



Endüstriyel Dondurma İşlemi ve *in vitro* Gastrointestinal Sindirim Sırasında Taze Fasulyenin Fenoliklerinde, Flavonoidlerinde ve Antioksidan Kapasitesinde Meydana Gelen Değişimler

Senem Kamiloğlu  

Mevsim Gıda Sanayi ve Soğuk Depo Ticaret A.Ş., Turanköy, 16540, Kestel, Bursa

Geliş Tarihi (Received): 10.06.2019, Kabul Tarihi (Accepted): 25.07.2019

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): senem@mvsm.com.tr (S. Kamiloğlu)

☎ 0 224 383 36 01 📠 0 224 383 31 23

ÖZ

Taze fasulye (*Phaseolus vulgaris*) fenolik bileşen içeriği yüksek olan bir sebze olup, antioksidan içeriği ve aktivitesi bakımından zengin olan ve yaygın tüketilen sebzeler içerisinde sınıflandırılmaktadır. Bu çalışmada taze fasulyenin endüstriyel dondurulma işlemi sırasında çeşitli üretim basamaklardan alınan numunelerde toplam fenolik maddede, toplam flavonoid maddede ve toplam antioksidan kapasitede meydana gelen değişimleri belirlemek ve hammadde, atık ve dondurulmuş ürün için sırasıyla ağız, mide ve bağırsak sindirimi aşamalarından oluşan standartlaştırılmış *in vitro* gastrointestinal sindirim modeli kullanılarak fenoliklerin, flavonoidlerin ve antioksidan kapasitenin biyoerişilebilirliklerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde ve toplam antioksidan kapasitedeki değişimler spektrofotometrik yöntemlerle tespit edilmiş olup, toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesinde ABTS, CUPRAC, DPPH ve FRAP olmak üzere 4 farklı metot kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar endüstriyel dondurma işleminin taze fasulyenin toplam fenolik ve flavonoid madde içeriğini korunduğunu ve atık olarak ayrılan yan ürünün toplam flavonoid madde içeriğinin ve antioksidan kapasitesinin hammaddeden yüksek olduğunu göstermiştir (sırasıyla %117 ve %97'ye kadar) ($p < 0.05$). İlaveten, *in vitro* gastrointestinal sindirim sonrasında dondurulmuş taze fasulyenin ve atık ürünün hammaddeye kıyasla sırasıyla %12–23, %143–148 ve %10–230 kadar daha fazla biyoerişilebilir toplam fenolik maddeye, toplam flavonoid maddeye ve toplam antioksidan kapasiteye sahip olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). Sonuç olarak bu çalışma gıda işleminin polifenollerin biyoerişilebilirliğini etkileyebileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Phaseolus vulgaris*, IQF, Biyoerişilebilirlik, Polifenoller

Changes in Green Bean Phenolics, Flavonoids and Antioxidant Capacity during Industrial Freezing Process and *in vitro* Gastrointestinal Digestion

ABSTRACT

Green bean (*Phaseolus vulgaris*) contains high amounts of phenolic compounds, and it is classified as one of the widely consumed vegetables, which is rich in antioxidant content and activity. The aim of this study was to determine the changes in total phenolic content, total flavonoid content and total antioxidant capacity in the samples taken from various production steps of the industrial freezing process of green beans, and to evaluate the bioaccessibility of phenolics, flavonoids and antioxidant capacity for raw material, waste and frozen product using the standardized *in vitro* gastrointestinal digestion model simulating the digestion in the mouth, stomach and intestine, respectively. Total phenolic content, total flavonoid content and total antioxidant capacity were determined using spectrophotometric methods and for the evaluation of total antioxidant capacity 4 different methods including ABTS, CUPRAC, DPPH and FRAP were used. Results showed that the total phenolic and flavonoid contents of the fresh green beans were

preserved after industrial freezing process and their by-product that is separated as waste contains higher total flavonoid content and antioxidant capacity compared to raw material (117% and up to 97%, respectively) ($p<0.05$). In addition, after *in vitro* gastrointestinal digestion, frozen green beans and waste contained 12–23%, 143–148% and 10–230% more bioaccessible total phenolics, flavonoids and antioxidant capacity, respectively compared to fresh green beans ($p<0.05$). In conclusion, this study showed that food processing may affect the bioaccessibility of polyphenols.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*, IQF, Bioaccessibility, Polyphenols

GİRİŞ

Epidemiyolojik çalışmalar sebzelerce zengin bir diyetin kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve tip 2 diyabet gibi bazı kronik hastalıkların gelişme riskini azalttığı göstermiştir [1]. Sağlık üzerine söz konusu olan bu olumlu etkiler antioksidan özellik gösteren fenolik bileşenlerin varlığı ile ilişkilendirilmektedir [2]. Taze fasulye (*Phaseolus vulgaris*) fenolik bileşen içeriği yüksek olan bir sebze olup, antioksidan içeriği ve aktivitesi bakımından zengin olan ve yaygın tüketilen ilk 10 sebze içerisinde sınıflandırılmıştır. Özellikle kuersetin ve kaempferol glikozitleri açısından önemli bir flavonoid kaynağıdır [3].

Dondurma işlemi, global olarak gıda endüstrisinde taze fasulye de dahil olmak üzere birçok sebze için gıda kalitesinin korunmasında en iyi yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir. Sıcaklık düşüşü ile sebzelerde hasat sonrası oluşan metabolik süreçlerin önlenmesinin yanı sıra, ürün kalitesini bozan mikrobiyolojik üreme hızı da yavaşlatılmaktadır [4]. Öte yandan, dondurma işlemi tek başına enzimatik reaksiyonları ve mikrobiyal üremeyi tamamen durdurmak için yeterli değildir ve bu nedenle ön işlem olarak haşlama yapılması gerekmektedir [5]. Literatürde daha önce yapılmış çalışmalar haşlama ve dondurma gibi işlemlerin sebzelerin fenolik bileşen miktarını ve antioksidan kapasitesini etkilediğini göstermiştir [4-6]. İlave olarak, taze fasulyenin endüstriyel dondurma işlemi esnasında kesim neticesinde açığa çıkan fasulye uçlarını ve saplarını içeren bir atık ürün oluşmaktadır. Sanayide oluşan bu tür atık ürünlerin bertarafı hem çevre üzerinde potansiyel bir olumsuz etki yaratmakta hem de üretici için büyük bir maliyet oluşturmaktadır. Bununla birlikte, yapılan araştırmalarda bazı endüstriyel atıkların fenolik bileşen kaynağı olarak kullanılabilirliği ortaya koyulmuştur [7, 8].

