

GIDA

THE JOURNAL OF FOOD



E-ISSN 1309 - 6273, ISSN 1300 - 3070

CİLT / VOLUME : 42

SAYI / NUMBER : 5

YIL / YEAR : 2017

GIDA TEKNOLOJİSİ DERNEĞİ YAYINI

*PUBLISHED BY THE ASSOCIATION OF
FOOD TECHNOLOGY IN TURKEY*

Sahibi / Owner

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

Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

Yönetim Kurulu Başkanı / President of the Association

Editörler / Editors	Danışma Kurulu / Advisory Board
<p>ÇAKIR, İbrahim; <i>Abant İzzet Baysal University, Turkey</i> ERİNÇ, Hakan; <i>Ömer Halisdemir University, Turkey</i> HALKMAN, A. Kadir; <i>Ankara University, Turkey</i> ÖZDEN, Özkan; <i>Istanbul University, Turkey</i> TABAN, Birce; <i>Ankara University, Turkey</i></p>	<p>Alichanidis, Efstathios <i>Aristotle University of Thessaloniki, Greece</i> Artık, Nevzat <i>Ankara University, Turkey</i> Baysal, Taner <i>Ege University, Turkey</i> Boyacı, İsmail Hakkı <i>Hacettepe University, Turkey</i> Certel, Muharrem <i>Akdeniz University, Turkey</i> Draughon, Ann <i>Tennessee University, USA</i> Ekşi, Aziz <i>Ankara University, Turkey</i> El Soda, Morsi <i>University of Alexandria, Egypt</i> Fogliano, Vincenzo <i>University of Napoli Federico II, Italy</i> Ghosh, Bikash C. <i>National Dairy Research Institute, India</i> Gollop, Natan <i>The Volcani Center, ARO, Israel</i> Gökmen, Vural <i>Hacettepe University, Turkey</i> Griffiths, Mansel <i>University of Guelph, Canada</i> Göğüş, Fahrettin <i>Gaziantep University, Turkey</i> Gümüşkesen, Aytaç Saygın <i>Ege University, Turkey</i> Güven, Mehmet <i>Cukurova University, Turkey</i> Heperkan, Dilek <i>Istanbul Technical University, Turkey</i> Ho, Chi-Tang <i>The State University of New Jersey, USA</i> Kaya, Mükerrerem <i>Atatürk University, Turkey</i> Kaymak-Ertekin, Figen <i>Ege University, Turkey</i> Koçak, Celalettin <i>Ankara University, Turkey</i> Köksel, Hamit <i>Hacettepe University, Turkey</i> Morales, Francisco J. <i>CSIC Instituto del Fr o, Spain</i> Mujtaba, Mustafa G. <i>Florida Gulf Coast University, USA</i> Özilgen, Mustafa <i>Yeditepe University, Turkey</i> Paalme, Toomas <i>Tallinn University of Technology, Estonia</i> Parlar, Harun <i>Technical University of Munich, Germany</i> Raspor, Peter <i>University of Primorska, Slovenia</i> Rezessy-Szabo, Judit M. <i>Corvinus University of Budapest, Hungary</i> Şahin, Serpil <i>Middle East Technical University, Turkey</i> Şanlıbaba, Pınar <i>Ankara University, Turkey</i> Üstünoğlu, Zeynep <i>Michigan State University, USA</i> Yetişemiyen, Atila <i>Ankara University, Turkey</i></p>
<p>Yönetim Yeri Adres / Address Büyükelçi Sokak No: 18/1 Kavaklıdere/Ankara Turkey</p> <p>Tel: (+90) 0534 968 5994 • Faks: (+90) 312 317 8711 E-posta / E-mail: dergi@gidadernegi.org URL: http://www.gidadernegi.org</p> <p>Yayın Türü: Yaygın süreli ve hakemli</p> <p>Hazırlayan / Prepared Onay Ofset Matbaacılık G.M.K. Bulvarı No: 108/1 Maltepe / Ankara Turkey Tel : (+90) 312 230 22 09 e-mail: onayofset@gmail.com</p> <p>Yayın Tarihi / Publication Date 15 10 2017</p>	

