

GIDA (Gıda Teknolojisi Derneği Yayını)
THE JOURNAL OF FOOD (Published by the Association of Food Technology; Turkey)
Cilt / Volume: 41 • Sayı / Number: 5 • 2016
İki ayda bir yayımlanır / Published bimonthly
ISSN 1300 - 3070; ISSN 1309 - 6273 (GIDA on-line)

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 Kurulu / Editorial Board	Danışma Kurulu / Advisory Board
Baş Editör/ Editor-in Chief Halkman, A. Kadir <i>Ankara University, Turkey</i>	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, Atilla <i>Ankara University, Turkey</i>
Editörler / Co-Editors Çakır, İbrahim <i>Abant İzzet Baysal University, Turkey</i> Erinç, Hakan <i>Niğde University, Turkey</i> Taban, Birce <i>Ankara University, Turkey</i> Velioglu, Y. Sedat <i>Ankara University, Turkey</i>	
Yönetim Yeri Adres / Address Büyükelçi Sokak No: 18/1 Kavaklıdere/ Ankara Turkey	
Tel: (+90) 0534 968 5994 • Faks: (+90) 312 317 8711 E-posta / E-mail: dergi@gidadernegi.org URL: http://www.gidadernegi.org	
Yayın Türü: Yaygın süreli ve hakemli	
Basım Yeri / Printing House Sim Matbaacılık Ltd. Şti İvedik Organize San. Böl. Mat-Sit İş Mrk. 1518. Sk. No: 2/14 Yenimahalle / Ankara Turkey Tel : (+90) 312 230 22 09 Faks: (+90) 312 230 41 39 e-mail: simmatbaasi@gmail.com	
Yayın Tarihi / Publication Date 15 10 2016	

Bu dergi, uluslararası **CAB Abstracts, Citefactor, Index Copernicus, EBSCO, ULAKBİM** (Yaşam Bilimleri) **FAO Agris** ve **DOAJ** veri tabanları kapsamındadır.

This journal is covered by **CAB Abstracts, Citefactor, Index Copernicus, EBSCO, ULAKBİM** (National Databases) **FAO Agris** and **DOAJ** database systems.

İçindekiler / Content

Kartal E, Ozturk S; <i>Pine cone as an alternative dietary fiber source and its effect on cake and cookie quality / Alternatif bir besinsel lif kaynağı olarak çam kozalağının kek ve bisküvi kalitesine etkisi</i>	291-297
Uyar GEÖ, Uyar B; <i>Effect of NaCl and KCl salts on growth and lactic acid production of Rhizopus oryzae / NaCl ve KCl tuzlarının Rhizopus oryzae'nin büyümesine ve laktik asit üretimine etkisi</i>	299-304
Kaya G, Taner B; <i>Production of fermented red beet juice powder by using spray and drum drier / Fermente pancar suyu tozunun püskürtmeli ve valsli kurutucu ile üretimi</i>	305-310
Cerit İ, Şenkaya S, Tulukoğlu B, Kurtuluş M, Seçilmişoğlu ÜR, Demirkol O; <i>Enrichment of functional properties of white chocolates with cornelian cherry, spinach and pollen powders / Kızılçık, ispanak ve polen tozları kullanılarak beyaz çikolataların fonksiyonel özelliklerinin zenginleştirilmesi</i> . . .	311-316
Çetinkaya A, Akbaba GB, Özkaymak S, Gülbaz G; <i>Mineral and heavy metal content in Cami Boğazi cheese on sale in Trabzon, Turkey / Trabzon'da tüketime sunulan Cami Boğazi Peynirlerinin mineral madde içeriği ve ağır metal kontaminasyonu</i>	317-321
Avcı A, Üzmez S, Alkan FB, Bagana İ, Nurçeli E, Çiftçi E; <i>Antimicrobial activity spectrums of some Bacillus strains from various sources / Çeşitli kaynaklardan izole edilmiş olan bazı Bacillus suşlarının antimikrobiyel aktivite spektrumları</i>	323-328
Soncu ED, Haskaraca G, Davarcıoğlu ES, Kolsarıncı N; <i>Donmuş depolanan tavuk burgerlerde yeşil çay ekstraktının lipolitik değişimler ve mikrobiyel inhibisyon üzerine etkisi / The effect of green tea extract against lipolytic changes and inhibition of microbial activity in frozen stored chicken burger</i>	329-336
Velioglu YS, Cönger E, Aksu P, Ergen ŞF, Baltacı HMY; <i>Ozonlu suyla yıkamanın domateslerde pestisit giderimi, askorbik asit ve renk üzerine etkileri / Effects of ozonated water washing on pesticide removal, ascorbic acid and colour of tomatoes</i>	337-344
Karagöz Ş, Demirdöven A; <i>Termosonikasyon ve geleneksel ısıtma uygulamalarının havuç suyuna etkileri: Pektin metilesteraz inaktivasyonu ve fizikokimyasal özellikler / Effects of thermosonication and conventional thermal treatments on carrot juice: Pectin methylesterase inactivation and physicochemical properties</i>	345-350
Akal C, Türkmen N, Koçak C; <i>Kefir üretiminde peyniraltı suyu kullanımı / Use of whey in kefir production</i>	351-357
Bayhan T, Aypak SÜ; <i>Büyük Menderes deltasından avlanan kefal ve levreklerde Cu, Zn ve Cd düzeylerinin belirlenmesi ve metalloitiyonin ile ilişkisinin araştırılması / Determination of Cu, Zn and Cd concentrations of mullet and perchs hunted in Büyük Menderes delta and investigation of their relationship with metallothionein</i>	359-365
Kıvrak M, Yorulmaz A, Erinç H; <i>Ak Delice yabani zeytini (Olea europaea L. subsp. oleaster) ve zeytinyağının karakterizasyonu / Characterization of virgin olive oils from Ak Delice wild olives (Olea europaea L. subsp. oleaster)</i>	367-372

Editörden,

Merhaba,

GIDA Dergisi'nin 41. yayın yılının 5. sayısında 12 makale bulunmaktadır. Bunlardan 6 adedi İngilizce ve 6 adedi Türkçe araştırma makalesidir.

GIDA Dergisinin kâğıt baskısından vazgeçtikten sonra pek çok ilkleri de yaşadık. Önceki sayıda derleme makale sayısı İngilizce ve Türkçe araştırma makale sayısını geçmişti ama bu sayıda, ilk kez, 6 İngilizce araştırma makalesi yayımladık ve bu sayıda hiç derleme makale yok.

Bu sayıda derleme makale olmaması bizim açımızdan övünülecek bir şey değildir. GIDA Dergisi 2016 yılı 41. cilt 6. sayısında ve ilerisinde de derleme makaleler olacaktır. Temmuz 2016 tarihinde www.gidadernegi.org sayfasında yayımlanan GIDA Dergisinin 2016 yılı 41. cilt 5. sayısında (Eylül-Ekim 2016), baskıya hazır makaleler içerisinde derleme makaleler olduğu görülmektedir.

GIDA Dergisinde şu kuralı hiç ihmal etmedik: Baskı önceliği İngilizce araştırma, Türkçe araştırma ve Türkçe derleme şeklindedir. Bu sayıda baskıya hazır hiç derleme makale yoktu ve biz yine 8 makale sınırını aşarak 12 makale yayımladık. 6. sayı için 11 makalemiz var, bunlardan 8 adedi sayı numarası verilmiş şekilde elektronik ortamda yayımlanmıştır, diğer 3 adedinde işlemler sürmektedir. Elektronik ortamda 2017 yılı 42. cilt olarak künye verilmiş 4 makalemiz de vardır.

Türkiye 12. Ulusal Gıda Kongresi için kayıtlar devam ediyor. Devamında, Kapadokya'da yapmayı planladığımız 3. Uluslararası Gıda Teknolojisi Kongresi için 2018 yılı sonbaharını kurşun kaleminden biraz daha silinmez bir kalem ile ajandanıza kaydedin.

Sevgi ve saygılarımla,

Prof. Dr. A. Kadir Halkman

A Message from the Editor-in-Chief

Hello,

There are 12 articles in the 5th issue of the 41st volume of FOOD Journal. Six of them are research articles in English and the rest are research articles in Turkish.

We have lived many firsts after we gave up the printing of the journal in paper form. The number of review articles passed the number of research articles both in English and in Turkish in the previous issue, but in this issue, for the first time, we published 6 research articles in English and there is not any review article in this issue.

According to us, having not any review article in this issue is not a something to be proud of. There will be review articles both in the 6th issue of the 41st volume and in the further issues of FOOD Journal. It can be seen that there are review articles in ready-to publishing articles in the 5th issue (September-October 2016) of the volume 41 of the year 2016 of FOOD Journal which was printed at the web page www.gidadernegi.org in July 2016.

We have never neglected this rule in FOOD Journal: The main priority in publishing articles is in the form of research articles in English, then research articles in Turkish, and the latest is the review articles in Turkish. There was not any ready-to publishing review article in this issue and we published 12 articles by exceeding the limit of 8 articles again. We have 11 articles for the 6th issue, 8 of them have been printed in electronic form with the issue number, the reviewing process has been continuing at the other 3 articles. We have 4 articles given a tag as "volume 42 of the year 2017" in electronic form as well.

The registration for the 12th National Food Congress continues. Subsequently, note the fall of the year 2018 by a ball-point pen to your calendar for the 3rd International Congress on Food Technology which we plan to do in Cappadocia.

Best Regards,
Prof. A. Kadir Halkman

PINE CONE AS AN ALTERNATIVE DIETARY FIBER SOURCE AND ITS EFFECT ON CAKE AND COOKIE QUALITY

Elif Kartal, Serpil Ozturk*

Sakarya University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Sakarya, Turkey

Received / Geliş Tarihi: 18.01.2016

Received in revised form / Düzeltilerek Geliş Tarihi 30.03.2016

Accepted / Kabul Tarihi 05.05.2016

Abstract

In this study, production and characterization of pine cone powder (PCP) and its utilization as alternative dietary fiber source in cake and cookie formulations at 10, 20, and 30% levels were investigated. Total dietary fiber (TDF) content of PCP was found as 62.0%. TDF contents of fiber-rich PCP supplemented products increased with increasing addition levels and reached to 8.3% in cake and 11.8% in cookie by 30% addition. PCP addition did not cause deterioration on physical properties of cakes. Cookies had better (10% PCP) or same (20% PCP) spread ratio values as compared to control one. The hardness of the products increased by 30% PCP addition. The PCP supplemented products had darker but acceptable color. According to sensory score, the PCP added products were accepted up to 20% addition level. The pine cone has potential using as a source of dietary fiber for bakery products.

Key Words: Pine cone, dietary fibers, cake quality, cookie quality

ALTERNATİF BİR BESİNSEL LİF KAYNAĞI OLARAK ÇAM KOZALAĞININ KEK VE BİSKÜVİ KALİTESİNE ETKİSİ

Özet

Bu çalışmada, çam kozalağı tozu (ÇKT) üretimi ve karakterizasyonu ile alternatif bir lif kaynağı olarak kek ve bisküvi formülasyonunda %10, 20 ve 30 oranlarında kullanımı araştırılmıştır. ÇKT'nin toplam besinsel lif (TBL) içeriği %62.0 olarak bulunmuştur. Lifçe zengin ÇKT ilaveli ürünlerde, artan ilave oranıyla TBL miktarı artmış ve %30 ilave ile kekta %8.3, bisküvide ise %11.8 değerlerine ulaşılmıştır. ÇKT ilavesi keklerin fiziksel özelliklerini bozmamıştır. Bisküvilerin yayılma oranı değerleri kontrole göre daha iyi (%10 ÇKT) ya da aynı (%20 ÇKT) bulunmuştur. Ürünlerin sertliği, %30 ÇKT ilavesi ile artmıştır. ÇKT ilaveli ürünler daha koyu ancak kabul edilebilir renklere sahiptir. Duyusal analiz sonucuna göre, ÇKT ilaveli ürünler %20 ilave oranına kadar kabul edilebilir bulunmuştur. Çam kozalağı, fırıncılık ürünlerinde besinsel lif olarak kullanılma potansiyeline sahiptir.

Anahtar kelimeler: Çam kozalağı, besinsel lifler, kek kalitesi, bisküvi kalitesi

*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

sozturk@sakarya.edu.tr,

(+90) 264 295 5926,

(+90) 264 295 5601

INTRODUCTION

Dietary fiber (DF) is the edible parts of plants or analogous carbohydrates that are resistant to digestion and absorption in the human small intestine with complete or partial fermentation in the large intestine. DF includes polysaccharides, oligosaccharides, lignin, and associated plant substances (1, 2). The health benefits of DF were generally reported by many researchers. It has been supposed to have a role in prevention of certain diseases such as diverticulitis, colon cancer, hemorrhoids, arteriosclerosis, varicose veins, and appendicitis (1, 3-6). An increase in level (25-30 g/day) of DF in the daily diet has been recommended by World Health Organization.

Different plant fibers are added to various baked food products in order to increase their fiber content. Whole grains, cereal bran, legumes (soy) and fruit fibers (apple, apricot), sugar beet fiber and brewer's spent grain are common some used for fiber supplementation of foods (7-13). Although, increasing DF content in food products confers health benefits, the sensory and textural properties generally deteriorate (14, 15). In the last decades, there is a trend to find new sources of DF. Dietary fibers from different sources such as pea, mango, hazelnut, banana and cocoa have been used to replace wheat flour in bakery products (16-20).

In East-Asian countries various parts of pine trees, including pine needles, cones, cortices and pollen, are widely consumed as food or dietary supplements to promote health. Consumption of pine tree parts is supposed to affect gastrointestinal diseases and neuronal problems beneficially, and believed to prevent chronic diseases such as hypertension, atherosclerosis, and diabetes (21). Extracts from pine cones have been reported to be effective scavengers of reactive oxygen and lowering serum lipids. Anti-mutagenicity and anti-influenza virus activity of substances of pine cone extract were also determined (21-26). It was shown that a natural product extracted from pine cones inhibited the replication of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 (27).

Cakes and cookies are highly consumed bakery products. The qualities of these products are affected by the quality and level of ingredients used (28). Generally dietary fiber sources cause

deteriorations in quality properties, especially in volume and texture. Fiber content of pine cone is also high and therefore appears as an alternative dietary fiber source. To the authors' knowledge, there is no published research investigating the possible use of pine cone as a fiber source in foods. Thus, the current work investigated the production and characterization of fiber-rich pine cone powder (PCP) and evaluated the effects of PCP addition into cake and cookie formulations.

MATERIALS and METHODS

Materials

Commercial soft wheat flour was used in cake and cookie production. All of the other ingredients were supplied from a local market. Pine cone samples were obtained from Kastamonu, Turkey. The wheat flour used in the study contained 13.4% moisture, 8.4% protein, 22.1% wet gluten, 0.65% ash and 1.1 % total dietary fiber with 1.0% insoluble and 0.1% soluble forms.

Preparation and properties of pine cone powder

Pine cones were collected as immature forms (green, young buds) with a length of 20-25 mm. They were cut into two parts and dried in oven at 50°C until reaching moisture content below 10%. The dried samples were ground and sieved (425 µm) to obtain pine cone powder (PCP). The dried PCP was kept in glass jar and stored at 4°C until used.

The PCP sample was analyzed for moisture and ash by using AACC Approved Methods No. 44-15A and No. 08-01, respectively (29). Soluble (SDF), insoluble (IDF) and total dietary fiber (TDF) contents of PCP sample were determined according to AACC Approved Method No.32-07 (29). The bulk density value of PCP sample was determined (30). Solubility (%), water binding capacity (%), swelling power (g water/g sample) and fat binding capacity (mL oil/100 g sample) values of the PCP sample were determined as functional properties (31-33).

Cake and cookie production

Cakes and cookies were prepared according to AACC Approved Methods No.10-90 and No.10-54,

respectively (29). The PCP was added into formulations at 10, 20, and 30% (in flour basis). Control cake and cookie were also produced without PCP. In preliminary studies, it was observed that the PCP addition caused very low batter consistency. Therefore, in cake formulation water was added at 90, 80, and 70% for 10, 20, and 30% PCP levels, respectively. Four cookies and two cakes were baked at a time and baking was done in duplicate.

Evaluation of cakes and cookie quality

Soluble, insoluble and total dietary fiber contents of cake and cookie samples were determined by using AACC Approved Method No.32-07 (29).

Weight loss (%) values of cakes were determined after cooling of 2 hours. Volume, symmetry and uniformity index values of cakes were calculated (29). After cooling of the cookies, diameter (D) and thickness (T) were measured and spread ratio values (D/T) were calculated. Color values (L*, a*, and b*) of the products were examined by using Lovibond RT300 (UK). Texture analyzer (Brookfield CT3, USA) was used for determination of the hardness of products. The maximum force (N) required to compress the cake samples by 25% of its initial height and the maximum force required breaking cookie sample with a three-point bending jig were determined.

The sensory characteristics (appearance, texture and taste) of the products were screened by panel members by giving the scores ranging between 1 and 5; 5 being the most desirable.

Statistical analysis

The tests were performed in duplicate and mean values were reported. Data were analyzed for variance using the one-way analysis of variance

(ANOVA). When significant ($P<0.05$) differences were found, Duncan’s test was used to determine the differences among means.

RESULTS and DISCUSSION

Properties of pine cone powder

The moisture and ash contents of the PCP sample were found as 8.8% and 3.45%, respectively. Total dietary fiber content of PCP sample was determined as 62.0% (in dry basis), which was mostly insoluble dietary fiber (61.6%, db). Dietary fiber contents varied between 35-60% in apple, 35-74% in orange, 35-87% in pea, 70-73% in sugar beet, 30-36% in peach and 6-64% in nuts (34). The data in the present study revealed that the PCP sample was rich in dietary fiber and could be used to supplement cereal based foods.

Bulk density of PCP was found as 0.5 g/mL. Solubility, water binding capacity, swelling power and fat binding capacity values of PCP sample were measured as 17%, 335%, 4.5 g/g and 15 mL oil/100 g sample, respectively.

Dietary fiber contents of cakes and cookies

Soluble (SDF), insoluble (IDF) and total (TDF) dietary fiber contents of cakes and cookies are presented in Table 1. Control samples did not have IDF and had very low TDF contents.

Insoluble dietary fiber of wheat flour was higher than SDF. However, control cookie and cake samples did not have IDF and had low SDF contents. Baking of the products caused changes in fiber structures and also increases in resistant starch by heating. Resistant starch is indigestible form of starch which is considered as soluble dietary fiber (35). Therefore, formation of resistant starches in products could be the reason of higher SDF than IDF values.

Table 1. Dietary fiber contents of cakes and cookies

PCP level (%)	Cakes			Cookies		
	SDF (%)	IDF (%)	TDF (%)	SDF (%)	IDF (%)	TDF (%)
0	0.6 ^a	0.0 ^d	0.6 ^d	0.7 ^a	0.0 ^d	0.7 ^d
10	0.3 ^a	3.5 ^c	3.8 ^c	0.2 ^a	4.1 ^c	4.3 ^c
20	0.6 ^a	5.7 ^b	6.3 ^b	0.3 ^a	8.4 ^b	8.7 ^b
30	0.6 ^a	7.7 ^a	8.3 ^a	0.3 ^a	11.5 ^a	11.8 ^a

Means with different letters within each column are significantly different ($P<0.05$)

PCP: Pine cone powder, SDF: Soluble dietary fiber, IDF: Insoluble dietary fiber, TDF: Total dietary fiber

IDF and TDF contents of the products increased significantly ($P<0.05$) as the PCP level increased. TDF content reached up to 8.3% in cake and 11.8% in cookie by replacing 30% of flour with pine cone powder. SDF content of pine cone powder was very low (0.4%), therefore SDF contents of the products were also found as low levels and there was no statistically difference in SDF values with PCP levels.

In the related literature, similar results were obtained for fiber enriched bakery products. It was reported that the TDF content of cookies reached to 11.74% and 12.55% by replacing 25% of flour with brewer's spent grain (12) or sugar beet fiber (36) and increased to 11.3% and 10.6% with 40% addition of apple and apricot powder, respectively (13). The cakes prepared with 25% of apple pomace had a dietary fiber content of 14.2% (37).

Quality parameters of cakes and cookies

Volume and symmetry index values of the cake samples were in the range of 75-79 and 10.0-11.3, respectively (Table 2). The PCP addition had negative effect on uniformity index of the cakes. Weight loss of the cakes decreased with increasing PCP level (Table 2) which was probably caused by high water binding capacity of the PCP. The hardness values of the 10% and 20% PCP supplemented cakes were lower than control sample while the differences were not significant. Low water content in formula could be the reason of the higher cake hardness with higher level (30%) of PCP addition. During baking, PCP can absorb more water by increasing of temperature. At 10 and 20% PCP addition levels in cake, water content was adequate for all components and also PCP could hold more water to maintain soft products. At higher PCP level in cake, water content in formula

was not sufficient for hydration of gluten and starch that could be the reason of hard texture after baking. Therefore, this level might possibly be limited level for the PCP sample produced in this study to obtain good texture in cake.

Spread ratio (SR) value of 10% PCP supplemented cookie increased as compared to control (Table 2). However, at high addition level (30%) SR value decreased. The hardness values of cookies increased with increasing PCP levels and the increases were significant ($P<0.05$) at 20% and 30% addition levels (Table 2).

The color of the food product is one of the characteristics which are firstly perceived by the consumer and affect the acceptability. The PCP sample had color of 44.5 L*, 9.4 a* and 33.2 b* values. Changes in color values were caused by natural dark color of the PCP sample (Table 3). The crumb L* values decreased while a* and b* values increased by adding PCP into cakes. The surface L* values of the PCP added cookies decreased significantly ($P<0.05$) with increasing level. Cookies supplemented with PCP gave higher a* and lower b* values as compared to control sample, especially for higher PCP addition levels.

In related literature, negative effects have been reported for bakery products when flour was substituted with various fiber sources. Addition of fibers has been shown to reduce loaf volume and generate harder and darker crumb in cakes (37, 38). Similarly, increased hardness, loss of crispness and reduced spread ratio were observed in cookies (34). Studies have shown that baked products with high level of fiber were not well accepted. Acceptable levels of fiber inclusion varied between 5 and 15% (12, 17, 18, 39). It was compatible with the findings of this study.

Sensory properties of the PCP supplemented products are presented in Figure 1. General appearances of the PCP supplemented cakes were

Table 2. Physical properties and hardness values of cakes and cookies

PCP level (%)	Volume index	Symmetry index	Uniformity index	Weight loss (%)	Cake hardness (N)	Spread ratio	Cookie hardness (N)
0	75 ^a	10.3 ^a	1.0 ^c	19.0 ^a	2.35 ^b	9.5 ^{ab}	55.1 ^b
10	78 ^a	10.8 ^a	2.6 ^b	17.2 ^c	1.63 ^b	10.3 ^a	60.6 ^b
20	79 ^a	11.3 ^a	2.6 ^b	17.8 ^{bc}	1.75 ^b	9.2 ^{ab}	97.4 ^a
30	78 ^a	10.0 ^a	4.4 ^a	18.1 ^b	3.48 ^a	7.5 ^b	97.5 ^a

Means with different letters within each column are significantly different ($P<0.05$)

PCP: Pine cone powder, N: Newton

Table 3. Color values of the cakes and cookies

PCP level (%)	Cake color values			Cookie color values		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
0	73.9 ^a	0.8 ^c	29.8 ^b	70.5 ^a	8.5 ^b	44.5 ^a
10	54.9 ^b	7.9 ^b	31.9 ^b	54.7 ^b	10.9 ^{ab}	36.3 ^b
20	54.3 ^b	11.1 ^a	35.4 ^a	49.9 ^{bc}	11.6 ^a	34.0 ^c
30	54.4 ^b	11.4 ^a	35.8 ^a	45.7 ^c	12.1 ^a	32.0 ^c

Means with different letters within each column are significantly different ($P < 0.05$)

PCP: Pine cone powder; L*: Lightness; a*: Redness; b*: Yellowness

higher than that of control cake. The softness of the PCP supplemented cakes were not significantly ($P > 0.05$) different from that of control sample up to 30% addition level. However, the cookies supplemented with PCP were accepted by the panelists up to 20% level. Crispness of cookies decreased significantly by adding PCP. Above 20% addition level, sensory scores deteriorated significantly ($P < 0.05$), especially for taste. Above 20% level, bitter taste was detected in cakes and cookies.

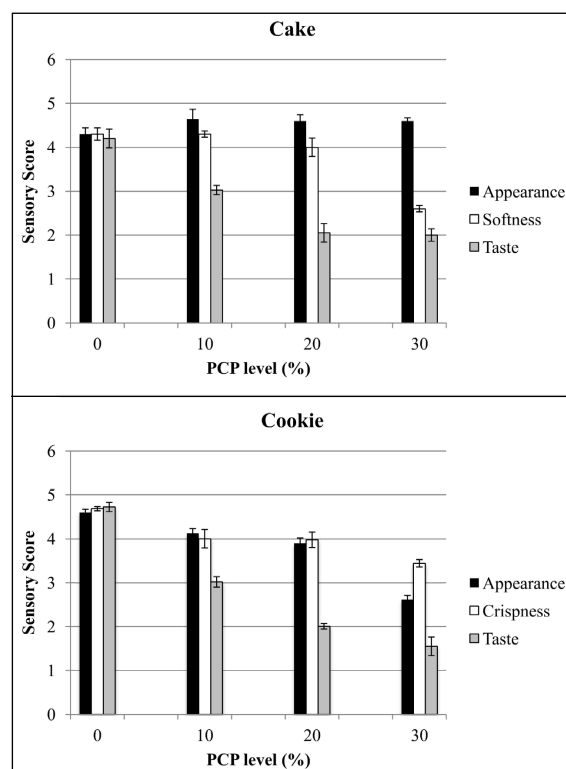


Figure 1. Sensory scores of the cakes and cookies
PCP: Pine cone powder

Figure 2 shows the photos of the cakes and cookies supplemented with different levels of PCP. Addition of PCP did not have substantial deteriorative effect on external appearance of the

products. The PCP included cakes and cookies had darker color because of the natural dark color of PCP, but they were found as acceptable.

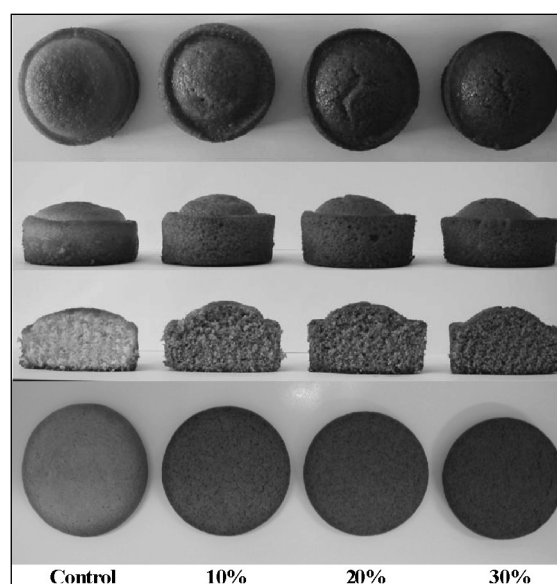


Figure 2. Cakes and cookies supplemented with pine cone powder (PCP)
Control: not supplemented with PCP; 10, 20 and 30%: PCP levels

CONCLUSION

The importance of dietary fibers in human diet is well-understood and accepted by many researchers. Extensive studies have been carried out regarding to the fortification of food products with different fibers. Enrichment of bakery products with new sources of fiber other than common ones (whole grains, wheat bran, oat, barley, etc.) has been interested nowadays. The current work investigated, the first time, the production and characterization of pine cone powder (PCP) and evaluated the effects of fiber-rich PCP incorporation on cake and cookie quality.

Total dietary fiber (TDF) content of PCP was found as 62.0%, which was very high level as

compared to fiber sources commonly used. TDF contents of the PCP supplemented products increased with increasing addition levels and reached up to 8.30% in cake and 11.80% in cookie with 30% addition. The PCP did not have substantial deteriorative effect on external appearance of cakes and cookies. Generally dietary fiber sources caused lower volume and harder texture in cakes. In the present study, 10 and 20% PCP addition gave softer cake than control sample without decreasing volume of the products. Also spread ratio, the most important physical parameter of cookies, was not negatively affected by adding PCP up to 30% level, moreover improved by 10% addition.

The color of the food product is one of the characteristics which affect the consumer acceptability. The PCP included products had darker color, but the changes in color were not substantial to make the products unacceptable according to sensory evaluation. Acceptable PCP addition level was found as 20% according to taste of the cakes and cookies. Above the level, bitter taste was detected in products. However, there was no flavoring agent in formulations of products to observe the effect of PCP better. Bitter taste caused by high level of PCP addition could be enhanced by adding flavoring such as vanilla or the formulation could be fortified with fruit fibers such as apple pomace or orange peels that have rich fine flavor. Therefore, pine cone powder sample produced in this study has great potential in baking industry and can be used as an alternative dietary fiber source in cake and cookie formulations.

Acknowledgement

Authors wish to thank the Research Fund of Sakarya University (No. 2012-50-01-040) for the financial support.

REFERENCES

- Guillon F, Champ M. 2000. Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology. *Food Res Int*, 33, 233-245.
- Thebaudin JY, Lefebvre AC, Harrington M, Bourgeois CM. 1997. Dietary fibres: Nutritional and technological interest. *Trends in Food Sci Technol*, 8, 41-48.
- BeMiller JN, Whistler RL. 1996. Dietary fiber and carbohydrate digestibility, in *Food Chemistry*, Fennema OR (Ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 157-224.
- Harris PJ, Fergusdon LR. 1999. Dietary fibers may protect or enhance carcinogenesis. *Nutr Research*, 443, 95-110.
- Levi F, Pasche C, Lucchini F, La Vecchia C. 2001. Die-tary fibre and risk of colorectal cancer. *Eur J Cancer*, 37, 2091-2096.
- Schneeman B. 1998. Dietary fiber and gastrointestinal function. *Nutr Res*, 18, 625-632.
- Dhingra S, Jood S. 2001. Organoleptic and nutritional evaluation of wheat breads supplemented with soybean and barley flour. *Food Chem*, 77, 479-488.
- Hassona HZ. 1993. High fiber bread containing brewer's spent grains and its effect on lipid metabolism in rats. *Die Nahrung*, 37, 576-582.
- Hu G, Huang S, Cao S, Ma Z. 2009. Effect of enrichment with hemicellulose from rice bran on chemical and functional properties of bread. *Food Chem*, 115, 839-842.
- Knuckles BE, Hudson CA, Chiu MM, Sayre RN. 1997. Effect of b-glucan barley fractions in high-fiber bread and pasta. *Cereal Food World*, 42, 94-99.
- Ozboy O, Koksel H. 1999. Utilization of sugar beet fiber in the production of high fiber bread. *Zuckerindustrie*, 124, 712-715
- Ozturk S, Ozboy O, Cavidoglu I, Koksel H. 2002. Effects of brewer's spent grain on the quality and dietary fiber content of cookies. *J I Brewing*, 108, 23-27.
- Seker IT, Ozboy Ozbas O, Gokbulut I, Ozturk S, Koksel H. 2009. Effects of fiber-rich apple and apricot powders on cookie quality. *Food Sci Biotechnol*, 18, 948-953.
- Ozboy O, Koksel H. 1997. Unexpected strengthening effects of a coarse bran of a wheat variety on dough rheological properties and baking quality. *J Cereal Sci*, 25, 77-82.
- Sakharam KP. 2004. Resistant starch as low-cal ingredients-current applications issues. *Cereal Food World*, 49, 292-294.
- Collar C, Santos E, Rosell CM. 2007. Assessment of the rheological profile of fibre-enriched bread doughs by response surface methodology. *J Food Eng*, 78, 820-826.

17. Ajila CM, Leelavathi K, Rao U. 2008. Improvement of dietary fiber content and antioxidant properties in soft dough biscuits with the incorporation of mango peel powder. *J Cereal Sci*, 48, 319-326.
18. Anil M. 2007. Using of hazelnut testa as a source of dietary fiber in breadmaking. *J Food Eng*, 80, 61-67.
19. Juarez-Garcia E, Agama-Acevedo E, Sayago-Ayerdi SG, Rodriguez-Ambriz SL, Bello-Perez LA. 2006. Composition, digestibility and application in breadmaking of banana flour. *Plant Food Hum Nutr*, 61, 131-137.
20. Martinez-Cervera S, Salvador A, Muguerza B, Moulay L, Fiszman SM. 2011. Cocoa fibre and its application as a fat replacer in chocolate muffins. *LWT-Food Sci Technol*, 44, 729-736.
21. Kwak CS, Moon SC, Lee MS. 2006. Antioxidant, antimutagenic, and antitumor effects of pine needles (*Pinus densiflora*). *Nutr Cancer*, 56, 162-171.
22. Kong Z, Liu Z, Ding B. 1995. Study on the antimutagenic effect of pine needle extract. *Mutat Res*, 347, 101-104.
23. Satoh K, Kihara T, Ida Y, Sakagami H, Koyama N, Premanathan M, Arakaki R, Nakashima H, Komatsu N, Fujimaki M, Misawa Y, Hata N. 1999. Radical modulation activity of pine cone extracts of *Pinus elliotti* var. *elliottii*. *Anticancer Res*, 19, 357-364.
24. Nagata K, Sakagami H, Harada H, Nonoyama M, Ishihama A, Konno K. 1990. Inhibition of influenza virus infection by pine cone antitumor substances. *Antiviral Res*, 13, 11-21.
25. Lee H, Aoki K, Sakagami H, Yoshida T, Kuroiwa Y. 1993. Interaction of pine cone extract fraction VI with mutagens. *Mutat Res*, 297, 53-60.
26. Sakagami H, Takeda M, Kawazoe Y, Nagata K, Ishihama A, Ueda M, Yamazaki S. 1992. Anti-influenza virus activity of a lignin fraction from cone of *Pinus parviflora* Sieb. et Zucc. *In Vivo*, 6, 491-495.
27. Tamura Y, Lai PK, Bradley WG, Konno K, Tanaka A, Nonoyama M. 1991. A soluble factor induced by an extract from *Pinus parviflora* Sieb et Zucc can inhibit the replication of human immunodeficiency virus in vitro. *P Natl Acad Sci USA*, 88, 2249-2253.
28. Hosney RC. 1994. *Principles of Cereal Science and Technology*. AACC Press Inc., St.Paul, MN, 2nd ed., pp. 275-307.
29. AACC International. 2000. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 10th Ed., The Association: St. Paul, MN.
30. Michel F, Thibault JF, Barry JL. 1988. Preparation and characterization of dietary fiber from sugar beet pulp. *J Sci Food Agric*, 4, 77-85.
31. Singh J, Singh N. 2003. Studies on the morphological and rheological properties of granular cold water soluble corn and potato starches. *Food Hydrocolloid*, 17, 63-72.
32. Crosbie GB. 1991. The relationship between starch swelling properties, paste viscosity and boiled noodle quality in wheat flour. *J Cereal Sci*, 13, 145-150.
33. Lin MJY, Humbert ES, Sosulski FW. 1974. Certain functional properties of sunflower meal products. *J Food Sci*, 39, 368-370.
34. Ktenioudaki A, Gallagher E. 2012. Recent advances in the development of high-fibre baked products. *Trends Food Sci Tech*, 28, 4-14.
35. Haralampu, SG. 2000. Resistant starch-a review of the physical properties and biological impact of RS3. *Carbohydr Polym*, 41, 285-292.
36. Ozturk S, Ozboy Ozbas O, Cavidoglu I, Koxsel H. 2008. Utilization of sugarbeet fiber and zero-*trans* interesterified and non-interesterified shortenings in cookie production. *ZuckerIndustrie*, 133, 704-709.
37. Sudha ML, Baskaran V, Leelavathi K. 2007. Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making. *Food Chem*, 104, 686-692.
38. Rupasinghe HPV, Wang LX, Pitts NL, Astatkie T. 2009. Baking and sensory characteristics of muffins incorporated with apple skin powder. *J Food Quality*, 32, 685-694.
39. Ayadi MA, Abdelmaksoud W, Ennouri M, Attia H. 2009. Cladodes from *Opuntia ficus indica* as a source of dietary fiber: Effect on dough characteristics and cake making. *Ind Crop Prod*, 30, 40-47.

Yazım Kuralları

GIDA (2009) 34 (1): 55-58

www.gidadernegi.org/ Gıda Dergisi / Yayın kuralları

Makale Gönderimi ve Telif Hakkı Devir Formu

GIDA (2009) 34 (1): 65

www.gidadernegi.org/ Gıda Dergisi / Makale Gönderimi ve Telif Hakkı Devir Formu

Son Kontrol Listesi

GIDA (2009) 34 (1): 66

www.gidadernegi.org/ Gıda Dergisi / Son Kontrol Listesi

adreslerinden erişilebilir. Yazarlar, makale göndermeden önce yazım kurallarını tam olarak okumalı ve makalelerini burada verilen kurallara göre hazırlamalıdır.

EFFECT OF NaCl AND KCl SALTS ON GROWTH AND LACTIC ACID PRODUCTION OF *RHIZOPUS ORYZAE*

Gülsüm Ebru Özer Uyar^{*1}, Başar Uyar²

¹Kocaeli University, Arslanbey Vocational School

²Kocaeli University, Faculty of Engineering, Department of Chemical Engineering

Received / Geliş Tarihi: 22.01.2016

Received in revised form / Düzeltilerek Geliş Tarihi 01.02.2016

Accepted / Kabul Tarihi 13.02.2016

Abstract

Rhizopus group organisms produce a variety of fermented foods and industrial products including enzymes, organic acids, lipid derivatives, pesticides, herbicides, antibiotics. Some strains of *Rhizopus* are good lactic acid producers, with many advantages over lactic acid producing bacteria. Lactic acid has a wide range of application in food processing industry. In this study, growth and lactic acid production of *Rhizopus oryzae* in response to different NaCl and KCl concentrations in the culture were investigated. The growth and lactic acid production depended on the salt concentration, they decreased as the salt concentration increased. The type of salt did not result in significant differences in terms of growth and lactic acid production.

Key Words: *Rhizopus oryzae*, lactic acid, salt

NaCl VE KCl TUZLARININ *RHIZOPUS ORYZAE*'NİN BÜYÜMESİNE VE LAKTİK ASİT ÜRETİMİNE ETKİSİ

Özet

Rhizopus grubu organizmalar enzimler, organik asitler, lipit türevleri, pestisitler, herbisitler ve antibiyotikleri içeren endüstriyel ürünler ile çeşitli fermente gıdaları da üretirler. *Rhizopus*'un bazı suşları laktik asit üreten bakterilere göre daha avantajlı laktik asit üreticisidirler. Laktik asit gıda işleme endüstrisinde geniş bir uygulama alanına sahiptir. Bu çalışmada *Rhizopus oryzae*'nin besiyerindeki farklı NaCl ve KCl derişimlerine cevaben büyüme ve laktik asit üretimi araştırılmıştır. Büyüme ve laktik asit üretimi tuz derişimine bağlıdır, tuz derişimi artıkça azalmışlardır. Tuzun türü büyüme ve laktik asit üretimi açısından kayda değer bir farka neden olmamıştır.

Anahtar kelimeler: *Rhizopus oryzae*, laktik asit, tuz

*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ ebruozeryar@gmail.com,

© (+90) 262 351 3281/141,

☎ (+90) 262 351 3283

INTRODUCTION

Fungi are able to synthesize many materials important to food, drug and chemical industries. *Rhizopus group* is important in the production of fermented food products like bongkrek, khaomak, lao-chao, oncom, tape ketan, tapuy, tauco, tempeh (1, 2). Some properties of *Rhizopus* species make them preferred in food production. They can grow in a wide range of temperature, between 25 and 45 °C (3, 4). Moreover they produce a high number of secondary metabolites with sensorial and nutritional interest like β -carotene, ergosterol, lactic acid (5, 6). Also they can produce anti-fungal and anti-bacterial compounds (7). *R. oryzae* is considered GRAS by the U.S FDA. *R. oryzae* does not produce any mycotoxin (8), even though some of *Rhizopus* species have been reported to produce mycotoxins (9). In fact, *Rhizopus* species can be used as a detoxifying agent against food toxins, like Ochratoxin A (10) and on the other hand, to increase the digestibility of certain legumes (11).

R. oryzae was first described in 1936 as a lactic acid producer. Lactic acid is a naturally occurring multifunctional organic acid. It is found in many food products, mainly in fermented food items. It is used in a wide range of food processes from soda to sausages production and in non-food industrial applications because it preserves, enhances flavour or imparts desired acidity (6).

In the literature, there are studies on the effect of oxygen rate, pH of medium, CaCO_3 addition, inoculum size, concentration of nitrogen source, agitation speed and aeration rate on the morphology and lactic acid production. Indeed morphology and lactic acid production of *R. oryzae* are interdependent, since the growing mycelia causes highly viscous broth and a dramatic decrease in oxygen and mass transfer rate. Therefore, controlling mycelia morphology is important in order to get higher production rates (12, 13).

In this study, the effect of salt type and concentration on the growth and lactic acid production of *R. oryzae* was investigated. To the best of our knowledge, there are currently no reports in the literature published on the relationship between salt and growth in *R. oryzae*. Throughout the study, macroscopic and microscopic images of mycelia were examined in addition to dry we-

ight determination and lactic acid production to define the growth characteristics and product formation.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism and growth conditions

R. oryzae (ATCC 9363) was used in this study. It was sporulated on streaked agar plates containing Potato Dextrose Agar for 4-5 days at 30 °C. After sporulation, the plates were stored at 4 °C until preparation of spore suspension. For fermentation study, agar plates containing sporulated fungus were washed by sterile water to obtain spore suspension. For each inoculation, spore concentration in the suspension was determined by counting the spores on hemocytometer. *R. oryzae* was inoculated into the liquid media composed of (all w/v) 2% glucose, 0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.065% KH_2PO_4 ; 0.025% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 0.005% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and then the cultures were incubated in shaker- incubator at 35 °C and 150 rpm.

R. oryzae secretes significant amounts of lactic acid to the growth media, which leads to the decrease in pH down to 2.0–2.3 after 24 h. Hence, 1% CaCO_3 was also added to the cultures to neutralize the secreted lactic acid; buffering capacity of CaCO_3 is sufficient to keep pH between 6.1–6.5 in the cultures.

In order to examine the effect of salts on the growth of *R. oryzae*, salt ((w/v) 4%; 2%; 1%; 0.5% of NaCl and (w/v) 4%; 2%; 1%; 0.5% of KCl) were added to the growth media.

250 ml-Erlenmeyer flasks containing 100 ml of medium were used. The cultures were inoculated with 10^5 spores/ml. Fermentation duration was six days, glucose was totally consumed in the cultures by then.

Analytical methods

Glucose and lactic acid concentration was determined by HPLC. The HPLC method is based on a normal chromatography procedure, using Phenoemex (California, USA), Rezex Cal organic acid column column size of which is 300x7.8 mm. and a refractive index detector. Eluent was 5 mM H_2SO_4 flowing at 0.6 ml/min. The volume of injection for both standard solutions and sample extracts was 20 μl .

The morphology was characterized by macro- and microimaging. For macro imaging, a generic digital camera was used. For micro imaging, a digital microscope imager (Celestron, CA, USA), mounted on a light microscope (Bresser, Germany) was used to capture the images.

Dry weight measurements

Mycelia were harvested by filtering the media, washed with distilled water, filtered again, dried in pre-weighed aluminum folia for 24 hours at 90 °C, and finally were weighed to obtain the dry weights.

The student's t-test was used for statistical analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Physiological conditions of media like pH, type of carbon and nitrogen source and their amounts, minerals, size of inoculum are well known to have great influence on morphology of *R. oryzae* (12, 14). Besides these conditions, salt effect on the morphology and growth should be determined. Therefore, a study was conducted which included two types of salts (NaCl and KCl) with different concentrations.

A salt-free control flask and NaCl containing flasks were inoculated and incubated in shaker incubator. As shown in Figure 1a, the macroscopic appearances of the mycelial growth can be defined as non-uniform size pellet in cultures containing 0.5 and 1% NaCl, pellet in culture containing 2% NaCl, uniform size pellet in culture containing 4% NaCl, and congealed mass in the control culture. Biomass dry weights obtained were 65, 50, 26, 8 and 3 mg/L for 0%, 0.5%, 1%, 2% and 4% NaCl containing cultures, respectively (Figure 2).

Tarı *et al.* (2011) reported the effects of the different concentrations of Mg^{2+} and Zn^{2+} salts on the morphology of *R. oryzae*, small clumps became fluffy pellets with mycelium in response to an increase of Mg^{2+} concentration, changing Zn^{2+} concentrations in growth media did not cause any difference (15). In the literature there are many studies on the physiological responses of yeasts (especially *S. cerevisiae*) to salt stress (16). However, the available researches on molds focus on the molecular mechanisms and morphological changes in halotolerant/ halophilic/ xerophilic strains (17, 18).