Son zamanlarda gastrointestinal koşulların simülasyonu için hızlı, güvenilir ve *in vivo* metotlarda olduğu gibi etik kaygılarla kısıtlaması olmayan *in vitro* sindirim yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. *In vitro* gastrointestinal sindirim modelleri fenolik bileşiklerin gıda matriksinden salınımının belirlenmesini ve vücutta emilmeden önce meydana gelen değişikliklerin değerlendirilmesini sağlamaktadır. Öte yandan, uygulanan modellerin koşullarındaki varyasyonlar farklı çalışmalarda elde edilen sonuçların birbirleri ile karşılaştırılmasını güçleştirmiştir [9]. Bu sorunu ortadan kaldırmak için, yakın zaman önce sırasıyla ağız, mide ve bağırsak sindirimi aşamalarından oluşan standartlaştırılmış ve pratik bir statik model önerilmiştir [10]. Bu model daha önce bazı gıdalarda dondurma işleminin fenolik bileşenlerinin biyoerişilebilirliğine

etkisini araştırmak için uygulanmıştır [11]. Bununla birlikte, bilindiği kadarıyla, daha önce yapılan çalışmalarda endüstriyel dondurma işleminin taze fasulyenin fenolik bileşenlerinin biyoerişilebilirliğine olan etkisi incelenmemiştir. İlave olarak, bitki bazlı gıdalarda fenolik bileşiklerin biyoerişilebilirliğini ve biyoyararlılığını arttırmaya yönelik gıda işleme stratejileri konusunda yapılmış güncel bir derleme [12], dondurma işleminin polifenollerin sindirime olan etkisini inceleyen çalışmaların sayısının artırılmasını desteklemiştir.

Yukarıda sunulan bilgiler dikkate alınarak bu çalışmanın amacı, (i) taze fasulyenin endüstriyel dondurulma işlemi sırasında çeşitli üretim basamaklardan alınan numunelerde toplam fenolik maddede, toplam flavonoid maddede ve toplam antioksidan kapasitede meydana gelen değişimlerin belirlenmesi ve (ii) hammadde, atık ve dondurulmuş ürün için standartlaştırılmış *in vitro* gastrointestinal sindirim modeli kullanılarak fenoliklerin, flavonoidlerin ve antioksidan kapasitenin biyoerişilebilirliklerinin değerlendirilmesidir.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Antakya'da ticari olgunlukta hasat edilen Gina cinsi taze fasulyeler (*Phaseolus vulgaris*) Nisan 2018'de bir gıda işleme fabrikasında (Mevsim Gıda Sanayi ve Soğuk Depo Ticaret A.Ş., Salihli, Manisa) Şekil 1'de verilen akım şemasına göre endüstriyel dondurma işlemine tabii tutulmuşlardır. Akım şeması üzerinde gösterilen 5 noktadan 3 farklı üretim günü numuneler toplanmış ve ertesi hafta soğuk zincirle laboratuvara nakledilinceye kadar -20°C 'de muhafaza edilmiştir. Numuneler, soğutulmuş değirmen (IKA, Almanya) kullanılarak sıvı azot içerisinde ince bir toz halinde öğütülmüş ve analizlerden önce -80°C 'de depolanmıştır.

In vitro gastrointestinal sindirim için kullanılan α -amilaz (*Aspergillus oryzae*'den), pepsin (domuz mide mukozasından), pankreatin (domuz pankreasından) ve safra Sigma-Aldrich'den (Almanya) temin edilmiştir. Spektrofotometrik analizlerde kullanılan diğer kimyasallar ve reaktifler de analitik saflık derecesinde olup aksi belirtilmediği takdirde aynı firmadan (Sigma-Aldrich) temin edilmiştir.

Nem Tayini

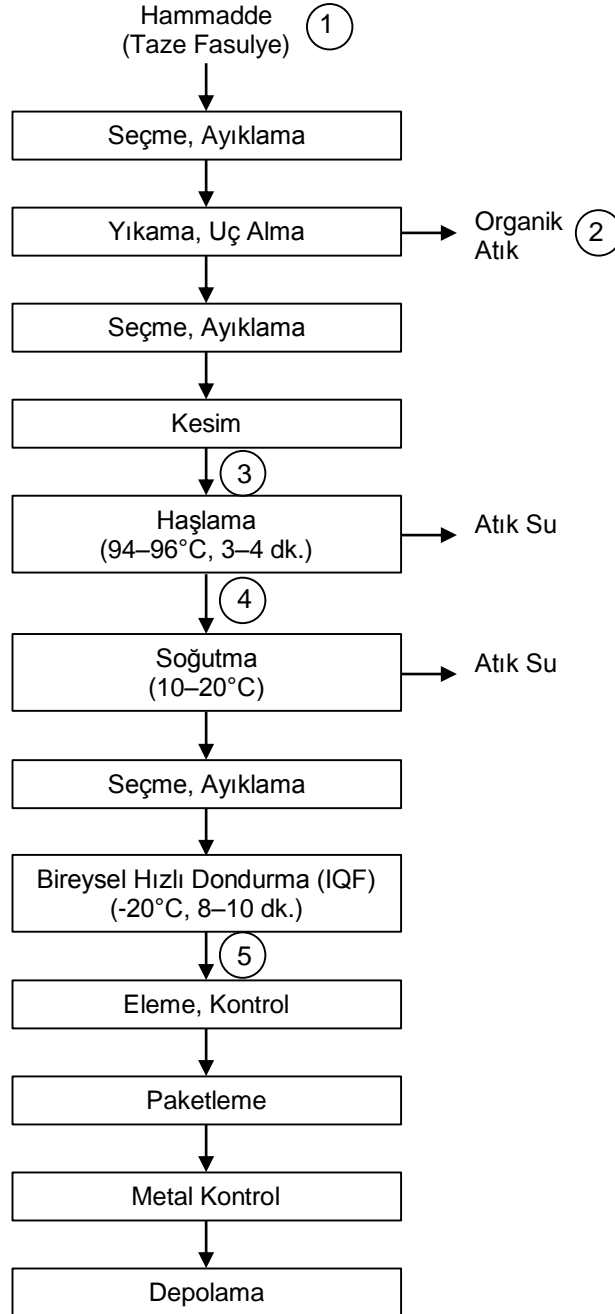
Numunelerin nem tayini Resmi Analitik Kimyacılar Derneği (AOAC) protokolünde belirtilen şekilde yapılmıştır [13]. 2.00 ± 0.01 g numune önceden tartılmış alüminyum kaplara alınıp, nem içeriği dengeye

ulaşınca kadar etüv (Memmert, Almanya) içerisinde 105°C'de kurutulmuştur. Etüvden çıkarılan kaplar desikatörde soğumaya bırakılmış ve tekrar tartılmışlardır. Nem içeriği yüzde (%) olarak ifade edilmiştir.

