etmek için optimum sıcaklık, kateşol kullanılan ve optimum sıcaklığı 20°C bulunan çeşit I dışında, tüm patlıcan eşitleri için 30°C olarak bulunmuştur.

2.5. Model Gıda Olarak Kullanılan Kuşburnu Meyvesi

Kuşburnu Rosaceae familyasından Rosa cinsine ait bir bitki türüdür. Anavatanı Batı Asya, Anadolu, Kuzey ve Orta Avrupa olan kuşburnu çalı formunda, kışın yaprağını döken bir bitkidir. Halk arasında Yabangl, şillan, Deligl, Glburnu, Glelması olarak da bilinir. Meyve şekli basık yuvarlaktan, uzun eliptik şekle kadar değişmekte, sarı, turuncu, kırmızı renktedir.

içerdiği yüksek vitamin ve mineral maddeler sayesinde son yıllarda gerek dünyada gerekse ülkemizde büyük ilgi görmüş ve bu nedenle birçok araştırmalara konu olmuştur. Kuşburnular üzerinde yapılan araştırmalar meyvenin çok zengin bir C vitamini kaynağı olduğunu göstermektedir. Kuşburnu, dünyada yetiştiriciliği yapılan kültür ve yabani meyve türleri içinde C vitamini bakımından en zengin meyve türüdür. Başta C vitamini olmak üzere, diğer birçok vitamin ve mineral maddeler bakımından önemli bir besin kaynağı teşkil eden kuşburnu, bu besin içeriği ve geniş kullanım alanları sayesinde, dünyada popüler bir meyve türü konumuna gelmeye aday bir meyve türüdür [98].

Bugüne kadar yapılan bilimsel çalışmalarda kuşburnu meyvesinin içerdiği C vitamini miktarı, başta yetiştiği rakım olmak üzere, tür ve çeşitlere, yetiştirilen bölgenin iklim ve toprak koşullarına, hasat zamanına ve işleme teknolojisine göre 100-5300 mg/100g arasında bir değişim gösterdiği tespit edilmiştir. Ülkemizde

yapılan araştırma sonuçlarına göre kuşburnunun içerdiği C vitamini miktarı 417-3062 mg/100g arasında değişirken, dünyada yapılan birçok araştırma sonucuna göre ise vitamin C miktarı yukarıda belirtilen faktörlere göre 0–14500 mg/100g arasında değiştiği bildirilmektedir.

C vitamini kadar önemli olan ancak üzerinde durulmayan P vitamini özelliği gösteren maddeler 1100 mg/100 gr oranında bulunurlar. Tatlılığını veren şekerler; bilhassa glikoz, ekşiliğini veren sitrik ve malik asit, kokusunu veren asetik asit, rengini veren karotenlerdir. Ayrıca Provitamin A kaynağı olan karotenler de renk maddesi olarak 3,8 mg/100 gr gibi fazla oranda bulunur. Bu da gıda boya maddesi olarak gıda endüstrisinde kullanılmasını sağlar[99].

Kuşburnunun kimyasal bileşimi %1.7-3.0 sabit yağ, %11 pektin asidi, %2.0 - 2.7 taneli maddeler, %10.0 - 13.7 invert şeker, %0.6 - 2.4 sakaroz, %11.6 - 15.6 toplam şeker, %3 elma ve limon asidi, %0.038 oranında portakal sarısı renginde uçucu yağdan oluşmaktadır. %22.8 - 38.0 arasında değişen oranlarda su ihtiva etmektedir. Ayrıca eser miktarda Vanilin bulunur. Kuşburnu ekirdek yağının doymamışlık derecesi linoleik asitten daha fazla olan yağ asitlerini içermemesinden dolayı, bu yağ tat ve aroma bozulmasına karşı dirençlidir, yani oksidasyon stabilitesi yüksektir. Kuşburnu meyvelerinde selüloz % 2.1-3.8 oranında değişebilmektedir. Tüm bunlar kuşburnunun oldukça konsantre enerji kaynağı olduğunu açıkça göstermektedir. Kuşburnunun kl içeriği ise % 2.4-7.72 oranındadır [100]. Mineral maddelerden Ca 94-138 mg/100 g, Mg 56-124 mg/100 g, Na 1.0-5.9 mg/100 g, K 461-795 mg/100 g, P 337-834 mg/100 g arasında değişim göstermektedir. Bütün bu veriler kuşburnunun enerji ve vitamince zenginliği yanı sıra iyi bir mineral kaynağı olduğuna da işaret etmektedir [101].

Gao ve ark. 'ın [102] yapmış olduğu çalışmada, Rosa cinsinin farklı türlerinde antioksidan miktarının Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemine (TEAC) göre, 457.2 μ mol TEAC g-1 kuru madde ile 626.2 μ mol TEAC g-1 kuru madde; demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan güç yöntemine (FRAP) göre ise 983.4 μ mol FRAP g-1 kuru madde ile 2187.1 μ mol FRAP g-1 kuru madde arasında olduğu belirlenmiştir.

Demir ve ark.' ın [100] yapmış olduğu çalışmada Hadim ve Kastamonu illerinden toplanan kuşburnunun kimyasal özellikleri incelenmiştir. Buna göre Konya'da

yetişen kuşburnunda kül miktarı % 7.35, kuru madde % 20.5, yağ % 1.6, protein % 6.71, askorbik asit 2365 mg/100 g, suda çözümlü ekstrakt %17, pH 5.12, Na 3.97 mg/kg, K 890.5 mg/kg, P 1850 mg/kg, Fe 72.9 ppm, Mg 162.7 ppm, Ca ise 146.7 ppm olarak bulunmuştur. Kastamonu'da yetişen kuşburnunda ise kül miktarı % 6.48, kuru madde % 23.47, yağ % 1.2, protein % 8.44, askorbik asit 2712 mg/100 g, suda çözümlü ekstrakt %21, pH 4.34, Na 4.67 mg/kg, K 1023.9 mg/kg, P 2200 mg/kg, Fe 59.4 ppm, Mg 183.9 ppm, Ca ise 133.3 ppm olarak bulunmuştur.

3. MATERYAL - METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Gazlar, Kimyasallar ve Gıda Örnekleri

Yapılan çalışmada iki farklı plazma sistemi kullanılmıştır. Bunlardan biri Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Negatif Basınç Biyogüvenlik Laboratuvarı (NBBL)'nda bulunan atmosferik plazma jetidir. Diğeri ise Polonya'da, Lublin Teknoloji Üniversitesi'nde bulunan DBD plazma sistemidir.

Atmosferik plazma jetinde gaz olarak kuru hava kullanılmıştır. Gaz, Oksan Kollektif'ten (Ankara) temin edilmiştir. Çalışmada kuru hava seçilmesinin nedeni havanın hem azot hem de oksijen atomlarını içermesi ve dolayısıyla reaktif oksijen ve nitrojen türlerini bir arada bulundurmasıdır. Ayrıca gurubumuz tarafında yapılan başka bir çalışmada havanın mikroorganizmalar üzerinde saf azot ve oksijenden çok daha etkili olduğu tespit edilmiştir[1].

Polonya' da gerçekleştirilen deneylerde kullanılan gazlar He ve O₂' dir. Ayrıca burada gerçekleştirilen deneylerde bu gazların belirli oranlarda karışımları kullanılmıştır.

Potasyum dihidrojen fosfat, sodyum okzalat, L-askorbik asit, n-hekzan, sodyum dihidrojen fosfat dihidrat, glasiyal asetik asit, susuz sodyum asetat Merck (Almanya) firmasından tedarik edilmiştir.

α - tokoferol, polivinilpolipirolidon (PVPP), kateşol ve diklorofenolindofenol Sigma-Aldrich (Amerika) firmasından tedarik edilmiştir.

Çalışmalarda gıda örnekleri olarak kurutulmuş kuşburnu meyvesi (Lokman Hekim, Ankara), enzim ekstraksiyonu amacıyla da elma (Migros A.Ş., Ankara) kullanılmıştır.

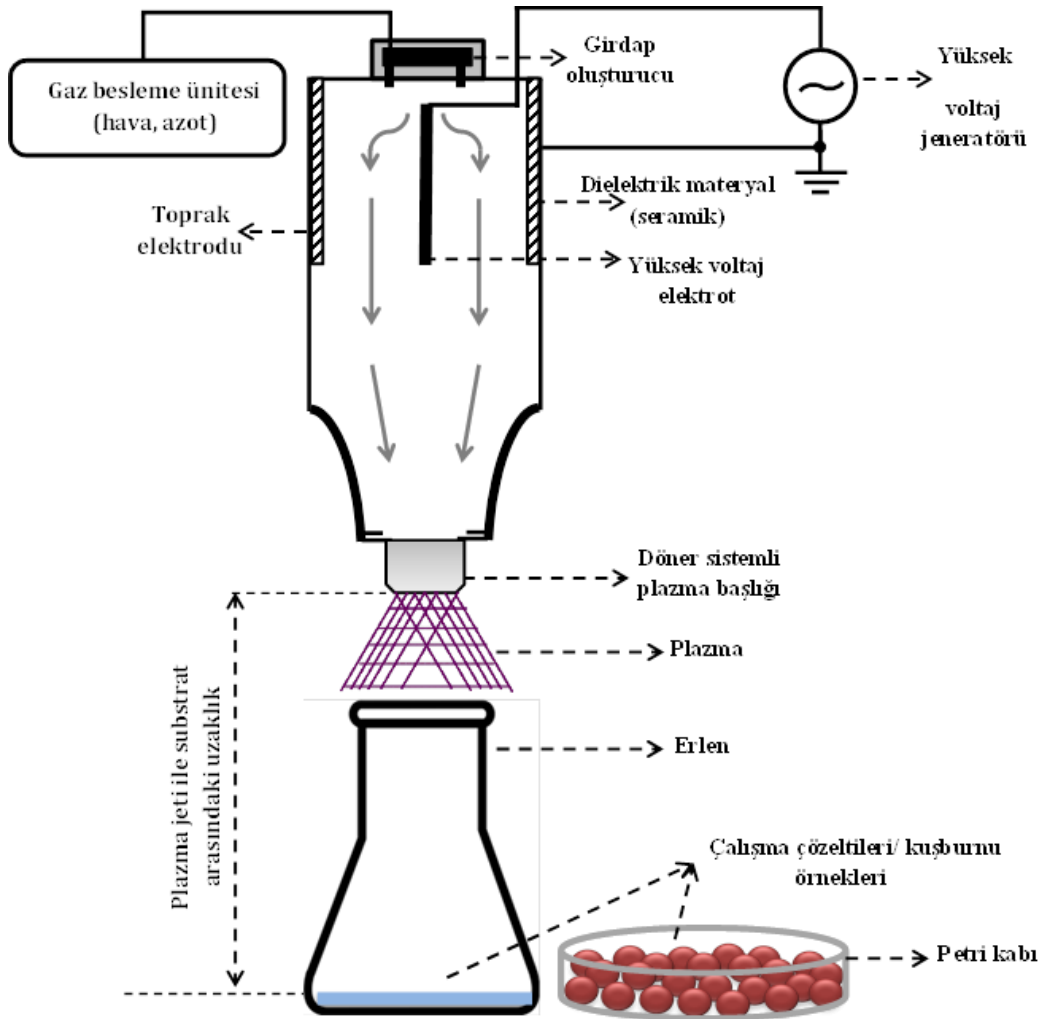
Spektrofotometrik ölçümler Perkin Elmer Lambda 25 (Waltham, Massachusetts, USA) marka spektrofotometre ile yapılmıştır. Sıcaklık ölçümleri ise TFA Digital Probe Thermometer 30.1018 marka termometre ile yapılmıştır.

3.1.2. Plazma Sistem Özellikleri

3.1.2.1. Atmosferik Basınç Plazma Jet (Plasmatreat AS400)

Tez kapsamında kullanılan plazma cihazı, Plasmatreat GmbH (Almanya) tarafından üretilen, AS400 markalı, x-y düzleminde hareket kabiliyetine sahip bir cihazdır.

Deneyler kapsamında çalışılacak atmosferik plazma sisteminin şematik görünümü Şekil 17' de detaylı olarak gösterilmiştir.



Şekil 17 Çalışmada kullanılan atmosferik plazma sisteminin şematik gösterimi

Sisteme beslenen gaz öncelikle girdap oluşturmucudan geçerek havanın plazma probunda homojen olarak dolaşması sağlanmaktadır. Girdap oluşturmucudan çıkan

gaz yüksek voltaj gerilimi sağlayan jeneratörden verilen enerji ile plazma fazına geçirilerek probun uç kısmına doğru ilerlemektedir. Prob içinde oluşan plazmanın sıcaklığı termal hassasiyete sahip ürünler için problem oluşturmaktadır. Bu sebeple plazma probunun ucuna takılmış olan özel bir sistem sayesinde oluşan plazma fazı homojen olarak dağıtılmaktadır. Bu sistem hem probun ucundan çıkan plazmanın sıcaklığının düşük olmasını sağlamakta hem de aktif plazma türlerinin daha geniş bir yüzeye yayılımını sağlayarak uygulama yüzey alanını artırmaktadır.

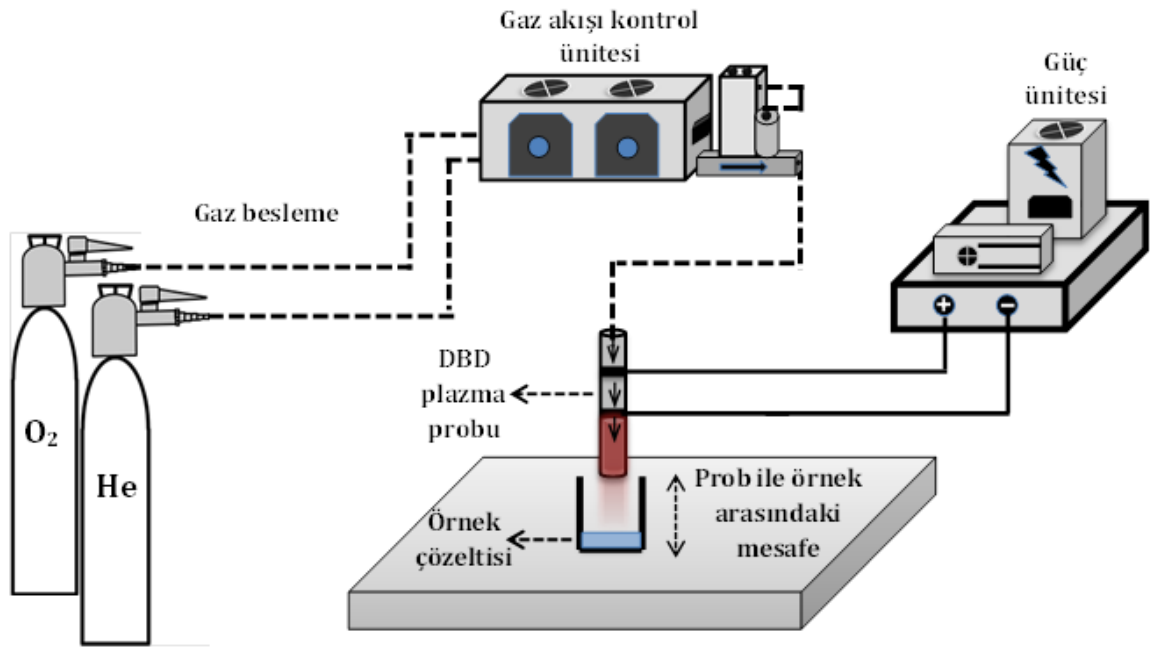
Cihaz spesifikasyonları aşağıda daha detaylı olarak belirtilmiştir:

Çizelge 2 Çalışmada kullanılan plazma parametreleri

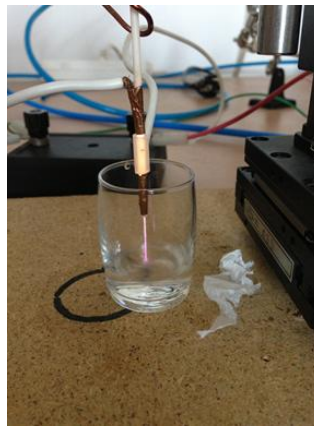
PLAZMA PARAMETRELERİ			Deneylerde Kullanılan Parametreler
Atmosferik Plazma	Referans Voltaj (%)	40-100	100
	Plazma Frekansı (kHz)	15-25	16-20-25
	Plazma devir süresi (%)	0-100	100
	Plazma jet hızı (m/dak)	1-100	-
	Raster offset (mm)	1-250	-
	Gaz akış hızı (L/sa)	100-5000	500-750-1000
	İyonlaştırma gazları	Hava, azot, oksijen	Hava
	Plazma jeti ile örnek arası mesafe (cm)	-	5

3.1.2.2. DBD Plazma Sistemi

Polonya'da Lublin Teknoloji Üniversitesi'nde DBD plazma sistemi kullanılmıştır. Sistem ev sahibi bilim gurubu tarafından tasarlanmış olup sistemin şematik görünümü Şekil 18'de detaylı olarak belirtilmiştir. Plazma sisteminin genel görünümü ise Şekil 19'da gösterilmektedir. Sistem; güç ünitesi, gaz akış kontrol ünitesi, gaz kaynağı ve plazma jetinden oluşmaktadır. Akış hızı ve karışımdaki gaz oranları Bronkhorst M-112-12-69-6A tipi akış kontrol ünitesi ile kontrol edilmiştir.



