

GIDA (Gıda Teknolojisi Derneği Yayını)
THE JOURNAL OF FOOD (Published by the Association of Food Technology; Turkey)
Cilt / Volume: 41 • Sayı / Number: 6 • 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, Atıla <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 12 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

Özbey F; <i>Stable isotope and multi-element techniques for determination of geographical origin of Turkish rice / Türk pirincinin coğrafi menşei belirlenmesinde duraylı izotop ve multi-element tekniklerinin kullanımı</i>	373-379
Yemişcioğlu F, Özdikicierler O, Çapar S, Saygın Gümüşkesen S; Memecik ve Erkence zeytin çeşitlerinde olgunluk derecesinin natürel zeytinyağının toplam polifenol miktarı ve acılık indeksi üzerindeki etkisi / <i>Influence of the fruit's ripeness on total polyphenol content and bitterness index of virgin olive oil for Memecik and Erkence olive varieties</i>	381-386
Baltacıoğlu C; Farklı kızartma yöntemlerinin bitkisel yağların oksidatif stabilitesi üzerine etkisi / <i>Effect of frying methods on oxidative stability of vegetable oils</i>	387-393
Kıvanç M, Temel O; Fermente gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin tannaz aktivitesinin belirlenmesi / <i>Determination of tannase activity of the lactic acid bacteria that isolated from fermented products</i>	395-402
Çağdaş E, Seydim AC; Üzüm çekirdeğinden fenolik bileşen ekstraksiyonunun yüzey yanıt metodu ile optimizasyonu / <i>Optimization of phenolic compounds from grape seed by response surface methodology</i>	403-410
Polat Yemiş G, Çakır İ, Halkman AK; Bebek mamalarında direkt PCR yöntemi ile <i>Cronobacter</i> spp. tespiti / <i>Detection of Cronobacter spp. in powdered infant formula by PCR</i>	411-418
Candal C, Kılıç Ö, Erbaş M; Enzime dirençli nişasta üretim yöntemleri ve gıda endüstrisinde kullanım amaçları / <i>Enzyme resistant starch production methods and its intended purposes in food industry</i>	419-426
Uğuz Ş, Andiç S; Mikroorganizmalara etki eden başlıca stres faktörleri / <i>Fundamental stress factors affecting the microorganisms</i>	427-434
Balkır P; Stevia; fonksiyonel özellikleri ve gıdalarda kullanım olanakları / <i>Stevia; functional properties and use in food systems</i>	435-442

Editörden,

Merhaba,

GIDA Dergisi'nin 41. yayın yılının 6. sayısı ile kâğıt baskılı yayın hayatımıza son veriyoruz. Bundan sonra dergi sadece elektronik olarak yayımlanacak.

Türkiye 12. Gıda Kongresini başarı ile tamamladık. Çok yaklaşık 650 katılımcı vardı. Kongre programında 5 paralel sözlü bildiri oturumunda toplam 159 sözlü bildiri ve 5 poster bildiri grubunda 397 poster bildiri sunusu vardı. Gerek sözlü gerek poster bildiri sunularında haklı nedenlerle katılamayanlar oldu ancak her iki grupta da katılım %95 üzerinde idi.

Kongrenin son günü olan 07 Ekim 2016 son sözlü oturumlarda A salonunda 53 ve B salonunda 49 meslektaşımızın salonda olması kongrenin başarısını kanıtlamaktadır. Bu vesile ile, isim ve kurum belirtmeksizin emeği geçen tüm meslektaşlarıma ve tüm katılımcılara bir kez daha teşekkür ediyorum.

2018 yılında yapılacak olan 3. Uluslararası kongremizi, Türkiye 12. Gıda Kongresi açılış konuşmasında duyurdum. Her ne kadar önceden 07-09 Kasım 2018 olarak duyuru yapmış olsak da, Nevşehir Hacı Bektaş Üniversitesi yetkililerinin hava sıcaklığı konusundaki uyarısına uyarak tarihi 10-12 Ekim 2018 olarak güncelledik.

Bu uluslararası kongremizde önceki uluslararası kongrelerimizden farklı iki uygulama yapacağız:

-Kongre, Nevşehir Hacı Bektaş Üniversitesi salonlarında yapılacak. Dolayısı ile, bir kongre oteli olmayacak. Tüm katılımcılar bütçelerine göre istedikleri otelde kalabilirler. Hiç kimseyi belirli bir otele zorlamayacağız. Devamında misafirhane konusuna da hiçbir koşulda karışmayacağız.

-Kongre bildiri özetleri kitabı basmayacağız. Bildiri özetlerini CD ortamında katılımcılara vereceğiz. Hatta sadece elektronik ortamda bile yayımlayabiliriz.

Bu iki uygulama, kongre maliyetlerini ve dolayısı ile katılım ücretlerini düşürecektir. Böylece daha fazla katılım olmasını planlıyoruz.

Sevgi ve saygılarımla,

Prof. Dr. A. Kadir Halkman

A Message from the Editor-in-Chief

Hello,

We end the printing of FOOD Journal in paper form with the 6th issue of the volume 41. From now on, FOOD journal will only be printed in electronic form.

We successfully completed the 12th National Food Congress. There was very nearly 650 participants in the congress. There were a total of 159 oral presentations in 5 parallel oral sessions and 397 poster presentations in 5 poster sessions in the congress' program. There were some colleagues who were unable to attend to the sessions for good reasons but, the whole participation in both oral and poster sessions were above 95%.

The presence of 53 colleagues in the Hall A and of 49 colleagues in the Hall B during the oral sessions on the last day (October 07, 2016) of the Congress, proves the success of the Congress. Herewith I thank once again to all my colleagues who work hard with me and all participants, without stating any name and institution.

I announced the 3rd International Congress on Food Technology which will be held in 2018, during the opening speech at the 12th National Food Congress. Although we announced the date of the 3rd International Congress on Food Technology as November, 07-09 in 2018, we updated this date as October, 10-12 of the year 2018 due to the warnings of Nevsehir Haci Bektas University authorities about the weather temperature.

We will do two different applications in this congress when compared with our previous international congresses:

-Congress will be held in the halls of Nevsehir Haci Bektas University. Therefore, there won't be any congress hotel. All participants can stay at any hotel they want according to their budget. We won't force anyone to any specific hotel. We will also not interfere in matters of the guesthouse under any circumstances.

We will not publish congress abstract book. We will provide abstracts to the participants on CD. Even, we could only publish them in electronic form.

These two applications will reduce the costs and therefore the registration fees of the congress. By this way, we plan to have more participation.

Best Regards,
Prof. A. Kadir Halkman

STABLE ISOTOPE AND MULTI-ELEMENT TECHNIQUES FOR DETERMINATION OF GEOGRAPHICAL ORIGIN OF TURKISH RICE

Fatih Özbey*

Department of Food Engineering, Engineering Faculty, Hitit University, Çorum, Turkey

Received / Geliş Tarihi: 06.04.2016

Received in revised form / Düzeltilerek Geliş Tarihi 07.06.2016

Accepted / Kabul Tarihi 10.06.2016

Abstract

Osmancık-97 is an important Turkish rice cultivar with high quality and it is often targeted for the adulteration with imported varieties. Multiple elements and stable isotope profile were investigated for their use to trace geographical origin of Turkish rice (*Oryza sativa* L.) samples. Fourteen key variables Copper (Cu), Zinc (Zn), Iron (Fe), Nickel (Ni), Chromium(Cr), Aluminium (Al), Strontium (Sr), Carbon (C), Nitrogen (N), Oxygen (O) and Hydrogen (H) contents and stable isotopes (carbon, nitrogen, and oxygen isotopic compositions) were identified by "stepwise" canonical discriminate analysis (CDA) of Turkish rice. For all samples $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, and $\delta^{18}\text{O}$ values are contributed from -25.99 to -28.15‰, +3.27 to +7.71‰ and +22.32 to 27.08‰, respectively. Thus, the comparison of isotope profile and multiple element contents of the rice is a good tool for rice authentication.

Keywords: Authenticity, geographical origin, IRMS, Osmancık 97, rice

TÜRK PİRİNCİNİN COĞRAFİ MENŞEİ BELİRLENMESİNDE DURAYLI İZOTOP VE MULTI- ELEMENT TEKNİKLERİNİN KULLANIMI

Özet

Osmancık-97, yüksek kalitede bir Türk pirinç çeşidi olup ve genellikle düşük kalite ve fiyatlı ithal çeşitleri karıştırılarak satılmak suretiyle tağşiş gerçekleştirilen bir pirinç çeşidimizdir. Ülkemiz pirinç örneklerinin coğrafi orijinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmada çoklu element ve kararlı izotop oran analizler verileri birlikte kullanılmıştır. Araştırmada pirinç örnekleri Bakır (Cu), çinko (Zn), demir (Fe), Nikel (Ni), krom (Cr), alüminyum (Al), stronsiyum (Sr), karbon (C), azot (N), oksijen (O) ve hidrojen (H), olmak üzere on dört element bileşimi ve karbon, azot ve oksijen kararlı izotop oranı değerleri ölçülmüştür. Elde edilen veriler kanonik diskriminant analizi (CDA) ile istatistiksel olarak anlamlandırılarak gruplamalar gerçekleştirilmiştir. Pirinç örneklerine ait $\delta^{13}\text{C}$ için $\delta^{15}\text{N}$ ve $\delta^{18}\text{O}$ değerleri sırasıyla; -25,99 den -28,15‰, +3.27 ile +7.71‰ ve +22,32 ile + 27.08‰, olarak saptanmıştır. Bu değerlendirmeler ışığında pirinç örneklerinin $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ ve $\delta^{18}\text{O}$ kararlı izotop oranları ve elemental bileşim oranlarına göre orijin sınıflandırmasının başarılı sonuç verdiği saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: IRMS, coğrafik işaretleme, pirinç

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ fatihozbey@hitit.edu.tr,

☎ (+90) 364 227 4533,

☎ (+90) 364 227 4535

INTRODUCTION

Rice is the seed of a monocot plant "*Oryza sativa* L.", from the grass family (Poaceae). It is an important staple food for Turkey as well as more than half of the world's population. Climate and soil provisions of Turkey are appropriate for raising this plant. Turkey has tended to increase rice production in recent years and has been the position of resellers of around the country as a result of it. In particular, Osmancık-97, a cultivar of Turkish rice is the highest quality rice and has sometimes been targeted for the adulteration. High quality Osmancık- 97 rice varieties are sold mixed with poor quality imported rice in the rice market, which distorts the image. Osmancık-97 rice is originally from Osmancık province of the city Çorum, Turkey and it is mostly grown under the rain-fed conditions. It was first released in 1997 and its growing region has been increasing over the years in all the rice growing regions in Turkey. Today's Osmancık-97 species constitute more than 80% of the rice cultivated area in Turkey (1). The expansion of global trade has also promoted the international trade of rice. As the global economy expands, agricultural products including rice are inevitably labelled with their geographical origin in many countries for consumer desire.

The characterization of the geographical origin of foodstuff is continuously gaining interest from the consumers and the producers since it may be used as a criterion for the denomination of the material as a "traditional product". One of the most reliable techniques for determination of authenticity is to measure isotopes. Most elements occur in natural bio-systems as mixtures of stable isotopes. Thus, various types of analytical techniques have been developed to arrange of the source or geographical origin of agricultural products. Most commonly applied analytical methods include isotope ratio mass spectrometry (IRMS) and the isotopic composition of light elements such as H, C, N, O and S. Stable isotope ratio analysis has a wide range of applications and unlike quantitative methods, it does not focus directly on the amount of certain compounds present in the food, but studies the isotopic composition of selected elements to infer information on the product's origin (2). This techniques provide interesting information about

the origin of food products, since they are governed by the geo-climatic condition under which the plant (3). The isotopic composition of oxygen in plants is the most complicated among light isotopes since there are multiple sources of this element, which is absorbed via leaf system as atmospheric O₂ and CO₂ and via the root system as liquid H₂O. The dependence of the oxygen isotopic ratio on geo-climatic conditions is at the base of the geographical origin profiling of food products, while the ¹⁵N/¹⁴N and ¹³C/¹²C ratios and hydrogen and oxygen contents of agricultural products generally show climatic characteristics of cultivation areas (4). Recently identification of isotopic composition of fruit juices, wine, olive oil, fish, meat and dairy products has been used to prevent adulteration (5,6).

The level of trace elements depends on the topography and soil characteristics; hence for the application of this to geographic origin studies, a unique soil map is needed for every country (3). Trace element composition in rice is primarily affected by the water and soil composition as well as the composition of any fertilizer used (7). The significant influence of the soil mineral nutrients on plants has led to many studies of the geographical origins of foods using multi-elements ICP-OES analysis. Studies have demonstrated that the inclusion of elemental composition in rice grains is capable of providing good geographical discrimination of rice (3, 7, 8). Most of the studies concerning the geographical origins of rice were limited to rice samples from a single country, therefore with the current extent of globalization in trade; there is a need to establish rice geographical origin data across the world (2, 9). To improve the protection level of consumer and honest producers, an analytical technique capable of objective determination of the indicated geographical origin of rice is fundamental for the implementation of the law.

In this study, the selected analytical approach involved the use of multi-element isotope and trace elements analysis by IRMS and ICP/OES, respectively. Also an additional comparison study was performed between the carbon isotope measurements by conventional mass spectrometry versus spectroscopic techniques. The aim of this work is to evaluate the discrimination of the geographical origin of Turkish (Osmancık-97)

and imported rice sample in the Turkish market using combined data from multi-element isotope and trace element analysis and with the processing by statistical approaches.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The study was conducted on 50 rice samples with varying origins 19 of which were from local producers in Osmancık, Çorum, Turkey (Local Osmancık), 20 of which were local variety from Turkish market place (Turkish variety) and 11 of which were imported varieties obtained from Turkish market (Imported). These rice samples are classified in three groups as indicated. The production areas of the Turkish samples were distributed throughout 37 prefectures out of 39 was included. Each of the samples was taken from a different lot. The large number of Turkish samples, compared to those from other countries is more or less proportional to the ratio production according to Turkish Statistical Institute (TUIK) in the last ten years. According to the TUIK data also emerged that about 20% of Turkish Osmancık-97 rice was produced in northern Turkey.

Determination of Isotope Ratios and Multi-element Concentrations

Dried rice representative samples (100–150 g) were ground to a fine powder before analysis. For carbon and nitrogen, the powdered rice was weighed 7 mg into tin capsule. Then, each sample was analyzed by elemental analyzer/isotope ratio mass spectrometry (EA/IRMS) using a Vario ISOTOPE cube. For oxygen, the powdered rice was weighed 1 mg into silver capsule. Then, oxygen isotope analysis was carried out by using Vario PYRO cube+IRMS. The δ notation is used to describe the isotopic difference between the sample and the international standard, and defined as the following equation (1),

$$\delta (\text{‰}) = (R_{\text{sample}} - R_{\text{standart}}) / R_{\text{standart}} \times 1000 \quad (1)$$

Where R_{sample} is the isotope ratio (*i.e.*, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) of the sample, and R_{standart} is the isotope ratio of the international standards: for carbon: Peedee Belemnite (PDB); for nitrogen: Air; and for oxygen: Standard Mean Ocean Water (SMOW). Each isotope value is given as per mille, ‰. C, N and O isotopic compositions can normally

be measured with analytical uncertainty of ± 0.2 to 0.3‰. Additionally sample values were corrected using running standards, *i.e.* Benzoic Acid (IAEA-601 and IAEA-602) with certified IAEA were used for carbon, nitrogen and Oxygen, respectively. All of the samples were analyzed three times with reliable reproducibility. C, O, N and H (by difference) contents are given % of dry w/w.

Determination of trace element concentrations

Rice samples were ground to a fine powder before analysis, with particle size lower than 250 μm , before sample digestion. The microwave-assisted treatment was adapted from that of González (7) according to the microwave laboratory system manufacturer recommendations Cu, Zn, Fe, Ni, Cr, Al, and Sr analysis of previously digested rice samples were determined by using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES Perkin Elmer Model Optima 7000 spectrometer). The operating conditions of the ICP-OES equipment were as follow: 15 L/min plasma gas flow rate, 0.2 L/min auxiliary gas flow rate, 0.8 L/min nebuliser gas flow rate, 1300 W RF power, 1.5 mL/min sample flow rate with 15 s time flush.

Statistical analysis

The canonical discriminate analysis (CDA) method were applied to combined isotopes and element data obtained from Osmancık-97 collected from Osmancık-Çorum, Osmancık-97 collected from the rest of Turkey and imported samples (from USA, Europe and Thailand *etc.*) collected from markets. This approach was used to find combination of functions based on isotope and multi element values that maximized the separation between countries of origin. The CDA was employed for fourteen variable quantities, Cu, Zn, Fe, Ni, Cr, Al, Sr, C, N, O and H contents and $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, and $\delta^{18}\text{O}$ values with using the PASW® Statistics Ver.18.0. For the analysis, data were standardized as mean values of one and variations of one. The Holdout Cross-validation was used to check the reliability of the chemometric models in terms of classification ability (10).

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the mean value of isotope ratios and mineral concentrations in collected rice samples from Turkish origin and imported groups. Compared to Turkish samples (Local Osmaniçik and Turkish variety) the mean concentrations of mineral nutrients such as Fe, Al and Sr are rather high in the Local Osmaniçik and imported samples (Imported). Therefore, strontium contents of the Turkish rice samples obtained in this study can be regarded as a reasonable representation of the discrimination from imported sample (Fig 1). We found that the comparison of Ni is also difficult because there is lack of information for group Turkish variety and Imported. It has been reported that Ni is a highly mobile element (11). In general, elemental concentration range of Turkish rice is similar to the imported rice. The nitrogen and carbon contents in all groups of the samples were found to be centred at about 1.16%, and 37.80% respectively. The oxygen content showed a slight variation at around 47% among the group of samples. Similarly, the hydrogen content in group Turkish variety and imported were almost the same at 13.90 and 14.10% but that of Local Osmaniçik samples were slightly lower 12.56 % ($P < 0.05$).

The $\delta^{15}\text{N}$ variation of the rice samples ranged from 1.53‰ to 8.08‰, using a box plot (Fig. 2) it was observed the variation in the $\delta^{15}\text{N}$ values is larger than that of the $\delta^{15}\text{N}$ values in general and one striking observation is that the rice sample

from group Turkish variety had the highest $\delta^{15}\text{N}$ values. The observation that rice samples from group Imported had $\delta^{15}\text{N}$ values lower than the mean whereas those from group Local Osmaniçik and Turkish variety had $\delta^{15}\text{N}$ values higher than the mean (Fig 4) may suggest different agricultural practice. Organic fertilizers generally raise the ^{15}N content in soil and plants whereas the uses of synthetic fertilizers decrease it (6). The $\delta^{18}\text{O}$ variation of the rice samples ranged from 22.32‰ to 27.08‰. In general there was a significant variation in the $\delta^{18}\text{O}$ values in the groups. As the Figure 3 indicates, an interesting observation is that the rice samples from Turkey (Local Osmaniçik and Turkish variety) possess noticeably higher $\delta^{18}\text{O}$ value than from import samples (Imported).

In order to illustrate the contribution of O-C elements to the canonical discrimination, the $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values of rice samples have been plotted as an X-Y scatter graphs in Fig 4. The

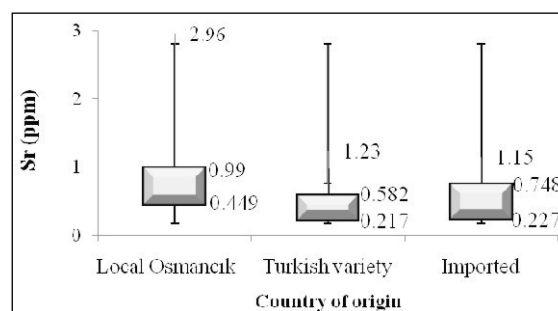


Fig 1. Box plot showing Sr (ppm) variations of for all rice according to the groups

Table 1. The mean analytical results of rice sample from each group and results of multiple comparisons between groups*

Isotopes and elements	Local Osmaniçik (n=19, Mean±SD)	Turkish variety (n= 20, Mean±SD)	Imported (n=11, Mean±SD)
$\delta^{15}\text{N}$	+5.04±0.9d	+6.28±1.0e	+4.27±1.1d
$\delta^{13}\text{C}$	-26.69±0.3a	-26.45±0.3a	-27.11±1.0b
$\delta^{18}\text{O}$	+26.00±0.6f	+25.26±0.9g	+24.28±0.03h
N %	1.12±0.09c	1.16±0.08c	1.16±0.06c
C %	38.63±2.2i	37.37±3.7i	37.45±3.9i
O %	47.64±0.5j	47.55±1.1j	47.27±0.7j
**H %	12.56±2.4e	13.90±4.1e	14.10±0.4e
***Cu	6.232±0.9v	5.865±0.8v	5.286±0.9v
***Ni	5.497±0.2k	nd±l	nd±m
***Zn	28.48±0.8r	33.85±0.7r	32.31±0.4r
***Cr	0.690±0.1n	0.826±0.5n	0.407±0.7n
***Al	4.326±0.2s	1.850±0.8t	2.699±0.5s
***Sr	0.990±0.8p	0.582±0.5p	0.748±0.5p
***Fe	4.803±0.6u	4.014±0.5u	3.629±0.9u

*Different letters mean significantly different results ($P < 0.05$): SD means standard deviation.

** Obtained by difference

***mg/kg

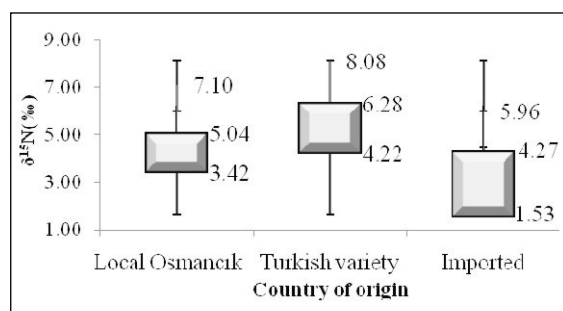


Fig 2. Box plot showing $\delta^{15}\text{N}$ (‰) variations of for all rice according to the groups

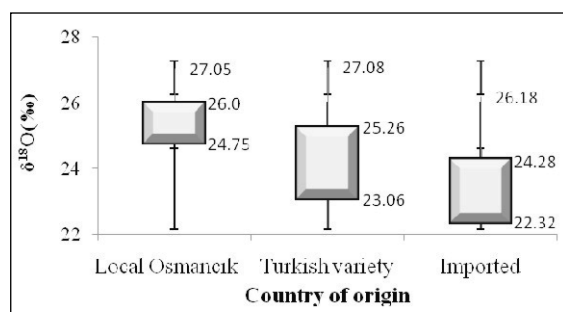


Fig 3. Box plot showing $\delta^{18}\text{O}$ (‰) variations of for all rice according to the groups

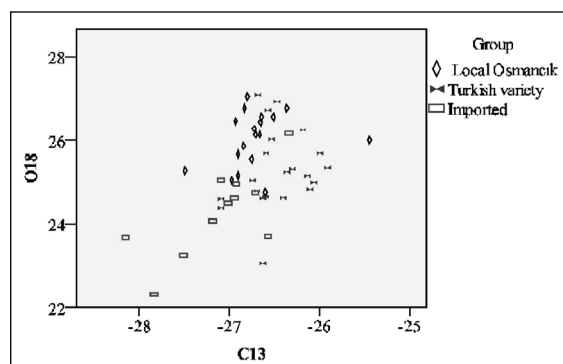


Fig 4. Distributions of $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic composition of whole rice samples.

mean value of $\delta^{18}\text{O}$ is found to be $+24.28\text{‰}$ for imported samples followed by the Turkish variety of samples which have the next highest set of $\delta^{18}\text{O}$ values with a mean value of $+25.26\text{‰}$. The rice samples classified in group Local Osmançık collected from Çorum-Osmançık have the highest mean $\delta^{18}\text{O}$ values of $+26.00\text{‰}$. The imported rice samples have relatively lower $\delta^{13}\text{C}$ values with a mean value of -27.11‰ . The group Turkish variety samples relatively enriched in $\delta^{13}\text{C}$ with a mean of -26.45‰ compared to the imported samples. The Local Osmançık rice samples are the most enriched one in terms of ^{13}C with a mean $\delta^{13}\text{C}$ value of -26.69‰ .

The main principle of CDA method is to find a combination of functions based on isotope and elemental values that maximize the separation of Osmançık-97 (Local Osmançık and Turkish variety) and other group of samples. The concentrations of isotopes were significantly different ($P < 0.05$) between groups as determined by multiple comparisons. For all samples C, N, O and H contents and $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, and $\delta^{18}\text{O}$ values are contributed from 29.16 to 40.26%, 0.96 to 1.37%, 46.03 to 51.60%, 9.99 to 24.23%, -25.99 to -28.15‰ , $+3.27$ to $+7.71\text{‰}$ and $+22.32$ to $+27.08\text{‰}$, respectively. These C, N, O and H contents and isotopic compositions are consistent with those of general plant material (12). Turkish rice samples (Local Osmançık and Turkish variety) showed a higher $\delta^{15}\text{N}$ value than import rice samples and clearly discriminated from group Imported samples. Nitrogen isotopic composition of rice is thought to depend mainly on soil nutrition. Although, organic fertilizers generally increase the $\delta^{15}\text{N}$ content in soil and plants, the utilization of artificial fertilizers decreases it. In fact, in Australia, many farmers rotate the rice crops with pasture crops over several years. This agricultural cycle in Australia may be consistent with the high $\delta^{15}\text{N}$ value of the Australian rice as determined several researchers (2, 13). The first group of rice samples ($n=19$) collected from ten different cultivation regions have average values of $+5.04 \pm 0.9\text{‰}$ in $\delta^{15}\text{N}$, $-26.69 \pm 0.3\text{‰}$ in $\delta^{13}\text{C}$, and $+26.0 \pm 0.6\text{‰}$ in $\delta^{18}\text{O}$. When the average value of each region is compared, the heavier $\delta^{15}\text{N}$ is found in the Turkish variety samples with the value of $+6.28\text{‰}$ whereas the lighter value is found in imported samples (Imported) with $+4.27\text{‰}$. When the $\delta^{13}\text{C}$ values are compared, it has been found that the heaviest value of -26.45‰ is observed in Turkish variety group, whereas the lightest value of -27.11‰ is seen in group Imported samples. For $\delta^{18}\text{O}$ values the heaviest value of $+26.00\text{‰}$ is found in the Local Osmançık group samples, whereas the lightest value of $+24.28\text{‰}$ is found in imported samples. Notably, Local Osmançık sample was enriched in $\delta^{18}\text{O}$, whereas imported sample was enriched in $\delta^{12}\text{C}$, $\delta^{14}\text{N}$, and $\delta^{16}\text{O}$. Because the Local Osmançık group sample has higher value of $\delta^{18}\text{O}$ compared to other group of samples, they can clearly be distinguished from the second and third group of samples.

In this study, fourteen variables including $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, and $\delta^{18}\text{O}$, Cu, Zn, Fe, Ni, Cr, Al, Sr, C, N, O and H contents were selected by the software for discrimination. Function 1 (70.4% of variance) which provides the main separation between the group Local Osmancık and Turkish variety rice samples was primarily correlated with $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, carbon and nitrogen contents. Function 2 (29.6% of variance) which provides the discrimination between the group Local Osmancık and Imported rice samples was primarily correlated with $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{15}\text{N}$, Sr, and Ni contents. According to Box's of equality of covariance matrices test results of CDA, for the groups to determine the geographical origin of the rice sample is homogeneous in its inside, and it can be used for this purpose.

In 2008, Suzuki et al. (2), Investigated the geographical origins of a single rice cultivar, the Koshihikari rice, from Australia, Japan and USA. In the study, rice samples from different origins were clearly discriminated from Japanese rice by high $\delta^{15}\text{N}$ or high $\delta^{18}\text{O}$ values. The other geographical traceability study of rice was carried out by González *et al.* (7), on the "Arròs de Valencia" rice grain using mineral element composition. From the study, lanthanides, cadmium and cobalt have been identified as the most influential indicators of the geographical origin of rice samples (4).

The results of the CDA analysis, 89.5% of the samples in group Local Osmancık, 80.0% of samples in group Turkish variety and 81.8% of samples in group Imported can correctly be classified. According to the CDA analysis results

84.4% of original grouped cases correctly classified. The inclusion of the stable isotope ratio results, together with the multi-element data, in the geographical origin discrimination of the rice samples by CDA was found to be more powerful in providing distinction by group of origin slight improvement to the rice geographical differentiation. This was supported statistically by the increase of the original grouped cases correctly classified from 83.3% to 84.4%. All rice samples can be successfully classified into three groups representing corresponding origins during model training process. Holdout Cross-validation was selected during the model cross-validation procedure to evaluate the robustness of the developed model. As shown in Table 2, 92.3% of the samples in group cases selected Local Osmancık, 64.3% of samples in group cases selected Turkish variety and 100.0% of samples in group cases selected Imported can correctly be classified. According to the cross-validation results 82.4% of original grouped cases correctly classified.

CONCLUSIONS

Our study demonstrated that both trace-element composition and stable isotope profile are important parameters for establishing scientifically the geographic origin of foods by selecting appropriate chemometric data treatments. The 11 elements and $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, and $\delta^{18}\text{O}$ isotopic ratios were selected for stable isotopes and the multi-element compositions for discriminate analysis. The elemental variations in the rice

Table 2. Classification of rice sample from each group and percentages of observations correctly classified^{a,b}

		Group	Predicted Group Membership			
			Local Osmancık	Turkish variety	Imported	Total
Cases Selected	Original Count	Local Osmancık	12	1	0	13
		Turkish variety	1	9	4	14
		Imported	0	0	7	7
	%	Local Osmancık	92.3	7.7	0	100.0
		Turkish variety	7.1	64.3	28.6	100.0
		Imported	.0	.0	100.0	100.0
Cases Not Selected	Original Count	Local Osmancık	5	1	0	6
		Turkish variety	0	6	0	6
		Imported	0	1	3	4
	%	Local Osmancık	83.3	16.7	.0	100.0
		Turkish variety	.0	100.0	.0	100.0
		Imported	.0	25.0	75.0	100.0

^a82.4 % of selected original grouped cases correctly classified.

^b87.5 % of unselected original grouped cases correctly classified.

samples of the different origins could possibly improve the discriminate study. The rice from Osmancik (Local Osmancik) and other part of Turkey (Turkish variety) are clearly distinguished from imported samples (Imported) by high $\delta^{15}\text{N}$ or high $\delta^{18}\text{O}$ values. Thus comparison of Cu, Zn, Fe, Ni, Cr, Al, Sr, C, N, O, and H contents and $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, and $\delta^{18}\text{O}$ values would potentially be applied for rapid and routine analyses of geographical origin of rice. However, further investigation is still needed to test whether this discrimination method based on the observed difference in elemental and isotopic compositions can be generalized to all Turkish rice as well as other cultivars. At least, the proposed methods clearly indicate that it can be used as a tool to discriminate geographical origin of Turkish, "Osmancik-97" rice.

Acknowledgements

The author is grateful to Hitit University Scientific Research and Development Office for their financial support (Project no: MUH19001.14.009).

REFERENCES

1. Gevrek NM. 2012. Some Agronomic and Quality Characteristics of New Rice Varieties In The Aegean Region of Turkey. *Turkish J Field Crops*, 17(1), 74-77.
2. Suzuki Y, Chikaraishi Y, Ogawa ON, Ohkouchi N, Korenaga T. 2008. Geographical origin of polished rice based on multiple element and stable isotope analyses. *Food Chem*, 109, 470-475.
3. Kelly S, Heaton K, Hoogewerff J. 2005. Tracing the geographical origin of food: The application of multi-element and multi-isotope analysis. *Trends Food Sci Tech*, 16, 555-567.
4. González A, Armenta S, Guardia la de M. 2009. Trace-element composition and stable -isotope ratio for discrimination of foods with Protected Designation of Origin. *Trends Anal Chem*, 28(11), 1295-1311.
5. Suzuki Y, Akamatsu F, Nakashita R, Korenaga T. 2013. Characterization of Japanese polished rice by stable hydrogen isotope analysis of total fatty acids for tracing regional origin. *Anal Sci*, 29, 143-146.
6. Korenaga T, Musashi M, Nakashita R, Suzuki Y. 2010. Statistical analysis of rice sample for compositions of multiple light elements (H,C,N, and O) and their stable isotopes. *Anal Sci*, 26, 873-878.
7. González A, Armenta S, Guardia la de M. 2011. Geographical traceability of "Arròs da Valencia" rice grain based on mineral element composition. *Food Chem*, 126:1254-1260.
8. Ariyama K, Shinozaki M, Kawasaki A. 2012. Determination of the geographical origin of rice by chemometrics with strontium and lead isotope ratios and multielement concentrations. *J Agr Food Chem*, 60, 1628-1634.
9. Kelly S, Baxter M, Chapman S, Rhodes C, Dennis J, Brereton P. 2002. The application of isotopic and elemental analysis to determine the geographical origin of premium long grain rice. *Eur Food Res Technol*, 214, 72-78.
10. Kohavi R. 1995. A study of cross-validation and bootstrap for accuracy estimation and model selection. *Proceedings of the Fourteenth International Joint Conference on Artificial Intelligence* (San Mateo, CA: Morgan Kaufmann) 2 (12), 1137-1143.
11. Li A. 2011. Determination of geographical origin of rice using stable isotope ratio and multi element analysis. The University of York Department of Chemistry Msc Thesis, United Kingdom.
12. Phuong DT, Chuong VP, Khiem DT, Kokot S. 1999. Elemental content of Vietnam rice Part 1. Sampling, analysis and comparison with previous studies. *The Analyst*, 124, 553-560.
13. Rodrigues C, Maia R, Máguas C. 2013. The application of isotope ratio mass spectrometry to the study of the ecophysiology of plant seeds. *Spectrosc Eur*, 25(1), 12-18.

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.

MEMECİK VE ERKENCE ZEYTİN ÇEŞİTLERİNDE OLGUNLUK DERECESİNİN NATÜREL ZEYTİNYAĞININ TOPLAM POLİFENOL MİKTARI VE ACILIK İNDEKSİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Fahri Yemişçioğlu, Onur Özdikicierler*,
Sibel Çapar, Aytaç Saygın Gümüşkesen

Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Bornova, İzmir

Geliş tarihi / Received: 18.02.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 03.05.2016

Kabul tarihi / Accepted: 06.05.2016

Özet

Natürel zeytinyağının karakteristik duyuşal özellikleri arasında yer alan acılık, zeytinyağının yapısındaki fenolik bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Zeytinyağının önemli bir bileşeni olan fenolik bileşiklerin nitel ve nicel özelliklerini; iklimsel, agronomik ve teknolojik faktörler belirlemektedir. Bu çalışmada; farklı olgunluk düzeylerinde hasat edilen Memecik ve Erkence çeşidi zeytinlerden elde edilen yağların toplam polifenol içeriği ile acılık indeksi K_{225} değerindeki değişim incelenmiştir. Her iki zeytin çeşidinde de olgunlaşma ilerledikçe, toplam polifenol miktarının logaritmik olarak azaldığı ve bu değişimin istatistiksel olarak önemli olduğu ($P<0.05$) belirlenmiştir. Memecik ve Erkence zeytin çeşitlerinden elde edilen yağların toplam polifenol miktarı ile acılık indeksi K_{225} arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak önemli olduğu ($P<0.01$), bu ilişkinin matematiksel olarak logaritmik bir denklemlle ifade edilebileceği saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Zeytin, zeytinyağı, olgunlaşma indeksi, acılık indeksi, polifenol

INFLUENCE OF THE FRUIT'S RIPENESS ON TOTAL POLYPHENOL CONTENT AND BITTERNESS INDEX OF VIRGIN OLIVE OIL FOR MEMECİK AND ERKENCE OLIVE VARIETIES

Abstract

Phenolic compounds are responsible from bitterness which is one of the desired sensory characteristics of natural olive oils. Quantitative and qualitative properties of phenolic compounds in natural olive oils depend on climatic and agronomic factors as well as the olive oil processing technology. In this study; changes in total polyphenol content of olive oil extracted from Memecik and Erkence varieties at different maturation levels are investigated. Moreover; relation of total polyphenol content of olive oil with bitterness index K_{225} is also examined. Total polyphenol content decreased in logarithmic manner as maturation proceeds for both varieties. This dependence is found to be statistically significant ($P<0.05$). Relationship between total polyphenol content and bitterness index K_{225} showed a logarithmic dependence which is also confirmed to be statistically significant ($P>0.01$) for Memecik and Erkence varieties.

Keywords: Olive, olive oil, maturity index, bitterness index, polyphenol

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ onur.ozdikicierler@ege.edu.tr,

☎ (+90) 232 311 3026,

☎ (+90) 232 342 75 92

GİRİŞ

Natürel zeytinyağı, zeytin meyvesinden fiziksel yöntemlerle elde edilen doğal bir meyve suyu olup, rafinasyon işlemi uygulamadan doğal haliyle tüketilmektedir (1). Natürel zeytinyağının kimyasal kompozisyonu; agronomik (çeşit, olgunlaşma derecesi, iklimsel koşullar, sulama vb.), ve teknolojik (kırma, malaksasyon, su ilavesi vb.) faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (2).

Zeytin meyvesinin olgunlaşma sürecinde oluşan metabolik proseslere bağlı olarak yağın trigliserit yapısı, yağ asidi kompozisyonu, nitel ve nicel olarak fenolik madde, tokoferol, klorofil ve karotenoid içeriğinde değişimler meydana gelmektedir. Bu değişimler yağın duyuşal özelliklerini, oksidatif stabilitesini, besin değerini ve kalitesini belirlemektedir (3). Zeytinyağında bulunan ve farklı mekanizmalarla oksidasyonu önleyen başlıca antioksidanlar; polifenoller (basit ve aglikonlar), tokoferoller, karotenoidler ve klorofillerdir. Bu antioksidanlar arasında en etkili olanın, zeytinyağında bulunma miktarıyla doğru orantılı olarak oksidasyonu engellediği düşünölen polifenoller olduğu bilinmektedir (4).

Polifenoller, bir benzen halkasına bağılı bir veya daha fazla sayıdaki hidroksil grubu ve fonksiyonel grupları içeren yapılardır. Natürel zeytinyağında bulunan polifenollerin önemli kısmı sekoiridoidler, basit fenoller ve lignanlardır. Zeytinyağında bulunan toplam fenollerin %60-90 gibi yüksek oranını; tirosol, hidroksitirosol ve onların sekoiridoid türevleri oluşturmaktadır (5).

Zeytinin yetiştiiği bölgenin yağış veya sulama koşulları ile toprak ve iklim özellikleri, zeytinin çeşidi, hasat zamanı ve şekli, zeytinleri depolama koşulları ve süresi, yağ üretim akışı (kırma-ezme, yoğurma, santrifüjleme, filtrasyon) ve yağın depolanma koşulları, zeytinyağında bulunan polifenollerin nicel ve nitel özellikleri üzerinde etkili olan etmelerdir (5, 6).

Zeytin meyvesinin hasat zamanı ve olgunluk indeksi, zeytinyağında hem kimyasal hem de duyuşal kalitenin oluşması açısından önemlidir. Zeytin meyvesinin olgunlaşma sürecinde birçok metabolik değişimler meydana gelmekte, fenolik bileşenlerin kompozisyonu, bu bileşenlerin biyosentezi ve biyotransformasyonu sonucunda değişime uğramaktadır. Erken hasat zeytinlerden,

polifenol içeriğı ve oksidatif stabilitesi yüksek yağlar üretilmektedir. Ancak bu yağlar yüksek acılık-yakıcılık şiddeti nedeniyle tüketici tarafından tercih edilmemektedir. Bu nedenle her zeytin çeşidi için en uygun hasat zamanının belirlenmesi gerekmektedir (5, 7). Erken hasat sürecinde; zeytinyağının hidroksitirosol, ligstrosid aglikon, oleuropein aglikon, asetoksi-pinoresinol ve elenolik asit içeriğı yükselmekte, olgunlaşmanın ilerlemesi ile bu maddelerin miktarında azalma meydana gelmektedir. Toplam polifenol miktarındaki düşmeye de bağılı olarak yağın acılık-yakıcılık özellikleri azalmaktadır (6). Zeytinyağının polifenol içeriğı ile acılık-yakıcılık şiddeti arasında ilişki olduğu birçok araştırmacı tarafından belirtilmektedir (8-15). Zeytinyağının acılık şiddetinin kimyasal olarak belirlenmesinde acılık indeksi K_{225} ölçüt olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde, natürel zeytinyağında acılığa neden olan bileşenleri içeren metanol/su ekstraktının 225nm dalga boyundaki absorbanı ölçölmektedir. Duyusal değerlendirme ile belirlenen acılık şiddeti ile bu yöntemle belirlenen acılık indeksinin paralellik gösterdiği saptanmıştır (16).

Bu çalışmada; farklı olgunluk derecelerinde hasat edilen Memecik ve Erkence zeytin çeşitlerinden elde edilen yağların toplam polifenol miktarı ve acılık indeksi K_{225} değerleri belirlenmiştir. Ayrıca toplam polifenol miktarı ile acılık indeksi K_{225} arasındaki ilişki incelenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal olarak; Memecik ve Erkence zeytin çeşitleri kullanılmıştır. Zeytin örnekleri İzmir'in Urla ilçesinden temin edilmiştir. Hasat, zeytinlere zarar vermeyecek şekilde elle yapılmıştır. Seçilen ağaçların tüm dallarını içerecek şekilde 5 kg zeytin toplanarak 24 saat içinde yağa işlenmiştir.

Zeytinyağının toplam polifenol içeriğı ve acılık indeksi K_{225} değerinin, zeytinin olgunlaşma indeksi ile değişiminin incelenmesi amaçlandığı için, 16/Ekim /2009 – 16/Ocak /2010 tarihleri arasında her bir zeytin çeşidinden 8 farklı olgunluk derecesinde zeytin toplanmıştır. Zeytinlerin olgunlaşma indeksleri (OI), Uceda ve Frias (17) tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Zeytin yığınının rastgele 100 adet zeytin tanesi alınmış ve bu zeytinler enlemesine ortadan ikiye kesilerek kabuktan iç kısma kadar

renk profili incelenmiş, gözlenen renk 0-7 aralığına sahip bir skalada puanlandırılmıştır. Puanlamada 0, tamamen yeşil zeytin tanesini temsil ederken; 7, renk dönüşümü tamamlanmış ve rengi tamamen siyaha dönmüş zeytinleri temsil etmektedir. Puanlamanın tamamlanmasının ardından her bir puan grubundaki zeytin taneleri kendi içinde sayılmış, bulunan sayı ait olduğu puan ile çarpılmış, tüm çarpım sonuçları toplanmış ve elde edilen genel toplam 100'e bölünerek olgunlaşma indeksi hesaplanmıştır. Olgunlaşma indeksinin 0'a yakın olması olgunlaşmamış, 7'ye yakın olması olgun zeytin tanesinin daha fazla olduğunu göstermektedir. Farklı olgunluk derecelerinde hasat edilen zeytinlerin yağa işlenmesinde, laboratuvar tipi "Mini Zeytin Değirmeni ve Presleme Ünitesi" kullanılmıştır.

Zeytinyağı üretiminin ilk aşamasında zeytinler mini zeytin değirmeninde kırılarak zeytin hamuru elde edilmiş, zeytin hamuru yaklaşık 30 dakika süreyle ortam sıcaklığında yoğrulduktan sonra jüt pres torbalarına yerleştirilerek preslenmiştir. Presleme işleminde 2,5 kg zeytin hamuru 5 adet torbaya eşit olarak paylaştırılmış, prese yerleştirilen torbalara basınç uygulanmış, yağ+karasu çıkışı son bulana kadar presleme işlemine devam edilmiştir. Yağ ve karasudan oluşan sıvı fazdaki karasu, dekantasyon yöntemi ile yağdan uzaklaştırılmıştır. Elde edilen zeytinyağı pamuk filtreden iki kez geçirilip, 100ml'lik kahverengi şişelerde -18°C sıcaklıkta depolanmıştır. Zeytinyağı üretimi 2.5 kg'lık ikinci zeytin hamuru partisi ile tekrar edilmiştir. Her partiden elde edilen yağların toplam polifenol içerikleri ve acılık indeksi K_{225} değerleri belirlenmiştir.

Zeytinyağı örneklerinin toplam polifenol miktarı (TPM), Gutfinger tarafından uygulanan spektrofotometrik yöntemle belirlenerek, sonuçlar mg kafeik asit/ kg yağ olarak verilmiştir (18).

Zeytinyağının acılık indeksi K_{225} , Gutierrez Rosales ve ark. (16) tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak saptanmıştır. Bu yöntemde octadecyl C18 kolonu kullanılmaktadır. Öncelikle kolon metanol ve hekzan ile aktifleştirilerek hekzanda çözülen yağ kolondan geçirilmiştir. Kolonda tutulan fenolik maddeler metanol:su (1:1) karışımı ile ekstrakte edilerek, ekstraktın 225 nm dalga boyundaki absorbansı "acılık indeksi K_{225} " olarak ifade edilmiştir.

Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS for Windows yazılımı kullanılmıştır. Memecik ve Erkence çeşitleri için olgunlaşma indeksi, toplam polifenol miktarı ve acılık indeksi değerleri arasındaki korelasyon ise Pearson korelasyon katsayıları hesaplanarak belirlenmiştir. Ayrıca zeytin çeşitlerinin olgunlaşma indeksi ile toplam polifenol miktarı, toplam polifenol miktarı ile acılık indeksi arasındaki ilişkiler regresyon analizi ile incelenerek istatistiksel olarak önemli bulunan en yakın matematiksel model oluşturulmuştur.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Memecik ve Erkence zeytin çeşitlerinin olgunlaşma indeksi ile bu zeytin çeşitlerinden elde edilen yağların toplam polifenol miktarı ve K_{225} değerleri Çizelge 1'de, bu değerlere ait Pearson korelasyon katsayıları ise Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 1. Memecik ve Erkence zeytin çeşitlerinin olgunlaşma indeksi, toplam polifenol miktarı ve K_{225} değerleri
Table 1. Maturity index, total polyphenol content and K_{225} value of Memecik and Erkence Olive Varieties

Olgunlaşma İndeksi Maturity Index (MI)	Memecik Memecik			Erkence Erkence		
	Toplam Polifenol Miktarı Total Polyphenol Content (TPC)	K_{225}	Olgunlaşma İndeksi Maturity Index(MI)	Toplam Polifenol Miktarı Total Polyphenol Content (TPC)	K_{225}	
0.01	615	3.31	0.10	780	3.30	
0.16	500	2.83	0.89	438	2.71	
0.71	225	1.68	0.95	364	2.08	
0.89	205	1.07	1.24	316	1.34	
1.21	111	0.91	1.45	273	1.11	
1.68	93	0.82	1.72	247	1.04	
2.02	85	0.75	1.90	214	0.93	
3.81	53	0.36	3.62	164	0.39	

Çizelge 2. Olgunlaşma indeksi, toplam polifenol miktarı ve K_{225} değerine ait Pearson Korelasyon Katsayıları
 Table 2. Pearson correlation coefficients of maturity index, total polyphenol content and K_{225}

		Memecik			Erkence		
		Oİ MI	TPM TPC	K_{225}	Oİ MI	TPM TPC	K_{225}
Oİ MI	Pearson Korelasyonu Person Correlation Önem derecesi Significance Level	1	-.771*	-.809*	1	-.803*	-.826*
TPM TPC	Pearson Korelasyonu Person Correlation Önem derecesi Significance Level	-.771*	1	.989**	-.803*	1	.935**
K_{225}	Pearson Korelasyonu Person Correlation Önem derecesi Significance Level	-.809*	.989**	1	-.826*	.935**	1

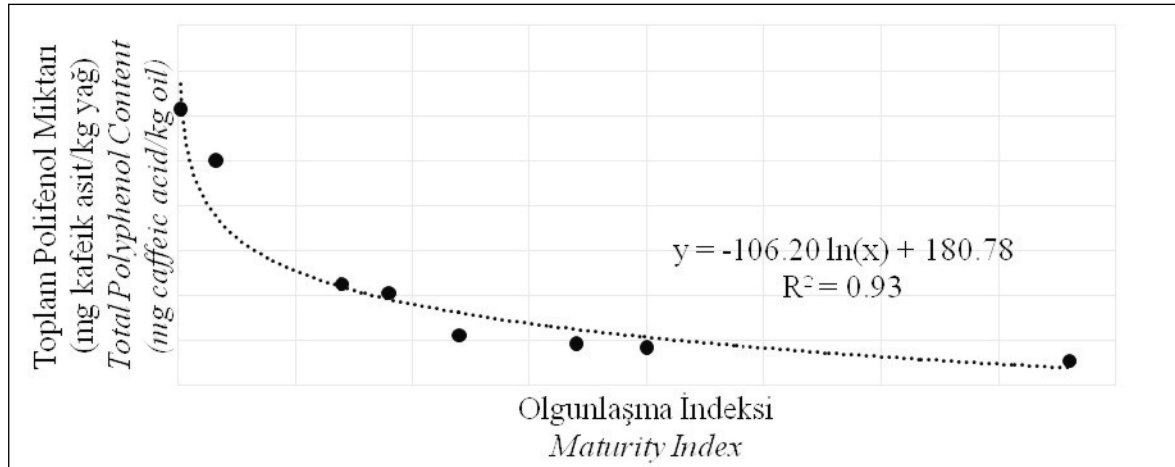
Memecik ve Erkence zeytin çeşitlerinde olgunlaşma indeksi yükseldikçe, bu zeytin çeşitlerinden elde edilen yağların toplam polifenol miktarı ve K_{225} değerinin azaldığı (Çizelge 1), bu değişimin istatistiksel olarak önemli olduğu ($P<0.05$) (Çizelge 2) saptanmıştır.

Memecik ve Erkence zeytin çeşitlerinde olgunlaşma indeksinin yükselmesi ile toplam polifenol miktarında logaritmik bir azalma olduğu, sırasıyla Şekil 1 ve Şekil 2'de görülmektedir.

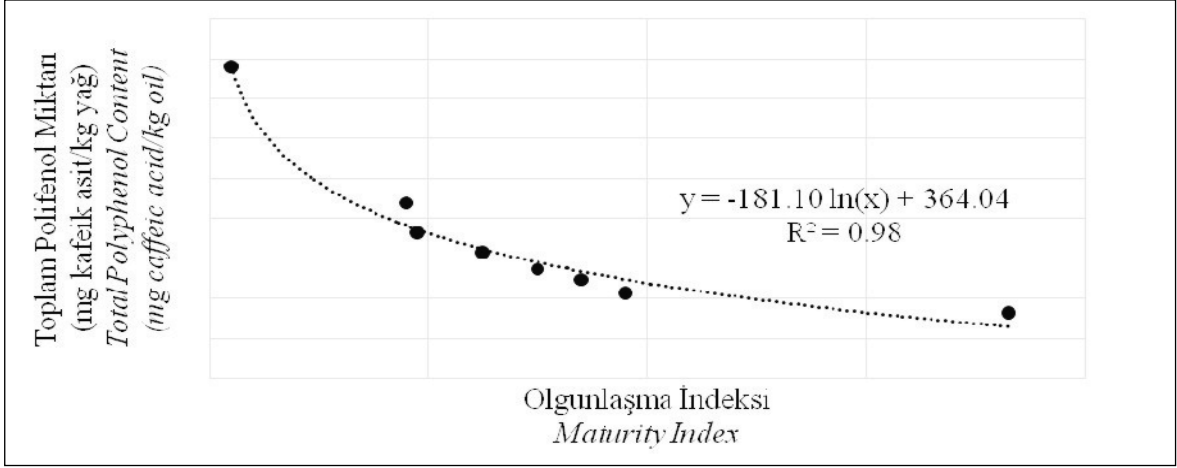
Memecik ve Erkence zeytin çeşitlerinden elde edilen yağların toplam polifenol miktarı ile K_{225} değeri arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak önemli olduğu ($P<0.01$) saptanmıştır (Çizelge 2). Her iki zeytin çeşidinde de, toplam polifenol miktarı azaldıkça, K_{225} değerinin düştüğü belirlenmiştir (Çizelge 1).

Memecik ve Erkence zeytin çeşitlerinde toplam polifenol miktarı ile K_{225} değeri arasındaki ilişkinin logaritmik regresyon modeli ile açıklanabileceği sırasıyla Şekil 3 ve Şekil 4'te görülmektedir.

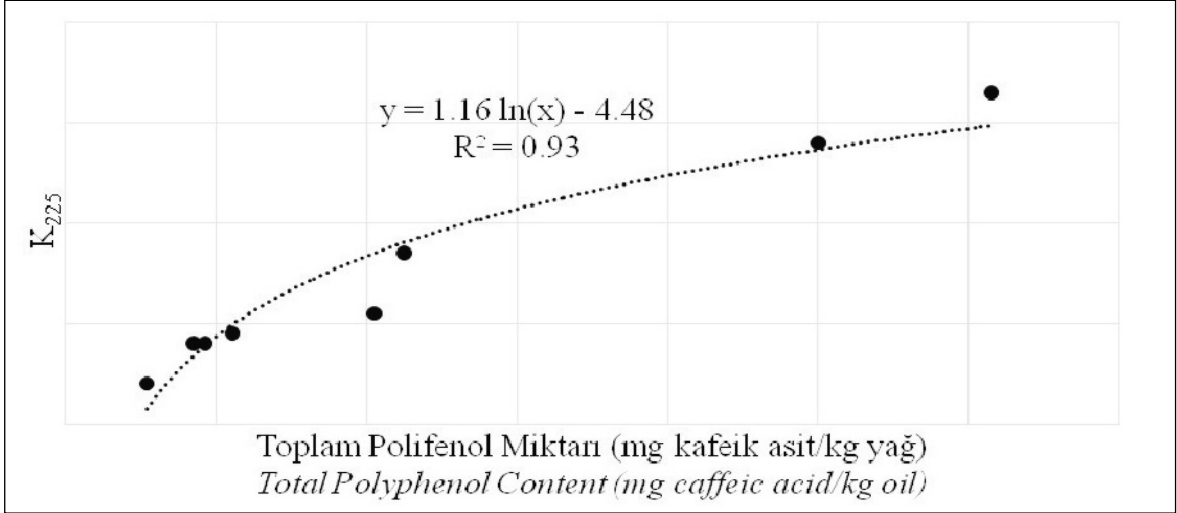
Sonuç olarak; incelenen zeytin çeşitlerinde olgunlaşma indeksi, toplam polifenol miktarı ve K_{225} değerleri arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır. Zeytinlerin olgunlaşma indeksinin 3 değerinin üzerine çıkması ile Memecik zeytin çeşidinde toplam polifenol miktarı 615 mg kafeik asit/kg yağ değerinden 53 mg kafeik asit/kg yağ değerine düşerek %92 oranında, Erkence zeytin çeşidinde ise toplam polifenol miktarı 780 mg kafeik asit/kg yağ değerinden 164 mg kafeik asit/kg yağ değerine düşerek %79 oranında azalma göstermektedir. Toplam polifenol miktarındaki azalma ile ilişkili olarak K_{225} değerindeki düşmenin; Memecik



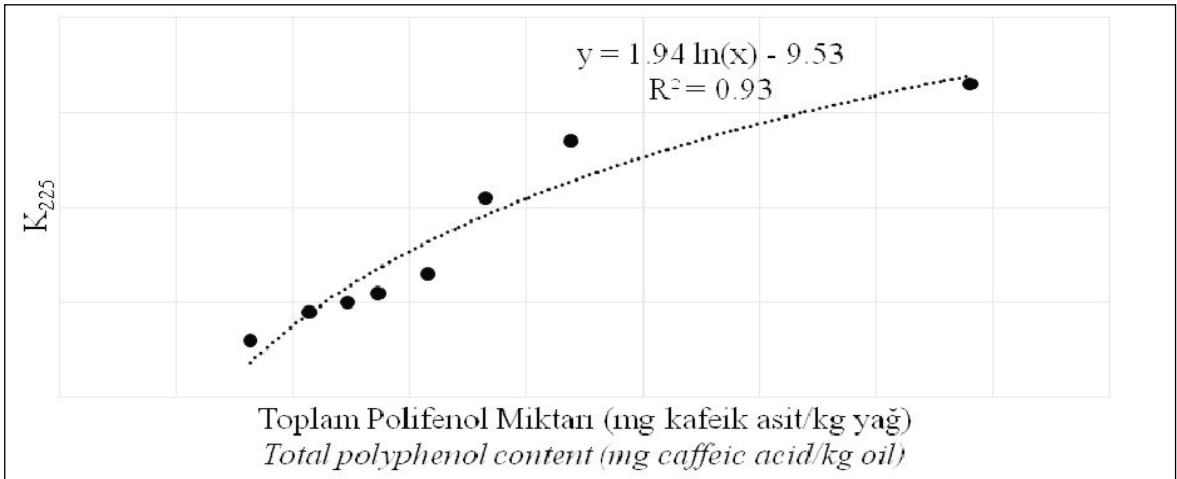
Şekil 1. Memecik zeytin çeşidinde toplam polifenol miktarının olgunlaşma indeksi ile değişimi
 Figure 1. Change in total polyphenol content with maturity index for Memecik olive variety



Şekil 2. Erkençe zeytin çeşidinde toplam polifenol miktarının olgunlaşma indeksi ile değişimi
Figure 2. Change in total polyphenol content with maturity index for Erkençe olive variety



Şekil 3. Memecik zeytin çeşidi için toplam polifenol miktarı ile K225 değerinin değişimi
Figure 3. Changes in K225 value with total polyphenol content for Memecik olive variety



Şekil 4. Erkençe zeytin çeşidi için toplam polifenol miktarı ile K225 değerinin değişimi
Figure 4. Changes in K225 value with total polyphenol content for Erkençe olive variety

zeytin çeşidinden elde edilen yağda %89, Erkence zeytin çeşidinden elde edilen yağda %88 olduğu belirlenmiştir.

Zeytinyağının özellikle biyoaktif bir bileşen olan polifenol içeriğinin zeytinin olgunlaşma indeksiyle değişimi ve tüketici tercihleri göz önünde bulundurularak her zeytin çeşidi için en uygun hasat zamanının belirlenmesi önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Garcia-Mesa JA, Mateos R. 2007. Direct automatic determination of bitterness and total phenolic compounds in virgin olive oil using a pH-based flow-injection analysis system. *J Agric Food Chem*, 55, 3863-3868.
2. Garcia-Mesa JA, Pereira-Caro G, Fernandez-Hernandez A, Civantos CGO, Mateos R. 2008. Influence of lipid matrix in the bitterness perception of virgin olive oil. *Food Quality and Preference*, 19, 421-430.
3. Franco MN, Sanchez J, De Miguel, C, Martinez M, Martin-Vertedor D. 2015. Influence of the fruit's ripeness on virgin olive oil quality. *Journal of Oleo Science*, 64, (3), 263-273.
4. Del Carlo M, Sacchetti G, Di Mattia C, Compagnone D, Mastrocola D, Liberatore L, Cichelli A. 2004. Contribution of the phenolic fraction to the antioxidant activity and oxidative stability of olive oil. *J Agric Food Chem*, 52 (13), 4072-4079.
5. Vitaglione P, Savarese M, Paduano A, Scalfi L, Fogliano V, Sacchi R. 2015. Healthy virgin olive oil: A matter of bitterness. *Food Science and Nutrition*, 55, 1808-1818.
6. Frankel E, Bakhouche A, Lozano-Sanchez J, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A. 2013. Literature review on enriched in bioactive compounds: Potential use of by products as alternative sources of polyphenols. *J Agric Food Chem*, 61, 5179-5188.
7. Aguilera MP, Jimenez A, Sanchez-Villasclaras S, Uceda M, Beltran G. 2015. Modulation of bitterness and pungency in virgin olive oil from unripe "Picual" fruits. *Eur J Lipid Sci Technol.*, 117, 1463-1472.
8. Beltran G, Aguilera MP, Del Rio C, Sanchez S, Martinez L. 2005. Influence of fruit ripening process on the natural antioxidant content of Hojiblanca virgin olive oils. *Food Chem*, 89, 207-215.
9. Johanneke LH, Busch HC, Hrnccirik K, Blukin E, Boucon C, Mascini M. 2006. Biosensor measurement of polar phenolics for the assessment of the bitterness and pungency of virgin olive oil. *J Agric Food Chem*, 54, 4371-4377.
10. Artajo LS, Pomero MP, Morello JR, Motilva MJ. 2006. Enrichment of refined olive oil with phenolic compounds: Evaluation of their antioxidant activity and their effect on the bitter index. *J Agric Food Chem*, 54, 6079-6088.
11. Youssef NB, Zarrouk W, Carrasco-Pancorbo A, Ouni Y, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A, Daoud D, Zarrouk M. 2010. Effect of olive ripeness on chemical properties and phenolic composition of chetoui virgin olive oil. *J of Sci Food Agric*, 90,199-204.
12. Dierkes G, Krieger S, Dück R, Bongartz A, Schmitz OJ, Hayen H. 2012. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry profiling of phenolic compounds for evaluation of olive oil bitterness and pungency. *J Agric Food Chem*, 60, 7597-7606.
13. Apetrei C. 2012. Novel method based on polypyrrole-modified sensors and emulsions for the evaluation of bitterness in extra virgin olive oils. *Food Res Int*, 48, 673-680.
14. Favati F, Condelli N, Galgano F, Caruso MC. 2013. Extra virgin olive oil bitterness evaluation by sensory and chemical analyses. *Food Chem*, 139, 949-954.
15. Inarejos-Garcia AM, Androulaki A, Salvador MD. 2009. Discussion on the objective evaluation of virgin olive oil bitterness. *Food Res Int*, 42, 279-284.
16. Rosales FG, Perdiguero S, Gutierrez R, Olias JM. 1992. Evaluation of the bitter taste in virgin olive oil. *J Am Oil Chem Soc*, 69, 4, 394-395.
17. Uceda M, Frias L. 1975. Harvest dates, evaluation of the fruit oil content, oil composition and oil quality. *Proc Segundo Seminario Oleicola Internacional, Cordoba*, 125-130.
18. Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive oil. *J Am Oil Chem Soc*, 58, 966-968.

FARKLI KIZARTMA YÖNTEMLERİNİN BİTKİSEL YAĞLARIN OKSİDATİF STABİLİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Cem Baltacıoğlu*

Gıda Mühendisliği Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Niğde Üniversitesi, Niğde

Geliş tarihi / Received: 27.02.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 05.05.2016

Kabul tarihi / Accepted: 05.06.2016

Özet

Derin yağda kızartma, ticari ve ev ölçeğinde en çok kullanılan gıda hazırlama yöntemlerinden birisidir. Sıcaklık, süre ve oksijen etkisiyle, kullanılan yağda kızartma sonunda ısıl oksidasyon görülmektedir. Yapılan bu çalışmada ayçiçek, kanola ve ticari kızartma yağları kızartma ortamı olarak kullanılmıştır. Derin yağda kızartma metodu olarak fritöz ve mikrodalgalı fırın kullanılmıştır. Kızartma sıcaklığı olarak fritözde 160°C ve 190°C, mikrodalgada fırında 600W ve 900W güç değerleri seçilmiş, her iki yöntemde de 4 dakika süre uygulanmıştır. Oksidasyon düzeyini belirlemek amacıyla peroksit değeri ve 232 ve 270 nm'de özgül soğurma parametreleri incelenmiştir. Ticari kızartmalık yağlarda 4.60±1.95, kanola yağında 5.80±2.26 ve ayçiçek yağında 7.43±2.30 ortalama peroksit değerleri elde edilmiştir. K₂₃₂ ve K₂₇₀ ortalama değerleri ayçiçek, kanola ve ticari kızartmalık yağda sırasıyla 1.868±0.406, 1.320±0.132, 1.036±0.107 ve 0.778±0.170, 0.302±0.054, 0.280±0.028 olarak ölçülmüştür.

Anahtar kelimeler: Kızartma, mikrodalgalı, oksidasyon, peroksit değeri, özgül soğurma.

EFFECT OF FRYING METHODS ON OXIDATIVE STABILITY OF VEGETABLE OILS

Abstract

Deep fat frying is one of the most widely used method of food preparation for commercial and household scale. The thermal oxidation is seen in frying oil by the effect of temperature, time and oxygen. In this study sunflower oil, canola oil and frying oil were used as a frying medium. Deep fat fryer and microwave oven were used as a frying method. 160°C and 190°C were selected as frying temperature in electric fryer, 600W and 900W power level were selected in microwave oven and 4 minutes were applied in both methods. Peroxide value and specific extinction coefficient in 232 and 270 nm were investigated to determine oxidation levels. Average peroxide values were obtained as 4.60±1.95 in commercial frying oil, 5.80±2.26 in canola oil and 7.43±2.30 in sunflower oil. K₂₃₂ and K₂₇₀ values of sunflower oil, canola oil and commercial frying oil were measured 1.868±0.406, 1.320±0.132, 1.036±0.107 and 0.778±0.170, 0.302±0.054, 0.280±0.028, respectively.

Keywords: Frying, microwave, oxidation, peroxide value, specific extinction.

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ cembaltacioglu@nigde.edu.tr,

☎ (+90) 0388 225 4227,

☎ (+90) 0388 225 0112

GİRİŞ

Derin yağda kızartma bilinen en eski gıda işleme metotlarından birisidir. Bu yöntemle gıdaya kendine has renk, tat, yapı, lezzet kazandırılmaktadır (1-3). Kızarmış ürünler endüstride ve ev ölçeğinde en çok tercih edilen ürünlerdir ve son yıllarda popülaritesi giderek artmaktadır (4). Derin yağda kızartma işlemi 150-200°C aralığında ısıtılmış bitkisel yağda belirlenen zaman aralığında gerçekleştirilmektedir (5). Kızartılmış olarak hazırlanan atıştırmalık ürünlerin başında gelen cipslerin ülkemizde 2004 yılında kişi başı 400 gram olan tüketimi son yıllarda 1200 grama kadar çıkmıştır. Avrupa ülkelerinde 4 kg, ABD'de 6 kg'ı bulan tüketim değerleri, kızarmış ürünlerde ülkemizdeki tüketimin önümüzdeki yıllarda gideceği noktayı açıkça göstermektedir. Gelişme dönemindeki gençlerin ve çocukların tüketim alışkanlıkları arasında önemli bir yer tutan başlıca ürünler arasında kızarmış ürünler ve cipsler yer almaktadır. Kızarmış ürünlerin kalitesi incelendiğinde kızartma metodu, kızartma koşulları, gıdanın ağırlığı, yağ miktarı, yağ çeşidi gibi pek çok faktörden etkilenmektedir (6).

Kızartmada, kızartma ortamı olan yağın ısıya karşı dayanıklılığı önem taşımaktadır. Kızartma sırasında kullanılan yağda zamanla ısı etkisiyle fiziksel ve kimyasal değişiklikler sonucunda termal oksidasyon, polimerizasyon ve hidroliz görülmektedir. Bu reaksiyonlar sonucunda peroksit değerinde bir artış ve polar maddeler gibi yüksek molekül ağırlıklı dekompozisyon ürünleri oluşmaktadır (7, 8). Oluşan oksidasyon ürünlerinin varlığı kızartmada kullanılan yağda kalite azalması, kızartılan üründe de tat, lezzet ve besleyici değer açısından olumsuz etki göstermektedir (9, 10).

Mikrodalga fırınların günümüzde kullanımının yaygınlaştığı bilinmektedir. Derin yağda yapılan kızartmaya göre kullanım kolaylığı açısından tercih edilebilmektedir. Mikrodalga kullanımının kızartmada yarattığı etki üzerine yapılan çalışmalarda olumlu katkısı olduğu vurgulanmaktadır (11). Mikrodalga fırınların kızartma prosesinde kullanılmasına ilişkin yapılan bir çalışmada mısır yağının oksidasyon parametreleri incelenmiş ve mikrodalga kullanımının yağın kalitesine üzerine etkili olduğu görülmüştür (12). Mikrodalgalar elektromanyetik dalgalar halinde 300MHz'den 300GHz'e kadar değişen aralıkta yayılmaktadırlar. Gıda hazırlamada ve pişirmede en çok 2450MHz

kullanılmaktadır (13). Mikrodalga ısıtma mekanizmasının konvansiyonel ısıtmadan farklı olmasından dolayı gıda maddesi iç kısmından ısınmaya başlamaktadır. Bu durum kızartmada kullanılması halinde hem yağı hem de kızaran materyali ısıtması açısından önem arz etmektedir (14,15).

Bu çalışmada kızartmalar derin yağda yapılmıştır. Derin yağda kızartma yöntemi olarak iki farklı ekipman olan fritöz ve mikrodalga fırın kullanılmıştır. Kızartmada ticari olarak ve ev ölçeğinde en çok tercih edilen ayçiçek yağı, kanola yağı ve ticari kızartma yağı olmak üzere üç farklı bitkisel yağ kızartma ortamı olarak tercih edilmiştir. Derin yağda yapılan kızartma yönteminde fritöz ile mikrodalga fırın kullanılarak yapılan kızartmanın kullanılan yağdaki oksidasyon düzeyindeki değişim araştırılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Kızartma işleminde kullanılacak materyal olan patatesler yerel bir marketten dondurulmuş olarak temin edilmiştir (Nimet, İstanbul). Tek seferde alınan patatesler hızlı bir şekilde laboratuvara getirilmiş ve kızartma işlemine kadar -40°C'de çalışan derin dondurucuda (Nüve FR490, Ankara) muhafaza edilmiştir. Kızartma işleminde üç tip yağ kullanılmıştır. Bunlar ayçiçek yağı, kanola yağı ve ticari kızartma yağıdır (Zade, Konya). Yağa ait özellikler kızartma işlemi öncesi analiz edilerek sonuçlar kızartma sonrası ile karşılaştırılmıştır.

Yöntem

Kızartma İşlemi

Kızartma işlemi, öncelikle bilinen en yaygın yöntem olan derin yağda yapılmıştır. Tezgâh üstü kızartma makinesi olan fritöz (Remta R92, İstanbul) bu amaçla kullanılmış olup 2 litre yağ ile işlem gerçekleştirilmiştir. Fritözde 160°C ve 190°C iki farklı sıcaklıkta 4 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. Yağ istenilen sıcaklığa ulaştıktan sonra yağ miktarının 1/100'ü (ağırlık/hacim) kadar miktarda patates yağa daldırılarak belirlenen sürede kızartma işlemi yapılmıştır. Kızartma süresi sonunda patatesler alınıp, yağdan yaklaşık 50 ml numune alınarak analizler yapılmıştır. Yağdan eksilen kısım tamamlanarak ikinci ve üçüncü kızartma işlemleri yapılmıştır. Üçüncü kızartma

işlemi ardından yağ değiştirilmiştir. Fritözde yapılan kızartmaya alternatif olarak mikrodalga fırında derin yağda kızartma işlemi uygulanmıştır. Bu amaçla içerisine 2 litre yağ alabilen bir cam kap, zaman ve güç ayarı yapılabilen mikrodalga fırın (LG MA38882Q, Hollanda) kullanılmıştır. Mikrodalga kızartma işleminde kızartma yağı ile 600W ve 900W güç değerlerinde çalışılmıştır. Cam haznedeki yağ öncelikle 10 dakika kadar mikrodalga fırında ısıtılmış ve belirlenen güç değerinde ısıtılmış yağda 4 dakika kızartma işlemi yapılmıştır. Kızartma işlemi ve yağdan numune fritözde yapılan ile aynı yöntem takip edilmiştir.

Kızartmalık Yağlarda Serbest Yağ Asidi ve Yağ Asidi Kompozisyonu Tayini

Kızartmalık yağlarda serbest yağ asidi miktarı belirlemek için AOCS Ca 5a-40 analiz metodu (16) takip edilmiştir. Yağ asidi kompozisyonu için numunelerde yağ asitlerinin metil esterleri ve izomerleri IUPAC metoduna göre hazırlanmıştır (17) ve Shimadzu GC-2010 Plus model Gaz Kromatografi DB23 kolon (60 m, 0.25 mm, i.d. 0.25 mm film kalınlığı, JW) kullanılmıştır. Enjektör, kolon ve detektör sıcaklığı sırasıyla 230, 190 ve 240°C, bölme oranı 1:80, taşıyıcı gaz olarak helyum, akış hızı 1 ml/dk ayarlanmıştır.

Peroksit Sayısı ve Özgül Soğurma (K232, K270) Tayini

Kızartma işleminden önce ve kızartma sonrası sıvı yağda 232 ve 270nm'de özgül soğurma analizleri AOCS Metot Ch 5-91'e göre, peroksit sayısı analizleri ise AOCS Metot Cd 8-53'e göre yapılmıştır.

Çizelge 1. Kızartmadan önce kullanılan yağların yağ asidi kompozisyonu (%) ve serbest yağ asidi (% oleik asit)
Table 1. Fatty acid composition (%) and free fatty acid (% oleic acid) of oils before frying

Yağ Asidi Fatty Acid	Kızartmada kullanılan yağ Frying oil		
	Ayçiçek yağı Sunflower Oil	Kanola yağı Canola Oil	Kızartmalık yağ Frying oil
12:0 (Laurik asit)	0.0019	0.0096	0.2036
14:0 (Miristik asit)	0.0751	0.0511	0.8487
14:1 (Miristoleik asit)	0.0014	0.0022	0.0049
16:0 (Palmitik asit)	5.8742	4.5954	43.9183
16:1 (Palmitoleik asit)	0.4409	0.3965	0.3396
18:0 (Stearik asit)	3.6275	1.9427	4.1508
18:1 (Oleik asit)	30.6100	62.0776	38.1041
18:2 (Linoleik asit)	58.7124	23.1177	11.2477
18:3 (Linolenik asit)	0.2905	6.2330	0.6009
20:0 (Araşidik asit)	0.2316	0.5428	0.3643
20:1 (Araşidonik asit)	0.1346	1.0133	0.1621
Serbest Yağ Asidi Free Fatty Acid	0.2281	0.2293	0.1144

İstatistiksel Analizler

Bütün analizler üçer tekrarlı yapılmış olup elde edilen veriler Minitab 17.0 yazılımı kullanılarak ANOVA yöntemi ile değerlendirilmiştir (Minitab 17.0). İkili karşılaştırmalar için Tukey Test uygulanmıştır (SPSS 15.0).

BULGULAR VE TARTIŞMA

Kızartmalık Yağların Özellikleri

Hammadde olarak kullanılan kızartmalık yağlarda kızartmadan önce yağların serbest yağ asidi miktarı ve yağ asidi kompozisyonu Çizelge 1'de verilmiştir. Kullanılmamış yağlara ait peroksit ve özgül soğurma miktarı değerleri Çizelge 2'de kızartmadan sonraki değerleri ile birlikte karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Çizelge 1

Peroksit Sayısı

Peroksit sayısı, 1g yağdaki aktif oksijenin mikrogram olarak miktarıdır. Peroksitler yağın oksidasyonu sırasında ortaya çıkan bileşiklerdir. Peroksit sayısı yağın bozulmuşluk düzeyi arasında pozitif bir ilişki olması bunun sonucudur. Türk Gıda Kodeksi (18) verilerine göre yağlarda peroksit değeri 10 meqO₂/kg'ı geçmemesi gerekmektedir. Kızartma öncesi kullanılmamış ayçiçek yağı, kanola yağı ve ticari kızartmalık yağlara ait peroksit değerleri Çizelge 2'de gösterilmiştir. Fritözde yapılan kızartmalardan sonra elde edilen peroksit değerlerinde kodeks değerinin üzerine çıkan bir durum görülmemişken başlangıç değerine göre ayçiçek ve kanola yağında bir artış ardından bir düşüş gözlenmiştir. Bunun

nedeni olarak oluşan hidroperoksitlerin ısı etkisiyle parçalanması ve ikincil oksidasyon ürünlerin oluşmasının neden olduğu düşünölmektedir (19). Karakaya ve şimşek'in (20) yaptığı bir çalışmada fındık, mısır ve soya fasulyesi yağında yaptıkları kızartma işleminde kızartma süresi ile değişen peroksit değerleri elde edilmiştir. Mısır ve soya fasulyesi yağında elde edilen değerler kanola yağına yakın elde edilirken, fındık yağında ayçiçek yağına benzer sonuçlar gözlenmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada kızartma sonunda artan peroksit değerleri elde edildiği vurgulanmıştır, buda kızartma sonucu oluşan oksidasyon hakkında fikir vermektedir (21, 22). Fritözde yapılan kızartma işleminin sonunda elde edilen peroksit değerleri istatistiksel açıdan incelendiğinde yađ tipi ve kızartma sıcaklığının peroksit değeri üzerine etkili olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Fritözde ayçiçek yağı ile yapılan kızartmada ikili karşılaştırma yapıldığında ise 160°C 'de yapılan kızartma işleminde peroksit değeri artarken 3. kızartmada dūřuř olduğu görölmüş buda oluşan peroksitlerin parçalanmasından meydana geldiği görüşünü istatistiksel açıdan da desteklemektedir (izelge 2).

Mikrodalgada yapılan kızartma işleminden elde edilen numunelerin peroksit değerleri izelge 2'de verilmiştir. Ticari kızartmalık yağ kullanılan yapılan kızartma işleminde 600W güç değerinde fritözde yapılan kızartmaya göre daha düşük değerde peroksit sayısı tespit edilirken 900W uygulandığında fritöz kızartmasına yakın değerlere ulaşılmıştır. Mikrodalga fırın kullanılarak yapılan kızartma işleminin sonunda elde edilen peroksit değerleri istatistiksel açıdan incelendiğinde kullanılan yağ çeşidinin ve mikrodalga gücünün peroksit değeri üzerine etkili olduğu ve ayrıca kızartma yönteminin de peroksit değerini önemli düzeyde etkilediği belirlenmiştir ($P<0.05$). İkili değerlendirme yapıldığında ise ayçiçek yağı kullanılarak mikrodalga fırın ile yapılan kızartmada 900W güç değerinde 3. kızartma diğerlerinden farklı harflendirilmiştir. Bunun nedeni olarak ilk iki kızartmada yaklaşık değerler elde edilmesine karşın 3.kızartmada yüksek bir değer çıkması görölmektedir. Mikrodalga fırında yapılan kızartma işleminde fritözde yapılan kızartmaya göre daha düşük peroksit değerleri elde edilmiştir. Aynı sürede yapılan bu kızartma işleminin sonucunda daha düşük peroksit değerine ulaşılmasına mikrodalga fırında her iki güç seviyesinde de

ulaşılan yağ sıcaklığının fritözden daha düşük değerlerde kalmasının neden olduğu düşünölmektedir. Mikrodalgada kızartma üzerine yapılan bir çalışmada ticari kızartmalık yağ ve ayçiçek yağı peroksit değeri açısından karşılaştırılmış ve kızartmalık yağda daha düşük peroksit değeri elde edildiği vurgulanmıştır. Bu sonuç kızartmalık yağda doymuş yağ asitlerinin fazla olması ile açıklanmıştır (23).

Özgöl Soğurma

Ultraviyole spektrofotometrik bir analiz olan özgöl soğurma yağlarda oksidasyon belirlenmesinde bir parametre olarak kabul edilmektedir. Kızartmadan önce yağlarda yapılan analizlere göre özgöl soğurma değerleri izelge 2'deki gibi belirlenmiştir. K_{232} değeri konjuge dien oluşumunun göstergesi olarak kabul edilirken K_{270} değeri birincil ve ikincil oksidasyon ürünlerinin miktarları hakkında fikir vermektedir (24). Fritöz ile yapılan kızartmada ve mikrodalga fırın kullanılarak yapılan kızartmada K_{232} değeri ayçiçek yağında artarken kanola ve kızartmalık yağda dūřuř göstermiştir (izelge 2). Ayçiçek yağı kullanılarak fritözde yapılan kızartma için yapılan ikili karşılaştırmada 160°C 'de oluşan K_{232} ve K_{270} değerlerinde 3.kızartma değerlerinin ilk iki kızartmadan farklı sonuçlara ulaştığı saptanmıştır. Bu farklılık 190°C 'de ayçiçek yağında yapılan 3.kızartmada sadece K_{270} değerinde elde edilmiştir. Oluřan konjuge dien ve trienler ısının etkisiyle zamanla peroksitlere dönüşmesinden dolayı azalmaya uğradığı düşünölmektedir. İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde ise fritözde ve mikrodalgada kızartma işleminde kızartma yönteminin ve yađ tipinin K_{232} değeri üzerine etkili olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). K_{270} değeri incelendiğinde ise kızartma yağında ve ayçiçek yağında önce bir artış ve ardından dūřuř gözlenmiştir, kanola yağında ise bir dūřuř kaydedilmiştir. Bunun yanında K_{270} değeri üzerine sadece yađ tipi etkili olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Konvansiyonel ısıtma ile yapılan bir çalışmada yağda oluşan oksidasyon ürünleri olan konjuge dien ve trien miktarlarında artış kaydedilmiş ve bu ürünlerin yağlarda acılaşmaya neden olduğu bildirilmiştir (24, 25).

Mikrodalgada yapılan kızartma işleminde elde edilen yağlardan ölçölen K_{232} ve K_{270} değerleri izelge 2'de verilmiştir. Kızartmalık yağ ve kanola

Çizelge 2. Kullanılmamış yağlarda ve kızartmadan sonra yağlarda peroksit değerleri ve özgül soğurma değerleri (K_{232} ve K_{270})
Table 2. Peroxide and specific extinction values of oils unused and after frying (K_{232} and K_{270})

Yağ Tipi Oil type	Sıcaklık (°C) veya Güç (W) Temp. or Power	Kızartma Sırası Frying order	Peroksit değeri (meq O ₂ /kg) Peroxide value	K_{232}	K_{270}
Ayçiçek yağı Sunflower oil	Kullanılmamış yağ/Unused	-	5.995±0.21 ^{b,c}	2.072 ± 0.023 ^{a,b,c}	0.810 ± 0.009 ^{b,c}
	160°C	1.	7.599±0.10 ^{d,e}	1.676±0.03 ^{a,b}	0.699±0.01 ^b
	160°C	2.	8.652±0.26 ^{e,f}	1.805±0.09 ^{a,b,c}	0.797±0.05 ^{b,c}
	160°C	3.	3.221±0.01 ^a	1.327±0.03 ^a	0.526±0.03 ^a
	190°C	1.	6.957±0.32 ^{c,d}	1.915±0.12 ^{a,b,c}	0.814±0.03 ^{b,c}
	190°C	2.	9.305±0.07 ^f	1.919±0.13 ^{a,b,c}	0.786±0.04 ^{b,c}
	190°C	3.	5.756±0.26 ^{b,c}	2.566±0.11 ^{a,b,c}	1.048±0.07 ^e
	600W	1.	9.649±0.13 ^f	2.023±0.14 ^{a,b,c}	0.871±0.06 ^{c,d}
	600W	2.	5.157±0.15 ^b	2.848±0.56 ^c	0.965±0.02 ^{d,e}
	600W	3.	9.424±0.42 ^f	2.263±0.26 ^{a,b,c}	1.009±0.01 ^e
	900W	1.	5.207±0.26 ^b	2.237±0.08 ^{a,b,c}	1.031±0.03 ^e
	900W	2.	5.649±0.24 ^b	2.167±0.13 ^{a,b,c}	1.014±0.02 ^e
	900W	3.	9.493±0.14 ^f	1.912±0.06 ^{a,b,c}	0.872±0.02 ^{c,d}
Kanola yağı Canola oil	Kullanılmamış yağ/Unused	-	1.791±0.15 ^a	1.412 ± 0.045 ^{a,b}	0.300 ± 0.005 ^{a,b,c}
	160°C	1.	8.575±0.17 ^f	1.561±0.13 ^{a,b}	0.406±0.03 ^c
	160°C	2.	5.905±0.53 ^{d,e}	1.300±0.07 ^{a,b}	0.29±0.02 ^{a,b}
	160°C	3.	5.105±0.08 ^{c,d}	1.344±0.07 ^{a,b}	0.302±0.02 ^{a,b,c}
	190°C	1.	3.852±0.29 ^{b,c}	1.231±0.11 ^{a,b}	0.28±0.03 ^{a,b}
	190°C	2.	7.691±0.77 ^f	1.177±0.12 ^{a,b}	0.248±0.03 ^a
	190°C	3.	5.376±0.16 ^{c,d}	1.309±0.12 ^{a,b}	0.287±0.04 ^{a,b}
	600W	1.	9.344±0.47 ^f	1.308±0.05 ^{a,b}	0.314±0.01 ^{a,b,c}
	600W	2.	5.275±0.08 ^{c,d}	1.507±0.06 ^{a,b}	0.348±0.01 ^{a,b,c}
	600W	3.	7.365±0.08 ^{e,f}	1.365±0.06 ^{a,b}	0.312±0.01 ^{a,b,c}
	900W	1.	2.846±0.09 ^{a,b}	1.642±0.18 ^b	0.388±0.01 ^{b,c}
	900W	2.	5.345±0.04 ^{c,d}	1.557±0.16 ^{a,b}	0.357±0.01 ^{a,b,c}
	900W	3.	4.63±0.06 ^{c,d}	0.980±0.16 ^a	0.269±0.04 ^a
Ticari kızartma yağı Commercial frying oil	Kullanılmamış yağ / Unused	-	2.131±0.24 ^a	0.846 ± 0.012 ^{b,c,d}	0.222 ± 0.001 ^{a,b,c}
	160°C	1.	7.07±0.28 ^f	1.125±0.08 ^d	0.279±0.02 ^{c,d}
	160°C	2.	6.747±0.58 ^f	1.085±0.04 ^{c,d}	0.28±0.01 ^{c,d}
	160°C	3.	5.166±0.07 ^e	1.082±0.04 ^{c,d}	0.335±0.01 ^d
	190°C	1.	6.856±0.12 ^f	1.115±0.08 ^d	0.265±0.01 ^{b,c}
	190°C	2.	4.954±0.04 ^e	0.952±0.01 ^{b,c,d}	0.255±0.06 ^{b,c}
	190°C	3.	4.165±0.42 ^{c,d,e}	0.857±0.02 ^{b,c,d}	0.267±0.07 ^{b,c}
	600W	1.	2.878±0.05 ^{a,b,c}	0.848±0.04 ^{b,c,d}	0.225±0.03 ^{a,b,c}
	600W	2.	2.538±0.03 ^{a,b}	0.915±0.04 ^{b,c,d}	0.223±0.01 ^{a,b,c}
	600W	3.	4.738±0.19 ^{d,e}	0.413±0.05 ^a	0.172±0.02 ^a
	900W	1.	7.151±0.17 ^f	0.733±0.05 ^b	0.181±0.01 ^a
	900W	2.	6.73±0.11 ^f	0.775±0.02 ^{b,c}	0.187±0.01 ^a
	900W	3.	3.573±0.25 ^{b,c,d}	0.962±0.13 ^{b,c,d}	0.207±0.01 ^{a,b}

Tabloda uygulanan harflendirmede her yağ tipi kendi içinde farklı kızartma yöntemlerinin, kızartmada uygulanan sıcaklık-güç parametrelerinin ve kızartma sırasının peroksit sayısı, K_{232} ve K_{270} değerleri üzerine etkisi incelenmiştir.

Effects of different frying methods, temperature and power parameters applied on frying, order of frying were investigated on peroxide number, K_{232} and K_{270} values within each type of oil at lettering applied in the table.

yağı kullanıldığında mikrodalga kızartma yöntemiyle daha düşük değerler elde edildiği görülürken ayçiçek yağında her iki kızartma yönteminde de yakın sonuçlar elde edilmiştir. K_{270} değeri mikrodalga kızartmada incelendiğinde ise kanola yağında ve ayçiçek yağında önce bir artış ve ardından düşüş gözlenmiştir, kızartma yağında ise bir azalma kaydedilmiştir. Kanola yağı kullanıldığında

mikrodalgada yapılan kızartmada 900W güç değerinde 3. kızartmada ölçülen konjuge dien ve trienin ilk iki değerden farklı olması grup içi yapılan ikili analiz sonucu elde edilmiştir (Çizelge 2). Ticari kızartmalık yağda da mikrodalga kızartmasında her iki güç seviyesinde K_{232} ve K_{270} değerleri 3.kızartmalarda diğerlerinden farklı olduğu kaydedilmiştir. Kaydedilen özgül soğurma

değerleri peroksit değeri ile uyumluluk göstermekte ve oksidasyon hakkında fikir vermektedir. Yapılan çalışmalarda kızartma sonrası dş olmasđ literatürde bulunan sonuçlara paralel bir durumu yansđtmaktadır (26). Mikrodalga fırında kızartma alışan Malheiro ve arkadaşları (27) zeytinyağında kızartma zamanđ ile özgül soğurma parametrelerinde bir artđř kaydetmişlerdir. Rodrigues ve arkadaşlarının da mikrodalga kullanarak ısıtma işlemi uyguladıkları bitkisel yağlar üzerine yaptıkları çalışmada zamanla K_{232} ve K_{270} değerlerinde artđř elde etmişler ve oksidasyon kaynaklı olduğunu vurgulamışlardır (28).

Teşekkür

Bu alışma Niğe Üniversitesi FEB 2014-32-BAGEP numaralı proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Gamble MH, Rice P, Selman JD. 1987. Relationship between oil uptake and moisture loss during frying potato slices from CV record UK tubers. *Int J Food Sci Tech*, 22 (3), 233–241.
2. Saguy IS, Pinthus EJ. 1995. Oil uptake during deep-fat frying-factors and mechanism. *Food Tech*, 49 (4), 142–145.
3. Southern CR, Chen XD, Farid MM, Howard B, Eyres L. 2000. Determining internal oil uptake and water content of fried thin potato crisps. *Food and Bioproducts Process*, 78 (C3), 119-125.
4. Saguy IS, Dana D. 2003. Integrated approach to deep fat frying: engineering, nutrition, health and consumer aspects. *J Food Eng*, 56(2), 143-152.
5. Yamsaengsung R, Moreira RG. 2002. Modelling the transport phenomena and structural changes during deep fat frying. Part II: model solution and validation. *J Food Eng*, 53, 11–25.
6. Sanchez-Gimeno AC, Negueruela AI, Benito M, Vercet A, Oriá R. 2008. Some physical changes in Bajo Aragon extra virgin olive oil during the frying process. *Food Chem*, 110, 654-658.
7. Xu XQ. 2000. A new spectrophotometric method for rapid assessment of deep frying oil quality. *J Am Oil Chem Soc*, 77, 1083-1086.
8. Farhoosh R, Moosavi SMR. 2008. Carbonyl value in monitoring of the quality of used frying oils. *Anal Chim Acta*, 617, 18-21
9. Casal S, Malheiro R, Sendas A, Oliveira BPP, Pereira JA. 2010. Olive oil stability under deep fat frying conditions. *Food Chem Toxicol*, 48, 2972-2979.
10. Gertz C. 2000. Chemical and physical parameters as quality indicators of used frying fats. *Eur J Food Sci Tech*, 102, 566-572
11. Sahin S, Sumnu G, Oztop MH. 2007. Effect of osmotic pretreatment and microwave frying on acrylamide formation in potato strips. *J Sci Food and Agric*, 87(15), 2830-2836.
12. Abbas A, Mesran HB, Abd Latip R, Hidayu ON, Nik Mahmood NA. 2016. Effect of microwave heating with different exposure times on the degradation of corn oil. *Int Food Res J*, 23(2), 842-848.
13. Wray D, Ramaswamy SR. 2015. Novel concepts in microwave drying of foods. *Drying Tech: An Int J*, 33(7), ISSN: 0737-3937 (Print) 1532-2300 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/ldrt20>
14. Barutcu I, Sahin S, Sumnu G. 2009. Acrylamide formation in different batter formulations during microwave frying. *LWT-Food Sci Tech*, 42, 17-22.
15. Oztop MH, Sahin S, Sumnu G. 2007. Optimization of microwave frying of potato slices bi using Taguchi Technique. *J Food Eng*, 79, 83-91.
16. AOCS 2003. American Oil Chemists' Society Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society AOCS Press, Champaign.
17. Anonim 1987. Standard Methods for Analysis of Oils, Fats and Derivatives, 7th edn., Blackwell Scientific, Oxford, IUPAC Method 2.301.
18. TGK 2010. Türk Gıda Kodeksi. Bitki Adđ ile Anılan Yemeklik Yağlar Tebliği.
19. Bester E, Butinar B, Bucar-Miklavcic M, Golob T. 2008. Chemical changes in extra virgin olive oils from Slovenian Istra after thermal treatment. *Food Chem*, 108, 446-454
20. Karakaya S, şimşek ř. 2011. Changes in Total Polar Compounds, Peroxide Value, Total Phenols and Antioxidant Activity of Various Oils Used in Deep Fat Frying. *J Am Chem Soc*, 88, 1361-1366.
21. Xu XQ. 2000. A new spectrophotometric method for rapid assessment of deep frying oil quality. *J Am Chem Soc*, 77, 1083-1086.

22. Farhoosh R, Moosavi SMR (2008) Carbonyl value in monitoring of the quality of used frying oils. *Anal Chim Acta*, 617, 18-21.
23. Gharachorloo M, Ghavami M, Mahdiani M, Azizinezhad R. 2010. The effects of microwave frying on Pphysicochemical properties of frying and sunflower oils. *J Am Oil Chem Soc*, 87, 355-360.
24. Poiana AM. 2012. Enhancing oxidative stability of sunflower oil during convective and microwave heating using grape seed extract. *Int J Mol Sci*, 13, 9240-9259.
25. Che-Man YB, Liu JL, Jamilah B, Rahman RA. 1999. Quality changes of deodorized (RBD) palm olein oil, soybean oil and their blends durind deep fat frying. *J Food Lipids*, 6, 181-193.
26. Casal S, Malheiro R, Sendas A, Oliveira BPP, Pereira JA. 2010. Olive oil stability under deep fat frying conditions. *Food Chem Toxicol*, 48, 2972-2979.
27. Malheiro R, Oliveira I, Vilas-Boas M, Falcao S, Bento A, Pereira A. 2009. Effect of microwave heating with different exposure times on physical and chemical parameters of olive oil. *Food Chem Toxicol*, 47, 92-97.
28. Rodrigues N, Malheiro R, Casal S, Asensio SC, Bento A, Pereira JA. 2012. Influence of spike levander (*Lavandula Latifolia* Med.) essential oil in the quality, stability and composition of soybean oil during microwave heating. *Food Chem Toxicol*, 50, 2894-2901.

