

GIDA

THE JOURNAL OF FOOD



E-ISSN 1309 - 6273, ISSN 1300 - 3070

CİLT / VOLUME : 43

SAYI / NUMBER : 1

YIL / YEAR : 2018

GIDA TEKNOLOJİSİ DERNEĞİ YAYINI

*PUBLISHED BY THE ASSOCIATION OF
FOOD TECHNOLOGY IN TURKEY*

Sahibi / Owner

Gıda Teknolojisi Derneği Adına / On behalf of the Association of Food Technology; Turkey

Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

Yönetim Kurulu Başkanı / President of the Association

Editörler / Editors	Danışma Kurulu / Advisory Board
<p>ÇAKIR, İbrahim; <i>Abant İzzet Baysal University, Turkey</i> ERİNÇ, Hakan; <i>Ömer Halisdemir University, Turkey</i> HALKMAN, A. Kadir; <i>Ankara University, Turkey</i> ÖZDEN, Özkan; <i>Istanbul University, Turkey</i> TABAN, Birce; <i>Ankara University, Turkey</i></p>	<p>Alichanidis, Efstathios <i>Aristotle University of Thessaloniki, Greece</i> Artık, Nevzat <i>Ankara University, Turkey</i> Baysal, Taner <i>Ege University, Turkey</i> Boyacı, İsmail Hakkı <i>Hacettepe University, Turkey</i> Certel, Muharrem <i>Akdeniz University, Turkey</i> Draughon, Ann <i>Tennessee University, USA</i> Ekşi, Aziz <i>Ankara University, Turkey</i> El Soda, Morsi <i>University of Alexandria, Egypt</i> Fogliano, Vincenzo <i>University of Napoli Federico II, Italy</i> Ghosh, Bikash C. <i>National Dairy Research Institute, India</i> Gollop, Natan <i>The Volcani Center, ARO, Israel</i> Gökmen, Vural <i>Hacettepe University, Turkey</i> Griffiths, Mansel <i>University of Guelph, Canada</i> Göğüş, Fahrettin <i>Gaziantep University, Turkey</i> Gümüşkesen, Aytaç Saygın <i>Ege University, Turkey</i> Güven, Mehmet <i>Cukurova University, Turkey</i> Heperkan, Dilek <i>Istanbul Technical University, Turkey</i> Ho, Chi-Tang <i>The State University of New Jersey, USA</i> Kaya, Mükerrerem <i>Atatürk University, Turkey</i> Kaymak-Ertekin, Figen <i>Ege University, Turkey</i> Koçak, Celalettin <i>Ankara University, Turkey</i> Köksel, Hamit <i>Hacettepe University, Turkey</i> Morales, Francisco J. <i>CSIC Instituto del Fr o, Spain</i> Mujtaba, Mustafa G. <i>Florida Gulf Coast University, USA</i> Özilgen, Mustafa <i>Yeditepe University, Turkey</i> Paalme, Toomas <i>Tallinn University of Technology, Estonia</i> Parlar, Harun <i>Technical University of Munich, Germany</i> Raspor, Peter <i>University of Primorska, Slovenia</i> Rezessy-Szabo, Judit M. <i>Corvinus University of Budapest, Hungary</i> Şahin, Serpil <i>Middle East Technical University, Turkey</i> Şanlıbaba, Pınar <i>Ankara University, Turkey</i> Üstünoğlu, Zeynep <i>Michigan State University, USA</i> Yetişemiyen, Atila <i>Ankara University, Turkey</i></p>
<p>Yönetim Yeri Adres / Address Büyükelçi Sokak No: 18/1 Kavaklıdere/Ankara Turkey</p> <p>Tel: (+90) 0534 968 5994 • Faks: (+90) 312 317 8711 E-posta / E-mail: dergi@gidadernegi.org URL: http://www.gidadernegi.org</p> <p>Yayın Türü: Yaygın süreli ve hakemli</p> <p>Hazırlayan / Prepared Onay Ofset Matbaacılık G.M.K. Bulvarı No: 108/1 Maltepe / Ankara Turkey Tel : (+90) 312 230 22 09 e-mail: onayofset@gmail.com</p> <p>Yayın Tarihi / Publication Date 15 02 2018</p>	

Bu dergi, TÜBİTAK ULAKBİM TR Dizin, CrossRef, DergiPark Akademik, EBSCO Host, DOAJ, CiteFactor, Infobase Index, SciLit, Journal Index, BASE (Bielefeld Academic Search Engine), OCLS WorldCat, FAO Agris, CAB Abstracts, DIIF, Journal Factor, COSMOS, Scholarsteer, JIFACTOR, Research Impact Factor, Index Copernicus, Scientific World Index (Sciindex), Scientific Indexing Services (SIS), CABI (CAB Direct), Academic Resource Index, IJIF, Food Science and Technology Abstracts (FSTA) ve Google Scholar veri tabanları kapsamındadır.

This journal is covered by TÜBİTAK ULAKBİM TR Dizin, CrossRef, DergiPark Akademik, EBSCO Host, DOAJ, CiteFactor, Infobase Index, SciLit, Journal Index, BASE (Bielefeld Academic Search Engine), OCLS WorldCat, FAO Agris, CAB Abstracts, DIIF, Journal Factor, COSMOS, Scholarsteer, JIFACTOR, Research Impact Factor, Index Copernicus, Scientific World Index (Sciindex), Scientific Indexing Services (SIS), CABI (CAB Direct), Academic Resource Index, IJIF, Food Science and Technology Abstracts (FSTA) and Google Scholar database systems.

İçindekiler / Content

Araştırmalar (İngilizce) / Researches (English)

- Karkar, B, Şahin, S, Güneş, M.E. *Antioxidative effect of Turkish chestnut bee pollen on DNA oxidation system and its phenolic compounds / Türk kestane arı polenin DNA oksidasyon sistemi üzerindeki antioksidan etkisi ve fenolik bileşikler* **34-42**
- Tomruk, D, Devseren, E, İltar, I, Akyıl, S, Koç, M, Kaymak Ertekin, F. *Rheological and sensorial properties of sesame paste blends prepared with different sugar sources / Farklı şeker kaynakları ile hazırlanan tahin karışımlarının reolojik ve duyuşsal özellikleri* **43-52**
- Aydoğan-Coşkun, B., Çoklar, H., Akbulut, M. *Effect of sunlight on fatty acid composition of tomato seed oil stored in different colored bottles / Farklı renkli şişelerde depolanan domates çekirdeği yağının yağ asidi kompozisyonu üzerine gün ışığının etkisi* **122-128**
- Bayrak, E., Büyükkileci, A.O. *Utilization of white grape pomace for lactic acid production / Beyaz üzüm posasının laktik asit üretiminde kullanılması* **129-138**
- Ersus Bilek, S., Özkan, G. *Encapsulation of zinc-chlorophyll derivatives in whey protein matrix by emulsion/cold-set gelation / Çinko-klorofil türevlerinin peynir altı suyu proteini ile emülsiyon/soğuk jelleşme yöntemi ile enkapsülasyonu* **174-183**

Araştırmalar (Türkçe) / Researches (Turkish)

- Dede, S., Aşar, Y K. Yaş üzüm boğmasının aroma profilinin belirlenmesi / *The determination of aroma profile of fresh grape bogma* **1-10**
- Giritlioğlu, E., Dizlek, H. Sakaroz ikamesi olarak farklı tip ve düzeylerde şeker otu (*Stevia rebaudiana* Bertoni) bazı tatlandırıcı kullanımının bisküvi nitelikleri üzerine etkileri / *Effects of stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) based sweetener as sucrose substitution on biscuit qualities at different types and levels* **21-33**
- Karabulut, G., Efendioğlu, B., Kurtuluş, B., Turan, E., Kuyumcu, H., Esen, Ş., Çağrı Mehmetoğlu, A. *Bacillus subtilis* içeren yenilebilir kaplama uygulamasının çileğin raf ömrüne etkisi / *Effects of edible coating incorporated with Bacillus subtilis on shelf life of strawberry* **53-63**
- Eker, T., Cabaroğlu, T. Gıdaların tüketilmesi sırasında retronazal yolla aroma salınımının belirlenmesi / *Determination of retronasal aroma release during food consumption* **64-77**
- Türksoy, S. Tam tane baklagil unlarının kimyasal, fonksiyonel ve reolojik özelliklerinin belirlenmesi / *Determination of chemical, functional and rheological properties of whole legume flours* **78-89**
- Dancı, M., Cabaroğlu, T. Alkollü içkilerin kalite kontrolünde kullanılan farklı alkol tayin metodlarının karşılaştırılması ve NIR (yakın kızılötesi spektroskopisi) metodunun validasyonu / *Validation of NIR (near-infrared spectroscopy) method for alcoholic strength measurement in alcoholic beverages: comparison of different methods* **90-100**
- Erinç, H., Çifçi, S. Maraş tarhanası üretiminde kefir kullanımının son ürün üzerine etkileri / *The effects of kefir usage on properties of tarhana cips* **114-121**

Derlemeler (Türkçe) / Reviews (Turkish)

- Arslan Tontul, S., Erbaş M. Biyoaktif gıda bileşenlerinin püskürterek dondurma yöntemi ile mikroenkapsülasyonu / *The microencapsulation of bioactive food components by spray chilling method* **11-20**
- Altuntaş, S., Korukluoğlu, M. Gıda işleme tesislerinde *Listeria monocytogenes* ve mücadelede yeni yaklaşımlar / *Listeria monocytogenes in food facilities and new approaches for struggle* **101-113**
- Aykın Dinçer, E., Erbaş, M. Etin tuzlanması işleminde vakumlu emdirim tekniğinin kullanılması / *Use of vacuum impregnation method in meat salting process* **139-150**
- Kübra Eryaşar Örer, K., Karasu Yalçın, S. Mikrobiyel ksilitol üretiminde hemiselülozik hidrolizatların kullanımı / *Utilization of hemicellulosic hydrolysates for microbial xylitol production* **151-162**
- Karademir, E., Karasu Yalçın, S., Yalçın, E. Tahıl ve bakliyat esaslı gıdalarda fermentasyon işleminin besinsel özellikler ve biyoaktif bileşenler üzerine etkisi / *Effect of fermentation process on nutritional properties and bioactive compounds of cereal and legume based foods* **163-173**

Editörden,

Merhaba,

Dergimizin 2018 yılı 43. cilt 1. sayısı ile yine birlikteyiz. Bu sayımızda 5 İngilizce araştırma, 7 Türkçe araştırma ve 5 Türkçe derleme olmak üzere 17 makale bulunmaktadır.

Bu sayımızdaki makalelere farklı doi numaraları verildiğini fark etmişsinizdir. Doi numaralarını önceden CrossRef üzerinden alıyorduk, artık DergiPark sistemini kullanıyoruz. Bu değişiklik, yazarları olumlu ya da olumsuz yönde etkilemeyecektir. DOI, evrensel bir dijital kod olup, bir çeşit makale kimlik numarasıdır.

Dergimize <http://dergipark.gov.tr/gida> adresinden doğrudan erişebilirsiniz.

Nevşehir Hacı Bektaş Üniversitesi'nde yapacağımız 3. Uluslararası Gıda Teknolojisi Kongremizin kayıtları devam etmektedir. 15 Ocak 2018 tarihi, bildiri özeti gönderilmesi için son tarih değildir. Bu tarihten sonra da bildiri özeti göndermek mümkündür. Nitekim bu tarihte yeni bildiri özetleri gelmektedir. Kongre web sayfasında da verildiği gibi, 15 Ocak 2018 tarihi erken kayıt ödemesi için son tarih idi. Bu tarihten sonra gönderilen bildiri özetleri erken kayıt ücreti ödeme şansını kaçırdı. Kongre programı uyarınca kabul edilen bildirimleri 01 Mart 2018 tarihinden itibaren sorumlu yazarlara bildirmeye başlayacağız ve 01 Nisan 2018 tarihine kadar erken kayıt ücreti tarifesi üzerinden ödeme yapmalarını isteyeceğiz.

Bildirilerin poster ya da sözlü sunum olarak kabul edilmesi ya da reddedilmesi, Kongre Bilimsel Kurulu'nda yer alan hakemlerimizin önceliğindedir, ancak farklı hakemlerden farklı görüşler gelirse kuşkusuz Kongre Düzenleme Kurulu devreye girecektir. Kabul edilen her bildiri için sorumlu yazara:

"-Bildiri özetiniz poster bildiri olarak kabul edildi, sözlü bildiri olmasında ısrarcı mısınız?

Ya da

"-Bildiri özetiniz sözlü bildiri olarak kabul edildi, poster bildiri olmasında ısrarcı mısınız?"...şeklinde e-mail göndereceğiz ve ivedi olarak yanıt vermelerini isteyeceğiz.

Kongre Sözlü Bildiri Programı'nın yapılabilmesi, ancak ve ancak belirli bir tarihe kadar gönderilen ve bu şekilde kabul edilen bildirimler ile mümkündür. Buna göre 01 Mayıs 2018 tarihine kadar gönderilen bildiri özetleri, sözlü ya da poster olarak değerlendirmeye alınacak ancak bildiri özeti son gönderim tarihi olan 01 Temmuz 2018'den sonra gönderilecek tüm bildirimler poster bildiri olarak değerlendirilecektir. 01 Temmuz 2018 sonrası gönderilecek hiçbir bildiri kabul edilmeyecektir.

Sevgi ve saygılarımla,

Prof. Dr. A. Kadir Halkman
GIDA Dergisi Editörü

A Message from the Editor-in-Chief

Hello,

We are together again with the 1st issue of the volume 43 of our journal in 2018. There are again 17 articles, including 5 research articles in English, 7 research articles in Turkish, and 5 review articles in Turkish in this issue.

You have noticed that different doi numbers were given to the articles of this issue. We have been receiving Doi numbers on CrossRef previously, and now we are using the DergiPark system. This change will not affect authors either positively or negatively. DOI is a universal digital code and is a sort of article identification number.

You can access our journal directly at <http://dergipark.gov.tr/gida>.

The registration to the 3rd International Congress on Food Technology which will be held in Nevsehir Haci Bektas University, has still been continuing. The date of January 15, 2018 is not the deadline for abstract submission. After this date, it is possible to submit abstracts. As a matter of fact, new abstracts are coming on this date. As stated at the Congress web page, the date of January 15, 2018 was the deadline for abstract submission for early-bird registration. Submissions after this date missed the chance to pay early-bird registration fees. We will begin notifying the corresponding authors for their abstracts accepted under the Congress program from the date of March 01, 2018 and will require them to make an early-bird registration payment by the date of April 01, 2018.

The acceptance or rejection of the abstracts as poster or oral presentation is at the initiative of our reviewers in the Congress Scientific Committee, but if different comments come from different reviewers, the Congress Organizing Committee will surely come into commission. For the all accepted abstracts, we will send an e-mail to the corresponding author as:

"-Your abstract is accepted as a poster presentation are you insisting on its oral presentation?

Or

"-Your abstract is accepted as a poster presentation, are you insisting on its oral presentation?"...and we will want them to reply as soon as possible.

The scheduling of the Congress Oral Presentation Program can only be made by means of abstracts which are submitted and accepted by a specific date. Accordingly, the abstracts submitted until the date of May 01, 2018 will be evaluated for oral or poster presentation, but all abstracts submitted after the date of July 01, 2018, which is the deadline for abstract submission, will be evaluated as poster presentation. No abstracts submitted after the date of July 01, 2018, will be accepted

Best Regards,

Prof. A. Kadir Halkman
Editor of Journal of FOOD



YAŞ ÜZÜM BOĞMA'SININ AROMA PROFİLİNİN BELİRLENMESİ*

Sercan Dede, Yahya Kemal Avşar**

Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Hatay, Türkiye

Geliş / *Received*: 07.08.2017; Kabul / *Accepted*: 22.11.2017; Online baskı / *Published online*: 30.11.2017

Dede, S., Avşar, Y.K.. (2018). Yaş üzüm boğma'sının aroma profilinin belirlenmesi. *GIDA* (2018) 43 (1): 1-10 doi: 10.15237/gida.GD17073

ÖZ

Bu çalışmada Hatay yöresinde geleneksel olarak yaş üzümünden üretilen Boğmanın laboratuvar koşullarında üretimi gerçekleştirilmiş ve son üründe uçucu bileşenleri ve aroma profili araştırılmıştır. Bu amaçla üretim, geleneksel yöntemler esas alınarak fermantasyon toprak küplerde (carra) ve distilasyon bakır düzeneklerde gerçekleştirilmiştir. Uçucu bileşenlerin belirlenmesinde gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GK-KS), aroma aktif bileşenlerin belirlenmesinde ve tanımlanmasında gaz kromatografisi-olfaktometri cihazları (GK-O) kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; boğmaların etil alkol miktarları, % 40-50 (v/v); yoğunlukları 0.9309-0.9498g/cm³; uçar asit miktarları 5.8-16.8mg/100mL mA arasında bulunmuştur. Örneklerde furfurala rastlanmazken; 43 uçucu bileşik (12 ester, 17 terpen, 4 yüksek alkol, 1 aldehit, 3 fenolik bileşen, 1 primer alkol, 1 keton ve tanımlaması yapılamayan 4 bileşik) olduğu saptanmıştır. GK-KS ile bunlardan 27'si tespit edilebilirken; koklama portunda, 26 aroma aktif bileşen tespit edilmiş ve bunların 18'i hem GK-KS ve GK-O de; 8'i ise sadece GK-O cihazında tespit edilmiştir.

Anahtar kelimler: Boğma, raki, gaz kromatografisi (GK), kütle spektrometresi (KS), olfaktometri (O), aroma

THE DETERMINATION OF AROMA PROFILE OF FRESH GRAPE BOGMA*

ABSTRACT

In this study, Bogma as a traditional alcoholic beverage in Hatay province was produced from fresh grape in laboratory conditions based on the traditional methods. The final product was analyzed for volatile compounds and the aroma profile. For this purpose, fermentation and distillation were carried out using clay pots, copper made pots as traditional methods, respectively. Volatile compounds were determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), whereas aroma active compounds were determined by gas chromatography-olfactometry (GC-O). According to the results; Bogma samples consisted of 40 to 50% (v/v) of ethanol, 5.8 and 16.8mg/100mL mA of total volatile substances and had a density of 0.9309 and 0.9488 g/cm³. Furfural was not present in the samples and there were 43 volatile compounds (12 esters, 18 terpenes, 4 higher alcohols, 1 aldehyde, 3 phenolic compounds, 1 primary alcohol, 1 ketone and 4 other unknown volatiles). Of the 43 compounds, 27 volatiles were identified in GC-MS that 18 were identified in both GC-MS and GC-O and 26 were identified as aroma active compounds. Of which, 8 were detected only at the sniffing port.

Keywords: Bogma, raki, gas chromatography (GC), mass spectrometry (MS), olfactometry (O), flavor

*Bu çalışma Sercan Dede'nin Yüksek Lisans Tezinin bir bölümüdür / *This paper is a part of Master Thesis of Sercan Dede*

** Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ sdede@mku.edu.tr,

☎ (+90) 326 245 5845 / 1063

☎ (+90) 326 245 5832

GİRİŞ

Boğma, ülkemiz de dâhil olmak üzere Balkanlardan Ortadoğu'ya kadar uzun yıllardan beri geleneksel yöntemlerle üretilen ev tipi damıtık bir alkollü içkidir. Özellikle Adana, Mersin, Hatay, Gaziantep ve Kahramanmaraş çevrelerinde yasal olmayan koşullarda ve miktarı kesin olarak belirlenememekle beraber, önemli düzeylerde üretimi yapıldığı bilinmektedir (Öncü vd., 2002; Bulur, 2010). Üretimi, yörede yaygın olarak yetişen üzüm ve/veya kuru incir çeşitlerinin (ayrıca diğer tüm şeker oranı yüksek meyveler) küp ya da carra adı verilen toprak kaplarda (günümüzde plastik bidonlar da kullanılmaktadır) fermantasyonu ile bir veya daha çok kez damıtılması esasına dayanmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1: Distilasyon ünitesi ile birlikte bakır Boğma üretim kazanı

Figure 1: A copper pot for production of Bogma equipped with distillation unit

Alkollü içkilerin kalitesi ve aroması sahip olduğu uçucu bileşen içeriğine bağlıdır. Uçucu bileşenlerin miktarları ve birbirlerine oranları alkollü içkilere karakteristik tat ve kokularını kazandırmakta ve aralarındaki ilişki kaliteyi etkilemektedir (Cabaroğlu ve Yilmaztekin, 2011). Aroma veren bileşenlerinin kimyasal kompozisyonu; hammadde, fermantasyon ve distilasyon sürecinin etkisi altında değişiklik göstermekte ve distilasyon esnasında son ürüne geçmektedir (Erten ve Canbaş, 2003). Boğma, rakı benzeri damıtık bir alkollü içki olduğu için

kalitesini belirleyen temel unsurlar yine rakıdaki uçucu bileşenlerle (etanol, metanol, yüksek alkoller, esterler, diğer uçucu bileşikler ve anasondan gelen uçucu yağlar) benzerlik göstermektedir (Fidan vd., 1996).

Alkollü içkilerin aroma ekstraksiyonlarında yararlanılan bir çok teknik bulunsa da özellikle tepe boşluğu katı faz mikro ekstraksiyon tekniği (TB-KFME) etkili bir yöntem olarak sıkça kullanılmaktadır (Capobiango vd., 2015). TB-KFME, gıdalarda bulunan uçucu bileşenlerin kalitatif ve kantitatif analizleri için ekstraksiyon ve konsantrasyon işlemlerinin birlikte gerçekleştiği etkin bir örnek hazırlama tekniğidir. Başlıca avantajları basit, ucuz ve hızlı olması, çözügen kullanılmaması, yüksek duyarlılığa sahip olması, küçük örnek hacmi ile çalışmanın mümkün olması ve basit otomasyona sahip olmasıdır. Bu teknikte örnek özelliğine bağlı olarak fiber seçimi yapılmakla beraber katı, sıvı ve gaz örneklerdeki apolar ve polar bileşiklerin ekstraksiyonu başarılı bir şekilde yapılabilmektedir (Plutowska ve Wardencki, 2008). Aroma bileşenlerinin TB-KFME yöntemiyle kombin şekilde; GK-KS ve GK-O' daki tutunma zamanları referans aroma maddelerinin tutunma zamanları ile eşleştirilerek tentatif olarak tanımlamaları yapılmıştır.

GK-KS cihazı uçucu bileşenlerin tanımlanmasında ne kadar yararlı bir yöntem olsa da, belirlenen bileşenlerin aroma aktif özelliklerinin belirlenmesinde yetersizdir. Aroma aktif bileşenlerin belirlenmesinde kullanılan yardımcı ya da tamamlayıcı yöntem olarak GK-O cihazı kullanılmaktadır. İnsan burnunun detektör olarak kullanıldığı olfaktometri cihazı ile algılanabilecek olan koku eşiği (10^{-19}), kendisine en yakın cihaz olan AID'nin eşik değerinin (10^{-12}) çok daha altındadır (Reineccius, 1994; Friedrich ve Acree, 1998).

Boğmanın kimyasal bileşimi ve uçucu bileşenleri üzerine literatürdeki çalışmalar oldukça sınırlıdır (Fidan vd., 1996; Anlı vd., 2007; Bulur, 2010; Zeren vd., 2012). Ayrıca, olfaktometrik teknikler kullanılarak aroma profili üzerinde bir çalışma yapılmamıştır. Yapılan bu çalışmanın amacı; laboratuvar koşullarında geleneksel yöntem ile yaş

üzüm kullanılarak üretilen Boğmanın, uçucu bileşenleri kompozisyonunu ve aroma aktif bileşenlerini belirlemektir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Araştırma materyali olarak; yerel bir üzüm çeşidi olan Pafi cinsi üzümlerden üretilen Boğma örnekleri, Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (Hatay, Türkiye) laboratuvarlarında üretilmiştir.

Standart referans madde olarak; n-alkan standartları (Aldrich Chemical Company, Inc. USA), Etanol, metanol, etil asetat, furfural, 2-fenil etil asetat, etil hekzanoat, etil oktanoat (Merck, Germany), etil dekanooat, etil tetradekanoat, β -karyofilen, γ -terpinen (Sigma Aldrich, Germany), 2-fenil etil alkol (Sigma Aldrich, USA), etil dodekanoat (Sigma Aldrich, Malezya), dl-limonen, p-kimen (Alfa Aesar, Germany), 3-metil-1-bütanol (Sigma Aldrich, Switzerland) kullanılmıştır. Ayrıca ekstraksiyon için NaCl (Merck, Germany), KFME fiber polydimethylsiloxane/carboxen/divinylbenzene (PDMS/CAR/DVB) 50/30 μ m, 2 cm (Supelco, Bellefonte, PA, USA) kullanılmıştır. Tüm kimyasalların saflıkları %97'nin üzerindedir. Analizlerde kullanılan saf su J.P. Selecta cihazı (Barselona, İspanya) ile temin edilmiştir.

Boğma üretimi ve fermantasyonun takibi

Yıkanan ve çöplerinden ayrılan üzümler el ile ezilerek toprak küplere konmuştur. Fermantasyon, bu küplerin içerisinde oda sıcaklığında (20-25°C) spontan olarak (maya ilavesi olmadan) gerçekleştirilmiştir. Distilasyon işleminde geleneksel yöntemlere uygun olarak hazırlanan 25 litrelik bakır kazan kullanılmıştır. Fermantasyon ve distilasyon aşamasında taşma olmaması için kaplar $\frac{3}{4}$ oranında doldurulmuştur.

Fermantasyon takibi etil alkol oluşumu üzerinden gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, fermantasyonun ilk gününden başlanarak örneklerden düzenli olarak alınan numuneler damıtılmış ve elde edilen distilat gaz kromatografisine (Shimadzu GC2010) enjekte edilmiştir. Alev iyonlaşma detektöründe önceden enjekte edilmiş olan etil alkol standart

referans maddesi enjeksiyonları ile tespit edilen alkonma zamanı ve oluşturulan kalibrasyon eğrisine uygun olarak yakalanması sağlanmıştır. Analizlerin gerçekleştirilmesinde, polar kapiler kolon (HP-INNOWAX 30-m * 0,25-mm i.d* 0,25 μ df J&W Scientific) kullanılmıştır. Etil alkol üretiminin maksimuma ulaştığı ve sabit kaldığı nokta fermantasyon son noktası olarak belirlenmiştir. Zira bu noktadan sonra enjeksiyonlarda elde edilen pik alanları hızla azalmaya başlamıştır. Bu nedenle fermantasyon süresi 7 gün olarak belirlenmiştir.

Yerel yöntemle benzer şekilde gerçekleştirilen üretimde, hava sızmaz şekilde kapatılmış bir kaynatma kazanı içine konulan mayşe haline gelmiş örnek, yoğunlaşmanın gerçekleşeceği kısma bir boru yardımıyla bağlanmıştır. Kaynatma kazanında gaz fazına geçmiş alkol, su vd. uçucu bileşenlerin ayrımı, yoğunlaşma kısmında sürekli akan soğuk su ve buz yardımıyla yapılmıştır. Sistemde iki defa distilasyon gerçekleştirilmiştir. İlk distilasyon esnasında belirli hacimlerde (100 mL) örnek alınarak ve metanol için elde edilen kalibrasyon eğrilerine göre metanol içeriği tüketim için uygun olmayan miktarın bulunduğu kısım baş kısım ayırma noktası belirlenmiş ve bu şekilde baş kısım ayrılmıştır. Daha sonra yine 100 mL'lik hacimde alınan örneklerde gaz kromatografisi cihazıyla etil alkol için hazırlanan kalibrasyon eğrisi ile hesaplanan bağıl etil alkol miktarı % 20'nin altına ininceye dek olan kısım orta kısım olarak ayrılmıştır. Distilasyonun devamında, bağıl etil alkol miktarı % 0-5 arasına indiği süreçte distilasyon sonlandırılmış ve bu kısım da son kısım (kuyruk) olarak belirlenmiş ve ayrılmıştır. İlk distilasyondan sonra bir gün dinlendirilen distilatın orta kısmı kaynatma kazanına alınmış ve üzerine kendi miktarı kadar su ve 100 gr/L anason tohumu ilave edilerek ikinci kez distile edilmiştir.

Genel analizler

Boğmaların yoğunluk, alkol, uçar asit ve furfural analizleri Türk Gıda Kodeksi ve Avrupa Birliği Komisyonu referans metodlarına göre gerçekleştirilmiştir (Anonymous, 2000; Anonymous, 2003; Anonymous, 2013).

Kromatografik analizler

Uçucu bileşiklerin analizi

Boğma örneklerinin analizleri HP-6890 Series GC/HP 6890 Series kütle seçici detektör (MSD, Hewlett Packard, İtalya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Uçucuların ayrıştırılmasında fused silika kapiler kolon (HP-INNOWAX, 60 m uzunluk x 0.25 mm iç çap x 0.25 µm film kalınlığı (df), J & W Scientific, USA) ve taşıyıcı gaz olarak helyum (1mL/dak sabit akış hızı) kullanılmıştır. Fırın sıcaklığı 40°C den 240°C'ye; 40 °C' de 3 dk bekletilip; sonra 3 °C/dk artış ile 150 °C' ye çıkarılıp; daha sonra bekletilmeden 10°C/dk artış ile 240°C'ye çıkarılarak bu sıcaklıkta 9 dakika bekleyecek şekilde programlanmıştır. MSD şartları ise: kapiler doğrudan ara yüzey sıcaklığı:280 °C; iyonizasyon enerjisi, 70 eV; kütle aralığı belirlenmemiş, scan modda çalışılmıştır. Yöntemde Boğma örneği GK-KS cihazına, doğrudan enjeksiyon (DE) ve TB-KFME teknikleriyle enjekte edilerek uçucu bileşikler belirlenmiştir. Uçucu bileşiklerin karşılaştırılmasında bileşenlerin bağıl (% oranları) ve mutlak ($\sqrt{\text{Alan}/10^3}$) oranları kullanılmıştır (Hayaloğlu, 2009). Uçucu bileşiklerin tanımlanmasında ise NIST 02 ve Wiley 175 kütüphanelerinden yararlanılmıştır.

Gaz kromatografisi – olfaktometri analizleri

Olfaktometrik analizlerin gerçekleştirilmesinde Shimadzu GC2010 model gaz kromatografisi ve el yapımı olfaktometri aparatı kullanılmıştır. Olfaktometrik analizler, polar kapiler kolon (HP-INNOWAX 30-m boy * 0.25-mm i.d* 0.25µm df J&W Scientific) ile gerçekleştirilmiştir. Örnekler 60 saat koklama tecrübesi olan panelistler tarafından koklanmıştır. Aroma ekstraksiyon dilüsyon analizi (AEDA) yapılarak, boğma örneklerinde saptanan aroma maddelerinin aromaya katkıları belirlenmiştir. Belirleme esnasında, her örnek, iki farklı tekniğe (DE ve TB-KFME) göre enjekte edilmiştir. Yapılan enjeksiyonlar, 5 farklı split oranı kullanılarak (splitless; split 1/5; 1/25; 1/25; 1/625) gerçekleştirilmiştir.

Aroma aktif maddelerin belirlenmesi

Aroma aktif maddelerin belirlenmesinde, referans aroma maddeleri sırasıyla GK-O cihazına

doğrudan enjekte edilmiştir. Aroma maddelerinin GK-O cihazlarındaki tutunma indeksleri (RI); aynı aroma maddelerinin literatürdeki tutunma indeksleriyle karşılaştırılarak tanımlanmıştır. Tutunma indeksleri; Van Den Dool ve Kratz (1963)'ün tanımlamada kullandığı Kovats tutunma indeksleri aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır.

$$I_x = 100n + 100(t_x - t_n) / (t_{n+1} - t_n)$$

I_x : uçucu bileşen X'in tutunma indeksi

t_n ve t_{n+1} : uçucu bileşen X'in hemen öncesinde ve sonrasında yer alan referans n-alkan serisinin tutunma zamanları

t_x : uçucu bileşen X'in tutunma zamanı

Ayrıca GK-O tekniğinde koklama portunda belirlenen ancak GK-KS cihazında belirlenemeyen aroma aktif bileşiklerin tanımlanmasında, tutunma indeksleri (RI) ve koku özelliklerinden faydalanılarak ve mümkün olduğunda referans maddenin tutunma indeksi ($RI_{GCO-Ref}$) ile ve literatürdeki tutunma indeksi ile (RI_{Ref}) karşılaştırılarak tentatif olarak belirlenmiştir. Tutunma indeksinin hesaplanmasında n-alkan serisinden faydalanılmıştır.

TB-KFME koşulları Jurado vd. (2007)' ye göre belirlenmiştir. Çalışmada, 6 mL boğma örneği ve 0.18 gram NaCl, 10 mL erlene konularak su ile 10 mL tamamlanmıştır. Daha sonra 20 mL'lik viyale aktarılarak hermetik olarak kapatılmıştır. DVB/CAR/PDMS fiber (uzunluk=2cm) kullanılan KFME, 34°C de 20 dakika 300 rpm de manyetik olarak karıştırılarak tepe boşluğundan örnek absorpsiyonu yapılmıştır. Son olarak, fiber GK' nin enjeksiyon portuna yerleştirilerek 3 dakika bekletilmiş termal desorpsiyon gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyonlar, split ve splitless modlarda olmak üzere bu işlem her örnek ve her seyreltme için tekrar edilmiştir.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Genel bileşim

Üretilen boğma örneklerinin genel bileşimlerini belirlemek amacıyla etil alkol, yoğunluk, uçar asit ve furfural analizleri yapılmıştır. Analizi yapılan Boğmaların ortalama bileşimleri, etil alkol %47.33±2.52 (v/v), yoğunlukları 0.9357±0.0045 (g/cm³), uçar asit 11.8±5.57 (mg/100mL mA)

olarak belirlenmiştir. Örneklerde furfural belirlenmemiştir.

Uçucu bileşenler

Boğma örneklerinin DE ve TB-KFME tekniğine göre gerçekleştirilen enjeksiyonlarında belirlenen uçucu bileşenler ve yüzde oranları çizelge 1'de verilmiştir. Buna göre DE ile 1 primer alkol, 4 sekonder alkol, 1 ester, 1 fenolik bileşen tespit edilmiştir. Örneklerde belirlenen başlıca uçucu bileşenin etanol olduğu bulunmuştur (%97.05±2.02). Boğma örneklerinin TB-KFME tekniğine göre gerçekleştirilen enjeksiyonlarında ise 25 uçucu bileşen (4 ester, 2 yüksek alkol, 1 primer alkol, 15 terpen, 2 fenolik bileşen ve 1 aldehit) tespit edilirken; etanol (bileşenler arasında %14.09 yüzde oranı), etil dekanolat (bileşenler arasında %1.28 yüzde oranı), karyofilen (bileşenler arasında %3.33 yüzde oranı) ve estragol (bileşenler arasında %76.76 yüzde oranı ile majör bileşenler olarak belirlenmiştir.

Çizelge 1 incelendiğinde, TB-KFME'nin daha duyarlı bir teknik olduğu görülmektedir. Yaş üzüm Boğma örneklerinde DE ile belirlenen 2 adet bileşen (3 ve 7), TB-KFME tekniği ile belirlenmemiştir. TB-KFME tekniği ile belirlenen 20 adet bileşen (8-27) ise DE ile belirlenmemiştir.

Yüksek alkoller

Alkollü içkilerde en fazla miktarda bulunan aroma maddeleri yüksek alkoller (füzel yağları) dir. Yüksek alkoller, mayalar tarafından Ehrlich (aminoasit varlığında aminoasitlerden) ve biyosentez (aminoasit ortamda bulunmadığında şekerlerden) yolu ile üretilmektedir (Nykanen ve Nykanen, 1991; Erten ve Canbaş, 2003). Boğma örneklerinde 4 yüksek alkol (3, 4, 5 ve 7) tespit edilmiştir (Çizelge 1 ve 2). Yüksek alkoller boğma örneklerin aromasına; alkol, meyvemsi, çiçeksi, tatlı olarak katkıda bulunurlar.

Elde edilen sonuçlar, fermantasyonda kullanılan hammaddenin son ürünün yüksek alkol içeriğini etkilediğini göstermektedir. Boğmalarda tanımlanan yüksek alkoller önceki çalışmalarda tanımlanan bileşiklerle benzerlik göstermiştir (Bulur, 2010; Zeren vd., 2012; Cevik vd., 2015; Akçan ve Lale, 2017).

Esterler

Distile alkollü içkilerdeki en geniş grup aroma bileşenleri, esterlerdir. İçkilerdeki miktarları ve algılanan kokuları açısından büyük öneme sahiptirler. Esterler, alkollü içkilere meyvemsi ve/veya çiçeksi tat ve koku vermekte olup kimyasal veya çoğunlukla biyokimyasal yolla üretilmektedirler (Nykanen ve Nykanen, 1991; Erten ve Canbaş, 2003). Çizelge 1 ve 2'de görüldüğü üzere Boğma örneklerinde GK-KS analizlerinde 4 ester (1, 10, 14 ve 27); GK-O analizlerinde de tentatif olarak 4 ester (29, 30, 31 ve 35) belirlenmiştir (Bulur, 2010; Cortes vd., 2005; Cevik vd., 2015; Akçan ve Lale, 2017).

Fenolik bileşenler

Boğma örneklerinde estragol (6), metil öjenol (26) ve *trans*-anetol (28) olmak üzere 3 adet uçucu fenolik bileşen tanımlanmıştır (Çizelge 1 ve 2). Bu bileşenler, anasonlu distile alkollü içkilerde yapılan çalışmalarda daha önce de bildirilmiştir (Yavaş ve Rapp, 1991; Jurado vd., 2007; Cevik vd., 2015; Akçan ve Lale, 2017). Yaş üzüm Boğması gibi diğer anasonlu distile alkollü içkilerin de aromatazede edilmesinde esas rol oynayan anason uçucu yağı, başlıca iki izomer bileşikten, *trans*-anetol ve estragol oluşmaktadır. Bu bileşikler saf anason kokusunda ve yoğun tatlı birer aroma sağlarlar (Arslan vd., 2004; Akçan ve Lale, 2017). Anason kullanım miktarı, içki çeşidine ve anasonun kalitesine göre değişmekte olup, %6–10 arasındadır (Fidan ve Şahin, 1983) Metil öjenol ise hammaddesi anason olan fenolik bileşenlerden olup meyvemsi, tatlı baharatımsı ve ağaçsı kokular sağlamaktadır (Arslan vd., 2004).

Terpenler

Terpenler, alkollü içkiye hammaddeden gelen yani Boğmalarda meyve tadından sorumlu aroma maddeleridir (Arslan vd., 2004). Çizelge 1 ve 2'de görüldüğü üzere Boğma örneklerinde 14 terpen (8, 9, 11-13, 15-24, 32 ve 33) tespit edilmiş olup önceki çalışmalarda tanımlanan terpenlerle benzerlik söz konusudur (Yavaş ve Rapp, 1991; Jurado vd., 2007). β-karyofilen (16)'in yaş üzüm Boğma örneklerinin majör bileşiklerinden olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 1. Yaş üzüm Boğmalarının doğrudan enjeksiyon (DE) ve tepe boşluğu-katı faz mikro ekstraksiyon (TB-KFME) tekniği ile gaz kromatografisi-kütle spektrometresinde (GK-KS) belirlenen uçucu bileşiklerin yüzde oranları^{1,2}

Table 1. Percentage ratios of volatile compounds of fresh grape Bogma samples determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) by direct injection (DI) and head space-solid phase microextraction (HS-SPME)

	Volatile Compounds	CAS	Min	Max	Mean	SD
1	Etil asetat	141-78-6	0.02	0.05	0.03	0.02
2	Etanol	64-17-5	94.73	98.32	97.05	2.02
3	1-Propanol	71-23-8	0.02	0.03	0.02	0.01
4	2-Me-1-propanol	78-83-1	0.06	0.08	0.07	0.01
5	3-Me-1-bütanol	123-51-3	0.27	0.32	0.29	0.02
6	Estragol	140-67-0	0.98	1.41	1.20	0.21
7	Fenil etil alkol	60-12-8	0.01	0.02	0.02	0.01
	(DE) Total		96.09	100.23	98.68	2.30
1	Etil asetat	141-78-6	0	0.05	0.05	0.006
2	Etanol	64-17-5	5.21	19.14	14.09	7.717
4	2-Me-1-propanol	78-83-1	0	0.04	0.04	0
8	dl-limonen	138-86-3	0.06	0.16	0.09	0.06
5	3-Me-1-butanol	123-51-3	0.13	0.29	0.20	0.08
9	Geyren	6902-73-4	0.04	0.11	0.06	0.04
10	Etil oktanoat	106-32-1	0.03	0.29	0.19	0.14
11	Δ -Elemen	515-13-9	0	0.11	0.08	0.04
12	α -terpinolen	586-62-9	0	0.16	0.16	0
13	α -ilangen	14912-44-8	0	0.06	0.06	0.007
14	Etil dekanat	110-38-3	0.18	2.05	1.28	0.975
15	β -Elemen	515-13-9	0	0.07	0.05	0.020
16	Karyofilen	87-44-5	0	4.80	3.33	2.078
17	β -Kürkümen	28976-67-2	0	0.13	0.13	0
18	Kopaen	3856-25-5	0	0.42	0.42	0
19	α -terpinolen	586-62-9	0	0.16	0.16	0
20	α -Bergamoten	64727-43-1	0	0.17	0.17	0
21	α -zingiberene	495-60-3	0.14	0.62	0.42	0.254
22	β -Longipinen	41432-70-6	0	0.56	0.33	0.322
23	Farnesen	28973-97-9	0	0.21	0.16	0.074
6	Estragol	140-67-0	69.25	89.07	76.76	10.747
24	α -Kalakoren	21391-99-1	0	0.03	0.03	0
25	<i>P</i> -anisaldehyt	123-11-5	0	0.02	0.02	0.002
26	Metil öjenol	93-15-2	0	0.01	0.01	0
27	Etil oktadekanoat	111-61-5	0.02	0.05	0.03	0.013
	(GK-KS) Total		75.06	118.78	98.32	22.575

1 Bağlı miktarlar HP-INNOWax kolon kullanılarak elde edilen pik alanlarından hesaplanmıştır.

2 Değerler iki enjeksiyon ortalamasıdır.

1 Relative quantities were calculated from the peak areas obtained using the HP-INNOWAX column.

2 Values are the average of two injections.

Çizelge 2. Yaş üzüm Boğmalarının doğrudan enjeksiyon (DE) ve tepe boşluğu katı faz mikroekstraksiyonu (TB-KFME) ile gaz kromatografisi-olfaktometre (GK-O) cihazında saptanan aroma-aktif bileşiklerin, koku tanımı, alıkonma indeksi (RI) ve aroma ekstraksiyon dilüsyon analizi (AEDA) sonuçları (n=3).

Table 2. Aroma active compounds of fresh grape Bogma samples that detected in gas chromatography-olfactometry (GC-O) by direct injection (DI) and head space-solid phase microextraction (HS-SPME) techniques, odor identifications, retention indexes (RI) and aroma extraction dilution analysis (AEDA) results (n=3)

No	Uçucu Bileşik <i>Volatile Compounds</i>	Koku Tanımı <i>Odor definition</i>	CAS#	¹ RI _{GCO}	² RI _{GCO-Ref}	³ RI _{Ref}	⁴ Log ₅ FDF			⁵ I
Doğrudan enjeksiyon (Direct injection)										
1	Etil Asetat	Meyvemsi, ekşi	148-78-6	902	854	902	3	3	3	KS, RI, RM, O
2	Etanol	Alkol	64-17-5	954	943	936	4	4	4	KS, RI, RMO
5	3-Me-1-bütanol	Kimyasal	513-86-0	1252	1235	1247	2	2	2	KS, RI, RM, O
6	Estragol	Anason	140-67-0	1631	-	1655	1	1	1	KS, O, RI
28	<i>Trans</i> -anetol	Anason	104-46-1	1843	-	1828	4	4	4	KS, O, RI
7	Fenil etil alkol	Çiçeksi, tatlı, bitki	60-12-8	1915	1915	1925	1	1	1	KS, RI, RM, O
25	<i>p</i> -anisaldehit	Tatlı, nane	123-11-5	1995	-	2051	3	3	3	KS, O, RI
Tepe Boşluğu –Katı faz mikro ekstraksiyon (Head Space-Solidphase microextraction)										
1	Etil asetat	Meyvemsi	141-78-6	902	854	902	3	3	3	KS, RI, RM, O
2	Etanol	Alkol	64-17-5	954	943	902	1	1	1	KS, RI, RM, O
29	Metil bütanoat(I)	Eter, meyvemsi, tatlı	623-42-7	970	981	990	1	1	1	O, RI, RM
30	Etil bütirat (I)	Tatlı, elma kabuğu	105-54-4	1058	981	1028	4	4	4	O, RI, RM
4	2-Me-1-propanol	Meyvemsi	123-86-4	1077	1083	1085	1	1	1	O, RI, RM
31	3-Me-1-butilasetat(I)	Tatlı, meyvemsi	123-92-2	1110	-	1118	1	1	1	O, RI, RM
8	dl-limonen	Limon, çay	138-86-3	1173	1193	1178	1	1	1	KS, RI, RM, O
5	3-Me-1-bütanol	Tatlı, karamel	123-51-3	1214	1205	1206	4	4	4	KS, RI, RM, O
32	γ -terpinen	Kimyasal, benzin	99-85-4	1278	1278	1262	1	1	1	KS, RI, RM, O
33	<i>p</i> -kimen	Metal	99-87-6	1275	1288	1277	1	1	1	KS, RI, RM, O
34	Etil hekzanoat	Tatlı, elma kabuğu, çiçeksi	123-66-0	1237	1200	1229	2	2	2	KS, RI, RM, O
10	Etil oktanoat	Meyvemsi, yağsı	106-32-1	1432	1436	1435	1	1	1	KS, RI, RM, O
14	Etil dekanat	Üzüm, tatlı, meyvemsi	106-33-2	1549	1556	1630	1	1	1	KS, RI, RM
35	İzobutiloktanoat(I)	Çiçeksi	5461-06-3	1549	-	-	1	1	1	O
36	Etil dodekanoat	Üzüm, tatlı, meyvemsi	106-33-2	1654	1725	1842	1	1	1	KS, RI, RM, O
37	Bilinmiyor / <i>Unknown</i>	İlaç <i>Medicine</i>	-	1690	-	-	1	1	1	O
38	Bilinmiyor / <i>Unknown</i>	Nane, ferah, limon <i>mint, fresh, lemon</i>	-	1774	-	-	1	1	1	O
39	Feniletanol asetat	Tatlı, meyvemsi, gül	103-45-7	1857	1837	1821	4	4	4	KS, RI, RM, O
40	E-â-damaskenon (I)	Tatlı, meyvemsi, <i>sweet, fruity</i>	23726-91-2	1907	1921	1836	1	1	1	KS, RI, RM, O
41	Bilinmiyor / <i>Unknown</i>	Boğma, meyvemsi, hoş <i>Bogma, fruity, nice</i>	-	1996	-	-	1	1	1	O
42	Etil tetradekanoat	Yağsı, eter, çiçeksi	124-06-1	2034	2060	2042	1	1	1	KS, RI, RM, O
43	Bilinmiyor / <i>Unknown</i>	Bitki, meyvemsi, üzüm <i>herbal, fruity, grape</i>	-	2171	-	-	1	1	1	O

¹ Gaz kromatografisi-olfaktometre portunda HP-INNOWax kolun kullanılarak hesaplanan alıkonma indeksi.

² Referans maddenin gaz kromatografisi-olfaktometre portunda HP-INNOWax kolun kullanılarak hesaplanan tutunma indeksi.

³ Referans maddenin literatürdeki tutunma indeksi;

⁴ Flavor dilüsyon faktörü

⁵ Bileşenin tanımlanma şekli: O: Olfaktometrik; KS: Kütle spektrumu; RI, Alıkonma İndeksi; RM, Referans madde; T: tentatif

¹ Retention index calculated using the HP-INNOWAX column in the gas chromatograph-olfactometer port.

² Retention index of the reference material calculated using the HP-INNOWAX column in the gas chromatograph-olfactometer port.

³ Retention index in the literature for the reference material;

⁴ Flavor dilution factor

⁵ Determination of the compound: O: Olfactometric; KS: Mass spectrum; RI, Retention Index; RM, Reference material; T: tentatively

Diğer bileşikler

“Türk Gıda Kodeksi Distile Alkollü İçkiler Tebliği”ne göre furfuralın rakı üretiminde kullanılan tarımsal kökenli etil alkollerde bulunmaması gerekmektedir (Anonymous, 2005a). Uçuculuğu düşük bir aldehit olan acı badem ve tarçın kokulu ve toksik özellikteki furfural, distilasyon sırasında fermente olabilir şekerin, asit ortamda ısıtılması, Strecker degradasyonu veya Maillard reaksiyonu sonucu oluşur (Nykanen ve Nykanen, 1991; Erten ve Canbaş, 2003). Üzümde elde edilen Boğma örneklerinde furfurala rastlanmamıştır.

Çalışmada varlığı tespit edilen tek aldehit p-anisaldehit (25) olup anasondan kaynaklı aroma bileşeni olan anason uçucu yağının %90'ını oluşturan anetolün hava ve ışıqla oksitlenmesi sonucu oluşur ve alkollü içkiye anason, rezene aroması vermektedir (Fidan ve Şahin, 1983) (Çizelge 1 ve 2).

Aroma profili

Boğma örneklerinin DE ve TB-KFME tekniğine göre gerçekleştirilen enjeksiyonlarında belirlenen aroma aktif bileşikleri ve AEDA testine göre belirlenen aroma dilüsyon faktörleri (FDF) Çizelge 2’de verilmiştir. Kullanılan ekstraksiyon tekniğine bağlı olarak Boğmaların aroma aktif profilinde değişik sonuçlar gözlenmiştir. DE tekniği ile 7 aroma aktif bileşen (1, 2, 5, 6, 7, 25 ve 28) belirlenmiştir. Etil asetat (1), etanol (2), 3-metil-1-bütanol (5) ve p-anisaldehit (25), DE ve AEDA tekniğine göre aroma profili üzerindeki etkili aroma aktif bileşenlerdir. Bu bileşenlerden p-anisaldehit (25) ve *trans*-anetol (28) yalnızca GK-O cihazı ile belirlenmiştir.

TB-KFME tekniği kullanıldığında ise yaş üzüm boğmalarında 22 aroma aktif bileşen tespit edilirken bunlardan 15 tanesi (29-43) yalnızca GK-O ile koklama portunda belirlenmiştir. Ancak bunların 5’i (29, 30, 31, 35 ve 40) tentatif olarak belirlenmiş, 4’ü (37, 38, 41 ve 43) tanımlanamamıştır. Bunlardan metilbütanoat (29), etil bütirat (30), 3-metil-1-bütasetat (31), izobütüloktanoat (35) ester olup, oluşma mekanizmalarına daha önce değinilmiş idi. Tentatif olarak olfaktometride tespit edilen

bileşiklerden birisi de ürüne bal ve meyvemsi aroma veren bir keton olan, E-β-damaskenon olup hammaddesi üzümdür (Acree vd., 1981). Etil asetat (1), 3-metil-1-bütanol (5), etil bütirat (30), etil hekzanoat (34) ve feniletasetat (39), TB-KFME ve AEDA tekniğine göre aroma profili üzerindeki etkili aroma aktif bileşenlerdir.

SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada Hatay ve çevresinde geleneksel olarak üretim ve tüketimi gerçekleştirilen bir distile alkollü içki olan yaş üzüm Boğmasının laboratuvar koşullarında geleneksel yöntemle üretimi gerçekleştirilmiş ve son ürünün uçucu ve aroma aktif bileşenleri belirlenmeye çalışılmıştır.

Son üründe yapılan analizlere göre; etil alkol miktarları %40-50 (v/v); yoğunlukları 0.9309-0.9498 g/cm³; uçar asit miktarları 5.8-16.8 mg/100mL mA arasında değişmektedir. Ayrıca metil alkole iz miktarda rastlanmış ve literatürdeki ev yapımı içkiler üzerine yapılan çalışmalardan farklılığı ortaya konmuştur. Dahası fermantasyon aşamasının takibi ile de oluşan metil alkol miktarında da azalma sağlanabileceği tespit edilmiştir.

Araştırmada elde edilen sonuçlar, Boğma örneklerinin uçucu bileşen içeriği ve aroma profilinin kullanılan analiz tekniğine göre farklı sonuçlar ortaya koyabileceğini göstermektedir. Aroma açısından değerlendirildiğinde, TB-KFME tekniğinin DE tekniğine göre daha üstün olduğu görülmektedir.

Ayrıca sonuçlar, Boğma örneklerinin aroma aktif bileşenlerinin, kullanılan hammaddeden (yalnızca anasondan gelen p-anisaldehit, estragol, metil öjenol, *trans*-anetol ile üzümden ve/veya anasondan gelen yani bitkisel kaynaklı olarak son üründe görülen; dl-limonen, geyren, Δ-elemen, α-terpinolen, α-ilangen, β-elemen, β-karyofilen, β-kürkümen, Kopaen, α-terpinolen, α-bergamoten, α-zingiberene, β-longipinen, farnesen, α-kalakoren, δ-terpinen, p-kimen, E-β-damaskenon (I)) ve fermantasyondan (etanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-bütanol, fenil etil alkol; etil asetat, etil oktanoat, etil dekanate, etil oktadekanoat, metil bütanoat(I), etil bütirat (I),

3-metil-1-butilasetat(I), etil hekzanoat, izobutiloktanoat(I), etil dodekanoat, feniletanol asetat, etil tetradekanoat) olmak üzere 2 kaynaktan geldiğini göstermektedir.

DE tekniğine göre yaş üzüm Boğmalarının başlıca aroma aktif bileşenleri etil asetat, etanol, 3-metil-1-bütanol, *trans*-anetol ve p-anisaldehyt iken, TB-KFME tekniğine göre etil asetat, etil bütirat (I), 3-metil-1-bütanol, etil hekzanoat ve feniletanol asetatdır. Ancak, TB-KFME ile arka planda yer alan aroma maddelerinin daha fazla olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak, geleneksel bir içki olarak Boğmanın yurtiçi ve yurtdışı pazarlara çıkarılması ve kırsal kalkınmada bir araç olarak kullanılması mümkündür. Ancak, özellikle hammaddeden kaynaklanan gıda güvenliği ile ilgili risklerin giderilmesi ve üretim tekniklerinin endüstriye uygulanabilir olması gerekmektedir. Özellikle farklı hammaddelerin (yerel üzüm ve incir çeşitlerinin) Boğma üretiminde kullanımı, fermantasyon ve distilasyon işlemlerinin kontrollü bir şekilde gerçekleştirilmesi üzerine yapılacak çalışmalarla daha sağlıklı, daha hoş aromalı ve tüketilebilir ürünler üretilebileceği açıktır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Mustafa Kemal Üniversitesi BAP (Bilimsel Araştırma Projeleri) Koordinatörlüğü tarafından 11800 numaralı proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

Acree, T. E., Braell, P. and Butts, R. M. (1981). The presence of damascenone in cultivars of *Vitis vinifera* (Linnaeus), *rotundifolia* (Michaux), and *labruscanu* (Baily). *J Agric Food Chem.*, 29: 688-690.

Akçan, R. ve Lale, A. (2017). Trans-anethole concentrations in bogma raki. Letter to the Editor. *Hum Exp Toxicol*, 1-2. DOI: 10.1177/0960327116641737

Arslan, N., Gürbüz, B, Sarihan, E.O, Bayrak, A., Gümüşçü, A. (2004). Variation in Essential Oil Content and Composition in Turkish Anise (*Pimpinella anisum* L.) Populations. *Türk J Agric For*, 28 173-177.

Anlı, R.E., Vural, N. and Gucer, Y. (2007). Determination of the principal volatile compounds of Turkish Raki. *J Inst Brew*, 113(3): 302-309.

Anonymous, (2000). Reference Methods of the Analysis of Spirits Drinks. Commission Regulation (EC) No 2870/2000, p: 20-46.

Anonymous, (2003). Commission Regulation (EC) No: 625/2003, p:31.

Anonymous, (2005a). Türkiye Cumhuriyeti Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı –Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü - Türk Gıda Kodeksi Distile Alkollü İçkiler Tebliği, Tebliğ No: 2005/11.

Anonymous, (2013). Türk Gıda Kodeksi Distile Alkollü İçkiler Analiz Metotları Tebliği (Tebliğ No: 2013/11).

Bulur A. (2010). Çukurova bölgesinde üretilen Boğmaların kimyasal bileşimleri üzerine bir araştırma- Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi Adana, Türkiye. 80s.

Cabaroglu, T. and Yilmaztekin, M. (2011). Methanol and major volatile compounds of Turkish Raki and effect of distillate source. *J Inst Brew*, 117(1), 98-105.

Capobianco, B. M., Mastello, R.B., Chin, S.T., Oliveira Ede, S., Cardeal, Zde, L., Marriott, P.J. (2015). Identification of aroma-active volatiles in banana Terra spirit using multidimensional gas chromatography with simultaneous mass spectrometry and olfactometry detection. *J Chromatogr A*, 1388. 227-235.

Cevik, C., Ozler, G.S., Arli, C., Tatar, I., Sargon, M.F., Zeren, C., Yonden, Z. and Akoglu, E. (2015). Electron microscopic examination of effects of bogma raki and walnut on cochlea: An experimental study. *Hum Exp Toxicol*, Vol. 34(3) 266-271.

Cortes, S., Gil, M.L. and Fernandez, E. (2005). Volatile composition of traditional and industrial orujo spirits. *Food Control*, 16, p.383-388.

Erten, H. ve Canbaş, A. (2003). Alkol fermantasyonu sırasında oluşan aroma maddeleri. *GIDA*, 28(6), 615-619.

- Fidan, I., ve Şahin İ. (1983). *Alkol ve Alkollü İçkiler Teknolojisi*. A.Ü.Z.F. Yayınları, Yayın No: 863, (304)s.
- Fidan, I., Denli, Y. ve Anlı, E. (1996). Türkiye’de üretilen rakılarda metanol miktarı üzerine bir araştırma. *GIDA*, 21(6), 415-418.
- Frienrich, J. E. and Acree, T. E., 1998. Gas chromatography olfactometry (GC/O) of dairy products. *Aust Dairy J*, 8, 235-241.
- Hayaloğlu, A. A. (2009). Volatile composition and proteolysis in traditionally produced mature Kashar cheese. *Int J Food Sci Technol*, 44: 1388-1394.
- Jurado, J.M., Ballesteros, O., Alcazar, A., Pablos, F., Martin, M.J., Vilchez, J.L. and Navalon, A. (2007). Characterization of aniseed-flavoured spirit drinks by headspace solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry and chemometrics - *Talanta* (72), 506–511.
- Nykanen, L., and Nykanen, I. (1991). *Distilled beverages*. Volatile compounds in foods & beverages, edited by Henk Maarse. Marcel Dekker, Inc. New York, p.547-580.
- Öncü F., Ögel K. ve Çakmak D. (2002) Alkol Kültürü-2: İçki Kültürü Ve Edebiyatta İçki, *Bağımlılık Dergisi*, 3(1), 31-36.
- Plutowska, B. And Wardencki, W. (2008). Application of gas chromatography–olfactometry (GC–O) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages – A review. *Food Chem*, 107. 449–463.
- Reineccius, G. (1994). *Source book of flavors*. Flavor and Fragrance Journal. UK. 9(6), 353-355.
- Van Den Dool, H. and Kratz, P.D. (1963). A generalization of the retention index system including linear programmed gas liquid partition chromatography. *J Chromatogr*, 11, 463-471.
- Yavaş, I. and Rapp, A. (1991). Gaschromatographisch-Massenspektrometrische Untersuchungen der Aromastoffe von Raki. *Dtsch Lebensmitt Rundsch*, 87, 41-45.
- Zeren, C., Aydin, Z., Yonden, Z., and Bucak, S. (2012). Composition of bogma raki, Turkish traditional alcoholic beverage. *J Food Technol*, 10, 87-91.



BİYOAKTİF GIDA BİLEŞENLERİNİN PÜSKÜRTEREK DONDURMA YÖNTEMİ İLE MİKROENKAPSÜLASYONU

Sultan Arslan Tontul*, Mustafa Erbaş

Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya, Türkiye

Geliş / *Received*: 13.08.2017; Kabul / *Accepted*: 11.11.2017; Online baskı / *Published online*: 07.12.2017

Arslan Tontul, S., Erbaş, M. (2018). Biyoaktif gıda bileşenlerinin püskürterek dondurma yöntemi ile mikroenkapsülasyonu, *GIDA* (2018) 43 (1): 11-20 doi: 10.15237/gida.GD17075

ÖZ

Mikroenkapsülasyon yöntemleri içerisinde püskürterek dondurma yöntemine olan ilgi, sağladığı birçok avantaj nedeniyle son zamanlarda giderek artmaktadır. Püskürterek dondurma yönteminde, taşıyıcı olarak hidrofobik karakterli lipid materyaller kullanılmaktadır. Erime sıcaklığına getirilerek sıvı forma geçirilen lipid matrisi içerisine biyoaktif gıda bileşeni eklenerek homojenize edilmekte ve püskürterek dondurma sisteminde erime sıcaklığının daha altındaki bir sıcaklıkta lipid damlacıklarının katılması sağlanarak mikroenkapsülasyon işlemi gerçekleştirilmektedir. Püskürterek dondurma yönteminde, taşıyıcı materyalin eritilmesi sırasında minimal bir sıcaklık uygulanmakta olup aktif materyal doğrudan yüksek sıcaklığa maruz kalmamaktadır. Bu nedenle son zamanlarda sıcaklık hassasiyeti yüksek biyoaktif gıda bileşenlerinin mikroenkapsülasyonunda püskürterek dondurma tekniği yaygın olarak tercih edilmektedir. Ayrıca püskürterek dondurma yönteminde taşıyıcı olarak kullanılan hidrofobik materyaller, mikrokapsüllerin mide sindiriminden etkilenmeden geçerek asıl etkili oldukları bölge olan kolonda salınımına imkan vermekte ve bu yolla biyoaktif gıda bileşenlerinin biyoyararlılığını da oldukça arttırmaktadır.

Anahtar kelimeler: Biyoaktif bileşik, püskürterek dondurma, mikroenkapsülasyon

THE MICROENCAPSULATION OF BIOACTIVE FOOD COMPONENTS BY SPRAY CHILLING METHOD

ABSTRACT

Recently, interest in spray chilling has been increasing due to the many advantages provided by microencapsulation methods. In the spray chilling method, hydrophobic lipid materials are used as carrier. The bioactive food ingredient is added into the lipid matrix which is brought to the melting temperature and homogenized. The microencapsulation process is operated by solidifying the lipid droplets at a temperature lower than the melting temperature in the spray chilling system.

Relatively low temperature is applied during melting of the carrier material and the active material is not exposed directly to high temperature in the spray chilling method. For this reason, it is widely preferred in the microencapsulation of heat sensitive bioactive food components. In addition, using of hydrophobic materials as carrier in the spray chilling method allow the microcapsules to pass through the gastric digestion and reach colon where they are most effective, thereby it increases the bioavailability of the bioactive food components.

Keywords: Bioactive component, spray chilling, microencapsulation

*Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ sltnarlan07@gmail.com,

☎ (+90) 242 310 6575

☎ (+90) 242 227 4564

GİRİŞ

Fonksiyonel özellikteki biyoaktif gıda bileşenlerinin, üretim aşamasında korunarak son ürüne taşınabilmesi ve depolama sırasında da stabilizasyonunun sağlanması son zamanlarda gıda sanayinde en çok dikkat edilen konuların başında gelmektedir. Bu amaçla uygulanan en yaygın yöntem ise mikroenkapsülasyon yöntemidir. Mikroenkapsülasyon, çekirdek materyal ve ortam koşulları arasında bir bariyer oluşturulması sonucu çevresel faktörlere karşı ekstra bir dayanım sağlayan ve son zamanlarda neredeyse her alanda kullanım imkanı bulan yaygın bir yöntemdir (Alvim vd., 2013). Biyoaktif gıda bileşenlerinin mikroenkapsülasyonunda en fazla kullanılan yöntemler ekstrüzyon, emülsiyon, dondurarak kurutma ve püskürterek kurutma (Rokka and Rantamaki 2010; Dianawati vd., 2013, 2016) olup bunların yanı sıra püskürterek dondurma (PD) yöntemi de yeni bir teknik olarak denenmektedir.

Gıda teknolojisi alanında sınırlı sayıda araştırmada kullanılmış olan PD tekniğinde, taşıyıcı olarak hidrofobik karakterli lipit materyaller kullanılmaktadır. Taşıyıcı materyallerin hidrofobik özellikleri, çekirdek materyalin stabilizasyonunda birçok avantaj sağlamaktadır. Üretilen hidrofobik mikrokapsüller gıda matrisinin hidrofilik ortamında, açılmadan stabilize olarak kalabilmektedir. Tüketildikten sonra midenin asitliğinden etkilenmeden ince bağırsağa geçen mikrokapsüller, bağırsaklarda lipaz enzimlerince parçalanarak taşıdıkları biyoaktif bileşenlerini serbest bırakabilmektedir (Okuro vd., 2013a). PD sistemi ile üretilen mikrokapsüllerin sindirim stabilitesinin araştırıldığı bir çalışmada, suda çözünür biyoaktif bileşenlerin, 3 saat sonunda sindirim sisteminde ihmal edilebilir bir seviyede salınma uğradığı ve bağırsak ortamında ise yaklaşık yarısının serbest kaldığı tespit edilmiştir (Park vd., 2014). Bu tür fiziksel avantajları nedeniyle püskürterek dondurma yöntemi ile üretilen mikrokapsüller, eczacılık çalışmalarında suda zayıf çözünürlüğe sahip farmasötiklerin katı partiküllerinin hazırlanması ve kontrollü salınımında da uzun süredir yaygın olarak kullanılmaktadır (Lopes vd., 2015). Tüm bunlara ilaveten püskürterek dondurma yöntemi, daha

fazla aktif materyal yüklenebilmesi, kolayca büyük ölçeğe dönüştürülebilmesi, üretim sırasında organik çözücüye ihtiyaç duyulmaması ve yüksek sıcaklık gerektirmemesi gibi birtakım avantajlara da sahiptir (Alvim vd., 2013; de Matos vd., 2017).

MİKROENKAPSÜLASYON

Mikroenkapsülasyon, genel olarak katı, sıvı veya gazların kimyasal ve fiziksel bozunmalara karşı korunması amacıyla koruyucu bir tabaka içerisinde tutuklanmasını amaçlayan fizikokimyasal ve mekanik bir proses olarak tanımlanmaktadır. Çeşitli mikroenkapsülasyon teknikleri ile üretilen mikrokapsül ise yarı geçirgen, yuvarlak şekilli ve çekirdek materyalini güçlü bir şekilde çevreleyen bir duvara sahip partikül olarak tanımlanmaktadır. Kapsül içerisinde tutuklanan madde çekirdek, aktif materyal, dolum veya iç faz olarak isimlendirilebilir. Mikrokapsül dışını saran kaplayıcı tabaka ise duvar materyali, taşıyıcı, membran ya da kaplama olarak adlandırılmaktadır. İşlem sonunda kullanılan tekniğe ve istenilen özelliklere göre 1 mm'den µm boyutuna kadar farklı büyüklüklerde kapsüller üretilebilmektedir. Günümüzde mikroenkapsülasyon uygulamaları; aktif materyalin kontrollü salınımı, sıvı aktif materyallerin toz forma dönüştürülmesi, istenmeyen aroma bileşenlerinin maskelenmesi, raf ömrünün uzatılması ve bileşiklerin besinsel kaybının azaltılması gibi farklı amaçlarla eczacılık, gıda, kimya, ziraat ve kozmetik gibi birçok alanda yaklaşık olarak 60 yıldır kullanılmaktadır (Desai and Park, 2005; Madene vd., 2006; Chambi vd., 2008; Burgain vd., 2011; Gamboa and Goncalves, 2011; Huq vd., 2013; Alvim vd., 2016; De Prisco and Mauriello, 2016). Özellikle gıda sanayi açısından mikroenkapsülasyon yöntemi, gıdaların biyoaktif bileşenlerce zenginleştirilmesi amacıyla yaygın olarak başvurulan bir yöntemdir.

Mikroenkapsülasyon işlemi, biyoaktif gıda bileşenlerinin stabilizasyonunu artırarak, toz formunda gıda sistemlerinde kullanımına imkan sağlayan etkili bir yöntemdir. Bu teknik ile çekirdek materyali yüksek nem, ısı, ışık, asitlik, oksijen varlığı veya sindirim enzimleri gibi olumsuz çevresel faktörlerden korunmaktadır (Huq vd., 2013; Matos vd., 2015). Biyoaktif gıda bileşenleri, bir takım özel ön işlemlerden

geçirilerek uygun kaplama materyali ile mikroenkapsüle edilmekte ve böylece proses ve depolama sırasında stabilizasyonu artırılabilir.

Mikroenkapsülasyonda kullanılacak taşıyıcı materyaller genellikle polimer yapılı, toksik ve anti-bakteriyel olmayan bileşiklerdir. Bu amaçla genellikle çözücü olarak organik çözücü gerektirmeyen, suda çözünebilir, doğal polisakkaritler veya proteinler kullanılmaktadır (Cook vd., 2012).

PÜSKÜRTEREK DONDURMA YÖNTEMİ

PD yöntemi ile biyoaktif gıda bileşenlerinin mikroenkapsüle edilmesi, diğer mikroenkapsülasyon yöntemlerine kıyasla nispeten daha yeni bir yöntemdir. Hidrofobik materyallerin taşıyıcı olarak kullanılmasıyla mikrokapsül üretimi fikri ilk olarak 1990 yılında bir patent ile ortaya atılmıştır (Chambi vd., 2008). PD, püskürterek kurutma tekniğine oldukça benzer bir yöntem olup; kullanılan taşıyıcı materyallerin fizikokimyasal özellikleri ve ısı transfer yönü temel farklılıkları oluşturmaktadır. Püskürterek kurutma yönteminde taşıyıcı materyal olarak genellikle suda çözünür polimerler kullanılırken, PD yönteminde ise hidrofobik karakterli materyaller kullanılmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılanlar; fosfolipitler, hidrojenize yağlar, mumlar, fitosteroller, yağ asitleri, polietilen glikol ve bunların karışımlarıdır (Chambi vd., 2008; Gamboa and Goncalves, 2011; Nedovic vd., 2011; Sillick and Gregson, 2012; Alvim vd., 2013; Okuro vd., 2013a). Püskürterek kurutma ve dondurma yöntemlerindeki bir başka farklılık ise ısı transfer yönüdür. Püskürterek kurutma yönteminde ısı akışı, havadan damlacıklara doğru gerçekleşirken, PD yönteminde ise damlacıklardan havaya doğru gerçekleşmektedir (Okuro vd., 2013a).

PD yöntemi (spray chilling) çoğu kaynakta püskürterek soğutma (spray cooling) yöntemi ile karıştırılmakla birlikte kullanılan taşıyıcı materyalin erime sıcaklığı farkı nedeniyle birbirlerinden ayrılmaktadır (Madene vd., 2006; Okuro vd., 2013a). PD yöntemi genellikle erime sıcaklığı 32-42°C arasında olan hidrofobik

taşıyıcılarla gerçekleştirilirken püskürterek soğutma yönteminde ise 45-122°C gibi daha yüksek erime sıcaklıklarına sahip taşıyıcılar tercih edilmektedir (Risch, 1995; Okuro vd., 2013a).

Günümüzde, PD yönteminden çoğunlukla eczacılık alanında yararlanılmakta olup vitamin, mineral, peptit, serbest amino asit, enzim ve aroma bileşikleri gibi biyoaktif gıda bileşenleri mikroenkapsüle edilebilmektedir. PD; endüstriyel çapta uygulanabilme, maliyetin düşük olması, etanol ve eter gibi organik çözücüler gerektirmeme ve düşük sıcaklıkta uygulama imkanları sağlaması gibi birtakım avantajlara sahip iken; aktif maddenin yüzeye sızabilmesi gibi birtakım dezavantajlara da sahip olduğu bildirilmektedir (Chambi vd., 2008; Pedrosa vd., 2012; Okuro vd., 2013a).

PD yöntemine olan ilgi son zamanlarda hızla artmakta olup, uygulama sırasında yüksek sıcaklıklara gerek kalmaması ve kaplama ajanlarının hidrofobik özellikleri nedeniyle biyoaktif gıda bileşiklerinin mikroenkapsülasyonunda kolayca kullanılabilmesi bildirilmektedir. Kullanılan hidrofobik bazlı kaplama materyalleri kimyasal özellikleri nedeniyle, üretim ve depolama sırasında aktif materyalin stabilizasyonunu arttırmaktadır. Ayrıca püskürterek dondurma ile üretilen mikrokapsüller suda çözünmedikleri için midenin asitlik koşullarından da etkilenmeden bağırsağa ulaşabilmekte ve bu bölgede bulunan lipaz enzimi varlığıyla ortama salınarak aktivite kazanmaktadır (Okuro vd., 2013a).

PD yöntemi temel olarak üç aşamada gerçekleşmektedir. Bunlar; biyoaktif gıda bileşeninin taşıyıcı materyal içerisinde dispersiyonunun sağlanması, hazırlanan emülsiyon çözeltisinin atomizasyonu ve bunu takiben damlacıkların katılaştırılması sonucu mikrokapsüllerin elde edilmesidir (Oxley, 2012).

Besleme Çözeltisinin Hazırlanması

PD yönteminde taşıyıcı olarak daha önceki bölümde bahsedildiği üzere hidrofobik karakterli lipid materyaller tercih edilmektedir. Yapılan çalışmalarda bu amaçla genellikle ucuz ve kolay rafine edilebilir bir yağ olan palm yağı tercih edilmektedir. Ayrıca palm yağı, doymuş ve

doymamış yağ asitlerini neredeyse eşit oranda içerdiğinden yarı katı bir forma sahip olup bu fiziksel özelliği ise kolay işlenebilirlik kazandırmaktadır (Mba vd., 2015; Oriani vd., 2016).

Kullanılan taşıyıcı materyalin erime sıcaklığı, mikroenkapsüle edilmesi amaçlanan aktif materyale uygun olarak belirlenmelidir. Ayrıca taşıyıcı materyal seçiminde, aktif materyalin salınımı, istenmeyen tadın baskılanması, sindirim iritasyonuna neden olmaması ve canlılığı arttırması da göz önünde bulundurulması gereken diğer faktörler arasındadır (Okuro vd., 2013a). PD yönteminde mikroenkapsüle edilecek biyoaktif materyal, probiyotikler veya suda çözünür vitaminler gibi sıcaklık hassasiyeti yüksek bileşenler ise üretim sırasında herhangi bir inaktivasyona veya degradasyona neden olmamak için erime sıcaklığı 32-48°C olan hidrojenize katı yağlar tercih edilmelidir (Okuro vd., 2013a). Ayrıca taşıyıcı materyalin erime sıcaklığının dar bir aralıkta olması, hızlı katılaşmayı ve homojen kapsül oluşumunu da sağlamaktadır (Okuro vd., 2013b). Kullanılan hidrofobik materyallerin erime sıcaklıkları, bitkisel yağların hidrojenizasyon derecesi kontrol edilerek istenilen aralığa ayarlanabilmektedir.

PD yönteminde, taşıyıcı materyal kendi erime sıcaklığının üstünde bir sıcaklıkta tamamen sıvı forma geçene kadar eritilmekte ve belirli oranlarda emülsifikatör eklenerek homojenize edilmektedir (Arslan-Tontul and Erbas, 2017). İşlem sırasında emülsifikatör eklenmesi elzem olmayıp yapılan çalışmalarda, emülsifiye edici ajan eklenerek üretilen mikrokapsüllerin daha stabil bir hal aldığı bildirilmektedir (Oxley, 2012; Okuro vd., 2013a). Bu amaçla PD çalışmalarında en yaygın kullanılan emülsifikatör ise lesitin olarak bildirilmektedir (Schubert vd., 2006; Okuro vd., 2013a).

Homojenizasyondan sonra erime sıcaklığının 5-10°C üzerine soğutulan emülsifiye edici ajan içerisine aktif materyal ilave edilerek ikinci bir homojenizasyon işlemi yapılmaktadır (Arslan-Tontul and Erbas, 2017). Homojenizasyon işlemine, mikrokapsüllerden daha küçük boyutta

emülsiyon damlacığı elde edilene kadar devam edilmektedir (Oxley, 2012).

Emülsiyon içerisine biyoaktif materyalin eklenmesinden sonra elde edilen çözeltinin fiziksel özellikleri doğrudan mikrokapsül yapısını etkilemektedir. Kullanılan besleme emülsiyonunun viskozitesinin düşük olması, işlem sonunda daha homojen yapıda ve küçük boyutlarda mikrokapsül üretimi sağlanmasına neden olmaktadır (Oxley, 2012; Okuro vd., 2013a). Yapılan bir çalışmada, farklı viskozite değerlerine sahip emülsiyonlar PD sisteminde mikroenkapsüle edilmiş ve en küçük mikrokapsül boyutlarının 55°C'de ve 24 cP civarındaki viskozite değerine sahip besleme emülsiyonunda elde edildiği bildirilmiştir (Lakkis, 2016). Ancak burada dikkat edilmesi gereken husus, emülsiyon viskozitesini düşürmek için besleme sıcaklığını yükseltmek gerekmekte ve bu durumda sıcaklık hassasiyetine sahip biyoaktif bileşenler inaktive olabilmekte veya parçalanabilmektedir (Oxley, 2012; Gavory vd., 2014).

Atomizasyon ve Katılaştırma

Besleme emülsiyonunun hazırlanmasından sonra PD sisteminde mikroenkapsülasyon işlemi gerçekleştirilmektedir. Nozul yardımı ile atomize edilen hidrofobik taşıyıcı-biyoaktif materyal karışımı, kurutma silindiri içerisinde lipit fazın kendi erime noktasının daha altında bir sıcaklık ile temas etmesi nedeniyle katılaşarak mikrokapsül haline gelmektedir. Hava akımı ile taşınarak ayırma siklonuna gelen katı mikrokapsüller, terminal hız farkı ile toplama kabında birikmektedir. Atomizasyon sırasında ortam atmosferi kullanıldığı gibi oksidasyonu engellemek amacıyla azot veya karbondioksitte kullanılabilir (Lakkis, 2016).

PD işlemi sonunda üretilen mikrokapsüllerin karakteristik özellikleri üzerine, kullanılan nozul tipi, tasarımı, çapı, dispersiyon sıcaklığı ve atomizasyon basıncı gibi faktörler etkili olmaktadır (Lopes vd., 2015). Mikrokapsül özellikleri ve nozul ilişkisinin incelendiği bir çalışmada, 0.7 mm nozul çapında ve 80°C dispersiyon sıcaklığında optimum partikül boyutunun elde edildiği rapor edilmiştir (Lopes

vd., 2015). Başka bir çalışmada ise PD işlemi sırasında atomizasyon basıncının ve besleme oranının değiştirilmesi ile partikül boyutunun 58-278 µm arasında ve verimin ise %81-96 arasında değişebildiği bildirilmiştir (Okuro vd., 2013a).

Atomizasyondan sonra, kurutma çemberinde soğuk havayla karşılaşan damlacıklar doğrudan katı hale geçmekte ve mikrokapsül formunu almaktadır. Bu katılaşma prosesi sonunda elde edilen mikrokapsüllerin morfolojik özellikleri doğrudan çemberin soğutma sıcaklığına ve taşıyıcı özelliklerine bağlı olarak değişmektedir (Oxley, 2012). Katılaşma sırasında erimiş materyal tekrar faz değiştirmek için ısı absorbe ettiğinden çekirdek daha az ısıya maruz kalmaktadır (Oxley, 2012).

PÜSKÜRTEREK DONDURMA YÖNTEMİ İLE ÜRETİLEN MİKROKAPSÜLLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ

PD yöntemi ile üretilen mikrokapsüllerin fiziksel ve kimyasal özellikleri mikroenkapsülasyon sırasında kullanılan proses parametrelerinden etkilenmektedir. Bu yöntemde aktif materyal yalnızca merkezde değil kapsülün her tarafına yayılmış bir biçimde bulunmakta olup bu tip mikrokapsüller daha çok matriks tipi mikrokapsüller olarak tanımlanmaktadır (Okuro vd., 2013b). Bu nedenle PD yöntemiyle üretilen mikrokapsüller yoğun ve ağır bir kapsül yapısına sahip olmaktadır. Bu yöntemle üretilen mikrokapsüllerin yığın yoğunluğunun, 0.78 g/mL olduğu (Sillick and Gregson, 2012) ancak bu değer püskürterek kurutma yöntemi ile üretilenlerde ise 0.42-0.62 g/mL arasında değiştiği tespit edilmiştir (Kingwatee vd., 2015).

Lipitler; α , β ve β' olmak üzere üç farklı kristal formda bulunmakta olup işlem sırasında faz değişimine uğrayarak birbirlerine dönüşebilmektedirler (Tulini vd., 2016). PD sırasında ortaya çıkan matriks görünümü soğuma hızı ile doğrudan ilişkili olup hızlı soğuyan lipit bazlı mikrokapsüllerde stabil olmayan α formunun, yavaş soğuyan kapsüllerde ise β formunun oluştuğu rapor edilmiştir (Okuro vd., 2013b). Bu nedenle genellikle pürüzsüz yüzeye sahip olan

mikrokapsüller, yavaş soğutma prosesinden dolayı boşluklu veya kusurlu bir görünüme sahip olabilmektedir (Lopes vd., 2015; de Matos vd., 2017). Lopes vd. (2015), farklı hızlarda soğutma uygulanan PD işlemi sırasında, minimum partikül boyutunun soğutma sıcaklığı 0°C'ye ulaşıldığında elde edildiğini belirlemiştir (Lopes vd., 2015).

PD sisteminde, mikrokapsül oluşumu sırasında püskürterek kurutma yönteminin aksine evaporasyon gerçekleşmediğinden mikrokapsüllerin boyutu doğrudan atomizasyondan etkilenmekte ve daha büyük boyutlu partiküller elde edilebilmektedir. Yapılan bir çalışmada püskürterek kurutma yöntemi ile üretilen mikrokapsüllerin boyutu 9.3 µm olarak ölçülmüşken bu değer PD yöntemi ile üretilenlerde ise 31.2 µm olarak belirlenmiştir (Alvim vd., 2016). Başka bir çalışmada ise mikrokapsüllerin partikül boyutunun 60.9-85.9 µm arasında değiştiği bildirilmiştir (Bampi vd., 2016).

PD yöntemi ile biyoaktif bileşenlerin mikroenkapsülasyonundaki en büyük avantaj yüksek enkapsülasyon etkinliği elde edilebilmesidir. PD yönteminde genellikle etkinliğin %80'in üzerinde olduğu rapor edilmektedir (Matos vd., 2015). Yapılan bir çalışmada askorbik asit PD yöntemi ile mikroenkapsüle edilmiş ve işlem sonunda mikroenkapsülasyon etkinliğinin yaklaşık %84 olduğu belirlenmiştir (Alvim vd., 2016). Probiyotik mikroorganizmaların mikroenkapsüle edildiği çalışmalarda da etkinliğin yaklaşık %90'dan fazla olduğu bildirilmektedir (Bampi vd., 2016; Arslan-Tontul and Erbas, 2017). Mikroenkapsülasyon etkinliğinde görülen bu farklı değerlerin nedeni ise kullanılan taşıyıcı materyal kombinasyonları olabilmektedir. Yapılan bir çalışmada taşıyıcı materyal içerisindeki oleik asit miktarının artmasının enkapsülasyon etkinliğini ve partikül boyutunu arttırdığı rapor edilmiştir (Gouin, 2004).

Mikroenkapsülasyon çalışmalarında elde edilen mikrokapsüllerin bir başka önemli fizikokimyasal özelliği ise nem içeriği ve su aktivitesi değerleridir. PD yöntemi ile üretilen mikrokapsüllerin su aktivitesi değeri yüksek ancak nem değeri ise genellikle düşüktür. Yapılan bir çalışmada

mikrokapsüllerin su aktivitesi değerinin 0.83, nem değerinin ise %4.4 olduğu tespit edilmiştir (Arslan-Tontul and Erbaş, 2017). Başka bir çalışmada ise mikrokapsüllerin su aktivitesi ve nem değerinin sırasıyla 0.60 ve %5 olduğu belirtilmiştir (Bampi vd., 2016). Genellikle mikrokapsüllerin nem içeriğinin iyi bir depolama stabilitesi açısından %5'in altında olması istenmektedir (Chavez and Ledebøer, 2007; Ghandi vd., 2012; Arslan vd., 2015). Bu nedenle PD yöntemi ile üretilen mikrokapsüller düşük nem içeriğine sahip olması açısından da ekstra bir avantaj kazanmaktadır.

PD yöntemi ile üretilen mikrokapsüllerin genellikle yüksek depolama stabilitesine sahip olduğu bildirilmektedir. Bunun nedeni ise mikrokapsülün dış katmanını oluşturan hidrofobik fazın depolama sırasında aktif materyal ile dış ortamın oksijen, su, H⁺ iyonu ve ışık gibi oksidatif stres etkenlerinden koruduğu ve diğer yöntemlere göre daha fazla dayanıklılık sağladığı rapor edilmektedir (Lahtinen vd., 2007; Okuro vd., 2013b; Bampi vd., 2016). Matos vd. (2015), PD yöntemi ile askorbik asit mikroenkapsüle etmiş ve depolama sırasında degradasyonun oldukça düşük seviyede kaldığını rapor etmiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise stearik asit ve ayçiçeği yağı kullanılarak üretilen mikrokapsüllerin buzdolabı sıcaklığında 7 ay depolanması sonucu biyoaktif materyalin %90'unun korunduğu bildirilmiştir (Gomes vd., 2013; Pelissari vd., 2016).

PD yöntemi ile üretilen mikrokapsüller hidrofobik karakterli dış katmana sahip olduğundan sulu ortamda çözünmezler ancak suya dayanıklı da değillerdir (Desai and Park, 2005; Lakkis, 2016). Bu nedenle bu mikrokapsüllerde aktif materyal eğer hidrofilik karakterli ise salınım sulu fazda hızla gerçekleşmektedir. Bunun nedeni ise daha önce de bahsedildiği üzere matriks tipindeki mikro-kapsüllerde aktif materyalin kapsülün yüzeyinde de bulunması ve sulu ortamda ki ozmotik stres, mekanik zedelenmeler ve difüzyon sonucu hızlıca serbest kalmasıdır (Gouin, 2004; Sartori vd., 2015). Ancak bu hızlı salınım taşıyıcı kombi-nasyonu değiştirilerek veya destek materyalleri ilave edilerek yavaşlatı-

labilmektedir. Yapılan bir çalışmada taşıyıcı içerisindeki oleik asit konsant-rasyonunun artırılması, sulu ortamdaki askorbik asit salınımını azalttığı bildirilmiştir (Sartori vd., 2015).

PÜSKÜRTEREK DONDURMA UYGULAMALARI

PD yöntemi, yüksek koruyucu etkisi nedeniyle mikroenkapsülasyon çalışmalarında yeni bir teknik olarak son zamanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Farklı gıda bileşenlerinin bu yöntemle mikroenkapsüle edilmesi ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmaların bazılarında aktif materyal olarak likopen, zencefil oleoresini, gallik asit, askorbik asit, glikoz, serbest amino asitler, mineraller ve aroma bileşenleri seçilmiş olup taşıyıcı materyal olarak ise fırıncılık yağı, palm yağı, soya yağı, hidrojenize soya yağı, oleik asit ve stearik asit kullanılmıştır (Gibbs vd., 1999; Chambi vd., 2008; Leonel vd., 2010; Ribeiro vd., 2012; Alvim vd., 2016; Consoli vd., 2016; Oriani vd., 2016; Pelissari vd., 2016). Bu yöntem ile üretilen ve biyoaktif gıda bileşeni içeren mikrokapsüller, fırıncılık ürünlerinde, hazır çorba karışımlarında ve yağlı gıdalarda kullanılabilir (Madene vd., 2006).

Aroma bileşenlerinin mikroenkapsülasyonu genellikle püskürterek kurutma yöntemi kullanılarak yapılmakta olup üretim sırasında uygulanan yüksek sıcaklıklar aroma kayıplarına neden olduğu için etkinliği düşürmektedir. Bu nedenle son zamanlarda PD yöntemi, aroma bileşenlerinin mikroenkapsülasyonunda kullanılmaya başlanmıştır (Reineccius, 2004; Oxley, 2012). Yapılan çalışmalarda tarçın ekstraktının taşınması ve depolanmasını kolaylaştırmak için toz forma dönüştürmek ve içerisindeki aroma bileşenlerinin kaybını engellemek amacıyla PD sisteminde başarıyla mikroenkapsüle edilmiştir (Oriani vd., 2016; Tulini vd., 2016; Tulini vd., 2017). Mikroenkapsülasyon sonunda aktif materyalin miktarında 90 gün boyunca istatistiksel olarak önemli bir azalma meydana gelmemiştir (Tulini vd., 2016; Tulini vd., 2017).

Yapılan çalışmalarda protein hidrolizatlarının acı tadının bastırılarak gıdalara ilave edilmesi ve enzimlerin stabilizasyonunun artırılması amacıyla

PD yönteminin denendiği görülmektedir. Rapor edilen farklı çalışmalarda albümin, β -galaktozidaz ve inülin bu yöntem kullanılarak mikroenkapsüle edilmiş ve böylece dayanımı arttırılmıştır (Kwak vd., 2001; Maschke vd., 2007; Di Sabatino vd., 2012; Salvim vd., 2015).

PD yöntemi ile mikroenkapsüle edilen bir başka önemli aktif materyal ise probiyotik mikroorganizmalardır. Probiyotik mikroorganizmalar, mikroenkapsülasyon sırasındaki yüksek sıcaklıklardan kolayca etkilenerek inaktive olabilmektedir. PD yönteminde minimal bir ısı işlem uygulandığından probiyotik mikroorganizmalar yüksek canlılık oranlarıyla mikroenkapsüle edilebilmektedir. Ayrıca bu yöntemle üretilen mikrokapsüllerin salınım mekanizması da probiyotik mikroorganizmalar açısından oldukça elverişlidir (Okuro vd., 2013a). Yapılan bir çalışmada *L. acidophilus* ve *B. lactis* PD yöntemi ile mikroenkapsüle edilmiş ve tahıl barları üretiminde kullanılmıştır. Tahıl barları buzdolabı şartlarında 105 gün depolanmış ve süre sonunda *L. acidophilus* ve *B. lactis* sayısının sırasıyla 7.8 ve 8.1 log kob/g olduğu tespit edilmiştir (Bampi vd., 2016). Okuro vd. (2013b), *in vitro* sindirim şartlarında PD yöntemiyle mikroenkapsüle edilen probiyotiklerin canlılığının %60 oranında korunduğu ancak serbest hücrelerin tamamının öldüğünü tespit etmiştir. Probiyotik mikroorganizmaların yüksek etkinlikle mikroenkapsüle edildiği farklı çalışmalarda da sindirim sisteminde önemli derecede korunduğu bildirilmiştir (Pedroso vd., 2012; Pedroso vd., 2013).

PD yöntemiyle üretilen mikrokapsüllerin ürünlere ilave edilerek gıdaların biyoaktif bileşen miktarının arttırılması ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde PD sistemi ile askorbik asit mikroenkapsüle edilmiş ve bisküvi üretiminde kullanım imkanları araştırılmıştır (Alvim vd., 2016). Başka bir çalışmada ise probiyotik mikroorganizmaların kek pişirme sıcaklığında canlılıklarını koruyabilmesi amacıyla püskürterek dondurma ve kurutma teknikleri kombine olarak kullanılmış ve çift katlı kaplama tekniği ile mikroenkapsülasyon gerçekleştirilmiştir. Kek hamuruna ilave edilen mikrokapsüllerden *L. acidophilus* ve *S. boulardii* hücre

canlılıklarının yaklaşık yarısının pişirme sırasında korunduğu tespit edilmiştir (Arslan-Tontul, 2017). Et ürünlerinin antioksidan bileşenlerce zenginleştirilmesinin amaçlandığı bir çalışmada ise PD yöntemiyle mikroenkapsüle edilen askorbik asit, sosis hamuruna ilave edilmiştir (De Matos vd., 2015).

SONUÇ

Günümüz gıda biliminin temel araştırma konularından birisi biyoaktif gıda bileşenlerinin fonksiyonel özelliklerinin korunarak son ürüne aktarılabilmesidir. Ayrıca bu son ürünün tüketiminden sonra vücutta uğradığı değişiklikler ve sindirimin biyoaktif bileşenler üzerindeki etkileri de önemli araştırma konuları arasındadır. Bu nedenle püskürterek dondurma gibi yeni mikroenkapsülasyon yöntemleri önem kazanmaktadır.

Püskürterek dondurma yöntemi biyoaktif gıda bileşenlerinin yüksek etkinlikle mikroenkapsüle edilebilmesi ve aktif materyalin stabilitesini oldukça yüksek oranda koruması nedenleriyle diğer mikroenkapsülasyon yöntemlerine kıyasla öne çıkmaktadır. Ayrıca püskürterek dondurma yönteminde taşıyıcı olarak kullanılan hidrofobik materyal, mikrokapsüllerin mide sindiriminden etkilenmeden geçerek asıl etkili oldukları bölge olan kolonda salınımına imkan verdiğinden biyoaktif gıda bileşenlerinin biyoyararlılığını da oldukça arttırmaktadır. Tüm bunlara ilaveten püskürterek dondurma tekniğinin kolayca optimize edilebileceği düşünülürse diğer mikroenkapsülasyon teknikleri ile kombine bir şekilde kullanımı daha dayanıklı mikrokapsüllerin üretimine de imkan tanıyabilecektir.

KAYNAKLAR

Alvim, I.D., De Souza, F.D., Koury, I.P., Jurt, T., Dantas, F.B.H. (2013). Use of the spray chilling method to deliver hydrophobic components: physical characterization of microparticles. *Food Sci Technol*, 33: 34-39.

Alvim, I.D., Stein, M.A., Koury, I.P., Dantas, F.B.H., Cruz, C. (2016). Comparison between the spray drying and spray chilling microparticles contain ascorbic acid in a baked product application. *Food Sci Technol*, 65: 689-694.

- Arslan-Tontul, S. (2017). Probiyotik mikroorganizmaların püskürterek dondurma ve kurutma teknikleriyle mikroenkapsüle edilerek probiyotik kek üretiminde kullanım imkanlarının araştırılması, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Antalya. 159 s.
- Arslan-Tontul, S., Erbaş, M. (2017). Single and double layered microencapsulation of probiotics by spray drying and spray chilling. *Food Sci Technol*, 81: 160-169.
- Arslan, S., Erbaş, M., Tontul, I., Topuz, A. (2015). Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying. *Food Sci Technol*, 63(1): 685-690.
- Bampi, G.B., Backes, G.T., Cansian, R.L., De Matos, F.E., Ansolin, I.M.A., Poletto, B.C., Corezzolla, L.R., Favaro-Trindade, C.S. (2016). Spray chilling microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* and its use in the preparation of savory probiotic cereal bars. *Food Biopro Technol*, 9(8): 1422-1428.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *J Food Eng*, 104(4): 467-483.
- Chambi, H.N.M., Alvim, I.D., Barrera-Arellano, D., Grosso, C.R.F. (2008). Solid lipid microparticles containing water-soluble compounds of different molecular mass: Production, characterisation and release profiles. *Food Res Int*, 41(3): 229-236.
- Chavez, B.E., Ledebor, A.M. (2007). Drying of probiotics: Optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Drying Technol*, 25(7-8): 1193-1201.
- Consoli, L., Grimaldi, R., Sartori, T., Menegalli, F.C., Hubinger, M.D. (2016). Gallic acid microparticles produced by spray chilling technique: Production and characterization. *Food Sci Technol*, 65: 79-87.
- Cook, M.T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., Khutoryanskiy, V.V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *J Control Release*, 162(1): 56-67.
- De Matos, F.E., Comunian, T.A., Thomazini, M., Favaro-Trindade, C.S. (2017). Effect of feed preparation on the properties and stability of ascorbic acid microparticles produced by spray chilling. *Food Sci Technol*, 75: 251-260.
- De Matos, F.E., Jr., Thomazini, M., Trindade, M.A., Fávoro-Trindade, C.S. (2015). Application of free or encapsulated Vitamin C to chicken frankfurter sausage by spray chilling: Physicochemical characteristics, stability and sensory acceptance. *Braz J Food Technol*, 18(4): 322-331.
- De Prisco, A., Mauriello, G. (2016). Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool. *Trend Food Sci Technol*, 48: 27-39.
- Desai, K.G.H., Park, H.J. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technol*, 23(7): 1361-1394.
- Di Sabatino, M., Albertini, B., Kett, V.L., Passerini, N. (2012). Spray congealed lipid microparticles with high protein loading: Preparation and solid state characterisation. *Eur J Pharm Sci*, 46(5): 346-356.
- Dianawati, D., Mishra, V., Shah, N.P. (2013). Survival of *Bifidobacterium longum* 1941 microencapsulated with proteins and sugars after freezing and freeze drying. *Food Res Int*, 51(2): 503-509.
- Dianawati, D., Mishra, V., Shah, N.P. (2016). Survival of microencapsulated probiotic bacteria after processing and during storage: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 56(10): 1685-1716.
- Gamboa, O.D., Goncalves, L.G., Grosso, C. F. (2011). Microencapsulation of tocopherols in lipid matrix by spray chilling method. 11th International Congress on Engineering and Food, 22-26 May 2011, Athens, Greece, 1732-1739 p.
- Gavory, C., Abderrahmen, R., Bordes, C., Chaussy, D., Belgacem, M.N., Fessi, H., Briancon, S. (2014). Encapsulation of a pressure sensitive adhesive by spray-cooling: Optimum formulation and processing conditions. *Adv Powder Technol*, 25(1): 292-300.