Şekil 18 DBD plazma sisteminin şematik görünümü



Şekil 19 DBD plazma sisteminin genel görünümü

3.2. Metot

Tez kapsamında plazma jet ve DBD plazma sistemi kullanılmış olup bu kısımda gerçekleştirilen deneyler her 2 plazma sistemi için ayrı ayrı belirtilmiştir. Tez kapsamında belirtilen deneyler Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Plazma Destekli Biyomühendislik ve Biyoteknoloji Laboratuvarında ve Negatif Basınç Biyogüvenlik Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiş olup, DBD plazma sistemiyle gerçekleştirilen deneyler sadece plazmanın askorbik asit üzerindeki etkisi üzerine etkilerinin incelenmesi üzerine dayanmaktadır.

3.2.1. Atmosferik Plazma Jeti (Plasmatreat AS400 Sistemi) ile Gerçekleştirilen Deneyler

Askorbik asit, tokoferol, polifenol oksidaz enzimi ve model gıdaya Plasmatreat AS400 atmosferik plazma sistemi ile plazma işlemi uygulanmıştır.

3.2.1.1. Sistem Parametrelerinin Optimizasyonu

Tüm örnekler için farklı frekans, süre, gaz akış hızı parametreleri kullanılmıştır. Parametrelerdeki değişimlerin model bileşenler üzerindeki etkileri göz önüne alınarak sistem çalışma parametreleri optimize edilmiştir.

3.2.1.2. Sıcaklık Ölçümleri

Tüm deneyler oda sıcaklığında yürütülmüş olup askorbik asit çözeltilerinin plazma işlemi öncesi ve sonrası sıcaklık ölçümleri TFA Digital Probe Thermometer 30.1018 marka termometre ile yapılarak veriler kaydedilmiştir. Böylece plazma işleminden kaynaklanan sıcaklık artışları tespit edilmiştir.

3.2.1.3. Askorbik Asit Analizleri

3.2.1.3.1. Askorbik Asit Çözeltisinin Hazırlanması

Askorbik asit analizi için Selimovic ve ark.' larının [103] uyguladığı yöntem kullanılmıştır.

Tampon çözelti (pH = 5.4): 4.08 g potasyum dihidrojenfosfat (KH_2PO_4) (Merck) ve 0.16 g disodyum hidrojen fosfatın 1000 ml saf suda çözündürülmesiyle hazırlanmıştır.

Sodyum okzalat çözeltisi (0.0056 mol/dm^3): 0.75 g sodyum okzalatın (Merck) 1000 ml tampon çözeltisinde çözündürülmesiyle hazırlanmıştır.

Stok L-askorbik asit çözeltisi ($1.13 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$): 0.05 g L-askorbik asidin (Merck) 250 ml sodyum okzalat çözeltisinde çözündürülmesiyle hazırlanmıştır.

Çalışma çözeltisi: 37,5 mL stok askorbik asit çözeltisi 500 mL'lik balon jøjeye aktararak 0.0056 mol/dm^3 sodyum okzalat çözeltisiyle çizgisine kadar seyreltilmiştir. Her parametre için bu çözelti kullanılmıştır.

3.2.1.3.2. Askorbik Asit Çözeltisine Plazma İşleminin Uygulanması

5 mL çalışma çözeltisi erlene alınıp aşağıdaki plazma parametreleri uygulanmıştır:

- ❖ Frekans: 16 kHz, 20 kHz, 25kHz
- ❖ Süre: 2 sn, 4 sn, 6 sn, 8sn
- ❖ Gaz akış hızı: 500 L/sa, 750 L/sa, 1000 L/sa
- ❖ Gaz kompozisyonu: Kuru hava
- ❖ Referans voltaj: %100

Deneylerde her parametre 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar verilerin ortalaması şeklinde verilmiştir.

3.2.1.3.3. Askorbik Asidin Spektrofotometrik Yöntemle Analizi

Spektrofotometrik ölçümler Perkin Elmer Lambda 25 (Waltham, Massachusetts, USA) marka spektrofotometre ile ölçülmüştür.

Standartların hazırlanması: Stok askorbik asit çözeltisinden sırasıyla 100, 250, 500, 750, 900 µL alınarak 10 mL'lik balon jodede sodyum okzalata çizgisine kadar tamamlandı.

Kalibrasyon eğrisinin çizilmesi: Standartlar 243 nm'de sodyum okzalata çözeltisine karşı okutuldu, veriler kaydedildi.

Örneklerin okutulması: Plazma işlemine tabi tutulan örnekler 243 nm' de sodyum okzalata çözeltisine karşı okutuldu, veriler kaydedildi.

3.2.1.4. Tokoferol Analizleri

3.2.1.4.1. Tokoferol Çözeltilerinin Hazırlanması

İki farklı konsantrasyonda tokoferol çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 250 mg ve 50 mg tokoferol 25 mL' lik balon jodede hekzanla çizgisine kadar tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin konsantrasyonu 10 mg/mL ve 2 mg/mL' dir.

3.2.1.4.2. Tokoferol Çözeltilerine Plazma İşleminin Uygulanması

10 mg/mL' lik çözeltiden 90 µL, 2 mg/mL' lik çözeltiden ise 100 µL alınıp erlene aktarılmıştır, hekzan uçurulduktan sonra plazma işlemine tabi tutulmuştur. Örnekler aşağıdaki parametreler uygulanmıştır.

- ❖ Frekans: 16 kHz, 25kHz
- ❖ Süre: 2 sn, 4 sn, 6 sn, 8sn
- ❖ Gaz akış hızı: 500 L/sa, 750 L/sa, 1000 L/sa
- ❖ Gaz kompozisyonu: Kuru hava
- ❖ Referans voltaj: %100

Tokoferol çözeltileri plazma bileşenlerine karşı çok hassas olduğundan kolayca degrade olabilmektedir. Bu sebepten dolayı en düşük(16 kHz) ve en yüksek (25 kHz) frekans değerlerinde etkileri gözlemlenmeye çalışılmıştır.

3.2.1.4.3. Tokoferolün HPLC Yöntemi ile Analizi

Plazma işleminden sonra her iki konsantrasyon (10 mg/mL ve 2 mg/mL) için de erlenlere 10 mL hekzan eklenip erlenlerde kalan kısım geri kazanılmıştır. Daha sonra örnekler Agilent 1100 HPLC cihazı vasıtası ile analiz edilmiştir.

Tokoferol miktarının belirlenmesi için AOCS Ce 8-89 HPLC metodu uygulanmıştır [104]. Bu yöntemde Hypersil 100 (25 cmx4.6mm, 5µm) kolon ile Agilent 1100 HPLC cihazı ve floresans dedektör kullanılmıştır. Çalışma koşulları aşağıdaki gibidir:

- ❖ Kolon fırın sıcaklığı: 25 °C
- ❖ Kolon akış hızı: 1,3 mL/dakika
- ❖ Enjeksiyon hacmi: 20 µL.
- ❖ Mobil faz: hekzan: izopropanol (% 95.5:0.5) karışımı
- ❖ Floresans dedektör: Ex:290 nm Em:330 nm .

Ayrıca askorbik asidin degradasyonunu tespit etmek amacıyla örneklerin farklı dalga boylarında gösterdikleri absorbanlar spektrofotometrede incelenmiştir.

3.2.1.5. Polifenol Oksidaz Enzimi Analizleri

3.2.1.5.1. Polifenoloksidaz Enziminin Ekstraksiyonu

Enzim ekstraksiyonunda Mogol ve ark. larının [105] uyguladığı yöntem kullanılmıştır.

Fosfat tamponunun hazırlanması: 15,60 gr $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ distile suda çözündürülerek, NaOH çözeltisiyle pH 6,5' a ayarlanmıştır.

Enzim ekstraksiyonu: Elmalar soyulup çekirdekleri çıkartılmıştır. 100 gr elma tarılarak üzerine fazla miktardaki esmerleşmeyi önlemek için 2 gr polivinil polipirolidon (PVPP) ve 160 mL tampon çözelti eklenerek homojenizatörde karıştırılmıştır. Daha sonra 4 katlı tül bentten süzölmüştür. Elde edilen süzöntü 10000 x g'de 4°C' de 25 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant alınarak -18°C'de saklanmıştır.

3.2.1.5.2. Polifenoloksidaz Enzimine Plazma İşleminin Uygulanması

4 mL enzim çözeltisi alınarak erlenlere aktarılmıştır. Örneklere aşağıdaki parametreler uygulanmıştır:

- ❖ Frekans: 25 kHz
- ❖ Süre: 2 sn, 4 sn, 6 sn, 8sn
- ❖ Gaz akış hızı: 1000 L/sa
- ❖ Gaz kompozisyonu: Kuru hava
- ❖ Referans voltaj: %100

Plazma sisteminde özellikle frekans arttığı zaman plazma gücünde artış meydana gelmektedir. Ayrıca sıcaklık ölçümleri ve askorbik asit verileri de dikkate alındığında 1000 L/sa parametresinin de en etkin parametre olduğu tespit edilmiştir. Plazma uygulamasının enzim aktivitesi üzerindeki etkinliğinin belirlenmesi dolayısıyla enzim kinetiklerinin çıkartılması amacıyla en etkin plazma parametrelerinde çalışılmasının kinetiklerin anlaşılmasında etkin olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte enzim protein yapıda olduğu için düşük frekansın ve düşük akış hızının bu yapıya etkisi olamayacağı düşünülmektedir.

3.2.1.5.3. Polifenoloksidaz Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi

Plazma işlemi uygulanmamış ve uygulanmış örneklerdeki enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Bu amaçla 5 farklı konsantrasyonda substrat çözeltisi hazırlanmıştır. Substrat olarak kateşol kullanılmış olup substrat konsantrasyonları, 20 mM, 50 mM, 100 mM, 250 mM ve 500 mM olacak şekilde hazırlanmıştır. Küvete 2,5 mL substrat çözeltisi ve 0,5 ml enzim ekstraktı koyulmuştur. 420 nm' de 10 saniyede bir absorbans ölçümü yapılarak zamana karşı absorbans grafiği çizilmiştir.

3.2.1.6. Model Gıda Üzerinde Plazma İşleminin Etkinliğinin Belirlenmesi

3.2.1.6.1. Plazma İşlemi Öncesi Ön Hazırlık Aşamaları

Model gıda olarak kuşburnu meyvesi kullanılmıştır. Meyveler ayıklanıp temizlendikten sonra petri kaplarına 20 şer gr tartılmıştır.

3.2.1.6.2. Model Gıda Örneklerine Plazma İşleminin Uygulanması

Petri kaplarındaki kuşburnu meyvesi örneklerine aşağıdaki plazma parametreleri uygulanmıştır:

- ❖ Frekans: 25kHz
- ❖ Süre: 2 sn, 4 sn, 6 sn, 8sn
- ❖ Gaz akış hızı: 1000 L/sa
- ❖ Gaz kompozisyonu: Kuru hava
- ❖ Referans voltaj: %100

Model gıdalar üzerinde yapılan deneylerde de frekans ve gaz akış hızı verileri sabit tutularak uygulama süresinde değişimle meydana gelebilecek etkiler incelenmiştir.

3.2.1.6.3. Askorbik Asit Analizi

Petri kaplarındaki örneklerin üzerine ağırlığı kadar %2' lik okzalik asit çözeltisi eklenerek homojenizatörde karıştırılmıştır. Oluşan ezmeden 25 mL'lik balon jöjeye ~5 gr tartılarak %2' lik okzalik asit çözeltisiyle çizgisine kadar tamamlanmıştır. 5 dakika ultrasonik su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra kaba süzgeç kağıdından süzölmüştür. Filtrat analize alınmıştır.

C vitamini analizi için gerekli çözeltiler:

%2' lik okzalik asit çözeltisi: 20 gr okzalik asit 1 L distile suda çözüldürölmüştür.

pH 4 Asetat tamponu: 15 gr susuz sodyum asetat, 35 mL distile suda çözüldürölmüştür üzerine 50 mL glasiyal asetik asit eklenmiştir. pH 4' e ayarlanmıştır.

Boya çözeltisi: 0,0125 gr diklorofenol indofenol 12,5 mL sıcak distile suda çözüldürörlüp, üzerine 0,0105 gr sodyum bikarbonat eklenmiştir. Distile su ile 50

mL' ye tamamlanmıştır. Bu stok boyadan 38,46 mL alınarak 100 mL' ye distile su ile seyreltilmiştir.

Stok askorbik asit çözeltisi: 0,1 gr askorbik asit 100 mL' ye distile su ile tamamlanmıştır. Bu çözelti iki defa %2' lik okzalik asitle 1/10 oranında seyreltilmiştir.

Standart askorbik asit çözeltileri stok askorbik asit çözeltisinden sırasıyla 0,5, 1, 1,5, 2 mL alınıp %2' lik okzalik asit çözeltisiyle 10 mL' ye seyreltilmesiyle hazırlanmıştır.

Kör deneme için deney tüpüne sırasıyla 2 mL okzalik asit çözeltisi, üzerine 2 mL asetat tamponu ve 2 mL boya çözeltisi eklenmiştir. Spektrofotometrede 520 nm'de okzalik asit çözeltisine karşı okuma yapılmıştır. Veriler kaydedilmiştir.

Hazırlanan standart askorbik asit çözeltileri ve plazma işlemine tabi tutulan örneklerden elde edilen filtrattan deney tüpüne 2 mL alınıp, üzerine 2 mL asetat tamponu ve 2 mL boya çözeltisi eklenmiştir. Spektrofotometrede 520 nm'de okzalik asit çözeltisine karşı okuma yapılmıştır. Veriler kaydedilmiştir.

3.2.2. DBD Plazma Sistemi İle Gerçekleştirilen Deneyler

3.2.2.1. Sistem Parametrelerinin Optimizasyonu

Süre parametreleri halihazırda yapılan çalışmalara göre belirlenmiştir. Literatüre bakıldığında uygulama süresinin genellikle 60 saniyeyi geçmediği görülmüştür.

Çizelge 3' teki veriler Lublin Teknoloji Üniversitesi'nde, Prof. Stryczewska'nın çalışma grubundan alınmış olup boşalımdan 5 cm uzaklıkta ölçülen sıcaklık değerleridir. Deneylerde kullanılan akış hızları bu verilere göre belirlenmiştir. En düşük 3 sıcaklık değerine karşılık gelen akış hızları seçilmiştir.