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.

FERMENTE GIDALARDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN TANNAZ AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Merih Kıvanç*¹, Onur Temel²

¹Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Eskişehir, Türkiye

²Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye

Geliş tarihi / Received: 18.03.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 02.04.2016

Kabul tarihi / Accepted: 14.04.2016

Özet

Bu çalışmada, daha önceki çalışmalarda fermente ürünlerden izole edilen 10 izolatın DuPont Qualicon RiboPrinter® sistem ile tanımlamaları yapılmıştır. Spektrofotometrik ve görsel okuma metodu ile tannaz aktivitesi belirlenmiştir. En yüksek aktiviteyi *Lactobacillus curvatus* P3X izolatu göstermiştir. *L. curvatus* P3X'e ait enzimin yaklaşık molekül ağırlığı SDS-PAGE yöntemi ile belirlenmiştir. Yüksek tannaz aktivitesi gösteren *L. curvatus* P3X'in tannaz aktivitesi üzerine farklı sıcaklık, pH, substrat yoğunluğu, tannik asit konsantrasyonu ve çeşitli minerallerin etkisi araştırılmıştır. Yapılan testler sonucunda optimum sıcaklık 37°C, pH 5.0 substrat olarak kullanılan metil gallat konsantrasyonu 7 mM, tannik asit konsantrasyonu ise 1.75 mM olarak bulunmuştur. Laktik asit bakterilerinin tannaz aktivitesi Hg⁺² ve Mg⁺² iyonlarının varlığında düşerken, Ca⁺² ve Zn⁺²'nin tannaz aktivitesi üzerine etki yapmadığı görülmüştür. Ayrıca yüzey aktif madde (Tween 80), şelat (EDTA), inhibitör (DMSO) ve yapıyı bozan maddenin de (Üre) tannaz aktivitesine tesir etmediği saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Tannaz, laktik asit bakterisi, metil galat

DETERMINATION OF TANNASE ACTIVITY OF THE LACTIC ACID BACTERIA THAT ISOLATED FROM FERMENTED PRODUCTS

Abstract

In this study, 10 isolates obtained from fermented products in previous studies were identified by DuPont Qualicon RiboPrinter® system. Tannase activity was determined by spectrophotometric and visual reading methods. *Lactobacillus curvatus* P3X showed the highest tannase activity. Approximate molecular weight of the enzyme was determined by SDS- PAGE method. The effect of different temperatures, pH values, substrate concentrations, and the concentrations of tannic acid and various minerals, on activity of tannase of *L. curvatus* P3X, of which showed high tannase activity, were investigated. As a result of tests, the optimum temperature was found as 37°C, optimum pH was found as 5.0, methyl gallate concentration that was used as the substrate was found as 7 mM and tannic acid concentration was found as 1.75 mM. Tannase activity of lactic acid bacteria decreased in the presence of Hg⁺² and Mg⁺² ions, Ca⁺² and Zn⁺² ions did not show any effect on tannase activity. In addition, it was detected that surfactant (Tween 80), chelate (EDTA), inhibitor (DMSO), and denaturing agents (urea) had no effect on tannase activity.

Keywords: Tannase, lactic acid bacteria, methyl gallate

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ mkivanc@anadolu.edu.tr,

☎ (+90) 222 335 0580/4725,

☎ (+90) 222 320 4910

GİRİŞ

Laktik asit bakterileri ile fermente gıdalar, çok eski zamanlardan beri gıdaların korunmasında oynadığı temel rol ve insan gıdalarında besinsel, duyuşsal ve sağlık 6zelliklerine sağladığı katkılar nedeniyle geniş bir kullanım alanı bulmuştur. G6n6m6zde probiyotik 6zellik g6stermeleri nedeniyle laktik asit bakterileri 6zerinde 6nemle durulan bakteri grubu olup sağlık a6ısından yararlı olarak kabul edilmektedir. Bu bakterilerin direkt kendisi kullanılarak hem gıda da istenilen aroma kazanılmaya 6alışılırken diğer taraftan da sağlıklı bir 6r6n elde edilme hedeflenmektedir.

Tanenler bitkisel 6r6nlerin yapraklarında, tohumlarında ve k6klerinde yaygın olarak bulunmaktadır. 6ay, şarap ve meyve suları gibi bir6ok i6eekte de bu fenolik bileşikler bulunmaktadır. Tanenler beslenmede istenmeyen maddelerdir. 66nk6 sindirim enzimlerini inhibe edebilir. Vitamin ve minerallerin kullanımını etkileyebilirler. Ayrıca kanser oluşumu ile ilişkili olduğu ve hepatoksik olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle sağlık a6ısından riskli bileşiklerdir (1). Sindirim sisteminde bulunan bazı mikroorganizmalar tanenleri par6alayarak zararsız bileşenleri oluşturabilmektedir. Osawa ve ark.(2) insan dışkısından ve fermente gıdalardan izole edilen laktobasillus t6rlerinin tannaz aktivitesine sahip olduklarını g6stermişlerdir. Laktobasillus t6rleri, tanenleri hidrolize etmesi ve h6crede tutunmayı azaltmasından dolayı gıdada var olan tanenleri par6alamada kullanılabilir. Tanenleri gallik asit ve glukoza par6alayan enzim karboksil ester hidrolazlar ailesinde yer alan (E.C. 3.1.1.20. tanen a6ıl hidrolaz) tannazdır. Tannaz hidrolize olabilen tanenlerdeki ester ve depsiğ bağlarını hidrolize ederek gallik asit ve glukoz ortaya 6ıkarmaktadır. *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus foetidus*, *Penicillium chrysogenum*, *Paecilomyces variotii*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter* sp., *Bacillus cereus* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi bir6ok mikroorganizma tannazı 6retme yeteneğine sahiptir (3-6). Laktik asit bakterileri tannaz enzimi 6alışmalarında 6ok fazla kullanılmamıştır. Ancak sahip olduğu ekolojik avantajla bu alanda potansiyel teşkil etmektedir (2). Yapılan 6alışmada fermente sebzelerden izole edilen laktik asit bakterileri mikrobiyel tannaz aktivite yetenekleri a6ısından incelenerek enzim aktivitesi 6zerine etkili fakt6rler belirlenmeye 6alışılmıştır.

MATERYAL VE Y6NTEMLER

Test Mikroorganizmaları

6alışmada, Anadolu 6niversitesi Fen Fak6ltesi, Biyoloji B6l6m6 Mikrobiyoloji laboratuvarında daha 6nceki 6alışmalarda fermente 6r6nlerden izole edilen 10 laktik asit bakteri izolatu kullanılmıştır (6izelge 1).

Y6NTEMLER

Laktik asit bakteri izolatlarının otomatik riboprinter® sistem ile tanımlanması

Riboprinter sistemi 16S rRNA'yı temel alarak mikroorganizmaların t6r tayinlerini ger6ekleştiren molek6ler identifikasyon sistemidir. Riboprinter sistemi ile tanımlanacak bakteriye ait 16 S rRNA'nın EcoRI enzimi ile kesilmesi ve daha sonra jelde koşturulması ve oluşan bant b6y6klerinin kullanılan marker ile kıyaslanarak sistemde bulunan k6t6phaneki veriler ile benzerliğine g6re bakteri isimlendirilmektedir. Benzerlik oranı % 85 in 6zerinde olduğunda sonuca gidilmektedir. Identifikasyon işlemleri spesifik kitler aracılığıyla, kullanıcı talimatları doğrultusunda ger6ekleştirilmiştir.

Tannaz ve gallat dekarboksilaz aktivitesinin g6rsel olarak belirlenmesi

İzolatlar MRS agara ekilerek et6vde 37°C'de 24 saat ink6be edilmiştir. MRS agarda gelişen kolonilerden alınarak i6erisinde 1 mL substrat bulunan (pH 5; 33 mmol/L NaH₂PO₄ ve 20 mmol/L metil gallat i6eren) t6pte McFarland 3 (9x10⁸ h6cre/mL) olacak şekilde s6spanse edilmiştir. T6pler 37°C 24 saat ink6be edilmiştir. İnk6basyondan sonra t6plere eşit miktarda doymuş NaHCO₃ sol6syonu (pH 8.6) ilave edilerek 1 saat oda sıcaklığında bırakılmıştır. Bu s6re sonunda kahverengiden yeşile d6nen t6pler tannaz pozitif olarak kaydedilmiştir (7).

Gallat dekarboksilaz aktivitesini belirlemek i6in gecelik k6lt6rden 50 µL alınarak 10 mM gallik asit i6eren 10 ml MRS broth i6erisine aktarılmış ve t6pler 37°C 3 g6n ink6be edilmiştir. İnk6basyondan sonra doymuş NaHCO₃ sol6syonu (pH 8.6) ile eşit miktarda karıştırılarak 37°C'de 1 saat ink6be edilmiştir. Besiyeri renginin kahverengiden a6ık bir sarıya d6n6şmesi dekarboksilaz aktivitesi a6ısından pozitif olarak değerlendirilmiştir (2).

Tannaz aktivitesi g6steren taze k6lt6rlerden 10 µL alınarak % 2 tannik asit ve % 0.5 Yeast extract

ilaveli Brain Heart Infusion agara ekilmiştir. Petriler 37 °C' de 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra koloniler etrafında açık bir zon oluşumu tannaz aktivitesi açısından pozitif olarak kabul edilmiştir (8).

Tannaz aktivitesinin spektrofotometre ile belirlenmesi

Laktik asit bakterilerinin tannaz enzimi aktivitesi Nishitani ve Osawa (9) metoduna göre belirlenmiştir. Elisa petrisine hazırlanan süpernatanttan her bir kuyucuğa 100 µL olacak şekilde dağıtılarak mikropalak okuyucu yardımıyla 450 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır. Okunan değerler ile *Aspergillus ficuum*'dan elde edilen standart ticari tannaz enzimi kullanılarak hazırlanan standart eğriden yararlanılarak tannaz aktivitesi belirlenmiştir.

İnce tabaka kromatografisi ile oluşan ürünlerin belirlenmesi

Besiyerinde tannik asit, gallik asit ve piragallol oluşumu Kwon ve ark. (10)' a göre ince tabaka kromatografisi (TLC) metodu ile belirlenmiştir.

Kültür şartlarının tannaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

En yüksek tannaz aktivitesi gösteren *L. curvatus* P3X ile çalışmalara devam edilmiştir. P3X izolatu MRS broth içerisinde geliştirildikten sonra 8000 g de 20 dakika santrifüj edilmiş ve buradan elde edilen süpernatant çalışmalarda kullanılmıştır. *L. curvatus* P3X den elde edilen hücresiz süpernatanttan 50 µL, 5 mL 5 mM metil gallat içeren 33 mM NaH₂PO₄ (pH 5.0) tamponuna ilave edilerek farklı sıcaklıklarda (4, 20, 25, 30, 37, 45, 55 °C) 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübe edilen bu karışımdan 100 µL alınarak üzerine eşit hacimde doymuş NaHCO₃ çözeltisi eklenmiştir. Bu karışım daha sonra farklı sıcaklıklarda 2 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra santrifüj edilerek 96 kuyucuklu Eliza petrisine aktarılmış ve 450 nm' de okuma yapılarak değerlendirilmiştir.

Tannaz aktivitesinin optimum pH sını belirlemek için hücresiz filtrattan 50 µL, 5 mL 5 mM metil gallat içeren 33 mM NaH₂PO₄ farklı pH lardaki (3; 4; 5; 6; 7; 8; 9) tampona ilave edilerek 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra her bir karışımdan ayrı ayrı 100 µL alınarak eşdeğer hacimde doymuş NaHCO₃ ile karıştırılarak 37°C'de 2 saat inkübe edilmiş ve daha sonra 450 nm de okutularak değerlendirilmiştir.

Hücresiz süpernatandan 50 µL, 5 ml farklı tannik asit konsantrasyonu (0.4375; 0.875; 1.75; 3.5 ve 7 mM)

içeren fosfat tamponu (33 mM pH 5.0) içerisine eklenmiş ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra bu karışımın 100 µL alınarak eşit hacimde doymuş NaHCO₃ solüsyonu ilave edilerek 37°C'de 2 saat tekrar inkübe edilmesinin ardından santrifüj edilmiştir. Daha sonra bu karışımdan 100 µL alınarak Eliza petrisine aktarılmıştır ve 450 nm de spektrofotometre ile okunmuştur.

Çeşitli maddelerinin tannaz aktivitesi üzerine etkisi

Magnezyum klorür (MgCl₂), potasyum klorür (KCl), çinko klorür (ZnCl₂), civa-II-klorür (HgCl₂), kalsiyum klorür (CaCl₂) gibi metal iyonları, tween 80 (yüzey aktif madde), üre (yapıyı bozan madde), şelat edilen diamin tetra asetik asit (EDTA) ve inhibitör dimetil sülfoksit (DMSO) ayrı ayrı olarak 5 mL' lik fosfat tamponunda (33 mM, pH 5.0) 1mM olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra *L. curvatus* P3X ile hazırlanan süpernatantdan 50µL 5 mL' lik bu karışıma ilave edilerek 37° C 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübe işleminden sonra karışım farklı tüpe alınarak üzerine eşit hacimde olacak şekilde NaHCO₃ solüsyonu ilave edilerek 37°C de 2 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübe edildikten sonra santrifüj yapılarak süpernatanttan 100 µL 96 kuyucuklu elisa petrisine aktarılmış ve 450 nm dalga boyunda okuması yapılarak değerlendirilmiştir.

Enzim molekül ağırlığının belirlenmesi

Tannaz enziminin moleküler büyüklüğü Rodriguez ve ark. (11) göre SDS-PAGE yöntemi ile incelenmiştir. % 12.5 akrilamid/bisakrilamid derişimine sahip ayırma jelinde 1000 ve 1200 mU derişimlerine sahip tannaz enzimi (Sigma, 42395) ile kıyaslanmıştır. Elde edilen protein profilinin boyut analizi geniş aralıklı protein marker (Sigma, M4038) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

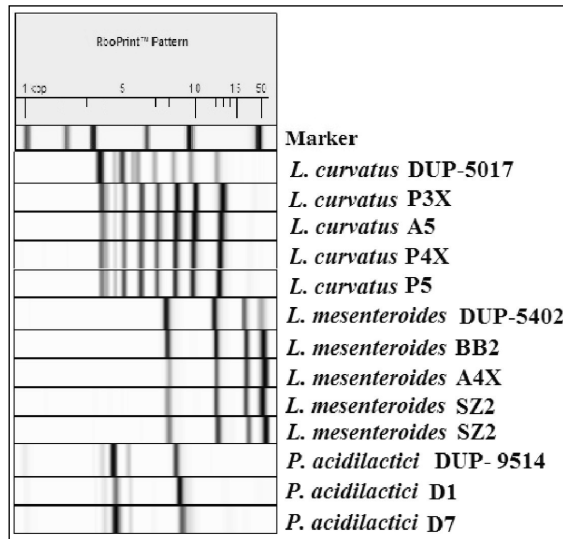
Protein miktarının belirlenmesi

Protein derişimi bilinmeyen çözelti Bradford reaktifi ile muamele edilerek, köre karşı hazırlanan çözeltinin absorbansı oda sıcaklığında spektrofotometrede okunmuştur. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış standart protein çözeltileri (BSA) de reaktif ile muamele edilerek absorbans değerleri ölçülmüş ve ölçüm sonuçları kullanılarak absorbansa karşı derişim grafiği çizilmiştir. Derişimi bilinmeyen çözeltinin protein miktarı bu grafikten hesaplanmıştır. 5 µL protein standart çözeltisi 250 µl Bradford solüsyonu

içeren tüp içine aktarılmıştır. Rengin stabil hale gelmesi için çok kuyucuklu petriye dağıtılarak 20 dak oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonra plak spektrofotometrede 595 nm de okutularak protein miktarı hesaplanmıştır.

BULGULAR

Fermente sebzelerden izole edilen on laktik asit bakterisi otomatik riboprinter ile *Lactobacillus curvatus* (4 izolat), *Leuconostoc mesenteroides* (4 izolat) ve *Pediococcus acidilactici* (2 izolat) olarak tanımlanmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. Laktik asit bakterilerinin ribotip profilleri (Standartlar DUP numaraları ile gösterildi)

Figure 1. Ribotyping profiles of lactic acid bacteria (Standards were shown with DUP numbers)

Tannaz aktivitesi açısından görsel olarak taranan izolatların tannaz ve gallat dekarboksilaz aktivitesi Çizelge 1'de verilmiştir. İzolatların hepsinin az veya çok tannaz aktivitesine sahip olduğu görülmüştür.

Çizelge 1. Laktik asit bakterilerinin görsel metot ile belirlenen tannaz ve gallat dekarboksilaz aktivitesi

Table 1. Tannase and gallat decarboxylase activity of Lactic acid bacteria that is determined by visual method

Fermente gıda Fermented food	İzolat Isolate	Tanımlanan tür Identified species	Tannaz aktivitesi Tannase activity	Gallat dekarboksilaz aktivitesi Gallate decarboxylase activity
Pancar turşusu Pickled beetroots	P3X	<i>L. curvatus</i>	++	-
Pancar turşusu Pickled beetroots	P4X	<i>L. curvatus</i>	++	-
Pancar turşusu Pickled beetroots	P5	<i>L. curvatus</i>	+	-
Acur turşusu Pickled cucurbita	A5	<i>L. curvatus</i>	+	+
Biber turşusu Pickled pepper	BB2	<i>L. mesenteroides</i>	+	-
Siyah zeytin Black olive	SZ2	<i>L. mesenteroides</i>	+	-
Siyah zeytin Black olive	SZ6	<i>L. mesenteroides</i>	+	-
Acur turşusu Pickled cucurbita	A4X	<i>L. mesenteroides</i>	+	-
Domates turşusu Pickled tomato	D1	<i>P. acidilactici</i>	++	-
Domates turşusu Pickled tomato	D7	<i>P. acidilactici</i>	+	-

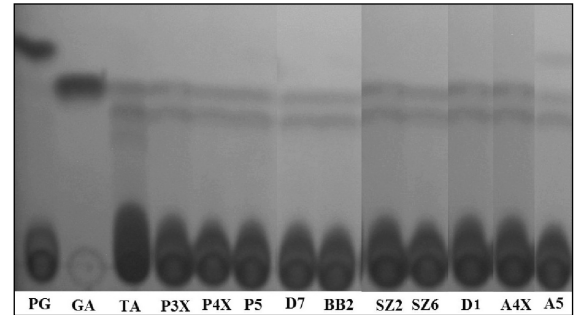
+, Düşük aktivite, ++, orta derecede aktivite, +++, Yüksek aktivite

+, Low activity, ++, medium activity, +++, high activity

İzolatların tannaz aktivitesi katı besiyerinde de doğrulanmıştır. Aktivite açısından görsel olarak taranan izolatlardan *L. curvatus* P3X yüksek aktivite göstermiştir. Gallat dekarboksilaz aktivitesi ise *L. curvatus* A5 hariç diğer izolatlarda negatif olarak bulunmuştur.

İzolatların spesifik tannaz aktivitesi optimum koşullarda birim olarak 1 unit, tannazın dakikada 1 µmol tannik asidi hidrolize etmesi olarak hesaplanarak Çizelge 2'de gösterilmiştir. Laktik asit bakterileri 0.56-1.07 U/mL değerleri arasında aktivite göstermiştir.

Tannaz hidrolize olabilen tanenlerdeki ester ve depsid bağlarını hidrolize ederek gallik asit ve glukoz ortaya çıkarmaktadır. Tannazın katalizlediği reaksiyonlarda tannik asit, metilgallat, n-propilgallat, etilgallat ve izoamilgallat gibi hidrolize olabilen tanenler gallik asit ve glukozla hidrolize olmaktadır. Oluşan ürünler TLC ile tanımlanmaya çalışılmıştır. İzolatların hepsinde gallik asit oluştuğu görülmüştür (Şekil 2).



Şekil 2. TLC de reaksiyon ürünleri (PG: Pirogallol, GA: Gallik asit, TA: Tannik asit)

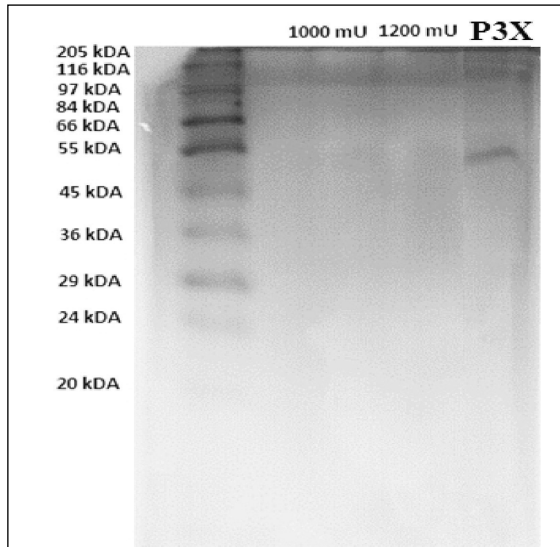
Figure 2. Demonstration of reaction products by TLC (PG: pyrogallol, GA: gallic acid, TA: tannic acid)

Çalışmamızda maksimum aktivite gösteren *L. curvatus* P3X suşuna ait SDS-PAGE jel görüntüsü

Çizelge 2. Laktik asit bakterilerinin tannaz aktivitesi
Tablo 2. Tannase activity of lactic acid bacteria

İzolatlar <i>Isolates</i>	Koloni sayımı (kob/mL) <i>Bacteria count (cfu/mL)</i>	Spesifik tannaz aktivitesi <i>Specific tannase activity</i>		
		U/10 ⁷ kob	U/mg Protein	
P3X	<i>L. curvatus</i>	3.1x10 ⁷	1.07	7.78
P4X	<i>L. curvatus</i>	2.5x10 ⁷	0.78	1.96
P5	<i>L. curvatus</i>	3.1x10 ⁷	0.56	2.04
A5	<i>L. curvatus</i>	1.7x10 ⁷	0.58	2.22
BB2	<i>L. mesenteroides</i>	2.3x10 ⁷	0.81	3.40
SZ2	<i>L. mesenteroides</i>	2.6x10 ⁷	0.72	5.16
SZ6	<i>L. mesenteroides</i>	2.2x10 ⁷	0.63	2.69
A4X	<i>L. mesenteroides</i>	2.6x10 ⁷	0.65	2.22
D1	<i>P. acidilactici</i>	1.5x10 ⁷	0.77	3.30
D7	<i>P. acidilactici</i>	2.1x10 ⁷	0.57	1.98

Şekil 3'te verilmiştir. Burada da görüleceği üzere izolatların hücresiz filtratlarında bulunan enzimin moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 55 kDA olarak bulunmuştur.



Şekil 3. *L. curvatus* P3X ait tannazın moleküler ağırlığı (1000mU ve 1200mU ticari tannaz enzimi)
Figure 3. The molecular weight of *L. curvatus* P3X tannase (1000 mU and 1200 mU of commercial tannase enzyme)

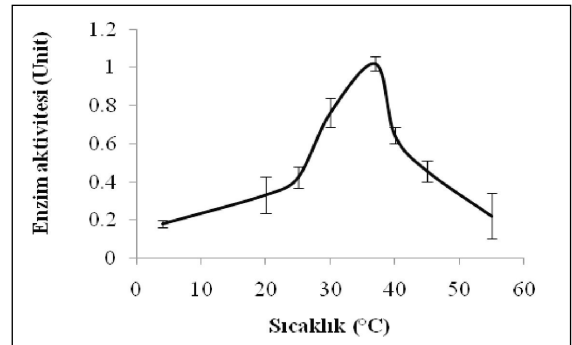
Tannaz Aktivitesi Üzerine Kültür Koşullarının Etkisi

L. curvatus P3X, izolatını maksimum tannaz aktivitesi 37°C'de elde edilmiştir (Şekil 4). Optimum pH 5 olarak bulunmuştur (Şekil 5).

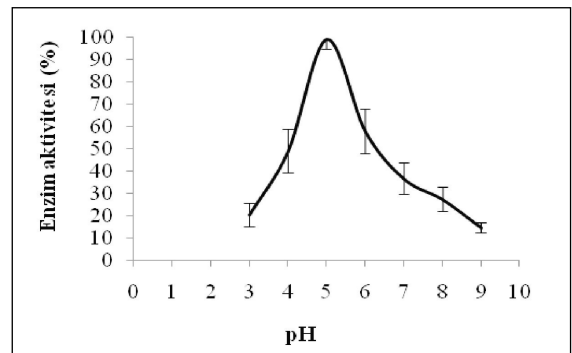
Çizelge 3. *L. curvatus* P3X tannaz aktivitesi üzerine çeşitli maddelerin etkisi
Tablo 3. Effect of different compounds on *L. curvatus* P3X tannase activity

İzolat <i>Isolate</i>	Tannaz aktivitesi (U/mL) <i>Tannase activity (U/mL)</i>									
	Kontrol <i>Control</i>	MgCl ₂	KCl	CaCl ₂	ZnCl ₂	HgCl ₂	Tween 80 Urea	Üre	EDTA	DMSO
P3X	1.07	0.94	1.10	1.08	1.07	0.33	1.07	1.07	1.07	1.07

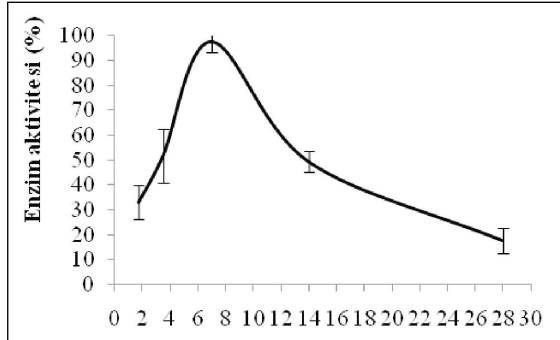
Substrat olarak metil gallat kullanıldığında en yüksek enzim aktivitesi 7 mM metil gallatta saptanmıştır (Şekil 6). Tannik asit kullanıldığında ise 1.75 mM tannik asitte en yüksek aktivite gözlenmiştir (Şekil 7).



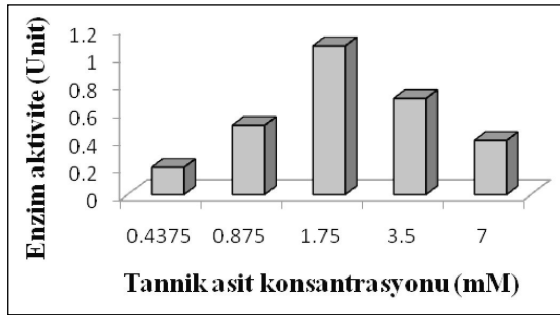
Şekil 4. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi
Figure 4. Effect of temperature on the enzyme activity



Şekil 5. pH'nin enzim aktivitesi üzerine etkisi
Figure 5. Effect of pH on the enzyme activity



Şekil 6. Metil gallat konsantrasyonunun tannaz aktivitesi üzerine etkisi
Figure 6. Effect of methylgallate concentration on the tannase activity



Şekil 7. Tannik asit konsantrasyonunun tannaz aktivitesine etkisi
Figure 7. Effect of tannic acid concentration on the tannase activity

Farklı Maddelerin Tannaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Çizelge 3'te tannaz aktivitesi üzerine metal iyonların etkisi gösterilmiştir. Hg^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının varlığında enzim aktivitesi düşerken Ca^{+2} ve Zn^{+2} laktik asit bakterisinin tannaz aktivitesi üzerine etki yapmadığı görülmüştür. Ayrıca bazı sürfaktan (Tween 80), şelat (EDTA), inhibitör (DMSO) ve yapıyı bozan maddenin de (Üre) tannaz aktivitesine tesir etmediği saptanmıştır.

TARTIŞMA

Lactobacillus, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Enterococcus* cinsleri ile tanınan laktik asit bakterileri günümüzde çeşitli fermente gıdaların üretiminde kullanılmalarından dolayı yoğun ilgi görmektedir (12). Çeşitli fermente ürünlerden elde edilen laktik asit bakterileri *L. mesenteroides*, *L. curvatus*, *P. acidilactici* olarak saptanmıştır. Literatürde *L. plantarum* ve *L. mesenteroides* ile tannaz enzim çalışmaları bulunmaktadır. Ancak *L. curvatus* ile tannaz enzim çalışmasına rastlanılmamıştır.

Test edilen bakterilerin hepsinin az veya çok tannaz aktivitesine sahip olduğu görsel metotlarla ve spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Benzer olarak yapılan çalışmalarda *L. plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* ve *Lactobacillus pentosus*'un tannaz aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (2, 10, 13). Vaquero ve ark. (7) ve Kostinek ve ark. (14) *L. mesenteroides*'in tannaz üreticisi olduğunu bildirmiştir. *L. curvatus* A5 hariç diğer izolatların hiç birinde gallat dekarboksilaz aktivitesi görülmemiştir. Osawa ve ark. (2) laktik asit bakterilerinin gallat dekarboksilaz aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca *Lactobacillus gasserii*'nin tannaz aktivitesi göstermediği ancak gallat dekarboksilaz aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar farklı ortamlardan izole ettikleri laktik asit bakterilerinin tannaz ve gallat dekarboksilaz aktivitesi göstermediğini de saptamışlar. Hidrolize olabilen tanenler glukoz ve polioller gruplarının esterlenmiş halleri olup en basitleri gallotanenlerdir. Gallotanenler glukozun poligallol esterleridir. Tannaz hidrolize olabilen tanenlerdeki ester ve depsid bağlarını hidrolize ederek gallik asit ve glukoz ortaya çıkarmaktadır. Tannazın katalizlediği reaksiyonlarda tannik asit, metilgallat gibi hidrolize olabilen tanenler gallik asit ve glukozu hidrolize olurlar. Oluşan gallik asit dekarboksilaz enzimi ile dekarboksile olarak pirogallol oluşmaktadır. Bazı mikroorganizmaların gallotanenleri parçaladığı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (15, 16). Test edilen laktik asit bakterilerinin hepsi ticari tannik asidi hidrolize ederek gallik asit oluşturmuştur. Benzer olarak son yıllarda Rodriguez ve ark.(11) *L. plantarum*'un hücre dışı ekstraktının tannik asidi biyodegrade ettiğini rapor etmişlerdir. Kwon ve ark.(10) *L. pentosus* LT7 suşunun çok yüksek (60.61 U/10⁹cfu) tannaz aktivitesine sahip olduğunu bildirmiştir. Bizim izolatlarımız arasında ise bu kadar yüksek aktivite gösteren olmamıştır. Ancak araştırmacıların *L. plantarum* için belirttikleri tannaz aktivite değerleri bizim bulgularımızla benzerlik göstermektedir. Aradaki farklılığın bir sebebi de hücre sayısındaki artışın farklı olması olabilir.

L. curvatus P3X hücre dışı filtratlarında bulunan enzimin SDS-PAGE yöntemi ile moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 55 kDa olarak bulunmuştur. Skene ve Brooker (17) yaptıkları çalışmada *Selemonasrum inantium*'dan üretilen tannazın moleküler ağırlığını yaklaşık olarak 59 kDa olarak belirlemişlerdir.

Maksimum tannaz aktivitesi pH 5'te görülmüştür. Rodriguez ve ark. (11) *L. plantarum* için optimum pH'yı 5 olarak bildirirken Ayed ve Hamdi (13) *L. plantarum* ile tannaz üretiminde optimum pH'yı 6 olarak bildirmişlerdir. Test edilen örneklerimizin enzim aktivitesi için optimum sıcaklık 37°C olarak belirlenmiştir. Sıcaklığın azalması ve yükselmesi enzim aktivitesini önemli ölçüde düşmeye neden olmuştur. Rodriguez ve ark. (11) *L. plantarum* için optimum sıcaklığı 30°C olarak bildirmişlerdir.

7mM gallat aktivitesinde en yüksek aktivite elde edilirken tannik asit için en yüksek aktivite 1.75mM da elde edilmiştir. Metil gallatın sübstrat olarak kullanıldığı birçok çalışmada *L. plantarum*'un tannaz aktivitesi incelenmiştir (7, 9, 18). Rodriguez ve ark. (11) tannaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini incelemişlerdir. Yapılan çalışmada en yüksek aktivite 6,25 mM metil gallat konsantrasyonunda elde edildiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızdakine benzer olarak, araştırmacılar substrat konsantrasyonundaki artış ile tannaz aktivitesinde azalma meydana geldiğini saptamışlardır. Metil gallat gibi küçük moleküllerin hücre içine kolayca geçtiğini ve takiben parçalanma ürünlerinin hücre dışına çıktığı rapor edilmiştir (11). Ancak araştırmacılar tannik asit gibi kompleks bileşiklerin hücre içine geçemediğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar 1mM tannik asidin *L. plantarum*'un hücre dışı ekstraktı ile hidrolize edilebildiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda tannik asit substrat olarak kullanıldığında tannaz aktivitesi saptanmıştır. Düşük substrat konsantrasyonlarında yüksek enzim aktivitesi elde edilmesi endüstride uygulama açısından yarar sağlayabilir.

Enzimler aktivatör olarak metal iyonlara ihtiyaç duyarlar. Metal iyonlar düşük konsantrasyonlarda enzimler için kofaktörler gibi davranırlarken yüksek konsantrasyonlar ise katalik aktivitenin düşmesine neden olabilirler. Çalışmamızda Hg⁺² ve Mg⁺² iyonlarının varlığında enzim aktivitesi düşerken Ca⁺² ve Zn⁺² laktik asit bakterilerinin tannaz aktivitesi üzerine etki yapmadığı görülmüştür. K⁺ ise tannaz aktivitesinde az da olsa bir artışa neden olmuştur. Benzer olarak Rodriguez ve ark (11) K⁺, Ca⁺² ve Zn⁺² *L. plantarum*'un tannaz aktivitesi üzerine etki yapmadığını, Hg⁺² ve Mg⁺² iyonlarının varlığında ise enzim aktivitesinin kısmen inaktive olduğunu bildirmişlerdir. Kar ve ark. (19) ise 1 mM Ca⁺², Zn⁺² ve Hg⁺² metal iyonlarının tannaz aktivitesini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Ağır

metallerin inhibitör etkisi literatürde bildirilmiştir. Civa iyonları proteinlerin tiol grupları ile reaksiyona girerek proteinlerin yapısını bozarlar. Ayrıca civanın ilavesi ile disülfit bağlar hidrolitik olarak parçalanabilir. Bu ise enzim aktivitesinde düşmeye neden olabilir. İki değerlikli iyonlar ise enzimin agregasyonuna veya spesifik olmayan bağlanmaya neden olabilirler (11). Sabu ve ark (20) *Aspegillus niger* tannaz aktivitesinin K⁺ ilavesi ile arttığını, Ca⁺² ve Zn⁺² iyonlarının ise enzim aktivitesini inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda bazı yüzey aktif madde (Tween 80), şelat (EDTA), inhibitör (DMSO) ve yapıyı bozan madde (Üre)'nin tannaz aktivitesine tesir etmediği saptanmıştır. Bu sonuçlara göre test edilen laktik asit bakterilerine ait tannaz enzim aktivitesi enzimleri etkileyen yüzey aktif madde, inhibitör ve yapıyı bozan maddelerden etkilenmemektedir. Benzer sonuçlar *L. plantarum* tannazı için Rodriguez ve ark (11) tarafından da bildirilmiştir. Kar ve ark. (19) Tween 80'in enzim aktivitesini artırırken 1 mM EDTA'nın tannaz aktivitesini inhibe ettiğini belirlemişlerdir.

Bu çalışma ile *L. curvatus*'un tannaz aktivitesine sahip olduğu ilk kez ortaya konmuştur. Bazı meyve sularının üretiminde acı-buruk tat (nar suyu, gilaburu) problem oluşturmakta, acılığın giderilmesi önemli işleme aşamalarından birini oluşturmaktadır. Depolanmış bira veya meyve sularında tannaz enzimi yardımıyla bulanıklık oluşumu önemli ölçüde azalma göstermiştir (21). Bu meyve sularında acı buruk tada tanenli bileşenler neden olmaktadır. Laktik asit bakterileri tanenleri parçalayan tannaz aktivitesine sahip olduğundan bu meyve sularında acı ve buruk tadın giderilmesinde rahatlıkla kullanılabileceğinden doğal yolla acı ve buruk tat giderilmesinin yanında laktik asit bakterilerinin sahip olduğu antimikrobiyel aktivite ve benzeri özellikleri ile ürünlerin raf ömrü uzatılmış olacaktır. Yine ileride yapılacak çalışmalar doğrultusunda bu izolatların probiyotik özellikleri ortaya konduğu takdirde günümüzde yaygın bir kullanım alanı bulunan probiyotik ürün eldesi sağlanmış olacaktır.

TEŞEKKÜR

Bu proje Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (BAP-1002F62).

KAYNAKLAR

1. Rodriguez H, De las Rivas B, Gomez-Cordoves C, Munoz R. 2008. Degradation of Tannic Acid by Cell-Free Extracts of *Lactobacillus plantarum*. *Food Chem*, 107: 664-670.
2. Osawa R, Kuroiso K, Goto S, Shimizu A. 2000. Isolation of Tannin- Degrading Lactobacilli From Humans and Fermented Foods. *Appl Environ Microbiol*, 66 (7): 3093-3097.
3. Yao J, Guo GS, Ren GH, Liu YH. 2014. Production, Characterization and Applications of Tannase. *J Mol Catal B: Enzym*. 101: 137-147.
4. Temel O, Kivanç M. 2015. Tannase Activity by *Enterococcus faecium* Isolated From Local Fermented Food. *J Ferment Technol*, 3:2.
5. Zhang S, Gao X, He L, Qiu Y, Zhu H, Cao Y. 2015. Novel Trends For Use of Microbial Tannases. *Prep Biochem Biotech*, 45: 221-232.
6. Kumar M, Beniwal V, Salar KR. 2015. Purification and Characterization of A Thermophilic Tannase From *Klebsiella pneumoniae* KP 715242. *Biocatal Agric Biotech*, 4: 745-751.
7. Vaquero I, Marcobal A, Munoz R. 2004. Tannase Activity by Lactic Acid Bacteria From Grape Must and Wine. *Int J Food Microbiol*, 96 (2): 199-204.
8. Nishitani Y, Osawa R. 2005. Deceptive Halo Formation by Tannase-Defective Bacteria on Tanin-Treated Plate Media. *Microbes Environ*, 20 (2): 117-119.
9. Nishitani Y, Osawa, R. 2003. A Novel Colorimetric Method to Quantify Tannase Activity of Viable Bacteria. *J Microbiol Meth*, 54: 281-284.
10. Kwon T, Shim S, Lee JH. 2008. Characterization of Lactobacilli With Tannase Activity Isolated From Kimchi. *Food Sci Biotechnol*, 17 (6): 1322-1326.
11. Rodriguez H, Rivas B, Cordoves CG, Munoz R. 2008. Characterization of Tannase Activity in Cell-Free Extracts of *Lactobacillus plantarum* CECT 748T. *Int J Food Microbiol*, 121: 92-98.
12. Madigan MT, Martinko MM, Stahl DA, Clark DP. (Ed). 2013. *Brock Biology of Microorganisms*, 13th Ed, Pearson Education Inc. San Francisco, CA 94111.USA.
13. Ayed A, Hamdi M. 2002. Culture Conditions of Tannase Production by *Lactobacillus plantarum*. *Biotechnol Lett*, 24: 1763-1765.
14. Kostinek M, Specht I, Edward VA, Pinto C, Egounlety M, Sossa C, Mbugua S, Dortu C, Thonart P, Taljaard L. 2007. Characterisation and Biochemical Properties of Predominant Lactic Acid Bacteria From Fermenting Cassava For Selection as Starter Cultures. *J Food Microbiol*, 114: 342-351.
15. Bhat TK, Singh B, Sharm OP. 1998. Microbial Degradation of Tannins; A Current Perspective. *Biodegradation*, 9: 343-357.
16. Mingshu L, Qiang H, Dongying J. 2006. Biodegradaton of Gallotannins and Ellagitannins. *J Basic Microbiol*, 46 (1): 68-84.
17. Skene IK. and Brooker JD. 1995. Characterization of Tannin Acylhydrolase Activity in The Ruminal Bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Anaerobe*, 1 (6): 321-327.
18. Nishitani Y, Sasaki E, Fujisaw T. and Osawa R. 2004. Genotypic Analyses Of Lactobacilli With A Range of Tannase Activities Isolated From Human Feces and Fermented Foods. *Syst Appl Microbiol*, 27: 109-117.
19. Kar B, Banerjee R, Bhattacharyya BC. 2003. Effect of Additives on The Behaviorual Properties of Tannin Acyl Hydrolase. *Process Biochem*, 38: 1285-1293.
20. Sabu A, Kiran GS, Pandey A. 2005. Purification and Characterization of Tannin Acyl Hydrolase From *Aspergillus niger* ATCC 16620. *Food Technol Biotech*. 43: 133-138.
21. Fitzpatrick DE, Bing B, Maggi DA, Fleming RC, O'Malley RM. 2002. Vasodilating Procyanidins Derived From Grape Seeds. *Ann New York Acad Sci*, 957: 78-89.

ÜZÜM ÇEKİRDEĞİNDEN FENOLİK BİLEŞEN EKSTRAKSİYONUNUN YÜZEY YANIT METODU İLE OPTİMİZASYONU

Ece Çağdaş*, Atıf Can Seydim

Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta

Geliş tarihi / Received: 10.04.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 11.06.2016

Kabul tarihi / Accepted: 02.08.2016

Özet

Üzümde bulunan fenolikler, antioksidan aktivite ve antimikrobiyel özellikleri sayesinde insan sağlığı üzerine olumlu etkileri olan ikincil metabolitlerdir. Bu nedenle fenoliklerin geri kazanımı için etkin ekstraksiyon teknikleri gereklidir. Bu çalışmada, üzüm sanayi yan ürünü olan üzüm çekirdeğinin fenolik bileşenleri su/etanol çözücü karışımı kullanılarak katı-sıvı ekstraksiyon işlemi ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon işlemi, etanol oranı (60-90 ml etanol/100 ml çözücü), üzüm çekirdeği konsantrasyonu (10-20 g/100 ml çözücü) ve işlem süresi (32-120 dk) olan bağımsız değişkenlerle gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon işlemi, toplam fenolik miktarı, antioksidan aktivite ve bazı fenolik bileşenlerin miktarı için yanıt-yüzey metodu (RSM) kullanılarak optimize edilmiştir. Optimum ekstraksiyon koşulları maksimum toplam fenolik (0.254 mg/g), gallik asit (0.143 mg/g), kateşin (0.058 mg/g), epikateşin (0.040 mg/g) ve antioksidan aktivite (67.90 µmol/ml) için 60 ml etanol/100 ml çözücü sistem (etanol+su); 20 g üzüm çekirdeği/100 ml çözücü; 109 dk ekstraksiyon süresi, şeklinde tanımlanmıştır. Genel olarak, konsantrasyon ve ekstraksiyon süresinin fenolik ekstraksiyonuna etki eden önemli parametreler olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$).

Anahtar kelimeler: : Üzüm çekirdeği, ekstraksiyon, yüzey-yanıt metodu, polifenoller, antioksidan

OPTIMIZATION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM GRAPE SEED BY RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

Abstract

Grape phenolics are secondary metabolites with potential beneficial effects on human health because of their antioxidant and antimicrobial activities. Thus, it is necessary to have efficient extraction techniques to achieve good recoveries of compounds. In this study, phenolic compounds of grape seeds which are byproducts of grape industry were extracted by solid-liquid extraction using water/ethanol solvent mixture. Extraction was carried out with independent variables which were solvent ratio (60-90 ml ethanol/100 ml solvent), grape seed concentration (10-20 g/100 ml solvent) and process time (32-120 min). Extraction process was optimized by using response surface methodology (RSM) for the total phenols, antioxidant and some phenolic compounds content of grape seeds. Optimal extraction conditions were identified as 60 ml ethanol/100 ml solvent (ethanol+water); 20 g grape seed/100 ml solvent; 109 min extraction time for maximum total phenols (0.254 mg/g), antioxidant activity (67.90 µmol/ml), gallic acid (0.143 mg/g), catechin (0.058 mg/g) and epicatechin (0.040 mg/g). Generally, solid concentration and extraction time were determined as the most important parameter on phenolic extraction ($P<0.05$).