Ekstraksiyon

Sindirilmemiş numunelerin ekstraksiyon işlemi Kamiloğlu ve Capanoğlu'nun [14] çalışması referans alınarak yapılmıştır. 2.00±0.01 g numune 5 mL %0.1

formik asit içeren %75 metanol (Merck, Almanya) solüsyonu ile muamele edilmiştir. Sonrasında 15 dk. boyunca 20°C'ye soğutulmuş ultrasonik banyoda (VWR, ABD) tutulmuş ve akabinde 4°C'de 2700xg devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir (Hettich, Almanya). Üst faz ayrı bir tüpe alınarak, aynı işlemler bir kez daha tekrarlanmıştır. En sonunda iki üst faz birleştirilip, son hacim 10 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan ekstraktlar spektrofotometrik analizlere kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 1. Taze fasulyenin endüstriyel dondurulma işleminin akım şeması. Analiz için toplanan numuneler: 1: Hammadde, 2: Atık, 3: Kesim sonrası, 4: Haşlama sonrası, 5: Dondurma sonrası.

Toplam Fenolik Madde Tayini

Toplam fenolik madde miktarı Velioglu ve ark. [15] tarafından uygulanan şekilde tespit edilmiştir. 100 µL ekstrakta 0.75 mL Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edildikten sonra karışım 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 0.75 mL %6 sodyum karbonat solüsyonu eklenmiş ve 90 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra, spektrofotometre (Optima, Japonya) ile 725 nm'de absorpsiyon ölçülmüştür. Gallik asit standart eğrisi (lineer aralık: 10–400 ppm, $R^2= 0.999$) kullanılarak örneklerin toplam fenolik madde miktarları belirlenmiş olup, sonuçlar mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/100 g kuru ağırlık (KA) olarak ifade edilmiştir.

Toplam Flavonoid Madde Tayini

Toplam flavonoid madde miktarı Kim ve ark.'nın [16] çalışmasında tarif edilen şekilde belirlenmiştir. 1 mL ekstrakta 0.3 mL %5 sodyum nitrit solüsyonu ilave edilerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 0.3 mL %10 alüminyum klorür solüsyonu ilave edilmiş ve 1 dakika sonrasında karışıma 2 mL 1 M sodyum hidroksit eklenmiştir. Akabinde 2.4 mL saf su ilave edilmiş ve spektrofotometre ile 510 nm'de absorpsiyon ölçülmüştür. Kuersetin standart eğrisi (lineer aralık: 10–400 ppm, $R^2= 0.998$) kullanılarak örneklerin toplam flavonoid madde miktarları belirlenmiş olup, sonuçlar mg kuersetin eşdeğeri (KE)/100 g KA olarak ifade edilmiştir.

ABTS Radikal Süpürme Aktivitesi Tayini

ABTS (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit diamonyum tuzu)) metodu Miller ve RiceEvans'ın [17] çalışmasında belirtilen şekilde uygulanmıştır. ABTS stok solüsyonu (Applichem, Almanya) 50 mM pH 8 potasyum fosfat tamponu içerisinde 734 nm'de 0.90 ± 0.05 absorpsiyon derecesine seyreltilmiştir. Daha sonra, 100 µL ekstrakta 1 mL ABTS-çalışma solüsyonu ilave edilip, 1 dakika inkübasyondan sonra spektrofotometre ile 734 nm'de absorpsiyon ölçülmüştür. Trolox® standart eğrisi (lineer aralık: 1–100 ppm, $R^2= 0.994$) kullanılarak örneklerin toplam antioksidan kapasiteleri belirlenmiş olup, sonuçlar mg Trolox® eşdeğeri (TE)/100 g KA olarak ifade edilmiştir.

CUPRAC Tayini

CUPRAC (Bakır (II) İyonu İndirgenme Antioksidan Kapasitesi) metodu Apak ve ark. [18] tarafından belirtilen şekilde uygulanmıştır. 100 µL ekstrakta sırasıyla 1 mL 10 mM bakır (II) klorür, 1 mL 7.5 mM neokuproin, 1 mL 1 M amonyum asetat ve 1 mL distile su ilave edilip, hacim 4.1 mL'ye tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyondan sonra spektrofotometre ile 450 nm'de absorpsiyon ölçülmüştür. Trolox® standart eğrisi (lineer aralık: 10–600 ppm, $R^2= 0.997$) kullanılarak örneklerin toplam antioksidan kapasiteleri belirlenmiş olup, sonuçlar mg Trolox® eşdeğeri (TE)/100 g KA olarak ifade edilmiştir.

DPPH Radikal Süpürme Aktivitesi Tayini

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) metodu Kumaran ve Karunakaran [19] tarafından belirtilen şekilde uygulanmıştır. 100 µL ekstrakta 2 mL 0.1 mM metanolde çözünmüş DPPH reaktifi ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyondan sonra spektrofotometre ile 517 nm'de absorpsiyon ölçülmüştür. Trolox® standart eğrisi (lineer aralık: 10–100 ppm, $R^2= 0.999$) kullanılarak örneklerin toplam antioksidan kapasiteleri belirlenmiş olup, sonuçlar mg Trolox® eşdeğeri (TE)/100 g KA olarak ifade edilmiştir.