Çizelge 3 Probtan 5 cm uzaklıkta farklı gaz akış hızlarında ölçülen sıcaklıklar

Gaz Akış Hızı (L/dak)	0,028	0,042	0,056	0,070	0,084	0,098	0,112	0,126	0,140	0,154	0,168
Sıcaklık (°C)	80,0	76,0	54,0	45,0	40,5	37,6	36,0	34,0	32,5	31,0	30,2

Deneylerde He gazı ve farklı oranlarda He-O₂ gazı karışımı kullanılmıştır. Ayrıca plazma probu ile örnek yüzeyi arasındaki mesafe değiştirilerek farklı uzaklık parametreleri denenmiştir.

3.2.2.2. Sıcaklık Ölçümleri

Tüm deneyler oda sıcaklığında yürütülmüş olup plazma uygulamasından önce ve sonra örneklerin sıcaklığı ölçülmüştür.

3.2.2.3. Askorbik Asit Analizleri

3.2.2.3.1. Askorbik Asit Çözeltisinin Hazırlanması

Askorbik asit analizi için Selimovic ve ark.' larının [103] uyguladığı yöntem kullanılmıştır.

Tampon çözelti (pH = 5.4): 4.08 g potasyum dihidrojenfosfat (KH₂PO₄) (Merck) ve 0.16 g disodyum hidrojen fosfatın 1000 ml saf suda çözündürülmesiyle hazırlanmıştır.

Sodyum okzalat çözeltisi (0.0056 mol/dm³): 0.75 g sodyum okzalatın (Merck) 1000 ml tampon çözeltisinde çözündürülmesiyle hazırlanmıştır.

Stok L-askorbik asit çözeltisi (1.13x10⁻³ mol/dm³): 0.05 g L-askorbik asidin (Merck) 250 ml sodyum okzalat çözeltisinde çözündürülmesiyle hazırlanmıştır.

Çalışma çözeltisi: 37,5 mL stok askorbik asit çözeltisi 500 mL'lik balon jöjeye aktararak 0.0056 mol/dm³ sodyum okzalat çözeltisiyle çizgisine kadar seyreltilmiştir. Her parametre için bu çözelti kullanılmıştır.

3.2.2.3.2. Askorbik Asit Çözeltilerine DBD Plazma İşleminin Uygulanması

Hazırlanan çalışma çözeltisinden 5 mL alınarak behere aktarılmıştır. Aşağıdaki plazma parametreleri uygulanmıştır:

- ❖ Süre: 4, 8, 12, 16, 20, 60 sn
- ❖ Gaz kompozisyonu: He ve He-O₂ karışımı
- ❖ Helyumun akış hızı: 0,112, 0,140, 0,168 L/dak

- ❖ Karışımdaki oksijenin akış hızı: 0,063, 0,100, 0,141 L/dak
- ❖ Boşalımla örnek arasındaki uzaklık: 2, 3, 5, cm

Çalışma gazı olarak Polonya' daki araştırma gurubunun daha önce kullanmış olduğu iki gaz (He, O₂) kullanılmıştır.

3.2.2.3.3. Askorbik Asidin Spektrofotometrik Yöntemle Analizi

Standartların hazırlanması: Stok askorbik asit çözeltisinden sırasıyla 100, 250, 500, 750, 900 µL alınarak 10 mL'lik balon jodede sodyum okzalatla çizgisine kadar tamamlandı.

Kalibrasyon eğrisinin çizilmesi: Standartlar 243 nm'de sodyum okzalat çözeltisine karşı okutuldu, veriler kaydedildi.

Örneklerin okutulması: Plazma işlemine tabi tutulan örnekler 243 nm' de sodyum okzalat çözeltisine karşı okutuldu, veriler kaydedildi.

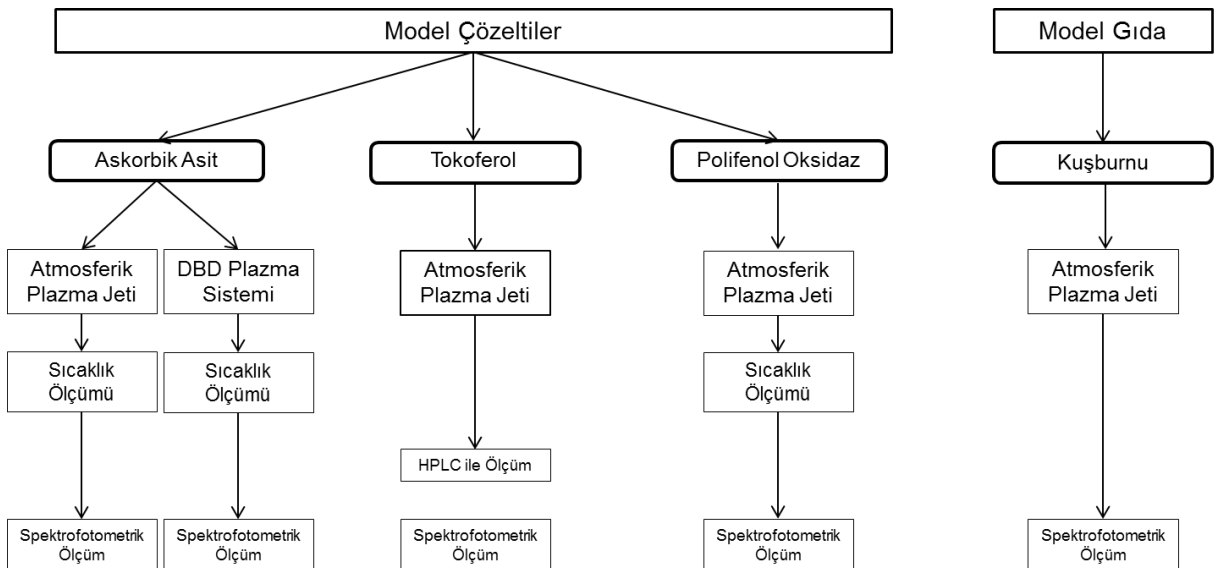
Spektrofotometrik ölçümler Lublin Teknoloji Üniversitesi, Çevre Mühendisliği Bölümü' nde Prof. Jacek Czerwiński' nin laboratuvarında yapılmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmanın temel amacı belirlenen gıda bileşenlerine ve örneklerine plazma işlemini uygulayarak plazmanın biyoaktif bileşenler üzerine etkisini incelemektir. Bu amaçla çalışmanın ilk aşamasında gıda bileşenleri olan L-askorbik asit, α - tokoferol ve polifenol oksidaza, sonrasında ise model gıda olarak seçilen kuşburnuna plazma işlemi uygulanmıştır. Plazma işlemi atmosferik plazma jeti ve DBD plazma sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada temel olarak atmosferik plazma jetinde hava, DBD plazma sisteminde ise He ve He-O₂ karışımı kullanılarak plazma uygulamasının etkisi incelenmiştir. Atmosferik plazma sisteminde farklı frekans, gaz akış hızı ve uygulama süresi parametreleri, DBD plazma sisteminde ise farklı gaz akış hızı, uzaklık ve süre parametreleri denenmiştir.

Öncelikle, ön çalışmalar kapsamında, gıda bileşenlerinin belirli konsantrasyonlarda çalışma çözeltileri hazırlanmıştır. Uygulanacak işlem parametreleri belirlenerek plazma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Sonraki aşamada ise, plazma işlemi uygulanmış örnekler analize alınarak plazmanın bu biyoaktif bileşenler üzerindeki etkileri belirlenmiştir.



Şekil 20 Tez kapsamında gerçekleştirilen deney akım şeması

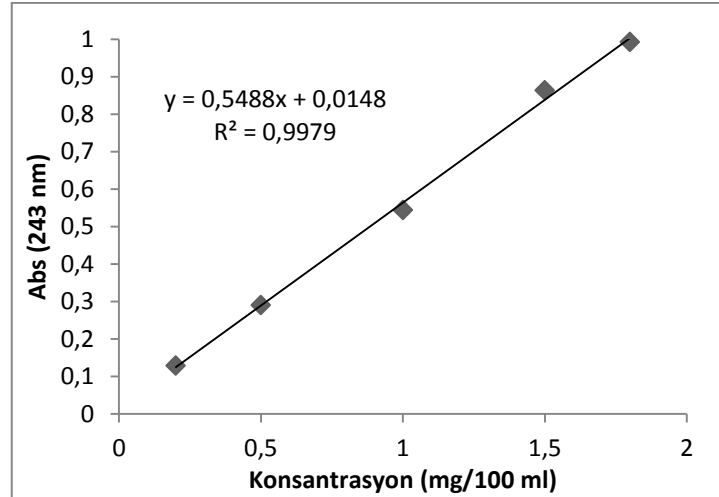
Tez kapsamında belirtilmiş olan deneylerin hepsi atmosferik plazma jeti ile gerçekleştirilmiş olup, DBD plazma sisteminin sadece askorbik asit çözeltileri üzerindeki etkileri incelenmiştir.

4.1. Plazma İşleminin Askorbik Asit Çözeltisi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Askorbik asit çözeltilerine atmosferik plazma jeti ve DBD plazma sistemi ile plazma işlemi uygulanmış; plazma işlemi öncesinde ve uygulanan her bir parametre sonrasında konsantrasyonlar hesaplanarak askorbik asit çözeltisindeki kayıp (%) belirlenmiştir. Ayrıca plazma işlemi öncesi ve sonrası sıcaklık ölçümleri yapılarak değişim miktarı tespit edilmiştir.

4.1.1. Atmosferik Plazma Jeti ile Uygulanan Plazma İşleminin Askorbik Asit Çözeltileri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Belirli konsantrasyonlarda hazırlanan askorbik asit standart çözeltilerinin spektrofotometrede 243 nm' de verdiği absorbanslar ölçülmüş, konsantrasyon değerlerine karşı absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.



Şekil 21 Askorbik asit analizi için kalibrasyon eğrisi

Plazma işlemi öncesinde stok çözeltiden hazırlanan çalışma çözeltisinin (1,5 mg/100 mL) absorbansı ölçülerek başlangıçtaki absorbans belirlenmiştir.

Erlenlere 5' er mL çalışma çözeltisi aktarılarak plazma işlemine geçilmiş, her bir parametre 3 tekrarlı olarak uygulanmıştır. Plazma işlemi uygulanmış örneklerin absorban değerleri ölçülmüştür ve konsantrasyonlar hesaplanarak % askorbik asit kaybı belirlenmiştir.

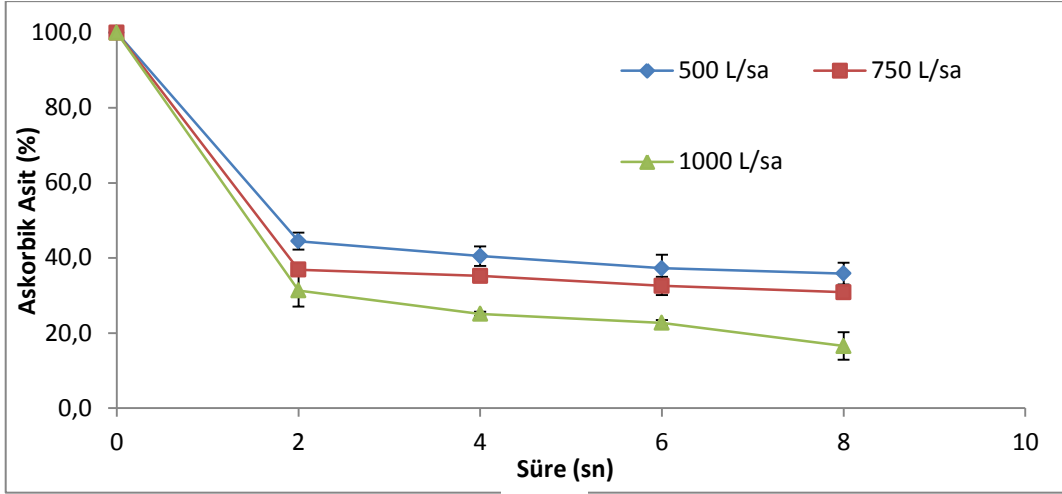
Çizelge 4 Plazma işlemi sonrası askorbik asit miktarındaki kayıp (%)

(N=3, RSD=relatif standart sapma)

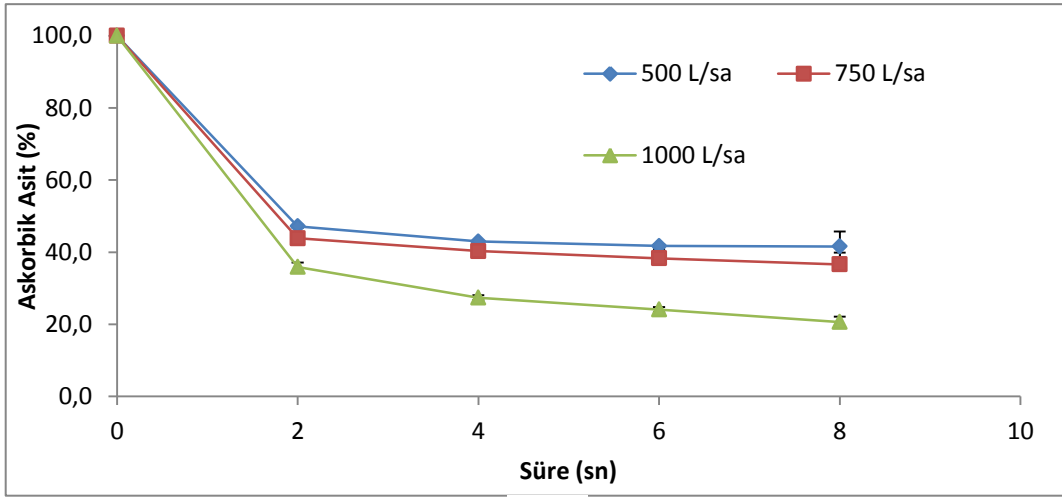
Frekans (kHz)	Süre (sn)	Gaz Akış Hızı (L/sa)	Askorbik Asit Kaybı (%)	RSD (%)	Frekans (kHz)	Süre (sn)	Gaz Akış Hızı (L/sa)	Askorbik Asit Kaybı (%)	RSD (%)
25	8	500	64,2 ± 2,9	4,5	25	4	500	59,5 ± 2,6	4,4
		750	69,2 ± 0,9	1,3			750	64,8 ± 0,7	1,1
		1000	83,5 ± 3,7	4,4			1000	74,9 ± 0,6	0,8
20	8	500	58,4 ± 4,1	7,1	20	4	500	57,1 ± 0,2	0,4
		750	63,4 ± 3,3	5,2			750	59,7 ± 0,6	0,9
		1000	79,4 ± 1,5	1,9			1000	72,6 ± 0,7	1,0
16	8	500	53,8 ± 0,5	1,0	16	4	500	53,3 ± 1,7	3,2
		750	61,1 ± 0,5	0,9			750	56,7 ± 0,5	0,9
		1000	77,7 ± 1,2	1,5			1000	66,4 ± 0,2	0,4
25	6	500	62,7 ± 3,6	5,7	25	2	500	55,5 ± 2,3	4,1
		750	67,4 ± 2,5	3,6			750	63,1 ± 1,3	2,1
		1000	77,3 ± 0,7	1,0			1000	68,7 ± 4,3	6,2
20	6	500	58,3 ± 0,5	0,9	20	2	500	52,8 ± 0,4	0,8
		750	61,7 ± 2,3	3,7			750	56,2 ± 1,1	1,9
		1000	75,9 ± 0,7	0,9			1000	64,1 ± 1,3	2,0
16	6	500	53,5 ± 0,3	0,5	16	2	500	52,3 ± 1,1	2,2
		750	60,9 ± 0,4	0,7			750	55,8 ± 0,4	0,8
		1000	72,8 ± 1,1	1,6			1000	62,6 ± 0,0	0,1

Çizelge 5 Atmosferik plazma uygulaması sonrası birinci dereceden inaktivasyon modeli için kinetik sabitler (k) ve D değerleri