Keywords: Grape seed, extraction, response surface method, polyphenols, antioxidant

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ ececadg@sd.edu.tr,

☎ (+90) 246 211 16 68,

☎ (+90) 246 2111667

GİRİŞ

Tüketicilerin gıdalarda kullanılan katkı maddeleri hakkında daha çok bilgi sahibi olması ve fonksiyonel gıdalara ilginin artması ile birlikte, gıdalarda kullanılacak alternatif doğal ve daha güvenli katkı maddeleri üzerine araştırmalar artış göstermiştir. Üzüm, dünyada en çok tüketilen meyvelerden biridir ve yaklaşık %75'i çekirdek ve kabuklarında olmak üzere fenolik bileşenler bakımından oldukça zengindir. Özellikle üzümde bulunan antosiyaninler, antiinflamatuar, antioksidan ve antimikrobiyel aktivite gibi güçlü biyolojik fonksiyonlar göstermektedir (1, 2). Üzümde en çok bulunan fenolikler antosiyaninler, hidroksibenzoik ve hidroksisünamik asit, flavan-3-ol, flavanoller ve stilbenler olarak tanımlanmıştır (3). Son yıllarda, şarap endüstrisi yan ürünlerinden ve atıklarından fenolik bileşenlerin geri kazanımında kullanılacak etkin alternatif yöntemler üzerine yapılan çalışmalar artış göstermiştir. Yu ve Ahmedna, (4), üzüm posasında bulunan fonksiyonel grupları onların kompozisyonu ve biyolojik aktivitelerini baz alarak özetlemiş, sonuç olarak üzümün sahip olduğu fenolik profilinin antioksidatif ve antimikrobiyel aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Fonksiyonel bileşenlerin bitkilerden ekstrakte edilmesi önemli bir proses olup bu alanda uygulanan pek çok yöntem bulunmaktadır. Ekstraksiyon, fenolik bileşenlerin izolasyonu, tanımlanması ve kullanımında önemli bir basamaktır (5). Üzümde bulunan fenolik bileşenlerin ekstraksiyonunda kullanılan en yaygın yöntem katı-sıvı ekstraksiyondur. Çözücü tipi, ekstraksiyon etkinliğini etkileyen en önemli parametredir. Şarap endüstrisi atıklarından ve diğer bitkilerden polifenollerin ekstraksiyonunu daha etkin hale getirmek için pek çok yöntem uygulanmıştır. Bu yöntemler genel olarak hidroalkolik çözücü sistemler üzerine yoğunlaşmaktadır (6-10). Polifenollerin polar doğası, bu bileşiklerin hidroalkolik çözücüler gibi polar protik ortamlarda daha kolay çözünmesini sağlar. Bazı çalışmalarda, kateşin ve prosiyanidinlerin ekstraksiyonunda, etanol/su karışımlarının aseton ya da metanol/su karışımlarına göre daha iyi sonuçlar verdiği gösterilirken (11) diğer araştırmacılar üzüm çekirdeğinden kateşin, epikateşin ve epigallokateşin ekstraksiyonunda metanolün daha iyi olduğunu belirtmişlerdir (12). Üzüm çekirdeği ve kabuğundan ya da diğer bitkilerden fenolik bileşenlerin konvansiyonel ekstraksiyon prosedürü kullanılarak ekstrakte edildiği ve yüksek verimliliğin elde edildiği çalışmalar bulunmaktadır (13-14). Ekstrakte edilen maddenin konsantrasyonu arttıkça ekstraksiyon etkinliği de doğru orantılı olarak artış gösterir. Ancak, yüksek ve düşük çözücü/katı oranları arasındaki denge, maliyet/çözücü-atık miktarı dengesi ve yoğunlaşma etkisinden kaçınma gibi hususlar, ekstrakte edilen bileşik için belirlenmelidir. Üzümde bulunan fenolik bileşenlerin yapı bakımından çeşitliliği (15), bu bileşenlerin ekstraksiyonunun optimize edilmesini gerektirmektedir. Ekstraksiyon metodları farklı parametrelerden etkilendiği ve bu parametreler

birbirleri ile de etkileşimde olduğu için uygun bir optimizasyon modeli kullanılmalıdır. Yüzey yanıt metodu, deney sayısını azaltırken farklı test parametreleri arasındaki etkileşimlerle de ilgili istatistiksel modeller oluşturabilen matematiksel bir tekniktir (16).

Özet olarak, üzüm ve üzüm sanayi yan ürünlerinden fenolik bileşenlerin katı-sıvı ekstraksiyonu, optimize edilmesi gereken pek çok parametreye bağlı olarak değişim göstermektedir. Etanol/su çözücü karışımlarının, benzer ekstraksiyon etkinliklerine sahip olmaları, maliyetlerinin düşük olması ve sürdürülebilirliğinin yüksek olması nedeniyle kullanılması tercih edilmektedir. Bu çalışmanın amacı, çözücü karışım oranı, üzüm çekirdeği konsantrasyonu ve proses süresi gibi ekstraksiyon değişkenlerinin, maksimum toplam fenolik bileşen ve antioksidan aktivite değerlerinin elde edilmesi amacıyla yanıt-yüzey metodu kullanılarak optimize edilmesidir. Bu çalışmada, üzüm ve ürünleri sanayi yan ürünü olan üzüm çekirdeğinin fenolikleri su/etanol çözücü karışımı kullanılarak katı-sıvı ekstraksiyon işlemi ile ekstrakte edilmiştir. Optimizasyon için seçilen noktalarda ekstraktların fenolik bileşenleri sıvı kromatografik yöntemle saptanırken antioksidan aktiviteleri oksijen radikal absorban kapasitesi değerlerine göre belirlenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Çalışmada kullanılan üzüm çekirdeği Denizli'deki yerel bir işletmeden temin edilmiştir. Hammaddeler kullanım ve analiz süresine kadar vakum paketlenmiş ve -18°C'de saklanmıştır. Ekstraksiyon için kullanılan etanol ve analizler için kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma Aldrich'ten (St. Louis, MO) temin edilmiştir. Kromatografik analiz için kalibrasyon eğrileri kateşin, epikateşin ve gallik asit (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) kullanılarak hazırlanmıştır.

Ekstraksiyon işlemi

Ekstraksiyon için katı-sıvı ekstraksiyon tekniği kullanılmıştır. Belirlenen oranlarda öğütülmüş üzüm çekirdeği, farklı oranlarda karıştırılmış etanol:su çözücü sistemi ile muamele edilmiştir. Öğütülmüş üzüm çekirdeğinin ortalama partikül çapı yapılan elek analizi (Tyler elekleri, No 10-140) ile 490.5 µm olarak bulunmuştur. Çözücü ile karıştırılan üzüm çekirdeği tozu örnekleri manyetik karıştırıcı ile farklı sürelerde oda sıcaklığında (25°C) ekstrakte edilmiştir. Sıvı kısım karışımından vakum altında filtre edilerek ayrılmıştır. Etanol fazı vakum altında evaporatör kullanılarak uzaklaştırılmış kalan sulu kısım liyofilize edilerek kurutulmuştur. Elde edilen toz ekstrakt vakum paketlerde analiz anına kadar -18°C'de saklanmıştır.

Toplam fenolik madde miktarının ve antioksidan aktivitenin belirlenmesi

Üzüm çekirdeği tozu örneklerinin su-etanol ekstraktlarının toplam fenol içeriği Folin-Ciocalteu metoduna göre spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (17). Ekstraktlardan uygun seyreltiler

alınarak 0.2 N 5 mL Folin-Ciocalteu ayracı ile karıştırılmıştır. 5 dakikanın sonunda 4 ml (75 g/L) doygun Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilerek oda sıcaklığında 2 saat karanlıkta bekletildikten sonra oluşan mavi rengin absorbansı 765 nm dalga boyunda spektrofotometrik (Boeco S-20 Spectrophotometer, Germany) olarak ölçülmüştür. Standart eğri 0.125-2 mg/ml aralığındaki farklı konsantrasyonlara sahip gallik asit kullanılarak elde edilmiştir. Örneklerin toplam fenolik madde içeriği mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g olarak verilmiştir. Ekstraktların antioksidan kapasiteleri, oksijen-radikal absorbans kapasitesi (ORAC) testi kullanılarak belirlenmiştir (18). Peroksi radikal üretici olarak 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) kullanılmış ve antioksidan kapasite floresansın indirgenme grafiğinden elde edilen net değerler hesaplanmasıyla belirlenmiştir. Çalışma sonuçları troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametil-kromon-2-karboksilik asit) eşdeğeri olarak, 1 litre test edilen çözelti ile aynı antioksidan aktiviteye sahip µmol cinsinden troloks miktarı şeklinde verilmiştir.

Fenolik bileşenlerin belirlenmesi

Gallik asit, kateşin ve epikateşinin standart stok çözeltileri 5 mg standardın 10 ml saf suda çözündürülmesi ile hazırlanmıştır. Analiz edilecek farklı ekstraktlar analiz öncesi 1:10 kat seyreltme yapıldıktan sonra 0.45 µm membran filtre kullanılarak filtre edilmiştir. Kromatografik analiz için HPLC sistem LC Solution yazılımı ile ayırım modülü, pompa, vakum degaz ünitesi ve diode array detektörden (DAD) oluşmaktadır (Schimadzu, LC-20AD, Japan). Kromatografik ayırım RP-18 kolon (150mmx3mm, 5 µm, Phenomenex, Gemini 5u C18, USA) kullanılarak izokratik elüsyon ile gerçekleştirilmiştir. Mobil faz, asetonitril (%15, A) ve 50 mM O-fosforik asit-su (%85, B) karışımından oluşmaktadır. Enjeksiyon hacmi 25 µl ve kolon sıcaklığı 30°C'dir. Kromatografik pikler alıkonma zamanları baz alınarak tanımlanmıştır. Ekstraktlarda bulunan gallik asit, kateşin ve epikateşin

hesaplanan değerler ile nominal konsantrasyonlar arasındaki % fark karşılaştırılarak analiz doğruluğu hakkında bilgi edinilmiştir.

Deneyel Tasarım ve Optimizasyon

Ekstraksiyon işleminde değişkenlerin, üzüm çekirdeği örneklerinin toplam fenolik madde miktarı, antioksidan aktivitesi ve bazı fenolik bileşenleri üzerine asıl etkileri "Yüzey-Yanıt Metodu" kullanılarak belirlenmiştir. Etanol miktarı (F₁), katı/çözücü oranı (F₂) ve ekstraksiyon süresi (F₃) bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. Bu faktörler ve seviyeleri Çizelge 1'de gösterildiği gibidir. İşlem değişkenlerinin aralığı yapılan bazı çalışmalar incelenerek ve yapılan ön denemelerden elde edilen verilere bakılarak belirlenmiştir. Deneme tasarımı, 6 merkez noktası olan 2³ tam faktöriyel tasarıma eksenel ve faktöriyel noktalarda 2 tekrarlı (α = ±1.68179) olacak şekilde 34 nokta ile elde edilmiştir. Gözlenen sonuçlardaki açıklanamayan değişimlerin etkileri, deneysel verilerin sırası rastgele dağıtılarak minimize edilmiştir. Her bir cevap için matematik modeller çoklu regresyon analizi (Design Expert, Stat Ease Inc., Minneapolis, USA) ile hesaplanmış ve modelleme, lineer, karesi alınmış ve kesişim terimlerini içeren kuadratik model ile başlatılmıştır. Her bir cevap için önemli terimler varyans analizi kullanılarak belirlenmiştir. Bu çalışmada, bütün cevapları tek bir ölçüm ile kombine eden istenilen hedefe ulaşma fonksiyonu fenolik içeriğin ve antioksidan aktivite değerlerinin maksimum olduğu kriter için geliştirilmiştir. Ekstraksiyon prosesinin optimize edilmesinde ve elde edilen sonuçların modele uygunluğunun tespit edilmesinde Design Expert 10.0 (Stat Ease Inc., Minneapolis, USA) paket programı kullanılmıştır. Bu çalışmada, istenilen hedefe ulaşma fonksiyonu cevapların (toplam fenolik, antioksidan aktivite, bazı fenolik bileşenlerin miktarı) maksimum değerlerinin belirlenmesi üzerine kurulmuştur.

Çizelge 1. Bağımsız değişkenler ve faktöriyel tasarım için seviyeleri
Table 1. Independent variables and levels for factorial design

Değişkenler Independent variables	Birim Unit	Değişken seviyeleri Factor level		
		-1	0	+1
F ₁ etanol F ₁ ethanol	ml/100 ml çözücü ml/100 ml solvent	60	75	90
F ₂ üzüm çekirdeği oranı F ₂ grape seed ratio	g/100 ml çözücü g/100 ml solvent	10	15	20
F ₃ ekstraksiyon süresi F ₃ extraction period	dakika minute	32	76	120

konsantrasyonu, ilgili çözelti için hazırlanmış standart eğri ile ekstraktlardaki entegre pik alanları karşılaştırılarak belirlenmiştir. Standartlar için kalibrasyon eğrileri farklı konsantrasyonlardaki standart örnek çözeltilerinin enjekte edilerek alanlarının belirlenmesi ve elde edilen alanların konsantrasyonlarına karşı grafiklerin oluşturulması ile elde edilmiştir. Oluşturulan grafiklerden yararlanılarak örnek ekstraktlardaki miktar belirlenmiştir. Metodun kesinliğini ölçmek için analizler aynı gün içerisinde 2 kere ve farklı 2 günde tekrarlanmıştır. Kalibrasyon eğrilerinden

SONUÇ VE TARTIŞMA

Çizelge 2'de her bir (çözücü sistem, üzüm çekirdeği tozu/çözücü (katı:çözücü) oranı, ekstraksiyon süresi) koşul için üzüm çekirdeği ekstraktlarının toplam fenol, gallik asit, kateşin ve epikateşin miktarları ile antioksidan aktivite değerleri gösterilmektedir. Toplam fenolik madde miktarı 0.066-0.309 mg/g değerleri arasında, gallik asit, kateşin ve epikateşin miktarları ise sırasıyla 0.006-0.140; 0.008-0.060; 0.0002-0.040 mg/g değerleri arasında bulunmuştur. Bunun yanı sıra

oksijen radikal absorpsan kapasitesine göre belirlenen antioksidan aktivite değerleri ise 15.06-75.72 $\mu\text{mol/ml}$ aralığındadır. Üzüm çekirdeği ekstraktlarında bulunan değerler Yılmaz ve ark. (19) ve Garcia-Jares ve ark. (20) tarafından yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Proses değişkenlerinin önemli etkilerini belirlemek için tek bir faktörün 2 seviyesinin, test edilen ve önerilen işlem sonuçlarının karşılaştırıldığı varyans analizi (ANOVA) ($P<0.05$) gerçekleştirilmiş ve deneysel veriler için en uygun model belirlenmiştir. Önerilen modelin regresyon denklem katsayıları ve tüm ana etkilerin istatistiksel önem dereceleri her bir cevap için elde edilerek önemli olan ve olmayan etkiler model içerisinde belirlenmiştir. Analiz edilen değişkenlere ait varyans analizi sonuçları Çizelge 3 de gösterildiği gibidir. En küçük kareler yöntemi ile kuadratik denklik, tüm sonuçlar için (1-34) model verinin oluşturulmasında kullanılmıştır. Model denklıkları tüm faktör seviyeleri için üretilmiş ve her bir değişkenin üzüm çekirdeğinden fenolik madde ekstraksiyonu üzerine etki derecesi hesaplanmıştır. Bağımsız değişkenler arasındaki korelasyonlar polinomiyal denklıkların birinci ve ikinci derece katsayıları yardımıyla hesaplanmış ve değerlendirilmiştir. Elde edilen modelin belirleme katsayıları (R^2) toplam fenolik miktarı için 0.758; ORAC için 0.5128; gallik asit için 0.872; kateşin için 0.761 ve epikateşin miktarı için 0.788 olarak bulunmuştur. ORAC değerleri hariç diğer sonuçlar için R^2 değerlerinin yüksek olması deneysel sonuçlar ile önerilen modelden elde edilen teorik sonuçlar arasında uygun bir korelasyon olduğunu gösterir. Proses değişkenleri ile toplam fenolik madde miktarı (Y_1), antioksidan aktivite (Y_2), gallik asit (Y_3), kateşin (Y_4) ve epikateşin (Y_5) miktarları arasındaki ilişki kodlanmış değişkenlere bağlı olarak elde edilmiştir. A, etanol miktarı; B, katı/çözücü oranı ve C ekstraksiyon süresi olmak üzere kodlu değişkenlere bağlı olarak elde edilen denklıklar (1-5) verildiği gibi olup önemli ($P<0.05$) proses değişkenleri "*" ile işaretlenmiştir.

$$Y_1=0.14+4.967x10^{-3}B+0.031C+0.040BC+0.023B^2 \quad (1)$$

$$Y_2=43.08-2.01A+2.84B+8.16C+5.51AB-1.97AC+3.83BC-7.34A^2-8.08B^2-1.48C^2 \quad (2)$$

$$Y_3=0.051-8.475x10^{-3}A+5.988x10^{-3}B+1.314x10^{-3}C-1.127x10^{-3}AB-2.973x10^{-3}AC-1.94x10^{-3}BC-7.381x10^{-3}A^2+0.023B^2+0.023C^{2**} \quad (3)$$

$$Y_4=0.024-3.591x10^{-3}A+3.025x10^{-3}B-3.042x10^{-3}C-7.834x10^{-4}BC+7.828x10^{-3}B^{2*}+9.373x10^{-3}C^{2*} \quad (4)$$

$$Y_5=8.592x10^{-3}+1.316x10^{-3}B-1.194x10^{-3}C-1.124x10^{-3}BC+7.099x10^{-3}B^{2*}+7.643x10^{-3}C^{2*} \quad (5)$$

Model deneysel verilere uygunluk göstermekte ve seçilen değişkenlerin istatistiksel olarak önemli olduğunu ortaya çıkarmaktadır. Etanol miktarı ekstraksiyon işleminin diğer bağımsız değişkenlerine nazaran daha az etki göstermiştir. Bu nedenle, yüzey-yanıt grafikleri, etanol miktarı 60 ml/100 ml çözücü olacak şekilde sabitlenerek elde edilmiştir. Şekil 1 ve 2, toplam fenolik, gallik asit, kateşin ve epikateşin miktarları ile antioksidan aktivite değerini ekstraksiyon süresi ve üzüm çekirdeği konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak göstermektedir. Toplam fenolik madde, gallik asit, kateşin ve epikateşin miktarı ile

antioksidan aktivite üzerinde istatistiksel olarak önemli doğrusal ve kuadratik etkilerin, üzüm çekirdeği konsantrasyonu ve süre olduğu belirlenmiştir. Üzüm çekirdeği konsantrasyonu ve ekstraksiyon süresindeki artış sonucu fenolik bileşen miktarındaki ve antioksidan aktivitedeki artış doğrusal olmayan bir davranışa sahiptir. Elde edilen yüzey grafiklerinin analizi, çözücü sistem, üzüm çekirdeği tozu/çözücü (katı/çözücü) oranı, ekstraksiyon süresi faktörlerinin üzüm çekirdeğinden fenolik bileşenlerin ekstrakte edilmesindeki önemli faktörler olduğunu göstermiştir. En yüksek toplam fenolik madde miktarı 50 ml etanol/100 ml çözücü (etanol+su) oranına sahip örneklerde gözlenirken, en düşük miktar 100 ml etanol ile ekstrakte edilen örneklerde gözlenmiştir. Benzer eğilim gallik asit, kateşin ve epikateşin miktarlarında da belirlenmiştir. En düşük antioksidan aktivite değerleri 50 ml etanol/100 ml çözücü (etanol+su) ile ekstrakte edilen örneklerde belirlenirken, en yüksek aktivite değerlerine 60 ml etanol/100 ml çözücü (etanol+su) ekstraktlarında ulaşılmıştır. Çözücü karışımda suyun miktarının artmasıyla üzüm çekirdeğinden ekstrakte edilen fenolik madde miktarında gözlenen artış antosiyanidinlerin doğada serbest halde değil şekerlerle glikozit yaparak bulunmasından da kaynaklanabilir. Etanol içerisine suyun eklenmesi ekstraksiyon hızını arttırmıştır ancak su miktarının daha fazla artırılması diğer bileşenlerin de ekstrakte edilmesine ve elde edilen ekstraktta fenolik bileşen oranının azalmasına neden olacaktır. Çözücü tipi, ekstraksiyonun verimine etki eden en önemli parametredir. Polifenollerin polar yapısı nedeniyle hidroalkolik çözeltiler gibi polar protik ortamlarda kolayca çözülebilmektedir. Fenolik fraksiyonlar, düşük polaritedeki çözeltilerin konsantrasyonunun artması ile karışımdaki alkol konsantrasyonu değiştirilerek daha kolay elde edilebilir (21). Ekstraksiyon çözeltisi olarak alkol kullanıldığı zaman, üzüm çekirdeklerinden fenolik madde salınımı ekstraksiyon süresinin bir fonksiyonu olarak

oldukça yüksek hızda gerçekleşmektedir. Ancak, bu durumda, su kullanıldığı zaman katı-sıvı temas süresi önemini yitirmektedir. Bunların yanı sıra farklı fenolik bileşenlerin elde edilmesi için farklı çözücü sistemleri kullanılabilir. Bazı araştırmacılar kateşin ve prosiyanidinlerin etanol/su karışımı çözücü sistemi kullanılarak daha kolay ekstrakte edildiğini bildirmişlerdir (11). Bazı araştırmacılar ise, kateşin, epigallokateşin ve epikateşinlerin üzüm çekirdeğinden metanol kullanılarak daha fazla ekstrakte edildiğini bildirmişlerdir (12). Bunun yanı sıra, düşük etanol miktarının kullanıldığı sulu ekstraksiyonlarda,

organik asitler kullanılarak elde edilen düşük pH değerlerinde üzüm çekirdeğinden etkin polifenol ekstraksiyonun gözlendiği çalışmalar bulunmaktadır (22-23). Üzüm çekirdeğinden elde edilen fenoliklerin karakterizasyonunda tek tek fenolik bileşenlerin ekstrakte edilme verimlerinin yanı sıra toplam fenolik madde ekstraksiyon veriminin elde edilmesi amaçlanmalıdır.

etkilerinin incelendiği bu çalışmada çözgen konsantrasyonu ve ekstraksiyon süresinin fenolik madde ekstraksiyonuna etki eden önemli parametreler olduğu belirlenmiştir. Özet olarak, üzüm çekirdeğinden fenolik madde ekstraksiyonu optimize edilmesi gereken pek çok faktöre bağlı olarak değişmektedir. Üzüm çekirdeğinden fenoliklerin ekstraksiyonunda kullanılabilecek

Çizelge 2. Yüzey-yanıt metodu için üç faktörlü merkezi kompozit dizayn
Table 2. Three-factor central composite design for response surface method

Std	Sıra	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Yanıt 1	Yanıt 2	Yanıt 3	Yanıt 4	Yanıt 5
Std	Run	A:Etanol (ml/100 ml çözücü) Factor 1 A:Ethanol (ml/100 ml solvent)	B:kati:çözücü (g/100 ml çözücü) Factor 2 B:solid:solvent (g/100 ml solvent)	C:süre (dk) Factor 3 C:time (min)	Toplam fenolik (mg/g) Response 1 Total phenolic (mg/g)	ORAC (µmol/ml) Response 2 ORAC (µmol/ml)	Gallik asit (mg/g) Response 3 Gallic acid (mg/g)	Kateşin (mg/g) Response 4 Catechin (mg/g)	Epikateşin (mg/g) Response 5 Epicatechin (mg/g)
11	1	90 ^a (+1) ^b	10 (-1)	120 (+1)	0.116	20.278	0.118	0.053	0.024
4	2	90 (+1)	10 (-1)	32 (-1)	0.151	35.486	0.115	0.053	0.025
27	3	75 (0)	15 (0)	150 (+1.68)	0.215	75.719	0.134	0.055	0.035
1	4	60 (-1)	10 (-1)	32 (-1)	0.174	41.350	0.140	0.058	0.038
18	5	50 (-1.68)	15 (0)	76 (0)	0.107	27.791	0.012	0.014	0.000
15	6	90 (+1)	20 (+1)	120 (+1)	0.252	72.557	0.023	0.013	0.003
29	7	75 (0)	15 (0)	76 (0)	0.121	71.449	0.045	0.028	0.008
9	8	60 (-1)	10 (-1)	120 (+1)	0.269	27.088	0.063	0.033	0.019
21	9	75 (0)	6.6 (-1.68)	76 (0)	0.228	17.780	0.034	0.017	0.003
8	10	90 (+1)	20 (+1)	32 (-1)	0.067	3.707	0.115	0.037	0.024
12	11	90 (+1)	10 (-1)	120 (+1)	0.072	8.118	0.057	0.029	0.013
2	12	60 (-1)	10 (-1)	32 (-1)	0.120	18.283	0.123	0.056	0.035
5	13	60 (-1)	20 (+1)	32 (-1)	0.130	25.858	0.121	0.055	0.039
13	14	60 (-1)	20 (+1)	120 (+1)	0.309	15.061	0.109	0.044	0.026
25	15	75 (0)	15 (0)	2 (-1.68)	0.066	7.600	0.006	0.008	0.004
31	16	75 (0)	15 (0)	76 (0)	0.116	20.278	0.118	0.053	0.024
28	17	75 (0)	15 (0)	150 (+1.68)	0.151	35.486	0.115	0.053	0.025
10	18	60 (-1)	10 (-1)	120 (+1)	0.215	75.719	0.134	0.055	0.035
14	19	60 (-1)	20 (+1)	120 (+1)	0.174	41.350	0.140	0.058	0.038
20	20	100 (+1.68)	15 (0)	76 (0)	0.107	27.791	0.012	0.014	0.000
32	21	75 (0)	15 (0)	76 (0)	0.252	72.557	0.023	0.013	0.003
34	22	75 (0)	15 (0)	76 (0)	0.121	71.449	0.045	0.028	0.008
3	23	90 (+1)	10 (-1)	32 (-1)	0.269	27.088	0.063	0.033	0.019
30	24	75 (0)	15 (0)	76 (0)	0.228	17.780	0.034	0.017	0.003
24	25	75 (0)	23.4 (+1.68)	76 (0)	0.067	3.707	0.115	0.037	0.024
33	26	75 (0)	15 (0)	76 (0)	0.072	8.118	0.057	0.029	0.013
26	27	75 (0)	15 (0)	2 (-1.68)	0.120	18.283	0.123	0.056	0.035
7	28	90 (+1)	20 (+1)	32 (-1)	0.130	25.858	0.121	0.055	0.039
16	29	90 (+1)	20 (+1)	120 (+1)	0.309	15.061	0.109	0.044	0.026
17	30	50 (-1.68)	15 (0)	76 (0)	0.066	7.600	0.006	0.008	0.004
6	31	60 (0)	20 (+1)	32 (-1)	0.120	18.283	0.123	0.056	0.035
22	32	75 (0)	6.6 (-1.68)	76 (0)	0.130	25.858	0.121	0.055	0.039
23	33	75 (0)	23.4 (+1.68)	76 (0)	0.309	15.061	0.109	0.044	0.026
19	34	100 (+1.68)	15 (0)	76 (0)	0.066	7.600	0.006	0.008	0.004

Gerçek değer^a (kodlanmış değer)^b Real values^a (coded values)^b

Ekstraksiyon prosesinde artan çözücü/kati oranlarının ekstraksiyon verimini olumlu yönde etkilediği belirtilmektedir (5). Ancak, yüksek ve düşük kati oranlarının kullanımı, çözücü atığı ile maliyet ve doyunluk etkileri arasındaki dengenin işlem öncesinde belirlenmesi gerekmektedir. Kullanılan ekstraksiyon süresi işlem için gerekli enerji miktarını ve yüksek oranda bileşen geri eldesini optimize etmek için belirlenmesi gereken en önemli faktördür. Bu çalışmada, artan ekstraksiyon süreleri üzüm çekirdeğinden fenolik madde ekstraksiyonunu olumlu yönde etkilemiştir. Üzüm çekirdeğinden fenolik madde ekstraksiyonu üzerine çözücü sistemin, üzüm çekirdeği tozu konsantrasyonunun ve ekstraksiyon süresinin

en uygun çözücülerin etanol, metanol ve aseton içeren sulu karışımlar olduğu belirtilmektedir. Bu çözücüler içlerinden etanol hem polifenollerin ekstraksiyonunda yüksek verim göstermesi hem de güvenli olması nedeniyle en çok tercih edilen çözücüdür. Aynı zamanda, kullanılan kati miktarın artırılması ekstraksiyon verimini arttıracaktır ancak yüksek konsantrasyonlar ekstraksiyon verimini düşürebilmektedir.

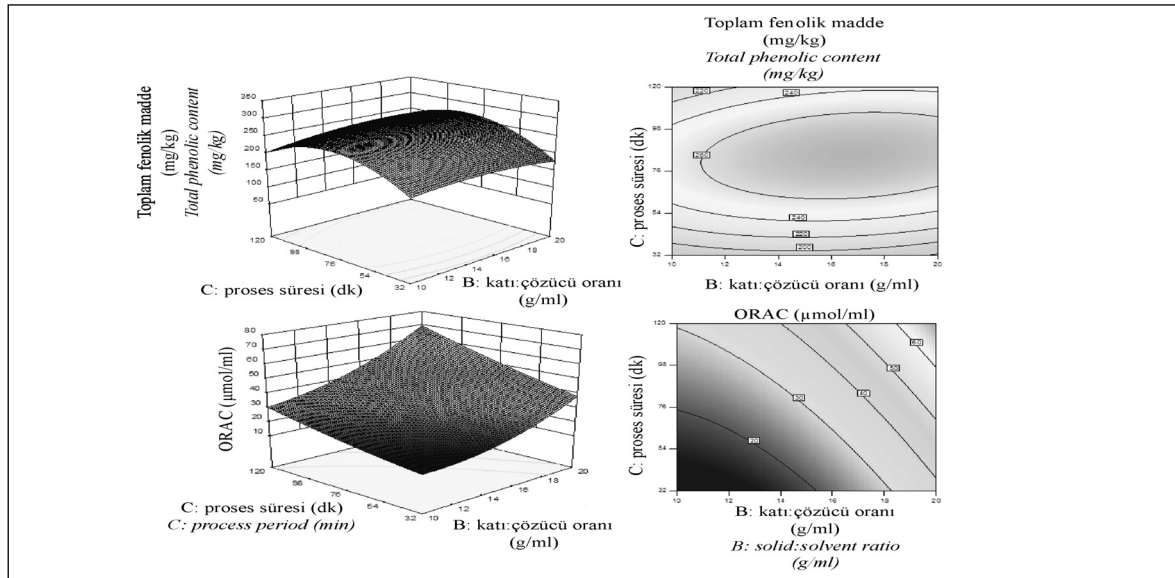
Ekstraksiyon yönteminin optimizasyonu

Üzüm çekirdeğinden fenolik madde ekstraksiyonu için optimum koşullar, maksimum toplam fenolik madde miktarı, antioksidan aktivite değerleri ve fenolik bileşen miktarı kriterlerini elde edebilecek şekilde belirlenmiştir. Üzüm çekirdeğinden fenolik

Çizelge 3. Fenolik bileşenlerin üzüm çekirdeğinden ekstraksiyonuna ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları
 Table 3. Analysis of variance (ANOVA) results for the extraction of phenolic compounds from grape seed

Kaynak Source	DF* DF*	Kareler toplamı Sum of squares	Kareler ortalaması Mean square	F değeri F value	p değeri p-value
Toplam fenolik Total phenolic					
Model	4	0.067	0.017	3.58	0.0173 ^a
Lack of fit	10	0.047	4.73x10 ⁻³	1.02	0.4649 ^b
Pure error	19	0.088	4.64x10 ⁻³		
Total error	33	0.20			
ORAC					
Model	9	5116.05	568.45	1.14	0.3721 ^b
Lack of fit	5	1864.22	372.84	0.70	0.6273 ^b
Pure error	19	10060.52	529.50		
Total error	33	17040.80			
Gallik asit Gallic acid					
Model	9	0.030	3.31x10 ⁻³	1.77	0.1262 ^b
Lack of fit	5	0.018	3.61x10 ⁻³	2.57	0.0616 ^b
Pure error	19	0.027	1.41x10 ⁻³		
Total error	33	0.075			
Kateşin Catechin					
Model	6	3.38x10 ⁻³	5.63x10 ⁻⁴	2.09	0.0873 ^b
Lack of fit	8	2.88x10 ⁻³	3.60x10 ⁻⁴	1.56	0.2023 ^b
Pure error	19	4.38x10 ⁻³	2.31x10 ⁻⁴		
Total error	33	0.011			
Epikateşin Epicatechin					
Model	5	2.30x10 ⁻³	4.60x10 ⁻⁴	3.33	0.0174 ^a
Lack of fit	9	1.70x10 ⁻³	1.89x10 ⁻⁴	1.66	0.1679 ^b
Pure error	19	2.16x10 ⁻³	1.14x10 ⁻⁴		
Total error	33	6.16x10 ⁻³			

*Serbestlik derecesi; ^a önemli; ^b önemsiz *Degrees of freedom; ^a Significant; ^b non-significant

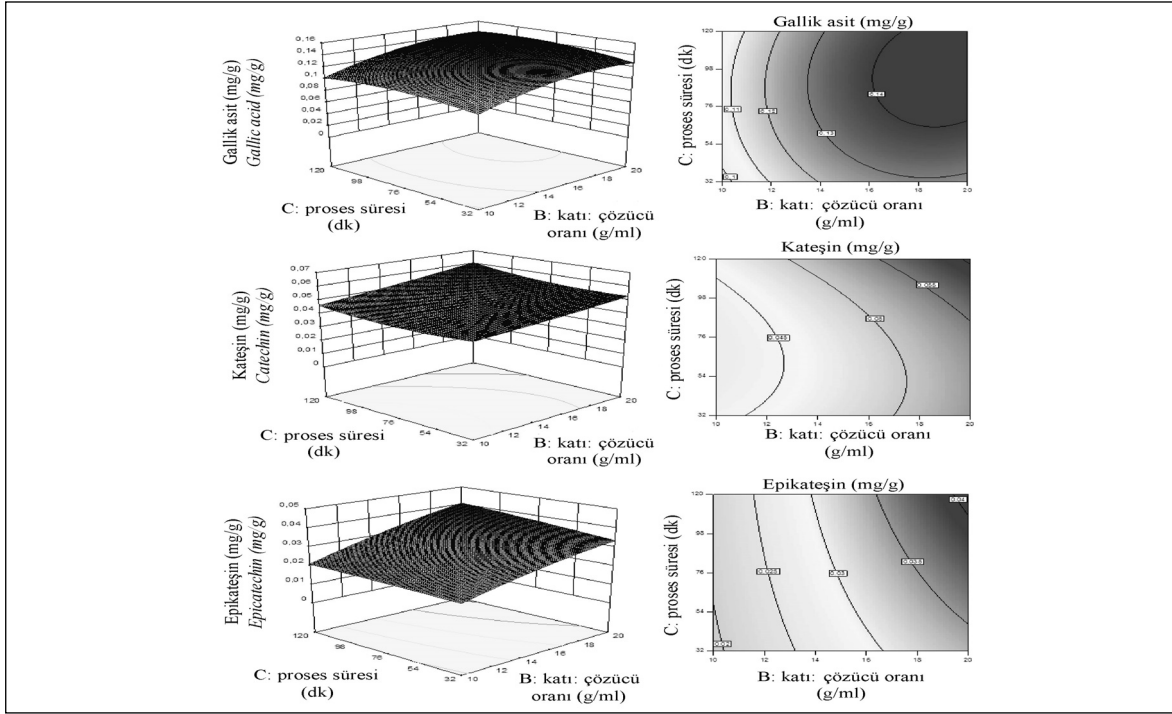


Şekil 1. Sabit etanol miktarında (60 ml/ 100 ml çözücü) konsantrasyon ve ekstraksiyon süresinin toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite miktarına etkileri için yanıt-yüzey ve kontur grafikleri

Figure 1. Response surface and contour plots for the effects of concentration and extraction time at a constant ethanol content (60 ml/ 100 ml solvent) on total phenolic compound and antioxidant activity

bileşen ekstraksiyonu için optimize koşullar Çizelge 4 de gösterildiği gibidir. Bu çalışmada, belirlenen aralık içinde elde edilen optimum ekstraksiyon parametreleri: 60 ml etanol/100 ml çözücü sistem (etanol+su); 20 g üzüm çekirdeği/

100 ml çözücü; 109 dk ekstraksiyon süresi şeklindedir. Elde edilen değerler genelde birbirlerine yakın bulunmuştur. Optimum koşullar için elde edilen toplam fenolik madde miktarı, gallik asit, kateşin, epikateşin miktarları ve antioksidan aktivite



Şekil 2. Sabit etanol miktarında (60 ml/ 100 ml çözücü) konsantrasyon ve ekstraksiyon süresinin gallik asit, katesin ve epikatesin miktarlarına etkileri için yanıt-yüzey ve kontur grafikleri

Figure 2. Response surface and contour plots for the effects of concentration and extraction time at a constant ethanol content (60 ml/ 100 ml solvent) on total gallic acid, catechin and epicatechin compound

değerleri sırasıyla 0.254 mg/g, 0.143 mg/g, 0.058 mg/g, 0.040 mg/g ve 67.90 $\mu\text{mol/ml}$ 'dir. Bu sonuçlar istenilen hedefe ulaşma fonksiyonu 0.855 olan koşullar seçilerek verilmiştir. Elde edilen sonuçlar Casazza vd. (24)'nin üzüm çekirdeklerinden etanol:su karışımı kullanarak yaptığı çalışmadaki değerlerden (55.98 ± 0.58 mg GAE/g, toplam fenolik) yüksek bulunmuştur. Medouni-Adrar vd. (25) ise %65 etanol içeren sulu ekstraksiyonda üzüm çekirdeğinin toplam fenolik miktarını 87.99-95.97 mg GAE/g aralığında belirlemiştir. Krishnaswamy vd. (26), üzüm çekirdeğinden %30 etanol içeren sulu ekstraksiyonda toplam fenolik miktarının 13.5 ± 0.48 mg GAE/g olduğunu rapor etmişlerdir.

SONUÇ

Katı-sıvı ekstraksiyon yönteminde ekstraksiyon etkinliğine etki eden pek çok faktör bulunmaktadır. Bu faktörlerin iyi bir şekilde belirlenmesi ve uygun deneysel tasarımın oluşturulması için yüzey-yanıt yöntemi etkin bir şekilde kullanılabilir. Bu

çalışmada, üzüm çekirdeğinden fenolik madde ekstraksiyonu üzerine çözücü sistemin, üzüm çekirdeği tozu konsantrasyonunun ve ekstraksiyon süresinin etkileri ile bu parametrelerin etkileşimleri incelenmiştir. Genel olarak, çözgen konsantrasyonu ve ekstraksiyon süresinin fenolik madde ekstraksiyonuna etki eden en önemli parametreler olduğu belirlenmiştir. Fenolik madde ekstraksiyonunun optimizasyonunda belirlenen istatistiksel modelde kullanılan bağımsız değişkenlerin, üzüm çekirdeği tozundan aktif bileşenlerin geri kazanımı ve değerlerinin belirlenmesi için yeterli olduğu belirlenmiştir. Bu model için belirlenen optimum koşullar, 60 ml etanol/100 ml çözücü sistem (etanol+su); 20 g üzüm çekirdeği/100 ml çözücü; 109 dk ekstraksiyon süresi şeklindedir. Optimum koşullar için elde edilen toplam fenolik madde miktarı, gallik asit, katesin, epikatesin miktarları ve antioksidan aktivite değerleri sırasıyla 0.254 mg/g, 0.143 mg/g, 0.058 mg/g, 0.040 mg/g ve $67.90 \mu\text{mol/ml}$ 'dir.

Çizelge 4. Üç faktörlü kompozit dizayn modelinde belirlenen optimum koşullarda elde edilen değerler

Table 4. Estimated values of three-factor design model at optimum conditions

Çözüm no Solution number	Etanol (ml/100 ml) Ethanol (ml/100ml)	Üzüm çekirdeği konsantrasyonu (g/100 ml) Grape seed concentration (g/100ml)	Ekstraksiyon süresi (dakika) Extraction period (minute)	Toplam fenolik (mg/g) Total phenolic (mg/g)	ORAC ($\mu\text{mol/ml}$) ORAC ($\mu\text{mol/ml}$)	Gallik asit (mg/g) Gallic acid (mg/g)	Katesin (mg/g) Catechin (mg/g)	Epikatesin (mg/g) Epicatechin (mg/g)
1	60	20	109	0.254	64.90	0.143	0.058	0.040
(D=0.855)*								

*İstenilen hedefe ulaşma fonksiyonu *Desirability function

KAYNAKLAR

1. Vatai T, Skerget M, Knez Z, Kareth S, Wehowski M, Weidner E. 2008. Extraction and formulation of anthocyanin-concentrates from grape residues. *J Supercrit Fluids*, 45(1): 32-36.
2. Ghafoor K, Park J, Choi YH. 2010. Optimization of supercritical fluid extraction of bioactive compounds from grape (*Vitis labrusca B.*) peel by using response surface methodology. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 11: 485-490.
3. Lu Y, Foo LY. 1995. The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chem*, 65: 1-8.
4. Yu J, Ahmedna M. 2013. Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. *Int J Food Sci Technol*, 48: 221-237.
5. Fortana AR, Antonioli A, Bottini R. 2013. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics. *J Agric Food Chem*, 61: 8987-9003.
6. Boussetta N, Vorobiev E, Le LH, Cordin-Falcimaigne A, Lanoiselle JL. 2012. Application of Electrical Treatments in Alcoholic Solvent for Polyphenols Extraction From Grape Seeds. *Food Sci Technol (N Y)*, 4: 127-134.
7. Bucic-Kojic A, Planinic M, Tomas S, Bilic M, Velic D. 2007. Study of Solid-Liquid Extraction Kinetics of Total Polyphenols From Grape Seeds. *J Food Eng*, 81: 236-242.
8. Carrera C, Ruiz-Rodriguez A, Palma M, Barroso CG. 2012. Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds From Grapes. *Anal Chim Acta*, 732: 100-104.
9. Makris DP, Boskou G, Chiou A, Andrikopoulos NK. 2008. An Investigation on Factors Affecting Recovery of Antioxidant Phenolics and Anthocyanins From Red Grape (*Vitis vinifera*) Pomace Employing Water/Ethanol-Based Solutions. *Am J Food Technol*, 3: 164-173.
10. Jeganathan PM, Venkatachalam S, Karichappan T, Ramasamy S. 2014. Model Development and Process Optimization for Solvent Extraction of Polyphenols From Red Grapes Using Box Behnken Design. *Prep Biochem Biotechnol*, 44: 56-67.
11. Torres JL, Varela B, Garcia MT, Carilla J, Matito C, Centelles JJ, Cascante M, Sort X, Bobet R. 2002. Valorization of grape (*Vitis vinifera*) by products. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyandin composition and flavonol content. *J Agric Food Chem*, 50: 7548-7555.
12. Kallithraka S, Garcia-Viguera C, Bridle P, Bakker J. 1995. Survey of solvents for the extraction of grape seed phenolics. *Phytochem Anal*, 6: 265-267.
13. Bordiga M, Travaglia F, Locatelli M, Coisson JD, Marco Arlorio M. 2011. Characterization of polymeric skin and seed proanthocyanidins during ripening in six *Vitis Vinifera L.* CV. *Food Chem*, 127: 180-187.
14. Katalinic V, Mozina SS, Skroza D, Generalic I, Abramovic H, Milos M, Ljubenkovic I, Piskernik S, Pezo I, Terpin P, Boban M. 2010. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chem*, 119: 715-723.
15. Rivera-Dominguez M, Yahia EM, Wlodarchak N, Kushad M. 2010. Identification and quantification of phenolic compounds in grapes. *Acta Hort*, 877: 1233-1240.
16. Dahmoune F, Spigno G, Moussi K, Remini H, Cherbal A, Madani K. 2014. Pistacia lentiscus leaves as a source of phenolic compounds: microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Ind Crops Prod*, 61: 31-40.
17. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 299: 152-178.
18. Sanchez-Moreno C. 2002. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Sci Technol Int*, 8(3): 121-137.
19. Yılmaz Y, Göksel Z, Erdoğan SS, Öztürk A, Atak A, Özer C. 2015. Antioxidant Activity and Phenolic Content of Seed, Skin and Pulp Parts of 22 Grape (*Vitis vinifera L.*) Cultivars (4 Common and 18 Registered or Candidate for Registration). *J Food Process Pres*, 39(6): 1682-1691.
20. Garcia-Jares C, Vazquez A, Lamas JP, Pajaro M, Alvarez-Casas M, Lores M. 2015. Antioxidant White Grape Seed Phenolics: Pressurized Liquid Extracts from Different Varieties. *Antioxidants*, 4(4): 737-749.
21. Galanakis CM. 2012. Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends Food Sci Technol*, 26: 68-87.
22. Libran CM, Mayor L, Garcia-Castello EM, Vidal-Brotons D. 2013. Polyphenol Extraction From Grape Wastes: Solvent and pH Effect. *Agric Sci*, 4: 56.
23. Makris DP, Passalidi V, Kallithraka S, Mourtzinis I. 2016. Optimization of polyphenol extraction from red grape pomace using aqueous glycerol/tartaric acid mixtures and response surface methodology. *Prep Biochem Biotechnol*, 46(2): 176-182.
24. Casazza AA, Aliakbarian B, Mantegna S, Cravotto G, Perego P. 2010. Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques. *J Food Eng*, 100: 50-55.
25. Medouni-Adrar S, Boulekbache-Makhlouf L, Cadot Y, Medouni-Haroune L, Dahmoune F, Makhoukhe A, Madani K. 2015. Optimization of the recovery of phenolic compounds from Algerian grape by-products. *Ind Crop Prod*, 77: 123-132.
26. Krishnaswamy K, Orsat V, Gariépy Y, Thangavel K. 2013. Optimization of microwave-assisted extraction of phenolic antioxidants from grape seeds (*Vitis vinifera*). *Food Bioprocess Technol*, 6(2): 441-455.

BEBEK MAMALARINDA DİREKT PCR YÖNTEMİ İLE *CRONOBACTER SPP.* TESPİTİ

Gökçe Polat Yemiş^{1*}, İbrahim Çakır² A. Kadir Halkman³

¹Sakarya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Sakarya

²Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bolu

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

Geliş tarihi / Received: 16.04.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 20.06.2016

Kabul tarihi / Accepted: 12.07.2016

Özet

Cronobacter spp., bebeklerde ve çocuklarda hayati tehlike yaratan menenjit, sepsis ve nekrotizan enterokolit enfeksiyonlarının önemli bir sebebidir. Çeşitli klinik vakalarda *Cronobacter* spp. enfeksiyonu ile bebek maması tüketimi epidemiyolojik olarak ilişkili bulunmuştur. Bu çalışmada bebek mamasında patojenin hızlı tanısı için direkt PCR yöntemi üzerine modifikasyon çalışmaları yapılmıştır. Bebek mamasında direkt PCR yöntemi ile 10^2 KOB/mL düzeyinde ve 4 saatlik ön zenginleştirme sonrasında uygulanan PCR yöntemi ile 1 KOB/mL seviyesinde *Cronobacter* spp. belirlenebilmiştir. *Cronobacter* spp. tespitinde uygulanan PCR yönteminin kültürel belirleme yöntemlerine oranla daha hızlı ve daha duyarlı olduğu saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: *Cronobacter* spp., bebek maması, izolasyon, PCR

DETECTION OF *CRONOBACTER SPP.* IN POWDERED INFANT FORMULA BY PCR

Abstract

Cronobacter spp. causes meningitis, sepsis, and necrotizing enterocolitis in neonates and infants. *Cronobacter* spp. infections have been epidemiologically associated with consumption of reconstituted powdered infant formula. In this study, the modified PCR method for the rapid detection of *Cronobacter* spp. were performed. Detection limit of PCR assay for *Cronobacter* spp. was determined to be 10^2 CFU/mL directly and 1 CFU/mL after 4-h of enrichment step in infant formula. The result showed that the modified PCR based technique described in this study was found more rapid and sensitive than the conventional methods for detection of *Cronobacter* spp. from infant formula.

Keywords: *Cronobacter* spp., infant formula, isolation, PCR

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ gokceyemis@sakarya.edu.tr, ☎ (+90) 264 295 7038, 📠 (+90) 264 295 5601

Bu makale Gökçe Polat Yemiş'in Doktora tezinin bir bölümünden üretilmiştir. This paper is a part of Gökçe Polat Yemiş's Ph. D. thesis.