FRAP Tayini

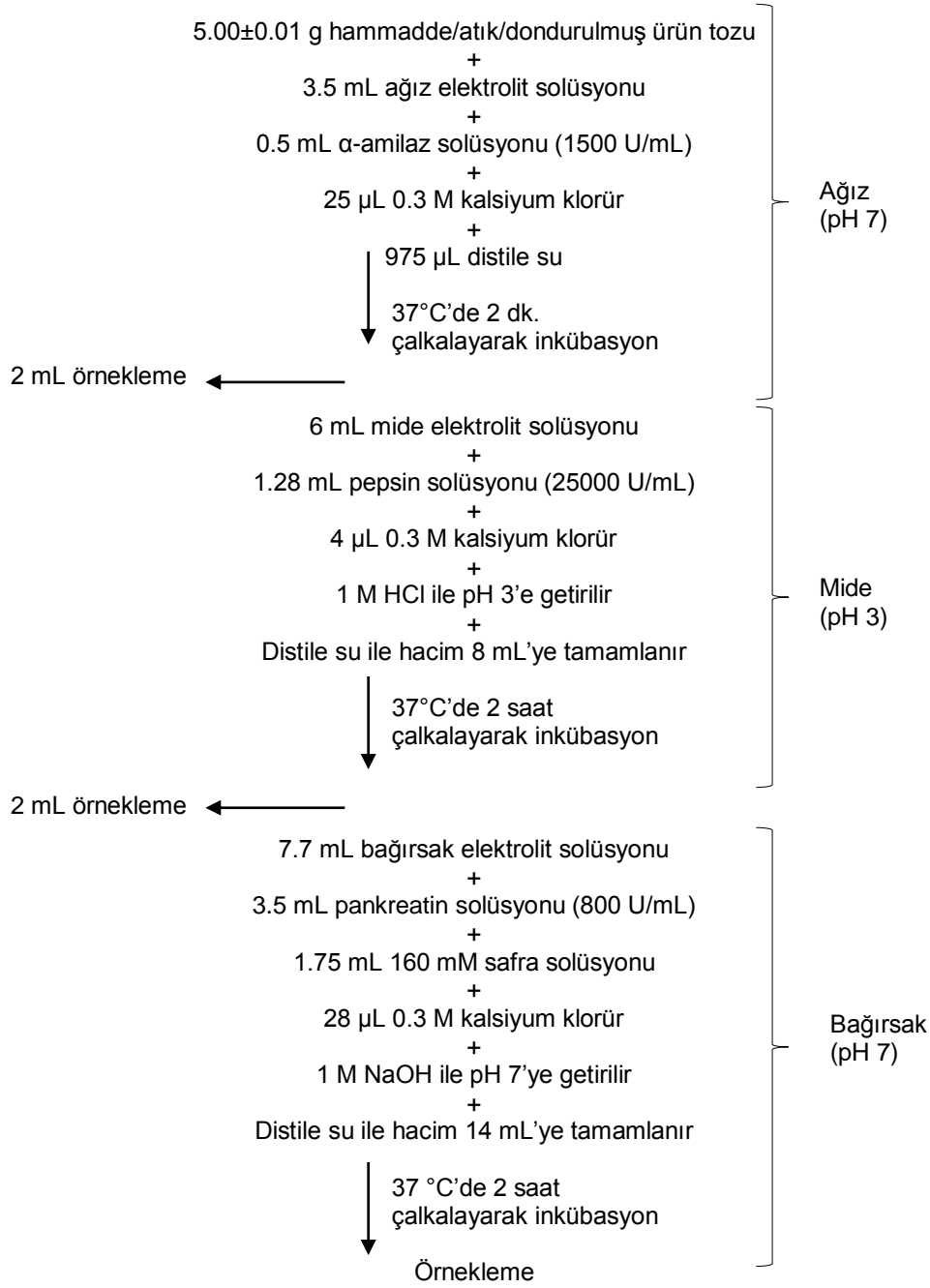
FRAP (Demir (III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç) metodu daha önce Benzie ve Strain'nin [20] çalışmasında belirtilen şekilde uygulanmıştır. 100 µL ekstrakta 900 µL FRAP reaktifi (10:1:1 oranlarında pH 3.6 asetat tamponu, 10 mM 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) solüsyonu ve 20 mM demir (III) klorür karışımı) ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 4 dakika inkübasyondan sonra spektrofotometre ile 593 nm'de absorpsiyon ölçülmüştür. Trolox® standart eğrisi (lineer aralık: 10–100 ppm, $R^2= 0.991$) kullanılarak örneklerin toplam antioksidan kapasiteleri belirlenmiş olup, sonuçlar mg Trolox® eşdeğeri (TE)/100 g KA olarak ifade edilmiştir.

In vitro Gastrointestinal Sindirim

Minekus ve ark.'nın [10] çalışmasından uyarlanan *in vitro* gastrointestinal sindirim modeli Şekil 2'de gösterilmiştir. Ağız, mide ve bağırsak sindirimi aşamalarından oluşan prosedür çalkalayıcı su banyosu (Mommert, Almanya) kullanılarak hammadde, atık ve dondurulmuş ürün için üç tekrarlı olarak uygulanmıştır. Kullanılan elektrolit solüsyonları Minekus ve ark.'ın [10] çalışmasında belirtilen şekilde hazırlanmıştır. İlaveten, taze fasulye numuneleri katılmadan aynı koşullar altında inkübasyonlar yapılmış ve elde edilen kör örnekler sindirim sıvılarından kaynaklanan etkileşimlerin düzeltilmesi için kullanılmıştır. Numune ve sindirim sıvılarını içeren ve homojen olarak toplanan örneklerin pH'sı formik asit ile 2'ye ayarlanmış ve 4°C'de, 23000xg hızında 5 dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Üst fazlar ayrı bir tüpe alınarak analizlere kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Sonrasında bu örnekler toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde ve toplam antioksidan kapasite analizlerine tabi tutulmuş ve sonuçlar, örneklem miktarı içerisindeki örnek miktarı oranına göre hesaplanmıştır.