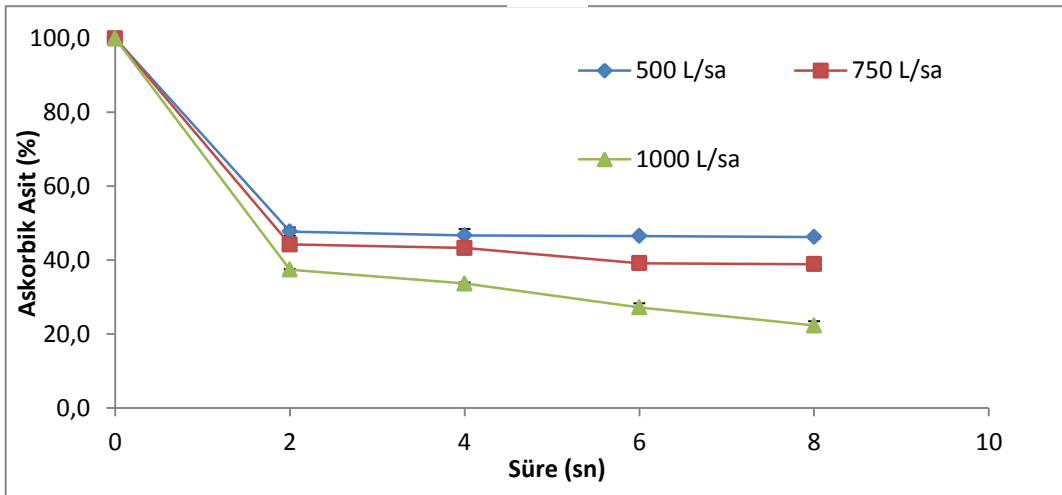
Frekans (kHz)	Gaz Akış Hızı (L/sa)	k ($\times 10^{-2} \text{ sn}^{-1}$)	D (sn)
25 kHz	500	0,11	2066,1
	750	0,12	1858,7
	1000	0,20	1175,1
20 kHz	500	0,09	2451,0
	750	0,11	2145,9
	1000	0,18	1295,3
16 kHz	500	0,08	2932,6
	750	0,10	2288,3
	1000	0,17	1385,0



(a)

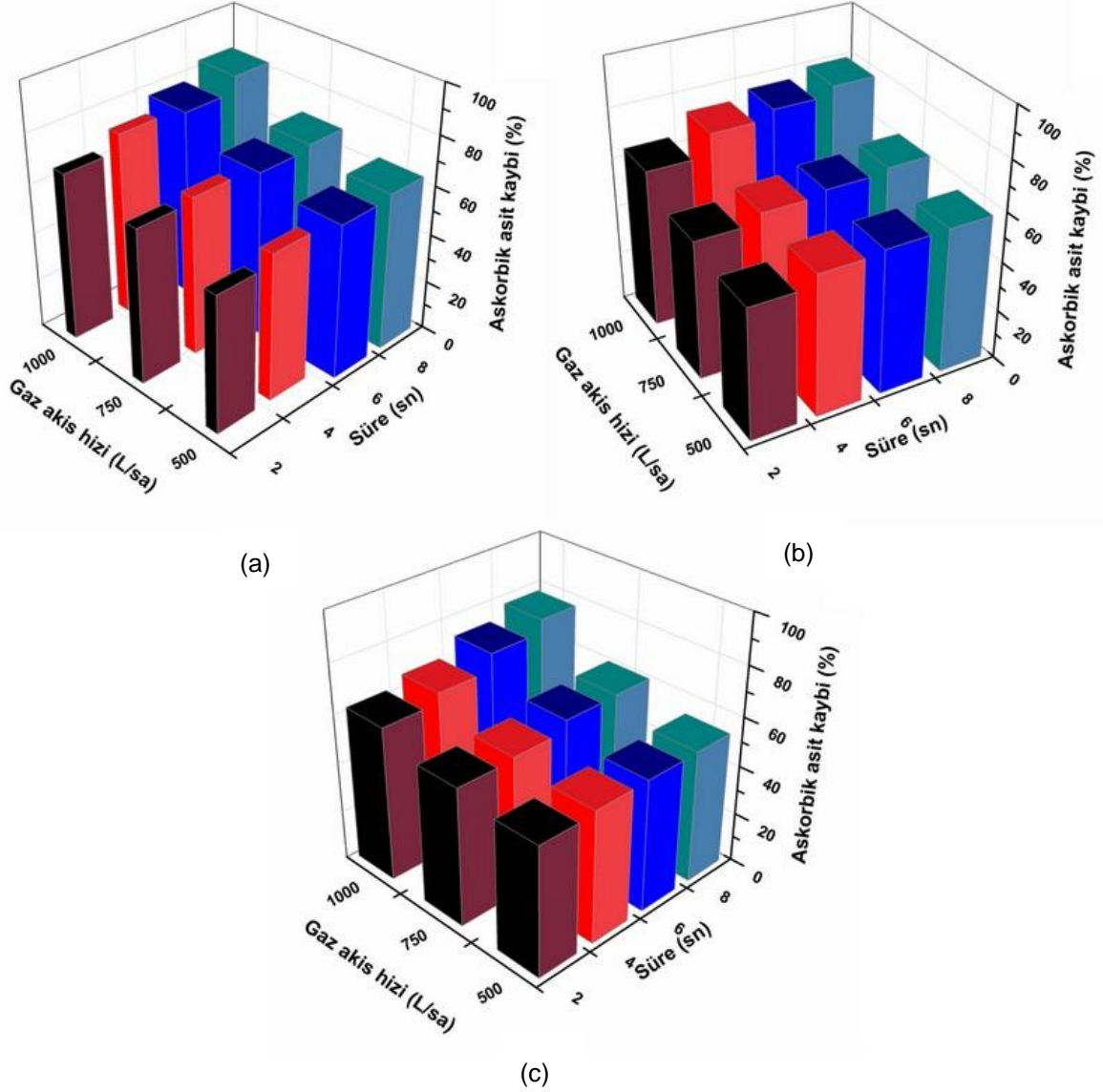


(b)



(c)

Şekil 22 Plazma uygulaması sonrası askorbik asit miktarındaki değişim, (a)25 kHz,(b)20 kHz,(c)16 kHz



Şekil 23 Farklı plazma parametrelerinde askorbik asit üzerine etkisi (a)25 kHz,(b)20 kHz,(c)16 kHz

Grafikler incelendiğinde askorbik asit kaybı en fazla 25 kHz, 1000 L/sa akış hızında ve 8 sn'lik uygulama sonucunda %83,5 olarak belirlenmiştir.

Tez kapsamında çalışılan Plasmamatreat AS 400 cihazında artan frekans değerleri ile birlikte plazma voltajı ve akım artmakta olup bu değerler plazma gücünü vermektedir. Dolayısıyla bu da plazma probunun ucundan çıkacak olan havaya iyonlaşması için gerekenden daha fazla güç verildiği anlamına gelmektedir(plazma stabil halde sürekli oluşmaktadır). 25 kHz plazmada çalışılabilecek en yüksek

frekans değeri olduğu için buradan elde edilen indirgenme diğer parametrelere göre daha fazla olmaktadır.

Akış hızı da plazma oluşumunu etkileyen bir diğer parametredir. Güç verilen ve topraklanan elektrot arasından geçen gaz tam olarak iyonlaşabildiğinde etkin ve stabil plazma oluşabilmektedir. Ayrıca beslenen gaz miktarı gerekenden az olduğunda stabil plazma fazı oluşmamaktadır. Cihazın gaz besleme üst limiti olan 5000 L/sa parametresi tez kapsamına alınmamış olup bu parametre ile çalışıldığında çalışılan çözelti üzerine çok fazla hava akışı olmakta ve çözelti içinde bulunduğu deney kabından dışarıya taşmaktadır. Gerçekleştirilen ön denemeler sonucunda maksimum 1000 L/sa akış hızının yeterli olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu akış hızı değerinde plazma probundan çıkan hava ile çözültide karışım sağlanabilmektedir. Böylece zayıf penetrasyon yeteneğine sahip plazmanın askorbik asit çözeltisi ile etkileşimi arttırılmaktadır.

Plazma uygulamasında en etkin parametrelerden birisi zamandır. Atmosferik plazma özellikle kısa uygulama süresinde daha etkin sonuçlar alınması bakımından düşük basınçlı plazmalara göre tercih edilmektedir. İşlem süresinin artması ile aktif plazma türleri ile çalışılan çözültülerin etkileşim süresi artmaktadır. Bu da degradasyonun artmasına sebebiyet vermektedir.

Askorbik asidin degradasyonu, hem plazmadaki aktif türler ve radikaller nedeniyle hem de UV ışını etkisiyle gerçekleşmektedir. UV ışını askorbik asitteki bağları etileyerek askorbik asidin parçalanmasına neden olmaktadır. Ayrıca askorbik asit antioksidan özellikte olduğu için radikallerle ve reaktif türlerle kolayca tepkimeye girme eğilimindedir. Bu durum plazmanın askorbik asit üzerindeki etki mekanizmasını açıklamaktadır.

Sıcaklık Ölçümleri:

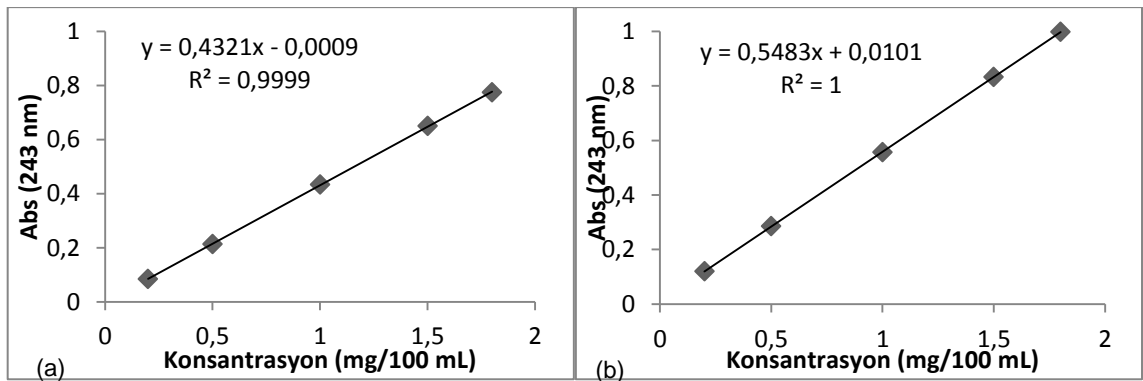
Askorbik asit çözültisinin plazma işlemi öncesi ve sonrası sıcaklık ölçümleri yapılmış, sıcaklıklarda görülen değişim Tablo 2'de verilmiştir. Deneylerde askorbik asit çözültisinin sıcaklığının 31,1 °C' yi geçmediği belirlenmiştir. En fazla sıcaklık artışı ise 25 kHz, 1000 L/sa akış hızında 8 sn'lik plazma uygulaması sonucu görülmüştür. Ayrıca en yüksek sıcaklık 31,1 °C'yi geçmediği için kullanılan yöntemin soğuk plazma yöntemi olduğu söylenebilir.

Çizelge 6 Plazma uygulaması sonrası sıcaklık değişimleri

Frekans (kHz)	Süre (sn)	Gaz Akış Hızı (L/sa)	ΔT (°C)	Frekans (kHz)	Süre (sn)	Gaz Akış Hızı (L/sa)	ΔT (°C)
25	8	500	4,8	25	4	500	1,0
		750	6,4			750	2,4
		1000	8,0			1000	3,4
20	8	500	3,3	20	4	500	1,5
		750	5,0			750	2,3
		1000	6,2			1000	3,9
16	8	500	2,3	16	4	500	1,3
		750	4,9			750	2,4
		1000	5,8			1000	2,5
25	6	500	2,8	25	2	500	1,3
		750	5,5			750	1,6
		1000	5,9			1000	2,1
20	6	500	1,5	20	2	500	0,9
		750	3,7			750	1,6
		1000	4,5			1000	1,5
16	6	500	1,1	16	2	500	0,6
		750	3,0			750	1,0
		1000	4,2			1000	1,2

4.1.2. DBD Plazma Sistemi ile Uygulanan Plazma İşleminin Askorbik Asit Çözeltileri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

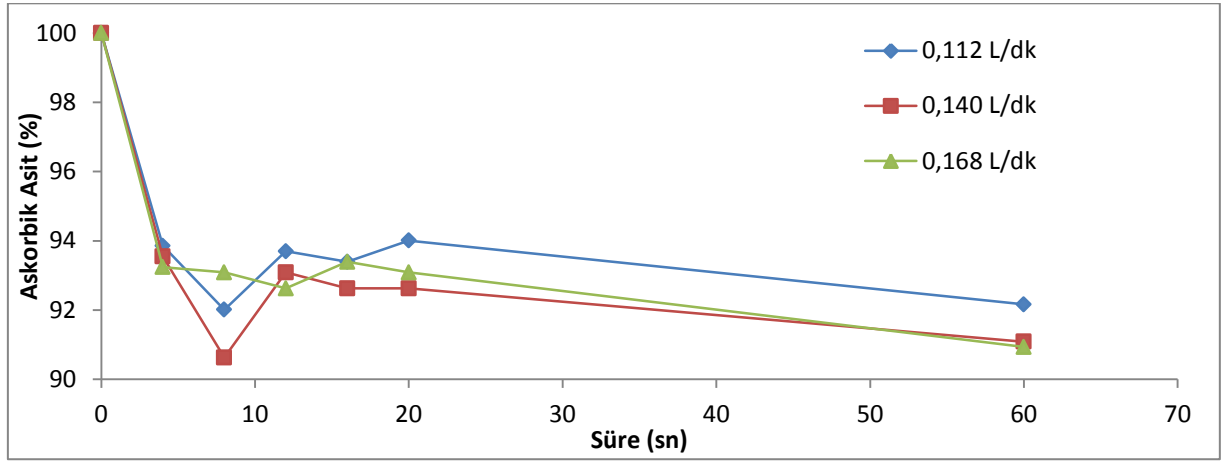
Belirli konsantrasyonlarda hazırlanan askorbik asit standart çözeltilerinin spektrofotometrede 243 nm' de verdiği absorbanslar ölçülmüş, konsantrasyon değerlerine karşı absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.



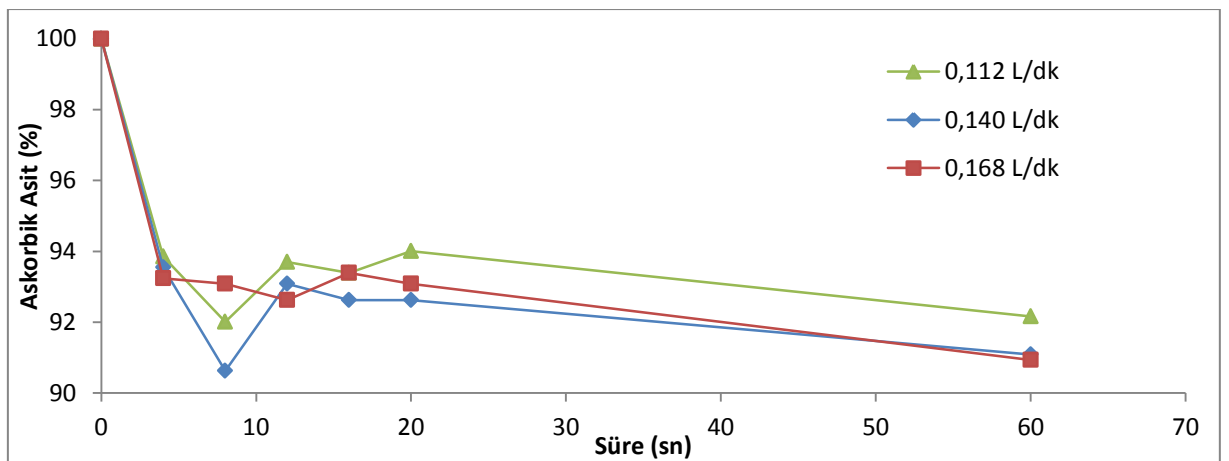
Şekil 24 He gazı ve He-O₂ gazı ile yapılan deneyler için askorbik asit kalibrasyon eğrisi (a) He, (b) He-O₂

Uygulanacak plazma parametreleri belirlendikten sonra plazma uygulamasına geçilmiştir. Gaz akış hızları bölüm 3.2.2.1’de belirtilmiş olan sıcaklık verilerine göre belirlenmiştir. Buna göre en düşük 3 sıcaklık değerine karşılık gelen akış hızı değerleri seçilmiştir. Uygulama süresi olarak ise literatürde genellikle kullanılan süreler seçilmiştir. Üç farklı uzaklık parametresi seçilerek plazmanın ile örnek arasındaki mesafenin plazmanın etkinliği üzerindeki etkisi incelenmiştir.