GİRİŞ

Son yıllarda önemi artan bir patojen olan *Cronobacter* spp. (eski adı ile *Enterobacter sakazakii*), bebeklerde hayati risk oluşturan menenjit, sepsis ve nekrotizan enterokolit enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Henüz tam olgunlaşmamış bağırsak yapısına sahip olan prematüre, 28 günden küçük, düşük doğum ağırlığına sahip ve medikal bakım gören bebekler *Cronobacter* spp. enfeksiyonu riski altındadır (1-3). *Cronobacter* spp. enfeksiyonunun görülme oranı 12 aydan küçük bebekler için 1/100 bin iken, düşük doğum ağırlığına (<1500 g) sahip bebeklerde bu oran 9.4/100 bin'dir. Doğal yaşam alanı bilinmemekle beraber; bakteri gıdadan, çevreden ve farklı klinik kaynaklardan izole edilmiştir. Yenidoğan bebeklerde görülen enfeksiyonlar sebebiyle *Cronobacter* spp.'nin, bebek maması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Salgınlar da çoğunlukla yenidoğan bakım ünitelerinde gerçekleşmektedir. *Cronobacter* spp. ozmotik ortam ve kurutma gibi çevresel stres koşullarına diğer *Enterobacteriaceae* üyelerine kıyasla daha dirençlidir ve düşük su aktivitesine sahip olan bebek mamasında (0.25-0.5 a_w) uzun süre canlılığını korumaktadır. Ancak, epidemiyolojik araştırmalar bebek mamasının yanı sıra, hastane ortamlarında mamaların hazırlanması için kullanılan araç ve gereçleri de kontaminasyon kaynağı olarak göstermiştir (4-8).

Uluslararası Mikrobiyolojik Spesifikasyonlar Komisyonu (International Commission on Microbiological Specifications for Foods; ICMSF) *Cronobacter* spp.'yi potansiyel olarak yaşamı tehdit eden ya da önemli kronik sekellere yol açan ciddi bir tehlike olarak tanımlamış ve *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* tip A ve tip B gibi gıda kaynaklı ya da *Cryptosporidium parvum* gibi su kaynaklı patojenler ile aynı grupta yer almasına karar vermiştir. Bakterinin, yeni doğmuş bebeklerin üst gastrointestinal sistemlerinde düşük pH koşullarıyla karşılaşmayacağı ve hızla ince bağırsaklara geçerek enfeksiyona neden olabileceği belirtilmiştir.

Cronobacter spp. ilk kez 1958 yılında İngiltere'de iki bebeğin ölümü ile sonuçlanan bir salgında yenidoğanlarla ilişkilendirilmiştir. Son dönemde yapılan araştırmalarda ise *Cronobacter* türleri içerisinde yalnızca *C. sakazakii*, *C. malonaticus* ve *C. turicensis*'in neonatal enfeksiyonlarla ilişkili

olduğu bildirilmiştir (2, 4, 6, 9). Bakteri, en çok yeni doğmuş bebekler ve 3 günlük ile 4 yaş arası çocuklarda hastalığa neden olarak kendini göstermiş olup, hastalığa yakalanan bebeklerde ölüm oranının % 40-80 olduğu ve hayatta kalanlar için süregelen sorunların nörolojik rahatsızlıklarla sonuçlanabildiği bildirilmiştir (10). Bunun üzerine toz bebek maması kullanımı ile ortaya çıkan enfeksiyon riskini azaltmak için uygun stratejilerin uygulamasına yönelik çabalar artmıştır.

Son yıllarda *Cronobacter* spp. izolasyonunda var olan yöntemlere alternatif daha hızlı, etkin ve güvenilir yöntem arayışına gidilmiş ve bu konuda araştırmalar yoğunluk kazanmıştır. Patojenlerin analizinde kullanılan klasik yöntemlerde analiz sürelerinin uzunluğu önemli bir dezavantajdır. Moleküler teknikler, bakterilerin tanımlanması, karakterizasyonu ve sınıflandırılmasında büyük öneme sahiptir. Bu nedenle patojen mikroorganizmaların tespitinde DNA'ya dayalı teknikler oldukça önem kazanmış ve özellikle PCR tekniği klasik yöntemlerin yerini alabilecek hızlı ve duyarlı bir alternatif olarak öne çıkmıştır. *Cronobacter* spp.'nin genetik tiplendirme çalışmalarında tüm gen bölgelerinin analizine imkân sağlayan, sınıflandırma ve karakterizasyonda oldukça hızlı bir yöntem olan PCR temelli teknikler kullanılmaktadır. Ribozomal 16S rRNA geni, 16S ve 23S rRNA genleri arasında yer alan ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgesi ile *thdF*, *rpoA*, *rpoB*, *ompA*, *recN* ve *gluA* gibi hedef genler *Cronobacter* spp.'nin tanımlanmasında kullanılan genlerdir (11-21).

Bu araştırmada direkt PCR uygulaması ile bebek mamasında *Cronobacter* spp.'nin tespitinde klasik kültürel belirleme yöntemine kıyasla daha hızlı ve duyarlı bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Bebek maması

Materyal olarak kullanılan toz bebek maması (başlangıç), Türkiye Atom Enerjisi Kurumu'nda (TAEK, SANAEM, Ankara) 10 kGy dozda ışınlanarak sterilize edilmiştir.

Bakteri kültürü

Araştırmada, *C. muytjensii* ATCC 51329, *C. sakazakii* (bebek ek gıdasından izole edilerek moleküler tanısı gerçekleştirilen suş G73), bakteri kültürleri kullanılmıştır. *Cronobacter* türlerine özgü primerlerin spesifikliğini tespitinde ise referans

bakteri kültürleri olarak *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus cereus* kullanılmıştır. -20°C'ta dondurularak muhafaza edilen bakteri kültürleri denemelerden önce Tryptic Soy Broth (TSB, Merck) besiyerine inoküle edilmiş ve 37°C'ta 24 saat inkübe edilerek aktive edilmiştir.

Bebek maması örneklerinin inokülasyonu

Bebek maması, üretici firmanın hazırlama talimatı doğrultusunda steril su ile hazırlanmıştır. Geri alma çalışmalarında belirli sayıda (10^1 - 10^6 KOB/mL) *C. muytjensii* ATCC 51329 suşu steril bebek mamasına katılıp homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra herhangi bir ön zenginleştirme işlemi yapılmaksızın buradan alınan örnekte hedef bakterinin hangi sayıda geri alınabileceği tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu belirlemeler DNA izolasyon kiti kullanılarak ve kaynatma yöntemi ile ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. İkinci aşamada steril bebek maması örnekleri standart suş ile inoküle edilmiş (yaklaşık 10^0 , 10^1 ve 10^2 KOB/mL) ve 4; 6 ve 8 saatlik ön zenginleştirme işlemi uygulanarak hedef bakterinin direkt PCR yöntemi ile belirlenmesi için gerekli optimum ön zenginleştirme süresi saptanmıştır.

DNA izolasyonu

C. muytjensii ATCC 51329 standart suşu inoküle edilmiş bebek mamalarından DNA izolasyonu iki farklı yöntemle gerçekleştirilmiştir. Birinci yöntemde bebek mamasından *C. muytjensii* ATCC 51329 DNA izolasyonu Fermantas Genomic DNA Purification Kit #K0512 yardımıyla gerçekleştirilmiştir. DNA kiti ile izolasyon için 5 mL bebek maması örneği 12000 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiş (Sigma 3K30) ve elde edilen pelet 200 µL Tris-EDTA (TE)'da çözülmüştür. Daha sonra 400 µL lizis çözültisi eklenerek 65 °C'ta 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 600 µL kloroform eklenerek 12000 x g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. İşlem sonrasında üst faz alınıp 800 µL presipitasyon çözültisi eklenerek 12000 x g'de 2 dakika yeniden santrifüj edilmiş ve süpernatant tamamen uzaklaştırılmıştır. Elde edilen DNA peleti 100 µL 1.2 M NaCl'de çözüldükten sonra üzerine 300 µL soğuk etanol eklenerek -20°C'ta 10 dakika bekletilmiştir. 12000 x g'de 4 dakika santrifüj işleminden sonra etanol uzaklaştırılıp pelet 50-100 mL TE içerisinde çözülmüştür. Ekstraktlar

kullanılınca kadar -20 °C'da muhafaza edilmiştir. İkinci yöntemde ise bebek maması örneğinde bulunan bakteriler kaynatma yöntemi ile lize edilerek DNA'ları açığa çıkarılmış ve buradan PCR aşamasına geçilerek hedef bakterinin varlığı tespit edilmeye çalışılmıştır (21). Bu amaçla 1 mL bebek maması örneği 16000 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiş (Sigma 3K30) ve elde edilen pelet 1 mL steril damıtık suda çözülmüştür. Elde edilen süspansiyon ısıtıcı blokta (Thermolyne 17600 Dri-Bath) 100 °C'ta 10 dakika kaynatıldıktan sonra 5000 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiş, süpernatanttan alınan 10 µL yeni bir Eppendorf tüpüne aktarılarak PCR işleminde kullanılmıştır.

DNA'nın PCR'da amplifikasyonu

PCR analizlerinde kullanılan 16S rRNA spesifik primerleri National Center for Biotechnology Information (NCBI) veri tabanında bulunan *Cronobacter* türlerine ait 16S rRNA dizileri ile karşılaştırılarak %100 homolojiyle uygunluğu belirlenmiştir. Belirlenen primer dizileri ile *Cronobacter* spp.'nin 16S rRNA gen bölgesinin 929 baz çiftlik (bç) bölümü çoğaltılmıştır. PCR reaksiyonunda kullanılan *Cronobacter* türlerine özgü primerlerin oligonükleotid dizilimi: Esak-F (Forward primer) 5' GCT YTG CTG ACG AGT GGC GG 3' ve Esak-R (Reverse primer) 5' ATC TCT GCA GGA TTC TCT GG 3' şeklindedir. PCR reaksiyon karışımı; 0.05 U/mL Taq DNA polimeraz, 4mM MgSO₄, 0.4 mM dATP, 0.4 mM dCTP, 0.4 mM dGTP ve 0.4 mM dTTP içeren PCR master mix (Fermantas), 50 µM forward primer (Thermo) ve 50 µM reverse primerden (Thermo) oluşmaktadır. Uygun konsantrasyonlardan oluşan reaksiyon karışımına PCR işlemi uygulanmıştır. PCR döngüsü; 94 °C'ta 2 dakika ön denatürasyon, 94 °C'ta 30 saniye, 58 °C'da 30 saniye, 72 °C'ta 30 saniye (50 döngü) ve 72 °C'ta 5 dakika son uzama olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Agaroz jel elektroforezi

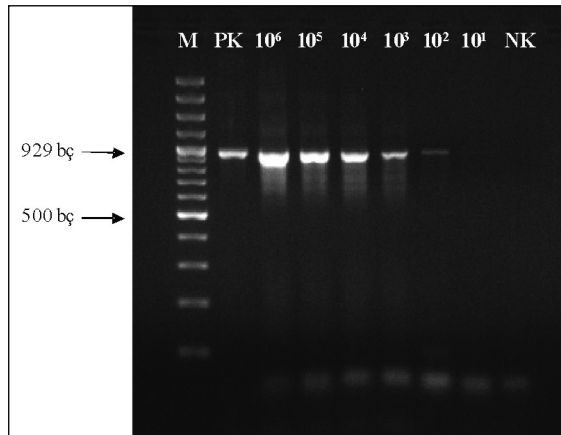
İzolasyonu yapılan DNA örnekleri için %1'lik agaroz jeller, PCR sonucunda elde edilen ampikonların analizi için %1.5'lik agaroz jeller kullanılmıştır. Agaroz, 1X TBE (Tris-Borik asit-EDTA; 10X TBE: 0.9M Tris, 0.9M Borik Asit ve 0.02M EDTA) tamponunda eritildikten sonra DNA'nın ultraviyole ışık altında görünmesini sağlayan etidyum bromür ilave edilerek tarak içeren elektroforez kasetine dökülmüştür. Jel polimerize olduktan sonra 1X TBE içeren elektroforez tankına yerleştirilmiştir. DNA örnekleri

ve PCR ürünlerinden 10'ar µL alınarak, 2'şer µL 6X yükleme boya çözeltisi (Fermantas) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklenmiş ve ilk kuyucuğa yüklenen 100 bç'lik DNA ladder (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder, Fermantas) eşliğinde 90V elektrik akımında yaklaşık 90 dakika yürütülmüştür. Daha sonra jel, jel görüntüleme sistemi ile bilgisayarda incelenerek görüntüleri kaydedilmiştir (Gel Logic 200 Imaging System, Kodak).

SONUÇ ve TARTIŞMA

Bebek mamalarından *Cronobacter* spp. tespitinde direkt PCR yönteminin duyarlılığı

Geri alma çalışmalarında belirli sayıda (10^1 - 10^6 KOB/mL) *C. muytjensii* ATCC 51329, bebek maması ortamına katılıp homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra buradan alınan örnekte direkt PCR yöntemi ile hedef bakterinin hangi sayıda geri alınabileceği tespit edilmiştir. Hedef bakterinin tespiti DNA izolasyon kiti ve kaynatma işlemi olmak üzere iki farklı yöntemle gerçekleştirilmiştir. Ön zenginleştirme işlemi uygulanmaksızın DNA izolasyon kiti ile DNA izolasyonu gerçekleştirilen ve ardından PCR uygulanan örneklerin agaroz jel görüntüleri Şekil 1'de verilmiştir. Bu yöntem ile bebek mamalarında en düşük 10^2 KOB/mL düzeyinde bakteri kontamine edilen bebek

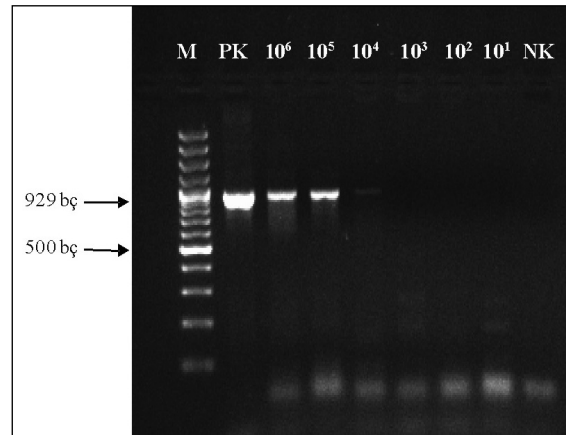


Şekil 1. Rekonstitüe bebek mamasında direkt PCR yöntemi ile *Cronobacter* spp. tespiti (DNA izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirilen yöntem). M: Marker (100 bp DNA ladder), PK: Pozitif Kontrol (*C. muytjensii* ATCC 51329 DNA'sından çoğaltılmış PCR ürünü), NK: Negatif Kontrol

Figure 1. Direct detection of *Cronobacter* spp. in reconstituted infant formula by PCR (DNA Isolation Method I). PCR products amplified from infant formula containing 10^1 to 10^6 CFU/mL of *C. muytjensii* ATCC 51329. M: Molecular weight marker (100 bp DNA ladder), PK: Positive control (PCR products amplified from *C. muytjensii* ATCC 51329 DNA). NK: Negative control (PCR run without any template DNA)

mamasından DNA izolasyonu gerçekleştirilirken, 10^1 KOB/mL düzeyinde bakteri kontamine edilen bebek mamalarından izole edilen DNA örnekleri jelde gözlenmemiştir. Bebek mamasında *Cronobacter* spp. tespitinde DNA izolasyon kiti ile elde edilen en düşük belirleme limiti (10^2 KOB/mL) Wang ve ark. (22) tarafından bildirilen değere (1.2×10^3 KOB/mL) göre daha düşük olmasına karşın Seo ve Brackett (23) tarafından belirlenen değerle (1.0×10^2 KOB/mL) oldukça benzerlik göstermektedir.

Belirli sayıda *C. muytjensii* ATCC 51329 standart suşu ile kontamine edilmiş bebek mamalarından DNA izolasyonu yapılmadan, kaynatılarak elde edilen hücre lizatından hazırlanan süpernatant, kalıp DNA olarak kullanılmış ve bu örnekler de spesifik primerler kullanılarak PCR işlemi uygulanmıştır. Bu örneklerle ait PCR ürünlerinin jel görüntüsü Şekil 2'de verilmiştir. Uygulanan bu yöntem ile bebek mamalarında *Cronobacter* spp. tespitinde limit değer 10^4 KOB/mL olarak belirlenmiştir. 10^1 ; 10^2 ve 10^3 KOB/mL düzeyinde yapılan kontaminasyonlardan hazırlanan jellerde özgün bant gözlenmemiştir. Sonuçlar incelendiğinde direkt PCR yöntemi ile *Cronobacter* spp. tespitinde, DNA izolasyon kiti ile uygulanan yöntemin kaynatma yöntemine göre daha duyarlı olduğu saptanmıştır.



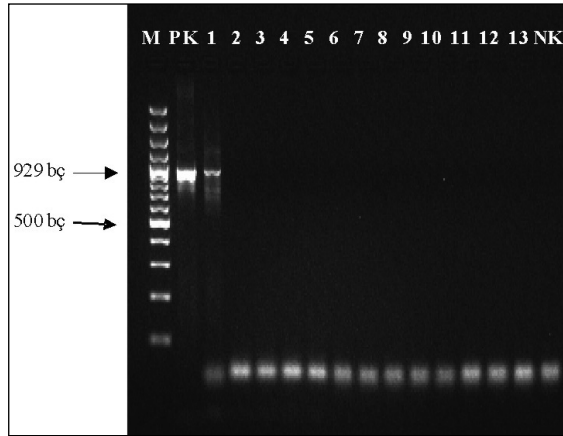
Şekil 2. Rekonstitüe bebek mamasından direkt PCR yöntemi ile *Cronobacter* spp. tespiti (kaynatma yöntemi). M: Marker (100 bp DNA ladder), PK: Pozitif Kontrol (*C. muytjensii* ATCC 51329 DNA'sından çoğaltılmış PCR ürünü), NK: Negatif Kontrol

Figure 2. Direct detection of *Cronobacter* spp. in reconstituted infant formula by PCR (DNA Isolation Method II). PCR products amplified from infant formula containing 10^1 to 10^6 CFU/mL of *C. muytjensii* ATCC 51329. M: Molecular weight marker (100 bp DNA ladder), PK: Positive control (PCR products amplified from *C. muytjensii* ATCC 51329 DNA). NK: Negative control (PCR run without any template DNA)

Araştırma kapsamında PCR analizlerinde kullanılan, *Cronobacter* türlerine özgü 16S rRNA gen bölgesinin 929 bç'lik DNA fragmentini çoğaltan primerlerin spesifikliğı belirlenmiştir (Şekil 3). Bu amaçla *C. mytjensii* ATCC 51329 standart suşu dışında bebek maması ve ek gıda bileşenlerinden yaygın olarak izole edilen ve tanımlanan bakteriler ile özellikle bebeklerde potansiyel enfeksiyon etkeni bakteriler referans olarak kullanılmıştır. Belirli sayıda (10^6 KOB/mL) test bakterileri ile kontamine edilmiş bebek mamasında yapılan direkt PCR sonrasında *C. mytjensii* ATCC 51329 ve sekans analizi sonucu *C. sakazakii* olarak tanımlanan G73 kodlu suş dışında diğer bakteriler için jelde bant gözlenmemiş ve kullanılan primerlerin *Cronobacter* spp. için spesifik olduğu belirlenmiştir.

Ön zenginleştirme sonrası direkt PCR yöntemi ile bebek mamalarından *Cronobacter* spp. tespiti

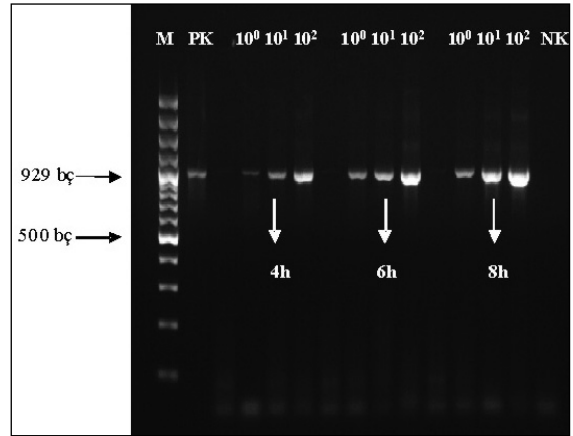
Yapılan çalışmalarda *Cronobacter* spp.'nin bebek mamalarındaki kontaminasyon düzeyinin oldukça düşük sayılarda (0,36-66 KOB/100 g) olduğu bildirilmiştir (1). Bu nedenle *Cronobacter* spp.



Şekil 3. *Cronobacter* türlerine özgü primerlerin spesifikliğinin tespiti. M: Marker (100 bp DNA ladder), PK: Pozitif Kontrol (*C. mytjensii* ATCC 51329 DNA'sından çoğaltılmış PCR ürünü), 1: *C. sakazakii* (G73), 2: *E. cloacae*, 3: *E. aerogenes*, 4: *E. coli*, 5: *K. pneumoniae*, 6: *K. oxytoca*, 7: *A. baumannii*, 8: *C. freundii*, 9: *S. Enteritidis*, 10: *P. aeruginosa*, 11: *B. cereus*, 12: *S. aureus*, 13: *L. monocytogenes*, NK: Negatif Kontrol (PCR run without any template DNA)

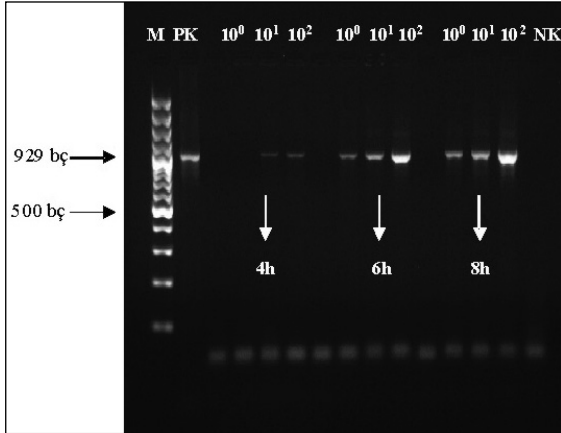
tespitine yönelik mevcut yöntemlerde bakterinin geri kazanım oranını artırmak için zenginleştirme işlemi uygulanmaktadır. Araştırma kapsamında bebek maması örneklerinde, selektif olmayan ön zenginleştirme ortamında (rekonstitüe bebek maması) 37 °C'ta 4; 6 ve 8 saatlik inkübasyon süreleri kullanılarak yaklaşık 10^0 ; 10^1 ve 10^2 KOB/mL seviyesindeki hedef bakterinin direkt PCR yöntemi ile belirlenmesi için gerekli en kısa ön zenginleştirme süresi saptanmıştır. Belirli sayıda bakteri ile kontamine edilmiş ve ön zenginleştirme işlemine tabi tutulmuş bebek maması örneklerinden DNA izolasyon kiti ve kaynatma yöntemi ile DNA izolasyonu yapılmış, ardından PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu örneklerle ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri Şekil 4 ve Şekil 5'de verilmiştir.

DNA izolasyon kiti kullanılarak kontamine edilmiş bebek mamalarında yalnızca 4 saatlik ön zenginleştirme işleminin uygulanması ile 1 KOB/mL seviyesinde *Cronobacter* varlığı tespit edilebilmiştir (Şekil 4). Buna karşın kaynatma yöntemi uygulanarak gerçekleştirilen direkt PCR yöntemi ile 4 saatlik ön zenginleştirme işlemi sonrasında 10 KOB/mL seviyesinde *Cronobacter*



Şekil 4. Rekonstitüe bebek mamasından ön zenginleştirme sonrası direkt PCR yöntemi ile *Cronobacter* spp. tespiti (DNA izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirilen yöntem). M: Marker (100 bp DNA ladder), PK: Pozitif Kontrol (*C. mytjensii* ATCC 51329 DNA'sından çoğaltılmış PCR ürünü), NK: Negatif Kontrol

Figure 4. Detection of *Cronobacter* spp. in reconstituted infant formula by PCR after an enrichment step (DNA Isolation Method I). PCR products amplified from infant formula containing 10^0 to 10^2 CFU/mL of *C. mytjensii* ATCC 51329. M: Molecular weight marker (100 bp DNA ladder), PK: Positive control (PCR products amplified from *C. mytjensii* ATCC 51329 DNA). NK: Negative control (PCR run without any template DNA).



Şekil 5. Rekonstitüe bebek mamasından ön zenginleştirme sonrası direkt PCR yöntemi ile *Cronobacter* spp. tespiti (kaynatma yöntemi). M: Marker (100 bp DNA ladder), PK: Pozitif Kontrol (*C. muytjensii* ATCC 51329 DNA'sından çoğaltılmış PCR ürünü), NK: Negatif Kontrol
Figure 5. Detection of *Cronobacter* spp. in reconstituted infant formula by PCR after an enrichment step (DNA Isolation Method II). PCR products amplified from infant formula containing 10^0 to 10^2 CFU/mL of *C. muytjensii* ATCC 51329. M: Molecular weight marker (100 bp DNA ladder), PK: Positive control (PCR products amplified from *C. muytjensii* ATCC 51329 DNA). NK: Negative control (PCR run without any template DNA).

belirlenebilirken, 6 saatlik ön zenginleştirme sonrasında *Cronobacter* tespitinde limit değer 1 KOB/mL olarak saptanmıştır (Şekil 5). Ön zenginleştirme işlemi sonrası direkt PCR yöntemi ile *Cronobacter* tespitinde, DNA izolasyon kiti ile gerçekleştirilen yöntemin (4 saatlik bir ön zenginleştirme ile 1 KOB/mL duyarlılıkta tespit) kaynatma yöntemine göre daha duyarlı olduğu ve bu yöntemde daha kısa bir ön zenginleştirme süresine ihtiyaç duyulduğu saptanmıştır. Buna karşın analiz maliyeti göz önüne alındığında 6 saatlik bir ön zenginleştirme ile kaynatma yönteminin (1 KOB/mL duyarlılıkta) daha avantajlı bir yöntem olduğu belirlenmiştir.

Cronobacter spp. tespitinde PCR yönteminin, kültürel belirleme yöntemlerine göre etkinliği, birçok araştırmacı tarafından karşılaştırmalı olarak araştırılmış ve PCR yönteminin, kültürel belirleme yöntemlerine oranla daha hızlı ve daha duyarlılıkta sonuç verdiği bildirilmiştir. Gutierrez-Rojo ve Torres-Chavollo (24) tarafından yapılan çalışmada, direkt PCR yöntemi ile 10^5 KOB/mL düzeyinde *Cronobacter* spp. tespit edilirken, 8 saatlik selektif zenginleştirme ile yapılan PCR sonucunda 1 KOB/mL düzeyinde *Cronobacter* spp. saptanmıştır.

Araştırmacılar tarafından 50 bebek maması örneği klasik yöntem ve direkt PCR yöntemi ile analiz edilmiş ve analiz sonrasında PCR yöntemi ile 39 örnekte *Cronobacter* spp. pozitif olarak doğrulanırken, klasik yöntemde 31 örnekte pozitif olarak doğrulanmıştır. 16S-23S rDNA genini kodlayan ITS gen bölgeleri hedef alınarak yapılan başka bir çalışmada, TaqMan prob ve SYBR Green temelli olmak üzere iki farklı real-time PCR tekniği ile *Cronobacter* spp. toz bebek maması örneklerinde 1.1 KOB/100 g seviyesinde tespit edilebilmiştir (12). Mohan Nair ve Venkitanarayanan (21), tarafından yapılan çalışmada, bebek mamasında direkt PCR yöntemi ile 10^3 KOB/mL düzeyinde ve 8 saatlik zenginleştirme sonrasında 0.1 KOB/mL düzeyinde *Cronobacter* spp. belirlenmiştir. Zimmermann ve ark. (14) tarafından real-time PCR ve *ompA* hedef geni kullanılarak toz bebek mamasında *Cronobacter* spp.'nin hızlı tespitine yönelik yapılan diğer bir çalışmada, brain heart infusion (BHI) broth besiyerinde 12 saatlik zenginleştirme ile 10 KOB/g düzeyinde hedef bakteri tespit edilmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada ise, kantitatif real-time PCR ile *cgcA* hedef geni ve TaqMan prob kullanılarak, toz bebek mamasında zenginleştirme işlemi yapılmaksızın 1100 KOB/g, tamponlanmış peptonlu suda gerçekleştirilen 6 saatlik zenginleştirme sonrasında ise 2 KOB/25 g (0.08 KOB/g) düzeyinde *C. sakazakii* belirlenebilmiştir (25).

Standart kültürel yöntemle (ISO/TS 22964) *Cronobacter* spp. izolasyonu ve biyokimyasal identifikasyonu için 6 günlük bir zaman dilimine ihtiyaç duyulmaktadır (26). Bu çalışmada, bebek mamasından *Cronobacter* spp. tespitinde (1 KOB/mL düzeyinde) uygulanan direkt PCR yöntemi ile kit kullanılarak yalnızca 10 saat, kaynatma yöntemi ile ise yalnızca 12 saat sonunda sonuç alınabilmektedir. Biyokimyasal izolasyon ve tanı yöntemleri kullanılarak yapılan kültüre dayalı yöntemlerin bazı dezavantajları vardır. Bunlar; izolasyon ve tanı için uzun zaman gereksinimi, tür düzeyinde kesin tanı yapılmasında karşılaşılan yanlış negatif sonuçlar ve belki de en önemlisi hasar görmüş mikroorganizmaların kültürel yöntemlerle geliştirilmesinde karşılaşılan zorluklardır. Bu ve benzeri nedenlerle gıdalardan patojen mikroorganizmaların aranmasında direkt PCR yönteminin kullanılması son zamanlarda üzerinde çok durulan bir konudur. Klinik

mikrobiyolojide patojenlerin izolasyonunda PCR temeline dayalı yöntemler patojen aranmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin diğer bazı avantajları da canlı fakat kültürü yapılamayan (viable but non-culturable; VBNC) mikroorganizmaların da belirlenmesine olanak sağlamakta, aynı anda çok sayıda örnek ile çalışılmasına olanak tanımaktadır. Yüksek duyarlılık ve seçicilik gibi avantajlarının yanı sıra, hızlı ve otomasyona uyum sağlayan bir yöntem olarak kabul edilmektedir (27).

Araştırma sonunda, *Cronobacter* spp. tespitinde klasik kültürel yöntemlere göre daha kısa sürede ve yüksek duyarlılıkta sonuç veren PCR bazlı bir yöntem geliştirilmiştir. Kontamine edilmiş bebek mamalarında yalnızca 4 saatlik bir ön zenginleştirme sonrası uygulanan direkt PCR yöntemi ile 1 KOB/mL düzeyinde hedef bakteri belirlenebilmiştir. Bebek mamalarının *Cronobacter* spp. ile kontaminasyon düzeyinin oldukça düşük olduğu göz önüne alındığında kısa süreli bir zenginleştirme işlemi ile kombine edilerek uygulanan PCR yönteminin, bebek mamalarında *Cronobacter* spp. tespitinde başarılı bir şekilde kullanılabileceği ortaya konmuştur.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu tarafından desteklenen projenin (08B4343004) bir bölümünü oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Healy B, Cooney S, O'Brien S, Iversen C, Whyte P, Nally J, Callanan JJ, Fanning S. 2010. *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*): An opportunistic foodborne pathogen. *Foodborne Pathog Dis*, 7(4): 339-347.
2. Holy O, Forsythe S. 2014. *Cronobacter* spp. as emerging causes of healthcare-associated infection. *J Hosp Infect*, 86: 169-177.
3. Gurtler JB, Kornacki JL, Beuchat LR. 2005. *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. *Int J Food Microbiol*, 104: 1-34.
4. Forsythe SJ. 2005. *Enterobacter sakazakii* and other bacteria in powdered infant milk formula. *Matern Child Nutr*, 1: 44-50.
5. Dancer GI, Mah JH, Rhee MS, Hwang IG, Kang DH. 2009. Resistance of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) to environmental stresses. *J Appl Microbiol* 107: 1606-1614.
6. Jaradat ZW, Al Mousa W, Elbetieha A, Al Nabulsi A, Tall DT. 2014. *Cronobacter* spp. – opportunistic food-borne pathogens. A review of their virulence and environmental-adaptive traits. *J Med Microbiol*, 63: 1023-1037.
7. Craven HM, McAuley CM, Duffy LL, Fegan N. 2010. Distribution, prevalence and persistence of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) in the nonprocessing and processing environments of five milk powder factories. *J Appl Microbiol*, 109 (3): 1044-1052.
8. Gurtler JB, Beuchat LR. 2007. Survival of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula as affected by composition, water activity, and temperature. *J Food Protect*, 70: 1579-1586.
9. Kucerova E, Clifton SW, Xia X-Q, Long F, Porwollik S, Fulton L, Fronick C, Minx P, Kyung K, Warren W, Fulton R, Feng D, Wollam A, Shah N, Bhonagiri V, Nash WE, Hallsworth-Pepin K, Wilson RK, McClelland M, Forsythe SJ. 2010. Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 and comparative genomic hybridization analysis with other *Cronobacter* species. *PLoS ONE*, 5(3): e9556.
10. Kandhai MC. 2010. Detection, occurrence, growth and inactivation of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). PhD. Thesis. Wageningen University, 240 p., Wageningen.
11. Lehner A, Nitzsche S, Breeuwer P, Deip B, Thelen K, Stephan R. 2006. Comparison of two chromogenic media and evaluation of two molecular based identification systems for *Enterobacter sakazakii* detection. *BMC Microbiol*, 6: 15.
12. Liu Y, Cai X, Zhang X, Gao Q, Yang X, Zheng Z, Luo M, Huang X. 2006. Real time PCR using TaqMan and SYBR Green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *J Microbiol Methods*, 65: 21-31.
13. Krascensicsova K, Trncikova T. 2008. Detection and quantification of *Enterobacter sakazakii* by real-time 5'-nuclease polymerase chain reaction targeting the pale gene. *Food Anal Method*, 1 (2): 85-94.

14. Zimmermann J, Schmidt H, Loessner MJ, Weiss A. 2014. Development of a rapid detection system for opportunistic pathogenic *Cronobacter* spp. in powdered milk products. *Food Microbiol*, 42: 19-25.
15. Stoop B, Lehner A, Iversen C, Fanning S, Stephan R. 2009. Development and evaluation of *rpoB*-based PCR systems to differentiate the six proposed species within the genus *Cronobacter*. *Int J Food Microbiol*, 136 (2): 165-168.
16. Pan Z, Cui J, Lyu G, Du X, Qin L, Guo Y, Xu B, Li W, Cui Z, Zhao C. 2014. Isolation and molecular typing of *Cronobacter* spp. in commercial powdered infant formula and follow-up formula. *Foodborne Pathog Dis*, 11 (6): 456-461.
17. Ye Y, Wu Q, Zhou Y, Dong X, Zhang J. 2008. Analysis of major band of *Enterobacter sakazakii* by ERIC-PCR and development of a species-specific PCR for detection of *E. sakazakii* in dry food samples. *J Microbiol Methods*, 75: 392-397.
18. Feer CF, Cernela N, Bolzan S, Lehner A, Stephan R. 2011. Evaluation of three commercially available real-time PCR based systems for detection of *Cronobacter* species. *Int J Food Microbiol*, 146 (2): 200-202.
19. Kuhnert P, Korczak BM, Stephan R, Joosten H, Iversen C. 2009. Phylogeny and prediction of genetic similarity of *Cronobacter* and related taxa by multilocus sequence analysis (MLSA). *Int J Food Microbiol*, 136: 152-158.
20. Ye Y, Ling N, Han Y, Cao X, Wu Q. 2015. Detection of *Cronobacter* on *gluB* gene and differentiation of four *Cronobacter* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism typing. *J Food Safety*, 35 (3): 422-427.
21. Mohan Nair MJ, Venkitanarayanan KS. 2006. Cloning and sequencing of the *ompA* gene of *Enterobacter sakazakii* and development of an *ompA*-targeted PCR for rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *Appl Environ Microbiol*, 72 (4): 2539-2546.
22. Wang X, Zhu C, Xu X, Zhou G. 2012. Real-time PCR with internal amplification control for the detection of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in food samples. *Food Control*, 25 (1): 144-149.
23. Seo KH, Brackett RE. 2005. Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay. *J Food Protect*, 68: 59-63.
24. Gutierrez-Rojo R, Torres-Chavollo E. 2007. A rapid polymerase chain reaction assay for *Enterobacter sakazakii* detection in infant milk formulas. *J Rapid Meth Aut Mic*, 15: 345-358.
25. Hu S, Yigang Y, Li R, Wu X, Xiao X, Wu H. 2016. Rapid detection of *Cronobacter sakazakii* by real-time PCR based on the *cgcA* gene and TaqMan probe with internal amplification control. *Can J Microbiol*, 62: 191-200.
26. Anon. 2006. Milk and milk products - Detection of *Enterobacter sakazakii*, International Standards Organization, ISO/TS 22964, 13 p.
27. Çakır İ, Çakmakçı ML. 2005. Gıdalarda patojen mikroorganizma aranmasında kullanılan moleküler yöntemler. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 3 (12): 1-7.

ENZİME DİRENÇLİ NİŞASTA ÜRETİM YÖNTEMLERİ VE GIDA ENDÜSTRİSİNDE KULLANIM AMAÇLARI

Cihadiye Candal, Özlem Kılıç, Mustafa Erbaş*

Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya

Geliş tarihi / Received: 13.01.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 08.04.2016

Kabul tarihi / Accepted: 14.04.2016

Özet

Gıdaların olası sağlık yararları üzerine artan toplum ilgisi, gıda endüstrisini fonksiyonel gıdaların geliştirilmesi yönünde teşvik etmektedir. Besleyici değeri bulunan ve sağlık için faydalı olan bu gıdaların üretiminde, birincil enerji kaynağı olan karbonhidratlar büyük önem arz etmektedir. Temel bir karbonhidrat ve bitkisel gıda bileşeni olan nişasta gıdalara önemli fonksiyonel gıda özellikleri kazandırabilmektedir. Enzime dirençli nişasta (EDN) sağlıklı insanların ince bağırsaklarında sindirime direnç gösteren nişasta olarak tanımlanmakta ve bu özelliği ile diyet lif gibi davranması sayesinde fonksiyonel gıda katkısı olarak gıdalarda kullanılabilmesi nedeniyle nişastanın fonksiyonel gıda özelliğine en önemli örneklerden birini teşkil etmektedir. EDN; hidrotermal işlemler, mikrodalga uygulaması, ekstrüzyon işlemi, ultrasonikasyon işlemi, enzim uygulaması, kimyasal uygulamalar ve tüm bu işlemlerin bir veya birkaçının kombinasyonu kullanılarak üretilmekte ve çeşitli gıdalara katılarak fonksiyonel gıda üretiminde kullanılabilir.

Anahtar kelimeler: Fonksiyonel gıda, enzime dirençli nişasta (EDN), diyet lif

ENZYME RESISTANT STARCH PRODUCTION METHODS AND ITS INTENDED PURPOSES IN FOOD INDUSTRY

Abstract

Increasing public attention on the potential health benefits of foods has encouraged the food industry to develop functional foods. Carbohydrates, the primary energy source, have a great importance in production of these nutritious and healthful foods. Starch is a basic herbal food ingredient and carbohydrate and it gives important functional food properties to the foods. Enzyme resistant starch (ERS) is defined as the starch that resists to digestion at small intestine of healthy humans, by this means it acts like dietary fibers. It constitutes one of the greatest example to the functional food properties of starch because ERS can be used as functional food additives in foods. ERS is produced using hydrothermal process, microwave treatment, extrusion process, ultrasonication process, enzyme treatment, chemical treatments and the combination of one or some of these processes and it can be used in production of functional food with its addition to various foods.

Keywords: Functional food, enzyme resistant starch (ERS), dietary fibre

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ erbas@akdeniz.edu.tr,

☎ (+90) 242 310 6575,

☎ (+90) 242 310 6309

GİRİŞ

Günümüzde insanlar, daha sağlıklı ve kaliteli yaşam düzeylerine ulaşmak için sağlık sorunlarını tedavi ettirmek yerine önleyici tedbirler almayı tercih etmektedirler. Beslenme şekli ve tercihi sağlıklı bir yaşam için bu önleyici tedbirlerin en başında gelenidir. Bu nedenle tüketicilerin besleyici özelliğinin yanı sıra sağlığı da geliştirici özelliğe sahip gıdalar olarak tanımlanan fonksiyonel gıdalara olan talebi (1, 2, 3), uluslararası gıda endüstrisini sağlığa faydalı yenilikçi gıda ürünleri geliştirme yönünde daha çok araştırma yapmaya yöneltmiştir (3, 4). Diyabet, kardiyovasküler rahatsızlık ya da obezite gibi kronik rahatsızlıklarla olan ilişkisi sebebiyle de gıdaların glisemik indeks değerleri, bu kapsamda yoğun olarak ele alınan güncel araştırma konularından birisi olmuştur (5). Karbonhidratların, insan diyetindeki 3 temel enerji kaynağından (karbonhidrat, yağ, protein) birisi olması ve vücutta enerji verici olarak ilk sırada kullanılması sebebiyle (6) düşük glisemik etkiye sahip karbonhidratlı gıdalar üzerinde oldukça fazla çalışma yapılmaktadır (4). Bu gıdalar çoğunlukla diyet lifçe zengin olmakta ve prebiyotik olarak da bağırsak florasını desteklemeleri nedeniyle fonksiyonel gıda ürünleri olarak değerlendirilebilmektedir.

Tüketildikten sonra sindirilmeden dışarı atılan gıda bileşenleri olarak da tanımlanan diyet liflerin, beslenmede gıdalarla tüketimi sağlıklı bir yaşam için oldukça önemlidir. Diyet lifler insanlardaki sindirim enzimlerine direnç göstermekte ve ancak bağırsaklardaki bakteriler tarafından fermente edilebilmektedir (7). Düşük glisemik etkiye sahip olan diyet lifçe zengin, işlenmiş gıdaları elde etme konusunda ise gıdalarda yaygın ve yüksek miktarlarda bulunan nişasta büyük önem taşımakta ve endüstriyel anlamda birçok amaç için yaygın olarak kullanılabilir. Nişastanın; kalınlaştırıcı, koloidal stabilizatör, jelleştirme ajanı, hacim artırıcı, su tutucu ve yapıştırıcı olarak kullanılabilmesi yaygın kullanımına önemli örnekler teşkil etmektedir (8). Tüm bu kullanımlarının yanı sıra nişasta; çeşitli işlemlerden geçirildikten sonra diyet lif özelliği gösteren, sindirim enzimlerine dirençli bir nişasta formuna da dönüştürülebilme ve bu nişasta fiziksel ve besinsel açıdan fonksiyonel özelliğe sahip bir gıda kaynağı ve katkı maddesi olarak da kullanılabilir (9).

Bu çalışmanın amacı; diyet lif özelliğinde olan enzime dirençli nişastanın (EDN); tiplerini, özelliklerini, sindirim enzimlerine karşı en yüksek dirence sahip Tip 3 EDN (EDN3) oluşum mekanizmasını, EDN üretim yöntemlerini ve kullanım amaçlarını incelemektir.

NIŞASTA

Temel bitkisel gıda bileşeni olarak bilinen nişasta (10), insan diyetindeki en önemli karbonhidrat olup vücutta temel enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır (11, 12). Nişasta, besleyici değerinin yanında birçok gıdanın bileşiminde yer alması nedeniyle gıdalara önemli fonksiyonel özellikler de kazandırmaktadır (13).

Nişastanın granüler yapısının incelenmesiyle, granülün kristal ve amorf bölgeler içerdiği ve heterojen bir yapı gösterdiği tespit edilmiştir (14). Granülde, amorf ve yarıkristal büyüme halkaları birbirini takip etmektedir. Amorf bölge, amiloz ve kristal yapıda olmayan amilopektinden; yarıkristal büyüme halkaları ise birbirini dönüşümlü olarak takip eden amorf ve kristal tabakalardan meydana gelmektedir (15).

Nişastanın kimyasal yapısı incelendiğinde ise; ana bileşenlerin glikozdan oluşan lineer yapıdaki amiloz ve dallanmış yapıdaki amilopektin olduğu görülmektedir (16-18). Ayrıca; granülde çok düşük miktarlarda protein, fosfor, lipid ve mineral de bulunmaktadır (18, 19).

Amiloz ve amilopektin polimerleri glikoz birimlerinden oluşmaktadır fakat fizikokimyasal özellikleri bakımından oldukça farklıdır (16). Amiloz, α -D-glikoz birimlerinin α -1,4 glikozidik bağı ile bağlanması sonucu oluşan lineer bir polimerdir. Amilopektin ise α -D-glikoz birimlerinin α -1,4 glikozidik bağı ile bağlanması ve α -1,6 glikozidik bağı ile dallanması sonucu oluşan dallanmış bir polimerdir (20, 21). Amiloz:amilopektin oranı, nişasta kaynağına bağlıdır ve 15:85 oranından 35:65 oranına kadar değişebilmektedir (20). Nişastadaki amiloz içeriği, nişasta kalitesinin belirlenmesinde temel faktördür (18) ve genel olarak, granüler nişastadaki EDN içeriği amiloz içeriği ile doğru orantılıdır (22).

Nişastanın Jelatinizasyonu ve Retrogradasyonu

Doğal nişasta granülleri soğuk suda çözünmezken (23), yeterli su içeriğinde uygun sıcaklığa ulaşıldığında nişasta granülü su alıp şişmekte ve granüldeki moleküler sıra ve kristal yapının bozulması sonucu granülün deforme olmasıyla çözünme gerçekleşmektedir (24, 25). Bu deformasyonla birlikte amiloz zincirleri granülden çıkarak suya geçmekte ve burada yeniden organize olarak aralarında suyu hapsetmektedir (8). Viskozitenin yükselmesine neden olan bu olaya jelatinizasyon adı verilmektedir.

Jelatinizasyon sonucu oluşan yüksek viskoziteli yapı stabil değildir ve zamanla jel halini almaktadır (21). Oluşan jelin bekletilme periyodu uzun sürerse, nişasta zincirleri arasında hidrojen bağı nedeniyle oluşan etkileşim artmakta ve bu zincirler ikili sarmal yapı şeklinde yeniden organize olmaya

başlamaktadır (8, 26). Amiloz zincirleri arasındaki bu yeniden organize olma haline nişastanın retrogradasyonu adı verilmekte ve oluşan bu yeni kristal yapı sindirim enzimlerine karşı daha fazla direnç göstermektedir (27). Başka bir ifade ile retrogradasyon; jelatinize olmuş nişastanın yeniden kristalizasyonu ve nişastanın enzime daha dirençli bir hal kazanması olarak tanımlanabilmektedir (13, 28). Buğday nişastası 52-66°C arasında jelleşmekte olup (29), bu jel yapının retrogradasyonu üzerine, nişastanın her iki polimerinin de etkisi bulunmaktadır (30, 31). Ancak amiloz ve amilopektinin retrograde olma özelliği birbirinden oldukça farklıdır. Amilopektin, retrograde olmaya çok yatkın değildir ve retrograde olma süresi oldukça uzundur. Amiloz ise amilopektine göre daha kısa sürede retrograde olabilmektedir (13, 32, 33). Bu nedenle; amiloz:amilopektin oranı ne kadar yüksekse retrogradasyon o kadar hızlı gerçekleşmekte ve amiloz bakımından zengin olan nişastalardan daha fazla EDN meydana gelmektedir (11).