- Ghandi, A., Powell, I.B., Chen, X.D., Adhikari, B. (2012). The effect of dryer inlet and outlet air temperatures and protectant solids on the survival of *Lactococcus lactis* during spray drying. *Drying Technol*, 30(14): 1649-1657.
- Gibbs, B.F., Kermasha, S., Alli, I., Mulligan, C.N. (1999). Encapsulation in the food industry: a review. *Int J Food Sci Nutr*, 50(3): 213-224.
- Gomes, G.V.D., Borrin, T.R., Cardoso, L.P., Souto, E., De Pinho, S.C. (2013). Characterization and shelf life of beta-carotene loaded solid lipid microparticles produced with stearic acid and sunflower oil. *Braz Archives Biol Technol*, 56(4): 663-671.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation. *Trend Food Sci Technol*, 15(7): 330-347.
- Huq, T., Khan, A., Khan, R.A., Riedl, B., Lacroix, M. (2013). Encapsulation of probiotic bacteria in biopolymeric system. *Critic Rev Food Sci Nutr*, 53(9): 909-916.
- Kingwatee, N., Apichartsrangkoon, A., Chaikham, P., Worametrachanon, S., Techarung, J., Pankasemsuk, T. (2015). Spray drying *Lactobacillus casei* 01 in lychee juice varied carrier materials. *Food Sci Technol*, 62(1): 847-853.
- Kwak, H.S., Ihm, M.R., Ahn, J. (2001). Microencapsulation of beta-galactosidase with fatty acid esters. *J Dairy Sci*, 84(7): 1576-1582.
- Lahtinen, S.J., Ouwehand, A.C., Salminen, S.J., Forssell, P., Myllarinen, P. (2007). Effect of starch- and lipid-based encapsulation on the culturability of two *Bifidobacterium longum* strains. *Lett Appl Microbiol*, 44(5): 500-505.
- Lakkis, J.M. (2016). Encapsulation and controlled release in bakery applications. In: *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*, Lakkis, J.M. (ed.). Wiley-Blackwell, Boca Raton, pp. 204-235.
- Leonel, A.J., Chambi, H.N.M., Barrera-Arellano, D., Pastore, H.O., Grosso, C.R.F. (2010). Production and characterization of lipid microparticles produced by spray cooling encapsulating a low molar mass hydrophilic compound. *Cien Tecnol Alimentos*, 30(1): 276-281.
- Lopes, J.D., Grosso, C.R.F., Calligaris, G.D., Cardoso, L.P., Basso, R.C., Ribeiro, A.P.B., Efraim, P. (2015). Solid lipid microparticles of hardfats produced by spray cooling as promising crystallization modifiers in lipid systems. *Eur J Lipid Sci Technol*, 117(11): 1733-1744.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release - A review. *Int J Food Sci Technol*, 41(1): 1-21.
- Maschke, A., Becker, C., Eyrich, D., Kiermaier, J., Blunk, T., Gopferich, A. (2007). Development of a spray congealing process for the preparation of insulin-loaded lipid microparticles and characterization thereof. *Eur J Pharm Biopharm*, 65(2): 175-187.
- Matos, F.E., Di Sabatino, M., Passerini, N., Favaro-Trindade, C.S., Albertini, B. (2015). Development and characterization of solid lipid microparticles loaded with ascorbic acid and produced by spray congealing. *Food Res Int*, 67: 52-59.
- Mba, O.I., Dumont, M.J., Ngadi, M. (2015). Palm oil: Processing, characterization and utilization in the food industry - A review. *Food Biosci*, 10: 26-41.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Proc Food Sci*, 1: 1806-1815.
- Okuro, P.K., De Matos Junior, F.E., Favaro-Trindade, C.S. (2013a). Technological challenges for spray chilling encapsulation of functional food ingredients. *Food Technol. Biotechnol*, 51(2): 171-182.
- Okuro, P.K., Thomazini, M., Balieiro, J.C.C., Liberal, R., Favaro-Trindade, C.S. (2013b). Co-encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability. *Food Res Int*, 53(1): 96-103.
- Oriani, V.B., Alvim, I.D., Consoli, L., Molina, G., Pastore, G.M., Hubinger, M.D. (2016). Solid lipid microparticles produced by spray chilling technique to deliver ginger oleoresin: Structure and compound retention. *Food Res Int*, 80: 41-49.

- Oxley, J.D. (2012). Spray cooling and spray chilling for food ingredient and nutraceutical encapsulation. In: *Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals*, Garti, N., Bhandari, B. (Eds.). Academic Press, Boca Raton, pp. 110-130.
- Park, K.M., Sung, H., Choi, S.J., Choi, Y.J., Chang, P.S. (2014). Double-layered microparticles with enzyme-triggered release for the targeted delivery of water-soluble bioactive compounds to small intestine. *Food Chem*, 161: 53-59.
- Pedroso, D.D., Thomazini, M., Heinemann, R.J.B., Favaro-Trindade, C.S. (2012). Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling. *Int Dairy J*, 26(2): 127-132.
- Pedroso, D.L., Dogenski, M., Thomazini, M., Heinemann, R.J.B., Favaro-Trindade, C.S. (2013). Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* and *Lactobacillus acidophilus* in cocoa butter using spray chilling technology. *Braz J Microbiol*, 44(3): 777-783.
- Pelissari, J.R., Souza, V.B., Pigoso, A.A., Tulini, F.L., Thomazini, M., Rodrigues, C.E.C., Urbano, A., Favaro-Trindade, C.S. (2016). Production of solid lipid microparticles loaded with lycopene by spray chilling: Structural characteristics of particles and lycopene stability. *Food Bioprocess Technol*, 98: 86-94.
- Reineccius, G.A. (2004). The spray drying of food flavors. *Drying Technol*, 22(6): 1289-1324.
- Ribeiro, M., Arellano, D.B., Grosso, C.R.F. (2012). The effect of adding oleic acid in the production of stearic acid lipid microparticles with a hydrophilic core by a spray-cooling process. *Food Res Int*, 47(1): 38-44.
- Risch, S.J. (1995). Encapsulation: Overview of uses and techniques. In: *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*, Risch, S.J., Reineccius, G.A. (ed). American Chemical Society, Washington, pp. 2-7.
- Rokka, S., Rantamäki, P. (2010). Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *Eur Food Res Technol*, 231(1): 1-12.
- Salvim, M.O., Thomazini, M., Pelaquim, F.P., Urbano, A., Moraes, I.C.F., Favaro-Trindade, C.S. (2015). Production and structural characterization of solid lipid microparticles loaded with soybean protein hydrolysate. *Food Res Int*, 76: 689-696.
- Sartori, T., Consoli, L., Hubinger, M.D., Menegalli, F.C. (2015). Ascorbic acid microencapsulation by spray chilling: Production and characterization. *Food Sci Technol*, 63(1): 353-360.
- Schubert, M.A., Harms, M., Muller-Goymann, C.C. (2006). Structural investigations on lipid nanoparticles containing high amounts of lecithin. *Eur J Pharm Sci*, 27(2-3): 226-236.
- Sillick, M., Gregson, C.M. (2012). Spray chill encapsulation of flavors within anhydrous erythritol crystals. *Food Sci Technol*, 48(1): 107-113.
- Tulini, F.L., Souza, V.B., Echalar-Barrientos, M.A., Thomazini, M., Pallone, E., Favaro-Trindade, C.S. (2016). Development of solid lipid microparticles loaded with a proanthocyanidin-rich cinnamon extract (*Cinnamomum zeylanicum*): Potential for increasing antioxidant content in functional foods for diabetic population. *Food Res Int*, 85: 10-18.
- Tulini, F.L., Souza, V.B., Thomazini, M., Silva, M.P., Massarioli, A.P., Alencar, S.M., Pallone, E., Genovese, M.I., Favaro-Trindade, C.S. (2017). Evaluation of the release profile, stability and antioxidant activity of a proanthocyanidin-rich cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) extract co-encapsulated with alpha-tocopherol by spray chilling. *Food Res Int*, 95: 117-124.

**SAKAROZ İKAMESİ OLARAK FARKLI TİP VE DÜZEYLERDE
ŞEKER OTU (*STEVIA REBAUDIANA* BERTONI) BAZLI TATLANDIRICI
KULLANILMASININ BİSKÜVİ NİTELİKLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Emre Giritlioğlu, Halef Dizlek*

Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Karacaoğlan Yerleşkesi
E Blok, Osmaniye, Türkiye

Geliş / Received: 13.08.2017; Kabul / Accepted: 14.11.2017; Online baskı / Published online: 07.12.2017

Giritlioğlu, E., Dizlek, H. (2018). Sakaroz ikamesi olarak farklı tip ve düzeylerde şeker otu (*Stevia rebaudiana* Bertoni) bazlı tatlandırıcı kullanılmasının bisküvi nitelikleri üzerine etkileri. *GIDA* (2018) 43 (1): 21-33 doi: 10.15237/gida.GD17076

ÖZ

Bu çalışmada, kinoa unlu bisküvi üretiminde sakaroz ikamesi olarak farklı tip ve düzeylerde şeker otu (*Stevia rebaudiana* Bertoni) bazlı tatlandırıcı kullanılarak yeni bir bisküvi formülünün geliştirilmesi ve incelenen etmenlerin mamul ürün nitelikleri üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında; en uygun şeker otu tozu formu (saf stevia ekstrakt tozu [SET] veya stevia ticari preparat [STP]) ve kullanım düzeyi belirlenerek çölyak ve şeker hastalarına alternatif bir ürün sunulması hedeflenmiştir. Üretilen bisküvi örneklerinin önemli fiziksel, kimyasal, renk, tekstürel ve duyuşsal özellikleri belirlenmiştir. Araştırma sonucunda; uygun şeker otu formunun STP, bunun en uygun kullanım düzeyinin ise %40 olduğu saptanmıştır. Bisküvi üretiminde STP'nin sakaroz ikamesi olarak kullanılabilmesi kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Şeker otu, sakaroz, ikame, bisküvi, ürün nitelikleri

**EFFECTS OF STEVIA (*STEVIA REBAUDIANA* BERTONI) BASED
SWEETENER AS SUCROSE SUBSTITUTION ON BISCUIT
QUALITIES AT DIFFERENT TYPES AND LEVELS**

ABSTRACT

In this study, it was aimed to develop a new biscuit formula using sweeteners based on stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) at different types and levels as sucrose substitutes in the production of quinoa flour biscuits and to determine the effects of the factors investigated on the finished product qualities. Within the scope of the study, it has been aimed to present an alternative product to celiac and diabetic patients by determining the most appropriate form of stevia powder (pure extract powder [SET] or commercial preparation [STP]), and level of usage. Significant physical, chemical, color, textural and sensory properties of biscuit samples produced was determined. As a result of the research; it has been determined that the appropriate stevia form is STP, and the most suitable level of use is 40%. It has been reach the conclusion that STP can be used as a sucrose substitute in the production of biscuits.

Keywords: Stevia, sucrose, substitution, biscuit, product characteristics

* Yazışmalarda sorumlu yazar / Corresponding author

✉ hdizlek@osmaniye.edu.tr,

☎ (+90) 328 827 1000 / 3655

☎ (+90) 328 825 0097

GİRİŞ

Bileşiminde gluten protein kompleksini içermediği için çölyak hastalarının tüketebileceği ürün kategorisinde yer alan, pseudocereal (tahıl benzeri ürün) grubuna giren bir bitki olan kinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), Birleşmiş Milletler (BM) tarafından gıda yoksulluğunu azaltmak için alternatif gıda olarak seçilmiş ve bu ürüne olan ilgiyi arttırmak amacıyla BM, 2013 yılını “Uluslararası Kinoa Yılı” olarak ilan etmiştir (FAO, 2014). Polifenol, fitosterol, flavonoid tabiatında bileşenler ihtiva eden ve nutrasötik faydaları bulunan kinoanın, son derece besleyici ve fonksiyonel bir gıda hammaddesi olduğu bildirilmektedir (Johnson, 1990; Valencia-Chamorro, 2003; James, 2009).

Şeker otu (*Stevia rebaudiana* Bertoni) yapraklarından elde edilen steviol glikozitler yüksek tatlılığa sahip, doğal bileşiklerdir. Bu glikozitler; steviosit, rebaudiosit A, B ve C olarak isimlendirilir ve suyla kolayca ekstrakte edilip saflaştırılmakta, sonra konsantre edilmek ve kurutulmak suretiyle üretilmektedir (Carakostas et al., 2008; Zahn et al., 2013). Kalorisiz bir tatlandırıcı olan steviol glikozitler, sakarozu göre 200-300 kat daha fazla tatlı olup (Prakash et al., 2008), birçok ülkede doğal tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır (Barba et al., 2014). Bu glikozitleri diğerlerinden farklı kılan başlıca özellikler; ısı ve pH stabilitesinin yüksek olması, kimyasal içermemesi, doğal bir biçimde elde edilmesi, pişirme ve fırın stabilitesinin iyi olması, ağızda acımsı-metalimsi tat bırakmaması ve lif içeriğinin yüksek olmasıdır (Soliman, 1997). Anılan bu özelliklerinden dolayı steviol glikozitler bütün gıdalarda ve özellikle unlu mamullerde sakaroz ikamesi olarak kullanım alanı bulmuştur (Kinghorn et al., 2001; Pól et al., 2007; Zahn et al., 2013). İnsülin metabolizmasını etkilemeden kan şekeri düzeyini düşüren ve bu nedenle şeker hastaları için tavsiye edilen şeker otu (Lisak et al., 2011), vücut tarafından tamamen metabolize edilir. Steviol glikozitlerin, diyabetin yanı sıra obezite, kalp hastalığı ve diş çürümesi gibi rahatsızlıkları olan bireyler için iyi bir ürün olduğu bildirilmektedir (Ghanta et al., 2007; Manisha et al., 2012). Chatsudthipong ve Muanprasat (2009), söz konusu glikozitlerin anti-hipertansiyon, anti-

hipertansiyon, anti-inflamatuar, anti-tümör, anti-ışhal ve idrar söktürücü etkilerinin bulunduğunu bildirmişlerdir.

Sakaroz ikamesi olarak %25, %33, %50 ve %100 oranında şeker otu, ksilitol, maltitol, izomalt, mannitol ve sukraloz kullanılarak top kek üretimi yapılan bir çalışmada (Edelstein et al., 2007), söz konusu tatlandırıcı bileşimi ile üretilen top keklerin sakaroz ile üretilene göre hacim, tekstür ve duysal özellikler bakımından daha iyi niteliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Ulusoy (2011), bisküvinin sakaroz içeriğinin şeker otu esaslı ticari bir tatlandırıcı (Truvia) kullanılarak azaltılmasının bisküvinin kalitesi ve akrilamid içeriği üzerine etkilerini araştırmıştır. Çalışmada; kontrol, sakaroz içeriği %25 ve %50 azaltılmış örneklerin nem değerleri, şeker otu bazlı tatlandırıcı miktarı arttıkça artmıştır. Truvia miktarı arttıkça bisküvilerin sertliği azalmış, ancak kırılabilirliği artmıştır. Üretilen bisküvilerin L* ve b* değerleri arasında büyük bir farklılık oluşmamış, tatlandırıcının kullanım miktarının artmasıyla a* değeri azalmıştır. Örneklerin şeker otu bazlı tatlandırıcı miktarı arttıkça çap değerleri azalırken, kalınlık değerleri artmıştır. Duysal olarak renk, lezzet, ağızda dağılıma ve genel beğeni açısından sakaroz ve sakaroz + tatlandırıcı içeren formüllerin birbirinden farklı olmadıkları kanısına varılmıştır. Ticari bir tatlandırıcı preparatı olan Splenda ve bünyesinde dolgu maddesi de ihtiva eden şeker otu ekstrakt tozu (SET) kullanılarak üretilen krep örneklerinin tekstür, renk ve duysal analizlerinin değerlendirildiği bir çalışmada (Waldron et al., 2013), Splenda kullanılan formülün tat ve dokusu duysal olarak daha çok beğenilirken, SET’in kullanıldığı formül daha az beğeni almıştır. Tekstür analiz sonuçlarına göre SET kullanılan kreplerin sertliği kontrol örneğine göre düşük bulunmuş, Splenda kullanılan krepler ise daha sert bir yapıya sahip olmuştur. Muffin üretiminde bazı liflerin şeker otu tatlılık bileşeni olan rebaudiosit A ile kombine edilerek sakaroz ile değişik oranlarda yer değiştirildiği bir çalışmada (Zahn et al., 2013), rebaudiosit A’nın farklı lifler ile kombine edilerek eklenmesinin muffin örneklerinin nem içeriği, parlaklığı ve kek içi sertliğinin artmasına, hacminin azalmasına neden olduğu belirlenmiştir. Duysal analiz sonuçlarına

göre, muffin tipi keklerde rebaudiosit A'nın kullanılabilmesi kanısına varılmıştır. Kulthe et al. (2014), şeker otu yaprak tozunun kullanım miktarı arttıkça bisküvilerin nem miktarının azaldığını, kül miktarının değişmediğini, lif ve karbonhidrat miktarının arttığını bildirmiştir. Araştırmacılar, en yüksek genel beğenilirliğe sahip bisküvi örneğinin bileşiminde %20 şeker otu yaprak tozu kullanılan örnek olduğunu bildirmişlerdir. Vatankhah et al. (2015)'in yaptığı çalışmada, bisküvi üretiminde sakaroz ikamesi olarak %0, %50 ve %100 şeker otu (steviosit) kullanılmıştır. Steviosit kullanımı bisküvilerin kül, yağ ve protein içeriği ile hacim ve özgül hacim değerleri üzerinde önemli bir etki yapmamış, buna karşın pH ve nem içeriğini etkilemiştir. Steviosit miktarı arttıkça bisküvi örneklerinin çapı, yayılma oranı, sertliği ve a* değeri azalmış, L* değeri artmış, b* değeri ise değişmemiştir. %50 sakaroz + %50 steviosit kombinasyonu ile üretilen bisküvi, duyu değerlendirme sonucunda lezzet ve genel kabul edilebilirlik bakımından en iyi sonuçları almıştır.

Bu çalışmada klasik tip bisküvi üretiminde kullanılan buğday unu ve sakaroz yerine kinoa unu ve şeker otu kullanılarak yeni bir bisküvi formülünün geliştirilmesi ve şeker otu bazlı tatlandırıcıların (saf ekstrakt tozu [SET] veya ticari preparat [STP]) sakarozu ne ölçüde ikame ettiğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Araştırmada; en uygun şeker otu tozu formu ve kullanım düzeyi belirlenerek çölyak ve şeker hastalarına alternatif bir ürün sunulması hedeflenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Araştırmada, Bora Tarım Ürünleri Gıda San. ve Tic. Ltd. Şirketinden (İstanbul) temin edilen kinoa unu (un), Kardel Gıda Pazarlama Ltd. Şirketinden (İstanbul) temin edilen "Fibrelle" marka Saf Şeker Otu Ekstraktı Tozu (=Stevia Ekstrakt Tozu [SET]) ve Şeker Otu Ticari Preparatı (=Stevia Ticari Preparatı [STP]), Katsan Gıda San. ve Tic. Ltd. Şirketinden (İstanbul) temin edilen sakaroz (pudra şekeri), yağsız süt tozu, sodyum bikarbonat, Elita Gıda San. ve Tic. A. Ş.'den (Adana) temin edilen "Sunar" marka dörtte üç yağlı (bitkisel) margarin, Saray Bisküvi ve Gıda San. A. Ş.'den (Karaman) temin edilen etil vanilin,

amonyum bikarbonat, Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi (OKÜ) kampüsü şebeke suyundan temin edilen içme suyu, yerel bir marketten temin edilen tuz, Arosel Gıda Katkı Maddeleri ve Makine Sanayi Dış Tic. Ltd. Şirketinden (İstanbul) temin edilen "Herbacel Classic Plus HF06" marka yulaf lifi ve "Herbacel Classic Plus EF01" marka bezelye lifi kullanılmıştır. Deneme bisküvi hamuru formülünde temel bileşenler olan kinoa unu, SET/STP, margarin, yulaf ve bezelye liflerinin bazı temel özellikleri şu şekildedir: Kinoa ununun nem (AACCI Metot 44-19.01), kül (AACCI Metot 08-01.01), protein (AACCI Metot 46-09.01; AACCI, 2000) ve ham yağ miktarlarının (Randall, 1974) sırasıyla %10.77, %2.3, %14 ve %0.44 olduğu belirlenmiştir. Bu unun gluten içermemesine de bağlı olarak sedimantasyon (AACCI Metot 56-60.01; AACCI, 2000) ve gecikmeli sedimantasyon değerlerinin (Greenaway et al., 1965) nispeten düşük olduğu saptanmıştır; sırasıyla 20.3 ve 18 mL. Fibrelle SET "%99 saflıkta şeker otu (rebaudiosit A) ekstraktı tozundan", STP ise; "polidekstroz, maltitol, inülin, eritritol ve şeker otu ekstraktı tozundan" oluşmaktadır. Margarin "%60 yağlı, bitkisel yağlar (palm yağı ve türevleri), su, emülgatörler, tuz, asitlik düzenleyici, koruyucu, renklendirici ve aroma verici" den oluşmaktadır. Üretici firmadan sağlanan bilgiler doğrultusunda, yulaf lifi en az %85'i suda çözünmez diyet lif olmak üzere %90, bezelye lifi ise %88.2 oranında suda çözünmez diyet lif içermektedir.

Denemelerde, "Kitchen Aid" marka "KSM45" model mikser, 4 pişirme bölmeli Siemens marka "HB 331 S2T" model fırın kullanılmıştır. Bisküvi hamuruna şekil verme işleminde yüksekliği 4.5 mm olan iki tahta parçası ve 60 mm çaplı metal kesme aleti kullanılmıştır. Bisküvi örnekleri fırının orijinal tepsisi üzerine konulan yağlı kâğıt (Dünya Gıda ve İhracat Maddeleri Tekstil Sanayi Tic. Ltd. Şti. [İstanbul], Iwo marka) üzerinde pişirilmiştir.

Bisküvi Formülü ve Yapım Yöntemi

Bisküvi üretiminde AACCI (Uluslararası Amerikan Hububat Kimyacıları Birliği) Metot 10-50.05 (AACCI, 2000) kısmen modifiye edilmek suretiyle kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan şahit reçete Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Bisküvi hamuru formülü (şahit reçete).
Table 1. Biscuit dough formula (control recipe).

Bileşenler <i>Ingredients</i>	Miktar <i>Amount (g)</i>
Kinoa unu <i>Quinoa flour</i>	100
Sakaroz <i>Sucrose</i>	40
Margarin <i>Margarine</i>	40
Su <i>Water</i>	10
Tuz <i>Salt</i>	1.25
Yağsız süt tozu <i>Non-fat dry milk</i>	1
Sodyum bikarbonat <i>Sodium bicarbonate</i>	1
Amonyum bikarbonat <i>Ammonium bicarbonate</i>	0.5
Etil Vanilin <i>Ethyl Vanillin</i>	0.03

SET kullanılan formüllerde, bunun kullanım miktarının düşük olması nedeniyle SET su içerisinde iyice çözündürülmek suretiyle bisküvi hamuruna eklenmiştir. Hamurun hazırlanmasında takip edilen izlek aşağıda özetlenmiştir (AACCI Metot 10-50.05; AACCI, 2000): Margarin + sakaroz/STP + süt tozu + tuz + sodyum bikarbonat + amonyum bikarbonat + vanilin bileşenleri 95 d/d hızında 3 d süre ile karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi boyunca her d sonunda karıştırma kabının kenarlarına yapışan malzemeler kitleye dâhil edilmiştir. Su eklenerek 95 d/d hızında 1 d süreyle karıştırılmıştır. Karışım alt-üst edilerek, 165 d/d hızında 1 d daha karıştırılmıştır. Un eklenerek 95 d/d hızında 2 d süreyle karıştırılmıştır. Karışım 30 saniyede bir alt-üst edilmiştir. Özetle, bisküvi bileşenleri mikserde toplam 7 d süre ile yoğurulmuştur. Yoğurma sonrası elde edilen hamur oda sıcaklığında 10 d süreyle dinlendirilmeye bırakılmıştır. Dinlendirilen hamur oklava yardımıyla üzerinden 3-4 defa geçilmek suretiyle 4.5 mm kalınlığında açılmış ve 60 mm çaplı kesme aleti ile kesilmiştir. Pişirme işlemi fırının üstten ikinci bölmesinde 205 °C'de 12 d süreyle yapılmıştır. Fırından çıkarılan bisküviler 5 d tepsi içerisinde, 55 d tel ızgara üzerinde soğumaya bırakılmıştır. Soğuyan bisküviler analiz edilinceye kadar kilitli polietilen torbalarda saklanmıştır.

En Uygun Şeker Otu Formu ve Düzeyinin Belirlenmesi

Çalışmada bisküvi üretiminde en uygun şeker otu (SET ya da STP) kullanım düzeyinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bunun için un esasına göre %0, %0.1, %0.2, %0.3, %0.4, %0.5 ve %0.6 düzeylerinde SET; %0, %10, %20, %30, %40, %50 ve %60 düzeylerinde STP kullanılmıştır. Yukarıda belirtilen şeker otu formu ve oranları sakarozun hiç kullanılmadığı formüller üzerinde denenmiştir. Şeker otu ekstraktı tozu kullanılan formüllerde, SET su içerisinde iyice çözündürülmek suretiyle bisküvi hamuruna eklenmiştir. Ayrıca SET'in kullanım miktarının düşük olmasından dolayı sakaroz ikamesi olarak, dolgu maddesi niteliğinde yulaf ve bezelye liflerinden yararlanılmıştır. SET kullanılan formüllerde Çizelge 1'e ek olarak, formülden çekilen sakaroz miktarı kadar lif ve su ilavesi yapılmıştır (Vatankhah et al., 2015). Bu şekilde üretilen formüllerde eklenecek olan lif miktarları ön denemelerle belirlenmiştir (Ön denemelerde ilkin formülden kaldırılan sakaroz miktarı kadar bezelye lifi ve/ya da yulaf lifi kullanılmış ancak bisküvi hamurunun çok sert bir yapıya sahip olmasından ve liflerin yüksek düzeyde su tutma yeteneklerinden dolayı uygun hamur kıvamı elde edilinceye kadar yulaf ve bezelye lifi miktarında azalmaya su miktarında ise artmaya gidilerek sakaroz ikame edilmiştir). Bu ilaveler Çizelge 2'de verilmiştir. Araştırmada kontrol örneği olarak kinoa unu (100 g) + %100 sakaroz (40 g) içeren formül kullanılmış, SET ya da STP ile üretilen bisküviler kontrol örneği ile karşılaştırılmıştır.

Analizler

Bisküvi hamurlarının yoğunluğu; hacmi bilinen bir kaptaki hamurun ağırlığının, aynı kaptaki suyun hacmine bölünmesi suretiyle (Masoodi et al., 2002) belirlenmiştir. Bisküvi örneklerinin fiziksel kalite özelliklerinin belirlenmesi amacıyla çapları ve kalınlıkları dijital kumpas (Mitutoyo, Tokyo, Japonya) kullanılarak ölçülmüştür. Yayılma oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (AACCI Metot 10-54.01; AACCI, 2000).

$$\text{Yayılma oranı} = \text{Çap} / \text{Kalınlık} \quad (1)$$

Çizelge 2. SET kullanılan formüllere eklenen lif ve ilave su miktarları.
Table 2. The amounts of added fiber and added water to the formulations used SET.

SET Düzeyi <i>SET Level</i> (%)	Bezelye Lifi <i>Pea Fiber</i> (g)	Yulaf Lifi <i>Oat Fiber</i> (g)	İlave Su <i>Additional Water</i> (mL)
0	3.54	3.54	32.92
0.1	3.53	3.53	32.84
0.2	3.52	3.52	32.76
0.3	3.51	3.51	32.68
0.4	3.50	3.50	32.60
0.5	3.49	3.49	32.52
0.6	3.48	3.48	32.44

Bisküvi örneklerinin nem içerikleri AACCI Metot 44-19.01'e (AACCI, 2000), pişme kayıpları Dizlek ve Gül (2009)'e, hacimleri ise hardal tohumu ile yer değiştirme metoduna (Uluöz, 1965) göre tespit edilmiştir. Bisküvi örneklerinin renk ölçümleri 3 boyutlu, Konica Minolta marka CR-400 model renk ölçüm cihazı (Konica Minolta Inc., Osaka, Japonya) kullanılarak yapılmıştır (Wrolstad and Smith, 2010). Örneklerin tekstürel özellikleri Brookfield CT3 4500 marka (Brookfield Engineering Laboratories Inc., Massachusetts, ABD) tekstür analiz cihazı yardımıyla, üç nokta kırılma testi (Brown et al., 1998) uygulanarak tespit edilmiştir. Bu analizde kullanılan parametreler şu şekildedir; Test speed: 3 mm/s, Pre-test speed: 2 mm/s, Post test speed: 10 mm/s, Trigger load: 4 N, Distance: 40 mm ve Probe: TA-BT-KI TA7 (Ulusoy, 2011).

Bisküvi örnekleri ayrıca duyuşsal olarak da değerlendirilmiştir. Bu amaçla konu hakkında önceden eğitilen 7 panelistten; bisküvi örneklerini yüzey görünüm özellikleri (parlaklık-matlık, renk, yüzey düzgünlüğü), kesit özellikleri (kesit yapısı ve kesit rengi), tadım özellikleri (ısırsı, çiğneme ve yutma) ve satın alına bilirlik özellikleri bakımından hedonik skalaya göre 1 ile 5 puan arasında değerlendirmeleri (1 kötü, 3 kabul edilebilir ve 5 çok iyi) istenmiştir (Acun, 2011; Acun ve Gül, 2014). Sigara kullanmayan kişilerden oluşturulan panelist grubunun 4'ü bayan, 3'ü erkektir. Numuneler arasındaki geçişte ağzın temizlenmesi su ile yapılmıştır. Tüm denemeler 2'ser kez tekrar edilmiştir. Araştırmada üretilen bisküvi örneklerinin ölçülen tüm özelliklerine ilişkin verilere "SPSS" paket programı (version 18.0 for

Windows, SPSS Inc., Chicago, ABD) kullanılarak varyans analizi (ANOVA) uygulanmış, sonra önemli bulunan değerler Duncan çoklu karşılaştırma testine tabi tutulmuşlardır.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Bisküvi üretiminde sakaroz yerine farklı düzeylerde SET ya da STP kullanılmasının ürünün fiziksel ve kimyasal özellikleri üzerine etkileri Çizelge 3'de verilmiştir. Söz konusu üretimlere ait bisküvi resimleri ise Şekil 1 ve 2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3'ün incelenmesiyle, SET kullanılması genellikle hamur yoğunluğunu değiştirmemiş, STP kullanılması anlamlı olmamakla birlikte hamur yoğunluğunu arttırmış ya da azaltmıştır. Vatankhah et al. (2015), bisküvi üretiminde sakaroz yerine %50 ve %100 oranlarında steviosit kullanılmasının hamur yoğunluğu üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını belirlemişlerdir. Bisküvilerin çap değerlerine ait verilerin incelenmesiyle SET'in kullanıldığı formüllerde kontrol örneğine göre daha düşük değerler elde edilmiştir. SET kullanım düzeyleri arasında çap değerleri bakımından önemli bir farklılık oluşmamıştır. Benzer biçimde Vatankhah et al. (2015), tatlandırıcı olarak steviosit kullanımının bisküvilerin çap değerlerini azalttığını bildirmişlerdir. STP'nin kullanılması ve kullanım düzeyinin artmasıyla çap değerleri genellikle artış göstermiştir. %40 ve üzeri düzeylerde STP kullanılması kontrol örneğine benzer çap değerleri vermiştir. Bileşiminde SET bulunan formülasyonlar ile üretilen bisküvi örneklerinin kalınlık değerleri kontrol örneğinden daha düşük

çıkıştır (Çizelge 3). Bununla birlikte kullanılan SET düzeyleri arasında kalınlık değerleri bakımından belirgin bir farklılık olmadığı saptanmıştır. STP kullanılan formüllerde STP'nin kullanım düzeyinin artmasına koşut olarak kalınlık değerleri artmıştır ($P < 0.05$). STP ve SET kullanılarak üretilen bisküvi örneklerinin kalınlık değerleri kontrol örneğinden daha düşük bulunmuştur. Ancak STP kullanılması ile bisküvi örneklerinin kalınlık değerleri daha fazla artmış ve

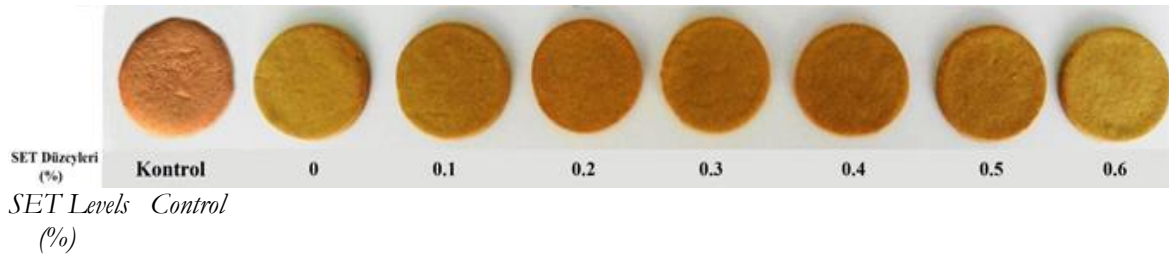
nispi olarak kontrol örneğine daha yakın değerler elde edilmiştir. SET kullanılarak üretilen bisküvilerin kalınlık değerleri 6 mm civarında olduğu için bu bileşen ile hazırlanan formüllerin yayılma oranları kontrol örneğinden daha yüksek bulunmuştur. STP'nin kullanıldığı formüllerde ise yayılma oranları kontrol örneğinden daha yüksek bulunmuş, ancak SET kullanılan formüllere göre daha düşük değerler elde edilmiştir.

Çizelge 3. Farklı düzeylerde SET ve STP kullanılması bisküvilerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine etkisi.

Table 3. The effect of using SET and STP at different levels on the physical and chemical properties of biscuits.

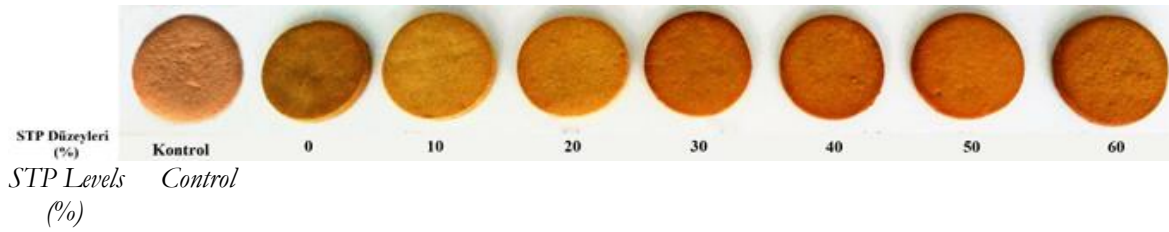
Şeker Otu Formu ve Düzeği <i>Stevia</i> Form and Level (%)	Bisküvi Özellikleri <i>Biscuit Features</i>						
	Hamur Yoğunluğu <i>Dough Density</i> (g/mL)	Çap <i>Diameter</i> (mm)	Kalınlık <i>Thickness</i> (mm)	Yayılma Oranı <i>Spread</i> <i>Ratio</i>	Hacim <i>Volume</i> (cm ³)	Pişme Kaybı <i>Weight</i> <i>Loss</i> (%)	Nem <i>Moisture</i> (%)
Kontrol <i>Control</i>	1.27 ^{bcd} ±0.02	61.3 ^b ±0.0	9.62 ^a ±0.12	6.38 ^f ±0.07	27.6 ^a ±0.4	14.3 ^{gh} ±0.1	6.7 ^{fg} ±0.2
SET							
0	1.27 ^{bcd} ±0.02	57.3 ^{fg} ±0.1	6.54 ^f ±0.01	8.76 ^b ±0.00	17.4 ^e ±0.4	24.2 ^b ±0.4	15.1 ^b ±0.3
0.1	1.24 ^{de} ±0.01	57.4 ^f ±0.1	6.28 ^{fg} ±0.30	9.16 ^{ab} ±0.44	15.7 ^f ±1.2	24.6 ^{ab} ±0.8	16.9 ^a ±0.1
0.2	1.26 ^{de} ±0.00	56.6 ^h ±0.1	6.28 ^{fg} ±0.05	9.04 ^{ab} ±0.05	14.8 ^f ±0.3	25.2 ^a ±0.6	12.9 ^c ±0.4
0.3	1.26 ^{cde} ±0.00	57.2 ^{fg} ±0.0	6.29 ^{fg} ±0.09	9.17 ^{ab} ±0.02	15.6 ^f ±0.4	22.9 ^e ±0.7	12.9 ^c ±0.6
0.4	1.23 ^{de} ±0.04	56.8 ^{gh} ±0.4	6.26 ^{fg} ±0.13	9.10 ^{ab} ±0.24	15.1 ^f ±1.1	24.1 ^b ±0.1	16.2 ^a ±0.0
0.5	1.22 ^e ±0.07	57.3 ^f ±0.3	6.36 ^{fg} ±0.36	9.04 ^{ab} ±0.47	16.0 ^{ef} ±0.2	24.7 ^{ab} ±0.3	14.3 ^b ±0.1
0.6	1.28 ^{bcd} ±0.00	57.3 ^f ±0.0	6.19 ^g ±0.10	9.28 ^a ±0.13	16.4 ^{ef} ±0.1	25.2 ^a ±0.0	10.7 ^d ±0.1
STP							
0	1.32 ^{bc} ±0.00	57.2 ^{fg} ±0.1	6.88 ^e ±0.01	8.33 ^c ±0.03	19.8 ^d ±0.2	16.4 ^d ±0.3	10.0 ^d ±0.1
10	1.40 ^a ±0.00	58.6 ^e ±0.1	7.60 ^d ±0.13	7.72 ^d ±0.16	20.2 ^d ±0.9	15.2 ^{efg} ±0.5	6.9 ^f ±1.0
20	1.23 ^{de} ±0.04	58.8 ^{de} ±0.0	8.16 ^c ±0.05	7.22 ^e ±0.06	22.2 ^c ±0.9	14.9 ^{fg} ±0.2	8.0 ^e ±0.4
30	1.29 ^{bcd} ±0.01	59.2 ^d ±0.4	7.95 ^c ±0.02	7.46 ^{de} ±0.09	22.3 ^c ±1.3	16.0 ^{de} ±0.1	4.6 ⁱ ±0.1
40	1.22 ^e ±0.00	61.0 ^{bc} ±0.4	8.64 ^b ±0.04	7.07 ^e ±0.01	24.8 ^b ±0.1	15.4 ^{ef} ±0.0	6.2 ^{gh} ±0.3
50	1.32 ^b ±0.00	60.6 ^c ±0.1	8.49 ^b ±0.03	7.14 ^e ±0.01	26.1 ^{ab} ±0.1	14.7 ^{fg} ±0.1	5.6 ^h ±0.0
60	1.23 ^{de} ±0.04	62.2 ^a ±0.1	8.75 ^b ±0.02	7.12 ^e ±0.03	25.7 ^b ±1.2	13.7 ^h ±0.5	5.9 ^{gh} ±0.1

Çizelgede aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler arasındaki farklar 0.05 güven sınırına göre önemlidir. Values in the table shown in the same column with the different letters are significantly different ($P < 0.05$).



Şekil 1. Değişik düzeylerde SET kullanılarak üretilen bisküvi örnekleri.

Figure 1. Biscuit samples produced using SET at different levels.



Şekil 2. Değişik düzeylerde STP kullanılarak üretilen bisküvi örnekleri.

Figure 2. Biscuit samples produced using STP at different levels.

Sakaroz yerine SET kullanılması bisküvi hacimlerini belirgin ölçüde azaltmış ($P < 0.05$), ancak muhtelif SET kullanım düzeyleri arasında belirgin bir fark oluşmamıştır (Çizelge 3). Bununla birlikte bileşiminde SET olan bisküvi örneklerinin hacimleri SET olmayan örneğe (%0 SET) göre daha düşük bulunmuştur. Bisküvi formülünde STP kullanılması, kullanılmamasına göre ürün hacmini istatistiksel olarak önemli düzeyde ($P < 0.05$) geliştirmiştir. Genellikle artan STP oranına koşut olarak bisküvi hacimleri artış göstermiştir. Bu artışlar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. STP dozları içerisinde hacim anlamında en iyi sonuç %50 kullanım düzeyinde görülmüştür. Bu kullanım düzeyinde elde edilen bisküvi hacminin kontrol örneği ile benzer olduğu bulunmuştur ($P > 0.05$). Bisküvi formülünde sakaroz yerine SET ya da STP kullanılması ürün hacmini geliştirememiş bununla birlikte STP'nin kullanıldığı denemelerde, SET kullanılan denemelere göre daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Hacim değerlerine ait veriler, bisküvi örneklerinin çap ve kalınlık değerleri ile uyumlu bulunmuştur. Buna göre, beklenebileceği gibi çap ve kalınlık değerleri diğer örnekler göre daha yüksek olan kontrol numunesinin hacmi deneme örnekleri içerisinde en yüksek bulunmuş, bunu STP'li formüller izlemiştir. Çalışmamızdan elde edilen bulgular ile uyumlu olarak Vatankhah et al. (2015),

bisküvi formülünde sakaroz ikamesi olarak steviosit kullanılması bisküvi hacmini azalttığını, ancak bu azalmanın istatistiksel olarak önemsiz olduğunu; Zahn et al. (2013) ise muffin üretiminde sakaroz ikamesi olarak şeker otu bileşeni olan SET (rebaudiosit A) ve bazı liflerin kombine edilerek kullanılması durumunda muffin örneklerinin hacimlerinin düştüğünü belirlemişlerdir. Hamur formülünde sakarozun kullanılması, kullanılmamasına göre bisküvilerin pişme kaybını azaltmıştır (Çizelge 3). Değişik düzeylerde SET ve buna bağlı olarak bezelye ve yulaf liflerinin kullanılması bisküvilerin pişme kayıplarını önemli düzeyde arttırmıştır. Bu artış %60 (%0.3 SET) – %76 (%0.2 ve %0.6 SET) arasında değişmiştir. SET kullanılan denemelerde pişme kaybı değerlerinin yüksek çıkmasında formülde SET ile birlikte kullanılan lifler etkili olmuştur. Bu liflerin su tutma kapasitelerinin yüksek olması (Vatankhah et al., 2015) ve sakaroz yerine SET ikamesi ile sakarozdan kaynaklanan miktar azalmasının suyla telafi edilmesi belirleyici olmuştur. STP'nin farklı kullanım düzeyleri arasında yer yer çok anlamlı olmamakla birlikte STP dozunun artmasına paralel olarak pişme kayıplarının azaldığı görülmüştür. Bu noktada %50 ve %60 oranlarında preparat kullanılması kontrol örneği ile benzer bir pişme kaybı değeri elde edilmesine yol açmıştır ($P > 0.05$). Pişme

kaybında belirtilen nedenlerden dolayı SET kullanılan bisküvilerin nem değerleri kontrol örneğine göre %93 (%0.2 ve %0.3 SET) ile %152 (%0.1 SET) arasında artış göstermiştir. Bileşiminde SET bulunan formüllerde, liflerin hamuru kurutucu etkisinden ve bundan dolayı hamurun uygun bir biçimde işlenebilmesi için zaruri olarak yüksek düzeyde su kullanılmasının bisküvilerin pişme kaybı ve nem değerlerini belirgin bir biçimde arttırdığı tespit edilmiştir. Vatankhah et al. (2015), sakarozun formülden çekilmesiyle bisküvilerin nem içeriklerinin arttığını, bu artışın steviosit düzeyinin artmasıyla doğru orantılı olduğunu belirtmişlerdir. Zahn et al. (2013)'in yaptığı çalışmada ise sakaroz ikamesi olarak şeker otu bileşeni olan rebaudiosit A ve bazı liflerin kombine edilerek kullanılmasının muffin örneklerinin nem içeriklerini arttırdığı saptanmıştır. Genel olarak STP'nin %20 düzeyine kadar kullanılması, bisküvilerin nem içeriklerini arttırmış, bu düzeyden sonra bisküvilerin nem içeriklerinde azalma saptanmıştır. %40, %50 ve %60 düzeyinde STP içeren formüller kontrol örneğine yakın değerler vermiştir. TS 2383 Bisküvi standardında (TSE, 2010) bisküvinin nem içeriğinin maksimum %6 olabileceği bildirilmiştir. Çalışmada tatlandırıcı olarak SET'in kullanılması ve buna bağlı olarak hamur formülünde yüksek düzeyde su kullanılması ile üretilen bisküvilerin nem değerlerinin yüksek çıkması ve standarda uygun olmama durumu söz konusudur. STP'nin bisküvi üretiminde %30 ve daha yüksek düzeylerde kullanılması genel olarak bisküvilerin nem içeriğinde standarda uygunluk anlamında önemli bir sorun çıkarmamış, daha düşük düzeylerde kullanılması ise bisküvi neminin standartta öngörülen kotayı aşmasına yol açmıştır.

Araştırmada üretilen bisküvilerin renk ve tekstürel özelliklerine ait bulgular Çizelge 4'de verilmiştir. Renk ölçümünde L* değeri matlığı (0)/parlaklığı (100), a*/-a* değeri kırmızılığı/yeşilligi, b*/-b* değeri sarılığı/maviliği ifade etmektedir (Wrolstad ve Smith, 2010). Hamur formülünde SET kullanıldığında bisküvi örneklerinin L* değeri kontrol örneği ile aynı bulunmuştur. STP'nin %10 ve %20 düzeylerinde kullanılması bisküvilerin L* değerlerinin kontrol bisküvisi ile benzer sonuçlar almasına yol açmış, diğer kullanım düzeyleri ise

kontrol bisküvisinden daha düşük değerler almıştır. Bisküvi formülünde sakaroz yerine lif (%0 SET) ya da lif + SET kullanılması numunelerin a* değerlerinde belirgin ve anlamlı bir azalmaya yol açmıştır. Buna göre SET kullanımı bisküvilerin kırmızılık değerini azaltmıştır. SET'in denemede ele alınan düzeyleri arasında a* değerleri bakımından istatistiksel bir fark görülmemiştir ($P > 0.05$). Vatankhah et al. (2015), çalışmamızdan elde edilen bulgular ile uyumlu olarak steviosit ile üretilen bisküvilerin a* değerlerinin sakaroz ile üretilen bisküviden daha düşük değere sahip olduğunu belirlemişlerdir. STP'nin %20 düzeyine kadar kullanılması kontrol örneğine göre a* değerini azaltmış, %30 ve daha yüksek olan düzeylerinde ise kontrol örneğinden daha yüksek değerler elde edilmiştir ($P < 0.05$). Bu durum Şekil 2'nin incelenmesiyle de görülebilir. Kontrol örneği referans alındığında STP kullanılarak üretilen bisküvi örneklerinin SET kullanılarak üretilen örneklere göre daha yüksek kırmızılık değerine sahip oldukları bulunmuştur. SET kullanılması bisküvi örneklerinin b* değerlerini azaltmıştır ($P < 0.05$). Ancak SET'in kullanım düzeyleri arasında b* değerleri bakımından bir farklılık oluşmadığı ($P > 0.05$) gözlenmiştir. Hamur formülünde STP'nin artan düzeylerde kullanımı bisküvilerin b* değerini genel olarak arttırmıştır. STP kullanılarak üretilen bisküvilerin sarılık değerleri, SET kullanılanlara göre kontrol örneğine daha yakın bulunmuştur. Örnekler içerisinde sarılık bakımından en düşük değere sahip olan numunenin bileşiminde hiç tatlandırıcı olmayan %0 STP örneği olduğu belirlenmiştir.

Sertlik (hardness) değeri, bisküvinin yapısında belirli bir deformasyonun sağlanabilmesi için gerekli kuvvetin Newton cinsinden; kırılmalık (fracturability) değeri ise bisküvinin kırılması için gerekli olan kuvvetin üründe yol açtığı deformasyon değerinin mm cinsinden ifadesi olarak tanımlanmaktadır (Bourne, 2002). SET kullanılan bisküvi formüllerinin sertlik değeri kontrol örneğine göre önemli ölçüde düşük bulunmuştur (Çizelge 4). Bu düşüş kontrol örneğine göre %50 (%0.6 SET) – %70 (%0.3 SET) arasında değişmiştir. Benzer biçimde Vatankhah et al. (2015), bisküvi üretiminde

steviosit kullanım miktarının artmasıyla sertlik değerinin azaldığını belirlemişlerdir. STP kullanılan formüllerde, STP'nin hamur formülünde kullanım düzeyinin artmasına koşut olarak örneklerin sertlik değeri artış göstermiştir. Bu artış %30 düzeyine kadar çok belirgin bir biçimde ortaya çıkmış, bu düzeyden sonra sertlik verileri benzer değerler almıştır. Bileşiminde sakarov ve sakarov türevi olmayan formülasyon ile (%0 STP) üretilen bisküvinin sertlik değeri ile SET kullanılarak üretilen bisküvilerin sertlik değeri birbirine yakın bulunmuştur. Ancak bu numunelerin sertlik değeri kontrol örneğinin çok gerisinde kalmıştır. Bu durum bisküvi için istenilmeyen bir özelliktir. Çünkü bisküvi nispeten sert/gevrek yapılu bir unlu mamul olup, bisküvide yumuşak bir tekstür arzu edilmemektedir. Dizlek (2003), sakarovun unlu mamullerde gevrekleştirici, kırılgaştırıcı bir bileşen olarak

kullanıldığını; Faridi et al. (2000) ile Madenci ve Türker (2011) ise bisküviye tat vermesinin yanı sıra sakarovun ürünün yapısını, rengini, aromasını, yayılma oranını etkilediğini ve bayatlamasını geciktirdiğini bildirmişlerdir. Çalışmadan elde edilen veriler bu bildirimler ile uyumludur. Farklı düzeylerde SET ya da STP kullanılmasının kontrol örneğine göre bisküvilerin kırılgaçlık değerlerinde istatistiksel olarak bir fark oluşturmadığı belirlenmiştir ($P > 0.05$). SET'in ya da STP'nin kendi içinde farklı kullanım düzeyleri arasında kırılgaçlık değeri açısından yer yer farklılık oluşmuş ancak bu farklılık anlamsız bulunmuştur. Vatankhah et al. (2015)'in yaptığı çalışmada, bisküvi örneklerinin kırılgaçlık değerleri arasında kısmi farklar olsa da bu farkların istatistiksel olarak önemsiz olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızdan elde edilen bulgular Vatankhah et al. (2015)'in bulguları ile uyumludur.

Çizelge 4. Farklı düzeylerde SET ve STP kullanılmasının bisküvilerin renk ve tekstür özelliklerine etkisi.

Table 4. The effect of using SET and STP at different levels on the color and textural properties of biscuits

Şeker Otu Formu ve Düzeyi Stevia Form and Level (%)	Renk Değerleri Color Values			Tekstür Değerleri Texture Values	
	L* Değeri L* Value	a* Değeri a* Value	b* Değeri b* Value	Sertlik Hardness (N)	Kırılgaçlık Fracturability (mm)
Kontrol Control	62.07 ^{ab} ±0.84	9.53 ^c ±0.47	34.69 ^a ±0.15	37.46 ^b ±1.88	0.87 ^{abcd} ±0.18
SET					
0	60.90 ^{abc} ±0.67	4.80 ^f ±0.26	29.60 ^e ±0.15	12.52 ^{hi} ±1.15	0.83 ^{abcd} ±0.08
0.1	9.93 ^{abcd} ±1.00	4.77 ^f ±0.30	29.28 ^e ±0.59	13.82 ^{gh} ±1.53	0.80 ^{abcd} ±0.01
0.2	0.41 ^{abcd} ±1.09	4.70 ^f ±0.38	29.41 ^e ±0.28	14.71 ^{fgh} ±0.42	1.01 ^{ab} ±0.02
0.3	8.97 ^{bcd} ±0.14	5.37 ^{ef} ±0.54	29.96 ^e ±0.13	11.20 [±] ±0.57	0.83 ^{abcd} ±0.04
0.4	58.60 ^{cde} ±0.53	5.41 ^{ef} ±0.25	29.79 ^e ±0.28	16.32 ^f ±0.67	0.91 ^{abcd} ±0.16
0.5	60.96 ^{abc} ±1.99	4.89 ^f ±1.34	29.95 ^e ±1.44	15.27 ^{fg} ±1.33	0.94 ^{abcd} ±0.21
0.6	60.37 ^{abcd} ±2.49	5.09 ^f ±1.15	29.75 ^e ±0.35	18.87 ^e ±1.23	0.80 ^{abcd} ±0.14
STP					
0	57.50 ^{de} ±1.99	7.15 ^{de} ±1.44	27.84 ^d ±0.16	16.94 ^{ef} ±1.15	0.89 ^{abcd} ±0.11
10	62.32 ^a ±1.14	6.01 ^{def} ±1.58	30.42 ^e ±0.47	24.93 ^d ±0.91	1.08 ^a ±0.08
20	62.25 ^a ±0.37	7.42 ^d ±0.04	32.87 ^b ±0.13	28.89 ^e ±0.59	0.91 ^{abcd} ±0.22
30	8.90 ^{bcd} ±2.04	10.13 ^c ±1.00	33.21 ^b ±0.07	43.63 ^a ±0.84	0.71 ^{abcd} ±0.22
40	58.74 ^{cde} ±0.94	10.45 ^{bc} ±0.64	4.07 ^{ab} ±1.32	45.09 ^a ±1.54	0.66 ^{cd} ±0.15
50	56.23 ^e ±0.96	12.43 ^a ±0.52	4.11 ^{ab} ±0.29	44.69 ^a ±0.79	0.82 ^{abcd} ±0.05
60	56.58 ^e ±0.87	12.20 ^{ab} ±0.27	3.88 ^{ab} ±0.45	45.69 ^a ±0.39	0.59 ^d ±0.13

Çizelgede aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler arasındaki farklar 0.05 güven sınırına göre önemlidir. Values in the table shown in the same column with the different letters are significantly different ($P < 0.05$).

Çizelge 5’de duyuşsal analizlere ait ölçüm sonuçları verilmiştir. STP’nin %30 ve %40 düzeyinde kullanıldığı örneklerin sertlik değerleri kontrol örneği ile istatistiksel olarak aynı sınıfa girmiştir. Lezzet ve satın alma bilirlilik değerleri bakımından, STP içeren formüllerin SET içerenlere göre daha iyi oldukları belirlenmiştir. SET ve STP’nin muhtelif düzeylerde kullanılması (kullanım dozları) ile bunların ürün niteliklerine etkileri arasında çok anlamlı bir ilişki kurulamamıştır. Duyusal değerlendirmelere ait bulguların bir arada incelenmesiyle; gerek SET, gerekse STP kullanımının bisküvilerin ele alınan özelliklerinde gerilemeye yol açtığı, bu anlamda sakarozu tam olarak ikame edemedikleri ancak STP kullanımı ile SET kullanımına göre daha olumlu sonuçlar elde edildiği kanısına varılmıştır. STP’nin ürün özellikleri üzerine olumlu etkisi bunun genellikle %20 düzeyinde kullanımı ile başlamış ve artan

dozlarda kullanımı ürün niteliklerini daha iyi islah etmiştir. Fakat %40 kullanım düzeyinden sonra ürün niteliklerinde ek bir iyileşme sağlamadığı, bu nedenle %40 düzeyinin STP’nin optimum kullanım düzeyi olduğu kanısına varılmıştır. TS 2383 Bisküvi standardında (TSE, 2010), bisküvilerin renk, tat ve koku bakımından kendine has renk ve kokuda olması, yabancı tat ve koku ihtiva etmemesi veya sabunumsu bir tatta olmaması öngörülmüştür. Yapı ve görünüş bakımından bisküvinin gevrek bir yapıya sahip ve bir örnek görünüşte olması, kırılmış veya zedelenmiş olmaması gerektiği bildirilmiştir. Yine aynı standartta bisküvinin yabancı madde ihtiva etmemesi hükme bağlanmıştır. Bu çalışmada ele alınan duyuşsal test sonuçlarına göre, genellikle STP kullanılarak üretilen bisküvilerin standartta belirtilen özelliklerle daha uyumlu olduğu kanısına varılmıştır.

Çizelge 5. Farklı düzeylerde SET ve STP kullanılarak üretilen bisküvilerin duyuşsal özellikleri.

Table 5. Sensory properties of biscuits produced using SET and STP at different levels

Şeker Otu Formu ve Düzeyi Stevia Form and Level (%)	Yüzey Görünüm Özellikleri Surface Appearance Properties			Kesit Özellikleri Sectional Properties				
	Parlaklık Matlık Brightness Opacity	Renk Color	Yüzey Düzgünlüğü Surface Smoothness	Sıkı Yapı Compact Structure	Gözenek Dağılımı Pore Distribution	Kabuk İnceliği Crust Thinness	İç Renk Interior Color	Kabuk İç Renk Farkı Crust Crumb Color Difference
Kontrol Control	4.73 ^a	4.73 ^a	4.57 ^a	3.43 ^a	2.91 ^{ab}	3.76 ^{ab}	4.43 ^{ab}	3.33 ^{ab}
SET								
0	4.29 ^{ab}	3.71 ^{abc}	4.29 ^{ab}	2.14 ^{bc}	2.43 ^{abc}	2.57 ^c	2.71 ^{bcd}	3.29 ^{ab}
0.1	1.86 ^{cd}	2.71 ^{cde}	3.86 ^b	2.86 ^{abc}	3.29 ^a	2.71 ^{bc}	3.43 ^{abc}	3.29 ^{ab}
0.2	3.57 ^b	4.00 ^{ab}	3.29 ^{bcd}	1.57 ^c	1.29 ^c	2.43 ^c	1.86 ^{cd}	4.00 ^a
0.3	2.43 ^c	3.14 ^{bcd}	3.57 ^{bc}	1.86 ^{bc}	2.71 ^{abc}	2.14 ^c	3.00 ^{bcd}	2.86 ^{ab}
0.4	1.43 ^d	3.14 ^{bcd}	2.43 ^{de}	2.71 ^{abc}	1.57 ^{bc}	2.00 ^c	1.86 ^{cd}	2.43 ^b
0.5	1.86 ^{cd}	2.29 ^{de}	2.57 ^{de}	2.00 ^{bc}	2.29 ^{abc}	2.71 ^{bc}	2.43 ^{bcd}	2.43 ^b
0.6	3.71 ^b	3.71 ^{abc}	3.71 ^b	3.14 ^{ab}	2.14 ^{abc}	2.00 ^c	2.43 ^{bcd}	3.29 ^{ab}
STP								
0	1.57 ^d	1.86 ^e	1.71 ^f	2.29 ^{bc}	2.14 ^{abc}	3.14 ^{abc}	2.14 ^{cd}	3.57 ^{ab}
10	2.00 ^{cd}	1.86 ^e	2.00 ^e	2.00 ^{bc}	1.86 ^{abc}	2.43 ^c	1.57 ^d	3.57 ^{ab}
20	3.86 ^{ab}	3.71 ^{abc}	3.71 ^b	3.14 ^{ab}	1.86 ^{abc}	3.00 ^{bc}	2.57 ^{bcd}	3.86 ^a
30	3.43 ^b	3.71 ^{abc}	4.14 ^{ab}	2.71 ^{abc}	2.71 ^{abc}	3.86 ^{ab}	3.00 ^{bcd}	3.86 ^a
40	4.57 ^a	4.57 ^a	4.29 ^{ab}	2.71 ^{abc}	2.57 ^{abc}	4.29 ^a	4.14 ^{ab}	3.86 ^a
50	4.29 ^{ab}	3.86 ^{abc}	4.29 ^{ab}	3.00 ^{ab}	3.29 ^b	3.14 ^{abc}	4.71 ^a	3.14 ^{ab}
60	4.29 ^{ab}	3.86 ^{abc}	4.00 ^{ab}	2.57 ^{bc}	2.86 ^{ab}	3.86 ^{ab}	4.14 ^{ab}	3.00 ^{ab}

Çizelge 5 devam ediyor / Table 5 continuing

Tadım Özellikleri Tasting Properties								
Şeker Otu Formu ve Düzeyi <i>Stevia Form and Level</i> (%)	Sertlik <i>Hardness</i>	Gevreklik <i>Brittleness</i>	Kumlu Kuru Olmama <i>Not to be Sandy-Dry</i>	Ağızda Dağılma <i>Dispersion in the mouth</i>	Çözünürlük <i>Dissolution</i>	Lezzet <i>Flavor</i>	Satın alınabilirlik <i>Purchase Intent</i>	Toplam <i>Total</i> (0-75 Puan) (0-75 Point)
Kontrol <i>Control</i>	4.57 ^a	3.57 ^a	3.71 ^{ab}	3.86 ^a	3.43 ^{ab}	3.71 ^{ab}	3.57 ^a	58.31 ^a
SET								
0	1.86 ^d	2.71 ^{ab}	3.00 ^{bcd}	2.43 ^{bc}	2.29 ^{cd}	2.29 ^{de}	1.71 ^{de}	41.72 ^{cd}
0.1	3.14 ^{abc}	3.00 ^{ab}	2.29 ^{cde}	2.14 ^{bc}	3.57 ^{ab}	1.71 ^e	2.29 ^{cd}	42.15 ^{cd}
0.2	2.00 ^d	1.86 ^b	2.71 ^{bcd}	2.71 ^{abc}	2.86 ^{abcd}	1.71 ^e	1.71 ^{de}	37.57 ^d
0.3	2.43 ^{cd}	2.71 ^{ab}	3.00 ^{bcd}	3.14 ^{ab}	2.57 ^{bcd}	2.43 ^{cde}	1.71 ^{de}	39.70 ^d
0.4	2.29 ^{cd}	3.14 ^{ab}	2.57 ^{bcd}	3.14 ^{ab}	3.14 ^{abc}	1.71 ^e	2.00 ^d	35.56 ^{de}
0.5	2.71 ^{bcd}	2.86 ^{ab}	3.00 ^{bcd}	2.57 ^{bc}	3.57 ^{ab}	1.71 ^e	2.00 ^d	37.00 ^d
0.6	2.86 ^{bcd}	3.43 ^a	2.86 ^{bcd}	3.86 ^a	3.00 ^{abc}	2.71 ^{bcd}	2.00 ^d	44.85 ^c
STP								
0	3.71 ^{abc}	3.00 ^{ab}	2.00 ^e	2.14 ^{bc}	1.86 ^{de}	1.86 ^e	1.14 ^e	34.13 ^{de}
10	3.00 ^{bcd}	2.43 ^{ab}	1.71 ^{de}	1.71 ^c	1.29 ^e	1.86 ^e	1.29 ^e	30.58 ^e
20	3.00 ^{bcd}	2.43 ^{ab}	3.00 ^{bcd}	2.29 ^{bc}	2.43 ^{cd}	2.57 ^{cde}	3.14 ^{ab}	44.57 ^c
30	4.00 ^{ab}	3.43 ^a	3.00 ^{bcd}	3.43 ^{ab}	2.43 ^{cd}	3.29 ^{abcd}	2.71 ^{bc}	49.71 ^{bc}
40	3.14 ^{abc}	3.14 ^{ab}	3.71 ^{ab}	2.86 ^{abc}	2.71 ^{abcd}	3.43 ^{abc}	3.57 ^a	53.56 ^b
50	2.29 ^{cd}	2.71 ^{ab}	3.43 ^{abc}	3.29 ^{ab}	3.71 ^a	3.71 ^{ab}	3.71 ^a	52.56 ^b
60	2.29 ^{cd}	3.00 ^{ab}	4.29 ^a	3.43 ^{ab}	3.57 ^{ab}	4.00 ^a	3.57 ^a	52.73 ^b

Çizelgede aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler arasındaki farklar 0.05 güven sınırına göre önemlidir. Values in the table shown in the same column with the different letters are significantly different ($P < 0.05$).

Çizelge 3 ve 4'ün birlikte incelenmesiyle, kinoa unu ile üretilen bisküvi örneklerinde sakaroz ikamesi olarak STP kullanımı SET kullanımına göre ürün niteliklerini daha olumlu yönde etkilemiştir. STP'nin kullanıldığı formüllerde (özellikle %40-60 düzeylerinde) bisküvi örneklerinin çap, kalınlık, hacim, pişme kaybı, nem, b* ve sertlik değerleri kontrol örneği ile aynı ya da yakın sonuçlar vermiştir. Oysa SET'in kullanıldığı hiçbir formülde – genel olarak – kontrol numunesine yakın veriler elde edilmemiştir. Yine Çizelge 5'de sunulan duyu analizi sonuçlarına göre STP'nin SET'e üstün olduğu kanısına varılmıştır. Sonuç olarak, ürün niteliklerine vermiş olduğu daha olumlu tepkilerden dolayı deneme bisküvi örneğinde sakaroz ikamesi olarak STP kullanılması daha uygundur ve bunun optimum kullanım düzeyi %40'tır.

Bileşiminde kinoa unu + STP içeren bisküvinin çölyak ve diyabet hastalarının diyetinde kullanılabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada kullanılan hamur formülüne benzer bir formülle üretilen bisküvilerde sakaroz ikamesi olarak STP'nin kullanılabileceği belirlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma OKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından OKÜBAP-2015-PT2-008 proje numarası ile desteklenmiştir. Ayrıca, projede "Araştırmacı" olarak görev yapan Emre GİRİTLİOĞLU "2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yüksek Lisans Burs Programı" kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Projeye katkılarından dolayı OKÜBAP birimine ve TÜBİTAK'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- AACCI (2000). international approved methods of the american association of cereal chemists. 10th Edition, St. Paul, MN, the USA.
- Acun, S. (2011). şarap işletmelerinin atığı olan üzüm posasının ve üzüm çekirdeğinin bisküvi kalitesine etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Isparta, Türkiye, 93 s.
- Acun, S., Gl, H. (2014). Effects of grape pomace and grape seed flours on cookie quality. *Qual Assur Saf Crop*, 6(1): 81-88.
- Barba, F.J., Criado, N.M., Belda-Galbis, C.M., Esteve, M.J., Rodrigo, D. (2014). Stevia rebaudiana Bertoni as a natural antioxidant/antimicrobial for high pressure processed fruit extract: processing parameter optimization. *Food Chem*, 148: 261-267.
- Bourne, M.C. (2002). *Food texture and viscosity: concept and measurement*. 2nd Edition, Academic Press, 416 p. ISBN: 978-0-12-119062-0.
- Brown, W.E., Langley, K.R., Braxton, D. (1998). Insight into consumers' assessments of biscuit texture based on mastication analysis-hardness versus crunchiness. *J Texture Stud*, 29: 481-497.
- Carakostas, M.C., Curry, L.L., Boileau, A.C., Brusick, D.J. (2008). Overview: the history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food Chem Toxicol*, 46(7): 1-10.
- Chatsudthipong, V., Muanprasat, C. (2009). Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacol Therapeut*, 121: 41-54.
- Dizlek, H. (2003). Farklı kabartma tozlarının değişik oranlarda kullanılmasının ve kek hamurunun pişme öncesinde bekletilmesinin pandispanya nitelikleri üzerine etkilerinin incelenmesi. ukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mhendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Adana, Türkiye, 85 s.
- Dizlek, H., Gl, H. (2009). Required criteria for the definition of bread attributes I. *Miller*, 16: 56-65.
- Edelstein, S., Smith, K., Worthington, A., Gillis, N., Bruen, D., Kang, S.H., Guiducci, G. (2007). Comparisons of six new artificial sweetener gradation ratios with sucrose in conventional-method cupcakes resulting in best percentage substitution ratios. *J Culinary Sci Technol*, 5: 61-74.
- FAO (2014). 2013 international year of quinoa. <http://www.fao.org/quinoa-2013/en/> (Accessed: 21 July 2014).
- Faridi, H., Gaines, C.S., Strouts, B.L. (2000). Soft wheat products. In: *Handbook of Cereal Science and Technology*, Kulp, K. and Ponte J.G. (eds.), Marcel Dekker, USA, pp. 575-614.
- Ghanta, S., Banerjee, A., Poddar, A., Chattopadhyay, S. (2007). Oxidative DNA damage preventive activity and antioxidant potential of stevia rebaudiana bertoni, a natural sweetener. *J Agr Food Chem*, 55: 10962-10967.
- Greenaway, W.T., Neustadt, M.H., Zeleny, L. (1965). Communication to the editor: A test for stink bug damage in wheat. *Cereal Chem*, 42(6): 577-579.
- James, L.E.A. (2009). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): Composition, chemistry, nutritional, and functional properties. *Adv Food Nutr Res*, 58: 1-31, doi: 10.1016/S1043-4526(09)58001-1.
- Johnson, D.L. (1990). New grains and pseudograins, advances in new crops. Proceeding of the First Natural Symposium New Crops: Research Development, Economics - Indianapolis, pp. 122-127.
- Kinghorn, A.D., Wu, C.D., Soejarto, D.D. (2001). Stevioside. In: *Alternative Sweeteners*, O'Brien Nabors, L. and Gelardi, R.C. (eds.) New York: Marcel Dekker. pp. 166-183.
- Kulthe, A.A., Pawar V.D., Kotecha, P.M., Chavan, U.D., Bansode, V.V. (2014). Development of high protein and low calorie cookies. *J Food Sci Technol*, 51(1): 153-157, doi: 10.1007/s13197-011-0465-2.

- Lisak, K., Jelcic, I., Tratnik, L., Bozanic, R. (2011). Influence of sweetener stevia on the quality of strawberry flavoured fresh yoghurt. *Mljekarstvo*, 61(3): 220-225.
- Madenci, A.B., Türker, S. (2011). Helal bakış açısıyla bazı bisküvi formülasyonlarının incelenmesi. 1. Ulusal Helâl ve Sağlıklı Gıda Kongresi, 19-20 Kasım 2011, Ankara, Türkiye, 203 s.
- Manisha, G., Soumya, C., Indrani, D. (2012). Studies on interaction between stevioside, liquid sorbitol, hydrocolloids and emulsifiers for replacement of sugar in cakes. *Food Hydrocolloid*, 29: 363-373.
- Masoodi, F.A., Sharma, B., Chauhan, G.S. (2002). Use of apple pomace as a source of diet dry fiber in cakes. *Plant Food Hum Nutr*, 57: 121-128.
- Pól, J., Hohnova, B., Hyötyläinen, T. (2007). Characterisation of stevia rebaudiana by comprehensive two dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1150(1-2): 85-92.
- Prakash, I., Dubois, G., Clos, J., Wilkens, K., Fosdick, L. (2008). Development of rebiana, a natural, non-caloric sweetener. *Food Chem Toxicol*, 46: 75-82.
- Randall, E.L. (1974). Improved method for fat and oil analysis by a new process of extraction, *J Assoc Off Anal Chem*, 57: 1165-1168.
- Soliman, M.D.E. (1997). Stevia plant, natural concentrated sweeteners. Egyptian Society of Sugar Technologists, 28th Annual Conference, 2-4 December, Egypt.
- TSE (2010). Bisküvi standardı. TS 2384, Ankara, Türkiye.
- Uluöz, M. (1965). *Buğday, un ve ekmeke analiz metodları*. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisleri, İzmir, Türkiye, 91 s.
- Ulusoy, S. (2011). Stevia ile tatlandırılmış bisküvilerin kalite özellikleri ve akrilamid içeriğinin belirlenmesi. Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Mersin, Türkiye, 65 s.
- Valencia-Chamorro S.A. (2003). Quinoa. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Caballero, B., Finglas, P., Toldra, F. (chiefs ed.), Academic Press, the UK, pp. 4895-4902.
- Vatankhah, M., Garavand, F., Elhamirad, A., Yaghbani, M. (2015). Influence of sugar replacement by stevioside on physicochemical and sensory properties of biscuit. *Qual Assur Saf Crop*, 7(3): 393-400.
- Waldron, J., Reyes, R., Rebecca, L. (2013). The effect of substituting sugar with artificial sweeteners on the texture and palatability of pancakes. http://www.cfs.purdue.edu/fn/fn453/Project_Archive/Fall_2013/Substituting_artificial_sweeteners_for_sucrose_in_pancakes.pdf (Accessed 18 September 2016).
- Wrolstad, R.E., Smith, D.E. (2010). Color analysis. In: *Food Analysis*. Nielson, S.S. (ed.), Springer New York Dordrecht Heidelberg, London, UK. pp. 573-586.
- Zahn, S., Forker, A., Krügel, L., Rohm, H. (2013). Combined use of rebaudioside A and fibres for partial sucrose replacement in muffins. *LWT-Food Sci Technol*, 50(2): 695-701.

ANTIOXIDATIVE EFFECT OF TURKISH CHESTNUT BEE POLLEN ON DNA OXIDATION SYSTEM AND ITS PHENOLIC COMPOUNDS

Büşra Karkar¹, Saliha Şahin^{1*}, M. Ertan Güneş²

¹University of Uludag, Faculty of Science and Arts, Department of Chemistry, Bursa, Turkey

²University of Uludag, Vocational School of Technical Sciences, Milk Technology Programme, Bursa, Turkey

Received / Geliş: 14.06.2017; Accepted / Kabul: 05.11.2017; Published online / Online baskı: 08.12.2017

Karkar, B, Şahin, S, Güneş, M.E. (2018). Antioxidative effect of Turkish chestnut bee pollen on dna oxidation system and its phenolic compounds. *GIDA* (2018) 43 (1): 34-42 doi: 10.15237/gida.GD17055

ABSTRACT

Chestnut bee pollen is a high antioxidative natural bee product. In this study the phenolic compounds in chestnut bee pollen were determined by HPLC-DAD system. Ethanol, water and methanol were used for the extraction of antioxidant compounds from chestnut bee pollen. The total phenolic contents and antioxidant capacities of extracts were determined by Folin-Ciocalteu, CHROMAC (Cr(VI) reduction antioxidant capacity) and FRAP (ferric reducing antioxidant power) methods, respectively. When compared the amounts of phenolic compounds and spectroscopic results (total phenolic contents and antioxidant capacities), the most suitable solvent was found ethanol for the extraction of antioxidant compounds from bee pollen. The major phenolic compounds in the chestnut bee pollen were determined as pinocembrin, chrysin, galangin and hyperoside with the contents of 1.246, 0.332, 0.122 and 0.516 mg/g of bee pollen, respectively. And also it was determined that the chestnut bee pollen was inhibited 11% of DNA oxidation in Fenton medium.

Keywords: Chestnut bee pollen, HPLC, CHROMAC, DNA oxidation, phenolic compounds

TÜRK KESTANE ARI POLENİNİN DNA OKSİDASYON SİSTEMİ ÜZERİNDEKİ ANTIOKSİDAN ETKİSİ VE FENOLİK BİLEŞİKLERİ

ÖZ

Kestane arı poleni antioksidan özelliği yüksek doğal bir arı ürünüdür. Bu çalışmada kestane arı poleninde bulunan fenolik bileşikler HPLC-DAD cihazı ile tayin edilmiştir. Kestane poleninden antioksidan bileşiklerin ekstraksiyonu için etanol, su ve metanol çözücüleri kullanılmıştır. Ekstraktların toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan kapasiteleri sırasıyla Folin-Ciocalteu, CHROMAC (Cr (VI) indirgen antioksidan kapasite) ve FRAP (demir iyonu indirgeyici antioksidan güç) yöntemleri ile belirlenmiştir. Fenolik madde miktarları ve spektroskopik sonuçlar (toplam fenolik miktarları ve antioksidan kapasiteleri) karşılaştırıldığında arı poleninden antioksidan bileşiklerin ekstraksiyonu için en iyi çözücünün etanol olduğu bulunmuştur. Pinocembrin, chrysin, galangin ve hyperoside sırasıyla 1.246, 0.332, 0.122 and 0.516 mg/g örnek içeriği ile kestane arı poleninde bulunan başlıca fenolik bileşiklerdir. Bununla birlikte Fenton ortamında, kestane poleninin DNA oksidasyonunu %11 oranında önlediği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Kestane arı poleni, HPLC, CHROMAC, DNA oksidasyonu, fenolik bileşikler

* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar;

✉ salihabilgi@uludag.edu.tr

☎ (+90) 224 294 1724

☎ (+90) 224 294 1899

INTRODUCTION

Bee pollens are one of the bee products collected by honeybees that have natural nutrient content. Bee pollens are known to contain amino acids, proteins, hormones, enzymes, carbohydrates, minerals, fats, vitamins, phytochemicals and antioxidant substances (Bogdanov, 2004; Eraslan et al., 2010). At the same time bee pollens that have high nutritional and medical value are used in food, cosmetic and medicine industry. Bee pollens are known to be used in the treatment of colds, flu, ulcers, premature aging, anemia, colitis, allergic reactions, enteritis and chronic prostatitis (Kao et al., 2011). Bee pollens are also a rich source of phenolic compounds, which have beneficial antioxidant, anti-carcinogenic, anti-allergic, anti-inflammatory properties (Bravo, 1998; Chang et al., 1977; Leite et al., 2001; Mi et al., 2004; Moroney et al., 1988; Veitch & Grayer, 2011).

Fruits and vegetables that naturally contain phenolic compounds can be consumed as a functional food. These compounds can be transferred from plants to the bee pollens. Phenolic compounds, such as phenolic acids and flavonoids, are considered to be useful for human health because they have the ability to deactivate free radicals and decrease the risk of degenerative diseases by reducing oxidative stress (Rzepecka-Stojko et al., 2014; Silva et al., 2004). There are various methods available for the assessment of the antioxidant capacity that provides useful data.

DNA is an important biomolecule for the cellular functionality of human and all organisms. It is known that many diseases such as neurodegenerative, cardiovascular, cancer diseases and ageing problems are related to the oxidation of DNA (Dawbaa et al., 2017). So the detection of DNA damage has got great importance. DNA damage can be caused by exogenous and endogenous factor such as UV and ionizing radiations, chemicals and reactive oxygen species (Chen et al., 2012).

The aim of this study was to analyze phenolic compounds quantitatively in chestnut bee pollen from Turkey by HPLC-DAD system and to

investigate antioxidative effect of chestnut bee pollen on DNA oxidation in Fenton medium.

MATERIAL and METHOD

Chemicals and reagents

Deoxyribonucleic acid (DNA) from calf thymus, activated, lyophilized powder, type XC was purchased from Sigma (Germany). Ethanol and methanol in HPLC grade, formic acid, phosphoric acid, sodium dihydrogen phosphate and hydrochloric acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Iron(II) sulfate-7-hydrate extra pure, potassium dichromate, 1,5-diphenylcarbazide, Folin-Ciocalteu reagent, potassium sodium tartrate, sodium hydroxide, copper(II) sulfate pentahydrate, sodium carbonate and gallic acid, syringic acid, kaempferol, pinocembrin, chrysin and galangin in HPLC grade were supported from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO., USA). Hydrogen peroxide trace Select Ultra $\geq 30\%$ was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Trolox was purchased from Acros organics (New Jersey, USA). Water was purified with Purelab Option-Q from Elga Laboratory (UK).

Chestnut pollen

Chestnut (*Castanea sativa*) bee pollen sample was collected from beekeepers in Cumalıkızık, Bursa (Turkey) in 2016. The sample was stored at -24°C for analysis. 10 g of bee pollen was used for melissopalynological analysis. Preparations were made according to the Louveaux *et al.* (1978) method and stained with glycerine gelatine colored by means of basic fuchsin and slides analyzed by light microscopy. The number of pollen grains was expressed as grains per square centimeter of microscope cover glass (22×22 mm).

Extraction of chestnut bee pollen

3 g of chestnut bee pollen was extracted for 30 min at 65°C with 30 mL of ethanol by ultrasonic assisted extraction. pH was adjusted to 2 with 10 M HCl. The ethanol extract (E) was filtered through filter paper. C18 column was used for solid phase extraction. For conditioning of SPE column, 10 mL of distilled water and 5 mL of 10 M HCl were passed from column. 5 mL of

ethanol extract (E) was passed from column and the antioxidant compounds were held on the column. These components were eluted from the column with 3 mL of methanol and this sample is called as EM. Sample E was passed through SPE column and the same procedure explained above was applied except the final elution solvent was ethanol and this sample is called as EE. 3 g of chestnut bee pollen was extracted along 30 min at 65°C with 30 ml of distilled water by ultrasonic assisted extraction. pH was adjusted to 2 with 10 M HCl. The water extract was filtered through filter paper and this sample is called as W. As in the case of sample EE the same procedure was applied for water extract and the elution solvent was ethanol and this sample is called as WE.

Antioxidant capacity analysis

The antioxidant capacities of bee pollen extracts were determined with chromium reducing antioxidant capacity (CHROMAC) (Nasır et al., 2017; Şahin and Demir, 2013) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) (Benzie and Strain, 1996) methods. In CHROMAC method, the extracts of chestnut bee pollen (100 µL), 400 µL of distilled water and 3.5 mL of phosphate buffer (pH 2.8) were taken to the test tube and the test tube was mixed. 0.5 mL of 1,5-diphenylcarbazide (3.4×10^{-4} mol/L) was reacted with the sample, after incubation for 1 min with 0.5 mL of $K_2Cr_2O_7$ (50 mg/L). The absorbance of the sample was analyzed at 540 nm, after waiting in the dark for 50 min. The antioxidant capacity was calculated as milligrams of trolox equivalent (TE) per g of chestnut bee pollen by using a standard calibration graph of trolox.

The FRAP method relies on the reduction of the Fe^{3+} -TPTZ (ferric tripyridyltriazine) complex to the ferrous form at low pH. Briefly, the extract of chestnut bee pollen (250 µL) and 2.75 mL of the TPTZ were mixed and incubated at 37°C for 30 min. 500 µL of the sample was mixed with 500 µL of distilled water and was stored in the dark for 8 min. The blue color samples were analyzed using a Varian Cary 50 UV-Vis spectrophotometer at 593 nm. The results were calculated as millimolar of trolox equivalent (TE) per g of chestnut bee pollen by using a standard calibration graph of trolox.

Total phenolic content analysis

The total phenolic content of bee pollen extract was evaluated according to Folin-Ciocalteu (FC) method. The FC method relies on the transfer of electrons from phenolic compounds and other reducing compounds to molybdenum. The FC method was performed according to the literature (Aybastier et al., 2013). Briefly, the extract of chestnut bee pollen (100 µL), 1.9 mL of distilled water and 2.5 mL of Lowry C solution were taken to the test tube. The mixture was stirred before Folin reagent (0.25 mL) was added and the samples were stored in the dark for 30 min. The samples were analyzed using a UV-Vis spectrophotometer (Varian Cary-50) at 750 nm. The concentration of total phenolic content was calculated as milligrams of gallic acid equivalent (GAE) per g of chestnut bee pollen by using a standard graph of gallic acid.

HPLC analysis

The chromatographic analysis of the chestnut bee pollen was performed on the HPLC system (Agilent 1200 Series) equipped with a diode array detector, vacuum degasser, binary pump and autosampler. XBridge C18 (4.6×250 mm, 3.5 µm) column was used, injection volume was 20 µL, flow rate was 0.5 mL/min. HPLC separation of phenolics was performed with a gradient elution using two mobile phase system (phase A: 1% formic acid; phase B: 100% methanol). The elution programs were: 0-10 min 5% B, 10-15 min 15% B, 15-20 min 30% B, 20-30 min 40% B, 30-50 min 45% B, 50-52 min 60% B, 52-60 min 80% B, 60-70 min 80% B, 70 min 5% B (Güneş et al., 2016).

Quantitative analysis of the phenolic compounds in extracts of chestnut bee pollen were determined by HPLC-DAD. Gallic acid, syringic acid, hyperoside, kaempferol, isorhamnetin, pinocembrin, chrysin and galangin were determined in the chestnut bee pollen. The calibration curves were prepared to determine the amounts of these compounds found in the chestnut bee pollen. Chromatograms of chestnut bee pollen extracts were interpreted in comparison with each phenolic standards. The calibration data of phenolic compounds that can

be assigned in chestnut bee pollen were given in Table 1.

Effect of antioxidants on the DNA oxidation

Antioxidant ability of chestnut bee pollen was examined to investigate the prevention of oxidation of calf thymus DNA in Fenton reaction medium. 3 mL of ethanol extract of chestnut bee pollen was evaporated to dryness under nitrogen atmosphere and then the residue was dissolved 3 mL of water. DNA of calf thymus was purchased and 5 mg of DNA was resolved in 10 mL of ultra-

distilled water. Four different samples were prepared to study the antioxidant effects on DNA oxidation; (1) 20 µg/mL DNA solution, (2) Fenton (150 µM Fe⁺² and 300 µM H₂O₂) solution, (3) Fenton and DNA (20 µg/mL) solutions and (4) Fenton, DNA (20 µg/mL) solutions and aqueous extract of chestnut bee pollen (1000 µL). Sample solutions were scanned every 10 min along a time range of 1 hour at a range of 200-400 nm.

Table 1. Calibrations of phenolic compounds contained in chestnut bee pollen

Phenolic compounds	Concentration range (mg/L)	Calibration equation	Regression coefficient (R ²)
Gallic acid	0.5 – 8.0	y=52.5085x-30.5770	0.9996
Syringic acid	0.1 – 10.0	y=74.3861x-0.1617	0.9990
Hyperoside	0.1 – 10.0	y=96.5243x-28.6102	0.9987
Kaempferol	0.1 – 2.0	y=82.9653x-6.6938	0.9993
Isorhamnetin	0.1 – 10.0	y=205.4008x-54.4131	0.9990
Pinocembrin	0.1 – 10.0	y=64.3752x+4.8661	0.9996
Chrysin	0.1 – 10.0	y=89.4119x-7.1368	0.9998
Galangin	0.1 – 4.0	y=85.7689x-6.3087	0.9997

RESULTS AND DISCUSSION

Antioxidant properties of chestnut bee pollen

The antioxidant capacities and total phenolic contents of chestnut bee pollen are reported in Table 2. The total phenolic contents of chestnut bee pollen determined by the FC method are between 43.48±0.77 and 4.12±0.09 mg of GAE per g of chestnut bee pollen. Antioxidant capacity values are between 20.24±1.15 and 3.15±0.04 mM of TE per g of chestnut bee pollen for the FRAP method and 3.70±0.05 and 34.18±0.02 mg of TE per g of chestnut bee pollen for the CHROMAC method. According the literatures, the antioxidant capacities of chestnut bee pollen determined by the FRAP method were found 82.31±2.41 mM of TE per g of dried chestnut bee pollen weight (DW) (Yildiz et al., 2013a) and 124.62±4.88 mM of TE per g of chestnut bee pollen (Yildiz et al., 2013b). And also the total phenolic contents of chestnut bee pollen

determined by the FC method were 28.87±2.48 mg of GAE per g DW (Yildiz et al., 2013a) and 52.12±2.14 mg of GAE per g of sample (Yildiz et al., 2013b). When the antioxidant capacity and total phenolic content values were compared to these literatures, these antioxidant capacity values are higher than our results but the total phenolic content values are found to be similar due to different sample preparation and extraction conditions. Phenolic compounds such as flavonoid and phenolic acid, possess a unique profile for each plant. For this reason, the concentration and species difference of phenolic compound in pollen are due to the change of plant origin. Furthermore, environmental factors are an important influence on these differences in phenolic compounds.

There is no study about antioxidant capacity of chestnut bee pollen determined by CHROMAC

method without chestnut honey in our knowledge. Güneş et al.(2016) have used the CHROMAC method to determine the antioxidant capacities of chestnut honeys. The antioxidant capacity results were found between

10.80±0.01 and 22.00±1.00 mg of TE kg of chestnut honey. In the direction of this data the antioxidant capacity of chestnut bee pollen was observed to be higher than the antioxidant capacity of chestnut honey.

Table 2. Total phenolic content (mg GAE/g chestnut bee pollen) determined by Folin method and antioxidant capacities determined by CHROMAC (mg TE/g chestnut bee pollen) and FRAP (mM TE/g chestnut bee pollen) methods of chestnut bee pollen

Sample	Total phenolic content	CHROMAC	FRAP
E	43.48±0.77	34.33±0.02	20.24±1.15
EM	13.91±0.54	4.69±0.06	5.58±0.11
EE	14.77±0.61	5.22±0.07	5.82±0.10
W	28.45±0.76	19.34±0.04	14.36±0.79
WE	4.12±0.09	3.70±0.05	3.15±0.04

Mean of two determinations±SD; E: ethanol extract, EM: methanol extract and EE: ethanol extract after SPE of ethanol extract, W: water extract, WE: ethanol extract of after SPE of water extract.

When spectroscopic methods of data were compared, high correlations were observed between methods. The correlation coefficient (R^2) between total phenolic content and CHROMAC methods was found to be 0.9706, between total phenolic content and FRAP methods was found to be 0.9888 and between CHROMAC and FRAP methods was found to be 0.9876. The high correlation between the methods proves that the phenolic content analyzes are compatible with each other.

Determination of phenolic compounds in chestnut bee pollen

Phenolic compounds in chestnut bee pollen were determined by HPLC-DAD system. The chromatogram of ethanol extract was shown in Figure 1. In the chromatogram of ethanol extract the first peak appearing was syringic acid at 26.8 min, it was followed by hyperoside at 33.9 min, kaempferol at 55.0 min, isorhamnetin at 56.6 min, pinocembrin at 60.3 min, chrysin at 61.3 min and galangin at 62.2 min. The peaks observed outside these peaks indicate the presence of other phenolic compounds but these phenolic

compounds could not be assigned. The amounts of phenolic compounds in chestnut bee pollen were shown in Table 3. The results showed that the most abundant amount was that of pinocembrin found in the ethanol extract of chestnut bee pollen with 1.246±0.125 mg/g of sample.

There was no big difference between the amounts of phenolic compounds in ethanol and methanol extracts obtained after SPE method. The detected compounds in the ethanolic extract that pinocembrin, chrysin and galangin were also found in the methanolic extract with the similar amounts. Hyperoside is the only compound found in methanolic but not in ethanolic extract. The amounts of phenolic compounds in the extracts of SPE were found to be lower than those of ethanolic extract. Some compounds were not found in methanolic and ethanolic extracts of SPE. This could be due to the low recovery and the insufficient sorption power of the column.

Hyperoside and pinocembrin were also found in the water extract but with much lower amount in

comparison to the ethanolic extract. Gallic acid was the only one compound found in the water extract but it could not be found in the ethanolic extract. The amount of gallic acid (1.340 ± 0.134 mg/g chestnut bee pollen) was observed to be the highest among other contents. Upon the

application of SPE to the obtained water extract of chestnut bee pollen, gallic acid was only found in the eluate. The low recovery and low sorption properties of the column are thought to be the cause of such low content.

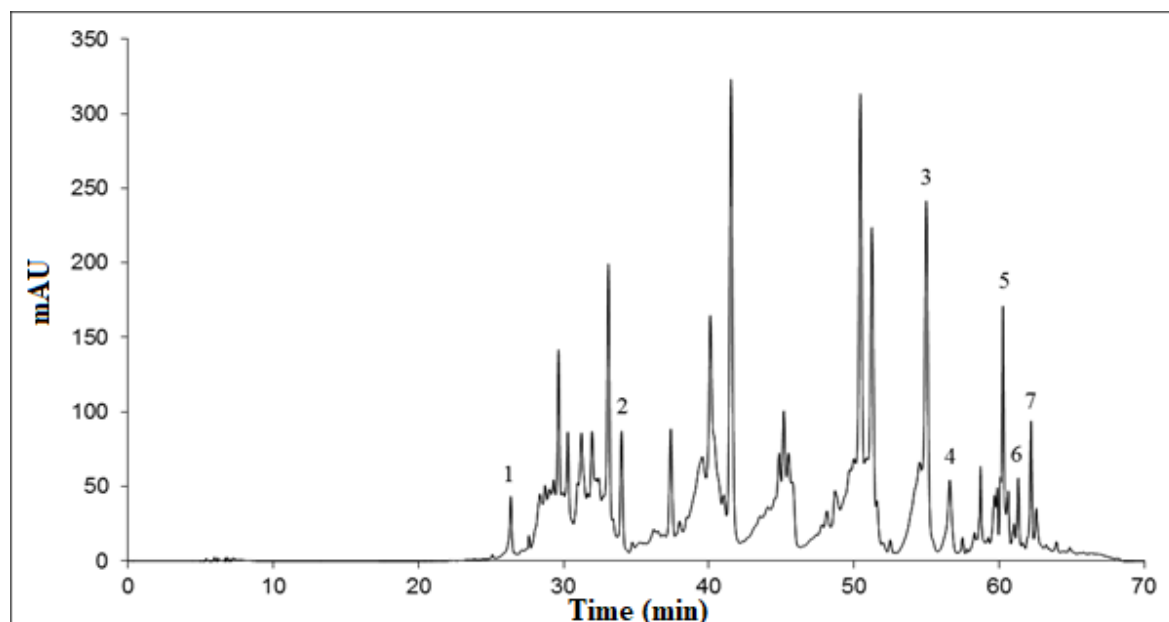


Figure 1. The chromatogram of chestnut bee pollen; 1, syringic acid; 2, hyperoside; 3, kaempferol; 4, isorhamnetin; 5, pinocembrin; 6, chrysin; 7, galangin.

Table 3. The amounts of phenolic compounds in chestnut bee pollen (mg per g chestnut bee pollen)

Phenolic compounds	E	EE	EM	W	WE
Gallic acid	nd	nd	nd	1.340 ± 0.134	0.034 ± 0.003
Syringic acid	0.011 ± 0.001	nd	nd	nd	nd
Hyperoside	0.121 ± 0.012	nd	0.072 ± 0.007	0.120 ± 0.012	nd
Kaempferol	0.516 ± 0.052	nd	nd	nd	nd
Isorhamnetin	0.062 ± 0.006	nd	nd	nd	nd
Pinocembrin	1.246 ± 0.125	0.489 ± 0.049	0.119 ± 0.012	0.198 ± 0.020	nd
Chrysin	0.332 ± 0.033	0.134 ± 0.013	0.153 ± 0.015	nd	nd
Galangin	0.122 ± 0.012	0.111 ± 0.011	0.055 ± 0.006	nd	nd

Mean of two determinations \pm SD; nd: not detected, E: ethanol extract, EM: methanol extract and EE: ethanol extract after SPE of ethanol extract, W: water extract, WE: ethanol extract of after SPE of water extract.

Güneş et al. (2016) have used the same method to determine the phenolic content of chestnut honeys. Gallic acid content was found to be considerably low in chestnut honeys as well as in chestnut bee pollen. Flavonoids such as chrysin and pinocembrin were generally found in high amounts in chestnut honeys. Kaempferol was found higher amount except pinocembrin and chrysin in chestnut bee pollen. Syringic acid and galangin were observed lower amount in chestnut bee pollen as in the chestnut honeys. Hyperoside and isorhamnetin were found in this study on chestnut bee pollen while not observed in chestnut honeys. When the amounts of phenolic compounds in general are compared the phenolic compounds in the chestnut bee pollen appeared to be higher than in the chestnut honeys. According to the results, chestnut bee pollen is believed to be a valuable natural source due to its phenolic compound content.

Determination of the effect of antioxidants on DNA oxidation

DNA damage occurs oxidatively in living cells by various mechanisms (Dizdaroglu, 2012). DNA

damage leads to various mutations and diseases such as cancer unless repaired. It is known that natural vegetables and fruits protect DNA damage by the antioxidants, if they contain. The effects of bee pollen which is a natural product with high antioxidant properties, on DNA damage were investigated in this study. The results were shown in Figure 2. DNA concentrations were calculated by absorbance at 260 nm using molar extinction coefficient of DNA, after oxidation with and without bee pollen solutions. The amount of 20 µg/mL of pure DNA solution was decreased to 10.2 µg/mL in Fenton environment due to oxidation. When the bee pollen extract was added in the same conditions, the amount of DNA was determined to be 12.4 µg/mL. The percentage of damage was determined initially by the amount of DNA in the medium. While the oxidative damage of DNA by Fenton environment was found to be 49%, this percentage was decreased to 38% by the effect of chestnut bee pollen. According to the results obtained, chestnut bee pollen was found to prevent DNA oxidation damage by 11% under oxidative environment.

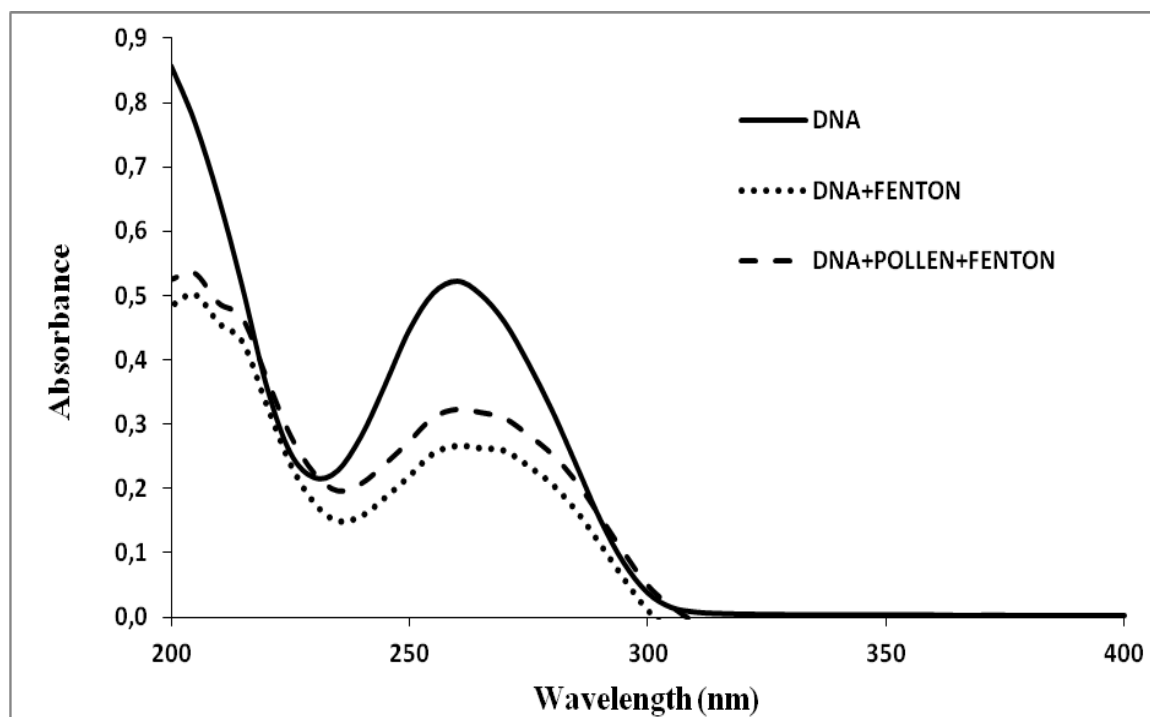


Figure 2. The spectrum of 20 µg ml⁻¹ of DNA, DNA and DNA with chestnut bee pollen extract after Fenton oxidation at 200-800 nm.

The ability of phenolic compounds to inhibit DNA damage was observed. The chestnut bee pollens contain natural phenolic compounds that are important due to their antioxidant properties. Therefore, they are recommended to be consumed as part of the normal daily nutritional elements.

CONCLUSIONS

This is the first study about determination of phenolic compounds quantitatively in chestnut bee pollen from Turkey in our knowledge. Solvent and SPE extraction methods were used for the extraction of phenolic compounds from the chestnut bee pollen. When compared these methods with the amount of phenolic compounds and antioxidant capacity values, the best results were found in the ethanolic extract. There are a number of methods in the literature because of the many different structures and properties that make up the antioxidant capacity. Unfortunately, there is no single antioxidant capacity determination method that will detect all of these compounds. For this reason, two methods (CHROMAC and FRAP) were used to determine antioxidant capacity in chestnut bee pollen. High correlation between them was showed the accuracy of the methods. Since CHROMAC method is a newly developed method, it is important to apply to different matrices. Because of the rich content of bee pollen such as phenolic compounds, carotenoids and flavonoids and bee pollen can inhibit DNA oxidation. The ability of phenolic compounds in chestnut bee pollen to inhibit DNA damage was observed as 11% under oxidative environment. Finally it is suggested that the consumption of chestnut bee pollen can be recommended as a dietary supplement for humans.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research is supported by Scientific Research Projects Foundation (BAP) of the Uludag University of Turkey [Project No. HDP (F)-2016/66].

REFERENCES

Aybastier, Ö., Şahin, S., & Demir, C. (2013). Response surface optimized ultrasonic-assisted extraction of quercetin and isolation of phenolic

compounds from hypericum perforatum l. by column chromatography. *Sep Sci Technol*, 48(11), 1665–1674.

<https://doi.org/10.1080/01496395.2012.760603>

Benzine, I.F.F. & Strain, J.J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal Biochem*. 239, 70-76.

Bogdanov, S. (2004). Quality standards of bee pollen and beeswax. *Apiacta*, 38(August), 334–341.

Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*, 56(11), 317–333. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>

Chang, S. S., Ostric-Matijasevic, B., Hsieh, O. A. L., & Huang, C.-L. (1977). Natural antioxidants from rosemary and sage. *J Food Sci*, 42(4), 1102–1106.