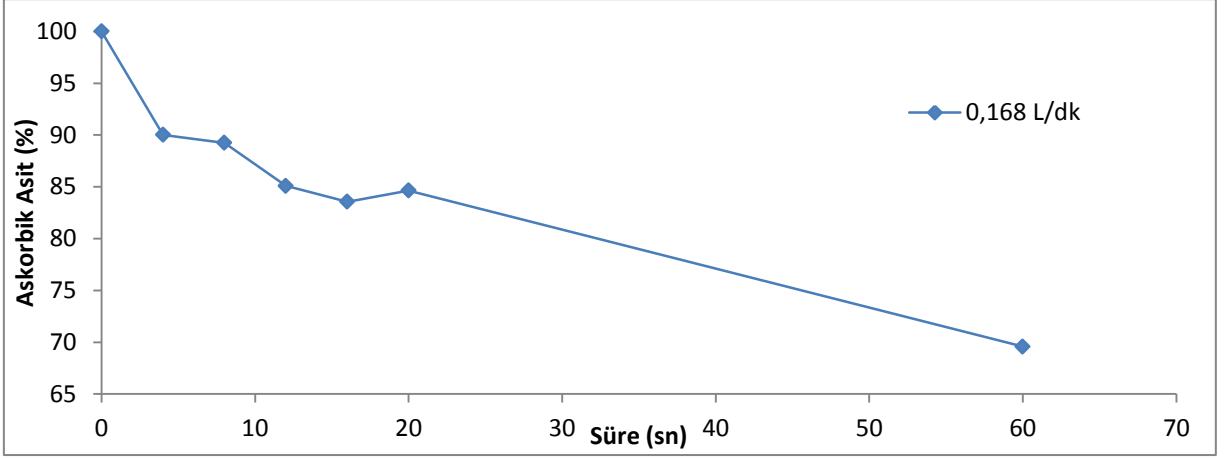
Plazma uygulamasından sonra örneklerin absorbanları ölçülüp konsantrasyonları hesaplanarak askorbik asit miktarındaki azalma belirlenmiştir. Sonuçlar farklı örnek-prob arası mesafe değerlerinde işlem süresine karşı grafiğe geçirilmiştir.



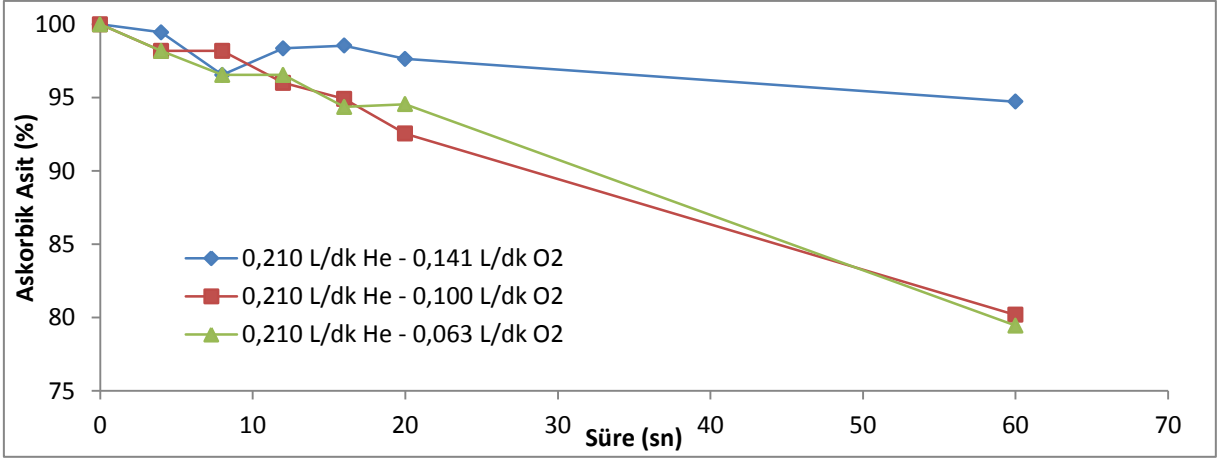
Şekil 25 He gazı kullanıldığında oluşan askorbik asit kaybı (plazma probu ile örnek arasındaki mesafe 5 cm)



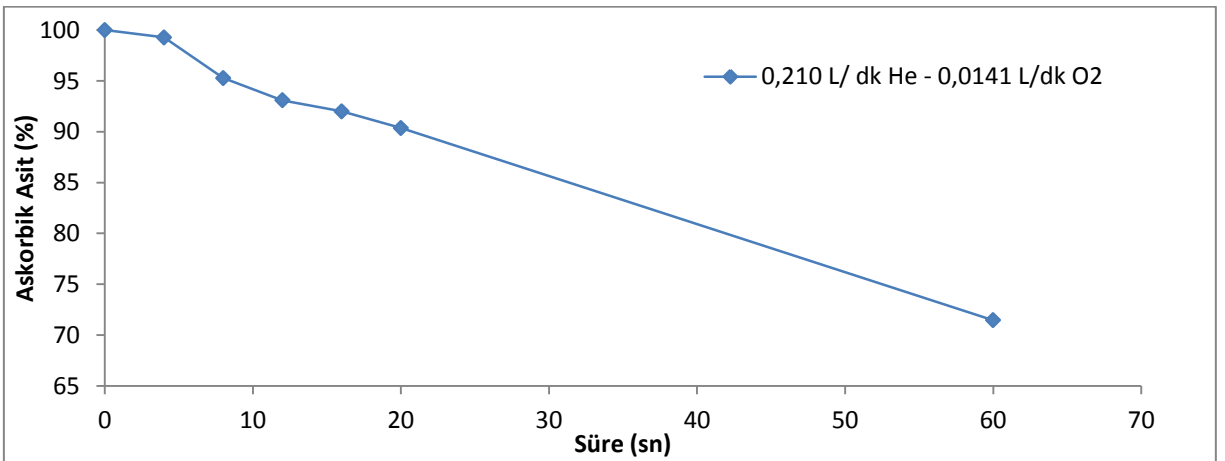
Şekil 26 He gazı kullanıldığında oluşan askorbik asit kaybı (plazma probu ile örnek arasındaki mesafe 3 cm)



Şekil 27 He gazı kullanıldığında oluşan askorbik asit kaybı (plazma probu ile örnek arasındaki mesafe 2 cm)



Şekil 28 He-O₂ gazı karışımı kullanıldığında oluşan askorbik asit kaybı (plazma probu ile örnek arasındaki mesafe 3 cm)



Şekil 29 He-O₂ gazı karışımı kullanıldığında oluşan askorbik asit kaybı (plazma probu ile örnek arasındaki mesafe 2 cm)

Deney sonuçları incelendiğinde He gazı tek başına kullanıldığında degradasyonun daha fazla olduğu buna karşın He-O₂ gazı ile yapılan deneylerde askorbik asit kaybının daha az olduğu görülmektedir. He gazı kullanılarak yapılan deneylerde maksimum askorbik asit kaybı % 28,6, He-O₂ gazı kullanıldığında ise %30,4'dir.

Grafiklere bakıldığında askorbik asit miktarında meydana gelen kaybın süre ve uzaklıkla orantılı olduğu görülmektedir. Buna göre, süre arttıkça ve proba örnek arası mesafe azaldıkça kayıp artmaktadır. Ayrıca en yüksek askorbik asit kaybı 60 sn'lik plazma işlemi uygulaması sonrası görülmektedir.

Askorbik asidin degradasyon mekanizması askorbik asidin plazmadaki aktif türlerle ve radikallerle etkileşimi ile açıklanabilir. Ayrıca plazma fazında oluşan UV ışınları da askorbik asidin bağlarını etkileyerek degradasyona sebep olmaktadır.

Deneyler sonucunda hesaplanan kinetik sabitler ve D-değerleri aşağıdaki gibidir.

Çizelge 7 DBD plazma uygulaması sonrası birinci dereceden inaktivasyon modeli için kinetik sabitler (k) ve D değerleri

Örnek-Prob Arası Mesafe (cm)	Akış Hızı	k ($\times 10^{-2} \text{ sn}^{-1}$)	D (sn)
3	0,112	0,003	76923,1
	0,140	0,003	76923,1
	0,168	0,003	83333,3
2	0,168	0,005	43478,3

Atmosferik plazma ve DBD plazma uygulaması sonrası k ve D-değerleri incelendiğinde atmosferik plazma uygulaması sonucunda daha yüksek D değerleri ve daha düşük k değerleri bulunmuştur. Bu durum atmosferik plazma uygulamasının askorbik asit degradasyonunda daha etkili olduğunu göstermektedir.

Sıcaklık Ölçümleri:

He gazı ve He-O₂ karışımı kullanılarak DBD plazma sistemi ile plazma uygulaması sonrası çözelti sıcaklığındaki artış Çizelge 8'de gösterilmektedir. Sonuçlar incelendiğinde DBD plazma sistemi ile plazma uygulamasının soğuk plazma uygulaması olduğu, sıcaklıkta önemli bir artışa sebep olmadığı görülmektedir.

Çizelge 8 He gazı kullanıldığında askorbik asit çözeltisi sıcaklığındaki değişim

Gaz Akış Hızı (L/dk)	Örnek-Prob Arası Mesafe (cm)	Süre (sn)	ΔT (°C)	Gaz Akış Hızı (L/dk)	Örnek-Prob Arası Mesafe (cm)	Süre (sn)	ΔT (°C)
0,112	5	4	1,7	0,112	3	4	0,9
		8	4,3			8	0,9
		12	4,1			12	1,9
		16	3,1			16	1,3
		20	3,1			20	1,6
		60	2,8			60	1,7
0,140	5	4	1,7	0,140	3	4	0,5
		8	1,4			8	0,8
		12	1,3			12	0,9
		16	1,4			16	0,7
		20	1,1			20	0,6
		60	1,1			60	1,1
0,168	5	4	0,8	0,168	3	4	1,2
		8	0,4			8	0,8
		12	0,9			12	1,2
		16	1,3			16	1,1
		20	1			20	1
		60	1			60	0,8
0,168	2	4	2,5	0,168	2	16	1,6
		8	2,2			20	0,9
		12	1,4			60	0,5

Çizelge 9 He-O₂ gaz karışımı kullanıldığında askorbik asit çözeltisi sıcaklığındaki değişim

Gaz Akış Hızı (L/dk)		Örnek-Prob Arası Mesafe (cm)	Süre (sn)	ΔT (°C)	Gaz Akış Hızı (L/dk)		Örnek-Prob Arası Mesafe (cm)	Süre (sn)	ΔT (°C)
He	O ₂				He	O ₂			
0,210	0,141	3	4	1,7	0,210	0,063	3	4	1,1
			8	0,8				8	0,9
			12	1,0				12	1,6
			16	0,5				16	0,9
			20	0,5				20	0,4
			60	-0,9				60	-0,9
0,210	0,100	3	4	1,3	0,210	0,141	2	4	1,1
			8	1,0				8	0,8
			12	0,8				12	0,2
			16	0,9				16	0,1
			20	0,8				20	-0,3
			60	-1,1				60	-1,7

Atmosferik plazma sisteminin ve DBD plazma sisteminin askorbik asit çözeltilerinde meydana getirdiği degradasyon etkisine bakıldığında DBD plazma sistemi çok daha avantajlı gözükmemektedir. Atmosferik plazma jet sistemi 8 saniyede %82 lik bir indirgenmeye sebebiyet verirken, DBD plazma sistemi ise 60 saniyelik bir uygulamada bile maksimum %30' luk bir indirgenmeye neden olmaktadır. Askorbik asit degradasyonunun meydana gelen farkların nedenlerini şöyle sıralayabiliriz:

Plazma uygulamalarında kullanılan gazın çeşidi plazma fazında oluşan reaktif türleri etkilediği için bu durum plazma uygulamasının etkinliğini de değiştirmektedir. Atmosferik plazma sisteminde kuru hava, DBD plazma sisteminde ise He ve He-O₂ kullanıldığı için oluşan reaktif türler de farklıdır. Askorbik asit moleküllerinin oluşan bu reaktif türler ile tepkimeye girme eğilimlerinin de farklı olması nedeniyle degradasyon derecesi plazma sistemlerine göre farklılık göstermiştir. Bunun yanı sıra gazların farklı olması, iyonlaşan gazların neden olduğu sıcaklık artışının da farklı olmasına neden olmaktadır.

DBD plazma sisteminde He-O₂ plazması oluşturabilmek için gerekli akış hızları belirlenmiştir. He ve O₂ için bu akış hızlarından düşük değerlerde plazma oluşmamaktadır. Plazma uygulaması sonrası sıcaklık değişimleri incelendiğinde He-O₂ gaz karışımı kullanıldığında sıcaklığın artmadığı aksine başlangıca göre

azaldığı görülmektedir. Bu durum plazma oluşturabilmek için gerekli akış hızlarında besleme yapıldığında, beslenen gaz miktarının tamamının iyonlaştırılmayıp plazma fazına geçirilememesi ve bunun sonucu olarak da iyonlaşmayan gazın soğutma etkisi yapması ile açıklanabilmektedir. Bu azalma genellikle 60 sn'lik plazma uygulaması sonucunda görülmektedir. İşlem süresinin artması yukarıda belirtilen etkinin artmasına neden olmakta bu nedenle sıcaklığın azalması en uzun süre parametresinde plazma uygulaması sonrası görülmüştür.

Bunun yanı sıra ısı işlemlerle karşılaştırıldığında DBD plazma vitamin miktarında önemli bir kayba neden olmamaktadır. Bu nedenle gıdalara uygulanabilmesi mümkündür.