İstatistiksel Analiz

Analizler 3 tekerrürlü olarak temin edilen numunelerde 3 paralelli ölçümler yapılarak gerçekleştirilmiş olup, elde edilen sonuçlar ortalama±standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. Veriler SPSS yazılımı (IBM, ABD) kullanılarak tek yönlü varyans analizine (ANOVA) tabii tutulmuştur. Örnekler arasındaki farklılıkların belirlenmesinde Tukey testi kullanılmıştır ($p<0.05$). Analizler arası korelasyon katsayıları (R^2) Excel yazılımı (Microsoft, ABD) kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 2. *In vitro* gastrointestinal sindirim modeli

BULGULAR ve TARTIŞMA

Endüstriyel Dondurma İşlemi Basamaklarının Toplam Fenolik Madde İçeriği ve Antioksidan Kapasiteye Etkileri

Endüstriyel dondurma işlemi sırasında taze fasulyenin nem miktarında meydana gelen değişimler Tablo 1'de verilmiştir. Hammadde için tespit edilen nem miktarı literatürle (%90.3) uyumlu olup [21], haşlama basamağı haricinde diğer üretim basamaklarında hammaddeye kıyasla istatistiksel olarak önemli bir fark görülmemiştir. Haşlama basamağında nem miktarında meydana gelen %2 artışın ($p < 0.05$) haşlama suyunun ürün içine penetre

olmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Numunelerin nem miktarlarındaki farklılıkları ortadan kaldırmak için, bu çalışmadaki tüm sonuçlar kuru ağırlık (KA) olarak ifade edilmiştir.

Taze fasulye hammaddesi için tespit edilen toplam fenolik madde içeriği (Tablo 1) literatürde daha önce belirtilen değerler (70.5–225.6 mg GAE/100 g KA) aralığındadır [22, 23]. Fasulyenin cinsi, olgunluğu, uygulanan tarımsal işlemler, ürün toplandıktan sonra fabrikaya ulaşıncaya kadar muhafaza edilen depo sıcaklığı ve süresi, oksijen veya ışık varlığı gibi koşullardaki farklılıklar fasulyenin fenolik bileşen içeriğini etkileyebilmektedir. Haşlama basamağında görülen %80 artış ($p < 0.05$) haricinde diğer tüm basamaklarda toplam

fenolik madde içeriği hammaddeye kıyasla istatistiksel olarak önemsizdir. Haşlama neticesinde toplam fenolik madde miktarında görülen artışın ısı işlem nedeniyle hücre duvarı ve hücre altı bölümlerin yapısının

bozularak fenolik bileşenlerin serbest kalması ve böylece daha iyi ekstrakte edilmesinden kaynaklanıyor olması muhtemeldir [24].

Tablo 1. Taze fasulyenin endüstriyel dondurulma işlemi sırasında farklı üretim basamaklarında nem miktarında, toplam fenolik madde miktarında, toplam flavonoid madde miktarında ve toplam antioksidan kapasitede meydana gelen değişimler

Analizler	Hammadde	Atık	Kesim	Haşlama	Dondurma
Nem miktarı (%)	91.5±0.2 b	91.9±0.2 ab	91.9±0.7 ab	93.5±1.3 a	91.9±0.3 ab
Toplam fenolik madde içeriği (mg GAE/100 g KA)	108.5±11.2 bc	107.2±7.1bc	94.0±10.3 c	194.9±23.7 a	144.3±21.0 b
Toplam flavonoid madde içeriği (mg KE/100 g KA)	426.9±71.5 b	924.9±199.2 a	374.5±91.8 b	601.1±148.4 b	557.3±80.5 b
ABTS (mg TE/100 g KA)	372.5±38.8 c	603.1±59.2 ab	458.8±92.4 bc	793.4±107.0 a	585.9±39.1 b
CUPRAC (mg TE/100 g KA)	323.5±33.0 b	638.8±62.8 a	460.9±42.2 ab	541.2±118.5 a	446.1±85.8 ab
DPPH (mg TE/100 g KA)	94.1±11.6 b	144.2±16.3 ab	78.2±15.1 b	207.9±51.9 a	158.5±40.7 ab
FRAP (mg TE/100 g KA)	32.3±8.7 c	63.7±11.4 bc	42.0±8.5 c	146.5±19.0 a	102.1±25.4 b

Bu tabloda gösterilen veriler 3 tekerrürlü ve 3 paraleli olarak yapılmış ölçümlerin ortalama ± standart sapma değerleridir. Satırlardaki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları temsil etmektedir ($p < 0.05$).

Taze fasulye hammaddesinin toplam flavonoid madde içeriği (Tablo 1) literatür ile uyumlu olup [25], endüstriyel dondurma işlemi basamaklarında görülen değişiklikler istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Öte yandan, atık olarak ayrılan fasulye uç ve saplarının toplam flavonoid madde içeriğinin hammaddeye kıyasla %117 daha yüksek ($p < 0.05$) olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu, taze fasulyede bulunan flavonoidlerin fasulyenin uç ve sap kısımlarında yoğunlaştığını ve dolayısıyla atık olarak ayrılan bu endüstriyel yan ürünün iyi bir flavonoid kaynağı olduğunu ortaya koymuştur.

Endüstriyel dondurma işlemi basamaklarının taze fasulyenin toplam antioksidan kapasitesi üzerine olan etkileri 4 farklı metot (ABTS, CUPRAC, DPPH ve FRAP) kullanılarak incelenmiştir (Tablo 1). En yüksek toplam antioksidan kapasite miktarı ABTS ve CUPRAC metotları ile elde edilmiştir. Gözlenen bu durum ABTS ve CUPRAC metotları ile gıda maddelerinde bulunan hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanlar tespit edilebiliyorken, DPPH metodu ile sadece lipofilik antioksidanların ve FRAP metodu ile de sadece hidrofilik antioksidanların tespit edilebiliyor olmasından kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca, FRAP metodu yavaş kinetik özelliklere sahip olan antioksidan bileşenlerin protokol süresi içinde (4 dk.) reaksiyona giremediğinden dolayı tespit edilemiyor olması nedeni ile de eleştirilmektedir [26]. Atık olarak ayrılan yan ürünün hammaddeye kıyasla %97'ye kadar ($p < 0.05$) daha yüksek miktarda toplam antioksidan kapasiteye sahip olduğu görülmüştür. Bu durum toplam flavonoid madde içeriği için elde edilen sonuçlarla paraleldir. Kesim basamağında görülen değişimler istatistiksel olarak önemsiz olmakla birlikte, haşlama sonrasında tüm metotlarda elde edilen sonuçlar hammaddeye kıyasla istatistiksel olarak önemli artışların olduğuna işaret etmiş olup, bu artışlar ABTS, CUPRAC, DPPH ve FRAP metotları için sırası ile %113, %67, %121 ve %354 olarak tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Haşlama sonrası dondurma işleminde haşlamaya kıyasla azalmalar görülse de, dondurma sonrasında elde edilen toplam antioksidan kapasitenin hammaddeye kıyasla %38–216 daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Dondurma işlemi

sırasında buz kristallerinin oluşumu nedeniyle gıda matrisine zarar verilmektedir ve bu matris değişikliği hücre duvarı maserasyonuna neden olarak biyoaktif bileşiklerin ekstrakte edilebilirliğini arttırmaktadır. Fakat aynı zamanda oksidasyon ve bozulmaya karşı daha yüksek duyarlılık da oluşmaktadır [27]. Toplam antioksidan kapasite miktarındaki değişimlerin trendi toplam fenolik madde içeriği için elde edilen sonuçlarla uyumlu olup, özellikle FRAP metodu ile toplam fenolik madde içeriği arasında iyi bir korelasyon olduğu ($R^2 = 0.873$) görülmüştür.

***In vitro* Gastrointestinal Sindirimin Toplam Fenolik Madde İçeriği ve Antioksidan Kapasiteye Etkileri**

In vitro gastrointestinal sindirimin toplam fenolik madde içeriği üzerine etkileri Tablo 2'de verilmiştir. Ağız sindirimi sonrasında sindirilmemiş örnekler kıyasla %63–72 daha düşük miktarda toplam fenolik madde içeriği elde edilmiştir. Görülen bu durum ağız sindirimi için uygulanan inkübasyon süresinin (2 dk.) fenolik bileşenlerin gıda matrisinden salınımı için yeterli olmamasından da kaynaklanıyor olabilir. Nitekim, 2 saat süren mide sindirimi simülasyonu sonrasında sindirilmemiş numunelerde bulunan toplam fenolik madde içeriğinin %93–130 kadarı açığa çıkmıştır. Mide sindirimi simülasyonundan sonra toplam fenolik madde içeriğinde görülen %30'a varan bu artış enzimatik hidroliz sonucunda gıda matrisine bağlı fenolik bileşenlerin serbest kalmasından kaynaklanıyor olabilir. *In vitro* bağırsak sindirimi toplam fenolik madde içeriğinde sindirilmemiş örnekler kıyasla daha da fazla artışa neden olmuş olup (%18–44), bu durumun ilave ekstraksiyon süresi (artı 2 saat) ve/veya enzimlerin etkisi ile ilgili olduğu düşünülmektedir [28]. *In vitro* gastrointestinal sindirim sonucunda atık ve dondurulmuş ürün için elde edilen biyoerişilebilir toplam fenolik madde içeriği hammaddeye kıyasla %12–23 daha yüksek bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlar, gıda işleminin sindirim sırasında fenolik bileşiklerin matriksten salınımı etkilediğini göstermiş olup, sindirilmemiş örnekler için

tespit edilen değerlerin biyoerişilebilirlik değerlerinden farklı olabileceğine işaret etmiştir.

In vitro gastrointestinal sindirim sırasında toplam flavonoid madde içeriğinde meydana gelen değişimler Tablo 2'de gösterilmiştir. Toplam fenolik madde içeriği sonuçlarında olduğu gibi ağız sindirimi sonrasında sindirilmemiş örneklerle kıyasla daha düşük miktarlarda (%47–55) toplam flavonoid madde içeriği tespit edilmiştir. Bu durum daha önce bahsedildiği gibi ağız sindirimi için uygulanan inkübasyon süresinin flavonoidlerin gıda matrisinden salınımı için yeterli olmamasından kaynaklanıyor olabilir. Yine toplam fenolik madde için elde edilen sonuçlarda olduğu gibi, mide sindirimi simülasyonu sonrasında toplam flavonoid madde değerleri ağız sindirimine kıyasla artış göstermiş

olup, sindirilmemiş numunelerde tespit edilen miktarların %47–83'üne kadar ulaşmıştır. Bağırsak sindiriminden sonra ise sindirilmemiş numunelerde bulunan toplam flavonoid madde içeriğinin %77–146 kadarı açığa çıkmış olup, atık ve dondurulmuş ürün için elde edilen biyoerişilebilir toplam flavonoid madde içeriği hammaddeye kıyasla istatistiksel olarak önemli miktarda yüksek bulunmuştur (%143–148) ($p<0.05$). Literatürde daha önce yapılmış bazı çalışmalarda da dondurma işlemi sonucunda biyoerişilebilir polifenol miktarlarında artışlar görülmüş olup [11, 29], bu durum dondurma işlemi sırasında oluşan buz kristallerinin gıda matrisinde meydana getirdiği değişimlerin polifenollerin sindirim sırasındaki ekstrakte edilebilirliğini artırmasından kaynaklanıyor olabileceği öne sürülmüştür.

Tablo 2. *In vitro* gastrointestinal sindirim sırasında taze fasulye ürünlerinin toplam fenolik madde miktarında, toplam flavonoid madde miktarında ve toplam antioksidan kapasitesinde meydana gelen değişimler

Numune	Sindirilmemiş	Ağız	Mide	Bağırsak
Toplam fenolik madde içeriği (mg GAE/100 g KA)				
Hammadde	108.5±11.2 ABa	30.3±4.4 Cb	125.7±22.6 Aa	138.3±12.7 Ba
Atık	107.2±7.1 Bb	39.5±1.2 Bc	139.0±21.3 Aab	154.7±12.4 Aba
Dondurulmuş ürün	144.3±21.0 Aa	52.2±4.0 Ab	133.8±13.0 Aa	170.4±12.8 Aa
Toplam flavonoid madde içeriği (mg KE/100 g KA)				
Hammadde	426.9±71.5 Ba	236.9±13.7 Bbc	199.2±39.9 Cc	327.8±34.2 Bab
Atık	924.9±199.2 Aa	438.0±44.7 Aa	717.1±90.6 Aa	796.0±285.7 Aa
Dondurulmuş ürün	557.3±80.5 Bb	303.2±11.3 Bb	461.5±86.0 Bb	814.8±123.4 Aa
ABTS (mg TE/100 g KA)				
Hammadde	372.5±38.8 Bb	93.8±5.9 Bc	441.0±29.4 Bb	690.9±47.1 Ba
Atık	603.1±59.2 Ab	159.3±6.4 Ac	604.5±6.5 Ab	901.0±73.6 Aa
Dondurulmuş ürün	585.9±39.1 Ab	172.9±12.4 Ac	454.1±68.8 Bb	756.6±70.7 Aba
CUPRAC (mg TE/100 g KA)				
Hammadde	323.5±33.0 Ba	153.4±14.1 Cb	419.7±52.1 Aa	380.9±102.2 Ba
Atık	638.8±62.8 Aab	332.0±1.8 Ac	531.1±3.2 Ab	709.6±64.9 Aa
Dondurulmuş ürün	446.1±85.8 Ba	188.5±14.2 Bb	466.3±88.8 Aa	605.1±66.5 Aa
DPPH (mg TE/100 g KA)				
Hammadde	94.1±11.6 Ac	48.5±2.7 Bc	215.8±10.6 Bb	558.2±65.7 Ba
Atık	144.2±16.3 Abc	79.0±2.8 Ac	267.2±7.1 ABb	716.9±98.2 Aba
Dondurulmuş ürün	158.5±40.7 Ac	85.6±4.5 Ac	315.0±34.9 Ab	740.1±33.2 Aa
FRAP (mg TE/100 g KA)				
Hammadde	32.3±8.7 Bb	38.5±2.4 Bb	132.3±19.4 Ba	40.0±6.7 Bb
Atık	63.7±11.4 Abc	64.3±5.1 Ac	206.3±31.7 Aa	131.8±19.9 Ab
Dondurulmuş ürün	102.1±25.4 Aa	51.3±7.4 ABb	137.6±23.7 Ba	109.0±11.8 Aa

Bu tabloda gösterilen veriler 3 tekerrürlü ve 3 paralelli olarak temin edilen numunelerde yapılan ölçümlerin ortalama ± standart sapma değerleridir. Satırlardaki küçük harfler ve sütunlardaki büyük harfler kendi aralarında istatistiksel olarak önemli farklılıkları temsil etmektedir ($p<0.05$).

In vitro gastrointestinal sindirimin toplam antioksidan kapasite üzerine olan etkileri genel olarak toplam fenolik ve flavonoid madde içerikleri için elde edilen sonuçlara benzerlik göstermiştir (Tablo 2). Ağız sindirimi simülasyonu sonrasında FRAP metodu hariç diğer tüm metotlarda sindirilmemiş örneklerden %45–75 kadar daha düşük miktarda toplam antioksidan kapasite miktarı tespit edilmiş olup, özellikle FRAP ve CUPRAC metotları ile toplam flavonoid madde içeriği arasında pozitif lineer ilişki tespit edilmiştir ($R^2=0.809–0.900$). Mide sindirimi sonrasında tüm metotlarla tespit edilen toplam antioksidan kapasite miktarları ağız sindirimine kıyasla istatistiksel olarak önemli artışlar göstermiş olup, DPPH metodu için sindirilmemiş numunelerde tespit edilen değerlerden %85–129 kadar daha yüksek miktarlar bulunmuştur ($p<0.05$). Bağırsak sindirimi

simülasyonundan sonra ise değişken sonuçlar elde edilmiş olsa da, genel olarak sindirilmemiş örneklerle kıyasla daha yüksek toplam antioksidan kapasite değerleri tespit edilmiş olup, ABTS ve DPPH metotları için %29–493 kadar istatistiksel olarak önemli artışlar görülmüştür ($p<0.05$). İlaveten, atık ve dondurulmuş ürün için hammaddeye kıyasla %10–230 daha yüksek biyoerişilebilir toplam antioksidan kapasite elde edilmiştir. Mide ve bağırsak sindiriminden sonra toplam antioksidan kapasite ile toplam fenolik ve flavonoid madde içerikleri arasında daha ortalama bir ilişki görülmüştür ($R^2\leq 0.730$). Bu çalışmada uygulanan toplam antioksidan kapasite tayin metotlarının çalışma pH'ları göz önüne alındığında, FRAP metodunun (pH 3.6), midedeki antioksidan aktiviteyi değerlendirmek için daha uygun bir metot olabileceği, CUPRAC ve DPPH

metotlarının (pH 7.0–8.0) ise ağız ve bağırsaktaki toplam antioksidan kapasitenin tayini için daha uygun olabileceği varsayılabilir. Sonuç olarak, tek bir antioksidan kapasite ölçüm metodu kullanarak gıdaların antioksidan kapasitesinin ölçülmesi ile tatmin edici bir değerlendirme yapmanın mümkün olmayacağı görülmüştür. Bu nedenle toplam antioksidan kapasitenin tayininde farklı mekanizmalara sahip birden fazla metodun kullanılması önerilmektedir [30]. Ayrıca, toplam fenolik madde tayini için kullanılan Folin-Ciocalteu metodu sadece fenolik bileşenlere özgü olan bir test olmayıp, askorbik asit, sitrik asit, basit şekerler ve bazı amino asitler gibi indirgen bileşenleri de ölçerek, toplam fenolik madde içeriğinin gerçek değerinden farklı çıkmasına neden olabilmektedir [31]. Benzer şekilde toplam flavonoid madde tayini için kullanılan metod da sadece flavonoidlere özgü bir test olmayıp, flavonoidlerle birlikte, fenolik asitler de bu testte oldukça güçlü bir reaksiyon verirken, flavan-3-oller hariç birçok flavonoid bu teste zayıf reaksiyon vermektedir [32]. Tüm bunlar dikkate alındığında, ileride yapılacak çalışmalarda fenolik bileşiklerin miktarlarının tespiti için spektrofotometrik metotların yanı sıra daha spesifik sonuç veren kromatografik yöntemlerin de kullanılması tavsiye edilmektedir.