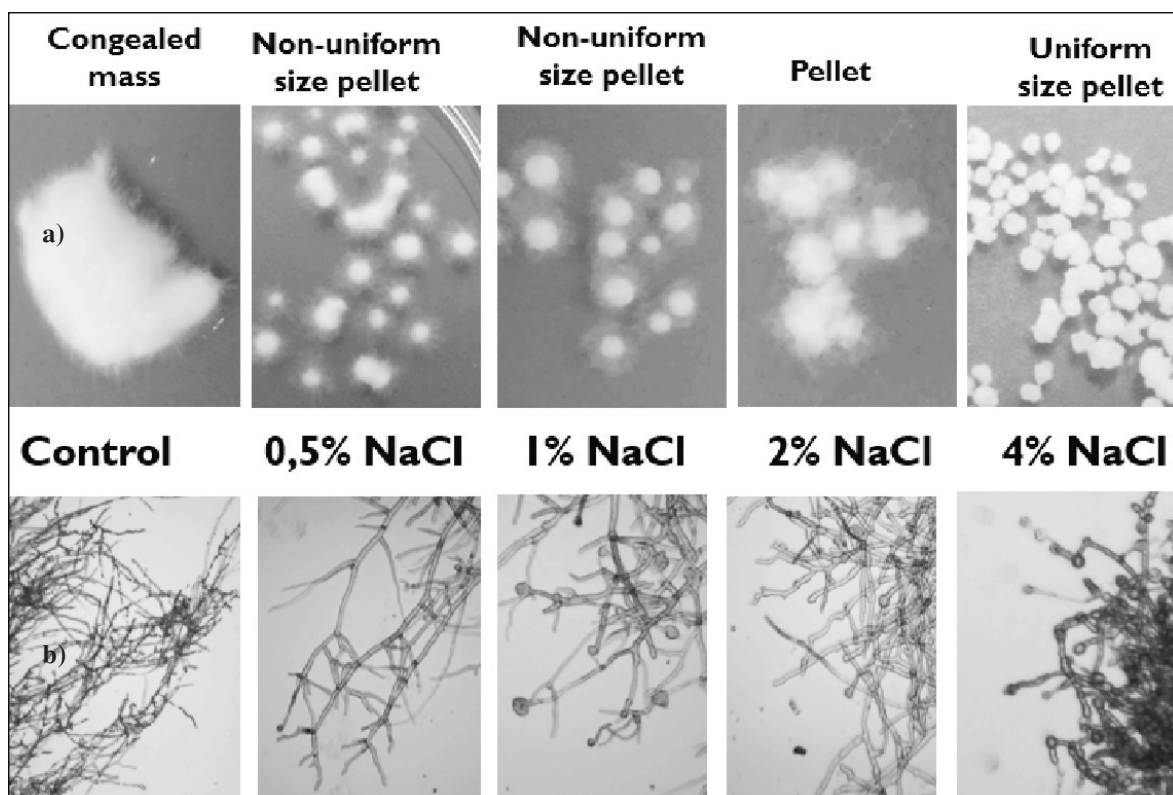


Figure 1. The morphological differences in *R. oryzae* at different NaCl concentrations. a) macroscopic appearances, b) microscopic appearances.

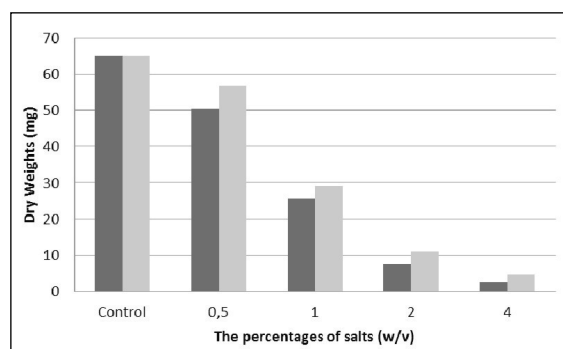


Figure 2. The effect of different NaCl (Black bars) and KCl (Gray bars) percentages on growth of *R. oryzae*.

In the case of KCl containing media, after the inoculation and incubation, the macroscopic appearances of the mycelial growth can be defined as non-uniform size pellet in cultures containing 0.5 and 1% KCl, dispersed in culture containing 2% KCl, pellet in culture containing 4% KCl, and congealed mass in the control culture (Figure 3a). Biomass dry weights obtained were 65, 57, 29, 11 and 5 mg/L for 0%, 0.5%, 1%, 2% and 4% KCl containing cultures, respectively (Figure 2).

The microscopic appearances (i.e. number of tips, hyphal length) were comparable and did

not differentiate in both NaCl and KCl containing cultures (Figure 1b and 3b).

According to these results, it can be suggested that the type of the salt used (NaCl/KCl) did not result in significant differences ($P>0.05$) in the final mycelia dry weights, however the salt concentration affected the biomass dry weights considerably. The effect may be attributed to the increase in the osmotic stress by the increasing salt concentration (19).

After the discovery of *R. oryzae* being a producer of optically pure L(+) lactic acid, many studies were made to understand its lactic acid production mechanism and the conditions affecting the production rate of lactic acid (20-24).

In our study it was found that the lactic acid production depended on the salt concentration, not on the type of the salt (Figure 4). The lactic acid production was in the same range up to 1% salt concentration, after which it decreased as the salt concentration increased, for both salt types studied, most possibly due to the repressive effect of salts on the growth and lactic acid formation.

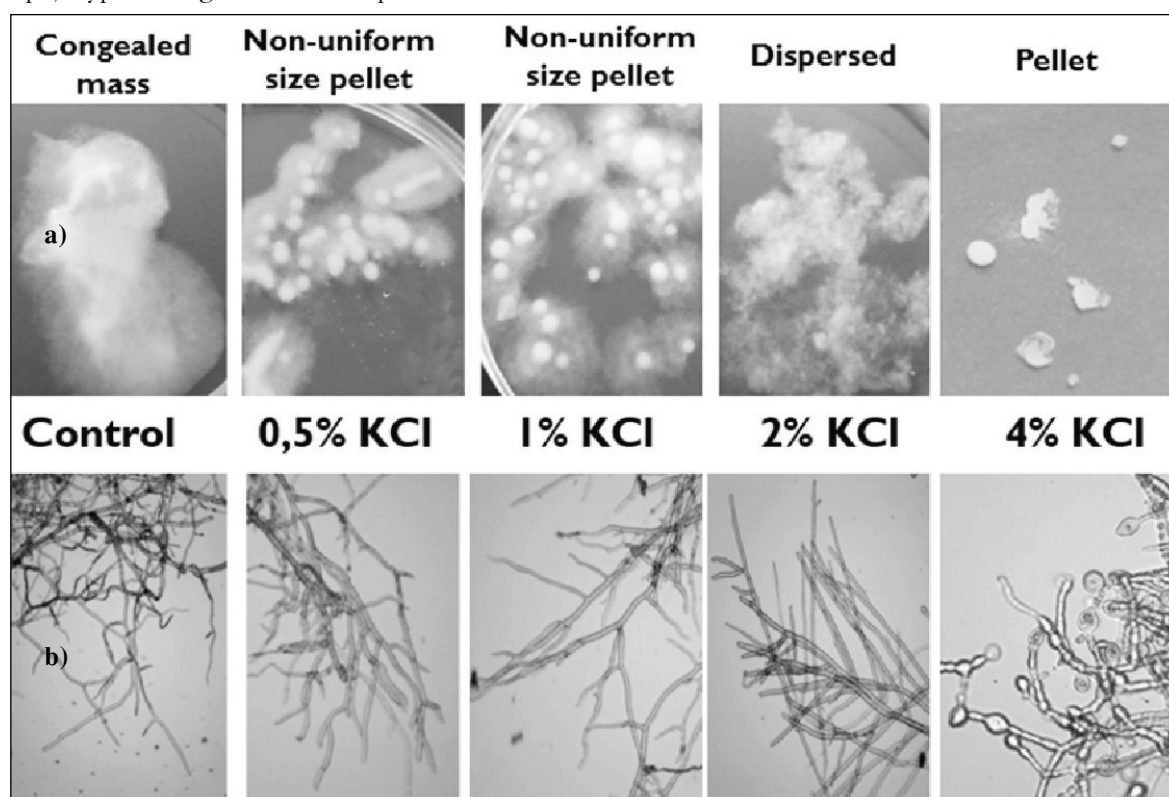


Figure 3. The morphological differences in *R. oryzae* grown at different KCl concentrations. a) macroscopic appearances, b) microscopic appearances.

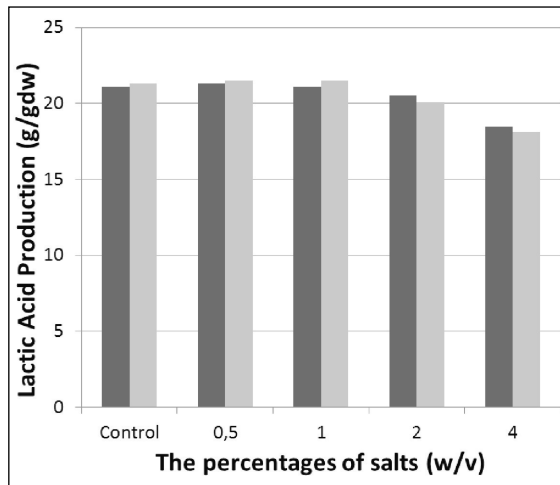


Figure 4. The effect of different NaCl (Black bars) and KCl (Gray bars) concentrations on the lactic acid production by *R. oryzae*.

REFERENCES

- Caplice E, and Fitzgerald GF. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int J Food Microbiol*, 50: 131-149.
- Blandino A, Al-Aseeri ME, Pandiella SS, Cantero D, Webb C. 2003. Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Res Int*, 36: 527-543.
- Kader AA. 2011. *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. 3rd Edition, University of California Division of Agriculture and Natural Resources, Richmond, California, USA. 535 p.
- Sparringa RA, Kendall M, Westby A, Owens JA. 2002. Effects of temperature, pH, water activity and CO₂ concentration on growth of *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710. *J Appl Microbiol*, 92: 329-337.
- Denter J, Rehm HJ, Bisping B. 1998. Changes in the contents of fat-soluble vitamins and provitamins during tempe fermentation. *Int J Food Microbiol*, 45: 129-134.
- Zhou Y, Dom nguez JM, Cao N, Du J, Tsao GT. 1999. Optimization of L-Lactic acid production from glucose by *Rhizopus oryzae* ATCC 52311. *Appl Biochem Biotechnol*, 77-79: 401-407.
- Babu PD, Bhakyaraj R, Vildhyalakshmi R. 2009. A low cost nutritious food "tempeh" – A review., *World J Dairy Food Sci*, 4: 22-27.
- Cantabrana I, Perise R, Hernandez I. 2015. Uses of *Rhizopus oryzae* in the kitchen. *Int J Gastronomy Food Sci*, 2: 103-111.
- Jennessen J, Nielsen KF, Houbraken J, Lyhne EK, Schnürer J, Frisvad JC, Samson RA. 2005. Secondary metabolite and mycotoxin production by the *Rhizopus microsporus* group. *J Agric Food Chem*, 53: 1833-1840.
- Varga J, Péteri Z, Tábori K, Téren J, Vágvölgyi C. 2005. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins. *Int J Food Microbiol*, 99: 321-328.
- Azeke MA, Fretzdorff B, Buening-Pfaue H, Betsche T. 2007. Comparative effect of boiling and solid substrate fermentation using the tempeh fungus (*Rhizopus oligosporus*) on the flatulence potential of African yambean (*Sphenostylis stenocarpa* L.) seeds. *Food Chem*, 103: 1420-1425.
- Bai DM, Jia MZ, Zhao XM, Ban R, Shen F, Li XG, Xu SM. 2003. L (+)-lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* R1021 in a stirred tank fermentor. *Chem Eng Sci*, 58: 785-791.
- Byrne GS, Ward OP. 1989. Effect of nutrition on pellet formation by *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnol Bioeng*, 33: 912-914.
- Fu YQ, Yin LF, Zhu HY, Jiang R, Li S, Xu Q. 2014. Effects of pellet characteristics on L-Lactic acid fermentation by *R. oryzae*: Pellet morphology, diameter, density, and interior structure. *Appl Biochem Biotechnol*, 174: 2019-2030.
- Tarı C, Özkan K, Oncu Ş, Avcı T. 2011. The relationship of pellet morphology to polygalacturonase production of *Rhizopus oryzae* in various media compositions. *Gıda*, 36 (1): 25-31.
- Blomberg A. 2000. Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. *FEMS Microbiol Lett*, 182: 1-8
- Kuncic MK, Kogej T, Drobne D, Gunde-Cimerman N. 2010. Morphological response of the halophilic fungal genus *Wallemia* to high salinity. *Appl Environ Microbiol*, 76 (1): 329-337.
- Plemenitas A, Lenassi M, Konte T, Kejzar A, Zajc J, Gostincar C, Gunde-Cimerman N. 2014. Adaptation to high salt concentrations in halotolerant/halophilic fungi: a molecular perspective. *Front Microbiol*, 5: 1-12.
- Uyar EO, Hamamcı H, Turkel S. 2010. Effect of different stresses on trehalose levels in *Rhizopus oryzae*. *J Basic Microbiol*, 50: 368-372.

20. Bulut S, Elibol M, Ozer D. 2004. Effect of different carbon sources on L(+) -lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochem Eng J*, 2: 33-37
21. Büyükkileci AO, Hamamcı H, Yücel M. 2006. Lactate and ethanol productions by *Rhizopus oryzae* ATCC 9363 and activities of related pyruvate branch point enzymes. *J Biosci Bioeng*, 102: 464-466.
22. Skory CD, Freer SN, Bothast RJ. 1998. Production of L-lactic acid by *Rhizopus oryzae* under oxygen limiting conditions. *Biotechnol Lett*, 20: 191-194.
23. Yin P, Nishina N, Kosakai Y, Yahiro K, Park Y, Okabe M. 1997. Enhanced production of L(+)-Lactic acid from corn starch in a culture of *Rhizopus oryzae* using an air-lift bioreactor. *J Ferment Bioeng*, 84: 249-253.
24. Wu X, Jiang S, Liu M, Pan L, Zheng Z, Luo S. 2011. Production of L-lactic acid by *Rhizopus oryzae* using semicontinuous fermentation in bioreactor. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 38:565-571.

PRODUCTION OF FERMENTED RED BEET JUICE POWDER BY USING SPRAY AND DRUM DRIER

Gamze Kaya, Taner Baysal

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

Received / Geliş Tarihi: 27.01.2016

Accepted / Kabul Tarihi 12.03.2016

Abstract

In this study, red beet juice (RBJ) was produced by lacto-fermented method in order to facilitate preservation and enhance the flavor of beet juice. RBJ was inoculated with *Lactobacillus plantarum* L2-1 and incubated at 30 °C for 72 hours. The viable cell counts of *L. plantarum* culture reached 1.3×10^8 CFU/ml after fermentation. Quality characteristics such as pH, titratable acidity, total soluble solids, total sugar, invert sugar, sucrose content and color of fermented RBJ were determined. In order to extend the shelf life of product, the powder of RBJ was produced by using a spray and drum dryer. The effects of maltodextrins with different dextrose equivalent (25% and 50%) were evaluated during drying process. Then, the total dry matter, particle size, and bulk density were analyzed to determine the quality of powder product. According to sensory analysis of reconstituted products, powder product which was produced with drum dryer was most preferred product than other products.

Keywords: Red beet juice, lacto-fermented method, red beet juice powder, drying

FERMENTE PANCAR SUYU TOZUNUN PÜSKÜRTMELİ VE VALSLİ KURUTUCU İLE ÜRETİMİ

Özet

Bu çalışmada, pancar suyunun lezzetini artırmak ve muhafazasını kolaylaştırmak için laktoferment yöntemi ile pancar suyu üretilmiştir. Pancar suyuna *Lactobacillus plantarum* L2-1 ile inoküle edilmiş ve 30 °C'de 72 saat inkübe edilmiştir. Fermantasyondan sonra *L. plantarum* sayısı 1.3×10^8 KOB/ml olarak belirlenmiştir. Fermente pancar suyunun pH, titrasyon asitliği, suda çözünür kuru madde, toplam şeker, invert şeker, sakkaroz içeriği ve renk gibi kalite özellikleri analiz edilmiştir. Ürünün raf ömrünü artırmak amacıyla püskürtmeli ve valslı kurutucu kullanılarak pancar tozu üretilmiştir. Ayrıca, kurutma işlemi sırasında farklı dekstroz eşdeğerliğine sahip (%25 ve %50) maltodekstrinlerin etkisi araştırılmıştır. Daha sonra toz ürünün kalite özelliklerini belirlemek amacıyla toplam kuru madde, partikül boyutu ve yığın yoğunluğu analizleri yapılmıştır. Toz ürünlerin sulandırılması ile elde edilen ürünlerin duyu analizi sonuçlarına göre, valslı kurutucu ile üretilen ürün diğerlerinden daha fazla beğenilmiştir.

Anahtar kelimeler: Pancar suyu, laktoferment yöntemi, pancar suyu tozu, kurutma

* Corresponding author /Yazışmalardan sorumlu yazar;

✉ tanbay@hotmail.com, ☎ (+90) 232 311 3043,

☎ (+90) 232 342 7592

INTRODUCTION

Red beet (*Beta vulgaris*) is a traditional and popular vegetable in many parts of the world (1). It contains 87.3% moisture, 1.6% protein, 9.1% carbohydrates, 0.8% fiber, 0.1% fat, and 1.1% ash. Red beet is generally processed before consumption which influences the stability of betalains in turn which affects the acceptability and health properties. Betalain pigment mixtures can be used as a natural additive for food, drugs and cosmetic products in the form of beet juice concentrate or beet powder (2). Intense red-colored beets are most popular for consumption, both cooked and raw as salads or juice. In order to improve the red color of tomato pastes, sauces, soups, desserts, jams, jellies, breakfast cereals, the powder of red beet is used industrially (3). The use of betalains as food colorant is approved by European Union and betalains are labeled as E-162 (2).

Fermentation is one of the oldest methods of food preservation, which extend the shelf life of product and also improves the nutritional value (4, 5). It is difficult to preserve vegetable juices because of low acidity and high concentration of spoilage and spore-forming bacteria. Therefore, vegetable juice can be offered fermented. Production of fermented vegetable juices cannot be realized without microorganisms. Fermentation may be spontaneous by using the red beet's own lactic acid bacteria or may be controlled using a starter culture. Lactic acid bacteria are used as starter cultures (lactofermentation) (6).

Lactic acid fermentation of vegetables is widely practiced technology which improves flavour, healthy effects, and safety (7, 8). Consumption of lactic acid fermented vegetable juices has increased worldwide. These juices are mainly produced from cabbage, red beets, carrots, celery, and tomatoes, and may be called "new functional foods" (8).

Red beet is mainly consumed as lactofermented juice, as pickled preserves or as a cooked vegetable. To the best of our knowledge, no data on the production of lactofermented RBJ and powder and the effects of maltodextrins with different dextrose equivalent on drying of red beet juice have been reported in the literature. The main objective of this study is to carry out

production of lactofermented RBJ and produce the powder of RBJ by using a spray and drum dryer in order to minimize transportation, storage costs, microbial spoilage and deterioration by chemical reactions. Also, quality characteristics of lactofermented RBJ and powder products were determined after production.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Red beets (*Beta vulgaris*) were purchased from local market in Izmir, Turkey. Red beets were stored in a refrigerator at +4 °C and 85-90% humidity before processing. *Lactobacillus plantarum* L2-1 (Labor Wiesby, Germany) was used in the study. Freeze-dried (lyophilized) cultures were stored at -18 °C until used. The inoculum was prepared by growing the culture at 30 °C for 24 h in MRS broth (Merck, Germany). Viable cell counts (CFU/ml) of the inoculum were determined by the standard plate method with MRS medium after 48 h of incubation at 30 °C.

Methods

Processing methods

Fermented beet juice production

Red beets were washed and peeled by peeling machine. RBJ was obtained with Moulinex (JU5000-800 W) juice extractor. Raw RBJ was heated for 5 min at 90 °C. After heating, the beet juice was cooled to 30 °C for inoculation with lactic culture. *L. plantarum* L2-1 was used as a starter culture to produce fermented RBJ after being sub-cultured in MRS broth. Lyophilized culture was dissolved in saltwater solution for activation. Then, raw RBJ was inoculated with activated culture at 30 °C. At the end of the fermentation period (72 h at 30 °C), fermented RBJ was subjected to pasteurisation at 90 °C for 5 min and cooled to 25 °C (Figure 1).

Red beet ⇒ Washing and peeling ⇒ Beet juice extraction ⇒ Raw beet juice ⇒ Heating (90 °C, 5 min) ⇒ Cooling ⇒ Inoculation (*Lactobacillus plantarum*) ⇒ (30 °C, 72 h, pH 3.8-4.2) ⇒ Fermented beet juice
Figure 1. Fermented beet juice production

Powder Production

FBJ powders were produced by spray and drum dryer. Firstly, 50% maltodextrin-containing product produced with drum dryer. Then, 50% and 25% maltodextrin-containing product produced with spray dryer. Drying conditions in spray dryer were at inlet temperature of 180 °C, outlet temperature of 100 °C and flow rate of 10 ml/min. The working parameters of drum dryer were 3 bar pressure and 2.5 min/cycle speed of rotation.

Methods of analysis**pH and total acidity**

pH was determined using a pH meter (Inolab WTW, Weilheim, Germany). Total acidity was measured by titrating sample up to pH 8.1 with 0.1 N NaOH using digital pH meter (Inolab) and results were expressed as g/100 mL with reference to lactic acid (9).

Color

Color of RBJ and powders were measured by using the Hunter-Lab Colorflex (CFLX 45-2 Model Colorimeter; HunterLab, Reston, VA) based on three color coordinates, namely L^* , a^* and b^* . The cylindrical quartz cell containing the sample was placed directly into the colorimeter, and post processing L^* , a^* and b^* values were recorded. The L^* (lightness: $L^*=0$ for black, $L^*=100$ for white), a^* (redness-greenness: $a^*<0$ for green, $a^*>0$ for red) and b^* (yellowness-blueness: $b^*<0$ for blue, $b^*>0$ for yellow) indexes of the CIELAB (Commission Internationale de l'éclairage, L^* , a^* , b^*) colorimetric system were used to evaluate the color.

Total soluble matter

Total soluble matter (°Brix) of juice was determined by an automatic digital refractometer at 20 °C (Krüss DR 201, Germany) (10).

Total dry matter

Total dry matter of fermented beet juice powders was determined by infrared moisture measurement device (Shimadzu MOC-63U) at 105 °C.

Physical analysis of powders

Particle size and bulk density were analyzed to determine the quality of powder product (11).

Analysis of carbohydrates

Total sugar, invert sugar, and sucrose content were determined by Lane Eynon Method (9).

Viable cell counts

Viable cell counts (CFU/ml) were determined by the standard plate method with Lactobacilli MRS medium after 48 h of incubation at 30 °C (9).

Sensory evaluation

Samples were given to ten panelists, and they were asked to rank the samples based on their preferences for taste, color and smell. The sample score sheet consisted of 5 scores (from 1:dislike to 5:like) (12).

Statistical analysis

The mean values and standard deviations were calculated by Excel (Microsoft Corp., USA). The results were submitted to ANOVA and Duncan test to evaluate differences between treatments using SPSS 15 (SPSS Inc., Chicago, USA); and significance level was set at $P < 0.05$. Statistically significant differences were compared with treatment groups. Each experiment was repeated 3 times.

RESULTS AND DISCUSSION

The red beet juice and powders were produced and changes on quality characteristics such as pH, total soluble solids, color, titratable acidity were determined. Also, bulk density, particle size, total dry matter was analyzed for powder products.

Fermentation is carried out spontaneously using microorganisms in vegetables or by the addition of starter culture (13). During fermentation, pH decreases and lactic acid increases in vegetable juices reported in literature (Table 1).

In this study, it was determined that the viable cell counts of *L. plantarum* culture reached 1.3×10^8 CFU/ml after 72 h of fermentation at 30 °C. Similarly, Huang et al. (2005) found that lactic acid bacteria of red beet juice fermented at 30 °C for 72 h was 9.2×10^8 CFU/ml (14).

Table 1. pH of some vegetables after fermentation

Food	Starter culture	pH after fermentation	References
Carrot	<i>L. plantarum</i>	pH 3.81 (32 °C 19 h)	Gökmen and Acar,1992
	<i>L. xylosum</i>	pH 4.96 (32 °C 19 h)	
	<i>L. delbrueck</i>	pH 3.82 (40 °C 19 h)	
Cucumber	<i>L. plantarum</i>	pH 3.82 (35 °C 12 h)	Kurtar, 1998
Beet	<i>L. plantarum</i>	pH 4.2 (30 °C 48 h)	Yoon et al. 2004
Cabbage	<i>L. plantarum</i>	pH 3.6 (30 °C 72 h)	Yoon et al. 2005
	<i>L. casei</i>	pH 3.4 (30 °C 72 h)	

Total sugar, invert sugar, and sucrose content of fermented red beet juice decreased during fermentation (Table 2). It means that *L. plantarum* consumed the sugar and decreased the lactic acid concentration in culture medium. In parallel to our results, Kurtar (1998) reported that total sugar content of lactofermented vegetable juice decreased from 3.84 g/100 ml to 1.66 g/100 ml after fermentation (15). Also, invert sugar content decreased from 3.1 g/100 ml to 1.64 g/100 ml. Özler and Kılıç (1996) found that invert sugar content of turnip juice decreased to 0.2-0.4 g/100 ml at the end of fermentation (16). In addition, Öztürk (2009) indicated that sucrose content of turnip juice decreased to 1.14 g/100 ml (17).

Table 3 presents the change in physical and chemical parameters of fermented beet juice and reconstituted products. The pH of fermented red beet juice was found to be 4.15. The pH of fermented red beet powders were higher than red beet juice ($P<0.05$), with values ranging from 4.32 to 4.42. Several previous studies stated a significant decrease in pH values after fermentation. Huang et al. (2005) found that pH of red beet juice was 6.3 and it decreased to 4.2 after fermentation (14).

During fermentation, the lowering of pH was most probably because of accumulation of organic acids, mainly lactic acid (18-20). The increase in concentration of lactic acid was because of bioconversion of starch to sugar and finally to

lactic acid, which resulted in further decrease in starch and sugar concentration in the fermented medium (6, 21-22). Yoon et al. (2006) reported a similar increase in lactic acid concentration and simultaneous decrease in pH during production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria (19). The titratable acidity of fermented RBJ was 0.55 g/100 ml, and acidity of reconstituted powders were changed between 0.17-0.22 ($P<0.05$). Similar results were obtained by Huang et al. (2005) in red beet juice fermentation (14). They reported that that acidity of red beet juice fermented by *L. plantarum* increased from 0.13 g/100 ml to 0.56 g/100 ml after 72-h fermentation. Furthermore, Kurtar (1998) found that acidity of fermented cucumber increased from 0.14 g/100 ml to 0.52 g/100 ml (15).

The total soluble solids of RBJ and fermented RBJ were found to be 7.3 and 6.5, respectively. This is due to the bioconversion of sugars to lactic acid. Gökmen and Acar (1992) reported that total soluble solid content of carrot juice fermented by *L. plantarum* decreased from 8.5% to 7.35% (23). The L* value of RBJ and fermented RBJ were found to be 0.72 and 4.04, respectively. The L* value of red beet juice increased after fermentation. This might be attributed to the decrease in turbidity of lactofermented red-beet juice. Similarly, Rodrigues et al. (2011) observed that L* value of apple juice increased during fermentation (24). The a* value of RBJ and fermented RBJ were found to be 3.93

Table 2. Total sugar, invert sugar, and sucrose content of fermented red beet juice

Analysis	Days		
	0	2	4
Total sugar	4.42±0.2 ^c	3.60±0.3 ^b	3.14±0.3 ^a
Invert sugar	0.95±0.1 ^c	0.47±0.1 ^b	0.30±0.2 ^a
Sucrose	3.47±0.1 ^c	3.13±0.2 ^b	2.85±0.1 ^a

^{a,b,c}Different letters within rows are significantly different ($P<0.05$)

and 18.58, respectively. Increase in a* value after fermentation might be due to the cell disruption and intracellular components passed through the water. Similarly, Gobetti et al. (2009) found that a* value of tomato juice increased during fermentation (25).

determined. The results indicated that pH, total sugar, invert sugar, sucrose, total soluble solid content of red beet juice decreased after fermentation. Fermentation improved the color of red beet juice. Juice powders have many benefits and economic potentials over their liquid counterparts

Table 3. Physical and chemical parameters of fermented beet juice and reconstituted products

Analysis	Fermented beet juice	Reconstituted product (%25 MD, spray dryer)	Reconstituted product (%50 MD, spray dryer)	Reconstituted product (%50 MD, drum dryer)
pH	4.15 ^a	4.32 ^b	4.33 ^b	4.42 ^c
Total soluble solids (°Brix)	6.5 ^a	6.1 ^b	6.1 ^b	6.1 ^b
L*	4.04 ^a	0.21 ^b	0.39 ^c	2.88 ^d
a*	18.58 ^a	0.82 ^b	1.92 ^c	11.96 ^d
b*	4.32 ^a	0.17 ^b	0.47 ^c	2.54 ^d
Titrate acidity (g/100 mL)	0.55 ^a	0.22 ^b	0.19 ^c	0.17 ^d

^{a10c}Different letters within rows are significantly different ($P<0.05$)

As shown in Table 4, bulk density of powder products were changed between 0.33-0.83. There were significant differences evaluated between powder products ($P<0.05$). Powder product produced by drum dryer and containing 50% maltodextrin had the lowest particle size value.

Sensory analysis of fermented RBJ and reconstituted products are presented in Table 5. According to results of analysis, panelists gave the highest score to fermented RBJ. In addition, powder product which was produced with drum dryer was most preferred product than other powder products.

Conclusion

In this study, red beet juice (RBJ) was produced by lacto-fermented method with *Lactobacillus plantarum* L2-1 and quality characteristics were

such as reduced volume or weight, reduced packaging, easier handling and transportation, and much longer shelf life. Powder products were obtained by drum and spray dryer. Powder product including 50% maltodextrin produced by drum dryer has the lowest particle size and also it was most preferred by panelists compared to the others.

Acknowledgement

This research was supported by the Scientific Research Project of Ege University (BAP) (Project No: 12 MUH 063). The authors wish to thank to Özge Taştan for her valuable contributions during the study.

Table 4. Some properties of lactofermented red-beet juice powders

Analysis	Powder product containing %25 MD (spray dryer)	Powder product containing %50 MD (spray dryer)	Powder product containing %50 MD (drum dryer)
Bulk density	0.59 ^a	0.33 ^b	0.83 ^c
Particle size	300 ^a	333 ^b	229 ^c
Total dry matter	94.03 ^a	92.16 ^b	94.28 ^c

^{a10c}Different letters within rows are significantly different ($P<0.05$)

Table 5. Sensory analysis of fermented red-beet juice and reconstituted products

Product	Taste	Color	Smell	Total effect
Fermented red-beet juice	3.6	4.4	3.8	4.4
Powder product containing %25 MD (spray dryer)	2.4	3.2	2.6	3.2
Powder product containing %50 MD (spray dryer)	2.6	3.6	2.6	3
Powder product containing %50 MD (drum dryer)	3	3	3.4	3.8

REFERENCES

1. Latorre ME, Bonelli PR, Rojas AM, Gerschenson LN. 2012. Microwave inactivation of red beet (*Beta vulgaris* L. var. *conditiva*) peroxidase and polyphenoloxidase and the effect of radiation on vegetable tissue quality. *J Food Eng*, 109: 676-684.
2. Ravichandran K, Saw NMMT, Mohdaly AAA, Gabr AMM, Kastell A, Riedel H, Cai Z, Knorr D, Smetanska I. 2013. Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity. *Food Res Int*, 50: 670-675.
3. Gokhale SV, Lele SS. 2012. Optimization of convective dehydration of beta vulgaris for color retention. *Food Bioprocess Technol*, 5:868-878.
4. Tangüler H. 2010. Determining of lactic acid bacteria involved in shalgam production and development of shalgam production techniques, Doctorate thesis, Çukurova University, Adana.
5. Marsh AJ, Hill C, Ross RP, Cotter PD. 2014. Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. *Trends in Food Sci & Technol*, 38: 113-124.
6. Demir N, Bahçeci KS, Acar J. 2006. The effects of different initial *Lactobacillus plantarum* concentrations on some properties of fermented carrot juice. *J Food Processing and Preservation*, 30: 352-363.
7. Panda SH, Naskar SK, Sivakumar PS, Ray RC. 2009. Lactic acid fermentation of anthocyanin-rich sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) into lacto-juice. *Int J Food Sci and Technol*, 44: 288-296.
8. Semjonovs P, Shakizova L, Denina I, Kozlinskis E, Unite D. 2014. Development of a fructan-supplemented synbiotic cabbage juice beverage fermented by *Bifidobacterium lactis* Bb12. *Res J Microbiol*, 9 (3): 129-141.
9. Cemeroglu B. 2010. Gıda Analizleri, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, 34, Ankara.
10. [AOAC] Assoc. of Official Analytical Chemists. 1995. Official methods of analysis of AOAC International, 16th ed. Arlington, Va.: Assoc. of Official Analytical Chemists.
11. Walton DE. 2000. The Morphology Of Spray Dried Particles a Qualitative View. *Drying Technol*, 18 (9):1943-1986.
12. Altug T. 1993. Duyusal Test Teknikleri, E.Ü. Mühendislik Fakültesi Ders Kitapları, 28, İzmir, 56 s.
13. Çakır P. 2011. Determination of the composition of Shalgam and eligibility of Food Legislation, Master's thesis, Namık Kemal University, Tekirdağ.
14. Hang YD, Yoon KY, Woodams EE. 2005. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 38:73-75.
15. Kurtar N. 1998. Fermented vegetable juice production with Lactic Acid Fermentation, Master's thesis, Mersin University, Mersin.
16. Özler N, Kılıç O. 1996. Studies on the production of Shalgam. *GIDA*, 21(5):323-330.
17. Öztürk O. 2009. Adana piyasasındaki şalgam sularının bileşimi üzerine bir araştırma, Master's thesis, Çukurova University, Adana.
18. Gardner NJ, Savard T, Obermeier P, Caldwell G, Champagne CP. 2001. Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. *Int J Food Microbiol*, 64: 261-275.
19. Yoon KY, Woodams EE, Hang YD. 2006. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresource Technol*, 97: 1427-1430.
20. Panda SH, Parmanick M, Ray RC. 2007. Lactic acid fermentation of sweet potato into pickles. *J Food Processing and Preservation*, 31: 83-101.
21. Rakin M, Vukasinovic M, Siler-Marinkovic S, Maksimovic M. 2007. Contribution of lactic acid fermentation to improved nutritive quality vegetable juices enriched with brewer's yeast autolysate. *Food Chem*, 100: 599-602.
22. Tamang JP, Tamang B, Schillinger U, Franz CMAP, Gores M, Holzapfel WH. 2005. Identification of predominant lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented vegetable products of the Eastern Himalayas. *Int J Food Microbiol*, 105: 347-356.
23. Gökmen V, Acar J. 1992. Laktoferment yöntemi ile havuç suyu üretimi. *GIDA*, 17(6):395-398.
24. Rodrigues S, Pereira ALF, Maciel TC. 2011. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Res Int*, 44:1276-1283.
25. Gobbetti M, Di Cagno R, Surico RF, Paradiso A, De Angelis M, Salmon JC. 2009. Effect of autochthonous lactic acid bacteria starters on health-promoting and sensory properties of tomato juices. *Int J Food Microbiol*, 128:473-483.

ENRICHMENT OF FUNCTIONAL PROPERTIES OF WHITE CHOCOLATES WITH CORNELIAN CHERRY, SPINACH AND POLLEN POWDERS

İnci Cerit, Sara Şenkaya, Berna Tulukoğlu, Merve Kurtuluş,
Ü. Rida Seçilmişoğlu, Omca Demirkol*

Department of Food Engineering, Sakarya University, Esentepe / Sakarya, Turkey

Received / Geliş Tarihi: 24.02.2016

Received in revised form / Düzeltilerek Geliş Tarihi 24.03.2016

Accepted / Kabul Tarihi 29.03.2016

Abstract

Nowadays, there is an increasing demand to reduce the chemical additives and enrich the functional properties of food with using natural ingredients such as fruit and vegetables. In this study, the objective was to determine the influence of addition of cornelian cherry, spinach and bee pollen powders on the total phenolic content and antioxidant capacity of white chocolate. The Folin-Ciocalteu reagent was used to evaluate the total phenolic content and the antioxidant capacity of samples was measured by two different assays which were DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) scavenging activity and FRAP (ferric reducing antioxidant power) tests. The obtained results showed that plain white chocolate exhibited no phenolic compound. In addition, antioxidant activity of white chocolate was found so low. However, the addition of cornelian cherry and spinach to chocolates enhanced the total phenolic content and antioxidant capacity and contribution of pollen powder to functional property of white chocolate was found as highest among all powders used.

Keywords: White chocolate, antioxidant capacity, cornelian cherry, spinach, pollen.

KIZILCIK, İSPANAK VE POLEN TOZLARI KULLANILARAK BEYAZ ÇİKOLATALARIN FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN ZENGİNLEŞTİRİLMESİ

Özet

Günümüzde, meyve ve sebzeler gibi doğal bileşenler kullanılarak gıdaların fonksiyonel özelliklerinin zenginleştirilmesi ve kimyasal katkıların azaltılmasına gösterilen talep artmaktadır. Bu çalışmada amaç, beyaz çikolataya eklenen kıvılcık, ıspanak ve arı poleni tozlarının toplam fenolik madde ve antioksidan kapasiteye etkisini belirlemektir. Örneklerin toplam fenolik maddesini belirlemek için Folin-Ciocalteu reaktifi, antioksidan kapasitesini belirlemek için ise DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) süpürme aktivitesi ve FRAP (demir indirgeme antioksidan gücü) testleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar sade beyaz çikolatada fenolik madde bulunmadığını göstermiştir. Ayrıca, beyaz çikolatanın antioksidan aktivitesi de çok düşük bulunmuştur. Ancak, çikolatalara eklenen kıvılcık ve ıspanak tozu toplam fenolik madde ve antioksidan kapasiteyi geliştirmiş ve beyaz çikolatanın fonksiyonel özelliklerine katkısı çalışmada kullanılan tozlar arasında en yüksek polen tozunda sağlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Beyaz çikolata, antioksidan kapasite, kıvılcık, ıspanak, polen.

* Corresponding author /Yazışmalardan sorumlu yazar;

✉ omcad@sakarya.edu.tr,

☎ (+90) 264 295 5921,

☎ (+90) 264 295 5601

INTRODUCTION

Cocoa and chocolate products have been one of the most popular foods for thousands of years. They have been consumed for both energy source and health benefits. Chocolates are mainly categorized as dark, milk and white that differs in contents of cocoa solids, milk fat and cocoa butter (1). White chocolate is formulated with sugar, cocoa butter, milk solids, lecithin and vanillin. It contains sugar and milk solids covered by a continuous fatty phase. If a chocolate is named as "white chocolate", it has to include whole milk powder and cocoa butter in the formulation (2, 3). Studies about the health benefits of cocoa and cocoa products are focused on especially degenerative diseases. Cocoa beans contain many different biologically active substances which are enzymes, vitamins, dietary fibers, minerals, xanthines (caffeine and theobromine) and polyphenols (4-6). The percentage of cocoa content determines the amount of polyphenols in chocolates. Although dark and milk chocolate contain cocoa mass, white chocolate does not contain, so it lacks in terms of phenolic substances. Because white chocolate has no cocoa solid content, antioxidant effect of white chocolate is low. Therefore, enrichment of white chocolate with fruits and vegetables can enhance its antioxidant capacity.

Functional foods contain a considerable amount of bioactive substances. They provide health benefits and prevent from chronic diseases. Phytochemicals such as phenolic substances and antioxidants in fruits and vegetables play an important role in creating functional foods (7). Cornelian cherry grown in Asia and Europe (*Cornus mas* L.) has bright, red colour and sour taste. Antioxidant activity of cornelian cherry is high because it contains ascorbic acid and polyphenolic compounds. In Turkey, it is consumed as directly or jam, marmalade, fruit pulp, in syrup or dry form. In addition, because of high antioxidant capacity, cornelian cherry can be used as food additive (8, 9). Spinach (*Spinacia oleracea*), one of the most important vegetables is consumed as fresh in salads or cooked. It involves higher amount of phenolic compounds, chlorophyll and β -carotene than many vegetables. Up to now, spinach powder has been added in bread, noodles and cheese due to its colour and

nutrients (10-12). Bee pollen includes carbohydrates, proteins, lipids, vitamins, minerals, micronutrients and polyphenolic substances which scavenge free radicals. Therefore, bee pollen can be used as additive due to health benefits. (13, 14). In literature, there are some studies about the chocolate enriched with raspberry, red pepper, rosemary and dried fruits like prunes, papaya, cranberry (15-17). However, there is no study on functional chocolate using powder of cornelian cherry, spinach or bee pollen. In addition, there are studies about the antioxidant capacity of the cocoa and chocolate products which are milk and dark chocolate (18-21). However, the number of studies are limited on antioxidant activities of white chocolates (22-24).

The purpose of this study was to produce white chocolate with addition of cornelian cherry, spinach and bee pollen powders. Coloring of chocolates and increasing antioxidant activity were targeted by using powders. The antioxidant potential of chocolates was determined with total phenolic content, DPPH scavenging activity and FRAP analysis by spectrophotometrically.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Methanol, Folin-Ciocalteu reagent, sodium carbonate, ferric chloride hexahydrate, sodium acetate trihydrate were provided from Merck™ (Darmstadt, Germany). DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), TPTZ (2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine), gallic acid (GAE) and $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ were supplied from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Cornelian cherry, spinach, bee pollen and other ingredients used in chocolate were taken from local markets (Sakarya, Turkey).

Preparation of chocolate samples

Cornelian cherry and spinach were washed with tap water then freeze-dried with the freeze drier (Labconco Freezone 6, USA). Bee pollen was dried in oven (Jeio Tech ON-12G, Korea) at 40-50 °C for 2 hours. After drying, all samples were ground into powder by using grinder (Fakir, Germany). Ingredients of white chocolate are listed in Table 1. Cocoa butter was melted by bain-marie method, ingredients in powder form were added and mixed with a mixer (Fakir-mezza plus, Germany).

Table 1. Ingredients of white and dark chocolate. Powdered sugar was used instead of cornelian cherry/spinach/bee pollen powder in control samples.

Ingredients	Percentage
Cocoa butter	39.00%
Powdered sugar	33.50%
Milk powder	17.00%
Whey powder	7.60%
Lecithin	0.50%
Butter	0.40%
Cornelian cherry/spinach/bee pollen powder	2.00%

The mixture was ground in melanger (Santha, USA) to gain required particle size for 6 hours. After councing, lecithin (emulgator) was added to the mixture. Chocolate mass was cooled to 27 °C, then heated to 32 °C and tempering was completed. The samples were stored in 4 °C until analysed.

Preparation of chocolate extracts

Chocolate extracts were prepared according to Wojdylo (25) with some modifications. 1 g of each chocolate sample was extracted with 10 ml of aqueous methanol (70ml/100ml) for 15 min in an ultrasonic water bath (Bandelin Sonorex, Germany). Then, each sample was centrifuged in centrifuge (Hettich Univarsal 320R, England) for 10 min at 13,130 x g. The supernatants of samples were seperated in tubes to use in analysis. Step of lipid elimination from samples was not applied due to possibility of loss in powders (cornelian cherry, spinach and bee pollen) during process. Although lipids from chocolates have been removed in most of the studies, there are some studies in the literature which did not eliminate lipids from chocolates (18).

Determination of total phenolic content

Total phenolic content of chocolate extracts was determined according to Singleton et al. (26) by spectrophotometrically. One hundred microliter of extract was mixed with 2 ml of distilled water and 1 ml Folin-Ciocalteu reagent was added to the mixture. After 3 min, 1 ml of sodium carbonate solution (20%) was added and incubated for 1 hour. Absorbances of samples were measured at 765 nm in UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu UVmini-1240, North America). Total phenolic content was expressed as mg GAE/100 g chocolate.

Antioxidant activity assays

DPPH assay

DPPH assay was applied according to the procedure of Brand and Williams (27) with some modifications. Two hundred microliter of chocolate extract was added to 3 ml of 0.051 mM DPPH in methanol and incubated at room temperature for 30 min. The DPPH scavenging capacity was evaluated by measuring the decrease in absorbance at 517 nm. Antioxidant capacity was calculated by using following equation:

$$\% \text{ DPPH scavenging activity} = \frac{A(\text{control}) - A(\text{sample})}{A(\text{control})} \times 100$$

FRAP assay

The ferric ion reducing antioxidant power assay was done according to modified method of Benzie and Strain (28). Three hundred milimolar acetate buffer (pH 3.6), 10 mM TPTZ, 20 mM FeCl₃ x 6H₂O were prepared as stock solutions. Then, FRAP reagent was made by mixing 25 ml of acetate buffer, 2.5 ml of TPTZ and 2.5 ml of FeCl₃ x 6H₂O solutions. One hundred microliter of chocolate extract and 1.2 ml of distilled water were added to 1.8 ml of FRAP reagent. Absorbance was measured at 593 nm after incubation at 37 °C for 15 min. For calibration curves, aqueous solutions of FeSO₄ x 7H₂O were used and the results were expressed as mmol Fe(II)/L.

Statistical analysis

Analysis were applied in three independent samples for each chocolate product and all determinations were performed in triplicate in each chocolate extract. Statistical analyses were done with the SPSS program (Version 20, Chicago, IL, USA) and the differences between chocolate samples were determined using Duncan's multiple range test. Results were expressed as the average ± standard deviation.

RESULTS AND DISCUSSION

Total phenolic content

Total phenolic content of white chocolate samples are shown in Table 2. The total phenolic content in control sample was not detected which is not surprising because white chocolate contains no cocoa mass. According to literature, there is high positive correlation between amount of cocoa solid and phenolic compounds (18, 21).

Tabernero et al (19) determined the total phenolic content of milk and dark chocolates as 13.10 and 18.16 mg GAE/g, respectively. Miller et al. (20) also reported that total phenolic content of dark chocolate was 11.73-14.88 mg GAE/g. These values are high according to this study due to difference in chocolate variety. When the white chocolate samples were compared, as can be seen from the data in Table 2, cornelian cherry, spinach and pollen enhanced the phenolic content of white chocolate. Pollen had the highest effect on total phenolic compounds (205.15 mg GAE/100 g) because it contains significant amount of polyphenolic substances (13). In literature, there are different results about phenolic contents of chocolates enriched with fruits and vegetables. In the study of Komes et al. (17), the effect of dried fruits (dried prunes, dried papaya, dried apricots, dried raisins, dried cranberries) on sensory properties and bioactive content was examined in samples. It was shown that the prunes increased the total phenolic content of dark chocolate and cranberry enhanced the phenolic content of milk chocolate. In contrast, Todorovic et al. (15) reported the total phenolic content of dark chocolate and dark chocolate with raspberry as 11.99 ve 11.56 mg GAE/g, respectively. As a result of the study, raspberry could not have significant influence on the dark chocolates. Similarly, Cervellati et al. (16) added the red pepper and rosemary in chocolate samples, however, there was no change on phenolic content. In the literature,

studies have been done with different chocolates, fruits or spices and amount of ingredients are also different. Therefore, results may not be similar with each other.

Antioxidant activity

DPPH and FRAP analysis, which are most frequently used to determine the antioxidant capacity of foods, were applied chocolate samples in this research. As can be seen from Figure 1, DPPH scavenging activity of plain white chocolate were found as 9.72%. Antioxidant activity of white chocolate was found low because the majority of antioxidant capacity in chocolate is due to the non fat cocoa solid content which contains important phenolic substances. When the contribution of powders to DPPH value of chocolates was examined, cornelian cherry and pollen powders provided increase in antioxidant activity of white chocolates. However, there was no significant difference between control of white chocolates and white chocolate with spinach. Todorovic et al. (15) reported that DPPH scavenging activity of dark chocolate was higher than the milk chocolate and addition of raspberry could not affect the activity of dark samples. Similarly, Komes et al. (17) explained that the antioxidant capacities of dark chocolates with dried fruits were higher than the dried fruits as opposed to total phenolic content. These

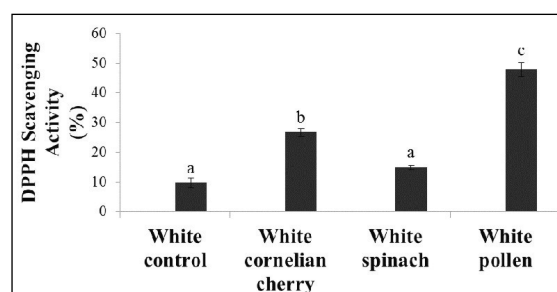


Figure 1. DPPH (2,2-dyphenil 1-picrylhydrazyl) content of chocolate samples. Values are mean \pm SD, (n=3). Results followed by the same letter (a–c) are not statistically different at $P < 0.05$.

Table 2. Total phenolic content of chocolate samples.

Chocolates	TPC (mg GAE/100 g)	FRAP (mmol Fe(II)/L)
White chocolate control	ND	3,20 \pm 0,42a
White chocolate with cornelian cherry	16.03 \pm 3.34a	8,14 \pm 1,54b
White chocolate with spinach	78.48 \pm 14.13b	7,15 \pm 0,77b
White chocolate with pollen	205.15 \pm 5.67c	18,55 \pm 2,01c

Values are expressed as means \pm SD (n = 3). Results followed by the same letter (a–c) are not statistically different at $P < 0.05$. ND: Not detected.

results lead to conclusion that cocoa polyphenols are major contributor to the antioxidant capacity instead of polyphenol content of dried fruits.

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) is a method which has been developed to measure the reduction ability of a compound from Fe^{+3} to Fe^{+2} by Benzie and Strain (25). FRAP value of plain white chocolate was determined as 3.20 mmol Fe(II)/L (Table 2). In addition, FRAP values of enriched chocolates changed between 7.15 and 18.55 mmol Fe(II)/L. As it can be understood from the values, cornelian cherry, spinach and pollen powders increased the antioxidant capacity of white chocolates due to high phenolic contents. Belscak et al. (21) determined the antioxidant capacity of chocolates with different cocoa solid content. They found that FRAP value of dark chocolate (with 88% cocoa solid) was 24.93 mmol Fe(II)/L. In the study of Komes et al. (17), FRAP value of milk and dark chocolates were determined as 4.00 and 8.06 mmol Fe(II)/L. Although all of powders increased the FRAP values of white chocolate, the major contributor was bee pollen as in the DPPH activity assay. Bee pollen contains important micronutrients and phenolic substances which increase the antioxidant capacity of foods.

CONCLUSIONS

This study investigated the contribution of cornelian cherry, spinach and pollen powders to antioxidant capacity of white chocolate. It was determined that white chocolate had no phenolic substances. Therefore, the antioxidant capacity of white chocolate was low. However, addition of cornelian cherry, spinach and pollen powders to the chocolates increased the phenolic compounds. Pollen powders on white chocolate was the most efficient one among three powders used in this study. When the effect of powders on antioxidant activity of chocolates were compared, it was found that the highest antioxidant capacity also belong to pollen powder. Considering the limited researches on antioxidant capacity of enriched chocolates, the findings in current study may contribute to literature data. Further studies may be done with adding different powders of fruit and vegetables to chocolates.

Acknowledgements

The authors are grateful for the financial support provided by Sakarya University. We are indebted to Prof. Dr. Zehra Ayhan for pre-reviewing the manuscript. We also thank to R.A Ayse Sariçam for her help in laboratory analysis.

REFERENCES

1. Afoakwa EO, Paterson A, Fowler M. 2007. Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate - a review. *Trends Food Sci Technol*, 18: 290-298.
2. Vercet A. 2003. Browning of white chocolate during storage. *Food Chem*, 81 (3): 371-377.
3. Samsudin S, Rahim AA. 1996. Use of palm mid-fraction in white chocolate formulation. *J Sci Food Agr*, 71 (4): 483-490.
4. Jalil AMM, Ismail A. 2008. Polyphenols in cocoa and cocoa products: is there a link between antioxidant properties and health? *Molecules*, 13 (9): 2190-2219.
5. Gu L, House SE, Wu X, Ou B, Prior RL. 2006. Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. *J Agr Food Chem*, 54 (11): 4057-4061.
6. Yao LH, Jiang YM, Shi J, Tomas-Barberan FA, Datta N, Singanusong R, Chen SS. 2004. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Food Hum Nutr*, 59 (3): 113-122.
7. Liu RH. 2003. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am J Clin Nutr*, 78 (3): 517-520.
8. Tural S, Koca I. 2008. Physico-chemical and antioxidant properties of cornelian cherry fruits (*Cornus mas* L.) grown in Turkey. *Sci Hort*, 116 (4): 362-366.
9. Pantelidis GE, Vasilakakis M, Manganaris GA, Diamantidis G. 2007. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chem*, 102 (3): 777-783.
10. Lee J, Lee S, Lee H, Park K, Choe E. 2002. Spinach (*Spinacia oleracea*) powder as a natural food-grade antioxidant in deep-fat-fried products. *J Agr Food Chem*, 50 (20): 5664-5669.

11. Howard LR, Pandjaitan N, Morelock T, Gil MI. 2002. Antioxidant capacity and phenolic content of spinach as affected by genetics and growing season. *J Agr Food Chem*, 50 (21): 5891-5896.
12. Ismail A, Marjan ZM, Foong CW. 2004. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chem*, 87 (4): 581-586.
13. Feás X, Vázquez-Tato MP, Estevinho L, Seijas JA, Iglesias A. 2012. Organic bee pollen: botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. *Molecules*, 17 (7): 8359-8377.
14. Carpes ST, Begnini R, Alencar SMD, Masson ML. 2007. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. *Ciênc Agrotec*, 31 (6): 1818-1825.
15. Todorovic V, Redovnikovic IR, Todorovic Z, Jankovic G, Dodevska M, Sobajic S. 2015. Polyphenols, methylxanthines, and antioxidant capacity of chocolates produced in Serbia. *J Food Comp Anal*, 41: 137-143.
16. Cervellati R, Greco E, Costa S, Guerra MC, Speroni E. 2008. A comparison of antioxidant properties between artisan-made and factory-produced chocolate. *Int J Food Sci Tech*, 43 (10): 1866-1870.
17. Komes D, Belscak-Cvitanovic A, Skrabal S, Vojvodic A, Busic A. 2013. The influence of dried fruits enrichment on sensory properties of bitter and milk chocolates and bioactive content of their extracts affected by different solvents. *LWT- Food Sci and Technol*, 53 (1): 360-369.
18. Vertuani S, Scalambra E, Vittorio T, Bino A, Malisardi G, Baldisserotto A, Manfredini S. 2014. Evaluation of antiradical activity of different cocoa and chocolate products: relation with lipid and protein composition. *J Med Food*, 17 (4): 512-516.
19. Taberner M, Serrano J, Saura-Calixto F. 2006. The antioxidant capacity of cocoa products: Contribution to the Spanish diet. *Int J Food Sci Tech*, 41 (1): 28-32.
20. Miller KB, Stuart DA, Smith NL, Lee CY, McHale NL, Flanagan JA, Hurst WJ. 2006. Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin contents of selected commercially available cocoa-containing and chocolate products in the United States. *J Agr Food Chem*, 54 (11): 4062-4068.
21. Belscak A, Komes D, Horzic D, Ganic KK, Karlovic D. 2009. Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Res Int*, 42 (5): 707-716.
22. Meng CC, Jalil AMM, Ismail A. 2009. Phenolic and theobromine contents of commercial dark, milk and white chocolates on the Malaysian market. *Molecules*, 14(1): 200-209.
23. Carlsen MH, Halvorsen BL, Holte K, Bohn SK, Dragland S, Sampson L, Willey C, Senoo H, Umezono Y, Sanada C, Barikmo I, Berhe N, Willet W, Philips KM, Jacobs DR, Blomhoff R. 2010. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutr J*, 9(1): 1-11.
24. Pimentel FA, Nitzke JA, Klipel CB, de Jong EV. 2010. Chocolate and red wine—A comparison between flavonoids content. *Food Chem*, 120 (1): 109-112.
25. Wojdylo A, Oszmianski J, Czemerys R. 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem*, 105 (3): 940-949.
26. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Method Enzymol*, 299: 152-178.
27. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT- Food Sci and Technol*, 28 (1): 25-30.
28. Benzie IFF, Strain J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant power": The FRAP assay. *Anal Biochem*, 239: 70-76.

MINERAL AND HEAVY METAL CONTENT IN CAMİ BOĞAZI CHEESE ON SALE IN TRABZON, TURKEY

Asya Çetinkaya^{1*}, Giray Buğra Akbaba², Sibel Özçakmak³, Güven Gülbaz³

^{1,4} Kafkas University, Faculty of Engineering and Architecture, Department of Food Engineering, Kars, Turkey

² Kafkas University, Faculty of Engineering and Architecture, Bioengineering Department, Kars, Turkey

³ Food, Agriculture and Livestock Directorate, Samsun, Turkey

Received / Geliş Tarihi: 27.12.2015

Received in revised form / Düzeltilek Geliş Tarihi 22.02.2016

Accepted / Kabul Tarihi 27.02.2016

Abstract

The objective of this study was to determine the levels of certain minerals and heavy metals in 15 samples of locally produced Cami Boğazi cheese collected from cheese shops and district bazaars in Trabzon province, Turkey and evaluate whether the levels are within the acceptable limits given in the Turkish Food Codex. Using Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, the average levels of the mineral substance and heavy metals in the Cami Boğazi cheese samples were determined as; calcium 3573.40±249.61 mg/kg, potassium 452.13±25.31 mg/kg, sodium 8413.31±506.59 mg/kg, magnesium 164.23±8.97 mg/kg, iron 0.37±0.17 mg/kg, zinc 27.52±1.85 mg/kg, copper 1.350±0.10 mg/kg, manganese 0.15±0.09 mg/kg, phosphorus 4272±269.90 mg/kg, lead 0.179±0.03 mg/kg and cadmium 0.028±0.001 mg/kg. These results show that the mineral content and heavy metal levels of the cheese samples were within the limits for certain foodstuffs (such as raw milk and heat-treated milk, hoca fish, canned foods, beef and mutton) given in the Turkish Food Codex. This is the first report on the mineral and heavy metal content in Cami Boğazi cheese.

Keywords: Cami Boğazi cheese, mineral substance, heavy metal, ICP-OES

TRABZON'DA TÜKETİME SUNULAN CAMİ BOĞAZI PEYNİRLERİNİN MİNERAL MADDE İÇERİĞİ VE AĞIR METAL KONTAMİNASYONU

Özet

Araştırma, Trabzon ilindeki peynir pasajları ve semt pazarlarından toplanan 15 adet Cami Boğazi peynirinde mineral madde ve ağır metal içeriklerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Araştırmada, küçük mandıra ve aile tipi işletmelerde üretilip Trabzon ilinde tüketime sunulan Cami Boğazi peynirinde bazı mineral madde ve ağır metal düzeylerinin belirlenmesi ve Türk Gıda Kodeksi'nde belirtilen limitlere uygunluğunun tespit edilmesi amaçlanmıştır. Mineral madde ve ağır metal içerikleri ICP-OES kullanılarak sonuçlar mg/kg cinsinden verilmiştir. Ortalama mineral madde ve ağır metal içerikleri; kalsiyum 3573.40±249.61 mg/kg, potasyum 452.13±25.31 mg/kg, sodyum 8413.31±506.59 mg/kg, magnezyum 164.23±8.97 mg/kg, fosfor 4272±269.90, demir 0.37±0.17 mg/kg, çinko 27.52±1.85 mg/kg, bakır 1.350±0.10 mg/kg, mangan 0.15±0.09 mg/kg, kurşun 0.179±0.03 mg/kg ve kadmiyum 0.028±0.001 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak, peynir numunelerinin ağır metal seviyelerinin Türk Gıda Kodeksi'nin çiğ süt ve ısıtılmış süt, balık, konserve gıdalar, sığır ve koyun eti vb bazı gıdalar için belirlediği sınırlar içerisinde olduğu belirlenmiştir. Bu makale, Cami Boğazi peynirindeki mineral madde içeriği ve ağır metal varlığı hakkındaki ilk rapordur.

Anahtar kelimeler: Mineral madde, ağır metal, Cami Boğazi Peyniri, ICP-OES

* Corresponding author /Yazışmalardan sorumlu yazar;

✉ a_cetinkaya36@hotmail.com,

☎ (+90) 474 225 1279,

☎ (+90) 474 225 1282

INTRODUCTION

Cami Boğazi cheese is a traditional type of cheese produced in Trabzon, Turkey. In the production of this cheese, first, white cheese produced from cow's milk is melted and kneaded in boiled whey, then it is chopped and mixed with salt and cheese curds usually made from buttermilk and known as Minci (Minzi) in the Black Sea region (1).

After a maturation period of few months in wooden barrels, cheese is ready for consumption. Due to their nutritional content, milk and dairy products are indispensable for human beings (2). Cheese is the most commonly produced dairy product and most people enjoy consuming it. Almost all types of cheese have a high nutritional value, being rich in milk fat, fat-soluble vitamins and minerals. They also contain significant amounts of calcium and phosphorous; the consumption of 100 g of hard cheese is sufficient to meet the daily calcium and phosphorous requirements for an adult and the same amount of soft cheese meets 50% of this requirement (3, 4). With regard to their amounts, minerals in the milk are divided in two groups: macro elements such as calcium, magnesium, chlorine and sodium and trace elements including iron, zinc, copper, chrome, aluminum, and manganese (2). In the first group, calcium, phosphorous, magnesium, sodium and potassium are all of great significance to nutritional physiology. In addition, these minerals stabilize the chemical structure of milk proteins, promoting the effects of the rennin enzyme on the casein complex, and play an essential role in resistance to heat treatment and flavor formation in certain dairy products (5). Furthermore, calcium has significant involvement in blood clotting, enzyme activation, regulation of cellular development and insulin secretion. Magnesium is imperative for muscle and nerve conduction and phosphorus is important for bone and teeth structure (5, 6). The mineral content of cheese varies depending on the species and breed of the animal, lactation status, presence of udder diseases, nutrition of the animal, seasonal variations and genetic factors (5).

Some of the heavy metals necessary for the functioning of enzyme systems (eg., iron, copper and zinc) are of particular importance while the role of some others is yet to be identified (7). For

example, zinc plays a significant role in major aspects of maintaining the human body, such as the preservation of olfaction, development of a healthy immune system, the production of proteins, secretion of enzymes, and the production of DNA (8). Depending on its level, heavy metal intake during food consumption leads to various irregularities in functions and damage to the body. These substances lead to disturbances, such as a lack of appetite, labored breathing, loss of memory, sleep and nervous system disorders. Furthermore, heavy metals are involved in cardiovascular and circulatory system diseases, which may lead to cancers, anemia, intoxication and premature death. The rate of heavy metal deposition in the body varies, depending on the chemical forms of heavy metals, age and nutrition (9, 10). Metal residues are not present in the natural structure of foods but they contaminate foods in various ways. This contamination can result from the equipment used or packaging materials with which the food products come into contact during production and storage. The contamination of these products may also be a result of the transfer to the raw material from a contaminated environment. Some heavy metals can accumulate in plants and then be absorbed into animal fat (11). Milk and dairy products contain low levels of heavy metals, which may increase due to contamination. The heavy metal contamination in milk and dairy products can result from contamination in lactating animals or from the machines and equipment with which dairy products come into contact during production and storage (12). Copper, zinc, iron, tin, lead, arsenic and cadmium are major elements present in metallic contamination, due to metal canisters or service water used during the technological processing or storage of milk and dairy products. The dissolution of metals in the composition of these canisters creates a higher risk of contamination for acidic products such as cheese and milk when compared with other products (2).

Contaminants from various sources are considered to be health hazards by environmental organizations. Among the issues concerning FAO/WHO are problems created by the contamination of foodstuffs with heavy metal ions and the increase of contamination beyond daily tolerance levels (13). Therefore, this study determined the levels of calcium, potassium, sodium, magnesium,

phosphorous, manganese, iron, zinc, copper, cadmium and lead in Cami Boğazi cheese marketed in cheese shops and district bazaars in Trabzon.

MATERIAL and METHODS

Sample Collection

Fifteen samples of locally produced Cami Boğazi cheese were obtained from cheese shops and district bazaars in Trabzon. The samples were transported to the laboratory using cold chain, and stored at 4±1 °C until the time of analysis.

Methods

Sample Preparation:

After being kept in a 1:1 HNO₃ solution in glass jars overnight, the samples were washed first in distilled, then in bidistilled water, and finally dried. In order to eliminate the organic compounds and release the inorganic compounds in a soluble phase, 1 g cheese samples were placed in Teflon containers, to which a combination of 5 ml of 65% nitric acid (Merck, 1.00452) and 5 ml of 30% hydrogen peroxide (Merck, 1.08597) was added. The Teflon containers were capped and the samples were ashed in a Mars-5 microwave oven (Cem Corporation) using a two-stage procedure. First, the samples were washed in bidistilled water and complemented to 50 ml with bidistilled water. In the second stage, the samples were filtered using S&S blue tape filter papers. A blank solution was prepared in the same way. In order to avoid metal contamination, materials used in the dissolution of the samples were rinsed a couple of times with 1+9 (v/v) HNO₃ ultra-distilled water. Then, the materials were thoroughly washed and rinsed with ultra-distilled water and dried in the stove. The levels of mineral substances and heavy metals in the samples were measured using the ICP-OES (Thermo scientific ICAP 7400) device (14).

Statistical Analysis

The results obtained from the cheese samples were analyzed using the SPSS package program (version 18) to determine the minimum, maximum, average values and standard deviations (15).

RESULTS AND DISCUSSION

The mineral analyses of our study are given in Table 1.

As seen from Table 1, in Cami Boğazi cheese samples, of the calcium and sodium contents, calcium values are found lower than Yüzbaşı and Demirözü (16) have determined in the studies they have conducted in Ankara (7067.00±3069 and 4334.0±3021mg/kg)) while sodium values are found higher, and also higher than the values determined in the studies of Öksüztepe et al. (17) in Elazığ (327.76±36.7 µg/kg and 620.40±68.12 µg/kg) and Kılıç et al. (18) in Izmir (797.962±200.28 mg/100g and 1212.32±370.66 mg/100 g). Potassium content was recorded rather lower than the findings obtained by Öksüztepe et al. (17) as 1142±512.50mg/kg, and Yüzbaşı and Demirözü (16) as 1742.00±602 mg/kg. While average magnesium content of Cami Boğazi cheeses is determined quite lower than the value determined by Yüzbaşı and Demirözü (16) as 6026.00±908 mg/kg, it was higher than the value determined by İşleten et al. (19) as 27.42 ±60.51 mg/100g. Phosphor content of cheese samples is recorded considerably higher than the findings Kılıç et al. (18) and Öksüztepe et al. (17) have obtained as 448.09±100.27 mg/100 and 67.46±5.83 mg/kg, respectively.

As a result of loss in moisture in cheese with maturation, a proportional increase specifically in sodium amount is possible (20). These differences in mineral substance level in Cami Boğazi cheeses may be subject to the soil structure where the animals are raised, seasonal changes, content of the milk being used and different cheese

Table 1. Mineral substance content in the Cami Boğazi cheese samples (mg/kg) n= 15

Mineral Substances	Mean *	Min.	Max.
Ca	3573.4±249.61	2212.5	5320
K	452.13±25.305	280.10	571
Mg	164.23±8.97	111.20	214
Na	8413.30±506.59	4852.5	10520
P	4272±269.90	2412.5	5485

* Mean ± Standard Error

production techniques. Thus various researchers have emphasized that cheese production techniques and environmental conditions may result in variations in the mineral substance contents of the cheeses produced (7).

The obtained heavy metal results of our study and their suitability with Turkish food Codex are taking place in Table 2.

As clearly seen from Table 2, iron content in Cami Boğazı cheeses is found lower than the values determined by Yüzbaşı and Demirözü (16) as 3.05 ± 1.27 mg/kg and by Temurci and Güner (21) as 62.56 ± 3.5 mg/kg, and zinc content is found lower than the values Yüzbaşı and Demirözü (16) have obtained as 4334.00 ± 3021 mg/kg in a study they've conducted in Ankara. Milk and dairy products are not the main sources for iron. Iron content in these products is arising from using iron containing materials during pasteurization processes applied on milk and process of deriving products from milk (22). Besides, average zinc content in Cami Boğazı cheeses is found higher than the values Yalçın and Tekinşen (23) have determined in Konya as 15.96 ± 1.30 mg/kg and İşleten et al. (19) have determined as 2.12 ± 8.19 mg/100g. Variations detected in zinc content of cheeses in different researches are thought to be arising from milk used in cheese production and tools and equipment used at production stage. This situation is also expressed by Yalçın and Tekinşen (23). Besides, it is reported that 85% of zinc in milk is subject to casein micelles and is separated from curd by becoming free in acidic pH values (7, 20). Average contents of mineral substances and heavy metals in the composition of milk are stated as calcium 1221-1259 mg/L, potassium 1424-1550 mg/L, sodium 310-523 mg/L, magnesium 89-228 mg/L, iron 0.70-2.40

mg/L, zinc 0.96-4.84 mg/L, copper 0.19-0.29 mg/L, manganese 0.02-0.038 mg/L, nickel 0-0.730 µg/L, lead 4-100 µg/L and arsenic 30-100 µg/L (2, 24). As mineral substances, heavy metals are also transferred to milk in a specific ratio. For this reason, heavy metal level in Cami Boğazı cheese may change according to the heavy metal contamination of milk used in cheese production. In the "Communiqué on Determining Maximum Limits of Contaminants in Food Products" of Turkish Food Codex (25, 26), acceptable values of heavy metals in some foods are determined although they are not the maximum limits of Cami Boğazı cheese. However, heavy metal quantities detected in the samples are stated to be within the limits Turkish Food Codex (25, 26) has determined in some foods (Table 2).

In conclusion, the results of the study are favorable in terms of demonstrating that the heavy metal content of Cami Boğazı cheese is within acceptable limits. However, since high levels of heavy metals can lead to serious health hazards, it is crucial to ensure sustainability in healthy and safe cheese production. To this end, cheese production techniques should be standardized; the tools and equipment used in production and storage should be in line with the required standards; and production facilities and materials used in production should be located far from chemical wastes and environmental pollution. Furthermore it is recommended that chemical feed should not be used in animal feed preparations where there is a risk of environmental contamination and livestock feed should be prepared in isolation from chemical nutrients.

Table 2. Heavy metal content in the Cami Boğazı cheese samples (mg/kg) n= 15

	Heavy metal (mg/kg)					
	Fe	Cu	Pb	Cd	Zn	Mn
Mean	0.371±0.177	1.350±0.108	0.179±0.036	0.028±0.001	27.52±1.85	0.313±0.11
Min	-	0.90	-	0.02	11.88	-
Max	0.90	2.04	0.38	0.035	36.94	0.33
**Maximum Limit mg/kg	0.2-25	0.05-25	0.02-2	0.05-1	5-50	-
Status	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	-

* Mean ± Standard Error

** Turkish Food Codex Maximum Limits of Contaminants in Food (25, 26)

REFERENCES

1. Şanlıdere Aloğlu H, Turhan I, Öner Z. 2001. Minci (Minzi) Peynirinin Özelliklerinin Belirlenmesi. *GIDA* 37 (6) : 349-354.
2. Metin M. 2001. Süt Teknolojisi. Sütün Bileşimi ve İşlenmesi. 4. Baskı, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, No: 33, Bornova, İzmir, Türkiye, 801-806 s.
3. Renner E. 1987. Nutritional Aspects of Cheese. Dordrecht: D. Reidel Publishing Company.
4. Demirci M.1994. Peynirin Beslenmedeki Önemi. Her Yönüyle Peynir. Trakya Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları Ders Kitabı No: 9, Tekirdağ, Türkiye.
5. Üçüncü M. 2005. Süt ve Mamulleri Teknolojisi. Meta Basım, Bornova İzmir, Türkiye.
6. Demirci M. 2002. Beslenme. Rebel Yayıncılık, Topkapı, İstanbul, Türkiye, 287 p.
7. Özlü H, Aydemir-Atasever M, Urçar S, Atasever, M. 2012. Erzurum'da Tüketime Sunulan Kaşar Peynirlerinin Mineral Madde ve Ağır Metal Kontaminasyonu. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 18 (2): 205-208.
8. Anon. 2015. Çinko hangi besinlerde bulunur? <http://www.onikibilgi.com/cinko-hangi-besinlerde-bulunur>. Accessed date December 2015.
9. Goyer RA. 1996. Toxic Effects of Metals. "CD Klaassen (ed): Casarett and Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons", 5th ed. 691, McGraw-Hill Inc, New York, USA.
10. Hu H. 2002. Human Health and Toxic Metals. In, McCally M (Ed): Life Support: The Environment and Human Health, MIT Press.
11. Akın N, Ayar A, Sert D, Çalık N. 2003. Konya ilinin değişik bölgelerinden toplanan sütlerin ağır metal içerikleri üzerine bir araştırma. Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu Bildiriler Kitabı. İzmir, Türkiye, 355-358.
12. Özrenk, E. 2002. Van ili ve ilçelerinde üretilen inek sütlerinin ağır metal kirlilik düzeyi ve bazı mineral madde içerikleri. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi, Van, Türkiye, 94 s.
13. Kadkhodae M, Khastar H, Faghihi M, Ghaznavi R, Zahmatkesh M. 2005. Effect of co-supplementation of vitamins E and C on gentamicin induced nephrotoxicity in rat. *Exaphysiol*, 90 (4), 571-576.
14. Association Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 2002. 17th Edition, Revision 1, Metals and other elements, chapter 9. 16-19. Maryland.
15. Özdamar K. 1997. Paket Programlar ile İstatistiksel Veri Analizi 1. Anadolu Üniversitesi Yayınları No: 1001, Fen Fakültesi Yayınları No: 11, Eskişehir, Türkiye.
16. Yüzbaşı N, Demirözü B. 2002. Peynir ve Sütte Bazı Esansiyel Minerallerin Belirlenmesi. *GIDA* 27(6): 499-504.
17. Öksüztepe G, Karatepe P, Özçelik M, İncili GK. 2013. Tulum Peyniri ve Taze Beyaz Peynirlerin Mineral Madde ve Ağır Metal İçerikleri. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi* 27 (2): 93-97.
18. Kılıç S, Karagözlü C, Uysal H, Akbulut N. 2002. İzmir Piyasasında Satılan Bazı Peynir Çeşitlerinin Kalsiyum, Fosfor, Sodyum ve Potasyum Düzeyleri Üzerine Bir Araştırma. *GIDA* 27(3): 229-234.
19. İşleten M, Uysal Pala Ç, Karagül-Yüceer Y. 2007. Ezine Peynirinin Mineral Madde İçeriği. *GIDA* 32 (4) : 173-179
20. Vural H. 1993. Ağır Metal İyonlarının Gıdalarda Oluşturduğu Kirlilikler. *Ekoloji* 8: 3-8
21. Temurci H, Güner A. 2006. Ankara'da Tüketime Sunulan Süt ve Beyaz Peynirlerde Ağır Metal Kontaminasyonu. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi* 1(1-2): 20-28.
22. Anon 1992. Trace elements in milk and milk products. Bulletin of the International Dairy Federation. No: 278
23. Yalçın Ö, Tekinşen KK. 2010. Konya'da Tüketime Sunulan Beyaz Salamura, Tulum ve Kaşar Peynirlerinin Ağır Metal İçeriklerinin Araştırılması. *Etilik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* 21: 5-10.
24. Demirci M. 1981. Sütün Mineral Maddeleri ve İnsan Beslenmesindeki Önemi. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 12 (1): 195-207.
25. Anon. 2002. Türk Gıda Kodeksi. Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliği (2002/63). Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. 23 Eylül 2002 tarih ve 24885 sayılı Resmi Gazete, Ankara.
26. Anon. 2008. Türk Gıda Kodeksi. Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliği (2008/26). Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. 17 Mayıs 2008 tarih ve 26879 sayılı Resmi Gazete, Ankara.

Author Instructions

GIDA (2009) 34 (1): 59-63

www.gidadernegi.org / English / The Journal of FOOD /Author Instructions

Manuscript Submission and Copyright Release Form

GIDA (2009) 34 (1): 67

www.gidadernegi.org / English / The Journal of FOOD /Manuscript Submission and Copyright Release Form

Final Check List

GIDA (2009) 34 (1): 68

www.gidadernegi.org / English / The Journal of FOOD /Final Check List

can be reached from those addresses. Authors must read carefully the author instructions and prepare the manuscript accordingly.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY SPECTRUMS OF SOME *BACILLUS* STRAINS FROM VARIOUS SOURCES

Ayşe Avcı*, Seda Üzmez, Firdevs Büşra Alkan, İpek Bagana, Esra Nurçeli, Enes Çiftçi

Sakarya University, Faculty of Engineering,
Department of Food Engineering, Serdivan, Sakarya, Turkey

Received / Geliş Tarihi: 17.03.2016

Received in revised form / Düzeltilek Geliş Tarihi 22.04.2016

Accepted / Kabul Tarihi 26.04.2016

Abstract

During the recent years, production of antimicrobial substances by *Bacillus* strains have been attracted due to their broad antimicrobial spectrum. In the current study, some *Bacillus* strains which were previously isolated from some fermented foods as well as soil have been screened for antimicrobials production. Six of the isolates have been detected as antimicrobial substance producers. Antimicrobial activity was determined using disc diffusion assay against eight important food pathogens (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*. and *Pseudomonas aeruginosa*). The cell-free supernatants of the isolates used in current study did not inhibit the growth of *S. aureus*, however all inhibited *E. coli* O157:H7. The results showed that their antimicrobial spectrums were broad including both Gram negative and Gram positive bacteria. All the isolates produced the maximum amount of antimicrobials at 24 h and increased incubation periods caused the decrease in the production of antimicrobials.

Keywords: Antimicrobial substances, *Bacillus*, bacteriocin.

ÇEŞİTLİ KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLMİŞ OLAN BAZI *BACILLUS* SUŞLARININ ANTİMİKROBİYEL AKTİVİTE SPEKTRUMLARI

Özet

Son yıllarda, *Bacillus* suşları ile antimikrobiyel madde üretimine olan ilgi bunların geniş antimikrobiyel aktivite spektrumlarından dolayı artmıştır. Bu çalışmada, çeşitli fermente gıdalar ve topraktan izole edilmiş olan bazı *Bacillus* suşlarının antimikrobiyel madde üretimleri araştırılmıştır. Çalışılan mikroorganizmalardan 6'sının antimikrobiyel madde üreticisi olduğu belirlenmiştir. Antimikrobiyel aktivite 8 önemli gıda patojeni (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa*) kullanılarak disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan izolatların süpernantları *S. aureus*'a etki etmemiş, ancak hepsi *E. coli* O157:H7'yi inhibe etmiştir. Elde edilen sonuçlar, mikroorganizmaların hem Gram negatif hem de Gram pozitif patojenlere etki eden geniş spektrumlu antimikrobiyel maddeler ürettiğini göstermiştir. En iyi antimikrobiyel madde 24 saatte üretilmiş ve artan inkübasyon sürelerinde antimikrobiyel aktivitenin düştüğü gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyel maddeler, *Bacillus*, bakteriyosin.

* Corresponding author /Yazışmalardan sorumlu yazar;

✉ aysea@sakarya.edu.tr, ☎ (+90) 264 295 5464,

☎ (+90) 264 295 5608

INTRODUCTION

Bacteriocins are hydrophobic peptides which are ribosomally synthesized by generally Gram positive bacteria (1-3). They have antimicrobial effects on various microorganisms, including foodborne pathogens, by killing or inhibiting the growth (4, 5). Bacteriocins are considered as natural antimicrobials alternative to antibiotics, as they have been formed in many fermented foods and consumed by human for more than thousand years (6). During the last decades, great attention has been given for the screening of bacteriocin producing bacteria owing to their beneficial effects on food preservation (7, 8). Several reports are available representing the improved shelf-life and safety of foods by the help of bacteriocins as biopreservatives (9, 10).

Due to their natural occurrence in foods, production of bacteriocin has been extensively studied by lactic acid bacteria (LAB) including the species of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weisella*, and *Enterococcus* (1, 7, 8, 11, 12). In addition, most LAB are regarded as GRAS (generally recognized as safe) (10). LAB originated from fermented foods such as Turkish sucuk, boza, and cheese have been determined to produce bacteriocins which also contribute to the shelf-life of these products (13-15). However it has been reported that antimicrobial spectrum of LAB is narrow. Especially Gram negative pathogens in foods are more robust to bacteriocins from LAB (16).

Various species from *Bacillus* genus have been reported as bacteriocin producers such as *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium*. Amongst them *B. subtilis*, *B. coagulans* and *B. licheniformis* are mostly investigated ones that produce subtilin, coagulin and bacitracin, respectively (3, 17). Antimicrobial spectrum of bacteriocins vary and some strains of *Bacillus* were reported as having broad antimicrobial spectrum (18). Therefore, bacteriocins by *Bacillus* spp. are of great interest for their potential application as food preservatives and therapeutic agents (19). In this study, we aimed to screen bacteriocin producing *Bacillus* strains which were isolated from different sources and determining their antibacterial spectrum over some foodborne pathogens.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms

Twelve *Bacillus* isolates that were previously isolated from various sources such as pickles, olives, and soil were screened for their antimicrobial effects on some food pathogens. They were defined as *Bacillus* spp. based on the morphological and some biochemical tests. Test organisms used for antimicrobial activity detection were *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*. They were obtained from culture collection of Sakarya University, Food Engineering Department, except *Pseudomonas aeruginosa* which was supplied from Ankara University, Food Engineering Department.

Cultural conditions

Bacillus isolates were maintained in nutrient broth (Merck, Darmstadt, Germany) containing 50% glycerol at -18°C. They were activated by propagating on nutrient agar (Merck, Darmstadt, Germany) plates followed by incubation at 33°C for 24 h. Thereafter, single colonies were picked up and transferred into nutrient broth which was prepared in 100 mL Erlenmeyer flasks as 30 mL portions. Incubations were carried out on a shaking incubator (120 rpm) at 33°C for 24 h. This liquid culture was used as inoculum for the production of antimicrobials. In order to determine production of antimicrobials, Erlenmeyer flasks (100 mL) containing 30 mL of nutrient broth were inoculated with 5% (v/v) fresh *Bacillus* cultures and incubated aerobically at 33°C for 72 h on a shaking incubator (120 rpm). Separate samples were collected every 24 h for the determination of antimicrobial activity and growth. Analysis were performed at least in duplicate. Test organisms were maintained in tryptic soy broth (TSB; Merck, Darmstadt, Germany) containing 50% glycerol at -18°C. They were activated in TSB at 37°C for 24 h, except *L. monocytogenes* which was incubated at 30°C.

Antimicrobial activity assay

Samples were centrifuged at 10000 rpm for 10 min and supernatants were filtered through 0.45 µm Millex membrane filter (Merck Millipore,

Darmstadt, Germany). The resulting filtrates were used for antimicrobial activity measurements. Antimicrobial activity was determined using disc diffusion method as described by Cadirci and Citak (20) with some modifications. Briefly, 50 µL of 24 h actively grown test microorganisms (~10⁸ cfu/mL) were spread on TSA plates which were then allowed around 30 min to diffuse cultures. Sterilized filter paper discs (Whatman No.1; 6 mm in diameter) were placed on the agar plates containing pathogens. Subsequently, 10 µL of cell-free supernatants were carefully applied in the center of the filter papers. Plates were incubated at 37°C, except *L. monocytogenes* which was incubated at 30°C for 24 h. At the end of the incubations, clear zones were measured by using a ruler.

Monitoring growth of Bacillus strains

Growth of the *Bacillus* strains were measured using UV-VIS spectrophotometer (UVmini 1240; Shimadzu, Japan). For this, samples containing bacterial cells were diluted 5-fold with deionized water and homogenized by vortexing. Optical densities of cell suspensions were measured at 600 nm.

Growth curve of Bacillus sp. GIT2 and production of antimicrobials during the growth

Bacillus sp. GIT2 which was one of the best isolates producing antimicrobials was chosen for the detection of antimicrobial production during the growth. Throughout the 48 h incubation time, periodical samples were taken and optical densities were measured to construct growth curve. Separate samples were taken for the determination of the antimicrobial activity by disc diffusion method. *L. monocytogenes* was used as indicator organism in this experiment.

RESULTS AND DISCUSSION

Antimicrobial activities of 12 *Bacillus* isolates have been determined. Six of them (*Bacillus* sp. BAST2, *Bacillus* sp. BMZE4, *Bacillus* sp. GIT2, *Bacillus* sp. ZBP10, *Bacillus* sp. ZGT3, *Bacillus* sp. ZGT9) have shown antimicrobial activity on various test organisms. All were Gram positive, rod shaped, catalase positive and spore forming strains isolated from some fermented foods and soil samples. Sources of the isolates having antimicrobial activity are given in Table 1.

Table 1. Origins of the *Bacillus* isolates possessing antimicrobial activity.

Isolate	Origin
<i>Bacillus</i> sp. BAST2	Homemade cucumber pickles
<i>Bacillus</i> sp. BMZE4	Homemade fermented olives
<i>Bacillus</i> sp. GIT2	Soil (Istanbul)
<i>Bacillus</i> sp. ZBP10	Soil (Sakarya)
<i>Bacillus</i> sp. ZGT3	Soil (Sakarya)
<i>Bacillus</i> sp. ZGT9	Soil (Sakarya)

The microorganisms were grown in nutrient broth and daily samples were taken and assayed for antimicrobial activities using disc diffusion method. The results obtained after 24 h are depicted in Table 2. Inhibitory spectrum of the bacteria varied and inhibition zone ranged from 6.5 to 10.3 mm. Among them *Bacillus* sp. ZGT9 was the strain having the narrowest inhibition spectrum which did not inhibit four of the test organisms. The other strains inhibited the growth of at least five bacteria over the eight test organisms.

As a general consideration, bacteriocins from Gram positive bacteria inhibit Gram positive bacteria and they are less effective against Gram negative bacteria [19]. For instance, Khalil *et al* (18) reported a *B. megaterium* strain inhibiting

Table 2. Antimicrobial spectrums of *Bacillus* isolates that were grown in nutrient broth at 33°C for 24 h on shaking incubator (120 rpm).

Indicator Bacteria	Zone of inhibition (mm)						
	BAST2	BMZE4	GIT2	ZBP10	ZGT3	ZGT9	
Gram Positive	<i>B. cereus</i>	10.3±0.4	7.8±0.4	10.0±0.0	7.3±0.4	8.8±0.4	9.3±0.4
	<i>L. monocytogenes</i>	N.A*	8.5±0.7	9.5±0.7	8.0±0.0	8.5±0.7	N.A
	<i>S. aureus</i>	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
Gram Negative	<i>E. coli</i> O157:H7	8.8±0.4	8.3±0.4	9.5±0.7	8.0±0.0	9.5±0.7	9.0±0.0
	<i>E. coli</i>	10.0±0.0	10.0±0.0	N.A	8.0±0.0	10.0±0.0	N.A
	<i>P. aeruginosa</i>	9.0±1.4	N.A	9.5±0.7	8.0±0.0	8.5±0.0	8.8±0.4
	<i>S. Enteritidis</i>	8.5±0.7	8.5±0.7	9.5±0.7	9.0±0.0	N.A	N.A
	<i>S. Typhimurium</i>	6.5±0.0	N.A	8.0±0.0	N.A	9.0±0.0	7.0±0.0

*N.A: No Activity

Gram positive bacteria such as *S. Typhimurium*, *B. licheniformis* ZJU12, but not the Gram negatives. In another study, Cherif et al. (17) searched the antimicrobial activity of *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD10 against Gram negative bacteria and found no activity. However in our study, it was not the case that the action of the antimicrobials from the *Bacillus* isolates had different mode of action which was not attributed to Gram characteristics of the test organisms. None of the isolates inhibited the growth of Gram positive *S. aureus*. On the other hand, all of the strains interestingly inhibited the growth of *E. coli* O157:H7 which is Gram negative. On contrary to general approach, similar findings to our results were also reported that proves the antimicrobial activity of bacteriocins from *Bacillus* against the bacteria having different Gram reactions (18, 19, 21). Some lactic acid bacteria were also reported with the same property (10). In the literature, it was cited that narrow spectrum of bacteriocins limits the application in foods (21). Thus, discovery of novel strains with large antibacterial spectrum would help to expand food applications.

Bacteriocins are mostly effective against closely related strains (17). It has been argued that bacteriocins are generally originated from plasmids which are incidentally produced as a by-product of protein mechanism. Due to the incidental mutation on the plasmids, the bacteria can inhibit the competitive flora and dominate in the medium (22). Our findings are in accord with this phenomenon that all of the isolates have shown antimicrobial activity against *B. cereus* (Table 2).

An interesting outcome of this study is that all the strains had inhibitory effect over *E. coli* O157:H7 which is one of the most important foodborne pathogens causing serious health problems almost in all regions of the world. It is mainly found in milk and meat products and have a low infectious dose (~50 CFU) (23). To our knowledge, there are few studies in the

literature about the effects of bacteriocins on *E. coli* O157:H7. Bacteriocins from *Enterococcus faecium*, *Pediococcus pentosaceus* (16), *L. mesenteroides* (24), *P. acidilactici* (25) have been shown as ineffective on *E. coli* O157:H7. There are some reports representing the inhibitory action of bacteriocins on this pathogen. For instance, Rodriguez *et al.* (26) tested the survival of *E. coli* O157:H7 in the presence of bacteriocin producing LAB in cheese during ripening. They found an inhibition after 30 days of storage when they used *Lc. lactis* CL2 which produces nisin and pediocin.

Antimicrobial activities of the isolates were also measured after 48 and 72 hours of the production against the same pathogens. It has been observed that the most of the strains did not show antibacterial effects after prolonged incubations, except *Bacillus* sp. GIT2 and *Bacillus* sp. ZBP10. Antimicrobials from *Bacillus* sp. GIT2 inhibited *B. cereus*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis*, and *S. Typhimurium* after 48 h and 72 h. Those from *Bacillus* sp. ZBP10 inhibited *B. cereus*, *E. coli* O157:H7, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa* and *S. Enteritidis* (Results are not shown).

Growths of the isolates were given in Table 3. As can be seen from the table, cell concentrations of the strains are distant from each other even though they were grown in the same conditions. *Bacillus* sp. ZGT9 had the highest cell concentration and *Bacillus* sp. GIT2 had the lowest. These results indicate that there is no correlation between cell concentration and antimicrobial production. Because *Bacillus* sp. ZGT9 was the bacterium having narrowest antibacterial spectrum that had shown inhibitory effect on only four pathogens (*B. cereus*, *E. coli* O157:H7, *P. aeruginosa*, *S. Typhimurium*). In a similar manner, *Bacillus* sp. GIT2 which has the lowest growth amongst the strains had the better zone of inhibition, as well as inhibition spectrum. Growth decreased at 48 h, as microorganisms entered death phase and continuous decrease have been observed at 72 h of the incubation.

Table 3. The growth of *Bacillus* isolates in nutrient broth measured as optical density.

Microorganism	Microbial growth (OD ₆₀₀)		
	24 h	48h	72 h
<i>Bacillus</i> sp. BAST2	4.87±0.25	3.00±0.3	3.22±0.17
<i>Bacillus</i> sp. BMZE4	4.62±0.05	3.40±0.02	2.99±0.13
<i>Bacillus</i> sp. GIT2	3.57±0.03	1.86±0.11	2.02±0.19
<i>Bacillus</i> sp. ZBP10	5.56±0.28	3.16±0.33	2.38±0.35
<i>Bacillus</i> sp. ZGT3	5.79±0.05	4.38±0.01	3.30±0.09
<i>Bacillus</i> sp. ZGT9	7.40±0.29	3.57±0.37	2.92±0.03

As *Bacillus* sp. GIT2 had possessed better inhibition zone against *L. monocytogenes* and *E. coli* O157:H7, we have chosen this bacterium to make further investigations on the relation of antimicrobials production with the growth. For this, periodical samples were taken and subjected to antibacterial activity measurements against *L. monocytogenes* and growth curve of the bacterium was constructed from the optical density measurements (Figure 1).

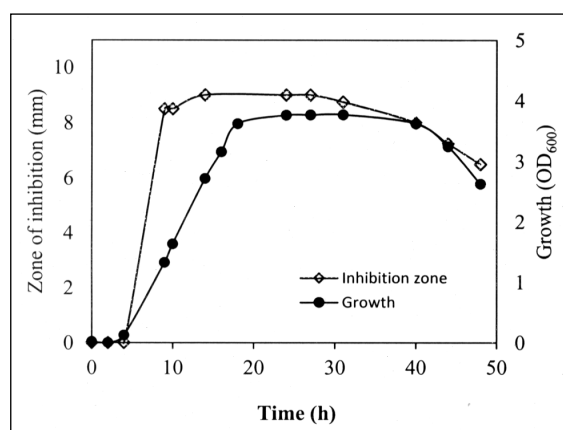


Figure 1. Relation of growth and antimicrobial activity of *Bacillus* sp. GIT2. *L. monocytogenes* was used as test organism for the determination of antimicrobial activity.

After 4 h of lag phase, the bacterium entered exponential phase at which production of antimicrobials have started. The first antimicrobial activity has been observed in the sample taken at the 9th hour of the growth. It almost reached to maximum during the exponential phase and retained until the end of the stationary phase (30th hour of the growth). Afterwards measured activities started to decrease. According to the results, it can be suggested that production of antimicrobials is associated with growth. Most of the bacteria, including LAB and *Bacillus* strains, generally produce bacteriocins as primary metabolites (21, 27-30). Decrease in the antimicrobial activity attributed to the proteolytic enzymes produced during the growth of the cells (3).

CONCLUSIONS

Antibacterial activities of some *Bacillus* strains which were isolated in our lab have been determined. It has been observed that they had relatively wide antimicrobial activity spectrum. Unlike most of the bacteriocin producing bacteria,

they inhibited Gram negative pathogens including *E. coli* O157:H7 and *S. Typhimurium*. This feature makes these bacteria a potential for use as biopreservatives. However further investigations are necessary for the characterization of the antimicrobials from those strains.

REFERENCES

1. Anthony T, Rajesh T, Kayalvizhi N, Gunasekaran P. 2009. Influence of medium components and fermentation conditions on the production of bacteriocin(s) by *Bacillus licheniformis* AnBa9. *Bioresource Technol*, 100, 872-877.
2. Pattnaik P, Grover S, Batish VK. 2005. Effect of environmental factors on production of lichenin, a chromosomally encoded bacteriocin-like compound produced by *Bacillus licheniformis* 26L-10/3RA. *Microbiol Res*, 160, 213-218.
3. He L, Chen W, Liu Y. 2006. Production and partial characterization of bacteriocin-like peptides by *Bacillus licheniformis* ZJU12. *Microbiol Res*, 161, 321-326.
4. Altuntas EG, Kocan D, Cosansu S, Ayhan K, Juneja VK, Materon L. 2012. Antibiotic and bacteriocin sensitivity of *Listeria monocytogenes* strains isolated from different foods *Food Nutr Sci*, 3, 363-368.
5. Mandal V, Sen SK, Mandal NC. 2008. Optimized culture conditions for bacteriocin production by *Pediococcus acidilactici* LAB 5 and its characterization. *Indian J Biochem Bio*, 45, 106-110.
6. Wang HT, Chen IH, Hsu JT. 2012. Production of bacteriocin from ruminal bacterium *Ruminococcus albus* 7. *Biosci Biotech Bioch*, 76(1), 34-41.
7. Seatovic SL, Novakovic JSJ, Zavisic GN, Radulovic ZC, Jankulovic MDG, Jankov RM. 2011. The partial characterization of the antibacterial peptide bacteriocin G2 produced by the probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* G2. *J Serb Chem Soc*, 76(5), 699-707.
8. Meera NS, Devi MC. 2012. Partial characterization and optimization of parameters for Bacteriocin production by Probiotic Lactic acid bacteria. *J Microbiol Biotech Res*, 2(2), 357-365.
9. Cosansu S, Geornaras I, Ayhan K, Sofos JN. 2010. Control of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* 13 and its antimicrobial substance in a dry fermented sausage sucuk and in turkey breast. *J Food Nutr Res*, 49(4), 206-214.

10. Yaddula RK, Venkata RK. 2011. Purification and characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from fermented Milk products. *Int J Adv Pharm Res*, 2(4), 107-118.
11. Sriannual S, Yanagida F, Lin LH, Hsiao KN, Chen YS. 2007. Weissellicin 110, a newly discovered bacteriocin from *Weissella cibaria* 110, isolated from plaasom, a fermented fish product from Thailand. *Appl Environ Microb*, 73(7), 2247-2250.
12. Yamamoto Y, Togawa Y, Shimosaka M, Okazaki M. 2003. Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RJ-11. *Appl Environ Microb*, 69(10), 5746-5753.
13. Cosansu S, Kuleasan H, Ayhan K, Materon L. 2007. Antimicrobial activity and protein profiles of *Pediococcus* spp. isolated from Turkish "Sucuk". *J Food Process Pres*, 31, 190-200.
14. Tuncer Y, Ozden B. 2010. Partial biochemical characterization of nisin-like bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* YBD11 isolated from boza, a traditional fermented Turkish beverage. *Rom Biotech Lett*, 15(1), 4940-4948.
15. Daba H, Pandian S, Gosselin JF, Simard RE, Huang J, Lacroix C. 1991. Detection and activity of a Bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl Environ Microb*, 57(12), 3450-3455.
16. Pinto AL, Fernandes M, Pinto C, Albano H, Castilho F, Teixeira P, Gibbs PA. 2009. Characterization of anti-Listeria bacteriocins isolated from shellfish: Potential antimicrobials to control non-fermented seafood. *Int J Food Microbiol*, 129(1), 50-58.
17. Cherif A, Rezgui W, Raddadi N, Daffonchio D, Boudabous A. 2008. Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Entomocidus* HD110. *Microbiol Res*, 163, 684-692.
18. Khalil R, Elbahloul Y, Djadouni F, Omar S. 2009. Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus megaterium* 19 strain. *Pak J Nutr*, 8(3), 242-250.
19. Chopra L, Singh G, Choudhary V, Sahoo DK. 2014. Sonorensin: an antimicrobial peptide, belonging to the heterocycloanthracin subfamily of bacteriocins, from a new marine isolate, *Bacillus sonorensis* MT93. *Appl Environ Microb*, 80(10), 2981-2990.
20. Çadirici BH, Çitak S. 2005. A comparison of two methods used for measuring antagonistic activity of lactic acid bacteria. *Pak J Nutr*, 4 (4), 237-241.
21. Sharma N, Kapoor R, Gautam N, Kumari R. 2011. Purification and characterization of bacteriocin produced by *Bacillus subtilis* R75 isolated from fermented chunks of mung bean (*Phaseolus radiatus*). *Food Technol Biotech*, 49(2), 169-176.
22. Kuleasan H, Çakmakçı ML. 2003. Characteristics of bacteriocins, application in food microbiology and their potential usage in the future. *GIDA* 28(2), 123-129.
23. Lim JY, Yoon JW, Hovde CJ. 2010. A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *J Microbiol Biotechnol*, 20(1), 5-14.
24. Xiraphi N, Georgalaki M, Rantsiou K, Cocolin L, Tsakalidou E, Drosinos EH. 2008. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* E131. *Meat Sci*, 80, 194-203.
25. Albano H, Todorov SD, van Reenen CA, Hogg T, Dicks LMT, Teixeira P. 2007. Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from "Alheria", a fermented sausage traditionally produced in Portugal. *Int J Food Microbiol*, 116, 239-247.
26. Rodriguez E, Calzada J, Arques JL, Rodriguez JM, Nunez M, Medina M. 2005. Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. *Int Dairy J*, 15, 51-57.
27. Tolinacki M, Kojic M, Lozo J, Vidojevic AT, Topisirovic L, Fira D. 2010. Characterization of the bacteriocin-producing strain *Lactobacillus paracasei* Subsp. *paracasei* BGUB9. *Arch Biol Sci*, 62(4), 889-899.
28. Altuntas EG, Cosansu S, Ayhan K. 2010. Some growth parameters and antimicrobial activity of a bacteriocin-producing strain *Pediococcus acidilactici* 13. *Int J Food Microbiol*, 141, 28-31.
29. Georgalaki MD, Van den Berghe E, Kritikos D, Devreese B, Van Beeumen J, Kalantzopoulos G, De Vuyst L, Tsakalidou E. 2002. Macedocin, a food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *Appl Environ Microb*, 68, 5891-5903.
30. Moreno MRF, Leisner JJ, Tee LK, Ley C, Radu S, Rusul, G, Vancannet M, De Vuyst L. 2002. Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. *J Appl Microbiol*, 92, 147-157.

DONMUŞ DEPOLANAN TAVUK BURGERLERDE YEŞİL ÇAY EKSTRAKTININ LİPOLİTİK DEĞİŞİMLER VE MİKROBİYEL İNHİBİSYON ÜZERİNE ETKİSİ

Eda Demirok Soncu**¹, Güliz Haskaraca¹, Esra Selin Davarcıoğlu², Nuray Kolsarıcı¹

¹Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Dışkapı, Ankara

²Bolu Belediyesi, Veteriner İşleri Müdürlüğü, Bolu

Geliş tarihi / Received: 05.01.2016

Kabul tarihi / Accepted: 20.02.2016

Özet

Tavuk burgerlerde donmuş depolamada meydana gelen lipolitik reaksiyonlar ve mikrobiyel aktivite ürün raf ömrünü kısıtlayan ve kalite kayıplarına neden olan değişimlerdir. Bu noktadan hareketle, bu araştırma kapsamında, burgerlerin kaplanmasında kullanılan sıvı ve kuru sosa ilave edilen yeşil çay ekstraktının (YÇE-%0, %0.5, %1.5, %3) 8 ay süreyle donmuş depolanan (-18°C) tavuk burgerlerde lipolitik reaksiyonları ve mikrobiyel aktiviteyi sınırlandırması amaçlanmıştır. YÇE, ilk 3 ay boyunca oksidasyon reaksiyonları üzerine etkili değilken, 4. ay ve sonrasında oksidatif reaksiyonları sınırlayıcı bir etki göstermiştir ($P<0.05$). YÇE kullanımıyla, daha koyu ve daha sarı renkte ürün kaplaması elde edilmiş ($P<0.05$) ancak bu değişim duyuşsal panelde negatif yönde değerlendirilmemiştir. %0.5 YÇE içeren burger, %1.5 ve %3 YÇE içeren burgerlere kıyasla daha yüksek duyuşsal puan almıştır ($P<0.05$). Tüketime hazır ürün olmaları ve donmuş depolama sebebiyle burgerlerde mikrobiyel aktivite gözlenmemiştir. Özetle, YÇE, raf ömrü uzun ve kaliteli tavuk burger üretmek amacıyla kullanılabilir doğal ve etkili antioksidanlardan biridir.

Anahtar kelimeler: Tavuk burger, yeşil çay ekstraktı, donmuş depolama, TBARS, antioksidan bileşik, kaplamalı tavuk ürünleri, mikrobiyel aktivite

THE EFFECT OF GREEN TEA EXTRACT AGAINST LIPOLYTIC CHANGES AND INHIBITION OF MICROBIAL ACTIVITY IN FROZEN STORED CHICKEN BURGER

Abstract

Lipolytic reactions and microbial activity occurred in chicken burgers during frozen storage cause a decrease in shelf life and quality losses. From this point of view, the purpose of the current study was to mitigate lipolytic reactions and microbial activity in chicken burger stored at -18°C for 8 months by adding green tea extract (GTE-0%, 0.5%, 1.5%, 3%) into batter and bread. Although GTE did not found to be effective in lipid oxidation reactions during the first three months of frozen storage, it restricted lipid oxidation at the fourth month and later ($P<0.05$). Darker and more yellowness color were observed on the outer surface of burger as a result of GTE usage, but this color change did not evaluate as a fault in the sensory panel. Chicken burger with 0.5% GTE had higher sensory scores than those of with 1.5% and 3% GTE ($P<0.05$). Microbial growth did not observe in ready to eat burgers due to frozen storage and cooking process. In brief, GTE is suggested as a natural and effective antioxidant to produce chicken burger with long shelf life and high quality.

Keywords: Chicken burger, green tea extract, frozen storage, TBARS, antioxidant compound, coated chicken meat products, microbial activity

* Bu çalışma 16-17 Ekim 2014 tarihleri arasında Tokat'ta düzenlenen "Et Ürünleri Üretiminde Inovasyon" konulu 3. Et Ürünleri Çalıştay'ında sözlü sunum olarak sunulmuştur. *This study was presented as a oral presentation at 3rd Meat Products Workshop "Innovation in Production of Meat Products" held on 16-17 September 2014 in Tokat.*

** Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ edemirok@eng.ankara.edu.tr,

☎ (+90) 0312 203 3300,

☎ (+90) 0312 317 8711

GİRİŞ

Son zamanlarda değişen yaşam koşulları, iş hayatında artan zaman ve kültürel değişikliklere bağlı olarak, tüketicilerin ayaküstü (fast food) ürünlere olan talepleri de hızla artmaktadır (1). Özellikle, kısa sürede tüketime hazırlanabilme olanağı sunan kaplamalı tavuk ürünleri, ayaküstü gıdalar içerisinde her yaşta tüketiciye hitap eden popüler ürün gruplarından birisidir (2). Türkiye’de 2012 yılında yaptığımız bir çalışmada, Ankara, Bolu, Çorum, İstanbul, Manisa, Sakarya illerinden rastgele seçilen bireylerin katıldığı bir anket ile tüketicilerin kaplamalı tavuk eti tüketim algıları ve satın alma alışkanlıkları belirlenmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre ankete katılan bireylerin %70.25’inin kaplamalı tavuk ürünlerini tükettiği ve tüketilen kaplamalı tavuk ürünlerinden en yüksek payın %77.48 ile tavuk burgere ait olduğu ifade edilmiştir (3).

Tavuk burger üretim prosesinin son aşaması donmuş depolamadır. Bu noktada, tavuk burgerlerin raf ömrünü sınırlandıran en önemli faktör lipit oksidasyonudur. Lipit oksidasyonu sonucunda üründe karsinojenik bileşiklerin yanı sıra ürünün duyuusal kabul edilebilirliğini etkileyen ransit koku ve tada neden olan bileşikler de oluşur. Ayrıca, ürünün fonksiyonel özelliklerinde, renginde ve tekstüründe değişim meydana gelirken, besinsel değerlerinde de kayıp açığa çıkar (4, 5).

Uzun yıllardan beri gıdalarda soğuk ve donmuş depolama esnasında meydana gelen lipit oksidasyonunu engellemek amacıyla antioksidanlar kullanılmaktadır. Son dönemde yapılan çalışmalarda, karsinojenik etkilerinden dolayı sentetik antioksidanların insan sağlığı açısından zararlı olduğu bildirilmiş ve buna bağlı olarak tüketici talepleri de gıdalarda sentetik antioksidanlar yerine doğal antioksidanların kullanımı yönünde değişmiştir (1, 6). Bu noktada, gıdaların yapısında bulunan polifenoller, hem kolay erişilebilirlikleri hem de güçlü antioksidatif etkileri nedeniyle önemli doğal antioksidanlardır (7). Yeşil çay ekstraktı da (YÇE) son zamanlarda gıdalarda sıklıkla kullanılan, popüler ve zengin kateşin içeriği nedeniyle güçlü antioksidan aktiviteye sahip doğal antioksidanlardan birisidir. Araştırmalar, gıda sistemlerinde özellikle et ve et ürünlerinde yeşil çay ve çay kateşinlerinin lipit oksidasyonunu engellemede veya azaltmada oldukça etkili olduğunu belirtirken (6, 8-14), bir grup çalışmada, yeşil çayın bileşiminde bulunan polifenollerin hem gram pozitif hem de gram negatif bakteriler üzerine antimikrobiyel etkiye de sahip olduğu bildirmiştir (9, 14-17).

Bu noktadan hareketle, et endüstrisi için önemli bir kalite problemi olan lipit oksidasyonunu tavuk burgerlerde engellemek amacıyla kaplamaya ilave edilen yeşil çay ekstraktının 8 aylık donmuş depolama süresince etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca tavuk burgerlerde donmuş depolama süresi boyunca meydana gelen mikrobiyolojik ve duyuusal değişimlerde araştırma kapsamında incelenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Tavuk Burger Üretimi

Tavuk burgerlerin üretimi Türkiye’de ticari olarak üretim yapan bir işletmede (Beypi Beypazarı Tarımsal Üretim Pazarlama Sanayi ve Ticaret A.Ş.) gerçekleştirilmiştir. Tavuk burger üretimi için ilk önce ürüne özgü et hamuru hazırlanmış ve ardından hamura burger formu verilmiştir. Burgerlerin kaplanması için kullanılmak üzere dört farklı oranda yeşil çay ekstraktı (%0; %0.5; %1.5 ve %3 YÇE) içerikli sıvı sos ve kuru sos hazırlanmıştır. Sıvı sos, 1 kg toz halindeki materyale gerekli miktarda YÇE eklendikten sonra 1600 ml su içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır. Sıvı sos, buğday unu, buğday nişastası, tuz ve bezelye lifi içerirken, kuru sosun bileşimi buğday unu, tuz, difosfat (E450), sodyum karbonat (E500), asetik asit (E260), baharat, maya (*S. cerevisiae*), L-sistein (E920), biber ekstraktı (E160c) ve ayçiçek yağıdır. YÇE (Guardian green tea extract 20S) Burkim Kimya San. Tic. A.Ş. aracılığıyla Danisco (Kopenhag, Danimarka) firmasından satın alınmış ve fenolik madde içeriği Çelik ve Gökmen (18) tarafından bildirilen yöntemle göre HPLC-MS kullanılarak belirlenmiştir. Bir sonraki aşamada, formlanmış burgerler manuel olarak ilk önce sıvı sos ardından kuru sos ile kaplanarak derin yağda kızartma hattına yerleştirilmiş ve 190°C’de 45 sn süreyle ayçiçeği yağında kızartılmıştır. Kızartma sonrası, burgerler %80 buhar altında 160°C’de 3 dk 15 sn süreyle buharlı fırında pişirilmiştir. Son olarak, burgerler -30°C’deki spiral dondurucuda 50 dk içerisinde orta nokta sıcaklığı -18°C’ye ulaşıncaya kadar dondurulmuştur. Donmuş burgerler yüksek bariyerli hazır tabaklara yerleştirilerek ambalajlanmış, soğuk zincir kırılmadan Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Et İşletmesi’ne getirilmiş ve -18°C’de 8 ay süreyle depolanmıştır. Deneme 2 tekerrürlü olarak kurulmuş ve donmuş depolama sürecinde mikrobiyolojik ve oksidatif değişimleri incelemek amacıyla aylık periyotlarda yapılan analizler her bir tekerrür için iki paralelli olarak yürütülmüştür. Genel bileşim, pH ve

serbest yağ asitliği (SYA) analizleri bir doğrayıcı (Tefal Smart, France) kullanılarak homojen hale getirilen örneklerde yapılmıştır. TBARS analizi ise burgerlerin kaplamaları sıyrıldıktan sonra et kısmında yürütülmüştür. Ayrıca burgerlerde L^* , a^* , b^* renk ölçümü, mikrobiyolojik analiz ve duyuşal değerlendirme de yapılmıştır.

Genel Bileşim ve pH Analizi

Örneklerin genel bileşimlerini belirlemek amacıyla homojen örneklerde, nem analizi (950.46), Soxhelet ekstraksiyon yöntemine göre yağ analizi (991.36), Kjeldahl yöntemine göre protein analizi (955.04) ve kül analizi (920.153) yapılmıştır (19). Ayrıca, örneklerin pH değeri de belirlenmiştir (20).

Serbest Yağ Asitliği (SYA) Analizi

Bligh ve Dyer (21) tarafından rapor edilen soğuk ekstraksiyon yöntemine göre homojen et örneğinden ham yağ elde edilmiş ve SYA miktarı 10 mL etil alkol içerisinde çözündürülen 1 gram yağda 0.05 N NaOH ile titre edilerek belirlenmiştir. Burgerlerdeki SYA miktarı oleik asit cinsinden % olarak hesaplanmıştır (22).

TBARS Analizi

TBARS analizi Mielenik ve ark. (23) tarafından bildirilen yöntemine göre yapılmış ve sonuçlar TEP (1,1,3,3 tetraetoksi propan) standardı kullanılarak çizilen kurve yardımı ile burgerlerin et kaplama oranları da dikkate alınarak mg malondialdehide (MA)/kg olarak hesaplanmıştır.

L^* , a^* , b^* Renk Değerlerinin Ölçümü

L^* , a^* , b^* renk ölçümü burgerlerin dış yüzeylerinin 6 farklı noktasından beyaz kalibrasyon plakası (Referans no: 1353123; $Y=92.70$; $x=0.3133$; $y=0.3193$) kullanılarak kalibre edilmiş Minolta kolorimeter (CR 300, Japan) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. $+L^*$ açıklık, $-L^*$ koyuluk, $+a^*$ kırmızılık, $-a^*$ yeşillik, $+b^*$ sarılık ve $-b^*$ mavilik koordinatlarını simgelemektedir.

Mikrobiyolojik Analiz

10 g burger örneği steril homojenizasyon poşeti içerisinde 90 mL fizyolojik tuzlu su kullanılarak homojen hale getirilmiş ve uygun dilüsyonlar hazırlanmıştır. Toplam mezofil aerob bakteri (TMAB) için plate count agarda (PCA) 28°C'de 48 saat, toplam psikrofil bakteri için PCA'da 6.5°C'de 10 gün, *Staphylococcus aureus* için Baird Parker Agarda 37°C'de 24 saat, toplam koliform grup bakteri için VRB Agarda 37°C'de 24 saat, *E. coli* için Chromocult TBX Agarda 44°C'de 18-24 saat, *Pseudomonas* için Cetrimide Agarda 37°C'de 48 saat, toplam maya küf sayısı için Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC)

Agarda 28°C'de 4-5 gün inkübasyondan sonra gelişen koloniler değerlendirmeye alınmış ve sonuç log KOB/g cinsinden hesaplanmıştır. Ayrıca, burgerlerde ISO 11290 yöntemine göre *Listeria monocytogenes* ve ISO 6579 yöntemine göre de *Salmonella* için var/yok testi yapılmıştır (24).

Duyusal Değerlendirme

Burgerlerin duyuşal değerlendirmesi aylık periyotlarda Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Duyusal Analiz Laboratuvarında deneyimli 8 kişiden oluşan bir ekip tarafından yapılmıştır. Burgerler rastgele belirlenen 3 haneli sayılarla kodlanarak, 360 W'da 2 dk süreyle mikrodalga fırında (HMT84G451, Bosch, Germany) ısıtıldıktan sonra sunum kapları içerisinde panelistlere sunulmuştur. Örnek grupları arasında bir önceki örnekten ağızda kalan tadı gidermek amacıyla yağsız tuzsuz kraker ve su kullanılmıştır. Panelistlerden burgerlerin duyuşal özelliklerini belirlemek için 9'lu hedonik skala (9=Mükemmel, 1=Son derece kötü) kullanarak puanlama testi yapmaları ve farklı konsantrasyonda YÇE içeren grupların görünüş, renk, koku, lezzet, tekstür ve genel beğeni parametreleri açısından değerlendirmeleri istenmiştir.

İstatistik Değerlendirme

Araştırma, tesadüf blokları faktöriyel deneme deseninde tekrarlanan ölçümler düzenine göre kurulmuştur. Gruplar arasında incelenen özellik bakımından fark olup olmadığı SPSS 15 paket programı kullanılarak belirlenmiş ve gruplar arasındaki farklılığın önemlilik düzeyi ($\alpha=0.05$) Duncan's çoklu karşılaştırma testi kullanılarak ölçülmüştür.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Donmuş depolama sürecinde lipolitik reaksiyonları engellemek amacıyla kaplamaya %0; %0.5; %1.5 ve %3 oranlarında YÇE ilave edilerek üretilen tavuk burgerlerin besinsel bileşimine ait değerler Çizelge 1'de verilmiştir. %0; %0.5; %1.5 ve %3 oranlarında YÇE içeren tavuk burgerlerin sırasıyla nem değerleri %54.55; %50.86; %49.94 ve %49.45, kül içerikleri %2.48; %2.94; %3.28 ve %3.28, protein değerleri %11.64; %10.09; %10.33 ve %10.60 ve yağ değerleri %12.36; %11.93; %11.26 ve %12.35 olarak belirlenmiştir. 8 aylık donmuş depolama periyodu boyunca tavuk burgerlerin pH değerindeki değişimler de incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 2'de verilmiştir. Burgerlerin üretim sonrası pH değerleri 6.59-6.63 arasında ölçülürken, 8 aylık depolama sonunda bu değer 6.53-6.55 aralığında ölçülmüştür. 8 aylık ölçümlere ilişkin ortalama değerler incelendiğinde,

kaplamaya YÇE ilavesinin ve depolama süresinin ürünlerin pH değerlerini istatistiksel olarak önemli oranda etkilemediği tespit edilmiştir ($P>0.05$).

Donmuş depolama süresince lipitlerde meydana gelen değişimler lipoliz ve oksidasyon reaksiyonları olarak tanımlanır. Lipoliz reaksiyonları, trigliseritler ile fosfolipitlerin hidrolizi olarak bilinir ve lipoliz reaksiyonları sonucunda oksidasyon reaksiyonlarının substratı olan serbest yağ asitleri açığa çıkar (25). Tavuk burgerlerin SYA değerleri üzerine 8 aylık depolama süresi istatistik olarak önemli bulunmuş

ve değişimler Çizelge 2'de gösterilmiştir ($P<0.05$). Bu değişimler ilk 3 ay boyunca azalış 4. aydan itibaren ise artış şeklinde ortaya çıkmıştır. Benzer şekilde, yapılan bir araştırmada, 3 gün süreyle 4°C'de depolanan kaplamalı tavuk ürünlerinde de SYA değerlerinin artış ve azalış sergilediği belirlenmiştir (26). Burgerlerin kaplamalarına ilave edilen YÇE ise üründe gelişen lipoliz reaksiyonları üzerine etkili olmamış ve aynı depolama periyodunda %0; %0.5; %1.5 ve %3 YÇE içeren örnek gruplarının SYA değerleri arasında istatistik

Çizelge 1. Tavuk burgerlerin besinsel bileşimi
Table 1. Proximate composition of chicken burgers

Tavuk burgerler Chicken burgers	Nem (%) Moisture (%)	Kül (%) Ash (%)	Protein (%) Protein (%)	Yağ (%) Fat (%)
%0 YÇE/0% GTE	54.55±0.26	2.48±0.04	11.64±2.26	12.36±2.23
%0.5 YÇE/0.5% GTE	50.86±0.53	2.94±0.35	10.09±1.00	11.93±0.73
%1.5 YÇE/1.5% GTE	49.94±0.63	3.28±0.05	10.33±1.22	11.26±1.36
%3 YÇE/3% GTE	49.45±1.90	3.28±0.67	10.60±1.67	12.35±1.74

Çizelge 2. Depolama periyodu boyunca tavuk burgerlerin pH, SYA ve TBARS değerlerindeki değişim
Table 2. The changes in pH, FFA, and TBARS values of chicken burgers during frozen storage

Tavuk burgerler / Chicken burgers						
	Aylar Months	%0 YÇE 0% GTE	%0.5 YÇE 0.5% GTE	%1.5 YÇE 1.5% GTE	%3 YÇE 3% GTE	Ort±SH Mean±SEM
pH değeri / pH value	0	6.63±0.05	6.61±0.08	6.59±0.09	6.59±0.09	6.60±0.03
	1	6.60±0.04	6.60±0.05	6.59±0.05	6.59±0.05	6.59±0.02
	2	6.56±0.03	6.53±0.03	6.53±0.04	6.53±0.04	6.54±0.01
	3	6.54±0.01	6.56±0.02	6.57±0.02	6.56±0.02	6.56±0.01
	4	6.52±0.03	6.55±0.07	6.51±0.05	6.52±0.05	6.53±0.02
	5	6.55±0.02	6.56±0.01	6.54±0.01	6.55±0.01	6.55±0.01
	6	6.57±0.08	6.53±0.05	6.53±0.05	6.54±0.06	6.54±0.02
	7	6.59±0.03	6.59±0.01	6.60±0.01	6.58±0.01	6.59±0.01
	8	6.53±0.02	6.54±0.04	6.55±0.03	6.55±0.03	6.54±0.01
Serbest yağ asitliği (SYA-%) Free fatty acid (FFA-%)	0	0.53±0.13	0.52±0.01	0.52±0.03	0.62±0.08	0.55±0.03 ^A
	1	0.30±0.04	0.27±0.13	0.31±0.13	0.22±0.07	0.28±0.04 ^C
	2	0.38±0.13	0.39±0.20	0.28±0.18	0.30±0.17	0.34±0.07 ^{BC}
	3	0.29±0.14	0.36±0.18	0.37±0.16	0.27±0.13	0.32±0.06 ^C
	4	0.46±0.04	0.63±0.13	0.45±0.02	0.44±0.06	0.49±0.04 ^{AB}
	5	0.60±0.01	0.52±0.05	0.40±0.01	0.47±0.15	0.50±0.04 ^{AB}
	6	0.42±0.01	0.51±0.03	0.72±0.23	0.67±0.23	0.58±0.08 ^A
	7	0.55±0.11	0.75±0.14	0.61±0.13	0.54±0.07	0.61±0.06 ^A
	8	0.53±0.01	0.49±0.01	0.49±0.04	0.52±0.02	0.51±0.02 ^{AB}
TBARS değeri (mg MA/kg) TBARS value (mg MA/kg)	0	0.73±0.01	0.71±0.01	1.01±0.01	0.78±0.01	0.81±0.05 ^{DE}
	1	1.14±0.01	1.24±0.01	1.05±0.01	1.06±0.01	1.12±0.03 ^{AB}
	2	0.99±0.01	0.69±0.01	0.59±0.01	0.64±0.01	0.73±0.06 ^E
	3	1.05±0.18	1.04±0.01	1.04±0.07	1.08±0.01	1.05±0.04 ^{ABC}
	4	1.13±0.05	0.92±0.22	0.90±0.24	0.75±0.14	0.92±0.09 ^{CD}
	5	1.40±0.25	1.12±0.17	1.06±0.17	0.93±0.34	1.13±0.11 ^A
	6	1.17±0.04	1.00±0.30	0.81±0.19	0.82±0.24	0.95±0.10 ^{BCD}
	7	0.93±0.14	0.77±0.16	0.75±0.24	0.76±0.30	0.80±0.09 ^{DE}
	8	1.04±0.10	0.84±0.12	0.96±0.16	0.82±0.14	0.92±0.06 ^{CD}

A,B,C,D,E: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan aylar arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ($P<0.05$).

A,B,C,D,E: Mean values with different uppercase letters in the same column are different due to the main effect of storage time ($P<0.05$).

Ort±SH: Ortalama±Standard hata, Mean±SEM: Mean±Standard error of the mean

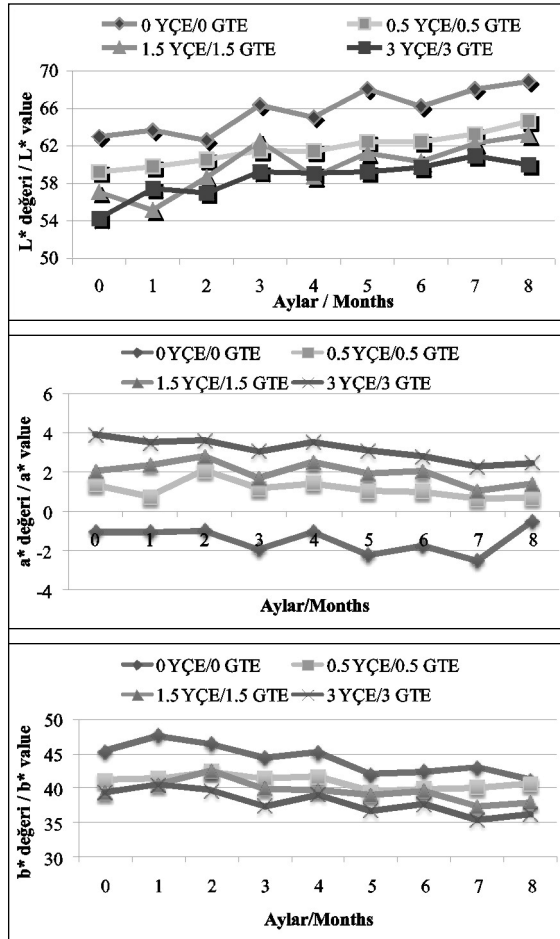
olarak bir farklılık gözlenmemiştir ($P>0.05$).

Lipoliz reaksiyonları sonucu açığa çıkan ya da etin yapısında bulunan serbest yağ asitlerinin moleküler oksijen ile reaksiyona girmesi sonucu otokalik olarak gelişen lipit oksidasyonu üründe karsinojenik bileşiklerin yanı sıra kalite kayıpları ile sonuçlanır. TBARS analizi de, et ve et ürünlerinde meydana gelen lipit oksidasyon düzeyini ölçmek amacıyla uzun yıllardan beri kullanılan hassas bir yöntemdir (27, 28). Çizelge 2'de tavuk burgerlerin 8 aylık donmuş depolama periyodu boyunca TBARS değerlerindeki değişim verilmiştir. Başlangıçta (0. ayda) 0.73-1.01 mg MA/kg aralığında değişen TBARS değeri, 8. ayın sonunda 0.82-1.04 mg MA/kg aralığında bulunmuştur. Donmuş depolama süresince aylık ölçümlerde TBARS değerinde istatistik olarak önemli düzeyde değişimler gözlenmiştir ($P<0.05$). Bununla birlikte 4. ay ve sonrasında elde edilen TBARS değerleri incelendiğinde YÇE içermeyen burgerin TBARS değerinin, YÇE içeren burgerlerin TBARS değerine kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç, kaplamaya YÇE ilavesinin, donmuş depolama süresince tavuk burgerlerde lipit oksidasyon reaksiyonlarını sınırlandırdığını göstermektedir. Benzer şekilde araştırmacılar, aerobik koşullarda, 4°C'de, 616 lux floresan ışık altında 10 gün depolanan domuz, sığır eti ve tavuk köftelerinde (8, 29), 700 lux floresan ışık altında 7 gün ya da 620 lux floresan ışık altında 9 gün depolanan burgerlerde (9, 13) ve aerobik koşulların yanı sıra MAP ambalajda 4°C'de 616 lux ışık altında 7 gün süreyle depolanan köftelerde (12) YÇE'nin bileşiminde bulunan kateşinlerin lipit oksidasyonunu engellediğini ifade etmiştir. Yapılan çalışmalar, YÇE'nin lipit oksidasyon reaksiyonlarını inhibisyon mekanizmasını YÇE'nin yapısında yer alan benzen halkasının serbest radikallerle reaksiyona girmesi, kateşinlerin zincir oksidasyon reaksiyonlarını durdurması ya da metal iyonları ile şelat oluşturması olarak açıklamaktadır (6). Çalışmada kullanılan YÇE'nin fenolik madde dağılımı 1.90 mg/g gallik asit, 0.24 mg/g tearubigin, 6.61 mg/g gallokateşin (GC), 0.14 mg/g teofilin, 25.83 mg/g epigallokateşin (EGC), 18.62 mg/g kafein, 0.75 mg/g epikateşin (EC), 124.01 mg/g epigallokateşin gallat (EGCG) ve 20.09 mg/g epikateşin gallat (ECG) olarak belirlenmiştir. Bu bileşikler, antioksidan etki düzeyleri açısından $ECG>EGCG>EGC>EC$ şeklinde sıralanmakta olup, epikateşin ve kateşin ise lipit sistemlerinde güçlü antioksidatif özellik göstermektedir (6). He ve Shahidi (10) de yürüttükleri araştırmada, 4°C'de 7 gün boyunca depolanan balık eti model sisteminde lipit

oksidasyonunu inhibe etmek amacıyla ECG, EGCG ve EGC kullanımının sentetik antioksidanlara kıyasla daha başarılı olduğunu belirlemişlerdir. Bu bilgiler doğrultusunda, YÇE'nin bileşiminde tanımlanan kateşinlerin donmuş depolama süresince burgerlerde gelişen oksidasyon reaksiyonları üzerine etkili olduğu ifade edilebilir.

Renk tüketiciler için ürünün kabul edilebilirliği açısından önemli bir kalite parametresi olup (7), özellikle kaplamalı tavuk ürünlerinin karakteristik amber renginin donmuş depolama süresince korunması bu noktada önem taşımaktadır. Tavuk burgerlerin dış yüzey L^* , a^* , b^* renk değerlerine ilişkin grafik Şekil 1'de verilmiştir. Aylık periyotlarda yapılan ölçümler, depolama boyunca L^* değerinde istatistik olarak önemli düzeyde bir artış olduğunu gösterirken, a^* ve b^* değerlerinde de önemli düzeyde bir azalış tespit edilmiştir ($P<0.05$). Bu çalışma kapsamında vurgulanması gereken diğer önemli noktalardan birisi de, kaplamaya ilave edilen YÇE'nin ürün rengi üzerine negatif etkisinin belirlenmiş olup olmamasıdır. Şekil 1'de verilen grafikler incelendiğinde, genel olarak YÇE içermeyen burgerlerin YÇE içeren burgerlere kıyasla daha yüksek L^* ve b^* değerlerine, daha düşük a^* değerine sahip olduğu görülebilir. Bu sonuç, kaplamaya YÇE ilavesinin daha koyu ve daha sarı renkli tavuk burger üretimine neden olduğunu göstermektedir. Ancak bu değişim, bir sonraki paragrafta da açıklandığı gibi duyuşal değerlendirmede orta düzeye yakın puanlar almış olmasına rağmen kabul edilemeyecek düzeyde değildir. Benzer şekilde araştırmacılar, tavuk burgerlere üzüm posası ilavesinin ürün rengini değiştirdiğini ancak bu değişimin duyuşal panelde ürünün kabul edilebilirliği üzerine etkili olmadığını bildirmiştir (7).

Tavuk burgerlerin duyuşal değerlendirmesinde panelistler tarafından verilen ortalama beğeni puanları Çizelge 3'de yer almaktadır. 8 aylık donmuş depolama süresince burgerlere verilen puanlar çok iyi (8.00) ve orta (5.00) düzeyinde değişim göstermiştir ve 8. ayın sonunda tüm burger grupları tüketilebilir düzeyde puan almıştır. Kaplamaya ilave edilen YÇE'nin oksidasyon reaksiyonlarını sınırlandırmasına bağlı olarak ürünün duyuşal özelliklerinde kötü tat ve koku oluşumuna rastlanmamıştır. Ancak, kaplamaya YÇE ilavesine bağlı ürün renginde açığa çıkan ve enstrümental olarak ölçülen değişim duyuşal analizde beğeni puanlarına yansımış ve artan YÇE konsantrasyonuna bağlı olarak ortalama renk puanları da istatistik olarak önemli düzeyde azalış göstermiştir ($P<0.05$). Ayrıca, kaplamada YÇE kullanımına



Şekil 1. Depolama periyodu boyunca tavuk burgerlerin L^* , a^* , b^* renk değerlerindeki değişim
Figure 1. The changes in L^* , a^* , b^* values of chicken burgers during frozen storage

bağlı olarak, YÇE konsantrasyonu arttıkça ortalama görünüş, koku, lezzet, tekstür ve genel beğeni puanları da azalma göstermiştir ($P < 0.05$). YÇE içeren gruplar içerisinde en yüksek puanı %0.5 oranında YÇE içeren burger alırken en düşük puanı %3 oranında YÇE içeren burgerler almıştır. Ancak, genel olarak tüm grupların tüketiciler açısından duysal olarak kabul edilebilir puanlar aldığı da söylenebilir. Benzer şekilde, önemli bir şarap endüstrisi atığı olan üzüm posasının 9 ay boyunca vakum paketlenerek donmuş depolanan tavuk köftelerinde kullanımının renk, koku ve lezzet değişikliklerine neden olduğu ve bu değişimin duysal panelde gözlemlendiği Selani ve ark. (30) tarafından yapılan bir araştırma da belirtilmiştir. Genel olarak renkteki bu değişim, gıdaların ya da bitkilerin yapısında bulunan antioksidan bileşiklerin veya ekstraktlarının koyu renkli olması ile ilişkilendirilebilir.

Tavuk burgerlerde donmuş depolama boyunca mikrobiyel aktivite de değişim göstermiş ve başlangıçta yaklaşık $3.13 \log$ KOB/g olan TMAB sayısı azalış göstererek 8 aylık depolamanın sonunda tüm gruplarda $2.5 \log$ KOB/g'in altına ulaşmıştır. TMAB sayısındaki bu düşüşe kaplamaya ilave edilen YÇE'nin etkili olmadığı, donmuş depolama esnasında bakteri hücrelerinin soğuktan etkilenmesine bağlı olarak söz konusu azalışın ortaya çıktığı düşünülmektedir. Benzer şekilde, taze tavuk etinin -10°C ve -18°C 'de depolandığı bir çalışmada TMAB ve *Pseudomonas* sayılarında azalış rapor edilmiştir (31). Koliform, *E. coli* ve *S. aureus* sayısı depolama boyunca $< 1 \log$ KOB/g, toplam maya küf, *Pseudomonas* ve psikrofil bakteri sayısı da $< 2 \log$ KOB/g olarak belirlenmiştir. Ayrıca tavuk burgerlerde donmuş depolama periyodu boyunca *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella* ya rastlanmamıştır. Yashoda ve ark. (26) yürüttükleri bir çalışmada, benzer şekilde, 3 gün süreyle 4°C 'de depolanan kızarmış tavuk ürünlerinde koliform, *S. aureus*, enterococci ve küf oluşumuna rastlanmadığını bildirmiştir. Bu bağlamda, tavuk burgerlerin üretim prosesi gereği tüketime hazır pişmiş ürün olmasının, son üründe iyi bir mikrobiyel kaliteye sahip olmasında etkili en önemli faktör olduğu ifade edilebilir.

SONUÇ

Donmuş depolanan (-18°C) tavuk burgerlerde %0.5; %1.5 ve %3 oranında YÇE kullanımı oksidasyon reaksiyonlarını aynı düzeyde sınırlamıştır. Duyusal değerlendirme incelendiğinde de, YÇE içermeyen burgerlere en yakın, YÇE içeren burgerler içerisinde de en yüksek puana sahip grup %0.5 YÇE katkılı burgerlerdir. Bu bağlamda, oksidasyon reaksiyonlarını sınırlandırarak kalite kayıplarını önlemek, raf ömrünü artırmak ve duysal açıdan da YÇE içermeyen gruba en yakın ürünü üretmek amacıyla kaplamaya %0.5 oranında YÇE ilavesi önerilebilir. Ayrıca, lipoliz ve oksidatif reaksiyonlar üzerine daha etkili sonuçlar alabilmek için YÇE'nin et hamuruna katılması bir başka yöntem olarak düşünülebilir.

Teşekkür

Bu araştırma, TÜBİTAK tarafından desteklenen "Kaplama tavuk ürünlerinde heterosiklik aromatik amin ve akrilamid oluşumu, yeşil çay ekstraktı ve mikrodalga kullanımı ile azaltılma olanakları (No: 111-O-375)" konulu projenin bir parçasıdır. Ayrıca Beypi Beypazarı Tarımsal Üretim Pazarlama Sanayi ve Ticaret A.Ş.'ye verdiği teknik destekten dolayı teşekkür ederiz.

Çizelge 3. Depolama periyodu boyunca tavuk burgerlerin duyu özelliklerindeki değişimler
Table 3. The changes in sensory properties of chicken burgers during frozen storage

	Aylar Months	Görünüş Appearance	Renk Color	Koku Odor	Lezzet Taste	Tekstür Texture	Genel beğeni Overall acceptability
%0 YÇE / 0% GTE	0	7.62±0.24	7.42±0.29	6.85±0.72	7.54±0.04	7.73±0.02	7.54±0.17
	1	7.56±0.32	7.38±0.50	6.75±0.38	7.50±0.25	7.38±0.50	7.33±0.42
	2	7.81±0.19	7.83±0.46	7.33±0.05	7.67±0.04	7.32±0.25	7.55±0.02
	3	7.56±0.19	7.63±0.38	7.31±0.69	7.75±0.63	7.59±0.47	7.66±0.41
	4	7.31±0.00	7.38±0.38	7.31±0.07	7.66±0.03	7.22±0.28	7.47±0.03
	5	7.38±0.13	7.50±0.13	7.03±0.72	7.72±0.53	7.06±0.44	7.50±0.44
	6	7.69±0.31	7.50±0.50	7.19±0.44	7.81±0.57	7.41±0.22	7.97±0.09
	7	6.85±0.28	6.97±0.41	6.38±0.25	6.97±0.41	6.84±0.41	6.72±0.66
	8	7.50±0.13	6.94±0.06	6.81±0.69	7.56±0.57	7.47±0.28	7.56±0.50
	Ort±SH Mean±SEM	7.48±0.08 ^A	7.40±0.11 ^A	7.00±0.15 ^A	7.58±0.12 ^A	7.34±0.10 ^A	7.48±0.12 ^A
%0.5 YÇE / 0.5% GTE	0	6.60±0.03	6.72±0.16	6.62±0.24	6.84±0.41	6.88±0.75	6.85±0.28
	1	7.41±0.60	7.13±1.13	6.44±0.69	6.97±0.78	6.88±0.63	6.97±0.72
	2	7.21±0.08	7.25±0.19	6.26±0.12	6.63±0.51	6.71±0.29	6.86±0.36
	3	7.34±0.35	7.28±0.03	5.94±0.31	6.88±0.50	6.63±0.13	6.47±0.28
	4	6.75±0.50	6.63±0.38	5.91±0.72	6.69±0.81	6.72±0.41	6.56±0.75
	5	7.44±0.56	7.75±0.38	6.16±0.85	6.94±0.81	7.16±0.60	6.88±0.75
	6	7.03±0.35	6.81±0.07	6.13±0.25	6.84±0.04	6.63±0.00	6.78±0.03
	7	7.33±0.05	7.54±0.17	6.35±0.22	7.19±0.38	6.96±0.33	7.10±0.03
	8	6.81±0.69	6.63±0.75	5.56±0.69	6.41±0.66	6.38±0.44	6.41±0.66
	Ort±SH Mean±SEM	7.10±0.13 ^A	7.08±0.15 ^A	6.15±0.15 ^B	6.82±0.15 ^B	6.77±0.12 ^B	6.76±0.14 ^B
%1.5 YÇE / 1.5% GTE	0	7.02±0.17	7.25±0.25	6.51±0.63	7.14±0.15	7.38±0.25	7.10±0.04
	1	6.56±0.94	6.41±0.97	6.31±0.82	6.69±0.75	6.91±0.72	6.59±0.79
	2	6.96±0.33	6.74±0.12	6.74±0.55	6.81±0.12	6.57±0.43	6.74±0.12
	3	6.53±0.03	6.28±0.41	5.88±0.38	6.38±0.00	6.44±0.19	6.00±0.00
	4	6.69±0.44	6.47±0.16	5.88±0.63	6.31±0.57	6.50±0.38	6.41±0.47
	5	7.19±0.06	7.06±0.07	6.25±0.63	6.69±0.81	6.63±0.50	6.63±0.50
	6	6.00±0.50	6.47±0.72	6.25±0.38	6.78±1.03	6.25±0.63	6.44±0.75
	7	6.60±0.03	6.51±0.13	6.02±0.27	5.35±0.21	5.99±0.20	5.84±0.09
	8	6.63±0.88	6.25±0.50	5.75±0.63	6.06±0.57	6.38±0.25	6.13±0.57
	Ort±SH Mean±SEM	6.69±0.14 ^B	6.61±0.14 ^B	6.18±0.16 ^B	6.47±0.19 ^{BC}	6.56±0.14 ^{BC}	6.43±0.15 ^{BC}
%3 YÇE / 3% GTE	0	6.53±0.10	6.26±0.12	6.17±0.54	6.75±0.19	6.89±0.61	6.60±0.18
	1	5.63±0.00	5.63±0.25	6.13±0.25	6.25±0.06	5.69±0.06	6.25±0.19
	2	6.62±0.76	6.47±0.47	6.27±0.02	6.68±0.18	6.92±0.28	6.83±0.05
	3	6.19±0.56	6.25±0.75	5.97±0.22	6.13±0.25	6.38±0.25	6.16±0.22
	4	5.91±0.78	5.81±0.82	5.56±0.94	5.69±0.81	6.31±0.57	5.66±0.91
	5	7.00±0.13	7.13±0.25	6.41±0.35	6.50±0.63	6.47±0.28	6.47±0.47
	6	5.56±0.32	5.63±0.38	5.69±0.44	5.97±0.22	5.44±0.56	5.84±0.10
	7	6.64±0.65	6.41±0.66	5.85±0.72	5.33±0.96	6.07±1.07	5.4±0.97
	8	6.25±0.50	5.88±0.25	5.06±0.44	5.94±0.06	6.19±0.19	5.91±0.10
	Ort±SH Mean±SEM	6.26±1.17 ^C	6.16±0.16 ^B	5.90±0.16 ^B	6.14±0.16 ^C	6.26±0.17 ^C	6.13±0.16 ^C

^{A,B,C}: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan farklı oranda YÇE içeren gruplar arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ($P<0.05$).
^{A,B,C}: Mean values with different uppercase letters in the same column are different due to the main effect of GTE ($P<0.05$).
Ort±SH: Ortalama±Standard hata, Mean±SEM: Mean±Standard error of the mean

KAYNAKLAR

1. Mohamed HMH, Mansour HA. 2012. Incorporating essential oils of marjoram and rosemary in the formulation of beef patties manufactured with mechanically deboned poultry meat to improve the lipid stability and sensory attributes. *LWT Food Sci. Tech*, 45: 79-87.

2. Barbut S. 2012. Convenience breaded poultry meat products-New developments. *Trends in Food Sci. Tech*, 26: 14-20.

3. Yaldirak G, Kolsarıcı N. 2012. Tüketicilerin kaplama tavuk eti tüketim alışkanlıklarının belirlenmesi. 2. Et Ürünleri Çalıştayı "Kanatlı Et Ürünleri", 6-7 Aralık 2012, Manisa, Türkiye, 30.

4. Ladikos D, Lougovois V. 1990. Lipid oxidation in muscle foods: A review. *Food Chem*, 35: 295-314.
5. Cheng J, Ockerman HW. 2003. Effect of phosphate with tumbling on lipid oxidation of precooked roast beef. *Meat Sci*, 65: 1353-1359.
6. Gramza A, Korczak J. 2005. Tea constituents (Camellia sinensis L.) as antioxidants in lipid systems. *Trends in Food Sci Tech*, 16: 351-358.
7. Sáyago-Ayerdi SG, Brenes A, Go i I. 2009. Effect of grape antioxidant dietary fiber on the lipid oxidation of raw and cooked chicken hamburgers. *LWT Food Sci Tech*, 42: 971-976.
8. Tang S, Kerry JP, Sheehan D, Buckley DJ, Morrissey PA. 2001. Antioxidative effect of added tea catechins on susceptibility of cooked red meat, poultry and fish patties to lipid oxidation. *Food Res Int*, 34: 651-657.
9. Ba ón S, D az P, Rodr guez M, Garrido MD, Price A. 2007. Ascorbate, green tea and grape seed extracts increase the shelf life of low sulphite beef patties. *Meat Sci*, 77: 626-633.
10. He Y, Shahidi F. 1997. Antioxidant activity of green tea and its catechins in a fish meat model system. *J Agric Food Chem*, 45: 4262-4266.
11. Tang SZ, Kerry JP, Sheehan D, Buckley DJ, Morrissey PA. 2000. Dietary tea catechins and iron-induced lipid oxidation in chicken meat, liver and heart. *Meat Sci*, 56: 285-290.
12. Tang SZ, Ou SY, Huang XS, Li W, Kerry JP, Buckley DJ. 2006. Effects of added tea catechins on colour stability and lipid oxidation in minced beef patties held under aerobic and modified atmospheric packaging conditions. *J Food Eng*, 77: 248-253.
13. Mitsumoto M, O'Grady MN, Kerry JP, Buckley DJ. 2005. Addition of tea catechins and vitamin C on sensory evaluation, colour and lipid stability during chilled storage in cooked or raw beef and chicken patties. *Meat Sci*, 69: 773-779.
14. Perumalla AVS, Hettiarachchy NS. 2011. Green tea and grape seed extracts-Potential applications in food safety and quality. *Food Res Int*, 44: 827-839.
15. Sakanaka S, Juneja LR, Taniguchi M. 2000. Antimicrobial effects of green tea polyphenols on thermophilic spore-forming bacteria. *J Biosci Bioeng*, 90: 81-85.
16. Akiyama H, Fujii K, Yamasaki O, Oono T, Iwatsuki K. 2001. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob Chemother*, 48: 487-491.
17. Taylor PW, Hamilton-Miller JMT, Stapleton PD. 2005. Antimicrobial properties of green tea catechins. *Food Sci Technoll Bull*, 2: 71-81.
18. Çelik EE, Gökmen V. 2014. Investigation of the interaction between soluble antioxidants in green tea and insoluble dietary fiber bound antioxidants. *Food Res Int*, 63: 266-270.
19. AOAC. 2000. *Official methods of analyses*. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
20. Vural H, Öztan A. 1996. *Et ve Ürünleri Kalite Kontrol Laboratuvarı Uygulama Klavuzu*. H.Ü. Müh. Fak. Yayınları, Ankara, 236 s.
21. Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37: 911-917.
22. Mauriello G, Casaburi A, Blaiotta G, Villani F. 2004. Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of southern Italy. *Meat Sci*, 67: 149-158.
23. Mielnik MB, Olsen E, Vogt G, Adeline D, Skrede G. 2006. Grape seed extract as antioxidant in cooked, cold stored turkey meat. *LWT-Food Sci Tech*, 39: 191-198.
24. Halkman AK. 2005. *Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları*. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, 358 s.
25. Gandemer G. 2002. Lipids in muscles and adipose tissues, changes during processing and sensory properties of meat products. *Meat Sci*, 62: 309-321.
26. Yashoda KP, Modi VK, Mahendrakar NS, Sachindra NM, Narasimha Rao D. 2004. Quality characteristics of fried broiler chicken prepared by two processing methods. *Food Res Int*, 14: 163-173.
27. Cheng J, Wang S, Ockerman HW. 2007. Lipid oxidation and color change of salted pork patties. *Meat Sci*, 75: 71-77.
28. Cheng JH, Wang ST, Sun YM, Ockerman HW. 2011. Effect of phosphate, ascorbic acid and α -tocopherol injected at one-location with tumbling on quality of roast beef. *Meat Sci*, 87: 223-228.
29. Mc Charthy TL, Kerry JP, Kerry JF, Lynch PB, Buckley DJ. 2001. Assessment of the antioxidant potential of natural food and plant extracts in fresh and previously frozen pork patties. *Meat Sci*, 57: 177-184.
30. Selani MM, Contreras-Castillo CJ, Shirahigue LD, Gallo CR, Plata-Oviedo M, Montes-Villanueva ND. 2011. Wine industry residues extracts as natural antioxidants in raw and cooked chicken meat during frozen storage. *Meat Sci*, 88: 397-403.
31. Al-jasser MS. Effect of cooling and freezing temperatures on microbial and chemical properties of chicken meat during storage. *J Food Agric Environ*, 10: 113-116.

OZONLU SUYLA YIKAMANIN DOMATESLERDE PESTİSİT GİDERİMİ, ASKORBİK ASİT VE RENK ÜZERİNE ETKİLERİ

Y. Sedat Velioglu^{1*}, Ergün Cönger², Pelin Aksu³,
Şeyda Fikirdeşici-Ergen⁴, H. Merve Yiğit-Baltacı⁵

¹ Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Dışkapı-Ankara

² BASF, Bitki Koruma Bölümü, Can İş Merkezi, 48. Sk. No:5/2, Balgat-Ankara

³ Ziraî Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü, Yenimahalle-Ankara

⁴ Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Tandoğan-Ankara

⁵ Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, İstanbul İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, İstanbul

Geliş tarihi / Received: 16.02.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 24.03.2016

Kabul tarihi / Accepted: 27.03.2016

Özet

Domateslere laboratuvar koşullarında iki farklı pestisit (azoxystrobin ve chlorpyrifos) uygulanmıştır. Bu domatesler daha sonra suda veya ozon uygulanan suda yıkanmıştır. Uygulamaların pestisit giderimi, askorbik asit düzeyi ve renk üzerine olan etkileri incelenmiştir. Yapılan uygulamaya bakılmaksızın chlorpyrifosun azoxystrobine göre çok daha kolay giderildiği görülmüştür. Azoxystrobine su, çalkalamalı su ve ozonlu su ile yapılan 5 dakikalık yıkama işlemi sırasıyla %4.4, %13 ve %39 oranında giderim sağlarken aynı uygulamalar 30 saniye süreli chlorpyrifos uygulamasında sırasıyla %74, %77 ve %86 oranında giderim sağlamıştır. Renk ve askorbik asit içerikleri açısından suyla ve ozonlu suyla yapılan yıkama uygulamaları arasında önemli bir fark görülmemiştir. Yıkama işlemleri askorbik asitte %7-13'lük, a/b değerinde %2-5'lik bir azalmaya yol açmıştır. Askorbik asitte görülen kayıp yapılan uygulamadan çok vitaminin sudaki çözünürlüğü ile ilgilidir.

Anahtar kelimeler: Domates, ozon, pestisit, yıkama, giderim, askorbik asit, renk

EFFECTS OF OZONATED WATER WASHING ON PESTICIDE REMOVAL, ASCORBIC ACID AND COLOUR OF TOMATOES

Abstract

Tomatoes were treated with two different pesticides (azoxystrobin and chlorpyrifos) in a lab scale study followed by washing in water and ozone bubbled water. The effects of these treatments on pesticide removal, color (a/b values) and ascorbic acid losses were

evaluated. Chlorpyrifos was degraded more easily compared to azoxystrobin regardless of treatments. Water and nitrogen or ozone bubbled water treatments resulted in 4.4, 13 and 39% reduction in azoxystrobin content after 5 min treatment time while same treatments

resulted in 74, 77 and 86% chlorpyrifos reduction in 30 s of treatment time, respectively. The given treatments had no significant effect on ascorbic acid losses and color changes. The ascorbic acid losses and color changes were 7 to 13 and 2 to 5%, respectively. Ascorbic acid losses were assumed to be due to the higher water solubility of it other than the applied treatments.

Keywords: Tomatoes, ozone, pesticide, washing, removal, ascorbic acid, colour

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ avelioglu@ankara.edu.tr,

☎ (+90) 312 203 3300/3619,

☎ (+90) 312 317 8711

GİRİŞ

Tarımsal üretimin artırılması amacıyla günümüzde en sık kullanılan tekniklerden biri de kimyasal savaşımıdır. Bu amaçla kullanılan pestisitler, tarımsal üretimde sağladığı artışla önemli bir girdi oluştururken, aynı zamanda bilinçsiz kullanım nedeniyle, bir kısmının gıdalarda kalarak beslenme yoluyla insan bünyesine alınması bir takım sağlık risklerini de beraberinde getirmektedir. Genellikle bitkiler ve bitkisel ürünler üzerinde az ya da çok pestisit kalıntısı bulunmaktadır. Burada önemli olan kalıntının miktarıdır. Kalıntı düzeyinin insan ve hayvan sağlığı açısından risk oluşturmadığı sınır, genellikle maksimum kalıntı limiti (tolerans, MRL) olarak tanımlanır (1). Gıdalarda, tarımsal ürünlerde veya hayvansal yemlerde yasal olarak bulunmasına izin verilen MRL düzeyleri Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyonu'nun (FAO) bünyesinde bulunan Kodeks Alimentarius Komisyonu (CAC), ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA), AB Komisyonu gibi kurumlar tarafından belirlenmekte ve yönetmelikler düzenlenmektedir.

Tarımsal savaşımında insektisit kullanımında dikkat edilecek en önemli konu ürünün MRL değeri üzerinde kalıntı içermemesidir. Gıda maddelerinde bulunan pestisit kalıntı düzeyi; gıdalara tarladaki pestisit uygulamaları, evde hazırlanması/pişirilmesine kadar uzanan işleme ve depolama parametreleri ile etken maddelerin fizikokimyasal özellikleriyle doğrudan ilişkilidir. Özellikle yıkama ve pişirme gibi parametreler, pestisit özelliklerine bağlı olmak kaydıyla kalıntı düzeylerinde önemli azalmaları sağlayabilmektedir. Ayrıca farklı pestisit etken maddeleri fizikokimyasal parametrelerine göre farklı sürelerde parçalanmaktadır (2). Ürünlerdeki kalıntıların giderimi için suyla yıkama, ısıtma, buharda pişirme, ışığa maruz bırakma, asidik veya bazik ortamlarda bekletme gibi işlemler uygulanmaktadır. Hasat edilmiş ürünlerde su ile yıkamada kalıntıların azalması, yıkama suyunda çeşitli oksidanların kullanımını gündeme getirmiştir.

Son yıllarda, özellikle de ozonun 1997'de ABD'nde GRAS kabul edilmesinden sonra pestisitlerin ozonla parçalanmasına dair çalışmalar hızlanmıştır. Ozon, gıda sanayinde çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Bunlar arasında meyve ve sebzelerde, mikroorganizmaların inaktivasyonu, mikotoksinlerin giderilmesi, hatta ürünün raf

ömürünün uzatılması sayılabilir (3). Meyve-sebze sektörünün önemli problemlerinden mikotoksin (4-5) ve pestisit (6-8) kalıntılarının gıdalardan uzaklaştırılmasında da umut veren sonuçlar göstermektedir. Ozon, 2.07 mV'luk oksidasyon potansiyeline sahipken; hidrojen peroksit (H_2O_2), hipokloroz asit (HOCl), klor (Cl_2) ve klordioksitin (ClO_2) oksidasyon potansiyelleri sırasıyla 1.78, 1.49, 1.36 ve 1.27 mV'tur. Görüldüğü gibi ozonun oksidasyon potansiyeli diğer oksidan ajanların potansiyellerinden oldukça yüksektir (9-10).

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, ozonla sulu çözeltilerde; 2,4-dichlorophenoxyacetic asit (11), phorate (12), dissuloton, terbufos ve dyfonate (13), malathion (14), atrazine (15), diazinon (16), pirimiphos-methyl (17) ve chlorophenylurea pestisitleri (18), pyrimethanil (19) gibi belli pestisitlerin parçalanabileceği belirlenmiştir. Bir çalışmada pH 9'daki sulu çözeltide 30 dakika ozonlama ile diazinonun hemen hemen tamamının parçalandığı belirlenmiştir (16). Elmalara iki farklı düzeyde (1 ve 10 mg/kg) uygulanan mancozeb kalıntılarının ozon uygulamalarıyla %56-97 oranında azaldığı bildirilmiştir (6). Benzer bir çalışmada 1 ve 3 mg/kg konsantrasyonundaki ozonlu suyun üç farklı pH (4.6, 7.0, 10.7) ve iki farklı sıcaklıkta (10 ve 21°C) mancozeb degradasyonundaki etkinliği model sistem çalışmalarında incelenmiş ve degradasyonun pH'ya bağlı olarak değiştiği ve en hızlı degradasyonun pH 7'de gerçekleştiği saptanmıştır (7). Hwang ve ark. (20), mancozeb uygulanmış ve farklı yıkama uygulamalarına tabi tutulmuş elma ve ürünlerindeki mancozeb ve ethylenethiourea (ETU) seviyelerini incelemişlerdir. Sonuç olarak, gerek mancozebin, gerekse kanserojen ETU bileşiğinin giderilmesinde 3 mg/kg konsantrasyondaki ozonlu su, 500 mg/kg klorlu su ile birlikte en etkin yöntem olarak belirlenmiştir. Ozonun etkinliği farklı ürün çeşitleri için mancozeb gideriminde %82-100 ve ETU gideriminde %76-100 olarak belirlenmiştir. Ozonlu su uygulamasının tüm meyve, meyve dilimi, kabuğu soyulmuş ve soyulmamış elmalardan yapılan soslarda gerek mancozeb gerekse ETU miktarını tespit edilebilir limitin altına düşürdüğü bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada; bentazonun ozonla oksidasyon reaksiyon mekanizması ve kinetiği incelenmiştir. Destile su içinde, karanlık koşullarda, 120 gün sonunda dahi bozunumu görülmeyen bentazonun, ozon oksidasyonu ile giderimi kısa süreler içinde

sağlanabilmiştir (21). Wu ve ark. (8), düşük konsantrasyonda çözülmüş ozonun dört farklı pestisitın parçalanması üzerine etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonunda 30 dakika içinde %60 ila %99 oranında parçalanma olduğu, etkinliğin suda çözülmüş ozon miktarı ve sıcaklık ile doğrudan ilgili olduğu belirlenmiştir. Üç farklı sebze de fenitrothion kalıntılarının gideriminde farklı tip mikrobaloncuk kullanımının etkilerinin incelendiği bir çalışmada dekompresyon tip jeneratörün gaz-su sirkülasyon tip jeneratöre göre daha etkili olduğu görülmüştür (22). Fenitrothionun marul ve çeri domateslerindeki kalıntısının azaltılmasında 30 OC'lik sıcaklık uygulamasının denenen diğer sıcaklıklara göre daha etkin olduğu anlaşılmıştır (23). Hurma yapraklarındaki fenitrothion ve benomyl kalıntılarının ozonlama ile uzaklaştırılması üzerinde yapılan bir çalışmada mikrobaloncuk uygulamasının etkin olduğu ve yaprakların direnci ile rengi üzerinde olumsuz etkisinin olmadığı görülmüştür (24). Taze çay yapraklarında O₃/UV/TiO₂ uygulaması ile cypermethrinde %80, malathionda ise %78 azalma görülmüştür. Çalışma sırasında taze çay yapraklarında ve suda yapılan O₃/UV/TiO₂ uygulamalarında pH'nın sudaki denemelerde etkili, çay yapraklarında ise etkisiz olduğu görülmüştür (25). Bir çalışmada chlorothalonil kalıntısı içeren portakal 5 dakika boyunca ozonlanmış ve kalıntı miktarında %100'lük bir azalış görülmüştür. Aynı şekilde tetradifon içeren limonda 5 dakika ozonlama ile kalıntı miktarında %98.6, chlorpyrifos ethyl içeren greyturta ise kalıntı miktarında %94.2 azalma görülmüştür. Bu üç pestisit ile yapılan musluk suyunda gıdaların yıkanması denemeleri ise, ozonlu suda yapılan yıkama işleminin musluk suyuna kıyasla çok daha etkin olduğunu göstermiştir (26). Yapılan başka bir çalışmada chlorfluazuron ve chlorothalonil uygulanan sebzeler ozonla 15 dakika 250mg/saat ve 500mg/saat akış hızı olmak üzere iki ayrı işleme tabi tutulmuştur. Uygulanan işlemler sonucunda; 250mg/saat akış hızında chlorfluazuron için %51, chlorothalonil için %53 azalma görülmüştür. Akış hızı 500mg/saat olduğunda ise chlorfluazuron için %75, chlorothalonil için %77 azalma olduğu belirlenmiş ve sebzelerdeki pestisit kalıntı miktarları "Gıdalarda Pestisit Kalıntı Limit Standartları-Standards for Pesticide Residue Limits in Foods" seviyesine düşürülmüştür (27). Farklı çalışmalarda elmalardaki mancozeb kalıntılarının ozonlama ile % 56-97 oranında giderilebildiği (6), üzümün ozon atmosferinde

depolanması sonucu fenhexamid, cyprodinil ve pyrimethanilin azalmasının hızlandığı (28), mum ile kaplanmış Navel portakallarının 180-200 ng/L düzeyinde ozon içeren atmosferde 35 gün depolanması sonucunda imazalil, malathion ve chlorpyrifos kalıntılarının normal atmosferde depolamadakine göre çok daha fazla azaldığı (29) belirlenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Kullanılan Pestisitler ve Domateslerin İlaçlanması: Çalışmada sudaki çözümlüklerinin az olması nedeniyle (30) azoxystrobin (fungisit, metoksi-akrilat grubu) ve chlorpyrifos (insektisit, organik fosforlu) pestisitleri seçilmiştir. Bu bileşiklere ilişkin bazı bilgiler Çizelge 1'dedir. Denemede kullanılan domatesler bir marketten satın alınmıştır. Her tekerrür için 8 domates (yaklaşık 2 kg) olacak şekilde toplamda bitki koruma ürünü (BKÜ) uygulanması gerekli domates miktarı belirlendikten sonra homojenliğin sağlanabilmesi için örneklerin tamamı aynı anda BKÜ uygulamasına alınmıştır. Bu amaçla azoxystrobin (250 SC) ticari preparatı 75mL/100L su oranına göre hazırlanmıştır. 1 kg domatesin kapladığı alan yaklaşık 1 m² olarak ölçülmüş ve kalibrasyonda püskürtme yöntemiyle her bir kg domates başına 200 mL su kullanılacağı tespit edilmiştir. Bu nedenle örneklerin tamamı (yaklaşık 5 kg domates) için yaklaşık 1000 mL ilaçlı su kullanılmış, yaklaşık 30 cm uzaklıktan el spreyi ile ilaç püskürtülerek uygulanmıştır. İlaçlama sırasında domatesler üzerinde birikim olmamasına dikkat edilmiş, bu amaçla ilaçlama devam ederken bir taraftan da domateslerin bulunduğu plastik sepet elle sürekli olarak sallanmıştır. İlaçlama işlemi bittikten sonra, tarla koşullarına benzerlik göstermesi için domatesler güneşin altına alınmış ve 3 saat kuruması beklenmiştir. Örnekler, kontrol, suda bekletme, azot (N₂) altında suda bekletme ve ozonlama işlemlerine tabi tutulmuştur. Chlorpyrifos'ta farklı olarak sebzeler için tavsiye dozu esas alınarak gerekli hesaplamalar yapılmış ve 0.96g aktif madde/400mL su olacak şekilde ilaç çözeltisi hazırlanmıştır.

Domateslerin Yıkılması

İlaçlanmış domatesler, her deneme için 8'er tane olmak üzere dış kısmından soğutucu sıvı geçen ve sıcaklığı 15°C'de sabit tutulan ve içerisinde tam olarak 2.5 L çeşme suyu bulunan ozonlama tankına, tanka uygun boyuttaki çelik bir sepet içerisinde konulmuştur. Suyun içine jeneratörden

Çizelge 1. Çalışmalarda kullanılan aktif maddelere ilişkin bazı bilgiler
Table 1. Several properties of studied active ingredients

Aktif Madde Adı <i>Active ingredient</i>	İçerik ve formülasyonu <i>Content and formulation type</i>	Ticari Adı <i>Commercial name</i>	Üreticisi <i>Producer</i>	Önerilen Dozu <i>Recommended dosage</i>	Sudaki çözünürlük <i>Water solubility</i>
Azoxystrobin	250 g/L – SC ¹	Quadris	Syngenta	75 mL/100 L water	6 mg/L (20°C)
Chlorpyrifos	480 g/L- EC ²	Sarban 4E	Safa Tarım	200 mL/da	1.4 mg/L (25°C)

¹ SC: Süspansiyon konsantre, ²EC: Emülsiyon konsantre

¹ SC: Suspension concentrate, ²EC: Emulsion concentrate

(20g/saat kapasiteli Opal OG 20, Ankara) elde edilen gaz ozon, gaz dağıtıcı paslanmaz çelik poröz dağıtıcı (Fisher Scientific Solvent Inlet Filter, 10µm gözenek çaplı) ile verilmiştir. Ozon miktarı debi ölçer (Riteflow flow-meter, 150 mm, size 2, Bel-Art Products Pequannock, NJ, ABD) kullanılarak 600mL/dak olacak şekilde ayarlanmıştır. 5 dakikalık ozonlama sonucu sudaki ozon düzeyi Palintest test kitiyle yaklaşık 13 mg/kg olarak ölçülmüştür. (Ozon gazının suya verilmesini takiben domatesler derhal tanka alınmıştır. Domatesler istenilen sürede ozonlandıktan sonra akış kesilmiş, ön denemelerde miktarının 1 mL olmasına karar verilmiş reaksiyon durdurucu (5.2g/L konsantrasyondaki Difco Neutralizing Buffer, Cat. Nr. 236210, Becton, Dickinson and Sparks, MD, ABD) eklenmiş ve domatesler sudan hızlıca alınmıştır. Su ile yapılan yıkama işleminde ise tüm koşullar aynı tutulmuş, ancak ozon gazı çıkışının çalkalama etkisini elemine edebilmek için bu kez suya aynı başlıkla ve aynı düzeyde azot gazı verilmiştir. Her işlem sonunda su yenilenmiş ve suyun sıcaklığı 15°C'ye ulaştığında bir sonraki denemeye geçilmiştir. Çalışmada kullanılan pestisitlerin ozona duyarlılıkları birbirinden çok farklı olduğundan ozonlama süreleri farklı tutulmuştur.

Domateslerde Kalıntı Analizleri

Farklı yıkama işlemleri uygulanan domatesler, pestisit kalıntı analizleri için hazırlanmıştır. Kontrol grubu, ozonlanan grup ve suda bekletilen domateslerde tekerrür edilen her grup için üçer ekstraksiyon yapılmıştır. Ekstraksiyon işlemleri AKSU (1) ve Quechers (31) metodlarına göre yapılmıştır. Buna göre; 10 g homojenize domates örneği 10 mL asetonitril: diklorometan (1:1) ilave edilip, bir dakika karıştırıldıktan sonra üzerine 4 g susuz MgSO₄ ve 0.5 g NaCl ilavesi yapılarak 2 dakika daha tüp karıştırıcıda karıştırılmış ve homojenat 5000 devir/dak'da 5 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Ekstraktan 2 mL alınarak, içinde 0.03 g diamino + 0.03 g PSA sorbentleri ve 0.3 g

susuz MgSO₄ bulunan tüpe konarak karıştırıldıktan sonra aynı devir ve sürede tekrar santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Çalışmada azoxystrobin HPLC ile, chlorpyrifos ise GC/µECD cihazıyla belirlenmiştir (1, 30). Azoxystrobin tayininde uygulanan HPLC koşulları şu şekildedir: Sistem, Agilent 1100, otomatik enjektörlü, akış hızı, 1 mL/dak; pompa, dereceli elüsyon pompası; kolon RP C-18; kolon fırını sıcaklığı, 25°C; detektör DAD (200-400 nm aralıkta); enjeksiyon hacmi 20µL; data analiz programı, ChemStation LC 3D (rev. B.01.01). Chlorpyrifos tayininde uygulanan GC/µECD koşulları ise şu şekildedir: Gaz kromatografisi, Agilent 6890N GC; oto örnekleyici (ALS), Agilent 6890 serisi; taşıyıcı gaz, helyum (yüksek saflıkta, %99.999 BOSS); akış hızı, 1 mL/dak sabit akış; Kapiler kolon, HP-5 (%5 phenyl methyl siloxane) (30m x 0.25mm x 0.25µm film kalınlığı); bölünmeli/ bölünmesiz enjeksiyon blok sıcaklığı, 250 °C; enjeksiyon hacmi, 1 µL bölünmeli enjeksiyon; bölünme oranı 1:50; kolon sıcaklık programı, 70°C (2 dak), 25°C/dak ile 280°C (7 dak), toplam analiz süresi: 17.40 dak; detektör, µECD; detektör sıcaklığı, 300 °C; detektör makeup gazı ve akışı, N₂ (%99.999 saflıkta) 59 mL/dak.

Domateste Renk ve Askorbik Asit Tayini

Örneklerde Minolta 300 CR kolorimetresi ile Hunter sistemine göre L, a, b renk ölçümleri yapılmıştır. Renk tayininde tüm parseller için alınan domateslerin tamamı analize alınmıştır. Aygıtın kendi plakasıyla kalibrasyonundan sonra her bir domates örneği 4 tekrarlı olarak okunmuş ve değerler L, a, b olarak kaydedilmiştir. Domateslerde bulguların yorumlanmasında a/b (kırmızılık/sarılık) değeri dikkate alınmıştır.

Askorbik asit analizlerinde Reyes (32) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Plastik bir behere blenderde iyice parçalanmış yaklaşık ±0,001 g duyarlılıkla 4 g örnek tartılmış ve üzerine %3'lük sitrik asit çözeltisinden 24 mL ilave edilmiştir. Bu

karışım, ultratürax cihazında, beherin etrafına buz poşetleri sarılarak homojenize edilmiş ve kaba filtre kağıdından bir santrifüj tüpüne süzölmüş ve süzöntü 0oC'de 6000 devir/dakika hızda 10 dakika santrifüj edilmiştir. Katı faz ekstraksiyon kartuşları (Phenomenex, Strata C18-E, 55µm, 70A, 100 mg, Torrance, CA, ABD) vakum manifold cihazına yerleştirildikten sonra üst kısım, işlem öncesinde önce 3 mL metanol ve bunu takiben 3 mL su ile şartlandırılıp, kartuşların içinde su damlası kalmayacak şekilde vakumlanarak kurutulmuştur. Şartlandırılmış kartuşlardan, santrifüj edilen örneklerin üst fazı geçirilmiştir ve HPLC aygıtına enjekte edilmiştir. Kullanılan aygıtla ilişkin bilgiler şu şekildedir: Sistem, Agilent 1100, otomatik enjektörlü, 100 örnek tepsili; Akış hızı, 0,5 mL/dakika; hareketli faz, %2'lik potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄) çözeltisi [o-fosforik asit ile pH'sı 2,4'e ayarlanmış], isokratik akış; kolon, Thermo Scientific Reverse faz-C18 (250 x 4.6mm x 5µm); kolon fırını çalışma sıcaklığı, 25°C; detektör ve çalışma dalga boyu, diyot array detektör, 242 nm; enjeksiyon hacmi, 20µL data analiz programı, ChemStation LC 3D (rev B.01.01). L-askorbik asit standardının (Sigma-Aldrich) %3'lük sitrik asit çözeltisi içerisinde çözdürülmesiyle askorbik asit stok çözeltisi (500 ppm'lik) elde edilmiştir. Bu stok çözeltiden de 250, 100, 50 ve 25 ppm'lik standart çözeltiler yine %3'lük sitrik asit çözeltisi içerisinde hazırlanmış ve HPLC cihazında okumaları gerçekleştirilerek askorbik asit standart eğrisi çizilmiş ve eğrinin regresyon katsayısı R²= 0,9989 olarak bulunmuştur. Söz konusu eğri Şekil 1'de verilmiştir. Ayrıca hesaplamalarda kullanılmak üzere domateslerde kuru madde miktarı refraktometre ile ölçölmüş ve 5,3 briks olarak bulunmuştur. Askorbik asit standart eğrisinin çizilmesiyle örneklerdeki C vitamini miktarlarının kantitatif hesaplamaları gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2. Uygulamaların azoxystrobin ve chlorpyrifos azalmasına etkileri*
Table 2. Effects of treatments on pesticide reduction*

Domateslere uygulanan işlem Applied treatment on tomatoes	Azalma (%) Reduction (%)	
	Azoxystrobin	Chlorpyrifos
Suda bekletme Soaking in water	4.40±0.13 ^A	73.54±1.80 ^A
N ₂ altında suda bekletme Soaking in water with N ₂ flow	13.07±0.28 ^B	76.63±2.80 ^A
Ozonlama Ozonation	39.14±0.02 ^C	86.27±3.21 ^B

* Uygulama süresi azoxystrobin ve chlorpyrifosta sırasıyla 5 dakika ve 30 saniyedir.

* Treatment times for azoxystrobin and chlorpyrifos are 5 min and 30sec, respectively.

A-C: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki olarak farklılığı göstermektedir (P<0.05).

A-C: Different letters in a column indicating a statistically significant difference (P<0.05).

İstatistik analiz

İstatistiksel analizler SPSS for Windows (ver.10.1, USA) paket programı ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. Örnekler arasında anlamlı bir fark olup olmadığı varyans analizi (one-way ANOVA) ile değerlendirilmiş ve farklılığın derecesi Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. Analizlerde P<0.05'lik güven seviyeleri dikkate alınmıştır (33).

SONUÇ VE TARTIŞMA

Azoxystrobinde suda bekletme ile ozon uygulaması arasında pestisit miktarında yaklaşık 9 katlık bir azalma ortaya çıkmıştır (Çizelge 2). Bu durumun bir kısmının ozonun çalkalama etkisinden kaynaklandığı düşünölmektedir bu kez suda yıkama sırasında tanka ozonla aynı debide N₂ gazı verilmiştir. Bu kez fark 3 kata inmiş olmasına rağmen bu azalma da çok üst düzey bir azalma anlamına gelmektedir. Özetlenecek olursa çalkalamalı suda azoxystrobinde %13 azalma olurken, ozonlu suda azalma %39'a çıkmıştır ve rakamlar ozon uygulamasının söz konusu aktif maddenin giderimindeki etkisini açık bir şekilde ortaya koymaktadır. Emölsiyon konsantre (EC) formölsiyonlu chlorpyrifosla ilaçlanmış domateslerde ozonlu suyun kalıntı miktarını azaltma etkisinin, suda bekletmeye ya da azot gazı akışı altında suda bekletmeye göre daha fazla olduğu görölmüştür (Çizelge 2) ve bu fark ANOVA testi ile doğrulanmıştır. Burada da suda bekletmeye göre çalkalama uygulamasında %3, çalkalamalı su ile ozon uygulamasında ise yaklaşık %13'lük bir fark vardır. 30 saniye gibi kısa bir uygulama süresinde bile chlorpyrifos miktarı %86 kadar azaltılabilmektedir. Ayrıca EC formölsiyona sahip chlorpyrifos aktif maddeye sahip bitki koruma ürünleri suda çözönmeyip, organik çözücülerde çözöünebilmektedir.

Chlorpyrifosun sulu ortamda özellikle serbest Cl varlığında hızla degrade olduğu diğer çalışmalarda görülmüş (34), bu çalışmada çıkan sonuçlar bu durumu doğrular niteliktedir.

Bilindiği üzere ozon çok kuvvetli bir oksidandır ve askorbik asit ve renk üzerinde etkisi söz konusudur. Dolayısıyla pestisit giderimi yapılırken oksidasyona duyarlı ögelerin durumunun bilinmesi önem taşımaktadır. Ozonlanan örneklerdeki renk ve askorbik asit düzeyleri sırasıyla Çizelge 3 ve Çizelge 4'de verilmiştir. Çizelge 3'ten görüleceği üzere ilaçlanan domateslere uygulanan ozonlama işlemi ile azoxystrobinde %39 gibi yüksek düzeyde bir pestisit giderimi sağlanmasına karşın (Çizelge 2) domateste kırmızılık (a/b) değeri üzerinde ancak %4'lük sınırlı bir azalma oluşmuştur. Pestisit giderimi oranının %20-25'lerde tutulması hedeflenirse bu oranın ancak %1-2'lerde kalacağı düşünülebilir ki bu önemsiz bir renk kaybı anlamına gelecektir. Chlorpyrifos için de aynı durum geçerlidir ve burada domateslerin doğrudan 30 saniye ozonlanmasında pestisit oranında %86 azalma söz konusuysa renk kaybı (a/b) ancak %3 kadardır. Bu süre %20-25'lik azalma için 5-10 saniyelerde tutulduğunda renk kaybı azoxystrobinde olduğu gibi ancak %1-2'lerde olacaktır. Nitekim gaz ozonla çileklerde pestisit giderimi üzerinde yapılan bir çalışmada (37) işlem sonrası 4°C'de 10 gün muhafaza ile meyvelerde pH ve renk değerlerinde anlamlı bir değişim gözlemlenmediği bildirilmiştir.

Gene gaz ozonla domateslerde yapılan benzer bir çalışmada (36), domates meyvelerinde renk,

ağırlık, şeker miktarı, asitlik ve antioksidan kapasitesi gibi özelliklerinde herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir.

Azoxystrobin ozonla gideriminin askorbik asit üzerine etkisi ele alındığında (Çizelge 4) her ne kadar askorbik asit düzeyleri arasında bir miktar fark görünüyorsa da Duncan testine göre, ozon uygulanmış ve uygulanmamış örnekler aynı grupta yer almaktadır. Dolayısıyla görülen azalma BKÜ uygulamasından değil, muhtemelen askorbik asidin sudaki yüksek çözünürlüğünden kaynaklanmaktadır. Benzer durum chlorpyrifos uygulaması için de büyük ölçüde geçerlidir (Çizelge 4). Burada ozon uygulaması ile uygulanmaması arasında ancak %2'lik bir fark söz konusudur. Çizelge 2'de 30 saniyelik bir ozon uygulamasıyla bile %86'lık bir chlorpyrifos gideriminin olduğu görülmektedir. Dolayısıyla gene hedeflenen %20-25'lik giderim için süre 10 saniye civarında tutulduğunda düzeyleri arasındaki bu fark da muhtemelen ortadan kalkacaktır ki kayıp aynı kalsa bile %2'lik bir askorbik asit kaybının, elde edilen yüksek giderim düşünüldüğünde önemli olmayacağı açıktır. Yapılan bir çalışmada da (35) dilimlenmiş domateslere gaz ozon uygulanması ile domateslerin askorbik asit miktarı ve renk değerlerinde belirgin bir değişim gözlemlenmediği belirlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada ele alınan iki pestisit düzeylerinin ozonlama ile etkin bir şekilde azaltılabileceği ve yapılan işlemin renk ve askorbik asit üzerinde olumsuz bir etkiye neden olmadığı ortaya konulmuştur.

Çizelge 3. Ozonlama işleminin domateslerde renk üzerine etkileri
Table 3. Effects of ozonation on colour of tomatoes

Aktif madde ve uygulanan işlem Active ingredient and treatment	L	a	b	a/b	% azalma (a/b) Reduction, % (a/b)
Azoxystrobin					
İlaçsız domates <i>Untreated tomatoes</i>	40.2±2.5	31.6±3.1	31.5±2.5	1.00 ^A	-
Suda 5 dakika ozon uygulaması <i>5 min ozone treatment in water</i>	41.2±3.0	31.3±3.2	32.6±3.0	0.96 ^{AB}	4.0±1.6 ^A
Suda 5 dakika azot uygulaması <i>5 min nitrogen treatment in water</i>	40.2±2.9	30.3±2.9	30.9±2.9	0.98 ^A	2.0±0.7 ^B
5 dakika suda bekletme <i>5 min soaking</i>	41.4±2.3	31.4±3.1	32.5±2.8	0.96 ^{AB}	4.0±0.6 ^A
İlaçlı kontrol <i>Pesticide applied control</i>	40.3±2.9	30.3±2.5	31.6±3.0	0.95 ^B	5.0±0.4 ^C
Chlorpyrifos					
İlaçsız domates <i>Untreated tomatoes</i>	39.9±2.3	32.9±2.4	32.7±3.9	1.00 ^A	-
Suda 30 saniye ozon uygulaması <i>30 sec ozone treatment in water</i>	38.3±2.5	32.3±3.1	33.2±2.8	0.97 ^{AB}	3.0±0.8 ^A
Suda 30 saniye azot uygulaması <i>30 sec nitrogen treatment in water</i>	39.4±2.4	31.5±3.2	31.9±3.4	0.99 ^A	1.0±0.6 ^B
30 saniye suda bekletme <i>30 sec soaking</i>	39.5±2.1	32.8±3.0	33.3±3.3	0.99 ^A	1.0±0.4 ^B
İlaçlı kontrol <i>Pesticide applied control</i>	39.5±2.6	31.5±3.2	33.3±2.2	0.95 ^B	5.0±2.3 ^C

A-C: Her bir aktif madde için sütunlardaki farklı harfler istatistik olarak farklılığı göstermektedir ($P<0.05$).

A-C: Different letters in columns indicating a statistically significant difference ($P<0.05$) for each active ingredient.

TEŞEKKÜR

Bu makale TÜBİTAK tarafından desteklenen 110 O 201 nolu projenin sonuçlarının bir bölümünden yararlanılarak hazırlanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Aksu P. 2007. Meyve ve Sebzelerdeki Pestisit Kalıntılarının Tayininde Gaz Kromatografisi/ Kütle Spektrofotometresi (GC/MS) ile Çoklu Kalıntı Analiz Yönteminin Geliştirilmesi, (Doktora Tezi, basılmamış), Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği ABD, İzmir.
2. Holland PT, Hamilton D, Ohlin B, Skidmore W. 1994. Effects of storage and processing on pesticide residues in plant products. *Pure and Appl Chem.* 66:335-356.
3. Guzel-Seydim ZB, Grene AK, Seydim AC. 2004. Use of ozone in the food industry. *Lebensm. Wiss- u Tech.* 37:45-460.
4. Karaca H, Velioglu YS. 2009. Effects of some metals and chelating agents on patulin degradation by ozone. *Ozone Sci Eng.* 31:224-231.
5. Karaca H, Velioglu YS, Nas S. 2010. Mycotoxins: contamination of dried fruits & degradation by ozone. *Toxin Rev.* 29:51-59.
6. Hwang ES, Cash JN, Zabik MJ. 2001. Postharvest treatments for the reduction of mancozeb in fresh apples. *J Agric Food Chem.* 49: 3127-3132.
7. Hwang ES, Cash JN, Zabik MJ. 2001. Ozone and hydrogen peroxyacetic acid treatment to reduce or remove EBDCs and ETU residues in a solution. *J Agric Food Chem.* 49:5689-5694.

8. Wu JG, Luan TG, Lan CY, Lo WH, Chan GYS. 2007. Efficacy evaluation of low-concentration of ozonated water in removal of residual diazinon, parathion, methyl-parathion and cypermethrin on vegetable. *J Food Eng.* 79: 803-809.
9. Kim JG, Yousef AE, Dave S. 1999. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: A review. *J Food Protect.* 62:1071-1087.
10. Kim JG, Yousef AE, Khadre MA. 2003. Ozone and its current and future application in the food industry. *Adv Food Nutr Res.* 45:167-218.
11. Chu W, Ching MH. 2003. Modeling the ozonation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid through a kinetics approach. *Water Res.* 37:39-46.
12. Ku Y, Lin HS. 2002. Decomposition of phorate in aqueous solution by photolytic ozonation. *Water Res.* 36:4155-4159.
13. Chen WR, Sharpless C, Linden KG, Suffet IH. 2003. Treatment of organophosphate pesticides on the EPA contaminant candidate list using ozonation, International Ozone Assoc. 16th World Congress 31 Aug -5 Sept. Las Vegas Nevada USA. pp: 261-274.
14. Masten SJ, Tian M, Upham BL, Trosko JE. 2001. Effect of selected pesticides and their ozonation by products on gap junctional intercellular communication using rate liver epithelial cell lines. *Chemosphere* 44:457-465.
15. Ma J, Graham NJD. 2000. Degradation of atrazine by manganese-catalysed ozonation-influence of radical scavenges. *Water Res.*34:3822-3828.

Çizelge 4. Ozonlama işleminin domateslerde askorbik asit üzerine etkileri
Table 4. Effects of ozonation on ascorbic acid contents in tomatoes

Aktif madde ve uygulanan işlem Active ingredient and treatment	Askorbik asit (mg/kg) Ascorbic acid (mg/kg)	Askorbik asit (mg/kg KM) Ascorbic acid (mg/kg DM)	% azalma Reduction (%)
<i>Azoxystrobin</i>			
İlaçsız domates <i>Untreated tomatoes</i>	121.9±1.41	2299.7±26.78	---
Suda 5 dakika ozon uygulaması <i>5 min ozone treatmnt in water</i>	112.7±0.33	2127.4±6.21	7.49±0.27 ^A
Suda 5 dakika azot uygulaması <i>5 min nitrogen treatment in water</i>	113.4±0.97	2139.5±18.15	6.98±0.80 ^A
5 dakika suda bekletme uygulaması <i>5 min soaking</i>	111.7±1.39	2108.1±26.44	8.33±1.15 ^A
İlaçlı kontrol <i>Pesticide applied control</i>	1110±4.57	2093.9±86.36	8.94±3.76 ^A
<i>Chlorpyrifos</i>			
İlaçsız domates <i>Untreated tomatoes</i>	162.8±4.02	3071.5±75.77	---
Suda 30 saniye ozon uygulaması <i>30 sec ozone treatment in water</i>	147.3±3.96	2278.6±74.88	9.54±2.44 ^{AB}
Suda 30 saniye azot uygulaması <i>30 sec nitrogen treatment in water</i>	151.0±2.43	2848.7±46.03	7.25±1.50 ^B
30 saniye suda bekletme uygulaması <i>30 sec soaking</i>	148.1±0.57	2794.5±10.84	9.02±0.35 ^{AB}
İlaçlı kontrol <i>Pesticide applied control</i>	141.4±2.22	2667.9±41.78	13.14±1.36 ^C

A-C Her bir aktif madde için aynı sütündeki farklı harfler istatistiki olarak farklılığı göstermektedir ($P<0.05$).

A-C: Different letters in columns indicating a statistically significant difference ($P<0.05$) for each active ingredient ($P<0.05$).

16. Ku Y, Chang JL, Shen YS, Lin SY. 1998. Decomposition of diazinon in aqueous solution by ozonation. *Water Res.* 32:1957-1963.
17. Chiron S, Rodriguez A, Fernandez-Alba A. 1998. Application of gas and liquid chromatography-mass spectrometry to the evaluation of pirimiphos methyl degradation products in industrial water under ozone treatment. *J Chromatogr A.* 823:97-107.
18. Tahmassebi LA, Nelieu S, Kerhoas L, Einhorn J. 2002. Ozonation of chlorophenylurea pesticides in water: reaction monitoring and degradation pathways. *Sci Total Env.* 291:33-44.
19. Agüera A, Almansa E, Tejedor A, Fernández-Alba A. 2000. Photocatalytic pilot scale degradation study of pyrimethanil and of its main degradation products in waters by means of solid-phase extraction followed by gas and liquid chromatography with mass spectrometry detection. *Env Sci Tech.* 34:1563-1571.
20. Hwang ES, Cash JN, Zabik MJ. 2002. Degradation of mancozeb and ethylenethiourea in apples due to postharvest treatments and processing. *Food Chem Tox.* 67:3295-3300.
21. Ölmez T, Tünay O, Bahnemann D. 2006. Çoklu substrat sistemlerinde bentazonun ozon oksidasyonu ile giderim mekanizmasının incelenmesi. *İTÜ Dergisi* 16:103-114.
22. Ikeura H, Kobayashi F, Tamaki M. 2011. Removal of residual pesticide, fenitrothion, in vegetables by using ozone microbubbles. *J Food Eng.* 103:345-349.
23. Ikeura H, Kobayashi F, Tamaki M. 2013. Ozone microbubble treatment at various water temperatures for the removal of residual pesticides with negligible effects on the physical properties of lettuce and cherry tomatoes. *J Food Sci.* 78:350-355.
24. Ikeura H, Hamasaki S, Tamaki M. 2013. Effects of ozone microbubble treatment on removal of residual pesticides and quality of persimmon leaves. *Food Chem.* 138:366-371.
25. Lin L, Xie M, Liang Y, He Y, Chan GY, Luan T. 2012. Degradation of cypermethrin, malathion and dichlorvos in water and on tea leaves with O₃/UV/TiO₂ treatment. *Food Control* 28:374-379.
26. Kuşvuran E, Yıldırım D, Mavruk F, Ceyhan M. 2012. Removal of chlorpyrifos ethyl, tetradifon and chlorothalonil pesticide residues from citrus by using ozone. *J Hazard Mat.* 241-242: 287-300.
27. Chen JY, Lin YJ, Kuo WC. 2013. Pesticide residue removal from vegetables by ozonation. *J Food Eng.* 114:404-411.
28. Karaca H, Walse SS, Smilanick JL. 2012. Effect of continuous 0.3 µL gaseous ozone exposure on fungicide residues on table grape berries. *Postharvest Biol Technol.* 64:154-159.
29. Metzger C, Barnes JD, Singleton I, Andrews P. 2007. Effect of low level ozone-enrichment on the quality and condition of citrus fruit under semi-commercial conditions. *IOA Conference and Exhibition*, Valencia, Spain, pp: 5.11:1-7.
30. Tomlin CDS. 2003. The e-Pesticide Manual (13th ed. ver. 3.0 2003-04) British Crop Protection Council, UK.
31. Lehotay SJ, Kok A, Hiemstra M, Bodegraven P. 2005. Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. *JAOAC Int.* 88:595-614.
32. Reyes LF, Villareal JE, Zevallos LC. 2007. The increase in antioxidant capacity after wounding depends on the type of fruit and vegetable tissue. *Food Chem.* 101:1254-1262.
33. SPSS Statistics Data Editor 17.0 License Authorization Wizard <http://cs.its.uiowa.edu/software/documents/SPSS17.0MacintoshSiteLicenseInstallationInstructions.pdf>
34. Duirk SE, Collette TW. 2006. Degradation of chlorpyrifos in aqueous chlorine solutions: Pathways, kinetics, and modeling. *Environ Sc. Technol.* 40: 546-551.
35. Heleno FF, de Queiroza ME, Neves AA, Freitas RS, Faroni LR, DeOliviera AF. 2014. Effects of ozone fumigation treatment on the removal of residual difenoconazole from strawberries and on their quality. *J Environ Sci Health B.* 49:94-101.
36. Rodoni L, Casadei N, Concellon A, Alicia ARC, Vicente AR. 2010. Effect of short-term ozone treatments on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit quality and cell wall degradation. *J Agric Food Chem.* 58:594-599.
37. Aguayo E, Escalona VH, Artes F. 2006. Effect of cyclic exposure to ozone gas on physicochemical, sensorial and microbial quality of whole and sliced tomatoes. *Postharvest Biol Technol.* 39:169-177.

TERMOSONİKASYON VE GELENEKSEL ISITMA UYGULAMALARININ HAVUÇ SUYUNA ETKİLERİ: PEKTİN METİLESTERAZ İNAKTİVASYONU VE FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLER

Şeyda Karagöz, Aslihan Demirdöven*

Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Tokat

Geliş tarihi / *Received*: 16.02.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / *Received in revised form*: 05.04.2016

Kabul tarihi / *Accepted*: 14.04.2016

Özet

Bu çalışmada pektin metilesteraz enziminin (PME) inaktivasyonunda termosonikasyon (TS) ve geleneksel ısıtma (T) uygulamalarının etkilerinin kıyaslanması amaçlanmış ve örneklerle toplam pektin, toplam karotenoid, pH, titrasyon asitliği, suda çözünür kurumadde, renk gibi bazı fizikokimyasal analizler uygulanmıştır. Termosonikasyon ve geleneksel ısıtma uygulamaları 65 °C ve 80 °C'lerde gerçekleştirilmiştir. Her iki uygulama için PME inaktivasyon süreleri geleneksel ısıtma işlemde 65 °C'de 62 dakika, 80 °C'de 37 dakika ve termosonikasyon uygulamaları için 65 °C'de 39 dakika, 80 °C'de 20 dakika olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, havuç suyuna uygulanan termosonikasyon işleminin, geleneksel termal uygulamaya kıyasla daha fazla PME enzim inaktivasyonunu daha kısa sürede sağladığı, pektin ve karotenoid konsantrasyonunu artırdığı ve renk değerlerini de koruduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Termosonikasyon, geleneksel ısıtma, havuç suyu, pektin metilesteraz

EFFECTS OF THERMOSONICATION AND CONVENTIONAL THERMAL TREATMENTS ON CARROT JUICE: PECTIN METHYLESTERASE INACTIVATION AND PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES

Abstract

In this study, it was aimed to compare the effects of thermosonication (TS) and conventional heating (T) treatments in the inactivation of the pectin methylesterase (PME) and some physicochemical analyzes (total pectin, total carotenoids, pH, titratable acidity, soluble solids and color) was applied to samples. Thermosonication and conventional heating were realized in 65 °C and 80 °C. For both treatments PME inactivation times were determined as 62 minute at 65 °C, 37 minute at 80 °C for conventional heating; and 39 minute at 65 °C, 20 minute at 80 °C for thermosonication. As a result, it was determined that thermosonication, provides more PME inactivations compared to the conventional heating in a short time, and TS applications increased the concentration of carotenoids and pectins; and also color values were protected in carrot juice.

Keywords: Thermosonication, conventional heating, carrot juice, pectin methylesterase

* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ aslihan.demirdoven@gop.edu.tr,

© (+90) 356 252 1616/95,

☎ (+90) 356 252 1729

GİRİŞ

Pektin metilesteraz (PME) pek çok bitki, patojen küf ve bakteriler ile elma, muz, turunçgiller, üzüm, armut, domates, fasulye, havuç, salatalık, pırasa, soğan, bezelye ve patatesten bulunan bir enzimdir. PME bitki hücrelerinden elde edilen veya bakteri, mantar, maya gibi mikroorganizmaların sentezlediği pektik enzimdir (1) ve meyve ve sebze sularında bulanıklık stabilitesinin sağlanması açısından önemlidir. PME, pektin zincirindeki esterleşmiş karboksil gruplarındaki metoksil gruplarını ayırarak, pektinin esterleşme derecesini düşürmektedir (2). Esterleşen pektin, kalsiyum iyonları ile birleşerek çözünmeyen pektat bileşiklerini oluşturmakta ve bunlar da meyve ve sebze sularında pulp partikülleri ile birleşerek bulanıklık kaybına neden olmaktadır (1).

PME enziminin inaktivasyonu için kullanılan geleneksel termal yöntemler, yoğun ısı uygulamaları olmaları nedeniyle son üründe renk değişimi, vitamin ve aroma kaybı gibi olumsuzluklara neden olmaktadır. Tüketicilerin minimal işlem görmüş taze gıdalara yönelmesiyle vurgulu elektrik alan, yüksek basınç ve ultrason (ultrases) gibi yöntemlerle söz konusu enzimin inaktivasyonu önem kazanmıştır. Bu yöntemlerden biri olan ultrason, ses dalgalarının saniyede 20 bin veya daha fazla titreşimleri sonucunda üretilen bir enerjidir. Ultrason ve ısı uygulamasının bir arada kullanımı ise termosonikasyon adını almaktadır. Termosonikasyonun amacı pastörizasyon ve sterilizasyon gibi geleneksel yöntemlerle elde edilen letal etkinin ultrases ve ısı kombinasyonu ile daha düşük sıcaklık ve daha kısa sürede elde edilmesidir (3).

Ultrason ile enzimlerin inaktivasyonu başlıca fiziksel (kavitasyon, mekanik etkiler) ve/veya kimyasal (sonokimyasal reaksiyon nedeniyle serbest radikallerin oluşumu) işlemler tarafından gerçekleştirilmektedir. Ultrasonla alkol dehidrojenaz, katalaz ve lizozim enzimlerinin inaktivasyonu üzerine yapılan bir çalışmada alkol dehidrojenaz ve lizozim enziminin inaktive olduğu, ancak katalaz için çok düşük etkiler gösterdiği belirlenmiştir (4). Bu uygulamanın inaktivasyon mekanizmasının, enzimlerin konformasyonel mekanizması ve aminoasit kompozisyonuna bağlı olduğu ve enzimden enzime değiştiği belirtilmiştir. Katalaz, invertaz ve pepsin gibi enzimler, ultrasonik ses dalgası muamelesine karşı dirençlidir. Alfa amilaz

enziminin inaktivasyonunun ise termosonikasyon ile sağlandığı gösterilmiştir. Düşük sıcaklık, düşük basınç ve pH gibi uygulamalar ile sonikasyon işlemi kombine edildiğinde, ultrasonik yöntemlerin etkinliği artmaktadır (4).

Termosonikasyon; çilek, böğürtlen ve turunçgil suyu gibi meyve sularının üretiminde kullanılan ısı işleme alternatif bir yöntemdir (5). Termosonikasyon uygulamasının PME ve PG (poligalaktaturanaz) gibi enzimlerinin inaktivasyonunu sağlamada geleneksel ısı işlemlerden daha etkili olduğu belirtilmektedir (6). Araştırmacılar ultrasonun domates suyu ve portakal suyunda PME inaktivasyonunu artırdığını saptamışlardır (7).

Havuç suyu pH değerinin yaklaşık 6.0 olması nedeniyle 115-121 °C'lerde yoğun ısı işleme tabi tutulmaktadır ve bu tür işlemler de son üründe besin içeriğindeki ve duyuşsal özelliklerindeki kayıpları arttırmaktadır (8).

Bu çalışmada, yukarıda bahsi geçen kalite kayıplarını azaltmak amacıyla daha düşük sıcaklıklarda PME enzimin inaktivasyonunun termosonikasyon ve geleneksel termal uygulamalarla sağlanması ve bu koşullarda üretilen havuç sularının toplam pektin, toplam karotenoit, pH, titrasyon asitliği, suda çözünür kuru madde ve renk değerlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Araştırma kapsamında materyal olarak yerel bir marketten temin edilen "Nantes" çeşidi havuç (*Daucus carota*) kullanılmıştır. Havuçlar, sebze suyuna işlenene kadar +4 °C'de en fazla 48 saat bekletilmiştir.

Sebze suyu üretimi amacıyla havuçlar ayıklama, yıkama ve kabuk soyma işlemlerinden geçirildikten sonra havuç suyu eldesi amacıyla ekstraktörden (Maxie 800w, Fakir, Almanya) geçirilmiştir. Elde edilen havuç sularının 10'ar ml'lik hacimlerine termosonikasyon ve geleneksel termal ısıtma işlemleri uygulanmıştır. Geleneksel termal ısıtma, su banyosunda 65 °C ve 80 °C'lerde gerçekleştirilmiştir. Uygulamaya alınan örneklerin sıcaklığı ölçülerek merkez sıcaklığı istenen sıcaklığa ulaştıktan sonra süre başlatılmıştır. Her beş dakikada bir örnek alınarak 65 dakika boyunca ısı işlem uygulanmıştır. Termosonikasyon uygulaması ise ultrasonik banyoda (Elmasonic S 100 (H), Elma, Almanya) termal uygulamadaki sıcaklıklarda (65

°C ve 80 °C), 5'er dakika arayla örnek alınarak 65 dakika boyunca uygulanmıştır. Alınan örnekler için süre termal ısıtmada olduğu gibi merkez sıcaklığı istenen sıcaklığa ulaştıktan sonra başlatılmıştır. Isıl uygulamalardan alınan örnekler soğumaları için 10'ar dakika buzlu suda bekletilmiş ve analiz edilinceye kadar (-80 °C)'de depolanmıştır. Analiz öncesinde örnekler, akan su altında çözündürülmüş ve her bir örneğin PME aktivitesi belirlenmiş ve en düşük PME aktivitesini gösteren beş dakikalık periyotta tekrar üretimler yapılarak her bir dakikada için PME aktivitesi ölçülerek PME inaktivasyon süreleri belirlenmiştir. Bununla birlikte rapor edilen inaktivasyon sürelerinde havuç sularının fizikokimyasal özellikleri tüm örnek grupları ile ısıl işlem geçirmemiş (kontrol) örneklerde belirlenmiştir.

Havuç suyu örneklerinde PME aktivitesi ve toplam pektin tayini Cemeroglu (2010) yöntemine göre belirlenmiştir. Uygulanan diğer analizler suda çözünür kuru madde, titrasyon asitliği AOAC (1995) ve pH değeri AOAC (1990) metotlarına uygun olarak yürütülmüştür. Toplam karotenit konsantrasyonu ise Rayman (2010)'de havuç suyu için verilen metot uygulanarak analiz edilmiştir. Ayrıca örneklerin renk (L*, a*, b*, ΔE, ΔC ve Hue °) değerleri Hunter-Lab Color Flex model Colorimetre (Managment Company, USA) kullanarak saptanmıştır. ΔE ve ΔC değerlerinin hesaplanmasında kontrol grubu (ısıl işlem görmemiş) havuç sularının L* =44.53, a* = 15.08 ve b* =35.12 değerleri kullanılarak aşağıda verilen formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\Delta E = [(L^* - L_{ref}^*)^2 + (a^* - a_{ref}^*)^2 + (b^* - b_{ref}^*)^2]^{1/2}$$

$$\Delta C = [(a^* - a_{ref}^*)^2 + (b^* - b_{ref}^*)^2]^{1/2}$$

$$\text{Hue açısı} = \tan^{-1} (b^*/a^*)$$

İstatistiksel Değerlendirme

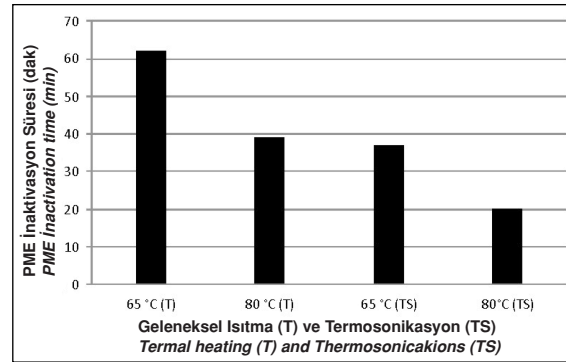
Üretimlere ait istatistiksel değerlendirmeler "Tesadüfi parseller" deneme desenine göre, uygulamalara ait farklılıklar ise Duncan testi ile %95 güven aralığında değerlendirilmiştir. İstatistiksel değerlendirmeler SPSS 13 paket programı kullanılarak yürütülmüştür. Tüm analizler 2 paralel ve 2 tekerrürlü olarak yürütülmüştür.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Havuç Sularında PME Aktivitesi ve İnaktivasyon Süreleri

Havuç sularının çalışılan sıcaklık değerlerindeki PME inaktivasyon süreleri Şekil 1'de gösterilmiştir.

Başlangıçta 0.43 µmol/dak/mL PME aktivitesine sahip olan havuç suyu örneklerinde 65 °C'de uygulanan geleneksel termal işlemde 62. dakikada ve aynı sıcaklıktaki termosonikasyon işleminde 37. dakikada PME inaktivasyonu sağlanmıştır. Bunun yanında 80 °C de geleneksel termal işlemde PME inaktivasyonun 39. dakikada ve aynı sıcaklık derecesindeki termosonikasyon uygulamasında 20. dakikada olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen verilere göre 80 °C de termosonikasyon uygulaması ile inaktivasyon süresi % 48.7 ve 65 °C'de % 40.3 oranlarında daha kısa sürmüştür. Bu koşullardaki sıcaklık uygulamaları sonucunda PME inaktivasyonunun %100 sağlandığı ve ultrasonun ısıl işlemle beraber uygulanması sonucunda enzim inaktivasyon süresinin neredeyse yarı yarıya düştüğü belirlenmiştir.



Şekil 1. Isıl uygulamalar süresince PME (µmol/dak/mL) inaktivasyon süreleri

Figure 1. The inactivation period during heating applications of PME (µmol/min/mL)

Literatürde benzer bir çalışmada domates suyuna uygulanan sıcaklıklarda (60 °C, 65 °C ve 70 °C), 60 °C'deki ısıl işlem dışında, ısıtma veya termosonikasyona maruz kalma süresinin artmasıyla, kalıntı enzim aktivitesinin (PME, PG), önemli ölçüde azaldığı ve kalıntı aktivitesindeki azalma hızının yüksek sıcaklıklarda daha fazla olduğu belirtilmiştir (6). Siwach ve Kumar (2012) mosambi suyunun termosonikasyon ve termal (60 °C, 70 °C ve 80 °C) uygulamaları ile yaptıkları bir çalışmada termosonikasyon işlemlerinin ses dalgalarının kaviteasyon etkisi nedeniyle ısıl işlemlerden daha etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmada 80 °C de 20. dakika sonunda tüm termal ve termosonikasyon uygulamalarında PME inaktivasyonunun sağlandığı belirlenmiştir. Wu ve arkadaşları domates suyunda PME'nin ısı (60 °C ve 65 °C) ve termosonikasyon (25 µm, 50 µm

ve 75 µm, 60 °C ve 65 °C) ile inaktivasyonunu incelemişler ve termosonikasyonda 60 °C ve 65 °C'de sırayla 41.8 ve 11.7 dakika sonra pektin metilesteraz aktivitesinde %90 oranında azalma olduğunu belirtmişlerdir. Aynı orandaki azalmanın yalnızca ısı işlem kullanarak elde edebilmesi için 60 °C ve 65 °C'de sırasıyla 90.1 ve 23.5 dakika uygulanması gerektiği saptanmıştır (14). Yine domates suları ile yapılan bir çalışma da ultrason ve ısı kombinesinin inaktivasyon üzerine etkisinin sinerjistik olduğunu ve termosonikasyonda PME'nin inaktivasyon oranlarını artırdığını tespit etmişlerdir. Bu artışın PME inaktivasyon hızında 60-70 °C'de 1.5-6 kat olduğu saptanmıştır (15). Sonuç olarak tüm sıcaklık değerlerinde (65 °C ve 80 °C), termosonikasyon ve geleneksel termal ısıtma işlemi ile PME enzim inaktivasyonu sağlanmıştır. Bunun yanında termal ısıtmaya göre termosonikasyon işlemi PME inaktivasyon süresini kısaltmıştır. Bunun nedeni olarak ısı etki ve ultrasona bağlı kavitasyon etkisi görülmektedir.

Havuç Sularının Fizikokimyasal Özellikleri

Örneklere ait toplam pektin ve toplam karotenoit içerikleri çizelge 1'de verilmiştir. 80 °C'de ısı işlem görmüş havuç sularındaki pektin içerikleri kontrol örneğine göre %56 artış göstermiştir. 65 °C'de ısı işlem görmüş havuç sularının pektin içeriğinde herhangi bir değişme görülmemişken, 65 °C ve 80 °C'de uygulanan termosonikasyon işlemlerinin her ikisinde ise artış gözlemlenmiştir. Belirlenen bu sonuçlardaki pektin konsantrasyonundaki artışın sıcaklıktaki artışla beraber ultrasonun kavitasyon etkisi nedeniyle olduğu düşünülmektedir.

Isıl işlemler, pektik materyallere direkt ya da dolaylı olarak etki eder. Düşük sıcaklıkta uzun süre gerçekleştirilen ısı işlemler sonucu hücre

zarının seçici geçirgenliğinin zarar görmesi tetiklenmektedir. Böylece kationların hücre içinden hücre duvarına doğru nüfuz etmesi ile pektin metilesteraz enzimi aktive olarak pektik maddelerdeki metil esterlerin hidrolizi ile pektinlerin kısmi de-esterifikasyonunu gerçekleştirmektedir. Sıcaklığın yaklaşık 50 °C'ye erişmesi ile hücre membranları zarar görmeye başlamakta, hücresel turgor oldukça hızlı şekilde bozulmaktadır. Fakat hücre duvarı pektin molekülleri henüz bu durumdan etkilenmemektedir. Isıl işlemin devam etmesi durumunda ise hücre duvarı ve orta lamel arasındaki pektinin yapısı bozularak, çözünür hale geçmektedir (16).

Genel olarak 65 °C ve 80 °C'de yapılan termal ısıtma ve termosonikasyon işlemleri sonucunda karotenoit konsantrasyonlarında değişim gözlemlenmiştir. Karotenoit içeriğinde en fazla kayıp ise 80 °C'de uygulanan geleneksel termal ısıtma işleminde belirlenmiştir. 80 °C'de yapılan TS uygulamasında ise karotenoit konsantrasyonunda artış belirlenmiştir. Bu artışın γ-karotenin β-karotene dönüşmesi ile gerçekleştiği düşünülmektedir (17).

Araştırma sonucunda elde edilen; pH, titrasyon asitliği ve suda çözünür kuru madde (SÇKM) değerleri Çizelge 2'de verilmiştir. Kontrol gurubu havuç suyu örneklerinin pH, titrasyon asitliği değerleri sırası ile 6.71, 0.24 ve SÇKM değeri ise %9 olarak belirlenmiştir. Örneklerin pH değerleri kontrol örneği ile karşılaştırıldığında uygulanan geleneksel ısıtma ile değişmediği, fakat belirlenen sıcaklıklardaki termosonikasyon işlemi ile azaldığı tespit edilmiştir. Bunun nedeninin ise ultrason uygulaması sırasında oluşan OH-radikalleri ve hidrojen peroksit olduğu düşünülmektedir (18). Titrasyon asitliğinde ise 80 °C ve 65 °C'deki geleneksel ısıtmada ve 65 °C de termosonikasyon

Çizelge 1. Havuç suyuna uygulanan termosonikasyon ve geleneksel termal ısıtma işlemlerinin, toplam pektin ve toplam karotenoit üzerine etkisi

Table 1. Effects of thermal heating and thermosonication applications on PME, total pectin and total carotenoids of carrot juice

Sıcaklık Temperature (°C)	Toplam Pektin Total Pectin (µg/ml)	Toplam Karotenoit Total Carotenoids (mg/l)
Kontrol (28.7 °C)	262.91±0.03 ^a	17.19±0.02 ^a
80 °C (T)	411.60±0.01 ^b	1.39±0.01 ^b
80 °C (TS)	290.34±0.01 ^c	21.46±0.03 ^c
65 °C (T)	262.91±0.01 ^a	6.15±0.01 ^d
65 °C (TS)	352.89±0.01 ^d	9.09±0.01 ^e

^{a,b}harfleri her bir sütündeki istatistiksel farkları ifade etmektedir; sonuçlar ortalama±SD olarak gösterilmiştir (P≤0.05).

^{a,b} different lower case letter in the same column for each treatment indicates significant differences and results shown as means±SD (P≤0.05).

işleminde genel olarak bir miktar azalma görülürken, 80 °C de termosonikasyon işleminde artış gözlemlenmiştir. Bu durumun pH değişimine de neden olan ultrason uygulaması sırasında oluşan OH-radikalleri ve hidrojen peroksit olduğu düşünülmektedir. Örneklerin SÇKM değerleri ise 8.87-9.12 aralığında belirlenmiştir.

Çizelge 3'te havuç suyu örneklerinin L* (parlaklık), a* (kırmızılık) ve b* (sarılık) değerleri verilmiştir. 80 °C'de yapılan ısı işlem uygulamalarının örneklerin L* değerlerinde kayba neden olduğu ve örneklerin parlaklıklarının kayba uğradığı; bunun yanında a* değerinin termosonikasyon grubunda daha yüksek olduğu ancak örneklerin a* değerleri arasında istatistiksel bir fark olmadığı belirlenmiştir ($P>0.05$). b* değeri açısından termosonikasyon uygulanan koşulların her ikisinde de daha yüksek b* değerleri elde edilmiştir ve örneklerin sarılık değerleri üzerine kullanılan yöntemler arasında istatistiksel olarak fark varken, sıcaklığın b* değeri üzerine etkisinin olmadığı saptanmıştır ($P>0.05$). ΔE (toplam renk farkı) ve ΔC (doyunluk) değerleri incelendiğinde de istatistiksel bir fark saptanmamıştır ($P>0.05$).

Ancak renk tonu olarak ifade edilen Hue° değerlerinde TS grubu ve T gruplarında renk tonu açısından sıcaklık farkının önemli olmadığı ancak uygulanan yöntemin renk tonu üzerine etkili olduğu belirlenmiştir. Ultrason etkiye bağlı olarak ultrason uygulanan örneklerde daha yüksek renk tonu değerleri elde edilmiştir.

SONUÇ

Havuç suyu üretiminde kullanılan termosonikasyon işleminin geleneksel termal yöntemle göre çok daha kısa sürede PME inaktivasyonu sağladığı belirlenmiştir. Örneklerin fizikokimyasal özellikleri karşılaştırıldığında 65 °C'de yapılan uygulamaların beklenildiği üzere daha az renk ve karotenoit kaybına neden olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak elde edilen bulgular termosonikasyon uygulamasının geleneksel termal ısıtmanın yanında alternatif bir yöntem olarak kullanılabilmesi ve böylelikle geleneksel ısıtma sonucunda oluşan ısı zararlarının azaltılabileceği belirlenmiştir. Ayrıca bu verilerin doğrulanması amacıyla depolama aşamasında da örneklerin incelenmesi ve mikrobiyolojik analizlerle de desteklenmesi gerekmektedir.

Çizelge 2. Havuç suyuna uygulanan termosonikasyon ve geleneksel termal ısıtma işlemlerinin pH, titrasyon asitliği (%) ve SÇKM (%) üzerine etkisi

Table 2. Effects of traditional heating and thermosonication applications on pH, titratable acidity (%) and soluble solid (%) of carrot juice

Sıcaklık (Temperature) (° C)	pH	Titrasyon asitliği (Titratable acidity) (%)	SÇKM (Soluble solid) (%)
Kontrol (28.7 °C)	6.71±0 ^a	0.24±0.01 ^a	9±0 ^a
80 °C (T)	6.73±0.01 ^b	0.19±0.02 ^b	9±0 ^a
80 °C (TS)	6.59±0.01 ^c	0.23±0.01 ^a	9±0 ^a
65 °C (T)	6.7±0.02 ^b	0.20±0.01 ^b	8.87±0.01 ^b
65 °C (TS)	6.63±0.01 ^d	0.20±0 ^b	9.12±0.01 ^c

*^{a,b} harfleri her bir sütündeki istatistiksel farkları ifade etmektedir; sonuçlar ortalama±SD olarak gösterilmiştir ($P\leq 0.05$).

*^{ab} different lower case letter in the same column for each treatment indicates significant differences and results shown as means±SD ($P\leq 0.05$).

Çizelge 3. Havuç suyuna uygulanan termosonikasyon ve geleneksel termal ısıtma işlemlerinin renk üzerine etkisi

Table 3. Effects of traditional heating and thermosonication applications on color values of carrot juice

Sıcaklık (Temperature) (° C)	Renk değerleri (Color values)					
	L*	a*	b*	ΔE	ΔC	Hue°
Kontrol (28.7 °C)	44.53±0.8a	15.08±0.7a	35.12±1.55a	-----	-----	66.7±0.02a
80 °C (T)	42.17±0.48b	16.88±1b	31.93±0.96b	4.35±0.83a	3.66±0.67a	61.01±1.4b
80 °C (TS)	43.82±0.9c	18.35±0.04b	36.11±1.26a	3.48±0.72a	3.41±0.72a	63.13±0.95c
65 °C (T)	44.09±1.05a	17.57±1.16b	32.7±0.72b	3.5±0.95a	3.47±0.94a	61.71±0.72b
65 °C (TS)	44.72±0.02a	18.14±0.7b	36.58±0.52a	3.39±1.34a	3.39±1.02a	63.89±0.63c

*^{ab} harfleri her bir sütündeki istatistiksel farkları ifade etmektedir; sonuçlar ortalama±SD olarak gösterilmiştir ($P\leq 0.05$).

*^{ab} different lower case letter in the same column for each treatment indicates significant differences and results shown as means±SD ($P\leq 0.05$).

KAYNAKLAR

1. Espachs-Barroso A, Van-Loey A, Hendrickx M, Martin-Belloso O. 2006. Inactivation of plant pectin methylesterase by thermal or high intensity pulsed electric field treatments. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 7: 40-48.
2. Cemeroglu B, Yemencioğlu A, Özkan M. 2001. *Meyve ve Sebzelerini Bileşimi ve Soğukta Depolanmaları*. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, 24, 328 s.
3. Demirdöven A ve Baysal T. 2009. The use of ultrasound and combined technologies in food preservation. *Food Rev Int*, 25:1-11.
4. Ulusoy K ve Karakaya M. 2011. Gıda Endüstrisinde Ultrasonik Ses Dalgalarının Kullanımı. *GIDA*, 36 (2):113-120.
5. Abid M, Jabbar S, Hua B, Hashim MM, Wua T, Lei S, Khan MA, Zeng X. 2014. Thermosonication as a potential quality enhancement technique of apple juice. *Ultrasonics Sonochem*, 21:984-990.
6. Wu J, Gamage TV, Vilku KS, Simons LK, Maw R. 2008. Effect of thermosonication on quality improvement of tomato juice. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 9: 186-195.
7. Tiwari BK, Muthukumarappan K, Donnell CPO, Cullen PJ. 2009. Inactivation kinetics of pectin methylesterase and cloud retention in sonicated orange juice. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 10: 166-171.
8. Balogh T, Smout C, Nguyen BL, Loey AMV, Hendrickx ME. 2004. Thermal and high-pressure inactivation kinetics of carrot pectinmethylesterase: from model system to real foods. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 5: 429-436.
9. Cemeroglu B. 2010. *Gıda Analizleri*. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, 34. Ankara, 535s.
10. AOAC. 1995. Official Methods of Analysis, J Assoc Offic Anal Chem, Int, 16th Ed. Arlington, VA.
11. AOAC. 1990. Official Methods of Analysis, J Assoc Offic Anal Chem, Int: 15th Ed. Arlington, VA.
12. Rayman A. 2010. Havuç suyu üretiminde elektrop plazmoliz ve mikrodalga uygulamalarının verim ve kalite özellikleri üzerine etkileri. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, İzmir, Türkiye, 184 s.
13. Siwach R, Kumar M. 2012. Comparative study of thermosonication and thermal treatments on pectin methylesterase inactivation in mosambi juice. *J Dairy Foods Home Sci*, 31 (4): 290-296.
14. Şahin-Ercan S, Soysal Ç. 2011. Ultrasonun gıdalarda ve enzimlerin inaktivasyonunda kullanılması. *GIDA* 36 (4): 225-231.
15. Terefe NS, Gamage M, Vilku K, Simons L, Mawson R, Versteeg C. 2009. The kinetics of inactivation of pectin methylesterase and polygalacturonase in tomato juice by thermosonication. *Food Chem*, 117: 20-27.
16. Başkaya-Sezer D, Demirdöven A. 2015. Meyve Sebze İşlemede Mikrodalga Haşlama Uygulamaları. *GIDA* 40 (3): 171-177.
17. Odriozola-Serrano I, Soliva-Fortuny R, Hernández-Jover T, Martín-Belloso O. 2009. Carotenoid and phenolic profile of tomato juices processed by high intensity pulsed electric fields compared with conventional thermal treatments. *Food Chem*, 112: 258-266.
18. Açı M, Yerlikaya O, Kınık Ö. 2014. Gıdalarda ısı olmayan yeni teknikler ve mikroorganizmalar üzerine etkileri. *Gıda ve Yem Bilimleri Teknoloji Dergisi/J Food Feed Sci Technol*, 14: 28-35.

KEFİR ÜRETİMİNDE PEYNİRALTI SUYU KULLANIMI

Ceren Akal*, Nazlı Türkmen, Celalettin Koçak

Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Süt Teknolojisi Bölümü, Ankara

Geliş tarihi / Received: 25.02.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 24.03.2016

Kabul tarihi / Accepted: 27.03.2016

Özet

Bu çalışmada değişik oranlarda (%10, %20 ve %30) peyniraltı suyu (PAS) ilave edilmiş sütlerden üretilen kefirlerin nitelikleri araştırılmıştır. Araştırmada PAS ilave edilmeyen çiğ süt (A) ile toplam süt miktarının %10 (B), %20 (C) ve %30'u (D) kadar PAS ilave edilen çiğ süt-PAS karışımından dört ayrı kefir üretimi yapılmıştır. Elde edilen kefir örneklerinde depolamanın 1., 7. ve 14. günlerinde kimyasal (pH değeri, titrasyon asitliği, toplam kurumadde, protein ve yağ içeriği), fiziksel (viskozite ve serum ayrılması) ve duyu analizler (görünüş, yapı, lezzet) yapılmıştır. Elde edilen bulgular, PAS katkılı sütlerden üretilen kefir örneklerinin kabul edilebilir nitelikte olduğunu ve kontrol örneğine (A) göre özellikle serum ayrılması ve lezzet özellikleri açısından daha iyi sonuçlar verdiğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Kefir, peyniraltı suyu

USE OF WHEY IN KEFIR PRODUCTION

Abstract

In this research, properties of kefir produced from bovine milk including whey in different rates (10%, 20% and 30%) were investigated. In the research, four different kefir samples were manufactured with raw milk without whey (A) and whey were added in rates of 10% (B), 20% (C) and 30% (C) of total milk. Chemical (pH, titratable acidity, dry matter, total nitrogen and fat content), physical (viscosity and phase separation) and sensory analyzes (appearance, structure, taste) of the kefir samples were investigated on days 1, 7 and 14 of the storage. According to the results, kefir samples produced with whey were acceptable and they had better results especially for phase separation and taste properties compared to the control sample (A).

Keywords: Kefir, whey

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ akal@agri.ankara.edu.tr,

☎ (+90) 0312 318 2219,

☎ (+90) 0312 596 1350

GİRİŞ

Fermente süt ürünleri besin değeri ve sağlık açısından yararları nedeniyle oldukça önemlidir. Ülkemizde, yoğurt ve ayrandan sonra en yaygın tüketimi olan kefir, üretiminde spesifik olarak *Lactobacillus kefiri*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* ve *Acetobacter* cinslerinin değişik suşları ile laktozu fermente eden (*Kluyveromyces marxianus*) ve etmeyen mayaları (*Saccharomyces unisporus*, *Sacch. cerevisiae* ve *Sacch. exiguus*) içeren starter kültürler veya kefir tanelerinin kullanıldığı fermente süt ürünüdür (1-4). Kefir, sarımsı veya beyaz renkte, viskoz yapıda ve hafif asidik tada sahip, alkol içeren ferahlık verici fermente bir süt içeceğidir (5-8). Etil alkol ve laktik asit fermantasyonlarının birarada gerçekleşmesi ile oluşan bu ürün inek, koyun, keçi ve kısrak sütlerine kefir tanesi eklenerek veya starter kültür kullanılarak elde edilmektedir (9, 10).

PAS, peynir üretiminden elde edilen ve yüksek oranda laktozun yanı sıra protein, mineral maddeler ve az miktarda yağ içeren bir yan üründür (11). Ülkemizde, PAS genelde toz ürün haline dönüştürülerek veya lor peyniri üretiminde kullanılarak değerlendirilmektedir. Ancak, kurutma işlemi için ekipman kurulumunun güç olması ve yüksek maliyet gerektirmesi, mevcut tesislerin yetersizliği, peynir üreten mandıraların küçük kapasiteli ve dağınık olması nedeniyle ulaşımda yaşanan güçlükler gibi faktörler ülkemizde PAS'ın önemli bir bölümünün atık su olarak kanalizasyona gitmesine neden olmaktadır. Yüksek besin içeriğine sahip olan bu yan ürünün herhangi bir işleme tabi tutulmadan atılması, besin kaybının yanı sıra organik bileşik içermesi sebebiyle çevre kirliliğine de yol açmaktadır. Bu olumsuzlukların giderilmesi, peynir üretiminde yan ürün olarak ülkemizde yılda ~2 milyon ton (12) elde edilen PAS'ın değişik yöntemler kullanılarak değerlendirilmesiyle mümkün olabilir. Bu nedenle çalışmada, PAS'ın önemli fermente bir ürün olan kefirin üretiminde kullanılabilirliği araştırılmıştır. Araştırmada PAS'daki besin öğelerinin kazanılması, kefirin daha fonksiyonel bir ürün haline dönüştürülmesi ve üretimde randıman artışı sağlanması ana hedefler olarak belirlenmiştir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışmada, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Eğitim, Araştırma ve Uygulama İşletmesi'nden temin edilen inek sütü, kefir tanesi ve işletmedeki Beyaz Peynir üretiminden elde edilen PAS kullanılmıştır.

Kefir örneklerinin üretimi Şekil 1'de verilen akış şemasındaki gibi gerçekleştirilmiştir (13, 14). Üretimde kullanılan PAS oranları ön denemeler ile belirlenmiştir.

Çiğ Süt ⇒ Separasyon (50±1°C) ⇒ Yağ Standardizasyonu (%1-1.2 yağ oranı) ⇒ A Kontrol; B %10 PAS içeren örnek*; C %20 PAS içeren örnek*; D %30 PAS içeren örnek* ⇒ Isıl İşlem (90°C 10 dk) ⇒ Soğutma (25±1°C) ⇒ Kefir Tanesi İlavesi (%3) ⇒ İnkübasyon (25±1°C); 4.5 pH-değerine kadar ⇒ Süzme ⇒ Paketleme ⇒ Depolama (4°C)

Raw milk ⇒ Separation (50±1°C) ⇒ Fat standardization (%1-1.2 fat ratio) ⇒ A Control; B Sample containing 10% whey*; C Sample containing 20% whey*; D Sample containing 30% whey* ⇒ Heat treatment (90°C 10 min) ⇒ Cooling (25±1°C) ⇒ Kefir Grain Addition (3%) ⇒ Incubation (25±1°C); until pH-value of 4.5 ⇒ Draining ⇒ Packaging ⇒ Storage (4°C)

* Süt (hammadde), toplam örnek miktarının %10, %20 ve %30'u PAS olacak şekilde seyreltilmiştir.

* Raw milk diluted with whey in rates of 10%, 20% and 30% of total milk.

Şekil 1. Kefir örneklerinin üretimi

Figure 1. Manufacture of kefir samples

Kefir örneklerinin titrasyon asitliği değerleri (15), toplam kurumadde değerleri (Gravimetrik yöntem), yağ içerikleri (Gerber yöntemi), toplam kül içerikleri (16) ve toplam azot değerleri (17) belirlenmiştir. Örneklerin pH-değerleri birleşik elektrotlu dijital pH-metre (Mettler Toledo MP 225) ile, viskozite değerleri ise HAAKE VT 181 / VTR 24 viskozimetresi ile MV II başlığı kullanılarak ölçülmüştür. Viskozite ölçümleri 1 ve 4 ayarlarında yapılmış, viskozite değerleri aşağıdaki formülde yerine konularak hesaplanmıştır.

Viskozite (cP) = Okunan ölçüm değeri x Okumanın yapıldığı ayar x 3 (Başlık sabiti)

Örneklerin ayrıca serum ayrılması değerleri (18)'e göre belirlenmiş, duyu analizler ise 10 panelistin katılımıyla yapılmıştır (19).

Araştırma 2 tekrarlı olarak yürütülmüştür. Sonuçların istatistiki değerlendirilmesi tekrarlanan ölçümlü varyans analizi ile gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Kefir üretiminde hammadde olarak kullanılan çiğ sütün özellikleri standart sapmalarıyla birlikte Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Hammadde çiğ sütün bazı nitelikleri (n=2)
Table 1. Some properties of raw milk (n=2)

Nitelikler Properties	Değerler Values
pH değeri pH value	6.80±0.07
Titrasyon asitliği (°SH) Titratable acidity (°SH)	7.82±0.27
Yağ içeriği (%) Fat content (%)	3.75±0.05
Protein içeriği (%) Protein content (%)	3.35±0.12
Toplam kurumadde içeriği (%) Total solid content (%)	13.25±0.09

Çizelge 2. Peyniraltı suyunun bazı nitelikleri (n=2)
Table 2. Some properties of whey (n=2)

Nitelikler Properties	Değerler Values
pH değeri pH value	6.46±0.05
Titrasyon asitliği (°SH) Titratable acidity (°SH)	4.96±0.07
Yağ içeriği (%) Fat content (%)	1.40±0.01
Kül içeriği (%) Ash content (%)	0.50±0.00
Toplam kurumadde içeriği (%) Total solid content (%)	7.45±0.03

Çizelge 3. Kefir örneklerinin bazı nitelikleri (n=2)
Table 3. Some properties of kefir samples (n=2)

	Yağ içeriği (%) Fat content (%)	Kurumadde içeriği (%) Total solid content (%)	Kül içeriği (%) Ash content (%)	Protein içeriği (%) Protein content (%)
A	1.08±0.04 ^a	9.80±0.04 ^a	0.85±0.01 ^a	3.47±0.01 ^a
B	1.20±0.00 ^a	9.51±0.06 ^b	0.72±0.02 ^b	3.14±0.07 ^b
C	1.23±0.04 ^a	9.38±0.09 ^b	0.70±0.01 ^b	2.94±0.06 ^{bc}
D	1.20±0.00 ^a	9.02±0.06 ^c	0.67±0.01 ^b	2.76±0.01 ^c

Aynı sütündeki farklı harfler örnekler arasındaki farklılığın önemli olduğunu ifade etmektedir ($P<0.05$)
Different letters in the same column refers to statistically significant difference between samples ($P<0.05$).

Çizelge 1 incelendiğinde, hammadde olarak kullanılan çiğ sütün yağ, toplam kurumadde, protein ve titrasyon asitliği değerlerinin, Türk Gıda Kodeksi'nin 2000/6 numaralı "Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği"ne uygun olduğu görülmektedir (20).

Kefir üretiminde kullanılan PAS'ın bazı nitelikleri standart sapmalarıyla birlikte Çizelge 2'de verilmiştir.

Araştırmada kullanılan maya PAS'ın Çizelge 2'de belirtilen nitelikleri, yapılan çeşitli araştırmalarda bulunan PAS bileşimine yakın değerler göstermektedir (11, 21). Yalnız, araştırmada kullanılan PAS'ın yağ oranı, önceki çalışmalarda bulunan PAS yağ oranlarına (%0.12-0.95) göre biraz yüksektir. Bu durumun, PAS'ın temin edildiği işletmenin Beyaz peynir üretiminde kullandığı parametrelerden (mayalama sıcaklığı, pıhtı kesim büyüklüğü vb.), özellikle de üretimde tam yağlı süt kullanmasından ileri geldiği düşünülmektedir (22).

Kefir örneklerinin bazı kimyasal özellikleri Çizelge 3'te verilmiştir.

Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği'ne (1) göre kefirdeki süt yağı oranının en fazla %10, toplam protein oranının ise en az %2.7 olması gerekmektedir. Ancak, tebliğde kurumadde yönünden uyulması gereken bir değer bulunmamaktadır. Çizelge 3 incelendiğinde tüm örneklerin yağ ve protein oranları yönünden tebliğe uygun olduğu görülmektedir. Yalnız, örneklerin kurumadde ve yağ oranları kefir üzerine yapılan diğer araştırmalardaki değerlerden düşük bulunmuştur (13, 23, 24). Denemede yağ oranının, kalori değeri düşük kefir üretmek amacıyla yaklaşık %1 düzeyine standardize edilmesi ve PAS ilavesi, yağ ve kurumadde oranlarının düşük çıkmasının en önemli nedenleridir. Yapılan istatistik kontrolde yağ, kurumadde, kül ve protein içerikleri açısından örnekler arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P<0.05$).

Kefir örneklerinin pH ve titrasyon asitliği değerleri Çizelge 4'de verilmiştir.

Kefir örneklerinin pH değerlerinde depolama süresince çok küçük artışlar (en büyüğü 0.05) olmakla birlikte genel olarak önemli değişiklikler gözlenmemiştir (Çizelge 4). Yoğurt gibi fermente süt ürünlerinde laktik asit bakterilerinin faaliyetine bağlı olarak depolama süresince pH değerinde düşmeler görüldüğü bilinmektedir. Ancak, benzer durum kefirde olmayabilmektedir. Araştırma kapsamında incelenen örneklerdeki duruma benzer şekilde, yapılan bir başka çalışmada da kefir örneklerinde pH değerlerinin depolama süresince arttığı belirtilmiştir (23). Kefir üretiminde kullanılan starter kültürlerinin ve kefir tanelerinin laktik asit bakterilerine ek olarak maya da içermesi asitlik gelişimini yavaşlatabilmekte, bu nedenle de pH değerlerinde artışlar ve çok önemsiz değişimler görülebilmektedir. Ayrıca, örneklerde görülen pH artışlarında PAS kullanımının neden olduğu kurumadde ve laktoz düzeyindeki değişimler ile tamponlama özelliklerinin etkili olduğu düşünülebilir. Kefir örneklerinin titrasyon

asitliği değerleri depolama süresince az da olsa artış göstermiştir. Kefirin, yoğurt, ayran gibi fermente ürünlerden farklı starter kültürlerle üretilmesi, asitlik gelişiminin yavaş olmasındaki en önemli etkidir. Kefir üzerine yapılan araştırmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (13, 25). Örnekler içerisinde en yüksek titrasyon asitliği değeri kontrol örneğinde görülmüştür (Çizelge 4). Bu durum da PAS ilavesinin asitlik gelişimi üzerinde etkili olduğunu göstermektedir.

Yapılan istatistik değerlendirmede, pH değeri açısından örnekler ve depolama günleri arasındaki interaksiyon ile örneklerin titrasyon asitliği değerleri arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Aynı zamanda örneklerin pH ve titrasyon asitliği değerleri yönünden depolama günleri arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunurken ($P<0.05$), örnekler ile depolama günleri arasında interaksiyon bulunmamıştır ($P>0.05$).

Kefir örneklerinin serum ayrılması ve viskozite değerleri Çizelge 5'te verilmiştir.

Çizelge 4. Kefir örneklerinin pH ve titrasyon asitliği değerleri (n=2)
Table 4. pH and titratable acidity values of kefir samples (n=2)

	pH değeri pH value			Titrasyon asitliği (°SH) Titratable acidity (°SH)		
	1. Gün Day 1	7. Gün Day 7	14. Gün Day 14	1. Gün Day 1	7. Gün Day 7	14. Gün Day 14
A	4.46±0.01 ^{Aa}	4.47±0.02 ^{Aa}	4.47±0.01 ^{Aa}	37.76±0.06 ^{Ab}	38.83±0.10 ^{Ab}	40.96±0.13 ^{Aa}
B	4.39±0.01 ^{Bc}	4.44±0.04 ^{ABa}	4.42±0.02 ^{Bb}	35.79±0.05 ^{Bb}	36.56±0.28 ^{Bb}	37.39±0.45 ^{Ba}
C	4.35±0.00 ^{Cc}	4.38±0.00 ^{Cb}	4.40±0.01 ^{Ba}	35.66±0.06 ^{Bb}	36.19±0.03 ^{Bb}	37.93±0.31 ^{Ba}
D	4.40±0.01 ^{Bb}	4.43±0.01 ^{Ba}	4.39±0.00 ^{Bb}	33.95±0.11 ^{Cb}	33.68±0.04 ^{Cb}	35.71±0.13 ^{Ca}

Aynı satırdaki farklı büyük harfler depolama günleri arasındaki farklılığın önemli olduğunu ifade etmektedir ($P<0.05$). Aynı sütündeki farklı küçük harfler örnekler arasındaki farklılığın önemli olduğunu ifade etmektedir ($P<0.05$). Different capital letters in the same row refers to statistically significant difference between storage days ($P<0.05$). Different small letters in the same column refers to statistically significant difference between samples ($P<0.05$).

Çizelge 5. Kefir örneklerinin serum ayrılması ve viskozite değerleri (n=2)
Table 5. Phase separation and viscosity values of kefir samples (n=2)

	Serum Ayrılması (mL/100mL) Phase separation (mL/100mL)			Viskozite (cP) Viscosity (cP)		
	1. Gün Day 1	7. Gün Day 7	14. Gün Day 14	1. Gün Day 1	7. Gün Day 7	14. Gün Day 14
A	6.50±0.78 ^{Ba}	13.50±0.71 ^{Aa}	17.50±0.71 ^{Ab}	2225±35.4 ^{Ac}	1500±70.7 ^{Bc}	1050±70.7 ^{Cb}
B	2.50±0.78 ^{Cb}	7.50±0.71 ^{Bb}	27.50±3.54 ^{Aa}	2750±70.7 ^{Aa}	2350±70.7 ^{Ba}	1700±0.00 ^{Ca}
C	0.50±0.78 ^{Bb}	2.50±0.71 ^{Bc}	13.00±0.00 ^{Ac}	2500±70.7 ^{Ab}	1950±70.7 ^{Bb}	1075±35.4 ^{Cb}
D	1.50±0.78 ^{Bb}	6.50±0.71 ^{Ab}	7.00±1.41 ^{Ad}	1925±35.4 ^{Ad}	1525±35.4 ^{Bc}	1575±35.4 ^{Ba}

Aynı satırdaki farklı büyük harfler depolama günleri arasındaki farklılığın önemli olduğunu ifade etmektedir ($P<0.05$). Aynı sütündeki farklı küçük harfler örnekler arasındaki farklılığın önemli olduğunu ifade etmektedir ($P<0.05$). Different capital letters in the same row refers to statistically significant difference between storage days ($P<0.05$). Different small letters in the same column refers to statistically significant difference between samples ($P<0.05$).

Çizelge 5 incelendiğinde görülebileceği gibi B örneğinin 14. gün değeri hariç, PAS ilaveli örneklerdeki serum ayrılması değerleri kontrol örneğine (A) göre oldukça düşük çıkmıştır. Burada PAS ilaveli örneklerde serum proteini oranlarında olan artışların ve bu proteinlerin kazein ile olan interaksyonunun örneklerdeki su bağlama kapasitesini artırmasının etkili olduğu söylenebilir. Ayrıca, laktoz oranındaki artışların kaldırma kuvveti yönünden etkili olabileceği de düşünülebilir. Kefir üzerine yapılan bir çalışmada da, PAS proteini konsantratu ilavesinin, örneklerimizdekine benzer şekilde kefir örneklerinin pıhtı stabilitesini olumlu yönde etkilediği ve serum ayrılmasını azalttığı belirtilmiştir (26). Depolama sürecinde örneklerde serum ayrılması artmıştır. Bu durum kefir ile ilgili yapılan çalışmalarda da (27, 28) benzer şekilde olmuştur.

Örneklerde belirlenen viskozite değerleri, serum ayrılması değerlerini doğrular niteliktedir (Çizelge 5). Çünkü PAS katkılı örneklerin viskozite değerleri genel olarak kontrolden (A) daha yüksek bulunmuştur. Bu da serum ayrılmasını olumlu yönde etkileyen önemli bir faktördür. Çizelge 5'te de görüldüğü gibi örneklerin viskozite değerleri depolama sürecinde azalma eğilimi göstermiştir. Bu durum, asitlik gibi faktörlere bağlı olarak su bağlama kapasitesinde meydana gelebilecek değişimlerden kaynaklanabilir. Aynı konuda yapılan çalışmalarda da kefirlerin viskozitelerinin depolama sürecinde düzensiz değişimler gösterdiği belirlenmiştir (13, 23, 26).

Serum ayrılması ve viskozite değerleri açısından örnekler arasındaki fark ($P<0.05$) ve bu değerlerin depolama süresince gösterdiği değerler arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Ayrıca serum ayrılması değerleri açısından örnekler ve depolama

günleri arasındaki interaksyon da önemli bulunmuştur ($P<0.05$).

Çizelge 6'daki duyu değerlendirmesi sonuçlarına göre, PAS katkılı örneklerin panelistler tarafından kontrol örneğinden daha iyi bulunduğu görülmektedir. Çünkü PAS katkılı örneklerin aldığı lezzet puanları tüm periyotlarda kontrol örneğinden daha yüksek olmuştur. Ayrıca, PAS katkılı örneklerin görünüş ve yapı puanları da genel olarak kontrol örneğinden daha yüksektir. Görünüş, yapı ve lezzet özellikleri bakımından örnekler ve depolama günleri arasındaki interaksyon önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Örneklerin görünüş ve yapı özelliklerinin, depolama süresince düzensiz değişim gösterdiği görülmüştür (Çizelge 6). Ayrıca belirtilen özellikler açısından örnekler arasında görülen farklılıklarda da düzensizlikler vardır. Burada subjektif değerlendirmenin de etkili olduğu söylenebilir. Örnekler lezzet açısından değerlendirildiğinde, PAS içeren örneklerin kontrol örneğinden daha fazla beğenildiği görülmektedir. Örneğin, depolamanın 7. ve 14. günlerinde PAS içeren bütün örneklerin kontrol örneğinden daha lezzetli olduğu saptanmıştır. Ayrıca, örneklerin tamamının depolamanın 14. gününde, depolamanın 1. ve 7. gününe göre lezzet bakımından daha düşük puan aldığı belirlenmiştir.

Bu çalışmada, ülkemizde, yoğurt ve ayranın sonra en yaygın tüketimi olan kefirin üretiminde PAS'ın kullanılabilirliği üzerinde durulmuştur. Araştırma sonuçları, hammadde süte değişik oranlarda (%10, %20 ve %30) PAS ilave edilerek üretilen kefirlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri bakımından kabul edilebilir nitelikte olduğunu göstermiştir. Ayrıca, PAS ilavesinin kefirin serum ayrılması değerini azalttığı ve pıhtı yapısını olumlu yönde etkilediği belirlenmiştir. Duyusal

Çizelge 6. Kefir örneklerinin duyu değerlendirmesi sonuçları (n=2x10)
Table 6. Sensory analyzes results of kefir samples (n=2x10)

	Görünüş Appearance			Yapı Structure			Lezzet Taste		
	1. Gün Day 1	7. Gün Day 7	14. Gün Day 14	1. Gün Day 1	7. Gün Day 7	14. Gün Day 14	1. Gün Day 1	7. Gün Day 7	14. Gün Day 14
A	4.75±0.03 ^{Aa}	4.64±0.05 ^{Bb}	4.52±0.11 ^{Bb}	4.26±0.06 ^{Ba}	4.33±0.04 ^{Ba}	4.32±0.02 ^{Ba}	3.85±0.04 ^{Ba}	3.39±0.13 ^{Bb}	3.08±0.11 ^{Cc}
B	4.76±0.02 ^{Aa}	4.93±0.04 ^{Aa}	4.80±0.04 ^{Aa}	4.80±0.04 ^{Aa}	4.85±0.07 ^{Aa}	4.61±0.08 ^{Ab}	3.79±0.02 ^{Bb}	4.15±0.07 ^{Aa}	3.59±0.06 ^{Bc}
C	4.41±0.04 ^{Bc}	4.96±0.06 ^{Aa}	4.72±0.07 ^{Ab}	4.35±0.02 ^{Ba}	4.34±0.06 ^{Ba}	4.32±0.02 ^{Ba}	4.21±0.01 ^{Aa}	4.27±0.09 ^{Aa}	3.94±0.08 ^{Ab}
D	4.67±0.01 ^{Ab}	4.91±0.01 ^{Aa}	4.30±0.11 ^{Bc}	4.06±0.08 ^{Cb}	3.79±0.02 ^{Cc}	4.36±0.04 ^{Ba}	3.86±0.03 ^{Bb}	4.23±0.04 ^{Aa}	3.57±0.03 ^{Bc}

Aynı satırdaki farklı büyük harfler depolama günleri arasındaki farklılığın önemli olduğunu ifade etmektedir ($P<0.05$). Aynı sütundaki farklı küçük harfler örnekler arasındaki farklılığın önemli olduğunu ifade etmektedir ($P<0.05$)

Different capital letters in the same row refers to statistically significant difference between storage days ($P<0.05$). Different small letters in the same column refers to statistically significant difference between samples ($P<0.05$).

değerlendirme sonuçları da PAS ilaveli örneklerin kontrol örneğine kıyasla daha fazla beğenildiğini ortaya koymuştur. Elde edilen bu sonuçlar, kefir üretiminde PAS'ın kullanılabilirliğini göstermiştir.

KAYNAKLAR

1. Anon 2009. Tük Gıda Kodeksi. Fermente Süt Ürünleri Tebliği (2009/25). Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. 16 Şubat 2009 tarih ve 27143 sayılı Resmi Gazete, Ankara.
2. Ersoy M, Uysal H. 2003. Süttozu, Peyniraltı Suyu Tozu ve Yayıktalı Karışımları ile Üretilen Kefirlerin Özellikleri Üzerine Bir Araştırma II. Bazı Fiziksel ve Duyusal Özellikler. *Ege Üniv Ziraat Fak Derg*, 40 (1): 79-86.
3. Seçkin AK, Baladura E. 2011. Süt ve Süt Ürünlerinin Fonksiyonel Özellikleri. *C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 7.1: 27-38.
4. Güzel-Seydim Z, Wyffels JT, Seydim AC, Greene AK. 2005. Turkish Kefir and Kefir Grains: Microbial Enumeration and Electron Microscopic Observation. *Int J Dairy Technol*, 58 (1): 25-29.
5. Papavasiliou G, Kourkoutas Y, Rapti A, Sipsas V, Soupioni M, Koutinas AA. 2008. Production of Freeze-dried Kefir Culture Using Whey. *Int Dairy J*, 18: 247-254.
6. Enikeev R. 2012. Development of a New Method for Determination of Exopolysaccharide Quantity in Fermented Milk Products and its Application in Technology of Kefir Production. *Food Chem*, 134: 2437-2441.
7. Wszolek M, Kupiec-Teahan B, Guldager HS, Tamime AY. 2006. Production of kefir, koumiss and other related products. In: *Fermented Milks*, Tamime A (ed), Blackwell Science, UK, pp. 174-216.
8. Gülmez M, Güven A. 2003. Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* 4b and *Yersinia enterocolitica* O3 in Ayran and Modified Kefir as Pre- and Postfermentation Contaminant. *Vet Med - Czech*, 48 (5): 126-132.
9. Karaçıl MŞ, Acar Tek N. 2013. Dünyada Üretilen Fermente Ürünler: Tarihsel Süreç ve Sağlık ile İlişkileri. *U Ü Ziraat Fakültesi Dergisi*, 27 (2): 163-173.
10. Karatepe P, Yalçın H, Patır B, Aydın, I. 2012. Kefir ve Kefirin Mikrobiyolojisi. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 10 (1): 1-10.
11. Gürsel A. 2015. *Peyniraltı Suyu Teknolojisi*. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, Türkiye, 209 s.
12. Mete H. 2012. Peynir Altı Suyu'nun Ekmekçilikte Değerlendirilmesi ve Ekonomik Önemi. *TSMMO Sosyal Bilimler Dergisi*, 1: 1-10.
13. Yıldız F. 2009. Farklı yağ oranlarının ve farklı starter kültürlerin kefirin nitelikleri üzerine etkisi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsün Süt Teknolojisi Anabilim Dalı Doktora Tezi, Ankara, Türkiye, 203 s.
14. Koçak C, Gürsel A. 1981. Kefir. *GIDA*, 4: 11-14.
15. TSE. 2002. Pastörize süt. TS 1019. Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
16. Kurt A, Çakmakçı S, Çağlar A. 1993. *Süt ve Mamulleri Muayene ve Analiz Metodları Rehberi*. Atatürk Üniversitesi Yayınları, Erzurum, Türkiye, 150 s.
17. Gripon JC, Desmazeud MJ, Et le Baes D, Bergere JH. 1975. Role des Microorganismes et des Enzymes du Cours de la Maturation. *Le Lait*, 55 (548): 502-516.
18. Atamer M, Sezgin E. 1986. Yoğurttaki Kurumadde Artırımının Fiziksel Özellikler Üzerine Etkisi. *GIDA*, 11: 327-331.
19. Meilgaard M, Civille GV, Carr T. 1999. *Sensory Evaluation Techniques*, 2nd Edition, CRC Press, USA, 354 p.
20. Anon 2000. Türk Gıda Kodeksi. Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği (2000/6). Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. 14 Şubat 2000 tarih ve 23964 sayılı Resmi Gazete, Ankara.
21. Yerlikaya O, Kınık Ö, Akbulut N. 2010. Peyniraltı Suyunun Fonksiyonel Özellikleri ve Peyniraltı Suyu Kullanılarak Üretilen Yeni Nesil Süt Ürünleri. *GIDA*, 35 (4): 289-296.
22. Fagan CC, Castillo M, Payne FA, O'Donnel CP, O'Callaghan DJ. 2007. Effect of Cutting Time, Temperature, and Calcium on Curd Moisture, Whey Fat Losses, and Curd Yield by Response Surface Methodology. *J Dairy Sci*, 90: 4499-4512.
23. Irigoyen A, Arana I, Castiella M, Torre P, Ibanez FC. 2005. Microbiological, Physicochemical, and Sensory Characteristics of Kefir During Storage. *Food Chem*, 90: 613-620.

24. Uslu G. 2010. Ankara piyasasında satılan kefirlerin mikrobiyolojik, fiziksel, kimyasal ve duyuşal özellikleri üzerine bir araştırma. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsün Süt Teknolojisi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Türkiye, 70 s.
25. Cais-Sokolinska D, Danków R, Pikul J. 2008. Physicochemical and Sensory Characteristics of Sheep Kefir During Storage. *Acta Sci Pol Technol Aliment*, 7 (2): 63-73.
26. Sady M, Domagala J, Najgebauer-Lejko D, Grega T. 2009. Effect of Whey Protein Concentrate Addition on Texture and Rheological Properties of Kefir Produced from Skimmed Milk. *Biotechnol Anim Husband*, 25 (5-6): 763-771.
27. Paraskevopoulou A, Athanasiadis I, Blekas G, Koutinas AA, Kanellakib M, Kiosseoglou V. 2003. Influence of Polysaccharide Addition on Stability of a Cheese Whey Kefir-Milk Mixture. *Food Hydrocolloid*, 17: 615-620.
28. Kahraman C. 2011. Production of kefir from bovine and oat milk mixture. Graduate School of Engineering and Sciences of İzmir Institute of Technology, Yüksek Lisans Tezi, İzmir, Türkiye, 119 s.

Türkiye 12. Gıda Kongresi Takvimi

01 Mayıs 2016 tarihinden sonra gönderilen bildirimler geç kayıt ücreti tarifesiyle ücretlendirilecektir.

Kongre takvimi aşağıdaki gibidir

01 Temmuz 2015	: 1. Duyuru ve bildiri özetlerinin gönderilmeye başlanması
01 Mayıs 2016	: Bildiri kabulü için son tarih*
01 Haziran 2016	: Yazarlara sonucun bildirilmesi
01 Ağustos 2016	: Erken kayıt için son tarih
15 Eylül 2016	: Normal (standart) kayıt için son tarih
04 Ekim 2016	: Kongre merkezinde kayıtların başlaması, gıda mikrobiyolojisi ve bitkisel yağ analizleri kursları, açılış kokteyli
05 Ekim 2016	: Kongrenin başlaması
07 Ekim 2016	: Kongrenin kapanışı ve sosyal program (Edirne Şehir Turu)
08 Ekim 2016	: Sosyal Program

*02 Mayıs-01 Eylül 2016 tarihleri arasında da bildiri başvurusu yapılabilir. Bunlar, içeriği ve yazarın tercihi her ne olursa olsun poster olarak değerlendirilmek üzere hakemlere gönderilecektir. Kabul edilenlerin, bildiri özeti kitabında basılacağı garantisizdir. Bu bildirimler, kongre takvimi uyarınca sadece geç kayıt ücreti ile kongre kaydına alınabilir.

Kongre programında bildiri özetleri gönderilmesi aşamasında yeterli bir esneklik olduğu için bildiri özetlerinin gönderilme ve erken/ standart/ geç kayıt ücreti ödeme tarihlerinde herhangi bir **uzatma yapılmayacaktır.**

Ayrıntılı bilgi: <http://gidakongresi2016.org/>

BÜYÜK MENDERES DELTASINDAN AVLANAN KEFAL VE LEVREKLERDE Cu, Zn VE Cd DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ VE METALLOTİYONİN İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI*

Tuğçe Bayhan, Serap Ünübol Aypak**

Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Aydın

Geliş tarihi / Received: 03.03.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 25.03.2016

Kabul tarihi / Accepted: 28.03.2016

Özet

Çalışmamızda, Büyük Menderes Deltasından avlanan 15'er adet kefal ve levreğin karaciğer ve kas doku örnekleri mikrodalga fırında çözünürleştirilmiş ve ICP-OES ile Cu, Zn ve Cd analizleri yapılmıştır. Balıkların karaciğer dokularındaki metallothionein düzeyleri ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. En yüksek Cu değerleri levrek karaciğerinde (3485.20 ± 543.80 µg/kg), en yüksek Zn düzeyleri kefal karaciğerinde (522.60 ± 91.46 µg/kg), en yüksek Cd düzeyleri levrek kasında (9.43 ± 1.26 µg/kg) tespit edilmiştir. Kefal karaciğerindeki metallothionein düzeyi 115.62 ± 571.51 mg/kg, levrek karaciğerindeki metallothionein düzeyi 109.44 ± 159.54 mg/kg'dır. Elde edilen sonuçlar; literatür verileri ve ilgili bakanlığın açıklamış olduğu tolere edilebilir sınırlar göz önüne alınarak değerlendirildiğinde, Büyük Menderes Deltasından avlanan kefal ve levreklerde sağlık açısından tehlike oluşturacak bir ağır metal kontaminasyonunun olmadığı anlaşılmıştır. Dokulardaki ağır metal ve metallothionein düzeyleri arasındaki ilişkinin istatistik olarak önemli olmadığı görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Kefal, levrek, Cu, Zn, Cd, Büyük Menderes, metallothionein

DETERMINATION OF Cu, Zn AND Cd CONCENTRATIONS OF MULLET AND PERCHES HUNTED IN BÜYÜK MENDERES DELTA AND INVESTIGATION OF THEIR RELATIONSHIP WITH METALLOTHIONEIN*

Abstract

In our study, liver and muscle samples of 15 pieces mullet and perchs fish samples hunted from Büyük Menderes Delta were solubilised in the microwave and Cu, Zn, Cd analyzes were performed by ICP-OES. Metallothionein levels in fish liver tissues were determined by ELISA method. The highest Cu values were found at perch liver (3485.20 ± 543.80 µg/kg), the highest Zn values were found at mullet liver (522.60 ± 91.46 µg/kg), the highest Cd values were found at perch muscle (9.43 ± 1.26 µg/kg). The metallothionein level in mullet liver is 115.62 ± 571.51 mg/kg and in perch liver is 109.44 ± 159.54 mg/kg. When obtained results are compared to the literature data and related ministry regulations with considering the tolerable limits, it is concluded that mullet and perchs samples hunted from Büyük Menderes Delta do not constitute risk for public health in respect to their heavy metal contamination levels. There was no statistical significance between the levels of heavy metals and metallothionein concentrations in tissues.

Keywords: Mullet, perch, Cu, Zn, Cd, Büyük Menderes, metallothionein

* Bu makale Tuğçe BAYHAN'ın yüksek lisans tezinden özetlenmiş olup, araştırma, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından (proje kodu: VTF-14022) desteklenmiştir. Çalışmanın özeti 27. Ulusal Biyokimya kongresinde yayınlanmıştır. *This article summarizes Tuğçe Bayhan's master thesis. The research was supported by Adnan Menderes University Scientific Research Projects Unit (project code: VTF-14022). The summary of the study were published in the 27th National Biochemistry Congress.*

** Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ serapunubol@yahoo.com,

© (+90) 256 247 0700,

☎ (+90) 256 247 0120

GİRİŞ

Yirmi birinci yüzyılda dünya ülkelerinin en büyük sorunlarından biri, gelişen teknolojiye paralel olarak gün geçtikçe artan ve yaşamı olumsuz etkileyen çevre kirliliğidir. Çevre kirliliğinin artış göstermesi ile birlikte yeryüzünde yaşayan canlılar beslenme ortamlarının ve besin maddelerinin kirlenmesi nedeniyle tehlike altındadırlar. Doğaya yayılmış bulunan her türlü kirlilikte metal kalıntılarının önemli bir payı vardır. Bunlar; bitkiler, hayvanlar ve besin zinciri içinde son tüketici olan insanlar üzerinde toksik etkiler yapmaktadır.

Ağır metaller, canlılar tarafından belirli bir konsantrasyonun üzerinde alındığında hücrenin metabolizmasına ve gelişimine zarar verirler. Çeşitli kaynaklardan ortaya çıkabilmeleri, çevre koşullarına dayanıklı olmaları ve kolaylıkla besin zincirine girerek canlılarda artan yoğunluklarda birikebilmeleri nedeni ile diğer kimyasal kirleticiler arasında ilk sırada yer alırlar (1). Çinko, bakır, kadmiyum gibi ağır metallerin, elektrik, kâğıt, boya, plastik, metal kaplama ve cam sanayi gibi çeşitli endüstri alanlarında kullanımı, tarımda verimi arttırmak amacı ile yaygın olarak kullanılan pestisit ve yapay gübrelerin bileşimine girmeleri, bu metallerin su ortamındaki derişimlerini arttırır (2). Bu birikimin sonucu olarak su ortamında yaşayan canlılar üzerinde kısa ya da uzun vadede ortaya çıkabilen zararlı etkiler meydana gelir (3). Son yıllardaki hızlı nüfus artışı ve hızlı endüstrileşmenin sonucu olarak, özellikle akuatik ortamlardaki toksik ağır metal seviyesi artmaktadır. Büyük Menderes Akarsuyu ve yan kolları, çevresindeki yerleşim birimlerinde ve sanayi tesislerinde oluşan atıklar için bir alıcı ortam oluşturmaktadır. Bu durum yakın zamana kadar ciddi bir sorun oluşturmamıştır ancak kentsel nüfus artışı ile birlikte sanayi ve bazı altyapı yatırımlarındaki artış, Büyük Menderes Akarsuyundaki kirliliğin artmasına neden olmuştur (4).

Çevre kirliliğine sebep olan ve yaşamı olumsuz etkileyen ağır metaller organizmada akut ve kronik çeşitli zehirlenme belirtileri meydana getirmektedirler. Bu sebeple gıdaların ağır metallerle kirlilik düzeylerinin belirlenmesi ve gerekli tedbirlerin alınması son derece önemlidir. Metalloiyoninler (MT), sülfürden zengin, enzimatik olmayan, Zn, Cu ve Cd gibi metallere affiniteli, hücre içi metal şelatlayıcılarıdır. Karaciğer, pankreas,

bağırsak ve böbrekte çok yoğun olarak bulunurlar. Küçük molekül ağırlıklı (6000-7000 Da), sisteince zengin proteinler olup, metal iyonlarını diğer proteinlere transfer ederek metalloşaperon olarak davranırlar. Esansiyel iz elementlerden çinko ve bakırın serbest iyon derişimini kontrol ederken, aynı zamanda ağır metal olan bu elementlerin ve diğer ağır metallerin detoksifikasyon ajanı olarak görevlidirler (5). Bakır, molibden, çinko gibi esansiyel metaller ile kadmiyum, civa, kurşun gibi esansiyel olmayan elementlerin organ, doku ve hücrelerde aşırı miktarda birikmesi toksikasyona sebep olmaktadır. Bu toksikasyonun önlenmesinde, MT'ler devreye girmekte ve ağır metalleri bağlayarak onları zararsız hale getirmektedir (6). Metalloiyoninler ağır metalleri sadece metal bağlama kapasiteleri ile değil aynı zamanda hücreleri oksidatif hasardan koruyarak da detoksifiye ederler (7).

Bu çalışmanın amacı; Büyük Menderes nehrindeki kefal ve levreklerin kas ve karaciğerlerindeki Cu, Zn ve Cd düzeylerini belirlemek ve bu elementlerin en fazla bulunduğu organ olan karaciğerdeki MT düzeylerini araştırarak, olası bir ağır metal kirliliği durumunda bu iki balık türünün detoksifikasyon kapasitelerini karşılaştırmaktır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada gereç olarak 15'er adet kefal (*Leuciscus cephalus*) ve levrek (*Perca fluviatilis*) balığı örnekleri kullanıldı. Çalışma, Büyük Menderes Deltasında bulunan Deringöl Lagününden avlanan bu balıkların karaciğer ve kas dokuları ile yapıldı. Balıklar, yaz döneminde, ağustos ayında avlandı. Buz içerisinde laboratuvara getirilen örnekler numaralandırıldı, balıkların boyları (40-50 cm) ölçüldü ve ağırlıkları (1000-1500 g) tartıldı. Kas ve karaciğer örnekleri alınarak çözünürleştirme işlemine kadar -18 °C'lik derin dondurucularda muhafaza edildi.

Örneklerin Çözünürleştirilmesi

Teflon tüplere 1'er gram yerleştirilen örneklerin üzerine önce 15 ml % 65'lik HNO₃ ilave edilip mikrodalga fırında asitle yakma işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra 2 ml % 30'luk H₂O₂ ilave edilerek yakma işlemi tekrarlandı. Çözündürülmüş olan bu örnekler oda sıcaklığında soğutulduktan sonra 0.45 µm'lik Whatman filtrelerle süzülerek 25 ml'lik balon jojelere alındı ve 25 ml çizgisine kadar deiyonize su ile tamamlanarak analize hazırlandı (7, 8).

Ağır metal analizleri

Karaciğer ve kaslardaki ağır metal düzeyleri Prism marka (Teledyne Leeman Lab, ABD) ICP-OES ile okundu. ICP-OES'te kullanılmak üzere her bir element için 5 tane standart ve bir tane kör olmak üzere 6 adet standart çözelti hazırlandı. Bu çözeltiler kullanılarak 5 noktalı kalibrasyon eğrileri çizildikten sonra ağır metal düzeyleri analiz edildi.

Metallotiyonin Analizi İçin Doku**Homojenizatının Hazırlanması**

Cam homojenizatöre alınan 0.2 gram karaciğer örneğinin üzerine 1 ml PBS ilave edilerek buz içerisinde homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi. Sonrasında örnekler 5 dk ultrasonifikasyona tabi tutuldu ve 5000 rpm'de 15 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantları alınarak MT ölçümüne geçildi (9, 10).

Metallotiyonin Analizi

Karaciğer doku örneklerinde MT analizi, Lowry yöntemiyle (11) spektrofotometrede protein düzeyleri tespit edildikten sonra ELISA (Ivymen system) yöntemi ile yapıldı. Bu amaçla Fish Metallothionein ELISA Kit (*Katalog no:MBS038414*) kullanıldı.

İstatistiksel Değerlendirmeler

Çalışma sonunda analiz sonuçlarına ait ortalama±

Çizelge 1. Örneklerden elde edilen ağır metal sonuçları
Table 1. Heavy metal results obtained from samples

n: 15		Kefal-Mullet			Levrek-Perch		
		Min	Max	Ort değer Mean value $\bar{X}\pm S\bar{X}$	Min	Max	Ort değer Mean value $\bar{X}\pm S\bar{X}$
Cu (µg/kg)	Kas-Muscle	8.73	50.81	25.21±3.20	4.74	43.24	25.40±2.98
	Karaciğer-Liver	133.95	862.84	378.56±57.70	798.93	7492.07	3485.20±543.80
Zn (µg/kg)	Kas-Muscle	16.93	211.55	101.83±14.76	23.35	216.98	71.08±12.96
	Karaciğer-Liver	176.12	1464.85	527.60±91.46	131.20	975.46	550.10±71.59
Cd (µg/kg)	Kas-Muscle	1.24	12.47	6.07±0.90	2.07	19.63	9.43±1.26
	Karaciğer-Liver	3.43	15.09	9.13±0.94	2.82	17.03	8.22±1.21

Çizelge 2. Kas ve karaciğer dokularındaki ağır metal düzeyleri
Table 2. Heavy metal levels in muscle and liver tissue

n: 15		Kefal-Mullet $\bar{X}\pm S\bar{X}$	Levrek-Perch $\bar{X}\pm S\bar{X}$	Önemlilik Significance
Cu (µg/kg)	Kas-Muscle	25.21±3.20	25.40±2.98	ÖD-NS
	Karaciğer-Liver	378.56±57.70	33485.20±543.80	***
Zn (µg/kg)	Kas-Muscle	101.83±14.76	71.08±12.96	ÖD-NS
	Karaciğer-Liver	527.60±91.46	550.10±71.59	ÖD-NS
Cd (µg/kg)	Kas-Muscle	6.07±0.90	9.43±1.26	ÖD-NS
	Karaciğer-Liver	9.13±0.94	8.22±1.21	ÖD-NS

***P<0.001 ÖD: Önemli Değil $\bar{X}\pm S\bar{X}$: (Aritmetik ortalama ± Standart hata) NS: Not significant $\bar{X}\pm S\bar{X}$: (Arithmetic mean ± Standart error)

standart hata ($\bar{X}\pm S\bar{X}$), minimum, maksimum değerler verildi. Temel istatistik değerler, gruplar arası fark ve önemlilik için SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, version 22.0) paket programında T testi ile Man Whitney U testi kullanıldı.

BULGULAR VE TARTIŞMA**Ağır Metal Düzeyleri**

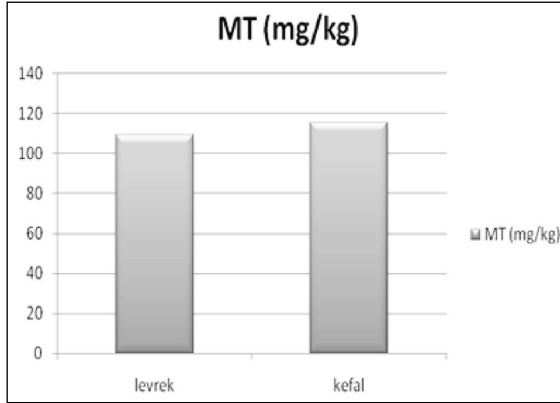
Elde edilen sonuçların minimum, maksimum ve ortalama değerleri hesaplanarak Çizelge 1'de gösterilmiştir. "n" birey sayısını göstermektedir.

Kas ve karaciğer dokusundaki ağır metal düzeyleri Çizelge 2'de gösterilmiştir. "n" birey sayısını göstermektedir.

Balıklarda Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının açıkladığı kabul edilebilir değerler, bakır için 20.00 mg/kg, çinko için 50.00 mg/kg, kadmiyum için 0.10 mg/kg' dır (12). Sonuçlarımız bu değerler dikkate alınarak değerlendirilmiştir.

Karaciğerdeki Metallotiyonin Düzeyleri

Karaciğerdeki MT düzeyleri levrek karaciğerinde 109.44 mg/kg kefal karaciğerinde 115.62 mg/kg şeklinde olup, şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Metallothionein düzeyleri
Figure 1. Metallothionein levels

Kirlenmelerin bir bölümünü oluşturan ağır metaller, metal bileşikler ve çeşitli mineraller; göller, nehirler, körfez ve okyanuslar ile bunların sedimentlerinde geniş birikim gösterirler. Bu birikim sonucunda sularda yaşayan balıklar ve diğer canlıların bünyesinde yoğunlaşan bu elementler eşik dozlarını aştıklarında, ciddi hastalıklara hatta ölümlere sebep olabilirler. Aynı şekilde ağır metalle kirlenmiş balıkların insanlar tarafından tüketilmesi durumunda ciddi sağlık problemleriyle karşı karşıya kalınmaktadır (4).

Son yıllardaki hızlı nüfus artışı ve hızlı endüstrileşmenin sonucu olarak, özellikle akuatik ortamlardaki toksik ağır metal seviyesinin arttığını gösteren çalışmaların sayısı oldukça fazladır. Öztürk ve Bat (14), Kızılırmak nehrindeki Altınkaya barajında, bazı ağır metalleri (Cd, Cr, Cu, Fe, Ni ve Pb) su, sediment ve aynalı sazın (*Cyprinus carpio*) dokularında incelemişlerdir. Balıklarda Cr, Pb, Cd, Ni düzeyleri uluslararası kuruluşlar tarafından kabul edilebilir limitleri aştığını bildirmişlerdir. Brown ve Balls (15), Ege Denizindeki ekonomik balık türlerinden sultan balığı (*Mullus barbatus*), berlam (*Merluccius merluccius*), kupes (*Boops boops*) türlerindeki ağır metallerin (Cu, Zn, Cd, Pb) kas, solungaç, karaciğer ve gonadlardaki düzeylerini araştırmışlar ve bu ağır metallerin en fazla karaciğerde, en az kaslarda bulunduğunu bildirmişlerdir. Kocaman (16), Marmara Denizindeki farklı istasyonlarda avlanan demersal balıklarında (berlam, mezigit, öksüz, barbunya) bakır ve çinko düzeylerini araştırmış ve tüm türlerde kabul edilebilir limitlerin altında olduğunu, bu ağır metallerin organlarda belirlenen birikim düzeyine göre ise, Cu'nun en

fazla karaciğerde, sonra kasta ve son olarak solungaçta bulunduğu, Zn'nun ise; en fazla solungaçta, sonra karaciğerde ve son olarak kasta bulunduğunu bildirmiştir. Wong ve Chu (17), Hong Kong'daki deniz kültür alanlarından topladıkları hamur balığı (*Epinephalus areolatus*), kırmızı imparator (*Lutjanus russelli*), çipura (*Sparus aurata*) dokularında, Cu ve Zn düzeylerini incelemişlerdir. Bakırın en fazla karaciğerde (4.94-44.1 mg/kg), daha sonra solungaçlarda (0.85-4.84 mg/kg) ve son olarak kaslarda (0.77-1.41 mg/kg) bulunduğunu, Zn'nun ise, yine en çok karaciğerde (59.5-174 mg/kg), daha sonra solungaçlarda (71.5-116 mg/kg) ve en az olarak kaslarda (20.8-68.3 mg/kg) bulunduğunu bildirmişler. Bu düzeylerin kabul edilebilir limitlerin altında olduğunu belirtip, sağlık açısından herhangi bir risk taşımadığını ifade etmişlerdir. Mormede ve arkadaşları (18), İskoçya'nın batısında bulunan Rockail Boğazı'ndaki demersal balık türlerinden, fare balığı (*Nezumia aequalis*), kuzey atlantik balığı (*Lepidion eques*), yuvarlak ışın balığı (*Raja fyllae*) dokularında, Cu ve Zn düzeylerini araştırmışlar; Cu'nun en fazla karaciğerde (1.92-3.07 mg/kg), sonra solungaçlarda (0.47-0.93 mg/kg) ve son olarak kaslarda (0.17-0.33 mg/kg) biriktiğini belirtmişlerdir. Zn'nun ise en fazla karaciğerde (15.05-17.97 mg/kg), sonra solungaçlarda (12.89-29.88 mg/kg) ve son olarak kaslarda (2.62-5.53 mg/kg) bulunduğunu bildirmişlerdir. Demirak ve arkadaşları (19), Dipsiz Çayının Yatağan Termik Santrali etkisindeki bir alanında yaptıkları çalışmada, ak balığın (*L. Cephalus*) kas ve solungaç dokularındaki Cd, Cr, Cu, Pb ve Zn metallerinin birikimini incelemişler ve Zn, Cd, Pb ve Cr metallerinin solungaçta, Cu'nun ise kas dokusunda daha yüksek düzeyde olduğunu bildirmişlerdir. Bulunan bu değerlerden Cu ve Cd'nun yasal limitlerin altında, Cr, Pb ve Zn'nun yasal limitlerin üzerinde olduğunu ifade etmişlerdir. Dural ve Göksoy (20), Tuzla lagününden, çipura (*Sparus aurata*), Avrupa deniz levreği (*Dicentrarchus labrax*) ve dubar (*Mugil cephalus*) türlerinin kas, solungaç, karaciğer ve gonadlarında Cd, Pb, Zn ve Fe düzeylerini incelemişlerdir. Ağır metal ortalamasının; en çok çipuranın kaslarında bulunduğu ve bu metallerden Cd ve Zn'nun baharda, Fe, Cu ve Pb'nun kışın arttığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada Zn, Cd ve Pb düzeylerinin bazı mevsimlerde kasta kabul edilebilir limitlerin üzerine çıktığı görülmüştür. Yabancı ve arkadaşları (21), Bafa Gölü'nden elde

ettikleri levreklerin (*Dicentrarchus labrax*) kas dokularında Al, Cr, Ni, Cu, As, Cd, Hg ve Pb düzeylerini araştırmışlardır. Ağır metallerin kas dokudaki düzeylerinin $Al > Cu > As > Pb > Hg > Cd > Cr > Ni$ şeklinde olduğu bildirilmiştir. Balık kas dokularının analizinden elde edilen ortalama yoğunlukların, sınır değerlerde olan kadmiyum hariç tutulursa, halk sağlığı açısından bir risk oluşturmadığını belirtmişlerdir.

Büyük Menderes Deltasından avlanan kefal (*Leuciscus cephalus*) ve levrek (*Perca fluviatilis*) örnekleriyle yaptığımız bu çalışmada, balıkların yenilebilir kısımlarında (kas), karaciğere nazaran daha düşük metal düzeyleri tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar; literatür verileri ve Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının açıklamış olduğu tolere edilebilir sınırlar göz önüne alınarak değerlendirildiğinde, Büyük Menderes Deltasından avlanan kefal ve levreklerde sağlık açısından tehlike oluşturacak bir ağır metal kontaminasyonunun olmadığı anlaşılmıştır. Balıkların karaciğer ve kas dokularındaki bakır, çinko ve kadmiyum düzeylerinin güvenli sınırlar içerisinde olması, Kocaman'ın (16), Wong ve Chu'nun (17), Mormede ve arkadaşlarının (18), Brown ve Balls'ın (15), Ünsal ve Yemencioğlu'nun (1992), Öztürk ve Bat'ın (14), Yabanlı ve arkadaşlarının (21) çalışmalarına uyumludur. Dural ve Göksu (20) ise çalışmalarında, bazı dönemlerde metallerin belirtilen limitleri aştığını bildirmişlerdir. Demirak ve arkadaşları (19) ise bakır ve kadmiyumu güvenli sınırlarda, çinkoyu ise sınır değerlerin üzerinde tespit etmişlerdir.

Metallotiyoninlerin metal bağlama özelliklerinin saptanması ile birlikte ağır metal detoksifikasyonunda da potansiyel rolleri olabileceği düşünülmüş ve bu düşünce, yapılan birçok in vivo ve in vitro çalışma ile desteklenmiştir. Çeşitli metallere maruziyetten sonra, böbrek, karaciğer ve barsak gibi organlarda MT sentezinin arttığı ve bu organlarda MT birikiminin olduğu saptanmıştır. MT'ler doğrudan metal tutucu olduklarından, metallerin hücre içerisinde serbest halde dolaşarak hücreye zarar vermelerini engellemektedir. MT'lerin metal detoksifikasyonları, maruz kalınan hücrenin tipine, metalin özelliğine ve metalin konsantrasyonuna göre değişmektedir (22, 23).

Birçok ülkede ve Türkiye'nin değişik bölgelerinde, metallotiyonin proteininin araştırılmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır (24-27). Gürel (24), kadmiyum ve bakıra maruz bırakılan sığanların karaciğer,

böbrek, akciğer, kalp ve beyin dokularındaki Cd, Cu ve metallotiyonin düzeylerini araştırmışlardır. Bu amaçla, dişi Sprague-Dawley sıçanlarından oluşan ve her biri sekiz hayvan içeren dokuz grup oluşturulmuştur. İçme suyu ile dört grup kadmiyuma, dört grup bakıra maruz bırakılmıştır. Kontrol grubuna ise normal içme suyu verilmiştir. Cd'a maruz bırakılan grupların karaciğer, böbrek, akciğer ve kalp dokularındaki Cu, Cd ve MT düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı artışlar belirlenmiştir.

Van Campenhout ve arkadaşları (25), Belçika'da 10 örnekleme sitesinden 10'ar adet kaya balığı avlamışlar, sudaki metal kontaminasyonunu belirlemek için balıkların farklı dokularındaki (solungaç, kas, karaciğer) kadmiyum, çinko ve metallotiyonin düzeylerini araştırmışlardır. Karaciğer dokusunda Cd, Zn ile metallotiyonin düzeyleri arasında pozitif korelasyon, solungaç dokusundaki Cd, Zn ile metallotiyonin düzeyleri arasında negatif korelasyon görülmüştür. Böbrek dokusunda ise Cd, Zn ile metallotiyonin düzeyleri arasında bir ilişki kurulamamıştır. MT düzeylerinin böbrek ve solungaca kıyasla daha çok karaciğerde ölçülmesi gerektiğini vurgulamışlardır. Kalay ve Erdem (26), Nil çipurasının (*Tilapia nilotica*) farklı dokularındaki kadmiyum düzeylerini incelemişler, karaciğer, böbrek dokularındaki kadmiyumun, total protein derişimine etkisini araştırmışlardır. Solungaç, karaciğer ve böbrek dokularında kadmiyumun yüksek düzeyde olduğunu bildirmişler, bu toksik ağır metalin öncelikle karaciğer dokusunda, daha sonra böbrek dokusunda yoğunlaştığını ifade etmişlerdir. Karaciğer ve böbrek dokularındaki kadmiyum düzeyleri ile total protein düzeyleri arasında pozitif korelasyon görüldüğünü bildirmişlerdir. Metabolik olarak aktif olan karaciğer ve böbrek dokularında, total protein derişiminin artmasını, kadmiyum düzeyine bağlı olarak bu dokularda artış gösteren MT proteinine bağlamışlardır. Bervoets ve arkadaşları (27), Belçika'daki Scheldt Nehrinde, dere kaya balığı (*Gobio gobio*), kızılkanat (*Rutilus rutilus*) ve levrek (*Perca fluviatilis*) balıklarını bir referans site boyunca 6 örnekleme ile elde etmişlerdir. Sitelerden her tür için 10 balık alınmış, üç tatlı su balığının karaciğerindeki kadmiyum, bakır ve çinko düzeyleri ve metallotiyonein indüksiyonu araştırılmıştır. Tüm Cd ve Zn değerlerinin ulusal sınırları aştığı,

levrek karaciğer Cd ve Zn düzeylerinin, diğer balıkların karaciğer Cd ve Zn düzeylerinden yüksek olduğu görülmüştür. Karaciğerdeki Cu düzeylerinin ise düşük olduğu belirtilmiştir. En yüksek MT değerlerinin kayabalgısında, en düşük MT değerinin levrekte olduğu bildirilmiştir. Levreklerde görülen yüksek Cd ve Zn düzeylerine rağmen gözlenen düşük MT değerleri levreklerin detoksifikasyon kapasitelerinin düşük olduğunu göstermektedir. Böylece levreğin metal kirliliğine duyarlılığının daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır. MT seviyeleri ile hepatik çinko düzeyleri arasında pozitif korelasyon görülmüştür.

Büyük Menderes Deltasından avlanan kefal (*Leuciscus cephalus*) ve levrek (*Perca fluviatilis*) balıklarının karaciğer dokularında yaptığımız MT analizlerinde, levrek karaciğerinde MT düzeyinin kefal karaciğerindeki MT düzeyine yakın bir değerde olduğu görülmüştür. Bu değerler, kefal ve levrek karaciğerinde bulunan Cu, Cd, Zn değerleriyle karşılaştırıldığında bir önemlilik görülmemiştir. Balıklarımızın karaciğerindeki ağır metal düzeyleri, izin verilen limitlerden çok daha düşük olduğu için metalotiyonin değerlerinde ağır metallerle ilişkili bir değişiklik olmadığı düşünülmektedir.

SONUÇ

Akuatik ortamlar doğal ve antropojenik kirleticilerin son uğrak yerleri olduğundan, bu ortamlardaki ağır metal birikimi biyolojik yaşamı tehdit etmektedir. Balıklar çevreleriyle sürekli ilişki halinde yaşadıklarından, fizyolojik ve kimyasal değişikliklere oldukça duyarlıdır. Su ekosistemlerinin önemli bir canlı grubu olan balıklar, insanlar için değerli bir besin kaynağıdır. Yapılan bu çalışmayla, sıklıkla tüketilen iki farklı balığın karaciğer ve kas dokularındaki bakır, çinko ve kadmiyum düzeyleri araştırılmış, ayrıca ağır metallerin toksik etkilerini azaltan metalotiyonin proteininin karaciğerdeki düzeyleri belirlenmiştir. Kefal ve levreklerin karaciğer ve kas dokularındaki bakır, çinko ve kadmiyum düzeylerinin kabul edilebilir sınırların çok altında olduğu gözlenmiştir. Genel olarak ağır metaller, MT proteininin başlıca sentez yeri olan karaciğer dokusunda daha fazla görülmüştür. Ağır metal birikimi ile artış gösteren MT'ler, kefal ve levreklerin karaciğer dokularında incelenmiş ve her iki balıkta benzer değerlerde bulunmuştur. Toler edilebilir sınırlar göz önüne

alınarak değerlendirildiğinde bakıl dokularındaki ağır metal seviyeleri çok düşük olduğu için metalotiyonin düzeyleri ile ağır metal düzeyleri arasında istatistiki olarak anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır.

İncelenen balıklarda bakır, çinko ve kadmiyum düzeyleri açısından Büyük Menderes Akarsuyu'ndan kaynaklanmış olabilecek önemli bir kontaminasyonun olmadığı anlaşılmıştır. Ancak sonraki dönemlerde yapılacak analizlerde, farklı sonuçlarla karşılaşılabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Örneğin, suya ya da toprağa karışacak tehlikeli bir sanayi atığı, kısa ya da uzun vadede ciddi tehlikelere neden olabilir. Bu açıdan bakıldığında ilgili bakanlıkların konuya gereken hassasiyeti göstermesi, sanayinin ve endüstrileşmenin yoğun olduğu bölgelerde sıklıkla gerekli kontrollerin yapılması gerekmektedir. Özellikle ağır metal kirliliğinin bulunduğu bölgelerde değişik balık türlerinin MT düzeyleri araştırılarak detoksifikasyon kapasitelerinin karşılaştırılması yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Çalışkan E. 2005. Asi Nehri'nde su, sediment ve karabalık (*Clarias gariepinus burchell*)'ta ağır metal birikiminin araştırılması. T.C. Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Hatay, Türkiye, 64 s.
2. Brüwer M, Schmid KW, Metz KA, Kriegelstein CF, Senninger N, Schürmann G. 2001. Increased Expression of metallothionein in inflammatory bowel disease. *Inflamm Res*, 50 (4): 289-293.
3. Karadede H. 1997. Atatürk Baraj Gölü'nde su, sediment ve balık türlerinde ağır metal birikiminin araştırılması. Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Diyarbakır, Türkiye, 72 s.
4. Kayhan FE. 2006. Su Ürünlerinde kadmiyumun biyobirikimi ve toksisitesi. Ege Üniversitesi *Su Ürünleri Dergisi*, 23: 215-220.
5. Swiergosz R. 2001. Cadmium distribution and toxicity in tissues of small rodents. *Microsc Res Techniq*, 55 (3): 208-222.
6. Dameron CT, Harrison MD. 1998. Mechanisms for protection against copper toxicity. *Am J Clin Nutr*, 67 (5): 1091-97.

7. Hidalgo J, Penkowa M, Espejo C, Carrasco J, Quintana A, Molinero A, Florit S, Giralt M. 2006. Expression of metallothionein-I, -II, and -III in Alzheimer disease and animal models of neuro inflammation. *Exp Biol Med*, 231: 1450-1458.
8. Türkmen A. 2003. İskenderun Körfezi'nde deniz suyu, askıdaki katı madde, sediment ve dikenli taş istiridyesi'nde (*Spondylus spinosus schreibers*, 1793) oluşan ağır metal birikimi üzerine araştırma. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Erzurum, Türkiye, 50 s.
9. Ikem A, Egiebor NO. 2005. Assessment of traceelements in cannedfishes (mackerel, tuna, salmon, sardines and herrings) marketed in Georgia and Alabama (United States of America) *J Food Compos Anal*, 18: 771-787.
10. Tomita T. 2000. Metallothionein in pancreatic endocrine neoplasms. *Modern Pathol*, 13: 389-395.
11. Zhou Z, Sun X, Kang YJ. 2002. Metallothionein protection against alcoholic liver injury through inhibition of oxidative stres. *Exp Biol Med*, 227 (3): 214-222.
12. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-275.
13. Anon 2002. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı. Su ürünleri kanunu ve su ürünleri yönetmeliği. 63-78.
14. Öztürk M, Bat L. 1995. Altinkaya Barajı'nda yaşayan *C. carpio* türünün çeşitli organ ve dokularındaki bazı ağır metallerin birikimi. 2. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi Bildiri, 11-13 Eylül, Ankara, Türkiye, 651-657.
15. Brown FM, Balls PW. 1997. Trace metals in fish and shell fish from Scottish waters. *Scot Res Rep*, 60: 30.
16. Kocaman I. 1999. Marmara Denizi demersal balıklarında ağır metal kirliliği. İstanbul Üniversitesi Deniz Bilimciliği ve İşletmeciliği Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, Türkiye, 25 s.
17. Wong CK, Chu LM. 2001. Heavy metal concentrations in marine fishes collected from fish culture sites in Hong Kong. *Arch Environ Con Tox*, 40: 60-69.
18. Mormede S, Davies I. 2001. Trace elements in deep-water fish sp. from the Rock all Trough. *Fish Res*, 51: 197-206.
19. Demirak A, Yılmaz F, Tuna AL, Özdemir N. 2005. Heavy metals in water, sediment and tissues of *Leuciscus cephalus* from a stream in south western Turkey. *Chemosphere*, 1-7 p.
20. Dural M, Göksu MZL, Özak AA, 2007. Investigation of heavy metal levels in economically important fish species captured from the Tuzla lagoon. *Food Chem*, 5-7 p.
21. Yabancı M, Coşkun Y, Öz B, Yozukmaz A, Sel F, Öndeş S. 2013. Determination of the content of heavy metal in the lake water and seabass (*Dicentrarchus labrax*) obtained from Bafa Lake and evaluation in terms of public health. *Bornova Vet Bil Derg*, 35 (49): 15-23.
22. Kagi JH. 1991. Overview of metallothionein. *Method Enzymol*, 205: 613-626.
23. Vallee BL. 1995. The function of metallothionein. *Neurochemistry*, 27: 23-33.
24. Gürel Z. 2001. Investigation of relationship apoptosis and metallothionein in tissues of rat which to cadmium and copper. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı Doktora Tezi, İstanbul, Türkiye, 78 s.
25. Van Campenhout K, Bervoets L, Blust R. 2003. Metallothionein concentrations in natural populations of gudgeon (*Gobio gobio*): Relationship with metal concentrations in tissues and environment. *Environ Toxicol Chem*, 22: 1548-1555.
26. Kalay M, Erdem C. 2003. Tilapia nilotica'da kadmiyum birikiminin total protein düzeyine etkisi. *Turk J Vet Anim Sci*. 27: 1367-1374.
27. Bervoets L, Knapen D, De Jonge M, Van Campenhout K, Blust R. 2013. Differential hepatic metal and metallothionein levels in three feral fish species along a metal pollution gradient. *Plos One*. 8 (3): 1-11.



**Sektörde 23 yıllık tecrübe*

CND DANIŞMANLIK olarak sektörel bazda ayrıntılı referanslarımızı <http://www.cnd.com.tr/> web sayfamızdan görebilirsiniz.

CND DANIŞMANLIK, Türk Müşavir Mühendis ve Mimarlar Birliği'ne (TMMMB) üye kuruluştur.

Siz değerli müşterilerimizin Ankara'daki çözüm ortağı olarak yıllardır faaliyetlerini sürdüren CND DANIŞMANLIK, yine aynı hassasiyetle, **"Memnun müşteri en iyi referanstır."** ilkesinden yola çıkarak çalışmalarına devam etmektedir.

CND DANIŞMANLIK olarak, yatırımların projelendirilmesi ve yapılabilirlik etütlerinin hazırlanması konularında 23 yıl önce başladığımız yolculukta, günümüzde yerli ve yabancı sermayeli kuruluşların faaliyet gösterdikleri "Tarım, gıda, turizm, eğitim, sağlık, makine, enerji, tekstil ve müteahhitlik hizmetleri vb. " çeşitli sektörlerde yüzlerce kuruluşa yatırım danışmanlığı, yasal mevzuat danışmanlığı, kalite yönetim sistemleri danışmanlığı, marka ve patent danışmanlığı ile firmaların idari mevzuatlara uyumları ile ilgili her türlü belgelendirmeleri yanında Kişisel Gelişim Eğitimleri, Kalite Yönetim Sistemleri Eğitimleri (ISO 9001:2008, ISO14001:2004, ISO 22000:2005 ve OHSAS 18001:2007 Standartları ile Lejyonella vb), Gıda Güvenliği ve Hijyeni Eğitimleri vb. konularda eğitim hizmetleri de vermekteyiz.

DANIŞMANLIK ve EĞİTİM Hizmetlerimiz

1. Fizibilite Etütleri Hazırlanması
 2. Yatırım Teşvik Belgesi Alınması
 3. Dahilde İşleme İzin belgesi Alınması
 4. Turizm Bakanlığı Yatırım ve İşletme Belgeleri Alınması
 5. Yabancı Personel İzinleri Alınması
 6. Özel İthal İzinleri Alınması
 7. İhracat Sertifikaları Alınması
 8. AB Hibe Projeleri Hazırlanması
 9. Tarım Bakanlığı IPARD ve TEDGEM Hibe Projeleri Hazırlanması
 10. Marka ve Patent Tescilleri
 11. Endüstriyel Tasarım Tescilleri
 12. Kapasite Raporu Alınması
 13. Barkod Numarası Alınması
 14. Sanayi Sicil Belgesi Alınması
 15. GSM Ruhsatı, Çalışma İzni Alınması
 16. Tarım ve Hayvancılık İşletmeleri Ruhsatları Alınması
 17. Gıda Sicili Alınması
 18. Kayıt ve Onay İzni Alınması
 19. Kontrol Belgesi Alınması
 20. EPDK' dan Uygunluk Belgesi Alınması (solvent, bazyaj vb.)
 21. Gözetim Belgesi Alınması
 22. ÇED Gerekli Değildir/Muafiyet Belgesi Alınması
 23. Yabancı Firmaların İrtibat Bürosu İzinleri
 24. İŞGÜM'den ithal izinleri, Kontrol ve Uygunluk Belgesi Alınması
 25. TSE/TSEK Belgelerinin Alınması
 26. Satış Sonrası ve Garanti Belgeleri Alınması
 27. Ulaştırma Bakanlığı SRC, B3, C2 ve K Belgeleri Alınması
 28. Yüksek Öğrenim Kurumu'ndan Denklik Belgesi Alınması
 29. Entegre Kalite Sistemleri kurulumları (ISO 9001, ISO 22000 (HACCP), ISO 14001 Çevre ve OHSAS 18001 İş ve İşçi Sağlığı Standartları Kurulumları)
 30. Kalite, Çevre, Gıda Güvenliği ve Gıda Hijyeni Eğitimleri
 31. İş Güvenliği Eğitimleri
 32. Atom Enerjisi Kurumundan ithal izni ve lisans Alınması
- Ve daha fazlası...

CND MÜHENDİSLİK MÜŞAVİRLİK LTD.ŞTİ.

Adres: Büyükelçi Sokak No: 18/1 06700 Kavaklıdere-Çankaya ANKARA Telefon: 0 312 468 87 02 - 468 86 77
Fax: 0 312-468 86 58 Web : www.cnd.com.tr E-mail : cnd@cnd.com.tr

AK DELİCE YABANI ZEYTİNİ (*OLEA EUROPAEA* L. SUBSP. *OLEASTER*) VE ZEYTİNYAĞININ KARAKTERİZASYONU

Mücahit Kıvrak¹, Aslı Yorulmaz², Hakan Erinc^{3*}

¹Balıkesir Üniversitesi, Edremit Meslek Yüksekokulu, Edremit/ Balıkesir

²Adnan Menderes Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Aydın

³Niğde Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Niğde

Geliş tarihi / Received: 24.03.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 13.04.2016

Kabul tarihi / Accepted: 14.04.2016

Özet

Çalışmanın amacı Türkiye’de yetişen Ak Delice (*Olea Europaea* L. subsp. *Oleaster*) yabancı zeytininden elde edilen zeytinyağının kompozisyonu, kalitesi ve oksidatif stabilitesini belirlemektir. Bu amaçla, Ak Delice zeytini Edremit’te hasat edilip, presleme yöntemiyle çalışan bir zeytinyağı fabrikasında yağa işlenmiştir. Zeytinyağı örnekleri yağ asidi, triaçilgliserol ve sterol kompozisyonları yanında kaliteleri ve oksidatif stabiliteyi açısından da incelenmişlerdir. Sonuçlar, serbest asitlik, peroksit, K_{232} , K_{270} ve ΔK değerlerinin ekstra natürel sızma zeytinyağları için belirlenen sınırlar içinde yer aldığını göstermiştir. Klorofil ve karotenoid içerikleri sırasıyla 7.06 mg/kg ve 5.70 mg/kg olarak belirlenmiştir. Yağ örnekleri yüksek oksidatif stabilite göstermiştir (14.6 saat, 120°C). Temel yağ asitleri oleik (73.97%), palmitik (11.48%) ve linoleik (9.25%) asit iken, temel trigliseritler OOO (44.85%), OOP (23.21%), OOL (13.59%) ve PLO’dur. (6.16%). Toplam sterol içeriği 2069 mg/kg’dır ve temel steroller β -sitosterol (81.87%), Δ -5-avenasterol (9.57%) ve kampesteroldür (3.32%).

Anahtar kelimeler: Ak Delice, sterol, triaçilgliserol, yabancı zeytin, zeytinyağı

CHARACTERIZATION OF VIRGIN OLIVE OILS FROM AK DELICE WILD OLIVES (*OLEA EUROPAEA* L. SUBSP. *OLEASTER*)

Abstract

The objective of the study was to determine the composition, quality parameters and oxidative stability of virgin olive oils from Ak Delice wild olives (*Olea Europaea* L. subsp. *Oleaster*) grown in Turkey. For this purpose, Ak Delice wild olives were harvested from Edremit, and processed to oil in an olive oil mill equipped with a pressure system. Olive oil samples were evaluated for their quality and oxidative stability besides fatty acid, triacylglycerol and sterol composition. Results have shown that free acidity, peroxide index, K_{232} , K_{270} , and ΔK values fell within the limits established for extra virgin olive oil. Chlorophyll and carotenoid contents were 7.06 mg/kg and 5.70 mg/kg respectively. The oil samples presented high oxidative stability (14.6 h, 120°C). Oleic (73.97%), palmitic (11.48%), linoleic (9.25%) were the main fatty acids while OOO (44.85%), OOP (23.21%), OOL (13.59%) and PLO (6.16%) were the major triglycerides. Total sterol content was 2069 mg/kg and β -sitosterol (81.87%), Δ -5-avenasterol (9.57%) and campesterol (3.32%) were the main sterols.

Key words: Ak Delice, olive oil, sterol, triacylglycerol, wild olive

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ herinc@nigde.edu.tr,

☎ (+90) 388 225 4005,

☎ (+90) 388 225 0110

GİRİŞ

Zeytin bitkisi (*Olea Europaea* L.) *Olea Europaea* L. subs. *Sativa* (kültür zeytini) ve *Olea Europaea* L. subs. *Oleaster* (yabani zeytin-delice) olmak üzere iki alt türe ayrılmaktadır. Zeytinyağı, zeytin meyvesinden sadece mekanik-fiziksel yöntemler (presleme, santrifüjleme ve perkolasyon) kullanılarak elde edilen, kendine has tat ve kokuya sahip olan bir yağdır. Ayrıca sağlık üzerine birçok olumlu etki göstermesinden dolayı önemli bir yere sahiptir (1-3). Ülkemizde birçok kültür zeytinlerinin yanı sıra, Ak Delice ve Kara Delice olmak üzere iki yabani zeytin çeşidi de mevcut olup Ak Delice açık renkli ve iri yaprakları, Kara Delice ise küçük ve koyu renkli yaprakları ile bilinmektedir.

Zeytinyağının sağlık üzerine olumlu etkilerinden dolayı son yıllarda kaliteli zeytinyağına olan talep artmaktadır (4). Zeytinyağının kalitesini oluşturan duyuşal özellikler ve kimyasal bileşimi üzerine yetiştirme şartları, çevresel faktörler, tarımsal teknikler, olgunluk derecesi, çeşit (genetik faktör), hasat zamanı, taşıma ve depolama, işleme koşulları, zeytinyağının paketlenmesi ve depolanması gibi birçok faktör etkili olmaktadır (5-9). Bu nedenle kaliteli zeytinyağı üretimine yönelik yeni çeşitlerin kullanılması ilgi çeken konulardan biridir. Bu çalışma Ak Delice yabani zeytininden elde edilen yağın kimyasal karakterizasyonuna ilişkin ilk çalışma niteliğindedir.

MATERYAL VE METOT

Zeytin örneklerinin temini ve zeytinyağı eldesi

Olea Europaea L. subs. *Oleaster* zeytin meyveleri (Ak Delice) Balıkesir ili Edremit ilçesi Dereli ve Hacı Hasanlar köylerinden, tozlaşmayı kolaylaştırmak amacıyla ekilmiş toplamda 20 ağaçtan hasat edilmiştir. Bu amaçla, 80 kg kadar zeytin meyvesi el ile hasat edilmiş olup toplanan örnekler Çanakkale ilinde yer alan bir zeytinyağı fabrikasında, sırasıyla yıkama ünitesi, kırıcı, malaksör ve presleme ünitelerini kapsayan presleme yöntemi ile yağa işlenmiştir. İşletmede yapılan üretim sırasında malaksiyon süresi 45 dak ve malaksör ceket sıcaklığı 30 °C olarak belirlenmiş olup bu aşamadan elde edilen yağ ve su karışımı dekantasyon yoluyla birbirinden ayrılış ve yağ örnekleri analiz edilene kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Zeytin meyve özellikleri

Zeytin meyvelerinin olgunlaşma indeksi Uluslararası Zeytin Konseyi'nin önerdiği yöntemle göre (10), zeytin meyve kabuğu ve etinin rengi değerlendirilerek belirlenmiştir. Zeytinlerin nem içeriğinin belirlenmesi amacıyla 10 g zeytin parçalanmış ve 24 saat boyunca 105 °C'deki etüvde kurutulduktan sonra tartım yapılmıştır. Yağ miktarı ise AOCS Am 2-93 (11) sokselet yöntemine göre n-hekzan kullanılarak belirlenmiştir. Zeytinlerin ortalama ağırlıkları ve et/çekirdek oranları 10 adet meyvenin dane ağırlıkları ile et ve çekirdeklerinin ayrı ayrı tartılmalarıyla belirlenmiştir.

Zeytinyağı Özellikleri

Serbest yağ asidi, peroksit değeri, ultraviyole özgül soğurma değerleri (K_{232} , K_{270} , ΔK)

Serbest yağ asitliği, peroksit değeri, K_{232} ve K_{270} değerleri sırasıyla AOCS Ca 5a-40, Cd 8-53, Ch 5-91 (11) yöntemlerine göre belirlenmiştir.

Klorofil ve karotenoit içeriği

Yağ örneklerinin klorofil ve karotenoit içerikleri Ceballos vd. (12)'in önerdiği spektrofotometrik yöntemle göre belirlenmiştir. Bu amaçla, yağ örneklerinin 470 ve 670 nm'deki absorbans değerleri spektrofotometre ile ölçülmüş ve daha sonra aşağıda verilen formüllerle klorofil ve karotenoit içerikleri belirlenmiştir.

Klorofil miktarı (mg/kg) = $(A_{670} \times 10^6) / (613 \times 100 \times d)$

Karotenoit miktarı (mg/kg) = $(A_{470} \times 10^6) / (2000 \times 100 \times d)$

A_{670} : 670 nm'deki absorbans değeri

A_{470} : 470 nm'deki absorbans değeri

d : Işın yolu

Ransimat testi

Yağ örneklerinin oksidatif stabilitesi AOCS Cd 12b-92'de (11) önerilen yöntemle göre Ransimat cihazıyla (Metrohm Co., Basilea, Switzerland), 120 °C sıcaklık ve 20 L/saat hava akışında gerçekleştirilmiştir.

Yağ asidi kompozisyonu

Zeytinyağının yağ asidi metil esterleri IUPAC (13)'de önerilen yöntemle göre hazırlanmış ve gaz kromatografi cihazında (GC 2010, Shimadzu,

Kyoto, Japonya) DB-23 kapiler kolon (60 m x 0.25 mm x 0.25 µm, J&W Scientific) kullanılarak analiz edilmiştir. Kolon fırını, enjeksiyon bloğu ve dedektör (Alev iyonlaştırmalı dedektör) sıcaklıkları sırasıyla 195, 230 ve 240 °C olarak belirlenmiştir. Taşıyıcı gaz olarak 1.0 mL/dak akış hızında helyum kullanılmıştır. Split oranı 80:1 olup, sonuçlar % metil esterleri olarak verilmiştir.

Trigliserit kompozisyonu

Zeytinyağı örneklerinin trigliserit kompozisyonlarının belirlenmesi için yağ örnekleri asetonitril: 2-propanol:hekzan (2:2:1) karışımında %3 oranında çözündürüldükten sonra yüksek performans sıvı kromatografi cihazında (Shimadzu, Kyoto, Japonya) refraktif indeks detektörü ile analiz edilmiştir. Kromatografik ayırma Herslöf (14) tarafından belirlenen yöntemle göre Nucleosil 100 C18 (25 cm x 0.46 mm x 5 µm, Teknochroma, Barcelona, Spain) kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mobil faz 1.0 mL/dak akış hızında asetonitril:2-propanol:hekzan (500:118:100) karışımıdır. Enjeksiyon hacmi 50 µL'dir.

Sterol miktarı ve kompozisyonu

Zeytinyağlarının sterol bileşiminin belirlenmesi AOCS Official Method Ch 6-91'e (11) göre gerçekleştirilmiştir. Trimetilsililleme yöntemi ile uçucu hale getirilen örnekler gaz kromatografi cihazında (GC 2010, Shimadzu, Japonya), HP-5 kapiler kolon (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) (Chrom Tech., Apple Walley, MN, USA) kullanılarak sterol bileşenlerine ayrılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak 0.8 mL/dak akış hızında helyum kullanılmıştır ve split oranı 50:1'dir. Kolon fırını, enjeksiyon bloğu ve detektör (alev iyonlaştırmalı detektör) sıcaklıkları sırasıyla 260, 280 ve 290 °C olarak belirlenmiştir.

İstatistik analiz

Tüm analizler 2 paralelli olarak yapılmış olup sonuçlar ± standart sapma şeklinde verilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Zeytin Özellikleri

Çizelge 1'de görüldüğü üzere zeytin meyvelerinin olgunluk indeksi 6.71 olarak belirlenmiş olup meyvelerin ortalama ağırlığı 2.12 g, et/çekirdek oranı ise 3.60'tır. Bu değerler sofralık zeytin

üretiminden ziyade genellikle yağ üretimi için kullanılan zeytinlerin genel ortalamasına uygun değerlerdir. Zeytinlerin nem içeriği ve yağ içeriği (% kuru madde) sırasıyla %47.57±1.161 ve %43.70±1.811 olarak belirlenmiş olup su içeriği bakımından Edremit, Kalamata ve Erkence gibi bazı Türk zeytin çeşitlerinin su içeriğiyle uyumludur (15).

Çizelge 1. Ak Delice zeytin meyvesinin ve zeytinyağının bazı özellikleri

Table 1. Some properties of Ak Delice olive and olive oil

Özellik Properties	Ak Delice Zeytin Olive
Olgunlaşma indeksi Maturation index	6.71±0.101
Ortalama Ağırlık (g) Average weight (g)	2.12±0.152
Et/Çekirdek oranı Flesh/pit ratio	3.61±0.126
Nem (%) Water (%)	47.58±1.161
Yağ (kuru maddede, %) Oil (% d.b.)	43.70±1.811
	Zeytinyağı Olive Oil
Serbest yağ asitliği (% oleik) Free fatty acids (% oleic)	0.24±0.003
Peroksit sayısı (mg O ₂ /kg yağ) Peroxide value (mg O ₂ /kg oil)	4.78±0.0770
K ₂₃₂	1.989±0.0012
K ₂₇₀	0.1795±0.0003
ΔK	0.0016±0.00002
Karotenoit içeriği (mg/kg) Carotenoids (mg/kg)	5.70±0.005
Klorofil içeriği (mg/kg) Chlorophyll (mg/kg)	7.06±0.017
İndüksiyon süresi (saat) Induction time (hour)	14.61±0.005

Zeytinyağı Özellikleri

Serbest yağ asitliği genotipten ziyade, genellikle zeytinin yağa işlenmeden önce zeytin sineği zararı görmesi, ya da uygun olmayan koşullarda depolanması durumunda lipolitik enzim aktivitesi sonucu artış göstermektedir. Ak Delice zeytinyağının serbest yağ asidi içeriği ortalama %0.24 olarak belirlenmiş olup ekstra natürel sızma zeytinyağı sınıfına girmektedir. Peroksit değeri birincil oksidasyon ürünlerini gösteren bir parametredir ve oksijen, ışık, sıcaklık ve süreden etkilenmektedir. K₂₃₂ değeri, çoklu doymamış yağ asitlerinin konjugasyonunu ifade eden bir indikatör görevi yapmaktadır. K₂₇₀ değeri ise genellikle aldehit ve keton gibi ikincil oksidasyon ürünlerinin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Ak Delice

zeytinyağının peroksit, K_{232} , K_{270} ve ΔK değerleri ise sırasıyla 4.78 mg O_2 /kg yağ, 1.989, 0.1795 ve 0.0016 olup Kodeks Alimentarius, Türk Gıda Kodeksi ve Uluslararası Zeytinyağı Konseyi'nce ekstra natürel sızma zeytinyağları için belirtilen değerlerin içinde yer almıştır (Çizelge 1).

Klorofil ve karotenoidler zeytinyağının karakteristik renginden sorumludur ve Ak Delice zeytinyağında 5.70 mg/kg karotenoid ve 7.06 mg/kg klorofil varlığı tespit edilmiştir. Zeytinyağı örneğinin klorofil ve karotenoid madde içeriği aynı bölgede yetişen Edremit çeşidi zeytinyağına yakın bulunmuştur (16). Ak Delice zeytinyağının indüksiyon süresi ise 14.61 ± 0.005 saat olarak belirlenmiştir (Çizelge 1).

Bitkisel yağların yağ asidi kompozisyonu çeşit, coğrafi yetiştirme bölgesi, iklimsel koşullar ve meyve olgunluk düzeyi gibi farklı faktörlerden etkilenmektedir. Ak Delice zeytinyağlarının yağ asidi oranları ile bu oranların ulusal ve uluslararası yasal düzenlemelerde yer alan limitlerle kıyası Çizelge 2'de verildiği gibidir. Miristik (C14:0), palmitik (C16:0), palmitoleik (C16:1), heptadekanoik (C17:0), heptadesenoik (C17:1), stearik (C18:0), oleik (C18:1), linoleik (C18:2), linolenik (C18:3), araşidik (C20:0), gadoleik (C20:1), behenik (C22:0) ve lignoserik (C24:0) asitlerin yüzde değerleri ulusal ve uluslararası kuruluşlarca belirlenen yasal sınırların içinde yer almıştır. Ak Delice zeytinyağının yağ asidi kompozisyonu Türk zeytinyağları için tespit edilen değerlerle uyumludur (17, 18).

Ak Delice zeytinyağında tespit edilen temel trigliseritler OOO, OOP, OOL, PLO'dir ve sırasıyla % 44.85, % 23.21, % 13.59 ve % 6.16 oranında yağda yer almışlardır. Ek olarak, POP, SOO, LLL, OLLn, PLLn, OLL, OOLn, PLL, POLn, OOPo, PoOP, PPL ve POS'de yağda varlığı belirlenen trigliseritler olup, aynı sırayla % 2.49, % 4.27, % 0.09, % 0.15, % 0.05, % 1.51, % 0.70, % 0.26, % 0.13, % 1.26, % 0.49, % 0.07, % 0.69 değerlerini almışlardır (Çizelge 3). Trigliseritler için belirlenen yüzde oranlar yağ asitleri sonuçları ile paralellik göstermekte olup literatürde bulunan sonuçlarla da benzerlik göstermektedir (19). Temel trigliserit olan triolein (OOO) Türk zeytinyağları için belirlenen limitlerin içinde olup (20), bazı İspanyol (21), Fransız (22), Tunus (23) için tespit edilen değerlerle de uyumludur. Benzer şekilde, ikinci önemli trigliseridi oluşturan OOP oranı da, Türk çeşitleri için belirlenen değerlere uyum göstermektedir (19,20).

Ak Delice zeytinyağlarının sterol miktarı ve yüzdesi ile ulusal ve uluslararası yasal limitlerle kıyaslanması Çizelge 4'de verildiği gibidir. β -sitosterol, Δ -5-avenasterol ve kampesterol temel steroller olarak bulunmuştur. Ek olarak kolesterol, brassikasterol, 24-metilen-kolesterol, kampestanol, stigmasterol, Δ -7-kampesterol, klerosterol, sitostanol, Δ -5-24-stigmastadienol, Δ -7-stigmastenol, Δ -7-avenasterol ve 2 triterpen dialkol'de (eritrorodiol ve uvaol) düşük oranlarda tespit edilmiştir. Toplam sterol ve bireysel steroller

Çizelge 2. Ak Delice zeytinyağlarının yağ asidi oranları (%) ve ulusal - uluslararası yasal limitler
Table 2. Fatty acid composition of Ak Delice olive oil (%) and National-International Limits

Yağ asitleri Fatty acids	Ak Delice (%)	Kodeks Alimentarius Codex Alimentarius (%)	Uluslararası Zeytin Konseyi International Olive Council (%)	Türk Gıda Kodeksi Turkish Food Codex (%)
Miristik asit	0.014±0.0001	≤ 0.05	0.0 - 0.05	≤ 0.05
Palmitik asit	11.49±0.006	7.5 - 20.0	7.5 - 20.0	7.5 - 20
Palmitoleik asit	0.99±0.0006	0.3 - 3.5	0.3 - 3.5	0.3 - 3.5
Heptadekanoik asit	0.12±0.0001	≤ 0.3	0.0 - 0.3	≤ 0.3
Heptadesenoik asit	0.16±0.0126	≤ 0.3	0.0 - 0.3	≤ 0.3
Stearik asit	2.70±0.0015	0.5 - 5.0	0.5 - 5.0	0.5 - 5.0
Oleik asit	73.97±0.042	55.0 - 83.0	55.0 - 83.0	55.0 - 83.0
Linoleik asit	9.25±0.0388	3.5 - 21.0	3.5 - 21.0	3.5 - 21.0
Linolenik asit	0.63±0.012	≤ 1.0	-	≤ 1.0
Araşidik asit	0.36±0.008	≤ 0.6	0.0 - 0.7	≤ 0.6
Gadoleik asit	0.29±0.004	≤ 0.4	0.0 - 0.4	≤ 0.4
Behenik asit	0.10±0.002	≤ 0.2	0.0 - 0.2	≤ 0.2
Lignoserik asit	0.03±0.002	≤ 0.2	0.0 - 0.2	≤ 0.2
TDYA/ÇDYA	7.66±0.033			

TDYA: Tekli doymamış yağ asitleri, *Monounsaturated fatty acids*
ÇDYA: Çoklu doymamış yağ asitleri, *Polyunsaturated fatty acids*

Çizelge 3. Ak Delice zeytinyağlarının triaçilgliserol içeriği (%)
Table 3. Triacylglycerol composition of Ak Delice olive oil (%)

Trigliseritler Triacylglycerols	Ak Delice (%)
LLL	0.09±0.035
OLLn+PoLL	0.15±0.078
PLLn	0.05±0.022
OLL+OLPo	1.51±0.345
OOLn	0.70±0.399
PLL	0.26±0.131
POLn	0.13±0.071
OOL+PPLn	13.60±0.260
OOPo	1.26±0.084
PLO+SLL	6.17±0.973
PoOP	0.49±0.041
PPL	0.07±0.056
OOO	44.85±0.523
SOL	TE
OOP	23.22±0.148
POP	2.49±0.407
SOO	4.27±0.379
POS	0.69±0.207

TE: Tespit edilemedi, Not-Detected

için elde edilen değerler ulusal ve uluslararası düzenlemelerle belirlenen limitlerin içinde yer almaktadır.

Sonuç olarak mevcut bulgular, Ak Delice'den elde edilen zeytinyağının kimyasal kompozisyonunun ulusal ve uluslararası yasal düzenlemelere uyum gösterdiğini ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

1. Anon 2010. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı 7 Ağustos 2010, Resmi Gazete Sayı:27665 Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı ve Pirina Yağı Tebliği (Tebliğ No: 2010/35).
2. Boskou D. (ed) 1996. *Olive Oil: Chemistry and Technology*. AOCS Pres, Champaign, USA.
3. Kiritsakis AK. (ed) 1990. Chemistry of Olive Oil. In: *Olive Oil*, Kiritsakis AK (chief ed), AOCS Press, IL, USA, 25-55
4. Forina M, Boggia R, Casale M. 2007. The information content of visible spectra of extra virgin olive oil in the characterization of its origin. *Ann. Chim.*, 97, 615-633.
5. Angerosa F, Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, Esposto S, Montedoro G.F. 2004. Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *J. Chromatogr. A*, 1054, 17-31.
6. Aparicio R, Luna G. 2002. Characterisation monovarietal virgin olive oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 104, 614-627.
7. Kalua CM, Allen MS, Bedgood Jr DR, Bishop AG, Prenzler PD, Robards K. 2007. Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: a critical review. *Food Chem.*, 100, 273-286.
8. Lazzez A, Perri E, Caravita MA, Khelif M, Cossentini M. 2008. Influence of olive maturity stage and geographical origin on some minor components in virgin olive oil of the Chemlali variety. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 982-988.

Çizelge 4. Ak Delice zeytinyağlarının sterol miktarı ve yüzdesi ile ulusal ve uluslararası yasal limitler
Table 4. Sterol composition of Ak Delice olive oil (%) and National-International Limits

Steroller Sterols	Ak Delice (%)	Kodeks Alimentarius Codex Alimentarius (%)	Uluslararası Zeytin Konseyi International Olive Council (%)	Türk Gıda Kodeksi Turkish Food Codex (%)
Kolesterol	0.19	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5
Brassikasterol	0.05	≤ 0.1	≤ 0.1	≤ 0.1
24-metilen-kolesterol	0.06	-	-	-
Kampesterol	3.33	≤ 4.0	≤ 4.0	≤ 4.0
Kampestanol	0.12	-	-	-
Stigmasterol	0.89	< kampesterol	< kampesterol	< kampesterol
Δ-7-kampesterol	0.09	-	-	-
Klerosterol	0.78	-	-	-
β-sitosterol	82.17	-	-	-
Sitostanol	0.65	-	-	-
Δ-5-avenasterol	9.58	-	-	-
Δ-5,24-stigmastadienol	0.71	-	-	-
Δ-7-stigmastenol	0.44	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5
Δ-7-avenasterol	0.94	-	-	-
Δ β-sitosterol	93.88	≥ 93.0	≥ 93.0	≥ 93.0
Eritrodiol+uvaol	0.85	≤ 4.5	≤ 4.5	≤ 4.5
Toplam Total sterol (mg/kg)	2066.91	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000

9. Yıldız-Tiryaki G. 2005. Erken hasadın zeytinyağı kalitesi üzerine etkileri. *GIDA*, 30 (3), 193-196.
10. Anon 2015. Spectrophotometric Investigation in the Ultraviolet "(COI/T.20/Doc. No 19/Rev. 3)". International Olive Council, Spain.
11. Anon 2003. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society (AOCS), AOCS Press, IL, USA.
12. Ceballos C, Moyano MJ, Vicario IM, Alba J, Heredia FJ. 2003. Chromatic evolution of virgin olive oils submitted to an accelerated oxidation. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 80, 257-262.
13. Anon 1987. Standard Methods for Analysis of Oils, Fats and Derivates, International Union of Pure and Applied Chemistry, 7 th ed., IUPAC Method 2.301, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
14. Herslöf BG. 1981. HPLC of triglycerides using UV detection. *J. High Res. Chromatogr.*, 4, 471-473.
15. Yorulmaz A, Poyrazoglu ES, Ozcan MM, Tekin A. 2012. Phenolic profiles of Turkish olives and olive oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 114, 1083-1093.
16. Yorulmaz A, Erinc H, Tekin A. 2013. Changes in olive and olive oil characteristics during maturation. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 90, 647-658.
17. Gurdeniz G, Ozen B, Tokatli F. 2008. Classification of Turkish olive oils with respect to cultivar, geographic origin and harvest year, using fatty acid profile and mid-IR spectroscopy, *Eur. Food Res. Technol.*, 227, 1275-1281.
18. Dıraman H, Dibeklioglu H. 2009. Characterization of Turkish virgin olive oils produced from early harvest olives. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 86, 663-674.
19. Dıraman H, Telli Karaman H, Sefer F, Ersoy N, Arsel A.H, Özahçı E. 2013. Yerli zeytin çeşitlerinde ıslah çalışmaları: Memecik ve Gemlik çeşidi melez bireylerde Triaçilgliserol düzeyleri. *GIDA*, 41 (1), 23-30.
20. Yorulmaz A, Yavuz H, Tekin A. 2014. Characterization of Turkish olive oils by triacylglycerol structures and sterol profiles. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 91, 2077-2090.
21. Aranda F, Gómez-Alonso S, Rivera del Álamo RM, Salvador MD, Fregapano G. 2004. Triglyceride, total and 2-position fatty acid composition of Cornicabra virgin olive oil: Comparison with other Spanish cultivars. *Food Chem.*, 86, 485-492.
22. Ollivier D, Artau J, Pinatel C, Durbec JP, Guérère M. 2006. Differentiation of French virgin olive oil RDOs by sensory characteristics, fatty acid and triacylglycerols compositions and chemometrics. *Food Chem.*, 97, 382-393.
23. Baccouri O, Cerretani L, Bendini A, Caboni MF, Zarrouk M, Pirrone L, Miled DDB. 2007. Preliminary chemical characterization of Tunisian monovarietal virgin olive oils and comparison with Sicilian ones. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 109, 1208-1217.