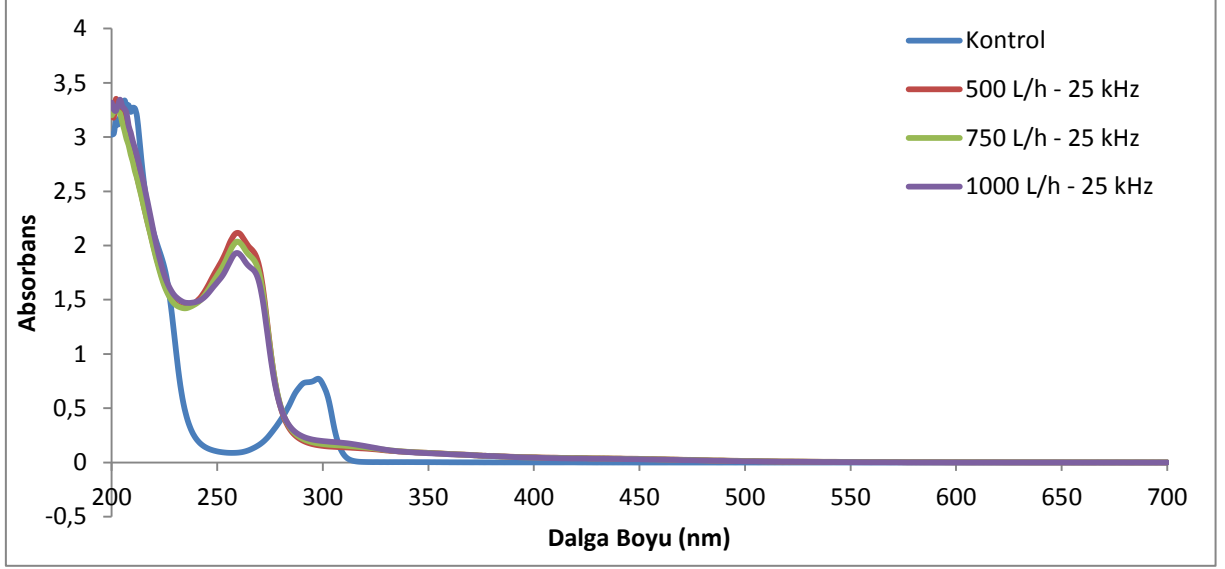
4.2. Plazma İşleminin Tokoferol Çözeltisi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Atmosferik plazma sistemi kullanılarak plazma uygulamasının α -tokoferol üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla iki farklı konsantrasyonda (10 mg/mL ve 2 mg/mL) hazırlanan tokoferol çözeltilerine farklı süre, frekans ve gaz akış hızı parametrelerinde plazma işlemi uygulanmıştır. Tokoferol çözeltileri hekzanda hazırlanmış olup plazma uygulaması öncesi yanıcı bir madde olan hekzan uçurulduktan sonra plazma uygulamasına geçilmiştir. 25 kHz, 20 kHz, ve 16 kHz frekans değerlerinde, 500 L/sa, 750 L/sa ve 1000 L/sa akış hızında, 2 sn, 4 sn, 6 sn ve 8 sn'lik plazma uygulaması gerçekleştirilmiştir. Deneyler 3 paralelli olarak yürütülmüştür.

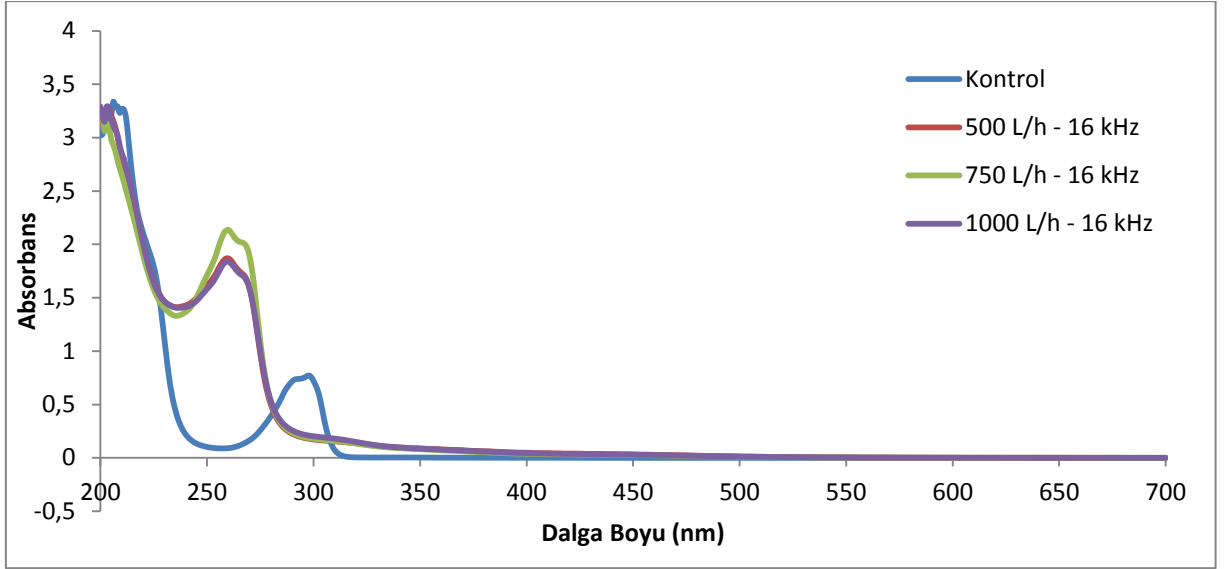
Plazma işlemi sonrası örnek kabına hekzan eklenerek kalan madde hekzanla çözüldürülerek geri alınmıştır. Konsantrasyonları belirlenmek üzere HPLC cihazına verilen örnekler beklenen dalga boyunda herhangi bir pik oluşturmamıştır. Bu nedenle tokoferolün başka bir bileşiğe dönüşme ihtimali düşünülerek spektrofotometrede 200-700 nm arası okuma yapılmıştır.

HPLC cihazında pik oluşturmadığı için plazma işlemi nedeniyle yüksek oranda parçalandığı düşünülen tokoferole uygulama süresi olarak en düşük süre (2sn) ve plazma frekansı olarak da en düşük ve en yüksek frekans (16 kHz, 25 kHz) parametreleri uygulanmıştır. Spektrofotometrede yapılan okuma sonucu elde edilen spektrumlar aşağıdaki gibidir. Kontrol grubu plazma işlemi uygulanmamış tokoferol çözeltisidir. Aynı şekilde hekzan uçurularak tekrar eklenerek örnek kabında

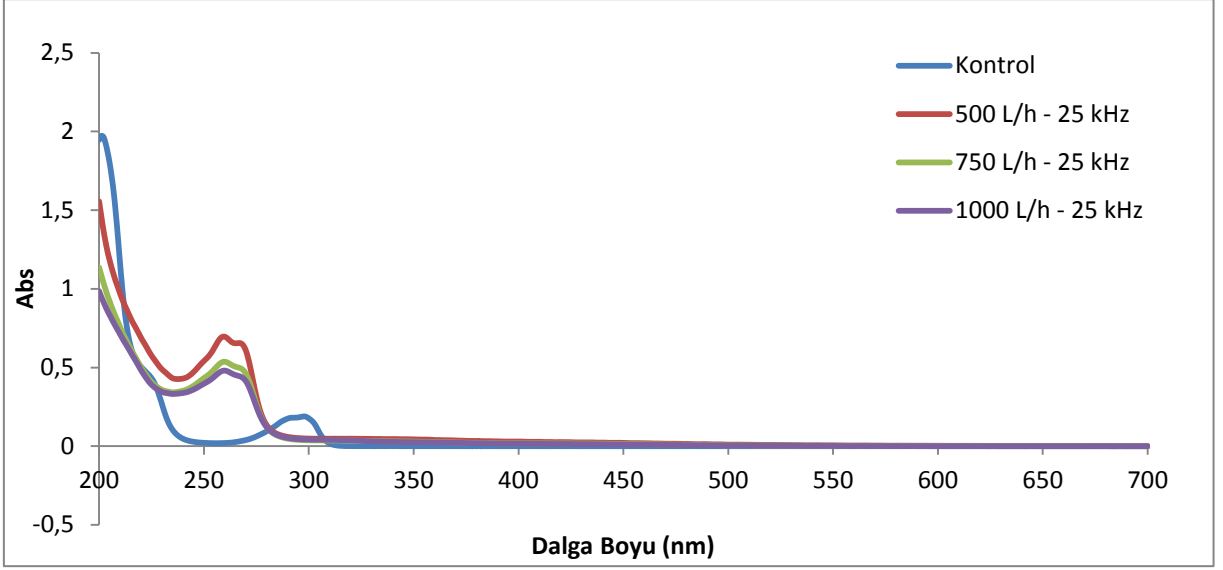
kalan tokoferolü geri alırken oluşabilecek hataların sonuçlardaki etkisi elimine edilerek sadece plazmanın etkisi incelenmiştir.



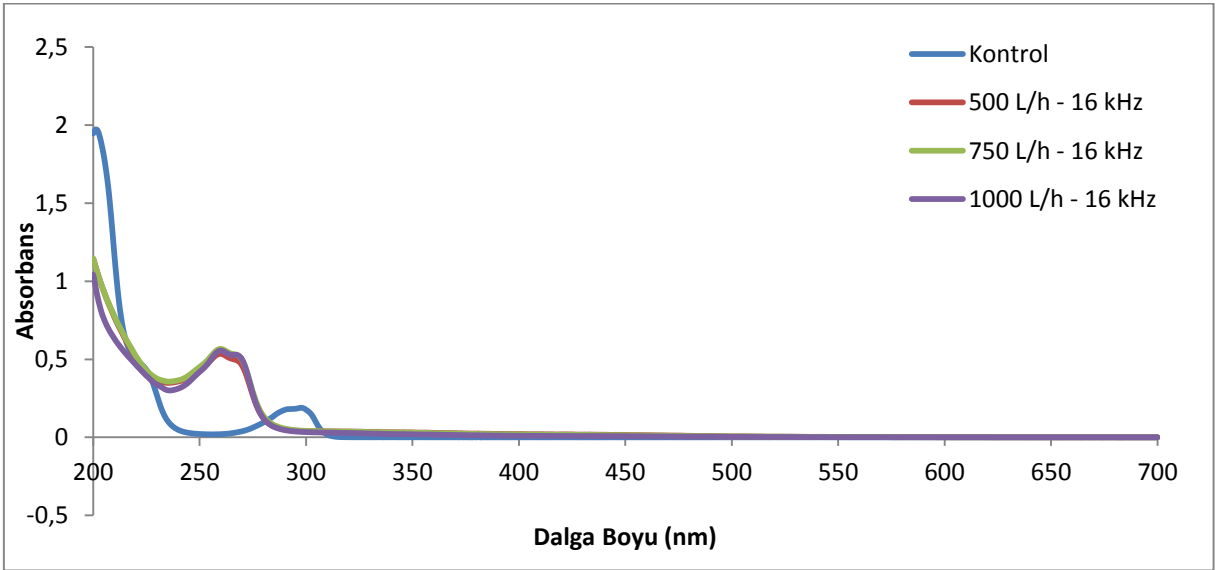
Şekil 30 Yüksek derişimdeki (10 mg/mL) tokoferol çözeltisinin 25 khz' de 2 sn'lik plazma uygulaması sonucu verdiği spektrum



Şekil 31 Yüksek derişimdeki (10 mg/mL) tokoferol çözeltisinin 16 khz' de 2 sn'lik plazma uygulaması sonucu verdiği spektrum



Şekil 32 Düşük derişimdeki (2 mg/mL) tokoferol çözeltisinin 25 kHz' de 2 sn'lik plazma uygulaması sonucu verdiği spektrum



Şekil 33 Düşük derişimdeki (2 mg/mL) tokoferol çözeltisinin 16 kHz' de 2 sn'lik plazma uygulaması sonucu verdiği spektrum

Spektrumlar incelendiğinde plazma uygulaması sonrasında oluşan piklerin kontrol grubunun verdiği pikle aynı dalga boyunda olmadığı görülmektedir. α -tokoferol 295 nm'de pik verirken uygulamadan sonra pikler 260 nm' ye kaymaktadır. Bu durum α -tokoferolün plazma uygulamasından sonra başka bir maddeye dönüşmesiyle açıklanabilir. Tokoferol oksidasyona uğrayarak ve peroksit radikalleriyle tepkimeye girerek tokoferilkinonları oluşturmaktadır. Bu tepkimeler

Bölüm 2.3.3.1' de detaylı olarak gösterilmektedir. Tokoferilkinonlar ise spektrofotometrik yöntemle yaklaşık 265 nm civarında ölçülebilmektedir [106]. Yapılan çalışmalara bakıldığında bu dönüşen maddenin α -tokoferilkinon olabileceği düşünülmektedir. [81,82].

4.3. Plazma İşleminin Polifenol Oksidaz Çözeltisi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Askorbik asit analizlerinde en etkin parametrelerin 25 kHz ve 1000 L/sa gaz akış hızı olduğu belirlenmiştir. Enzimler protein yapıda olup vitaminlere göre oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir. Bu nedenle işlem parametreleri belirlenirken en etkin parametreler seçilmiştir. Bu deneylerde 25 kHz ve 1000 L/sa akış hızında işlem süresinin polifenol oksidaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir.

Öncelikle ekstrakte edilen enzimin enzim kinetiğini incelemek ve K_m ve V_{max} değerini bulmak amacıyla 5 farklı substrat konsantrasyonu ile çalışılmış, 420 nm'de 10 saniyede bir ölçüm alınarak zamana karşı absorbans grafikleri çizilmiştir. K_m değeri, Lineweaver-Burk eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır.

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_{max} \cdot [S]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

$$y = ax + b$$

$$a \text{ eğim} = \frac{K_m}{V_{max}} \quad b = \frac{1}{V_{max}}$$

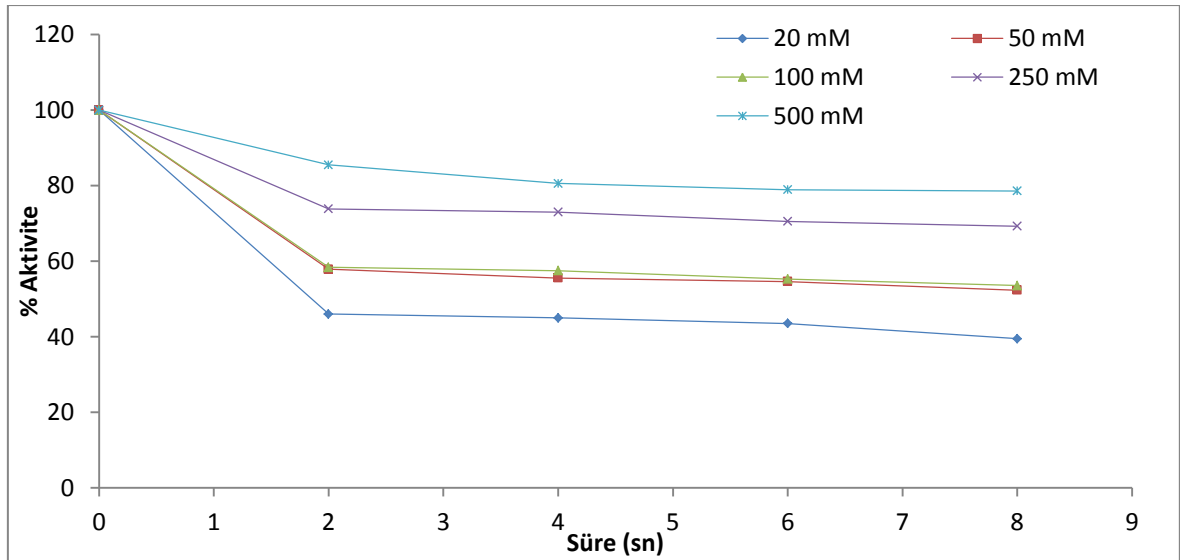
Buna göre her substrat konsantrasyonu için reaksiyon hızı belirlenip $1/[S]$ ' e karşı $1/V$ grafiği çizilmiştir. Eğrinin y-eksenini kestiği nokta $1/V_{max}$ değerini verirken x-eksenini kestiği nokta ise $-1/K_m$ değerini vermektedir.

Bu hesaplama göre ekstrakte edilen enzimin başlangıçtaki K_m değeri 5,77 mM, V_{max} değeri ise 0,273 mM.dak⁻¹ dir.

Daha sonra enzim ekstraktı farklı sürelerde plazma uygulamasına tabi tutulmuştur. Plazma uygulamasından sonra spektrofotometre küvetine 5 farklı konsantrasyonda hazırlanan substrat çözeltisinden 2,5 ml, plazma işelimi uygulanmış enzim örneğinden ise 0,5 ml alınarak 10 saniye aralıklarla zamana karşı absorbans ölçümü yapılmıştır. İlk 3 dakika boyunca absorbanstaki artış devam etmiş ve bu aralıktaki eğrinin eğimi hesaplanarak her bir substrat konsantrasyonu için reaksiyon hızı belirlenmiştir. Plazma uygulamasından sonraki enzim aktivitesi aşağıdaki eşitlikle hesaplanmıştır:

$$\text{Enzim Aktivitesi (\%)} = \frac{\text{Reaksiyon hızı (örnek)}}{\text{Reaksiyon hızı (kontrol)}} \times 100$$

Her substrat konsantrasyonu için kontrolün reaksiyon hızı belirlenmiş, plazma uygulandıktan sonra bulunan reaksiyon hızı kontrolün reaksiyon hızına oranlanarak kalan enzim aktivitesi hesaplanmıştır.