SONUÇ

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar endüstriyel dondurma işleminin taze fasulyenin toplam fenolik ve flavonoid madde içeriğini korunduğunu ve atık olarak ayrılan yan ürünün toplam flavonoid madde içeriğinin ve antioksidan kapasitesinin hammaddeden yüksek olduğunu göstermiştir. İlaveten, *in vitro* gastrointestinal sindirim sonrasında dondurulmuş taze fasulyenin ve atık ürünün hammaddeye kıyasla daha fazla biyoerişilebilir toplam fenolik maddeye, toplam flavonoid maddeye ve toplam antioksidan kapasiteye sahip olduğu görülmüştür. Bu bulgular dikkate alındığında, endüstriyel dondurma işleminin, polifenollerin biyoerişilebilirliğini arttırmak için alternatif bir strateji olabileceği söylenilebilir. Ancak, bu çalışmada, sadece dondurma işleminin etkisi incelenmiş olup, ileriki araştırmalarda polifenollerin biyoerişilebilirliğinin artırılması için optimum koşulları belirlemek amacıyla depolama sırasında polifenollerdeki değişikliklerin de çalışılması gerekmektedir. Bununla birlikte, polifenollerin stabilitesini, biyoerişilebilirliğini ve biyoaktivitesini tam olarak anlamak için *in vivo* çalışmalara da ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- [1] Boeing, H., Bechthold, A., Bub, A., Ellinger, S., Haller, D., Kroke, A., Leschik-Bonnet, E., Müller, M.J., Oberritter, H., Schulze, M. (2012). Critical review: Vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. *European Journal of Nutrition*, 51(6), 637-663.
- [2] Shahidi, F., Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820-897.
- [3] Abu-Reidah, I.M., Arráez-Román, D., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Phytochemical characterisation of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by using high-performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 24(2), 105-116.
- [4] Paciulli, M., Ganino, T., Pellegrini, N., Rinaldi, M., Zaupa, M., Fabbri, A., Chiavaro, E. (2015). Impact of the industrial freezing process on selected vegetables—Part I. Structure, texture and antioxidant capacity. *Food Research International*, 74, 329-337.
- [5] Mazzeo, T., Paciulli, M., Chiavaro, E., Visconti, A., Fogliano, V., Ganino, T., Pellegrini, N. (2015). Impact of the industrial freezing process on selected vegetables—Part II. Colour and bioactive compounds. *Food Research International*, 75, 89-97.
- [6] Baardseth, P., Bjerke, F., Martinsen, B.K., Skrede, G. (2010). Vitamin C, total phenolics and antioxidative activity in tip-cut green beans (*Phaseolus vulgaris*) and swede rods (*Brassica napus* var. *napobrassica*) processed by methods used in catering. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(7), 1245-1255.
- [7] Kamiloğlu, S., Ozkan, G., Isik, H., Horoz, O., Van Camp, J., Capanoğlu, E. (2017). Black carrot pomace as a source of polyphenols for enhancing the nutritional value of cake: An *in vitro* digestion study with a standardized static model. *LWT-Food Science and Technology*, 77, 475-481.
- [8] Kamiloğlu, S. (2019). Bireysel Hızlı Dondurma İşlemi Basamaklarının Granny Smith Elmaların Polifenol İçeriği ve Antioksidan Kapasitesine Etkileri. *Akademik Gıda*, 17(1), 38-46.
- [9] Alminger, M., Aura, A.M., Bohn, T., Dufour, C., El, S., Gomes, A., Karakaya, S., Martínez-Cuesta, M., McDougall, G., Requena, T. (2014). *In vitro* models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 413-436.
- [10] Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carriere, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Menard, O., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W., Brodkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113-1124.
- [11] Kamiloğlu, S. (2019). Taze ve dondurulmuş elmalarda ve elma posasında polifenol biyoerişilebilirliğinin değerlendirilmesi. *Gıda*, 44(3), 409-418.
- [12] Ribas-Agustí, A., Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R., Elez-Martínez, P. (2018). Food processing strategies to enhance phenolic compounds bioaccessibility and bioavailability in plant-based foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(15), 2531-2548.

- [13] AOAC. (1999). *Official Method of Analysis* (16th ed.). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- [14] Kamiloglu, S., Capanoglu, E. (2015). Polyphenol content in figs (*Ficus carica* L.): Effect of sun-drying. *International Journal of Food Properties*, 18(3), 521-535.
- [15] Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4113-4117.
- [16] Kim, D.O., Jeong, S.W., Lee, C.Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, 81(3), 321-326.
- [17] Miller, N.J., Rice-Evans, C. (1997). Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS•+ radical cation assay. *Free Radical Research*, 26(6), 195-199.
- [18] Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., Karademir, S.E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- [19] Kumaran, A., Karunakaran, R.J. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chemistry*, 97(1), 109-114.
- [20] Benzie, I.F., Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- [21] USDA Food Composition Database. Available from: <http://ndb.nal.usda.gov>.
- [22] Patras, A., Tiwari, B., Brunton, N. (2011). Influence of blanching and low temperature preservation strategies on antioxidant activity and phytochemical content of carrots, green beans and broccoli. *LWT-Food Science and Technology*, 44(1), 299-306.
- [23] Guillén, S., Mir-Bel, J., Oria, R., Salvador, M.L. (2017). Influence of cooking conditions on organoleptic and health-related properties of artichokes, green beans, broccoli and carrots. *Food Chemistry*, 217, 209-216.
- [24] Kaiser, A., Kammerer, D.R., Carle, R. (2013). Impact of blanching on polyphenol stability and antioxidant capacity of innovative coriander (*Coriandrum sativum* L.) pastes. *Food Chemistry*, 140(1-2), 332-339.
- [25] Gupta, S., Chatterjee, S., Vaishnav, J., Kumar, V., Variyar, P.S., Sharma, A. (2012). Hurdle technology for shelf stable minimally processed French beans (*Phaseolus vulgaris*): A response surface methodology approach. *LWT-Food Science and Technology*, 48(2), 182-189.
- [26] Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu, B., Berker, K.I., Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12(7), 1496-1547.
- [27] Oliveira, A., Alexandre, E.M., Coelho, M., Barros, R.M., Almeida, D.P., Pintado, M. (2016). Peach polyphenol and carotenoid content as affected by frozen storage and pasteurization. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 361-368.
- [28] Bouayed, J., Hoffmann, L., Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128(1), 14-21.
- [29] Kamiloglu, S. (2019). Effect of different freezing methods on the bioaccessibility of strawberry polyphenols. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(8), 2652-2660.
- [30] Apak, R., Ozyurek, M., Guclu, K., Capanoglu, E. (2016). Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(5), 997-1027.
- [31] Capanoglu, E., Kamiloglu, S., Ozkan, G., Apak, R. (2018). Evaluation of antioxidant activity/capacity measurement methods for food products. In *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications*, R. Apak, E. Capanoglu, & F. Shahidi, Editors., Chicester, United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd., p. 273-286.
- [32] Ho, Y.C., Yu, H.T., Su, N.W. (2012). Re-examination of chromogenic quantitative assays for determining flavonoid content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(10), 2674-2681.