ENZİME DİRENÇLİ NİŞASTA

Potansiyel sağlık faydaları ve fonksiyonel özellikleri nedeniyle fonksiyonel gıda katkısı olarak kullanılan EDN, günümüzde gıda endüstrisinde daha fazla yer almaktadır (4). Sağlıklı insanların ince bağırsaklarında sindirime direnç gösteren nişasta olarak tanımlanan EDN (34), insan sindirim sistemindeki enzimlerce hidroliz edilemediği için kalın bağırsağa ulaşabilmekte ve kalın bağırsak mikroflorası tarafından anaerobik fermentasyon substratı olarak kullanılabilir (35). EDN konusunda yürütülen çalışmalarda, EDN'nin fizyolojik fonksiyonlarının diyet lif ile benzer özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir (9). Tüm bu nedenlerden dolayı EDN; bağırsakta yararlı bakterilerin gelişimini destekleyen yüksek oranda fermente olabilir bir diyet lif olarak da tanımlanabilmektedir (36).

Gıdalardaki EDN, fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre 4 farklı tip olarak sınıflandırılmaktadır. Bunlardan EDN1, sindirim için fiziksel olarak erişilemeyen, öğütülmemiş veya kısmen öğütülmüş tahıl gibi taneli gıdalarda rastlanılan EDN tipi iken; EDN2 çığ patates, yeşil muz ve baklagillerde bulunan doğal granül halindeki ya da jelatinize olmamış EDN tipidir (13, 34, 37, 38). EDN3, retrograde ya da kristalize nişasta olarak bilinmekte (37, 38), pişirilip soğutulmuş ekme ve patates gibi gıdalardaki nişasta bu EDN tipine örnek olarak verilebilmektedir (34). Bu EDN tipi, yüksek sıcaklıkta dahi çözünmeye karşı oldukça dirençlidir (14) ve daha çok gıda işleme tekniklerinin etkisiyle oluşmaktadır (21, 30). EDN4 ise, kimyasal olarak modifiye edilmiş EDN tipidir (37, 38). Modifiye etme işlemi; eterleştirme, esterleştirme ve çapraz bağlama gibi kimyasal yöntemlerle yapılmakta

ve bu şekilde nişastaya sindirime karşı direnç kazandırılmaktadır (37).

Gıdaların EDN verimi nişastanın kaynağına, işlem tipine, amiloz:amilopektin oranına, fiziksel forma, jelatinizasyon derecesine ve ısıtma, soğutma ve depolama koşullarına bağlıdır. Birçok gıda işleme tekniği EDN1 ve EDN2'yi azaltmakta ya da tamamen yok etmektedir. Ancak bu EDN tiplerinin EDN3'e dönüşme potansiyelleri de bulunmaktadır. EDN4 için ise bazı gıda güvenliği kısıtlamaları bulunmakta, bu da kullanımını sınırlandırmaktadır (4). EDN üzerine yapılmış olan çalışmaların büyük bir kısmı, termal stabilitesi ve sindirim enzimlerine karşı direnci yüksek olması sebebiyle EDN3 üzerinde yoğunlaşmıştır (38, 39).

EDN3 Oluşum Mekanizması

Gıdalardaki EDN oluşumu ve miktarı; botanik kaynak, gıda prosesi, amiloz:amilopektin oranı, moleküllerin zincir uzunluğu ve amiloz-lipit kompleksi varlığı gibi çeşitli faktörlere bağlı olması nedeniyle farklı nişastalı gıdalar arasında çeşitlilik göstermektedir (10).

Gıda katkı maddesi olarak en çok kullanılan EDN türü olan EDN3, farklı kaynaklardaki nişastaların hidrotermal işlemlerle jelatinizasyonundan sonra meydana gelen retrogradasyon sırasındaki kristalizasyonla oluşmaktadır (40, 41). Jelatinizasyon aşaması, yeterli sıcaklık ve su varlığında gerçekleşmekte olup bu aşamada nişastanın granül yapısı dağılmaktadır (25). Nişasta jeli soğuduğunda meydana gelen retrogradasyon aşamasında ise, nişastanın fraksiyonlarından biri olan amiloz geri dönüşümsüz olarak yarı kristal çözünmez bir hale geçmektedir (32). Bu duruma sebep olan ve EDN3'ün sindirime direnç göstermesinde kabul edilen mekanizma, jelatinizasyon sonrasında yoğunlaşmış çift sarmal yapılar içerisine hidrojen bağı kuvvetlerinin etkisiyle lineer amiloz parçalarının hizalanmasıdır. Bu düzenlenme α -1,4 glikozidik bağlarla amilaz enziminin ulaşmasını engellemektedir (4). Bütün bu olaylar sonucunda oluşan nişasta EDN3 adını almaktadır.

EDN3 üretimi ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda, EDN3'ün yapısal karakteristiklerinin ve fizikokimyasal özelliklerinin farklı üretim metodlarından etkilendiği belirtilmektedir (38, 42). Hidrotermal işlemler, ekstrüzyon işlemi, mikrodalga uygulaması, enzim modifikasyonu ile amilopektindeki dallanmış yapının azaltılması, ultra yüksek basınç ve ultrasonikasyon uygulamaları gibi işlemler kullanılarak EDN3 üretimi gerçekleştirilebilmektedir (38).

EDN Üretim Yöntemleri

EDN sağlık için faydalıdır fakat birçok tahıl bazlı gıdada az miktarda bulunmaktadır (36). Bu nedenle

gıdaların EDN miktarını arttırmak amacıyla; EDN3 üretiminde uygulanan işlemler ve bunların kombinasyonlarına ek olarak kısmi asit hidrolizi gibi farklı yöntemler geliştirilmiştir.

Hidrotermal işlemler ile EDN üretimi

EDN üretimi için yaygın kullanılan yöntemlerden biri, su varlığında ısıl işleme maruz kalan saf nişastanın kontrollü olarak soğutulmasıyla retrogradasyonun sağlanmasıdır (36). Bu ısıl işlem; ısı ve basıncın bir kombinasyonu olan otoklavlama yoluyla da uygulanabilmektedir.

Pişirme sonrasındaki soğutma işleminde nişastanın küçük bir kısmı retrogradasyona uğramakta ve yeniden düzenlenen nişasta polimerleri sindirim boyunca enzimatik aktiviteye direnç göstermektedir (36). Pişirme ve soğutma işlemlerinin birkaç kez tekrarlanmasıyla daha fazla EDN üretilebilmektedir (36, 43). Bunun sebebi sindirilebilir nişasta fraksiyonlarının tekrar pişirme esnasında yeniden disperse olması ve soğutma sırasında kristalleşmenin daha fazla gerçekleşmesidir (36). Retrograde nişastanın suda çözünme sıcaklığı 110-120°C olduğu için yeniden oluşan kristaller sonraki pişirme aşamasında degrade olmamaktadır (21, 36).

Konuyla ilgili olarak yapılan bir çalışmada tam buğday ununa 1:15 un:su oranında 7 döngü pişirme ve dondurma işlemi uygulanmış ve her tekrarlanan döngüyle EDN miktarının önemli derecede arttığı tespit edilmiştir (36).

Mikrodalga uygulaması ile EDN üretimi

Dielektrik ısıtma ile ısıyı madde içerisine dağıtan ve moleküllerin enerjisini hızlı bir şekilde arttıran mikrodalga, termal enerjinin etkili bir kaynağıdır ve nişastanın modifikasyonunu da içeren çeşitli alanlarda standart bir teknik olarak kullanılmaktadır (44, 45). Mikrodalga enerjisi maddenin tüm hacminde homojen etki, daha fazla penetrasyon derinliği ve seçici absorpsiyon sağladığı için geleneksel ısıtma işleminden daha etkilidir (46).

Canna edulis bitkisinin nişastasında yapılan bir çalışmada, nemlendirilen nişastaya mikrodalga uygulanmış ve uygulama sonucunda EDN oluşumunun doğal nişastaya göre 2 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (47).

Ekstrüzyon işlemi ile EDN üretimi

Ekstrüzyon; termal ve mekanik enerji oluşumunun gerçekleştiği (48), makarna ve kahvaltılık tahıllar gibi nişasta bazlı gıdalarda yaygın kullanılan bir işleme tekniğidir. Burada kısa bir süre uygulanan yüksek miktarda mekanik enerjiyle yüksek sıcaklığın birleşimi; jelatinizasyon, erime ve parçalanma gibi nişastanın yapısal değişikliklerini desteklemektedir (49).

Nişastanın fizikokimyasal karakteristikleri; ekstrüzyondaki sıcaklık, nem ve enerji girişiyle değişmektedir (48, 50). Ekstrüzyon işleminde nişastanın parçalanması, kullanılan nişasta tipine ve vida hızı, sıcaklık ve nem içeriği gibi ekstrüderin işlem koşullarına bağlıdır (49).

Ekstrüzyon işlemi ile meydana gelen mekanik kesme gücü amilopektinin dallarındaki glikozidik bağları rastgele kırmakta, fakat granüler nişastadaki sert kristalleri daha belirgin bir biçimde birleştirmektedir (49). Bu durum EDN miktarını artırıcı etki göstermektedir.

Konuyla ilgili olarak yapılan bir çalışmada; yüksek amilopektinli, normal ve yüksek amilozlu mısır nişastası sulandırıldıktan sonra ekstrüzyon işlemine tabi tutulmuş ve yalnızca yüksek amilozlu mısır nişastasında daha yüksek EDN oluştuğu tespit edilmiştir (49).

Ultrasonikasyon işlemiyle EDN üretimi

Gıda işleme ve muhafazasında, yüksek verim, kısa işlem süresi, gelişmiş kalite özellikleri, düşük işletme ve bakım maliyeti gibi faydalı etkileri olan ultrasonikasyon (51), polimerlerin kimyasal modifikasyonunu desteklemede modern, çevre dostu ve etkili bir metottur (52). Sıcaklık, frekans, enerji miktarı ve işlem süresi gibi ultrasonikasyon parametreleri; nişastanın tipi, kompozisyonu ve konsantrasyonu kadar granül morfolojisi üzerinde etkilidir (51).

Ultrasonikasyon; tahrip edici etkiye sebep olan basınç değişimlerini ve yerel hızları teşvik etmektedir. Bu da granülde çatlak ve gözenek oluşumuna sebep olmakta (51) ve granüle hasar vererek uzun zincirlerin uygun boyutlara parçalanmasını sağlamaktadır. Parçalanmış zincirlerin yeniden düzenlenmesi ile oluşan çift sarmal yapı ultrasonikasyon tarafından desteklenmektedir. Bu durum EDN içeriğini artırıcı etki göstermektedir (38).

Nilüfer (lotus) tohumu nişastası üzerinde yapılan bir çalışmada EDN üretimi için nişastaya otoklav, mikrodalga ve ultrasonikasyon-otoklav işlemleri ayrı ayrı uygulanmış ve ultrasonikasyon-otoklav işleminin EDN oluşumunda daha etkili olduğu tespit edilmiştir (38).

Enzim uygulamasıyla EDN üretimi

EDN üretiminde enzimatik uygulamanın ana hedefi, pullulanaz ve izoamilaz kullanımı ile dallanmış amilopektin zincirlerinin düz zincirlere dönüşmesini sağlamak (53) ve dalları kısmen ayrılmış amilopektin üretmektir. Bu yöntemle üretilen EDN, yüksek kristallığe sahip modifiye bir nişasta olmasının yanı sıra, sıcaklığa ve sindirime de daha dirençlidir (54).

Konuyla ilgili olarak yapılan bir çalışmada; doğal ve jelatinize kırmızı barbunya nişastası pullulanaz

enzimiyle hidrolize edildikten sonra otoklavlanmış ve soğuk depolama yapıldıktan sonra liyofilize edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre enzimatik hidroliz uygulanan ve retrograde edilen jelatinize nişastada daha fazla EDN oluştuğu tespit edilmiştir (55).

Beş farklı baklagil unu (mercimek, nohut, bakla, kırmızı ve beyaz barbunya) ile yapılan bir çalışmada ise EDN üretimi için pullulanaz enzimi kullanılmış ve barbunya unu nişastalarının EDN'ye dönüşmeye daha elverişli olduğu sonucuna varılmıştır (54).

Konuyla ilgili olarak yapılan bir diğer çalışmada, α -amilaz ve pullulanaz ile birleştirilen bir metot kullanılarak mısır nişastasından EDN üretilmiştir. Doğal mısır nişastasına kıyasla α -amilaz ile işlem görmüş mısır nişastasının, daha kısa amiloz zincirleri içerdiği tespit edilmiştir. Amilopektinin pullulanaz tarafından parçalanabilmesi için fayda sağlayan bu durumun, amilopektinden ayrılan kısa amiloz zincirlerini çift sarmal yapıya dönüştürebileceği belirtilmiştir. Doğal mısır nişastası ile mısır dirençli nişastası kıyaslandığında ise mısır dirençli nişastasında kristallenmenin arttığı görülmüş ve kristallerin artan yoğunluğu, nişasta parçalayan enzimlere direnci de büyük ölçüde arttırmıştır (4).

Simüle edilen mide ve ince bağırsak sisteminde gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise; α -amilaz ve pullulanaz enzimleri uygulanan mısır nişastası örneklerinde sindirime gösterilen direncin, yüksek basınç uygulanan örneklerden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (38, 56).

Kimyasal uygulamalarla EDN üretimi

Kimyasal işlem, modifiye nişasta hazırlamada endüstride yaygın kullanılan uygulamalardan biridir ve kimyasal ajanlarla modifiye edilen nişastalar bazı sınırlamalarla birlikte gıda katkısı olarak endüstride kullanılabilir. Bu yöntemle EDN üretimi de mümkündür (57).

Çapraz bağlama, nişasta jelinin fonksiyonel özelliklerini geliştirmek, donma-çözülme ve soğuk depolama stabilitesi sağlamak, granülü stabilize etmek ve nişasta granülünün rastgele bölgelerine iç ve ara bağlar eklemek için kullanılan, kimyasal modifikasyon tekniklerinden biridir. Bu işlem; granüler nişastaya çok fonksiyonlu reaktiflerle (sodyum trimetafosfat, sodyum tripolifosfat vb.) muamele edildiğinde, nişasta molekülü üzerindeki hidroksil gurupları arasında eter ya da ester bağlarının oluşmasıyla gerçekleşmektedir. Bu şekilde sindirime direnç kazanan nişasta, Tip 4 EDN (EDN4) olarak sınıflandırılmaktadır (58, 59) ve bu nişastanın kimyasal ve fonksiyonel özellikleri; nişastanın kaynağına, reaksiyon koşullarına (süre, sıcaklık, pH, katalizör varlığı), reaktant tipi ve konsantrasyonuna bağlıdır (59).

Konuyla ilgili olarak yapılan bir çalışmada, mısır ve buğday nişastasında uygun reaksiyon koşullarının optimize edilmesiyle çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilmiş ve işlem sonucunda sıcaklık ve özellikle de pH artışıyla EDN içeriğinin arttığı tespit edilmiştir (59).

Diğer bir kimyasal modifikasyon türü olan asit hidrolizi ile yapılan bir çalışmada ise; pirinç nişastasına organik asit ve hidrotermal işlem uygulanmış ve nişastanın karakteristik özellikleri ve EDN oluşumu üzerinde en etkili olan organik asidin sitrik asit olduğu tespit edilmiştir (11). Bunun sebebi; fazla miktarda sitrik asit çözeltisi içerisinde ısıtılan nişastalarda, işlem boyunca granül dışına çıkan nişasta zincirlerinin sitrik asitle kolaylıkla tepkimeye girmesi ve sitrik anhidritin nişasta zinciri üzerindeki hidroksil ile yer değiştirmesidir (58).

EDN üretiminde kombine uygulamalar

EDN üretimi için, bahsedilen işlemler örneklere ayrı ayrı ya da bu işlemlerin kombinasyonları şeklinde uygulanabilmektedir. Birden fazla işlemin birlikte uygulanması, gıdalardaki EDN oluşumunu desteklemekte ve miktar bakımından daha fazla EDN oluşumu sağlamaktadır.

Bu konuda yapılan bir çalışmada gölevezi nişastasına uygulanan hidrotermal işlem - enzim uygulaması - retrogradasyon - kurutma kombinasyonu ile EDN içeriği artış göstermiştir (53).

Konuyla ilgili olarak yapılan bir diğer çalışmada ise; pirinç nişastasına jelatinizasyon - enzim uygulaması - depolama - ısı işlem - kurutma kombinasyonu uygulanmış ve bu uygulamalar sonucunda; EDN miktarının arttığı tespit edilmiştir (60).

Yukarıda da bahsedilen, gıdaların EDN içeriğini arttırma üzerine yapılan çalışmalar ve sonuçları Çizelge 1'de özetlenmiştir.

EDN Tespit Yöntemlerinin Temel Prensipleri

Gıdalardaki EDN miktarları, prensip olarak nişasta sindiriminde rol alan enzimlerin kullanılmasıyla belirlenmektedir. Bu enzimlerle ilk olarak enzime dirençli olmayan nişasta hidrolize edilip ortamdan ayrılmakta, son basamakta ise EDN'nin hidrolizi gerçekleştirilerek oluşan glikoz miktarından EDN miktarı tespit edilmektedir.

Gıda Endüstrisinde EDN Kullanım Amaçları

EDN; sağlıklı bireylerin ince bağırsaklarından sindirilmeden geçen ve kolonda tamamen ya da kısmen fermente olabilen nişastanın genel adıdır (38). Geleneksel diyet liflere kıyasla EDN'nin; gıda aromalarını daha az baskılaması, doğal görünüşte, beyaz renkte, tatsız ve iyi tekstürde olması

Çizelge 1. Gıdaların EDN içeriğini artırma üzerine yapılan çalışmalar ve sonuçları

Üretim Yöntemi	Kullanılan Nişasta Kaynağı	EDN Miktarı (%)	Kaynak
Hidrotermal	Tam buğday unu	1.3-8.1	(36)
	Nilüfer (lotus) tohumu nişastası	41.9	(38)
Mikrodalga	Canna edulis nişastası	55.5	(47)
	Nilüfer (lotus) tohumu nişastası	39.5	(38)
Ekstrüzyon	Yüksek amilozlu mısır nişastası	>40	(49)
Ultrasonikasyon	Nilüfer (lotus) tohumu nişastası	56.1	(38)
	Kırmızı barbunya nişastası (Doğal)	21.3-31.5	(55)
	Kırmızı barbunya nişastası (Jelatinize)	42.3	(55)
Enzimatik	Mercimek unu	3.0	(54)
	Nohut unu	0.9	(54)
	Bakla unu	3.3	(54)
	Kırmızı barbunya unu	30.8	(54)
	Beyaz barbunya unu	31.8	(54)
	Mısır nişastası	58.9	(4)
	Mısır nişastası	2.3-70.8	(59)
Kimyasal	Buğday nişastası	2.0-85.2	(59)
	Pirinç nişastası (Yüksek amilozlu)	39.0	(11)
	Pirinç nişastası (Normal)	36.6	(11)
	Pirinç nişastası (Yüksek amilopektinli)	35.3	(11)
Kombine uygulamalar			
Hidrotermal+Enzimatik	Gölevez nişastası	2.2-35.1	(53)
Hidrotermal+Enzimatik	Pirinç nişastası	2.5-47	(60)

nedenleriyle (4), hamurun işlenmesini ya da reolojisini önemli derecede etkilemeden ürün formülasyonunda kullanılması mümkün olmaktadır. Bu da kepek gibi ticari liflerin kullanılmasıyla elde edilen koyu renkli ve sert son ürünlere nazaran daha kaliteli ürünler oluşturulmasına ve üretimde maliyetin düşmesine katkı sağlamaktadır (13).

EDN'nin ekstrüde ürünlerde kullanımında da olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Ekstrüde ürünlerde gaz hücrelerinin genişlemesi oldukça fazla önem arz etmektedir ancak bu ürünlerde kullanılan ticari besinsel lifler, gıdanın fiziksel yapısını kuvvetlendirerek genişlemeyi sınırlandırmaktadır. Bu yüzden bu gıdaların formülasyonlarında EDN kullanılarak karşılaşılan olumsuzluklar önemli ölçüde giderilebilmektedir (26).

SONUÇ

Günümüzde devam etmekte olan birçok araştırmada EDN'nin doğal bir gıda katkı maddesi olarak kullanılması konusuna büyük önem verilmektedir. Farklı yöntemler ve bunların kombinasyonlarıyla üretilebilen EDN; renk, görünüş ve tekstür bakımından sağladığı olumlu özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde pek çok farklı amaç için kullanılabilmektedir. EDN, diyet lif gibi davranması sebebiyle ince bağırsakta sindirilemeyip kalın bağırsakta fermantasyona uğraması; bazı fizikokimyasal ve fonksiyonel özellikler taşıması nedenleriyle sağlık için oldukça faydalıdır. Glisemik indeksi düşük gıda üretiminde kullanılarak diyabet ve obezite riskini azaltması ve prebiyotik etkiye sahip olması gibi sağlığı düzenleyici önemli özellikler taşıyan EDN'nin, çağın getirmiş olduğu ve medeniyet hastalıkları olarak da tanımlanan

hastalıklardan korunmak için uygun araçlardan biri olarak kullanımı her geçen gün daha da artmaktadır. Bu nedenle EDN üretim tekniklerinin ve EDN'nin gıda üretimine dâhil edilmesinin toplum sağlığı ve yaşam kalitesi için önemli olduğu değerlendirilmektedir.

KAYNAKLAR

- Lalor F, Wall PG. 2011. Health claims regulations: comparison between USA, Japan and European Union. *Br Food J*, 113(2), 298-313.
- Moors EH. 2012. Functional foods: regulation and innovations in the EU. *Innov Eur J Soc Sci Res*, 25(4), 424-440.
- De Boer A, Bast A. 2015. International legislation on nutrition and health claims. *Food Policy*, 55, 61-70.
- Zhang H, Jin Z. 2011. Preparation of products rich in resistant starch from maize starch by an enzymatic method. *Carbohydr Polym*, 86(4), 1610-1614.
- Bordenave N, Kock LB, Abernathy M, Parcon JC, Gulvady AA, Van Klinken BJ-W, Kasturi P. 2015. Toward a more standardised and accurate evaluation of glycaemic response to foods: Recommendations for portion size calculation. *Food Chem*, 167, 229-235.
- Ek KL, Brand-Miller J, Copeland L. 2012. Glycaemic effect of potatoes. *Food Chem*, 133(4), 1230-1240.
- Liu Y, Chen W, Chen C, Zhang J. 2015. Physicochemical Property of Starch-Soluble Dietary Fiber Conjugates and Their Resistance to Enzymatic Hydrolysis. *Int J Food Prop*, 18(11), 2457-2471.

8. Gerits LR, Pareyt B, Delcour JA. 2015. Wheat starch swelling, gelatinization and pasting: Effects of enzymatic modification of wheat endogenous lipids. *LWT - Food Sci Technol*, 63(1), 361-366.
9. Lertwanawatana P, Frazier RA, Niranjana K. 2015. High pressure intensification of cassava resistant starch (RS3) yields. *Food Chem*, 181, 85-93.
10. Lee CJ, Moon TW. 2015. Structural characteristics of slowly digestible starch and resistant starch isolated from heat-moisture treated waxy potato starch. *Carbohydr Polym*, 125, 200-205.
11. Hung PV, Vien NL, Lan Phi NT. 2016. Resistant starch improvement of rice starches under a combination of acid and heat-moisture treatments. *Food Chem*, 191, 67-73.
12. Köksel H. 2007. Karbonhidratlar. *Gıda Kimyası, Saldamlı İ. (Baş Editör)*, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, Türkiye, 1, s: 85-129.
13. Kotancılar HG, Gerçekaslan KE, Karaoğlu MM, Boz H. 2009. Besinsel Lif Kaynağı Olarak Enzime Dirençli Nişasta/Resistant Starch as a Dietary Fiber. *J Fac Agric Atatürk Univ*, 40(1), 103-107.
14. Güzel D. 2009. Baklagil nişastalarının sindirimi yavaş nişastaya (SYN) ve enzime dirençli nişastaya (EDN) dönüştürülmesi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Mersin, Türkiye, 51 s.
15. Jobling S. 2004. Improving starch for food and industrial applications. *Curr Opin Plant Biol*, 7(2), 210-218.
16. Menzel C, Andersson M, Andersson R, Vázquez-Gutiérrez JL, Daniel G, Langton M, Gällstedt M, Koch K. 2015. Improved material properties of solution-cast starch films: Effect of varying amylopectin structure and amylose content of starch from genetically modified potatoes. *Carbohydr Polym*, 130, 388-397.
17. Worzakowska M, Grochowicz M. 2015. Effect of some parameters on the synthesis and the physico-chemical properties of new amphiphilic starch-g-copolymers. *Carbohydr Polym*, 130, 344-352.
18. Zhu F. 2016. Impact of γ -irradiation on structure, physicochemical properties, and applications of starch. *Food Hydrocoll*, 52, 201-212.
19. Zhang H, Zhang W, Xu C, Zhou X. 2014. Studies on the rheological and gelatinization characteristics of waxy wheat flour. *Int J Biol Macromol*, 64, 123-129.
20. Cano A, Jiménez A, Cháfer M, González C, Chiralt A. 2014. Effect of amylose: amylopectin ratio and rice bran addition on starch films properties. *Carbohydr Polym*, 111, 543-555.
21. Eerlingen RC, Delcour JA. 1995. Formation, analysis, structure and properties of type III enzyme resistant starch. *J Cereal Sci*, 22(2), 129-138.
22. Lin L, Guo D, Zhao L, Zhang X, Wang J, Zhang F, Wei C. 2016. Comparative structure of starches from highamylose maize inbred lines and their hybrids. *Food Hydrocoll*, 52, 19-28.
23. Carlstedt J, Wojtasz J, Fyhr P, Kocherbitov V. 2015. Understanding starch gelatinization: The phase diagram approach. *Carbohydr Polym*, 129, 62-69.
24. Bulut S, Schick C. 2012. Devitrification of the amorphous fractions of starch during gelatinisation. *Carbohydr Polym*, 90(1), 140-146.
25. Waterschoot J, Gomand SV, Delcour JA, Goderis B. 2015. Direct evidence for the non-additive gelatinization in binary starch blends: A case study on potato starch mixed with rice or maize starches. *Food Hydrocoll*, 50, 137-144.
26. Haralampu S. 2000. Resistant starch-a review of the physical properties and biological impact of RS 3. *Carbohydr Polym*, 41(3), 285-292.
27. Lian X, Zhao S, Liu Q, Zhang X. 2011. A photographic approach to the possible mechanism of retrogradation of sweet potato starch. *Int J Biol Macromol*, 48(1), 125-128.
28. Ozturk S, Koksel H, Ng PKW. 2011. Production of resistant starch from acid-modified amylopectin starches with enhanced functional properties. *J Food Eng*, 103(2), 156-164.
29. Papatthanasiou MM, Reineke K, Gogou E, Taoukis PS, Knorr D. 2015. Impact of high pressure treatment on the available glucose content of various starch types: A case study on wheat, tapioca, potato, corn, waxy corn and resistant starch (RS3). *Innov Food Sci Emerg Technol*, 30, 24-30.
30. Fu Z-q, Wang L-j, Li D, Zhou Y-g, Adhikari B. 2013. The effect of partial gelatinization of corn starch on its retrogradation. *Carbohydr Polym*, 97(2), 512-517.
31. Zhang Y, Liu W, Liu C, Luo S, Li T, Liu Y, Wu D, Zuo Y. 2014. Retrogradation behaviour of high-amylose rice starch prepared by improved extrusion cooking technology. *Food Chem*, 158, 255-261.
32. Fu Z, Chen J, Luo SJ, Liu CM, Liu W. 2015. Effect of food additives on starch retrogradation: A review. *Starch*, 67(1-2), 69-78.
33. Hsu RJC, Lu S, Chang Yh, Chiang W. 2015. Effects of added water and retrogradation on starch digestibility of cooked rice flours with different amylose content. *J Cereal Sci*, 61, 1-7.
34. Nugent AP. 2005. Health properties of resistant starch. *Nutr Bull*, 30(1), 27-54.
35. Hu X-P, Huang T-T, Mei J-Q, Jin Z-Y, Xu X-M, Chen H-Q. 2015. Effects of continuous and intermittent retrogradation treatments on in vitro digestibility and structural properties of waxy wheat starch. *Food Chem*, 174, 31-36.

36. Arcila JA, Rose DJ. 2015. Repeated cooking and freezing of whole wheat flour increases resistant starch with beneficial impacts on in vitro fecal fermentation properties. *J Funct Foods*, 12(0), 230-236.
37. Fuentes-Zaragoza E, Sánchez-Zapata E, Sendra E, Sayas E, Navarro C, Fernández-López J, Pérez-Alvarez JA. 2011. Resistant starch as prebiotic: A review. *Starch*, 63(7), 406-415.
38. Zeng S, Wu X, Lin S, Zeng H, Lu X, Zhang Y, Zheng B. 2015. Structural characteristics and physicochemical properties of lotus seed resistant starch prepared by different methods. *Food Chem*, 186, 213-222.
39. Shi M, Gao Q. 2011. Amylose content and digestibility of resistant starch. *Sci Technol Food Ind*, 5, 105-107, 112.
40. Kiatponglarp W, Tongta S, Rolland-Sabaté A, Buléon A. 2015. Crystallization and chain reorganization of debranched rice starches in relation to resistant starch formation. *Carbohydr Polym*, 122, 108-114.
41. Liao H-J, Hung C-C. 2015. Chemical composition and in vitro starch digestibility of green banana (cv. Giant Cavendish) flour and its derived autoclaved/debranched powder. *LWT - Food Sci Technol*, 64(2), 639-644.
42. Fan D, Ma W, Wang L, Huang J, Zhang F, Zhao J, Zhang H, Chen W. 2013. Determining the effects of microwave heating on the ordered structures of rice starch by NMR. *Carbohydr Polym*, 92(2), 1395-1401.
43. Silverio J, Fredriksson H, Andersson R, Eliasson AC, Aman P. 2000. The effect of temperature cycling on the amylopectin retrogradation of starches with different amylopectin unit-chain length distribution. *Carbohydr Polym*, 42(2), 175-184.
44. Liu J, Ming J, Li W, Zhao G. 2012. Synthesis, characterisation and in vitro digestibility of carboxymethyl potato starch rapidly prepared with microwave-assistance. *Food Chem*, 133(4), 1196-1205.
45. Huang C, Zhu J, Chen L, Li L, Li X. 2014. Structural changes and plasticizer migration of starch-based food packaging material contacting with milk during microwave heating. *Food Control*, 36(1), 55-62.
46. Anderson AK, Guraya HS. 2006. Effects of microwave heat-moisture treatment on properties of waxy and non-waxy rice starches. *Food Chem*, 97(2), 318-323.
47. Zhang, J., Chen, F., Liu, F., Wang, Z.W., 2010. Study on structural changes of microwave heat-moisture treated resistant Canna edulis Ker starch during digestion in vitro. *Food Hydrocolloids*, 24(1): 27-34.
48. Li M, Hasjim J, Xie F, Halley PJ, Gilbert RG. 2014. Shear degradation of molecular, crystalline, and granular structures of starch during extrusion. *Starch*, 66(7-8), 595-605.
49. Zhang B, Dhital S, Flanagan BM, Luckman P, Halley PJ, Gidley MJ. 2015. Extrusion induced low-order starch matrices: Enzymic hydrolysis and structure. *Carbohydr Polym*, 134, 485-496.
50. Yahaghi M, Liang JB, Balcells J, Valizadeh R, Jahromi MF, Alimon R, Ho YW. 2014. Extrusion of sorghum starch enhances ruminal and intestinal digestibility, rumen microbial yield and growth in lambs fed on high-concentrate diets. *Anim Feed Sci Technol*, 189, 30-40.
51. Zhu F. 2015. Impact of ultrasound on structure, physicochemical properties, modifications, and applications of starch. *Trends Food Sci Technol*, 43(1), 1-17.
52. Baxter S, Zivanovic S, Weiss J. 2005. Molecular weight and degree of acetylation of high-intensity ultrasonicated chitosan. *Food Hydrocoll*, 19(5), 821-830.
53. Simsek S, El SN. 2012. Production of resistant starch from taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) corm and determination of its effects on health by in vitro methods. *Carbohydr Polym*, 90(3), 1204-1209.
54. Morales-Medina R, Mar Muñoz M, Guadix EM, Guadix A. 2014. Production of resistant starch by enzymatic debranching in legume flours. *Carbohydr Polym*, 101, 1176-1183.
55. Reddy CK, Suriya M, HariPriya S. 2013. Physicochemical and functional properties of Resistant starch prepared from red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*.L) starch by enzymatic method. *Carbohydr Polym*, 95(1), 220-226.
56. Zhang H, Tian Y, Bai Y, Xu X, Jin Z. 2013. Structure and properties of maize starch processed with a combination of α -amylase and pullulanase. *Int J Biol Macromol*, 52, 38-44.
57. Kapelko-Zeberska M, Zieba T, Szychaj R, Gryszkin A. 2015. Acetylated adipate of retrograded starch as RS 3/4 type resistant starch. *Food Chem*, 188, 365-369.
58. Liu H, Liang R, Antoniou J, Liu F, Shoemaker CF, Li Y, Zhong F. 2014. The effect of high moisture heat-acid treatment on the structure and digestion property of normal maize starch. *Food Chem*, 159, 222-229.
59. Kahraman K, Koksels H, Ng PKW. 2015. Optimisation of the reaction conditions for the production of cross-linked starch with high resistant starch content. *Food Chem*, 174, 173-179.
60. Zhou Y, Meng S, Chen D, Zhu X, Yuan H. 2014. Structure characterization and hypoglycemic effects of dual modified resistant starch from indica rice starch. *Carbohydr Polym*, 103, 81-86.

MİKROORGANİZMALARA ETKİ EDEN BAŞLICA STRES FAKTÖRLERİ

Şehriban Uğuz*, Seval Andıç

Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Van

Geliş tarihi / *Received*: 11.04.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / *Received in revised form*: 03.05.2016

Kabul tarihi / *Accepted*: 07.05.2016

Özet

Mikroorganizmalar buldukları çevresel koşullar içerisinde ısı, oksijen, asit, safra tuzu ve ozmotik stres gibi çeşitli stres faktörlerine maruz kalmaktadır. Mikroorganizmalar, stres ile karşılaştıklarında canlı kalabilir ve/veya gelişmek için çeşitli fizyolojik adaptasyonlar geçirerek ortam koşullarına adapte olabilirler. Stres yanıt sistemi, mikroorganizmanın çeşidine, uygulanan stresin şiddetine ve mikroorganizmanın bu strese adapte edilip edilmediğine göre değişmektedir. Mikroorganizmaların olumsuz koşullara adaptasyonu, saprofitlerin ve gıda kaynaklı patojenlerin inaktivasyonunda bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır. Gıda güvenliği ve ürünlerin raf ömrü süresi düşünülünce patojenlerin bu özelliklerinin göz ardı edilmemesi gerekmektedir. Probiyotik mikroorganizmalarda olduğu gibi yüksek canlılık oranının istendiği ve patojen mikroorganizmaların ortamdaki elimine edilmesinin söz konusu olduğu durumlarda adaptasyon veya tolerans geliştirme üzerinde önemle durulması gereken bir konudur. Bu derleme çalışmasında; ısı, ışık, ozmotik stres ve oksidatif stres gibi başlıca stres faktörlerinin mikroorganizmalar üzerine etkisi, mikroorganizmaların bu stres koşullarındaki adaptasyon durumları ve adaptasyon geliştirme mekanizmaları incelenmiştir.

Anahtar kelimeler: Stres, adaptasyon, ısı şok proteini (HSP), soğuk şok proteini (CSP), asit tolerans yanıtı (ATR), reaktif oksijen türleri (ROS).

FUNDAMENTAL STRESS FACTORS AFFECTING THE MICROORGANISMS

Abstract

Microorganisms are exposed to various stress factors such as heat, oxygen, acid, bile salts and osmotic stress in the environment. Microorganisms may survive and/or get adapted to the environmental conditions by the physiological adaptations when they come across to such stress factors. Stress response system varies according to the type of microorganisms, stress intensity applied to microorganisms and whether they can be adapted to this stress. The adaptation of microorganism to the negative conditions poses a problem for inactivation of saprophytes and foodborne pathogens. Considering food safety and shelf life of products, it is required not to ignore these characteristics of pathogens. As in probiotic microorganisms, when high vitality ratio is required and when it comes to eliminating pathogen microorganisms from the environment, focus should be on adaptation or tolerance development. In this review, the main stress factors such as heat, acid, osmotic and oxidative stresses on microorganisms, adaptation conditions of microorganisms under these stress conditions and mechanisms of adaptation are discussed in the light of the relevant literature.

Keywords: Stress, adaptation, heat shock protein (HSP), cold shock protein (CSP), acid tolerance response (ATR), reactive oxygen species (ROS).

* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ sehribanuguz@hotmail.com,

☎ (+90) 432 225 1701,

☎ (+90) 432 225 1730

GİRİŞ

Gelişmeleri için gerekli olan optimum çevre koşullarındaki herhangi bir ekstrem değişiklik mikroorganizmalar üzerinde stres yaratmakta ve mikroorganizmalar doğal gelişme ortamlarında bu tür stres yaratan koşullara maruz kalabilmektedirler (1-3). Stres genel olarak, biyolojik bir sistemin normal fonksiyonunu bozan ya da sistemin uygunluğunu azaltan bir durum olarak tanımlanır. Stres faktörleri, iç (genetik stres ve yaşlanma) ve dış (çevresel) kaynaklı olmak üzere ikiye ayrılır (4). Mikroorganizmaların stres ile karşılaşmalarında canlı kalabilmeleri ve/veya gelişim gösterebilmeleri, fizyolojik adaptasyon ve aklimasyon (alıştırma) mekanizmalarına sahip olmaları ile mümkündür (2). Stres şiddetinin büyüklüğü; organizmanın ölüm ve çoğalma oranlarındaki artış ve azalışlar ile lag süresi uzunluğunu belirlemektedir (3). Subletal stres seviyelerinden zayıf stres (*mild*), mikroorganizmanın yaşama yeteneğini kaybettirmez fakat çoğalma hızını azaltır veya durdurur. Orta düzeyde stres (*ılımlı-moderate*), sadece mikrobiyel gelişimi durdurmak ile kalmayıp bazı hücrelerin yaşama yeteneğinin kaybolmasına neden olur. Aşırı stres (*extreme-severe*) ise hücreler için genellikle letal etki göstererek popülasyonun büyük bir çoğunluğunda ölüme neden olur (1, 5, 6). Mikroorganizmaların çoğu, çevresel parametrelerdeki küçük değişimleri tolere edebilmekte ve bu değişimlere dakikalar, saatler veya günler içinde adapte olabilmektedirler (7). Mikroorganizmaların giderek farklılaşan çevre koşullarına uyum sağlayabilmek için gösterdikleri yeteneğe adaptasyon adı verilir. Adaptasyon bir defada olmamakla birlikte küçük küçük değişikliklerin zaman içinde meydana gelmesi ile oluşur. Stres etkenleri sonucunda mikroorganizmalar yaşamlarını yitirebildikleri gibi adaptasyon mekanizmalarını aktif hale getirerek canlı kalabilir ve/veya başarılı bir şekilde çoğalabilirler. Mikroorganizmalar, karşılaşmaları stresin/streslerin şiddetine göre farklı yanıtlar verirler (1, 2, 6). Bu yanıt sistemi, mikroorganizmaların aynı (spesifik adaptif yanıt) ya da farklı (çoklu adaptif yanıt-çapraz koruma) tipteki streslere karşı tolerans yanıtını artırır. Bu durum, adaptif yanıt ya da tolerans olarak tanımlanır (8-10). Adaptif yanıtın ana mekanizması; algı mekanizmaları, düzenleyici proteinlerin işleyişi (örneğin; RpoS) gibi hücre koruma sistemlerinin karakterizasyonu, homeostatik uyarılması ve sistemin onarılması, şok proteinlerinin sentezi ve hücre zarının modifikasyonudur. Bakteriyel stres tolerans yanıtı, hem hücredeki yapısal hem de hücredeki fizyolojik değişiklikleri kapsamakta ve aynı zamanda genetik düzenleyici mekanizma gibi de görev yapmaktadır (10-12). Stres yanıt sistemleri patojenik organizmaların virülansında önemli bir rol oynayabilmektedir (13, 14). Kendilerini çevreleyen stres faktörlerine karşı olan direnç ve yanıtlar, bakteriyel patojenlerin değişen ortamlarda hayatta kalması veya gelişmesi için önemlidir. Bu amaçla, hücreler kendilerini stres faktörlerine karşı korumak ya da hasarlarını

onarmak için çeşitli gelişmiş yapılara (ağlar) sahiptirler (10, 12, 14, 15). Bazı mikroorganizmaların ise çeşitli streslere direnç göstererek canlılıklarını koruması istenmektedir. Probiyotik bakteriler endüstriyel uygulamalar sırasında ve tüketim sonrası sindirim sisteminde çeşitli stresler (düşük ve yüksek sıcaklık, asit, safra tuzu stresi gibi) ile karşılaşmakta ve canlılıklarını yitirebilmektedir. Çeşitli streslere adapte edilen suşların kullanımı ile bu sorunun önüne geçilebileceği düşünülmektedir (16).

Mikroorganizmaların stres yanıt sistemleri çeşitli stresler tarafından aktive edilerek birçok strese karşı koruma sağlamaktadır. Bu makalede, mikroorganizmalara etki eden başlıca stres faktörlerinden ısı stresi, asit stresi, ozmotik stres ve oksidatif strese değinilmiştir.

ISI STRESİ

Mikroorganizmalar, geniş bir sıcaklık aralığında gelişme gösterebilirler de optimum gelişme sıcaklıkları nispeten daha dar bir aralıktadır (17, 18). Mikroorganizmalar değişimlere yanıt vermek ve uyum sağlamak için sahip oldukları hücresel mekanizmalar ile stres faktörlerine hızlı fizyolojik adaptasyonlar göstererek ılımlı (orta) sıcaklık değişimlerini tolere edebilirler (19). Isı stresi, ısı şok proteinlerinin (heat shock proteins-HSPs) sentezlenmesine neden olan yüksek sıcaklık stresi ve soğuk şok proteinlerinin (cold shock proteins-CSPs) sentezlenmesine neden olan düşük sıcaklık stresi (soğuk stresi) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (20).

Yüksek Sıcaklık Stresi ve Isı Şok Proteinleri (HSPs)

Stres faktörlerine maruz kalan birçok biyolojik yapı strese karşı belirli yanıtlar ve bazı maddeler oluşturur. Bu maddelerin başında ise stres proteinleri olarak da adlandırılan ısı şok proteinleri (Hsps) gelir (21, 22). Isı şok proteinleri, hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerde mevcuttur (23). Hsp'lerin boyutları 27 ile 110 kDa arasında değişir. Hsp'ler boyut ve işlevlerine bağlı olarak 5 grup altında incelenir. Bunlar; Hsp 100, Hsp 90, Hsp 70, Hsp 60 ve küçük (26-28 kDa) ısı şok proteinleridir (21, 24). Bunların yüksek ölçüde korunmuş bir yapıda olması, hücresel süreçlerde birincil derecede önemli bir rol oynadığını gösterir (23). Isı şok proteinlerinin çoğu, hem iç hem de dış çevre koşulları ile başa çıkabilmek için organizmalara yardımcı olan moleküler şaperonlar gibi işlev görmektedir (4). Hücrede sentezlenen proteinlerin doğru bir şekilde katlanmasına yardımcı olan maddelere "moleküler şaperonlar" adı verilir. Şaperonlar, tüm canlı organizmalarda bulunan ve protein sentezi esnasında ya da sentezden hemen sonra proteinlerin işlevsel 3 boyutlu yapılarını almalarını sağlayan yapılardır. Bir hücre içindeki protein katlanma dinamiğini etkileyen stres koşulları, proteinlerin katlanmasındaki bileşenlerin ekspresyonunda değişikliklere neden olabilir (25, 26). Hsp'lerin çoğu ısı nedeniyle stres altında bulunan hücrelerin hayatta kalmasından, zarar

görmüş proteinlerin kümeleşmeden kalmasından ve tekrar fonksiyonel yapılarına dönmesinden, kümeleşmiş proteinlerin açılmasından ve zarar görmüş proteinlerin onarılarak tekrar katlanmasından, fonksiyonel olmayan ama zararlı olabilecek peptitlerin ortadan kaldırılmasından ve proteinlerin membran boyunca translokasyonundan (yer değiştirmesinden) sorumludur (4, 18, 21, 24). Chiang ve Chou (27), 47°C'de letal strese maruz bırakılan *Vibrio parahaemolyticus*'un farklı gelişim fazlarındaki duyarlılığını ve ısı şok yanıtının kültür üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Yapılan çalışmada log fazın ortasındaki *V. parahaemolyticus* hücreleri çevre stresine karşı en duyarlı hücreler olmuştur. Durağan fazdaki letal strese duyarlılık ise en az olmuştur. Hücrelere ısı şoku adaptasyonu uygulandıktan sonra hücrelere letal stres uygulanmış ve *V. parahaemolyticus*'un direncinde bir artma görülmüştür. *V. parahaemolyticus*'un adapte edilen hücreleri ile kontrol hücreleri arasındaki direnç farklılığının büyüme fazına bağlı olarak değiştiği bulunmuştur. Tüm hücreler karşılaştırıldığında ise durağan fazdaki adapte edilmiş hücrelerin ısı şokuna duyarlılığı en az olmuştur (27). Fonksiyonel *Lactobacillus plantarum* suşlarının gıdalardaki stres koşullarına karşı dayanıklılığının araştırıldığı başka bir çalışmada, fonksiyonel özellikleri olan üç *L. plantarum* suşunun (Lp 790, Lp 813 ve Lp 998) ısı stresi, ozmotik ve oksidatif stres faktörlerine karşı hayatta kalmaları incelenmiştir. Üç suşa 55°C'de 15 dk süre ile ısı stresi uygulanmıştır. Isı stresi sonrasında Lp 790 suşunun canlılığındaki azalma 5 logaritmik birim (log) olurken diğer iki suş için azalma 3 log olmuştur. Bu sonuca göre Lp 790 suşu sıcaklık faktörüne en duyarlı suştur. Diğer iki suş ise üç stres faktörüne karşı genel olarak aynı davranışı göstermiş ve sıcaklık stresi sonrasındaki canlılıklarında çok az bir azalma olmuştur. Farklı stres faktörleri, suşların canlılığını ve/veya performansını önemli ölçüde etkileyebileceğinden bu sonuçlar muhtemel "probiyotik" kültürlerin seçiminde hücrelerin teknolojik dirençlerinin de dikkate alınması gerektiğini göstermektedir (28). Yang ve arkadaşları *Cronobacter sakazakii* ile yaptıkları çalışmada Baranyi ve Roberts modelini kullanarak lag fazı süresi, iki katına çıkma süresi ve maksimum spesifik gelişme hızlarını belirlemiştir. Isı ve asit stresine adapte edilen hücrelerin lag fazı süresi ve maksimum spesifik gelişme hızı strese maruz kalmayan hücrelere göre fazla olmuştur. Hücrelerin iki katına çıkma süresi ise strese maruz kalmayan hücrelerine göre daha az olmuştur (29).