Şekil 34 Plazma uygulaması sonrası PPO aktivitesindeki değişim

Şekil 34'ten de görüleceği gibi enzim aktivitesindeki azalmanın uygulama süresine bağlı olarak arttığı ve 8 sn'lik işlem sonucunda %39,5'a inerek maksimum olduğu belirlenmiştir.

Plazma işlemi uygulanmış örnekler için de Lineweaver – Burk eşitliği kullanılarak K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. Buna göre sonuçların özeti Çizelge 10'da görülmektedir.

Çizelge 10 Plazma uygulaması ile örneklerin K_m ve V_{max} değerlerindeki değişim

Süre (sn)	K_m (mM)	V_{max} (mM.dk ⁻¹)
0	5,77	0,273
2	22,75	0,209
4	22,17	0,203
6	22,28	0,197
8	25,86	0,195

Uygulanan plazma işleminin işlem süresi ile doğru orantılı olarak V_{max} değerini azalttığı K_m değerini ise arttırdığı görülmektedir.

K_m enzimin substrata afinitesini ya da enzimin substrata bağanma gücünü gösteren bir terim olmakla birlikte, yüksek K_m değeri afinitede düşüş olduğunu ifade etmektedir. Çizelge 10'da da görüleceği üzere plazma uygulamasıyla K_m değerinde artış gözlenirken, V_{max} değerinin de azaldığı görülmektedir.

Dudak ve ark., [107] plazmanın glukoz oksidaz enzimi yapı ve aktivitesi üzerine bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda enzim aktivitesinin %50 oranında düştüğü ve enzimin protein yapısında değişiklikler meydana gelerek düşük moleküler ağırlıklı proteinlerin arttığı SDS-PAGE elektroforez yöntemi ile tespit edilmiştir.

Enzim deneylerinde ayrıca reaksiyon sabiti k ve D-değeri hesaplanmıştır.

Çizelge 11 Atmosferik plazma uygulaması sonrası birinci dereceden inaktivasyon modeli için kinetik sabitler (k) ve D değerleri

Frekans (kHz)	Gaz Akış Hızı (L/sa)	k ($\times 10^{-2}$ sn ⁻¹)	D (sn)
25	1000	0,0028	8196,7

Enzim aktivitesindeki bu azalmayı açıklamak için birçok etki mekanizması önerilebilir. Polifenol oksidaz protein yapıda bir enzim olduğu için serbest radikallerle tepkimeye girebilmektedir. Proteinlerin radikallere olan hassasiyeti içerdiği amino asitlere bağlıdır. Enzimin yapısında gerçekleşmesi muhtemel çapraz bağlanmaların enzimin aktivitesini değiştirdiği söylenebilir. Bunun yanısıra plazma fazında oluşan UV ışınlarının ve serbest radikaller ve reaktif türlerin enzimdeki bağlara etki ettiği, enzimin yapısını, konfigürasyonunu değiştirdiği, enzimde bir genişlemeye neden olabileceği ve bunların da enzimin substrata afinitesinde azalmaya neden olduğu söylenebilir. Bu etki mekanizmasının tam olarak açıklanabilmesi için daha detaylı çalışmalar yürütülecektir.

Sıcaklık Ölçümleri:

Plazma uygulanmadan önce sıcaklığı ölçülen örneklerin plazma uygulandıktan sonra da sıcaklığı ölçülerek veriler kaydedilmiştir. Sıcaklıkta meydana gelen değişim Çizelge 12'deki gibidir.

Çizelge 12 Plazma uygulaması sonrası enzim çözeltisi sıcaklığındaki değişim

Frekans (kHz)	Süre (sn)	Gaz Akış Hızı (L/sa)	ΔT (°C)
25	2	1000	0,3
25	4	1000	1,3
25	6	1000	2,6
25	8	1000	5,2

4.4. Plazma İşleminin Model Gıda Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

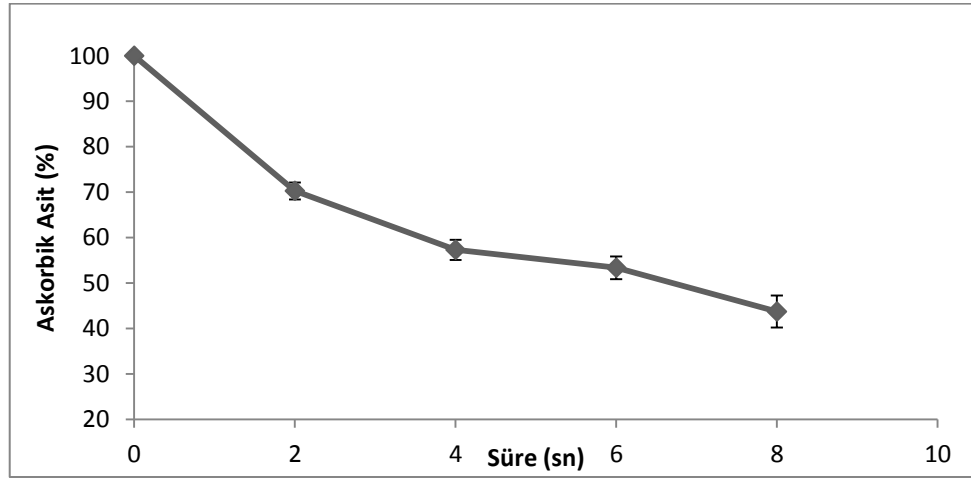
C vitamini açısından zengin olması nedeniyle model gıda olarak seçilen kuşburnu meyvesinin ilk olarak askorbik asit miktarı belirlenmiş daha sonra plazma işlemine geçilmiştir. Böylece model solüsyonda sebep olduğu C vitamini degradasyonu belirlenen plazma uygulamasının model gıdadaki sebep olacağı C vitamini degradasyonu incelenmiştir.

Gıda kompleks bir yapı olduğu için uygulanacak plazma işleminin model gıdadaki model çözeltilerde olduğu kadar fazla indirgenmeye sebep olamayacağı

düşünülmüştür. Bu nedenle frekans ve gaz akış hızı parametreleri sabit tutulup model çözeltilerde en fazla indirgenmeye sebep olan parametreler seçilerek uygulama süresinin askorbik asit miktarına etkisi incelenmiştir. Plazma uygulamasından sonra tekrar C vitamini ölçülerek kuşburnu meyvesinde askorbik asit kaybı hesaplanmış Çizelge 13'te farklı parametrelerin neden olduğu indirgenme gösterilmiştir. Deneylerde 3 paralelli çalışılmıştır.

Çizelge 13 Farklı sürelerde plazma uygulamasının askorbik asit miktarı üzerine etkisi

Frekans (kHz)	Süre (sn)	Gaz Akış Hızı (L/sa)	Askorbik Asit Kaybı (%)	RSD (%)
25	2	1000	29,7 ± 1,9	6,3
25	4	1000	42,7 ± 2,2	5,1
25	6	1000	46,6 ± 2,5	5,4
25	8	1000	56,3 ± 3,5	6,3



Şekil 35 Plazma uygulamasının model gıdadaki askorbik asit miktarı üzerine etkisi

Grafik incelendiğinde askorbik asitte meydana gelen kaybın en fazla 8 sn' lik plazma uygulaması sonucunda gerçekleştiği görülmektedir. Model gıdada gerçekleşen askorbik asit kaybı model çözeltilerdeki kayıptan daha azdır. Bunun başlıca sebebi aktif plazma türlerinin direkt olarak askorbik asitle muamele edilmemiş olması ve gıdada bulunan diğer bileşenlerin aktif plazma türlerinin etkilerini azaltmış olmasından kaynaklanmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Şen, Y., *Polimerik ve Metalik Malzemelerin Isıl Olmayan Plazma Yöntemiyle Farklı Gaz Kompozisyonları Kullanılarak Sterilizasyonunun İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2010**.
- [2] Şen, Y., Bağcı, U., Güleç, H.A., Mutlu, M., Modification of Food Contacting Surfaces By Plasma Polymerisation Technique: Reducing The Biofouling of Microorganisms on Stainless Steel Surface, *Journal of Food and Bioprocess Technology*, Vol. 5, Issue 1, pp 166-175, **2012**.
- [3] Şen, Y., Bağcı, U., Mutlu, M., *Sterilization of Food Contacting Polymer Surfaces via Non-Thermal Plasma Treatment by Using Different Precursor Gas Composition*, 6th International CIGR Technical Symposium - Section 6 "Towards a Sustainable Food Chain" Food Process, Bioprocessing and Food Quality Management, Nantes, France, **2011**.
- [4] Şen, Y., Layık, E., Alpsoy, P., Mutlu, M., *Plasma Processing of Powdered Food Materials: Decontamination Studies of Red Pepper*, 6th International Food Congress - Novel Approaches in Food Industry, Çeşme, Turkey, **2011**.
- [5] Şen, Y., Mutlu, M., Güleç, H.A., *Bio-decontamination of Nut Surfaces Using Non-thermal Plasma Technologies*, 3rd International Congress on Food and Nutrition, Antalya, Turkey, **2009**.
- [6] Şen, Y., Mutlu, M., Sterilization of Food Contacting Surfaces via Non-Thermal Plasma Treatment: A model study with *Escherichia coli* Contaminated Stainless Steel and Polyethylene Surfaces, *Journal of Food and Bioprocess Technology*, Vol.6, Issue 12, pp 3295-3304, **2013**.
- [7] Critzer, F.J., Kelly-Wintenberg, K., South, S., Roth, J.R., Golden, D.A., Atmospheric Plasma Inactivation of Foodborne Pathogens on Fresh Produce Surfaces, *J. Food Prot.*, 70, 2290-96, **2007**.
- [8] Montenegro, J., Ruan, R., Ma, H., Chen, P., Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 Using a Pulsed Non-thermal Plasma System, *Journal of Food Science*, 67(2), 646-48, **2002**.
- [9] Deng, S., Ruan, R., Mok, C.K., Huang, G., Lin, X., Chen, P., Inactivation of *Escherichia coli* on Almonds Using Nonthermal Plasma, *Journal of Food Science*, 72(2), M62-M66, **2007**.
- [10] Song, H.P., Kim, B., Choe, J.H., Jung, S., Moon, S.Y., Choe, W., Jo, C., Evaluation of Atmospheric Pressure Plasma to Improve The Safety of Sliced Cheese and Ham Inoculated by 3-Strain Cocktail *Listeria monocytogenes*, *Food Microbiology.*, 26, 432-6, **2009**.
- [11] Selçuk, M., Öksüz, L., Basaran, P., Decontamination of Grains and Legumes Infected with *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by Cold Plasma, *Bioresource Technology*, 99(11), 5104-09, **2008**.
- [12] Basaran, P., Basaran-Akgul, N., Oksuz, L., Elimination of *Aspergillus parasiticus* from Nut Surface with Low Pressure Cold Plasma (LPCP) Treatment, *Food Microbiology*, 25, 626–32, **2008**.

- [13] Jijie, R., Luca, C., Pohoata, V., Topala, I., , Effects of Atmospheric-Pressure Plasma Jet on Pepsin Structure and Function, *IEEE Transactions On Plasma Science*, Vol. 40, No. 11, **2012**.
- [14] Grzegorzewski, F., Ehlbeck, J., Schluter, O., Kroh, L. W. ve ark., Treating lamb's lettuce with a cold plasma – Influence of atmospheric pressure Ar plasma immanent species on the phenolic profile of *Valerianella locusta*. *LWT-Food Science Technology*, 44, 2285–2289, **2011**.
- [15] Grzegorzewski, F., Rohn, S., Kroh, L.W., Geyer, M. ve ark., Surface morphology and chemical composition of lamb's lettuce (*Valerianella locusta*) after exposure to a low-pressure oxygen plasma. *Food Chemistry*, 122, 1145–1152, **2010**.
- [16] Moisan, M., Moreau, S., Tabrizian, M., Pelletier, J., Barbeau, J., Yahia, L.H., *Canadian Pat. Application*, 2, 273, 432, **1999**.
- [17] Ross, A. I. V., Griffiths, M. W., Mittal, G. S. and Deeth, H. C.. Combining Nonthermal Technologies to Control Foodborne Microorganisms, *International Journal of Food Microbiology*, 89 : 125-138, **2003**
- [18] Alpas, H., Bozoğlu, F., Yüksek Hidrostatik Basınç (YHB) Değişken Parametrelerinin *Listeria innocua* hücrelerinin D ve Z Değerleri Üzerine Etkisi, *Gıda*. 25 (3) : 213-216, **2000**.
- [19] Trujillo, A.J., Capellas, M., Saldo, J., Gervilla, R. and Guamis, B.. Applications of high-hydrostatic pressure on milk and dairy products: a review. *Innovative Food Science Emerging Technology*, 3, 295-307, **2002**.
- [20] Dilek Özcan, Ersel Obuz, *Yüksek Basınç Uygulamasının Gıda Endustrisinde Kullanımı*, Türkiye 9. Gıda Kongresi; sf. 675-678, Bolu, **2006**.
- [21] İbanoğlu, E., Gıdalarda yüksek hidrostatik basınç uygulaması. *Gıda*, 27, 505-510, **2002**.
- [22] Karakaya, M., Caner, C., Sarıçoban, C., Et teknolojisinde yuksek hidrostatik basınç kullanımı, *Gıda*, 29, 465-470, **2004**.
- [23] Carneiro, L., Sa, I.S., Gomes, F.S., Virginia Martins Matta, V.M., Cabral, L.M.C., Cold sterilization and clarification of pineapple juice by tangential microfiltration, *Desalination* Vol.148, 1–3, 93–98, **2002**.
- [24] Bilek, S.E., Vurgulu Elektrik Alan (PEF) Teknolojisi , *Akademik Gıda*, 8 (3) 33-37, **2010**.
- [25] Elez-Martinez, P., Escola-Hernandez, J., Soliva-Fortuny, R.C., Martin-Belloso O., Inactivation of *Lactobacillus brevis* in orange juice by high-intensity pulsed electric fields. *Food Microbiology*, 22, 311-319, **2005**.
- [26] Anonim, Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies: pulsed electric fields. U.S. Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition. <http://www.fda.gov/Food/FoodScience/Research/SafePracticesforFoodProcesses/ucm101662.htm> (Aralık, **2013**).
- [27] Hacı Ali Güleç, *Modern Gıda Muhafazasında Vurgulu Elektrik Alan ve Ultrason Uygulamaları*, Türkiye 9. Gıda Kongresi, sf. 73-76, Bolu, **2006**.