Chen, Y., Xiong, H., Zhang, X., & Wang, S. (2012). Electrochemical detection of in situ dna damage induced by enzyme-catalyzed fenton reaction. part II in hydrophobic room temperature ionic liquid. *Microchim Acta*, 178(1–2), 37–43. <https://doi.org/10.1007/s00604-012-0809-2>

Dawbaa, S., Aybastier, Ö., & Demir, C. (2017). Ultrasensitive determination of DNA oxidation products by gas chromatography–tandem mass spectrometry and the role of antioxidants in the prevention of oxidative damage. *J Chromatogr B*, 1051, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.03.014>

Dizdaroglu, M. (2012). Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease. *Cancer Lett*, 327(1–2), 26–47. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.016>

Eraslan, G., Kanbur, M., Silici, S., & Karabacak, M. (2010). Beneficial effect of pine honey on trichlorfon induced some biochemical alterations in mice. *Ecotoxicol Environ Saf*, 73(5), 1084–1091. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.02.017>

Güneş, M. E., Şahin, S., Demir, C., Borum, E., & Tosunoğlu, A. (2016). Determination of phenolic

- compounds profile in chestnut and floral honeys and their antioxidant and antimicrobial activities. *J Food Biochem*, (August), 1–12. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12345>
- Kao, Y. T., Lu, M. J., & Chen, C. (2011). Preliminary analyses of phenolic compounds and antioxidant activities in tea pollen extracts. *J Food Drug Anal*, 19(4), 470–477.
- Louveaux, J., Maurizio, A., & Vorwohl, G. (1978). Methods of melissopalynology. *Bee World*, 59, 139–157.
- Leite, J. P. V., Rastrelli, L., Romussi, G., Oliveira, A. B., Vilegas, J. H. Y., Vilegas, W., & Pizza, C. (2001). Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from Brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*). *J Agric Food Chem*, 49(8), 3796–3801. <https://doi.org/10.1021/jf010294n>
- Mi, J. C., Howard, L. R., Prior, R. L., & Clark, J. R. (2004). Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Sci Food Agric*, 84(13), 1771–1782. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1885>
- Moroney, M.-A., Alcaraz, M. J., Forder, R. A., Carey, F., & Houlst, J. R. S. (1988). Selectivity of Neutrophil 5-Lipoxygenase and Cyclo-oxygenase Inhibition by an Anti-inflammatory Flavonoid Glycoside and Related Aglycone Flavonoids. *J Pharm Pharmacol*, 40(11), 787–792.
- Nasır, N., Şahin, S., Çakmak, Z. E., & Çakmak, T. (2017). Optimization of ultrasonic-assisted extraction via multiresponse surface for high antioxidant recovery from *Chlorella* sp. (Chlorophyta), *Phycologia*, 56(April), 1–10. <https://doi.org/10.2216/16132.1>
- Rzepecka-Stojko, A., Drzał, A., Stojko, J., & Buszman, E. (2014). Effect of storage conditions on antioxidant activity of bee pollen extracts. *Med Weter*, 70(12), 740–744.
- Silva, B. M., Andrade, P. B., Valentão, P., Ferreres, F., Seabra, R. M., & Ferreira, M. A. (2004). Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: Antioxidant activity. *J Agric Food Chem*, 52(15), 4705–4712. <https://doi.org/10.1021/jf040057v>
- Şahin, S., & Demir, C. (2013). Antioksidan kapasite tayin yöntemi. Turkey. Retrieved from <http://online.turkpatent.gov.tr/EPATENT/ser vlet/PreSearchRequestManager>
- Veitch, N. C., & Grayer, R. J. (2011). Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. *Nat Prod Rep*, 28(10), 1626. <https://doi.org/10.1039/c1np00044f>
- Yıldız, O., Can, Z., Saral, Ö., Yuluğ, E., Öztürk, F., Aliyazicioğlu, R., Kolaylı, S. (2013a). Hepatoprotective potential of chestnut bee pollen on carbon tetrachloride-induced hepatic damages in rats. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/461478>
- Yıldız, O., Karahalil, F., Can, Z., Sahin, H., & Kolaylı, S. (2013b). Total monoamine oxidase (MAO) inhibition by chestnut honey, pollen and propolis. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 29(5), 690–694. <https://doi.org/10.3109/14756366.2013.843171>

RHEOLOGICAL AND SENSORIAL PROPERTIES OF SESAME PASTE BLENDS PREPARED WITH DIFFERENT SUGAR SOURCES

Dilara Tomruk¹, Esra Devseren¹, Işıl İlter¹,
Saniye Akyıl¹, Mehmet Koç^{2*}, Figen Kaymak Ertekin¹

¹Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, Ege University, Izmir, Turkey.

²Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, Adnan Menderes University, Aydın, Turkey.

Received /Geliş: 06.10.2017; Accepted /Kabul: 13.11.2017; Published online /Online baskı: 08.12.2017

Tomruk, D, Devseren, E, İlter, I, Akyıl, S, Koç, M, Kaymak Ertekin, F. (2018). Rheological and sensorial properties of sesame paste blends prepared with different sugar sources. *GIDA* (2018) 43 (1): 43-52 doi: 10.15237/gida.GD17091

ABSTRACT

Rheological properties of sesame paste (SP) blends, which were prepared with concentrated grape juice (CGJ), honey and sugar syrup were determined using rotational viscometer at different SP concentrations (40, 50 and 60%) and temperatures (25, 35, 40, 50°C). Flow behavior of the SP/CGJ blends were expressed by Power law model, however SP/honey and SP/sugar syrup blends were fitted to the Bingham Plastic model. The relationship of the consistency index "K" and SP concentration was described by exponential and power functions. Rising in temperature lead to a decrease in the consistency index of SP blends. Increasing in SP concentration resulted in an increase in consistency index of samples. Sensorial analysis was evaluated to research the effect of SP concentration and type of sugar sources on sensorial properties. Spreadibility and mouth-coating properties of blends enhanced with the increase in SP concentration. Moreover rheological properties highly correlated with sensorial properties of samples.

Keywords: Sesame paste, rheological properties, honey, sugar syrup, concentrated grape juice

FARKLI ŞEKER KAYNAKLARI İLE HAZIRLANAN TAHİN KARIŞIMLARININ REOLOJİK VE DUYUSAL ÖZELLİKLERİ

ÖZ

Farklı tahin konsantrasyonlarında (%40, 50 ve 60) ve farklı sıcaklıklarda (25, 35, 40, 50°C) pekmez, bal ve şeker şurubu kullanılarak hazırlanan tahin karışımlarının reolojik özellikleri belirlenmiştir. Tahin/pekmez karışımı için akış davranışı Power modeli ile ifade edilmiştir, ancak tahin/bal ve tahin/şeker şurubu karışımı için Bingham Plastik modeline uymuştur. Kıvam indeksi "K" ile tahin konsantrasyonu arasındaki ilişki üstel ve power fonksiyonlarıyla tanımlanmıştır. Sıcaklığın yükselmesiyle birlikte kıvam indeksi azalmıştır. Fakat tahin konsantrasyonunun artışıyla birlikte örneklerin kıvam indeksi yükselmiştir. Duyusal analiz, tahin konsantrasyonunun ve tatlandırıcı çeşidinin karışımların üzerindeki etkisini araştırmak için değerlendirilmiştir. Karışımların sürülebilirlik ve ağzın kaplanması özellikleri tahin konsantrasyonunun yükselmesiyle birlikte iyileşmiştir. Ayrıca tahin karışımlarının reolojik özellikleri, örneklerin duyuşsal özellikleri ile oldukça yüksek bir korelasyona sahiptir.

Anahtar kelimeler: Tahin, reolojik özellikler, bal, şeker şurubu, pekmez

* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar;

✉ mehmetkoc@adu.edu.tr,

☎ (+90) 256 213 7503

☎ (+90) 256 213 6686

INTRODUCTION

Sesame paste (SP) is one of popular traditional products in East Asian and Middle Eastern countries (Johnson et al., 1977; Sawaya et al., 1985), also in Turkey. Roasted, dehulled or hulled and ground sesame seeds are used for SP production. SP is rich of lipids, proteins and dietary fiber (Abu-Jdayil et al., 2002). India, Sudan, China and Burma (Abou-Gharbia et al., 1997) are the main countries cultivating sesame seeds (*Sesamum indicum* L.). Sesame has also been considerably used as an ingredient (bakery product) or consumed directly as seed, oil or paste for many years.

SP is generally consumed after mixing with different sugar sources. Honey, sugar syrup, date syrup and concentrated grape juice (CGJ) (Kaya, 2002) are used for this purpose. However SP and these sugar sources are separately available for sale in the market and the SP blend is prepared by consumers themselves in accordance with their preference. Ready-mixed SP/sugar source blend would be an innovative and value-added product for the food market. One of the main criteria that affects the consumers' acceptance is the spreadability of the SP blends. Spreadability is a property that is highly related with the consistency of the blends (Alpaslan & Hayta, 2002). The consistency known as one of rheological properties of food materials determines the shelf-life stability of final product (Abu-Jdayil et al., 2002).

SP blends which are an emulsion, consists of dispersed phase (oil phase) as SP and continuous phase (water phase) as sugar sources. Emulsion is formed due to interaction of proteins and lipids in the SP blends (Alpaslan & Hayta, 2002). In the emulsion, sesame proteins which act as emulsifier are very important at oil-water interface. The rheological properties of an emulsion are directly affected by temperature and concentration of oil and water phase (Rao, 1999). As mentioned above, interaction between the lipids and the proteins leads to formation of emulsion which also improves the sensorial attributes like mouthfeel of the product.

In literature many studies have been published that are related with the rheological properties of sesame paste. It has been reported that pseudoplastic and thixotropic behavior reflects the steady shear behavior of sesame paste (Alpaslan & Hayta, 2002; Abu-Jdayil et al., 2002; Altay & Ak, 2005). Alpaslan and Hayta (2005), have also studied the rheological and sensorial quality of CGJ and SP blends at different concentrations and temperatures. It was determined that flow behavior and consistency index is influenced by the CGJ content and temperature. As the CGJ content increased, emulsion stability of the blends has improved. Non-Newtonian behavior has successfully explained the flow behavior of CGJ (Kaya, 2002; Sengul et al., 2005). Besides, CGJ and SP blends exhibited non-Newtonian pseudoplastic behavior. Arslan and co-workers (2005); were also determined the rheological behavior of SP and CGJ blends at different SP concentrations and temperatures. But they found that SP/CGJ blends showed non-Newtonian, shear thinning behavior at different temperatures. The flow behavior of blends was successfully explained with the power-law model. Temperature has significantly affected the flow behavior index, "n" and the consistency coefficient, "K" parameters. As mentioned above, CGJ is not only way to produce SP blend. Thus, Gharehyakheh and co-workers (2014); prepared SP blend with honey and studied its rheological properties. Result of this study revealed that honey and SP blend showed time independency and shear thinning behavior.

The objectives of this study were to prepare SP blends with CGJ, honey and sugar syrup with different SP concentration and determine the flow behavior of these blends at different temperatures.

MATERIALS AND METHOD

Materials

SP (1.18 % moisture, 50.76 % oil, 22.85 % carbohydrate, 23.35 % protein, 1.86 % ash), CGJ, pine honey (in this context it is called honey) and sugar (sucrose) were obtained by local market. All raw materials were kept at room temperature in dark condition until they were used. The brix values of CGJ and honey were 69 and 78°Brix, respectively.

Preparation of SP/sugar rich product blends

In order to get standard total soluble solid content of sugar sources, CGJ and honey were diluted with tapped water to 65°Brix. Sugar syrup was prepared with sugar and tapped water and its brix was also adjusted to 65°Brix. 100 g of blends were prepared by adding SP to sugar sources at different SP concentrations of 40, 50 and 60 % (w/w) and mixing gently with a spatula for a minute.

Rheological measurements

Rheological measurements of the SP/CGJ (SP-C), SP/sugar syrup (SP-S) and SP/honey (SP-H) blends were conducted using a rotational viscometer (Fungilab, Spain) equipped with the small sample adapter and TR 8, 9, 10 or 11 spindles. Spindle type was chosen depending on blends' concentration. Also, the adapter includes a thermocouple which is connected to viscometer on the bottom to measure the temperature of the samples. In order to keep the temperature at constant levels during the measurements, a chiller (Daihan, South Korea) was connected to the jacket surrounding the sample adapter cell. The rheological measurements were carried out at different temperatures 25, 35, 40 and 50 °C. After the sample was poured to the sample cell, it was allowed to stand for 10 min in the jacket to reach the targeted measuring temperature without working of viscometer. Then the viscometer ran at a wide rotor speed range (0.1-200 rpm) for 5 minutes. The rheological data including apparent viscosity, shear stress, shear rate, torque % and temperature were recorded for each measurement and transferred to Microsoft Excel by Datalogger software (Fungilab, Spain).

Each experiments were carried out in two replicates.

The experimental data were fitted to various models (Eq. 1-4) to obtain rheological (τ_0 , μ , K and n) and statistical (R^2) parameters;

$$\text{Newtonian Model} \quad \tau = \mu \cdot \dot{\gamma} \quad [1]$$

$$\text{Power Law Model} \quad \tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad [2]$$

$$\text{Herschel Bulkley Model} \quad \tau = \tau_0 + K \cdot \dot{\gamma}^n \quad [3]$$

$$\text{Bingham Plastic Models} \quad \tau = \tau_0 + K \cdot \dot{\gamma} \quad [4]$$

Where τ is shear stress (Pa), $\dot{\gamma}$ is shear rate (1/s), n is flow behaviour index (dimensionless), K is consistency coefficient, ($\text{Pa} \cdot \text{s}^n$), μ is viscosity ($\text{Pa} \cdot \text{s}$) and τ_0 is yield stress (Pa).

Sensory Evaluation

Sensory analysis of SP blends with CGJ, honey, sugar syrup was performed according to Alpaslan and Hayta (2002), with 10 panelists aged 22 to 30. All panelists were non-smokers. A slice of white bread and a knife for each blend were given all panelists. The intensity was determined using a 5-point scale (1 being the lowest and 5 the highest). Panelists also evaluated the general acceptance, appearance, color, smell, mouth-coating, spreadibility and taste of the blends.

Statistical Analysis

The statistical analyses were carried out by using the SPSS version 15.0 Windows software program (SPSS Inc., Chicago, IL). The results were evaluated by analysis of variance (ANOVA) test. The mean comparison was performed with Duncan's multiple range test at $P < 0.05$ level. Pearson correlation test also carried out to determine the rheological and sensorial properties relationship.

RESULTS AND DISCUSSION

The rheological properties of SP blends, which were prepared with CGJ, sugar syrup and honey and consisted of different SP concentrations (40, 50, 60%, w/w), were determined with respect to temperature at 25, 35, 40 and 50 °C. The results of apparent viscosity of SP blends changing with shear rate showed that the flow behavior of all SP blends at any concentration of SP and temperature explained with non-Newtonian flow behavior. However, while the flow behavior of SP-C blends was explained with power law model, the flow behavior of SP-S and SP-H blends were successfully described with the Bingham Plastic model for all temperatures and concentrations.

Increasing in shear rate resulted in decreasing in apparent viscosity of all samples as shown in Figure 1. The flow behavior index (n) and consistency (K) values of SP-C blends were obtained by fitting the shear rate versus shear stress data to a power law model. Differences in

shear rate range of the graphs was based on the selection of the appropriate range for each concentration and temperature that viscometer was able to measure properly. The values of flow behavior index, n , were ranged from 0.119 to 0.896, while the consistency index, K , was ranged from 0.265 to 7.338 Pa.s (Table 1). A decrease in the SP concentration in SP-C blends leads to an increase in viscosity of blends for all temperatures whereas the consistency decreased with rising temperature. The rheograms of SP-S and SP-H blends with different SP concentrations at different temperatures were also given in Figure 1. Apparent viscosity of these blends decreased with increasing shear rate indicating the shear thinning behavior similar to SP-C blends. The

consistency index (K) values and yield stress (τ_0) of these blends were determined with fitting the shear rate versus shear stress data to a Bingham Plastic model. Model parameters for SP-S and SP-H blends were given in Table 1. The values of consistency index (K) were of SP-S blends were ranged from 0.049 to 0.480 Pa·s ^{n} and the yield stress (τ_0) were ranged between 0.581 and 14.00 Pa. The R^2 values were ranged from 0.924 to 1.000 for all SP-S blends. Moreover, indicating the results for SP-H blends the values of consistency index (K) were ranged from 0.040 to 0.594 Pa·s and the yield stress (τ_0) were ranged between 0.485 and 8.99 Pa. The R^2 values were ranged from 0.898 to 1.000 at all concentrations and temperatures.

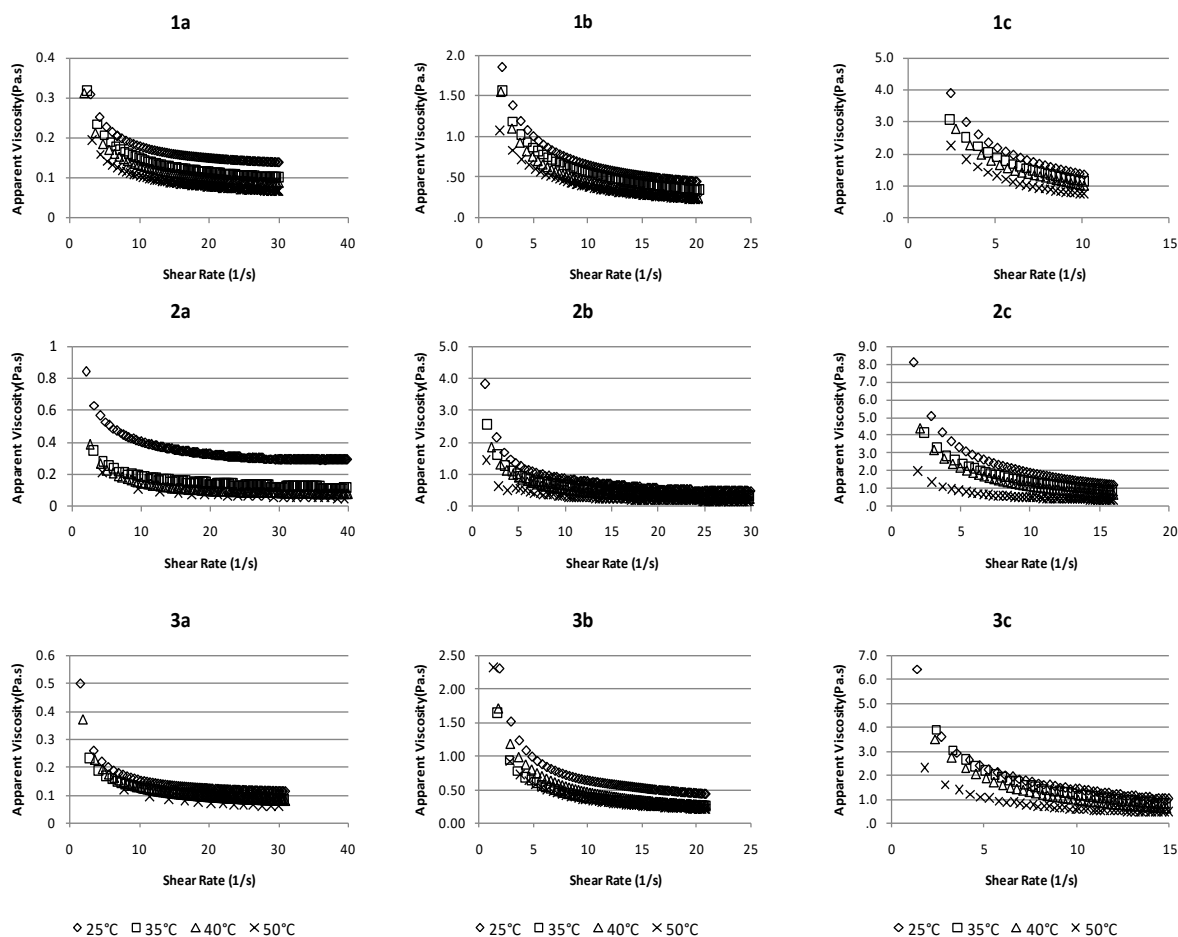


Figure 1. Apparent viscosity and shear rate relationship for SP blends. Numbers 1, 2, 3 represent SP-C, SP-S and SP-H blends, respectively. a, b, c letters represent containing 40%, 50% and 60% SP at different temperatures, respectively

High SP concentration caused a viscous SP blends at all temperature while the consistency index of blends decreased. Maskan and Göğüş (2000), explained this circumstance as molecular movements and interfacial film formation due to high solid content. However the apparent viscosity of SP blends decreased with increasing shear rate. Rao (1999), showed that generating hydrodynamic forces and increasing in interaction

of sugar, oil and protein lead to the structural deformation of the food blend. Singh and co-workers (2003); also explained that shearing resulted in deformation and disruption of oil droplets. Moros and co-workers (2002); reported that egg-yolk stabilized emulsions induced shear structural breakdown. It's because of oil droplet deflocculation.

Table 1. Flow behavior parameters for SP/sugar syrup (SP-S), SP/honey (SP-H) and SP/CGJ (SP-C) blends at different concentrations and temperatures

Samples	Temperature (°C)	SP Concentration								
		40%			50%			60%		
		K (Pa.s ⁿ)	τ_0 (Pa)	R ²	K (Pa.s ⁿ)	τ_0 (Pa)	R ²	K (Pa.s ⁿ)	τ_0 (Pa)	R ²
SP-S*	25	0.114 ^a	0.848 ^a	1.000	0.319 ^a	4.89 ^a	0.989	0.480 ^a	14.00 ^a	0.924
	35	0.069 ^a	0.747 ^a	0.999	0.157 ^a	4.64 ^a	0.960	0.364 ^a	9.88 ^b	0.927
	40	0.058 ^a	0.637 ^a	0.997	0.109 ^a	3.93 ^a	0.988	0.225 ^{ab}	8.64 ^b	0.966
	50	0.049 ^a	0.581 ^a	0.994	0.072 ^a	2.15 ^a	0.987	0.095 ^b	4.13 ^c	0.941
SP-H*	25	0.094 ^a	0.485 ^a	0.999	0.266 ^a	3.63 ^a	0.993	0.594 ^a	8.44 ^a	0.986
	35	0.069 ^{ab}	0.822 ^a	0.999	0.202 ^a	2.15 ^a	0.989	0.353 ^{ab}	8.99 ^a	0.921
	40	0.051 ^b	0.729 ^a	1.000	0.147 ^a	3.29 ^a	0.962	0.237 ^{ab}	8.19 ^a	0.909
	50	0.040 ^b	0.667 ^a	0.998	0.071 ^a	2.66 ^a	0.987	0.153 ^b	4.65 ^b	0.898
SP-C**	25	0.347 ^a	0.896	0.988	2.540 ^a	0.410	0.995	7.338 ^a	0.266	0.993
	35	0.313 ^a	0.692	0.996	2.101 ^a	0.333	0.997	5.996 ^{ab}	0.289	0.987
	40	0.280 ^a	0.661	0.996	1.881 ^a	0.370	0.994	5.634 ^{ab}	0.119	0.917
	50	0.265 ^a	0.638	0.993	1.610 ^a	0.338	0.962	4.179 ^b	0.326	0.981

* Flow behavior described with Bingham Plastic model

** Flow behavior described with power law model

The different letter in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

Rising in temperature lead to a decrease in the consistency index of SP blends. İçier (2009), discovered that the consistency index of whey solutions increased as the temperature decreased. Marcotte and co-workers (2001); and Abu-Jdayil and co-workers (2002); also found that the consistency coefficients changed inversely with temperature. Heating could break molecular complexity and bonds could stabilize the

molecular structure and reduce the effective molecular volume in protein and sugars resulting in a decrease in viscosity (Alpaslan & Hayta 2002). SP is mainly composed of oil and protein while CGJ, honey and sugar syrup are rich in sugar. The viscosity of SP blends containing different sugar sources may also be controlled by the molecular weight of sugars in these sugar sources.

Effect of Temperature and SP Concentration on Activation Energy

Arrhenius-type equation successfully describes relation of temperature and consistency coefficient as,

$$K = K_t \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad [5]$$

where, K_t are the experimental constant, E_a is the activation energy (kJ/mol), R is the universal gas constant (J/mol·K), and T is the absolute temperature (K). Before process can occur, E_a as a kind of energy barrier must be overcome (Rao 1999). Linear regression analysis was performed to the logarithmic form of Eq. (5) for establish relationship between the parameters (Table 2).

Table 2. Parameters of the Arrhenius equation (Eq.5) for temperature dependency of consistency coefficient at different SP concentration

Samples	SP Concentration (%)	K_t (mPa·s)	E_a (kJ/mol)	R^2
SP-C	40	9.34	8.94	0.953
	50	6.65	14.72	0.997
	60	6.07	17.64	0.971
SP-S	40	1.82×10^{-3}	27.18	0.946
	50	1.09×10^{-6}	48.17	0.987
	60	3.66×10^{-7}	52.43	0.921
SP-H	40	1.11×10^{-3}	28.11	0.982
	50	3.55×10^{-5}	39.47	0.947
	60	1.06×10^{-5}	44.20	0.992

E_a explained how temperature effected the viscosity of the blends. The results showed that increasing in SP concentration resulted in an increase in E_a while a decrease in experimental constant K_t . Alpaslan and Hayta (2002) also observed that E_a values of SP and CGJ blends decreased with increasing CGJ concentration.

In most of food products, the composition of ingredients directly affected the rheological properties of products. The viscosity of food products inversely correlated with solid concentration (Bourne, 2002) at constant temperature. Rao (1999), described the consistency index, K , as a function of SP concentration (C) with exponential (Eq. 6) and power (Eq. 7) models

$$K = K_{c_1} e^{a_1 C} \quad [6]$$

$$K = K_{c_2} C^{a_2} \quad [7]$$

where, K_{c_1} , K_{c_2} , a_1 , and a_2 are experimental constants (Rao 1999). The corresponding model parameters were shown in Table 1. The effect of SP concentration on the consistency coefficient was defined sufficiently with both models. Effect of SP-C, SP-S and SP-H concentrations on the consistency coefficient were given in Table 3 for different temperatures.

Table 3. Effect of SP concentration on the consistency coefficient of samples at different temperatures

Samples	Temperature (°C)	Exponential Model (Eq. 6)			Power Model (Eq. 7)		
		a ₁	K _{c1}	R ²	a ₂	K _{c2}	R ²
SP-C	25	0.152	0.907	0.970	1.045	0.125	0.972
	35	0.147	0.984	0.972	1.032	0.129	0.975
	40	0.150	0.791	0.976	1.062	0.113	0.978
	50	0.137	1.234	0.969	0.999	0.142	0.972
SP-S	25	0.061	13.04	0.964	0.550	0.655	0.975
	35	0.083	2.464	1.000	0.816	0.207	0.999
	40	0.067	3.876	0.998	0.703	0.301	0.996
	50	0.033	13.29	0.991	0.388	0.929	0.996
SP-H	25	0.092	2.449	0.994	0.843	0.203	0.996
	35	0.081	2.874	0.967	0.811	0.214	0.974
	40	0.076	2.663	0.955	0.810	0.196	0.964
	50	0.067	2.731	1.000	0.764	0.219	0.999

Formation of oil droplet can be asserted to increase the consistency coefficient values owing to the viscosity of the emulsion by rising SP concentration. Arslan and co-workers (2005); explained this circumstance as following, while SP content increased, a greater number of oil drops was suspended and tend to clump to form clusters. Therefore, these clusters dissolved fluids and caused to require more effort for the same flow rate. Moreover, the higher viscosity of blends could be explained that the particle-particle interactions and molecular motions also increased with solid content in terms of SP concentration (Alpaslan & Hayta 2002; Toğrul & Arslan 2004). Both exponential and power functions was used to fit the variation of E_a with SP concentration (Table 2),

$$E_a = A_1 e^{b_1 C} \quad [8]$$

$$E_a = A_2 C^{b_2} \quad [9]$$

where, A_1 , A_2 , b_1 , and b_2 , are the proportionality constants.

In order to calculate the model constants, the linearized forms of these two equations were used, as shown in Table 4. Kaya and Belibağlı (2002), stated that activation energy for a flow changes depended on the soluble solid content for a constant temperature. The dependency of E_a on the SP concentration was better described by the power model.

Table 4. Effect of SP concentration on activation energy, E_a of different samples

Samples	Exponential Model (Eq.8)			Power Model (Eq.9)		
	A ₁	b ₁	R ²	A ₂	b ₂	R ²
SP-C	2435.54	0.034	0.932	4.706	0.179	0.955
SP-S	7963.89	0.032	0.844	5.753	0.157	0.882
SP-H	11871.84	0.022	0.923	6.892	0.108	0.949

Sensory Evaluation

Sensory properties such as appearance, aroma, flavor, and texture are critical factors affecting consumer decision to buy or consume a food product (Chambers & Bowers 1993). The results of sensory analysis showed that mouth-coating, spreadability and overall acceptance scores of blends increased with increasing of SP concentration for all samples. However the sensorial properties of the blends were evaluated

with respect to appearance and color, the highest scores of these criteria were generally obtained from the blends containing 50% SP. Although the smell scores of SP blends were not significantly changed with SP concentration, increasing in SP concentration improved the taste scores of all the blends. According to the overall acceptability, the most appreciated samples were products had higher SP content than 50% irregardless of sugar sources (Table 5).

Table 5. Sensory evaluation scores of SP blends

Samples	SP Conc. (%)	Appearance	Colour	Smell	Mouth-coating	Spreadability	Taste	Overall acceptance
SP-C	40	3.31 ^a ±0.46	3.25 ^a ±0.21	3.75 ^a ±0.29	2.88 ^a ±0.39	2.63 ^a ±0.48	3.44 ^a ±0.33	3.00 ^a ±0.11
	50	4.00 ^{ab} ±0.16	4.00 ^{ab} ±0.76	3.94 ^a ±0.56	4.06 ^b ±0.56	3.56 ^b ±0.25	4.00 ^a ±0.43	3.88 ^b ±0.30
	60	4.25 ^b ±0.36	3.81 ^b ±0.53	4.13 ^a ±0.64	4.75 ^b ±0.46	4.69 ^c ±0.46	4.25 ^a ±0.21	4.25 ^b ±0.65
SP-S	40	3.13 ^a ±0.49	3.44 ^a ±0.12	3.44 ^a ±0.12	2.63 ^a ±0.22	2.13 ^a ±0.64	2.50 ^a ±0.26	2.68 ^a ±0.28
	50	4.00 ^a ±0.56	3.94 ^a ±0.26	4.06 ^a ±0.42	3.88 ^b ±0.63	3.75 ^b ±0.11	3.56 ^b ±0.23	3.88 ^b ±0.19
	60	3.81 ^a ±0.35	3.63 ^a ±0.58	4.13 ^a ±0.39	4.63 ^b ±0.44	4.56 ^c ±0.23	4.56 ^c ±0.43	4.38 ^b ±0.29
SP-H	40	3.50 ^a ±0.21	3.69 ^a ±0.40	3.75 ^a ±0.41	3.19 ^a ±0.75	2.38 ^a ±0.14	3.50 ^a ±0.53	3.13 ^a ±0.54
	50	4.19 ^{ab} ±0.65	4.31 ^a ±0.59	3.94 ^a ±0.16	3.94 ^b ±0.26	4.13 ^b ±0.58	4.19 ^b ±0.65	3.94 ^b ±0.43
	60	3.94 ^b ±0.42	3.88 ^a ±0.33	3.88 ^a ±0.39	4.50 ^b ±0.46	4.75 ^b ±0.46	4.31 ^b ±0.46	4.31 ^b ±0.36

Different letters in the same column for each type of blend are significantly different ($P<0.05$).

Spreadability and mouth-coating were significant sensorial properties of semi-solid food texture. Spreadability exhibits the uniform distribution of the product over a surface (Shakerardekani et al., 2013). For all the blends, it was determined that spreadability property enhanced with the increase in SP concentration and that led to highest scores given by panelists. In contrast to Alpaslan and Hayta (2002), the spreadability of SP blends improved with increasing SP concentration. It can be clearly seen that the sensorial spreadability scores of the SP blends increased with increasing in consistency index. The mouth-coating scores of blends also enhanced with increasing in SP concentration likewise spreadability. Muego and

Resurreccion (1993), had also reported that peanut paste samples with lower consistency exhibit less mouth-coating properties. The blends prepared with CGJ had higher mouth-coating scores compared to those prepared with sugar syrup and honey.

The correlation between rheological and sensorial properties of SP blends were given in Table 6. The results of Pearson correlation test showed that rheological properties E_a and K_t highly correlated with sensorial properties of SP blends.

Table 6. Pearson correlation (r) matrix between sensorial and rheological properties

Samples	Parameters	Appearance	Colour	Smell	Mouth-coating	Spreadibility	Taste	OA**	K _t (mPa·s)
SP-C	Colour	0.875							
	Smell	0.965	0.718						
	Mouth-coating	0.994	0.814	0.989					
	Spreadibility	0.949	0.678	0.998*	0.979				
	Taste	0.999*	0.851	0.976	0.998*	0.963			
	OA**	0.999*	0.859	0.973	0.997	0.959	0.999*		
	K _t (mPa·s)	-0.996	-0.916	-0.937	-0.979	-0.916	-0.999	-0.992	
	E _a (kJ/mol)	0.997*	0.835	0.982	0.999*	0.970	0.999*	0.999*	-0.986
SP-S	Colour	0.900							
	Smell	0.955	0.729						
	Mouth-coating	0.831	0.505	0.959					
	Spreadibility	0.856	0.545	0.971		0.999*			
	Taste	0.754	0.392	0.915	0.992	0.985			
	OA**	0.878	0.580	0.98	0.996	0.999*	0.977		
	K _t (mPa·s)	-0.978	-0.789	-0.996	-0.929	-0.945	-0.874	-0.958	
	E _a (kJ/mol)	0.933	0.683	0.998*	0.975	0.985	0.940	0.991	-0.988
SP-H	Colour	0.930							
	Smell	0.998*	0.909						
	Mouth-coating	0.692	0.378	0.729					
	Spreadibility	0.813	0.542	0.842	0.983				
	Taste	0.876	0.636	0.9	0.955	0.993			
	OA**	0.779	0.493	0.811	0.992	0.998*	0.985		
	K _t (mPa·s)	-0.927	-0.723	-0.945	-0.913	-0.972	-0.993	-0.958	
	E _a (kJ/mol)	0.792	0.512	0.823	0.989	0.999*	0.988	0.999*	-0.964

*Correlation is significant at the 0.05 level

**Overall acceptance

CONCLUSION

In this study, rheological and sensorial properties of SP blends prepared with CGJ, honey and sugar syrup and the effect of temperature and SP concentration in the blends were investigated. It was found that all the blends exhibited non-Newtonian, shear thinning fluid behavior by reason of crystal structure keeping the pasty form of SP. Flow behavior of SP-C blends was well presented by the Power law model although the flow behavior of the SP-S and SP-H blends were fitted to Bingham Plastic model for all temperatures. Both power and exponential

models adequately explained the relationship between SP concentration and consistency coefficient. The activation energy values increased with increasing SP concentration in the blends. The effect of rheological properties of the SP blends on consumer preferences was demonstrated with sensorial analysis. Sensorial scores of the blends were improved with increasing SP concentration. Therefore the highest overall acceptance was obtained from the blends containing 60% SP.

REFERENCES

- Abou-Gharbia, H.A., Shahidi, F., Shahata, A.A.Y., Youssef, M.M. (1997). Effects of processing on oxidative stability of sesame oil extracted from intact and dehulled seeds. *J Am Oil Chem Soc*, 74: 215–221.
- Abu-Jdayil, B., Al-Malah, K., Asoud, H. (2002). Rheological characterization of milled sesame (tehineh). *Food Hydrocoll*, 16: 55–61.
- Alpaslan, M., Hayta, M. (2002). Rheological and sensory properties of pekmez (grape molasses/tahin) (sesame paste blends). *J Food Eng*, 54: 89–93.
- Altay, F.L., Ak, M.M. (2005). Effects of temperature, shear rate and constituents on rheological properties of tahin (sesame paste). *J Sci Food Agric*, 85: 105–111.
- Arslan, E., Yener, M.E., Esin, A. (2005). Rheological characterization of tahin/pekmez (sesame paste/concentrated grape juice) blends. *J Food Eng*, 69: 167–172.
- Bourne, M.C. (2002). Food Texture and Viscosity Concept and Measurement. Academic Press, London, 78-81 p., ISBN:0121190625
- Chambers, E., Bowers, J.R. (1993). Consumer perception of sensory qualities in muscle foods. *Food Technol* (Chicago, IL, United States), 47: 116–120.
- Gharehyakheh, S., Amiri, M., Savareh, S.J. (2014). Rheological behavior of sesame paste/honey blend with different concentration of honey. *Eur J Exp Biol*, 4: 53-57.
- Icier, F. (2009). Influence of ohmic heating on rheological and electrical properties of reconstituted whey solutions. *Food Bioprod Process*, 87: 308–316.
- Johnson, L.A., Suleiman, T.M., Lucas, E.E. (1977). Sesame protein: a review and prospective. *J Am Oil Chem Soc*, 56: 463–468.
- Kaya, A., Belibağlı, K.B. (2002). Rheology of solid Gaziantep Pekmez. *J Food Eng*, 54: 221–226.
- Marcotte, M., Taherian, Hoshahili, A.R., Ramaswamy, H.S. (2001). Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature. *Food Res Int*, 34: 695-703.
- Maskan, M., Gögüş, F. (2000). Effect of sugar on the rheological properties of sunflower oil-water emulsions. *J Food Eng*, 43: 173-177.
- Moros, J.E., Franco, J.M., Gallegos, C. (2002). Rheology of spray-dried egg yolk stabilized emulsions. *Int J Food Sci Technol*, 37: 297-310.
- Muego, K.F., Resurreccion, A.V.A. (1993). Physicochemical and sensory characteristics of peanut paste as affected by processing condition. *J Food Process Pres*, 17: 321–336.
- Rao, M.A. (1999). Rheology of Fluid and Semisolid Foods, Principles and Applications. Aspen Publications, Maryland, ISBN: 9780387709291
- Sawaya, W.N., Ayaz, J.K., Khalil, J.K., Al-Shaltat, A.F. (1985). Chemical composition and nutrition quality of tehineh (sesame butter). *Food Chem*, 18: 35–45.
- Sengul, M., Ertugay, M.F., Sengul, M. (2005). Rheological, physical and chemical characteristics of mulberry pekmez. *Food Control*, 16: 73–76.
- Shakerardekani, A., Karim, R., Ghazali, H.M., Chin, N.L. (2013). Textural, rheological and sensory properties and oxidative stability of nut spreads-A Review. *Int J Mol Sci*, 14: 4223-4241.
- Singh, H., Tamehana, M., Hemar, Y., Munro, P.A. (2003). Interfacial compositions, micro structures and properties of oil-in-water emulsions formed with mixtures of milk proteins and κ -carrageenan: 1. Sodium caseinate. *Food Hydrocoll*, 17: 539-548.
- Toğrul, H., Arslan, N. (2004). Mathematical model for prediction of apparent viscosity of molasses. *J Food Eng*, 62: 281–289.

**BACILLUS SUBTILIS İÇEREN YENİLEBİLİR KAPLAMA
UYGULAMASININ ÇİLEĞİN RAF ÖMRÜNE ETKİSİ**

**Gülşah Karabulut, Büşra Efendioğlu, Büşra Kurtuluş, Ebru Turan,
Hilal Kuyumcu, Şule Esen, Arzu Çağrı Mehmetoğlu***

Sakarya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Sakarya, Türkiye

Geliş / Received: 12.06.2017; Kabul / Accepted: 24.11.2017; Online baskı / Published online: 11.12.2017

Karabulut, G., Efendioğlu, B., Kurtuluş, B., Turan, E., Kuyumcu, H., Esen, Ş., Çağrı Mehmetoğlu, A. (2018). *Bacillus subtilis* içeren yenilebilir kaplama uygulamasının çileğin raf ömrüne etkisi. GIDA (2018) 43 (1): 53-63 doi: 10.15237/gida.GD17054

ÖZ

Çilek (*Fragaria x ananassa*) meyvesinin su kaybına, fiziksel ve mikrobiyel bozulmalara karşı hassas olması pazarlanmasını zorlaştırmaktadır. Bu çalışmada, çileklerin raf ömrünü artırmak amacıyla kontrol (saf su), peynir altı suyu proteini (PASP), *Bacillus subtilis* içeren saf su (9 log KOB/mL), *B. subtilis* içeren PASP kaplama (9 log KOB/mL) olmak üzere 4 farklı uygulama yapılmıştır. Çileklerde kaplamadaki bakteri korunumu, küf inhibisyonu, ağırlık kaybı, pH, renk ve duyu özelliklerindeki değişimler 25 °C'de 5 günlük depolama boyunca analiz edilmiştir. Çileklerde *B. subtilis* korunumu saf su ile uygulandığında %77; PASP kaplama ile uygulandığında ise %83'tür. Küf inhibisyonu kontrole kıyasla *B. subtilis* içeren su uygulamasında %21; *B. subtilis* içeren PASP kaplama uygulamasında ise %16'dır. Depolama, tüm uygulamalarda çilek örneklerinin pH ve renk değerlerini önemli ölçüde değiştirmezken; kaplama uygulanan çileklerde ağırlık kaybını azaltmıştır. Ayrıca duyu analizinde *B. subtilis* kaplanan çileklerde yüksek kabul edilebilirlik saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Peynir altı suyu proteini, yenilebilir kaplama, antagonist, *Bacillus subtilis*, çilek

**EFFECTS OF EDIBLE COATING INCORPORATED WITH
BACILLUS SUBTILIS ON SHELF LIFE OF STRAWBERRY**

ABSTRACT

Susceptibility of strawberry (*Fragaria x ananassa*) to physical and microbial spoilage reduces its profit share in marketing. In this study, four different applications were investigated to improve shelf life of strawberries: whey protein concentrate (WPC), *Bacillus subtilis* with distilled water, WPC with *B. subtilis*, control (distilled water) coatings. During storage, viability of *B. subtilis* in coating, inhibition of mold, weight loss, pH, color and sensory properties were analyzed for 5 days at 25 °C. Viability of *B. subtilis* on the samples coated by water or WPC maintained 77% and 83%, respectively. The mold growth on strawberry coated with *B. subtilis* or coating containing *B. subtilis* was reduced 21% and 16%, respectively. The treatments did not change pH and color of strawberry; but coating application decreased weight loss of strawberry. Moreover, the highest acceptability was scored for the strawberry coated with *B. subtilis* in sensory analysis.

Keywords: Whey protein, edible coating, antagonist, *Bacillus subtilis*, strawberry

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ acagri@sakarya.edu.tr

☎ (+90) (264) 295 5920

☎ (+90) (264) 295 5601

GİRİŞ

Çilek (*Fragaria x ananassa*) meyvesi depolama sırasındaki mekaniksel yaralanmalara, su kaybına, fiziksel ve mikrobiyel bozulmalara karşı oldukça hassastır (Shafiee vd., 2010). Türkiye, çilek üretiminde 415.150 ton ile dünyada üçüncü; Avrupa'da ise ilk sırada yer almasıyla büyük öneme sahiptir (TÜİK, 2016). Ancak çilek meyvesinin hızla olgunlaşarak yaşlanma dönemine geçmesi pazarlanmasında zorluklara neden olmaktadır (Fan vd., 2009). Bu durumu önlemek amacıyla kullanılan yenilebilir kaplama uygulamaları meyvelerde tekstürel kaliteyi iyileştirmekte, nem ve oksijen geçişine bariyer sağlamakta, solunumu baskılamakta ve mikrobiyel gelişimi önleyebilmektedir (Bourtoom, 2008). Özellikle protein temelli kaplamalar ürüne parlaklık kazandırması, duyuşal özelliklerini değiştirmeden besin değerini artırması ve mükemmel bir oksijen bariyeri olmasıyla avantaj taşımaktadır (Tomasula, 2009).

Çileklerin hasat sonrası mikrobiyolojik olarak bozulmasındaki temel faktör *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium* spp. and *Mucor* spp. gibi küf suşlarıdır (Romanazzi vd., 2016). Taze meyve ve sebzeleri mikrobiyel bozulmalara karşı koruyarak raf ömrünü uzatmak için kullanılan yöntemlerin birçoğu kimyasal maddelerin kullanımına dayanmaktadır. Günümüzde dirençli patojen suşların artışına ve sağlık problemlerine neden olduğu bilinen kimyasal maddelerin kullanımına karşı yenilikçi biyokontrol uygulamaları üzerine yapılan çalışmalara duyulan ilgi artmaktadır (Vicente, 2002). Biyokontrol ajanları; patojenlerle besin ve yer mücadelesine girerek, antibiyotik benzeri litik enzimler üreterek ve biyofilm mekanizmalarıyla patojenlerin gelişmelerini ve çoğalmalarını engelleyebilmektedirler (Droby vd. 2009). Biyokontrol ajanlarının sentetik kimyasalların yerine gıda ürünlerinde başarılı bir şekilde uygulanması üzerine yapılan çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır (Janisiewicz ve Korsten, 2002). Örneğin; üzüm, çilek, portakal gibi küflenme riski olan meyvelerde *Clonostachys rosea*, *Cryptococcus laurentii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *C. laurentii* ve *Rhodotorula glutinis* gibi farklı tür antagonist mikroorganizmaların başarılı bir şekilde kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Cota

vd., 2008; Janisiewicz vd., 2008; Zhang vd., 2008; Zhang vd., 2010). Bu tür mikroorganizmaların kullanıldığı meyvelerde küf gelişimi başta olmak üzere mikrobiyel yönden kontrol sağlanmış olmakla birlikte duyuşal ve kimyasal özelliklerde de olumlu değişimler gözlenmiştir.

Antagonist ajanlardan biri olan *Bacillus subtilis* bakterisi 24'ten fazla antifungal madde üreterek çok çeşitli yapılarıdaki küf suşlarını engelleyebilme özelliğiyle dikkat çekmektedir (Chen vd., 2008). Yapılan çalışmalarda *B. subtilis*'in çileklerde yaygın bozulma etmeni *B. cinerea* ve *R. stolonifer*'e besi ortamında sırasıyla %43 ve %49 oranlarında antifungal etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Chen vd., 2008; Chaurasia vd., 2005). Benzer şekilde *B. subtilis*'in çilek meyvesinin yüzeyine tek başına ve mum kaplama ile birlikte uygulandığında küf gelişimini sırasıyla %79 ve %84 oranlarında inhibe ettiği rapor edilmiştir (Oregel-Zamudio vd., 2017).

Gıdalarda biyokontrol ve yenilebilir kaplamaların engeller teknolojisi kapsamında kullanımı yenilikçi bir uygulamadır. Filmler biyokontrol ajanlarının stres koşullarına toleransını artırabilmekte ve ajanlar uygulandığı gıdanın yüzeyine daha iyi tutunabilmektedir (Marín vd., 2016). Literatürde *B. subtilis* ile kombine PASP (peynir altı suyu proteini) temelli yenilebilir kaplama uygulanan çileklerin raf ömrü ve duyuşal kalitesinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Literatürdeki bu boşluğu kapatmak için çalışmamızda (1) *B. subtilis*'in çilek yüzeyindeki canlılığının korunumu; (2) kaplama yapısındaki bakterinin antifungal etkisi; (3) çileklerde raf ömrü ve depolama boyunca fiziksel ve duyuşal özelliklerdeki değişimler incelenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Çilek meyvelerinin (*Fragaria x ananassa*) benzer boyut, şekil, ağırlık, renk ve fiziksel ve mikrobiyel hasarı olmayanlar Sakarya Toplu Pazar'dan (Sakarya, Türkiye) seçilerek alınmıştır. Besiyerleri ve kimyasallar Merck'ten (Darmstadt, Almanya) alınmıştır. PASP konsantresi (%85 protein) Milkaş Gıda San. ve Dış Tic. Ltd. Şti.'den (İstanbul, Türkiye) temin edilmiştir.

Kültürler

Çalışmada kullanılan antagonist kültür *B. subtilis* Sakarya Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü Kültür Koleksiyonu'ndan (Sakarya, Türkiye) tedarik edilmiştir. *B. subtilis*'in çoğaltılması ve korunması amacıyla Nutrient Agar (NA) besiyerinde gelişen koloniler Nutrient Broth (NB) içerisine aktarılmıştır. Kültürler 30 °C'de 24 saat inkübasyon ile 2 kez aktifleştirilmiştir.

Çilekten küf suşlarının izole edilmesinde, oda koşullarında (25 °C) doğal olarak küflenmeye bırakılan çilek örneklerinin 10 gramı 90 mL peptonlu su içerisinde karıştırıcı (IKA,MS3 basic, Amerika) yardımıyla homojenize edilmiştir. Homojenat 10 mL NB besiyerine inoküle edilerek 25 °C'de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. Kullanılan kültürler %30 (h/h) gliserol içeren NB besiyerinde -80 °C'de depolanmıştır.

Yöntem

Bacillus subtilis içeren film ve çileklerin kaplanması

Öncelikle kullanılan *B. subtilis* ZBP4 kültürü 30 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası 9000 rpm 15 dakika 4 °C'de santrifüjlenerek (Hettich, Universal-320R, Almanya) dipte kalan pelet 2 kez steril destile su ile yıkanmıştır. Bakteri konsantrasyonu 9 log KOB/mL olarak ayarlanarak kaplama ve film uygulamalarında kullanılmıştır.

Kaplama ve film hazırlığı için Cagri vd. (2001) kullanıkdıkları yöntem modifiye edilmiştir. PASP'nin %5 (a/h)'lik yüksek proteinli konsantresi 160 mL destile steril su ile hazırlanmıştır. pH'sı 0.5 N NaOH kullanılarak pH'nın 8'e ayarlanması sonrası 90 ± 2 °C'de 30 dakika çalkalayıcı su banyosunda tutulmuştur. Isıtmanın son 5 dakikasında plastikleştirici olarak %2 (a/h) gliserol eklenmiştir. Bakteri içeren kaplama üretimi için santrifüj işlemiyle elde edilen *B. subtilis* (9 log KOB/mL) bakterisi soğutulan karışıma eklenerek karıştırıcı ile iyice karıştırılmıştır. Film eldesi için elde edilen kaplama ve bakteri içeren kaplama solüsyonları steril tepsilerde (150 x 180 cm²) 25 °C, %50 bağıl nemdeki iklimlendirme kabininde 2 gün kurutulmuştur.

Kaplama uygulaması için çilek örneklerinde kontrol (saf su), PASP kaplama, bakteri içeren PASP kaplama ve bakteri içeren saf su olmak üzere 4 farklı uygulama denenmiştir. Steril kabin içerisinde ızgaralar üstüne yerleştirilen çilek örneklerinin her yüzüne farklı kaplama solüsyonları püskürtülerek kuruması için yaklaşık 45 dakika oda koşullarında bekletilmiştir. Sonrasında 1000 gramlık porsiyonlara ayrılarak (her bir pakette yaklaşık 50-60 çilek bulunacak şekilde) market koşullarındaki satış paketlerine benzer ortam oluşturmak amacıyla alt ve üst kısımları delikli plastik kaplar ile paketlenmiştir. Çilek örnekleri 25 °C'de 5 gün boyunca depolanarak analiz edilmiştir.

B. subtilis canlılığı ve kaplamanın çilek üzerinde antifungal etkisi

Depolamanın 0., 2. ve 5. günlerinde bakteri içeren kaplama ve bakteri içeren saf su uygulamalarından alınan çilek örneğinin 10 gramı 90 mL %0,1 (h/h) peptonlu su içerisinde parçalayıcı (Interscience, Bagmixer 400, Fransa) ile 2 dakikada homojen hale getirilmiştir. Peptonlu su ile gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra MYP (Mannitol-Egg-yolk-Polymyxine Agar) besiyerlerinde 30 °C'de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır.

Kaplamaların antifungal etkisi in vitro ve in vivo ortamlarda incelenmiştir. In vitro uygulamada filmler steril olarak 6 mm çapında yuvarlak disk şeklinde kesilmiştir. Tartarik asit (%10, h/h) kullanılarak pH 3.5'e ayarlanmış PDA (Potato Dekstroz Agar) besiyerinin ortasına aktifleştirilmiş 4 log KOB/mL çilekten izole edilmiş küften 10 µL inoküle edilerek küf suşuna 3 mm uzaklıktaki bir kısma film örneği yerleştirilmiştir. Kontrol gruplarında sadece küf inoküle edilmiştir. Petrilerin 5 gün 25 °C'de inkübasyonu sonrası küflerin misel çapları cetvelle (1/10 mm) ölçülerek 5 ölçümün ortalaması hesaplanmıştır. Sonuçlar % inhibisyon formülüne göre verilmiştir (Denklem 1).

$$\%I = ((C-T) / C) * 100 \quad (1)$$

$$\%I = \text{Yüzde inhibisyon.}$$

C= Yalnızca küf gelişiminin olduğu petrilerde küf misel çaplarının ortalaması (mm).

T= Antagonist maya içeren filmlerin bulunduğu besiyerindeki küf misel çaplarının ortalaması (mm).

In vivo uygulamada *B. subtilis*'in biyokontrol etkinliği çilek örneklerindeki küf gelişimi üzerinden OGYE (Oxytetracyclin-Glucose-Yeast Extract Agar) besiyeri kullanılarak 25 °C'de 5 gün inkübasyon sonucunda test edilmiştir. Sonuçlar log KOB/gram çilek olarak verilmiştir.

Fiziksel analizler

Çilek örneklerinde depolamanın 0., 2. ve 5. günlerinde ağırlık kaybı, pH ve renk analizleri yapılmıştır. Ağırlık kaybı çileklerin 1000 gramlık paketlerinin hassas terazide (0,001 hassasiyetli) tartılmasıyla analiz edilmiştir. pH ölçümü için farklı uygulamalardan alınan çilek örneğinin 10 gramı homojenizatör yardımıyla karıştırılıp pH metre ile ölçüm gerçekleştirilmiştir (Oregel-Zamudio vd., 2017). Renk ölçümü Lovibond RT 300 Series Reflectance Tintometer (İngiltere) marka kolorimetre cihazı ile her bir çilek örneğinin, beyaz standart yüzey üzerinde L* (açıklık), a* (kırmızılık) ve b* (sarılık) renk parametreleri ölçülmüştür.

Duyusal analiz

Örneklerin duyuusal analizi Sakarya Üniversitesi'nde öğrenci 100 panelistle gerçekleştirilmiştir. Panelistlerden 9 nokta hedonik skala ile çilek örneklerinin renk, parlaklık, koku, ilk tat, son tat, tatlı, ekşi, pürüzsüzlük ve yumuşaklık değerlerini beğeni derecesine göre; 9: mükemmel, 1: aşırı kötü olacak şekilde puanlamaları istenmiştir. Analiz sonuçları; sorulara verilen puanların ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

İstatistiksel analiz

Farklı yenilebilir film ve çilekteki kaplama uygulamalarının mikrobiyolojik, fiziksel ve duyuusal özelliklerinden elde edilen veriler IBM SPSS Statistics 20 paket programıyla değerlendirilmiştir. Ortalamalar arası fark Duncan çoklu karşılaştırma testi ile %95 önem seviyesinde analiz edilmiştir. Her bir analiz gününde farklı uygulamalar 2 tekerrür olacak şekilde analiz edilmiştir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Bacillus subtilis canlılığı

Çilek yüzeyindeki *B. subtilis*'in (9 log KOB/mL) 25 °C'de 5 günlük depolama süresi boyunca saf su ve kaplama uygulamalarındaki canlılığı Şekil 1'e göre istatistiksel açıdan önemli derecede azalmaktadır ($P < 0.05$). Depolamanın sonunda *B. subtilis* kaplama ile uygulandığında canlılığın korunumu 7.27 ± 0.20 log KOB/gram (%korunum; %81) iken su ile uygulandığında 6.96 ± 0.85 log KOB/gram (%77)'dir. Aksine yapılan bir çalışmada, *Cryptococcus laurentii* (9 log KOB/mL) içeren sodyum aljinat ile kaplanan çileklerde antagonistin canlılığı 20 günlük depolama sonunda en az %49.7 oranında korunabildiğini belirtmişlerdir (Fan vd., 2009).

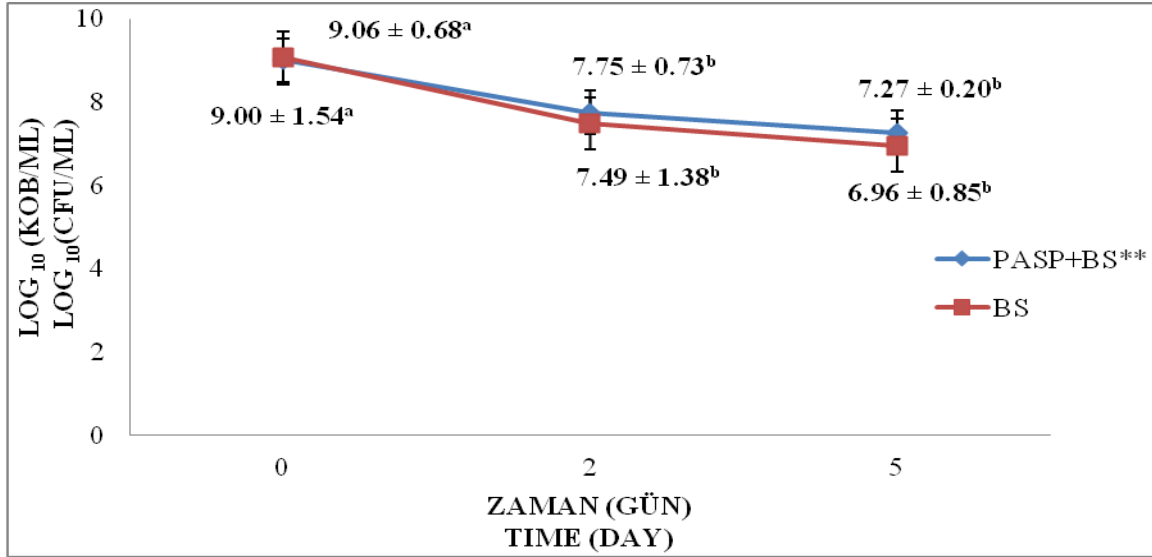
Çalışmamızda kullanılan *B. subtilis* bakterisi ekzopolisakarit yapısında olan biyofilmi üretebilmesi ve spor formunda bir bakteri olmasıyla olumsuz çevre koşullarına karşı yüksek direnç göstermektedir (Chai vd., 2008). Ancak antagonist mikroorganizmaların canlılığı uygulandığı gıdanın bileşimi, ortam pH'sı, sıcaklık ve depolama-koruma koşulları gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir (Sharma, 2014). Yenilebilir kaplamalar ile antagonistlerin kombinasyonu bakterilerin çevre koşullarına direncini arttırmakta ve ayrıca gıdaya mikrobiyel kontaminasyonu önleyebilmektedir (Marín vd., 2016). Aynı zamanda PASP kaplamalar bariyer özelliği sayesinde çileklerin nem kaybını, mikrobiyel kontaminasyonunu önleyebilmekte ve mekaniksel hasarı azaltarak olumsuz çevre koşullarına karşı koruyucu bir görev görmektedir (Pavlath ve Orts, 2009). Buna rağmen depolama boyunca ortamda azalan besin *B. subtilis* canlılığını ve aktivitesini etkileyebilmektedir (Droby vd., 2009). Ayrıca çileğin pH değeri (3.5) *B. subtilis* (minimum gelişme pH değeri 4.5) gelişimini sınırlandırıcı bir faktör olabilmektedir (Ayhan, 2000).

Kaplamanın çilek üzerinde antifungal etkisi

In vitro analizde bakteri içeren su ve bakteri içeren PASP kaplama uygulamalarının küf gelişimine karşı inhibisyonu sırasıyla %54.35 ve %38.98 oranlarında görülmüştür (Çizelge 1). Uygulamaların çilek yüzeyindeki küf gelişimine etkisi ise Şekil 2'de gösterilmiştir. Buna göre;

PASP kaplama, bakteri içeren su, bakteri içeren PASP kaplama uygulanan çilek örneklerinde depolamanın 0-2. gününde küf sayısı önemli derecede artarken 2-5. günde önemli bir azalma görülmüştür ($P < 0.05$). Bunun nedeni olarak *B. subtilis*'in ortam hâkimiyetini 2. günden sonra sağlayarak maksimum düzeyde antagonistik toksin üretmesi sayesinde (Avcı vd., 2017) küf

gelişimini engelleyebilmesi olduğu düşünülmektedir. Depolamanın sonunda kontrol örneklerinde ise küf sayısı depolama boyunca istatistiksel olarak 2.29 KOB/gram'dan 2.73 KOB/gram'a önemli derecede artış göstermiştir ($P < 0.05$). Ancak *B. subtilis* ve *B. subtilis* içeren kaplama uygulanan çilek örneklerindeki küf gelişimi sırasıyla %21 ve %16 oranlarında düşmüştür.



Şekil 1. Çilek yüzeyine su ve kaplama ile birlikte uygulanan *B. subtilis*'in 25°C'de 5 gün depolama boyunca canlılığı.

Figure 1. Viability of *B. subtilis* with water and *B. subtilis* with coating on strawberry during 5 days storage at 25 °C.

** BS: *B. subtilis* içeren saf su, PASP+BS: *B. subtilis* içeren kaplama.

a-d: Aynı uygulamalar için günler arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir ($P < 0.05$; n=6).

** BS: *B. subtilis* with water, PASP+BS: *B. subtilis* with coating.

a-d: Means in same applications with different days are significantly different ($P < 0.05$; n=6).

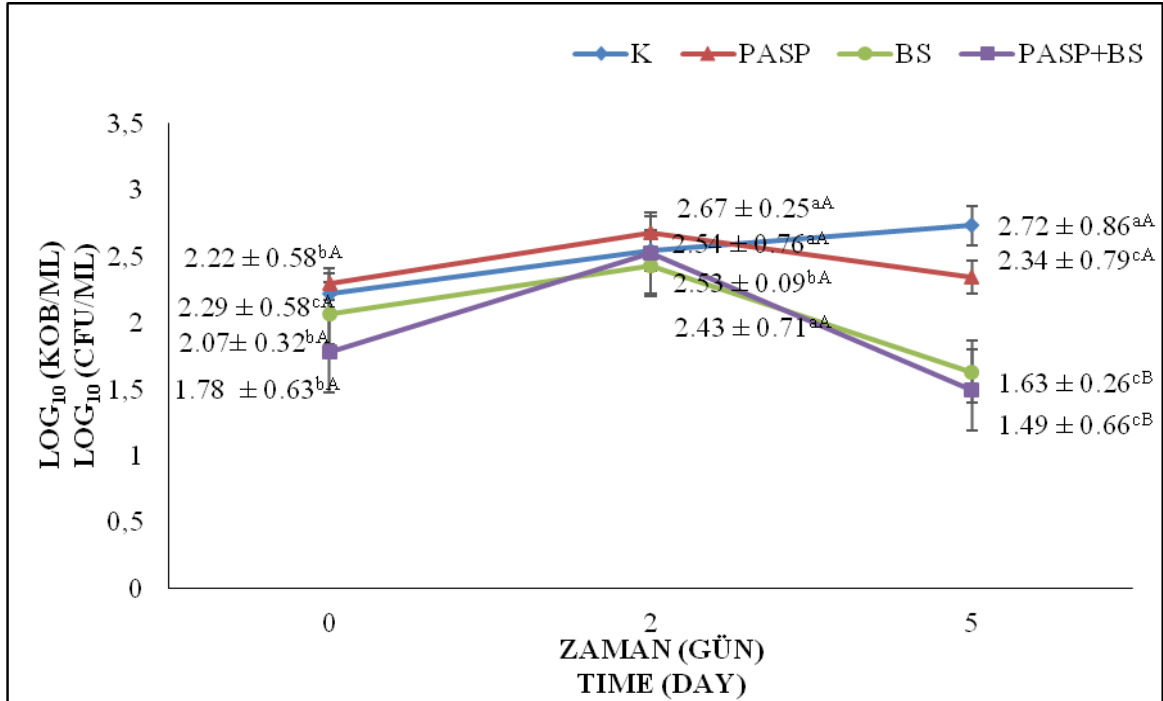
Çizelge 1. *B. subtilis* içeren PASP film ve *B. subtilis* içeren suyun disk difüzyon yöntemiyle PDA besiyerinde (Tartarik asit (%10, h/h) kullanılarak pH 3.5'e ayarlanmış Potato Dekstroz Agar) çilekte gelişebilen küf suşlarına karşı 25°C'deki 5 gün inkübasyon sonundaki inhibisyonu (%).

Table 1. Inhibition of *B. subtilis* with whey protein film and *B. subtilis* with water on PDA media (adjusted pH 3.5 with tartaric acid (10%, v/v)) to molds growing on strawberries after incubating 5 days at 25 °C (%).

Uygulamalar*	Küf misel çapları (mm)	İnhibisyon (%)
Applications*	Misel diameter of mold (mm)	(%)Inhibition
C	41.66 ± 2.35 ^a	-
TBS	25.33 ± 0.27 ^b	38.98
TPASP+BS	19.00 ± 0.81 ^c	54.35

* C: Kontrol, TBS: *B. subtilis* içeren saf su, TPASP+BS: *B. subtilis* içeren kaplama. a-d: Aynı günler için uygulamalar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir ($P < 0.05$; n=6).

* C:Control, TBS: *B. subtilis* with water, TPASP+BS: *B. subtilis* with coating. a-d: Means in same days with different applications are significantly different ($P < 0.05$; n=6).



Şekil 2. Çilekte farklı kaplama uygulamalarının 25°C'de 5 gün depolama boyunca küf gelişimine etkisi.

Figure 2. Effect of different strawberry coating applications on growth of mold during 5 days storage at 25°C.

** K: Kontrol, BS: *B. subtilis* içeren saf su, PASP: Kaplama, PASP+BS: *B. subtilis* içeren kaplama.

a-d: Aynı uygulamalar için günler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir ($P < 0.05$; $n=6$).

A-D: Aynı günler için uygulamalar arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir ($P < 0.05$; $n=6$).

* K:Control, BS: *B. subtilis* with water, PASP: Coating, PASP+BS: *B. subtilis* with coating.

a-d: Means in same applications with different days are significantly different ($P < 0.05$; $n=6$).

A-D: Means in same days with different applications are significantly different ($P < 0.05$; $n=6$).

Antagonist özellik gösteren *B. subtilis* bakterisi çilek meyvesinde yaygın bozulma etmeni olan *R. stolonifer* ve *B. cinerea* küflerine karşı etkili ikincil metabolitler üretebilmektedirler (Toure vd., 2004; Chen vd., 2008). Bu metabolitlerden zwittermisin-A, kanosamin, lipopeptitlerden surfaktin, iturin, botrycidin, alirin ve fengisin küf sporlarının çimlenmesini ve hiflerin uzamasını önleyerek küf gelişimini engellemektedir (Toure vd., 2004). Örneğin Toure vd. (2004) *B. subtilis*'in (6 log KOB/mL) *B. cinerea* (5 log konidia) küfü üzerindeki antagonistik etkisini in vitro ortamda %70; elma yüzeyindeki in vivo ortamda ise depolamanın 21. gününde %40 olarak saptamışlardır. Antifungal etkide temel etken olarak besin yanışı ya da konakçı direncinden çok bakterinin ürettiği antifungal metabolitler görülmüştür. Benzer şekilde *B. subtilis*'in çilek meyvesinde saf su veya mum kaplama ile birlikte

uygulanmasında *R. stolonifer* küfünün gelişimini sırasıyla %79 ve %84 oranlarında önleyebildiği görülmüştür (Oregel-Zamudio vd., 2017). Çalışmamızda küf gelişiminin daha fazla oranda önlenmesi *B. subtilis* ve PASP kaplamanın kombine kullanımıyla antifungal metabolitlerin etkisinin yanı sıra PASP kaplamanın oksijen bariyeri olmasıyla ilişkilendirilebilir.

Ağırlık kaybı

Ağırlık kaybı depolamanın 2. gününde PASP kaplamanın tek başına ve bakteriyile uygulandığı örneklerde sırasıyla %1.52 ve %1.60 ile en düşük değerleri gösterirken diğer uygulamalar önemli ölçüde daha fazla ağırlık kaybına neden olmuştur ($P < 0.05$) (Çizelge 2). Depolamanın 5. gününe gelindiğinde en düşük ağırlık kaybı PASP kaplamanın bakteriyile uygulanmasında olurken; PASP'nin kullanılmadığı bakteri ve kontrol

uygulamalarında ağırlık kaybı sırasıyla 3.18 ± 0.02 ve 3.50 ± 0.01 ile en yüksek değerleri göstermiştir ($P < 0.05$). Çalışmamızda PASP kaplamanın yarı geçirgen bariyer özelliği göstermesi birçok gıda uygulamasında da görüldüğü üzere ağırlık kaybını azaltmaktadır (Dhall, 2013). Yapılan bir çalışmada kandelila mumu ve/veya *B. subtilis* kaplanmış çileklerde ağırlık kaybı depolamanın 2. gününde

kaplama ve bakteri içeren kaplama uygulamalarında sırasıyla %10 ve %20 ile kontrol örneklerinden önemli derecede düşük bulunmuştur. Mum kaplamanın su buharı bariyer özelliğinin PASP'dan üstün olması çilekte meydana gelen su buharlaşmasına daha iyi engel olmasının kanıtıdır.

Çizelge 2. Çilekte farklı kaplama uygulamalarının 25 °C'deki 5 günlük depolama boyunca pH ve ağırlık kaybına (%) etkisi.

Table 2. Effects of different strawberry coating applications on pH and (%) weight loss during 5 days storage at 25 °C.

Uygulamalar* Applications*	pH pH			Ağırlık kaybı (%) (%)Weight loss	
	0.Gün Day 1	2.Gün Day 2	5.Gün Day 5	2.Gün Day 2	5. Gün Day 5
K	3.53 ± 0.00^{aA}	3.57 ± 0.04^{aA}	3.42 ± 0.02^{bA}	$2.06 \pm 0.01^{bA*}$	3.50 ± 0.01^{aA}
PASP	3.54 ± 0.08^{aA}	3.55 ± 0.08^{aA}	3.48 ± 0.02^{bA}	1.52 ± 0.02^{bD}	3.01 ± 0.01^{aC}
BS	3.56 ± 0.02^{aA}	3.54 ± 0.12^{aA}	3.41 ± 0.03^{bA}	2.02 ± 0.01^{bB}	3.18 ± 0.02^{aB}
PASP+BS	3.56 ± 0.08^{aA}	3.57 ± 0.18^{aA}	3.46 ± 0.09^{bA}	1.60 ± 0.01^{bC}	2.96 ± 0.01^{aD}

* K: Kontrol, PASP: Kaplama, BS: *B. subtilis* içeren saf su, PASP+BS: *B. subtilis* içeren kaplama. a-d: Aynı uygulamalar için günler arasındaki fark istatistikî açıdan önemlidir ($P < 0.05$; $n=6$). A-D: Aynı günler için uygulamalar arasındaki fark istatistikî açıdan önemlidir ($P < 0.05$; $n=6$).

* K:Control, BS: *B. subtilis* with water, PASP: Coating, PASP+BS: *B. subtilis* with coating. a-d: Means in same applications with different days are significantly different ($P < 0.05$; $n=6$). A-D: Means in same days with different applications are significantly different ($P < 0.05$; $n=6$).

pH

Çizelge 2'e göre çilek örneklerindeki uygulamalar arasında pH değerleri açısından önemli bir fark ortaya çıkarmamıştır ($P > 0.05$). pH depolamanın 2. gününde tüm uygulamalarda 3.54-3.57 arasındaki değerlerde ve önemli derecede değişim göstermezken ($P > 0.05$); 5. gününde 3.41'e kadar önemli derecede düşmüştür ($P < 0.05$). Benzer şekilde Oregel-Zamudio vd. (2017) mum ve *B. subtilis* içeren mum ile kaplanan çileklerde depolamanın 4. gününden sonra pH düşüşü rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda çilekte yaygın olarak bulunan organik asitlerden sitrik asit miktarının çileklerin depolanması boyunca arttığı bildirilmiştir (Famiani vd., 2015). Sonuç olarak çilekteki pH düşüşünün nedeni organik asit miktarındaki artıştan kaynaklanabilmektedir.

Renk

Çilek örneklerinin L* değerleri Çizelge 3'de verildiği üzere yaklaşık 33.33 iken depolama süresi ve farklı uygulamalar arasında önemli bir fark

bulunmamaktadır ($P > 0.05$). Depolama sonunda çilek örneklerinin a* (kırmızılık) değerleri PASP kaplama, bakteri ve bakteri içeren kaplama gruplarında sırasıyla 27.31, 26.11 ve 31.13 ile kontrol örneğinden önemli derecede daha yüksek çıkmıştır ($P < 0.05$). Örneklerin b* değerlerine bakıldığında ise PASP uygulanan çilekler depolama sonunda 20.48 ile diğer uygulamalardan daha yüksek değer göstermiştir. Depolama kontrol grubu örneklerin a* ve b* değerlerini düşürürken ($P < 0.05$), diğer uygulamalarda önemli bir değişim ortaya çıkarmamıştır ($P > 0.05$). Çilek meyvesine kırmızı rengi veren antosiyanin pigmentinin depolama süresine bağlı stabilitesi düşüktür. pH değişimleri, enzimatik esmerleşme veya oksidasyon antosiyanin miktarını etkilemektedir (Holcroft ve Kader, 1999). Aynı zamanda çilek meyvesindeki nem kaybı da a* değerlerinin yükselmesine neden olmaktadır (Nunes vd., 2005). Kaplanan çileklerde nem kaybının ve gaz geçişinin kontrolü sayesinde dış renk değişimleri en aza indirgenebilmektedir (Del-Valle vd., 2005). Kaplama gruplarında b*

değerlerinin daha yüksek olması PASP doğal renginden kaynaklanabilir. Çalışmamızın verilerine benzer şekilde Del-Valle vd. (2005) çilek örneklerine uyguladıkları kaktüs müsülajlı kaplamanın L* değerinin depolama boyunca değişmediği ve yaklaşık 33 ile kontrol örneklerin-

den önemli derecede farklı olmadığını belirtmişlerdir. Örneklerin a* değerlerinde ise depolamanın sonunda kaplama ve kontrol örneklerinde %40 düşüş gerçekleşirken b* değerlerinde değişim olmamıştır.

Çizelge 3. Çilekte farklı kaplama uygulamalarının 25°C'deki 5 günlük depolama boyunca renk parametrelerine etkisi.

Table 3. Effect of different strawberry coating applications on color parameters during 5 days storage at 25°C.

Uygulamalar* Applications*	Renk Color		
	0.Gün Day 0	2.Gün Day 2	5.Gün Day 5
K	34.51 ± 4.60 ^{aA}	34.25 ± 2.30 ^{aA}	34.05 ± 2.82 ^{aA}
PASP	29.94 ± 2.81 ^{aA}	32.05 ± 3.62 ^{aA}	30.99 ± 2.10 ^{aA}
BS	31.78 ± 3.52 ^{aA}	32.56 ± 3.09 ^{aA}	32.17 ± 1.94 ^{aA}
PASP+BS	33.09 ± 3.20 ^{aA}	33.09 ± 3.21 ^{aA}	34.19 ± 2.19 ^{aA}
K	27.79 ± 3.79 ^{aA}	23.59 ± 5.27 ^{abB}	22.09 ± 2.62 ^{bB}
PASP	33.33 ± 5.10 ^{aA}	27.55 ± 3.03 ^{aA}	27.31 ± 2.16 ^{aA}
BS	30.99 ± 4.51 ^{aAB}	29.62 ± 5.51 ^{aA}	26.11 ± 3.30 ^{aA}
PASP+BS	31.75 ± 4.30 ^{aA}	30.51 ± 6.20 ^{aA}	31.13 ± 4.60 ^{aA}
K	12.54 ± 4.65 ^{aC}	11.74 ± 4.46 ^{aB}	12.14 ± 3.61 ^{aC}
PASP	29.21 ± 6.89 ^{aA}	17.93 ± 3.03 ^{bA}	20.48 ± 3.96 ^{abAB}
BS	17.15 ± 3.57 ^{aB}	18.20 ± 4.20 ^{aA}	17.67 ± 2.85 ^{aB}
PASP+BS	29.67 ± 5.16 ^{aA}	21.39 ± 5.72 ^{aA}	21.45 ± 4.53 ^{aA}

* K: Kontrol, PASP: Kaplama, BS: *B. subtilis* içeren saf su, PASP+BS: *B. subtilis* içeren kaplama. a-d: Aynı uygulamalar için günler arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir ($P < 0.05$; $n=6$). A-D: Aynı günler için uygulamalar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir ($P < 0.05$; $n=6$).

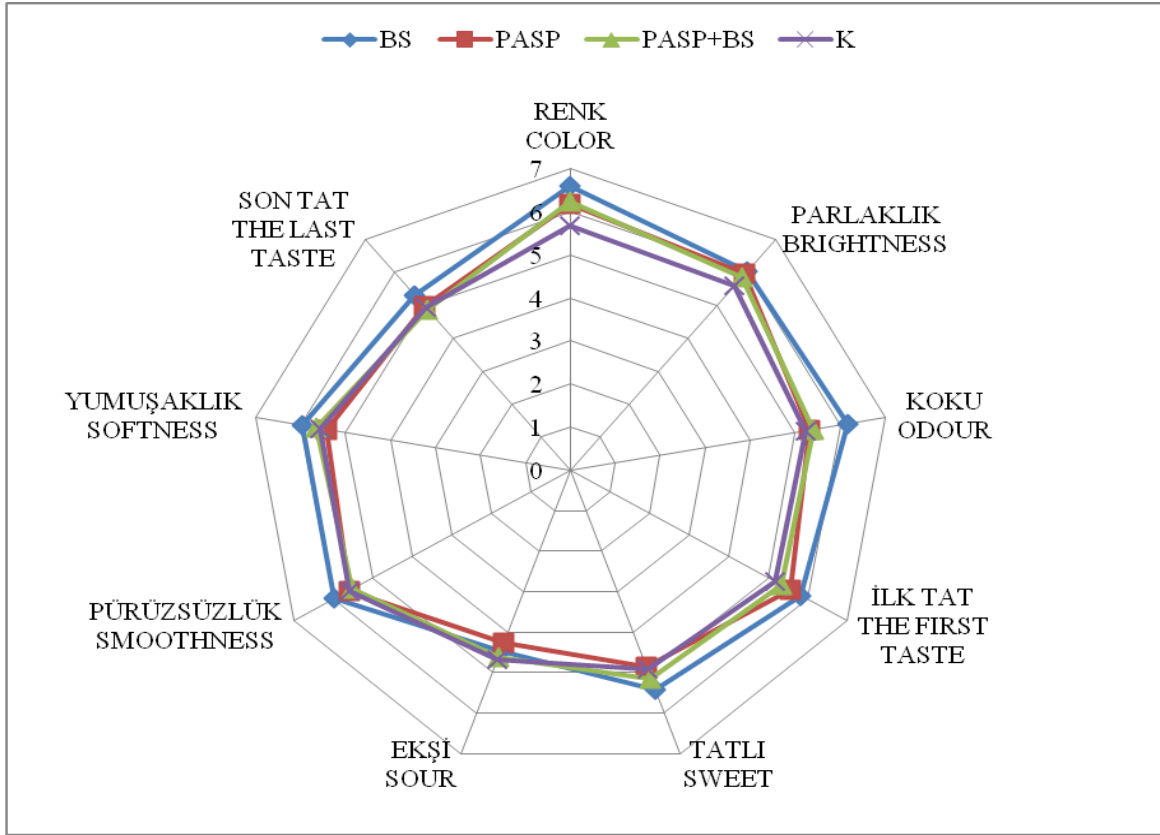
* K: Control, BS: *B. subtilis* with water, PASP: Coating, PASP+BS: *B. subtilis* with coating.

a-d: Means in same applications with different days are significantly different ($P < 0.05$; $n=6$). A-D: Means in same days with different applications are significantly different ($P < 0.05$; $n=6$).

Duyusal Analiz

Duyusal analiz sonuçlarına göre farklı uygulamalar arasında parlaklık, koku, ilk tat, tatlılık, ekşilik pürüzsüzlük, yumuşaklık, son tat parametreleri göz önünde bulundurulduğunda istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmamıştır (Şekil 3). Ancak renk açısından kontrol uygulaması en düşük puanı alırken diğer uygulamalar arasında önemli bir farka rastlanmamıştır ($P > 0.05$).

Kontrol grubunun renk açısından düşük puan alması a* değerinin diğer uygulamalardan daha düşük değerde olmasıyla yakından ilişkilendirilebilir. Analize istinaden en çok tercih edilen örnek grubu 5.71 genel kabul edilebilirlik puanıyla bakteri içeren su uygulaması yapılan çilek örnekleri olmuştur.



Şekil 3. Çilekte farklı kaplama uygulamalarının duysal özelliklere etkisi.

Figure 3. Effect of different strawberry coating applications on sensory properties.

** K: Kontrol, BS: *B. subtilis* içeren saf su, PASP: Kaplama, PASP+BS: *B. subtilis* içeren kaplama.

** K:Control, BS: *B. subtilis* with water, PASP: Coating, PASP+BS: *B. subtilis* with coating.

SONUÇ

Çilek örneklerinde *B. subtilis* içeren kaplama uygulaması daha yüksek bakteri korunumu ve ağırlık kaybını önlemesiyle öne çıkarken; *B. subtilis* içeren su uygulaması duysal analizde ve küf inhibisyonunda daha olumlu sonuçlar vermiştir. Ayrıca, kaplama uygulamasının çileklerin renk parametrelerinin ve pH değerlerinin korunumunda etkili olduğu düşünülmektedir. Elde edilen sonuçların nedenleri: (1) PASP kaplamanın bariyer özelliğinin meyve yüzeyindeki küf gelişimi için zorunlu oksijen miktarını kısıtlaması; (2) kaplama uygulamasının çilekleri mikrobiyel kontaminasyona karşı koruması; (3) biyokontrol ajanı *B. subtilis*'in küf gelişimine karşı kaplama ile sinerjistik etki göstermesi olarak sayılabilir. Sonuç olarak; *B. subtilis*'in PASP kaplama ile kombinasyonu çileklerin kalitesini koruyup ve raf ömrünü

uzatabilen yenilikçi bir uygulama olarak değerlendirilebilir. Gelecekte farklı antagonist mikroorganizmaların canlılık ve aktivitelerinin en yüksek seviyede olabileceği uygun kaplama solüsyonları ve ortam koşullarının belirlenmesi üzerine yapılacak detaylı çalışmalar yapılacaktır.

TEŞEKKÜR

Kendi izole ettiği *Bacillus subtilis* ZBP4 kültürünü bizimle paylaştığı için Yrd. Doç. Ayşe AVCI'ya çok teşekkür ederiz.

KAYNAKÇA

Avcı, A., Çağrı-Mehmetoğlu, A., Arslan, D. (2017). Production of antimicrobial substances by a novel *Bacillus* strain inhibiting *Salmonella* Typhimurium. *LWT - Food Sci Technol*, 80: 265-270.

- Ayhan, K. (2000), Gıda mikrobiyolojisi ve uygulamaları. *Gıdalarda bulunan mikroorganizmalar*, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Sim Matbaası, Ankara, 522 s.
- Bourtoom, T. (2008). Edible films and coatings: characteristics and properties. *Int Food Res J*, 15(3): 237-248.
- Cagri, A., Ustunol, Z., Ryser, E.T. (2001). Antimicrobial, mechanical, and moisture barrier properties of low pH whey protein-based edible films containing p-aminobenzoic or sorbic acids. *J Food Sci*, 66(6): 865-870.
- Chai, Y., Chu, F., Kolter, R., Losick, R. (2008). Bistability and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 67(2): 254-263.
- Chaurasia, B., Pandey, A., Palni, L.M.S., Trivedi, P., Kumar, B., Colvin, N. (2005). Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. *Microbiol Res*, 160(1): 75-81.
- Chen, H., Xiao, X., Wang, J., Wu, L., Zheng, Z., Yu, Z. (2008). Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. *Biotechnol Lett*, 30(5): 919-923.
- Cota, L.V., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S., Macedo, P.E., Antunes, R.F. (2008). Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. *Biol Control*, 46(3): 515-522.
- Del-Valle, V., Hernández-Muñoz, P., Guarda, A., Galotto, M.J. (2005). Development of a cactus-mucilage edible coating (*Opuntia ficus indica*) and its application to extend strawberry (*Fragaria × ananassa*) shelf-life. *Food Chem*, 91(4): 751-756.
- Dhall, R.K. (2013). Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 53(5): 435-450.
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., Wilson, C. (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm?. *Postharvest Biol Technol*, 52(2): 137-145.
- Famiani, F., Battistelli, A., Moscatello, S., Cruz-Castillo, J.G., Walker, R.P. (2015). The organic acids that are accumulated in the flesh of fruits: occurrence, metabolism and factors affecting their contents-a review. *Rev Chapingo Ser Horti*, 21(2): 97-128.
- Fan, Y., Xu, Y., Wang, D., Zhang, L., Sun, J., Sun, L., Zhang, B. (2009). Effect of alginate coating combined with yeast antagonist on strawberry (*Fragaria × ananassa*) preservation quality. *Postharvest Biol Technol*, 53(1): 84-90.
- Holcroft, D.M., Kader, A.A. (1999). Controlled atmosphere-induced changes in pH and organic acid metabolism may affect color of stored strawberry fruit. *Postharvest Biol Technol*, 17(1): 19-32.
- Janisiewicz, W.J., Korsten, L. (2002). Biological control of postharvest diseases of fruit. *Annu Rev Phytopathol*, 40(1): 411-441.
- Janisiewicz, W.J., Saftner, R.A., Conway, W.S., Yoder, K.S. (2008). Control of blue mold decay of apple during commercial controlled atmosphere storage with yeast antagonists and sodium bicarbonate. *Postharvest Biol Technol*, 49(3): 374-378.
- Marín, A., Cháfer, M., Atarés, L., Chiralt, A., Torres, R., Usall, J., Teixidó, N. (2016). Effect of different coating-forming agents on the efficacy of the biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 for control of *Botrytis cinerea* on grapes. *Biol Control*, 96: 108-119.
- Nunes, M.C.N., Brecht, J.K., Morais, A.M., Sargent, S.A. (2005). Possible influences of water loss and polyphenol oxidase activity on anthocyanin content and discoloration in fresh ripe strawberry (cv. Oso Grande) during storage at 1 degrees C. *J Food Sci*, 70(1): 79-84
- Oregel-Zamudio, E., Angoa-Pérez, M.V., Oyoque-Salcedo, G., Aguilar-González, C.N., Mena-Violante, H.G. (2017). Effect of candelilla wax edible coatings combined with biocontrol bacteria on strawberry quality during the shelf-life. *Sci Horti (Amst)*, 214: 273-279.
- Pavlath, A.E., Orts, W. (2009). Edible films and coatings: why, what and how? In *Edible films and*

- coatings for food applications, Springer New York, England, pp. 1-23.
- Romanazzi, G., Smilanick, J.L., Feliziani, E., Droby, S. (2016). Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. *Postharvest Biol Technol*, 113: 69-76.
- Shafiee, M., Taghavi, T.S., Babalar, M. (2010). Addition of salicylic acid to nutrient solution combined with postharvest treatments (hot water, salicylic acid, and calcium dipping) improved postharvest fruit quality of strawberry. *Sci Horti (Amst)*, 124(1): 40-45.
- Sharma, N. (2014). *Biological Controls for Preventing Food Deterioration: Strategies for Pre-and Postharvest Management*. John Wiley Sons Ltd. ,Oxford, UK, 306 p.
- Tomasula, P.M. (2009). Using dairy ingredients to produce edible films and biodegradable packaging materials. *Dairy-Derived Ingredients: Food and Nutraceutical Uses*, 589-624.
- Toure, Y., Ongena, M.A.R.C., Jacques, P., Guiro, A., Thonart, P. (2004). Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J Appl Microbiol*, 96(5): 1151-1160.
- TÜİK. (2016). Türkiye İstatistik Kurumu. <http://www.tuik.gov.tr>. (Erişim tarihi: 2017 Eylül).
- Valencia-Chamorro, S.A., Palou, L., Del Rio, M.A., Pérez-Gago, M.B. (2008). Inhibition of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* by hydroxypropyl methylcellulose - lipid edible composite films containing food additives with antifungal properties. *J Agric Food Chem*, 56(23): 11270-11278.
- Vicente, K.J. (2002). Ecological interface design: Progress and challenges. *Hum Factors*, 44(1): 62-78.
- Zhang, H., Ma, L., Wang, L., Jiang, S., Dong, Y., Zheng, X. (2008). Biocontrol of gray mold decay in peach fruit by integration of antagonistic yeast with salicylic acid and their effects on postharvest quality parameters. *Biol Control*, 47(1): 60-65.
- Zhang, H., Ma, L., Jiang, S., Lin, H., Zhang, X., Ge, L., Xu, Z. (2010). Enhancement of biocontrol efficacy of *Rhodotorula glutinis* by salicylic acid against gray mold spoilage of strawberries. *Int J Food Microbiol*, 141(1): 122-125.

GIDALARIN TÜKETİLMESİ SIRASINDA RETRONAZAL YOLLA AROMA SALINIMININ BELİRLENMESİ

Tülin Eker¹, Turgut Cabaroğlu^{2*}

¹Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Osmaniye, Türkiye.

²Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Adana, Türkiye

Geliş / Received: 18.07.2017; Kabul / Accepted: 04.12.2017; Online baskı / Published online: 27.12.2017

Eker, T., Cabaroğlu, T. (2018). Gıdaların tüketilmesi sırasında retronazal yolla aroma salınımının belirlenmesi. *GIDA* (2018) 43 (1): 64-77 doi: 10.15237/gida.GD17066

ÖZ

Uçucu organik bileşikler gıdanın aromasını oluşturan ve bu sebeple gıda bilimi ve teknolojisi alanında önemli yeri olan maddelerdir. Gıdaların tüketilme sırasındaki aroma salınımı ve bunun algılanması, bir gıdanın son aroma kalitesini belirleyen faktörlerdir. Bu nedenle son yıllarda gıdaların tüketimi sırasında aroma salınımının belirlenmesi konusuna büyük ilgi oluşmuştur. Yapılan araştırmalarda kütle spektrometresi teknikleriyle *in vivo* koşullarda "burun boşluğu" ve/veya "ağız boşluğundan" alınan havanın analizi yapılmaktadır. Atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon-kütle spektrometresi (APCI-MS) ve proton transfer reaksiyon-kütle spektrometresi (PTR-MS) uçucu organik bileşiklerin, gıda tüketimi sırasında eş-zamanlı ölçülmesine imkân vermektedir. *In vitro* aroma analizi ise her laboratuvarında kullanılabilen geleneksel gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) tekniği ile yapılmaktadır. Bu çalışmada, gıdalarda aroma salınımının önemi ve aroma salınımında kullanılan *in vivo* ve *in vitro* yöntemler üzerinde durulmuştur.

Anahtar kelimeler: Aroma, Retronazal aroma salınımı, APCI-MS, PTR-MS

DETERMINATION OF RETRONASAL AROMA RELEASE DURING FOOD CONSUMPTION

ABSTRACT

Volatile organic compounds are responsible of the food flavor. Therefore, they play an important role in food science and technology. Flavor release and perception during consumption are the key factors for flavor quality of the food. Consequently, studies on the understanding of the aroma release during food consumption have increased dramatically in recent years. Mass spectrometry techniques are often used for the analysis of the head-space from the "nasal cavity" and/or "oral cavity" during food consumption. Atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (APCI-MS) and proton transfer reaction mass spectrometry (PTR-MS) allow real-time measurement of volatiles release during *in vivo* consumption. For *in vitro* analysis, conventional gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) techniques are amenable to many laboratories. In this review, the importance of aroma release from different food matrices and *in vivo* and *in vitro* methods used for aroma release were discussed.

Keywords: Aroma, Retronasal aroma release, APCI-MS, PTR-MS

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ tcabar@cu.edu.tr

☎ (+90) 322 338 6997

☎ (+90) 322 338 6614

GİRİŞ

Aroma, lezzetin algılamaında önemli belirleyicilerden biridir ve dolayısıyla tüketici tercihlerini yönlendiren ana faktördür. Uçucu organik bileşiklerin analizinin gıda endüstrisi için önemli bir konu haline gelmesinin nedeni budur. Gıdalar, uçucu ve uçucu olmayan maddelerden oluşan karmaşık çok bileşenli sistemlerdir. Aroma bileşikleri, oda sıcaklığında buhar fazında bulunan, burun boşluğundaki koku alma dokusuna (olfaktor reseptörlerine) ulaşarak algılanan uçucu moleküllerdir. Aroma bileşenlerinin, gıda maddesinden buhar fazına salınmaları, gıda matriksinde bulunan uçucu olmayan bileşiklerle olan etkileşimine bağlıdır (Guichard, 2014). Proteinler, lipitler, karbonhidratlar ve polifenoller gibi gıda bileşenleri ile aroma maddeleri arasındaki etkileşimi anlamak için çok çeşitli analitik teknikler geliştirilmiştir.

Gıdalardaki aroma çalışmaları, çoğunlukla aroma bileşiklerinin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi üzerine odaklanmıştır. Bu tür çalışmalar aroma maddeleri ile gıda matriksi arasındaki etkileşimleri belirlemede çok değerli olmasına rağmen, bu teknikler ile gıdanın gerçek tüketimi sırasında salınan aroma maddeleri belirlenemez. Bu nedenle elde edilen sonuçlar ile duyuusal deneyim arasında ilişki elde etmek zordur. Bir gıdanın aroma bileşimi ile o gıdanın tüketilmesi esnasında salınan aroma maddelerinin aynı olmadığı bildirilmektedir (Muñoz-González vd., 2014a).

Birçok çalışmada, gıdanın aroma algısının ve *in vivo* aroma salınımının, (i) gıdanın doğası (tekstür, parçacık boyutu, viskozite), (ii) aroma maddelerinin miktarı ve doğası, (iii) gıda matriksi (lipid, protein, şeker, asit, alkol ve pektin vb.), (iv) yeme davranışı ve (v) oral fizyoloji (tükürük salınımı, çiğneme, nefes alma, ağız boşluğu hacmi, ağız sıcaklığı, zaman, vb.) gibi faktörlerden etkilendiği bildirilmiştir (Ting vd., 2012; Paravisini vd., 2014; Ting vd., 2016; Boesveldt ve Graaf, 2017; Ployon vd., 2017). Bu etkileşimler, gıdanın aroma maddelerinin salınımını değiştirebilir ve ürünün aromatik dengesini etkiler. Bir gıdanın tüketimi sırasında, matriksinin, oral fizyolojinin ve

oral çiğneme faktörlerinin aroma bileşiklerinin salınması üzerine etkisini anlamak için, *in vivo* ve *in vitro* koşullarda gerçek gıdalarda veya aroma maddelerinin takviye edildiği model gıda sistemleri üzerinde birçok çalışma yapılmıştır (Farneti vd., 2013; Boisard vd., 2014; Muñoz-González vd., 2014a; Muñoz-González vd., 2014b; Labouré vd., 2014; Genovese vd., 2015). Öte yandan, çok az sayıda araştırmada, ağızda aroma salınımını incelemek için gerçek gıda matriksleri kullanılmıştır (Doyennette vd., 2011; Genovese vd., 2015; Ting vd., 2016). Dolayısıyla bir gıdanın tüketimi sırasında olfaktori reseptörlerine ulaşan aroma maddelerini ve bu maddelerin konsantrasyonunu belirlemek için, burun boşluğundan veya ağız boşluğundan verilen nefese bağlantılı enstrümental teknikler geliştirilmiştir. Bu derlemede duyuusal etkileşimde rol oynayan aroma maddelerinin araştırılmasını sağlayan *in vitro* ve *in vivo* yöntemler ele alınmıştır.

Gıdanın tüketilme esnasındaki aroma salınımının belirlenmesi

Bir gıdanın duyuusal karakteri, fiziksel ve kimyasal özellikleriyle ortaya çıkan birden fazla uyarının bütünsel algısından kaynaklanır. Aromanın bu çoklu duyuusal algılanışının kökenini ve mekanizmasını anlamak amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. (Poinot vd., 2013; Arvisenet vd., 2016).

Bir gıdanın tüketilmesi sırasında, gıdadaki aroma bileşikleri gıda matriksinden serbest bırakılır ve bu bileşenler lezzet algılamaının gerçekleştiği ağız ve burun içindeki uygun reseptörlere taşınır. Aroma uyarınları olfaktör epitele genelde iki yol ile ulaşır: i) koklama sırasında burun yoluyla ve ii) yeme veya içme sırasında retronazal yolla. Bu uyarınlara algılanmasında koku, tat ve üçlü (trigeminal) duyuular olmak üzere üç büyük sistem rol alır. Aromanın algılanmasındaki ilk yol, koklama ile dış çevreden gelen koku uyarısının, ön burun deliklerinden olfaktori mukozaya doğru taşınmasıdır (Bojanowski ve Hummel 2012; Bushdid vd., 2014; Boesveldt ve de Graaf, 2017; Mosca ve Chen, 2017). İkinci yol ise, genellikle tat ve koku uyarısının birleşimidir. Çiğneme sırasında serbest kalan aroma molekülleri, soluma veya yutma ile birlikte burun boşluğuna ve geniz

yoluyla koku alma yarığındaki alıcılara ulaşarak uyarırlar. Bu yol retronazal koku alma olarak tanımlanır. Retronazal uyarı için koku kaynağı ağız içinde veya yutakta/midede olduğu için, algılanan uyarıların aralığı genellikle gıda ve ağız ile ilişkilidir (Bojanowski ve Hummel 2012).

Gıdanın tüketimi sırasında oluşan aroma algısı, aromayı oluşturan uçucu organik bileşiklerin yapısına, konsantrasyonuna ve gıda matrisine bağlıdır (Benjamin vd., 2012). Bununla birlikte, aromanın algılanması basit bir uyarıcı yanıt süreci değil, çok daha karmaşıktır. Her bir gıda aroması, belli sayıda koku veren anahtar maddenin farklı kompozisyonları ile karakterize edilir. Gıdanın çiğnenmesi sırasında ağızda salınan aroma, belli bir gıdayla ilişkili olan karakteristik aroma algısını uyandırır. Bu algı, gıda matrisini oluşturan yapısal bileşikler (proteinler, lipitler, karbonhidratlar) ile doğrudan ilgilidir (Guichard, 2014).

Gıda tekstürü, oral fizyoloji ve oral çiğneme faktörünün, tüketim sırasında aroma bileşiklerinin salınımı üzerine katkısını anlamak için, *in vivo* ve *in vitro* yöntemlerle uçucu organik bileşikler ilave edilmiş model yiyecek sistemleri veya gerçek gıdalar üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. Literatürde yapılan çalışmaları üç başlık altında toplamak mümkündür; i) statik *in vitro* analizler, ii) dinamik *in vitro* analizler ve iii) dinamik *in vivo* analizler.

Statik *in vitro* analizler

Model gıdalardan salınan uçucu maddelerin statik *in vitro* ekstraksiyonu genelde tepe boşluğu yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Katı faz mikroekstraksiyonu, sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu veya katı faz ekstraksiyonu da kullanılan yöntemlerdir. Tanımlama ve miktar belirleme geleneksel gaz kromatografisi-alev iyonlaştırma dedektör (GC-FID) (Van Ruth ve Roozen, 2000a), gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) (Muñoz-González vd., 2014a), proton transfer reaksiyon-kütle spektrometresi (PTR-MS), (Onishi vd., 2012), proton transfer reaksiyon-uçuş zamanlı kütle spektrometresi (PTR-TOF-MS) (Heenan vd., 2012; Cappelin vd., 2012; Cappelin vd., 2013; Soukoulis vd., 2013; Romano vd., 2014; Ting vd., 2016) ve atmosferik

basınç kimyasal iyonizasyon-kütle spektrometresi (APCI-MS) (Weel vd., 2004; Gan, 2015) teknikleri ile yapılmıştır. Bu yöntemler ile aroma bileşenleriyle lezzet veya yapısal bileşenler arasındaki fiziksel ve kimyasal etkileşimlerin yanı sıra gıda matrisinin yapısal değişimine bağlı olarak uçucu bileşenlerin davranışı izlenmiştir.

Dinamik *in vitro* analizler

Gıdaların ağız boşluğuna girdikten sonra, tüketim sırasında burun boşluğunda devamlı bir aroma salınımının mümkün olmadığı ve aromanın algılanmasını arttırmak veya aroma algılanmasına izin vermek için yutma gibi bir fizyolojik etkiye ihtiyaç duyulduğu bildirilmektedir. Bu etkilerin ölçülmesine yönelik bir yaklaşım da gıdanın ağızda çiğneme sürecini taklit eden model çiğneme cihazlarının geliştirilmesidir. Aroma salınımını inceleyen çalışmalarda, model veya gerçek gıda sistemleri, bu ağız modelleri ile yapay tükürük (Van Ruth ve Roozen 2000a; Doyennette vd., 2011; Onishi vd., 2012; Muñoz-González vd., 2014a; Thomsen vd., 2014) veya gerçek tükürük (Benjamin vd., 2012; Muñoz-González vd., 2014b; Genovese vd., 2015) eşliğinde çiğneme benzeri hareketler ile taklit edilmiştir (Çizelge 1).

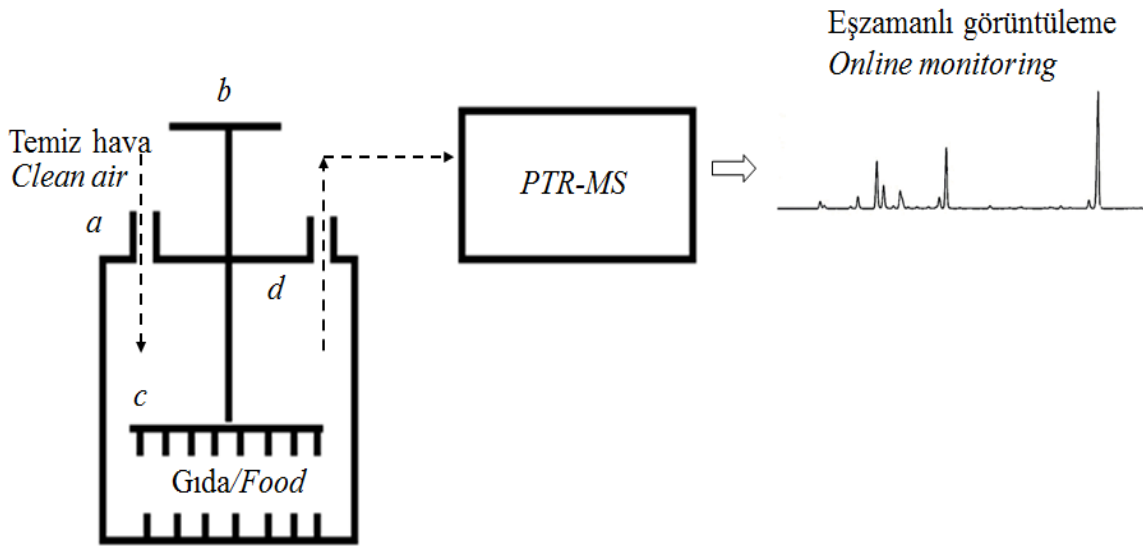
Katı bir gıda, çiğneme sırasında tükürük ile karışır, yapısı değişir. Bu işlem ile ağız boşluğuna salınan uçucu bileşenlerin difüzyonu etkilenir. Çiğneme ile gıdanın yüzey alanı artar ve gıda matrisi başlangıçta içerdiği sudan ayrılır. Gıdanın tekstürel ve fizikokimyasal özellikleriyle doğrudan ilişkili olan çiğneme süreci, *in vivo* aroma salınımını etkileyen önemli bir parametre olarak bildirilmiştir (Foster vd., 2011; Farneti vd., 2013). Geliştirilen model-ağız sistemleri, çiğneme sürecini insan ağızı gibi taklit ederek hızlı, hassas ve tekrarlanabilir sonuçlar verecek şekilde tasarlanmıştır. (Van Ruth ve Roozen 2000b; Weel vd., 2004; Benjamin vd., 2012; Genovese vd., 2015; Akiyama vd., 2016).

Bu modellerde, aroma bileşikleri ve diğer bileşenlerden (polisakkaritler, proteinler, lipitler) oluşan belli miktarda gıda maddesi bir kap içine konur ve farklı yollarla karıştırılır veya çalkalanır (çoğu durumda 37 °C'ye kadar ısıtılır). Tepe boşluğundan hava örneği alınır. Model sistemden salınan gaz akımı içinde bulunan uçucu bileşikler,

doğrudan MS tekniği ile ya da adsorbe/absorbe edici malzemeler üzerine tutularak GC-MS ile analiz edilir. Katı gıdalar için, ağızda yapısal parçalanma söz konusu olduğundan aroma salınımı, Van Ruth vd., (1995)'nin model ağız sistemi veya retronazal aroma simülatorü (RAS) ile tekrarlanabilir şekilde incelenebilir.

Farneti vd., (2013)'nin, geliştirdikleri çiğneme cihazı (Şekil 1), bir kapak ile kapatılmış silindirik

bir cam küvet (800 mL) ve elle kontrol edilen çentikli bir pistondan oluşmaktadır. Çentikli pistonun yüksekliği 10 mm'dir ve 34 plastik diş içerir. Çiğneme yapılacak meyve ile temas eden cihazın tüm kısımları politetrafloroetilenden (PTFE) yapılmıştır. Gerçek zamanlı analiz için tepe boşluğuna salınan uçucular bir vakum pompası ile (0,5 L/saat) PTR-MS'e gönderilir.



Şekil 1. Çiğneme cihazının şematik gösterimi. a) kapalı başlık ve b) elle kontrol edilen piston, c) plastik diş, d) PTR-MS'inde eş-zamanlı izlenen uçucuların toplandığı tepe boşluğu

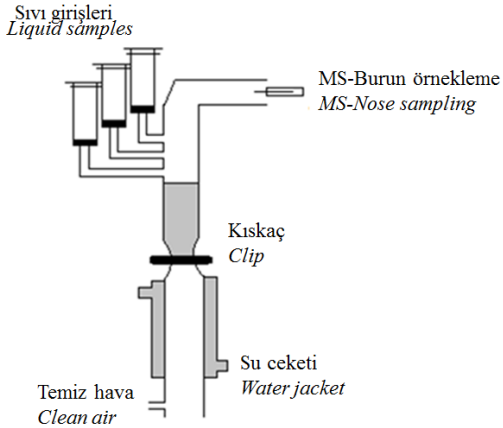
Figure 1. Chewing device. a) sealed with a cap, b) a plunger controlled manually, c) plastic teeth, d) the head space for online analysis into the PTR-MS

Ağıza alınmasından kısa bir süre sonra yutulan sıvı gıdalarda ise aroma salınımı yutma ile ortaya çıkar. Sıvıların aroma salınımı sıvıyı yuttuktan sonra gerçekleşen olaylarla belirlendiğinden, çiğneme faktörleri ve sıcaklık değişiklikleri gibi etkenlerin aroma salınımı üzerine etkisinin çok az olduğu bildirilmiştir (Weel vd., 2004).

Model sıvı gıdalardan aroma salınımı yapay bir yutak yardımı ile taklit edilmiştir (Şekil 2). Yutak, dikey cam tüplerden oluşur (iç çapı 12 mm). Cam tüpün ortasında, bir kısaç yardımı ile açılıp kapanabilen 3 mm kalınlığında yutak işlevi gören bir kauçuk vardır ve sistemin en önemli parçasıdır. Bu kauçuk bölümün üzerinden, aynı anda veya

farklı zamanlarda şırıngalardan cam tüpe çeşitli sıvılar eklenebilir. Cam tüpü çevreleyen su mantosu su banyosuna bağlıdır (37 °C'ye ayarlanmıştır). Su ceketinin altında, yukarı doğru bakan bir hava girişi bulunur. Sıvı, yutma işleminin taklit edilmesinden sonra cam tüpün alt ucundan sistemi terk edebilir (Weel vd., 2004).

Genovese vd., (2015), panelistlerden topladığı gerçek tükürük eşliğinde RAS'a yerleştirdiği model zeytinyağı örneklerinde aroma salınımını incelemiştir. Uçucu bileşenler, RAS içine bir septum aracılığıyla yerleştirilen fiber yardımıyla tutulmuş (37 °C, 4 dakika), ardından fiber geleneksel GC-MS yöntemi ile desorbe edilmiştir.



Şekil 2. Yapay yutak şematik görünümü
Figure 2. Schematic overview of the artificial throat

Teknik açıdan bakıldığında GC-MS gıda uçucu bileşenlerinin belirlenmesinde referans metottur ancak uzun zaman alması ve kinetik ölçümlere imkan vermemesi aroma salınımı çalışmalarında en önemli olumsuz yönleridir. Uçucu bileşenlerin hızlı tanımlanması ve miktar analizinin yapılmasında PTR-MS en çok kullanılan, piklerin eş-zamanlı izlenmesini sağlayan hızlı bir metottur (Farneti vd., 2013). Van Ruth ve Roozen (2000b) rehidre edilmiş biberden yapay tükürük ve gerçek tükürük eşliğinde aldehit salınımı arasında önemli bir fark olmadığını bildirirken Pagès-Hélary vd., (2014), insan tükürüğünün suni tükürüğe göre ester salınımı bakımından daha güçlü bir etkisi olduğunu göstermiştir. Ancak iki çalışma arasındaki fark, gerçek tükürük kompozisyonundaki değişkenlikler ve/veya analize tabi tutulan aromanın (esterler, aldehitler gibi) farklı kimyasal niteliği ile açıklanabilir. Öyle ki ağız mikrobiyotasının da aroma salınımı üzerine etkisi olabileceği bildirilmiştir. 200'den fazla sağlıklı bireyin 9 ağız bölgesinin bakteri popülasyonunu karşılaştırılmış, tükürük mikrobiyomunun analizi, bireyler arasında yüksek bir çeşitlilik ortaya koyarken, dünyanın dört bir yanındaki coğrafi bölgeler arasında nispeten daha az fark olduğunu ortaya koymuştur (Eren vd., 2014; Mark Welch vd., 2016; Ployon vd., 2017).

Bu tekniklerle, gıda matriksi, tükürük veya çiğneme kuvvetlerinin etkisi memnuniyet verici düzeyde taklit edilebilmesine rağmen olumsuz

yönleri gerçek yutkunma işleminin ve tabii ki ağız mukozasının etkisinin incelenememesidir (Benjamin vd., 2012).

Dinamik *in vivo* analizler

İnsanın aroma algısını, gıdadan bir çözgen yardımıyla veya fibere ekstrakte edilip GC-MS yöntemleri ile belirlenen uçucu aroma bileşikleri ile karşılaştırmanın çok doğru olmadığı bildirilmektedir (Farneti vd., 2013). Yapay koşullar altında salınan uçucu maddelerin maksimum miktarının ölçülmesine dayanan bu metotlar (dinamik ve statik *in vitro* çalışmalar), uçucuların gıda matriksinden bireysel farklı salınım kinetiğini ölçemezler. Gıdanın tüketilmesi sırasında insan ağızından veya burnundan örnek alınması gibi *in vivo* ölçümler daha çok tercih edilir çünkü, bu metotlar olfaktor epiteli ile etkileşime giren uçucu bileşen profiline daha yakın sonuçlar verir. Bu nedenle bu ölçümler duyuusal algı ile daha iyi ilişkilendirilebilir.

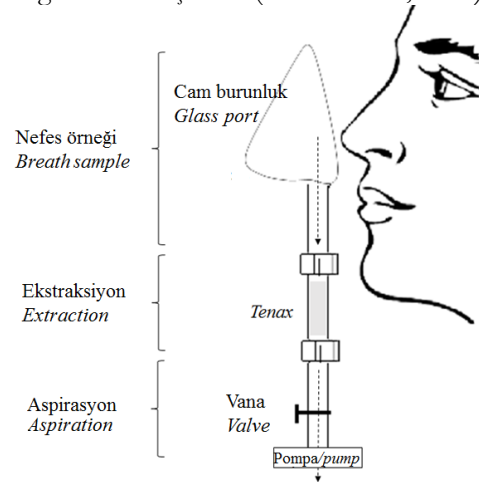
Nefes örneklerinde bulunan aroma maddelerinin eşzamanlı olarak ilk analizi 1988 yılına dayanmaktadır (Soeting ve Heidema, 1988). Linforth vd., 90'lı yılların ortalarında, burun-boşluğundan (nose space) örnek almayı sağlayan bir ara birimi APCI-MS'ine bağlayarak bu alanda yapılacak çalışmaların temelini atmışlardır.

Nefes/hava içinde bulunan uçucuların konsantrasyonunun zamana bağlı değişiminin çevrimiçi bir şekilde belirlenmesi için iki ayrı teknik geliştirilmiştir: i) APCI-MS (Taylor vd., 2000) ve ii) PTR-MS (Lindinger vd., 1998). Her iki teknik de aromaya katkıda bulunan uçucuların dinamik araştırmalarında gerçek bir ilerleme olmuştur. Tekrarlanabilirliği, doğrusallığı ve hassasiyeti yüksek olan bu metotlar, *in vitro* ekstraksiyon metotları ile birlikte uygulandığında, bir yapısal bileşiğin, gıda matriksine bağlı olarak aroma salınımı üzerine bir etkisi olup olmadığını belirler.

Bu yöntemlerde koku alma dokusuna ulaşan uçucu bileşenleri analiz etmek için APCI-MS veya PTR-MS teknikleri kişilerin bireysel burun delikleri ile bağlantılır (MS-nose adı verilir). Panelistler önceden eğitilir ve bireysel farklılıkları

ortadan kaldırmak için panelistlere belli bir tadım protokolü uygulanır. Bu yöntemler i) koku alma dokusuna ulaşan uçucu bileşenlerin konsantrasyonu ve doğası üzerine tat veya yapısal bileşiklerin etkisini ve ii) bu uçucu bileşenlerin burun boşluğu içindeki transfer kinetiğini göstermektedir. Bununla birlikte, her iki metot da büyük bir kısıtlamaya sahiptir. Sadece model gıdalardaki etkileşimlerin analizi için kullanılabilirler. Bilinmeyen bileşiklerin karışımları araştırılırken tanımlama problemi çok önemlidir. Uygulamada, gerçek bir gıdanın aromasına katkıda bulunan tüm bileşikler, bu teknolojilerle eşzamanlı olarak nadiren izlenebilir. Eşik değeri çok düşük olan ve tespit sınırlarının dışında kalan bileşikler takip edilemez. Buna ek olarak, aynı kütle/yük (m/z) değerine sahip küçük fragman iyonları ve aynı molekül yapısına sahip stereoisomerler zorlukla belirlenir. Bu tekniklerle yapılan aroma çalışmalarına bakıldığında takip edilen aroma bileşen sayısının 1-10 arasında değiştiği görülür (Muñoz-González vd., 2013; Özdehan 2013; Ruijschop vd., 2011; Muñoz-González vd., 2014a). Daha fazla bileşiğin hassas ve doğru bir şekilde tespit edilebilmesi için APCI ve PTR arabirimlerine uçuş zamanı-kütle spektrometresi (TOF-MS) bağlanmıştır (Heenan vd., 2012; Ting vd., 2016). Ting vd., (2016), statik *in vitro* koşullarda yaptıkları çalışmada, HS-PTR-TOF-MS tekniği ile elma çeşitlerinde 49 uçucu bileşen tespit etmiştir. Ancak, APCI-MS ve PTR-MS gibi gelişmiş cihazların yüksek fiyatları da ilave bir dezavantaj olarak söylenebilir. Aroma salınımının belirlendiği bir diğer yöntem ise burun boşluğundan verilen nefesteki aroma maddelerinin Tenax gibi adsorbe edici polimer üzerine ekstraksiyonudur ve ekstrakte edilen uçucu bileşikler geleneksel GC-MS tekniği ile belirlenir (Şekil 3). GC-MS, PTR veya APCI tabanlı tekniklerin aksine tüketim sırasında aroma bileşiklerinin salınımının zamansal profilini vermez (Benjamin vd., 2012). Bununla birlikte, bu teknik uçucu bileşiğin kesin olarak tanımlanmasına ve nefes ekstraktının içerdiği aroma bileşenlerinin hassas bir şekilde analiz edilmesine imkân sağlar. Öte yandan GC-MS'in, PTR-MS ve APCI-MS'e kıyasla nispeten düşük maliyeti herhangi bir laboratuvarında uygulanmasını kolaylaştırmaktadır (Muñoz-González vd.,

2014a). Muñoz-González vd., (2014a), şarap bazlı bir içkinin *in vivo* koşullarda aroma salınımını belirlemek için retronazal yolla aroma tuzaklayıcı aparat (RATD) geliştirmiştir. Bu aparat ile gıdayı tüketen panelistlerin, tüketim sırasında burundan verdikleri nefesteki uçucuların polimer içinde tuzaklanması sağlanmıştır. Panelistlere standart bir tüketim prosedürü uygulanarak, analiz sonunda polimer tarafından tutulan aroma maddeleri 6 mL hekzan:dietiler, [1:1, v/v] karışımı ile desorbe edilmiş, azot gazı altında konsantre edilen örnek içindeki aroma maddeleri GC-MS yöntemi ile analiz edilmiştir. Tüketim sırasında (*in vivo*), gıda matriksinin, aroma salınımı üzerine etkisini incelemek için RATD yöntemi hassas, ucuz ve uygun bir metot olarak görülmektedir (Muñoz-González vd., 2013; Muñoz-González vd., 2014a). *In vivo* aroma salınımını inceleyen bir başka çalışmada iki taze (taze küp parçaları, taze püre) ve iki kurutulmuş (kuru küp parçalar, kurutulmuş toz) halde olmak üzere dört farklı yapıdaki mango örnekleri kullanılmıştır. Tüketim sırasında salınan uçucu bileşenler RATD yöntemi ile ekstrakte edilmiştir. Araştırmacılar, aroma bileşiklerinin *in vivo* salınımının, gıda matriksinden etkilendiğini ve bütün haldeki örneklerden (taze ve kurutulmuş kübik parçalar), parçalanmış örneklere (taze püre, kurutulmuş toz) kıyasla daha fazla aroma bileşiği salındığını bildirmişlerdir (Bonneau vd., 2018).



Şekil 3. Retronazal yolla aroma salınımının RATD ile belirlenmesi

Figure 3. RATD used for the analysis of retronasal aroma release

Yapılan çalışmalar gıdaların tüketilmesi sırasında toplam aroma salınımını etkileyen faktörlerin yalnızca ürüne bağlı olmadığı aynı zamanda kişilerin oral fizyolojilerine ve yiyeceklerin ağız yoluyla işlenmesine bağlı olduğunu göstermektedir (Forde vd., 2013; Stieger ve Velde, 2013; Repoux vd., 2012; Laboure vd., 2014, Jourden vd., 2017). Laboure vd., (2014)'nin, farklı sertlikte ve yağ içeriğine sahip model peynirde yaptıkları çalışmada tadım yapan kişilerin oral işlemlerinin aroma salınımı üzerine etkisini nefes analizi-APCI-MS yöntemi ile araştırmışlar ve en yüksek aroma salınımına sahip olan kişilerin çiğneme aktivitesi en fazla olan kişiler olduğunu bildirmişlerdir. *In vivo* aroma salınımını inceleyen bir diğer çalışmada, 48 panelistin farklı sertlikteki peynirleri tüketim sırasında *in vivo* koşullarda çiğneme hareketleri bir elektro-miyografi (EMG) yardımı ile izlenmiş, elde edilen verilerden kişilerin çiğneme sayısı, çiğneme aralığı ve toplam kas hareketi gibi bilgiler hesaplanmıştır. Gıdanın tüketilmesi sırasında geniz boşluğunda salınan toplam uçucu bileşen profilinin nefes alma sayısına, ağız hacmine ve iki yutkunma arasındaki yutaktaki kapanmaya bağlı olduğunu bildirilmiştir (Feron vd., 2014; Kohyama vd., 2015; Kohyama vd., 2016).

Aroma salınımının *in vivo* koşullarda belirlenmesini sağlayan bir diğer yaklaşım ise gıdanın tüketilmesi sırasında ağıza yerleştirilen bir fibere uçucu bileşenlerin ekstraksiyonunu sağlamaktır. Çilek aromalı süt ve su örneklerinde aroma salınımı incelemek amacıyla, panelistlere 25 mL numune almaları söylenmiş ve 10 saniye boyunca ağızlarını örnek ile çalkalamaları süre sonunda numuneyi tükürmeleri istenmiştir. Tükürmenin ardından panelistlerin başka bir gıda almamak koşulu ile her zamanki davranışlarına (yutkunma konuşma gibi) izin verilmiştir. Tükürmenin ardından belli zamanlarda (15, 30, 60 saniye sonra) ağız içine kapsül fiber yerleştirilmiş, ağız ve dudaklar kapalı bir şekilde, yutkunma olmadan kapsülün yavaşça ağız içinde hareketi sağlanmıştır

(5 dakika). Ekstraksiyondan sonra kapsül çıkarılarak hızlıca desorpsiyon birimine yerleştirilmiştir (Buettner ve Mestres 2005). Şarap örnekleri ile yapılan bir başka çalışmada, yine panelistlerin ağız içine bir fiber yerleştirilmiş, ekstraksiyon süresi (2 dk) boyunca panelistlerin yutkunmasına izin verilmemiş ve ağızları kapalı bir şekilde süre sonuna kadar beklemişlerdir. Ekstraksiyon bittikten sonra, fiber ağızdan çıkarılarak GC-MS yöntemi ile aroma bileşimi belirlenmiştir (Fernández vd., 2016).

SONUÇ

Aromanın algılanmasını etkileyen faktörleri anlamak, gıda işleme endüstrisinde, yenilikçi ve beğenilen gıda ürünlerini üretmek için önemlidir. Nitekim, aroma, tüketicilerin tercihlerini etkileyen en önemli faktördür. Araştırmacılar, son yıllarda tüketim sırasında aroma salınımını ve algılanmasını zamana bağlı olarak inceleyen çeşitli yöntemler kullanmaktadır. Kullanılan tekniklerden, PTR-MS ve APCI-MS gıdanın ağızda tüketimi sırasında aroma salınımının gerçek zamanlı belirlenmesine olanak sağlarken takip edilen uçucu bileşen sayısının azlığı bu cihazların en önemli kısıtıdır. Öte yandan, son zamanlarda yapılan araştırmalarda gıdanın tüketimi sırasında bir polimer tarafından tutulan aroma maddelerinin geleneksel GC-MS yöntemleri ile belirlenmesine yönelik araştırmalar daha basit ve eş zamanlı metotlar kadar hassas metodoloji sunmaktadır. Ancak PTR ve APCI tabanlı tekniklerin aksine, aroma bileşenlerinin gerçek-zamanlı salınımının izlenmesine imkan vermemektedir. Literatürde yapılan çalışmalar daha çok model gıdalar üzerine odaklanmıştır. Gerçek gıda matrisleri ile yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır ve bu çeşitli faktörlerin (şekerler, pektinler, tükürük vb.) aroma bileşiklerinin salınımına ve aroma algısına etkisinin anlaşılmasına yardımcı olacaktır. Bu yaklaşımla ülkemizde yapılacak çalışmaların, geleneksel aroma analiz yöntemlerine yeni bir boyut kazandıracığı düşünülmektedir.

Çizelge 1. Aroma salınımının belirlenmesinde kullanılan yöntemler
 Table 1. The methods used for analysis of aroma release

Metodoloji <i>Methodology</i>	Enstrümental metot <i>Instrumental method</i>	Ürün <i>Product</i>	Değerlendirilen ürün sayısı <i>Number of different products evaluated</i>	Takip edilen uçucu bileşen sayısı <i>Number of volatiles followed</i>	Panelist Sayısı <i>Number of assessors</i>	Tadım protokolü <i>Tasting protocol</i>	Kaynaklar <i>References</i>
Dinamik <i>in vitro</i> ve <i>in vivo</i> analizler <i>Dynamic in vitro and in vivo analyses</i>	>>Model ağız sistemi-yapay tükürük veya insan tükürüğü-HS-PTR-MS >>Model mouth-airtificial or real saliva-HS-PTR-MS	Sıvı sistemler <i>Liquid systems</i>	3/5 mM fosfat tamponu (pH 7), yağ ve yağ/su emülsiyonu <i>3/5 mM phosphate tampon (pH 7) oil and oil/water emulsion</i>	7	10 (tükürük örnekleri için) <i>10 (for saliva)</i>	Yok <i>No</i>	Benjamin vd., 2012
	>>Model ağız -su veya yapay tükürük-Tenax-GC-MS >>Statik HS-GC-FID >>Model mouth-water or airtificial saliva-Tenax-GC-MS>>Statik HS-GC-FID	Ticari ayçiçek yağı <i>Commercial sun flower oil</i>	2/Ticari ayçiçek yağı ve ayçiçek yağı-su-tween emülsiyonu <i>2/ Commercial sun flower oil, flower oil-water-tween emulsion</i>	11	Yok <i>No</i>	Yok <i>No</i>	Van Ruth ve Roozen 2000a
Dinamik ve statik <i>in vitro</i> analizler <i>Dynamic and static in vitro analyses</i>	>>Model ağız-yapay tükürük-GC-MS>>SPME-GC-MS>>PT-GC-MS>>SAFE-GC-MS >>Model mouth-airtificial-GC-MS>>SPME-GC-MS>>PT-GC-MS>>SAFE-GC-MS	Peynir <i>Cheese</i>	7/farklı sertlikte <i>7/ different texture</i>	27	Yok <i>No</i>	Yok <i>No</i>	Thomsen vd., 2014
	>>Yapay tükürük-HS-GC-MS>>Gerçek tükürük-HS-GC-MS >>Airtificial saliva-HS-GC-MS>>Real saliva-HS-GC-MS	Şarap <i>Wine</i>	2/Kırmızı ve beyaz şarap <i>2/ Red wine and white wine</i>	45	20 (Tükürük örnekleri için) <i>20 (for saliva)</i>	Yok <i>No</i>	Muñoz-González., 2014a

Çizelge 1 devam
Table 1 continued

Metodoloji <i>Methodology</i>	Enstrümental metot <i>Instrumental method</i>	Ürün <i>Product</i>	Değerlendirilen ürün sayısı <i>Number of different products evaluated</i>	Takip edilen uçucu bileşen sayısı <i>Number of volatiles followed</i>	Panelist Sayısı <i>Number of assessors</i>	Tadım protokolü <i>Tasting protocol</i>	Kaynaklar <i>References</i>
Dinamik <i>in vivo</i> ve statik <i>in vitro</i> analizler <i>Dynamic in vivo and static in vitro analyses</i>	>>Yapay yutak-APCI-GPA-MS-Nose>>Statik HS-APCI-GPA-MS-Nose>>İnsan nefesi-APCI-GPA-MS-Nose>> <i>Artificial pharinx-APCI-GPA-MS-Nose>>Statik HS-APCI-GPA-MS-Nose>> Human breath-APCI-GPA-MS-Nose</i>	Peyniraltı suyu proteinleri <i>Whey proteins</i>	1/Peyniraltı suyu protein izolatı <i>1/Whey protein isolate</i>	8	2	Var Yes	Weel vd., 2004
	>>Model ağız (RAS)-yapay tükürük-PTR-MS>> Nefes analizi-PTR-MS <i>>>Model mouth (RAS)-yapay tükürük-PTR-MS>>Nefes analizi-PTR-MS</i>	Model ekmek <i>Model bread</i>	1	5	1	Var Yes	Onishi vd., 2012
	>>Burun boşluğu-PTR-TOF-MS>>HS-PTR-TOF-MS>>Nose space-PTR-TOF-MS>>HS-PTR-TOF-MS	Çilek aromalı tahıl çubukları <i>Cereal bars with strawberry aroma</i>	8/şeker içeriği değişen aromalı barlar <i>8/aromatic bars with different sugar concentrations</i>	14	5	Var Yes	Heenan vd., 2012
	>>Burun boşluğu-PTR-TOF-MS>>HS-PTR-TOF-MS>>Nose space-PTR-TOF-MS>>HS-PTR-TOF-MS	Model kahve <i>Model coffee</i>	3/farklı kavurma yöntemi <i>3/different roasting method</i>	81	5	Var Yes	Romano vd., 2014

Çizelge 1 devam
Table 1 continued

Metodoloji <i>Methodology</i>	Enstrümental metot <i>Instrumental method</i>	Ürün <i>Product</i>	Değerlendirilen ürün sayısı <i>Number of different products evaluated</i>	Takip edilen uçucu bileşen sayısı <i>Number of volatiles followed</i>	Panelist Sayısı <i>Number of assessors</i>	Tadım protokolü <i>Tasting protocol</i>	Kaynaklar <i>References</i>
	>>Ağız içi SBSE ekstraksiyon kapsülü >> <i>SBSE in mouth extraction capsule</i>	Çilek aroması <i>Strawberry aroma</i>	2/çilek aromalı su ve süt <i>2/ milk and water with strawberry aroma</i>	15	10	Var <i>Yes</i>	Buettner ve Mestres 2005
	>>Burun boşluğu-APCI-MS >> <i>Nose space-APCI-MS</i>	Model süt jeli <i>Model milk gel</i>	3/kimozin içermeyen, 3 veya 10 µL kimozin içeren süt jeli <i>3/ milk gel without chymosin and milk gel with 3 or 10 µL chymosin</i>	10	14	Var <i>Yes</i>	Gierczynski vd., 2008
	>>Burun boşluğu-PTR-MS >> <i>Nose space-PTR-MS</i>	Glikoz şurubu <i>Glucose syrup</i>	7/viskozitesi değişen şurup örnekleri <i>7/ syrup samples varying in viscosity</i>	2	5	Var <i>Yes</i>	Doyennette vd., 2011
Dinamik <i>in vivo</i> analizler <i>Dynamic in vivo analyses</i>	>>Nefes analizi-APCI-MS >> <i>Breath analysis-APCI-MS</i>	Model peynir <i>Model cheese</i>	6/ farklı tekstürde <i>6/ different texture</i>	2	44	Yok <i>No</i>	Repoux vd., 2012
	>>RATD-GC-MS >> <i>RATD-GC-MS</i>	Şarap <i>Wine</i>	5	4	6	Var <i>Yes</i>	Muñoz-González vd., 2014a
	>>RATD-GC-MS >> <i>RATD-GC-MS</i>	Model şarap <i>Model wine</i>	4	6	3	Var <i>Yes</i>	Muñoz-González vd., 2014b
	>>Nefes analizi-APCI-MS >> <i>Breath analysis-APCI-MS</i>	Model peynir <i>Model cheese</i>	6/ farklı yağ içerikli ve sertlikte <i>6/ different texture and fat content</i>	2	34	Var <i>Yes</i>	Labouré vd., 2014
	>>Nefes analizi-APCI-MS >> <i>Breath analysis-APCI-MS</i>	Model peynir <i>Model cheese</i>	4/ farklı tekstürde <i>4/ different texture</i>	-	48	Var <i>Yes</i>	Feron vd., 2014
	>>Nefes analizi-PTR-MS >> <i>Breath analysis_PTR-MS</i>	Konyak <i>Cognac</i>	5/ farklı olgunlukta <i>5/ different maturity</i>	9	13	Var <i>Yes</i>	Fiches vd., 2016
	>>Ağız içi SPME-GC-MS >> <i>SPME in mouth-GC-MS</i>	Beyaz şarap <i>White wine</i>	4/ farklı aromalı şaraplar <i>4/ wines with different aroma</i>	6	3	Var <i>Yes</i>	Fernandez vd., 2016

Çizelge 1 devam
Table 1 continued

	>>Yapay tükürük- PTR-MS	Peynir <i>Cheese</i>	4/ farklı yağ içerikli ve farklı sertlikte peynir	2	Yok <i>No</i>	Yok <i>No</i>	Doyennette vd., 2011
	>>Airtifical saliva- PTR-MS		4/ <i>different fat contents and different textures</i>				
Dinamik <i>in vitro</i> analizler <i>Dynamic in vitro analyses</i>	>>HS-GC-MS>>HS- APCI-MS>>Burun boşluğu analizi-APCI- MS	Model köri sos <i>Model curry</i>	21/ farklı yağ içeriği ve farklı baharatlar	3	23	Var <i>Yes</i>	Hatakeyama vd., 2014
	>>HS-GC-MS>>HS- APCI-MS>>Nose <i>space-APCI-MS</i>	Model köri sos <i>Model curry</i>	21/ <i>different fat ana- spices</i>				
	>>Model ağız (RAS)- gerçek tükürük SPME-GC-MS	Zeytin yağı <i>Olive oil</i>	6	13	14 (tükürük örnekleri için) 14 (for saliva)	Yok <i>No</i>	Genovese vd., 2015
Statik <i>in vitro</i> analiz <i>Static in vitro analysis</i>	>>HS-PTR-TOF-MS	Elma <i>Apple</i>	9/ farklı elma çeşitleri <i>9/ different variety</i>	49	13	Yok <i>No</i>	Ting vd., 2016

RAS: Retronazal aroma simülatörü/*Retronasal aroma simulator*; APCI-MS:Atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon-kütle spektrometresi/*Atmospheric-pressure chemical ionization*; GC-FID:Gaz kromatografisi-alev iyonlaşmalı dedektör/*Gas chromatography flame ionization detector*; SPME: Katı faz mikro ekstraksiyonu/*solid phase microextraction*; HS:Tepe boşluğu yöntemi/*Head space method*; RATD:Retronazal aroma tuzaklayıcı aparat/*Retronasal aroma trapping device*; SBSE:Karıştırma çubuğu sorptif ekstraksiyonu/*Stir bar sorptive extraction*; TOF: Uçuş zamanlı kütle spektrometresi/*Time of flight mass spectrometer*; GPA:Gaz faz analizatörü/*Gas phase analyser*; PT: Purge and trap/*Purge and trap*.

KAYNAKÇA

Akiyama, M., Watanabe, R., Ohata, M., Onishi, M., Mizota, Y., Okawa, T., Iwabuchi, H. (2016). Effect of milk components on release of retronasal-aroma compounds from coffee with milk. *Food Sci Technol Res*, 22(4): 545-555.

Arvisenet, G., Guichard, E., Ballester, J. (2016). Taste-aroma interaction in model wines: Effect of training and expertise. *Food Qual Prefer*, 52: 211-221.

Benjamin, O., Silcock, P., Beauchamp, J., Buettner, A., Everett, D.W. (2012). Tongue pressure and oral conditions affect volatile release from liquid systems in a model mouth. *J Agric Food Chem*, 60(39): 9918-9927.

Boesveldt, S., de Graaf, K. (2017). The differential role of smell and taste for eating behavior. *Perception*, 46(3-4), 307-319.

Boisard, L., Tournier, C., Semon, E., Noirot, E., Guichard, E., Salles, C. (2014). Salt and fat contents influence the microstructure of model cheeses, chewing/swallowing and in vivo aroma release. *Flavour Frag J*, 29(2): 95-106.

Bojanowski, V., Hummel, T. (2012). Retronasal perception of odors. *Physiol Behav*, 107: 484-487.

Bonneau, A., Boulanger, R., Lebrun, M., Maraval, I., Valette, J., Guichard, E., Gunata, Z. (2018). Impact of fruit texture on the release and perception of aroma compounds during in vivo consumption using fresh and processed mango fruits. *Food Chem*, 239, 806-815.

- Buettner, A., Mestres, M. (2005). Investigation of the retronasal perception of strawberry aroma aftersmell depending on matrix composition. *J Agric Food Chem*, 53(5): 1661-1669.
- Bushdid, C., Magnasco, M.O., Vosshall, L.B., Keller, A. (2014). Humans can discriminate more than 1 trillion olfactory stimuli. *Science*, 343: 1370-1372.
- Cappellin, L., Karl, T., Probst, M., Ismailova, O., Winkler, P.M., Soukoulis, C., Biasioli, F. (2012). On quantitative determination of volatile organic compound concentrations using proton transfer reaction time-of-flight mass spectrometry. *Environ Sci Technol*, 46: 2283-90.
- Cappellin, L., Loreto, F., Aprea, E., Romano, A., del Pulgar, J.S., Gasperi, F., Biasioli, F. (2013). PTR-MS in Italy: a multipurpose sensor with applications in environmental, agri-food and health science. *Sensors*, 13(9): 11923-11955.
- Doyennette, M., De Loubens, C., Deleris, I., Souchon, I., Trelea, I.C. (2011). Mechanisms explaining the role of viscosity and post-deglutitive pharyngeal residue on *in vivo* aroma release: A combined experimental and modeling study. *Food Chem*, 128(2): 380-390.
- Eren, A.M., Borisy, G.G., Huse, S.M., Mark Welch, J.L. (2014). PNAS Plus: From the cover: Oligotyping analysis of the human oral microbiome. *Proc Natl Acad Sci*, 111(28): 2875-2884.
- Esteban-Fernández, A., Rocha-Alcubilla, N., Muñoz-González, C., Moreno-Arribas, M. V., Pozo-Bayón, M.Á. (2016). Intra-oral adsorption and release of aroma compounds following in-mouth wine exposure. *Food Chem*, 205: 280-288.
- Farneti, B., Alarcón, A.A., Cristescu, S.M., Costa, G., Harren, F.J.M., Holthuysen, N.T. E., Woltering, E.J. (2013). Aroma volatile release kinetics of tomato genotypes measured by PTR-MS following artificial chewing. *Food Res Int*, 54(2): 1579-1588.
- Feron, G., Ayed, C., Qannari, E.M., Courcoux, P., Laboure, H., Guichard, E. (2014). Understanding aroma release from model cheeses by a statistical multiblock approach on oral processing. *PLoS one*, 9(4): e93113.
- Fiches, G., Saint Eve, A., Jourden, S., Délérís, I., Brunerie, P., Souchon, I. (2016). Temporality of perception during the consumption of French grape brandies with different aging times in relation with aroma compound release. *Flavour Frag J*, 31(1): 31-40.
- Forde, C.G., van Kuijk, N., Thaler, T., de Graaf, C., Martin, N. (2013). Oral processing characteristics of solid savoury meal components, and relationship with food composition, sensory attributes and expected satiation. *Appetite*, 60(1): 208-219.
- Foster, K.D., Grigor, J., Cheong, J.N., Yoo, M.J., Bronlund, J.E., Morgenstern, M.P. (2011). The role of oral processing in dynamic sensory perception. *J Food Sci*, 76(2): 49-61.
- Gan, H.H. (2015). Aroma-matrix interaction in food: an APCI approach. Ph.D. Dissertation, University of Nottingham, UK, 138 p.
- Genovese, A., Caporaso, N., Villani, V., Paduano, A., Sacchi, R. (2015). Olive oil phenolic compounds affect the release of aroma compounds. *Food Chem*, 181: 284-294.
- Gierczynski, I., Laboure, H., Guichard, E. (2008). *In vivo* aroma release of milk gels of different hardnesses: Inter-individual differences and their consequences on aroma perception. *J Agric Food Chem*, 56(5): 1697-1703.
- Guichard, E. (2014). Interaction of aroma compounds with food matrices. In: *Flavour Development, Analysis and Perception in Food and Beverages*, Parker, J.K., Elmore J.S., Methven, L., Elsevier, the UK, pp. 273-295.
- Hatakeyama, J., Davidson, J.M., Kant, A., Koizumi, T., Hayakawa, F., Taylor, A.J. (2014). Optimising aroma quality in curry sauce products using *in vivo* aroma release measurements. *Food Chem*, 157: 229-239.
- Heenan, S., Soukoulis, C., Silcock, P., Fabris, A., Aprea, E., Cappellin, L., Biasioli, F. (2012). PTR-TOF-MS monitoring of *in vitro* and *in vivo* flavour release in cereal bars with varying sugar composition. *Food Chem*, 131(2): 477-484.

- Jourdren, S., Masson, M., Saint-Eve, A., Panouillé, M., Blumenthal, D., Lejeune, P., Souchon, I. (2017). Effect of bread crumb and crust structure on the in vivo release of volatiles and the dynamics of aroma perception. *J Agric Food Chem*, 65(16): 3330-3340.
- Kohyama, K., Hayakawa, F., Kazami, Y., Ishihara, S., Nakao, S., Funami, T., Nishinari, K. (2015). Electromyographic texture characterization of hydrocolloid gels as model foods with varying mastication and swallowing difficulties. *Food Hydrocoll*, 43: 146-152.
- Kohyama, K., Hayakawa, F., Gao, Z., Ishihara, S., Funami, T., Nishinari, K. (2016). Natural eating behavior of two types of hydrocolloid gels as measured by electromyography: Quantitative analysis of mouthful size effects. *Food Hydrocoll*, 52: 243-252.
- Labouré, H., Repoux, M., Courcoux, P., Feron, G., Guichard, E. (2014). Inter individual retronasal aroma release variability during cheese consumption: Role of food oral processing. *Food Res Int*, 64: 692-700.
- Lindinger, W., Hansel, A., Jordan, A. (1998). On-line monitoring of volatile organic compounds at pptv levels by means of proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS) medical applications, food control and environmental research. *Int J Mass Spectrom Ion Process*, 173(3): 191-241.
- Linforth, R., Taylor, A.J. (2000). Persistence of volatile compounds in the breath after their consumption in aqueous solutions. *J Agric Food Chem*, 48(11): 5419-5423.
- Mark Welch, J.L., Rossetti, B.J., Rieken, C.W., Dewhirst, F.E., Borisy, G.G. (2016). Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proc Natl Acad Sci India Sect*, 113(6): 791-800.
- Mosca, A.C., Chen, J. (2017). Food-saliva interactions: Mechanisms and implications. *Trends Food Sci Technol*, 66: 125-134.
- Muñoz-González, C., Martín-Álvarez, P.J., Moreno-Arribas, M.V., Pozo-Bayón, M.A. (2013). Impact of the nonvolatile wine matrix composition on the in vivo aroma release from wines. *J Agric Food Chem*, 62(1): 66-73.
- Muñoz-González, C., Feron, G., Guichard, E., Rodríguez-Bencomo, J.J., Martín-Álvarez, P.J., Moreno-Arribas, M.V., Pozo-Bayón, M.A. (2014a). Understanding the role of saliva in aroma release from wine by using static and dynamic headspace conditions. *J Agric Food Chem*, 62(33): 8274-8288.
- Muñoz-González, C., Rodríguez-Bencomo, J.J., Moreno-Arribas, M.V., Pozo-Bayón, M. Á. (2014b). Feasibility and application of a retronasal aroma-trapping device to study in vivo aroma release during the consumption of model wine-derived beverages. *Food Sci Nutr*, 2(4): 361-370.
- Onishi, M., Inoue, M., Araki, T., Iwabuchi, H., Sagara, Y. (2012). A PTR-MS-based protocol for simulating bread aroma during mastication. *Food Bioprocess Tech*, 5(4): 1228-1237.
- Özdestan, Ö. (2013). PTR-MS tekniğinin gıda analizlerinde kullanımı. *GIDA*, 38(2): 103-110.
- Pagès-Hélary, S., Andriot, I., Guichard, E., Canon, F. (2014). Retention effect of human saliva on aroma release and respective contribution of salivary mucin and α -amylase. *Food Res Int*, 64: 424-431.
- Paravisini, L., Septier, C., Moretton, C., Nigay, H., Arvisenet, G., Guichard, E., Dacremont, C. (2014). Caramel odor: Contribution of volatile compounds according to their odor qualities to caramel typicality. *Food Res Int*, 57: 79-88.
- Ployon, S., Morzel, M., Canon, F. (2017). The role of saliva in aroma release and perception. *Food Chem*, 226: 212-220.
- Poinot, P., Arvisenet, G., Ledauphin, J., Gaillard, J.L., Prost, C. (2013). How can aroma-related cross-modal interactions be analysed? A review of current methodologies. *Food Qual Prefer*, 28(1): 304-316.
- Repoux, M., Sémon, E., Feron, G., Guichard, E., Labouré, H. (2012). Inter-individual variability in aroma release during sweet mint consumption. *Flavour Fragr J*, 27(1): 40-46.

- Romano, A., Cappellin, L., Ting, V., Aprea, E., Navarini, L., Gasperi, F., Biasioli, F. (2014). Nosespace analysis by PTR-ToF-MS for the characterization of food and tasters: The case study of coffee. *Int J Mass Spectrom*, 365: 20-27.
- Ruijschop, R.M., Zijlstra, N., Boelrijk, A.E., Dijkstra, A., Burgering, M.J., de Graaf, C., Westerterp-Plantenga, M.S. (2011). Effects of bite size and duration of oral processing on retro-nasal aroma release—features contributing to meal termination. *Br J Nutr*, 105(2): 307-315.
- Soeting, W.J., Heidema, J. (1988). A mass spectrometric method for measuring flavour concentration/time profiles in human breath. *Chem Senses*, 13(4): 607-617.
- Soukoulis, C., Cappellin, L., Aprea, E., Costa, F., Viola, R., Märk, T.D., Biasioli, F. (2013). PTR-ToF-MS, A novel, rapid, high sensitivity and non-invasive tool to monitor volatile compound release during fruit post-harvest storage: the case study of apple ripening. *Food Bioprocess Tech*, 6(10): 2831-2843.
- Stieger, M., Van de Velde, F. (2013). Microstructure, texture and oral processing: New ways to reduce sugar and salt in foods. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 18(4): 334-348.
- Taylor, A.J., Linfoth, R.S.T., Harvey, B.A., Blake, A. (2000). Atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry for in vivo analysis of volatile flavour release. *Food Chem*, 71(3): 327-338.
- Thomsen, M., Gourrat, K., Thomas-Danguin, T., Guichard, E. (2014). Multivariate approach to reveal relationships between sensory perception of cheeses and aroma profile obtained with different extraction methods. *Food Res Int*, 62: 561-571.
- Ting, J.L.V., Soukoulis, C., Silcock, P., Cappellin, L., Romano, A., Aprea, E., Biasioli, F. (2012). In vitro and in vivo flavor release from intact and fresh-cut apple in relation with genetic, textural, and physicochemical parameters. *J Food Sci*, 77(11): 1226-1233.
- Ting, V.J.L., Romano, A., Soukoulis, C., Silcock, P., Bremer, P.J., Cappellin, L., Biasioli, F. (2016). Investigating the in-vitro and in-vivo flavour release from 21 fresh-cut apples. *Food Chem*, 212: 543-551.
- Van Ruth, S.M., Roozen, J.P., Cozijnsen, J.L. (1995). Changes in flavour release from rehydrated diced bell peppers (*Capsicum annuum*) by artificial saliva components in three mouth model systems. *J Sci Food Agr*, 67(2): 189-196.
- Van Ruth, S.M., Roozen, J.P. (2000a). Aroma compounds of oxidised sunflower oil and its oil-in-water emulsion: volatility and release under mouth conditions. *Eur Food Res Technol*, 210(4): 258-262.
- Van Ruth, S.M., Roozen, J.P. (2000b). Influence of mastication and saliva on aroma release in a model mouth system. *Food Chem*, 71(3): 339-345.
- Weel, K.G., Boelrijk, A.E., Burger, J.J., Verschueren, M., Gruppen, H., Voragen, A. G., Smit, G. (2004). New device to simulate swallowing and in vivo aroma release in the throat from liquid and semiliquid food systems. *J Agric Food Chem*, 52(21): 6564-65.



TAM TANE BAKLAGİL UNLARININ KİMYASAL, FONKSİYONEL VE REOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Seçil Türksoy*

Hitit Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Çorum, Türkiye

Geliş / Received: 17.08.2017; Kabul / Accepted: 28.11.2017; Online baskı / Published online: 27.12.2017

Türksoy, S. (2018). Tam tane baklagil unlarının kimyasal, fonksiyonel ve reolojik özelliklerinin belirlenmesi. *GIDA* (2018) 43 (1): 78-89 doi: 10.15237/gida.GD17078

ÖZ

Zengin bir protein kaynağı olmaları sebebiyle günlük beslenmede önemli bir rol oynayan baklagiller besinsel lifler, dirençli nişasta, vitamin ve mineraller ile bazı fitokimyasallar gibi pek çok bileşiği de önemli oranda içermektedir. Bu çalışmada, Çorum İl'inde yetiştirilen baklagillerden (nohut, fasulye, bezelye, kırmızı ve yeşil mercimek) elde edilen unların kimyasal (rutubet, kül), besinsel (protein, yağ, nişasta, lif) ve antibesinsel (fitik asit) bileşimleri ile termal (Rapid Visco Analyser, RVA) özellikleri saptanmıştır. Ayrıca baklagillerin öğütülmesi ile elde edilen unlar belirli oranlarda (% 10, 15 ve 20) buğday ununa ilave edilerek elde edilen hamurların reolojik özellikleri belirlenmiştir. Baklagil unlarının toplam fitik asit miktarları 5.95 ile 11.77 mg/g değerleri arasında değişirken, toplam besinsel lif içerikleri ise %14.2 ile %24.4 değerleri arasında saptanmıştır. Farklı baklagil unlarının jelatinizasyon sıcaklıkları 63.7 °C (nohut) ile 78.6 °C (fasulye) arasında değişmiştir. Farinogram parametreleri incelendiğinde, baklagil unlarının maksimum % 15 oranında buğday ununa katılmasının reolojik özellikler bakımından optimum olduğu sonucuna varılmaktadır.

Anahtar kelimeler: Baklagil, besinsel lif, fitik asit, çirilenme özellikleri, reoloji

DETERMINATION OF CHEMICAL, FUNCTIONAL AND RHEOLOGICAL PROPERTIES OF WHOLE LEGUME FLOURS

ABSTRACT

Legumes that play an important role in daily nutrition due to being a rich protein source contain many important components such as resistant starch, vitamins, minerals and some phytochemicals besides dietary fibers which are important for health and have high biological activity. Within the scope of this study, chemical (moisture, ash), nutritional (protein, lipid, starch and dietary fiber) and antinutritional (phytic acid) compositions and thermal (RVA, Rapid Visco Analyzer) properties of the legume (chickpea, bean, pea, red lentil and green lentil) flours were determined. Furthermore, the legume flours were added to wheat flour with different ratios (10, 15 and 20%) and the rheological properties of the doughs were investigated. Total phytic acid and total dietary fiber contents of whole legume flours changed between 5.95 - 11.77 mg/g and 14.2 - 24.4%, respectively. The results showed that the gelatinization temperatures of different whole legume flours varied from minimum 63.7 °C with chickpea to maximum 78.6 °C for bean. According to the rheological parameters, the optimum addition level for whole legume flours into the wheat flour was 15%.

Keywords: Legume, dietary fiber, phytic acid, pasting properties, rheology.

* Yazışmalarda sorumlu yazar / Corresponding author

✉ secilturksoy@hitit.edu.tr,

☎ (+90) 364 227 4533 / 1220

☎ (+90) 364 227 4535

GİRİŞ

Günümüzde olumsuz yönde değişen beslenme koşullarına bağlı olarak başta sindirim sistemi hastalıkları olmak üzere, kardiyovasküler hastalıklar, obezite, diyabet, kolesterol, hipertansiyon ve çeşitli kanser türlerinin görülme sıklığı giderek yükselen bir grafik çizmektedir. Bu durum, sağlıklı ve fonksiyonel özellikteki yeni çeşitlerin üretilmesine yönelik taleplerin giderek artmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla günlük beslenmemizin vazgeçilmez bir parçası olan ekmek, makarna vb fırın ürünlerine fonksiyonellik katacak yeni bileşenlerin formülasyona dahil edilmesi yönündeki yeni araştırmalara gereksinim duyulmaktadır. Buğday, ekmek üretiminde en yaygın olarak kullanılan tahıllardan biri olmakla birlikte; rafine buğday unu ile hazırlanan ekmekler özellikle protein, besinsel lif vb besleyici özellikleri bakımından oldukça yetersizdir.

Baklagiller zengin protein, karbonhidrat (nişasta ve besinsel lif), vitamin ve mineral madde içeriklerinden dolayı dünyada en önemli gıda grupları arasında yer almaktadırlar. Bileşimlerinde az miktarda yağ bulunmakla birlikte, kolesterol içermeyen baklagiller ayrıca düşük glisemik indeksli gıdalar olarak tanımlanmaktadırlar. Bu özellikleri nedeniyle baklagillerin diyabet hastalığının beslenme yolu ile tedavisinde şeker ve lipid metabolizmasının sağlıklı işleyişi üzerinde de oldukça önemli etkileri bulunmaktadır. Baklagillerin besleyici faydalarının bileşimlerdeki besinsel lif ve düşük sindirilebilirlikteki nişastaya bağlı olduğu bildirilmektedir (Chung vd., 2008). Önemli besin grupları bakımından zengin kimyasal kompozisyonlarına bağlı olarak baklagillerin obezite, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, bazı kanser türleri ile iskelet sağlığı üzerinde önemli koruyucu ve tedavi edici etkileri bulunmaktadır (Tharanathan ve Mahadevamma, 2003; Hera vd., 2012). Baklagiller, dengeli aminoasit bileşimleri ve beslenme üzerine faydalı etkileri nedeniyle fırın ürünlerinin besleyici özelliklerinin geliştirilmesinde de ideal bir bileşen olarak dikkat çekmektedirler. Tahıl bazlı gıda formülasyonlarına baklagillerin ilave edilmesi, tüketim miktarlarının artırılması için iyi bir uygulama alanı oluşturmaktadır. Tahıl proteinleri ile kıyaslandığında baklagillerin esansiyel

aminoasitler bakımından daha dengeli bir bileşim içermeleri (lisin miktarı yüksek, kükürtlü aminoasit miktarı düşük) tahıl ve baklagillerin birlikte kullanımlarındaki önemi daha da arttırmaktadır (Eggum ve Beame, 1983; Livingstone vd., 1993; Iqbal vd., 2006).

Son 30 yıllık dönemde, baklagil unlarının belirli oranda buğday ununa ilavesi ile elde edilecek hamur ve ekmeğin fonksiyonel özellikleri üzerinde etkilerini araştırmak amacıyla çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla; nohut, bezelye, bakla, mercimek ve fasulye (Meksika fasulyesi, soya fasulyesi vb) gibi baklagil unları buğday ununa belirli oranlarda katılarak, ekmek ve diğer benzeri tahıl bazlı ürünlerin üretiminde kullanım olanakları araştırılmıştır (Hera vd., 2012). Farklı tipteki baklagil unlarının fizikokimyasal ve fonksiyonel özelliklerinin incelendiği bir çalışmada; fasulye (pinto, lima, kırmızı barbunya, siyah fasulye, navy, mung), mercimek ve nohut unları su ve yağ absorpsiyon kapasiteleri, suda çözünürlük kapasiteleri, emülsiyon aktivitesi ve stabilitesi ile çirşlenme özellikleri bakımından analiz edilmiştir. Baklagil unlarının içerdikleri protein/nişasta oranlarına bağlı olarak fizikokimyasal ve fonksiyonel özellikleri bakımından önemli farklılıklar gösterdikleri, çirşlenme özelliklerindeki farklılıkların ise büyük oranda içerdikleri nişastanın şişme ve su tutma kapasitesi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Du vd., 2014). Buğday ununa farklı oranlarda nohut unu ilave edilerek (%10, %20 ve %30) elde edilen hamurların reolojisi ile ekmek kalitesinin incelendiği diğer bir çalışmada ise; artan nohut unu miktarına bağlı olarak hamurun su absorpsiyon değerlerinde bir artış gözlenmiştir. Çalışma sonucunda, %10 ve %20 oranlarında nohut unu ilave edilerek hazırlanan ekmeklerin kabul edilebilir düzeyde oldukları ve ayrıca yeni fonksiyonel gıdaların geliştirilmesi bakımından nohut unu ilavesinin iyi bir bileşen olduğu ifade edilmektedir (Mohammed vd., 2012). Buğday ununa soya fasulyesi ve arpa unu ilave edilerek (%5, 10, 15 ve 20) hazırlanan ekmeklerin organoleptik ve besleyici özelliklerinin değerlendirildiği bir araştırma sonucunda, artan katma oranlarına bağlı olarak son ürünün çeşitli besinsel özellikler bakımından zenginleştiği (protein, yağ, toplam lisin, mineral madde,

besinsel lif, β -glukan) ifade edilmiştir. % 10 ve 15 oranlarında soya ve arpa unu ilave edilerek hazırlanan ekmeklerin organoleptik özellikler bakımından kabul edilebilir düzeyde olduğu belirtilmiştir (Dhingra ve Jood, 2001). Gómez vd. (2008) tarafından buğday ununun nohut unu ile zenginleştirilmesi ile elde edilen keklerin kalite özelliklerinin değerlendirilmesine yönelik yapılan çalışma sonucunda, nohut ununun kek formülasyonu için uygun bir bileşen olduğu, ancak artan katma oranlarına bağlı olarak kek hacmi ve simetrisinde azalma, tekstürel olarak daha katı ve yapışkan yapıda bir ürün elde edildiği belirtilmiştir.

Farklı baklagil unlarının (fasulye, yeşil mercimek, bezelye) değişik oranlarda ve değişik partikül iriliğinde formülasyona ilave edilerek hazırlanan bisküvilerin bazı fiziksel, kimyasal ve besleyici özelliklerinin değerlendirildiği bir araştırma sonucunda; baklagil unu ilavesinin araştırılan özellikleri önemli oranda değiştirdiği, en büyük etkinin ise yeşil mercimek unu ilavesi ile sağlandığı belirtilmektedir. Baklagil unları ile zenginleştirilmiş bisküvilerin kontrol örneğe kıyasla protein miktarı ve antioksidan aktivite bakımından da daha yüksek değerler sergilediği ifade edilmektedir (Zucco vd., 2011). Wood (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, nohut unu ile zenginleştirilen (%0-30) makarnanın tekstürel, işleme ve organoleptik özellikleri değerlendirilmiş ve sonuçta; nohut unu ilavesinin makarnanın toplam protein ve lizin miktarını önemli ölçüde arttırdığı, bazı fonksiyonel ve teknolojik işleme özelliklerini olumsuz (hamur işleme özellikleri ile makarna sertliği), bazı tekstürel özelliklerini (yapışkanlık, pişme kaybı) ise olumlu yönde etkilediği tespit edilmiştir.

Beslenme ve sağlık üzerindeki olumlu etkileri kanıtlanmış besinsel lif bileşikleri bakımından iyi bir kaynak olmaları, baklagillerin fonksiyonel katkı olarak kullanılması ve gıda formülasyonlarına dahil edilmesi uygulamalarında da önemli oranda artışa neden olmuştur. Çeşitli baklagillerin (bezelye, fasulye, nohut, mercimek) besinsel lif ve dirençli nişasta miktarları bakımından incelendiği bir araştırma sonucunda; baklagillerin içerdiği toplam besinsel lifin büyük bir kısmını çözünmez özellikteki besinsel liflerin oluşturduğu, fasulye ve

bezelyenin besinsel lif miktarı bakımından diğerlerine göre daha zengin kaynaklar olduğu ifade edilmiştir (Costa vd., 2006).

Önceki literatür verileri baklagil unlarının besinsel açıdan iyi birer kaynak olduklarını ve makarna, kek, bisküvi, ekmek vb tahıl ürünleri bileşiminde fonksiyonel bir unsur olarak kullanılabileceklerini belirtmektedir. Bu çalışmada; Çorum İli'nde yetiştirilen bazı baklagil çeşitlerinden (nohut, fasulye, bezelye, kırmızı ve yeşil mercimek) elde edilecek unların bazı kimyasal, besinsel, antibesinsel, reolojik ve termal özelliklerinin saptanması, elde edilen verilerin buğday unu özellikleri ile karşılaştırılması ve ekmek yapımında formülasyonda buğday ununa ilave edilecek baklagil oranlarının optimize edilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Araştırmada materyal olarak kullanılan baklagiller (nohut, fasulye, bezelye, kırmızı ve yeşil mercimek) Çorum İli'nde bulunan üretici bir fabrikadan, ekmeklik özellikteki buğday unu ise Çorum'da faaliyet gösteren yerel bir un fabrikasından temin edilmiştir. Baklagil örnekleri temel kimyasal, reolojik ve termokimyasal analizler için laboratuvar tipi diskli bir değirmende (Brabender, Germany) öğütüldükten sonra analize kadar ağzı kapalı iki katlı PVC poşetler içerisinde +4 °C' de muhafaza edilmiştir.

Yöntem

Kimyasal analizler

Baklagil unları ile buğday ununda rutubet (Metot No 44-01, AACC 2002), kül (Metot No 08-01, AACC 2002), protein (Metot No 46-12, AACC 2002), yağ (Metot No 30-25, AACC 2002), nişasta (Metot No 996.11, AOAC 2012; Metot No 76.13, AACC 2002), ham lif (Metot No 32-10, AACC 2002), suda çözünen, çözünmeyen ve toplam besinsel lif (Metot No 991.43, AOAC 2012) ve fitik asit (Lehrfeld, 1989) miktarları belirtilen yöntemlere göre tayin edilmiştir. İnositol fosfatların (IP₃-IP₆) ekstraksiyonu Pedrosa vd. (2012) tarafından belirtilen yöntemle gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 0,5 g örnek 5 mL 0,5 M HCl çözeltisi ile 1 dk süre boyunca

ultratoraks kullanılarak homojenize edilmiştir. 2.5 mL homojenizat 25 mL deiyonize su ile seyreltildikten sonra öncesinde 2 mL deiyonize su ile yıkanan SAX kolonundan 2 mL 2 M HCl ile ayrıştırılmıştır. Eluat kuruyana kadar evapore edildikten sonra kalıntı tampon çözelti içerisinde çözündürülmüştür. Çözelti HPLC analizi öncesinde enjekte edilmeden önce safsızlık unsurlarından arındırılmak için santrifüj (12,000 g, 6 dk) edilmiştir. 45°C’ de muhafaza edilen PRP-1 ters faz analitik kolon (150 x 4.1 mm, 5 µm, Hamilton, Reno, Nevada, USA) HPLC analizinde kullanılmıştır. HPLC analizinde mobil faz 560 mL metanol, 440 mL formik asit (0.035 M) karışımından hazırlanmıştır. Karışıma 10 mL tetrabütülamonyumhidroksit (%40, w/w) ilave edildikten sonra karışımın pH değeri %72’lik sülfirik asit (w/w) ile 4.3’e ayarlanmıştır.

Reolojik Analizler

Un miktarının azaltılması yoluyla buğday ununa değişen oranlarda (%10, 15 ve 20) baklagil unlarının katılmasıyla elde edilen hamurların reolojik özellikleri farinograf (Brabender Farinograph E, Germany) analizleri ile saptanmıştır. Farinograf analizleri (su absorpsiyonu, gelişme süresi, stabilite, yumuşama

derecesi değerleri) AACC Standart No 54/21 (2012) metoduna göre belirlenmiştir.

Çirişlenme Profili Analizleri

Buğday ve baklagil un örneklerinin çirişlenme özellikleri ile viskozite profilleri hızlı viskozite test cihazı (RVA – Rapid Visco Analyser Newport Scientific, Warriewood, Australia) kullanılarak belirlenmiştir. Analizde uygulanacak sıcaklık – süre parametreleri; 50°C (Bekletme – 1 dk), 50 – 95°C (Isıtma – 6°C/dk), 95°C (Bekletme – 5 dk), 95 – 50°C (Soğutma – 6°C/dk) ve 50°C (Bekletme – 2 dk) olacak şekilde uygulanmıştır.

İstatistiksel Analizler

Tüm analizler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. İstatistik analizlerde SPSS (SPSS Version 12.0, SPSS Inc., IL) paket programı kullanılmıştır. Elde edilen veriler ANOVA varyans analizi yöntemi ile değerlendirildikten sonra ortalamalar arasındaki farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testleri ile belirlenmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Kimyasal Özellikler

Baklagil örnekleri ile buğday ununun temel kimyasal analiz sonuçları Çizelge 1’de verilmiştir.

Çizelge 1. Baklagil örneklerinin kimyasal özellikleri

Table 1. Chemical properties of legume samples

Örnek Sample	Rutubet miktarı Moisture content (%)	Protein miktarı* Protein content* (%, x5.40)	Kül miktarı* Ash content* (%)	Yağ miktarı* Lipid content* (%)
Buğday unu Wheat flour	12.40 ± 0.03 ^d	12.00 ± 1.01 ^a	0.60 ± 0.01 ^a	1.60 ± 0.06 ^a
Nohut Chickpea	7.79 ± 0.02 ^a	19.50 ± 1.00 ^b	2.90 ± 0.05 ^d	5.40 ± 0.07 ^f
Mercimek (yeşil) Lentil, green	12.00 ± 0.09 ^d	20.70 ± 0.80 ^c	1.90 ± 0.02 ^{bc}	2.10 ± 0.01 ^c
Mercimek (kırmızı) Lentil, red	11.30 ± 0.11 ^b	21.60 ± 1.12 ^d	1.70 ± 0.05 ^b	1.90 ± 0.02 ^b
Fasulye Bean	11.20 ± 0.30 ^b	22.50 ± 0.99 ^c	3.90 ± 0.03 ^e	2.60 ± 0.01 ^e
Bezelye Pea	11.60 ± 0.90 ^c	24.90 ± 0.07 ^f	2.10 ± 0.01 ^c	2.40 ± 0.03 ^d

*Kuru madde üzerinden verilmiştir.

Her bir sütunda aynı harf ile gösterilen değerler istatistiksel olarak önemli değildir (P < 0.05)

*As dry basis.

For each cultivar, means with the same letter within a column are not significantly different (P < 0.05)

Baklagil çeşitleri ile buğday unlarına ait kimyasal analiz sonuçları birbirinden farklılık göstermekle birlikte, beklenildiği üzere baklagil örneklerinin protein miktarı bakımından buğday ununa kıyasla oldukça zengin bir bileşime sahip olduğu görülmektedir. Baklagiller içerisinde nohut unu en düşük protein (%19.5) ve en yüksek yağ miktarı (%5.4) değerleri ile dikkat çekmektedir. Bununla birlikte çalışma kapsamında analiz edilen baklagil

un örneklerinin protein miktarlarının önceki çalışmalar ile uyum içerisinde olduğu görülmektedir (Costa vd., 2006; Kutoš vd., 2003; Ratnayake vd., 2001).

Baklagil un örnekleri ile buğday ununa ait ham lif ve toplam nişasta miktarları Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 2. Baklagil örneklerinin ham lif (g/100g) ve toplam nişasta miktarları (%)

Table 2. Crude fiber (g/100g) and total starch (%) contents of legume samples

Örnek Sample	Ham lif miktarı* Crude fiber content* (g/100g)	Toplam nişasta miktarı* Total starch content* (%)
Buğday Wheat	0.32 ± 0.01 ^a	62.80 ± 0.90 ^e
Nohut Chickpea	9.58 ± 0.04 ^e	45.10 ± 0.57 ^b
Mercimek (yeşil) Lentil, green	6.95 ± 0.07 ^c	46.50 ± 1.09 ^c
Mercimek (kırmızı) Lentil, red	6.57 ± 0.03 ^b	47.20 ± 0.09 ^d
Fasulye Bean	8.74 ± 0.02 ^d	39.60 ± 0.07 ^a
Bezelye Pea	11.2 ± 0.04 ^f	47.80 ± 1.03 ^d

*Kuru madde üzerinden verilmiştir.

Her bir sütunda aynı harf ile gösterilen değerler istatistiksel olarak önemli değildir (P < 0.05)

*As dry basis.

For each cultivar, means with the same letter within a column are not significantly different (P < 0.05)

Çizelge 2'deki veriler incelendiğinde ham lif miktarı bakımından baklagil unlarının (% 8.74-11.2) iyi birer kaynak olduğu gözlenirken, bu durum toplam nişasta miktarı bakımından tam tersi bir durum göstermektedir. Mohammed vd. (2012) tarafından nohut unu ilavesinin hamur reolojisi ve ekmek kalitesi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, buğday ununun nişasta içeriği (% 63.5) nohut ununun nişasta içeriğine (% 51.2) göre daha fazla bulunmuştur.

Baklagil un örneklerine ait fitik asit ve inositol fosfat alt fraksiyonları (IP₃-IP₆) ile toplam inositol fosfat miktarları Çizelge 3'te verilmiştir.

Baklagil unlarının toplam IP miktarları 5.95 mg/g KM (Mercimek^{yeşil}) ile 11.77 mg/g KM (Bezelye) değerleri arasında değişiklik göstermiştir. Analiz edilen baklagil unlarının fitik asit kompozisyonları

önceki çalışmalardan elde edilen değerler ile benzerlik göstermektedir (Diaz-Batalla vd., 2006; Graf ve Dintzis, 1982; Lehrfeld, 1989; Martin-Cabrejas vd., 2009; Pedrosa vd., 2012; Rubio vd., 2006; Trugo vd., 1999).

Çizelge verileri incelendiğinde, baklagil unlarının içerdiği toplam IP miktarının ortalama %74'ünü IP₆ (fitik asit) fraksiyonunun oluşturduğu görülmektedir. Bu değerler içerisinde en yüksek oran bezelye ununda %81 olarak bulunmuştur. Literatür verileri IP₃ – IP₆ fraksiyonları içerisinde sadece yüksek oranda fosforile olan IP₅ ve IP₆'nın minerallerin biyoyararlılıkları üzerinde olumsuz etkiye sahip olduğunu, diğerlerinin ise zayıf mineral bağlama kapasitesinde olduklarını belirtmektedir (Martin-Cabrejas vd., 2009; Pedrosa vd., 2012).

Çizelge 3. Baklagil un örneklerinin toplam fitik asit ve inositol fosfat (IP₃-IP₆) miktarları (mg/g, KM)
 Table 3. Total phytic acid and inositol phosphate (IP₃-IP₆) contents of whole legume flour samples (mg/g, DM)

Örnek Sample	IP ₃	IP ₄	IP ₅	IP ₆ *	Toplam IP Total IP
Nohut unu Chickpea flour	0.16±0.01 ^a	0.37±0.01 ^b	1.43±0.03 ^c	5.57±0.02 ^c	7.53±0.04 ^c
Mercimek unu (yeşil) Lentil flour, green	0.27±0.01 ^c	0.41±0.00 ^c	0.97±0.00 ^b	4.30±0.01 ^a	5.95±0.02 ^a
Mercimek unu (kırmızı) Lentil flour, red	0.20±0.00 ^b	0.45±0.02 ^d	0.88±0.01 ^a	5.20±0.00 ^b	6.73±0.00 ^b
Fasulye unu Bean flour	0.27±0.00 ^c	0.66±0.0 ^e	2.70±0.01 ^e	7.60±0.01 ^d	11.23±0.03 ^d
Bezelye unu Pea flour	0.16±0.02 ^a	0.23±0.00 ^a	1.82±0.00 ^d	9.56±0.01 ^e	11.77±0.00 ^d

*IP₆: Fitik asit

Her bir sütunda aynı harf ile gösterilen değerler istatistiksel olarak önemli değildir (P < 0.05)

*IP₆: Phytic acid

For each cultivar, means with the same letter within a column are not significantly different (P < 0.05)

Baklagil unlarının çözünmeyen (IDF), çözünen (SDF) ve toplam besinsel lif (TDF) değerleri Çizelge 4'de verilmiştir.

Çizelge 4. Baklagil unlarının çözünmez (IDF), çözünen (SDF) ve toplam besinsel lif (TDF) miktarları (%)
 Table 4. Insoluble (IDF), soluble (SDF) and total dietary fiber (TDF) contents of whole legume flours (%)

Örnek Sample	IDF* (%)	SDF* (%)	TDF (%)	IDF/SDF
Buğday unu Wheat flour	0.55±0.25 ^a	0.17±0.15 ^a	0.72 ^a	3.20 ^a
Nohut unu Chickpea flour	13.50±0.19 ^b	0.70±0.22 ^b	14.20 ^b	19.30 ^c
Mercimek unu (yeşil) Lentil flour, green	19.30±0.11 ^c	1.10±0.10 ^c	20.40 ^c	17.60 ^d
Mercimek unu (kırmızı) Lentil flour, red	20.40±0.52 ^d	1.90±0.17 ^d	22.30 ^d	10.70 ^c
Fasulye unu Bean flour	19.70±0.18 ^c	3.70±0.23 ^e	23.40 ^e	5.30 ^b
Bezelye unu Pea flour	22.30±0.40 ^e	2.10±0.28 ^d	24.40 ^f	10.60 ^c

*IDF: Suda çözünmeyen besinsel lif, SDF: Suda çözünen besinsel lif, TDF: Toplam besinsel lif

*KM üzerinden verilmiştir.

Her bir sütunda aynı harf ile gösterilen değerler istatistiksel olarak önemli değildir (P < 0.05)

IDF: Insoluble Dietary Fiber, SDF: Soluble Dietary Fiber, TDF: Total Dietary Fiber

**As dry basis

For each cultivar, means with the same letter within a column are not significantly different (P < 0.05)

Baklagil unlarının TDF değerleri en düşük nohut ununda %14.2 ile, en yüksek bezelye ununda %24.4 olarak tespit edilmiştir. Baklagil unlarının TDF değerleri buğday ununda belirlenen TDF miktarı (%0.72) ile kıyaslandığında baklagillerin besinsel lif miktarı açısından zengin birer kaynak

oldukları ortaya çıkmaktadır. Baklagil unlarının IDF değerleri %13.5 – 22.3 değerleri arasında değişirken, SDF değerleri ise %0.7 ile % 3.7 arasında değişmektedir. Bu değerler önceki çalışma verileri ile benzerlik göstermektedir (Costa vd., 2006).

Diğer gıda maddelerinde olduğu gibi baklagil unlarında da TDF miktarı içerisinde en büyük oranı IDF fraksiyonu oluşturmaktadır. Çizelge 4 verileri incelendiğinde TDF miktarı içerisindeki IDF yüzdesinin %84 ile %96 değerleri arasında değiştiği gözlenmektedir. Bednar vd. (2001) baklagil bileşimlerini analiz ettikleri çalışmalarında farklı fasulye ve mercimek çeşitleri için IDF/TDF oranlarını sırasıyla %92-100 ile %99.7 olarak belirtmişlerdir. Araştırmacılar geriye kalan % 0.0-3.2' lik oranı ise çözünür özellikteki besinsel liflerin oluşturduğunu ifade etmektedir. Benzer şekilde Li vd. (2002) tarafından yürütülen bir diğer araştırmada ise baklagillerin SDF miktarlarının IDF değerlerinin altında olduğu tespit edildiği ifade edilmiştir.

Baklagil un örnekleri için hesaplanan IDF/SDF oranları hem baklagillerin fonksiyonel özellikleri açısından hem de baklagil unlarının gıda formülasyonlarında bir gıda bileşeni olarak kullanılabilme potansiyelleri açısından oldukça önemli indikatörlerdir. Ayrıca bu oran yapısal ve duyuşal özellikler açısından da oldukça önemli bir kriter olarak belirtilmektedir (Martin-Cabrejas vd., 2004).

Reolojik Özellikler

Baklagil unlarının hamur reolojik özellikleri üzerindeki etkilerini görmek amacıyla buğday ununa % 10, 15 ve 20 oranlarında baklagil unu ilavesi yapılmış ve temel reolojik parametrelerin değişimi belirlenmiştir. Buna göre buğday ununa farklı baklagil unlarının değişen oranlarda ilave edilmesiyle elde edilen hamur yoğurma özelliklerine ait değerler Çizelge 5'te verilmiştir.

Çizelge 5'te buğday ununa farklı oranlarda (%10, 15 ve 20) baklagil unları ilave edilmesiyle oluşan karışımların farinogram özellikleri incelendiğinde tüm baklagil çeşitleri için katıldıkları orana bağlı olarak farinografa unun su absorpsiyonunu önemli derecede arttırdıkları ve bu artışın en çok bezelye unu ilave edilen karışımda (%20 katma oranında %75.2 su absorpsiyonu) olduğu görülmüştür. Baklagil unlarının TDF değerleri incelendiğinde en fazla besinsel lif içeriğine sahip olan bezelye ununun su absorpsiyonunu en fazla arttıran çeşit olması beklenen bir sonuçtur. Artan

baklagil ilavesine bağlı olarak hamurun su absorpsiyon oranlarında meydana gelen artışlar önceki çalışmalar ile uygunluk göstermektedir (Dodok vd., 1993; Kohajdová vd., 2013; Mohammed vd., 2012; Sadowska vd., 2003; Shahzadi vd., 2005). Artan baklagil oranlarının su absorpsiyonunu arttırıcı etkisi artan protein miktarı ile ilişkilendirilmektedir. Toplam bileşenler içerisinde artan protein miktarı yüksek su bağlama kapasitesine sahip olan pentozanların (özellikle riboz ve deoksiriboz) miktarının artması ile sonuçlanmaktadır (Shahzadi vd., 2005).

Bileşenlerin karıştırılması aşamasında komponentlerin su ile hidratlanarak hamur gelişiminin sağlandığı süreç üzerine baklagil unlarının etkisi katıldıkları oranlardaki artış ile orantılı olarak arttırıcı yönde olmuştur. Hamur gelişme süresinde en önemli ve fazla artışı %20' lik ilave oranında kırmızı mercimek unu sağlarken (6.6 dk) bunu azalan bir sırayla nohut (6.0 dk), yeşil mercimek (5.9 dk), fasulye (3.7 dk) ve bezelye (3.6 dk) unları takip etmiştir. Baklagil unlarının hamur gelişme süresini arttırmasının nedeni; büyük bir olasılıkla bileşenlerin hidrasyon hızını ve hamurdaki buğday proteini olmayan proteinler ile gluten arasındaki etkileşimin hamur gelişmesini etkilemesinden kaynaklandığı ifade edilmektedir (Chen vd., 1988; Kohajdová vd., 2013; Sudha vd., 2007). Elde edilen bulgular önceki çalışmalar ile uygunluk göstermektedir (Dodok vd., 1993; Kohajdová vd., 2013; Mohammed vd., 2012; Sadowska vd., 2003; Shahzadi vd., 2005).

Hamur kuvvetinin bir göstergesi olan hamur stabilite değerinin artan oranları daha güçlü bir hamuru işaret etmektedir (Mohammed vd., 2012). Çizelge 5 verileri incelendiğinde buğday ununa %10 katma oranında kırmızı mercimek ve nohut unlarının hamur stabilite değerini arttırıcı (sırasıyla 7.1 dk ve 8.7 dk), artan katma oranlarında ise azaltıcı yönde etki ettiği görülmektedir. Diğer baklagil çeşitlerinde ise artan baklagil unu ilavesi stabilite değerini azaltıcı yönde olmuştur. Bu örneklerin stabilite değeri üzerindeki arttırıcı etkilerinin unun gluten özelliklerini iyileştirmesinden ziyade hamurdaki suyu yoğurma sırasında daha uzun süre tutmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Stabilite değerini azaltıcı etki ise

buğday gluten miktarının azalması ile ilişkilendirilmektedir (Shahzadi vd., 2005). Genel olarak buğday-baklagil un karışımlarında hamur gelişme süresindeki artış ve beraberindeki stabilite değerindeki azalma yoğurma sürecinde gluten ağ yapısının zayıflamasının bir göstergesi olarak ifade

edilmektedir (Mohammed vd., 2012). Baklagil unu ilavesinin hamur stabilitesi üzerinde önce artırıcı daha sonra azaltıcı etkisi Shahzadi vd. (2005) ile Abdel-Kader (2000) tarafından yapılan çalışma sonuçları ile uygunluk göstermektedir.

Çizelge 5. Baklagil - buğday unu karışımlarının farinogram karakteristikleri
Table 5. Farinogram characteristics of whole legume and wheat flour mixtures

Buğday – baklagil un karışımı <i>Wheat – legume flour mixture</i>		Su absorpsiyonu <i>Water absorption</i> (%)	Gelişme süresi <i>Development time</i> (dk, min)	Stabilite <i>Stability</i> (dk, min)	Yumuşama derecesi <i>Softening degree</i> (BU*)
Buğday unu <i>Wheat flour</i> (%)	Nohut unu <i>Chickpea flour</i> (%)				
100	0	63.20 ± 0.13 ^a	2.00 ± 0.18 ^a	6.20 ± 1.05 ^c	46 ± 0.35 ^a
90	10	64.40 ± 0.58 ^b	4.70 ± 1.10 ^b	8.70 ± 0.32 ^d	52 ± 0.26 ^b
85	15	64.60 ± 0.02 ^b	5.40 ± 0.26 ^c	5.20 ± 0.08 ^b	58 ± 1.17 ^c
80	20	67.30 ± 1.03 ^c	6.00 ± 0.10 ^d	4.70 ± 0.12 ^a	66 ± 1.25 ^d
Buğday unu <i>Wheat flour</i> (%)	Mercimek unu, yeşil <i>Lentil flour, green</i> (%)				
100	0	63.20 ± 0.13 ^a	2.00 ± 0.18 ^a	6.20 ± 1.05 ^c	46 ± 0.35 ^c
90	10	64.50 ± 0.34 ^b	2.40 ± 0.17 ^a	6.10 ± 0.16 ^c	30 ± 0.61 ^a
85	15	65.70 ± 0.41 ^c	4.10 ± 0.17 ^b	4.40 ± 0.03 ^b	34 ± 1.24 ^b
80	20	70.20 ± 1.17 ^d	5.90 ± 0.26 ^c	3.80 ± 0.20 ^a	42 ± 0.16 ^c
Buğday unu <i>Wheat flour</i> (%)	Mercimek unu, Kırmızı <i>Lentil flour, red</i> (%)				
100	0	63.20 ± 0.13 ^a	2.00 ± 0.18 ^a	6.20 ± 1.05 ^c	46 ± 0.35 ^d
90	10	66.10 ± 0.11 ^b	5.30 ± 0.23 ^b	7.10 ± 1.07 ^d	28 ± 0.16 ^a
85	15	67.70 ± 0.26 ^c	5.70 ± 0.28 ^b	5.90 ± 0.58 ^b	36 ± 0.12 ^b
80	20	74.90 ± 0.21 ^d	6.60 ± 0.12 ^c	4.90 ± 0.31 ^a	40 ± 0.42 ^c
Buğday unu <i>Wheat flour</i> (%)	Fasulye unu <i>Bean flour</i> (%)				
100	0	63.20 ± 0.13 ^a	2.00 ± 0.18 ^a	6.20 ± 1.05 ^d	46 ± 0.35 ^a
90	10	67.20 ± 0.17 ^b	2.60 ± 0.01 ^b	4.90 ± 0.09 ^c	48 ± 1.60 ^a
85	15	67.90 ± 0.19 ^{bc}	3.10 ± 0.02 ^c	3.20 ± 0.12 ^b	54 ± 1.24 ^b
80	20	68.30 ± 0.26 ^c	3.70 ± 1.02 ^d	2.30 ± 0.43 ^a	60 ± 0.87 ^c
Buğday unu <i>Wheat flour</i> (%)	Bezelye unu <i>Pea flour</i> (%)				
100	0	63.20 ± 0.13 ^a	2.00 ± 0.18 ^a	6.20 ± 1.05 ^d	46 ± 0.35 ^a
90	10	66.70 ± 0.31 ^b	2.20 ± 1.29 ^{ab}	4.20 ± 0.43 ^c	60 ± 0.33 ^b
85	15	68.00 ± 0.12 ^c	2.40 ± 0.03 ^b	2.40 ± 0.23 ^b	88 ± 1.12 ^c
80	20	75.20 ± 0.44 ^d	3.60 ± 0.01 ^c	2.00 ± 0.21 ^a	125 ± 1.17 ^d

*BU: Brabender ünitesi

Her bir sütunda aynı harf ile gösterilen değerler istatistiksel olarak önemli değildir (P < 0.05)

*BU: Brabender unit

For each cultivar, means with the same letter within a column are not significantly different (P < 0.05)

Buğday-baklagil un karışımlarının farinogramlarında yumuşama derecesi değerleri kırmızı ve yeşil mercimek ilaveli örnekler haricinde artan katma oranına bağlı olarak giderek artmıştır. Börülce ve nohut unu ilave edilerek yapılan önceki çalışmalarda da benzer sonuçlar gözlenmiştir (Fernandez ve Berry, 1989; Mustafa vd., 1986; Sharma vd., 1999). Kırmızı ve yeşil mercimek ununun % 20 ilavesi hamurun yumuşama değerini şahit örneklerin altına düşürmüştür.

Çizelge 6. Baklagil unlarının çirşlenme özellikleri

Table 6. Pasting properties of whole legume flours

Baklagil unu <i>Whole legume flour</i>	Çirşlenme Sıcaklığı <i>Pasting temperature</i> (°C)	Pik viskozitesi <i>Peak viscosity</i> (RVU)	İncelme sonrası viskozite <i>Breakdown</i> <i>viscosity</i> (RVU)	Son viskozite <i>Final viscosity</i> (RVU)
Nohut unu <i>Chickpea flour</i>	63.70 ± 0.4 ^a	94.30 ± 1.6 ^a	89.90 ± 5.7 ^a	112.50 ± 3.1 ^a
Mercimek unu (yeşil) <i>Lentil flour, green</i>	75.40 ± 1.2 ^c	132.30 ± 0.9 ^d	129.70 ± 4.2 ^c	230.10 ± 1.5 ^c
Mercimek unu (kırmızı) <i>Lentil flour, red</i>	75.20 ± 0.3 ^c	128.80 ± 0.2 ^c	121.20 ± 1.4 ^b	228.00 ± 2.0 ^d
Fasulye unu <i>Bean flour</i>	78.60 ± 0.6 ^d	149.20 ± 0.6 ^e	121.30 ± 0.7 ^b	204.30 ± 1.9 ^c
Bezelye unu <i>Pea flour</i>	69.80 ± 0.3 ^b	101.20 ± 0.7 ^b	92.00 ± 0.6 ^a	143.50 ± 0.9 ^b

Her bir sütunda aynı harf ile gösterilen değerler istatistiksel olarak önemli değildir (P < 0.05)

For each cultivar, means with the same letter within a column are not significantly different (P < 0.05)

Farklı baklagil unlarının jelatinizasyon sıcaklıkları 63.7 °C ile 78.6 °C arasında değişmiştir. Bu değerler arasında en yüksek jelatinizasyon sıcaklığı fasulye ununda, en düşük ise nohut ununda elde edilmiştir. Fasulye ununda elde edilen yüksek jelatinizasyon sıcaklığı fasulye nişastasının şişme ve bozulmaya karşı oldukça dayanıklı olduğunu göstermektedir. Baklagil unu örneklerinin pik viskozite değerleri ise minimum 94.3 RVU ile nohut ununda, maksimum 149.2 RVU ile fasulye ununda belirlenmiştir. Bütün örneklerde sıcaklık arttıkça viskozite değerlerinde de doğrusal bir artış gözlenmiştir. Baklagil unlarının final viskozite değerleri 112.5 RVU ile 230.1 RVU değerleri arasında değişmiştir.

Analiz edilen tüm baklagil un örnekleri içerisinde, nohut ununun en düşük jelatinizasyon sıcaklığı (63.7 °C), pik viskozitesi (94.3 RVU), breakdown (89.9 RVU), ve final viskozite (112.5 RVU)

Çirşlenme özellikleri

Baklagil unlarında nişastanın karakterizasyonu mikro viskoanalizör (RVA: Rapid Visco Analyser Newport Scientific, Warriewood, Australia) cihazı ile incelenmiş elde edilen sonuçlar (jelatinizasyon sıcaklığı, pik viskozitesi, breakdown ve son viskozite) Çizelge 6'da verilmiştir.

değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Bu durum, nohut ununun diğerlerine kıyasla daha kolay çirşlendiğinin, kayma kuvvetine karşı daha az dayanıklı olduğunun ve daha zor retrograde olma eğiliminde olduğunun göstergesi olarak yorumlanmaktadır. Belirtilen bu özellikler ise nohutun yüksek yağ içeriği ile ilişkilendirilmektedir (Bkz. Çizelge 1). Yüksek yağ içeriği yüksek su absorbe etme özelliği ile nişastanın şişmesini sınırlandırarak nişasta molekülleri arasındaki etkileşimleri inhibe etmektedir. Böylece nişastanın çirşlenme viskozitesini etkilemektedir. Yüksek yağ içeriği ayrıca nişastanın moleküler zincirlerinin doğrusal dizilimini de engellemek yoluyla retrograde olma eğilimini azaltmaktadır. Retrogradasyona eğilimin azaltılması ise çorba ve sos gibi gıdaların üretiminde önemli bir avantaj olarak görülmektedir (Chung vd., 2008; Du vd., 2014).

SONUÇ

Baklagil unlarının besleyici özelliklerinin belirlenerek gıda formülasyonlarında zenginleştirici bir bileşen olarak kullanıma olanaklarının araştırıldığı bu çalışmada, baklagil unlarının kimyasal, fonksiyonel ve çirilenme özellikleri tespit edildikten sonra buğday ununa farklı oranlarda (%10, 15 ve 20) katılarak bunların reolojik etkileri araştırılmıştır.

Çalışma sonuçlarına göre materyal olarak kullanılan baklagillerin ucuz ve kaliteli protein kaynakları olmalarının yanı sıra toplam, çözünen ve çözünmeyen diyet lif bakımından zengin bir bileşime sahip oldukları anlaşılmıştır. Baklagillerin zengin besleyici kompozisyonları onların ekmek başta olmak üzere çeşitli fırın ürünlerinin bileşiminde başarılı bir şekilde kullanım olanaklarını arttırmaktadır.

Buğday ununa değişik baklagil unlarının farklı oranlarda katılması, elde edilen hamurların su absorpsiyonunu ve gelişme süresini arttırmak yoluyla Farinogram parametrelerini önemli oranda değişikliğe uğratmıştır. Farinogram parametreleri incelendiğinde, artan baklagil unu ilavesinin hamur kuvvetinin bir göstergesi olan stabilite değerini azaltıcı etkilerinin bir sonucu olarak baklagil unlarının maksimum % 15 oranında buğday ununa katılmasının reolojik özellikler bakımından optimum olduğu sonucuna varılmaktadır.

Teşekkür: Bu çalışma Hitit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından MUH19001.14.002 numaralı proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

A.A.C.C. (2002) *Approved Methods of American Association of Cereal Chemists*. The Association: St. Paul, MN.

A.O.A.C. (2012) *Official Methods of Analysis*. 17th ed., Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA.

Abdel-Kader, Z.M. (2000). Enrichment of Egyptian 'Balady' Bread. Part 1. Baking studies, physical and sensory evaluation of enrichment with decorticated cracked broad beans flour (*Vicia faba* L.). *Nahrung*, 44:418-21.

Bednar, G.E., Patil, A.R., Murray, S.M., Grieshop, C.M., Merchen, N.R., Fahey, G.C.Jr., 2001. Starch and fiber fractions in selected food and feed ingredients affect their small intestinal digestibility and fermentability and their large bowel fermentability in vitro in a canine model. *J of Nutr.*, 131, 276-286.

Chen, H., Rubenthaler, G.L., Leung, H.K. and Baranowski, J.D. (1988). Chemical,

physical and baking properties of apple fiber compared with wheat and oat bran. *Cereal Chem.*, 65(3): 244-247.

Chung, H.J., Liu, Q., Hoover, R., Warkentin, T.D., Vandenberg, B. (2008). In vitro starch digestibility, expected glycemic index, and thermal and pasting properties of flours from pea, lentil and chickpea cultivars. *Food Chem.*, 111: 316-321.

Costa, G. E. A., Queiroz-Monici, K. S., Reis, S. M. P. M., Oliveira, A. C. (2006). Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food Chem.*, 94: 327 – 330.

Dhingra, S., Jood, S. (2001). Organoleptic and nutritional evaluation of wheat breads supplemented with soybean and barley flour. *Food Chem.*, 77: 479 – 488.

Díaz-Batalla, L., Widholm, J.M., Fahey, G.C., Castaño-Tostado, E., Paredes-López, O. (2006). Chemical components with health implications in wild and cultivated Mexican common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *J of Agric. and Food Chem.*, 54: 2045-2052.

Dodok, L., Modhir, A.A., Hozova, B., Halasova, G., Polacek, I. (1993). Importance and utilization of chickpea in cereal technology. *Acta Alimentaria*, 22: 119-129.

Du, S., Jiang, H., Yu, X., Jane, J. (2014). Physicochemical and functional properties of whole legume flour. *LWT – Food Sci. and Technol*, 55: 308-313.

Eggum, B. O., Beame, R. M. (1983). The nutritive value of seed proteins. In W. Gottschalk & P. H. Muller (Eds.), *Seed protein biochemistry, genetics and nutritive value*, p. 499 – 531.

- Fernandez, M.L., Berry, J.W. (1989). Rheological properties of flour and sensory characteristics of bread made from germinated chickpea. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 24:103-110.
- Gómez, M., Oliete, B., Rosell, C. M., Pando, V., Fernández, E. (2008). Studies on cake quality made of wheat – chickpea flour blends. *LWT – Food Sci. and Technol.*, 41: 1701 – 1709.
- Graf, E., Dintzis, F.R. (1982). Determination of phytic acid in foods by high-performance liquid chromatography. *J of Agric. Food Chem.*, 30: 1094-1097.
- Hera, E., Ruiz-Paris, E., Oliete, B., Gomez, M. (2012). Studies of the quality of cakes made with wheat-lentil composite flours. *LWT – Food Sci. and Technol.*, 49: 48 – 54.
- Iqbal, A., Khalil, I. A., Ateeq, N., Khan, M. S. (2006). Nutritional quality of important food legumes. *Food Chem.*, 97: 331 – 335.
- Kohajdová, Z., Karovičová, J., Magala, M. (2013).effect of lentil and bean flours on rheological and baking properties of wheat dough. *Chemical Papers*, 67(4): 398-407.
- Kutoš, T., Golob, T., Kač, M., Plestenjak, A. (2003). Dietary fibre content of dry and processed beans. *Food Chem.*, 80(2): 231-235.
- Lehrfeld, J. (1989). High-Performance liquid chromatography analysis of phytic acid on a pH-stable, macroporous polymer column. *Cereal Chem.*, 66(6): 510-515.
- Li, B.W., Andrews, K.W., Pehrsson, P.R. (2002). Individual sugars, soluble, and insoluble dietary fiber contents of 70 high consumption foods. *J of Food Comp. and Analysis*, 15: 715-723.
- Livingstone, A. S., Feng, J. J., Malleshi, N. G. (1993). Development and nutritional quality evaluation of weaning foods based on malted, popped and dried wheat and chickpea. *Int. J of Food Sci. and Technol.*, 28: 35 – 43.
- Martín-Cabrejas, M.A., Aguilera, Y., Pedrosa, M.M., Cuadrado, C., Hernández, T., Díaz, S., Esteban, R.M. (2009). The impact of dehydration process on antinutrients and protein digestibility of some legume flours. *Food Chem.*, 114: 1063-1068.
- Martin-Cabrejas, M. A., Sanfiz, B., Vidal, A., Molla, E., Esteban, R. M., & Lopez-Andreu, F. J. (2004). Effect of fermentation and autoclaving on dietary fiber fractions and antinutritional factors of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J of Agric. and Food Chem.*, 52: 261–266.
- Mohammed, I., Ahmed, A. R., Senge, B. (2012). Dough rheology and bread quality of wheat – chickpea flour blends. *Industrial Crops and Products*, 36: 196 – 202.
- Mustafa, A.L., Al-Wessali, M.S., Al-Basha, O.M., Al-Amir, R.H. (1986). Utilization of cowpea flour and protein isolate in bakery products. *Cereal Foods World* 31: 756-759.
- Pedrosa, M.M., Cuadrado, C., Burbano, C., Allaf, K., Haddad, J., Gelencsér, E., Takács, K., Guillaumon, E., Muzquiz, M. (2012). Effect of instant controlled pressure drop on the oligosaccharides, inositol phosphates, trypsin inhibitors and lectins contents of different legumes. *Food Chem.*, 131: 862-868.
- Ratnayake, W.S., Hoover, R., Shahid, F., Perera, C., Jane, J. (2001). Composition, molecular structure, and physicochemical properties of starches from four field peas (*Pisum sativum*) L. cultivars. *Food Chem.*, 74: 189-202.
- Rubio, L.R., Pedrosa, M.M., Cuadrado, C., Gelencser, E., Clemente, A., Burbano, C. (2006). Recovery at the terminal ileum of some legume non-nutritional factors in cannulated pigs. *J of the Sci. of Food and Agric.*, 86: 979-987.
- Sadowska, J., Blaszczyk, W., Fornal, J., Vidal-Valverde, C., Frias, J. (2003). Changes of wheat dough and bread quality and structure as a result of germinated pea flour addition. *Eur Food Res Technol*, 216: 46-50.
- Shahzadi, N., Butt, M.S., Rehman, S., Sharif, K. (2005). Rheological and baking performance of composite flours. *Int. J of Agricultura & Biology*, 7(1): 100-104.
- Sharma, S., Bajwa, U.H., Nagi, H.P.S. (1999). Rheological and baking properties of cowpea and wheat flour blends. *J. Sci. Food Agric.* 79: 657-662.

Sudha, M.L., Baskaran, V. and Leelavathi, K. (2007). Apple pomace as a source of dietary fibre and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making. *Food Chem.*, 104(2): 686-692.

Tharanathan, R. N., Mahadevamma, S. (2003). Grain legumes – a boon to human nutrition. *Trends in Food Sci. and Technol.*, 14: 507 – 518.

Trugo, L.C., Muzquiz, M., Ayet, G., Burbano, C., Cuadrado, C., Cavieres, C. (1999). Influence of malting on selected components of soya bean, black bean, chickpea and barley. *Food Chem.*, 65: 85-90.

Wood, J. A. (2009). Texture, processing and organoleptic properties of chickpea-fortified spaghetti with insights to the underlying mechanisms of traditional durum pasta quality. *J of Cereal Sci.*, 49: 128 – 133.

Zucco, F., Borsuk, Y., Arntfield, S. D. (2011). Physical and nutritional evaluation of wheat cookies supplemented with pulse flours of different particle sizes. *LWT – Food Sci. and Technol.*, 44: 2070 – 2076.

ALKOLLÜ İÇKİLERİN KALİTE KONTROLÜNDE KULLANILAN FARKLI ALKOL TAYİN METOTLARININ KARŞILAŞTIRILMASI VE NIR (YAKIN KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ) METODUNUN VALİDASYONU*

Merve Darıcı, Turgut Cabaroğlu**

Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Adana, Türkiye

Geliş / *Received*: 18.08.2017; Kabul / *Accepted*: 04.12.2017; Online baskı / *Published online*: 27.12.2017

Darıcı, M., Cabaroğlu, T. (2018). Alkollü içkilerin kalite kontrolünde kullanılan farklı alkol tayin metotlarının karşılaştırılması ve NIR (yakın kızılötesi spektroskopisi) metodunun validasyonu. *GIDA* (2018) 43 (1): 90-100 doi: 10.15237/gida.GD17083

ÖZ

Etil alkol miktarı alkollü içki endüstrisinde üreticinin kaliteyi standardize etmesi, mevzuat denetimi, ürün sınıf denetiminin yapılması, içki kategorilerinin belirlenmesi ve yasal vergi düzenlemesi açısından bilinmesi zorunlu bir parametredir. Bu çalışmada alkol miktarının tayininde referans metot olan piknometrik metot, sektörde yaygın kullanımı olan dansimetrik metot ve pratik bir metot olan NIR spektroskopisi metotları ele alınmıştır. Şarap ve rakı olmak üzere iki farklı alkollü içki matrisinde üç metodun validasyon çalışması yapılmıştır. Validasyon verileri karşılaştırılarak NIR spektroskopisinin performansı değerlendirilmiştir. Tekrarlanabilirlik (%RSD_r) değeri; NIR metodunda şarap ve rakı numunesinde %0.05 olarak, piknometrik metotta şarap için %0.31 ve rakı için %0.14 olarak, dansimetrik metot da ise şarap için %0.72 ve rakı için %0.44 olarak belirlenmiştir. NIR metodunda geri kazanım, iki farklı alkol konsantrasyonunda %98 olarak tespit edilmiştir. Rakı ve şarap numunelerinde farklı metotlarla belirlenen alkol miktarı arasında istatistiksel açıdan farklılık belirlenmemiştir. Kesinlik parametreleri karşılaştırıldığında NIR metodunun piknometrik ve dansimetrik metoda göre daha güvenilir olduğu belirlenmiştir. **Anahtar kelimeler:** NIR spektroskopisi, etil alkol analizi, piknometre, dansimetre, metot validasyonu, ölçüm belirsizliği

VALIDATION OF NIR (NEAR-INFRARED SPECTROSCOPY) METHOD FOR ALCOHOLIC STRENGTH MEASUREMENT IN ALCOHOLIC BEVERAGES: COMPARISON OF DIFFERENT METHODS

ABSTRACT

Alcohol content is an obligatory parameter in the production of alcoholic beverages for both the need of a constant quality in alcoholic beverages industry and from the point of view of legislative and taxation regulations. In this research, pycnometric method as the reference method, electronic densimetry method and NIR methods have been studied for the measurement of the alcohol strength. Wine and raki as the matrix of two different alcoholic beverages are evaluated with single-laboratory validation using these methods. Performance of NIR spectroscopy was evaluated with comparing validation parameters of other methods. The repeatability (%RSD_r) of NIR method is %0.05 in both matrices, RSD_r of pycnometric method is %0.31 for wine and is %0.14 for raki, RSD_r of densimetric method is %0.72 for wine and is %0.44 for raki have been determined for alcoholic strength. Recovery for NIR method in two different alcoholic solutions is %98. There are no significant differences among the alcoholic strengths depending on different methods in samples of raki and wine. Among the methods, NIR method is more reliable depending on precision parameters.

Keywords: NIR spectroscopy, alcoholic strength, pycnometer, densimetry, method validation, measurement uncertainty

* Bu makalenin özeti (poster) 40. Dünya Bağ ve Şarap Kongresi'nde yayınlanmıştır. *Abstract of this article (poster) are published in 40th World Congress of Vine and Wine.*

** Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ tcabar@cu.edu.tr,

☎ (+90) 322 338 6173/2172,

☎ (+90) 322 338 6614

GİRİŞ

Laboratuvar analizlerinde metot validasyonu, bir metodun ilgili performans kriterlerine uygunluğunun tespiti için metot parametrelerinin belirlenip incelendiği bir geçerlilik çalışmasıdır (Magnusson ve Örnemark, 2014; Yılmaz, 2013). Valide edilmiş yöntemle çalışıldığında yapılan işlemin kesin, doğru, spesifik, tutarlı, geçerli ve güvenilir olduğu garanti edilmiş olur. Metot validasyonunda bir ölçüm prosedürünün belirlenen amaçlara uygunluğu objektif olarak test edilerek yazılı delillerle kanıtlanır (Magnusson ve Örnemark, 2014; Yılmaz, 2013). Metot validasyonunun amacı, seçilen metodun istenen amaca uygun nitelikte (performansta, kalitede) sonuç verdiğini test etmek ve metodun rutin kullanımı sırasında istenen performansı sağlamanın koşullarını belirlemek ve kontrol altında tutmaktır. Kimyasal analizlerde analiz metodunun uygulama performansı birçok faktöre bağlıdır. Bu nedenle ölçüm metodunun çok iyi tanımlanması gerekmektedir (Magnusson ve Örnemark, 2014). Aynı analiz için birçok farklı metot bulunabilir. Belli bir analiz için çok değişik metotlardan hangisinin kullanılacağı, analiz edilen örnek cinsine, analiz edilecek bileşenlerin miktarına, günlük yapılacak analiz sayısına, istenen sonucun kalitesine, metodun uygulama kolaylığına, analiz süresine ve analiz maliyetine bağlı olarak yapılacak değerlendirme sonucunda belirlenmelidir.

Alkollü içkilerde alkol miktarı, damıtma sonucu elde edilen alkollü sıvının, piknometre ile bulunan yoğunluğundan özel çizelgeler yardımıyla % hacim (h/h) olarak hesaplanır (Anonymous, 2013; Anonymous, 2000a). Alkol miktarı hem alkollü içki endüstrisinde üreticinin kaliteyi standardize etmesi, mevzuat denetimi, ürün sınıf denetiminin yapılması, içki kategorilerinin belirlenmesi açısından hem de yasal vergi düzenlemesi açısından bilinmesi zorunlu bir parametredir. Piknometrik, gaz kromatografisi (GC), sıvı kromatografisi (HPLC), elektronik dansimetre ve NIR gibi yöntemler alkol tayininde kullanılan yaygın yöntemlerdir (Ergutay ve Başlar, 2011).

Ulusal ve uluslararası düzeyde alkollü içkilerde alkol tayininde kullanılan referans yöntem

piknometrik yöntemdir (Anonymous, 2014b). Bu yöntemle beraber gerek denetim gerekse işletmelerde kalite kontrolünde yaygın olarak dansimetrik yöntem de kullanılır. Proses sürecinde daha çok dansimetrik yöntem tercih edilir. Son yıllarda alkol tayininde büyük avantajlar sağlayan NIR metoduyla alkol tayini de geliştirilmiştir.

NIR spektroskopisi 780-2500 nm dalga boyu aralığında atomlar arasındaki bağları analiz ederek molekülleri tanımlamaya yarayan bir tekniktir. Her kimyasal bağ kendine has bir frekansta titreşir. Bir moleküldeki bir grup atom (örneğin CH₂) bağların esneme ve bükülme hareketlerinden dolayı birden fazla titreşim moduna sahip olabilir. Eğer bir titreşim molekülün dipol momentinde değişime yol açarsa molekül aynı frekansa sahip bir foton soğurur. NIR spektroskopisi moleküller arası titreşimsel enerji değişimini kullanarak düşük enerjili hv fotonların absorpsiyonuna dayanan bir analizdir (Anonymous, 2014a; Anonymous, 2017). Bu teknik, belirli dalga boyu aralığında numunedeki O-H, C-H ve N-H gibi moleküllerin titreşimindeki değişimin absorpsiyonunu gerçekleştirebilmektedir (Ergutay ve Başlar, 2011). Etil alkol molekülünün böyle bir özelliği mevcuttur (Anonymous, 2014a). Dedektör tarafından okunan absorpsiyon, numunenin hacmen alkol miktarını belirlemek için kullanılır. Alkollü içkilerde etil alkolün 1150-1200 nm dalga boyları arasında spesifik absorpsiyon göstermesi alkol miktarının belirlenmesini mümkün kılar. Bu aralıkta herhangi başka bir bileşik etkileşim yapmaz (Anonymous, 2014a). Alkol miktarının hesaplanması basit bir algoritma ile yapılır. Ölçüm bira için % 2-12 h/h, şarap için % 6-30 h/h ve distile alkollü içki için % 35-65 h/h olmak üzere üç skala üzerinden belirlenir (Anonymous, 2014a). NIR yönteminin en önemli avantajı çok hızlı sonuç vermesi, kullanımının kolay olması, kimyasal sarfiyat ve atığın olmaması ve kullanım maliyetinin ucuz olmasıdır. En önemli dezavantajı ise ilk yatırım maliyetinin yüksek olmasıdır (Ergutay ve Başlar, 2011).

Ülkemizde üretilen alkollü içkiler içerisinde rakı ve şarap önemli bir yer teşkil etmektedir. Bunlardan

rakı yalnızca suma veya tarımsal kökenli etil alkol ile karıştırılmış sumanın, bakır imbiklerde, anason tohumu ile distile edilmesiyle üretilen, hacmen en az %40 etil alkol içeren distile alkollü bir içkidir (Anonymous, 2017). Türkiye'nin coğrafi işaretli bir ürünü olan rakı, ülkemizde en çok üretilen ve tüketilen distile alkollü içkidir ve ülke ekonomisinde alkollü içkiler kategorisinde önemli yer tutar (Anonymous, 2009a). Şarap ise, Parçalanmış veya parçalanmamış yaş üzümün veya üzüm sırasının, kısmen veya tamamen alkol fermantasyonuna bırakılması ile elde edilen, coğrafi işaret ya da köken ismi tescilli yapılmış ya da yapılmamış ve hacmen en az %9 etil alkol içeren bir içkidir (Anonymous, 2009b).

Bu çalışmanın amacı, alkollü içkilerde temel bir analiz olan, etil alkol tayininde kullanılan piknometrik, dansimetrik ve NIR metotlarını şarap ve distile içki kategorilerinde valide etmek ve bu üç metodu karşılaştırarak NIR metodunun geçerli, güvenilir bir metot olup olmadığını belirlemektir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

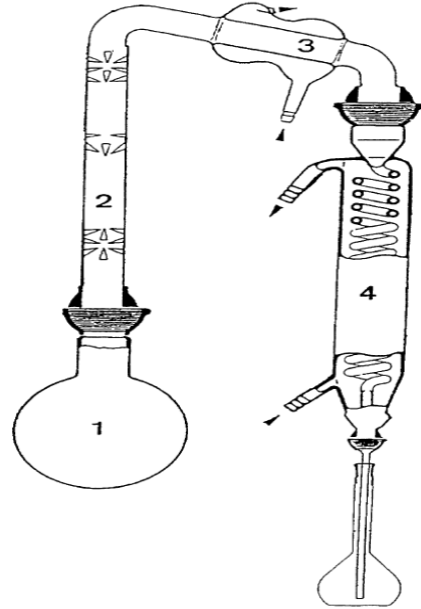
Araştırmada materyal olarak distile alkollü içki kategorisini temsilen rakı, şarap kategorisini temsilen kırmızı sek şarap seçilmiştir. Ticari bir alkollü içki işletmesinden temin edilen yaş üzüm rakısından 10 şişe, piyasadan temin edilen Elazığ yöresi Öküzgözü şarabından 10 şişe numune kullanılmıştır. Analizden önce numuneler 5 °C'deki dolaplarda ağzı kapalı şekilde tutulmuştur.

Etil Alkol Analizleri

Alkollü içkilerde kurumadde, piknometrik ve dansimetrik analizlerde, alkol miktarında sapmaya neden olduğu için analizlerden önce örneklere damıtma işlemi uygulanmıştır (Anonymous, 2013; Anonymous, 2000a). Damıtma işlemi, Uluslararası Avrupa Birliği'nin onayladığı damıtma sistemi ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 1).

Buna göre, 200 ml örnek ve 60 ml saf su ölçü balonunda ölçülüp, 500 ml'lik damıtma balonuna alınmıştır. Damıtma yavaş bir şekilde gerçekleştirilmiş, başlangıç hacmin %80'i oranında damıtık toplandığında damıtmaya son

verilmiş ve damıtık başlangıç hacmine saf su ile tamamlanmıştır.



1. Standardize küresel tabanlı cam bağlantılı bir litrelik balon joje litre round-bottomed flask with standardised spherical ground-glass joint.
2. Vigreux rektifiye kolonu, 20 cm 20-cm Vigreux rectifying column.
3. Düz çerçeveli West yoğunlaştırıcı, 10 cm 10-cm straight-rimmed West condenser
4. Soğutucu bobin, 40 cm 40-cm cooling coil

Şekil 1. Damıtma Düzenegi
Figure 1. Distillation Apparatus

Piknometre Metodu

Alkol miktarı, damıtma sonucu elde edilen distilatın, piknometre ile bulunan yoğunluğundan özel alkol çizelgelerinden yararlanarak % hacim (h/h) olarak hesaplanmıştır (Anonymous, 2014b). Damıtık, 100 ml'lik piknometreye alınmış ve 20 °C'lik su banyosunda 30 dakika bekletilmiş ve hassas terazi ile ağırlığı belirlenmiştir. Belirlenen damıtık ağırlığı piknometrenin su kıymetine bölünerek, alkollü sıvının yoğunluğu hesaplanmıştır. Bu yoğunluk karşılığı alkol miktarı, hacmen alkol miktarı cetvelinden bulunmuştur (Anonymous, 2014b).

Elektronik Dansimetre Metodu

Damıtma işleminden sonra, 50 ml damıtık alınmış ve yoğunluk, 20 °C ölçüm sıcaklığında salınım tekniği (osilasyon) prensibine göre elektronik dansimetre ile ölçülmüştür (Anonymous, 2014c). Ölçüm işleminde Mettler Toledo (Densito 30PX) marka elektronik dansimetre kullanılmıştır. Bu yoğunluk karşılığı alkol miktarı, hacmen alkol miktarı cetvelinden bulunmuştur (Anonymous, 2014b).

NIR (Yakın Kızılötesi Spektroskopisi)**Metodu**

Alkollü içkilerin hacmen alkol miktarı tayini, Anton Paar Alcozyzer (DMA 4500M-Alcozyzer ME) marka NIR (yakın kızılötesi) spektroskopisi ile gerçekleştirilmiştir. NIR spektrometresi led ışık kaynağı, çoklu lens ve dedektör array içerir. İlgili dalga boyunda numune NIR ışınları ile karşılaştığı zaman bu bağlar titreşimsel enerji değişikliklerine maruz kalmakta ve bunun sonucu olarak NIR bölgesindeki organik moleküllerin enerji absorpsiyonu meydana gelmektedir. Dedektör tarafından okunan absorpsiyon, numunenin hacmen alkol miktarını belirlemek için kullanılmıştır (Anonymous, 2014a). Cihaz (ölçüm hücresi) sıcaklık kontrolüne sahiptir. Bu şekilde numunenin sıcaklığı 20 °C'ye otomatik olarak ayarlanmıştır. Beher içerisine eklenen 50 ml homojen numune pompa yardımı ile otomatik olarak cihaz içerisine alınmıştır. Cihaz ölçümü yaptıktan sonra dijital göstergeden değer okunmuştur. Cihaz hacmen alkol miktarını 2 basamaklı yüzde olarak doğrudan veren bir programa sahiptir. Hacmen alkol miktarı şarap için cihazdaki şarap skalası (%6-30 h/h) ve rakı için distile skalası (%35-65 h/h) seçilerek ölçülmüştür.

Metot Validasyon Parametrelerinin**Hesaplanması**

Piknometrik, dansimetrik ve NIR spektroskopisi ile alkol tayini metotlarının validasyonu "Eurachem Rehberi: Analitik Yöntemlerin Amaca Uygunluğu - Metot Validasyonu ve İlgili Konuları için Bir Laboratuvar Rehberi" referansına göre gerçekleştirilmiştir (Magnusson ve Örnemark, 2014).

Doğruluk: Bir metodun ölçüm sonuçlarının gerçek değere ve birbirine yakınlığını göstermek için kullanılır. Doğruluğun gerçeklik ve kesinlik olmak üzere iki bileşeni vardır (Magnusson ve Örnemark, 2014; Yılmaz, 2013; Ellison ve Williams, 2012). Metotların validasyonunu gerçekleştirmek için gerçeklik ve kesinlik parametreleri hesaplanmıştır.

Kesinlik: Kesinlik ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ifadesidir ve rastgele hataların dağılımını gösterir (Magnusson ve Örnemark, 2014; Yılmaz, 2013; Yılmaztekin ve Cabaroğlu, 2011). Bu parametre için metotlarda, tekrarlanabilirlik ve laboratuvar-ıçi tekrar üretilebilirlik çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Yılmaz, 2013; Yılmaztekin ve Cabaroğlu, 2011).

Tekrarlanabilirlik: Aynı şartlar altında, kısa zaman aralığında, aynı örneğin analizinden elde edilen sonuçların birbirine yakınlığının göstergesidir. Tekrarlanabilirlik için her iki numunede de, her metot ile 10 kez analiz gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerden, standart sapma (SD), yüzde rölatif standart sapma (%RSD) değerleri formül [1] ve [2] kullanılarak hesaplanmıştır. Tekrarlanabilirlik, "RSD_r" ile ifade edilmiştir (Magnusson ve Örnemark, 2014; Yılmaz, 2013; Yılmaztekin ve Cabaroğlu, 2011).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_{ort})^2}{n - 1}} \quad [1]$$

x_i: analiz sonucu

x_{ort}: analiz sonuçlarının ortalaması

n: analiz sayısı

$$\%RSD = \frac{SD}{x_{ort}} \times 100 \quad RSD_r = \frac{SD_r}{x_{ort}} \quad [2]$$

Laboratuvar İçi Tekrar Üretilebilirlik: Aynı laboratuvarında, farklı ekipman ya da aynı ekipmanda ve farklı analistler tarafından uzun zaman aralığında elde edilen sonuçların birbirine yakınlığının göstergesidir. Tekrar üretilebilirlik için, her metot ile günde 2 tekerrür olacak şekilde 25 kez analiz gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerden, rölatif standart sapma (RSD) değerleri formül [3] kullanılarak hesaplanmıştır. Tekrar

üretilebilirlik “RSD_R” ile ifade edilmiştir (Magnusson ve Örnemark, 2014; Yılmaztekin ve Cabaroğlu, 2011; Anonymous, 2016a).

$$RSD_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \left[\frac{(x_i - y_i)}{x_{ort}} \right]^2}{2n}} \quad [3]$$

x_i: Birinci tekrar sonucu

y_i: İkinci tekrar sonucu

x_{ort}: Paralel analiz sonuçlarının ortalaması

n: Örnek sayısı (paralel sayısı)

Gerçeklik (Geri kazanım): Ölçüm sonuçlarının gerçek değere yakınlığını ifade etmektedir ve bu nedenle sistematik hata hesabı yapılır (Magnusson ve Örnemark, 2014; Yılmaz, 2013). %12 ve %45 h/h alkol miktarına sahip kalite kontrol standart çözeltileri hazırlanmış ve NIR metodu ile her bir konsantrasyon için 20 kez analiz gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerden, formül [4] kullanılarak % geri kazanım (GK) hesaplanmıştır (Magnusson ve Örnemark, 2014).

$$\%GK = \frac{X_{bulunan}}{X_{referans}} \times 100 \quad [4]$$

Ölçüm Belirsizliği

Bir ölçümün sonucu rapor edilirken, sonucun kalitesini belirten sayısal bir parametre olmalıdır. Böylece sonucun güvenilirliği temin edilebilir. Bu parametre ölçüm belirsizliğidir. Ölçüm belirsizliği, sonucu etkileyen rastgele ve sistematik hataların birleştirilmiş şeklidir (Ellison ve Williams, 2012; Magnusson vd., 2012). NIR metodu için ölçüm belirsizliği hesaplanırken, belirsizlik kaynakları belirlenmiş ve her bir belirsizlik bileşeni için rölatif standart belirsizlik (U(x)) hesaplanmıştır. Daha sonra hesaplanan tüm standart belirsizlik bileşenlerinin varyansları toplamının karekökü bulunarak birleştirilmiş belirsizlik (U_{birleştirilmiş}) formül [5] kullanılarak hesaplanmıştır. Son aşamada ise birleştirilmiş belirsizlik (U_{birleştirilmiş}) değeri 2 katsayı ile çarpılarak genişletilmiş belirsizlik (U_{genişletilmiş}) hesaplanmıştır (Ellison ve Williams, 2012; Magnusson vd., 2012).

$$U_{birleştirilmiş} = \sqrt{U_1^2 + U_2^2 + U_3^2 + \dots} \quad [5]$$

İstatistiksel Analizler

Metotlar arasında farklılık olup olmadığı varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Veri setlerinde sapan değerlerin belirlenmesi için tekrarlanabilirlik veri setlerine Grubb’s testi uygulanmıştır (Rivera ve Rodriguez, 2015). Geri kazanım çalışmalarında sistematik hata olup olmadığının kontrolünde t testi uygulanmıştır. Validasyon çalışmaları kapsamında yapılan istatistiksel analizlerde Eurachem Rehberi’ne göre %95 güven aralığı kullanılmıştır (Magnusson ve Örnemark, 2014).

Validasyon Verilerinin Uygunluk Değerlendirmesi

Grubb’s Testi: Veri setlerinin kesinlik parametrelerini hesaplamadan önce sonuçların normal bir dağılım gösterip göstermediği belirlenmelidir. Bu amaçla veri setlerine Grubb’s testi uygulanmış ve sapan değer veri setinden çıkarılmıştır (Anonymous, 2000b). Bu teste, ölçüm sonuçları küçükten büyüğe doğru sıralanmış ve veri setindeki minimum (X_{min}) ve maksimum (X_{maks}) değerler belirlenmiştir. Grubb’s düşük (GL) ve Grubb’s yüksek (GH) değerleri [6] numaralı formüller ile hesaplanmıştır (Anonymous, 2000b; Anonymous, 2016b). Elde edilen değerler, Grubb’s tablosundaki kritik değer ile karşılaştırılmıştır (Anonymous, 2016b).

$$GL = \frac{(\bar{X} - X_{min})}{SD} \quad GH = \frac{(X_{maks} - \bar{X})}{SD} \quad [6]$$

Horwitz/HorRat: Horwitz eşitliği (PRSD) ve HorRat (Horrat) eşitliği, performans parametreleri olup kimyasal metotların kesinliğinin kabul edilebilirliği konusunda bilgi verir (Yılmaz, 2013). Horwitz eşitliği [7] numaralı formülle hesaplanırken, HorRat değeri ise [8] numaralı formül kullanılarak hesaplanmıştır (Rivera ve Rodriguez, 2015).

$$PRSD = 2 * (C^{-0,1505}) \quad [7]$$

C: matris içinde aranan maddenin desimal olarak miktarıdır.

$$Horrat = \frac{RSD (bulunan)}{PRSD} \quad [8]$$

BULGULAR VE TARTIŞMA**Kesinlik Parametreleri ve Metot Güvenilirliği**

Piknometrik, dansimetrik ve NIR metotları ile elde edilen etil alkol analiz sonuçları, hesaplanan

kesinlik parametreleri ve metot validasyon uygunluk test sonuçları çizelge 1’de verilmiştir.

Çizelge 1. Kesinlik Parametreleri ve Metot Güvenilirliği

Table 1. Precision Parameters and Method Reliability

	NIR Metot		Piknometrik Metot		Dansimetrik Metot	
	NIR Method		Pycnometric Method		Densimetric Method	
	Şarap	Rakı	Şarap	Rakı	Şarap	Rakı
	Wine	Raki	Wine	Raki	Wine	Raki
Ortalama (%h/h) Mean	11.35	44.33	11.32	44.31	11.30	44.30
SD _s	0.005	0.02	0.04	0.06	0.08	0.19
Min. Değer Minimum	11.35	44.30	11.30	44.20	11.20	44.00
Maks. Değer Maximum	11.36	44.36	11.38	44.40	11.40	44.60
GL	0.77	1.17	0.62	1.94	1.22	1.54
GH	1.16	1.53	1.45	1.59	1.22	1.54
Grubb's Değerlendirme	<2.29	<2.29	<2.29	<2.29	<2.29	<2.29
RSD _r (%) ^a	0.05	0.05	0.31	0.14	0.72	0.44
r (%h/h)	0.01	0.06	0.10	0.17	0.22	0.53
PRSD _{rHorwitz} (%)	1.39	1.13	1.39	1.13	1.39	1.13
RSD _R (%) ^b	0.20	0.03	3.00	1.00	1.00	0.20
R (%h/h)	0.02	0.10	0.16	0.27	0.36	0.85
PRSD _{RHorwitz} (%)	2.77	2.26	2.78	2.26	2.78	2.26
Horrat _r	0.02	0.02	0.11	0.06	0.26	0.19

a, ölçüm sayısını n: 10; b, ölçüm sayısı n: 25; SD, standart sapma; Min, minimum değer; Maks, maksimum değer; GL ve GH, Grubb's düşük ve yüksek sınır değerleri; RSD, rölatif standart sapma; r tekrarlanabilirlik limiti, PRSD_r, hedeflenen tahmini rölatif standart sapma; R, Tekrar üretilebilirlik limiti

a, number of measurements is 10; b, number of measurements is 25; SD, standard deviation; Min, minimum value, Maks, maximum value; GL and GH; Grubb's low and high value; RSD, relative standard deviation; r, repeatability limit, PRSD_r, targeted-predicted relative standard deviation; R, reproducibility limit

Her bir metot ile aynı gün içerisinde rakı ve şarap numuneleri için 10 kez analiz gerçekleştirilmiştir. Bu analiz verilerinin ortalamaları (X_{ort}), standart sapmaları (SD) ve rölatif standart sapmaları (RSD) ile yüzde rölatif standart sapma (RSD%) değerleri hesaplanmıştır. Aynı gün içinde her bir metot için hesaplanan RSD değerleri metodun tekrarlanabilirlik (RSD_r) parametresini ifade etmektedir. Veri setleri için minimum ve maksimum değerler ile GL ve GH değerleri hesaplanmıştır.

Tekrarlanabilirlik çalışması sırasında elde edilen analiz verileri setinde sapan değerlerin olup olmadığı Grubb's testi ile belirlenmiştir. Hesaplanan GL ve

GH değerleri, %95 güven aralığına göre belirlenen Grubb's tablo kritik değerinden küçük ise sapan değer belirlenmemiştir, büyük ise sapan veriler olduğu şeklinde değerlendirme yapılmıştır (Anonymous, 2000b; Anonymous, 2016b). Her üç metot için de veri setlerinde sapmanın olmadığı Çizelge 1’de gösterilmiştir.

Rakı numunesinin hacmen alkol miktarı; NIR metodu ile %44.30-44.36 arasında, piknometrik metot ile %44.20-44.40 arasında, dansimetrik metot ile ise %44.00-44.60 arasında değişmiştir. Rakı numunesi için RSD_r değeri; NIR metodu ile %0.05, piknometrik metot ile %0.14, dansimetrik metot ile de %0.44 olarak belirlenmiştir. Analiz

yöntemlerinden elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak ($P > 0.05$) fark bulunmamış olmasına rağmen, veriler arasında en yüksek sapma dansimetrik metot (SD, %0.19 h/h) ile yapılan analiz sonuçlarında görülmüştür. Şarap numunesinde ise hacmen alkol miktarı; NIR metodu ile %11.35-11.36 arasında, piknometrik metot ile %11.30-11.38 arasında, dansimetrik metot ile %11.20-11.40 arasında değişmiştir. Şarap numunesi için RSD_r değeri NIR metodu ile %0.05, piknometrik metot ile %0.31, dansimetrik metot ile de %0.72 olarak belirlenmiştir. Analiz yöntemlerinden elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak ($P > 0.05$) fark bulunmamış olmasına rağmen, veriler arasında en yüksek sapma dansimetrik metot (SD, %0.08 h/h) ile yapılan analiz sonuçlarında görülmüştür. Alkol konsantrasyonu düştükçe uygulanan metotlardaki analiz sonuçlarının sapmasında artış gözlenmektedir.

Tekrar üretilebilirlik (RSD_R) çalışmasında rakı ve şarap numunelerinin hacmen alkol miktarı stabil bir değer olmadığı ve zamana bağlı değişebildiğinden; farklı günlerde, farklı numunelerle ve günde 2 tekerrür yapılarak 25 kez analiz gerçekleştirilmiştir. Elde edilen 25 analiz sonucu ile RSD_R değeri metotta belirtilen [3] numaralı formüle göre hesaplanmıştır. Hesaplanan bu değer laboratuvar içi tekrar üretilebilirliği (RSD_R) ifade etmektedir (Magnusson vd., 2012; Van Reeuwijk ve Houba, 1998). Günde 2 tekerrürlü yapılan analiz sonuçları arasındaki farkın tekrarlanabilirlik limiti (r) sınırları içinde olup olmadığı kontrol edilmiştir. “ r ”, tekrarlanabilirlik çalışması sonucu belirlenen SD’nin 2.8 ile çarpılması ile belirlenmiştir. Bu değer tekerrürler arasındaki olmasına izin verilen maksimum farkı ifade etmektedir (Magnusson ve Örnemark, 2014; Yılmaz 2013; Magnusson vd., 2012).

Validasyon sonuçlarının uygunluğu için Horwitz eşitliği formül [7] kullanılarak tahmini rölatif standart sapma (PRSD) hesaplanmış ve bu değer ikiye bölünmesi ile de hedeflenen tahmini rölatif standart sapma ($PRSD_r$) belirlenmiştir (Rivera ve Rodriguez, 2015). Belirlenen RSD_r değerinin, hedeflenen ($PRSD_r$) değerden küçük

olması ve belirlenen RSD_R değerinin de $PRSD_R$ değerinden küçük olması metot güvenilirliği sağlamıştır.

Horrat ise analizlerle belirlenen RSD değerinin öngörülen $PRSD$ değerine oranıdır. Metot güvenilirliği için bu oranın 1.3’ün altında olması gerekmektedir (Rivera ve Rodriguez, 2015). Yapılan analizlerle belirlenen $Horrat_r$ değerleri tüm metotlarda ve numunelerde 1.3’ün altında belirlenmiştir. $Horrat_r$ değeri 1.5’in üzerinde ise metodun tekrarlanabilirliği beklenenden daha yüksek olup bu durumda gözden geçirme önerilir. $Horrat_r$ değeri 2’nin üzerinde ise tekrar üretilebilirlikte sorun vardır ve validasyon tekrarlanmalıdır (Yılmaz, 2013).

Metot güvenilirliği için referans alınan metotların vermiş olduğu kesinlik çalışmalarındaki değerler referans olarak kullanılabilir. Uluslararası Bağcılık ve Şarap Organizasyonunun yayınladığı şarapta piknometrik ve dansimetrik yöntem ile gerçekleştirilen etil alkol analiz metodundaki kesinlik değerleri, şarap numunesi analiz sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Referans alınan piknometrik metotta r değeri 0.1 h/h olarak belirtilmiştir (Anonymous, 2016c). Bu çalışmada şarap numunesinde piknometrik yöntem ile elde edilen sonuçların r değeri 0.1 h/h olarak bulunmuştur. Bu değer referans çalışmadaki değere eşit olduğu için sonuçlar uygun bulunmuştur. Referans alınan dansimetrik metottaki kesinlik çalışması sonucunda verilen r değeri % 0.067 h/h olarak verilmiştir (Anonymous, 2016c). Çalışmadaki şarap numunesinde dansimetrik metot ile belirlenen r değeri referans değerden yüksek bulunduğu için sonuçlar uygun bulunmamıştır.

Uluslararası Bağcılık ve Şarap Organizasyonunun yayınladığı bağcılık kökenli distile alkollü içkilerde piknometrik ve dansimetrik metotlarla yapılan validasyon çalışmalarında elde edilen RSD değerleri, rakı numunesi analiz sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Referans piknometrik metotta rakı benzeri bir numune olan grappa içkisinde RSD_r değeri %0.25, dansimetrik metotta ise %0.19 olarak verilmiştir (Anonymous, 2014b). Bu çalışmada rakı numunesinde piknometrik yöntem ile elde edilen sonuçların RSD_r değeri 0.14 ve

dansimetrik metot ile elde edilen RSD_r değeri ise 0.44 olarak belirlenmiştir. Piknometrik metot sonuçları OIV'nin bildirdiği değerden küçük olduğu için uygun bulunurken, dansimetrik metot sonuçları uygun bulunmamıştır. Her iki numunede gerçekleştirilen farklı analiz metotlarından elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak ($P > 0.05$) fark bulunmamış olsa da, dansimetrik metot verilerindeki sapmanın yüksek olduğu görülmektedir.

Geri Kazanım (Gerçeklik)

Geri kazanım (GK), yapılan analiz sırasında bir kayıp olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılmaktadır (Anonymous, 2016a). Şarap numunesini temsilen %12 h/h ve rakı numunesini temsilen de %45 h/h etil alkol miktarına sahip iki farklı konsantrasyondaki kontrol çözeltileri NIR metodu ile 20 kez analiz edilmiştir. NIR metodu için gerçekleştirilen geri kazanım verileri çizelge 2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2. NIR metodu geri kazanım çalışması sonuçları

Table 2. Recovery results of NIR method

	%12 Etil Alkol Çözeltisi %12 Ethyl Alcohol Solution	%45 Etil alkol çözeltisi %45 Ethyl Alcohol Solution
RSD _r (%)	0.07	0.05
Geri kazanım (%) Recovery	98	98
n*	20	20
	Ort Mean	0.98
	SD	0.001
	n*	40
Rölatif Standart Belirsizlik Relative Standard Uncertainty	$U(x) = [SD / \sqrt{(n)}] / Ort$	0.0001

*n, ölçüm sayısını; Ort, ortalama değer; SD, standart sapmayı ifade etmektedir

*n, represents the number of measurements; Ort, mean; SD, standard deviation

NIR metodu için iki farklı konsantrasyonda da GK, %98 olarak belirlenmiştir. Bu değer kabul edilebilir geri kazanım aralık değerine uygun bulunmuştur (Magnusson ve Örnemark, 2014). Bu GK değerlerinin metot güvenilirliği kontrolü ise t testi ile gerçekleştirilmiş ve sonuçlar uygun olarak belirlenmiştir. Toplamda yapılan 40 analiz sonucunda ortalama geri kazanım değeri 0.98 ve SD ise 0.001 olarak hesaplanmıştır. Standart belirsizlik (u_x) ise SD'nin ölçüm sayısının kareköküne bölünerek 0.0001 olarak belirlenmiştir. Bu değer ortalamaya bölünerek rölatif belirsizlik hesaplanmıştır (Ellison ve Williams, 2012; Magnusson vd., 2012).

NIR Metodu için Belirsizlik Kaynakları ve Toplam Belirsizlik

NIR metodu için belirsizlik kaynakları olarak analistten kaynaklanan belirsizlik, standarttan saflığından gelen belirsizlik, malzemeden gelen hacim belirsizliği, kesinlik parametrelerinden (Tekrarlanabilirlik ve Tekrar üretilebilirlik) gelen

belirsizlik ve geri kazanımdan gelen belirsizlik olarak sayılabilmektedir (Magnusson vd., 2012).

Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik için hesaplanan RSD değerleri standart belirsizlik olarak ele alınır ve geri kazanım çalışmasında hesaplanan rölatif standart belirsizlik (U_x) ile birlikte toplam belirsizlik hesaplamasında kullanılır. Bunların yanında hacimden gelen belirsizlik ve standardın saflığından gelen belirsizlik de hesaplanmıştır (Ellison ve Williams, 2012; Magnusson vd., 2012).

Kullanılan malzemelerin üstünde belirtilmiş sapma değerleri kullanılırsa B tipi belirsizlik olarak değerlendirilip dikdörtgen dağılıma göre hesaplama yapılırken, kalibrasyon sertifikalarından gelen sapmalar kullanılacak olursa A tipi belirsizlik olarak değerlendirilir ve normal dağılıma göre belirsizlik hesaplaması gerçekleştirilir (Ellison ve Williams, 2012; Anonymous, 2016a). Cam malzemeler için kalibrasyon sertifikaları verileri kullanıldığı için A tipi

belirsizlik olarak değerlendirilmiş ve normal dağılıma göre hesaplama yapılmıştır. Buna göre standart belirsizlik (u_x), kalibrasyon sertifikalarından elde edilen ölçüm belirsizliği değerlerinin 2'ye bölünmesi ile hesaplanmıştır. Standart belirsizlikler de kullanılan malzemelerin hacim miktarına bölünerek rölatif standart belirsizlik (U_x) olarak hesaplanmıştır. Tüm hacimden gelen belirsizlik her bir malzeme için tek tek hesaplanarak birleşik rölatif standart belirsizlik hesaplanmıştır.

Standart saflığından gelen belirsizlikte standart maddenin üzerinde yazan saflık değerleri

kullanıldığı için belirsizlik B tipidir ve dikdörtgen dağılıma göre hesaplamalar gerçekleştirilmiştir (Ellison ve Williams, 2012; Anonymous, 2016a). Buna göre standart belirsizlik (u_x), standardın açıklamasından elde edilen safsızlık değerlerinin $\sqrt{3}$ 'e bölünmesi ile hesaplanmıştır. Standart belirsizlikler de standardın saflığına bölünerek rölatif standart belirsizlik (U_x) hesaplanmıştır.

Toplam belirsizlik birleşenleri ve bütçesi, birleşik belirsizlik ($U_{\text{Birleşik}}$) ve genişletilmiş belirsizlik ($U_{\text{Genişletilmiş}}$) çizelge 3'de verilmiştir.

Çizelge 3. NIR Metodu Toplam Belirsizlik Bileşenleri ve Bütçesi
Table 3. Total Uncertainty Components and budget of NIR Method

Belirsizlik bileşenleri <i>Uncertainty Components</i>	Rölatif Standart Belirsizlik <i>Relative Standard Uncertainty</i> $U(x)=u(x)/x$
Tekrarlanabilirlik (RSD_r) <i>Repeatability</i>	0.0005
Tekrar Üretilirlik (RSD_R) <i>Reproducibility</i>	0.0003
Geri Kazanım ($U(x)$) <i>Recovery</i>	0.0001
Standart Madde Belirsizliği ($U(x)$) <i>Uncertainty of Chemical</i>	0.0006
Hacim Belirsizliği ($U(x)$) <i>Uncertainty of Volume</i>	0.0029
U Birleştirilmiş	0.003
U* Genişletilmiş	0.006

$U_{\text{birleştirilmiş}}$, birleştirilmiş ölçüm belirsizliği; $U_{\text{genişletilmiş}}$, genişletilmiş ölçüm belirsizliği; *%95 güven aralığında $k=2$ ile çarpılmıştır

$U_{\text{birleştirilmiş}}$, *Combined measurement uncertainty*; $U_{\text{genişletilmiş}}$, *expanded measurement uncertainty*; * *multiple with k:2 in %95 confident level*

Birleştirilmiş belirsizlik belli bir emniyet katsayısı ile çarpılarak genişletilmiş belirsizlik hesaplanmıştır. Bu katsayı %95 güven aralığı için 2'dir. Genişletilmiş belirsizlik, ölçüm sonucu değerlerinin büyük bir kısmını içeren aralık olarak tanımlanır (Ellison ve Williams, 2012; Magnusson vd., 2012). Bu sonucun 100 ile çarpılması ile de yüzde ± 0.6 ölçüm belirsizliği değeri belirlenmiştir.

SONUÇ

Alkollü içkilerde etil alkol tayininde kullanılan piknometrik, dansimetrik ve NIR metodlarının valide edilerek sonuçlarının karşılaştırıldığı bu çalışmada her üç metodunda güvenilir olduğu belirlenmiştir. Bunlardan NIR spektroskopisi

metodu verileri, hem tekrarlanabilirlik (RSD_r : %0.05) hem de tekrar üretilebilirlik açısından rakı ve şarapta diğer metodların verilerinden daha iyi sonuçlar vermiştir. Rakı numuneleri için RSD_r değeri %0.05 ve RSD_R değeri %0.03 olarak, şarap numuneleri için ise RSD_r değeri %0.05 ve RSD_R değeri %0.2 olarak belirlenmiştir. Geri kazanım (%98) çalışması farklı iki konsantrasyonda başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Yöntemler arasında istatistiksel olarak bir fark ($P > 0.05$) görülmemiştir. Daha hızlı bir yöntem olması ve damıtma gibi bir ön hazırlığa ihtiyaç duyulmaması NIR metodunu daha ilgi çekici ve avantajlı hale getirmektedir. NIR metodunun validasyon ve ölçüm belirsizliği verileri daha güvenilir sonuçlar

vermiştir. Bu nedenle etil alkol analizinin yoğun olarak yapıldığı işletmelerde veya analiz laboratuvarlarında NIR metodu önerilir.

TEŞEKKÜR

Rakı numunelerini sağlayan Antalya Alkollü İçecek A.Ş.'ye teşekkür ederiz. Laboratuvar analizlerine katkı sağlayan Aşkım AKÇA, Benu GERDAN, Damla METİN, Elvin BUCDE, Gizem PARMAKSIZ' a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

Anonymous (2000a). Reference Methods for the Analysis of Spirits Drinks. Official Journal of the European Communities, Council Regulation (EEC) No: 2870/2000 of 19 December 2000.

Anonymous (2000b). Türk Standardı, TS 5822-2 ISO 5725-2, Ölçme Metotlarının ve sonuçlarının doğruluğu (Gerçeklik ve Kesinlik)-Bölüm 2: Standard bir ölçme metodunun tekrarlanabilirliğinin ve uyarılığın tayini için temel metot, Kasım 2000.

Anonymous (2009a). Türk Patent Enstitüsü, Rakı-Distile Alkollü İçki, Coğrafi İşaret Tescil Belgesi (no: 136), 8 Aralık 2009 tarih ve 27426 sayılı Resmi Gazete, Ankara.

Anonymous (2009b). Türk Gıda Kodeksi, Şarap Tebliği (2008/67). Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. 4 Şubat 2009 tarih ve 27131 sayılı Resmi Gazete, Ankara.

Anonymous (2013). Türk Gıda Kodeksi, Distile Alkollü İçkiler Analiz Metotları Tebliği (2013/11). Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. 11 Nisan 2013 tarih ve 28615 sayılı Resmi Gazete, Ankara.

Anonymous (2014a). International Organisation of Vine and Wine, Compendium of international methods of analysis of spirituous beverages of vitivinicultural origin, near infrared reflectance spectroscopy, OIV-MA-BS-08:R2009.

Anonymous (2014b). *International Organisation of Vine and Wine, Compendium of international methods of analysis of spirituous beverages of vitivinicultural origin*, Reference method for the determination of the real alcoholic strength by volume of spirit drinks of viti-vinicultural origin: measurement by pycnometry, OIV-MA-BS-03: R2009.

Anonymous (2014c). *International Organisation of Vine and Wine, Compendium of international methods of analysis of spirituous beverages of vitivinicultural origin*, Reference method for the determination of the real alcoholic strength by volume of spirit drinks of viti-vinicultural origin: measurement by electronic densimetry, OIV-MA-BS-04: R2009.

Anonymous (2016a). *International Organisation of Vine and Wine, Compendium of international methods of wine and must analysis*, Practical guide for the validation, quality control, and uncertainty assessment of an alternative oenological analysis method, Resolution 10/2005, OIV-MA-AS1-12: R2005.

Anonymous (2016b). ASTM Standardı, ASTM E178-16a, Standard Practice for Dealing With Outlying Observations, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2016, www.astm.org.

Anonymous (2016c). International Organisation of Vine and Wine, Compendium of international methods of wine and must analysis, alcoholic strength by volume, Resolution 337/2009, OIV-MA-AS312-01A: R2009.

Anonymous (2017). Türk Gıda Kodeksi, Distile Alkollü İçkiler Tebliği (2016/55). Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. 21 Mart 2017 tarih ve 30014 sayılı Resmi Gazete, Ankara.

Ellison, S. L. R., Williams A. (ed.) (2012). *Eurachem / CITAC Guide CG 4: Quantifying uncertainty in analytical measurement*, 3rd Edition, Eurachem, www.eurachem.org.

Ertugay, M. F., Başlar, M. (2011). Gıdaların Kalite Özelliklerinin Belirlenmesinde Yakın Kızılötesi (NIR) Spektroskopisi, *GIDA* 36: 49-54.

Magnusson, B., Näykki, T., Hovind, H., Krysell, M. (2012). *Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories*, Nordtest NT Technical Report 537, Edition 3.1, www.nordtest.info.

Magnusson B., Örnemark U. (ed.) (2014). *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 2nd edition, ISBN 978-91-87461-59-0, Eurachem, www.eurachem.org.

Rivera, C., Rodriguez R. (2015). Horwitz Equation as Quality Benchmark in ISO/IEC 17025 Testing Laboratory. Retrieved from <http://www.bii.mx/documentos/horwitzCf11.pdf>.

Van Reeuwijk L. P., Houba V. J. G. (ed.) (1998). *Guidelines for Quality Management in Soil and Plant Laboratories*, FAO Soils Bulletin 74, Section 7, Quality of Analytical Procedures (<http://www.fao.org/docrep/W7295E/w7295e09.htm>, section 7.5.2.3).

Yılmaz, A. (2013). *Kimyasal Analizlerde Metot Validasyonu ve Verifikasyonu*. Turklab Kalibrasyon ve Deney Laboratuvar Derneği, TURKLAB Rehber 01, Rev.02, 51s.

Yılmaztekin, M., Cabaroğlu, T. (2011). Confirmatory method for the determination of volatile congeners and methanol in Turkish Rakı according to European Union Regulation (EEC) No. 2000R2870: single-laboratory validation, *J AOAC Int*, Vol. 94, No: 2.

GIDA İŞLEME TESİSLERİNDE *LISTERIA MONOCYTOGENES* VE MÜCADELEDE YENİ YAKLAŞIMLAR

Seda Altuntaş^{1*}, Mihriban Korukluoğlu²

¹ Bursa Teknik Üniversitesi Doğa Bilimleri Mimarlık ve Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Bursa, Türkiye

² Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Bursa, Türkiye

Geliş / Received: 02.10.2017; Kabul / Accepted: 18.11.2017; Online baskı / Published online: 27.12.2017

Altuntaş, S., Korukluoğlu, M. (2017). Gıda işleme tesislerinde *Listeria monocytogenes* ve mücadelede yeni yaklaşımlar. *GIDA* (2018) 43 (1): 101-113 doi: 10.15237/gida.GD17090

ÖZ

Listeria monocytogenes, bağışıklığı baskılanmış bireylerde gastrointestinal problemler, nörolojik bozukluklar ve sepsis gibi ciddi semptomlara ve yüksek ölüm oranına sahip bir gıda patojenidir. Listeriosisin ölümlü sonuçlanma oranı yaklaşık %25, hastaneye kaldırılma oranı ise %95'in üzerindedir. Bu nedenle günümüzde hâlâ artan bir gıda güvenliği sorununu teşkil etmektedir. Olumsuz koşullarda uzun süre hayatta kalabilme ve biyofilm oluşturabilme yeteneği nedeniyle gıda işleme ortamlarının en önemli sorunlarından biri *L. monocytogenes* ile mücadeledir. Bu mücadelede başlangıç olarak, mikroorganizmanın kontaminasyon yollarını ve yayılmasına katkıda bulunan faktörleri bilmek, antilisterial uygulamalar için gerekli olmaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda, doğru tasarlanan tesis, ekipman, temizlik ve sanitasyon programları, personel eğitimi ve sürekli izleme sistemleri ile etkili bir mücadele sağlanabilmektedir. Ancak artan bilinç ve önlemlere rağmen, bazı gıda işletmelerinde ve gıdalarda *L. monocytogenes* tespit edilmektedir. Bu durum *Listeria* ile mücadelede antimikrobiyel bileşiklerin kullanımı, ohmik ısıtma, yüksek basınç uygulaması ve soğuk plazma tekniği gibi birçok yeni yaklaşımların gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu derlemede, *L. monocytogenes* in gelişme koşulları, olası kontaminasyon kaynakları, gıda işleme tesislerinde yapılması gereken uygulamalar ve mücadelede yeni yaklaşımların verilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar kelimeler: *L. monocytogenes* ile mücadele, kontaminasyon kaynakları, anti-listerial uygulamalar

***LISTERIA MONOCYTOGENES* IN FOOD FACILITIES AND NEW APPROACHES FOR STRUGGLE**

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a food pathogen with high mortality and severe symptoms such as gastrointestinal, sepsis, neurological disorders in immuno-suppressed individuals. The mortality rate of listeriosis is about 25% and the rate of hospitalization is over 95%. For this reason, it is still an increasing problem of food safety. One of the most important problems of food processing environments is the struggle against *L. monocytogenes* because of its ability to survive for long time under adverse conditions and to be capable of producing biofilm. As a starting point in this struggle, it is necessary for anti-listerial applications to know the ways in which microorganisms are contaminated and the factors contributing to their growth and spread. In line with this information, an effective struggle can be achieved with properly designed facilities and equipment, cleaning and sanitation programs, staff training and continuous monitoring systems. However, despite increased awareness and precautions, *L. monocytogenes* are detected in some food processing facilities and in foods. This necessitates many new approaches such as the use of antimicrobial compounds in combating against *Listeria*, ohmic heating, high pressure application and cold plasma technique. In this review, growth conditions of *L. monocytogenes*, potential sources of contamination, applications to be made in food processing plants and new approaches to struggle are given.

Keywords: Struggle with *L. monocytogenes*, sources of contamination, anti-listerial applications

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author:

✉ seda.altuntas@btu.edu.tr

☎ (+90) 506 943 4982

☎ (+90) 224 300 3515

GİRİŞ

Listeria monocytogenes gıda kaynaklı hastalıklara sebep olan patojenlerin içerisinde en yüksek ölüm oranına sahip bir gıda patojenidir ve yılda yaklaşık 200 milyon dolar maddi kayba yol açmaktadır (Luksiene ve Paskeviciute, 2011). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (Center for Disease Control and Prevention-CDC), Amerika'da her yıl 1600 listeriosis vakasının olduğunu, bunların 1500 adedinin hastaneye kaldırılma ve 260 vakanın ise ölümlerle sonuçlandığını tahmin etmektedir (Lourenço vd., 2017; Hammons ve Oliver, 2014). Artan bilinç ve bulaşmayı önleyici uygulamalara rağmen, aynı kuruluş 2015 yılında dondurmaya bulaşmış *L. monocytogenes* kaynaklı 10 vakanın 3'ünün ölümlerle sonuçlandığını bildirmiştir (Çizelge 1) (Leong vd., 2016). Hamile, yeni doğan, çocuk, yaşlı ve bağışıklığı baskılanmış kişilerde sağlığı

ciddi oranda tehdit eden *L. monocytogenes*, süt ve ürünleri, et ürünleri ve özellikle hazır gıda üretimi yapan işletmelerin öncelikli sorunlarından biridir. 2002 yılında Amerika'nın ikinci büyük kümes hayvanları şirketinin, 13000 tona yakın soğutulmuş ve dondurulmuş hindi ve tavuk ürününü *L. monocytogenes* bulaşma şüphesi nedeniyle geri çağırdığı ve ürünlerin 5 ayda toplanabildiği ifade edilmektedir (Food Safety Authority of Ireland, 2005). Son 15 yılda sadece Avustralya'da 40'ın üzerinde *L. monocytogenes* kaynaklı geri çağırma olduğu ve 2005 yılında Güney Avustralya'da bulunan küçük bir şirketin geri çağırma maliyetinin yaklaşık 2 milyon dolar olduğu bildirilmiştir (Meat and Livestock Australia, 2006).

Çizelge 1. Farklı gıdalarda raporlanan listeriosis salgınları

Yıl	Bölge	Gıda	Vaka Sayısı	Ölüm Sayısı	Referans
1985	ABD	Meksika peyniri	142	48	(Meat and Livestock Australia, 2006)
1987	İsviçre	Vacherin Mont d'Or peyniri	122	34	(Melo vd., 2015)
1988	İngiltere	Pâté (Etlı hamur işi)	355	94	(Meat and Livestock Australia, 2006)
1990	Danimarka	Küflü peynir	26	7	(Melo vd., 2015)
1992	Fransa	Jöleli domuz dili	279	85	(Meat and Livestock Australia, 2006)
1998-1999	ABD	Sosisli sandviç ve şarküteri etleri	101	21	(Meat and Livestock Australia, 2006)
2006	Almanya	Yumuşak peynir	189	26	(Melo vd., 2015)
2007	Norveç	Camembert peyniri	17	3	(Melo vd., 2015)
2008	Kanada	Peynir	92	NA*	(Melo vd., 2015)
2009	Avusturya	Lor peyniri	34	8	(Melo vd., 2015)
2011	ABD	Cantaloupe (Kavun türü)	147	33	(Khan vd., 2016)
2012	ABD	Ricotta peyniri	22	4	(Melo vd., 2015)
2012	İspanya	Taze peynir	2	-	(Leong vd., 2016)
2013-2014	Danimarka	Baharatlı kuzu rulo, domuz eti, sosis, karaciğer pâté ve diğer et ürünleri	41	17	(Leong vd., 2016)
2014	ABD	Karamelli elma	32	1	(Zhu vd., 2017)
2015	ABD	Dondurma	10	3	(Leong vd., 2016)
2016	ABD	Paketlenmiş salata	19	1	(Zhu vd., 2017)

*NA; Belirlenemedi

L. monocytogenes'in gıda işleme tesislerine bulaşma, hayatta kalma ve çoğalmasını etkileyen faktörleri bilmek, etkili kontrol stratejileri belirlemek için önemlidir. *Listeria* cinsine ait 17 tür olduğu ve *L. monocytogenes*'in dünya çapında özellikle 3 serotipinin (4b, 1/2a ve 1/2b) insanlarda hastalık oluşturma oranının daha yüksek olduğu belirtilmiştir. (Weller vd., 2015; Ciccio vd., 2012).

Gram pozitif, fakültatif anaerobik, spor oluşturmayan, 13 serotipe sahip *L. monocytogenes* düşük sıcaklıklarda gelişebilmekte ve birçok mikroorganizmanın inhibe olabileceği tuz ve asit konsantrasyonuna karşı direnç göstermektedir (Çizelge 2) (Luo vd., 2017; Rodrigues vd., 2017; Hamedi vd., 2014).

Çizelge 2. *L. monocytogenes* gelişme ve hayatta kalma koşulları (Sadekuzzaman vd., 2017; Melo vd., 2015; Välimaa vd., 2015; World Health Organization States, 2004)

Parametre	Minimum	Maksimum	Optimum	Hayatta kalabilir ancak gelişemez
Sıcaklık (°C)	-1.5 - 3	45	30-37	-18
pH (pH)	4.2-4.3	9.4-9.5	7.0	3.3-4.2
Su aktivitesi (a _w)	0.90-0.93	>0.99	0.97	<0.90
Tuz (%)	<0.5	12-16	NA*	≥20

*NA; Belirlenemedi

Mikroorganizmaların gıdalarda gelişmesi ve hayatta kalması, ortamın iç ve dış faktörleri ile işleme tekniklerine bağlıdır. Termizasyon, pastörizasyon ve sterilizasyon gibi ısı işlemler *L. monocytogenes* gibi birçok patojenin ölmesini sağlar (Luksiene ve Paskeviciute, 2011). Ancak uygulama sonrası gıdaya uygulanacak ısı işlemler, *L. monocytogenes*'in tekrar bulaşmasına neden olur. Tüketime hazır gıdalar, tüketici tarafından ısı işlem ya da özel bir hazırlık gerektirmeyen gıdalardır (Rodrigues vd., 2017). Bu sebeple *L. monocytogenes* ile kontamine gıdaların tüketilmesi sonucu meydana gelen listeriosis en fazla görüldüğü gıdalar, tüketime hazır gıdalardır.

Bakteriyel kalıcılık, genetik olarak ayırt edilemeyen aynı ortamdan izole edilmiş suşların uzun süre varlığı olarak ifade edilir (Nowak vd., 2017). *L. monocytogenes*'in kalıcılık özelliği üzerine yapılan çalışmalar peynir üretimi, et işleme, kümes hayvanları gibi birçok işletmede yıllarca yaşayabildiğini göstermektedir (Buchanan vd., 2017). Geniş sıcaklık aralığında gelişebilme, aside ve kurumaya karşı dayanıklı olma, sanitasyon ajanlarına direnç gösterme ve biyofilm oluşturabilme özelliği sayesinde, diğer mikroorganizmalara karşı rekabeti kazanarak gelişmekte ve işletmede kalıcı olabilmektedir (Leong vd., 2016). Biyofilm, biyotik veya abiyotik

bir yüzeye yapışmış ve mikroorganizmanın kendisi tarafından üretilen hücre dışı polimerik maddeler (EPS) içine gömülü mikroorganizmaların baskın bir yaşam biçimi olarak tanımlanmaktadır (Sadekuzzaman vd., 2017). Mikrobiyel biyofilmlerin temizleme ajanlarına ve sanitasyona karşı daha dirençli olduğu bilinmektedir (Nowak vd., 2017). Bu nedenle biyofilm oluşturma ile bakteriyel kalıcılık arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir (Buchanan vd., 2017; Leong vd., 2016; Schöbitz vd., 2014). Mikroorganizmalarda flagella, biyofilm oluşumunun ilk aşaması için gerekli olan yüzeye tutunmada önemli rol oynamaktadır. Ancak *L. monocytogenes* suşlarının çoğunun 30°C üzerindeki sıcaklıklarda flagella oluşturmadığı ve buna rağmen biyofilm oluşturabildiği gerçeği, başka mekanizmaların biyofilm oluşturmada etkili olduğunu göstermektedir (Luo vd., 2017). *L. monocytogenes*'in zayıftan orta kuvvete kadar biyofilm oluşturabildiği, bazı suşların abiyotik yüzeylere çok sıkı tutunduğu ve bunun yüzey özelliğine bağlı olarak değiştiği belirtilmiştir (Fernanda vd., 2017). *L. monocytogenes*'in paslanmaz yüzeylerde biyofilm oluşturabilmesi nedeniyle (Luo vd., 2017), kontaminasyona neden olabilmekte ve bu durum gıdaya temas eden veya etmeyen tüm yüzeylerin kontrol altında tutulması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

L. monocytogenes'i gıda işleme tesislerinden her yerde rastlanabilmesi, proses alanında bulaşabilmesi için pek çok olası yolun olması ve kalıcılık özelliği nedeniyle, tamamen yok etmenin neredeyse imkansız olduğu sonucuna varılmıştır (Buchanan vd., 2017; Lee vd., 2017). Bu nedenle ekipman ve çevrenin yeterli hijyene sahip olması, etkili temizlik ve sanitasyon prosedürlerinin varlığı, personel uygulamaları, gıda işleme alanına personel ve ürün-malzeme girişlerinin bölgesel olarak kısıtlanması gibi önlemler ile gıdalara bulaşması engellenebilir. Bu derleme ile *L. monocytogenes* kontaminasyon kaynaklarının belirlenmesi, kontaminasyonu azaltmak için alınacak önlemler, pozitif sonuç sonrası uygulamaların araştırıldığı çalışmaların irdelenmesi amaçlanmış ve sürekli kontrol-doğrulama için çevresel patojen izleme programının önemi vurgulanmıştır.

OLASI KONTAMİNASYON KAYNAKLARI

L. monocytogenes bulaşmasını en aza indirmek ya da kontrol altına almak için kontaminasyon kaynaklarının bilinmesi önemlidir. Ham madde, çevre-ekipman ve personel başlıca kaynaklar olarak belirlenmiştir (Hicks vd., 2004). Tarladan sofraya kadar gıda zincirinin tüm basamaklarında *L. monocytogenes*'in bulaşması olasıdır. Et, kümes hayvanları, bazı meyve ve sebzeler, deniz ürünleri ve çiğ süt gibi ham maddeler *L. monocytogenes*'i işletme içerisine taşır (Lakicevic vd., 2015). Bu nedenle farklı gıda sektörlerinde *L. monocytogenes* bulunma olasılığı farklı olabilmektedir. Üç yıl boyunca 16 süt, 18 et, 15 deniz ürünleri ve 5 sebze işletmesinin gönüllü katılımıyla *L. monocytogenes* varlığının araştırıldığı çalışmada, 54 gıda

işletmesinden sadece 10 işletmede (1 adet süt, 3 et, 6 deniz ürünleri) *L. monocytogenes*'in olmadığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada farklı sektörler arasında *L. monocytogenes* pozitif test oranının anlamlı olarak farklı olduğu, *L. monocytogenes*'in en az deniz ürünleri işletmelerinde (%1.7) görüldüğü ve bunu süt (%3.7), et (%4.3) ve sebze işletmelerinin (%9.5) takip ettiği tespit edilmiştir (Leong vd., 2017). Sektörel farklılığın yanı sıra, işletme ortamının ve ekipmanların fiziksel durumu mikroorganizmaların gelişimini doğrudan etkilemektedir. İşletme ortamı kuru olduğunda *L. monocytogenes* gelişimi sınırlanmaktadır. İşleme proseslerinin sonrasında temizlikte kullanılan su, özellikle yüksek basınç hortumları, patojenlerin aerosollar yoluyla işletmeye yoğun bir şekilde yayılmasına olanak sağlar. *L. monocytogenes* işletmeye kontamine olduktan sonra çoğalabileceği nemli ve girintilerin olduğu noktaları tercih eder. Eğer gıda işleme çevresinde temizlik ve sanitasyon prosedürleri iyi tasarlanmamış veya yeterince uygulanmıyorsa, standart sanitasyon uygulaması ile giderilemeyen biyofilm oluşumu görülür. Bu noktalar gıda işleme sürecinde, önemli kontaminasyon kaynağını oluşturur (Lakicevic vd., 2015). Dilimleyiciler, gıda taşıma arabalarının tekerlekleri, gıda hazırlama sehpalarındaki çatlaklar, soğutma odalarındaki soğutma fanları gibi temizlenmesi zor ekipmanlar, *L. monocytogenes* gelişimi için mükemmel bir ortam yaratır. Tüm bu yüzeyler ile doğrudan ya da dolaylı olarak temasta olan gıda, bakteri ile kontamine olur (Çizelge 3) (Cutter vd., 2006).

Çizelge 3. Gıda işleme tesislerindeki bulaşma kaynakları

Doğrudan	Dolaylı
Konveyörler	Giderler
Konteynırlar	Zemin
El aletleri	Duvarlar
Dilimleme, parçalama, kesme makineleri	Taşıma araçları (forklift)
Personel kıyafetleri	Hava, buhar
Eldivenler	Su
Doldurma ve paketleme makineleri	Bakım ekipmanları
Salamura ve diğer solüsyonlar	Temizlik ekipmanları (fırça, bez, kova)

KONTAMİNASYON RİSKİNİ AZALTMAK İÇİN YAPILACAK UYGULAMALAR

Gıda ve Tarım Örgütü (FDA) ve Gıda Güvenliği ve Denetleme Servisi (FSIS) 2003 yılında yayınladıkları risk değerlendirmesinin ardından, *Listeria* kontrolüne dayanan düzenlemelere öncülük etmekte ve alınacak tedbirleri anlatan kılavuzlar yayınlamaktadır. Ayrıca gıda endüstrisi de, tüketime hazır gıda ürünlerinin formülasyonunda antimikrobiyel ajanların ve inhibitörlerin kullanımının artması, sanitasyon ve çevresel izleme programlarının iyileştirilmesi de dahil olmak üzere, gıda üretim ve işleme biçiminde önerilen değişiklikler konusunda rehberlik etmektedir (Luchansky vd., 2017). Etkili bir *L. monocytogenes* kontrolü için, detaylı olarak tanımlanmış iş akışı, etkili temizlik prosedürlerinin varlığı, girdilerin mikrobiyolojik kontrolü, personel eğitimleri, üretim alanlarının yerleşimi, hijyenik ekipman tasarımı, işletme ortamının hava ve nem kontrolü, atık yönetimi ve düzenli uygulanan bir çevresel patojen izleme programı önerilmektedir (Fox vd., 2015; Tompkin, 2002).

Ham Madde ve Yardımcı Malzemelerin Kontrolü

L. monocytogenes sıklıkla hayvansal ya da hayvan kökenli ham maddelerde ve çiğ sebzelerde bulunur (Leong vd., 2016). Bunların yanı sıra katkılar, paketlenme materyalleri ve kimyasallar gibi gıda işleme alanlarına giren her ham madde ve diğer yardımcı malzemeler *L. monocytogenes* kontaminasyonunun potansiyel kaynaklarıdır. Bu doğrultuda, gelen ürünlerin ambalajlarının gıda işleme alanları dışında çıkartılarak, ambalajdan gelebilecek kontaminasyonu engellemek mümkündür. Alınacak başka bir önlem ise ham madde ve diğer girdi malzemelerinin tedarikçi firmaları denetlenerek, *Listeria* spp. için gıda güvenliği programlarının teşvik edilmesi, bu sayede bilincin artırılmasını sağlamaktır. Gelen ham madde ve üretime yardımcı diğer malzemelerin periyodik olarak *L. monocytogenes* analizlerinin yapılması ve satın alma sürecinde kriter olarak değerlendirilmesi, işletme içerisine *L. monocytogenes* taşınmasını önemli ölçüde azaltacak bir uygulamadır (NSW Government, 2016).

İşletme Konumu, Tasarımı ve Yapısı

L. monocytogenes' in (ve diğer patojenlerin) kontrolünde, *L. monocytogenes'* in gelişmesini, çapraz kontaminasyon ve tekrar bulaşma risklerini en aza indirmek için bir işletmenin konumu, tasarımı, yapımı ve düzeni önemlidir. Zayıf tasarım, bina ve ekipman düzeni, tesislerin etkin şekilde temizlenmesine yönelik çabaları engelleyecektir. Öncelikle işletmelerin haşere girişini önleyen sınırlarla çevrili olması sağlanmalıdır. İşletme çevresinde uygun drenaj için eğim verilmeli ve işletme çevresi ışıklandırılmaları böcek, sinek ve kemiricileri engelleyecek şekilde konumlandırılmalıdır. Gıda işlemenin yapıldığı tüm alanlar yeterli temizliğe elverişli ve minimum nem birikimi olacak şekilde tasarlanmalıdır. Üretim yapılan bir işletmede bakım, onarım ya da inşaat çalışmaları sırasında, üretim alanı bu ortamlardan etkin bir şekilde izole edilmelidir. Yapım, bakım ve onarım esnasında izleme programları sıklığı ve örneklem sayısı artırılmalıdır (Food Safety Authority of Ireland, 2005). Gıda işleme tesislerinde yüzeylerde kondens oluşumunu en aza indirmek için doğru havalandırma sistemleri kullanılmalıdır. Aksi takdirde ürün içerisine düşen damla ve aerosoller *L. monocytogenes* kaynağı olabilir (Codex Alimentarius Commission, 2007).

Ekipman Dizaynı ve Bakımı

Ekipmanların hijyenik tasarımı, en önemli patojen kontrol prensiplerinden biridir. Bir gıda işleme firmasında çalışan personellerin katıldığı bir ankette, zayıf hijyenik tasarım nedeniyle paketlenme makineleri, konveyörler ve dilimleyicilerin en sorunlu bölgeler oldukları raporlanmıştır (Schäfer vd., 2017). Temizlenmesi zor yüzeyler ve kör noktalar sanitasyon döngüsü sonunda temizlenemez ve bu yüzeyler mikroorganizmalar için uygun bir barınak haline gelir. Temizlenebilirliği daha iyi değerlendirmek ve iyileştirmeleri belirlemek için, sanitasyon süreci boyunca gözlem yapılması ve mikrobiyolojik analizlerle sonuçların değerlendirilmesi olası noktaların elimine edilmesini sağlar (Innovation Center for U.S. Dairy, 2015). Özellikle gıdaya temas eden ekipman yüzeylerinin pürüzsüz olması temizliğin etkinliğini artırır (NSW Government, 2016). Ekipman yerleşiminin yere ve giderlere çok yakın konumlandırılması, yer temizliği sırasında

drenaj sistemlerindeki sıvı seviyesinin artmasıyla birlikte kontaminasyona neden olmakta ve *L. monocytogenes* kontrolünü zorlaştırmaktadır (Tompkin, 2002). Ekipmanlardaki çatlaklar, uygun olmayan kaynak işleri, aşınmış contalar temizlik ve dezenfeksiyon sonrasında organik madde barındırmakta ve bu nedenle periyodik makine bakımları ile olası *L. monocytogenes* yaşama alanları yok edilebilmektedir (Codex Alimentarius Commission, 2007).

Bölgesel Ayrımın Yapılması

İşletmenin hijyenik bölgelere ayrılması, çapraz bulaşmanın önlenmesinde hayati bir gerekliliktir. Düşük ve yüksek riske sahip bölgelerin fiziksel ayrımı ile *L. monocytogenes*'in taşınması engellenebilmektedir. Bu bölgelere göre personel, malzeme, ekipman ve ürün akışını yönetmek, çapraz kontaminasyon potansiyelini önemli ölçüde azaltır (Fox vd., 2015; Innovation Center for U.S. Dairy, 2015). Çiğ ve hazır bitmiş ürünler, üretim alanları ve depolarda fiziksel olarak ayrılmalıdır. Bitmiş ürünün imalatı ile ilgili gıda ekipmanlarının yıkama alanları, bitmiş ürün işleme alanından ayrı bir yerde bulunmalıdır. Su varlığı *L. monocytogenes*'in gelişimini ve yayılmasını arttırdığından, hazır ürünlerin çevreye maruz bırakıldığı odalar mümkün olduğu kadar kuru kalacak şekilde tasarlanmalıdır. Kap, palet, araba, forklift ve mobil raflar çapraz bulaşmayı en aza indirmek için çiğ ürünün bulunduğu bölgede ve bitmiş ürün alanlarında sabit olarak kullanılmalı, yüksek riskli alandan düşük riskli alana geçiş engellenmelidir. Bunun pratik olmadığı durumlarda, bitmiş ürün alanına girmeden önce temizlenmeli ve dezenfekte edilmelidirler. Çiğ ürünlerin bulunduğu bölgede kullanılan temizleme ekipmanları ile hazır ürünlerin bulunduğu bölgedeki temizleme ekipmanları ayrılmış olmalı ve renk veya tanımlamalar ile kolaylıkla ayırt edilebilmelidir (Codex Alimentarius Commission, 2007).

Temizlik ve Sanitasyon Programları

İşletmedeki tüm ekipmanları ve yüzeyleri kapsayacak temizlik ve sanitasyon programları hazırlanmalıdır. Bu prosedürler, kullanılacak kimyasalların adları ve türlerini, işlemin nasıl ve kim tarafından yapılacağını, temizliğin sıklığını

içermelidir (Schäfer vd., 2017). Kimyasallar, tavsiye edilen konsantrasyon, süre ve sıcaklıkta uygulanmalıdır. Genel olarak, dezenfektanlar etkisiz bir temizleme prosedürünün ardından bir yüzeyde kalan biyofilm matrisine nüfuz edemez ve bu nedenle yaşayan hücrelerin tamamı işletmeden arındırılamaz. Temizlik, gıda işleme ekipmanlarının *L. monocytogenes* istilasına karşı korumada ilk adımdır ve büyük önem taşımaktadır. Temizleme işlemi, yüzeye bağlı mikroorganizmaların %90'ını ortamdan uzaklaştırır ancak onları öldürmek için yeterli bir uygulama değildir. Bu nedenle temizleme sonrası dezenfeksiyon uygulanması önerilmektedir (Simoes, 2010).

Personel Hijyeni ve Eğitimi

Sağlıklı yetişkinlerin %1-10'unun *L. monocytogenes* taşıyıcısı olduğu belirtilmiştir. Uygun olmayan el yıkama veya kirli iş elbiseleri gibi personel uygulamaları, gıda ve ekipmanın *L. monocytogenes* ile çapraz bulaşmasına neden olabilir (Lakicevic ve Nastasijevic, 2017; Strydom vd., 2016). Gıda işlemede çalışan personelin yanı sıra yardımcı işletme çalışanları ve bakım personellerinin de aynı bilince sahip olmaları gerekmektedir. Aarnisolo ve ark. (2006) bakım personelinin işlerinin doğası gereği gıda işleme çevresi için potansiyel kontaminasyon kaynağı olduklarını ve yeterli hijyen eğitimleri almadıklarını belirtmişlerdir. Etkili bir *L. monocytogenes* kontrol programı için, her bir çalışanın program içindeki rolünü iyi anlaması gerekir. Çalışanların iş birliği yapmadığı veya neler yapması beklendiğini anlamadıkları bir ortamda kontrol stratejileri belirlenmiş olsa da uygulanma başarısı beklenmemelidir. Personel eğitimi, işletmede çalışan tüm personeli kapsayan *L. monocytogenes*'in öneminin anlatıldığı temel eğitimden başlamalıdır. Bitmiş ürün ortamında çalışan personel için ise çapraz kontaminasyonun nasıl önleneceğini anladıkları eğitim verilmelidir. Ayrıca temizlik ve sanitasyon faaliyetlerini birebir yürüten personelin *Listeria* kontaminasyonunu azaltmak ya da ortadan kaldırmak için dikkat etmeleri gerekenleri anlatan bir eğitim mücadele için faydalı olacaktır (Hicks vd., 2004).

Sıcaklık ve Nem Kontrolü

Çevre sıcaklığı hem gıda güvenliği hem de çalışan sağlığı ve güvenliği için önemlidir. Bu nedenle uygulamalar, çalışan rahatlığı ve gıda güvenliği ile bağlantılı olarak yapılmalıdır. Özellikle yüksek riskli bölgeler olarak adlandırılan işleme, hazırlama ve paketlemenin yapıldığı ortamlarda ideal sıcaklık olarak 10°C önerilmektedir. Bu sıcaklığın *L. monocytogenes* gelişimine izin verdiği ancak gelişimi geciktirdiği tespit edilmiştir. Ayrıca 10°C'den daha düşük sıcaklıklarda çalışan sağlığı riske gireceğinden, bazı tedbirler alınması gerekmektedir (Food Safety Authority of Ireland, 2005). Sıcaklık (4°C, 10°C ve 21°C) ve nem oranının (%11, %50 ve %85) *L. monocytogenes* üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmada, düşük sıcaklık ve %50 nem içeriğine sahip ortamlarda bakteri gelişiminin arttığı ancak düşük nem içeriğinde (%11) tüm sıcaklıklarda *L. monocytogenes* sayısının azaldığı belirtilmiş, işletmelerin nem kontrolüne yeteri kadar önem vermediği ifade edilmiştir (Redfern ve Verran, 2017).

Hava ve Su Kalitesinin Kontrolü

İşletmede hava; kurutma, karıştırma, paketlenme, taşıma, temizlik ve makinenin çalışması için gerekli olan sistemlerde kullanılmaktadır. Doğrudan gıdaya temas edecek havanın filtrelerden geçirilerek verilmesi ve yüksek riskli alanlar olarak belirtilen bitmiş ürün alanlarında pozitif basınçlı ortam yaratılması önerilmektedir (Food Safety Authority of Ireland, 2005). Mekanik aksamalarda kullanılan basınçlı hava *L. monocytogenes* kontaminasyon kaynağı olarak tanımlanmıştır. Bu nedenle basınçlı havanın kullanımı sınırlandırılmalı ve havanın mikrobiyolojik gelişmeyi en aza indirecek kurulukta olması gerekmektedir (Tompkin, 2002). Ürün proseslerinde girdi olarak ve gıdaların hazırlanmasında kullanılan su içilebilir nitelikte olmalıdır. Tesisin içine girecek suyun içilebilir kalitede olmadığı durumlarda, kullanımdan önce suya uygun işlemler uygulanmalıdır (Food Safety Authority of Ireland, 2005).

Kontrolün Doğrulanması

L. monocytogenes saprofit yaşam biçimi nedeniyle gıda işleme çevresinde oldukça fazla bulunmaktadır. İşletmede hijyen bariyer uygulamaları

aşıldığında *L. monocytogenes* kontaminasyonu tetiklenebilir (Muhterem-Uyar vd., 2015). Etkili Patojen Çevre İzleme (PEM) programları, *Listeria* kontrol programlarının ve stratejilerinin etkinliğini izlemeye, tesis tasarımının ve altyapının ürünlerin güvenli bir şekilde üretimini ve taşınmasını destekleyip desteklemediğini belirlemeye yardımcı olur. Genel izleme sağlamanın yanı sıra etkili PEM programları tesislerdeki belirli sorunlu bölgelerin belirlenmesini sağlar (Simmons ve Wiedmann, 2017). Çevresel patojen izleme programının, kontrolü değerlendirmede özellikle de bir proses kontrol bakışı ile yaklaşıldığında, daha iyi ve daha uygun maliyetli bir ölçüt olduğuna karar verilmiştir. İdeal olarak, veriler olası bir kontrol kaybını belirten eğilimleri saptamak ve zamanında düzeltici eylemler gerçekleştirmek için kullanılır (Fox vd., 2015). Bazı kılavuzlar ve literatür çalışmaları, gıdaya temas eden ve etmeyen tüm ekipman ve alanlar için örnekleme bölgelerinin oluşturulmasını önermektedirler. Genellikle, çevresel örnekleme alanları dört bölge; (i) gıdaya temas eden yüzeyler, (ii) gıdaya temas etmeyen ancak gıdaya temas eden yüzeylere yakın yüzeyler, (iii) işlenmiş ürün alanında bulunan ancak gıda veya gıda ile temas eden yüzeylerin yakınında olmayan yüzeyler, (iv) işlenmiş ürünün maruz kaldığı alanın dışındaki yüzeyler olarak sınıflandırılmaktadır (Simmons ve Wiedmann, 2017).

Bir örnekleme programının nihai hedefi, ürün temas yüzeyi örneklerinin hepsinin olumsuz (*Listeria* negatif) sonuçlar vermesi için çevreyi kontrol etmektir. Eğer *Listeria* pozitif bir sonuç alınırsa düzeltici önlem alınmalıdır. Etkili bir kontrol programı ile tespit edilen pozitif sonuçlar "başarı" olarak değerlendirilmelidir, çünkü izleme programının etkili olduğunu, sorunun düzeltilebileceğini ve tüketicinin korunmasının sağlanabileceğini gösterir. Bu aşamada üretim alanı ve ekipman düzenini gösteren basit bir harita, pozitif sonuçların işaretlenerek bulaşma kaynağının tespit edilmesinde yararlı olmaktadır. Önleyici faaliyet olarak pozitif numunenin kaynağı olan ekipman sökülmesi, temizlenmesi ve sanite edilmelidir (Muhterem-Uyar vd., 2015, Tompkin, 2002).

LISTERIA MONOCYTOGENES İLE MÜCADELEDE YENİ YAKLAŞIMLAR

Gıda kaynaklı hastalıklara neden olan *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter* gibi önde gelen patojenler biyofilm oluşturabilme yeteneğine sahiptir ve gıda endüstrisinde önemli bir güvenlik sorunu teşkil eder. Biyofilm oluşumunu önlemede, doğal maddeler, çekirdek algılama inhibisyonu, ultrason, UV-C radyasyon, soğuk oksijen plazması, bakterisidal kaplama ve bakteriyofajlar gibi sayısız fiziksel, kimyasal ve biyolojik strateji önerilmiştir. Ancak bu yöntemlerin etkinliği sınırlı olmakla birlikte, tekniklerden çoğu maliyet ve uygulama zorluğu açısından endüstriye uygun değildir. Yine de bu yöntemler arasında bakteriyofaj uygulaması gıda ve temas eden yüzeylerde biyofilm oluşumunu yok etmede en etkili yöntemler arasında değerlendirilmektedir (Sadekuzzaman vd., 2017; Hong vd., 2015). Fermente ürünler üretiminde bakteriyofajlar risk olarak görülse de, bakteriyofaj preparatları FDA tarafından GRAS (Generally Recognized As Safe) statüsünde değerlendirilmektedir (Hagens ve Loessner, 2010). Bakteriyofaj tekniği farklı depolama koşullarında da etkilidir ve gıdanın aromasını ve besleyici değerlerini değiştirmemektedir. Ticari bakteriyofaj preparatları (ListShield™, Salmo Fresh™, EcoShield™, Listex™) Amerika, Kanada, Avustralya'da işletme çevresinin ve ekipmanların patojenden arındırılması amacıyla kullanılmaktadır (Yang vd., 2017). Sadekuzzaman ve ark. (2017) tarafından 1.0×10^8 PFU/mL ListShield™'in marul, paslanmaz çelik ve kauçuk malzemelerdeki etkinliğinin değerlendirildiği çalışmada, 2 saat sonunda tüm yüzeylerde inaktivasyonun kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirtilmiştir. Bir başka çalışmada, ListShield™ ve Listex™ P100 bakteriyofaj preparatlarının kurutulmuş jambon ve paslanmaz çelik yüzeylerdeki biyofilm lizasındaki etkinlikleri değerlendirilmiş ve ListShield™'nin incelenen *L. monocytogenes* suşlarının %100'ünün lizasında etkili iken, Listex™ P100'ün sadece %64'ünde etkili olduğu tespit edilmiştir (Gutiérrez vd., 2017).

Diğer bir biyokontrol stratejisi ise enzim temeline dayanan kimyasalların kullanımınıdır. Biyolojik esaslı temizleyici ya da yeşil kimyasallar olarak

adlandırılan proteolitik ve glikolitik enzimler, biyofilm oluşumunun giderilmesinde alternatif olarak görülmektedir. Özellikle bazı enzimler ile diğer uygulamaların birlikte kullanımının sinerjik etkiye sahip olduğu raporlanmıştır (Simoës, 2010). *L. monocytogenes*'in oluşturduğu biyofilme DNaz I ve proteinaz K'nın etkisinin araştırıldığı çalışmada, proteinaz K'nın DNaz I enzimine kıyasla daha etkili bir ajan olduğu ve potansiyel bir inhibitör olarak kullanılabileceği vurgulanmıştır (Nguyen ve Burrows, 2014).

Gıda patojenleri üzerine antimikrobiyel maddelerin etkili olduğu birçok çalışmada ortaya konmuştur (Lourenço vd., 2017; Oloketuyi ve Khan, 2017; Abdollahzadeh vd., 2014; Ivana vd., 2014; Stasiewicz vd., 2011). Monolaurin, laktik asit (%60), sodyum laktat (%55,7), sodyum diasetat (%4), nisin, kaprılık asidin, queso fresco (Meksika peyniri) üzerinde *L. monocytogenes* gelişiminin incelendiği çalışmada, nisin ve kaprılık asit uygulamasının en etkili yöntem olduğu, uygulamanın yapıldığı ürünlerde tüketicilerin aromada farklılık algıladıkları ancak duyuşal olarak kabul edilebilir olarak puanladıkları belirtilmiştir (Lourenço vd., 2017). Saini ve ark. (2013) laurik asidin türevi olan laurik arjantin paslanmaz çelik yüzeylerde *L. monocytogenes* gelişimi üzerine etkisini incelemişlerdir. Uygulama süresi ve konsantrasyonun etkisinin de incelendiği çalışmada, 100 ve 200 ppm laurik arjantin 5 dakika uygulamasının kontrol grubu ile benzer sayıda bakteri içerdiği, ancak 15 dakika uygulamanın kontrol grubu ile farklı olduğu tespit edilmiştir.

L. monocytogenes'in biyofilm oluşturmasını önlemek ve patojenleri ortadan kaldırmak için yeni bir yaklaşım olarak, laktik asit bakterilerinin metabolitleri olan nisin, laurisin, reuterin, pediosin, diversin, piskikolin, enterosin gibi bakteriyosinlerin birlikte ve bireysel kullanımı üzerine çalışmalar artmıştır (Aspri vd., 2017; Wu vd., 2017; Simoës, 2010). Marques ve ark. (2017) dilimlenmiş Prato peynirinde, *L. monocytogenes* kontrolünü hedefleyen, *Lactobacillus curvatus* P99 suşu tarafından üretilen bakteriyosin benzeri maddelerle biyobozunur bir filmin etkisini belirlemeyi amaçlamışlardır. Çalışmada, farklı mikroorganizmalara ve *L. monocytogenes*'e karşı,

Lactobacillus curvatus P99 suşu hücresiz süpernatantının (cell-free supernatant) etki spektrumu, minimum inhibisyon (MIC) ve bakterisidal (MBC) konsantrasyonları belirlenmiştir. P99-CFS'nin minimal bakterisidal konsantrasyonunu içeren filmin, "Prato" peyniri dilimlerinde *L. monocytogenes* Scott A'nın kontrolünde etkili olduğu ve 30 günlük aktivitenin devam ettiği belirtilmiştir.

Taze yiyeceklerde patojen inhibisyonu için, klorlu su, organik asitler, UV-C radyasyon ve ultrason gibi ısı olmayan uygulamalar önerilmektedir. Ancak tüketicinin kimyasal ajanlara karşı artan endişesi nedeniyle, doğal antimikrobiyel ajanlara ilgi artmıştır. Aspir tohumu ekstraktının taze marul üzerine aşılınmış *L. monocytogenes* inaktivasyonundaki etkisinin araştırıldığı çalışmada, *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, ve *S. aureus* arasında en yüksek antimikrobiyel etkinin *L. monocytogenes* üzerinde olduğu belirtilmiş ve gıda endüstrisine *L. monocytogenes* ile mücadelede yeni antimikrobiyel ajan olarak önerilmiştir (Son vd., 2017). Sosis yüzeyinin kitosan matrisli fitokimyasallar ile kaplandığı çalışmada, et yüzeyinde hayatta kalmak için kritik olan *L. monocytogenes* genlerinin lipid oksidasyonunu ve ifadesini azalttığı belirlenmiş ve fitokimyasalların etkili bir proses sonrası antimikrobiyel kaplama olarak kullanılabilceği ifade edilmiştir (Upadhyay vd., 2015).

Ohmik ısıtma ve çeşitli uçucu yağ bileşenlerinin birlikte ve ayrı ayrı kullanımının bazı patojenler üzerindeki etkisinin incelendiği çalışmada, ohmik ısıtma + sitral'in *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium* ve *L. monocytogenes* inaktivasyonunda sinerjik etkisinin olduğu ancak ohmik ısıtma+ timolun *L. monocytogenes* üzerinde herhangi bir sinerjik etkinin bulunmadığı tespit edilmiştir (Kim ve Kang, 2017).

Amerika Birleşik Devletleri'nde 1997 yılında GRAS statüsü altında değerlendirilen ozon gazı, FDA tarafından 2001 yılında gıda ürünleriyle doğrudan temas için resmi olarak onaylanmıştır (Vaz-Velho vd., 2006). *L. monocytogenes* inoküle edilmiş çavdar tohumlarına 20 dakika süreyle $21.3 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyona sahip sulandırılmış

ozonun 1.48 log KOB/g azalma sağladığı belirtilmiştir (Khan vd., 2016).

Yüksek basınç uygulaması gıdayı mikroorganizmalardan arındırmada etkili bir yöntem olarak görülmektedir. Lucore ve ark. (2000) dokuz dakikanın üzerinde 300, 500 ve 700 MPa yüksek basınç uygulamasının *L. monocytogenes* sayısını sırasıyla 1, >3 ve >5 log azalttığını tespit etmişlerdir. Tüketime hazır gıdalar için 2009 yılından itibaren ticari olarak yüksek basınç uygulaması kullanılmaya başlanmıştır (Khan vd., 2016).

Gıda işlemede ısı uygulamalar çoğu patojeni etkisiz hale getirmekle birlikte, ısı işlem her yüzey ve ambalaj için uygulanabilir olmadığından, iyonize radyasyon, ultraviyole, atmosfer basınçlı plazma gibi yöntemler geliştirilmiştir (Mikš-Krajnik vd., 2017). Bunlara ilave olarak, günümüzde yüzey sterilizasyonunda yeni ve umut verici bir yaklaşım olan fotosensitizasyon ile patojen inhibisyonu için çalışmalar devam etmektedir. Fotosensitizasyon ile hücre zarı bozulması, enzim inaktivasyonu veya DNA hasarına neden olan fotokimyasal reaksiyonlar indüklenir ve bu, mikroorganizmanın inaktivasyonu ile sonuçlanır. Luksiene ve ark. (2011), suda çözünebilir bir katkı maddesi olan (E140) N-klorofilin (Na-Chl)'in *L. monocytogenes* ATCL3C 7644 ve *B. cereus* ATCC 12826 üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Bakterilerin 2 dakika 7.5×10^{-7} M konsantrasyon Na-klorofilin ile müdahalesi sonucunda, 7 log azalma tespit edilmiştir. Aynı çalışmada *L. monocytogenes*'in *B. cereus*'a göre fotosensitizasyona daha duyarlı olduğu belirtilmiştir.

SONUÇ

Gıda işlemede *L. monocytogenes* ile mücadelede farklı uygulamaların antilisterial potansiyelleri de farklı olmaktadır. Gıda ortamının kimyasal bileşimi, fiziksel durumu, gıda matrisi gibi değişkenler, seçilen yöntemin başarısını etkilemektedir. Bu nedenle yeni ve umut verici alternatif mücadele yöntemlerinin gerçek gıda sistemlerinde uzun bir süre denenmesi, üreticiden ve tüketiciden gelen olumsuz geri bildirimlerin değerlendirilmesi gibi uygulamaların bir gereklilik olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aarnisalo, K., Tallavaara, K., Wirtanen, G., Maijala, R., Raaska, L. (2006). The Hygienic Working Practices of Maintenance Personnel and Equipment Hygiene in the Finnish Food Industry. *Food Control*, 17: 1001-1011, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.07.006>
- Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., Hosseini, H. (2014). Antibacterial Activity of Plant Essential Oils and Extracts : The Role of Thyme Essential Oil , Nisin and Their Combination to Control *Listeria monocytogenes* Inoculated in Minced Fish Meat. *Food Control*, 35(1): 177-183, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.004>.
- Aspri, M., Field, D., Cotter, P. D., Ross, P., Hill, C., Papademas, P. (2017). Application of Bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* Isolated from Donkey Milk , in the Bio-control of *Listeria monocytogenes* in Fresh Whey Cheese. *Int Dairy J*, 73: 1-9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.04.008>.
- Buchanan, R. L., Gorris, L. G. M., Hayman, M. M., Jackson, T. C., Whiting, R. C. (2017). A Review of *Listeria monocytogenes*: An Update on Outbreaks, Virulence, Dose-response, Ecology and Risk Assessments. *Food Control*, 75: 1-13, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.016>.
- Ciccio, P. D., Meloni, D., Festino, A. R., Conter, M., Zanardi, E., Ghidini, S., Vergara, A., Mazzette, R., Ianieri, A. (2012). Longitudinal Study on the Sources of *Listeria monocytogenes* Contamination in Cold-smoked Salmon and its Processing Environment in Italy. *Int J Food Microbiol*, 158: 79-84, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.016>.
- Codex Alimentarius Commission. (2007). Guidelines on the Application of General Principles of Food Hygiene to the Control of *Listeria monocytogenes* in Foods. Retrieved from http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10740/CXG_061e.pdf (Accessed 13 October 2017)
- Cutter, C., McElroy, D., Penn, S. (2006). Control of *Listeria monocytogenes* in Retail Establishments. USDA Food Safety and Inspection Service and the Association of Food and Drug Officials, Pennsylvania, Penn State, 4-19.
- Fernanda, B. dos R. T., Virgínia, F. A., Elaine, C. P. de M. (2017). Growth, Viability and Architecture of Biofilms of *Listeria monocytogenes* Formed on Abiotic Surfaces. *Braz J Microbiol*, 48(3): 587-591, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.004>.
- Food Safety Authority of Ireland. (2005). The Control and Management of *Listeria monocytogenes* Contamination of Food. Dublin. Retrieved from https://www.fsai.ie/resources_publications.html (Accessed 05 October 2017).
- Fox, E. M., Wall, P. G., Fanning, S. (2015). Control of *Listeria* Species Food Safety at a Poultry Food Production Facility. *Food Microbiol (Lond)*, 51: 81-86, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.05.002>.
- Gutiérrez, D., Rodríguez-Rubio, L., Fernández, L., Martínez, B., Rodríguez, A., García, P. (2017). Applicability of Commercial Phage-based Products against *Listeria monocytogenes* for Improvement of Food Safety in Spanish Dry-cured Ham and Food Contact Surfaces. *Food Control*, 73: 1474-1482. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.007>.
- Hagens, S., Loessner, M. J. (2010). Bacteriophage for Biocontrol of Foodborne Pathogens : Calculations and Considerations. *Curr Pharm Biotechnol*, 11(1): 58-68, <http://dx.doi.org/10.2174/138920110790725429>.
- Hamed, H., Razavi-Rohani, S. M., Gandomi, H. (2014). Combination Effect of Essential Oils of Some Herbs with Monolaurin on Growth and Survival of *Listeria monocytogenes* in Culture Media and Cheese. *J Food Process Preserv*, 38: 304-310, <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2012.00778.x>.
- Hammons, S. R., Oliver, H. F. (2014). *Listeria monocytogenes*, Listeriosis and Control Strategies : What the Retail Deli and Food Safety Manager Need to Know. In J. Farber, J. Crichton, & P. J. Snyder (Eds.), In Retail Food Safety (1st ed., pp. 43-58). New York: Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1550-7>.

- Hicks, D., Wiedmann, M., Scott, V. N., Collette, R., Jahncke, M. L., Gall, K. (2004). Minimizing *Listeria* Contamination in Smoked Seafood: Training Plant Personnel. *Food Prot Trends*, 24(12): 953-960.
- Hong, Y., Choi, S. T., Lee, B. H., Conway, W. S. (2015). Combining of Bacteriophage and *G. asaii* Application to Reduce *L. monocytogenes* on Honeydew Melon Pieces. *Food Technol*, 3: 115-122.
- Innovation Center for U.S. Dairy. (2015). Control of *Listeria monocytogenes*. <http://www.idfa.org/docs/default-source/resource-library/guidance-for-the-us-dairy-industry-10-19-15.pdf> (Accessed: 12 September 2017)
- Ivana, S., Purkatova, S., Kosova, M., Mihulova, M., Švirakova, E., Demnerova, K. (2014). Antilisterial Activity of Lactic Acid Bacteria against *Listeria monocytogenes* Strains Originating from Different Sources. *Czech J Food Sci*, 32(2): 145–151.
- Khan, I., Khan, J., Miskeen, S., Tango, C. N., Park, Y. S., Oh, D. H. (2016). Prevalence and Control of *Listeria monocytogenes* in the Food Industry – A Review. *Czech J Food Sci*, 34(6): 469-487, <https://doi.org/10.17221/21/2016-CJFS>.
- Kim, S., Kang, D. (2017). Combination Treatment of Ohmic Heating with Various Essential Oil Components for Inactivation of Food-borne Pathogens in Buffered Peptone Water and Salsa. *Food Control*, 80: 29-36, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.04.001>.
- Lakicevic, B., Nastasijevic, I. (2017). *Listeria monocytogenes* in Retail Establishments: Contamination Routes and Control Strategies *Listeria monocytogenes* in Retail Establishments: Contamination. *Food Rev Int*, 33(3): 247-269, <http://dx.doi.org/10.1080/87559129.2016.1175017>.
- Lakicevic, B., Nastasijevic, I., Raseta, M. (2015). Sources of *Listeria monocytogenes* Contamination in Retail Establishments. *Italian Oral Surgery*, 5(1): 160-163, <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2015.09.046>.
- Lee, S. H., Barancelli, G. V., de Camargo, T. M., Corassin, C. H., Rosim, R. E., da Cruz, A. G., Cappato, L. P., de Oliveira, C. A. F. (2017). Biofilm-producing Ability of *Listeria monocytogenes* Isolates from Brazilian Cheese Processing Plants. *Food Res Int*, 91: 88-91, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.039>.
- Leong, D., Alvarez-ordóñez, A., Jooste, P., Jordan, K. (2016). *Listeria monocytogenes* in Food: Control by Monitoring the Food Processing Environment. *Afr J Microbiol Res*, 10(1): 1-14, <https://doi.org/10.5897/AJMR2015.7832>.
- Leong, D., Nicaogáin, K., Luque-Sastre, L., Mcmanamon, O., Hunt, K., Alvarez-Ordóñez, A., Scollard, J., Schmalenberger, A., Fanning, S., O'Byrne, C., Jordan, K. (2017). A 3-year Multi-food Study of the Presence and Persistence of *Listeria monocytogenes* in 54 Small Food Businesses in Ireland. *Int J Food Microbiol*, 249: 18-26, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.015>.
- Lourenço, A., Kamnetz, M. B., Gadotti, C., Diez-Gonzalez, F. (2017). Antimicrobial Treatments to Control *Listeria monocytogenes* in Queso Fresco. *Food Microbiol (Lond)*, 64: 47-55, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2016.12.014>.
- Luchansky, J. B., Chen, Y., Porto-fett, A. C. S., Pouillot, R., Shoyer, B. A., Rycke, R. J. E., Eblen, D. R., Holezer, K., Shaw, W. K., Doren, J. M. V., Catlin, M., Lee, J., Tikekar, R., Gallagher, D., Lindsay, J. A., Dennis, S. (2017). Survey for *Listeria monocytogenes* in and on Ready-to-Eat Foods from Retail Establishments in the United States (2010 through 2013): Assessing Potential Changes of Pathogen Prevalence and Levels in a Decade, *J Food Prot*, 80(6): 903-921, <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-420>.
- Lucore, L. A., Shellhammer, T. H., Yousef, A.E. (2000). Inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A on Artificially Contaminated Frankfurters by High-Pressure Processing, *J Food Prot*, 63(5): 662-664.
- Luksiene, Z., Paskeviciute, E. (2011). Microbial Control of Food-related Surfaces: Na-Chlorophyllin-based Photosensitization. *J Photochem Photobiol B Biol*, 105: 69-74, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.06.011>.

- Luo, L., Zhang, Z., Wang, H., Wang, P., Lan, R., Deng, J., Miao, Y., Wang, Y., Wang, Y., Xu, J., Zhang, L., Sun, S., Liu, X., Zhou, Y., Chen, X., Li, Q., Ye, C. (2017). A 12-month Longitudinal Study of *Listeria monocytogenes* Contamination and Persistence in Pork Retail Markets in China. *Food Control*, 76: 66-73, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.037>.
- Marques, J. L., Funck, G. D., Dannenberg, G. da S., Cruzen, C. E. dos S., Halal, S. L. M. El, Dias, A. R. G., Fiorentini, A. M., Silva, W. da P. (2017). Bacteriocin-like Substances of *Lactobacillus curvatus* P99: Characterization and Application in Biodegradable Films for Control of *Listeria monocytogenes* in Cheese. *Food Microbiol*, 63: 159-163, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.008>
- Meat and Livestock Australia. (2006). *Listeria monocytogenes* in Smallgoods: Risks and Controls. Meat and Livestock Australia Limited. Sydney. Retrieved from <https://www.mla.com.au/research-and-development/search-rd-reports/final-report-details/Product-Integrity/Listeria-monocytogenes-in-smallgoods-risks-and-controls/2328>, (Accessed 12 July 2017)
- Melo, J., Andrew, P. W., Faleiro, M. L. (2015). *Listeria monocytogenes* in Cheese and the Dairy Environment Remains a Food Safety Challenge: The Role of Stress Responses. *Food Res Int*, 67: 75-90, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.10.031>.
- Mikš-Krajnik, M., Feng, L. X. J., Bang W. S., Yuk, H.-G. (2017). Inactivation of *Listeria monocytogenes* and Natural Microbiota on Raw Salmon Fillets Using Acidic Electrolyzed Water, Ultraviolet Light or / and Ultrasounds. *Food Control*, 74: 54-60, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.033>.
- Muhterem-Uyar, M., Dalmasso, M., Bolocan, A. S., Hernandez, M., Kapetanakou, A. E., Kuchta, T., Manios, S. G., Melero, B., Minarovicova, J., Nicolau, A. I., Rovira, J., Skandamis, N. P., Jordan, K., Rodriguez-Lazaro, D., Stessl, B., Wagner, M. (2015). Environmental Sampling for *Listeria monocytogenes* Control in Food Processing Facilities Reveals Three Contamination Scenarios. *Food Control*, 51: 94-107, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.042>.
- Nguyen, U. T., Burrows, L. L. (2014). DNase I and Proteinase K Impair *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation and Induce Dispersal of Preexisting Biofilms. *Int J Food Microbiol*, 18: 26-32, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.025>
- Nowak, J., Cruz, C. D., Tempelaars, M., Abee, T., Vliet, A. H. M. Van, Fletcher, G. C., Hedderley, D., Palmer, J., Flint, S. (2017). Persistent *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Mussel Production Facilities form More Biofilm but are not Linked to Specific Genetic Markers. *Int J Food Microbiol*, 256: 45-53, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.024>
- NSW Government. (2016). Controlling *Listeria monocytogenes* in the Food Processing Environment. Newington.
- Oloketuyi, S. F., Khan, F. (2017). Inhibition Strategies of *Listeria monocytogenes* Biofilms Current Knowledge and Future Outlooks, *J Basic Microbiol*, 9999: 1-16, <https://doi.org/10.1002/jobm.201700071>.
- Redfern, J., Verran, J. (2017). Effect of Humidity and Temperature on the Survival of *Listeria monocytogenes* on Surfaces, *Lett Appl Microbiol*, 64: 276-282, <https://doi.org/10.1111/lam.12714>.
- Rodrigues, C. S., Cláudia, R., Cordeiro, C. V. G., Melo, C. B., (2017). An Overview of *Listeria monocytogenes* Contamination in Ready to Eat Meat, Dairy and Fishery Foods. *Cienc Rural*, 47(2): 1-8, <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160721>.
- Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, Md. F. R., Kim, H.-S., Ha, S.-D. (2017). Effectiveness of a Phage Cocktail as a Biocontrol Agent Against *L. monocytogenes* Biofilms. *Food Control*, 78: 256-263, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.10.056>.
- Saini, J. K., Barrios, M. A., Marsden, J. L., Getty, K. J. K., Fung, D. Y. C. (2013). Efficacy of Antimicrobial Lauric Arginate against *Listeria monocytogenes* on Stainless Steel Coupons. *Adv Microbiol*, 3(1): 65-68, <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2013.31010>.

- Schäfer, D. F., Steffens, J., Barbosa, J., Zeni, J., Paroul, N., Valduga, E., Junges, A., Backes, G. T., Cansian, R. L. (2017). Monitoring of Contamination Sources of *Listeria monocytogenes* in a Poultry Slaughterhouse. *LWT - Food Sci Technol*, 86: 393-398, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.024>.
- Schöbitz, R., González, C., Villarreal, K., Horzella, M., Nahuelquín, Y., Fuentes, R. (2014). A Biocontroller to Eliminate *Listeria monocytogenes* from the Food Processing Environment. *Food Control*, 36: 217-223, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.017>.
- Simmons, C. K., Wiedmann, M. (2017). Identification and Classification of Sampling Sites for Pathogen Environmental Monitoring Programs for *Listeria monocytogenes*: Results from an Expert Elicitation. *Food Microbiol (Lond)*, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.005>.
- Simoes, M., Simoes, L. C., Vieira, M. J. (2010). A Review of Current and Emergent Biofilm Control Strategies. *LWT - Food Sci Technol*, 43: 573-583, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.12.008>.
- Son, H., Kang, J., Song, K. B. (2017). Antimicrobial Activity of Safflower Seed Meal Extract and its Application as an Antimicrobial Agent for the Inactivation of *Listeria monocytogenes* Inoculated on Fresh Lettuce. *LWT - Food Sci Technol*, 85: 52-57, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.063>.
- Stasiewicz, M. J., Wiedmann, M., Bergholz, T. M. (2011). The Transcriptional Response of *Listeria monocytogenes* during Adaptation to Growth on Lactate and Diacetate Includes Synergistic Changes That Increase Fermentative Acetoin Production. *Appl Environ Microbiol*, 77(15): 5294-5306, <https://doi.org/10.1128/AEM.02976-10>.
- Strydom, A., Vorster, R., Gouws, P. A., Witthuhn, R. C. (2016). Successful Management of *Listeria* spp. in an Avocado Processing Facility. *Food Control*, 62: 208-215, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.043>.
- Tompkin, R. B. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* in the Food-Processing Environment, *J Food Prot*, 65(4): 709-725.
- Upadhyay, A., Upadhyaya, I., Karumathil, D. P., Yin, H., Nair, M. S., Bhattaram, V., Chen, C., Flock, G., Mooyottu, S., Venkitanarayanan, K. (2015). Control of *Listeria monocytogenes* on Skinless Frankfurters by Coating with Phytochemicals. *LWT - Food Sci Technol*, 63: 37-42, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.100>.
- Vaz-Velho, M., Silva, M., Pessoa, J., Gibbs, P. (2006). Inactivation by Ozone of *Listeria innocua* on Salmon-trout during Cold-smoke Processing, *Food Control*, 17: 609-616, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.03.007>.
- Välilä, A. L., Tilsala-Timisjärvi, A., Virtanen, E. (2015). Rapid Detection and Identification Methods for *Listeria monocytogenes* in the Food Chain- A Review. *Food Control*, 55: 103-114, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.037>.
- Weller, D., Andrus, A., Wiedmann, m., den Bakker, H. C. (2015). *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from Food Processing Environments in the USA. *Int J Syst Evol Microbiol*, 65(1): 286-292, <http://dx.doi.org/10.1099/ij.s.0.070839-0>.
- World Health Organization, States, F. and A. O. of the U. (2004). Risk Assessment of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-eat Foods. Rome. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/010/y5394e/y5394e00.htm> (Accessed 02 August 2017).
- Wu, S., Yu, P. L., Flint, S. (2017). Persister Cell Formation of *Listeria monocytogenes* in Response to Natural Antimicrobial Agent Nisin. *Food Control*, 77: 243-250, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.011>.
- Yang, S., Sadekuzzaman, M., Ha, S.-D (2017). Treatment with Lauric Arginate Ethyl Ester and Commercial Bacteriophage, Alone or in Combination, Inhibits *Listeria monocytogenes* in Chicken Breast Tissue. *Food Control*, 78: 57-63, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.021>.
- Zhu, Q., Gooneratne, R., Hussain, M. A. (2017). *Listeria monocytogenes* in Fresh Produce: Outbreaks, Prevalence and Contamination Levels. *Foods*, 6(3): 1-11, <https://doi.org/10.3390/foods6030021>.

MARAŞ TARHANASI ÜRETİMİNDE KEFİR KULLANIMININ SON ÜRÜN ÜZERİNE ETKİLERİ

Hakan Erinç*, Selma Çifçi

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Niğde, Türkiye

Geliş / Received: 26.11.2017; Kabul / Accepted: 15.12.2017; Online baskı / Published online: 27.12.2017

Erinç, H., Çifçi, S. (2018). Maraş tarhanası üretiminde kefir kullanımının son ürün üzerine etkileri. GIDA (2018) 43 (1): 114-121 doi: 10.15237/gida.GD17105

ÖZ

Sunulan bu çalışmada Maraş tarhanası üretiminde yoğurda alternatif olarak kefir kullanılmış olup son ürünün bazı kimyasal ve tekstürel özellikleri ile antioksidan kapasiteleri ve toplam fenolik madde içerikleri karşılaştırılmıştır. Kimyasal analizler sonucunda yoğurda alternatif olarak kefir kullanımı ile pH, kül, nem, yağ ve protein miktarlarında önemli bir değişim gözlenmemiştir ($P > 0.05$). Ancak toplam asitlik miktarında önemli bir azalma (yoğurtlu %11.23, kefirli %7.63) gözlenmiştir ($P < 0.05$). Diğer taraftan tekstürel özelliklerden çıtırılık (yoğurtlu 105.98 g, kefirli 82.01 g) ve sertlik (yoğurtlu 506.21 ± 35.880 g, kefirli 276.72 ± 15.558 g) değerlerinde önemli bir azalma gözlenirken ($P < 0.05$), kırılganlık (yoğurtlu 1.04 mm, kefirli 1.06 mm) değerleri benzerlik göstermiştir ($P > 0.05$). Ayrıca yoğurda alternatif olarak kefir kullanımı ile son ürünün antioksidan kapasitesinde önemli bir artış (yoğurtlu 0.78 ± 0.031 μmol troloks/g, kefirli 0.85 ± 0.048 μmol troloks/g) olduğu belirlenmiştir ($P < 0.05$). Sonuç olarak antioksidan kapasitesi dolayısıyla raf ömrü daha uzun bir ürün elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Maraş tarhanası, kefir, toplam fenolik madde, antioksidan kapasite, tekstür

THE EFFECTS OF KEFIR USAGE ON PROPERTIES OF TARHANA CIPS

ABSTRACT

In this study, kefir was used instead of yoghurt in the production of tarhana cips. Some chemical and textural properties, antioxidant capacities and total phenolic content of the final product were compared. No significant change in the amounts of pH, ash, moisture, fat and protein was observed with the use of kefir instead of yoghurt ($P > 0.05$). However, a significant decrease in total acidity (11.23% for yoghurt and 7.63% for kefir) was obtained ($P < 0.05$). Fracturability (1.04 mm for yoghurt, 1.06 mm for kefir) values were similar ($P > 0.05$); however, there were significant decreases in brittleness (105.98 g for yoghurt, 82.01 g for kefir) and hardness (yoghurt 506.21 ± 35.880 g for yoghurt, 276.72 ± 15.558 g for kefir) ($P < 0.05$). The use of kefir instead of yoghurt increased significantly the antioxidant capacity of the final product (0.78 ± 0.031 μmol trolox / g for yoghurt, 0.85 ± 0.048 μmol trolox / g for kefir) ($P < 0.05$). As a result, a product with a longer shelf life was obtained due to its antioxidant capacity.

Keywords: Tarhana cips, kefir, total phenolic compound, antioxidant capacity, texture

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ hakanerinc@hotmail.com,

☎ (+90) 388 225 4005,

☎ (+90) 388 225 0112

GİRİŞ

Tarhana ülkemizde kış mevsimi için hazırlanan yiyecekler arasında yer almaktadır. Yakın zamana kadar ülkemizde daha çok kırsal kesimlerde üretilen bir gıda ürünü olmakla birlikte son yıllarda kentsel nüfusun hızla artması, özellikle kadınların iş hayatına katılması hazır gıdalara duyulan gereksinimi artırmış ve tarhana da hazır çorbalar arasına girmiştir (Göçmen vd., 2003).

Ülkemizin birçok bölgesinde farklı üretim tekniklerine sahip olan tarhana genel olarak; yoğurt, buğday ürünü (dövme, un, irmik), ekmekek mayası (*Saccharomyces cerevisiae*), çeşitli sebze ve baharat karıştırılmasının ardından 1-7 günlük fermantasyon sürecine bırakılması, güneşte kurutulması ve sonrasında plakalar halinde kırılmasıyla elde edilmektedir (Coşkun, 2014).

Tarhana daha çok çorba olarak kullanılmakta, bununla birlikte yöreye ve üretim tekniğine bağlı olarak topak veya plaka halinde üretilip kurutulduktan sonra çerez gibi de tüketilebilmektedir (Erbaş, 2003). Ülkemizde bileşimi, yöreden yöreye değişmekte olan üretim şekli, tüketim şekli gibi bazı özellikleri yönüyle farklılıklara sahip olan tarhanaya farklı isimler verilmektedir (Dağhoğlu, 2000). TSE 2282 Tarhana Standart tebliğinde, tarhana; “Un Tarhanası”, “Göce Tarhanası”, “İrmik Tarhanası” ve “Karışık Tarhana” olmak üzere dört tipte tarif edilmiştir (TSE, 2004). Bu çeşitlerin dışında kalan bazı yörelerimizde yapılan, Kızılıcak tarhanası, Sütü tarhana gibi değişik tarhanalarda bulunmaktadır (Göçmen vd., 2003; Yücecan vd., 1988).

Maraş tarhanası değişik tüketim çeşitliliği ve fonksiyonel özelliklere sahip olması nedeniyle ihracatı yapılan tahıl esaslı geleneksel fermente bir üründür. Maraş tarhanasının yapımında genel olarak buğday yarması (dövme) ve yoğurt kullanılmaktadır. Ayrıca isteğe bağlı olarak kekik, çörekotu gibi lezzet artırıcı baharat ilave edilebilir. Diğer tarhanaların aksine Maraş tarhanasında yoğurt, pişirme aşamasında katılmayıp daha sonra karışıma ilave edilmektedir. Önce buğday dövmesi pişirilir; tarhananın aroma ve gıda değerine katkıda bulunan kekik, çörek otu

ve benzeri baharat ve yoğurt katılarak karıştırılır (Şimşekli ve Doğan, 2015). Hazırlanan karışım “çığ” adı verilen hasır benzeri sergilere serilerek kurutma işlemine tabi tutulur. Kurutma işlemi tamamlandıktan sonra çığlardan ayrılan tarhana ambalajlanır (Coşkun, 2014).

Maraş tarhanasının, pişmiş dövme yoğurdun katılması ile katma aş olarak, tarhananın yarı kurumuş hali olan firik şeklinde, kurumuş halde çerez, çorba olarak, sıcak haldeki et veya kelle suyuna ıslatılarak, yağda kızartılarak, ıslatılmış tarhana soğan ile yağda kavrulur, sıcak sac üzerinde gevretilerek vb. şekillerde çok zengin tüketim biçimleri bulunmaktadır (Yörükoğlu ve Dayısoylu, 2016).

Yakın yüzyılda bilinçsiz beslenme ve yoğun iş temposu gibi faktörler nedeniyle, hem besleyici değeri yüksek hem de hazırlama kolaylığına sahip fonksiyonel ürünlere yönelim artmıştır (Şimşekli ve Doğan, 2015). Son yıllarda bu alandaki ürün eksikliğini gidermek amacıyla yeni ürün geliştirme çalışmaları hız kazanmış, bu ürünlerin; yapı, lezzet, kabul edilebilirlik ve raf ömrü gibi özelliklerinin geliştirilmesi için yapılan çalışmalar önem kazanmıştır. Bu alanda yapılan yeni ürün geliştirme çalışmalarıyla farklı yaş gruplarına hitap eden ve atıştırmalık gıdalar veya çerez gıda ürünleri (snack foods) olarak ifade edilen fonksiyonel özelliklere sahip gıdaların tüketimi tüm dünyada zaman geçtikçe artış göstermektedir. Özellikle tatlı, yağlı cips, hamburger, pizza gibi obezite ve kalp damar hastalıklarına neden olan atıştırmalık gıdaların yerine, daha az kaloriye sahip tortilla cipsleri gibi gıda ürünleri üretilmekte ve bu ürünlerin tüketimleri günden güne artmaktadır. Maraş tarhanası tortilla cips formunda üretilen ve fonksiyonel özelliklere sahip geleneksel fermente bir tahıl ürünüdür (Özçam vd., 2012). Kahramanmaraş'ın geleneksel ürünü olan Maraş tarhanası iki temel hammadde olan buğday dövmesi ve yoğurttan oluşan bitkisel ve hayvansal proteinlerin mükemmel bir bileşimi olarak bildirilmektedir (Dayısoylu vd., 2002).

Sunulan bu çalışmada, Maraş tarhanası üretiminde geleneksel olarak kullanılan yoğurda alternatif olarak kefirin yararlanılmıştır. Kefirin insan

sağlığı açısından faydalı olması özelliği göz önünde bulundurularak Maraş tarhanasını daha faydalı hale getirmek ve Maraş tarhanasına farklı bir özellik kazandırarak yeni bir ürün elde etmek bu çalışmanın temel amaçlarıdır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

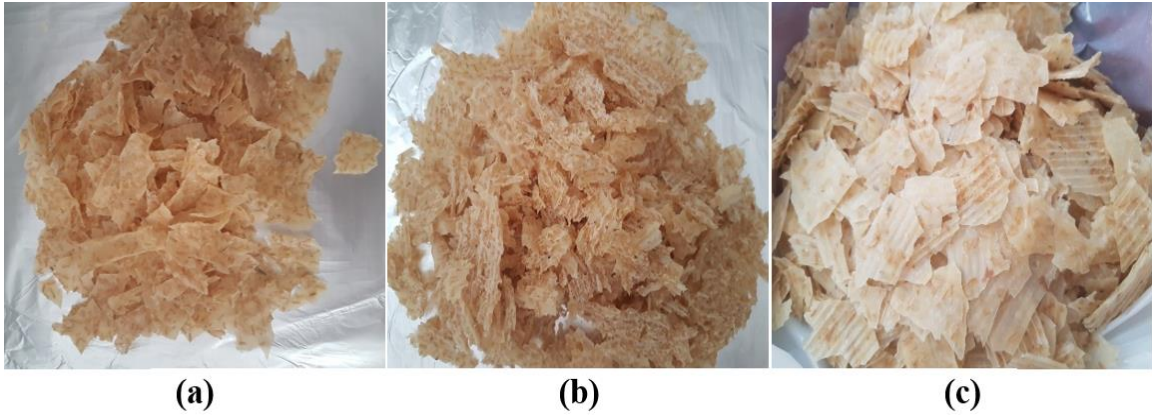
Çalışma kapsamında kullanılan ticari olarak üretilen yoğurt ve kefir yerel bir marketten, buğday dövmesi değirmenden, karşılaştırma yapabilmek amacıyla ticari Maraş tarhanası ise yerel bir marketten temin edilmiştir. Kimyasal analizlerde kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır.

Metot

Maraş tarhanası üretimi

Maraş tarhanası üretiminde Yıldırım ve Güzeler (2016) tarafından bildirilen üretim yöntemi kullanılmış olup bu amaçla 1 kg buğday dövmesi

pişirilmeden 4 saat önce suda bekletilerek hazırlanan dövmenin suyu süzülerek uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 10 L kaynar su içeren muhasara kazanının içerisine süzölmüş dövme ve 200 g tuz eklenmiş ve 2 saat pişirilmiştir. Pişirme aşamasında sürekli tahta kürek yardımıyla karıştırılmış ve daha sonra 2 saat dinlendirmeye bırakılmıştır. Buradan elde edilen dövme büyük bakır leğenlere alınarak soğuduktan sonra yoğrulmuştur. Yoğurma işlemi sırasında 1 kg ürüne yoğurtlu tarhana için 3 kg yoğurt, kefirli tarhana için ise 3 kg kefir eklenmiş ve uygun sıcaklıkta (37°C) 18 saat fermantasyona bırakılmıştır. 18 saat sonunda hazırlanan tarhanalar çığlere serilmiş ve 24 saat sonunda 3 gün güneş altında kurutularak üretilen ürünler buzdolabı poşetlerine alınarak muhafaza edilmiştir. Üretim 2 paralel olarak yapılmış olup ürünler aynı şartlar altında üretilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. (a) Yoğurtlu tarhana (b) Kefirli tarhana (c) Ticari tarhana
Figure 1. (a) Yoğurt tarhana çips (b) Kefir tarhana çips (c) Commercial tarhana çips

Nem, kül, yağ ve protein analizi

Tarhana örneklerinde nem miktarı ICC Standard Method No: 110/1, kül miktarı ICC Standard Metod No: 104/1 (ICC, 2002)'e, protein miktarı AACC Standard Method No: 46-12 (AACC, 2000)'e, yağ miktarı ise AOCS Official methods Am 2-93 (AOCS, 2003)'e göre belirlenmiştir.

pH ve asitlik derecesinin belirlenmesi

Tarhana örneklerinin pH analizinde VWR pH 1000 L (Almanya) model pH metre kullanılmıştır. Ürünlerin pH değeri ölçümü için, 10 g örnek ile

100 mL saf su karıştırılıp homojenize edildikten sonra pH ölçümü yapılmıştır (AACC, 2000). Örneklerin asitlik derecesinin belirlenmesinde ise TS 2282 Tarhana Standardı (TSE, 2004) kullanılmıştır.

Toplam fenolik bileşik içeriğinin ve antioksidan değerinin belirlenmesi

Tarhana örneklerinin toplam fenolik madde miktarları Singleton vd. (1965) tarafından belirtilen Folin-Ciocalteu yöntemine göre belirlenmiştir. Bu aşamada fenolik maddelerin

ekstrakte edilmesi amacıyla 10 g örnek üzerine 100 mL %70'lik metanol ilave edildi ve 30 dakika 25°C sıcaklıkta çalkalamalı inkübatörde bekletildi. Bu karışım buzdolabında (+4°C) 24 saat bekletildikten sonra kaba filtre kâğıdından süzüldü. Buradan elde edilen süzüntüden 250 µL alınarak, 1 mL su ve 250 µL Folin-Ciocaltue içeren tüplere ilave edildi ve daha sonra karanlıkta 6 dk bekletildi. Son aşamada ise 2.5 mL sodyum hidrojen karbonat (%7.5'lik; m/v) eklendi ve 2 saat karanlıkta bekletildi. Süre sonunda 760 nm'de okuma yapıldı ve standart gallik asit çözeltilerinden elde edilen grafikler yardımıyla hesaplamalar yapılarak sonuçlar mg GAE/100 g olarak belirlendi.

Örneklerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde ise troloks eşiti antioksidan kapasite (TEAC) yöntemi (Re vd., 1999) kullanılmıştır. Bu amaçla, 9.7 mg 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) 2.5 mL, 37.5 mg potasyum persülfat 1 mL saf suda çözüldü. Potasyum persülfat çözeltisinden 44 µL alınıp, ABTS çözeltisine ilave edildi ve karışım ABTS radikal çözeltisinin hazırlanması için 16 saat karanlıkta (25°C) bekletildi. Süre sonunda bu çözeltiden 1 mL alınıp 88 mL etanol ilave edilerek 734 nm'de 0.700 (±0.02) absorbans değeri verecek şekilde seyreltilerek çalışma çözeltisi hazırlandı. Daha sonra 300 µL örnek ile 3 mL çalışma çözeltisi karıştırıldı ve karanlıkta (25°C) 6 dakika bekletildikten sonra 734 nm'de okuma yapıldı. Standart olarak troloks kullanıldı ve sonuçlar µmol troloks/g olarak belirlendi (Re vd., 1999).

Renk değerinin belirlenmesi

Örneklerin renk analizi için Minolta CR-400 (Konica Minolta Sensing, Osaka, Japonya) renk ölçüm cihazı kullanılmış olup renk ölçümleri CIE (L*, a*, b*) renk sistemi ile ifade edilmiştir.

Tekstürel özelliklerin belirlenmesi

Tarhana örneklerinin tekstürel özelliklerinin belirlenmesinde TA-XT2i Tekstür Analiz (Stable Micro Systems Ltd, Godalming, Surrey, İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Örneklerin sertlik ve kırılganlıkları 3-point Bend Rig, çıtırılıkları ise Ottawa Cell ünitesi kullanılarak belirlenmiştir.

Sertlik ve kırılganlık analizinde kullanılan açıklık 4 cm ve test hızı 1 mm/saniye, Ottawa Cell ünitesinde ise test hızı 5 mm/saniye kullanılarak probun 4 cm derinliğine kadar örneği sıkıştırması sağlanmıştır.

İstatistik Analiz

Yapılan analizler sonucu elde edilen veriler, SPSS 15.0 paket programı kullanılarak istatistiki değerlendirmeye tabi tutulmuştur. Varyans analizi tekniği ile (ANOVA) grup ortalamaları arasındaki fark belirlenerek, bu farklılığın önem derecesi ise Duncan çoklu karşılaştırma testi yapılarak incelenmiştir ($P < 0.05$).

BULGULAR VE TARTIŞMA

Nem, kül, yağ ve protein tayini sonuçları

Yapılan analizler sonucunda ticari tarhanadaki nem miktarı 6.26 ± 0.203 , kefirli tarhananın nem miktarı 5.51 ± 0.002 ve yoğurtlu tarhananın nem miktarı 5.60 ± 0.116 olarak belirlenmiştir. Literatürde bulunan çalışmalarda tarhana örneklerinin nem değerleri $9.31-11.28$ aralığında belirlenmiş (Dayısoylu vd., 2003; Siyamoğlu, 1961; Ertaş vd., 2009) olup sunulan bu çalışmada belirlenen nem değerlerinden daha yüksektir (Çizelge 1).

Örneklerin kül miktarı ticari tarhanada 3.75 ± 0.18 , yoğurtlu tarhanada 3.24 ± 0.31 , kefirli tarhanada ise 3.75 ± 0.91 olarak belirlenmiştir. Literatürde bulunan çalışmalarda ise tarhanadaki kül miktarı $1.36-9.40$ aralığındadır (Siyamoğlu, 1961; Dayısoylu ve Çınar, 2004; Tamer vd., 2007; Ertaş vd., 2009). Çalışmamızda belirlenen kül değerleri diğer araştırmacılar tarafından belirlenen değerler arasındadır (Çizelge 1).

Yağ tayini sonucunda, kefirli tarhana en yüksek yağ (16.16 ± 0.510) içeriğine sahip olup, yoğurtlu tarhananın 15.27 ± 0.860 , ticari tarhananın ise 15.20 ± 0.880 yağ içerdiği belirlenmiştir. Ancak istatistiki açıdan tarhana örneklerinin yağ içeriğinde farklılık tespit edilememiştir (Çizelge 1) ($P > 0.05$). Tarhanada tek yağ kaynağının süt ürünü olan yoğurt ya da çalışma kapsamında kullanılan kefir olduğu dikkate alındığında, son ürünlerin yağ içeriğinin benzer bulunması çalışma kapsamında

kullanılan yoğurt ve kefirin benzer yağ içeriğine sahip olduğunu göstermektedir. Literatürde bulunan çalışmalarda ise tarhananın %0.44-15.8

yağ içerdiği tespit edilmiştir (Siyamoğlu, 1961; Yücecan vd., 1988; Tamer vd., 2007; Ertaş vd., 2009).

Çizelge 1. Ürünlerin bazı kimyasal, toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite analiz sonuçları
Table 1. Results of some chemical, total phenolic substance and antioxidant capacity analysis of products

	Kefirli tarhana <i>Kefir tarhana</i>	Yoğurtlu tarhana <i>Yogurt tarhana</i>	Ticari tarhana <i>Commercial tarhana</i>
Nem (%) <i>Moisture (%)</i>	5.51±0.002 ^a	5.60±0.116 ^{a,b}	6.26±0.203 ^b
Kül (%) <i>Ash (%)</i>	3.75±0.91 ^a	3.24±0.31 ^b	3.75±0.18 ^a
Yağ (%) <i>Total lipid (%)</i>	16.16±0.510 ^b	15.27±0.860 ^a	15.20±0.880 ^a
Protein (%) <i>Protein (%)</i>	15.11±0.171 ^b	16.36±0.342 ^b	12.63±0.884 ^a
pH	3.78±0.011 ^a	3.79±0.015 ^a	3.76±0.01 ^a
Toplam Asitlik (%) <i>Total Acid (%)</i>	7.63±0.030 ^a	11.23±0.030 ^b	13.73±0.050 ^b
Toplam fenolik madde (mg GAE/100g) <i>Total phenolic compound (mg GAE/100g)</i>	32.08±0.120 ^a	32.04±1.619 ^a	35.26±0.780 ^b
Antioksidan kapasite (µmol troloks/g) <i>Antioxidant capacity (µmol troloks/g)</i>	0.85±0.048 ^b	0.78±0.031 ^a	0.76±0.008 ^a

^a Aynı satırdaki farklı üst simgeler, $P < 0.05$ seviyesinde önemli bir fark olduğunu gösterir.

^a Different superscript letters in the same row indicate a significant difference between the values at the $P < 0.05$ level

Protein tayini sonucunda kefirli tarhananın %15.11±0.171, yoğurtlu tarhananın %16.36±0.342 ve ticari tarhananın ise %12.63±0.884 protein içerdiği belirlenmiş olup en yüksek protein içeriğine sahip olan örneğin yoğurtlu tarhana, en düşük protein içeriğine sahip olan örneğin ise ticari olarak satılan tarhana olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 1). Tarhana üzerine yapılmış çalışmalarda ürünün protein içeriğinin %6.8-28.6 aralığında olduğu bildirilmiştir (Siyamoğlu, 1961; Dayısoylu vd., 2003; Tamer vd., 2007). Bu sonuçlardan görüldüğü üzere son üründeki protein, yağ ve kül miktarları çok fazla değişkenlik göstermiştir. Bu durum kullanılan hammaddelerin farklı özelliklere sahip olması ile açıklanabilmektedir.

pH ve toplam asitlik analiz sonuçları

Örneklerin pH değerleri kefirli tarhanada 3.78±0.011, yoğurtlu tarhanada 3.79±0.015 ticari tarhanada 3.76±0.014 olarak belirlenmiştir. Dayısoylu vd. (2003), çalışmalarında pH

ortalamasını 3.64, Soyyığıt (2004) ise 3.61-4.86 olarak verilmiştir. Bu çalışma kapsamında bulunan Maraş tarhanası pH değerleri literatürde belirlenen pH değerleri ile paralellik göstermiş olup, üretilen örneklerinin pH değerlerinin benzer oluşu ($P > 0.05$) fermantasyon işleminin aynı değere kadar yapılmış olduğunu göstermektedir (Çizelge 1).

Toplam asitlik analizi sonucunda ise ticari tarhana %13.73±0.050, yoğurtlu tarhana %11.23±0.030 ve kefirli tarhana %7.63±0.030 olup en yüksek asitlik ticari tarhanada, en düşük asitlik ise kefirli tarhanada belirlenmiştir. Tamer vd. (2007) yapmış oldukları bir çalışmada 218 tarhananın titrasyon asitliğini %1,7-40,7 olarak bildirmişlerdir. Sunulan bu çalışma sonucunda pH değerleri birbirine benzer ancak toplam asitlik içeriği birbirinden farklı ürünler elde edilmiştir ($P < 0.05$). Bu durum fermantasyon işleminin aynı düzeye kadar gerçekleştiğini ancak oluşan ürünlerin aynı olmadığını göstermektedir.

Toplam fenolik madde ve antioksidan kapasitesi analiz sonuçları

Toplam fenolik madde içeriği, kefirli tarhanada 32.08 ± 0.120 mg GAE/100g, yoğurtlu tarhanada 32.04 ± 1.619 mg GAE/100g ve ticari tarhanada ise 35.26 ± 0.780 mg GAE/100g olduğu belirlenmiştir. Antioksidan kapasitesi analizi sonucunda ise kefirli tarhanada 0.85 ± 0.048 μ mol troloks/g, yoğurtlu tarhanada 0.79 ± 0.031 μ mol troloks/g ve ticari tarhanada 0.76 ± 0.008 μ mol troloks/g olarak belirlenmiştir. Kefirli ve yoğurtlu tarhanaların toplam fenolik madde içerikleri, yoğurtlu ve ticari satılan tarhanaların ise antioksidan kapasitesi benzer bulunmuştur ($P < 0.05$). Sonuçlardan anlaşıldığı üzere Maraş tarhanası üretiminde yoğurda alternatif olarak kefir kullanımı ile antioksidan kapasitesi dolayısıyla raf ömrü daha uzun olan bir ürün elde edilmiştir (Çizelge 1).

Renk analizi sonuçları

Yapılan analiz sonucunda, L* değerinin (beyazlık) kefirli tarhanada 53.47 ± 0.280 , yoğurtlu tarhanada 50.68 ± 0.130 ve ticari tarhanada ise 59.29 ± 0.640 olduğu, ticari tarhananın yoğurtlu ve kefirli tarhanaya göre daha beyaz olduğu görülmektedir. Ticari satılan tarhananın a* değeri (kırmızılık) 4.89 ± 0.103 , yoğurtlu tarhananın 3.82 ± 0.036 ve kefirli tarhananın 2.97 ± 0.170 olarak belirlenmiş olup en yüksek değer ticari satılan Maraş tarhanasına ait olduğu belirlenmiştir. Ticari tarhananın b* değeri (sarılık) 19.10 ± 0.500 , yoğurtlu tarhananın 22.75 ± 0.130 ve kefirli tarhananın ise 22.76 ± 0.100 olduğu belirlenmiş olup kefirli ve yoğurtlu tarhananın b* değerleri birbirlerine benzer olup ticari satılan tarhana örneğinin b değerinden daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 2) ($P < 0.05$).

Çizelge 2. Ürünlerin renk analizi sonuçları
Table 2. Color analysis results of the products

	Kefirli tarhana Kefir tarhana	Yoğurtlu tarhana Yogurt tarhana	Ticari tarhana Commercial tarhana
L*	53.47 ± 0.280^b	50.68 ± 0.130^a	59.29 ± 0.640^c
a*	2.97 ± 0.170^a	3.82 ± 0.036^b	4.89 ± 0.103^c
b*	22.76 ± 0.100^b	22.75 ± 0.130^b	19.10 ± 0.500^a

^a Aynı sütündeki farklı üst simgeler, $P < 0.05$ seviyesinde önemli bir fark olduğunu gösterir.

^a Different superscript letters in the same column indicate a significant difference between the values at the $P < 0.05$ level

Tekstürel analiz sonuçları

Maraş tarhanası halk arasında cips olarak da tüketildiğinden tekstürel özellikleri beğeni açısından oldukça önemlidir. Cips olarak tüketilmesi durumunda sertlik değerinin çok yüksek, kırılabilirliğin ve çıtırlığın düşük olması istenmez. 3 Point Bend Rig ile yapılan analiz sonucu sertliği en yüksek olan yoğurtlu tarhana örneği, daha sonra ticari satılan tarhana örneğidir. Kefirli tarhana örneği ise diğer örneklerle oranla sertliği en düşük olan ürün olduğu belirlenmiştir ($P < 0.05$). Örneklerin kırılması için gerekli olan mesafenin (mm) tüm ürünlerde benzer olduğu

belirlenmiştir ($P > 0.05$). Ottawa Cell kullanılarak gerçekleştirilen çıtırlık analizi sonucunda yoğurtlu tarhana örneğinin çıtırlığının en yüksek olduğu, ticari olarak satılan ürünün ise en düşük çıtırlık değerine sahip olduğu belirlenmiştir ($P < 0.05$). Kefir kullanılarak üretilen tarhana örneğinin ise çıtırlığının yoğurtlu tarhanadan yüksek ancak ticari tarhanadan düşük olduğu belirlenmiştir ($P < 0.05$). Bu değerlerden de görüldüğü üzere kefir kullanılarak üretilen Maraş tarhanasının kabul edilebilir tekstürel özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3).

Çizelge 3. Ürünlerin sertlik, kırılabilirlik ve çıtırılık değerleri
Table 3. Hardness, fracturability and brittleness values of the products

	Sertlik (g) Hardness (g)	Kırılabilirlik (mm) Fracturability (mm)	Çıtırılık (g) Brittleness (g)
Kefirli tarhana <i>Kefir tarhana</i>	276.72±15.558 ^a	1.06±0.915 ^a	82.01±5.154 ^b
Yoğurtlu tarhana <i>Yoğurt tarhana</i>	506.21±35.880 ^b	1.04±0.252 ^a	105.98±10.523 ^c
Ticari tarhana <i>Commercial tarhana</i>	459.59±48.785 ^b	1.09±0.752 ^a	64.72±4.812 ^a

^a Aynı sütündeki farklı üst simgeler, $P < 0.05$ seviyesinde önemli bir fark olduğunu gösterir.

^a Different superscript letters in the same column indicate a significant difference between the values at the $P < 0.05$ level

SONUÇ

Sunulan bu çalışma sonucunda atıştırılabilir cips olarak da tüketilen Maraş tarhanası üretiminde yoğurda alternatif olarak kefir kullanımı ile son ürünün kimyasal özelliklerinin çok fazla değişmediği ($P > 0.05$), ancak sertlik derecesinin düştüğü, çıtırılığın arttığı ve antioksidan kapasitesinin yükseldiği belirlenmiştir ($P < 0.05$). Sertlik derecesindeki azalmaya bağlı olarak ürünün daha kolay tüketilebileceği, kırılabilirliğin benzer olması ve çıtırılığın artması sebebiyle de tüketiminin daha fazla tercih edilebileceği öngörülmektedir. Diğer taraftan antioksidan kapasitesinin artması ile ürünün daha uzun süre depolanabileceği anlaşılmaktadır.

KAYNAKLAR

AACC. (2000). Approved Methods of American Association of Cereal Chemists (AACC). The Association: St. Paul, Mn.

ICC. (2002). Standard Methods of International Association for Cereal Science and Technology (ICC). Vienna, Austria.

AOCS. (2003). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. Champaign, IL (USA), AOCS Press.

TSE. (2004). TS 2282 Tarhana Standardı. Ankara, Türkiye: Türk Standartları Enstitüsü.

Coşkun, F. (2014). Tarhananın Tarihi ve Türkiye'de Tarhana Çeşitleri. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 9(3): 69-79.

Dağhoğlu, O. (2000). Tarhana as a Traditional Turkish fermented cereal food: It's recipe, production and composition. *Nahrung*, 44: 85-88.

Dayısoylu, K. S. ve Çınar, İ. (2004). The Fermented Synbiotic Product: Turkish Tarhana. 1st International Congress on Functional Foods and Nutraceuticals. Antalya, Turkey, 27-29 April 2004, 53 p.

Dayısoylu, K. S., Gezgin, Y., Duman, A. D., Didin, M. (2003). Geleneksel Kahramanmaraş Tarhanasının Kimi Özellikleri ve Beslenmedeki Fonksiyonel Önemi. 3. Gıda Müh. Kongresi, 2-5 Ekim 2003, Ankara, Türkiye, 511-523 s.

Dayısoylu, K. S., İnanç, A. L., Duman, A. D., Gezgin, Y., Özsisli, B. (2002). Model Kahramanmaraş Tarhanası. Hububat Ürünleri Teknolojisi Kongre ve Sergisi, 3-4 Ekim 2002, Gaziantep, Türkiye, 485-491 s.

Erbaş, M. (2003). Yaş Tarhananın Üretim ve Farklı Saklama Koşullarında Bileşimindeki Değişmeler. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi, Antalya, Türkiye, 160 s.

Ertaş, N., Sert, D., Demir, M. K., Elgun, A. (2009). Effect of Whey Concentrate Addition on the Chemical Nutritional and Sensory Properties of Tarhana (a Turkish Fermented Cereal-Based Food). *Food Science and Technology Research*, 15(1): 51-58.

Göçmen, D., Gürbüz, O., Şahin, İ. (2003). Hazır Tarhana Çorbaları Üzerinde Bir Araştırma. *GIDA*, 28: 13-18.

- Özçam, M. ve Obuz, E. (2012). Kahramanmaraş Cips Tarhanasının Kimyasal ve Tekstürel Özellikleri, III. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, (s. 501-502). Konya, Türkiye.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26: 1231-1237.
- Singleton, V. L. ve Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Society for Enology and Viticulture*, 16: 144-158.
- Siyamoğlu, B. (1961). *Türk Tarhanalarının Yapılışı ve Terkibi Üzerinde Bir Araştırma*. İzmir: Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları:44, Ege Üniversitesi Matbaası.
- Soyyigit, H. (2004). Isparta ve Yöresinde Üretilen Ev Yapımı Tarhanaların Mikrobiyolojik ve Teknolojik Özellikleri. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Isparta, Türkiye, 68s.
- Şimşekli, N. ve Doğan, I. S. (2015). Tahıl Esaslı Beta-glukan İlavesinin Gıdaların Teknolojik ve Fonksiyonel Özelliklerine Etkisi. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 3(4): 190-195.
- Tamer, C. E., Kumral, A., Aşan, M., Şahin, İ. (2007). Chemical Compositions of Traditional Tarhana Having Different Formulations. *Journal of Food Processing and Preservation*, 31(1): 116-126.
- Yıldırım, Ç. ve Güzeler, N. (2016). Tarhana Cipsi. *Neşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, TARGİD Özel sayı: 1-8.
- Yörüköğlu, T. ve Dayısoylu, K. S. (2016). Yöresel Maraş Tarhanasının Fonksiyonel ve Kimyasal Bazı Özellikleri. *Atatürk Üniv. Ziraat Fak Derg*, 47(1): 53-63.
- Yücecian, S., Kayakırılmaz, K., Başoğlu, S., Tayfur, M. (1988). Tarhananın Besin Değeri Üzerine Bir Araştırma. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 45(1): 47-51.

EFFECT OF SUNLIGHT ON FATTY ACID COMPOSITION OF TOMATO SEED OIL STORED IN DIFFERENT COLORED BOTTLES

Burcu Aydoğan-Coşkun, Hacer Çoklar, Mehmet Akbulut*

Selcuk University, Agriculture Faculty, Department of Food Engineering, Konya, Turkey

Received / Geliş: 21.12.2017; Accepted / Kabul: 24.12.2017; Published online / Online baskı: 27.12.2017

Aydoğan-Coşkun, B., Çoklar, H., Akbulut, M. (2018). Effect of sunlight on fatty acid composition of tomato seed oil stored in different colored bottles. GIDA (2018) 43 (1): 122-128 doi: 10.15237/gida.GD17111

ABSTRACT

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seeds and skins, which are the wastes of the tomato processing industry, are often regarded as animal feed in everyday life. In this study, tomato seed oil was obtained by Soxhlet extractor. The oil yield of tomato seeds was approximately 20.8%. The oils in the transparent, amber and opaque glass bottles were exposed to sunlight from June to September. The sample intake was made every 20 days and this procedure was repeated 4 times. Each sample was analyzed for fatty acid composition in gas chromatography. The minimum and maximum rates of the major fatty acids in all of the oil samples were 54.12-55.72%, 21.68-22.35%, 11.92-12.55%, 6.18-6.63% and 2.39-2.62% for linoleic (C18:2n6), oleic (C18:1n9), palmitic (C16:0), stearic (C18:0) and α -linolenic acids (C18:3n3), respectively. The results showed that there was no highly variation between the fatty acid rates in all samples.

Keywords: Fatty acids, tomato seed oil, sunlight, colored bottles, store

FARKLI RENKLİ ŞİŞELERDE DEPOLANAN DOMATES ÇEKİRDEĞİ YAĞININ YAĞ ASİDİ KOMPOZİSYONU ÜZERİNE GÜN IŞIĞININ ETKİSİ

ÖZ

Domates işleme endüstrisinin atıkları olan domates (*Solanum lycopersicum* L.) çekirdeği ve kabukları, günlük hayatta genellikle hayvan yemi olarak değerlendirilmektedir. Bu çalışmada, domates çekirdeği yağı Soxhlet ekstraktörü ile elde edilmiştir. Domates çekirdeğinin yağ verimi yaklaşık %20.8 olarak bulunmuştur. Şeffaf, kehribar ve opak cam şişelerdeki yağlar Haziran'dan Eylül'e kadar güneş ışığına maruz bırakılmıştır. 20 günde bir örnek alınmış ve bu işlem 4 kez tekrarlanmıştır. Her numune, gaz kromatografisinde yağ asidi kompozisyonu için analiz edilmiştir. Analiz edilen tüm yağ numunelerinin ana yağ asitlerinin minimum ve maksimum oranları, linoleik (C18: 2n6) için %54.12-55.72, oleik (C18: 1n9) için %21.68-22.35, palmitik (C16: 0) için %11.92-12.55, stearik (C18: 0) için %6.18-6.63 ve α -linolenik asitler (C18: 3n3) için %2.39-2.62 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar, tüm numunelerde yağ asidi oranları arasında önemli bir değişimin olmadığını göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Yağ asitleri, domates çekirdeği yağı, güneşiği, renkli şişeler, depolama

* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar;

✉ makbulut@selcuk.edu.tr

☎ (+90) 332 223 2955,

☎ (+90) 332 241 0108

INTRODUCTION

Tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) are the second most common vegetable with a production of about 171 million tonnes, while the first rank is potatoes in terms of production in the world (Turkey has a share of approximately 7% in world tomato production) (FAO, 2014). While most of the tomatoes are consumed fresh, a little more than one third of the production is processed for canning, tomato juice, tomato paste or puree, sauces and ketchup. Skins and seeds, which are by-products of the tomato processing, constitute about 4% of the vegetable (Del Valle et al., 2006). These products are often regarded as animal feed in everyday life (Barros et al., 2017). Tomato seed includes essential fatty acids, essential amino acids, minerals, antioxidants as ascorbic acid, phenolics, phytosterols, tocopherols and carotenoids (Al-Wandawi et al., 1985; Toor and Savage, 2005; Eller et al., 2010). The oil yield of tomato seeds is about %11-36 on a dry weight basis. Linoleic (C18:2), oleic (C18:1) and palmitic (C16:0) fatty acids compose of the majority of the composition which has 75.8% unsaturated fatty acids (El Amrani et al., 2007; Demirbaş, 2010). The higher the degree of unsaturation of fatty acids, the faster the lipid oxidation gets (Demirci, 2003).

Extrinsic (temperature, light) and intrinsic (fatty acid composition, presence of pro- or antioxidants) factors have an impact on the oxidation reactions (Cillard and Cillard, 2006; Fabien et al., 2014). Vegetable oils undergo photooxidation by the action of light, in which the photosensitive natural compounds in the oil react with triplet oxygen ($^3\text{O}_2$) and form the excited state singlet oxygen ($^1\text{O}_2$). Singlet oxygen having powerful reactivity attacks directly double bonds of unsaturated fatty acids and leads to form of hydroperoxides (Skibsted, 2000; Shao et al., 2015; Sun et al., 2015). Natural antioxidants with high $^1\text{O}_2$ quencher properties are found in many foods and prevent oxidation reactions. Therefore, foods with high natural antioxidant content are more resistant to oxidation (Cillard and Cillard, 2006; Fabien et al., 2014). Natural antioxidants in tomato seed as ascorbic acid, phenolics, phytosterols, tocopherols and carotenoids can act

as $^1\text{O}_2$ quencher. Lycopene is highly active on reactive singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and is the most effective antioxidant among carotenoids (Woodall et al., 1997; Henry et al., 1998). The oxidation of lycopene causes loss of color (Xianquan et al., 2005).

The light transmission of packaging materials also influences the oxidation. The light barrier property of packaging materials has a great influence on the shelf life of food rich in fat (Zhang, 2004; Lu and Xu, 2009; Sun et al., 2015). Preservation of edible oils in coloured bottles affects oxidation reactions significantly. Amber colored glass provides better protection from light than transparent glass and photooxidation takes place more easily in the transparent case (Wang et al., 2014; Makni et al., 2015).

The purpose of this study was to determine the change in the fatty acid composition by the exposure of the tomato seed oil to the sunlight and the extent to which this change was affected by the transparent, amber and opaque glass bottles.

MATERIALS AND METHODS

Material

The seeds of the tomatoes taken from the market were manually removed and the seeds were dried for 2 days at room temperature. The oil of the seeds was extracted with Soxhlet extractor using petroleum ether. The solvent was evaporated at 40°C. The oil was divided into three different glass bottles (transparent, amber and opaque) and each bottle was exposed to sunlight from June until September (total 80 days). The sample intake was made every 20 days and this procedure was repeated 4 times. The samples were stored in dark at +4°C until analyzed.

ANALYSIS METHODS

Preparation of fatty acid methyl esters

The esterification of fatty acids was carried out according to the method described by Williams (1984) with some modifications. 0.4 g of sample was weighed in a screw-capped test tube. Then 4 mL of isooctane was added, and the tube was shaken vigorously. 0.2 mL of 2 N KOH in methanol was then added, and the tube was

shaken again. The tube was kept in the dark for 6 min. After dripping some methyl orange, 0.45 mL of 1 N HCl was added into tube. The tube was shaken and centrifuged (2000 rpm/5 min). The supernatant was removed and injected into the gas chromatography.

Chromatographic conditions for fatty acid analysis

Fatty acid profile analysis was performed on an Agilent 7890 A-FID gas chromatography system, equipped with a 100 m × 0.25 mm × 0.2 µm HP-88 capillary column. Split injector and flame ionization detectors (FID) were operated at 260 °C. Oven temperature was set at 140 °C, held for 5 min, and ramped at 4 °C/min to 240 °C for 15 min. The sample (1 µL) was injected into the system with a split ratio of 30:1. Hydrogen gas was used as the carrier gas at a flow rate of 30 ml/min, and air flow rate was set at and 300 ml/min (Destailats et al., 2010).

RESULTS AND DISCUSSION

The oil yield of tomato seeds was found to be approximately 20.8%. El Amrani et al. (2007), Lazos et al. (1998) and Demirbaş (2010) determined oil contents as 11%, 21.8% and 36%,

respectively. Our result shows similarity with Lazos et al. (1998).

The fatty acid profiles of samples were presented in Table 1, 2, and 3. The majority of composition of tomato seed oil consist of linoleic (C18:2n6*c*), oleic (C18:1n9*c*), palmitic (C16:0), stearic (C18:0) and linolenic (C18:3n3) acids as 55.67%, 21.75%, 11.98%, 6.29% and 2.62%, respectively. Linoleic acid was found to be the dominant unsaturated fatty acid, followed by oleic acid, while palmitic acid was the dominant saturated fatty acid, followed by stearic acid. Similar results have been seen in the report of Lazos et al. (1998), their results were 53.6, 22.0, 14.0, 6.0 and 2.0 in percent, respectively. Demirbaş (2010) showed a little different results as 46.8, 24.6, 18.1, 4.0 and 0.4 in percent in the same order. The composition of tomatoes may vary depending on factors such as type, variety, applied cultural practices, growing environment (field, greenhouse), region, harvest time (Thakur et al., 1996; Cemeroglu et al., 2009). In our study the concentration of unsaturated fatty acids was composed of polyunsaturated fatty acids as 72.51% and monounsaturated fatty acids as 27.49%.

Table 1. Fatty acid compositions of tomato seed oil samples stored in transparent glass bottles

Fatty acid (%)		Transparent (days)				
		0	20	40	60	80
Myristic	C14:0	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Pentadecanoic	C15:0	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Palmitic	C16:0	11.98	12.05	12.18	12.24	12.55
Palmitoleic	C16:1	0.31	0.30	0.31	0.31	0.31
Heptadecanoic	C17:0	0.05	0.07	0.07	0.06	0.07
Stearic	C18:0	6.29	6.32	6.40	6.36	6.60
Elaidic	C18:1n9 <i>t</i>	0.06	0.13	0.12	0.10	0.12
Oleic	C18:1n9 <i>c</i>	21.75	21.72	21.82	22.05	22.35
Linoelaidic	C18:2n6 <i>t</i>	0.14	0.33	0.28	0.18	0.22
Linoleic	C18:2n6 <i>c</i>	55.67	55.33	55.10	54.98	54.12
Arachidic	C20:0	0.49	0.49	0.51	0.51	0.53
γ-Linolenic	C18:3n6	0.03	0.03	0.03	0.04	0.05
α-Linolenic	C18:3n3	2.62	2.58	2.53	2.50	2.39
Gadoleic	C20:1	0.09	0.10	0.09	0.10	0.10
Behenic	C22:0	0.10	0.12	0.12	0.12	0.13
Lignoceric	C24:0	0.19	0.21	0.22	0.23	0.23
Docosahexaenoic	C22:6n3	0.11	0.10	0.10	0.10	0.11

Analyses were performed at days 0, 20, 40, 60 and 80. The results are given in %.

Trace amounts (<0.6%) of C14:0, C15:0, C16:1, C17:0, C18:1n9*t*, C18:2n6*t*, C20:0, C18:3n6, C20:1, C22:0, C24:0 ve C22:6n3 were also found in tomato seed oil. Total of these fatty acids was 1.69% of the composition of the initial sample.

Table 2. Fatty acid compositions of tomato seed oil samples stored in amber glass bottles

Fatty acid (%)		Amber (days)				
		0	20	40	60	80
Myristic	C14:0	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Pentadecanoic	C15:0	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Palmitic	C16:0	11.98	11.96	12.04	12.11	12.33
Palmitoleic	C16:1	0.31	0.31	0.30	0.31	0.31
Heptadecanoic	C17:0	0.05	0.06	0.05	0.06	0.06
Stearic	C18:0	6.29	6.22	6.29	6.35	6.63
Elaidic	C18:1n9 <i>t</i>	0.06	0.10	0.07	0.07	-
Oleic	C18:1n9 <i>c</i>	21.75	21.68	21.80	21.81	21.98
Linoelaidic	C18:2n6 <i>t</i>	0.14	0.27	0.18	0.18	0.16
Linoleic	C18:2n6 <i>c</i>	55.67	55.65	55.53	55.36	54.81
Arachidic	C20:0	0.49	0.48	0.49	0.50	0.51
γ-Linolenic	C18:3n6	0.03	0.02	0.02	0.02	0.03
α-Linolenic	C18:3n3	2.62	2.61	2.60	2.58	2.53
Gadoleic	C20:1	0.09	0.10	0.09	0.09	0.09
Behenic	C22:0	0.10	0.12	0.11	0.12	0.12
Lignoceric	C24:0	0.19	0.21	0.21	0.22	0.22
Docosahexaenoic	C22:6n3	0.11	0.10	0.11	0.11	0.12

Analyses were performed at days 0, 20, 40, 60 and 80.

The results are given in %.

Table 3. Fatty acid compositions of tomato seed oil samples stored in opaque glass bottles

Fatty acid (%)		Opaque (days)				
		0	20	40	60	80
Myristic	C14:0	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Pentadecanoic	C15:0	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Palmitic	C16:0	11.98	11.97	12.00	12.01	11.92
Palmitoleic	C16:1	0.31	0.31	0.3	0.30	0.30
Heptadecanoic	C17:0	0.05	0.07	0.05	0.05	0.05
Stearic	C18:0	6.29	6.25	6.30	6.32	6.18
Elaidic	C18:1n9 <i>t</i>	0.06	0.09	0.10	0.07	0.10
Oleic	C18:1n9 <i>c</i>	21.75	21.70	21.75	21.76	21.74
Linoelaidic	C18:2n6 <i>t</i>	0.14	0.22	0.25	0.19	0.26
Linoleic	C18:2n6 <i>c</i>	55.67	55.64	55.49	55.53	55.72
Arachidic	C20:0	0.49	0.48	0.49	0.49	0.48
γ-Linolenic	C18:3n6	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02
α-Linolenic	C18:3n3	2.62	2.61	2.61	2.61	2.61
Gadoleic	C20:1	0.09	0.10	0.09	0.09	0.09
Behenic	C22:0	0.10	0.12	0.12	0.12	0.11
Lignoceric	C24:0	0.19	0.21	0.21	0.21	0.20
Docosahexaenoic	C22:6n3	0.11	0.10	0.10	0.10	0.11

Analyses were performed at days 0, 20, 40, 60 and 80.

The results are given in %.

Limited number of studies have reported on the effect of light and packing materials on fatty acid composition of vegetable oils (Méndez and Falqué, 2007; Al Juhaimi et al., 2016). However, up to the moment, there are no works about tomato seed oil. In this study, it was investigated whether sunlight affects the fatty acid composition of tomato seed oil stored in different colored (transparent, amber and opaque) glass bottles. The results were evaluated as the alteration of each fatty acid that can be detected and the comparison of different colored glass bottles among each other during the storage time.

According to the results, storing in different colored glass bottles did not affect the fatty acid composition of the samples. All fatty acid values were close to each other in general. While there was no change in the proportion of myristic (C14:0) and pentadecanoic (C15:0) fatty acids detected in all three bottles during storage, the proportions of palmitoleic (C16:1), heptadecanoic (C17:0), gamma-linolenic (C18:3n6), arachidic (C20:0), gadoleic (C20:1), behenic (C22:0), docosahexaenoic (C22:6n3) and lignoceric (C24:0) acids were very similar within themselves.

During 80 days in transparent, amber and opaque glass bottles, the contents of linoleic, oleic and palmitic acids changed between 54.12-55.72%, 21.68-22.35% and 11.92-12.55%, respectively. Linoleic acid had slight decrease in transparent and amber bottles. In addition to this, the decline rate was higher in transparent bottle that transfers more daylight than amber one. Oleic acid increased smoothly for each bottles, the greatest amount of increase was seen in the transparent bottle. Palmitic acid showed a steady increase in transparent and amber bottles for 80 days. In opaque bottles, there was no great alteration of these fatty acids.

The ratios of stearic and linolenic acids are shown in Table 1, 2 and 3. There was an increase in stearic acid in the amber bottle and some fluctuations were observed in the increases in transparent and opaque bottles. Linolenic acid demonstrated a decrease in the same bottles as linoleic acid, and even the reduction in bottles

showed similarities. No change was in opaque bottle. The elaidic and linoelaidic acids exhibited a non-uniform increase over the initial values for all bottles. It should be noted that in the 80th day of the analysis, the elaidic acid in amber one was not detected.

The reason of decrease may be oxidation caused by light of double bonds in unsaturated fatty acids and isomerization of *cis*- forms to *trans*- forms. The reason of increase especially in *trans*- forms may be isomerization of *cis*- forms to *trans*-. The absence of change in the values may be the presence of natural antioxidants in the oil. In present study, we determined that sunlight did not dramatically alter fatty acid composition of tomato seed oil.

Al Juhaimi et al. (2016) investigated extra-virgin olive oil added rosemary essential oil and stored in red, green, yellow and transparent glass bottles for 90 days under sunlight. They analysed the samples every 30 days and concluded that fatty acid compositions of olive oils in four different glass bottles did not vary majorly during storage under sunlight. Méndez and Falqué (2007) used different packaging materials (clear PET bottle, aluminium foil covered PET bottle, glass bottle, tin and Tetra-brik®) for extra-virgin olive oil for 6 months exposing light and air. After 3 and 6 months of storage their results showed that the percentage of fatty acids analysed did not vary with respect to the initial composition.

In addition, the resultant colors of initially orange-red color tomato seed oil stored in transparent, amber and opaque glass bottles were evaluated visually. It was observed that the sample in the amber colored bottle was slightly whereas the sample in the transparent bottle was discolored markedly. The order of decolorisation of oil samples in glass bottles is like this: transparent > amber > opaque. In terms of color, opaque glass bottle seems to provide the best protection. The findings of Makni et al. (2015) are in agreement with the best preservation of vegetable oil colors by means of opaque bottles. Lycopene from carotenoids, which are thought to give tomato seed oil its redness, becomes isomerized and thus

loses overall color intensity when exposed to light (Shi et al., 2008; Shao et al., 2013; Shao et al., 2015). There is a need for further research to determine the effect of light on the lycopene degradation.

CONCLUSION

The work was primarily aimed to see the change in fatty acid composition of tomato seed oil stored in different colored glass bottles under the sunlight. The oil yield of tomato seed was 20.8%. The results showed that the sunlight did not lead to major changes of fatty acid composition of samples, also valid for three bottles. As in other studies, the main fatty acids of tomato seed oil are linoleic, oleic, palmitic, stearic and α -linolenic acids in this study. When the effect of the bottles on the composition was compared, it was observed that all values of the opaque bottle were stabilized and slight increases and/or decreases were observed in the transparent and amber bottle. At the end of storage, visually assessed oil color was found to be best preserved in the opaque bottle, a slight decolorisation in the amber bottle and a complete colorlessness in the transparent bottle. Lycopene is thought to give redness to tomato seed oil and it is known that lycopene is colorless by exposure to light. Future studies may be focused on evaluating the lycopene in terms of the stability and the effect on the other oxidation products when exposed to light.

REFERENCES

- Al-Wandawi, H., Abdul-Rahman, M., Al-Shaikhly, K. (1985). Tomato processing wastes as essential raw material sources, *J Agr Food Chem*, 33, 804-807.
- Al Juhaimi, F., Uslu, N., Özcan, M.M., Ghafoor, K., Babiker, E.E. (2016). The effect of rosemary essential oil on physico-chemical properties of extra-virgin olive oil stored in colourful bottles, *Qual Assur Saf Crop*, 8 (3), 327-331.
- Barros, H.D.F.Q., Grimaldi, R., Cabral, F.A. (2017). Lycopene-rich avocado oil obtained by simultaneous supercritical extraction from avocado pulp and tomato pomace, *J Supercrit Fluid*, 120, 1-6.
- Cemeroğlu, B. (ed.), Yemenicioğlu, A., Özkan, M. (2009). *Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi: Meyve ve Sebzelerin Bileşimi*, 3rd Edition, Gıda Teknolojisi Derneği, Ankara, Turkey
- Cillard, J., Cillard, P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydants, *Ocl-Ol Corps Gras Li*, 13 (1), 24-29.
- Del Valle, M., Camara, M., Toriia, M.E. (2006). Chemical characterization of tomato pomace, *J Sci Food Agr*, 86, 1232-1236.
- Destailats, F.D.R., Cruz-Hernandez, C., Giuffrida, F., Dionisi, F. (2010). Identification of the botanical origin of pine nuts found in food products by gas-liquid chromatography analysis of fatty acid profile. *J Agr Food Chem*, 58, 2082-2087.
- Demirbaş, A. (2010). Oil, micronutrient and heavy metal contents of tomatoes, *Food Chem*, 118, 504-507.
- Demirci, M. (2003). *Gıda Kimyası*, Rebel Publishing, İstanbul, Turkey.
- El Amrani, A., Maata, N., Benaissa, M. (2007). Fatty acid composition of tomato seed oil of Morocco, 5th Euro Fed Lipid Congress-Oils, Fats and Lipids: From Science to Applications, 16-19 September 2007, Gothenburg, Sweden.
- Eller, F.J., Moser, J.K., Kenar, J.A., Taylor, S.L. (2010). Extraction and analysis of tomato seed oil, *J Am Oil Chem Soc*, 87, 755-762.
- Fabien, D.D.F., Annie, N.N., Adélaide, D.M., Florian, S., Inocent, G. (2014). Effect of heating and of short exposure to sunlight on carotenoids content of crude palm oil, *J Food Process Technol*, 5 (4), 314.
- FAO, (2014). FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Accessed: 1 October 2017).
- Henry, L.K., Catignani, G.L., Schwartz, S.J. (1998). Oxidative degradation kinetics of lycopene, lutein, and 9-*cis* and all-*trans* β -carotene, *J Am Oil Chem Soc*, 75 (7), 823-829.

- Lazos, E.S., Tsaknis, J., Lalas, S. (1998). Characteristics and composition of tomato seed oil, *Grasas Aceites*, 49 (5-6), 440-445.
- Lu, L.-X., Xu, F. (2009). Effect of light-barrier property of packaging film on the photo-oxidation and shelf life of cookies based on accelerated tests, *Packag Technol Sci*, 22 (2), 107-113.
- Makni, M., Haddar, A., Fraj, A.B., Zeghal, N. (2015). Physico-chemical properties, composition, and oxidative stability of olive and soybean oils under different conditions, *Int J Food Prop*, 18, 194-204.
- Méndez, A.I., Falqué, E., (2007). Effect of storage time and container type on the quality of extra-virgin olive oil, *Food Control*, 18, 521-529.
- Shao, D., Bartley, G.E., Yokoyama, W., Pan, Z., Zhang, H., Zhang, A. (2013). Plasma and hepatic cholesterol-lowering effects of tomato pomace, tomato seed oil and defatted tomato seed in hamsters fed with high-fat diets, *Food Chem*, 139, 589-596.
- Shao, D., Venkitasamy, C., Li, X., Pan, Z., Shi, J., Wang, B., Teh, H.E., McHugh, T.H. (2015). Thermal and storage characteristics of tomato seed oil, *LWT-Food Sci Technol*, 63, 191-197.
- Shi, J., Dai, Y., Kakuda, Y., Mittal, G., Xue, S.J. (2008). Effect of heating and exposure to light on the stability of lycopene in tomato purée, *Food Control*, 19, 514-520.
- Skibsted, L. (2000). Light-induced changes in dairy products, *Bulletin-International Dairy Federation*, 346, 4-9.
- Sun, H., Lu, L.X., Ge, C.F., Tang, Y.L. (2015). Effect of packaging films on the quality of canola oil under photooxidation conditions, *Math Probl Eng*, 2015, 1-6.
- Thakur, B.R., Singh, R.K., Nelson, P.E. (1996). Quality Attributes of Processed Tomato Products: A review, *Food Rev Int*, 12 (3), 375-401.
- Toor, R.K., Savage, G.P. (2005). Antioxidant activity in different fractions of tomatoes, *Food Res Int*, 38, 487-494.
- Wang, S., Li, X., Rodrigues, R., Flynn, D. (2014). Report: Packaging influences on olive oil quality: A review of the literature. Australian and New Zealand Olivegrower and Processor: *National Journal of the Olive Industry*, (94), 16.
- Williams, S. (1984). Official methods of analysis of the Association Official Analytical Chemists. 14th Edition, Arlington VA, USA.
- Woodall, A.A., Lee, S.W., Weesie, R.J., Jackson, M.J., Britton, G. (1997). Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity, *Biochim Biophys Acta*, 1336, 33-42.
- Xianquan, S., Shi, J., Kakuda, Y., Yueming, J. (2005). Stability of lycopene during food processing and storage, *J Med Food*, 8 (4), 413-422.
- Zhang, L. (2004). The effects of transparency of packaging materials on oxidative rancidity of fry, *Pack Eng*, 1, 47-48.

UTILIZATION OF WHITE GRAPE POMACE FOR LACTIC ACID PRODUCTION

Emrah Bayrak, Ali Oğuz Büyükkileci*

Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, İzmir Institute of Technology, İzmir, Turkey

Received / Geliş: 21.09.2017; Accepted / Kabul: 02.12.2017; Published online / Online baskı: 02.01.2018

Bayrak, E., Büyükkileci, A.O. (2018). Utilization of white grape pomace for lactic acid production. *GIDA* (2018) 43 (1): 129-138 doi: 10.15237/gida.GD17088

ABSTRACT

White grape pomace (WGP) contains high amount of soluble carbohydrates (glucose and fructose), which can potentially be used as a carbon source in the fermentative production of bio-based chemicals. In this study, this waste was valorized by lactic acid (LA) production by *Lactobacillus casei*. Adding WGP directly into the culture medium at a solid loading of 10% yielded 33.3 g/L LA. Water extract of WGP allowed comparably faster LA production. Increasing the solid loading in the extraction step increased the LA titers, however, it had a significant negative effect on the production rate. In all cases, fructose was consumed at a slower rate as compared to glucose. Yeast extract powder was required at a concentration of 10 g/L to support LA production. Alternatively, baker's yeast was autolyzed and the lysate was successfully used as the nitrogen source. The findings show that WGP can be regarded as a sustainable plant-based feedstock for LA production by *L. casei*, however, the probable negative effect of other pomace constituents should be avoided.

Keywords: grape pomace, lactic acid, autolysis, food waste valorization.

BEYAZ ÜZÜM POSASININ LAKTİK ASİT ÜRETİMİNDE KULLANILMASI

ÖZ

Beyaz üzüm posası (BÜP), biyo-temelli kimyasalların fermantasyonla üretimi için kullanılma potansiyeline sahip yüksek miktarda çözünmüş karbonhidrat (glukoz ve fruktoz) içerir. Bu çalışmada, bu atık *Lactobacillus casei* ile laktik asit (LA) üretilerek değerlendirilmiştir. BÜP kültür ortamına %10 oranında doğrudan eklendiğinde 33.3 g/L LA elde edilmiştir. BÜP'ün sulu özütü daha hızlı bir LA üretimi sağlamıştır. Özüt çıkarma aşamasında posa miktarının artırılması sayesinde daha fazla LA elde edilmiştir ancak, bu işlem üretim verimini kayda değer biçimde düşürmüştür. Tüm koşullarda fruktoz glukoza göre daha yavaş kullanılmıştır. LA üretimi için 10 g/L maya özütü tozu gerekmiştir. Buna alternatif olarak, ekme mayası otolize uğratılmış ve bu lizat azot kaynağı olarak başarıyla kullanılmıştır. Bulgulara göre, BÜP'ün *L. casei* ile LA üretimi için sürdürülebilir bir kaynak olduğu düşünülebilir, ancak, posada bulunan diğer maddelerin olası olumsuz etkileri önlenmelidir.

Anahtar kelimeler: üzüm posası, laktik asit, otoliz, gıda atıklarının değerlendirilmesi.

* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar

✉ oguzbuyukkileci@iyte.edu.tr

☎ (+90) 232 750 62 93

☎ (+90) 232 750 61 96

INTRODUCTION

There is an increasing interest in bio-based chemicals and materials, which are recovered or produced from biological materials. Food, agricultural and some other industries release huge amount of waste and by-products, most of which has little or no economic value. Lignocellulosic waste biomass, such as straw, bran, stalk, stover, cob, shell, wood, saw dust, and bagasse are abundant potential feedstocks, however energy intensive and costly pretreatment processes are required for their utilization in bioprocesses (Zabed et al., 2016). Fruit wastes, on the other hand, contains easily fermentable monosaccharides as well as structural cellulose, hemicellulose, and pectin. For example; Choi et al. (2015) reported high fermentable carbohydrate content (sum of glucose, fructose, and sucrose) in the peels of orange (53.2%), mandarin (57.1%), apple (59.1%), grapefruit (43.2%), and banana (45.3%) on dry basis. Unlike cellulose and hemicellulose in the lignocellulosic biomass, fermentable carbohydrates can be utilized by microorganisms for growth and product formation without the need of a pretreatment.

Similar to some other fruits, grapes (*Vitis vinifera* L.) contain substantial amount of soluble carbohydrates, which are the substrates for yeast growth and ethanol production during wine production. These carbohydrates are made available to wine yeast by breaking berries to release juice (crushing). Pomace is separated from red wine after the fermentation step. On the other hand, in white wine production skins are removed by pressing after crushing and juice is used as the fermentation medium. As a result of that, and due to using different grape varieties, the pomaces from red and white wine productions have different compositions (Deng et al., 2011). Red grape pomace is rich in dietary fibers and phenolic compounds (Deng et al., 2011, Xu et al., 2016), whereas WGP contains high amount of water soluble carbohydrates (Deng et al., 2011, Zheng et al., 2012). Therefore, WGP can be considered as a convenient source of carbon for microbial processes. Carreira et al. (2011) produced bacterial cellulose from the soluble carbohydrates in the aqueous extract of WGP. Mendes et al.

(2013) produced bioethanol from the aqueous extract of WGP, and in addition to that, recovered oleanolic acid in the organic extract and used remaining solids to manufacture low-density board.

Annual global grape production was 74.5 million tons in 2014 (FAO, 2014). Eighty percent of the all grapes is used in wine making (Fontana et al., 2013), thus wine industry discards huge amount of grape skin, stem, seeds, and lees. Approximately 20% of the grapes are discarded as pomace, which can be used as fertilizer and animal feed. However, high levels of phenolic compounds limit the utilization of pomace as fertilizer, while in animal feeding, lignin content reduces the digestibility of the pomace (Fontana et al., 2013). Pomace polyphenols and seed oil are valuable as health and food products ingredient (Korkie et al., 2002, Zheng et al., 2012).

Lactic acid (LA) and its salts have long been used in food and pharmaceutical industries and more recently there is an interest in poly-LA, which is a biodegradable polymer produced from optically pure LA monomer (Castillo Martinez et al., 2013). LA has also a high potential as one of the platform chemicals that can be derived from biomass resources (Dusselier et al., 2013). There are many efforts to produce this chemical from waste materials in cost effective and environmentally friendly processes (Wang et al., 2015, Kawaguchi et al., 2016). In this study, the potential of white wine grape pomace for LA production was assessed. The aim was the valorization of a food industry waste and development of a low-cost fermentation medium for an industrially valuable chemical.

MATERIALS AND METHODS

Materials

White grape pomace (WGP) from Muscat variety was obtained from Urla Winery (İzmir) in September 2012 and kept at -20°C until use. WGP was dried in an oven (Termal, İstanbul, Turkey) at 60°C for 24 h. After drying, seeds and stems were removed and the rest was ground to a fine powder with a kitchen grinder. All chemicals were of analytical grade and purchased from Sigma-

Aldrich (Steinheim, Germany) and Merck Millipore (Darmstadt, Germany), except baker's yeast (Pakmaya, İzmit, Turkey), which was purchased at a local market. *Lactobacillus casei* NRRL B-441 was kindly provided by United States Department of Agriculture, National Center for Agricultural Utilization Research.

Yeast Autolysis

Commercial baker's yeast (12 g on dry basis) was put in a 250 mL flask and distilled water was added to a final volume of 120 mL. pH was adjusted between 5-7 and the flask was incubated in a shaking incubator (Zhicheng, Shanghai, China) at 100 rpm, at 50 °C for 48 h (Şahin, 2002). After the incubation period, solid cell debris was removed by centrifugation and supernatant (autolysate) was added to the LA production medium.

Lactic Acid Production

L. casei was maintained in De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) broth, which was composed of (g/L): peptone from casein (10.0); meat extract (10.0); yeast extract (4.0); D-(+) glucose (20.0); K₂HPO₄ (2.0); Tween 80 (1.0); di-ammonium hydrogen citrate (2.0); sodium acetate (5.0); MgSO₄ (0.20); MnSO₄ (0.04). The MRS broth and all other growth and fermentation media were sterilized at 121 °C for 15 min in an autoclave (Hirayama, Tokyo, Japan).

Unless otherwise indicated, LA production medium was composed of (g/L): yeast extract (10); K₂HPO₄ (0.50); MgSO₄ (0.20); MnSO₄ (0.05); and the carbon source. In one set of experiments dry WPG was added to the medium without any pretreatment. In the other set, WPG was first extracted in hot water at 80 °C for 60 min in a water bath (Termal, İstanbul, Turkey) and the other ingredients were added to the extract after removing the remaining solids by centrifugation (Centurion, West Sussex, UK). Analytical grade glucose and fructose were used as the carbon sources in the control run. Seventy mL of the production medium was put in a 250 mL flask and the flask mouth was covered with aluminum foil before sterilization. CaCO₃ powder was sterilized separately and added before

inoculation (1g CaCO₃ per flask) in order to maintain pH level at 5-6 during the process. The production medium was inoculated (1% (v/v)) from 24 h old culture, which was grown in MRS broth at 37 °C in a static incubator (Termal, İstanbul, Turkey). Flasks were incubated in a shaking incubator at 37 °C and 150 rpm. Samples (2 mL) were taken at intervals and centrifuged at 3024 g to remove pomace, cells and undissolved CaCO₃. The supernatants were kept at -20 °C until HPLC analysis.

Analytical Methods

Cellulose and hemicellulose contents of the pomace were measured indirectly using two-stage acid hydrolysis. In this method, cellulose and hemicellulose was hydrolyzed to corresponding monomers, which were then quantified in HPLC. In the first stage, dried pomace (300 mg) free of stems and seeds was suspended in 3 mL of 12 M H₂SO₄ in a test tube and the tube was kept at room temperature for 3 h. In the second stage, water was added to the suspension to a final H₂SO₄ concentration of 0.80 M and the tube was kept at 100 °C in the water bath for 4 h (Zhou and Ingram, 2000). The pH was neutralized by CaCO₃ and insoluble materials were removed by centrifugation at 3024 g. Supernatants were diluted with water and analyzed for glucose, xylose, and arabinose and the concentrations were multiplied by anhydro factors (0.90 for glucose; 0.88 for xylose and arabinose) to calculate cellulose and hemicellulose contents of the pomace, respectively.

WPG hot water extract and the samples from LA production were analyzed for carbohydrates and LA. Samples were diluted at least 30 times with water in order to decrease the sugar and LA concentration below 1 g/L.

Glucose, fructose, xylose, arabinose, and LA contents were measured by HPLC (Perkin Elmer, USA) using Aminex HPX-87H column (Biorad Laboratories, CA, USA) operated at 65 °C and a refractive index detector. The mobile phase was 5 mM H₂SO₄ flowing at a rate of 0.6 mL/min. The peak areas in the chromatograms were used to

calculate the concentrations of the analytes by comparing to respective calibration curves.

RESULTS AND DISCUSSION

Carbohydrate Content of Grape Pomace

Free and easily fermentable carbohydrate content of the WGP was of great importance in this study, since in bioprocesses, the amount of target product depends on the initial substrate concentration as well as the conversion capacity of the fermenting microorganism. The potential of WGP as a fermentation substrate was determined by quantification of the available carbohydrates after a mild extraction step. Extracting WGP in water at 80 °C for 60 min yielded 18.7% glucose and 17.7% fructose (based on dry weight of WGP). Both glucose and fructose contents were in good agreement with the ones observed in the pomace from Sauvignon Blanc (Corbin et al., 2015), whereas higher total soluble sugars were reported in Muller Thurgau (56%) and Morio Muscat (78%) pomaces (Deng et al., 2011), and in a fresh grape pomace (49%) (Zheng et al., 2012). The results showed that WGP could provide substantial amount of easily fermentable carbohydrates and had a potential to be used as carbon source in fermentative production of bio-based products. Glucose and fructose in WGP can be extracted and added to the production media after the solid part is removed. Alternatively, GP can be used as a carbon source without a pre-extraction step or any other treatment. Both alternatives were tested in this study.

The structural polysaccharides in various wastes are potential carbon sources for fermenting microorganisms provided that they are hydrolyzed into fermentable monosaccharides. Therefore, the cellulose and hemicellulose content in WPG was quantified after acid hydrolysis. WPG was found to contain 10.6% cellulose and 3.41% hemicellulose. These results were in good agreement with those obtained in previous studies (Zheng et al., 2012, Corbin et al., 2015). The soluble carbohydrate content of WPG used in this study was approximately three times the insoluble polysaccharide content. Similarly, Corbin et al. (2015) reported that pomace of

Sauvignon Blanc contained 43% soluble carbohydrates, which value was almost four times the amount of the insoluble polysaccharides. On the other hand, lignocellulosic biomasses, such as agricultural wastes, generally contain higher amounts of structural polysaccharides (Botella et al., 2005, Menon and Rao, 2012). Taking into account the low polysaccharide content in WGP and the high cost of pretreatment needed to convert those polysaccharides into fermentable monosaccharides, in this study, only the soluble carbohydrates were utilized for LA production.

Lactic Acid Production from Glucose and Fructose

One of the problems related to using complex substrates, such as food waste, in growth and production media is their unknown composition (Hayek and Ibrahim, 2013, Basu et al., 2015). They may include compounds that impair the growth of the fermenting microorganism or inhibit the formation of the target product. Considering this, the capacity of *L. casei* for LA production was tested first in a medium containing purified (analytical grade) glucose and fructose (control run). This information was used in the following steps to evaluate the cultures in which WGP was used as the carbon source. The initial concentration of each monosaccharide was adjusted to 20 g/L, which simulated the carbohydrate profile of a medium containing 10% WGP (w/v), and the carbohydrate consumption and the LA production were followed (Figure 1). Glucose was utilized rapidly and depleted in 24 h, while fructose consumption was slower as compared to glucose. When fructose was used as the sole carbon source at a concentration of 20 g/L, its consumption was faster (data not shown) compared to the mixed substrate case. This showed that, the presence of glucose exerted a partial inhibition on fructose utilization. Nancib et al. (2009) observed a similar trend in LA production from date juice extract by *L. casei* and *Lactococcus lactis*. Both bacteria utilized glucose more rapidly than fructose in the early stage of the cultures. Similarly, during cucumber fermentation by *L. plantarum*, glucose was consumed slightly faster than fructose (Lu et al., 2001).

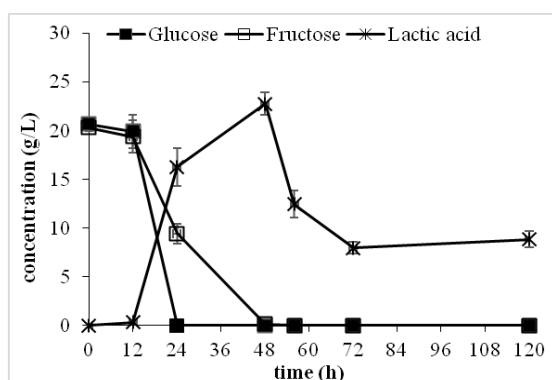


Figure 1. Carbohydrate consumption and lactic acid production from analytical grade glucose (20 g/L) and fructose (20 g/L).

Lactic Acid Production from White Grape Pomace

Direct utilization of a waste material in a bioprocess is advantageous due to not requiring a costly pretreatment step. Therefore, in the first attempt for utilization of WGP as the carbon source, dried WGP was added to the culture media (10% w/v) without applying any treatment. The initial concentrations of glucose and fructose were measured as approximately 20 g/L (Figure 2). Interestingly, the concentrations of these monosaccharides increased in the first 4 h, which could have been due to release of carbohydrates trapped in the pomace. This may have been possible owing to the bacterial action or agitation. After the rise in the early stage, the glucose concentration decreased following almost a linear trend and depleted in 48 h. Fructose was consumed at a slower rate similar to the trend observed in the control run, in which *L. casei* was grown on analytical grade glucose and fructose. The maximum LA concentration (33.3 g/L) was observed after 72 h, at which point there was not any soluble carbohydrates left in the culture medium (Figure 2). Taking into account the carbohydrate concentrations after first 4 h, LA yield was calculated as 0.58 (g LA)/(g carbohydrates), which value was very close to the one in the control run. On the other hand, the maximum LA production rate (0.60 g/(Lh)) obtained with WGP as the carbon source was almost half of the rate in the control run. The lower production rate was apparently due to the

slower utilization of carbohydrates. This behavior could be attributed to the contents of the pomace, which may have impaired the growth of *L. casei* or its carbohydrate consumption, or both. Some compounds that were toxic to the bacteria may have been extracted from pomace during sterilization step at 121 °C or during cultivation. Phenolic compounds, such as wine related ones, have been reported to have an effect on growth or viability of bacteria including *Lactobacillus* species, such as *L. hilgardii*, *L. plantarum*, and *L. casei* (Garcia-Ruiz et al., 2011, García-Ruiz et al., 2012, Sabel et al., 2017).

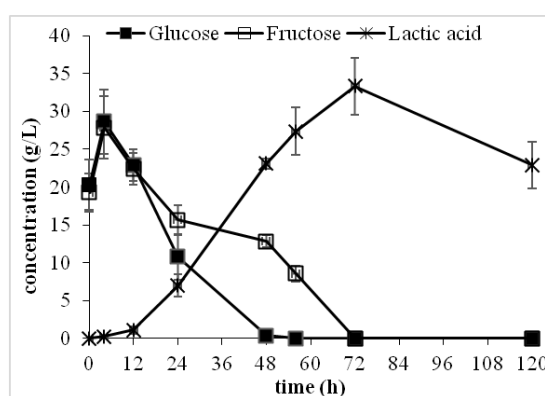


Figure 2. Carbohydrate consumption and lactic acid production from untreated white grape pomace (10% solid loading).

Lactic Acid Production from White Grape Pomace Extract

The probable negative influence of grape pomace on the fermenting organism can be avoided by preventing the release of compounds from the pomace and/or avoiding the contact between the bacteria and the pomace. In this study, these were achieved by pre-extraction of the pomace in water to release soluble carbohydrates and removal of the solid material by filtration afterwards. This way, pomace did not encounter high sterilization temperature (121 °C), so that release of compounds, such as phenolic compounds, may have been limited. In addition to that, *L. casei* did not contact the pomace during cultivation, since it was grown in the extract, which was free of solid pomace material.

The WGP was treated with hot water at a solid to liquid ratio of 1:10 at 80 °C for 60 min. The other nutrients were added to the extract and this medium was used for LA production. In this culture, glucose was utilized more rapidly compared to the cultures mentioned above. After 12 h, no glucose was detected in the culture medium (Figure 3A). Fructose consumption was slower than glucose, similar to the previous cases, and it was depleted in the medium in 48 h. At this time point, LA concentration was 22.1 g/L, while after 60 h, slightly higher amount of LA (24.1 g/L) was detected. In the first 12 h, LA production rate was considerably high in parallel to rapid glucose consumption. In this phase, 17.2 g/L LA was produced at a rate greater than 1.4 g/(Lh). After that time point, when fructose was the sole carbohydrate, its consumption and consequent LA production was much slower. During this phase, 6.9 g/L LA was produced in 48 h, corresponding to 10-fold lower production rate as compared to the initial phase. The total yield based on LA concentration after 60 h was calculated as 0.61 (g LA)/(g carbohydrates), while production rate was 0.40 g/(Lh).

In the next attempt, the pomace loading in the extraction step was increased to a solid to liquid ratio of 1:6.7 in an effort to obtain a more concentrated extract. As a result, LA production process started with increased amount of glucose and fructose (Figure 3B). Glucose utilization rate was only slightly slower than the previous case and it was depleted between 12 and 24 h of fermentation. Unlike the cultures above, in which fructose was consumed in parallel to glucose albeit at lower rates, in this case *L. casei* did not start to use fructose before glucose was consumed entirely. Fructose utilization started after 24 h and the utilization rate was relatively slow. In the first 24 h, 20.7 g/L LA was produced at a rate of 0.86 g/(Lh). In the second phase of the culture, 19.4 g/L LA was produced from fructose in 108 h, corresponding to LA production rate of 0.18 g/(Lh). Fructose utilization was completed after 132 h, at which point LA concentration was 40 g/L. Accordingly, the total LA yield was calculated as 0.75 (g LA)/(g carbohydrates), which value was 23% greater than the one

obtained in the previous run. On the other hand, the overall LA production rate (0.30 g/Lh) was 25% lower. The high solid loading in extraction yielded more LA as a result of higher initial carbohydrate concentration in the medium, however, the productivity was lower due to the late onset and low rate of fructose consumption. Consequently, it was possible to increase the product concentration and yield only by compromising from production rate.

The slow fructose utilization and LA production in the latter culture was probably not related to the relatively higher carbohydrate concentration, since *Lactobacillus* species were reported to function efficiently under high carbohydrate levels (Abdel-Rahman et al., 2013). *L. casei* was reported to utilize date juice containing glucose (50-55 g/L) and fructose (40 g/L), and produced over 53 g/L LA in 19 h (Nancib et al., 2009). It also could produce LA at a rate of 2.2 g/(Lh) from reconstituted whey powder with a lactose concentration of 103 g/L (Buyukkileci and Harsa, 2004). Thus, the impaired LA production was probably due to the presence of other compounds in the medium. During extraction, some chemicals that were potentially toxic to *L. casei* could have been released, similar to the case in which WGP was added directly into the medium. This negative effect was not experienced in the previous culture where the solid loading in the extraction was low, so that the toxic compound concentration in the extract may have been below a critical level.

Effect of Yeast Extract and Yeast Autolysate

Lactobacillus species are fastidious in their nutritional requirements and require some amino acids and vitamins in the growth media (Hofvendahl and Hahn-Hägerdal, 2000). The most common source of these has been yeast extract, which provides nutrients that most microorganisms may need for their growth (Rivas et al., 2004). Since using yeast extract increase the cost of LA production media, some other nitrogen sources have also been used to support the growth of *Lactobacillus* species (Abdel-Rahman et al., 2013, Ghaffar et al., 2014). In this study, the effect of yeast extract concentration was tested

and next, autolyzed baker's yeast was used in the LA production medium containing 10% (w/v) WGP.

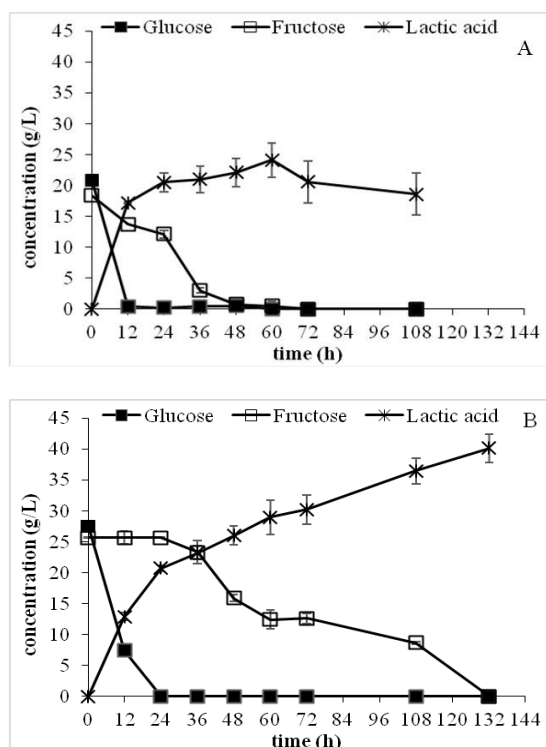


Figure 3. Carbohydrate consumption and lactic acid production from white grape pomace extracts with extraction solid to liquid ratio (w:v) of A. 1:10 and B.1:6.7.

When yeast extract concentration was reduced to 5 g/L, as opposed to 10 g/L in the previous runs, the organism grew only poorly. On the other hand, using 15 g/L of yeast extract did not improve the LA production as compared to using 10 g/L, resulting in almost the same fermentation kinetics (data not shown).

In the next step, commercial baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) was autolyzed and added to the LA production medium containing WGP, instead of using yeast extract powder. Autolysis is the breakdown of cellular components by the action of the hydrolytic enzymes found within the cell. As a result, biopolymers in the cell, such as proteins, are hydrolyzed into low molecular weight products and released (Bustos et al., 2004).

In previous studies, yeast autolysate was used successfully as a nutrient for *Lactobacillus* species (Borzani et al., 1993, Michelson et al., 2006, Bolner de Lima et al., 2009).

In this study, the liquid lysate obtained by autolysis of baker's yeast was introduced to the medium at two levels, namely 10 mL and 25 mL, while keeping the working volume (70 mL) and WPG loading (10%) constant. In both cases, similar LA concentrations were observed (33.1-33.5 g/L) at the end of the fermentations (Figure 4A and 4B), which levels were also very close to the ones obtained with yeast extract powder (Figure 2). The low lysate dose could support the growth and LA production; however, notable carbohydrate utilization and LA production did not start before 24 h (Figure 4A). After 72 h, glucose was depleted, fructose was low and LA production was completed. The high lysate dose, on the other hand, yielded faster fermentation, thus glucose consumption and LA production were rapid, while efficient fructose utilization began after 24 h (Figure 4B). In this case, fermentation was completed in 48 h. The results showed that autolysis of baker's yeast could provide the nutritional requirements of *L. casei*, thus could be used as an alternative to yeast extract powder. Instead of baker's yeast, it may be possible to use waste yeast obtained after the wine fermentations.

Utilization of food waste in the fermentation medium without any energy intensive pretreatment processes is a cost-effective solution for providing fermentable carbohydrates for the microorganisms. WPG was successful in supporting the growth of *L. casei* and its LA production, either in untreated form or after a simple hot water extraction step. It was also possible to supply the other nutritional requirements of the bacteria by autolysis of baker's yeast. Thus, the growth medium used in this study can be considered sustainable for production of LA or other bio-based products. WPG or its extract concentration was limited due their negative effect on the culture performance. Relating this to the toxic effect of phenolic compounds, a pre-extraction step to recover these

compounds not only can diminish the negative effect, but also provide functional ingredients for food and pharmaceutical industries.

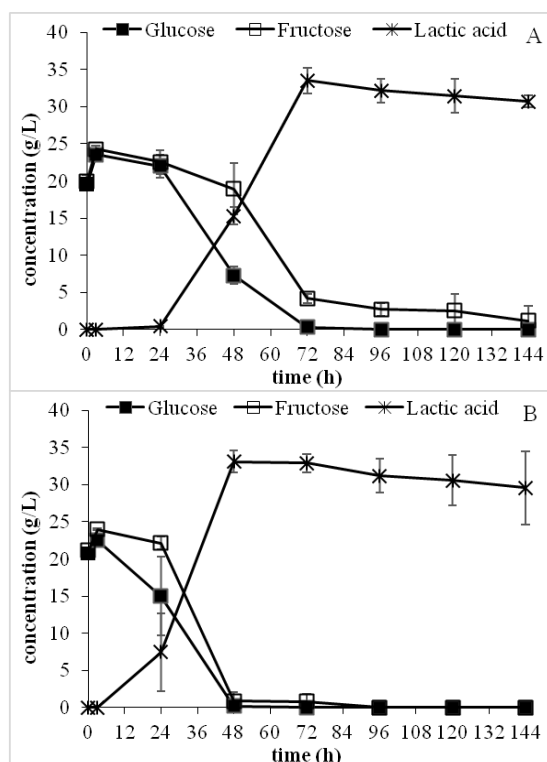


Figure 4. Effect of yeast autolysate as the nitrogen source for lactic acid production from untreated white grape pomace (10%). A: 10 mL, B: 25 mL yeast autolysate in total medium volume of 70 mL.

REFERENCES

- Abdel-Rahman, M.A., Tashiro, Y., Sonomoto, K. (2013). Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnol Adv* 31(6): 877-902.
- Basu, S., Bose, C., Ojha, N., Das, N., Das, J., Pal, M., Khurana, S. (2015). Evolution of bacterial and fungal growth media. *Bioinformation* 11(4): 182-184.
- Bolner de Lima, C.J., Coelho, L.F., Blanco, K.C., Contiero, J. (2009). Response surface optimization of D(-)-lactic acid production by *Lactobacillus* SMI8 using corn steep liquor and yeast autolysate as an alternative nitrogen source. *Afr J Biotechnol* 8(21): 5842-5846.
- Borzani, W., Sanchez Podlech, P.A., Luna, M.F., Jerke, P.R., Stein, M.A.C.F. (1993). Kinetics of semicontinuous microbial transformation of whey by *Lactobacillus bulgaricus* varying the initial concentration of yeast autolysate. *J Biotechnol* 31(1): 61-66.
- Botella, C., Ory, I.d., Webb, C., Cantero, D., Blandino, A. (2005). Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochem Eng J* 26(2): 100-106.
- Bustos, G., Moldes, A.B., Cruz, J.M., Domínguez, J.M. (2004). Formulation of low-cost fermentative media for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus* using vinification lees as nutrients. *J Agric Food Chem* 52(4): 801-808.
- Buyukkileci, A.O., Harsa, S. (2004). Batch production of L(+) lactic acid from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). *J Chem Technol Biotechnol* 79(9): 1036-1040.
- Carreira, P., Mendes, J.A.S., Trovatti, E., Serafim, L.S., Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D., Neto, C.P. (2011). Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. *Bioresour Technol* 102(15): 7354-7360.
- Castillo Martinez, F.A., Balciunas, E.M., Salgado, J.M., Domínguez González, J.M., Converti, A., Oliveira, R.P.d.S. (2013). Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends Food Sci Technol* 30(1): 70-83.
- Choi, I.S., Lee, Y.G., Khanal, S.K., Park, B.J., Bae, H.J. (2015). A low-energy, cost-effective approach to fruit and citrus peel waste processing for bioethanol production. *Appl Energy* 140: 65-74.
- Corbin, K.R., Hsieh, Y.S.Y., Betts, N.S., Byrt, C.S., Henderson, M., Stork, J., DeBolt, S., Fincher, G.B., Burton, R.A. (2015). Grape marc as a source of carbohydrates for bioethanol: Chemical composition, pre-treatment and saccharification. *Bioresour Technol* 193: 76-83.
- Deng, Q., Penner, M.H., Zhao, Y. (2011). Chemical composition of dietary fiber and

- polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. *Food Res Int* 44(9): 2712-2720.
- Dusselier, M., Van Wouwe, P., Dewaele, A., Makshina, E., Sels, B.F. (2013). Lactic acid as a platform chemical in the biobased economy: the role of chemocatalysis. *Energ Environ Sci* 6(5): 1415-1442.
- FAO (2014). FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Accessed: 1 September 2017)
- Fontana, A.R., Antonioli, A., Bottini, R. (2013). Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *J Agric Food Chem* 61(38): 8987-9003.
- García-Ruiz, A., Cueva, C., González-Rompinelli, E.M., Yuste, M., Torres, M., Martín-Álvarez, P.J., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M.V. (2012). Antimicrobial phenolic extracts able to inhibit lactic acid bacteria growth and wine malolactic fermentation. *Food Control* 28(2): 212-219.
- García-Ruiz, A., Moreno-Arribas, M.V., Martín-Álvarez, P.J., Bartolomé, B. (2011). Comparative study of the inhibitory effects of wine polyphenols on the growth of enological lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 145(2-3): 426-431.
- Ghaffar, T., Irshad, M., Anwar, Z., Aqil, T., Zulifqar, Z., Tariq, A., Kamran, M., Ehsan, N., Mehmood, S. (2014). Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification. *J Radiat Res Appl Sci* 7(2): 222-229.
- Hayek, S.A., Ibrahim, S.A. (2013). Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: A review. *Food Nutr Sci* 4(11): 73-87.
- Hofvendahl, K., Hahn-Hägerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb Technol* 26(2): 87-107.
- Kawaguchi, H., Hasunuma, T., Ogino, C., Kondo, A. (2016). Bioprocessing of bio-based chemicals produced from lignocellulosic feedstocks. *Curr Opin Biotechnol* 42: 30-39.
- Korkie, L.J., Janse, B.J.H., Viljoen-Bloom, M. (2002). Utilising grape pomace for ethanol production. *S Afr J Enol Vitic* 23(1): 31-36.
- Lu, Z., Fleming, H.P., McFeeters, R.F. (2001). Differential glucose and fructose utilization during cucumber juice fermentation. *J Food Sci* 66(1): 162-166.
- Mendes, J.A.S., Xavier, A.M.R.B., Evtuguin, D.V., Lopes, L.P.C. (2013). Integrated utilization of grape skins from white grape pomaces. *Ind Crop Prod* 49: 286-291.
- Menon, V., Rao, M. (2012). Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Prog Energ Combust* 38(4): 522-550.
- Michelson, T., Kask, K., Jõgi, E., Talpsep, E., Suitso, I., Nurk, A. (2006). L(+)-Lactic acid producer *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 and its comparison with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM 20073. *Enzyme Microb Technol* 39(4): 861-867.
- Nancib, A., Nancib, N., Boudrant, J. (2009). Production of lactic acid from date juice extract with free cells of single and mixed cultures of *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis*. *World J Microbiol Biotechnol* 25(8): 1423-1429.
- Rivas, B., Moldes, A.B., Domínguez, J.M., Parajó, J.C. (2004). Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. *Int J Food Microbiol* 97(1): 93-98.
- Sabel, A., Bredefeld, S., Schlander, M., Claus, H. (2017). Wine phenolic compounds: Antimicrobial properties against yeasts, lactic acid and acetic acid bacteria. *Beverages* 3(3): 29.
- Şahin, C. (2002). Aytolytic and preteolytic yeast biomass degradation. MSc Thesis, Middle East Technical University, Ankara, Turkey, 78p.
- Wang, Y., Tashiro, Y., Sonomoto, K. (2015). Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. *J Biosci Bioeng* 119(1): 10-18.

Xu, Y., Burton, S., Kim, C., Sismour, E. (2016). Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial properties of pomace extracts from four Virginia-grown grape varieties. *Food Sci Nutr* 4(1): 125-133.

Zabed, H., Sahu, J.N., Boyce, A.N., Faruq, G. (2016). Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. *Renew Sustain Energy Rev* 66: 751-774.

Zheng, Y., Lee, C., Yu, C., Cheng, Y.-S., Simmons, C.W., Zhang, R., Jenkins, B.M., VanderGheynst, J.S. (2012). Ensilage and bioconversion of grape pomace into fuel ethanol. *J Agric Food Chem* 60(44): 11128-11134.

Zhou, S., Ingram, L.O. (2000). Synergistic hydrolysis of carboxymethyl cellulose and acid-swollen cellulose by two endoglucanases (celz and cely) from *Erwinia chrysanthemi*. *J Bacteriol* 182(20): 5676-5682.



ETİN TUZLANMASI İŞLEMİNDE VAKUMLU EMDİRİM TEKNİĞİNİN KULLANILMASI

Elif Aykın Dinçer*, **Mustafa Erbaş**

Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya, Türkiye

Geliş / *Received*: 21.09.2017; Kabul / *Accepted*: 22.12.2017; Online baskı / *Published online*: 08.01.2018

Aykın Dinçer, E., Erbaş, M. (2018). Etin tuzlanması işleminde vakumlu emdirim tekniğinin kullanılması. GIDA (2018) 43 (1): 139-150 doi: 10.15237/gida.338797

ÖZ

Tuzlama işlemi, etin raf ömrünü uzatma ve teknolojik kalitesini geliştirme amacıyla uygulanmaktadır. Geleneksel yöntemlerden biri olan yaş tuzlamada, et salamura içerisinde belli bir süre bekletilmekte ve tuzun ete nüfuz etmesi sağlanmaktadır. Ancak, bu yöntemle tuzun ete nüfuzu oldukça yavaş olmaktadır. Son yıllarda salamura çözeltisi ile et arasındaki kütle aktarım hızını arttırmak için vakumlu emdirim yöntemi kullanılmaktadır. Vakumlu emdirim yönteminde, kısmi bir vakum basıncı uygulanarak kapiler sistemdeki doğal sıvılar ve gazlar uzaklaşmakta ve oluşan boşluklara arzu edilen çözelti nüfuz etmektedir. Kurutma ve dondurma gibi işlemlerden önce ön işlem olarak uygulanabilme, işleme süresini kısaltma, son ürünün kalitesini geliştirme ve üretim maliyetini azaltma bu yöntemin sağladığı başlıca avantajlardır. Bu makalede; etin tuzlanmasında vakumlu emdirim yönteminin kullanılmasıyla ilgili çalışmalar derlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Et, NaCl, salamura, tuzlama, vakumlu emdirim

USE OF VACUUM IMPREGNATION METHOD IN MEAT SALTING PROCESS

ABSTRACT

Salting is applied to meat to extend the shelf life and improve the technological quality. In wet salting, one of the traditional methods, the meat is kept in brine for a certain period of time and salt penetrates into the meat. However, salt transfer into the meat is quite slow with this method. In recent years, vacuum impregnation method has been used to increase the mass transfer rate between brine and meat. In vacuum impregnation method, a partial vacuum is applied so that the natural liquids and gases in the capillary system are removed and the desired solution penetrates into the voids formed. Applicability as pretreatment before drying and freezing, shortening the processing time, improving the quality of the final product and reducing the production cost are the main advantages of this method. In this article has been compiled studies about the use of vacuum impregnation method in meat salting.

Keywords: Meat, NaCl, brine, salting, vacuum impregnation

* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ elifaykin@akdeniz.edu.tr,

☎ (+90) 242 310 4345,

☎ (+90) 242 227 4564

GİRİŞ

Gıdaların salamura çözeltisine daldırılma yoluyla tuzlanarak muhafaza edilmesi, oldukça eski ve geleneksel bir yöntemdir. Etin salamura yöntemiyle tuzlanması da geleneksel bir yöntem olup; bu yöntemde et bir tuz (NaCl) çözeltisi içerisine daldırılmakta ve tuzun ete geçmesi sağlanmaktadır. Salamura çözeltisi eti oluşturan dokudaki hücre içi ve hücreler arası sıvıdan daha yüksek tuz konsantrasyonuna sahip olduğu için, tuz iyonları difüzyon ve ozmos yollarıyla ete geçerken, etteki su ve suda çözünen bazı maddeler ise salamuraya geçmektedir (Chiralt vd., 2001; Barat vd., 2006; Bampi vd., 2016).

Su, kas dokusunun ana bileşeni olup; canlı ve postmortem dokuda sırasıyla %75 ve %65-80 oranında bulunmaktadır. Kastaki suyun önemli bir kısmı (%85) miyofibrillerin iç boşluklarında ve geri kalan kısmı (%15) ise miyofibrillerin dışındaki boşluklarda yer almaktadır. Miyofibriller, önemli miktarda suyun etin yapısında tutulmasını sağlamakta ve et salamura içine daldırıldığında ilk hacminin iki katına kadar şişebilme özelliği göstermektedir (Kang vd., 2016; Inguglia vd., 2017).

Tuzlama işlemi etin raf ömrünü uzatırken tat, aroma ve tekstürel özelliklerini de geliştirmekte (Barat vd., 2006; Corral vd., 2013; Tobin vd., 2013; Shao vd., 2016) ve sağladığı bu avantajlardan dolayı, özellikle kurutulmuş et ürünlerinin üretiminde ön işlem basamağı olarak yer almaktadır. Ancak geleneksel tuzlama yöntemlerinde, tuzun salamura çözeltisinden ete geçişi uzun sürmektedir (Kang vd., 2016). Özellikle geleneksel ürünlerin %1.6-2.2 düzeyinde NaCl içermeleri için 2-2.5 gün/kg salamura çözeltisinde bekletilmesi gerekmektedir (McDonnell vd., 2014). Son yıllarda hem etin tuzlanma süresini kısaltmak hem de tuzun ete homojen dağılımını sağlamak için birçok çalışma yapılmakta ve yeni yöntemler denenmektedir. Bu yöntemlerden bir tanesi de vakumlu emdirim (VE) yöntemidir (Jin vd., 2014; Bampi vd., 2016; Tappi vd., 2016; Wang vd., 2016). Bu çalışmada; etin tuzlanmasında vakumlu emdirim yönteminin kullanımı ele alınmıştır.

ETİN TUZLANMASI

Gıdaların tuzlanması, güneşte kurutma kadar eski bir muhafaza yöntemidir. Özellikle kurutulmuş et ürünlerinin hazırlanmasında tuzlama işlemi en önemli aşamalardan biridir. Ete ilave edilen tuz; etin su tutma kapasitesini arttırmakla birlikte derişimine bağlı olarak (koligatif etkisi nedeniyle) etin su aktivitesini düşürmekte ve mikroorganizmaların gelişimini engellemektedir (Liu vd., 2013; Caballero vd., 2016; Li vd., 2016). Bu nedenlerle, kurutma öncesinde yapılacak bir tuzlama işlemi, etin su aktivitesini 0.95 değerinin altına düşürmekte, kurutma öncesi kısmen bir kuruma sağlayarak kurutma olayını hızlandırmakta ve böylece eti *Enterobacteriaceae* familyası bakterilere karşı mikrobiyolojik olarak güvenli hale getirmektedir. Su aktivitesi değeri 0.95 olan tuzlanmış ve kurutulmuş bir et ürününün tuz konsantrasyonu ise yaklaşık olarak %4.3-4.5 aralığında olmaktadır (Feiner, 2006; Martins vd., 2015; Bampi vd., 2016). Ayrıca tuz; proteoliz, lipoliz ve lipit oksidasyonu gibi bazı kimyasal ve biyokimyasal reaksiyonlara etki ederek kurutulmuş et ürünlerinin lezzet, renk ve tekstürel özelliklerini geliştirmektedir (Huang ve Nip, 2001; Barbieri vd., 2016; Wang vd., 2016).

Et ürünlerinin işlenmesinde yaygın olarak rafine tuz kullanılmaktadır. Rafine tuz, deniz suyunun iyon değiştirici membran içeren bir elektrodializden ve daha sonra evaporatörden geçirilmesiyle elde edilen bir tuz olup yüksek oranda (%99.8) NaCl içermektedir (Choi vd., 2016). Tuzlama işlemi, geleneksel olarak kuru ve yaş tuzlama şeklinde yapılmaktadır. Kuru tuzlama, genellikle “*pasturma*”, “*bacon*” ve “*ham*” gibi kurutulmuş ve kürlenmiş et ürünlerinin üretiminde uygulanmaktadır. Bu yöntemde, et parçasının yüzeyine homojen dağılacak şekilde tuz uygulanmakta ve tüm et yüzeyi %100 tuza maruz bırakılarak bir süre bekletilmektedir. Bu yöntemde su ilavesi olmadığından, tuz dokunun yapısında bulunan suda çözünmektedir. Yaş tuzlamada ise; etin tuz çözeltisi (salamura) içerisinde belli bir süre bekletilmesiyle, tuzun ete nüfuz etmesi sağlanmaktadır. Yaş tuzlamada salamura genellikle %20-24 oranında tuz içermekte ve bu oran % tuz veya Bome derecesi olarak ifade

edilmektedir (Feiner, 2006; Schmidt vd., 2008; De Prados vd., 2016; Wang vd., 2016).

Geleneksel tuzlama yöntemleri genellikle uzun sürmekte ve tuz kas içine yeterince homojen dağılmamaktadır. Teknolojinin gelişmesiyle birlikte tuzlama işlemi son zamanlarda enjeksiyon ve tamburlama gibi modern yöntemlerle yapılmaktadır (Huang ve Nip, 2001). Bu yöntemler hızlı ve sürekli bir tuzlama işlemi sağlayarak üretim verimini arttırmakta ve işçilik maliyetlerini düşürmektedir (Pegg ve Shahidi, 2006). Ancak, bu yöntemler et yüzeyinde bazı iğne deliklerinin oluşmasına ve bu nedenle etin derin tabakalarının su ve hava ile kontamine olarak bozulmasına da neden olabilmektedir (Devine ve Dikeman, 2014; Wang vd., 2016).

Tuzun difüzyon hızı, et yüzeyindeki tuz konsantrasyonu ile merkezinde bulunan tuz konsantrasyonu arasındaki farka bağlı olmaktadır. Difüzyon hızı, tuzlama işleminin başlangıcında yani henüz etin merkezinde tuz bulunmadığı zamanda en yüksektir. Zamanla etin dış tabakalarındaki su uzaklaşmakta ve bu tabakalardaki tuz konsantrasyonu yükselmektedir. Bu durumun devamında etin merkezindeki su yüzeye doğru hareket etmekte ve tuzlama ile birlikte ozmotik dehidrasyonla su kaybı da gerçekleşmektedir. Aynı zamanda tuz et parçasının merkezine doğru nüfuz etmekte ve böylece etin yüzeyindeki ve merkezindeki tuz konsantrasyonu dengeye ulaşarak tuz geçişi yavaşlamaktadır (Feiner, 2006; Tribuzi vd., 2014; Papazoglou ve Katsanidis, 2016).

Et yüzeyinde tuzun çözünmesi ve bu çözeltinin konsantrasyonu, tuzun ete penetrasyonunu düzenleyen ana faktör olmakla birlikte, tuzun penetrasyon oranı kas tipine bağlı olarak da değişebilmektedir. Tuz, etin yumuşamasını sağlayan proteolitik enzimleri de inhibe ettiği için farklı oranlarda tuzlanan kasların tekstürel özellikleri de farklı olmaktadır. Dolayısıyla, et ürünlerine düşük miktarlarda tuz ilave edilmesi, aşırı bir proteoliz gerçekleşmesini ve buna bağlı olarak da yumuşak bir tekstürel yapının görülmesini engellemiş olmaktadır (Wu vd., 2016; Żochowska-Kujawska, 2016).

VAKUMLU EMDİRİM YÖNTEMİNİN PRENSİBİ

Tuzlama yöntemleri arasında gıda mikroyapısının özelliklerine dayanan en yeni tekniklerden biri, vakumlu emdirim (VE) yöntemidir. Bu yöntemle, kimyasal ve organik bileşiklerin biyolojik dokulara girişi, dokuların kılcal kapiler damarları yoluyla kontrollü bir şekilde gerçekleşmektedir. VE yöntemi, kılcal kapiler sistemin içinde bulunan doğal sıvı ve gazların uzaklaşmasını ve arzu edilen tuzlama çözeltisinin girişini sağlayan kısmi bir vakum uygulanmasına dayanmaktadır (Derossi vd., 2012).

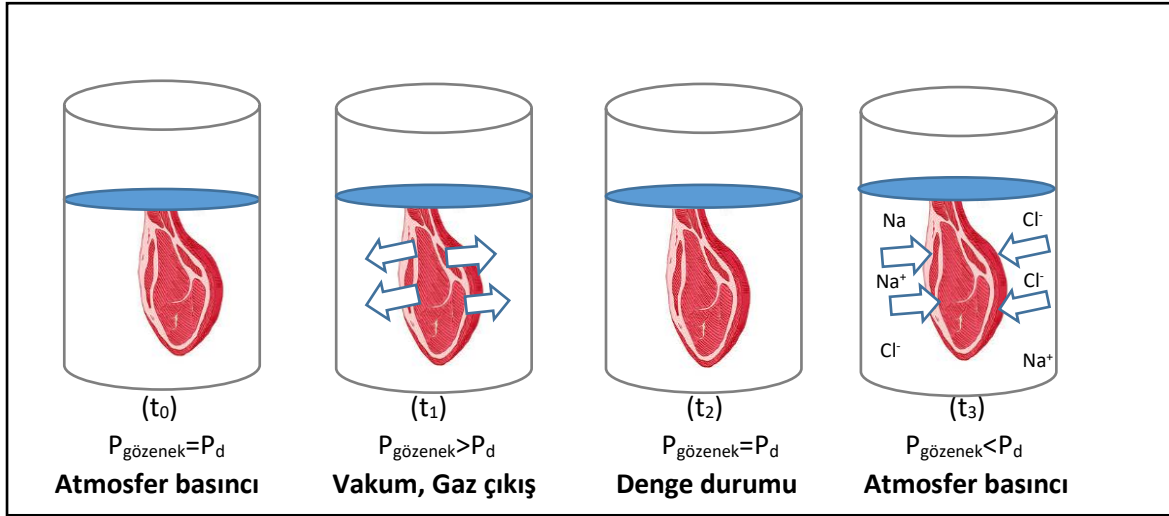
Bu yöntem ilk olarak; meyve ve sebzelerin hipertonic çözeltiye daldırılması sırasında su kaybını hızlandırmak ve çözeltinin dokuya hızlı girişini sağlamak için vakum ozmotik dehidrasyon yöntemi şeklinde uygulanmıştır. Gelişen teknoloji ile birlikte gıdaları besinsel ve fonksiyonel bileşikler bakımından zenginleştirme, onlara yeni duyuşsal özellikler kazandırma ve bozulma reaksiyonlarını ve mikrobiyel gelişimi önleme amacıyla VE yöntemi kullanılmaya başlanmıştır (Derossi vd., 2012; Moreno vd., 2012; Codoñer-Franch vd., 2013; Betoret vd., 2015). Ayrıca, VE yöntemi oda sıcaklığında uygulanabildiğinden ürünün; rengi, doğal lezzeti, aroması ve ısıya hassas bileşenleri korunmakta ve böylece ürün kalitesinde gelişme sağlanmaktadır (Zunin vd., 2017). VE yöntemi; kurutma, kızartma ve dondurma işlemlerinden önce ön işlem olarak da kullanılmaktadır (Bolin ve Huxsoll, 1993).

VE yöntemi ilk olarak Fito (1994) tarafından açıklanmıştır. Araştırmacı, ozmotik dehidrasyon sırasında gıdada meydana gelen değişimi belirlemek için mikro (hücre duvarı, hücre membranları ve organeller gibi hücreşel farklılıkları dikkate alan yöntemler) ve makro (gıdayı, homojen özelliklere sahip biyolojik dokuların bir bütünü olarak ele alan yöntemler) düzeyde analizler yapmıştır. Bu analizlerin sonucunda elde ettikleri su difüzyon katsayılarını (D_e) karşılaştırmış ve mikro yöntemle elde edilen değerlerin 100 kat daha yüksek olduğunu belirlemiştir. Böylece, ozmotik dehidrasyon sırasında geleneksel difüzyona ilave olarak daha hızlı bir kütle aktarım mekanizmasının varlığı

sonucuna ulaşılmıştır. Bu mekanizma; vakum altındaki materyalin gözeneklerindeki sıvı ve gazların boşalması sonucu materyal hacminin küçülmesi ve atmosferik basınca geri dönülme sırasında materyale ilave edilmek istenen çözeltinin materyal üzerine verilerek gözeneklere yerleşmesini sağlayan basınç değişikliklerine dayanmaktadır. Bu olay kütle aktarımının meydana geldiği birçok işlemin hızını arttırmaktadır (Derossi vd., 2012).

VE yöntemi gıdalara tek bir döngü (sırasıyla atmosfer basıncı (t_0) - vakum oluşturma (t_1) - denge durumu (t_2) - tekrar atmosfer basıncının sağlanması (t_3)) veya ardışık döngüler şeklinde uygulanabilmektedir. Her döngü üç aşamadan oluşmaktadır (Şekil 1). İlk aşamada gıda materyali, çözelti içerisine daldırılmaktadır. Başlangıçta gözenek iç basıncı atmosfer basıncına eşittir (t_0). Sisteme vakum uygulandığında gözenek basıncı dış basınçtan daha yüksek olur ve içteki gazların

genişlemesiyle kapiler deformasyonu ve iç hacmin artışı gerçekleşir. Basınç değişimine bağlı olarak gıdanın gözenek ve kapiler sisteminde bulunan doğal sıvılar ve gazlar kısmen dışarı çıkarlar. Bu aşamada hidrodinamik hareket devreye girer ve dışarıdaki çözelti kısmen kapiler içerisine geçmektedir. Bu olaylar denge sağlanıncaya kadar eş zamanlı olarak meydana gelmektedir (t_1). Denge basıncına ulaşıldığında sistem bu basınçta bir süre bekletilmektedir (t_2). Son aşamada tekrar atmosfer basıncı oluşturulmakta (t_3) ve örnekler çözelti içinde bekletilmektedir. Bu gevşeme periyodunda basınç değişimi ile birlikte hidrodinamik harekete ilaven deformasyon olayı da meydana gelmektedir. Hidrodinamik harekete ilaveten, basınçtaki değişim örnekler üzerinde titreşimler de oluşturmakta ve böylece kütle aktarım hızı daha da artabilmektedir (Barat vd., 2006; Carciofi vd., 2012; Derossi vd., 2012; Betoret vd., 2015; Yang vd., 2017).



Şekil 1. Etin tuzlanmasında vakum emdirim aşamaları

VE yöntemi ile etin tuzlanması sırasında farklı aşamalarda meydana gelen kütle aktarım olayları ve yapısal değişimler Çizelge 1'de verilmiştir. VE işlemi sırasında meydana gelen birçok olay, farklı değişkenlerden etkilenebilmektedir. Prosesi etkileyen başlıca dış değişkenler; vakum basıncı,

döngü sayısı, vakum periyodunun süresi, gevşeme periyodunun süresi, salamura çözeltisinin viskozitesi, sıcaklık, çözelti konsantrasyonu ve gıda/çözelti kütle oranıdır (Derossi vd., 2012; Yılmaz ve Bilek, 2017a).

Çizelge 1. Vakum emdirim yöntemi ile et tuzlanmasının farklı aşamalarında meydana gelen kütle aktarım olayları ve yapısal değişimler (Barat vd., 2006)

Aşamalar	Kütle aktarımı	Yapısal değişimler
Vakum öncesi atmosferik basınçta daldırma (t_0)	Salamuranın kapiler penetrasyonu Örnek yüzeyine yakın ürün sıvı fazında su ve tuz difüzyonu	Örnek yüzeyindeki değişiklikler: proteinlerin yapısal değişiklikleri
Sisteme vakum uygulanması (t_1 ; t_2)	Gaz ve serbest iç sıvının dışarıya akışı. Daha yoğun kapiler etkilere bağlı olarak salamuranın ilerlemesi. Difüzyonla birlikte salamura penetrasyonuna bağlı olarak tuzlu su konsantrasyon profillerinin geliştirilmesi	Gaz dolu gözeneklerin genişlemesi Biyopolimerlerdeki yapısal değişiklikler ve su bağlama kapasitesinin değişimi
Atmosferik basınçta geri getirme (t_3)	Hidrodinamik hareket ile salamura penetrasyonunun ilerlemesi Su ve tuzun difüzyon yoluyla taşınması	Matriks gözeneklerinde hacim azalması: serbest sıvı fazın dışarı atılması Biyopolimerlerdeki yapısal değişikliklerde ve su bağlama kapasitesinin değişiminde ilerleme

Vakum en önemli dış değişken olup, gıdanın gözenekleri ile salamura çözeltisinin etrafındaki atmosfer arasında basınç değişimini sağlayan kuvvettir. Genel olarak literatürde, kullanılan vakum basıncının 50-600 mbar arasında değiştiği bildirilmiştir (Derossi vd., 2011). Hindi eti üzerinde yapılan bir çalışmada; atmosfer basıncı ne kadar düşük olursa tuz alımının o kadar yüksek ve su kaybının o kadar az olduğunu belirlemiştir. Farklı seviyelerde (150, 400 ve 700 mbar) basınç uygulanan örneklerde 240 dakikanın sonunda su kaybı sırasıyla -1.89, 6.25 ve 8.86 g/100g ve tuz kazanımı ise 13.71, 9.47, 9.20 g/100g olarak belirlenmiştir. Kütle aktarımı üzerine bu etkiler, düşük basınçta yüksek işleme veriminin sağlandığını göstermektedir. Ayrıca, vakum döngüsünün sayısı (birden ona kadar) arttıkça örneklerin tuz kazanımı artmış ve su kaybı azalmıştır. Atmosfer basıncında tuzlanan örneklerin ortalama su kaybı ve tuz kazanımı 3.92 ve 5.54 g/100g olarak belirlenirken; on vakum döngüsünden sonra bu değerler sırasıyla -10.47 ve 11.31 g/100g olarak belirlenmiştir (Deumier vd., 2003a).

Vakum ve gevşeme periyotlarının süreleri VE yöntemini etkileyen diğer önemli değişkenlerdir. Vakum periyodu, vakum uygulandıktan sonra

gıda mikroyapısının dengeye ulaşma eğiliminde olduğu süredir. Gevşeme periyodu ise; atmosfer basıncı sağlandıktan sonra gıda yapısının dengeye ulaşma eğiliminde olduğu süredir. Vakum basıncı, vakum periyodu süresi ve gevşeme periyodu süresi birbiriyle ilişkili dış değişkenler olup, bu parametreler son ürünün hücre yapısı ve kalite özellikleri üzerinde etkili olmaktadır (Karacaoğlu vd., 2016; Yılmaz ve Bilek, 2017b). Dolayısıyla, üretimi oldukça zahmetli olan geleneksel et ürünlerinin işlenmesinde, VE yöntemi bu parametrelerin optimum koşulları belirlenerek kullanılabilen ve son ürün özellikleri iyileştirilebilmektedir. Andújar vd. (2001), Küba'ya özgü geleneksel bir et ürününün (tasajo) tuzlama aşamasında VE yöntemini uygulamış ve vakum süresi arttıkça ağırlık kaybının azaldığını belirlemiştir. Ayrıca VE yönteminin uygulanacağı et parçalarının büyüklüğü ve gözeneklerinin yapısı vakum süresinin belirlenmesinde dikkate alınmaktadır. Çünkü, VE uygulanan parçalar daha büyük ve gözenekler daha küçük olduğunda örneklerin dengeye ulaşması için daha fazla zaman gerekmektedir (Barat vd., 2006).

Sıcaklık, vakumlu emdirim yönteminin etkinliğini değiştirmemektedir. Gıdanın viskoelastik özellikleri sıcaklık değişkeninden etkilendiği için,

sıcaklık arttıkça yapının yumuşadığı ve ağırlık kaybının arttığı, ancak çözünen maddenin gıdaya geçişinde önemli bir farklılığın oluşmadığı bilinmektedir (Barat vd., 2006; Yılmaz ve Bilek, 2017b). Ayrıca, sıcaklık artışı kullanılan çözeltilerin viskozite değerinin düşüşünde etkili olabilmektedir (Derossi vd., 2012).

Salamura konsantrasyonunun, tuzlama yürütücü kuvveti ve etin su tutma kapasitesi üzerine bilinen etkileri dışında toplam tuz kazancı üzerine de etkisi bulunmaktadır. Diğer taraftan salamura, hipertonic özellikte bir çözeltilerdir. Dolayısıyla, salamura çözeltilerinin konsantrasyonu arttıkça, ozmotik dehidrasyon nedeniyle gıdanın su kaybında bir artış meydana gelmektedir (Barat vd., 2006). Corzo ve Bracho (2007), VE uyguladıkları balıklarda salamura konsantrasyonu arttıkça su difüzyon katsayısının arttığını belirlemiştir. Bunlara ilaveten; et salamura oranının düşük olması, salamura konsantrasyonunun işlem süresince aynı kalmasını sağlamaktadır (Derossi vd., 2012).

Gıdanın gözenekliliği, gözeneklerin boyutu ve morfolojisi ise; VE yöntemine etki eden başlıca iç değişkenlerdir (Panarese vd., 2013; Gomez-Galindo ve Yusof, 2015). Gözenek boyutu, çözeltilerin yüzey gerilimi ve çözelti ile gözenek duvarları arasındaki ıslanma açısı salamura çözeltilerinin et gözeneklerine girişini etkilemektedir (Tylewicz vd., 2012; Panarese vd., 2016). Ayrıca, biyolojik dokunun gözenek çapı da VE uygulaması için önemli olup, bu parametre salamuranın girişine uygun boş hacmi sağlamaktadır (Mao vd., 2017). Dolayısıyla gözenek çapı arttıkça emdirim düzeyi de artmaktadır. Genel olarak et, balık ve peynirle karşılaştırıldığında meyve ve sebzelerin gözenek çapı daha yüksektir. Hayvansal ürünlerde gözenekliliğin daha düşük olmasının nedeni, genellikle hücreler arası boşlukların serbest bir sıvı faz içermesinden kaynaklanmaktadır (Deumier vd., 2003b). Yapılan çalışmalarda gözeneklilik değeri sığır etinde %1.28 (v/v) (McDonald ve Sun, 2001) ve hindi etinde %1.69 (v/v) (Deumier vd., 2003b) olarak belirlenmiştir.

VE işlemini etkileyen diğer iç değişkenler; gıdanın yüzey alanı ve kalınlığıdır. Et örneğinin yüzey alanı arttıkça ve kalınlığı azaldıkça, salamura çözeltilerinin ete nüfuzu artmaktadır (Derossi vd., 2012). Chiralt vd. (2001), salamura çözeltilerinin emilim oranının kas yapısına da bağlı olduğunu bildirmiştir. Kasın yapısında gaz fazı bulunmamasına rağmen, kesimden sonra kan damarlarına gaz girebilmekte ve kan damarları VE işlemindeki hidrodinamik hareketler için kanal görevi görebilmektedir.

VAKUMLU EMDİRİM YÖNTEMİNİN ETİN TUZLANMASINDA KULLANIMI

Büyük et parçalarını tuzlama işlemi düşük sıcaklıklarda yapıldığından genellikle tuz difüzyonu yavaş gerçekleşmekte ve bu işlem birkaç gün sürebilmektedir. Örneğin “charque” adı verilen geleneksel et ürününün tuzlama aşaması sekiz gün sürebilmekte ve bunu beş gün veya daha fazla süren güneşte kurutma aşaması takip etmektedir (Shimokomaki vd., 1998). Bu et parçalarının uzun süren tuzlama periyodunu kısaltmak amacıyla son yıllarda VE yöntemi kullanılmaktadır (Barat vd., 2006; Bampi vd., 2016; Tappi vd., 2016). Çizelge 2’de etin vakumlu emdirim yöntemi ile tuzlanmasını içeren çeşitli çalışmalar verilmiştir.

Geleneksel et ürünlerinin hava ile kurutulmasından önce VE yönteminin kullanılması, iki hedefe aynı anda ulaşılmasını sağlayabilmektedir. Bu hedefler; enerji maliyetinin azalması ve son ürün kalitesini geliştirmek amacıyla antimikrobiyel özellikteki tuzun ete uygulanmasıdır (Derossi vd., 2012). Bampi vd. (2016) farklı tuzlama yöntemlerinin etin su kaybı ve tuz kazanımı kinetiklerine etkisini araştırmıştır. Et örneklerinin yaş tuzlanması sırasında, atmosfer basıncı yerine uygulanan vakum işlemi su kaybını %20 ve tuz kazanımını %15 arttırmıştır. Diğer taraftan, salamuraya farklı asit çözeltilerinin ilave edilmesi 6 saat daldırma işleminin sonunda tuz kazanımını %13-24 düşürmüştür. Ayrıca, NaCl yerine KCl kullanıldığında K⁺ iyonlarının difüzyonunun daha hızlı olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 2. Etin vakumlu emdirim yöntemi ile tuzlanmasını içeren literatür çalışmaları

Hammadde	Emdirilen çözelti - çözelti : ürün oranı	İşleme koşulları	Sonuç	Kaynak
Domuz eti	%20 tuz, %2 dekstroz, %1 sakaroz, %0.1 askorbat, %0.1 baharat karışımı ve %0.085 nitratlar - 2:1	4°C'de 20 dk vakumlu tamburlama 4°C'de 16 saat tank içinde bekletme	Geleneksel tuzlama yöntemine kıyasla VE yöntemi ürün yüzeyindeki <i>Enterobacteriaceae</i> popülasyonunu azaltmıştır.	Serio vd., 2017
Somon balığı	%1.5 sıvı tütsü içeren doymuş NaCl çözeltisi (370 g/L)	Vakum basıncı: 50 mbar Vakum süresi: 5 dk Gevşeme süresi: 45 dk	VE yöntemiyle tuzlanmış örnekler iki farklı şekilde ambalajlanmış ve depolama boyunca örneklerin kimyasal ve fiziksel parametrelerde herhangi bir değişim gözlenmemiştir.	Bugueño vd., 2003
Somon balığı	Çözelti, şeker ve tuzun (1:1) destile suda çözünmesiyle hazırlanmıştır (460 g/L). - 20:1	Vakum basıncı: 50 mbar Vakum süresi: 15 dk	Kuru tuzlama yöntemine kıyasla, yaş tuzlama ve VE yöntemleri tuzlama süresini (\approx %85) ve ağırlık kaybını (\approx %48) azaltmıştır.	Larrazábal-Fuentes vd., 2009
Sığır eti	Et farklı çözeltilerle muamele edilmiştir. +Doymuş tuz çözeltisi (6 mol/L) - 10:1 +Marinasyon sıvısı (Su, NaCl, asitler) - 10:1 +%75 NaCl ve %25 KCl içeren çözelti - 10:1	Vakum basıncı: 50 mmHg Vakum süresi: 20 dk Gevşeme süresi: 5 saat 40 dk	VE uygulaması su kaybını %20 ve tuz kazanımını %15 arttırmıştır. Diğer taraftan, salamuraya farklı asit çözeltilerinin ilave edilmesi, tuz kazanımını %13-24 düşürmüştür. Ayrıca, NaCl yerine KCl kullanıldığında K ⁺ iyonlarının difüzyonunun daha hızlı olduğu belirlenmiştir.	Bampi vd., 2016
Kuzu eti	Salamura çözeltisi (%15 NaCl)	Vakum basıncı: 70 kPa Vakum süresi: 15 dk Gevşeme süresi: 15 dk Döngü sayısı: 3, 6, 9, 12	VE yöntemiyle tuzlanan örneklerin tuz içeriği kontrole göre %1 daha yüksek tespit edilmiştir. VE yöntemiyle tuzlanan örneklerde aktomiyosin daha fazla çözünmüş ve miyofibriller daha fazla şişmiştir ($P < 0.05$).	Wang vd., 2016
Hindi eti	Salamura çözeltisi (350 g/kg) - 20:1	Vakum basıncı: 15, 40 ve 70 kPa Döngü sayısı: 1'den 10'a kadar	Basıncı düştükçe ve döngü sayısı arttıkça; tuz alımı artmış ve su kaybı azalmıştır.	Deumier vd., 2003a

VE yöntemi, kuru tuzlama ve atmosfer basıncında yaş tuzlama yöntemlerine kıyasla tuzlanmış ürünün kalite ve stabilite parametrelerini farklı şekilde etkilemektedir. VE yöntemiyle, ürünün stabilitesini sağlayan tuz seviyesine daha yüksek nem değerlerinde ulaşılmaktadır. Dolayısıyla, bu yöntemle elde edilen ürünler daha sulu bir yapıda olabilmektedir. Bugueño vd. (2000) yaptıkları bir çalışmada somon balığını ticari su aktivitesi değerine (0.965) ulaşmaya kadar iki farklı şekilde tuzlamıştır. Çalışmada atmosfer basıncında tuzlanan örnekler (%62) göre VE yöntemi ile tuzlanan örneklerin nem içeriklerinin (%63) daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, VE yöntemi kuru tuzlamaya kıyasla oksijenin örneklerdeki aktif bölgelere ulaşmasını engellediği için yağlı etlerde oksidasyonu geciktirebilmektedir (Chiralt vd., 2001). Bugueño vd. (2003) VE yöntemi ile tuzlanmanın, tütsülenmiş somon balığının raf ömrü üzerine etkilerini araştırmıştır. İşlendikten sonra iki farklı şekilde (vakum ve modifiye atmosfer paketlenme) ambalajlanan örneklerin raf ömrünü 25 gün olarak belirlemiş ve depolama boyunca örneklerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinde herhangi bir değişim gözlememiştir.

Yapılan başka bir çalışmada VE yöntemi ile tuzlanmış etin mikroyapısı, protein denatürasyonu ve su tutma kapasitesi araştırılmıştır. Örnekler VE (0, 1.5, 3, 4.5 ve 6 saat) ve atmosferik (kontrol) olmak üzere iki farklı şekilde tuzlanmıştır. VE yöntemiyle tuzlanan örneklerin tuz içeriği kontrole göre %1 daha yüksek tespit edilmiştir. VE yöntemiyle tuzlanan örneklerde aktomiyosin daha fazla çözünmüş ve miyofibriller daha fazla şişmiştir. Bu çalışma ile; VE yönteminin salamura verimini arttırdığı, aktomiyosin çözünmesini teşvik ettiği ve etin su tutma kapasitesini geliştirdiği sonucuna ulaşılmıştır (Wang vd., 2016).

Eş zamanlı salamura çözme / tuzlama tekniği, bir soğuk odada etin çözülmesi ve ardından tuzlanması için gerekli olan zamanı azaltmak için kullanılmaktadır. Bu teknik sayesinde, tuzlama işlemi sonrasında salamura çözeltisi ile etin tuz içeriği kısa sürede dengeye gelmektedir (Barat vd., 2005). Flores vd. (2006), "ham" üretiminde bu tekniğin VE ile birlikte kullanımını incelemiş ve

VE uygulanan örneklerde miyofibril bozulmasının daha hızlı olduğunu belirlemiştir.

VE uygulanan ürünün ve salamura çözeltisinin mikrobiyel güvenliğinin araştırılması önemli bir husustur. Hayvanın kesimiyle birlikte kontaminasyon gerçekleşebilmektedir. Eğer hammadde kontamine ise VE uygulaması sırasında salamura çözeltisi de kontamine olabilmektedir. Kontamine olmuş bir çözeltinin tekrar tekrar kullanılması ise, ürünün mikrobiyel güvenliğini tehdit edebilmektedir. Bununla birlikte literatürde, VE yönteminin ette bulunan kanı uzaklaştırdığı ve ürünün mikrobiyel açıdan daha güvenli hale geldiği belirtilmektedir (Chiralt vd., 2001).

Geleneksel et ürünlerinin olgunlaşması; endojen enzimlerin dışında katalaz negatif koklar, mayalar ve küflerin ürettiği mikrobiyel enzimlerle de sağlanmaktadır. Ancak, yetersiz kürlenme işlemi nedeniyle kürlenmiş et ürünlerinde *Enterobacteriaceae* gibi istenmeyen mikroorganizmalar da bulunabilmektedir. Kürlenmiş et ürünlerinde *Enterobacteriaceae* varlığı, ürünün sadece raf ömrünü olumsuz etkilemekle kalmaz, bu mikroorganizmalar patojen olduğundan ve biyojen amin ürettiğinden gıda güvenliği açısından risk oluşturmaktadır (Belletti vd., 2013). Serio vd. (2017) VE yöntemi ile tuzlanan geleneksel bir et ürününde (lonza) *Enterobacteriaceae* familyası bakterilerin varlığını araştırmış ve geleneksel tuzlama yöntemine kıyasla VE yönteminin ürün yüzeyindeki *Enterobacteriaceae* popülasyonunu azalttığını tespit etmiş ve bu ürünün üretiminde VE yönteminin kullanılabilmesi sonucuna varmıştır.

SONUÇ

VE yönteminde, salamura içine daldırılmış et örneğine kısmi bir vakum uygulanarak kapiler sistemindeki doğal sıvılar ve gazlar uzaklaştırılmakta ve oluşan boşluklara salamura çözeltisinin nüfuz etmesi sağlanmaktadır. Et ürünlerinin tuzlanmasında bu yöntemin kullanımı, diğer yöntemlere kıyasla tuzlama süresini kısaltmakta, aktomiyosinlerin daha fazla çözünmesini sağlamakta, su tutma kapasitesini arttırmakta ve ürünün mikrobiyel güvenliğini geliştirmektedir. Bu avantajlarının yanı sıra VE

yönteminin endüstriyel ölçekte yaygın bir şekilde kullanımı için, ürün bazında tüm koşulların optimize edildiği daha detaylı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

Andújar, G., Argüelles, A., Barat, J.M., Andrés, A., Fito, P. (2001). Salting studies during Tasajo making. In: *Osmotic dehydration and vacuum impregnation: Applications in food industries*, Fito, P., Chiralt, A., Barat, J.M., Beshnilian, D., and Spiess, W. (eds.), PA: Technomic Publishing, Lancaster, pp. 171–183.

Bampi, M., Domschke, N.N., Schmidt, F.C., Laurindo, J.B. (2016). Influence of vacuum application, acid addition and partial replacement of NaCl by KCl on the mass transfer during salting of beef cuts. *LWT - Food Sci Technol*, 74: 26-33, doi: 10.1016/j.lwt.2016.07.009.

Barat, J.M., Grau, R., Fito, P., Chiralt, A. (2006). Vacuum salting treatment for the accelerated processing of dry-cured ham. In: *Food Science and Technology*, Nollet, L.M.L. and Toldrá, F. (eds.), Marcel Dekker, New York, pp. 353-369.

Barat, J.M., Grau, R., Ibáñez, J.B., Fito, P. (2005). Post-salting studies in Spanish cured ham manufacturing. Time reduction by using brine thawing-salting. *Meat Sci*, 69: 201–208, doi: 10.1016/j.meatsci.2004.05.020.

Barbieri, G., Barbieri, Ge., Bergamaschi, M., Francheschini, M., Berizi, E. (2016). Reduction of NaCl in cooked ham by modification of the cooking process and addition of seaweed extract (*Palmaria palmata*). *LWT - Food Sci Technol*, 73: 700-706, doi: 10.1016/j.lwt.2016.06.057.

Belletti, N., Garriga, M., Aymerich, T., Bover-Cid, S., 2013. Inactivation of *Serratia liquefaciens* on dry cured ham by high pressure processing. *Food Microbiol*, 35: 34-37, doi: 10.1016/j.fm.2013.03.001.

Betoret, E., Betoret, N., Rocculi, P., Rosa, M.D. (2015). Strategies to improve food functionality: Structure-property relationships on high pressures homogenization, vacuum impregnation and drying technologies. *Trends Food Sci Technol*, 46: 1-12, doi: 10.1016/j.tifs.2015.07.006.

Bolin, H.R., Huxsoll, C.C. (1993). Partial drying of cut pears to improve freeze/ thaw texture. *J Food Sci*, 58: 357-360, doi: 10.1111/j.1365-2621.1993.tb04274.x.

Bugueño, G. (2000). Salado-ahumado de salmón (*Salmo salar*) por impregnación a vacío. Influencia del envasado en la calidad. PhD. Thesis, Universidad Politécnica de Valencia, Spain.

Bugueño, G., Escriche, I., Martínez-Navarrete, N., Camacho, M.d.M., Chiralt, A. (2003). Influence of storage conditions on some physical and chemical properties of smoked salmon (*Salmo salar*) processed by vacuum impregnation techniques. *Food Chem*, 81: 85-90, doi: 10.1016/S0308-8146(02)00381-3.

Caballero, D., Caro, A., Rodríguez, P.G., Durán, M.L., Ávila, M.d.M., Palacios, R., Antequera, T., Pérez-Palacios, T. (2016). Modeling salt diffusion in Iberian ham by applying MRI and data mining. *J Food Eng*, 189: 115-122, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2016.06.003.

Carciofi, B.A.N., Prat, M., Laurindo, J.B. (2012). Dynamics of vacuum impregnation of apples: experimental data and simulation results using a VOF model. *J Food Eng*, 113: 337-343, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2012.05.023.

Chiralt, A., Fito, P., Barat, J.M., Andrés, A., González-Martínez, C., Escriche, I., Camacho, M.M. (2001). Use of vacuum impregnation in food salting process. *J Food Eng*, 49: 141-151, doi: 10.1016/S0260-8774(00)00219-3.

Choi, Y.S., Jeong, T.J., Hwang, K.E., Song, D.H., Ham, Y.K., Kim, Y.B., Jeon, K.H., Kim, H.W., Kim, C.J. (2016). Effects of various salts on physicochemical properties and sensory characteristics of cured meat. *Korean J Food Sci An*, 36 (2): 152-158, doi: 10.5851/kosfa.2016.36.2.152.

Codoñer-Franch, P., Betoret, E., Betoret, N., López-Jaén, A.B., Fito, P., Valls-Bellés, V. (2013). Dried apple snacks enriched with mandarin juice improves antioxidant capacity and decreases inflammation in obese children. *Plant Foods Hum Nutr*, 28(3): 1177-1183, doi: 10.3305/nh.2013.28.4.6580.

- Corral, S., Salvador, A., Flores, M. (2013). Salt reduction in slow fermented sausages affects the generation of aroma active compounds. *Meat Sci*, 93(3): 776-785, doi: 10.1016/j.meatsci.2012.11.040.
- Corzo, O., Bracho, N. (2007). Determination of water effective diffusion coefficient of sardine sheets during vacuum pulse osmotic dehydration. *LWT-Food Sci Technol*, 40: 1452-1458, doi: 10.1016/j.lwt.2006.04.008.
- De Prados, M., Garcia-Perez, J.V., Benedito, J. (2016). Ultrasonic characterization and online monitoring of pork meat dry salting process. *Food Control*, 60: 646-655, doi: 10.1016/j.foodcont.2015.09.009.
- Derossi, A., De Pilli, T., La Penna, M.P., Severini, C. (2011). pH reduction and vegetable tissue structure changes of zucchini slices during pulsed vacuum acidification. *LWT- Food Sci Technol*, 44: 1901-1907, doi: 10.1016/j.lwt.2011.01.011.
- Derossi, A., De Pilli, T., Severini, C. (2012). The application of vacuum impregnation techniques in food industry. In: *Scientific, health and social aspects of the food industry*. InTech, pp. 25-56.
- Deumier, F., Bohuon, P., Trystram, G., Saber, N., Collignan, A. (2003a). Pulsed vacuum brining of poultry meat: experimental study on the impact of vacuum cycles on mass transfer. *J Food Eng*, 58: 75-83, doi: 10.1016/S0260-8774(02)00366-7.
- Deumier, F., Trystram, G., Collignan, A., Guédider, L., Bohuon, P. (2003b). Pulsed vacuum brining of poultry meat: interpretation of mass transfer mechanisms. *J Food Eng*, 58: 85-93, doi: 10.1016/S0260-8774(02)00367-9.
- Devine, C., Dikeman, M. (2014). *Encyclopedia of meat sciences*. 2nd Edition, Academic Press, Elsevier Ltd, Oxford, the UK, 1712 p.
- Feiner, G. (2006). *Meat products handbook: Practical science and technology*. CRC Press, Elsevier Ltd, Boca Raton, FL, USA, 648 p.
- Fito, P. (1994). Modelling of vacuum osmotic dehydration of foods. In: *Water in foods: Fundamental aspects and their significance in relation to processing of foods*, Fito, P., Mulet, A. and McKenna, B. (eds), Elsevier Applied Science, London, pp. 313-328.
- Flores, M., Soler, C., Aristoy, M.C., Toldrá, F. (2006). Effect of brine thawing/salting for time reduction in Spanish dry-cured ham manufacturing on proteolysis and lipolysis during salting and post-salting periods. *Eur Food Res Technol*, 222: 509-515, doi: 10.1007/s00217-005-0036-8.
- Gomez-Galindo, F., Yusof, N.L. (2015). New insights into the dynamics of vacuum impregnation of plant tissues and its metabolic consequences. *J Sci Food Agric*, 95: 1127-1130, doi: 10.1002/jsfa.6777.
- Huang, T.C., Nip, W.K. (2001). Intermediate-Moisture Meat and Dehydrated Meat. In: *Meat Science and Applications*, Hui, Y.H., Nip, W.K., Rogers R.W. and Young O.A. (eds), Marcel Dekker Inc, New York, 674 p.
- Inguglia, E.S., Zhang, Z., Burgess, C., Kerry, J.P., Tiwari, B.K. (2017). Influence of extrinsic operational parameters on salt diffusion during ultrasound assisted meat curing. *Ultrasonics*. In Press, doi: 10.1016/j.ultras.2017.03.017.
- Jin, G., He, L., Wang, Q., Liu, C., Jin, Y., Huang, F., Ma, M. (2014). Pulsed pressure assisted brining of porcine meat. *Innov Food Sci Emerg*, 22: 76-80, doi: 10.1016/j.ifset.2013.12.014.
- Kang, D., Wang, A., Zhou, G., Zhang, W., Xu, S., Guo, G. (2016). Power ultrasonic on mass transport of beef: Effects of ultrasound intensity and NaCl concentration. *Innov Food Sci Emerg*, 35: 36-44, doi: 10.1016/j.ifset.2016.03.009.
- Karacaoğlu, C., Gürsoy, O., Yılmaz, Y. (2016). Ultrasonikasyon destekli vakum impregnasyon (emdirme) tekniği ile muamele işleminin kivi dilimlerinin kuruma kinetiği üzerine etkisi. *Akademik Gıda*, 14: 256-266.
- Larrazábal-Fuentes, M.J., Escriche-Roberto, I., Camacho-Vidal, M.D.M. (2009). Use of immersion and vacuum impregnation in marinated salmon (*Salmo salar*) production. *J Food Process Pres*, 33: 635-650, doi: 10.1111/j.1745-4549.2008.00278.x.
- Li, F., Zhuang, H., Qiao, W., Zhang, J., Wang, Y. (2016). Effect of partial substitution of NaCl by KCl on physicochemical properties, biogenic

- amines and N-nitrosamines during ripening and storage of dry-cured bacon. *J Food Sci Technol*, 53(10): 3795-3805, doi: 10.1007/s13197-016-2366-x.
- Liu, D., Qu, J., Sun, D.W., Pu, H., Zeng, X.A. (2013). Non-destructive prediction of salt contents and water activity of porcine meat slices by hyperspectral imaging in a salting process. *Innov Food Sci Emerg*, 20: 316-323, doi: 10.1016/j.ifset.2013.09.002.
- Mao, J., Zhang, L., Chen, F., Lai, S., Yang, B., Yang, H. (2017). Effect of vacuum impregnation combined with calcium lactate on the firmness and polysaccharide morphology of kyoho grapes (*Vitis vinifera* x *V. labrusca*). *Food Bioprocess Technol*, 10: 699-709, doi: 10.1007/s11947-016-1852-5.
- Martins, M.G., Martins, D.E.G., Pena, R.d.S. (2015). Drying kinetics and hygroscopic behavior of pirarucu (*Arapaima gigas*) fillet with different salt contents. *LWT - Food Sci Technol*, 62: 144-151, doi: 10.1016/j.lwt.2015.01.010.
- McDonald, K., Sun, W.W. (2001). The formation of pores and their effects in a cooked beef product on the efficiency of vacuum cooling. *J Food Eng*, 47(3): 175-183, doi: 10.1016/S0260-8774(00)00111-4.
- McDonnell, C.K., Lyng, J.G., Allen, P. (2014). The use of power ultrasound for accelerating the curing of pork. *Meat Sci*, 98(2): 142-149, doi: 10.1016/j.meatsci.2014.04.008.
- Moreno, J., Simpson, R., Pizarro, N., Parada, K., Pinilla, N., Reyes, J.E., Almonacid, S. (2012). Effect of ohmic heating and vacuum impregnation on the quality and microbial stability of osmotically dehydrated strawberries (cv. Camarosa). *J Food Eng*, 110: 310-316, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2011.03.005.
- Panarese, V., Dejmek, P., Rocculi, P., Gomez-Galindo, F. (2013). Microscopic studies providing insight into the mechanisms of mass transfer in vacuum impregnation. *Innov Food Sci Emerg*, 18: 169-176, doi: 10.1016/j.ifset.2013.01.008.
- Panarese, V., Herremans, E., Cantre, D., Demir, E., Vicente, A., Galindo, F.G., Nicolai, B., Verboven, P. (2016). X-ray microtomography provides new insights into vacuum impregnation of spinach leaves. *J Food Eng*, 188: 50-57, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2016.05.013.
- Papazoglou, D.D., Katsanidis, E. (2016). Mass transfer kinetics during osmotic processing of beef meat using ternary solutions. *Food Bioprod Process*, 100: 560-569, doi: 10.1016/j.fbp.2016.09.001.
- Pegg, R.B., Shahidi, F. (2006). Processing of nitrite-free cured meats. In: *Advanced Technologies For Meat Processing*, Nollet L.M.L. and Toldrá F. (eds), CRC Press, Florida, pp. 309-329.
- Schmidt, F.C., Carciofi, B.A.M., Laurindo, J.B. (2008). Salting operational diagrams for chicken breast cuts: Hydration-dehydration. *J Food Eng*, 88: 36-44, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2007.12.005.
- Serio, A., Chaves-López, C., Rossi, C., Pittia, P., Rosa, M.D., Paparella, A. (2017). Salting by vacuum brine impregnation in nitrite-free lonza: effect on Enterobacteriaceae. *Ital J Food Saf*, 6: 23-27, doi: 10.4081/ijfs.2017.6178.
- Shao, J.H., Deng, Y.M., Jia, N., Li, R.R., Cao, J.X., Liu, D.Y., Li, J.R. (2016). Low-field NMR determination of water distribution in meat batters with NaCl and polyphosphate addition. *Food Chem*, 200: 308-314, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.01.013.
- Shimokomaki, M., Franco, B.D.G.M., Biscontin, T.M., Pinto, M.F., Terra, N.N., Zorn, T.M.T. (1998). Charqui meats are hurdle technology meat products. *Food Review Int*, 14: 339-349, doi: 10.1080/87559129809541167.
- Tappi, S., Tylewicz, U., Romani, S., Siroli, L., Patrignani, F., Rosa, M.D., Rocculi, P. (2016). Optimization of vacuum impregnation with calcium lactate of minimally processed melon and shelf-life study in real storage conditions. *J Food Sci*, 81 (11): 2734-2742, doi: 10.1111/1750-3841.13513.
- Tobin, B.D., O'Sullivan, M.G., Hamill, R.M., Kerry, J.P. (2013). The impact of salt and fat level variation on the physicochemical properties and sensory quality of pork breakfast sausages. *Meat Sci*, 93(2): 145-152, doi: 10.1016/j.meatsci.2012.08.008.

- Tribuzi, G., Schmidt, F.C., Laurindo, J.B. (2014). Operational diagrams for salting-marination processes and quality of cooked mussels. *LWT - Food Sci Technol*, 59(2): 746-753, doi: 10.1016/j.lwt.2014.06.048.
- Tylewicz, U., Lundin, P., Cocola, L., Dymek, K., Rocculi, P., Svanberg, S., Dejmek, P., Galindo, G.F. (2012). Gas in scattering media absorption spectroscopy (GSMAS) detected persistent vacuum in apple tissue after vacuum impregnation. *Food Biophys*, 7(1): 28-34, doi: 10.1007/s11483-011-9239-7.
- Wang, Z., Xu, W., Kang, N., Shen, Q., Zhang, D. (2016). Microstructural, protein denaturation and water holding properties of lamb under pulse vacuum brining. *Meat Sci*, 113: 132-138, doi: 10.1016/j.meatsci.2015.11.015.
- Wu, H., Yan, W., Zhuang, H., Huang, M., Zhao, J., Zhang, J. (2016). Oxidative stability and antioxidant enzyme activities of dry-cured bacons as affected by the partial substitution of NaCl with KCl. *Food Chem*, 201: 237-242, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.01.025.
- Yang, H., Wu, Q., Ng, L.Y., Wang, S. (2017). Effects of vacuum impregnation with calcium lactate and pectin methylesterase on quality attributes and chelate-soluble pectin morphology of fresh-cut papayas. *Food Bioprocess Technol*, 10: 901-913, doi: 10.1007/s11947-017-1874-7.
- Yılmaz, F.M., Bilek, S.E. (2017a). Natural colorant enrichment of apple tissue with black carrot concentrate using vacuum impregnation. *Int J Food Sci Technol*, 52: 1508-1516, doi: 10.1111/ijfs.13426.
- Yılmaz, F.M., Bilek, S.E. (2017b). Vakumlu emdirim (İmpregnasyon) teknolojisinin fonksiyonel meyve ve sebze ürünlerinin geliştirilmesinde kullanımı. *Akademik Gıda*, 15: 163-171, doi: 10.24323/akademik-gida.333673.
- Żochowska-Kujawska, J. (2016). Effects of fibre type and structure of longissimus lumborum (Ll), biceps femoris (Bf) and semimembranosus (Sm) deer muscles salting with different NaCl addition on proteolysis index and texture of dry-cured meats. *Meat Sci*, 121: 390-396, doi: 10.1016/j.meatsci.2016.07.001.
- Zunin, P., Turrini, F., Leardi, R., Boggia, R. (2017). Olive fruits and vacuum impregnation, an interesting combination for dietetic iron enrichment. *J Food Sci Technol*, 54(2): 481-487, doi: 10.1007/s13197-017-2489-8.



MİKROBİYEL KSİLİTOL ÜRETİMİNDE HEMİSELÜLOZİK HİDROLİZATLARIN KULLANIMI

Kübra Eryaşar Örer, Seda Karasu Yalçın*

Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bolu, Türkiye

Geliş / *Received*: 10.10.2017; Kabul / *Accepted*: 02.12.2017; Online baskı / *Published online*: 12.01.2018

Eryaşar Örer, K., Karasu Yalçın, S. (2018). Mikrobiyel ksilitol üretiminde hemiselülozik hidrolizatların kullanımını. *GIDA* (2018) 43 (1): 151-162 doi: 10.15237/gida.342722

ÖZ

Ksilitol, sakkarozaya benzer tatlılık derecesi, düşük kalori ve glisemik indeks değerlerinin yanısıra antikariyojenik özelliği sayesinde gıda endüstrisinde kullanılan şeker alkollerinde yer almaktadır. Ksilitol üretimi, günümüzde oldukça yüksek maliyetler gerektiren kimyasal proseslerle sağlanmaktadır. Diğer taraftan, üretim maliyetlerini azaltma potansiyeli değerlendirildiğinde, son yıllarda yapılan çalışmalar mikrobiyel ksilitol üretimi üzerine odaklanmıştır. Mikrobiyel ksilitol üretimi çalışmalarında yaygın olarak mayalar kullanılmaktadır. Çalışmalarda fermantasyon ortamı olarak, çeşitli lignoselülozik materyallerden hazırlanan ve ksilitol üretimi için gerekli substrat olan ksilozu içeren hemiselülozik hidrolizatlar kullanılmaktadır. Bu derleme, ksilitol ve fermantasyon yolu ile üretimi, ksilitol üretiminde doğal fermantasyon ortamı olarak kullanılan hemiselülozik hidrolizatların hazırlığı ve bu konuda son yıllardaki gelişmeleri içermektedir.

Anahtar kelimeler: Ksilitol, lignoselülozik materyal, hemiselülozik hidrolizat, fermantasyon

UTILIZATION OF HEMICELLULOSIC HYDROLYSATES FOR MICROBIAL XYLITOL PRODUCTION

ABSTRACT

Xylitol is one of the sugar alcohols used in food and pharmaceuticals industries, with relative sweetness equivalent to sucrose, less calorie and glycemic index values, and also its anticariogenic properties. Today, it is industrially produced by chemical processes demanding considerable high costs. On the other hand, when its potential for reducing the costs is evaluated, studies in recent years are focused on microbial xylitol production. Yeasts are widely used in microbial xylitol production studies. In those studies, hemicellulosic hydrolysates prepared from various lignocellulosic materials and containing xylose necessary as substrate for the xylitol production are utilized as fermentation media. This review was focused on xylitol and its production by fermentation, preparation of hemicellulosic hydrolysates used as natural fermentation media in xylitol production and recent developments in this subject.

Keywords: Xylitol, lignocellulosic material, hemicellulosic hydrolysates, fermentation

* Yazışmalardan sorumlu yazar/ *Corresponding author*:

✉ yalcin_s@ibu.edu.tr

© (+90) 374 254 1000 / 4833

☎ (+90) 374 253 4558

GİRİŞ

Ksilitol, sahip olduğu çeşitli olumlu özellikleri nedeniyle dünya çapında yoğun olarak talep gören bir şeker alkolüdür. Ülkemize ithalat yolu ile sağlanan ksilitol; endüstriyel olarak kimyasal yöntemlerin kullanıldığı proseslerle üretilmektedir. Ancak, kimyasal yöntemlerin gerektirdiği yüksek sıcaklık ve basınç değerlerinin sağlanması için yapılan enerji sarfiyatı ve üretimde hammadde olarak kullanılan saf ksilozun pahalı olması, ksilitol üretiminin oldukça maliyetli bir proses haline gelmesine yol açmaktadır. Bu nedenle, doğada bol miktarda bulunan ve ucuz substrat kaynakları olan çeşitli lignoselülozik materyallerden hazırlanan ve ksilitol üretimi için gerekli substrat olan ksiloz açısından zengin hemiselülozik hidrolizatların mikrobiyel ksilitol üretimlerinde doğal fermantasyon ortamı olarak kullanılması ile ilgili çalışmaların son yıllarda arttığı görülmektedir (Camargo vd., 2015). Ksilitol üretiminde mikroorganizmalar kullanıldığında çok daha düşük sıcaklıklarda çalışılma ve hemiselülozik hidrolizatlardaki ksilozun saflaştırılmadan substrat olarak kullanılma olanakları, üretim maliyetlerinin önemli ölçüde azalmasına katkı sağlamaktadır. Genel olarak, mayaların ksilitol üretimi potansiyellerinin daha yüksek olduğu belirtilen çalışmalarda, lignoselülozik materyal olarak oldukça fazla çeşitlilikteki gıda, tarım ve ormancılık endüstrisi artıklarının değerlendirildiği görülmektedir (Albuquerque vd., 2014).

Mikrobiyel ksilitol üretimi çalışmaları için fermantasyon ortamı hazırlığı sürecinde, ilk olarak lignoselülozik materyaller çoğunlukla seyreltik sülfürik asit çözeltisinin kullanıldığı bir hidrolizasyon işlemine maruz bırakılmaktadır. Elde edilen hemiselülozik hidrolizatların, hammadde kaynağı ve işlem parametrelerine göre farklılık gösteren miktarlarda ksiloz içerdikleri bilinmektedir (Ur Rehman vd., 2015). Ancak, hazırlık sürecini nispeten zorlaştıran aşama, hidrolizatlarda ksilozun yanısıra mikroorganizma gelişimini olumsuz yönde etkileyen furfural, hidroksimetil furfural (HMF), fenolik bileşikler ve asetik asit gibi birtakım inhibitör bileşenlerin ortaya çıkmasıdır. Dolayısıyla, elde edilen hemiselülozik hidrolizatların fermantasyon ortamı

olarak kullanılabilmesi için, öncelikle içerdiği inhibitör bileşenlerinden etkin bir şekilde arındırılması gerekmektedir. Bu amaçla, vakum evaporasyonu, iyon değiştirici reçine kullanımı, aşırı alkalileştirme veya pH ayarlama ve aktif kömür ile muamele işlemlerinden sıklıkla yararlanıldığı görülmektedir (Albuquerque vd., 2015).

KSİLİTOL VE BİYOTEKNOLOJİK YOLLA ÜRETİMİ

Ksilitol, ağırlıklı olarak gıda ve eczacılık endüstrilerinde alternatif bir tatlandırıcı olarak kullanılan beş karbonlu bir şeker alkolüdür (Ur Rehman vd., 2015). Emülsifiye edici, nem tutucu, kıvam arttırıcı ve tatlandırıcı olma fonksiyonları sayesinde, gıdalarda E967 kodlu katkı maddesi olarak kullanılan ksilitol, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından 'genel olarak güvenilir kabul edilen (GRAS)' bileşenler sınıfına dahil edilmiştir (Grembecka, 2015; Zada vd., 2017). Sakkaroz ile aynı tatlılık derecesine sahip olmakla birlikte kalori değeri yaklaşık üçte bir oranında olan ksilitol, düşük kalorili ürünlerin üretiminde kullanılabilme potansiyeline sahiptir (Ur Rehman vd., 2015). Sağlıklı beslenmeye olan ilginin artması ile beraber toplumlar şekersiz ve düşük kalorili gıda ürünlerini tüketmeye yönelmiş, bu durum ksilitol talebinin artmasına yol açmıştır. Dünya genelinde, 2013 yılında yaklaşık 160 bin ton olduğu belirlenen ksilitol tüketiminin önümüzdeki yıllarda 240 bin tonlara; piyasadaki ekonomik değerinin ise 670 milyon dolardan 1 milyar dolara yükseleceği tahmin edilmektedir (Rao vd., 2016; Dasgupta vd., 2017). Çözünme sıcaklığının negatif olması sayesinde ağza alındığında ferahlık hissi sağladığından, ksilitol genel olarak sakız, şekerleme ve çikolata gibi ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır (Albuquerque vd., 2014; Mohamad vd., 2015). Üretilen ksilitolün oldukça büyük bir çoğunluğunun sakız endüstrisi tarafından kullanıldığı rapor edilmiştir. Glisemik indeks değeri sakkarozla göre oldukça düşük olan ksilitol, insülin bağımsız olarak metabolize edildiğinden, diyabet hastalarına yönelik ürünlerde kullanılabilecek alternatif bir tatlandırıcıdır (Jain ve Mulay, 2014; Grembecka, 2015). Ksilitolün antikariyojenik özellik gösterdiği ve bu nedenle, diş macunu, ağız çalkalama suyu gibi kişisel bakım

ürünlerinde kullanıldığı bilinmektedir (Rafiqul ve Mimi Sakinah, 2013; Ur Rehman vd., 2015).

Ticari olarak ilk büyük ölçekli ksilitol üretimine, 1975 yılında Finlandiya'da başlandığı belirtilmektedir. Ksilitol üretimi kimyasal olarak; ticari ksilozun veya çeşitli lignoselülozik materyallerden elde edilen ve ardından saflaştırılan ksilozun, oldukça yüksek basınç (31-40 atm) ve sıcaklık (100-130°C) koşulları altında Raney nikel katalizörü eşliğinde ksilitole indirgenmesi ile gerçekleştirilmektedir (Albuquerque vd., 2014; Dasgupta vd., 2017). Kimyasal yolla ksilitol üretiminde, hammadde kaynağı olarak lignoselülozik materyallerden elde edilen ksiloz içeriği bakımından zengin hidrolizatların kullanılabilmesine yönelik çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Ancak, hem yüksek basınç ve sıcaklık koşullarının sağlanması için gerekli donanım ve enerji maliyetlerinin fazla olması hem de saflaştırma işlemlerinin oldukça fazla maliyet gerektirmesinden dolayı, kimyasal yöntemlerin kullanıldığı ksilitol üretiminin pahalı bir süreç olduğu bilinmektedir (Albuquerque vd., 2014; Dalli vd., 2017). Bununla beraber, ksilitol günümüzde halen kimyasal yöntemlerle üretilmektedir. Dünya genelindeki en büyük ksilitol üreticisi olan bir işletmenin, ksilitol üretiminde hammadde olarak, kağıt hamuru ve kağıt endüstrisi artıklarından elde ettikleri ksilozu kullandığı belirtilmektedir (Albuquerque vd., 2014).

Ksilitolün kimyasal yöntemlerle üretiminde karşılaşılan zorluklar, son yıllarda araştırmacıları üretim için alternatif proses arayışlarına yöneltmiş ve ksilitolün fermantasyon yolu ile (mikrobiyel) ve enzimatik olarak üretilebileceği iki farklı biyoteknolojik yaklaşım geliştirilmiştir. Ksilitol üretiminin yaygın olarak, lignoselülozik materyalin asit veya enzim aracılığı ile hidrolize edilmesi ve ksiloz kaynağı olarak elde edilen hemiselülozik hidrolizatların içerdiği inhibitör bileşenlerden arındırılması aşamalarından sonra fermantasyona tabi tutulmaları ile gerçekleştirildiği bilinmektedir (Rafiqul ve Mimi Sakinah, 2013). Kimyasal yöntemler ile kıyaslandığında, hidrolizattaki ksilozun saflaştırılmadan ksilitol üretiminde kullanılabilmesi ve üretimde kullanılan düşük

sıcaklıkların fazla enerji gerektirmemesi nedenleri ile üretim maliyetlerinin önemli ölçüde azaltılabildiği belirtilmektedir (Mohamad vd., 2015). Ksilitol üreticisi oldukları bilinen mikroorganizmalar arasında başlıca *Scheffersomyces (Pichia)*, *Debaryomyces* ve *Candida* cinslerine ait maya suşlarının olduğu bildirilmekte ve özellikle *Candida* cinsi mayaların daha yüksek verimlerde ksilitol ürettikleri rapor edilmektedir (Cheng vd., 2010). Gerçekleştirilen bazı çalışmalarda, *Candida tropicalis* türüne ait mutant veya rekombinant suşlar ile (Jeon vd., 2011; Guo vd., 2013), rekombinant *Saccharomyces cerevisiae* (Li vd., 2013) ve *Debaryomyces hansenii* (Pal vd., 2013) suşlarının ksilitol üretimlerinde kullanıldıkları rapor edilmiştir. Ayrıca, rekombinant *Corynebacterium glutamicum* ve *Escherichia coli* bakteri türlerinin ksilitol üretiminde kullanıldığı bilinmektedir (Kim vd., 2010; Su vd., 2015). Yapılan bir çalışmada, *Candida* cinsi 28 adet izolat arasında, *C. tropicalis* MVP 16 suşunun en yüksek verimde ksilitol ürettiği belirtilmiştir (Lourenço vd., 2014). Guamán Burneo vd. (2015) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise, *C. tropicalis* türüne ait bir suşun yanısıra, *Cyberlindnera galapagoensis* suşu kullanılarak en yüksek değerlerde ksilitol üretilebildiği bildirilmiştir. Bir diğer çalışmada, *Cyberlindnera saturnus* suşunun en yüksek derişimde ksilitol ürettiği rapor edilmiştir (Kamat vd., 2013).

Ksilitol, mikroorganizmaların ksilozu fermente etmeleri sırasında açığa çıkan bir ara üründür. Mayaların ksilozdan ksilitol üretim metabolizmasının, indirgenme ve yükseltgenme basamaklarını içeren bir dizi reaksiyondan oluştuğu görülmektedir. Ksiloz, NADPH veya NADH bağımlı ksiloz redüktaz (KR) enzimi varlığında indirgenerek ksilitole dönüşmekte, ardından elde edilen ksilitol hücre dışına salınmakta veya ortamda NADP⁺ veya NAD⁺ bağımlı ksilitol dehidrogenaz (KDH) enziminin olması durumunda ksiluloza okside olmaktadır. Ksilozdan fermantasyon yolu ile ksilitol üretimini düzenleyen enzimler olan KR ve KDH enzimleri arasındaki oranın, KR yönünde fazla olması, hücre içerisinde ksilitol birikimini sağlamaktadır (Winkelhausen ve Kuzmanova, 1998; Mohamad vd., 2016).

LİGNOSELÜLOZİK KAYNAKLARIN KİLİTOL ÜRETİMİ AMACIYLA DEĞERLENDİRİLMESİ

Doğada bol miktarda bulunan, gıda, tarım ve ormancılık endüstrisi artışı olabildiği çeşitli lignoselülozik materyallerin ksilitol üretimi amacı ile değerlendirilebilecek ucuz birer substrat kaynağı olduğu bilinmektedir (Jönsson ve Martín, 2016). Lignoselülozik materyaller selüloz, hemiselüloz ve lignin birimlerinden oluşmaktadır. Selülozik kısım, birbirlerine β -1,4 glikozidik bağları ile bağlanmış D-glukoz birimlerinden meydana gelen, yarı kristal (düzenli) yapı taşıyan bir homopolisakkarittir. Lignoselülozik materyallerin yaklaşık olarak %34-50'sinin selülozdan oluştuğu belirtilmektedir. Lignoselülozik materyal-deki hemiselülozik kısım ise, genel olarak pentoz ve heksoz şekerlerden, üronik asit ve asetil yan gruplarından oluşan heteropolisakkarit bir yapıdadır. Mikrobiyel ksilitol üretimi için gerekli substrat olan ksilozun pentoz bir şeker olduğu ve hemiselülozik kısımda yer aldığı bilinmektedir. Hemiselüloz, sahip olduğu düzensiz yapısı ile doğrusal bir polimer olan selülozdan ayrılmaktadır. Lignoselülozik materyalin yaklaşık %19-35'ini oluşturan hemiselülozun kimyasal yapısı ve bileşimi, bulunduğu bitki ve ağaç türlerine göre farklılık gösterebilmektedir. Lignoselülozik materyallerdeki bir diğer önemli kısım, fenolik maddelerin ester bağları ile birbirlerine bağlandıkları aromatik polimer bir madde olan lignindir (Rafiqul ve Mimi Sakinah, 2013).

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde; mısır koçanı (Li vd., 2012; Misra vd., 2013; Wang vd., 2013a), şeker pancarı posası (Silva vd., 2015; Castañón Rodríguez vd., 2015), şeker pancarı sapı (Hernández Pérez vd., 2016), pirinç sapı (Deng vd., 2007), pirinç kavuzu (Rambo vd., 2013), pamuk tohumu kabuğu (Wang vd., 2013b), sebze artıkları (Zhang vd., 2012b), kaju fıstığı posası (Rocha vd., 2014; Albuquerque vd., 2015), üzüm posası (Salgado vd., 2012), bira ve şarap tortusu (Pérez Bibbins vd., 2015), kahve meyvesi kabuğu (Arrizon vd., 2012), muz kabuğu, maş fasulyesi, yer fıstığı ve yulaf kabukları (Ur Rehman vd., 2015), asma budama artıkları (Rivas vd., 2007) ve kestane kabuğu (Eryaşar ve Karasu Yalçın, 2016)

gibi farklı gıda ve tarım endüstrisi artıklarından elde edilen, ksiloz içerikleri yüksek hemiselülozik hidrolizatların ksilitol üretiminde substrat olarak kullanıldığı görülmektedir. Ayrıca, zeytin ağacı budama artıkları (Mateo vd., 2013) ile ökalıptus ağacı (Villarreal vd., 2006), huş ağacı (Miura vd., 2015) ve bambu ağacı (Miura vd., 2013) kabuklarını kapsayan ormancılık endüstrisi artıklarının hidrolizat hazırlığında hammadde olarak değerlendirildiği bilinmektedir.

Mikrobiyel ksilitol üretiminde fermantasyon ortamı olarak kullanılan hidrolizatların hazırlığında hedeflenen, ksiloz içeriklerinin mümkün olduğu kadar yüksek, mikroorganizma gelişimi üzerine olumsuz etki gösterebilen çeşitli inhibitör bileşenlerin ise en düşük seviyelerde olduğu hemiselülozik hidrolizatların elde edilebilmesidir (Rafiqul ve Mimi Sakinah, 2013). Ancak, çok yüksek derişimlerde ksiloz içeren hemiselülozik hidrolizatların ksilitol üretimde kullanıldığı bazı çalışmalarda, mikroorganizmaların ksiloz fermantasyonu metabolizmalarının olumsuz yönde etkilendiği bildirilmektedir ve bu durumun ksilozun yanı sıra, hemiselülozik hidrolizatlarda bulunan inhibitör bileşenlerin derişimlerinin de daha yüksek olması ile açıklanmaktadır (Li vd., 2012). Ayrıca, üretimde kullanılan farklı suşların ksilitol üretimi kapasitelerinin de farklı olması ve hemiselülozik hidrolizatların kimyasal bileşimlerinin değişkenlik göstermesi nedenleri ile, ksiloz içeriği yüksek olan fermantasyon ortamlarında her zaman en yüksek derişimlerde ksilitol üretimi yapılamadığı bildirilmektedir. Tüm bu nedenlerle, mikrobiyel ksilitol üretimi çalışmaları için, lignoselülozik materyallerden hemiselülozik hidrolizat hazırlığı aşamalarının uygun yöntemler kullanılarak optimum koşullar altında gerçekleştirilmesi ve hazırlanan fermantasyon ortamlarında ksilitol üretme kapasitesi yüksek suşların seçilmesi oldukça büyük önem taşımaktadır (Mussatto ve Roberto, 2008).

Hemiselülozik hidrolizat hazırlığının başlangıç noktası olarak, lignoselülozik materyallere hidrolizasyon işlemi uygulanarak, bu materyallerdeki hemiselülozik yapının açığa çıkarılması ve bu sayede ksiloz içeren bir hidrolizatın elde edilmesi

sağlanmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda, hidrolizasyon öncesinde lignoselülozik materyallere birtakım ön işlemlerin uygulanarak, hidrolizasyon etkinliğinin artırılmaya çalışıldığı belirtilmektedir. Bazı çalışmalarda ise, lignoselülozik materyaller doğrudan, belirlenen uygun hidrolizasyon yöntem ve parametreleri kullanılarak hidrolize edilmektedir. Lignoselülozik materyallere, genel olarak fizikokimyasal veya kimyasal yöntemlerin kullanıldığı ön işlemler uygulandığında, bu materyallerin yapısal bütünlüklerinin bozulduğu, ligninin ortamdan uzaklaştırıldığı, hemiselülozik yapının parçalanarak açığa çıkmasının kolaylaştırıldığı ve dolayısıyla ksiloz derişimlerinin arttırılabildiği bildirilmektedir (Ur Rehman vd., 2015; Chen vd., 2017). Kimyasal yöntemlerden yararlanılan ön işlemlerde çeşitli alkali, amonyak ve asit çözeltilerinin, organik çözücülerin veya oksitleyici ajanların kullanıldığı rapor edilmektedir (Rao vd., 2016). Örneğin, ksilitol üretiminde fermantasyon ortamı olarak pirinç sapı hidrolizatının kullanıldığı bir çalışmada, materyalin amonyak çözeltisi ile muamele edilmesinin hidrolizatın ksiloz içeriğini bir miktar arttırmasının yanısıra inhibitör bileşenlerin de ortamdan uzaklaştırılmasına katkı sağladığı ve bu sayede hazırlanan hidrolizatın maya suşu tarafından fermente edilme kapasitesinin arttığı belirlenmiştir (Deng vd., 2007). Rocha vd., (2014) tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise, seyreltik asit çözeltisine belirli oranda ilave edilen kaju fıstığı posasının 121°C'de 15 dakika süresince bekletilmesi ile daha fazla miktarda hemiselülozik yapının açığa çıktığı bildirilmiştir. Ayrıca, hidrojen peroksit çözeltisinin, lignini yaklaşık %50 oranında uzaklaştırdığı ve hemiselülozun büyük bir miktarını parçaladığı; ozonun ise hemiselülozik yapıya fazla etki etmediği, ancak lignin miktarını azalttığı rapor edilmiştir. Lignoselülozik materyallere uygulanan ön işlemlerde, mikrodalga uygulaması, ekstrüderlerde muamele ve yüksek basınçlı buhar uygulamaları gibi fizikokimyasal yöntemlerin kullanıldığı bilinmekte ve genel olarak bu yöntemlerin materyallerdeki hemiselülozik yapının parçalanarak açığa çıkmasına katkı sağladıkları bildirilmektedir (Rao vd., 2016).

Literatürdeki çalışmaların büyük bir çoğunluğunda, hidrolizasyon işlemlerinde seyreltik sülfürik asit çözeltisinden yararlanılmaktadır. Seyreltik asit hidrolizasyonunun, genel olarak düşük derişimlerde asit çözeltileri kullanılarak, yüksek sıcaklık ve basınç koşullarında gerçekleştirildiği ve bu sayede, substrat kaynağı olarak hemiselülozik yapıdaki ksilozun açığa çıkarılmasının sağlandığı belirtilmektedir. Hidrolizat hazırlığında hammadde olarak değerlendirilen lignoselülozik materyalin cinsine, kullanılan asite ve derişimine, uygulanan sıcaklık ve süreye, ayrıca katı materyal ve çözelti oranına bağlı olarak, elde edilen hidrolizatlardaki ksiloz derişimlerinin değiştiği bildirilmektedir (Rafiqul ve Mimi Sakinah, 2013). Mısır koçanı hidrolizatı hazırlamak üzere materyalin 1:10 (w/v) oranında %1'lik sülfürik asit çözeltisi ile karıştırıldığı ve 121°C'de 60 dakika süresince hidrolize edildiği durumda 16.36 g/L ksilozun açığa çıktığı, hidrolizasyon işlemi belirlenen optimum koşullarda (%1'lik sülfürik asit çözeltisi, 1:8, 121°C, 30 dakika) gerçekleştirildiğinde ise 21.98 g/L ksiloz elde edildiği rapor edilmiştir (Misra vd., 2013). Zeytin ağacı budama artıkları, %2'lik sülfürik asit çözeltisi kullanılarak ve 120°C'de 90 dakika süresince hidrolize edildiğinde, hidrolizasyon işlemi için optimum koşulların sağlandığı ve bu durumda en yüksek 17.97 g/L ksiloz elde edildiği rapor edilmiştir (Mateo vd., 2014).

HEMİSELÜLOZİK HİDROLİZATLARIN İNHİBİTÖRLERDEN ARINDIRILMASI İÇİN UYGULANAN İŞLEMLER

Lignoselülozik materyallere uygulanan seyreltik asit hidrolizasyonu sırasında açığa çıkan, hidrolizatlardaki derişimleri kullanılan lignoselülozik materyale ve hidrolizasyon yöntemine bağlı olarak değişebilen furfural, HMF, asetik asit ve fenolik maddeler gibi çeşitli inhibitör bileşenlerin, hemiselülozik hidrolizatların fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı mikrobiyel ksilitol üretimi çalışmalarında karşılaşılan en yaygın problem olduğu bilinmektedir (Gupta vd., 2017). Rafiqul vd., (2015) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, hemiselülozik hidrolizatlardaki çeşitli inhibitörlerin *C. tropicalis* IFO 0618 suşunda bulunan ve ksilitol üretiminde kritik bir önemi olan ksiloz redüktaz (KR) enzimini inhibe ettiği

rapor edilmiştir. Lignoselülozik materyallerin asit ile muamele edildiği durumlarda, hemiselülozun parçalanması ile elde edilen pentoz şekerler ve üronik asitten furfural (2-furaldehit) ve heksoz şekerlerden HMF açığa çıkmaktadır (Rao vd., 2016). Genel olarak, kimyasal hidrolizle selülozun çok az miktarda parçalanması nedeni ile hemiselülozik yapıda heksoz şekerler daha düşük miktarlarda bulunduğundan, furfural ile kıyaslandığında, elde edilen hidrolizatlarda HMF oluşumunun daha az olduğu bilinmektedir (Ur Rehman vd., 2015). Daha yüksek sıcaklık değerleri ile yüksek derişimdeki asitlerin kullanıldığı ve daha uzun süreli hidrolizasyon işlemlerinde, HMF ve furfural bileşenlerinden levulinik ve formik asitlerin oluştuğu bilinmektedir. Hemiselülozdaki asetil gruplarının yıkımı sonucu oluşan asetik asit ise hidrolizatlarda bulunabilen bir diğer inhibitör bileşendir. Ayrıca, lignin molekülünün yıkımı ile yaygın olarak, 4-hidroksibenzaldehit, vanilin, siringaldehit, *p*-kumarik asit ve ferulik asit gibi fenolik maddeler meydana gelmektedir (Jönsson ve Martín, 2016).

Hemiselülozik hidrolizatlardaki inhibitör bileşenlerin, fermantasyon ortamının pH'sı ve çözünmüş oksijen derişimi, ortamda bulunan diğer inhibitörler ve kullanılan mikroorganizmaların inhibitörlere karşı gösterdikleri direnç gibi parametrelere bağlı olarak, mikroorganizma gelişimini farklı seviyelerde etkiledikleri belirtilmektedir (Ur Rehman vd., 2015, Rao vd., 2016). Çeşitli çalışmalarda, hidrolizasyon sırasında açığa çıkan furfural ve HMF bileşenlerinin hücre bölünmesini engellediği ve *Scheffersomyces stipitis* ve *S. cerevisiae* gibi bazı mikroorganizmaların gelişimini inhibe eden başlıca bileşen olduğu bilinmektedir (Chandel vd., 2013). Fermantasyon ortamında 0.5-2 g/L aralığındaki derişimlerde furfural bulunduğu durumlarda mikroorganizma gelişiminin %25-99 oranında azaldığı bildirilmektedir (Ur Rehman vd., 2015). Diğer yandan, bazı mikroorganizmaların aerobik koşullar altında, furfural bileşenini okside ederek daha az toksik etki gösteren furoik asite dönüştürebildikleri rapor edilmiştir (Wannawilai vd., 2017). Fermantasyon sürecinde inhibitör etki gösteren bileşenlerden asetik asit ise, düşük pH değerlerinde yağda çözünerek plazma membra-

nına difüze olmakta, hücre içerisindeki nötral pH'larda ise iyonlarına ayrışarak sitoplazmada birirmektedir. Bu sırada açığa çıkan protonların hücre pH'sını düşürerek mikroorganizma aktivitelerini inhibe ettiği ve mikroorganizmaların ölümüne neden olduğu belirtilmektedir. Fermantasyon ortamında 1 g/L'ye kadar bulunan asetik asitin ksilitol üretimini teşvik ettiği, 3 g/L ve üzerindeki derişimlerin ise fermantasyonu olumsuz etkilediği bildirilmiştir. (Chandel vd., 2013). Ayrıca, lignoselülozik materyallerdeki ligninin parçalanması sonucu oluşan başlıca inhibitörlerden olan fenolik bileşikler, hücre membranının seçici geçirgenlik özelliğini kaybetmesine yol açarak mikroorganizma gelişimi ve ksilitol üretimini etkilemektedir. *Candida guilliermondii* suşu kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada, fermantasyon ortamının oldukça düşük miktarlarda (0.1 g/L) fenolik madde içermesi durumunda bile, ksilitol üretiminin olumsuz etkilendiği bildirilmiştir (Chandel vd., 2013). Ksilitol üretiminde *Candida athensensis* suşunun kullanıldığı bir başka çalışmada ise; 1 g/L'den daha düşük derişimde fenolik madde içeren fermantasyon ortamlarında gerçekleştirilen üretimlerde olumsuz sonuçların alınmadığı belirtilmiştir (Zhang vd., 2012a).

Hemiselülozik hidrolizatlardaki inhibitör bileşenlerin ksilitol üretimine etkisinin mümkün olduğunca düşük seviyelerde tutulması için; hidrolizasyonun daha ılımlı koşullarda gerçekleştirilmesi, inhibitörlere karşı yüksek direnç gösterebilen mikroorganizmaların seçilmesi veya hidrolizatların içerdiği inhibitör bileşenlerden arındırılmasının (detoksifikasyon) ardından fermantasyon ortamı olarak değerlendirilmesi önerilmektedir (Ur Rehman vd., 2015). Yapılan bazı mikrobiyel ksilitol üretimi çalışmalarında ise; fermantasyon ortamı olarak inhibitör bileşenlerden arındırılmamış hemiselülozik hidrolizatlardan yararlandığı belirtilmiştir (Ping vd., 2013). Ancak, oldukça yaygın bir şekilde, çeşitli fiziksel, kimyasal veya biyolojik yöntemler ile detoksifiye edilen hidrolizatların fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı bilinmektedir. Hemiselülozik hidrolizatlara uygulanacak detoksifikasyon yöntemi, fermantasyonda kullanılan mikroorganizma türüne ve hidrolizatın kimyasal bileşimine bağlı olarak

değişkenlik gösterebildiğinden, her çalışma için uygun bir yöntem belirlenmelidir. Uygulanan işlemlerin ksilitol üretim maliyetini arttırdığı göz önüne alındığında, bu aşamada ucuz ve etkili yöntemlerin kullanılması oldukça büyük bir önem taşımaktadır (Ur Rehman vd., 2015, Vallejos vd.,

2016). Çizelge 1’de, çeşitli çalışmalarda kullanılan hemiselülozik kaynaklar, hidrolizasyon ve detoksifikasyon yöntemleri ile elde edilen hidrolizattaki ksiloz miktarları verilmiştir.

Çizelge 1. Hemiselülozik hidrolizatlar kullanılarak mikrobiyel ksilitol üretiminin gerçekleştirildiği çeşitli çalışmalara ait bilgiler

Mikroorganizma	Substrat kaynağı	Hidrolizasyon yöntemi	Detoksifikasyon yöntemi	Ksiloz derişimi (g/L)	Kaynak
<i>C. guilliermondii</i>	Kavak ağacı	Seyreltik H ₂ SO ₄ (%1.75, 120°C, 2 sa)	Vakum evaporasyonu (65°C) ve organik çözücü ekstraksiyonu (toluen ile)	102.4	Dalli vd. 2017
<i>C. magnoliae</i>	Huş ağacı	Seyreltik H ₂ SO ₄ (%3, 120°C, 1 sa, 1:4)	Aktif kömür ile muamele (15 g/L, 160 vuru/dak, 30°C, 1 sa) ve anyon değiştirici reçine ile muamele (80 g/L)	37.6	Miura vd., 2015
<i>C. tropicalis</i>	Şekerpancarı posası	Seyreltik H ₂ SO ₄ (100 mg/g, 121°C, 20 dak, 1:10)	pH ayarlama ve aktif kömür ile muamele (%2.5 w/v, 200 rpm, 30°C, 1 sa)	49.7	Guáman-Burneo vd., 2015
<i>C. magnoliae</i>	Bambu ağacı	Seyreltik H ₂ SO ₄ (%3, 121°C, 1 sa, 1:10)	Aktif kömür ile muamele (20 g/L, 160 vuru/dak, 30°C, 24 sa)	19.4	Miura vd., 2013
<i>C. tropicalis</i>	Mısır koçanı	Seyreltik H ₂ SO ₄ (%1, 121°C, 40 dak, 1:10)	pH ayarlama ve aktif kömür ile muamele (1:40 w/v, 200 rpm, 30°C, 1 sa)	31.25 ^a 160 ^b	Li vd., 2012
<i>D. hansenii</i>	Üzüm posası	Seyreltik H ₂ SO ₄ (%3.3, 130°C, 15 dak, 1:8)	Aktif kömür ile muamele (1:10 w/v, oda sıcaklığında, 1 sa)	7.8 ^a 50.1 ^b	Salgado vd., 2012
<i>C. athbensensis</i>	Sebze artıkları	25°C’de suda 1 gece ve etanol/seyreltik H ₂ SO ₄ karışımında bekletme (65°C, 4 sa)	pH ayarlama ve aktif kömür ile muamele (%2 w/v, 200 rpm, 30°C, 1 sa)	123.42	Zhang vd., 2012b
<i>D. hansenii</i>	Asma budama artıkları	Seyreltik H ₂ SO ₄ (30 g/kg, 130°C, 15 dak, 1:8)	Aktif kömür ile muamele (20 g/g, oda sıcaklığında, 1 sa)	14.6 ^a 57.3 ^b	Rivas vd., 2007

^a hidrolizat konsantre edilmeden önce elde edilen ksiloz derişimi

^b hidrolizat konsantre edildikten sonra elde edilen ksiloz derişimi

Hemiselülozik hidrolizatların inhibitörlerden arındırılmasında fiziksel yöntemlerden olan vakum evaporasyonu kullanıldığında asetik asit, furfural, HMF ve vanilin gibi uçucu inhibitör bileşenlerin oldukça büyük bir çoğunluğunun uzaklaştırılabildiği bildirilmiştir. Ancak, bu yöntemin uçucu olmayan inhibitörlerin derişimini arttırdığı ve hidrolizat hacmini önemli ölçüde azalttığı bilinmektedir. Aşırı alkalileştirme veya pH ayarlama, organik çözücü ekstraksiyonu, iyon değiştirici reçine kullanımı ve aktif kömür ile muamele uygulamaları ise detoksifikasyonda kullanılan kimyasal yöntemlerdendir. Hidrolizatların içerdiği fenolik madde, keton, furfural ve HMF inhibitörlerinden arındırılması amacıyla, genel olarak kalsiyum hidroksit ile sülfürik asit çözeltilerinin bir arada kullanıldığı pH ayarlama yöntemi sıklıkla uygulanan düşük maliyetli yöntemlerdendir (Mohamad vd., 2015). Detoksifikasyon amacıyla kullanılan aktif kömür ile muamele uygulaması ise, serbest yağ asitleri, n-hekzan, pigmentler ve diğer inhibitör bileşenlerin uzaklaştırılmasını sağlayan etkili ve ekonomik bir yöntem olarak bilinmektedir. Aktif kömür ile muamele uygulamasının etkinliğinin pH, sıcaklık, temas süresi ve hidrolizattaki aktif kömür oranı (w/v) gibi farklı proses parametrelerine bağlı olarak değiştirdiği belirtilmektedir. Düşük pH değerlerinde gerçekleştirilen uygulamalar hidrolizatlarda bulunan iyonlaşmamış yapıdaki fenolik maddelerin, yüksek pH değerleri ise organik bileşiklerin uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Hidrolizatların arıtılması işlemi, aktif kömürün hidrolizat ile temas süresinin arttırılmasından olumlu yönde etkilenmektedir. Ayrıca, inhibitör bileşenlerin aktif kömür tarafından tutulmasını hızlandırması nedeni ile, genellikle bu işlemin yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirildiği bildirilmektedir (Ur Rehman vd., 2015). Hidrolizattaki aktif kömür oranı (0.1-0.3 g/g), uygulama süresi (10-70 dak) ve sıcaklığı (30-80°C) olmak üzere farklı parametrelerin mısır koçanı hidrolizatının detoksifikasyonu üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada optimum değerler sırası ile 0.2 g/g, 40 dakika ve 80°C olarak rapor edilmiştir (Wang vd., 2013a). Mısır koçanı hidrolizatı ile ilgili yapılan diğer bir çalışmada ise, pH ayarlama ve aktif kömür uygulamaları birlikte kullanılmış ve işlemler sonucunda furfural

bileşeninin tamamının, fenolik maddelerin ve asetik asitin ise oldukça büyük bir çoğunluğunun ortamdaki uzaklaştırılabildiği bildirilmiştir (Misra vd., 2013). Zeytin ağacı budama artıkları kullanılarak hazırlanan hidrolizat, belirlenen optimum koşullar altında aktif kömür uygulamasına tabi tutulduğunda asetik asitin %46'sı, fenolik maddelerin %81'i, furfural ve HMF'nin ise tamamına yakınının hidrolizattan uzaklaştırıldığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada, pH ayarlama ve organik çözücü ekstraksiyonu yöntemleri uygulandığında, hidrolizatın içerdiği inhibitör derişimlerinin daha yüksek olduğu bildirilmiş ve bu sebeple elde edilen hidrolizatın arıtılmasında aktif kömür uygulaması önerilmiştir (Mateo vd., 2013). Hemiselülozik hidrolizatların inhibitörlerden arındırılması işlemlerinde iyon değiştirici reçinelerden de yararlanıldığı, özellikle anyon değiştirici reçineler kullanıldığında hidrolizatlardaki furfural, asetik asit, HMF ve fenolik maddelerin, ayrıca aldehit ve alifatik asitlerin önemli ölçüde uzaklaştırıldığı belirtilmiştir (Ur Rehman vd., 2015).

Hidrolizatların arıtılmasında, mikroorganizmalar veya enzimlerin kullanıldığı biyolojik yöntemlerden yararlanan çeşitli çalışmalar da bulunmaktadır. Hidrolizattaki inhibitör bileşenlerin bazı mikroorganizmalar tarafından metabolize edilmesi ile gerçekleştirilen biyolojik detoksifikasyon yöntemlerinin, enerji gereksinimlerinin daha düşük olması, istenmeyen bazı reaksiyon ürünlerinin açığa çıkmaması ve hidrolizatta hacim kaybı gerçekleşmemesi gibi avantajlara sahip olduğu belirtilmektedir. Mısır sapı hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak değerlendirildiği bir çalışmada, hidrolizattaki furfural, HMF ve diğer inhibitörlerin ortamdaki etkili bir şekilde uzaklaştırılmasında *Coniochaeta ligniaria* suşunun kullanıldığı bildirilmiştir. Hidrolizatların enzimler kullanılarak arındırılmasında ise genellikle lakkaz ve peroksidaz enzimlerinden yararlanılmaktadır. Ayrıca, son yıllarda hidrolizatların detoksifikasyonu ile ilgili olarak gerçekleştirilen bazı çalışmalarda, nanofiltrasyon, vakum membran distilasyonu ve elektrokimyasal yöntemlerin kullanıldığı bildirilmektedir (Rao vd., 2016).

SONUÇ

Kimyasal yöntemlerle yapılan ksilitol üretimi ile karşılaştırıldığında, fermantasyon ortamı olarak hemiselülozik hidrolizatların kullanıldığı mikrobiyel ksilitol üretimi çalışmalarının genel olarak daha az maliyet gerektirdikleri belirtilmektedir. Ayrıca, katma değeri yüksek bir ürün olan ksilitolün üretiminde substrat kaynağı olarak, doğada çok fazla miktarda bulunan lignoselülozik artıklardan yararlanılması sayesinde, bu artıkların neden olduğu çevre kirliliğinin azaltılmasına katkı sağlanmaktadır. Ancak, mikroorganizmaların ksilitol üretebildikleri uygun koşulların belirlenmesi ve sağlanması amacıyla, fermantasyon ortamı hazırlık aşamalarının farklı bileşimlerdeki lignoselülozik artıklar için ayrı ayrı optimize edilmesi gerekmektedir. Mikrobiyel ksilitol üretiminin, kimyasal üretimin yerini tamamen alabilmesi için; inhibitörlere dirençli yeni suşların geliştirilmesine veya kolay uygulanabilen detoksifikasyon yöntemlerinin kullanımına yönelik daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu belirtilmektedir.

KAYNAKLAR

Albuquerque, T.L.d., Silva, I.J.d., Macedo, G.R.d., Rocha, M.V.P. (2014). Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: a review. *Process Biochem*, 49(11): 1779-1789.

Albuquerque, T.L.d., Gomes, S.D.L., Marques, J.E., Silva, I.J.d., Rocha, M.V.P. (2015). Xylitol production from cashew apple bagasse by *Kluyveromyces marxianus* CCA510. *Catal Today*, 255: 33-40.

Arrizon, J., Mateos, J.C., Sandoval, G., Aguilar, B., Solis, J., Aguilar, M.G. (2012). Bioethanol and xylitol production from different lignocellulosic hydrolysates by sequential fermentation. *J Food Process Eng*, 35(3): 437-454.

Camargo, D., Sene, L., Variz, D.I.L.S., Felipe, M.G.A. (2015). Xylitol bioproduction in hemicellulosic hydrolysate obtained from sorghum forage biomass. *Appl Biochem Biotechnol*, 175(8): 3628-3642.

Castañón Rodríguez, J.F., Portilla Arias, J.A., Aguilar Uscanga, B.R., Aguilar Uscanga MG (2015). Effects of oxygen and nutrients on xylitol

and ethanol production in sugarcane bagasse hydrolysates. *Food Sci Biotechnol*, 24(4): 1381-1389.

Chandel, A.K., Silva, S.S.d., Singh, O.V. (2013). Detoxification of lignocellulosic hydrolysates: biochemical and metabolic engineering toward white biotechnology. *BioEnergy Res*, 6(1): 388-401.

Chen, H., Liu, J., Chang, X., Chen, D., Xue, Y., Liu, P., Lin, H., Han, S. (2017). A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. *Fuel Process Technol*, 160: 196-206.

Cheng, K.K., Ling, H.Z., Zhang, J.A., Ping, W.X., Huang, W., Ge, J.P., Xu, J.M. (2010). Strain isolation and study on process parameters for xylose-to-xylitol bioconversion. *Biotechnol Biotech Eq*, 24(1): 1606-1611.

Dalli, S.S., Patel, M., Rakshit, S.K. (2017). Development of evaluation of poplar hemicellulosic prehydrolysate upstream processes for the enhanced fermentative production of xylitol. *Biomass Bioenergy*, 105: 402-410.

Dasgupta, D., Bandhu, S., Adhikari, D.K., Ghosh, D. (2017). Challenges and prospects of xylitol production with whole cell bio-catalysis: a review. *Microbiol Res*, 197: 9-21.

Deng, L., Wang, Y., Zhang, Y., Ma, R. (2007). The enhancement of ammonia pretreatment on the fermentation of rice straw hydrolysate to xylitol. *J Food Biochem*, 31(2): 195-205.

Eryaşar, K., Karasu Yalçın, S. (2016). Evaluation of some lignocellulosic byproducts of food industry for microbial xylitol production by *Candida tropicalis*. *3 Biotech*, 6: 202.

Grembecka, M. (2015). Sugar alcohols-their role in modern world of sweeteners: a review. *Eur Food Res Technol*, 241(1): 1-14.

Guamán Burneo, M.C., Dussán, K.J., Cadete, R.M., Cheab, M.A.M., Portero, P., Carvajal Barriga, E.J., Silva, S.S., Rosa, C.A. (2015). Xylitol production by yeasts isolated from rotting wood in the Galapagos Islands, Ecuador, and description of *Cyberlindnera galapagoensis* f.a., sp. nov. *A van Leeuw J Microb*, 108(4): 919-931.

Guo, X., Zhang, R., Li, Z., Dai, D., Li, C., Zhou, X. (2013). A novel pathway construction in

- Candida tropicalis* for direct xylitol conversion from corn cob xylan. *Bioresource Technol*, 128: 547-552.
- Gupta, R., Gautam, S., Shukla, R., Kuhad, R.C. (2017). Study of charcoal detoxification of acid hydrolysate from corn cob and its fermentation to xylitol. *J Environ Chem Eng*, 5(5): 4573-4582.
- Hernández Pérez, A.F., Costa, I.A.L., Silva, D.D.V., Dussán, K.J., Villela, T.R., Canettieri, E.V., Carvalho, J.A., Neto, T.G.S., Felipe, M.G.A. (2016). Biochemical conversion of sugarcane straw hemicellulosic hydrolyzate supplemented with co-substrates for xylitol production. *Bioresource Technol*, 200: 1085-1088.
- Jain, H., Mulay, S. (2014). A review on different modes and methods for yielding a pentose sugar: xylitol. *Int J Food Sci Nutr*, 65(2): 135-143.
- Jeon, Y.J., Shin, H.S., Rogers, P.L. (2011). Xylitol production from a mutant strain of *Candida tropicalis*. *Lett Appl Microbiol*, 53(1): 106-113.
- Jönsson, L.J., Martín, C. (2016). Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technol*, 199: 103-112.
- Kamat, S., Gaikwad, S., Ravi Kumar, A., Gade, W.N. (2013). Xylitol production by *Cyberlindnera (Williopsis) saturnus*, a tropical mangrove yeast from xylose and corn cob hydrolysate. *J Appl Microbiol*, 115(6): 1357-1367.
- Kim, S.H., Yun, J.Y., Kim, S.G., Seo, J.H., Park, J.B. (2010). Production of xylitol from D-xylose and glucose with recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Enzyme Microb Technol*, 46(5): 366-371.
- Li, M., Meng, X., Diao, E., Du, F. (2012). Xylitol production by *Candida tropicalis* from corn cob hemicellulose hydrolysate in a two-stage fed-batch fermentation process. *J Chem Technol Biot*, 87(3): 387-392.
- Li, Z., Qu, H., Li, C., Zhou, X. (2013). Direct and efficient xylitol production from xylan by *Saccharomyces cerevisiae* through transcriptional level and fermentation processing optimizations. *Bioresource Technol*, 149: 413-419.
- Lourenço, M.V.M., Dini Andreote, F., Aguilar Vildoso, C.I., Basso, L.C. (2014). Biotechnological potential of *Candida* spp. for the bioconversion of D-xylose to xylitol. *Afr J Microbiol Res*, 8(20): 2030-2036.
- Mateo, S., Roberto, I.C., Sánchez, S., Moya, A.J. (2013). Detoxification of hemicellulosic hydrolyzate from olive tree pruning residue. *Ind Crop Prod*, 49: 196-203.
- Mateo, S., Puentes, J.G., Roberto, I.C., Sánchez, S., Moya, A.J. (2014). Optimization of acid hydrolysis of olive tree pruning residue. Fermentation with *Candida guilliermondii*. *Biomass Bioenerg*, 69: 39-46.
- Misra, S., Raghuvanshi, S., Saxena, R.K. (2013). Evaluation of corn cob hemicellulosic hydrolysate for xylitol production by adapted strain of *Candida tropicalis*. *Carbohydr Polym*, 92(2): 1596-1601.
- Miura, M., Watanabe, I., Shimotori, Y., Aoyama, M., Kojima, Y., Kato, Y. (2013). Microbial conversion of bamboo hemicellulose hydrolyzate to xylitol. *Wood Sci Technol*, 47: 515-522.
- Miura, M., Shimotori, Y., Nakatani, H., Harada, A., Aoyama, M. (2015). Bioconversion of birch wood hemicellulose hydrolyzate to xylitol. *Appl Biochem Biotech*, 176: 947-955.
- Mohamad, N.L., Mustapa Kamal, S.M., Mokhtar, M.N. (2015). Xylitol biological production: a review of recent studies. *Food Rev Int*, 31(1): 74-89.
- Mohamad, N.L., Mustapa Kamal, S.M., Mokhtar, M.N., Husain S.A., Abdullah, N. (2016). Dynamic mathematical modelling of reaction kinetics for xylitol fermentation using *Candida tropicalis*. *Biochem Eng J*, 111: 10-17.
- Mussatto, S.I., Roberto, I.C. (2008). Establishment of the optimum initial xylose concentration and nutritional supplementation of brewer's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Process Biochem*, 43(5): 540-546.
- Pal, S., Choudhary, V., Kumar, A., Biswas, D., Mondal, A.K., Sahoo, D.K. (2013). Studies on xylitol production by metabolic pathway engineered *Debaryomyces hansenii*. *Bioresource Technol*, 147: 449-455.

- Pérez Bibbins, B., Torrado Agrasar, A., Pérez Rodríguez, N., Aguilar Uscanga, M.G., Domínguez, J.M. (2015). Evaluation of the liquid, solid and total fractions of beer, cider and wine lees as economic nutrient for xylitol production. *J Chem Technol Biot*, 90(6): 1027-1039.
- Ping, Y., Ling, H.Z., Song, G., Ge, J.P. (2013). Xylitol production from non-detoxified corncob hemicellulose acid hydrolysate by *Candida tropicalis*. *Biochem Eng J*, 75: 86-91.
- Rafiqul, I.S.M., Mimi Sakinah, A.M. (2013). Processes for the production of xylitol- a review. *Food Rev Int*, 29(2): 127-156.
- Rafiqul, I.S.M., Mimi Sakinah, A.M., Zularisam, A.W. (2015). Inhibition by toxic compounds in the hemicellulosic hydrolysates on the activity of xylose reductase from *Candida tropicalis*. *Biotechnol Lett*, 37: 191-196.
- Rao, L.V., Goli, J.K., Gentela, J., Koti, S. (2016). Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: an overview. *Bioresource Technol*, 213:299-310.
- Rambo, M.K.D., Bevilaqua, D.B., Brenner, C.G.B., Martins, A.F., Mario, D.N., Alves, S.H., Mallmann, C.A. (2013). Xylitol from rice husks by acid hydrolysis and *Candida* yeast fermentation. *Quim Nova*, 36(5): 634-639.
- Rivas, B., Torrado, A., Rivas, S., Moldes, A.B., Domínguez, J.M. (2007). Simultaneous lactic acid and xylitol production from vine trimming wastes. *J Sci Food Agr*, 87(8): 1603-1612.
- Rocha, M.V.P., Rodrigues, T.H.S., Albuquerque, T.L.d., Gonçalves, L.R.B., Macedo, G.R.d. (2014). Evaluation of dilute acid pretreatment on cashew apple bagasse for ethanol and xylitol production. *Chem Eng J*, 243: 234-243.
- Salgado, J.M., Rodríguez, N., Cortés, S., Domínguez, J.M. (2012). Effect of nutrient supplementation of crude or detoxified concentrated distilled grape marc hemicellulosic hydrolysates on the xylitol production by *Debaryomyces hansenii*. *Prep Biochem Biotech*, 42(1): 1-14.
- Silva, D.D.V., Arruda, P.V.d., Vicente, F.M.C.F., Sene, L., Silva, S.S.d., Felipe, M.G.A. (2015). Evaluation of fermentative potential of *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 in cellulosic and hemicellulosic sugarcane bagasse hydrolysates on xylitol and ethanol production. *Ann Microbiol*, 65: 687-694.
- Su, B., Wu, M., Zhang, Z., Lin, J., Yang, L. (2015). Efficient production of xylitol from hemicellulosic hydrolysate using engineered *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 31: 112-122.
- Ur Rehman, S., Mushtaq, Z., Zahoor, T., Jamil, A., Murtaza, M.A. (2015). Xylitol; a review on bio-production, application, health benefits and related safety issues. *Crit Rev Food Sci*, 55(11): 1514-1528.
- Vallejos, M.E., Chade, M., Mereles, E.B., Bengoechea, D.I., Brizuela, J.G., Felissia, F.E., Area, M.C. (2016). Strategies of detoxification and fermentation for biotechnological production of xylitol from sugarcane bagasse. *Ind Crop Prod*, 91: 161-169.
- Villarreal, M.L.M., Prata, A.M.R., Felipe, M.G.A., Almeida e Silva, J.B. (2006). Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Enzyme Microb Tech*, 40(1): 17-24.
- Wang, L., Fan, X., Tang, P., Yuan, Q. (2013a). Xylitol fermentation using hemicellulose hydrolysate prepared by acid pre-impregnated steam explosion of corncob. *J Chem Technol Biot*, 88(11): 2067-2074.
- Wang, L., Wu, D., Tang, P., Yuan, Q. (2013b). Effect of organic acids found in cottonseed hull hydrolysate on the xylitol fermentation by *Candida tropicalis*. *Bioproc Biosyst Eng*, 36(8): 1053-1061.
- Wannawilai, S., Chisti, Y., Sirisansaneeyakul, S. (2017). A model of furfural-inhibited growth and xylitol production by *Candida magnoliae* TISTR 5663. *Food Bioprod Process*, 105: 129-140.
- Winkelhausen, E., Kuzmanova, S. (1998). Microbial conversion of D-xylose to xylitol. *J Ferment Bioeng*, 86(1): 1-14.
- Zada, B., Chen, M., Chen, C., Yan, L., Xu, Q., Li, W., Guo, Q., Fu, Y. (2017). Recent advances in catalytic production of sugar alcohols and their applications. *Sci China Chem*, 60(7): 853-869.

Zhang, J., Geng, A., Yao, C., Lu, Y., Li, Q. (2012a). Effects of lignin-derived phenolic compounds on xylitol production and key enzyme activities by a xylose utilizing yeast *Candida atbensensis* SB18. *Bioresource Technol*, 121: 369-378.

Zhang, J., Geng, A., Yao, C., Lu, Y., Li, Q. (2012b). Xylitol production from D-xylose and horticultural waste hemicellulosic hydrolysate by a new isolate of *Candida atbensensis* SB18. *Bioresource Technol*, 105: 134-141.



TAHİL VE BAKLIYAT ESASLI GIDALARDA FERMANTASYON İŞLEMİNİN BESİNSEL ÖZELLİKLER VE BİYOAKTİF BİLEŞENLER ÜZERİNE ETKİSİ

Ezgi Karademir, Seda Karasu Yalçın, Erkan Yalçın*

Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği, Bolu, Türkiye

Received / Geliş: 18.08.2017; Accepted / Kabul: 25.12.2017; Published online / Online baskı: 15.01.2018

Karademir, E., Karasu Yalçın, S., Yalçın, E. (2018). Tahıl ve bakliyat esaslı gıdalarda fermantasyon işleminin besinsel özellikler ve biyoaktif bileşenler üzerine etkisi. *GIDA* (2018) 43 (1): 163-173 doi: 10.15237/gida.335154

ÖZ

Birçok ülkede, tahılları veya tahıl ve bakliyat karışımlarını içeren, doğal fermantasyon ile veya starter kültür kullanılarak üretilen çok sayıda geleneksel fermente gıda bulunmaktadır. Genellikle karmaşık bir mikrofloraya sahip olan bu ürünlerde, fermantasyon işleminin ürünün besinsel kalitesi ve biyoaktif bileşenleri üzerinde oldukça etkili olduğu bilinmektedir. Tahıl tanesinin doğal mikroflorasına bağlı olarak, bu ürünlerde genellikle laktik asit bakterileri tarafından gerçekleştirilen laktik asit fermantasyonu ve mayalar tarafından gerçekleştirilen etil alkol fermantasyonu görülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, tahıl ve bakliyatlar uygulanan fermantasyon işlemi ile, bu gıdaların elzem aminoasit ve vitamin miktarları ile sindirilebilirliklerinin arttığı ortaya konmuştur. Ayrıca; fermantasyon sırasında; fenolik asitler, flavonoidler, folik asit, lignanlar ve gama-aminobütirik asit gibi önemli biyoaktif bileşiklerin kayda değer ölçüde arttığı rapor edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Fermente tahıl ürünleri, fermente bakliyat ürünleri, biyoaktif bileşikler, besinsel özellikler, laktik asit fermantasyonu

EFFECT OF FERMENTATION PROCESS ON NUTRITIONAL PROPERTIES AND BIOACTIVE COMPOUNDS OF CEREAL AND LEGUME BASED FOODS

ABSTRACT

In many countries, there are a lot of traditional fermented foods containing cereals or legumes which are produced by spontaneous fermentation or by using starter culture. It is known that fermentation process is very effective on nutritional value and bioactive compounds of these products which usually have a complex micro-flora. According to the natural micro-flora of the cereal grain, lactic acid fermentation and ethyl alcohol fermentation occurs in these products accompanied by lactic acid bacteria and yeasts, respectively. It was demonstrated in recent studies that essential amino acid content, vitamin content and digestibility of cereal and legume based foods increased by fermentation process. In addition, it was reported that contents of important bioactive compounds such as phenolic acids, flavonoids, folic acid, lignans and gamma-aminobutyric acid increased considerably during fermentation.

Keywords: Fermented cereal products, fermented legume products, bioactive compounds, nutritional properties, lactic acid fermentation

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ yalcin_e@ibu.edu.tr,

☎ (+90) 374 254 1000

☎ (+90) 374 253 4558

GİRİŞ

Tahıllar (*Gramineae*), dünyadaki ekili alanların %73.5'inde yetiştirilmekte ve dünya gıda üretiminin %60'ında kullanılmaktadırlar. Buğday (%28), mısır (%27), pirinç (%25) ve arpa (%10), dünyada tüketilen tahılların %90'lık bir kısmını oluştururken, sorgum, millet, yulaf ve çavdar %10'luk dilimde yer almaktadırlar (Chavan vd., 1989; Todorov ve Holzapfel, 2015; Hayes ve Garcia-Vaquero, 2016). Gıdaların besinsel özelliklerini protein, B vitaminleri, doğal antioksidanlar, mineral maddeler (demir ve çinko) ve besinsel lifler bakımından iyileştirme potansiyeline sahip başlıca baklagiller (*Leguminosae*) ise; fasulye, nohut, mercimek, börülce, bezelye, bakla ve soya fasüyesidir (Vaz Patto vd., 2015).

Tahılların besinsel değerini artırmak için bugüne kadar birçok yöntem başvurulmuştur. Bunlar; genetik modifikasyon, bazı elzem aminoasitlerce zenginleştirme ve protein konsantratları ve izolatları ile zenginleştirme, vb. yöntemlerdir (Chavan vd., 1989; Hayes ve Garcia-Vaquero, 2016). Tahıllara uygulanan bazı işlemler ise; pişirme, çimlendirme, öğütme ve fermentasyondur. Orta ve Uzak Doğu Asya'da, çimlendirme ve fermentasyon, özellikle bakliyatlar veya bakliyat-tahıl karışımları üzerinde çok sık uygulanan işlemlerdir. Fermentasyon, gıdanın muhafazasını, istenmeyen faktörlerin ortadan kaldırılmasını, beslenme kalitesinin iyileştirilmesini, gıdanın görünüşünün ve tadının iyileştirilmesini, gıdanın tüketilebilir hale gelmesini, pişirme işlemi için harcanan enerjinin azaltılmasını ve daha güvenli bir ürün üretimini sağlamaktadır (Chavan vd., 1989; Kockova vd., 2013). Tahıl esaslı fermente ürünlerin genellikle doğal fermentasyon ile, bir kısmının da starter kültür kullanılarak üretildiği bilinmektedir. Dünyada, özellikle doğal fermentasyon ile üretilen, çoğunluğu yöresel olup, henüz ticari boyuta taşınmamış olan çok sayıda tahıl ve bakliyat esaslı fermente gıdanın olduğu bildirilmektedir (Karaçıl ve Tek, 2013). Bu gıdaların çoğunlukla laktik asit bakterileri, mayalar ve küflerin bulunduğu karmaşık bir mikrofloraya sahip oldukları ve bu mikroorganizmaların fermentasyonda rol oynadıkları bilinmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, fermentasyon işleminin, tahılların ve bakliyatların duyu ve besinsel kalitesini artırmada oldukça etkili olduğunu ortaya koymuştur (Kockova vd. 2013; Hayes ve Garcia-Vaquero, 2016; Hassani vd., 2016). Fermentasyon işlemi ile, bu gıdaların protein miktarlarının değiştiği, aminoasit bileşiminin etkilendiği, bazı esansiyel aminoasitlerin arttığı, özellikle B grubu vitaminleri olmak üzere, vitamin bakımından daha zengin hale geldiği ve başta fenolik bileşikler ve biyoaktif peptitler olmak üzere bazı biyoaktif bileşiklerin miktarının arttığı rapor edilmiştir (Capozzi vd., 2012; Pallin vd., 2016). Bu derlemede; tahıl ve bakliyat esaslı fermente ürünler, bu ürünlerin mikroflorası ve fermentasyon işleminin bu ürünlerin besinsel özellikleri ve biyoaktif bileşenleri üzerindeki etkilerine yer verilmiştir.

TAHİL VE BAKLIYAT ESASLI FERMENTE ÜRÜNLERİN MİKROFLORASI

Tahılları veya tahıl ve bakliyat karışımlarını içeren gıdaların doğal fermentasyonunda rol oynayan mikroorganizmalar, genellikle tanelerin yüzey mikroflorasında yer alan türlerden oluşmaktadır. Bu ürünlerin karmaşık bir mikrofloraya sahip olmasına sebep olarak; tahıl tanelerinin üretim aşamalarındaki mikrobiyel çeşitlilik gösterilmektedir. Tanede bulunan mikroorganizmaların türü ve sayısı; tahılın yetiştirildiği iklimsel koşullar, toprak, biyolojik çevre, hasat sırasında ve sonrasındaki iklim koşulları ile depolama koşullarına bağlı olarak değişebilmektedir. Dünyanın çeşitli bölgelerinde üretilen geleneksel fermente tahıl ürünleri ve üretimlerinde rol oynayan mikroorganizmalar, Çizelge 1'de sunulmuştur. Bir çok üründe, fermentasyonun doğal fermentasyon olduğu; bakteri, maya veya bunların karışımından oluşan bir mikroflora tarafından gerçekleştirildiği bilinmektedir. Bakterilerin genellikle, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Micrococcus* ve *Bacillus* türlerine ait oldukları ifade edilmiştir. Bazı fermente tahıl veya bakliyat ürünlerinden ise; *Paecilomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* ve *Trichotecium* cinslerine ait küf türlerinin izole edildiği bildirilmiştir (Chavan vd., 1989; Kohajdova, 2017).

Çizelge 1. Çeşitli ülkelerde üretilen tahıl ve bakliyat esaslı bazı geleneksel fermente ürünler ve fermantasyonda rol oynayan mikroorganizmalar (Chavan vd., 1989; Achi ve Ukwuru, 2015; Liptáková vd., 2017)

Ürün İsmi	Ülke	Hammadde	Mikroorganizmalar
Boza	Türkiye, Arnavutluk	Mısır, pirinç, darı	<i>Leuconostoc</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Busaa	Kenya, Nijerya	Mısır, sorgum, malt, darı	<i>Candida krusei</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus salivarius</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Pediococcus damnosus</i>
Chicka	Peru	Mısır	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp.
Dhokla	Hindistan	Pirinç, nohut	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Hansenula silvicola</i> , <i>Torulopsis candida</i> , <i>Trichosporon pullulans</i>
Idli	Hindistan, Sri Lanka	Pirinç, siyah fasulye	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Streptomyces faecalis</i> , <i>Torulopsis</i> , <i>Candida</i> , <i>Trichosporon pullulans</i>
Kenkey	Gana	Mısır	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Candida</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i>
Tarhana	Türkiye	Buğday, yoğurt	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Puto	Filipinler	Pirinç	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Streptomyces faecalis</i>
Miso	Japonya, ABD	Çin, Buğday, soya, arpa	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Pediococcus halophilus</i> , <i>Bacillus</i> spp., <i>Saccharomyces rouxii</i>
Pito	Nijerya	Sorgum ve millet	<i>Acetobacter</i> spp., <i>Candida</i> spp., <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces chevalieri</i>

Fermente tahıl ve bakliyat ürünlerinin mikroflorasının karmaşık olduğu bilinmesine rağmen, yapılan çalışmalar, laktik asit bakterilerinin bu ürünlerin birçoğunda mikrofloranın bir kısmını oluşturduğunu göstermiştir (Kohajdova, 2017). Mısır unu hamurunun fermantasyonunu konu alan bir çalışmada, üründen *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus cellobiosus* ve *Pediococcus acidilactici* türlerine ait laktik asit bakterilerinin izole edildiği, bunlardan *L. fermentum*'un heterofermentatif olduğu bildirilmiştir. Bu fermantasyonun başında izole edilen koliform bakteriler, maya ve küflerin, fermantasyonun ikinci gününden itibaren inhibe oldukları rapor edilmiştir. Tahıl ve bakliyat esaslı fermente ürünlerde bakteriyel fermantasyonun genellikle laktik asit

fermentasyonu olduğu, ancak, bu ürünlerde mayalar tarafından etil alkol fermantasyonunun da gerçekleştirildiği bilinmektedir. Pirinç ve siyah fasulye karışımının fermantasyonunda ise, heterofermantatif laktik asit bakterilerinden *Leuconostoc mesenteroides*'in baskın florayı oluşturduğu, aynı üründen *Torulopsis candida* ve *Trichosporon pullulans* mayalarının da izole edildiği belirtilmiştir (Chavan vd., 1989).

BESİNSEL ÖZELLİKLER ÜZERİNE FERMANTASYONUN ETKİSİ

Bakliyat ve yağlı tohumlarla kıyaslandığında, tahılların toplam protein miktarının daha az olduğu bilinmektedir. Ayrıca; lizin ve triptofan gibi esansiyel aminoasitler bakımından fakir

oldukları, birçok tahılda B grubu vitaminleri ile demir ve çinko minerallerinin yetersiz olduğu rapor edilmiştir. Fermentasyon işleminin, tahılların besinsel kalitesinin artırılması için kullanılacak en ucuz ve en etkili yöntem olduğu bildirilmiştir (Chavan vd., 1989; Ciesarova vd., 2017). Yapılan bir çalışmada, mısır hamurunun *S. cerevisiae* ve *C. tropicalis* ile fermentasyonu sonucu protein miktarının %8.4 arttığı belirtilmiştir. Fermentasyonda ek olarak malt yer aldığı zaman, protein miktarının %14.5 arttığı ifade edilmiştir. Aynı çalışmada tahıl olarak sorgum kullanıldığında protein miktarının fazla değişmediği, sorgum ve yeşil fasulye karışımı kullanıldığında ise, %14'ten %17'ye yükseldiği bildirilmiştir (Chavan vd., 1989).

Tahılların doğal fermentasyonu sırasında toplam protein miktarında az bir artış kaydedilmesine rağmen, protein kalitesindeki değişimlerin oldukça önemli düzeyde gerçekleştiği rapor edilmiştir (Ciesarova vd., 2017). Tahıl ve bakliyat fermentasyonlarında, özellikle suda çözünür proteinlerin ve serbest aminoasitlerin artış gösterdiği belirtilmektedir. Fermentasyonda rol oynayan mikroorganizmaların proteolitik aktiviteleri sonucunda, proteinler daha küçük polipeptitlere, peptitlere ve serbest aminoasitlere yıkılırlar (Adeyemo ve Onilude, 2013). Aminoasitlerin biyoyararlılığının ve protein bileşimindeki oranının, toplam miktarlarından çok daha önemli olduğu bilinmektedir. Bazı fermentasyonlarda, serbest esansiyel aminoasitlerin miktarının arttığı görülmüştür (Ciesarova vd., 2017). Mısır hamurunun üç gün doğal fermentasyona uğratıldığı bir çalışmada, ortamdaki lizin ve metyonin miktarında önemli ölçüde artış olduğu rapor edilmiştir. Bu iki aminoasidin tahıllarda sınırlı düzeyde olduğu bilindiğinden, fermentasyon sırasında gerçekleşen transaminasyon gibi bir mekanizma ile bu artışın gerçekleşmiş olabileceği ifade edilmiştir (Chavan vd., 1989). Yulaf, pirinç, millet, mısır ve buğdayın altı gün doğal fermentasyonları sonucunda, bu tahıllardaki lizin miktarlarının önemli ölçüde arttığı görülmüştür. Bir diğer çalışmada, mısır ve sorgum hamurunun fermente edilmesiyle, metyonin ve triptofan miktarlarında artış olduğu bildirilmiştir (Chavan vd., 1989).

Fermentasyon uygulamasının, gıdaların sindirimi üzerine de birçok etkisi bulunmaktadır. Örneğin kalın bağırsakta mikrobiyel fermentasyon sonucu sindirilemeyen poli- ve oligo-sakkaritlerin miktarında azalma meydana gelmektedir. Fermentasyonun nişasta sindirilebilirliği üzerine de olumlu etkileri bulunmaktadır. Baskın mikrofloranın enzimatik özelliklerine bağlı olarak, nişastadaki bağların parçalanarak, amiloz ve amilopektinin maltoz ve glukozaya dönüşümü gerçekleştiğinden, nişasta sindirilebilirliğinde artış görülmektedir (Kohajdova ve Karovicova, 2007). Fermentasyon işleminin başlarında, mikrobiyel α - ve β -amilaz enzimlerinin aktivitesi sonucu nişasta miktarında azalma görülür. İleriki aşamalarda (12 saat sonra), pH'nın düşmesine bağlı olarak, α - ve β -amilaz enzimlerinin faaliyetleri durmakta ve nişasta degradasyonu sona ermektedir. Toplam şeker miktarı da fermentasyonun ilk 3- 6 saatinde düşmektedir. Çözünür şeker miktarında artış görülmesi beklenirken, şeker miktarının düşmesi, şekerin mikrobiyel aktivite için gerekli karbon kaynağı olmasından kaynaklanmaktadır (Chavan vd., 1989). Ham lif miktarının da kuru maddede fermentasyon boyunca arttığı ifade edilmiştir. Mikroorganizma faaliyeti sonucu, hücre duvarı ve depo polisakkaritleri modifikasyona uğratılmakta ve besinsel liflerin çözünürlüklerinde kısmi düşüşler görülmektedir (Martián-Cabrejas vd., 2004; Chavan vd., 1989).

Teknolojik işleme yöntemlerinden laktik asit fermentasyonunun, baklagillerin hem hücre duvarı hem de depo polisakkaritlerinin yapısında değişiklik meydana getirebileceği belirtilmiştir. Bunun da mikroorganizma faaliyetleri sonucu doku bütünlüğünün etkilenmesi veya protein-karbonhidrat bütünlüğünün bozulması ve böylece besinsel liflerin çözünürlüğünün azalması ile gerçekleştiği bildirilmiştir (Martián-Cabrejas vd., 2004).

Tahıl ve bakliyat taneleri ve bunları içeren gıdalar, önemli miktarda enerji, protein ve çeşitli mikro besin maddelerini sağlamları açısından beslenmemizin vazgeçilmez bir parçası olmasına rağmen, düşük çözünürlüğe ve sınırlı düzeyde sindirilebilirliğe sahip bazı antinutrisyonel bileşenleri de içermektedirler (Dordevic vd.,

2010). Tahılların fermantasyonu, genel olarak tahıl tanelerinin antinutrisyonel madde içeriğini (*fitat, tannin*) önemli miktarda düşürmesi açısından da önemli bir teknolojik işlemdir (Pranoto vd., 2013). pH 6'da bir magnezyum tuzu olan fitat (mineral bağlanmış fitik asit), pH 5'in altına düştüğünde mikrobiyal fitaz enzimi ile parçalanmaktadır (Chavan vd., 1989). Dolayısıyla fermantasyon koşulları, tahıllarda demir, çinko, magnezyum ve proteinler gibi çok değerli katyonlar ile kompleks formda bulunan fitatın (Gupta vd., 2013), enzimatik degradasyonunu sağlayacak optimum pH koşullarını sağlayabilmektedir. Tahıldaki baskın mikrofloranın büyük bir çoğunluğunun sahip olduğu fitaz enzimi aktivitesi sonucu, fitik asit içeriğinde belirli bir ölçüde düşüş olmaktadır. Yapılan bir çalışmada, laktik asit bakterilerinin fermantasyonu sonucunda fitat içeriğinin önemli miktarda düştüğü, diğer yandan laktik asit bakterilerinin fitat degradasyonunda direk olarak rol almadığı, endojen fitaz enziminin aktivasyonunu sağlayarak ortam koşullarını oluşturduğu ifade edilmiştir (Reale vd., 2007). Fitaz enzimi, fitatı defosforize ederek, fitatın serbest inorganik fosfata ve inositol fosfat esterlerine dönüşümünü sağlamaktadır (Mukhametzhanova vd., 2012). Bu dönüşümün, çözünür demir, çinko ve kalsiyum miktarında artırıcı etki oluşturduğu bildirilmiştir. Tannin seviyesindeki düşüşün de, demir minerali absorpsiyonunda önemli düzeyde artış sağladığı rapor edilmiştir (Kohajdova ve Karovicova, 2007).

BİYOAKTİF BİLEŞENLER ÜZERİNE FERMANTASYONUN ETKİSİ

Biyoaktif/biyolojik olarak aktif bileşikler; gıdalarda doğal olarak bulunan veya işleme sırasında açığa çıkan, diyetle alınmaları elzem olmayan, biyolojik aktiviteleri sayesinde çeşitli kronik hastalıkların ve kanser tiplerinin önlenmesinde etkileri olan, gıdalardaki başlıca besin öğelerinin dışındaki ikincil metabolitlerdir (Hayes ve Garcia-Vaquero, 2016).

Tahıl ve bakliyat taneleri ile tam tahıllı gıdalar, diyet lifleri, fenolik bileşikler, vitaminler ve mikroelementler gibi kendilerine has çok sayıda biyoaktif bileşeni içeren, önemli besinlerdir

(Bartłomiej vd., 2011). Bunun yanında, yüksek miktardaki tahıl biyoaktif bileşeni, tanede ilgili matrise bağlı halde bulunduğundan, biyoyararlılığı düşüktür (Gani vd., 2012). Fermantasyon uygulaması süresince meydana gelen biyokimyasal değişikliklerin, tahıl biyoaktif bileşenlerinin de biyoaktivitesine ve sindirilebilirliğine etki ettiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Wang vd., 2014b).

Fenolik Asit İçeriği Üzerine Fermantasyonun Etkisi

Tahıllarda serbest ve bağlı formda bulunan fenolik asitler, genel olarak perikarp tabakasının dış kısmında bulunmaktadır (Wang vd., 2014a). Tahıl tanelerinde baskın olan *p*-kumarik asit, ferulik asit, sinapik asit ve vanillik asit gibi fenolik asitler (Guo ve Beta, 2013), geçiş metallerini şelatlamakta ve ayrıca sülfür içeren amino asitler (sistein ve metyonin) hücre içinde sentezlenen başlıca antioksidan olan glutationun sentezine katkıda bulunurken, belirli genleri aktive edebilme veya baskılayabilme özelliklerine sahiptirler (Masiş vd., 2016). Tahıl tanelerinin fenolik asit içeriği, meyve ve sebzeler ile kıyaslandığında daha yüksek konsantrasyonlardadır. Ancak, meyve ve sebzelerdeki fenolik asitler, serbest formda veya ince bağırsaklarda kolayca hidrolize edilebilen çeşitli şeker molekülleri, kuinik, tartarik ve malik asitler ile konjuge halde bulunurken (Hole vd., 2012), tahıllarda genel olarak ester bağları ile arabinoksilan zincirlerine veya eter bağları ile ligninlere bağlı halde bulduklarından, sindirim enzimleri tarafından hidrolize edilemedikleri (Pallin, 2015), kolona ulaştıklarında mikrobiyal esterazlar, ksilanazlar gibi enzimlere maruz kaldıkları bildirilmiştir (Hole vd., 2012).

Fenolik asitler, antiviral, antibakteriyel ve güçlü antioksidan özelliğe sahiptir (Hole vd., 2012). Tahıl tanelerinin fenolik bileşik içeriği, öğütme, ekstrüzyon, çimlendirme ve ekşi maya uygulaması gibi çeşitli işleme teknolojileri uygulandığında önemli derecede değişiklik göstermektedir. Fermantasyon uygulaması süresince, esterazlar, ksilanazlar ve fenoloksidazlar gibi endojen ve bakteriyel enzimlerin etkisiyle tahıl bileşenleri modifikasyona uğramaktadır (Hole vd., 2012). Proses boyunca çözünürlüğü artan arabinoksilanların enzim aktivitesi ile degradasyonu

sağlanmakta (Katina vd., 2012) ve böylece yapılarında, biyoaktivitelerinde ve biyoyararlılıklarında değişimlerin görüldüğü ifade edilmektedir (Hole vd., 2012). Fermantasyon uygulamasının, fenolik asitlerin miktarına ve biyoyararlılığına etkisinin incelendiği ve Anson vd. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, kepeksiz buğday unlu ekmekek, tam buğday unlu ekmekek ve fermente kepek ilaveli tam buğday unlu ekmekek örneklerinin fenolik asit içerikleri incelenmiştir. Fermantasyon etkisiyle fenolik asit içeriğinin arttığı, serbest ve toplam fenolik asit miktarının fermente kepek ilaveli tam buğday ekmeğinde en yüksek değerde olduğu bulunmuştur. Fenolik asitlerin biyoerişilebilirliğinin belirlenmesi ve metabolik sindirimlerinin incelenmesi için *in vitro* kolon modeli kullanılmış, fenolik bileşiklerin farklı düzeyde hidrosilasyonu sonucu açığa çıkan kolon sonu metabolitlerinin miktarında artış gözlemlenmiştir. Buna göre fermantasyon uygulamasıyla fenolik asitlerin biyoerişimlerinin arttığı, etkili bir şekilde metabolize edildikleri bildirilmiştir (Anson vd., 2009).

Doğal olarak ayrılmış çavdar kepeği ve kabuk soyma makinesi ile ayrılmış çavdar kepeğinin fenolik asit içeriği karşılaştırıldığında, doğal olarak ayrılmış çavdar kepeğinin ferulik asit içeriğinde, fermantasyon sonunda daha fazla artış görülmüştür. Bunun, doğal olarak ayrılmış kepekte, başlangıç fenolik içeriğinin daha yüksek olmasından ve daha yüksek düzeyde olan endojen ve mikrobiyal orjinli enzim aktivitesinden kaynaklandığı bildirilmiştir. Yüksek enzim aktivitesine sahip, doğal olarak ayrılmış kepeklerin fermantasyonu sonucunda, hücre duvarının etkin bir şekilde yıkımının sağlanmasıyla, fenolik asitlerin salınımının daha yüksek seviyeye çıktığı belirtilmiştir (Katina vd., 2007).

Fermantasyon koşullarının serbest ferulik asit içeriğine etkisi incelendiğinde ise, en yüksek ferulik asit içeriğinin, tam çavdar unundaki sinnamoil esterazların optimum çalışma pH'sına (pH 7) yakın olan, pH 6-6.5'te ortaya çıktığı, düşük pH değerlerinde (3.9-4.1) serbest ferulik asit içeriğinin ise en düşük seviyede olduğu tespit edilmiştir. Kabuk soyma işlemi ile ayrılmış kepekte, amilaz, proteaz ve ksilanaz gibi enzim

aktivitelerinde düşüş meydana gelmiştir. Dolayısıyla, ferulik asit içeriği üzerine fermantasyonun etkisinin, endojen enzimlerin aktivasyonuna bağlı olarak değiştiği rapor edilmiştir (Katina vd., 2007).

Flavonoid İçeriği Üzerine Fermantasyonun Etkisi

Flavonoidler, meyve, sebze, çay, şarap ve kakao gibi gıdalarda yaygın olarak bulunan, sarı renkli olmaları sebebiyle latince 'sarı' anlamına gelen 'flavus' sözcüğünden türetilmiş (Keservani ve Sharma, 2014), güçlü antioksidan ve şelatlama özelliğine sahip bitkisel polifenolik bileşiklerdir ve P vitamini olarak da kabul edilirler (Kumar ve Pandey, 2013). Genel yapıları, difenilpropan iskeletine (C₆C₃C₆) sahiptir. Genellikle oksijen ile halka yapmış üç karbonlu köprü iki fenil grubunu birbirine bağlar. Flavonoidler; flavon'lar ve flavonol'ler, flavanonlar, kateşinler ve lökoantosiyonidinler, antosiyonidinler, proantosiyonidinler olmak üzere 5 alt gruba ayrılırlar, bunların kimyasal yapı farklılıkları ortadaki pıran halkasından kaynaklanmaktadır (Batra ve Sharma, 2013; Sommano, 2014). Bitkilerde fotosentezle meydana gelirler, bitkilerin yaşamsal faaliyetleri için kullandıkları karbonhidrat, aminoasitler gibi birincil metabolitlerden açığa çıkan ikincil metabolitlerdir (Weston ve Mathesius, 2013).

Flavonoidlerin, antioksidan, anti-karsinogenik, anti-alerjik, gastrointestinal sistemi koruyucu etkilerinin olduğu belirtilmiştir (Kozłowska ve Szostak-Wegierek, 2014). *In vivo* ve *in vitro* sistemlerde yapılan çalışmalarla yüksek antioksidan kapasiteleri olduğu kanıtlanmış (Khlestkina, 2013) ve çeşitli epidemiyolojik çalışmalarla kardiyovasküler hastalıkları, çeşitli kanser tiplerini ve yaşa bağlı olarak gelişen hastalıkları engelleyici etkilerinin olduğu saptanmıştır (Liu vd., 2013).

Tahıllarda flavonoid içeriği bakımından ilk sırada yer alan sorgum üzerinde yapılan bir çalışmada, farklı laktik asit bakterilerinin kombinasyonu ile sorgum bazlı ekşi hamurlar hazırlanmış ve fermantasyonun fenolik asit ve flavonoid içeriğindeki etkisi incelenmiştir. Fermantasyon boyunca, laktik asit bakterilerinin glukozidaz, fenolik asit redüktaz ve fenolik asit dekarboksilaz

aktivitesi sonucu, fenolik asitlerin, fenolik asit esterlerinin ve flavonoid glukozidlerinin metabolize edildiği, böylece çözünmez, hücre duvarına bağlı halde bulunan flavonoidlerin salınımının sağlandığı belirlenmiştir. Laktik asit fermantasyonu uygulanmış hamurlardaki polifenol içeriğinin, fermantasyon uygulanmayan örneklerle göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (Svensson vd., 2010).

Soya (*Glycine max*) izoflavonoidlerinin içeriği ve miktarına, fermantasyonun etkisinin incelendiği bir başka çalışmada, tam soya ununda (WSF) ve *Aspergillus oryzae* inoküle edilmiş fermente tam soya unundaki (24 ve 48 saat, FAWSF-24h, 48h) izoflavonoid konsantrasyonları karşılaştırılmış, toplam izoflavonoid konsantrasyonunun 459.19 ± 1.80 $\mu\text{g/g}$ 'dan, 676.54 ± 0.78 $\mu\text{g/g}$ 'a (FAWSF-24h) yükseldiği saptanmıştır. Bununla birlikte, glikozit formundaki soya izoflavonoidleri, asit veya alkali koşullarda veya β -glukozidaz enzimi etkisiyle aglikon formuna dönüşmüşlerdir (Da Silva vd., 2011). İzoflavonoid aglikonlarının, kardiyovasküler ve kronik hastalıkların önlenmesinde etkili oldukları bilinmektedir ve vücutta emilimleri daha kolaydır. *Aspergillus oryzae* tarafından sağlanan β -glukozidaz enzimi aktivitesi sonucu, fermantasyon uygulaması öncesinde %2.67 olan izoflavon aglikonlarının oranı, FAWSF-48h örneğinde %75.51'e yükselmiştir (Da Silva vd., 2011).

Folat/Folik Asit İçeriği Üzerine Fermantasyonun Etkisi

Folat terimi, B grubu vitaminlerinden folik asitlerin çeşitli formlarının genel ismi olarak kullanılır. Folatlar, amino asitlerin ve nükleotitlerin biyosentezinde yer alır, birçok enzimatik reaksiyon için kofaktör görevi görür. Önerilen günlük folat alımı yetişkenler için 300 μg iken, hamileler için 400 μg 'dır. Tahıllar, özellikle tam tahıllar, beslenmemizde temel folat kaynağıdır (Kariluoto vd., 2005). Çimlendirme, malta işleme, fermantasyon gibi prosesler uygulanarak gıdaların folat içeriklerinde artış sağlandığı yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır (Kariluoto vd., 2005). Buğday kepeği, folat içeriği bakımından oldukça zengin bir kaynaktır, buğday ununa kıyasla iki kat daha fazla folat içermektedir.

Buğday unları genel olarak 27-66 μg folat/100 g buğday unu aralığında folat içerirken, %20 oranında fermente buğday kepeği ilavesi ile bu miktarda 72-97.8 $\mu\text{g}/100$ g'a yükselmiştir (Katina vd., 2012).

Yapılan çalışmalarda, maya kaynaklı fermantasyon ile folat içeriğinin etkili bir şekilde artışının sağlandığı ve *S. cerevisiae* faaliyetinin diğer maya türlerine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Normal bir buğday unu ekmeği ile karşılaştırıldığında, maya kaynaklı fermente kepek ilave edilmiş ekmeklerdeki folat içeriğinin %32-62 oranında daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte yapılan bir çalışmada, en yüksek folat içeriğinin doğal laktik asit bakterisi ve diğer doğal olarak bulunan bakterilerin bulunduğu örneklerde tespit edildiği, bu bakterilerin folat sentezinde destekleyici rolünün bulunduğu bildirilmiştir (Katina vd., 2012). Kariluoto vd. (2006)'nin yaptığı bir çalışmada, farklı mikroorganizma kültürleri ile ürettikleri çavdar ekmeklerindeki folat içeriğine fermantasyonun etkisini incelemişlerdir. Bu çalışma için, mayalı ekmek (*Saccharomyces cerevisiae*), maya ve laktik asit bakterisi karışımı ile hazırlanmış ekşi mayalı ekmek (*Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum*, *Candida milleri*) ve laktik asit bakterisi ile hazırlanmış ekşi mayalı ekmek (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*) kullanılmıştır. Farklı fermantasyon uygulamalarıyla üretilen ekmeklerdeki folat içeriği incelendiğinde, en düşük değer yalnızca laktik asit bakterisi kullanılarak üretilen ekşi mayalı ekmekte saptanmış, fermantasyon boyunca folatların büyük ölçüde mayalar tarafından sentezlendiği bulunmuştur. Ekmek mayası ile üretilen ekmek ile maya ve laktik asit bakterisi karışımı ile hazırlanmış ekşi mayalı ekmek karşılaştırıldığında, mayalar tarafından sentezlenen folat miktarında azalma görülmüştür (Kariluoto vd., 2005). Laktik asit bakterilerinin, bileşikleri metabolize ederek organik asit üretmek için mayalar ile rekabet halinde olduğu (Gerez vd., 2013), dolayısıyla maya gelişimini inhibe edici etki oluşturduğu bildirilmiştir (Kariluoto vd., 2005).

Lignan İçeriği Üzerine Fermantasyonun Etkisi

Lignanlar, genel olarak glikozidik bağlar ile karbonhidratlara bağlı halde bulunan, fitoöstrojen grubuna ait bitkisel kaynaklı difenolik bileşiklerdir (Bartkiene vd., 2015). Moleküler yapıları ve molekül ağırlıkları, steroidler ile benzer olduğundan, hormonal sistemi düzenleyici önemli besinsel bileşikler olarak tanımlanabilir (Sommano, 2014).

Yapılan çalışmalar, lignanca zengin gıdalar ile beslenmenin, hormonlarla ilişkili kanser ve kalp hastalıklarını ve osteoporezi önleyici etkilerinin olduğunu göstermiştir (Durazzo vd., 2013; Sarwar vd., 2013). Temel kaynakları, yağlı tohumlar, tam tahıllar, baklagiller ve özellikle kırmızı meyveler olmak üzere çeşitli meyve ve sebzelerdir (Durazzo vd., 2013).

Arpa kepeği, öğütülmüş acı bakla tohumu ve bezelye lifi örneklerine, farklı laktik asit bakterileri (*Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus pentosaceus*) ile optimum çalışma sıcaklıklarında (sırasıyla 32, 30, 35°C), 48 saat katı hal fermantasyonu uygulanmıştır. Farklı laktik asit bakterileri ile uygulanan her fermantasyon koşulunda, tüm örneklerdeki lignan içeriğinde artış gözlenirken, en fazla artış görülen arpa kepeği örneğinde, fermantasyon öncesinde lignan içeriği 291.2±7.2 µg/100 g iken, *Pediococcus acidilactici* bakterisinin uygulandığı koşullarda 451.0±9.1 µg/100 g'a yükselmiştir (Bartkiene vd., 2015).

Lignanlar kolondaki bakteriler tarafından karbonhidratlardan ayrılarak, intestinal absorpsiyonu daha kolay olan ve enterolignan olarak bilinen enterodiol (ENL) ve enterolaktonlara (END) dönüştürülürler (Bartkiene vd., 2012). Laktik asit bakterilerinin faaliyetiyle de lignanların enterolignanlara dönüşümünün gerçekleşerek, sindirilebilirliklerinde artış sağlandığı belirlenmiştir (Bartkiene vd., 2015).

Gama-Aminobutirik Asit (GABA) İçeriği Üzerine Fermantasyonun Etkisi

Gama-aminobutirik asit (GABA), yaygın olarak bakterilerde, bitkilerde ve omurgalılarda dört karbonlu serbest amino asit formunda bulunan,

bakterilerde ve bitkilerde Krebs döngüsünde metabolik rolü olan, omurgalılarda ise sinirsel iletimde rol alan biyolojik olarak aktif bir bileşiktir (Diana vd., 2014; Dhakal vd., 2012). Aynı zamanda tansiyonu düşürme, idrar söktürme gibi önemli fizyolojik etkileri olan gama-aminobutirik asit, özellikle laktik asit bakterileri olmak üzere mikroorganizma faaliyetiyle de üretilebilmektedir (Bhanwar vd., 2013). Ayrıca GABA, pankreastan insülin salgılanmasını uyarıcı sekretagog olması sebebiyle, etkili bir şekilde diyabetik hastalıkları önleyici özelliğe sahiptir. Gama-aminobutirik asitçe zengin gıdaların büyük çoğunluğunu, tahıl bazlı gıdalar oluşturmaktadır (Diana vd., 2014).

Yapılan bir çalışmada, yüksek glutamat dekarboksilaz aktiviteye sahip mikroorganizmalar ile özellikle glutamik asitçe (L-Glu) zengin gıdaların fermantasyonu sonucunda GABA içeriğinin arttığı belirlenmiştir (Nagaoka, 2005). Coda vd. (2010), çeşitli tahıl unları ve farklı laktik asit bakterileri ile hazırladıkları ekşi hamurlarda, GABA ve serbest amino asit içeriğindeki değişimleri incelemişlerdir. Kültür aşlaması yapılmadan asitlendirme işlemi ile hazırladıkları kontrol grubuna göre, farklı laktik asit bakterilerinin aşılandığı hamurlardaki serbest amino asit içeriklerinde %28-76 arasında artış gözlemlenmiştir. Kontrol örneklerinde GABA içerikleri 7±2 - 78±13 mg/kg arasında değişirken, fermantasyon uygulanan örneklerde bu değer 30±13-1031±9 mg/kg arasında değiştiği belirtilmiştir (Coda vd., 2010). Mikroorganizma faaliyeti sonucu GABA üretimi, ortamın pH'sına (Bhanwar vd., 2013), glutamik asit veya glutamik asit tuzlarının varlığına ve dışarıdan eklenen karbon ve azot kaynaklarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Diana vd., 2014).

SONUÇ

Fermente tahıl ve bakliyat ürünlerinde kullanılan hammadde, işlem parametreleri ve son ürünün duyu özellikleri dünyanın çeşitli bölgelerinde kültürden kültüre oldukça değişiklik göstermektedir. Bu ürünlerde uygulanan fermantasyon işleminin, hem ürünün besinsel kalitesini artırdığı hem de üründe çeşitli biyoaktif bileşiklerin oluşumuna sebep olduğu ortaya konmuştur. Son yıllarda, tüketicilerin fonksiyonel gıdalara

eğiliminin arttığı bildirilmektedir (Hassani vd., 2016). Geleneksel olarak gıdaların korunması amacıyla yapılan birçok fermantasyon işleminin günümüzde artık gıdanın biyokimyasal ve besinsel özelliklerini geliştirmeye yönelik gerçekleştirildiği rapor edilmiştir (Ojha ve Tiwari, 2016). Tahıl ve bakliyalara uygulanan fermantasyon işleminin, biyoaktif bileşiklerce zenginleştirilmiş yeni fonksiyonel gıdaların üretimi için iyi bir alternatif olacağı ifade edilmektedir.

KAYNAKLAR

- Achi, O.K., Ukwuru, M. (2015). Cereal-Based Fermented Foods of Africa as Functional Foods. *Int J Microbiol Appl*, 2(4): 71-83.
- Adeyemo, S.M., Onilude, A.A. (2013). Enzymatic reduction of anti-nutritional factors in fermenting soybeans by *Lactobacillus plantarum* isolates from fermenting cereals. *Nig Food J*, 31(2): 84-90.
- Anson, N.M., Selinheimo, E., Havenaar, R., Aura, A.M., Mattila, I., Lehtinen, P., Bast, A., Poutanen, K., Haenen, G.R. (2009). Bioprocessing of Wheat Bran Improves *in vitro* Bioaccessibility and Colonic Metabolism of Phenolic Compounds. *J Agricult Food Chem*, 57: 6148-6155.
- Bartkiene, E., Skabeikyte, E., Krungleviciute, V., Jakobsone, I., Bobere, N., Bartkevics, V., Juodeikiene, G. (2015). The influence of fermentation on the content of alkylresorcinols and lignans in plant products. *The Open Biotech J*, 9: 31-38.
- Bartkiene, E., Juodeikiene, G., Basinskiene, L. (2012). *In vitro* production of plant lignans from cereal products in relationship with constituents of non-starch polysaccharides. *Food Technol Biotechnol*, 50(2): 237-245.
- Bartłomiej, S., Justyna, R.K., Ewa, N. (2011). Bioactive compounds in cereal grains – occurrence, structure, technological significance and nutritional benefits – a review. *Food Sci Technol Int*, 18(6): 559–568.
- Batra, P., Sharma, A.K. (2013). Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *3 Biotech*, 3: 439-459.
- Bhanwar, S., Bamnia, M., Ghosh, M., Ganguli, A. (2013). Use of *Lactococcus lactis* to enrich sourdough bread with γ -aminobutyric acid. *Int J Food Sci Nutr*, 64(1): 77-81.
- Capozzi, V., Russo, P., Dueñas, M.T., Lopez, P., Spano, G. (2012). Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: A great potential for functional cereal products. *Appl Microbiol Biotechnol*, 96: 1383-1394.
- Chavan, J.K., Kadam, S.S., Beuchat, L.R. (1989). Nutritional improvement of cereals by fermentation. *Critic Rev Food Sci Nutr*, 28(5): 349-400.
- Ciesarová, Z., Mikušová, L., Magala, M., Kohajdová, Z., Karovičová, J. (2017). Nonwheat cereal-fermented-derived products. In: *Fermented foods in health and disease prevention*, Frias, J., Martinez-Villaluenga, C., Peñas, E. (eds), Elsevier, Amsterdam, pp. 417-432.
- Coda, R., Rizzello, C.G., Gobbetti, M. (2010). Use of sourdough fermentation and pseudo-cereals and leguminous flours for the making of a functional bread enriched of γ -aminobutyric acid (GABA). *Int J Food Microbiol*, 137: 236-245.
- Da Silva L.H., Celeghini, R.M.S., Chang, Y.K. (2011). Effect of the fermentation of whole soybean flour on the conversion of isoflavones from glycosides to aglycones. *Food Chem*, 128: 640-644.
- Dhakal, R., Bajpai, V.K., Baek, K.H. (2012). Production of gaba (γ – aminobutyric acid) by microorganisms: a review. *Brazilian J Microbiol*, 43(4): 1230-1241.
- Diana, M., Quilez, J., Rafecas, M. (2014). Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review. *J Func Foods*, 10: 407-420.
- Dordević, T.M., Šiler-Marinković, S.S., Dimitrijević-Branković, S.I. (2010). Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo-cereals. *Food Chem*, 119: 957-963.
- Durazzo, A., Zaccaria, M., Polito, A., Maiani, G., Carcea, M. (2013). Lignan content in cereals, buckwheat and derived foods. *Foods*, 2: 53-63.
- Gani, A., Wani, S.M., Masoodi, F.A., Hameed, G. (2012). Whole-grain cereal bioactive compounds

- and their health benefits: a review. *J Food Process Technol*, 3(3): 1-10.
- Gerez, C.L., Torres, M.J., Font de Valdez, G., Rollán, G. (2013). Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biological Cont*, 64: 231-237.
- Guo, W., Beta, T. (2013). Phenolic acid composition and antioxidant potential of insoluble and soluble dietary fibre extracts derived from select whole-grain cereals. *Food Res Int*, 51(2): 518-525.
- Gupta, R.K., Gangoliya, S.S., Singh, N.K. (2013). Reduction of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains. *J Food Sci Technol*, 52(2): 676-684.
- Hassani, A., Procopio, S., Becker, T. (2016). Influence of malting and lactic acid fermentation on functional bioactive components in cereal-based raw materials: a review paper. *Int J Food Sci Technol*, 51: 14–22.
- Hayes, M., Garcia-Vaquero, M. (2016). Bioactive Compounds from Fermented Food Products. In: *Novel Food Fermentation Technologies*, Ojha, S.K., Tiwari, B.K. (eds), Springer, Switzerland, pp. 293-310.
- Hole, A.S., Rud, I., Grimmer, S., Sigl, S., Narvhus, J., Sahlström, S. (2012). Improved bioavailability of dietary phenolic acids in whole grain barley and oat groat following fermentation with probiotic *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, and *Lactobacillus reuteri*. *J Agricult Food Chem*, 60: 6369-6375.
- Karaçıl, M.Ş., Tek, N.A. (2013). Dünyada üretilen fermente ürünler: tarihsel süreç ve sağlık ile ilişkileri. *Uludağ Üniv Ziraat Fak Der*, 27(2): 163-173.
- Kariluoto, S., Aittamaa, M., Korhola, M., Salovaara, H., Vahteristo, L., Piironen, V. (2006). Effects of yeasts and bacteria on the levels of folates in rye sourdoughs. *Int J Food Microbiol*, 106(2): 137–143.
- Katina, K., Laitila, A., Juvonen, R., Liukkonen, K.H., Kariluoto, S., Piironen, V., Landberg, R., Aman, P., Poutanen, K. (2007). Bran fermentation as a means to enhance technological properties and bioactivity of rye. *Food Microbiol*, 24: 175-186.
- Katina, K., Juvonen, R., Laitila, A., Flander, L., Nordlund, E., Kariluoto, S., Piironen, V., Poutanen, K. (2012). Fermented wheat bran as a functional ingredient in baking. *Cereal Chem*, 89(2): 126-134.
- Keservani, R.K., Sharma, A.K. (2014). Flavonoids: emerging trends and potential health benefits. *J Chinese Pharmac Sci*, 23(12): 815-822.
- Khlestkina, E.K. (2013). The adaptive role of flavonoids: emphasis on cereals. *Cereal Res Commun*, 41(2): 185-198.
- Kockova, M., Dilongová, M., Hybenová, E., Valík, L. (2013). Evaluation of cereals and pseudo-cereals suitability for the development of new probiotic foods. *J Chem*, Article ID 414303.
- Kohajdová, Z. (2017). Fermented Cereal Products. In: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, Pandey, A., Sanroman, M.A., Du, G., Soccol, C.R., Dussap, C.G. (eds). Elsevier, Amsterdam, pp. 91-117.
- Kohajdová, Z., Karovičová, J. (2007). Fermentation of cereals for specific purpose. *J Food Nutr Res*, 46(2): 51-57.
- Kozłowska, A., Szostak-Wegierek, D. (2014). Flavonoids - food sources and health benefits. *Annals of the National Institute of Hygiene*, 65(2): 79-85.
- Kumar, S., Pandey, A.K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World J*, Article ID 162750.
- Liptáková, D., Matejčeková, Z., Valík, L. (2017). Lactic acid bacteria and fermentation of cereals and pseudo-cereals. In: *Fermentation Processes*, Jozala, A.F. (ed). Intech Publisher, DOI:10.5772/65459.
<https://www.intechopen.com/books/fermentation-processes/lactic-acid-bacteria-and-fermentation-of-cereals-and-pseudocereals>.
- Liu, Z., Liu, Y., Pu, Z., Wang, J., Zheng, Y., Li, Y., Wei, Y. (2013). Regulation, evolution, and functionality of flavonoids in cereal crops. *Biotechnol Lett*, 35(11): 1765-1780.

- Martián-Cabrejas, M.A., Sanfiz, B., Vidal, A. (2004). Effect of fermentation and autoclaving on dietary fiber fractions and antinutritional factors of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agricult Food Chem*, 52: 261–266.
- Masisi, K., Beta, T., Moghadasian, M.H. (2016). Antioxidant properties of diverse cereal grains: A review on *in vitro* and *in vivo* studies. *Food Chem*, 196: 90-97.
- Mukhametzhanova, A.D., Akhmetova, A.I., Sharipova, M.R. (2012). Microorganisms as phytase producers. *Microbiology*, 81(3): 267-275.
- Nagaoka, H. (2005). Treatment of germinated wheat to increase levels of GABA and IP6 catalyzed by endogenous enzymes. *Biotechnol Progress*, 21: 405-410.
- Ojha, K.S., Tiwari, B.K. (2016). Novel food fermentation technologies. In: *Novel Food Fermentation Technologies*, Ojha, K.S., Tiwari B.K. (Eds). Springer, Switzerland, 1-2.
- Pallin, A. (2015). Fermentation of barley flour with *Lactobacillus reuteri*. Swedish University of Agricultural Sciences, Licentiate Thesis, Upsala, Sweden, 60 p.
- Pallin, A., Agback, P., Jonsson, H., Roos, S. (2016). Evaluation of growth, metabolism and production of potentially bioactive components during fermentation of barley with *Lactobacillus reuteri*. *Food Microbiol*, 57: 159-171.
- Pranoto, Y., Anggrahini, S., Efendi, Z. (2013). Effects of natural and *Lactobacillus plantarum* fermentation on *in-vitro* protein and starch digestibilities of sorghum flour. *Food Biosci*, 2: 46-52.
- Reale, A., Konietzny, U., Coppola, R., Sorrentino, E., Greiner, R. (2007). The importance of lactic acid bacteria for phytate degradation during cereal dough fermentation, *J Agricult Food Chem*, 55: 2993-2997.
- Sarwar, M.H., Sarwar, M.F., Sarwar, M., Qadri, N.A., Moghal, S. (2013). The importance of cereals (*Poaceae: Gramineae*) nutrition in human health: a review. *J Cereals Oil Seeds*, 4(3): 32-35.
- Sommano, S. (2014). Effect of food processing on bioactive compounds. In: *Advances in Food Science and Nutrition*. Visakh, P.M., Iturriaga, L.B., Ribotta, P.D. (Eds). Vol 2, Scrivener Publishing, pp. 361-390.
- Svensson, L., Sekwati-Monang, B., Lutz, D.L., Schieber, A., Gänzle, M.G. (2010). Phenolic acids and flavonoids in nonfermented and fermented red sorghum (*Sorghum bicolor* L.) Moench). *J Agricult Food Sci*, 58: 9214-9220.
- Todorov, S.D., Holzapfel, W.H. (2015). Traditional cereal fermented foods as sources of functional microorganisms. In: *Advances in Fermented Foods and Beverages*, Holzapfel, W (ed), Cambridge: Woodhead Publishing, 123-153.
- Vaz Patta, M. C., Amarowicz, R., Aryee, A. N. A., Boye, J. I., Chung, H-J., Martín-Cabrejas, M. A., Domoney, C. (2015). Achievements and challenges in improving the nutritional quality of food legumes. *Crit Rev Plant Sci*, 34, 105-143.
- Wang, T., He, F., Chen, G. (2014a). Improving bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in cereal grains through processing technologies: A concise review. *J Funct Foods*, 7: 101-111.
- Wang, C.Y., Wu, S.J., Shyu, Y.T. (2014b). Antioxidant properties of certain cereals as affected by food-grade bacteria fermentation. *J Biosci Bioeng*, 117(4): 449-456.
- Weston, L.A., Mathesius, U. (2013). Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. *J Chem Ecology*, 39(2): 283-297.

ENCAPSULATION OF ZINC-CHLOROPHYLL DERIVATIVES IN WHEY PROTEIN MATRIX BY EMULSION/COLD-SET GELATION

Seda Ersus Bilek¹, Gülay Özkan^{2*}

¹ Ege University, Engineering Faculty, Food Engineering Department, Izmir, Turkey

² Istanbul Technical University, Chemical and Metallurgical Faculty, Food Engineering Department, Istanbul, Turkey

Received / Geliş: 13.06.2017; Accepted / Kabul: 02.12.2017; Published online / Online baskı: 08.02.2018

Ersus Bilek, S., Özkan, G. (2018). Encapsulation of zinc-chlorophyll derivatives in whey protein by emulsion/cold-set gelation. *GIDA* (2018) 43 (1): 174-183 doi: 10.153237/gida.321167

ABSTRACT

Encapsulation of spinach zinc-chlorophyll (Zn-chlorophyll) derivatives in whey protein matrix by emulsion/cold-set gelation seems to be a promising alternative method for handling stabilized green natural colorant. The main important parameter was the pH of the emulsion system that caused precipitation of the whey protein. The shape of the beads containing 1 and 5% Zn-chlorophyll derivatives were spherical, while beads containing 10% Zn-chlorophyll derivatives production resulted in precipitation of whey protein due to isoelectric point (pI= 4.9). Encapsulation efficiency was determined for different loads of active material, whereas, the highest value was obtained for 1% Zn-chlorophyll derivatives containing beads. Beads with 5% Zn-chlorophyll derivatives showed the best stability for color values ($L^*=31.25 \pm 0.06$, $a^*=-2.91 \pm 0.11$, and $b^*=25.85 \pm 0.08$), and a 74% protection of the total chlorophyll content was maintained at the end of 3 months of storage at 4 °C.

Keywords: zinc chlorophyll derivatives, whey protein, emulsion/cold-set gelation, and bead

ÇİNKO-KLOROFİL TÜREVLERİNİN PEYNİR ALTI SUYU PROTEİNİ İLE EMÜLSİYON/SOĞUK JELLEŞME YÖNTEMİ İLE ENKAPSÜLASYONU

ÖZ

Ispanakta bulunan çinko-klorofil (Zn-klorofil) türevlerinin peynir altı suyu protein kullanılarak emülsiyon/soğuk-tip jelleşme yöntemi ile enkapsülasyonu, kararlı yapıda doğal yeşil renklendirici eldesinde umut verici alternatif bir yöntem olarak görülmektedir. Emülsiyon sisteminde, peynir altı suyu proteininin çökmesi nedeniyle en önemli parametre pH olarak belirlenmiştir. %1 ve 5 oranında Zn-klorofil türevleri içeren tanecikler küresel bir yapıya sahipken, %10 oranında Zn-klorofil türevleri içeren taneciklerin üretimi peynir altı suyu proteinlerinin izoelektrik noktaya (pI= 4.9) ulaşması nedeniyle çökme ile sonuçlanmıştır. Enkapsülasyon verimliliği aktif maddenin farklı yükleri için hesaplanmış, en yüksek değer %1 oranında Zn-klorofil türevleri içeren tanecikler ile elde edilmiştir. 4 °C'de 3 aylık depolama süresi sonunda en iyi renk stabilitesi ($L^*=31.25 \pm 0.06$, $a^*=-2.91 \pm 0.11$ ve $b^*=25.85 \pm 0.08$) ve %74 oranında korunan toplam klorofil içeriği değerlerine %5 oranında Zn-klorofil türevleri içeren tanecikler ile ulaşılmıştır.

Anahtar kelimeler: çinko klorofil türevleri, peynir altı suyu proteini, emülsiyon/soğuk-tip jelleşme ve tanecik

* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar

✉ ozkangula@itu.edu.tr

☎ (+90) 212 285 6013

☎ (+90) 212 285 7333

INTRODUCTION

Development of food colorants from natural sources has an increasing interest to synthetic dyes due to legislative action and consumer concern (Giusti, 1996). Even though, the Food and Drug Administration have approved artificial colors using by food companies, consumer advocacy groups such as the Center for Science in the Public Interest have argued that they could be harmful to a person's health, leading to hyperactivity, allergic reactions, and other illnesses. Additionally, a marketing research firm Nielsen showed that according to global respondents, the absence of artificial colors (42%) and flavors (41%) is important to their food purchase decisions (Nielsen, 2016).

Chlorophylls as lipophilic compounds are synthesized and accumulated in specialized organelles including chloroplasts and chromoplasts and they are responsible for green color of vegetables and mostly unripe fruits (Britton and Hornero-Méndez, 1997). Biological importance of chlorophyll pigment stem from its antioxidant and antimutagenic activities, modulation of xenobiotic metabolising enzyme activity, and induction of apoptotic events in cancer cell lines, prevention of cancer and other degenerative diseases (Dashwood, 1997; Ferruzzi and Blakeslee, 2007). Chlorophyll is a stable pigment in nature, however when it is extracted from plant tissues, it could degrade due to heat, light, oxygen, acid, and enzymes (Koca et al., 2007). After its degradation, bright green colored natural chlorophyll transform into chlorophyll derivatives such as pheophytin, pyropheophytin, pheophorbide, pyropheophorbide and chlorophyllide (Rodríguez-Amaya, 2016). To preserve the green chlorophyll, replacing the Mg^{++} ion in the porphyrin ring of chlorophyll pigment with Cu^{++} or Zn^{++} salts produces a regreening effect. These metallo-chlorophyll complexes are more stable and more resistant to acid and heat (Leunda et al., 2000). In addition, these alternative metallo-chlorophyll complexes have greater antioxidant properties than their natural form (Mg^{++} -chlorophyll) (Tonucci and Von Elbe, 1992). Özkan and Bilek (2015) reported that the formation of Zn-chlorophyll

derivatives from spinach leaf was performed by the reaction of fresh leaves with 300 ppm $ZnCl_2$ at pH 7, followed by a heating process at 110 °C for 15 min. Zinc-pheophytin was also identified in the stabilized chlorophyll. For increasing the efficiency of the extraction, an enzyme-assisted release of zinc-chlorophyll derivatives from the spinach pulp was applied, and Pectinex Ultra SP-L (Novozymes, Denmark) was used as the enzyme to increase the extraction efficiency. Pretreatment of the pulp with enzyme and extraction in ethanol resulted in a 39% increase in the Zn-chlorophyll derivative yield (Özkan and Bilek, 2015). There are a limited number of researches about chlorophyll as a natural food colorant. One of the technology for production of colorant as solid form is microencapsulation. This technology is used for the protection, stabilization, and the slow release of the active materials in the microbead system (Özkan and Bilek, 2014). However, in aqueous environments, water-soluble microparticles generally disintegrate and lose their stabilizing effect for the encapsulated compounds. Thus, water-insoluble encapsulation systems appear promising because of their structure and core material-stabilizing function after immersion in water (Betz and Kulozik, 2011).

In recent years, microencapsulating properties of whey proteins have been investigated and reported (Rosenberg, 1997). Whey protein concentrates and isolates exhibit high nutritional value, good emulsification, gelation, and film-forming properties (Lee and Rosenberg, 2000; Lefevre and Subirade, 2000; Leung et al., 2005). Besides, whey proteins have the ability to form heat-induced gel matrixes, capable of holding large amounts of water and entrapping active agents for delivery (Oztop et al., 2012). Whey protein gels are usually formed by either heat set or cold set mechanisms (Nicolai et al, 2011; Banerjee and Bhattacharya, 2012). Heat set gelation is a one-step process that involves heating a solution of globular proteins above their thermal denaturation temperature (Nicolai et al., 2011). Cold-set gelation method is a two step process that involves the denaturation of whey protein isolate (WPI) solution at a concentration

below the critical concentration for gelation, followed by the gelation of the denatured protein solution at ambient temperature by either changing the pH of the solution (Britten and Giroux, 2001), or the saline conditions (Barbut and Foegeding, 1993). Microencapsulation by means of the emulsion/cold-set gelation method comprises the generation of the whey protein-zinc chlorophyll derivatives containing extract/sun flower oil emulsion and the cold-set gelation of this emulsion to acquire the dispersed beads.

The objective of the present study was to evaluate the ability of the newly developed whey protein based microencapsulation system to preserve the stability of the encapsulated zinc-chlorophyll extract with desirable characteristics. The usage of water insoluble protein based encapsulation systems for Zn-chlorophyll compounds and process related factors during bead production were investigated. In order to optimize the encapsulation process, different loads of active material was used. The encapsulation systems were examined and compared to choose the best process conditions with respect to entrapment efficiency and color and chlorophyll stability over storage period.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Spinach leaves were purchased from the local markets in İzmir, Turkey between October and November, 2013. The Pectinex Ultra SP-L enzyme (containing polygalacturonase, hemicellulase, cellulase, protease, and amylase) was obtained from Novozymes (Novozymes, Denmark). It is a brown liquid manufactured from *Aspergillus aculeatus*, and manufactured to an activity specification of 3800 PGNU/mL. The whey protein isolate was obtained from Davisco Foods International Inc. (North America). All reagents used for the analyses were of analytical grade.

Methods

Formation of Zn-chlorophyll derivatives

The formation of metallochlorophyll complexes in spinach leaf extract was performed according

to Ozkan and Bilek (2015) as follows: The fresh spinach leaves were washed, chopped into small pieces, and homogenized with a Waring blender (Waring Commercial, Torrington, CT) for 1 minute at the highest speed. The ratio of spinach leaves to water was 1:4. For the formation of the Zn-chlorophyll derivatives, the spinach pulp containing 300 ppm ZnCl₂ at a pH 7 was thermally processed at 110 °C for 15 min in a autoclave. Finally, enzyme-assisted extraction by Pectinex Ultra SP-L was carried out to thermally processed spinach pulp to obtain Zn-chlorophyll derivatives. Optimum enzyme-assisted extraction condition was determined as 8% (v/v) Pectinex Ultra SP-L, 30 min reaction time and 45 °C incubation temperature. Additionally, the pH of the Zn-chlorophyll containing spinach pulp was adjusted to 5 by addition a 1 N citric acid solution for the maximum enzyme activity. Extraction was performed under constant stirring conditions at 120 rpm in a Gerhard thermoshake shaker (C. Gerhardt GmbH & Co. KG Königswinter, Germany) continuously. After the enzymatic pretreatments, solvent extraction of total chlorophyll from spinach pulp was performed. Based on preliminary studies, the solvent extractions were carried out using an ethanol/pulp ratio (2.5:1, v/v), at 60 °C extraction temperature for 45 min extraction duration, and stirring at 120 rpm in a Gerhard Thermoshake shaker. The obtained Zn-chlorophyll derivatives in liquid form were concentrated to 30° Brix by using rotary evaporator (Heidolph, Germany) to use for the emulsion/cold-set gelation microencapsulation process.

Emulsion preparation

A WPI solution (8% w/v of protein content) was prepared and stirred with a magnetic agitator for 1 h at room temperature (25 ± 1 °C), then the solution was left overnight at 4°C to ensure full hydration of the proteins. The final pH of the solution was 6.8 without any adjustments. The following day, this WPI solution was denatured at 80 °C for 30 min in a temperature-controlled water-bath (Buchi 461 CH-9230, Switzerland) and simultaneously mixed at 900 rpm with a IKA stirring device (RW 20 D, IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Germany). After heat

treatment, the denatured WPI solution was cooled rapidly in an ice bath to 25 °C and was kept at this temperature before further use (Egan et al., 2014).

Oil-in-water emulsion (O/W) consisting of the denatured 8% (w/v) WPI solution as an aqueous phase; 1, 5, and 10% (v/v) of Zn-chlorophyll extract, and 20% (v/v) sunflower oil as an oil phase were prepared according to the emulsification procedure adapted from Rosenberg and Lee, (1993). Briefly, the emulsion was prepared using an Ultra-Turrax homogenizer (Ultra-Turrax T25 basic IKA-WERKE) operated at 15500 rpm for 1 min. The O/W emulsions prepared as described above were used for the production of beads by cold-set gelation method.

Preparation of beads

The preparation of beads was adapted from Wichchukit et al., (2013). The O/W emulsion containing the Zn-chlorophyll was dropped into 200 ml of mildly agitated 3% (w/v) calcium chloride (CaCl_2) solution using a 5 ml syringe with a 21 G (0.8 x 38 mm) needle. Tween 80 was added to the CaCl_2 at a final concentration of 1% (w/v) to obtain spherical beads and decrease the interfacial tension. The beads remained in the CaCl_2 solution for 1 hour to allow for sufficient gel matrix formation. Then, the beads were washed with 0.02% (w/v) sodium azide containing deionized water to remove the excess CaCl_2 . Before storage, they were dried for 12 h in a vacuum oven at 35 °C.

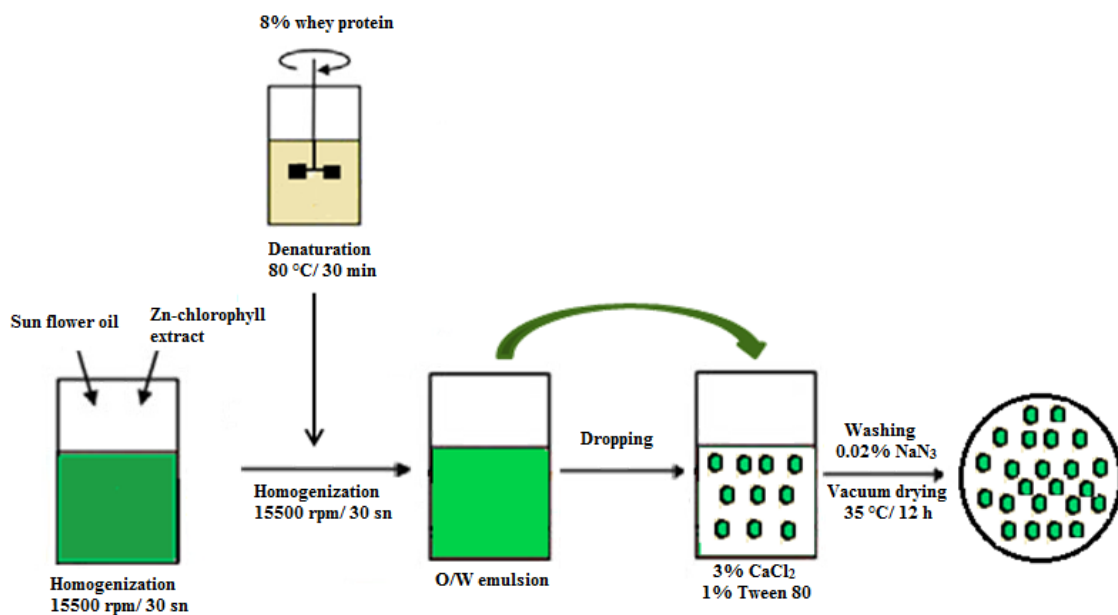


Figure 1. Bead production from stabilized spinach chlorophyll in whey protein by emulsion/external cold-set gelation

Determination of chlorophyll content by spectrophotometric method

To measure the chlorophyll content, 20 ml of 80% acetone was added to 1 g of each of the chlorophyll loaded beads and mixed with a homogenizer (Ultra-Turrax T25 basic IKA-WERKE) for 1 min at 15,500 rpm, then centrifuged at 8000 rpm for 5 min at 4 °C, and then filtered through Whatman No.1 filter papers.

The volume was adjusted to 25 ml and the absorbance values were measured at 663 and 645 nm by spectrophotometer (UV-Visible VARIAN Cary 50) (Vernon, 1960).

Color measurement

A Hunterlab Colorflex CFLX 45-2, VA colorimeter was used to determine the CIE L^* , a^* , and b^* values in which L^* is the lightness of the

color (100= white and 0= black), a^* value ($+a^*$ = red and $-a^*$ = green), and the b^* value ($+b^*$ = yellow and $-b^*$ = blue).

Total dry matter content

The dry matter content (%) of the beads was determined according to Young et al., (1993) using a vacuum oven (Nüve EV 018, Turkey) to dry the samples to a temperature of 65 °C at 517.17 mmHg of pressure.

Encapsulation efficiency

The encapsulation efficiency (EE) was calculated as the ratio between the initial mass of Zn-chlorophyll to be encapsulated and its mass in the final product (Shu et al., 2006).

Scanning electron microscopy (SEM)

The outer structural features of the dry beads were monitored by SEM. The beads were washed four times in absolute ethanol and then dried for 12 h in a vacuum oven at 55 °C. The procedure was carried out using the scanning electron microscope (Tescan) operated at 20 kV (Rosenberg and Young, 1993).

Zinc content

Zinc content of the beads was determined by AOAC (2005) 999.10 using inductively coupled plasma–optical emission spectrometry (ICP–OES) method (Porrarud and Pranee, 2010).

Protein content

The total protein content of the samples was determined by means of the Dumas method using the nitrogen gas analyser system FP-528 (LECO, Moenchengladbach, Germany). The whey protein concentration was calculated from total nitrogen content using a factor of 6.38 (Betz and Kulozik, 2011).

Storage stability of beads

The storage stability of the WPI based zinc-chlorophyll loaded beads was performed at +4 °C in a glass jar for 3 months. The beads were assessed in terms of color ($-a^*$, greenness) and spectrophotometric total chlorophyll contents at 30 day intervals. The aim of the storage was to investigate the effect of time on the physical and

chemical properties of the zinc-chlorophyll under constant storage conditions.

RESULTS AND DISCUSSION

Generation of zinc-chlorophyll extract-loaded cold-set gelled beads

The zinc-chlorophyll loaded WPI based spherical beads, 1-2 mm in diameter, were generated by changing the zinc-chlorophyll concentration as 1, 5, and 10% (v/v) in order to investigate the influence of the amount of the active material on the EE. It was found that the EE was influenced by the concentration of the zinc-chlorophyll. When the zinc-chlorophyll concentration increased from 1% to 5% and then 10%, the EE was found as 65.89, 47.05, and 39.82%, respectively. Addition of 1% zinc-chlorophyll extract was found to be the optimal choice in terms of EE for the emulsion/cold-set gelation method. This situation was effected from several factors including polymer hydrophilicity, porosity, crosslinking as well as, interaction between polymer and extract components (Trifković et al., 2014). Moreover, a SEM analysis was conducted to obtain information about the surface morphology and shape of whey protein beads as well as to confirm the influence of the content of active material. Visual observations showed that stable beads were obtained with 1% and 5% active material concentration (Fig 2). The pH value of the whey protein-Zn-chlorophyll/sunflower oil emulsion decreased with the addition of increasing amount of Zn-chlorophyll extract at pH 5. Hence, the zeta-potential of the WPI-zinc chlorophyll derivatives with a 10% chlorophyll content was approaching around zero. Due to reaching of the whey proteins isoelectric point (pI near 4.9) by addition of 10% chlorophyll extract, precipitation of the whey protein occurred where the stable emulsion matrix could not maintained.

These results are in agreement with earlier studies of the pH stability of oil-in-water emulsions which were prepared with WPI (Chanamai and McClements 2002; Charoen et al., 2010). According to Charoen et al. (2010), extensive aggregation at pH 5 and a large increase in mean diameter around the pI ($4 < \text{pH} < 6$) occurred in

the WPI-stabilized emulsion. It was also observed that creaming stability was fluctuating at pH values around their pI (Charoen et al., 2010). The instability of the WPI-stabilized emulsions around their pI may be due to poor electrostatic repulsion between the oil droplets that results with the flocculation of oil droplets (McClements 2005). At relatively high H^+ concentrations ($pH \ll pI$), the amino groups are positively charged ($-NH_3^+$) and the carboxyl groups are neutral ($-COOH$), so the net protein charge is positive. At

relatively low H^+ concentrations ($pH \gg pI$), the carboxyl groups are negatively charged ($-COO^-$) and the amino groups are neutral ($-NH_2$), so the net protein charge is negative. At the pI, net charge of the protein approach to zero due to balance in positively and negatively charged groups. Therefore, around the pI, aggregation of the droplets occurs because of decreasing stability to aggregation and increasing van der Waals forces (Charoen et al., 2010).

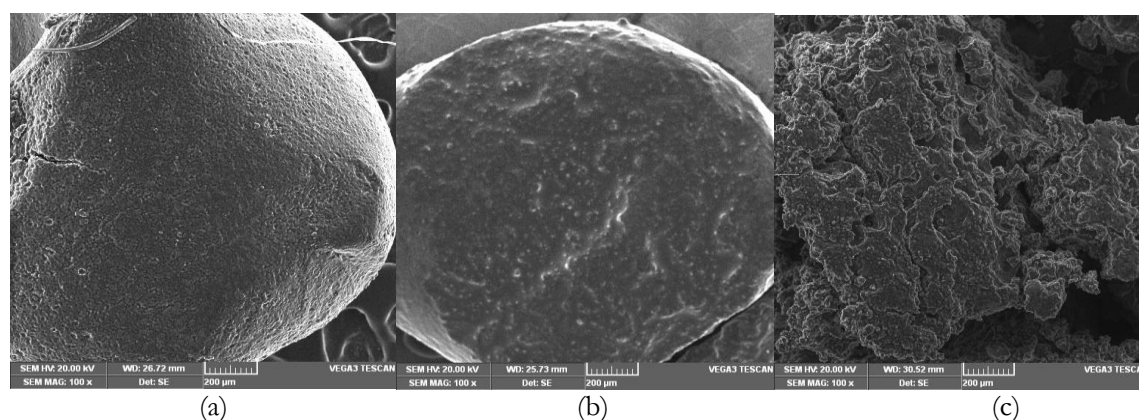


Figure 2. The morphology of the WPI based beads as observed with SEM with different chlorophyll contents 1% (a), 5% (b), 10% (c)

Qian et al. (2012) investigated the pH effect on the physical and chemical stability of β -carotene enriched nanoemulsions. According to the results, β -lactoglobulin-coated lipid droplets were unstable to aggregation at pH values close to the pI of the protein (pH 4 and 5). A large increase in mean particle size and phase separation due to droplet creaming was observed from the nanoemulsions stored at pH 4 and 5 (Qian et al., 2012).

Effect of storage on bead stability

Color values of beads

According to the results, the $-a^*$ value representing green color was found to be 0.62 ± 0.06 , -2.91 ± 0.11 , and -2.07 ± 0.02 for 1, 5, and 10% zinc chlorophyll derivatives containing beads, respectively (Table 1). The results also showed that the $-a^*$ value of the 1% zinc chlorophyll derivatives containing beads decreased significantly ($P \leq 0.05$) during the 3

months of storage. This result may be attributed to the loss of zinc-chlorophyll as a consequence of diffusion through the large specific area of the whey protein particles. On the other hand, there was no significant difference ($P > 0.05$) on the color change of the 5% zinc-chlorophyll containing beads during the storage period. Moreover, there was a slight decrease in the 10% zinc-chlorophyll containing sample.

Total chlorophyll content of the beads

Table 2 shows the change of total chlorophyll contents of beads. According to the results, the total chlorophyll contents of the 1, 5, and 10% Zn-chlorophyll containing beads decreased significantly ($P \leq 0.05$) during the 3 months of storage at 4 °C. Higher losses (55% reduction) for 1% Zn-chlorophyll derivatives containing beads may be due to the high diffusion rate of Zn-chlorophyll throughout the large specific area of the whey protein particles.

Table 1. Change in the a^* values of the beads during the 3 months at 4°C

Zn-chlorophyll concentration (%)	0. month	1. month	2. month	3. month
1	0.62 ± 0.06^a	0.89 ± 0.04^b	1.37 ± 0.03^c	1.70 ± 0.06^d
5	-2.91 ± 0.11^a	-2.98 ± 0.11^a	-3.05 ± 0.11^a	-2.75 ± 0.03^a
10	-2.07 ± 0.02^a	$-1.57 \pm 0.02^{a,b}$	-1.59 ± 0.15^b	-1.82 ± 0.07^b

Means in the same row identified by the same letter are not significantly different.

Table 2. Change in the total chlorophyll content of the beads during the 3 months of storage at 4°C

Zn-chlorophyll concentration (%)	0. month	1. month	2. month	3. month
1	1.83 ± 0.07^a	$1.34 \pm 0.19^{a,b}$	$1.31 \pm 0.24^{a,b}$	0.83 ± 0.70^b
5	6.54 ± 0.27^a	$5.33 \pm 0.45^{a,b}$	$5.28 \pm 0.42^{a,b}$	4.84 ± 0.13^b
10	11.07 ± 0.08^a	10.91 ± 0.29^a	8.57 ± 0.18^b	8.47 ± 0.42^b

Means in the same row identified by the same letter are not significantly different.

Storage stability of Zn-chlorophyll derivative containing WPI based beads was shown in Fig 3. Regression equation of \ln (pigment retention %) against storage time expressed the linear relation with negative slope when plotted on a natural logarithmic scale. Decrease of the Zn-chlorophyll derivative content can be concluded as first-order kinetics with rate constant (k) of 23×10^{-3} , 0.9×10^{-3}

and 1.045×10^{-3} /day for the 1, 5 and 10% Zn-chlorophyll derivatives containing beads, respectively. From this experiment results, it was clear that 5% Zn-chlorophyll was the appropriate concentration in which the most of the Zn-chlorophyll derivatives was retained with the lowest rate constant.

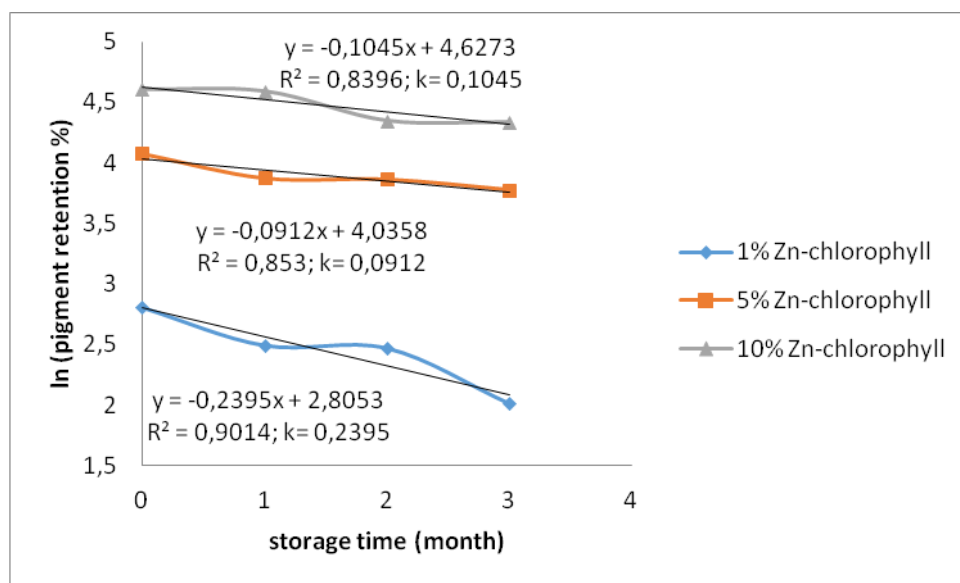





Figure 3. Degradation of Zn-chlorophyll derivatives in WBI beads with (a)  1% Zn-chlorophyll, (b)  5% Zn-chlorophyll, (c)  10% Zn-chlorophyll content

Similar rate constants for determining decay of Zn-chlorophyll derivatives was supported with another study. Porrarud and Pranee (2010) investigated the influence of different wall materials including gum arabic, maltodextrin and osa-modified starch (contains both hydrophobic and hydrophilic groups) on stabilities of encapsulated Zn-chlorophyll containing powder. The osa-modified starch as a wall material provided a longer shelf life ($k=1.5 \times 10^{-3}$ /day) compared to the gum arabic ($k=2.1 \times 10^{-3}$ /day) and the maltodextrin ($k=1.8 \times 10^{-3}$ /day) powders (Porrarud and Pranee, 2010).

Zinc content of the beads

The zinc content of the samples did not change during the storage period. The average zinc contents of the beads during storage were found to be 55, 232, and 383 mg/kg for 1, 5, and 10% Zn-chlorophyll derivatives loads, respectively. The FDA limit for the concentration of Zn^{2+} in the food product cannot exceed 75 ppm (LaBorde and Von Elbe, 1994). Hence, the concentrations of the Zn^{2+} of the bead samples are acceptable for the given limits when they are added to the food products for different concentrations. Similarly, Porrarud and Pranee (2010) reported that the zinc content of the zinc-chlorophyll powders produced by different wall material types such as gum arabic, maltodextrin, and osa-modified starch were found to be 14.45, 13.79, and 13.12 mg/kg, respectively which were also found in the range of acceptable values (Porrarud and Pranee, 2010).

Protein content of the beads

The initial protein concentration of WPI based beads (8% w/v) increased after drying due to removal of the moisture from bead structure. The protein content of the samples did not change during the storage period. The average % protein contents of the beads during storage were found to be 30.06, 31.94 and 30.81% for 1, 5, and 10% Zn-chlorophyll derivatives loads, respectively. Emulsion/cold-set gelation methods seems to be a promising encapsulation method on account of high protein recovery and protein protection. Egan et al., (2012) investigated the immobilization of a lipid phase within whey protein microgels

prepared by emulsification/cold-set whey protein gelation method. There was very little loss of protein phases from microgels after removal from the $CaCl_2$ solution. Hence, this method can be approved as an efficient immobilization of active material within the whey protein matrix with very high level of protein recovery in the range of 95.95-100% (Egan et al., 2012).

CONCLUSION

The whey protein based beads were used for entrapment of zinc-chlorophyll extract using emulsion/cold-set gelation aiming to improve the functionality and stability of the bioactive materials. It was found that the concentration of zinc-chlorophyll affected the bead formation in both shape occurrence and stability. Stable beads were obtained with 1% and 5% active material concentration, whereas 10% zinc-chlorophyll containing beads were prone to precipitation due to reaching the pH values of whey proteins to the pI. The encapsulation efficiency was found to be the highest as 65.83 for 1% zinc-chlorophyll loaded beads. On the other hand, beads obtained with 5% zinc-chlorophyll loading showed the best results in terms of color and total chlorophyll content during the 3 months of storage. The results of this study showed that zinc-chlorophyll derivatives could be successfully entrapped in whey protein matrix. These beads have a potential for usage as food colorants and food additives incorporated into dietary supplements, functional food, and pharmaceuticals.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) with project number 112 O 930.

REFERENCES

- Association of Official Analytical Chemists. Method 999.10. (2005). Official Methods of Analysis of AOAC International. Methods 18th.Ed. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
- Banerjee S, Bhattacharya S. (2012). Food gels: gelling process and new applications. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 52: 334-346.

- Barbut S, Foegeding E. (1993). Ca²⁺ Induced gelation of pre-heated whey protein isolate. *J Food Sci*, 58: 867-871.
- Betz M, Kulozik U. (2001). Microencapsulation of bioactive bilberry anthocyanins by means of whey protein gels. *Procedia Food Sci*, 1: 2047 – 2056.
- Britten M, Giroux H. (2001). Acid-induced gelation of whey protein polymers: effects of pH and calcium concentration during polymerization. *Food Hydrocol*, 15: 609-617.
- Britton G, Hornero-Méndez D. (1997). Carotenoids and colour in fruit and vegetables. Tomás-Barberán F, Robins R. *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*. Oxford: Clarendon Press, 11-27.
- Chanamai R, McClements D. (2002). Comparison of gum arabic, modified starch, and whey protein isolate as emulsifiers: influence of pH, CaCl₂ and temperature. *J of Food Sci*, 67 (1): 120-125.
- Charoen R, Jangchud A, Jangchud K, Harnsilawat T, Naivikul O, McClements D. (2011). Influence of Biopolymer Emulsifier Type on Formation and Stability of Rice Bran Oil-in-Water Emulsions: Whey Protein, Gum Arabic, and Modified Starch. *J of Food Sci*, 76 (1): 165-172.
- Dashwood R. (1997). Chlorophylls as anticarcinogens (Review). *Int J Oncol*, 10 (4): 721-728.
- Egan T, Jacquier J, Rosenberg Y, Rosenberg M. (2013). Cold-set whey protein microgels for the stable immobilization of lipids. *Food Hydrocol*, 31: 317-324.
- Egan T, O’Riordan D, O’Sullivan M, Jacquier J. (2014). Cold-set whey protein microgels as pH modulated immobilisation matrices for charged bioactives. *Food Chem*, 156: 197–203.
- Ferruzzi M, Blakeslee J. (2007). Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutr Res*, 27 (1): 1-12.
- Giusti M. (1996). Radish anthocyanin extract as a natural red colorant for maraschino cherries. *J Food Sci*, 61 (4): 688-694.
- Koca N, Karadeniz F, Burdurlu H. (2007). Effects of pH on chlorophyll degradation and colour loss in blanched green peas. *Food Chem*, 100: 609-615.
- Laborde L, Von Elbe J. (1994). Chlorophyll degradation and zinc complex formation with chlorophyll derivatives in heated green vegetables. *J Agric Food Chem*, 42: 1100-1103.
- Lee S, Rosenberg M. (2000). Whey Protein-based Microcapsules Prepared by Double Emulsification and Heat Gelation. *Lebenson Wiss Technol*, 33: 80-88.
- Lefevre T, Subirade M. (2000). Molecular differences in the formation and structure of fine-stranded and particulate β-lactoglobulin gels. *Biopolym*, 54: 578–86.
- Leunda M, Guerrero S, Alzamora S. (2000). Color and chlorophyll content changes of minimally processed kiwifruit. *J Food Process Preserv*, 24: 17-38.
- Leung V, Remondetto G, Subirade M. (2005). Cold gelation of β-lactoglobulin oil in water emulsions. *Food Hydrocol*, 18: 269-278.
- McClements D. (2005). *Food Emulsions: Principles, Practice and Technology*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Nicolai T, Britten M, Schmitt C. (2011). β-Lactoglobulin and WPI aggregates: formation, structure and applications. *Food Hydrocol*, 25: 1945-1962.
- Nielsen, 2016. [http://www.nielsen.com/content/dam/nielsen/global/eu/docs/pdf/Global%20Ingredient%20and%20Out-of-Home%20Dining%20Trends%20Report%20FINAL%20\(1\).pdf](http://www.nielsen.com/content/dam/nielsen/global/eu/docs/pdf/Global%20Ingredient%20and%20Out-of-Home%20Dining%20Trends%20Report%20FINAL%20(1).pdf) (Retrieved from 16.12.2016).
- Oztop M, McCarthy K, McCarthy M, Rosenberg M. (2012). Uptake of Divalent Ions by Heat-Set Whey Protein Gels. *J Food Sci*, 77 (2): 68-73.
- Özkan G, Bilek SE. (2015). Enzyme-assisted extraction of stabilized chlorophyll from spinach. *Food Chem*, 176: 152-157.
- Özkan G, Bilek SE. (2014). Microencapsulation of natural food colourants. *Int J Nutr Food Sci*, 3 (3): 145-156.

- Porrarud S, Pranee A. (2010). Microencapsulation of Zn-chlorophyll pigment from Pandan leaf. *Int Food Res J*, 17: 1031-1042.
- Qian C, Decker E, Xiao H, McClements D. (2012). Physical and chemical stability of β -carotene-enriched nanoemulsions: Influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type. *Food Chem*, 132 (3): 1221-1229.
- Rodriguez-Amaya DB. (2016). Natural food pigments and colorants. *Curr Opin Food Sci*, 7: 20-26.
- Rosenberg M, Lee S. (1993). Microstructure of whey protein/anhydrous milkfat emulsions. *Food Struct*, 12: 267-274.
- Rosenberg M, Young SL. (1993). Whey proteins as microencapsulating agents. Microencapsulation of anhydrous milkfat structure evaluation. *Food Struct*, 12: 31-41.
- Rosenberg M. (1991). Milk derived whey protein-based microencapsulating agents and a method of use. US Patent Number, 5: 601, 760.
- Shu B, Yu W, Zhao Y, Liu X. (2006). Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. *J of Food Eng*, 76: 664-669.
- Tonucci L, Von Elbe J. (1992). Kinetics of the formation of zinc complexes of chlorophyll derivatives. *J Agric Food Chem*, 40: 2341-2344.
- Trifković K, Milašinović N, Djordjević V, Kalagasidis-Krušić M, Knežević-Jugović Z. (2014). Chitosan microbeads for encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) polyphenols. *Carbohydr Polym*, 111: 901-907.
- Vernon L. (1960). Spectrophotometric determination of chlorophylls and pheophytins in plant extracts. *Anal Chem*, 32: 1144-1150.
- Wichchukit S, Oztop M, McCarthy M, McCarthy K. (2013). Whey protein/alginate beads as carriers of a bioactive component. *Food Hydrocol*, 33: 66-73.
- Young S, Sarada X, Rosenberg M. (1993). Microencapsulating properties of whey proteins, 1. Microencapsulation of anhydrous milk fat. *J Dairy Sci*, 76: 2868-2877.

İçindekiler / Content

Araştırmalar (İngilizce) / Researches (English)

- Karkar, B, Şahin, S, Güneş, M.E. *Antioxidative effect of Turkish chestnut bee pollen on DNA oxidation system and its phenolic compounds* / Türk kestane arı polenin DNA oksidasyon sistemi üzerindeki antioksidan etkisi ve fenolik bileşikleri34-42
- Tomruk, D, Devseren, E, İlter, I, Akyıl, S, Koç, M, Kaymak Ertekin, F. *Rheological and sensorial properties of sesame paste blends prepared with different sugar sources* / Farklı şeker kaynakları ile hazırlanan tahin karışımlarının reolojik ve duyuşsal özellikleri43-52
- Aydoğan-Coşkun, B., Çoklar, H., Akbulut, M. *Effect of sunlight on fatty acid composition of tomato seed oil stored in different colored bottles* / Farklı renkli şişelerde depolanan domates çekirdeği yağının yağ asidi kompozisyonu üzerine gün ışığının etkisi.....122-128
- Bayrak, E., Büyükkileci, A.O. *Utilization of white grape pomace for lactic acid production* / Beyaz üzüm posasının laktik asit üretiminde kullanılması129-138
- Ersus Bilek, S., Özkan, G. *Encapsulation of zinc-chlorophyll derivatives in whey protein matrix by emulsion/cold-set gelation* / Çinko-klorofil türevlerinin peynir altı suyu proteini ile emülsiyon/soğuk jelleşme yöntemi ile enkapsülasyonu174-183

Araştırmalar (Türkçe) / Researches (Turkish)

- Dede, S., Avşar, Y.K. Yaş üzüm boğmasının aroma profilinin belirlenmesi / *The determination of aroma profile of fresh grape bogma* 1-10
- Giritlioğlu, E., Dizlek, H. Sakaroz ikamesi olarak farklı tip ve düzeylerde şeker otu (*Stevia rebaudiana* Bertoni) bazlı tatlandırıcı kullanılması bisküvi nitelikleri üzerine etkileri / *Effects of stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) based sweetener as sucrose substitution on biscuit qualities at different types and levels* 21-33
- Karabulut, G., Efendioğlu, B., Kurtuluş, B., Turan, E., Kuyumcu, H., Esen, Ş., Çağrı Mehmetoğlu, A. *Bacillus subtilis* içeren yenilebilir kaplama uygulamasının çileğin raf ömrüne etkisi / *Effects of edible coating incorporated with Bacillus subtilis on shelf life of strawberry*.....53-63
- Eker, T., Cabaroğlu, T. Gıdaların tüketilmesi sırasında retronazal yolla aroma salınımının belirlenmesi / *Determination of retronasal aroma release during food consumption*.....64-77
- Türksoy, S. Tam tane baklagil unlarının kimyasal, fonksiyonel ve reolojik özelliklerinin belirlenmesi / *Determination of chemical, functional and rheological properties of whole legume flours*78-89
- Darıcı, M., Cabaroğlu, T. Alkollü içkilerin kalite kontrolünde kullanılan farklı alkol tayin metodlarının karşılaştırılması ve NIR (yakın kızılötesi spektroskopisi) metodunun validasyonu / *Validation of NIR (near-infrared spectroscopy) method for alcoholic strength measurement in alcoholic beverages: comparison of different methods*90-100
- Eriñç, H., Çifçi, S. Maraş tarhanası üretiminde kefir kullanımının son ürün üzerine etkileri / *The effects of kefir usage on properties of tarhana cips*.....114-121

Derlemeler (Türkçe) / Reviews (Turkish)

- Arslan Tontul, S., Erbaş M. Biyoaktif gıda bileşenlerinin püskürterek dondurma yöntemi ile mikroenkapsülasyonu / *The microencapsulation of bioactive food components by spray chilling method*.....11-20
- Altuntaş, S., Korukluoğlu, M. Gıda işleme tesislerinde *Listeria monocytogenes* ve mücadelede yeni yaklaşımlar / *Listeria monocytogenes in food facilities and new approaches for struggle*.....101-113
- Aykin Diñçer, E., Erbaş, M. Etin tuzlanması işleminde vakumlu emdirim tekniğinin kullanılması / *Use of vacuum impregnation method in meat salting proces*.....139-150
- Kübra Eryaşar Örer, K., Karasu Yalçın, S. Mikrobiyel ksilitol üretiminde hemiselülozik hidrolizatların kullanımı / *Utilization of hemicellulosic hydrolysates for microbial xylitol production*.....151-162
- Karademir, E., Karasu Yalçın, S., Yalçın, E. Tahıl ve bakliyat esaslı gıdalarda fermentasyon işleminin besinsel özellikler ve biyoaktif bileşenler üzerine etkisi / *Effect of fermentation process on nutritional properties and bioactive compounds of cereal and legume based foods*.....163-173