Düşük Sıcaklık (Soğuk) Stresi ve Soğuk Şok Proteinleri (CSPS)

Son zamanlarda yapılan araştırmalar, çeşitli soğuk habitatlardan elde edilen yeni bakteri ve fungus cins ve türlerinin psikrofilik özellik gösterebileceğini ortaya koymuştur. Psikrofiller düşük sıcaklık ortamlarında başarıyla gelişebilmek için bir dizi karmaşık yapısal ve işlevsel adaptasyonlar

geçirmektedir (30). Bu adaptasyon sistemi; soğuk stresine maruz kalınması sonucunda oluşan çeşitli negatif etkilerin üstesinden gelinmesini sağlamaktadır (31). Düşük sıcaklıklar tarafından uyarılan stres yanıt sistemi bir grup geni uyarmakta ve hem ökaryotik hem de prokaryotik mikroorganizmalar için ortak olan soğuk şoku yanıtına neden olmaktadır (32-34). Soğuk yanıtı sistemi, soğuk şok proteinleri (Csp's) olarak adlandırılan proteinlerin geçici olarak uyarılması ile oluşmaktadır. Bu sistem araştırılırken mezofilik bir bakteri olan *Escherichia coli* yoğun bir şekilde incelenmiştir. Önemli bir soğuk şoku proteini olan CspA, ilk olarak *E. coli*'den elde edilmiş ve o zamandan beri homologları psikrotrofik, psikrofilik, mezofilik ve termofilik suşlarında dahil olduğu çeşitli Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde tespit edilmiştir (35, 36). Hücreler düşük sıcaklığa maruz kaldığında yapılarında membran esnekliğinin kaybı, nükleik asitlerdeki ikincil yapıların stabilizasyonu, DNA'nın negatif süper sarmalındaki artış, ribozom işlevinin inhibasyonu, bazı proteinlerin açılması veya yanlış katlanması gibi çeşitli değişiklikler meydana gelmektedir (19, 31). Yapılan bir çalışmada mezofilik bir Gram pozitif bakteri olan *Enterococcus faecalis* JH2-2 üzerine soğuk şoku uygulanmış ve soğuk şok proteinleri incelenmiştir. *E. faecalis*'in 37°C'den 8°C'ye transferi, 11 adet Csp's'nin ekspresyonuna neden olmuştur (20). Başka bir çalışmada ise farklı soğutma sıcaklıkları ve sürelerinin *Lactobacillus acidophilus* RD758'in -20°C'de dondurulması ve donmuş olarak depolanmasındaki direncine olan etkisi CCRD (Merkezi Tümleşik Tasarım - Central Composite Rotatable Design) yöntemiyle incelenmiştir. Soğuk adaptasyonu, hücreler son sıcaklık olan 15°C'ye soğutulmadan önce ılımlı bir sıcaklık olan 26°C'de görülmüştür. Deneysel dizayn, optimal soğutma koşulunu 28°C olarak belirlemiştir. Aynı yöntem ile hücre zarındaki yağ asiti kompozisyonu incelenmiş doymamış yağ/doymuş yağ oranının ve C19:0 yağ asidi konsantrasyonunun arttığı ortaya konulmuştur. Bununla birlikte optimal soğutma koşullarında adaptif yanıt olarak 4 adet proteinin sentezlendiği bildirilmiştir (37). Tripathy ve ark., 2014 yılında yaptıkları bir araştırmada çeşitli çevresel streslere karşı canlı kalma ve adaptasyon mekanizmaları tam olarak anlaşılmayan *Brevibacillus borstel*'in soğuk şoku yanıtına adaptasyonunu genom düzeyinde incelemişlerdir. Organizmanın düşük sıcaklığa karşı olan moleküler yanıtını tanımlayabilmek için yüksek çıktılı dizileme (high-throughput sequencing/HTS) teknolojisi ile *B. borstel*'in 20°C'deki gen ekspresyonu profili ortaya konulmuştur. Maksimum uzunluğu 9919 baz çifti olan toplam 4579 transkript belirlenmiştir. Gen ekspresyonu profilinin çıkarılması, soğuk şoku sırasında önemli ölçüde artarak ya da azalarak hücreyi regüle eden 712 genin tespit edilmesini sağlamıştır (38). Başka bir çalışmada ise termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'dan elde edilen soğuk şok proteinlerinin (Ta-Csp) yapısı

ve dayanıklılığı Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR) kullanılarak incelenmiştir. Ta-Csp'nin mezofilik ve psikrofiliklerden elde edilen Csp'ler ile karşılaştırıldığında Ta-Csp'nin daha dayanıklı olduğu bulunmuştur (39). Derman ve arkadaşları ise patojen bir bakteri olan *Clostridium botulinum* ATCC 3502 ile yaptıkları araştırmada doğal suş ile bu suşun 3 mutantının (Csp eklenmiş) NaCl, pH ve etanol stresi ve *C. botulinum* ATCC 3502 hareketliliği üzerine olan etkisini incelemişlerdir. İnceleme sonucunda 3 soğuk şok mutantından ikisinin NaCl, pH ve etanol stres yanıtları ve *C. botulinum* ATCC 3502 hareketliliği için önemli olduğu ortaya çıkmıştır (34).

ASİT STRESİ

Her mikroorganizma gelişebilmesi için uygun bir pH aralığına ve iyi tanımlanmış optimum bir pH'ya sahiptir. Optimum gelişme pH'sı, sadece hücre dışındaki çevrenin pH değerini ifade eden bir kavramdır. Hücre içi pH değeri, asidik ve bazik koşullara dayanamayan makromoleküllerin hasar görmesini engellemek için nötrale yakın bir değerde kalmaktadır (33). Bakterilerin buldukları ortamın pH'sında meydana gelen değişiklikleri algılayarak belirli bir süre içinde ortama uyum sağlama yeteneğine, pH homeostasis mekanizması adı verilmektedir. Bu mekanizma, dış ortam pH'sında meydana gelen değişikliklere karşı sitoplazma pH'sının nötr değerlere yakın kalmasını sağlamaktadır. Ortam pH'sındaki 2-3 birimlik bir değişim sitoplazma pH'sında 0.1 birimden daha az bir değişikliğe neden olur (7, 40). Hücre içi pH dengesini bozan streslerin başında asit stresi gelmektedir. Asidik çevrelere karşı indüklenebilir tolerans, prokaryotik ve ökaryotik mikroorganizmaların çoğu için önemli bir hayatta kalma stratejisi olarak kabul edilmektedir. Bu olguyu anlamak için yapılan son çalışmalar; düzenleyici genlerin tanımlanmasını, asit tolerans yanıtını (ATR) ve toleransla ilgili genleri içermektedir (41). ATR, orta şiddette düşük pH'ya maruz kalmış olan bakterilerin çoğunda gözlemlenen ve oldukça düşük pH'larda hücrenin hayatta kalmasını sağlayan proteinlerin sentezinin tetiklendiği bir olgudur. ATR, log fazı ve durgunluk fazı hücrelerinde farklılık göstermektedir. Bu yanıt ayrıca farklı bakteri türleri arasında da önemli ölçüde farklılık göstermektedir (6). Bu nedenle mikroorganizmalardaki adaptif değişikliklerin belirlenmesi için asit direnci mekanizmasının iyi anlaşılması önemlidir (42).

Bakteriler pek çok yolla asit stresine yanıt vermektedir. Bunlar; membran bileşimindeki değişimler, proton akışındaki artış, aminoasit katabolizmasındaki artış ve DNA'yı onaran enzimlerin uyarılmasıdır (6, 43). Asit şoku veya adaptasyon proteinlerinin uyarılması için verilen sinyal, hücre içinde veya hücre dışında değişen pH'dan kaynaklanmaktadır. Dış ya da perioplazmadaki pH değişimi, membrana bağlı olan proteinler tarafından algılanabilmektedir (41). Hücre içindeki pH değişimi ise gen ekspresyonunu doğrudan etkileyebilmekte veya gen ekspresyonu için gerekli

olan hücresel bir bileşeni değiştirebilmektedir (6). Son yıllarda en dikkat çeken konu patojen mikroorganizmaların sıcaklık, pH ve su aktivitesinin esas aralığında bir sınırın olmadığı keşfidir. Bazı patojen bakteriler orta düzeydeki asitli ortamlara belirli bir süre maruz kaldıklarında asit şok proteinleri sentezleyerek yüksek asitli ortamlardaki canlılıklarını sürdürebilirler (7, 40). Bu da bakterilerde asit direncine neden olmaktadır. *E. coli*, *Salmonella enterica* ve *Shigella flexneri* gibi suşlar düşük pH'ya karşı oldukça dirençlidirler ve memelilerin midesindeki asidik koşullarda (~pH=2.0) diğer patojenlere kıyasla daha uzun süre ile canlı kalabilmektedir. Bu mikroorganizmalar durağan bir fazda, pH=2.5 gibi bir değerde birkaç saat boyunca canlı kalabilirler (42). Gıda kaynaklı bakteriyel patojenler, gıda maddelerinde ya da gastrointestinal sistem ve konak hücrelerinde organik ve inorganik asitler ile karşılaşmaktadırlar (6). Organik asitler, bazı gıdaların yapısında doğal olarak bulunabileceği gibi bazılarında ise mikrobiyel fermantasyonun bir sonucu olarak da bulunabilmektedir. Gıdaların hazırlanması sırasında kullanılan organik asitler mikroorganizmaların hücre içi pH'sını, hidrojen iyonlarının hücre sitoplazmasına akışıyla, azalmaya zorlar. Bu nedenle metabolizmaya ilgili çeşitli fonksiyonlar durur ve mikrobiyel gelişim kontrol altına alınmış olur (7). Sagong ve ark., çalışmalarında laktik asit, malik asit, sitrik asit ve ultrasoundun patojen bakteriler üzerine etkilerini incelemiş ve en etkin inhibasyonun %2 organik asit + ultrasound kombinasyonunda olduğunu bildirmişlerdir (44). Lee ve ark., ise hıyar turşusuna benzer bir ortam yaratmak için %50 ve %94 konsantrasyonda hıyar püresi hazırlamış ve bu ürüne *E. coli* O157:H7 inoküle etmişlerdir. Çalışmalarında asetik asidin ve asetik asidin tuz ile birlikte kullanımının bu patojenin canlılığına olan etkisini, depolama süresince incelemişlerdir. Artan asetik asit miktarı *E. coli* O157:H7'nin canlılığında azalmaya neden olurken asidin %3 NaCl ile birlikte kullanımında ise asetik asidin tek başına gösterdiği etkiden daha az etki gösterdiği görülmüştür. Bu durumun nedenini ise asit ve tuzun birlikte kullanımının antagonistik etki göstermesi ile açıklamışlardır (45). Mikroorganizmaların olumsuz koşullara adaptasyonu, saprofitlerin ve gıda kaynaklı patojenlerin inaktivasyonunda bir sorun olarak ortaya çıkarken, gıda içerisinde uzun süre canlı kalmaları ve/veya sindirim sistemini canlı olarak geçmeleri istenilen probiyotiklerde ise bir avantaj haline gelebilmektedir. Saarela ve ark., 3'er adet *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşu kullanarak durgun faz hücrelerine subletal düzeyde stres uygulamış ve bu suşların letal stres sırasındaki canlılıklarını incelemişlerdir. Subletal stres sonucu suşlarda asit direnci gelişmiş ve tüm suşların canlılığında sadece 0.5 log azalma olmuştur. Letal strese karşı ise suşların verdiği tepkiler farklı olmuştur (46). *Lactobacillus*'lardaki çevresel stres yanıtları ağırlıklı olarak proteomik yaklaşımlar şeklinde ortaya

konulmuştur. Adaptasyonun proteomik düzeydeki etkisini incelemek için yeni bir probiyotik bakteri olan *L. casei* Zhang pH 2.5 ve pH 6.4'te 30 dk süre ile asit stresine maruz bırakılmıştır. Bu bakterinin hücrelerinden sitozolik proteinler (sitoplazma içindeki) ekstrakte edilmiş ve akabinde proteinlerin 2 boyutlu jel elektroforezi yapılarak iki adet protein haritası oluşturulmuştur. Kontrol grubunun protein haritası ile adapte edilmiş hücrelerin protein haritası karşılaştırıldığında 33 protein beneğinin ekspresyonu değiştiği görülmüştür. pH 2.5'deki ekspresyonda 22 proteinin ekspresyonunun 1.5 kat arttığı gözlenmiştir (47).

OZMOTİK STRES

Ozmotik basıncın artırılması, gıda ürünlerinin korunması için kullanılan en yaygın yöntemler arasında yer almaktadır. Yapılan uygulama ile mikroorganizma tarafından kullanılabilir olan su miktarı azaltılmaktadır. Mikroorganizmalar minimum su aktivitesi (a_w) limitlerinin altında gelişim gösteremedikleri için özellikle bakteriyel gelişim açısından su aktivitesi çok önemlidir. Bu sınırlı a_w değeri; çözünen madde olarak kullanılan tuzlara (NaCl, KCl, vb), şekerlere (glikoz, sakkaroz, vb) ya da gliserole bağlıdır. Örneğin *Pseudomonas fragi* için NaCl kullanımında minimum gelişme a_w 'si 0.957 iken gliserol kullanımında bu değer 0.94'tür. Su aktivitesi 0.80'nin altına düştüğünde bakteriler gelişim gösteremezken bu değer altındaki a_w 'lerde (0.60) funguslar gelişebilmektedir (3, 48).

Bakteriler, gıdaların içerisinde yüksek şeker ve tuz (NaCl) gibi veya kurutulmuş ürünlerde olduğu gibi çeşitli ozmotik streslere maruz kalırlar. Bu durumlarda özellikle turgor basıncı ve dehidrasyon bakteriler için çok önemlidir. Bir hiperozmotik şoktan sonra oluşan geçici turgor basıncına karşı verilen yanıtlar ozmoregülasyon olarak adlandırılmaktadır. Hiperozmotik şartlar altındaki bakterilerde en iyi karakterize edilen metabolizma, hücre içi ozmolit (çözünen madde/uyumlu madde) olarak adlandırılan maddelerin birikimidir. Bir organizma düşük su aktivitesine sahip bir ortamda bulunuyorsa, çevresinden su sağlayabilmesi için tek yol, hücre içi ozmolit konsantrasyonunu artırmaktır. Hücre içi ozmolit konsantrasyonu ya inorganik iyonların (K^+ gibi) çevreden hücre içine pompalanması ya da organik çözünen sentezi veya bu maddelerin konsantrasyonunu artırarak artırılmaktadır. Bu mekanizmalardan birini ya da diğerini kullanan pek çok organizma vardır. Uyumlu maddelerin birikimi doğrudan doğruya mikroorganizma tarafından sentez yoluyla sağlanabileceği gibi, bazı durumlarda hücre dışından hücre içine transfer şeklinde de gerçekleşebilir. Bu maddeler, çoğunlukla nötr fakat polar yapıda, çözünürlüğü yüksek olan ve yüksek konsantrasyonlarda bile normal hücre fonksiyonlarını etkilemeden ozmotik basıncın etkisini gideren bileşiklerdir. Glin betain, prolin, ektoin, karnitin, kolin ve trehaloz yaygın uyumlu çözünen maddelerdir. Bu bileşiklerin birikimi, gen transkripsiyonu düzeyinde veya doğrudan

enzim aktivitesinin değiştirilmesi ile ayarlanmaktadır (6, 49). Ekstrem halofilik *Archaea* ve çok az sayıdaki ekstrem halofilik *Bacteria*'daki uyumlu çözünen madde K^+ (KCl)'dur (33). Ozmotik stres altındaki hücrelerde uyumlu çözünen maddelerin birikiminin yanı sıra membran lipid kompozisyonunda (fosfolipit ve yağ asitleri değişikliklerini de kapsayan) değişimlerin de meydana geldiği gözlenmiştir (3, 48).

Gıda kaynaklı patojenlerin ve bozulmaya neden olan bakterilerin gelişiminin inhibisyonunun etkili bir şekilde olması için uzun süreden beri gıdalara gıda antimikrobiyelleri eklenmektedir. Bu amaçla çeşitli sodyum veya potasyum tuzları mikrobiyel gelişimi kontrol altına almak, çeşitli gıdaların (et, tavuk ve balık gibi) raf ömrünü uzatmak ve aynı zamanda duyuşsal özelliklere katkıda bulunabilmek amacıyla kullanılmaktadır (50). Şekerlerin hiperozmotik çözümleri, meyvelerin dehidrasyonu ve yeniden biçimlendirilmesi için kullanılmaktadır (51). Fakat dikkat edilmesi gereken mikroorganizmaların sürekli olarak değişen ortamları algılayıp, bu ortamlara adapte olabilmek yeteneklerinin olduğudur. Bu durum onların canlı kalmaları ve gelişimi açısından çok önemlidir. Bununla beraber *Listeria monocytogenes* gibi patojenlerin yüksek tuz konsantrasyonlarına uyum sağlayarak hayatta kalabildiği ve gıdalardaki patojenlerin kontrol edilmesini zorlaştırdığı unutulmamalıdır (52). Glass ve ark., asit ve NaCl'nin *E. coli* O157:H7'nin canlı kalma oranı üzerinde etkisini araştırdıkları çalışmalarında *E. coli* O157:H7'nin %6.5 gibi yüksek NaCl konsantrasyonunda gelişebildiğini göstermişler ve %6.5 NaCl varlığında lag fazın normalden daha uzun olması nedeniyle bu patojenin tuz tolerans özelliğinin olabileceğini belirtmişlerdir (53). Faleiro ve ark., farklı kaynaklardan izole edilen *L. monocytogenes* suşlarını, %3.5 NaCl içeren besiyerinde 2 saat boyunca inkübe etmiş ve suşların tuza tolerans kazanmasını sağlamışlardır. Tolerans kazanan suşların, %20 NaCl içeren ortamdaki yaşama düzeyleri belirlenmiştir. Tuz toleransı, suşlar arasında farklılık göstermiş olup, 9 suştan 7'sinde tuz direncinde artış sağlanırken 2'sinde direnç sağlanamamıştır (54). Lee ve Kang, 2008 yılında *E. coli* O157:H7 üzerine ısı, asetik asit ve tuzun kombine etkisini inceledikleri çalışmalarında, bu üç faktörün tüm kombinasyonlarının etkileri ile faktörlerin tek başlarına kullanımlarının etkilerini karşılaştırmışlardır. Tuz ısı ile kombine edildiğinde *E. coli* O157:H7 miktarındaki azalmada önemli bir fark görülmemiş fakat asit, ısı ile kombine edildiğinde *E. coli* O157:H7'nin azalışı sadece asit etkisine göre daha fazla olmuştur. Tuz asit ile kombine edildiğinde ise tuz asit uygulamasına karşı koruyucu etki göstermiş yani sadece asit uygulamasına göre *E. coli* O157:H7'nin azalmasında daha az bir etki göstermiştir (55). Öztürk ise, *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes*'in asit ve tuz adaptasyonlarını sağlayarak, asit ve tuza olan dirençlerini ayrıca asit ve tuz adaptasyonunun *E. coli* O157:H7 ve

L. monocytogenes'in Türk sucuklarında yaşama düzeyleri üzerindeki etkilerini de incelemişlerdir. Tuz adaptasyon denemelerinde, %3.5 NaCl'e 1 saat süreyle tuza adapte edilen kültürler %8 NaCl içeren çözeltide 4°C ve 25°C'da 25 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu denemeler sonunda *L. monocytogenes*'in tuza direnç kazanmadığı görülmüş, *E. coli* O157:H7'nin ise 25°C'da muhafaza edilen kültürde tuz direnci artmış, 4°C'da muhafaza edilen kültürde ise direnç artışı olmamıştır. Asit adaptasyonu, *E. coli* O157:H7'nin Türk sucuğunda yaşama düzeyinde artışa neden olurken, *L. monocytogenes*'in yaşama düzeyi üzerinde önemli bir fark oluşturmamıştır. Ayrıca tuz adaptasyonu *E. coli* O157:H7'nin Türk sucuğunda yaşama düzeyini arttırmamıştır (8).

OKSİDATİF STRES

Oksidatif stres, oksidan ve antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulması ile oluşan ve hücrede hasarlara neden olan bir stres çeşididir (56, 57). Oksidatif stres özellikle fakültatif ve anaerobik mikroorganizmaları etkiler. Fakültatif organizmalar oksijenli ve oksijensiz koşullar altında gelişebilirken anaeroblar oksijen varlığında gelişmemektedir. Solunum ile enerji üretiminde oksijen önemli avantajlar sağlarken bu sırada oluşabilecek reaktif oksijen türleri (ROS) ise organizmanın yaşamını tehdit eder (58). Bu maddeler hücreler üzerinde toksik etki göstererek hücredeki lipid, protein ve DNA gibi makromolekülleri etkiler (59).

Çoğunluğunu serbest radikallerin oluşturduğu reaktif oksijen türleri normal oksijen molekülüyle karşılaştırıldığında, kimyasal reaktiviteleri daha yüksek olan oksijen formlarıdır (60). Serbest radikaller, bir veya birden fazla tek elektron (eşleşmemiş elektron çifti) içeren yüksek reaktiviteli moleküller veya gruplar olarak tanımlanmaktadır (59). Serbest radikaller normal metabolizma ürünleri ile hücre içinde (in vivo) oluşturulmakta ve reaktif oksijen türleri (ROS) ile reaktif nitrojen türleri (RNS) olmak üzere iki gruba ayrılır. ROS olarak isimlendirilen bu moleküller; süperoksit anyon radikali (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂), hidroksil radikalleri (HO⁻), hipoklorik asit (HOCl), singlet oksijen (O₂), ozon (O₃), alkil radikali (R), peroksil radikali (POO⁻), organik peroksit radikali (RCOO⁻), perhidroksil radikali (HO₂⁻), alkoksil radikali (RO⁻), RNS olarak adlandırılan molekülleri ise nitrik oksit (NO⁻), peroksinitrit (ONOO⁻)'tir (57, 61).

Hücreler subletal seviyedeki oksidanlara maruz kaldıklarında, adaptif yanıt sistemlerinin devreye girdiği belirlenmiştir (62). Oluşan serbest radikal ürünleri ve peroksitler gibi moleküllerin neden olabileceği oksidatif hasara karşı hücreler antioksidan savunma sistemleri tarafından korunur. Bu sistemler ikiye ayrılır;

-Enzimatik antioksidanlar (süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (Cat), selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) gibi)

-Enzimatik olmayan antioksidanlar (vitamin C, vitamin E, vitamin A, flavonoidler, melatonin, ürik asit, albümin, haptoglobulin, sistein, seruloplazmin, transferrin ve laktoferrin, ferritin, selenyum, oksipurinol, ubikinon, bilirubin, glutatyon, mannitol, lipoik asit, hemopeksin gibi)'dir.

Genel olarak enzimatik antioksidanlar hücre içinde enzimatik olmayan antioksidanlar ise hücre dışında daha fazla etkilidir (63). Bu onarım sistemleri oksidatif hasar görmüş makromolekülleri ortadan kaldırmakta ve/veya onarmaktadır. DNA onarımı için genellikle DNA nükleazlar ve glikosilazlar gerekir (62). Cruz ve ark., probiyotik yoğurtların işlenmesi sırasında oksidatif stresi azaltmak için artan konsantrasyondaki glikoz oksidazın etkisini incelemişlerdir. Glikoz oksidazın yüksek konsantrasyonda eklenmesi uzun süreli depolamada (30 gün) yoğurtlardaki çözünmüş oksijen seviyesinde az miktarda bir artışa neden olurken bu artış probiyotik yoğurtta bulunan *Bifidobacterium longum* ve *Lactobacillus acidophilus* sayılarında küçük bir düşüşe sebep olmuştur (64).

KAYNAKLAR

1. Dikici A. 2009. Çevresel Stres Faktörlerine Karşı Bakteriyel Adaptasyonlar ve Mekanizmaları. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 4 (3): 59-68.
2. Schimel J, Balsler TC, Wallenstein M. 2007. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecological Society of America Annual Meeting Abstracts*, 88 (6): 1386-1394.
3. Russell NJ, Evans RI, Steeg PF, Hellemons J, Verheul A, Abee T. 1995. Membranes as a target for stress adaptation. *International Journal of Food Microbiology*, 28: 255-261.
4. Sorensen JG, Kristensen TN, Loeschke V. 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters*, 6: 1025-1037.
5. Aksöz N. 1985. Halofilik Bakteriler. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 19: 161-167.
6. Yousef AE, Courtney PD. 2003. Basics of stress adaptation and implications in new generation foods. *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*. (Editor: AE Yousef and VK Juneja). CRC Pres, New York. Syf:1-25.
7. Hill C, O'Driscoll B, Booth I. 1995. Acid adaptation and food poisoning microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 25: 245-254.
8. Öztürk FY. 2010. Asit ve Tuza Adapte Edilmiş *Escherichia coli* O157:H7 ve *Listeria monocytogenes*'in Türk Sucuklarında Yaşama Düzeylerinin Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi, Ankara, Türkiye, 132 s.
9. Velliou EG, Derlinden EV, Cappuyns AM, Goossens J, Geeraerd AH, Devlieghere F, Van Impe JF. 2011. Heat adaptation of *Escherichia coli* K12: effect of acid and glucose. *Procedia Food Science*, 1: 987-993.

10. Isohanni P, Huehn S, Aho T, Alter T, Lyhs U. 2013. Heat stress adaptation induces cross-protection against lethal acid stress conditions in *Arcobacter butzleri* but not in *Campylobacter jejuni*. *Food Microbiology*, 34: 431-435.
11. Oger PM, Cario A. 2013. Adaptation of the membrane in Archaea. *Biophysical Chemistry*, 183: 42-56.
12. Ordóñez AA, Broussolle V, Colin P, Nguyen-The C, Prieto M. 2015. The adaptive response of bacterial food-borne pathogens in the environment, host and food: Implications for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 213: 99-109.
13. Chowdhury R, Sahu GK, Das J. 1996. Stress response in pathogenic bacteria. *Journal Biosciences*, 21 (2): 149-160.
14. Requana JM (ed). 2012. *Stress Response in Microbiology*. Caister Academic Press, Madrid, Spain, 436 p.
15. Dahlsten E, Lindström M, Korkeala H. 2015. Mechanisms of food processing and storage-related stress tolerance in *Clostridium botulinum*. *Research in Microbiology*, 166: 344-352.
16. Ergin F, Çomak Göçer EM, Aşçı Arslan A, Küçükçetin A. 2012. Probiyotik Bakterilerin Düşük Sıcaklık Stresine Adaptasyonu. *Akademik Gıda*, 10: 65-69.
17. Moat AG, Foster JW, Spector MP. 2002. Microbial Stress Responses. In: *Microbial Physiology*, Fourth Edition, John Wiley & Sons, Inc., USA, s 582- 611.
18. Verghese J, Abrams J, Wang Y, Morano KA. 2012. Biology of the Heat Shock Response and Protein Chaperones: Budding Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a Model System. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76 (2): 115-158.
19. Phadtare S, Inouye M. 2008. Cold-Shock Proteins. *Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology*, Margesin R (chief ed), Springer, Heidelberg, Germany, p. 191-205.
20. Panoff JM, Corroler D, Thammavongs B, Boutibonnes O. 1997. Differentiation between Cold Shock Proteins and Cold Acclimation Proteins in a Mesophilic Gram-Positive Bacterium *Enterococcus faecalis* JH2-2. *Journal of Bacteriology*, 179 (13): 4451-4454.
21. Aşkar TK, Ergün N, Turunç V. 2007. Isı Şok Proteinler ve Fizyolojik Roller. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 13 (1): 109-114.
22. Guzzo J. 2012. Biotechnical applications of small heat shock proteins from bacteria. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44: 1698-1705.
23. Kiang JG, Tsokos GC. 1998. Heat Shock Protein 70 kDa: Molecular Biology, Biochemistry and Physiology. *Pharmacology & Therapeutics*, 80 (2): 183-201.
24. Moseley PL. 1997. Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism whole organism. *Journal of Applied Physiology*. 83 (5): 1413-1417.
25. Voisine C, Pedersen JS, Morimoto RI. 2010. Chaperone networks: Tipping the balance in protein folding diseases. *Neurobiology of Disease*, 40 (1): 12-20.
26. Adıyaman S. E. 2014. Saanen keçilerinde HSP 60 ve HSP 70 genlerinin kantitatif analizi. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, Türkiye, 75 s.
27. Chiang ML, Chou CC. 2009. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* under environmental stresses as influenced by growth phase and pre-adaptation treatment. *Food Microbiology*, 26: 391-395.
28. Ferrando V, Quiberoni A, Reinhemer J, Suarez V. 2015. Resistance of functional *Lactobacillus plantarum* strains against food. *Food Microbiology*, 43: 63-71.
29. Yang HY, Kim SK, Choi SY, You DH, Lee SC, Bang WS, Yuk HG. 2015. Effect of acid, desiccation and heat stresses on the viability of *Cronobacter sakazakii* during rehydration of powdered infant formula and in simulated gastric fluid. *Food Control*, 50: 336-341.
30. Margesin R, Miteva V. 2011. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Research in Microbiology*, 162: 346-361.
31. Mega R, Manzoku M, Shinkai A, Nakagawa N, Kuramitsu S, Masui R. 2010. Very rapid induction of a cold shock protein by temperature downshift in *Thermus thermophilus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 399: 336-340.
32. Berger F, Morellet N, Menu F, Potier P. 1996. Cold Shock and Cold Acclimation Proteins in the Psychrotrophic Bacterium *Arthrobacter globiformis* S155. *Journal of Bacteriology*, 178 (11): p, 2999-3007.
33. Madigan MT, Martinko JM, Clark DP. 2010. *Brock Biology of Microorganisms*. Tenth Edition, Pearson Education International, USA.
34. Derman Y, Söderholm H, Lindström M, Korkeala H. 2015. Role of csp genes in NaCl, pH, and ethanol stress response and motility in *Clostridium botulinum* ATCC 3502 *Food Microbiology*, 46: 463-470.
35. Phadtare S, Alsina J, Inouye M. 1999. Cold-shock response and cold-shock proteins. *Current Opinion in Microbiology*, 2: 175-180.
36. Ivancic T, Jamnik P, Stopar D. 2013. Cold shock CspA and CspB protein production during periodic temperature cycling in *Escherichia coli*. *BMC Research Notes*, 6: 248.
37. Wang Y, Delettre J, Guillot A, Corrieu G, Béal C. 2005. Influence of cooling temperature and duration on cold adaptation of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *Cryobiology*, 50: 294-307.
38. Tripaty S, Sen R, Padhi SK, Sahu DK, Nandi S, Mohanty S, Maiti NK. 2014. Survey of the transcriptome of *Brevibacillus borstelensis* exposed to low temperature shock. *Gene*, 550:207-213.

39. Jin B, Jeong KW, Kim Y. 2014. Structure and flexibility of the thermophilic cold-shock protein of *Thermus aquaticus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 451: 402-407.
40. Tosun H. 2003. Bazı Patojen Bakterilerin Aside Tolerans Kazanmasının Tanımlanma ve Gıda Sanayindeki Önemi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi, İzmir, Türkiye, 179 s.
41. Foster JW. 1999. When protons attack: microbial strategies of acid adaptation. *Current Opinion in Microbiology*, 2: 170- 174.
42. Liu Y, Tang H, Lin Z, Ping Xu. 2015. Mechanisms of acid tolerance in bacteria and prospects in biotechnology and bioremediation. *Biotechnology Advances*, 33: 1484-1492.
43. Yang Y, Kadim MI, Khoo WJ, Zheng Q, Setyawati MI, Shin YJ, Lee SC, Yuk HG. 2014. Membrane lipid composition and stress/virulence related gene expression of *Salmonella Enteritidis* cells adapted to lactic acid and trisodium phosphate and their resistance to lethal heat and acid stress. *International Journal of Food Microbiology*, 191: 24-31.
44. Sagong HG, Lee SY, Chang PS, Heu S, Ryu S, Choi YJ, Kang DH. 2011. Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce. *International Journal of Food Microbiology*, 145: 287-292.
45. Lee SY, Rhee MS, Dougherty RH, Kang DH. 2009. Antagonistic effect of acetic acid and salt for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 in cucumber puree. *Journal of Applied Microbiology*, 108: 1361-1368.
46. Saarela M, Rantala M, Hallamaa K, Nohynek L, Virkajärvi I, Mättö J. 2004. Stationary-phase acid and heat treatment for improvement of the viability of probiotic lactobacilli and bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 1205-1214.
47. Wu R, Zhang W, Sun T, Wu J, Yue X, Meng H, Zhang H. 2011. Proteomic analysis of responses of a new probiotic bacterium *Lactobacillus casei* Zhang to low acid stress. *International Journal of Food Microbiology*, 147: 181-187.
48. Beales N. 2004. Adaptation of Microorganisms to Cold temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol.3.
49. Gülbezer S, Ökmen G. 2012. Ozmotik Koruyucular ve Mikroorganizmalar. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 5 (1): 41-52.
50. Yuan W, Ágoston R, Lee D, Lee SC, Yuk HG. 2012. Influence of lactate and acetate salt adaptation on *Salmonella Typhimurium* acid and heat resistance. *Food Microbiology*, 30: 448-452.
51. Burgess CM, Gianotti A, Gruzdev N, Holah J, Knöchel S, Lehner A, Margas E, Esser SS, Sela S, Tresse O. 2016. The response of foodborne pathogens to osmotic and desiccation stresses in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 221: 37-53.
52. Gandhi M, Chikindas ML. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113: 1-15.
53. Glass KA, Loeffelholz JM, Ford JP, Doyle MP. 1992. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 2513-2516.
54. Faleiro ML, Andrew PW, Power D. 2003. Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. *International Journal of Food Microbiology*, 84: 207-216.
55. Lee SY, Kang DH. 2008. Combined effects of heat, acetic acid, and salt for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory media. *Food Control*, 20: 1006-1012.
56. Yerer MB, Aydoğan S. 2000. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 9 (1): 49-53.
57. Tabakoğlu E, Durgut R. 2013. Veteriner Hekimlikte Oksidatif Stres ve Bazı Önemli Hastalıklarda Oksidatif Stresin Etkileri. *Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Dergisi*, 3 (1): 69-75.
58. Fu H, Yuan J, Gao H. 2015. Microbial oxidative stress response: Novel insights from environmental facultative anaerobic bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 584: 28-35.
59. Akpoyraz M, Durak İ. 1995. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 48: 258-262.
60. Koca N, Karadeniz F. 2003. Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları ve Vücuttaki Antioksidan Savunma Sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, s 32-37.
61. Freeman BA, Crapo JD. 1982. Biology of Disease. *Laboratory Investigation*, 47 (5): 412-426.
62. Crawford DR, Davies KJA. 1994. Adaptive Response and Oxidative Stress. *Environmental Health Perspectives*, 102 (10): 25-28.
63. Gümüştaş MK, Atukeren P. 2008. Oksidatif ve Nitrozatif Stresin Psikiyatrik Bozukluklarla İlişkisi. *Türkiye'de Sık Karşılaşılan Psikiyatrik Hastalıklar*, Uğur M, Balcıoğlu İ, Kocabaşoğlu N.(ed), Sempozyum Dizisi, İstanbul, Türkiye, 62: 329-340.
64. Cruz AG, Castro WF, Faria JAF, Lollo PCB, Amaya-Farfán J, Freitas MQ, Rodrigues D, Oliveira CAF, Godoy HT. 2012. Probiotic yogurts manufactured with increased glucose oxidase levels: Postacidification, proteolytic patterns, survival of probiotic microorganisms, production of organic acid and aroma compounds. *Journal of Dairy Science*, 95: 2261-2269.

STEVIA; FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİ VE GIDALARDA KULLANIM OLANAKLARI

Pınar Balkır*

Ege Üniversitesi, Ege Meslek Yüksekokulu, İzmir

Geliş tarihi / Received: 13.04.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 06.05.2016

Kabul tarihi / Accepted: 11.05.2016

Özet

İlk olarak Paraguay'da hasat edilen, *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisinin yapraklarından elde edilen steviol glikozitler, sakkarozun yaklaşık 300 katı kadar tatlılığa sahiptir. Stevia bitkisi içerisinde, bitki yaprağının kurumaddesinin yaklaşık %30'a kadarlık kısmını oluşturan on bir temel glikozit bulunmaktadır. Bunun yanı sıra kalori içermemesi ve sağlık üzerinde çeşitli olumlu etkilere sahip olması nedeniyle son yıllarda dünyanın birçok yerinde doğal tatlandırıcı olarak kullanımı yaygınlaşmıştır. Üstelik steviol glikozitler, gıdaların işlenmesi ve depolanması sırasında tatlılığını koruma ve çok farklı işlem koşullarında stabilitesini kaybetmeme gibi özellikleri açısından üreticilere avantaj sağlamaktadır. Günümüzde dünyanın birçok yerinde stevia çay, alkolsüz içecekler, meyve suları, yoğurt, soya sütü, fırınlanmış ürünler, tahıl ürünleri, salata sosları, şekerleme ürünleri gibi birçok işlenmiş gıda ürünlerinde kullanımının yanı sıra, sofraya şeker olarak da karşımıza çıkmaktadır. Stevia'nın botanik özellikleri, sağlık üzerindeki etkileri, yapraklarından tatlandırıcı ekstraksiyonu ve gıdalarda şeker yerine kullanım olanaklarının ele alındığı bu derlemenin, yakın gelecekte ülkemizde yapılacak araştırmalara ışık tutacağı düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: Stevia, steviol glikozit, steviozite, rebaudiozite A, tatlandırıcı

STEVIA; FUNCTIONAL PROPERTIES AND USE IN FOOD SYSTEMS

Abstract

Steviol glucosides, extracted from the leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni native to Paraguay, are nearly 300 times sweeter than sucrose. There are eleven main glycosides in the stevia plant, which comprise up to 30% of the dry weight of the plant leave. Despite intense sweetness, non-caloric and suggested to exert beneficial effects on human health, resulted in their wide use as natural sweeteners in various foods all over the world. Steviol glycosides have additional qualities that are beneficial to manufacturers. They tend to maintain their sweetness during normal conditions of food processing and storage and are stable across a broad spectrum of manufacturing conditions. Today, stevia can be found in hundreds of food and beverage products from around the world including teas, soft drinks, juices, yogurt, soymilk, baked goods, cereal, salad dressings, confections and as a tabletop sweetener. In this review, the purpose of which is considered to highlight recent research in this area, the botanical aspects, health concerns of stevia consumption, the extraction methods and the use of steviol glucosides as sweeteners in foods are discussed.

Keywords: Stevia, steviol glycoside, steviozite, rebaudioside A, sweetener

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ pinar.balkir@ege.edu.tr,

☎ (+90) 232 311 4031,

☎ (+90) 232 388 7599

GİRİŞ

Stevia rebaudiana Bertoni, ilk olarak Paraguay'ın kuzey doğusunda yer alan Amambay bölgesinde hasat edilen ve *Asteraceae* (papatyagiller) veya *Chrysantemum* (kasımpatı) familyasına ait olan, dallı yapıda bir bitkidir. 1899 yılında Moisés Santiago Bertoni tarafından botanik olarak sınıflandırılmış ve detaylı olarak tanımlanmıştır. Önceleri *Eupatorium rebaudianum* olarak adlandırılan bu bitki, 1905 yılında *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni adını almıştır. Yapraklardan tatlı bileşen 1909 yılında izole edilmiş ve 1931'de saflaştırılarak stevözit elde edilmiştir. 1952'de ise kimyasal yapısı incelenerek bir diterpen glikozit olduğu tanımlanmıştır. 1970'li yıllarda ise steviozitten daha da tatlandırma yeteneğine sahip olan rebaudiozit A gibi diğer bileşikler de izole edilmiştir. Brezilya ve Arjantin'de de bol miktarda bulunmakla birlikte günümüzde Kanada, Asya ve Avrupa'nın bazı bölgeleri olmak üzere dünyanın birçok yerinde 200'den fazla *Stevia* türünün tarımı yaygınlaşmıştır (1-3). Bu bitki, Güney Amerika'daki Guarani yerlileri tarafından yüzyıllar boyunca bitkisel ilaç ve içeceklerdeki acı tadı baskılamak amacıyla kullanılmıştır (4).

Stevia, odunsu bir gövde üzerinde yer alan hafif tüylü yapraklara ve açık mor renkte çiçeklere sahiptir. *Stevia* yaprakları, ent-kaurene diterpen glikozitlerden tatlı steviol glikozitleri bol miktarda içermektedir, bu miktar yaprak kuru ağırlığının genellikle %4-20'si arasında değişmekle birlikte %30'una kadar ulaşabilmektedir. Bu tatlı bileşenlerin yanı sıra, yapraklarda rebaudiozit A (%2-4), rebaudiozit C (%1-2), dulkozit A (% 0.4-0.7) gibi temel glikositler ve ayrıca flavonoidler, alkaloidler, hidrokisisinamik asit, vitaminler, fitosteroller, esansiyel yağlar gibi önemli fitokimyasal bileşikler de yer almaktadır. 230 *Stevia* türünden sadece *Rebaudiana* ve *Phlebophylla* cinsleri steviol glikozit üretmektedir. (2, 5, 6). Sakkarozun yaklaşık 300 katı kadar tatlılığa sahiptir (7). Steviol glikozitler aynı zamanda kalorisiz olduğu için, Çin, Japonya, Kore, Avustralya, Yeni Zelanda ve çoğu Avrupa Birliği üyesi ülkede, alkolsüz içecekler, soju, soya sosu, yoğurt ve birçok gıdalarda doğal tatlandırıcı olarak kullanılırken, Amerika Birleşik Devletleri'nde gıda takviyesi ve Bangladeş'te ise antidiyabetik çaylar gibi farklı kullanım alanları bulmuştur (5, 8, 9). Steviol glikozitlerin yüksek asit konsantrasyonlarında ve mikroorganizma varlığında hidrolizasyonu gerçekleşebilir ve steviol ortaya çıkar. Örneğin rebaudiozit A, kalın bağırsaklarda kolon mikroorganizmaları tarafından steviozite metabolize edilir ve önce steviol sonra da steviol glukuronide dönüştürülerek vücuttan atılır (10).

Lopes ve ark. (11), *Stevia rebaudiana* Bertoni köklerinden inülin elde etmiş, gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi ve yüksek manyetik rezonans yöntemleriyle incelendiğinde, elde edilen inülinin çözünürlük, ısıl stabilite, tatlandırma gücü ve prebiyotik özellik gibi önemli özellikler üzerinde etkili olan polimerizasyon derecesi yüksek moleküler yapıda olduğu ve stevianın yüksek polimerizasyon derecesine sahip inülin açısından iyi bir potansiyele sahip olduğu sonucuna varmışlardır.

STEVİANIN FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİ VE İNSAN SAĞLIĞI ÜZERİNE ETKİLERİ

Stevianın insan sağlığı açısından güvenilirliği, 200'ün üzerinde yapılan titiz araştırmalar sonucunda kanıtlanmış ve FDA ve FAO/WHO Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi tarafından "güvenli" olarak tanımlanmış ve günlük kabul edilebilir doz 4 mg steviol/vücut ağırlığı veya 10 mg steviozit/vücut ağırlığı olarak belirlenmiştir (10, 12). Rebaudiozit A'nın molekül ağırlığı 967 olup steviolün molekül ağırlığının (318) üç katı kadardır. Toksikolojik çalışmalar sonucunda steviozitin tatlandırıcı olarak kullanıldığında mutajenik, teratojenik ve kanserojen olmadığı ve alerjik reaksiyonlara yol açmadığı görülmüştür (13). Üstelik ksilitol veya sorbitol gibi diğer tatlandırıcılarda olduğu gibi steviol glikozitlere zamanla tolerans kazanım da gerçekleşmemektedir (14).

Stevianın sağlık açısından güvenli olduğu tekrarlı çalışmalar sonucunda görülmüştür. *Stevia* yapraklarının ekstraktları ve en etkin biyoaktif bileşenleri olan steviozit ve steviol üzerinde yoğun genetik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda ne steviozitin ne de steviolün DNA ile doğrudan etkileşime girmediği, insanlarda genotoksik bir hasar oluşturmadığı ve çok yüksek dozlarda vücuda alındığında bile klastojenik (kromozom yapısını değiştirebilen) etki göstermediği gözlenmiştir (15).

Stevianın, oldukça yüksek tatlandırma gücüne sahip olmasına karşın, dişlerde herhangi bir sorun oluşturmadığı gibi plak oluşumunu da engelleyici etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (10). Stevianın kalorisiz olması şekeri steviol yapısına bağlayan β -glukosidik ester bağlarının insan bağırsak sisteminde hidrolize edilememesinden kaynaklanmaktadır (16). Anton ve ark. (17), 18-50 yaş arası seçilen 19 sağlıklı ve 19 obez üzerinde yaptıkları çalışmada, *Stevia*, aspartam ve sakkarozun, insanlarda gıda tüketimi, doyunluk, postprandial glukoz ve insülin düzeyleri üzerindeki etkilerini karşılaştırmalı olarak ortaya koymuşlardır. *Stevia* postprandial glukoz seviyesini sakkarozu göre

önemli düzeyde ve postprandial insülin düzeyini ise hem aspartama hem de sakkarozu göre önemli ölçüde düşürmüştür. Ayrıca, stevia katkılı gıda alımından sonra hissedilen doyumluk hissinin, yüksek oranda sakkaroz alımı sonrası ile aynı düzeyde olduğu belirtilmiştir.

Şeker katkılı yiyecek ve içecekler yüksek miktarda kalori sağlamakla kalmayıp, obezite ve Tip 2 diyabet, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar, felç ve bazı kanser tiplerine yakalanma riskini de beraberinde getirmektedir. Stevia ve steviozit, diabetes mellitus, obezite, hipertansiyon, enfeksiyöz hastalıklar, nöralji, romatizma, egzama, dermatit, anmezi ve kanser tedavisi amacıyla sakkaroz yerine ikame olarak kullanılmaktadır. Steviozitin pankreastaki insülin salınımını artırdığı ve diyabet ve karbonhidrat metabolizması ile ilgili diğer hastalıkları tedavi edici etkisini ortaya çıkardığı belirtilmiştir (18). Steviozit aynı zamanda bakterisidal etki gösterir ve *Escherichia coli*'nin gelişimini engeller (8, 19). Ayrıca *S. rebaudiana* yapraklarının sıcak suda ekstraktının rotavirüslerin (HRV) çoğalması üzerinde engelleyici etkisi olduğu görülmüştür (20). Barba ve ark. (21) tarafından yürütülen bir çalışmada, %2.5 oranında Stevia eklenmiş meyve özütüne 453 MPa basınç ve 5 dakika süre koşullarında yüksek basınç uygulaması sonucu *Listeria monocytogenes* sayısında 5 logaritmik birim düşüş sağlanırken, oksidatif enzimler de inaktive edilmiştir. Stevia içermeyen örneklerde toplam fenolik madde içeriği 185.5 ± 7.1 ppm iken, %1.25 ve %2.5 stevia katkılı örneklerde sırasıyla 2261.1 ± 41.7 ppm ve 4050.8 ± 42.7 ppm olduğu görülmüştür. Ayrıca toplam fenol ve antioksidan kapasitesinin en yüksek düzeyde tutulabildiği de görülmüştür.

Stevia genotipinin antioksidan aktivitesi üzerine önemli ölçüde etkisi olduğu, özellikle rebaudiozit A ile toplam fenol içeriği ve antioksidan kapasitesi arasında önemli bir korelasyon olduğu bildirilmiştir (22). Ayrıca, özellikle bitkisel karışımlarda duyuşsal özellikleri iyileştirmesinin yanı sıra, stevia içeren karışımların içermeyenlere göre önemli ölçüde fenolik madde miktarını ve antioksidan aktiviteyi arttırdığı bildirilmiştir (23). Tadhani ve ark. (24), yaptıkları çalışmada stevia bitkisinin güçlü antioksidan etki gösterdiğini ve zengin bir antioksidan kaynağı olarak kullanılabileceğini kanıtlamışlardır. Benzer şekilde Shukla ve ark. (25) stevianın çok yüksek antioksidan etkiye sahip olduğunu görmüş, Barba ve ark. (21) ise stevianın çok güçlü antioksidan etkisinin yanı sıra yüksek oranda fenolik bileşen içeriğine sahip bir katkı olarak ticari kullanıma uygun olduğunu belirtmiştir.

Komes ve ark. (23), böğürtlen yaprağı ve kurutulmuş elma, erik, incir, üzüm, kayısı, havuç, tatlı patates, stevia yaprağı ve meyan kökü gibi doğal tatlandırıcılardan oluşan karışımların besin değeri, biyoaktif özellikleri, biyolojik aktivitesi ve duyuşsal özelliklerini incelemişlerdir. Bu karışımlarda stevia katkılı örneklerde fenolik bileşiklerin varlığı araştırıldığında, en yüksek oranda klorojenik asit miktarının kurutulmuş elmalardan sonra en çok stevia yapraklarında bulunduğu gözlenmiştir. Bir başka çalışmada, *Stevia rebaudiana* Bertoni yapraklarından elde edilen sulu özüt, sodyum aljinat ile ıslak enkapsülasyon ve dondurarak kurutma yöntemleriyle enkapsüle edilerek, toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Her iki enkapsülasyon yöntemiyle de elde edilen kapsüller +4°C'de 30 gün depolama sürecinde toplam fenolik madde içeriği açısından stabilite göstermiş ve antioksidan aktivitesini korumuştur. Stevia özütünün aljinat ile kaplanması işleminin, gıda endüstrisinde doğal antioksidan madde sağlanması açısından gelecek vadede bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır (26).

Sharma ve ark. (27), Tip 2 diyabetik fareler üzerinde yaptıkları çalışmalarında, *Stevia rebaudiana* Bertoni'nin yüksek kan glukoz seviyesini düşürdüğünü, oksidasyonu azaltıcı enzimlerin fonksiyonunu arttırdığını ve diyabetik hücrelerde hücre bütünlüğünü korumaya katkıda bulunduğunu görmüşlerdir.

Koyama ve ark. (28), stevia karışımının ve enzim modifiye stevianın insan sindirim sisteminde nasıl metabolize olduğunu araştırmak amacıyla yaptıkları *in vitro* çalışmada stevia karışımının, steviozit ve rebaudiozit A'nın ve enzim modifiye stevianın 24 saat içerisinde elimine olduğunu ancak steviolün yok olmadığını göstermiştir. Stevia karışımı, steviozit ve rebaudiozit A insan bağırsak mikroflorası tarafından steviole parçalandığı sonucuna varılmıştır ve bu sonucun daha önce yapılan fare denemelerinden elde edilen sonuçlarla tutarlı olduğu bildirilmiştir.

STEVİOL GLİKOZİT EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ

S. rebaudiana yapraklarından steviozit ekstraksiyonunda su ve alkol ile ekstrakte edip ardından çöktürme, pıhtılaştırma ve kristalizasyon uygulanması gibi geleneksel yöntemler kullanılmaktadır. Biyoaktif maddelerin ekstraksiyonunda modern ekstraksiyon yöntemleri olarak, basınçlı sıvı ekstraksiyonu, basınçlı sıcak su ekstraksiyonu, süperkritik akışkan ekstraksiyonu,

mikrodalga destekli ekstraksiyon, hatta son yıllarda bitkisel biyoaktif maddelerin ekstrasyonunda enzim destekli ekstraksiyon yöntemleri kullanılmaktadır (18).

Zang ve ark. (29), stevia yapraklarından su ile ekstrakte edilen glikozitleri membran yöntemiyle konsantre etmişlerdir. Ekstraktlarda bulunan asılı partiküller ve yüksek molekül ağırlıklı partiküller 0.3-0.8 µm çapında gözeneklere sahip laboratuvar tipi seramik filtre ile uzaklaştırılmıştır. Çok aşamalı membran prosesinin glikozitlerin konsantrasyonunda başarı ile kullanılabilmesi sonucuna varmışlardır.

Erkücü ve ark. (30), stevia yapraklarından glikozit eldesinde süperkritik akışkan ekstraksiyonu yöntemini kullanmışlardır. Bu yöntemle ekstrakte edilen steviozit ve rebaudiozid miktarlarının, su ile elde edilen özüt miktarlarına çok yakın ve etanol ile elde edilen miktarlardan da biraz daha yüksek olduğu görülmüştür. Her ne kadar süperkritik sıvı ekstraksiyon sisteminin yatırım masrafı geleneksel sisteme oranla yüksek olsa da, bu yöntemle elde edilen özütlerde istenmeyen ya da aromayı bozan bileşenler olmaması ve yüksek kalite nedeniyle geri dönüşün hızlı olacağı da dikkate alındığında, çözgen ekstraksiyonuna göre iyi bir alternatif olabileceğini belirtmişlerdir. Öztürk ve ark. (31) *Stevia rebaudiana* yapraklarından süperkritik su ekstraksiyonu ile steviol glikozit elde edildiği çalışmalarında optimum ekstraksiyon koşullarının 125°C sıcaklık, 45 dakika süre ve 4 ml/dk akış hızı olarak belirlemiştir. Söz konusu koşullarda 36.87 mg/g steviozid ve 35/68 mg/g rebaudiozid A elde edilmiştir.

Çözgen ekstraksiyonunda, steviozid ve rebaudiozid ekstraksiyon verimini ve etkinliğini arttırmak amacıyla yapılan bir çalışmada, kuru stevia yapraklarından steviol glikozit elde etmek amacıyla hızlandırılmış ve otomatize edilmiş çözgen ekstraksiyon işlem parametrelerinin optimize edilmesi amaçlanmıştır. Araştırmada yanıt-yüzey yöntemi ile ekstraksiyon sıcaklığı, statik süre ve döngü sayısının steviozid ve rebaudiozid A verimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. İşlem sırasında söz konusu her bir faktörün etkili olduğu ve bu yöntemde optimum parametrelerin 100°C'de 4 dakikalık tek bir işlem olarak saptandığı ve bu koşullardaki verimin %91.8±3.4 olduğu ifade edilmiştir (32).

Puri ve ark. (18), *S. rebaudiana* yapraklarından steviozid ekstraksiyonunda enzim destekli ekstraksiyon yöntemini kullanmış, bu amaçla pektinaz ve hemiselülaz enzimi ile farklı konsantrasyon, sıcaklık ve sürede ekstraksiyon denemeleri gerçekleştirmişlerdir. Enzim destekli

yöntemde verimin çözgen ekstraksiyonuna göre çok daha yüksek olduğunu göstermiştir. En yüksek ekstraksiyon veriminin ise hemiselülaz enzimi ile 60°C'de 1 saat koşullarında elde edildiğini, bu yöntemin çözgen ekstraksiyonuna iyi bir alternatif olabileceğini belirtmişlerdir. Benzer şekilde, Adari ve ark. (33), stevia yapraklarını selüloz ile işleme soktukten sonra çözünür nişasta eklemiş ve bu şekilde steviozitin transglukolizasyonu ile ekstrakte edilen rebaudiozid A oranı %4'den %66'ya yükselmiş, ardından uygulanan çoklu kolon kromatografisi ile %95 oranında saf rebaudiozid A elde edilmiştir.

Sheng ve ark. (34), sakkarit bazlı sabit bir fazın kullanıldığı hidrofilik interaksiyon sıvı kromatografisi yöntemi ile oligosakkaritlerin ve glikopeptitlerin ekstraksiyonu üzerine araştırmalar yapmıştır. Bir silika jel üzerine yüksek molekül ağırlıklı polisakkaridin immobilize edildiği bu yöntem ile steviadan steviozid, rebaudiozid A ve rebaudiozid C'nin sıvı fazları etkin bir şekilde elde edilmiştir.

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada steviol glikozitlerin yanı sıra, iki steviadan aminoasit bazlı tatlandırıcı elde edilmiştir. Steviozitten çözgen ekstraksiyonuyla stevia glisin etil ester ve stevia-L-alanin metil esterinin sentezlendiği bu çalışmada, elde edilen tatlandırıcıların saflığı yüksek performans sıvı kromatografisi yöntemiyle (HPLC) test edilmiş, ayrıca sulu çözeltilerinin duyu özellikleri sakkaroz ile karşılaştırmalı olarak belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, bu yeni tipte tatlandırıcıların akut toksisite, erime noktası, çözünürlük ve ısıl stabilitesi de test edilmiştir. Tatlandırıcıların, 100°C'de 2 saat süresince asidik, bazik ve nötral çözeltilerde stabil olduğu, yine steviozidlerde olduğu gibi sakkarozu göre çok daha yoğun tatlandırma kapasitesine sahip olduğu ancak steviozidlerde görülen acı tat kusuruna sahip olmadığı anlaşılmıştır. Aminoasit yapısındaki bu iki yeni tatlandırıcının gıda sanayinde düşük kalorili ürün eldesinde başarıyla kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır (35).

STEVİANIN GIDALARDA TATLANDIRICI OLARAK KULLANIM ALANLARI

Steviol glikozitler çay, alkolsüz içecekler, meyve suları, yoğurt, soya sütü, fırınlanmış ürünler, tahıl ürünleri, salata sosları, şekerlemeler gibi çeşitli gıdalarda katkı olarak ve sofraya şeker olarak kullanılmaktadır (10). Ancak, hala bazı ülkelerde birçok faktöre bağlı olarak yasal kullanım hakkı kazanamamıştır. Son yıllarda yapılan klinik ve toksisite çalışmaları steviol glikozitlerin "gıda saflığında" tanımına uygun özellikleri karşıladığını kanıtlamıştır (36).

Steviozot ve rebaudiozot A'nın gazlı içeceklerde kullanımının araştırıldığı bir çalışmada fosforik asit ve sitrik asit ile asitlendirilen içeceklerin kimyasal, duyuşsal ve mikrobiyolojik stabilitesi araştırılmıştır. Oda sıcaklığında depolama sonucu steviozot katkılı içeceklerde 5 ay, rebaudiozot katkılı içeceklerde ise 3 ay boyunca, araştırılan özellikler açısından herhangi bir bozulma gözlenmemiştir. Ancak depolama sıcaklığı 37°C'ye çıkarıldığında her iki steviol glikozit ile tatlandırılan örneklerde 2 ay sonra kimyasal bozulmalar gerçekleştiği tespit edilmiştir. Örnekler bir hafta boyunca güneş ışığına maruz bırakıldığında rebaudiozot A miktarında %20 kadar kayıp gerçekleştiği, 60°C'de 6 gün boyunca ısıtma ile de her iki tatlandırıcı miktarında %0-6 oranında bir kayıp gerçekleştiği gözlenmiştir (37).

Kerzicnik ve ark. (38), farklı oranlarda stevia ve sakkaroz ile tatlandırılmış çeşitli gıda örneklerinin duyuşsal özelliklerini araştırmış ve otuz üç gönüllüden oluşan panel ile çalışmıştır. En yüksek puanları %100 stevia ve %25 stevia + %75 sakkaroz ile tatlandırılmış örneklerin aldığı görülmüştür. Üstelik stevia'nın pişmiş gıda ürünlerinde de tatlandırma özelliğini kaybetmeksizin ve ürünün duyuşsal özelliklerini olumsuz yönde etkilemeksizin sakkaroz yerine tamamen ya da kısmen ikame olarak kullanılabilceği sonucuna da varılmıştır.

Kroyer (39), 0.5 g/l oranında steviozot katkılı çay ve kahve örneklerinde 80°C'de 4 saat boyunca steviozitin stabilitesini ve kafein ile etkileşimini araştırmak amacıyla bir saat aralıklarla örnek olarak bir dizi analizler yapmış ve 4 saat boyunca önemli bir değişiklik kaydetmemiştir. Ancak sıcaklık yükseltildiğinde, 140°C'den sonra bozunmalar başlamış ve 200°C'de ise tamamen bozunma gerçekleşmiştir. Bu durumda, steviozitin yüksek sıcaklıklarda üretilen fırın ürünleri ya da diğer gıda ürünlerinde kullanımında bazı sakıncaların doğacağı düşünülebilir. Ancak, steviozitin B grubu ve C vitaminleri ile de önemli bir etkileşime girmediği kaydedilmiştir.

De Melo ve ark. (40), şeker ilavesiz ve sükraloze ve steviozot katkılı %25 oranında kalorisi azaltılmış sütlü çikolataların duyuşsal özellikleri üzerinde laboratuvar ölçekli araştırma yapmışlardır. Örnekler arasında parlaklık, kakao aroması, tereyağı aroması ve kakao lezzeti açısından önemli bir fark olmadığı görülmüştür. Ancak, sükraloze katkılı örneklerin steviozot katkılı örneklere oranla kabul edilebilirliğinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Her iki tatlandırıcı katkılı örnekte de acı tat gelişimi gözlenmekle birlikte, bu durumun steviozot katkılı örneklerde daha yoğun olduğu

belirlenmiştir. Benzer şekilde Bollini-Cardello ve ark (41) tarafından yapılan çalışmada da, stevia yapraklarından elde edilen ekstraktlarda, konsantrasyon artışıyla beraber acı tat algısının da arttığı belirlenmiştir. Hatta algılanan bu acı tadın, ilk başta %20 sakkaroz tatlılığına denk gelen tatlı lezzeti baskıladığı bildirilmiştir. Mielby ve ark. (42), *Stevia rebaudiana* katkılı meyveli içeceklerde duyuşsal değerlendirme yapmış ve stevia'nın neden olduğu acılık lezzet kusurunun limon aroması katkısı ile bir derece düzeltilebildiğini görmüşlerdir.

Steviol glikozitlerin neden olduğu acılık kusuruna çözüm getirmek amacıyla yapılan bir çalışmada, steviol glikozitler, püskürtmeyle, dondurarak ve etüvde kurutma yöntemleri kullanılarak, farklı oranlarda karıştırılmış maltodekstrin ve inülinde oluşan bir kaplama maddesi ile enkapsüle edilmiştir. Çalışmada %2.5 lik steviol glikozit çözeltisi kullanılmıştır. Tüm kurutma işlemleri sırasında steviol glikozitler kimyasal bütünlüğünü korurken, fizikokimyasal ve duyuşsal özellikler açısından en iyi sonuçların püskürtmeyle kurutma ile enkapsüle edilmiş örneklerden elde edildiği sonucuna varılmıştır (43).

Guggisberg ve ark. (44), set tip yoğurtlarda %8 sakkaroz yerine farklı oranlarda stevia ve izomaltuloze karışımı ve palatinoz (%8) kullanarak, söz konusu şeker ikamelerinin yoğurtların kalite özellikleri üzerine etkisini incelemişlerdir. Katkıların hiçbirinin yoğurt üretim prosesi veya pH üzerinde olumsuz bir etki göstermediği belirtilmiştir. Sadece stevia katılmış ürünlerde acılık ve istenmeyen lezzet oluşumu gözlenmiştir. Bu istenmeyen lezzet, çeşitli panelistler tarafından, "küflü", "kartonumsu", "metalik" ve "yapay" olarak değerlendirilmiştir. Bununla birlikte en iyi kombinasyonun %0.025 stevia karışımı olduğu belirtilmiştir.

Oliveira ve ark. (45), Malaya elmalarından yüksek kalorili şekerleri uzaklaştırarak yerine düşük kalorili steviozot ve rebaudiozot kullanmışlardır. Bu amaçla ilk aşamada elmalardan destile su içerisinde 20 dakika süreyle ultrason yardımıyla şekerin uzaklaştırıldığı ve ozmotik yöntemle stevia bazlı tatlandırıcıların başarı ile elmalara katılabildiği sonucuna varmışlardır. Üstelik bu şekilde toplam kaloride % 40.2'lik bir azalma sağlanabilmiştir. Benzer şekilde Garcia-Noguera ve ark. (46) da iki aşamalı şeker ikame yöntemi ile çilek örneklerinden yüksek kalorili şekerleri kısmen uzaklaştırarak düşük kalorili steviozot ve rebaudiozot ile tatlandırmışlardır. En iyi sonuçların çileklerden doğal şekerlerin uzaklaştırılması ve stevia bazlı tatlandırıcıların ikame edilmesi aşamasında ultrason

desteği kullanıldığında elde edildiği gözlenmiştir. Torres ve ark. (47), kestane ve pirinç unlarından glutensiz jöle yapımında, tatlandırıcı olarak sakkaroz, stevia ve ksilitol kullanımının ürünün yapısal, tekstürel ve reolojik özellikleri üzerine etkisini araştırmışlardır. Sakkaroz ve ksilitol jel sıklığını önemli ölçüde azaltırken, stevianın etkisinin çok düşük olduğu gözlenmiştir.

Weber ve Hekmat (48), farklı tatlandırıcıların probiyotik yoğurtların duyuşal özellikleri ve *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 gelişimi üzerine etkisini araştırmışlardır. % 0.12 stevia, %0.12 stevia-inulin-krom (SIC), %1.0 sükraloz, %5.0 sakkaroz, % 6.0 ksilitol katkı ve tatlandırıcı içermeyen kontrol örneklerinde, 28 günlük depolama süreci boyunca *L. rhamnosus* GR-1 sayısının 10^8 - 10^9 kob/ml düzeyinde olduğunu görmüşlerdir. Stevia içeren örneğin stevia-inülin-krom içerene göre daha yüksek duyuşal puanlara sahip olduğu gözlenmiştir. Ancak sükraloz katkı yoğurt örneklerinin duyuşal özellikler açısından en yüksek puanları alması ve sakkarozun lezzet dışındaki diğer duyuşal özellikler açısından steviaya göre daha çok tercih edilmesi, stevianın daha yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında daha başarılı sonuçlar elde edilebileceğini ve bu konuda daha fazla araştırma yapılması gerekliliğini ortaya koymuştur.

Son yıllarda steviol glikozitlerin gıdalarda tatlandırıcı olarak kullanımı ile ilgili şüphesiz sanayide de yoğun çalışmalar başlatılmıştır. Clos ve ark. (49) tarafından yürütölen çalışmada, *Stevia rebaudiana*'dan elde edilen rebaudiozit A'nın geliştirilmesi ve ticari olarak yaygınlaştırılması hedeflenmiştir. Bu çalışmalarda saflık derecesi %97'den yüksek olan ve rebiana olarak da bilinen rebaudiozit A kullanılmıştır. Ayrıca, söz konusu tatlandırıcının stabilitesini belirlemek amacıyla içecek örnekleri güneş ışığına maruz bırakılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen bulguların aksine, rebiana'nın ışığa karşı stabil olduğu belirlenmiştir.

Carbonel-Capella ve ark. (50), portakal, mango ve papaya meyveleri ile hazırlanan ve %1.25 - %2.5 *Stevia rebaudiana* ile tatlandırılmış meyve sularına 300, 400 ve 500 MPa ve 5-15 dakika süre koşullarında yüksek basınç uygulamışlardır. 300 MPa basınçta 14 dakika süreyle uygulanan yüksek basınç işleminin %1.7 stevia içeren meyve suyu karışımı örneklerinde en yüksek miktarda antioksidan miktarına (stevia içermeyen örneklerin 15 katı kadar) ve en üstün renk özelliklerine sahip bir ürün eldesine olanak tanıdığı sonucuna varılmıştır.

Şekersiz çikolata üretiminde çeşitli tatlandırıcıların ürünün reolojik ve erime özellikleri üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, referans olarak sakkaroz kullanılmış ve denemelerde stevia ve tomatın özütü ile tatlandırılmış inülin ve polidekstroz karışımı kullanılmıştır. Stevia ile tatlandırılan örneklerin referans ile benzer erime ve reolojik özellikler gösterdiği görölmüştür (51).

Tek tip glikozit ile çalışıldığında duyuşal açıdan tercih edilmediği yapılan çalışmalar sonucunda anlaşılmıştır. Her ürün için doğru kombinasyonun ve kullanım oranının belirlenmesi ve farklı formölasyon veya katkıların yardımıyla lezzet kusurlarının giderilmesi amacıyla bir dizi çalışmalar yürütölməsi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Barriocanal, L, Palacios, M, Benitez, G, Benitez, S, Jimenez, J, Jimenez, N. 2008. Apparent lack of pharmacological effect of steviol glycosides used as sweeteners in humans, a pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and in type 1 and type 2 diabetics. *Regul Toxicol Pharm*, 51, 37-41.
2. Lemus-Mondaca, R, Vega-Gálvez, A, Zura-Bravo, L, Ah-Hen, K. 2012. Stevia *rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chem*, 132, 1121-1132.
3. Shivanna, N, Naika, M, Khanum, F, Kaul, VK. 2013. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of Stevia *rebaudiana*. *J Diabetes Complicat*, 27, 103-113.
4. Ramesh, K, Singh, V, Megeji, NW. 2006. Cultivation of Stevia [*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni]: A Comprehensive Review. *Adv Agron*, 89, 137-177.
5. Kumar, H, Kaul, K, Bajpai-Gupta, S, Kaul, VK, Kumar, S. 2012. A comprehensive analysis of fifteen genes of steviol glycosides biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Gene*, 492, 276-284.
6. Serfaty, M, Ibdah, M, Fischer, R, Chaimovitsh, D, Saranga, Y. 2013. Dynamics of yield components and steviozite production in *Stevia rebaudiana* grown under different planting times, plant stands and harvest regime. *Ind Crop Prod*, 50, 731-736.
7. Madan, S, Ahmad, S, Singh, GN, Kohli, K, Kumar, Y, Garg, M. 2010. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni-A Review, *Indian J Nat Prod Resour*, 1(3), 267-286.

8. Pól, J, Hannova, B, Hyötyläinen, T. 2007. Characterisation of *Stevia rebaudiana* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1150, 85-92.
9. Siddique, AB, Rahman, SMM, Hossain, MA. 2012. Chemical composition of essential oil by different extraction methods and fatty acid analysis of the leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Arab J Chem*, 10, 10-16.
10. Anonymous. 2013. www.globalstevia institute.com.
11. Lopes, SMS, Krausova, G, Rada, V, Gonçalves, JE, Gonçalves, RAÇ, de Oliveira, AJB. 2015. Isolation and characterization of inulin with a high degree of polymerization from roots of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. *Carbohydr Res*, 411, 15-21.
12. Palazzo, AB, Carvalho, MAR., Efraim, P, Bolini, HMA. 2011. Determination of isosweetness concentration of sucralose, rebaudioside and neotame as sucrose substitutes in new diet chocolate formulations using the time-intensity analysis. *J Sens Stud*, 26, 291-297.
13. Renwick, AG. 2008. The use of a sweetener substitution method to predict dietary exposures for the intense sweetener rebaudioside A. *Food Chem Toxicol*, 46, 561-569.
14. Bondarev, N, Reshetnyak, O, Nosov, A. 2001. Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in in vitro cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Sci*, 161(1), 155-163.
15. Thomas, JE, Glade, MJ. 2010. Stevia: It's not just about calories. *Open Obes J*, 2, 101-109.
16. Jookan, E, Monballiu, A, Ruis, A, Moons, N, de Borggraef, W, Dehaen, W, Meesschaert, B. 2013. Microbial degradation of steviol derived from steviol glycosides. *7th Stevia Symposium 2013, Knowledge on Tour in Europe, at Toulouse*, 7.
17. Anton, SD, Martin, CK, Han, H, Coulon, S, Cefalu, WT, Geiselman, P, Williamson, DA. 2010. Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite*, 55, 37-43.
18. Puri, M, Sharma, D, Barrow, CJ, Tiwary, AK. 2012. Optimisation of novel method for the extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves. *Food Chem*, 132, 1113-1120.
19. Kim, IS, Yang, M, Lee, OH, Kang, SN. 2011. The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *Food Sci Technol-LEB*, 44, 1328-1332.
20. de Oliveira, AJB, Cordeiro, LMC, Gonçalves, RAC, Ceole, LF, Ueda-Nakamura, T, Lacomini, M. 2013. Structure and antiviral activity of arabinogalactan with (1→6)-β-d-galactan core from *Stevia rebaudiana* leaves. *Carbohydr Polym*, 94, 179-184.
21. Barba, FJ, Esteve, M., Frigola, A. 2014. Bioactive components from leaf vegetable products. *Stud Natur Prods Chem*, 41, 321-346.
22. Tavarini, S, Ribuoli, M, Bimbatti, M, Angelini, LG. 2010. Functional components from *Stevia rebaudiana* Bert. Leaves. *J Biotechnol, Special Abstracts*, 150S, 326.
23. Komes, D, Belscak-Cvitanovic, A, Ljubicic, I, Durgo, K, Cindric, I, Busic, A, Vojvodic, A. 2014. Formulation of blackberry leaf mixtures for preparations of infusion with plant derived sources of sweeteners. *Food Chem*, 151, 385-393.
24. Tadhani, M.B., Patel, V.H., Subhash, R., 2007. In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus, *J Food Comp Anal*, 20: 323-329.
25. Shukla, S, Mehta, A, Mehta, P, Bajpai, VK. 2012. Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Exp Toxicol Pathol*, 64, 807-811.
26. Arriola, ND, de Medeiros, M, Prudencio, ES, Müller, CMO, de Mello Castanho Amboni, RD. 2016. Encapsulation of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni with sodium alginate and its impact on phenolic content. *Food Biosci*, 13, 32-40.
27. Sharma, R, Yadav, R, Manivannan, E. 2012. Study of effect of *Stevia rebaudiana* bertoni on oxidative stress in type-2 diabetic rat models, *Biomed Aging Pathol*, 2, 126-131.
28. Koyama, E, Kitazawa, K, Otori, Y, Kakegawa, K, Fujino, A, Ui, M. 2003. In vitro metabolism of the glycosidic sweeteners, stevia mixture and enzymatically modified stevia in human intestinal microflora. *Food Chem Toxicol*, 41 (3), 359-375.
29. Zang, SQ, Kumar, A, Kutow, O. 2000. Membrane-based separation scheme for processing sweeteners from stevia leaves. *Food Res Int*, 33, 617-620.
30. Erköçük, A, Akgün, IH, Yeşil-Çeliktaş, O. 2009. Supercritical CO₂ extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves: Identification and optimization. *J Supercrit Fluids*, 51, 29-35.

31. Öztürk, EY, Tag, Ö, Yesil Çeliktas, Ö. 2014. Subcritical water extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves and characterization of the raffinate phase. *J Supercrit Fluids*, 95, 422-430.
32. Jentzer, JB, Alignan, M, Vaca-Garcia, C, Rigal, L, Vilarem, G. 2014. Response surface methodology to optimise Accelerated Solvent Extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Food Chem*, 561-567.
33. Adari, BR, Alavala, S, George, SA, Meshram, HM, Tiwari, AK, Sarma, AVS. 2016. Synthesis of rebaudioside-A by enzymatic transglycosylation of steviol glycoside present in the leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Food Chem*, 200, 154-158.
34. Sheng, Q, Su, X, Li, X, Ke, Y, Liang, X. 2014. A dextran-bonded stationary phase for saccharide separation. *J Chromatogr A*, 1345, 57-67.
35. Khattab, SN, Mona, MI, Jad, YES, Bekhit, AA, El-Faham, A. 2015. Production and physicochemical assessment of new stevia amino acid sweeteners from the natural steviol glycoside. *Food Chem*, 173, 979-985.
36. Carakostas, MC, Curry, L., Boileau, AC, Brusick, DJ. 2008. Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food Chem Toxicol*, 46 (2008), 1-10.
37. Chang, SS, Cook, JM. 1983. Stability studies of Steviol glycoside and Rebaudioside A in carbonated beverages. *J Agric Food Chem*, 31, 409-412.
38. Kerzicnik, L, Stendell, N, McMuney, M, Hagan, D. 1999. Food Characteristics of Recipes Using Stevia Sweetener - A Proposed Herbal Sugar Substitute. *J Am Diet Assoc*, 99 (9), Supplement, p: A29.
39. Kroyer, GT. 1999. The low calorie sweetener Steviol glycoside: Stability and interaction with food ingredients. *Lebensm Wiss Technol*, 32, 509-512.
40. De Melo, LLMM, Bolini, HMA, Efraim, P. 2009. Sensory profile, acceptability, and their relationship for diabetic/reduced calorie chocolates. *Food Qual Prefer*, 20, 138-143.
41. Bolini-Cardello, HMA, Da Silva, MAPA, Damasio, M H. 1999. Measurement of the relative sweetness of stevia extract, aspartame and cyclamate/saccharin blend as compared to sucrose at different concentrations. *Plant Food Hum Nutr*, 54, 119-130.
42. Mielby, LH, Andersen, BV, Jensen, S, Kildegaard, H, Kuznetsova, A, Eggers, N, Brockhoff, PB, Byrne, DV. 2016. Changes in sensory characteristics and their relation with consumers' liking, wanting and sensory satisfaction: Using dietary fibre and lime flavour in *Stevia rebaudiana* sweetened fruit beverages. *Food Res Int*, 82, 14-21.
43. Chranioti, C, Chanioti, S, Tzia, C. 2016. Comparison of spray, freeze and oven drying as a means of reducing bitter aftertaste of steviol glycosides (derived from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant) – Evaluation of the final products. *Food Chem*, 190, 1151-1158.
44. Guggisberg, D, Piccinali, P, Schreirer, K. 2011. Effects of sugar substitution with Stevia, Actilight™ and Stevia combinations or Palatinose™ on rheological and sensory characteristics of low-fat and whole milk set yoghurt. *Int Dairy J*, 21, 636-644.
45. Oliveira, FIP, Rodriguez, S, Fernandes, FAN. 2012. Production of low calorie Malay apples by dual stage sugar substitution with Stevia-based sweetener. *Food Bioprod Process*, 90, 713-718.
46. Garcia-Noguera, J, Weller, CL, Oliveira, FIP, Fernandes, FAN. 2010. Dual-stage sugar substitution in strawberries with a *Stevia*-based sweetener. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 11 (1), 225-230.
47. Torres, MD, Raymundo, A, Sousa, I. 2013. Effect of sucrose, stevia and xylitol on rheological properties of gels from blends of chestnut and rice flours. *Carbohydr Polyme*, 98, 249-256.
48. Weber, A, Hekmat, S. 2013. The Effect of *Stevia rebaudiana* on the Growth and Survival of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and Sensory Properties of Probiotic Yogurt. *J Food Res*, 2 (2), 136-143.
49. Clos, JF, DuBois, GE, Prakash, I. 2008. Photostability of Rebaudioside A and Steviol glycoside in beverages. *J Agric Food Chem*, 56, 8507-8513.
50. Carbonel-Capella, JM, Francisco, JB, Esteve, MJ, Frigola, A. 2013. High pressure processing of fruit juice mixture sweetened by *Stevia rebaudiana* Bertoni: Optimal retention of physical and nutritional quality. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 18, 48-56.
51. Aidoo, RP, Afoakwa, EO, Dewettinck, K. 2015. Rheological properties, melting behaviours and physical quality characteristics of sugar-free chocolates processed using inulin/polydextrose bulking mixtures sweetened with stevia and thaumatin extracts. *Food Sci Technol LEB*, 62, 591-597.

GIDA TEKNOLOJİSİ DERNEĞİ TÜZÜĞÜ

MADDE 1: Derneğin adı, "Gıda Teknolojisi Derneği"dir. Şubesi açılmayacaktır. Derneğin merkezi: Ankara'dır.

MADDE 2: Derneğin Amaç ve Görevi: Derneğin amacı; Gıda Bilimi, Gıda Teknolojisi, Gıda Mühendisliği, Gıda Sanayisi, Gıda Güvenliği vb. gıda ile ilgili bütün konuları incelemek ve değerlendirmektir. Bu amaca uygun yayınlar yapar, seminerler, konferanslar, kurslar, yarışmalar, sergi ve geziler düzenler, ilgili ulusal ve uluslararası kuruluşlar ile birlikte çalışır. Dernek, kâr amacı gütmeyiz.

MADDE 3: Üyeler: Derneğin, iki çeşit üyesi vardır: a) Asıl üyeler b) Onursal Üyeler.

T.C. Dernekler Kanunu'na göre bir dernekte üye olmak hakkına sahip ve aşağıdaki koşullara uygun olan kişiler bu derneğe üye olabilir.

a) Asıl Üyelik Koşulları:

1) Üniversitelerin, gıda ile ilgili eğitim yapan her hangi bir bölümünden/ programından mezun olmuş olmak,

2) Birinci koşulda belirtilen yerlerde uzmanlık, yüksek lisans, doktora ve doktora üstü unvanlar kazanmış olmak, öğretim üyesi veya yardımcısı olarak çalışmış ya da çalışıyor olmak,

b) Onursal Üyelik Koşulları:

Asıl üyelik koşullarına uygun yabancı uyruklulara ve/veya dernek amacına uygun olarak kamu ya da özel sektörde çalışmalar yapanlara Yönetim Kurulu kararı ile "Onursal Üyelik" verilebilir.

MADDE 4: Derneğe üyelik için bireysel başvuru yeterlidir. Üyelik başvurusu, Yönetim Kurulu tarafından görüşülür ve en geç 30 gün içinde karara bağlanır.

MADDE 5: Ödenti ve Üyeliliğin Sona Ermesi:

Derneğe üye olmak için giriş ödentisi 10 TL, yıllık üye ödentisi ise 10 TL'dir. Ödenti miktarları genel kurul kararı ile değiştirilebilir.

Üyeliliğin sona ermesi aşağıdaki koşullarda gerçekleşir:

Kendiliğinden: Üyelik için kanunda ve tüzükte aranan nitelikleri sonradan kaybedenlerin Dernek üyeliği kendiliğinden sona erer.

Çıkma ile: Hiç kimse Dernekte üye kalmaya zorlanamaz. Her üye yazılı olarak bildirmek kaydıyla, Dernekten çıkma hakkına sahiptir.

Üyenin istifa dilekçesi yönetim kuruluna ulaştığı anda çıkış işlemleri sonuçlanmış sayılır. Üyelikten ayrılma, üyenin Derneğe olan birikmiş borçlarını sona erdirmeyiz.

Çıkarılma ile: Dernek üyeliğinden çıkarılma sebepleri aşağıda gösterilmiştir:

a) Dernek tüzüğüne aykırı davranışlarda bulunmak,

b) Verilen görevlerden sürekli kaçınmak,

c) Yazılı uyarıya gerek kalmadan, yıllık üyelik ödentisini üst üste 3 yıl ödememek,

d) Dernek organlarıncı verilen kararlara uymamak,

e) Yüz kızartıcı bir suçtan hüküm giymiş olmak.

Yukarıda sayılan durumlardan herhangi birinin tespiti halinde üye, Yönetim Kurulu kararı ile üyelikten çıkarılabilir.

MADDE 6: Derneğin organları şunlardır:

a) Genel Kurul

b) Yönetim Kurulu

c) Denetleme Kurulu

MADDE 7: Genel Kurul, her 3 yılda 1 olmak üzere Mayıs ayında Yönetim Kurulunun davetiyle olağan toplantısını yapar.

Yönetim Kurulu, Dernek Tüzüğüne göre Genel Kurula katılma hakkı bulunan üyelerin listesini düzenler. Genel Kurula katılma hakkı bulunan üyeler, en az 15 gün önceden, günü, saati, yeri ve gündemi bir gazetede ilan edilmek veya yazılı ya da elektronik posta ile bildirilmek suretiyle toplantıya çağılır. Genel Kurul çağrısı, Derneğin web sayfasında da duyurulur. Bu çağrıda, çoğunluk sağlanamaması nedeniyle toplantı yapılamazsa, ikinci toplantının hangi gün, saat ve yerde yapılacağı da belirtilir. İlk toplantı ile ikinci toplantı arasındaki süre 7 günden az, 60 günden fazla olamaz.

Toplantı, çoğunluk sağlanamaması sebebinin dışında başka bir nedenle geri bırakılırsa, bu durum, geri bırakma sebepleri de belirtilmek suretiyle, ilk toplantı için yapılan çağrı usulüne uygun olarak üyelere duyurulur. İkinci toplantının geri bırakma tarihinden itibaren en geç altı ay içinde yapılması zorunludur. Üyeler, ikinci toplantıya yukarıdaki paragrafta belirtilen esaslara göre yeniden çağılır.

MADDE 8: Genel Kurulun görev ve yetkileri şunlardır:

a) Önceki Yönetim ve Denetleme Kurullarının raporlarını, hesaplarını, yeni dönem bütçe öngörüsünü inceleyerek bunları bir bütün olarak kabul veya reddetmek,

b) Yeni dönem Yönetim ve Denetleme Kurullarının üyelerini seçmek,

c) Dernek Tüzüğünü değiştirmek,

d) Derneğin feshini ve tasfiyesini kararlaştırmak.

MADDE 9: Genel Kurul:

a) Asıl üyelerin en az 1/5'inin,

b) Yönetim Kurulunun ve

c) Denetçilerin istek ve davetleri ile olağanüstü toplantıya çağırılır.

MADDE 10: Genel Kurul, üyelerinin yarıdan bir fazlası ile toplanır ve kararları, katılan üyelerin yarıdan bir fazlası ile verir. Ancak ilk toplantıda gereken bu çoğunluk sağlanamazsa, ikinci toplantıya katılan üye sayısı, Dernek Yönetim ve Denetleme Kurulları üye tam sayıları toplamının iki katından az olamaz. 8. Maddenin c ve d fıkralarına ilişkin bir karar için ilk toplantıda üyelerin üçte ikisinin mevcudiyeti ve kararın, Dernek toplam üye sayısının üçte ikisi ile alınması şarttır. Ancak ilk toplantıda gereken bu çoğunluk sağlanamazsa, ikinci toplantıda katılan üye sayısının üçte ikisinin kararı gerekir.

Genel Kurul, bir Başkan, bir Başkan Yardımcısı ve bir Yazman seçerek çalışmalarına başlar.

MADDE 11: Genel Kurul, Yönetim Kurulu için 7 asil ve 7 yedek, Denetleme Kurulu için 3 asil ve 3 yedek üye seçer. Seçimler gizli oy, açık tasnif ile yapılır.

MADDE 12: Genel Kurul, aldığı kararları, Dernek internet sayfasında duyurur.

MADDE 13: Yönetim Kurulu görev paylaşımı şöyledir:

Başkan: Yönetim Kuruluna başkanlık eder, görevlerin yürütülmesini sağlar ve Derneğin yetkili tek temsilcisidir.

II. Başkan: Başkanın yardımcısıdır ve yokluğunda onu temsil eder.
Sekreter: Üyelerle ilişkileri ve yazışmaları düzenler, yasalarca tutulması gereken defterleri tutar.
Eğitim ve Tanıtma Yönetmeni: Seminer, kurs ve konferanslar gibi çalışmalarını düzenler.
Sayman: Derneğin bütçesi ve ödentileriyle ilgilenir, gelir-gider defterlerini tutar.
Yayın Yönetmeni: Derneğin yayın organının çıkarılması işlerini düzenler.
Dış İlişkiler Temsilcisi: Derneğin uluslararası kuruluşlarla ilgili çalışmalarını düzenler.

MADDE 14: Yönetim Kurulunun Görev ve Yetkileri şunlardır:

- Derneğin bütçesini Genel Kurula sunmak üzere hazırlamak ve harcamalarını Genel Kurulca onaylanmış bütçeye göre yapmak,
- Dernek amaçlarını gerçekleştirecek çalışmalar yapmak.

MADDE 15: Yönetim Kurulu, yılda en az iki defa olmak üzere Yönetim Kurulu Başkanı tarafından toplanır ve kararlar oy çokluğuyla alınır.

MADDE 16: Özürsüz olarak üst üste üç defa Yönetim Kurulu toplantısına katılmayan üyenin, Yönetim Kurulu üyeliği düşer ve yerine sıradaki yedek üye alınır.

MADDE 17: Dernek Denetleme Kurulunun Görev ve Yetkileri şunlardır:

- Denetleme Kurulu, Derneğin iç denetiminden sorumludur.
- Derneğin hesaplarını ve buna ilişkin bütün işlemlerini yılda en az 1 kez denetime tabi tutarak düzenleyeceği raporun bir kopyasını dosyasında saklamak, bir diğerini ise bilgi edinilmesi için imza karşılığında Yönetim Kuruluna vermek,
- Derneğin hesap işleri ile Yönetim Kurulunun hazırladığı bütçe hakkındaki raporu Genel Kurula sunmak üzere hazırlamak.

MADDE 18: Derneğin Gelirleri:

- Asil üyelerin ödentileri,
- Derneğin yayınlanmasını sağlayacağı yayınlardan ve derneğin aracılık edeceği, tüzüğe uygun başka işlerden elde edeceği kazançlar,
- Dernek yayınlarından ve kongre vb. diğer çalışmalardan elde edilecek gelirler,
- Gerçek ve tüzel kişilerin yapacakları bağış ve yardımlar.

MADDE 19: Yönetim Kurulu, Dernekler Yönetmeliğinin 32. Maddesinde belirtilen yasal defterleri tutar.

MADDE 20: Derneğin Borçlanma Usulleri: Dernek, amacını gerçekleştirmek ve faaliyetlerini yürütmek için hiçbir koşulda borçlanma yapamaz.

MADDE 21: Derneğin feshi halinde bütün mallar ve paranın nereye kalacağına Tasfiye Kurulu karar verir.

MADDE 22: Tüzük boşlukları ve ihtilaflar halinde Dernekler Kanununun ve Dernekler Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uygulanır.

MADDE 23: Derneğin Kurucu Heyeti aşağıdaki T.C. vatandaşlarından oluşmuştur: Adı ve Soyadı; Mesleği ve İş Adresi; İkametgâh Adresi; Doğum Yeri ve Yılı

- Arif Akman; Prof. Dr; Ank. Üniv. Ziraat Fak.; Hemşeri sok. 37 Gaziosmanpasa-Ankara; Elazığ 1903
- Turgut Yazıcıoğlu; Prof. Dr; Ank. Üniv. Ziraat Fak.; Tunus Cad. 89/12 Kavaklıdere-Ankara; İstanbul 1912
- M. Hilmi Pamir; Prof. Dr.; Ank. Üniv. Ziraat Fak.; Bardacık sok. 96/6 Küçüksat-Ankara; Kastamonu 1924
- İsmet Türker; Prof. Dr; Ank. Üniv. Ziraat Fak.; Bestekâr sok. 62/13 Kavaklıdere-Ankara; İstanbul 1924
- Ömer Gürses; Asist. Dr; Ank. Üniv. Ziraat Fak.; Ataç sok. 65/2 Yenisehir-Ankara; Ankara 1943
- R. Kemal Gökçe; Prof. Dr; Ank. Üniv. Ziraat Fak.; K.Sami paşa Cad. 11 Subayevleri-Ankara ; Erzincan 1913
- Zühtü Yöney; Prof. Dr; Ank. Üniv. Ziraat Fak.; Ataç Sok. 33/15 Yenisehir-Ankara; Çorum 1920
- Tunay Durgun; Asist. Dr; Ank. Üniv. Ziraat Fak.; 31. Sok. 26/5 Bahçelievler-Ankara; Alpullu 1945
- Mustafa Metin; Doç. Dr; Ank. Üniv. Ziraat Fak.; Meşrutiyet Cad. 29/17 Yenisehir-Ankara; Nizip 1940
- İşıl Fidan; Doç. Dr; Ank. Üniv. Ziraat Fak.; Ziraat Mah. İrfan Baştuğ Cad. 26/2 Dışkapı-Ankara; Ordu 1938
- Muazzez Eralp; Prof. Dr; Ank. Üniv. Ziraat Fak.; Yeşiltepe Koop. 7/41; Emek-Ankara; Konya 1913
- Nesrin Kaptan; Doç. Dr; Ank. Üniv. Ziraat Fak.; Sümer sok. 34/15 Demirtepe-Ankara; Elazığ 1933
- Mustafa Üçüncü; Asist. Dr; Ank. Üniv. Ziraat Fak.; İlk sok. 11/6 Ziraat mah. Dışkapı-Ankara; Taşköprü 1945
- Mehmet Aydın; Tarım Bak. Gıda İşleri Genel Müdürü; Güven sok. 28/7; Aşağı Ayrancı-Ankara; Samsun 1928
- Lütfü Çakmakçı; Asist. Müttehassıs; Ank. Üniv. Ziraat Fak.; Tarsus sok. Mutlu Ap. 10 Bankaevleri-Ankara; Muğla 1947

Gıda Teknolojisi Derneği Tüzük Değişikliğini Hazırlayan 21. Dönem ve Onaylayan 22. Dönem Yönetim Kurulu Üyeleri

Adı, Soyadı	21. Dönem Görevi	22. Dönem Görevi	İMZA
Prof. Dr. Abdulkadir Halkman	Yönetim Kurulu Asil Üye	Yönetim Kurulu Asil Üye	
Prof. Dr. Celalettin Koçak	Yönetim Kurulu Asil Üye	Yönetim Kurulu Asil Üye	
Prof. Dr. Atıla Yetişemiyen	Yönetim Kurulu Asil Üye	Yönetim Kurulu Asil Üye	
Prof. Dr. Ender S. Poyrazoğlu	Yönetim Kurulu Asil Üye	Yönetim Kurulu Asil Üye	
Yrd. Doç. Dr. İbrahim Çakır	Yönetim Kurulu Asil Üye	Yönetim Kurulu Asil Üye	
Yrd. Doç. Dr. Birce Taban	Yönetim Kurulu Asil Üye	Yönetim Kurulu Asil Üye	
Araş. Gör. Onur Ketenoğlu	-- --	Yönetim Kurulu Asil Üye	
Araş. Gör. İlker T. Akoğlu	Yönetim Kurulu Asil Üye	Yönetim Kurulu Yedek Üye	
Prof. Dr. Aziz Tekin	Yönetim Kurulu Asil Üye	Denetleme Kurulu Asil Üye	