- [28] Piyasena, P., Mohareb, E., McKellar, R.C., Inactivation of microbes using ultrasound: a review, *International Journal of Food Microbiology*, Vol.87, 3, 207–216, **2003**.
- [29] Laroussi, M., Mendis, D.A., Rosenberg, M., Plasma interaction with microbes, *New Journal of Physics* 5, 41.1–41.10, **2003**.
- [30] Fridovich, I., Biological effects of the superoxide radical, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 247 (1), 1-1, **1986**.
- [31] Holleman, A. F.; Wiberg, E., *Inorganic Chemistry*, Academic Press: San Diego, **2001**.
- [32] Akkuş, İ., *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*, Mimoza Yayınları, Konya, **1995**.
- [33] Denes, F.S., Manolache, S., Macromolecular plasma-chemistry: An emerging field of polymer science, *Progress in Polymer Science*, 29, 815-885, **2004**.
- [34] Lerouge, S., Fozza, A.C., Wertheimer, M.R., Marchand, R., Yahia, L.H., Sterilization by low-pressure plasma: the role of vacuum-ultraviolet radiation, *Plasmas and Polymers*, 5 (1), 31-46, **2000**.
- [35] Boucher, B. R. M. G., *Medical Device and Diagnostics*. Ind. 7, 51, **1985**.
- [36] Moreau, S., Moisan, M., Tabrizian, M., Barbeau, J., Pelletier, J., Ricard, A., Yahia, L.H., Using the flowing afterglow of a plasma to inactivate *Bacillus subtilis* spores: Influence of the operating conditions, *Journal of Applied Physics*, 88 (2), 1166-1174, **2000**.
- [37] Lerouge, S., Wertheimer, M. R., Yahia, L.H., Plasma Sterilization: A Review of Parameters, Mechanisms and Limitations, *Plasmas and Polymers*, 6 (3), 175-188, **2001**.
- [38] Hiratsuka, A., Karube, I., Plasma polymerized films for sensor devices, *Electroanal*, 12 (9), 695-702, **2000**.
- [39] Meidanshahi, F.S., Madanipour, K., Shokri, B., Investigation of first and second ionization on optical properties of atmospheric plasmas, *Optics Communications*, 285, 453-458, **2012**.
- [40] Shenton, M.J., Stevens, G.C., Wright, N.P., Duan, X., Chemical-surface modification of polymers using atmospheric pressure nonequilibrium plasmas and comparisons with vacuum plasmas., *Journal of Polym Science*, A1, 40, 95-109, **2002**.
- [41] Boucher, R.M., *Seeded gas plasma sterilization method*, US Patent 4207286, **1980**.
- [42] Khomich, A.V., Soloshenko, I.A., Tsiolko, V.V., Mikhno, I.L., *Gas Discharges and Their Applications*, Proc. 12th Int'l. Conference. Greifswald, 2740, **1997**.
- [43] Hury, S., Vidal, D.R., Desor, F., Pelletier, J., Lagarde, T., A parametric study of the destruction efficiency of *Bacillus* spores in low pressure oxygen-based plasmas, *Letters in Applied Microbiology*, 26 (6), 417-421, **1998**.

- [44] Wintenberg, K.K., Hodge, A., Montie, T.C., Deleanu, L., Sherman, D.M., Roth, J.R., Tsai, P., Wadsworth, L., Use of a one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP) to kill a broad spectrum of microorganisms, *Journal of Vacuum Science and Technology*, 17, 1539-1544, **1999**.
- [45] Chang, J.C.H., Ossoff, S.F., Lobe, D.C., UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms, *Applied and Environmental Microbiology*, 49 (6), 1361-1365, **1985**.
- [46] Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L., *Microbiology: An Introduction*, Fifth Edition, The Benjamin Cummings Publishing Co., New York, **1994**.
- [47] Morent, R., De Geyter, N., *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges, Inactivation of Bacteria by Non-Thermal Plasmas*, (ed. Fazel-Rezai, R.) 25-54, **2011**.
- [48] Laroussi, M., Nonthermal Decontamination of Biological Media by Atmospheric-Pressure Plasmas: Review, Analysis, and Prospects, *IEEE Transactions on Plasma Science*, 30 (4), 1409-1415, **2002**.
- [49] Kuzmichev, A.I., Soloshenko, I.A., Tsiolko, V.V., Kryzhanovsky, V.I., Bazhenov, V.Yu., Mikhno, I.L., Khomich, V.A., *Feature of sterilization by different type of atmospheric pressure discharges*, in Proc. Int. Symposium High Pressure Low Temperature Plasma Chemistry, sf. 402–406, Greifswald, Germany, **2001**.
- [50] Mendis, D.A., Rosenberg, M., Azam, F., A note on the possible electrostatic disruption of bacteria, *IEEE Transactions on Plasma Science*, 28, 1304–1306, **2000**.
- [51] Moisan, M., Barbeau, J., Crevier, M.C., Pelletier, J., Philip, N., Saoudi, B., Plasma sterilization. Methods and mechanisms, *Pure and Applied Chemistry*, 74 (3), 349-358, **2002**.
- [52] Montie, T.C., Kelly-Wintenberg, K., Roth, J.R., An overview of research using the one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP) for sterilization of surfaces and materials, *IEEE Transactions on Plasma Science*, 28, 41–50, **2000**.
- [53] Rauscher, H., Perucca, M., Buyle, G., Plasma Technology for Hyperfunctional Surfaces, ISBN: 978-3-527-32654-9.
- [54] Fridman, A., *Plasma Chemistry*, Cambridge University Press, United States of America, **2008**.
- [55] Becker, K.H., Kogelschatz, U., Schoenbach, K.H., Barker, R.J., *Generation of cold plasmas. In Non-equilibrium Air Plasma at Atmospheric Pressure*, (eds: Becker, K.H., Kogelschatz, U., Schoenbach, K.H., Barker, R.J.), Inst. Phys. Publications, Bristol, UK, 19–24, **2005**.
- [56] Niemira, B.A., Gutsol, A., *Nonthermal plasma as a novel food processing technology. Nonthermal Processing Technologies for Food*, (eds: Zhang, H.Q., Barbosa-C´anovas, G.V., Balasubramaniam, V.M., Dunne, P., Farkas, D., Yuan, J.), IA: Blackwell Publishing, Ames, 271–88, **2010**.
- [57] Niemira, B.A., Cold Plasma Decontamination of Foods, *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 125-142, **2012**.

- [58] Fridman, A., Chirokov, A., Gutsol, A., Non-thermal atmospheric pressure discharges, *Journal of Physics D: Applied Physics*, 38, 1-24, **2005**.
- [59] Nehra, V., Kumar, A., Dwivedi, H.K., Atmospheric non-thermal plasma sources, *International Journal of Engineering*, 2 (1), 53-68, **2008**.
- [60] Siemens, W., Poggendorfs Ann. *Phys. Chem.*, 12, 66–122, **1857**.
- [61] Menashi, W.P., *Treatment of surfaces*, U. S. Patent 3 383 163, **1968**.
- [62] Nijdam, S., Veldhuizen, E., Bruggeman, P., Ebert, U., *An Introduction to Nonequilibrium Plasmas at Atmospheric Pressure. Plasma Chemistry and Catalysis in Gases and Liquids*, (eds: Parvulescu, V.I., Magureanu, M., Lukes, P.), First Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, Germany, **2012**.
- [63] Morar, R., Suarasan, I., Budu, S., Ghizdavu, I., Porca, M., Dascalescu, L., Corona discharge effects on some parasitical insects of cultured plants, *Journal of Electrostatics*, 40-41, 669-673, **1997**.
- [64] Boudam, M.K., Moisan, M., Saoudi, B., Popovici, C., Gherardi, N., Massines, F., Bacterial spores inactivation by atmospheric-pressure plasmas in the presence or absence of UV photons as obtained with the same gas mixture, *Journal of Physics D: Applied Physics*, 39 (16), 3494-3507, **2006**.
- [65] Jeong, J.Y., Babayan, S.E., Tu, V.J., Park, J., Henins, I., Hicks, R.F., Selwyn, G.S., Etching materials with an atmospheric pressure plasmas jet, *Plasma Sources Science and Technology*, 7, 282-285, **1998**.
- [66] Park, J., Henins, I., Hermann, H.W., Selwyn, G.S., Gas breakdown in atmospheric radiofrequency capacitive plasma source, *Journal of Applied Physics*, 89, 15-19, **2001**.
- [67] Herrmann, H.W., Henins, I., Park, J., Selwyn, G.S., Decontamination of chemical and biological warfare (CBW) agents using an atmospheric pressure plasma jet, *Physics of Plasmas*, 6 (5), 2284–2289, **1999**.
- [68] Nelson, C.L., Berger, T.J., Inactivation of microorganisms by oxygen gas plasma, *Current Microbiology*, 18 (4), 275-276, **1989**.
- [69] Fraser, S.J., Gillette, R.B., Olsen, R.L., *Sterilizing process and apparatus utilizing gas plasma*, US Patent 3948601, **1976**.
- [70] Soloshenko, I.A., Khomich, V.A., Tsiolko, V.V., Mikhno, I.L., Shchedrin, A.I., Ryabtsev, A.V., *Experimental and theoretical investigation of cold sterilization of medical instruments by plasma DC glow discharge*, XIVth International Symposium on Plasma Chemistry, sf.2551-2556, Prague, Tchechoslovakia, **1999**.
- [71] Laroussi, M., Leipold, F., Evaluation of the roles of reactive species, heat and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure, *International Journal of Mass Spectrometry*, 233 (1-3), 81-86, **2004**.
- [72] Koulik, P., Begounov, S., Goloviatinskii, S., Atmospheric plasma sterilization and deodorization of dielectric surfaces, *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 19 (2), 311-326, **1999**.

- [73] Tietz, N.W., *Textbook of Clinical Chemistry*, 3rd Ed., Philadelphia, 959-984, **1986**.
- [74] Tannebaum, S.R., Young V.R., Archer M.C., *Vitamins and Minerals in Food Chemistry*, (ed: Fennema, O.R.), New York, 478-543, **1985**.
- [75] Anonim, Vitamin C, <http://tre.docdat.com/docs/835/index-55795.html> (Aralık, **2013**)
- [76] Dülger, Ö., *Renkli materyallerde askorbik asit (Vitamin C)'in spektrofotometrik yöntem ile tayini*, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, İstanbul, **2012**.
- [77] Cort, W.M., Antioxidant activity of tocopherols, ascorbyl palmitat and ascorbic acid and their modes of action, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 5, 321, **1974**.
- [78] Turan, B., *Kuşburnundan C vitamini izolasyonu ve çekirdek yağlarının incelenmesi*, Yüksek Lisan Tezi, İstanbul Teknik Üniveristesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, İstanbul, **1991**.
- [79] Keskin, H., *Besin Kimyası*, Güray Matbaacılık, İstanbul, 111; 168; 336-337, **1987**.
- [80] Yanishlieva, N.V. and Marinova, E.M.. Inhibited oxidation of lipids I: Complex estimation and comparison of the antioxidative properties of some natural and synthetic antioxidants, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 94: 374-379, **1992**.
- [81] Saldamlı, İ. *Gıda Kimyası*, Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği, Ankara, **1998**.
- [82] Liebler, D. C., Burr, J. A., Philips, L., Ham, A. J. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of vitamin E and its oxidation products. *Analytical Biochemistry*, 236,27-34, **1996**.
- [83] Yemenicioğlu, A., Özkan, M. ve Cemeroğlu, B., Inactivation Kinetics of Apple Polyphenoloxidase and Activation of its Latent Form. *Journal of Food Science*, Vol. 62, No. 3, 508-510, **1997**.
- [84] Heimdal, H., Larsen, M. L., & Poll, L. Characterization of polyphenol oxidase from photosynthetic and vascular lettuce tissues (*Lectuca sativa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42,1428–1433. **1994**.
- [85] Aydemir, T., Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus L.*) heads, *Food Chemistry*, 87, 9–67, **2004**.
- [86] Muchuweti, M., Mupure, C. H., Ndhlala, A. R., Kasiyamhuru, A., Characterization of Polyphenoloxidase from *Uapaca kirkiana* Fruit, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 328-332. **2006**.
- [87] Taş, C., *Domat Zeytini Polifenol Oksidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Gıda Mühendisliği A.B.D., Adana, **2009**.
- [88] Martinez, M.V., Whitaker, J.R., The Biochemistry and Control of Enzymatic Browning, *Trends in Food Science & Technology* June Vol. 6, 195-200, **1995**.

- [89] Casado-Vela, J., Selles, S. ve Bru, R., Purification and Kinetic Characterization of Polyphenol oxidase from Tomato Fruits. *Journal of Food Biochemistry*, 29:381-401, **2005**.
- [90] Queiroz, C., Mendes L., Maria L. , Fialho, Eliane, Valente-Mesquita, V.L., Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control', *Food Reviews International*, 24:4, 361 — 375, **2008**.
- [91] Sommer, A., Ne'eman, E., Steffens, J.C., Mayer, A.M., Harel, E., Import, targeting and processing of a plant polyphenol oxidase, *Plant Physiology*, 105, 1301–1311, **1994**.
- [92] van Gelder, C.W.G., Flurkey, W.H., Wichers, H.J., Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases, *Phytochemistry* 45, 1309–1323, **1997**.
- [93] Mayer, A.M., Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review, *Phytochemistry* 67, 2318–2331, **2006**.
- [94] Yemenicioğlu, A., Cemeroğlu, B., Hale Haven Seftalilerinde Polifenol Oksidaz Enzimlerinin Bazı Nitelikleri, *Tr. Journal of Agriculture and Forestry* 22, 261-265, **1998**.
- [95] Buckow, R., Weiss, U., Knorr, D., Inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase in different pressure–temperature domains, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 441–448, **2009**.
- [96] Ünal, M. Ü., Properties of Polyphenol Oxidase from Anamur Banana (*Musa cavendishii*), *Food Chemistry*, 100: 909-913, **2007**.
- [97] Doğan, M., Arslan, O. ve Doğan, S., Substrate specificity, heat inactivation and inhibition of polyphenol oxidase from different aubergine cultivars, *International Journal of Food Science and Technology*, 2002, 37, 415-423, **2002**.
- [98] Çelik, F., Kazankaya, A., Doğan, A., Oğuz, H.İ., Ekinci, A., *Kuşburnu (Rosa Spp) Tiplerinde C Vitamini İçeriğine Farklı Rakımların Etkileri*, II.Ulusal Üzümsü Meyveler Sempozyumu, s. 313-316, Tokat, **2006**.
- [99] Karasakal, A., *Kuşburnu Bitkisinde Spektrofotometrik Yöntemle Askorbik Asit Tayini*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya Bölümü, İstanbul, **2007**.
- [100] Demir, F., Özcan, M., Chemical and Technological Properties of Rose (*Rosa Canina L.*) Fruits Grown Wild in Turkey, *Journal of Food Engineering* 47, 333-336, **2001**.
- [101] Nas, S., Gökalp, H.Y., Kuşburnu ve Pestil Teknolojisi Gıda Değeri, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 24 (2), 142-150, **1993**.
- [102] Gao, X., Björk, L., Trajkovski, V., Ugglä, M., Evaluation Of Antioxidant Activities of Rosehip Ethanol Extracts in Different Test Systems, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80:2021-2027, **2000**.
- [103] Selimović, A., Salkić, M., Selimović, A., Direct spectrophotometric determination of L-ascorbic acid in pharmaceutical preparations using sodium oxalate as a stabilizer, *International Journal of Basic & Applied Sciences* Vol: 11, No: 02, **2011**.

- [104] American Oil Chemists' Society. Official Method Ce 8–89., Urbana, IL. **1997.**
- [105] Mogol, B.A., Yıldırım, A., Gökmen, V., Inhibition of enzymatic browning in actual food systems by the Maillard reaction products, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90:2556-2562, **2010.**
- [106] Kanazawa, H., Miyata, C., Nagata, Y.,Urano, S., Matsushima, Y., Determination of a-tocopherol and a-tocopherylquinone in rat tissues and plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 48(10) 1462-1466, **2000.**
- [107] Dudak, F.C, Kousal, J., Seker, U.O.S., Boyacı I.H.,, Shukurov, A., ve ark. *Influence of the Plasma Treatment on Enzyme Structure and Activity*. Proc. 28th ICPIG, Prague, **2007.**

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Dilara Bozkurt
Doğum Yeri : Fatih
Medeni Hali : Bekar
E-posta : gdbozk07@hacettepe.edu.tr
Adresi : Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği
Bölümü, 42049, Kampüs, KONYA

Eğitim

Lise : İSTEK Vakfı Kaşgarlı Mahmut Anadolu Lisesi
Lisans : Hacettepe Üniversitesi

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce : Çok iyi

İş Deneyimi

09/2013- : Arş. Gör., Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Konya
06/2012-10/2012 : İstihdamı Zorunlu Personel, Bildirici Gıda San. Tic. Ve Ltd.
Şti., Ankara
12/2012-05/2012 : Proje Müdürü, Öz Gaziantep Lokantacılık San. Ve Tic. Ltd.
Şti., Ankara

Deneyim Alanları

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar