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

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

İçindekiler / Content

Araştırmalar (İngilizce) / Researches (English)

- Özkaynak Kanmaz, E., Saral, Ö.; *The relationship between antioxidant activities and phenolic compounds in subcritical water extracts from orange peel / Portakal kabuğundan elde edilen kritik altı su ekstraktlarında antioksidan aktivite düzeyleri ile fenolik bileşikler arasındaki ilişki* 485-493
- Atalay, D., Selen Erge, H. *Determination of some physical and chemical properties of white, green and black teas (Camellia sinensis) / Beyaz, yeşil ve siyah çayların (Camellia sinensis) bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi* 494-504
- Yayayürük, O., Erdem Yayayürük, A. *Determination of mercury, lead, cadmium, copper, iron and manganese in sheep, cow and chicken liver samples in Turkey / Türkiye'deki koyun, dana ve tavuk karaciğer örneklerinde cıva, kurşun, kadmiyum, bakır, demir ve mangan tayini* 546-552
- Güler, F., Özçelik F. *An adaptation strategy to improve the proteolytic activities of lactic acid bacteria isolated from pickles / Bitki kaynaklı laktik asit bakterilerinin proteolitik aktivitelerinin geliştirilmesi için adaptasyon çalışması* 561-567
- Çağatay Ceylan, C., Bayraktar, O., Atci, E. Sarrafi, Ş. *Extraction and characterization of pectin from fresh globe artichoke and canned artichoke waste / Taze enginar ve konserve enginar atığından pektin ekstraksiyonu ve karakterizasyonu* 568-576
- Uçak Koç A., Karacaoğlu, M. Şahin Nadem, H., Doğan, M. *Determination of shelf life of chaste tree (Vitex agnus castus) honey and pine honey / Hayıt (Vitex agnus castus) ve çam balının raf ömrünün belirlenmesi* 577-587
- Tural, S., Turhan, S. *Antimicrobial and antioxidant properties of thyme (Thymus vulgaris L.), rosemary (Rosmarinus officinalis L.) and laurel (Lauris nobilis L.) essential oils and their mixtures / Kekik (Thymus vulgaris L.), biberiye (Rosmarinus officinalis L.) ve defne (Lauris nobilis L.) uçucu yağlarının ve karışımlarının antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri* 588-596
- Boynueğri, P., Yemişcioğlu, F., Saygın Gümüşkesen, A. *Effect of membrane degumming conditions on permeate flux and phospholipids rejection / Membran degumming koşullarının permeat akışı ve fosfolipitlerin reddedilmesi üzerindeki etkisi* 597-602

Araştırmalar (Türkçe) / Researches (Turkish)

- Kıvanç, M., Kovancı, P.; *Fermente gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin antifungal aktivitesinin belirlenmesi / Screening of antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from fermented foods* 477-484
- Yıldız, B., Öner, Z. *Karbondioksit uygulamasının Beyaz peynir kalitesine etkisi / The effect of carbon dioxide application on the quality of Beyaz cheese* 527-534
- Hayoğlu, İ., Başyığıt, B., Dirik, A. *Tane nar ilaveli lokum üretimi ve vakum ambalajlamanın raf ömrü üzerine etkisi / Production of Turkish delight with pomegranate and effect of vacuum packing on shelf life* 553-560
- Savran, D., Halkman A. K. *Salmonella, yoğurt bakterilerinin gelişimini etkileyebilir mi? / Can Salmonella affect the growth of yoghurt bacteria?* 603-608
- Hendek Ertop, M. *Farklı fermantasyon ve kurutma yöntemleriyle üretilmiş toz ekşi hamurun bazı mikrobiyolojik nitelikleri ve ekmekteki küf gelişimi üzerine etkileri / Effects on mold growth in bread and some microbiological properties of powder sourdough produced with different fermentation and drying methods* 609-619
- Güzel, M., Akpınar, Ö. *Komagataeibacter hansenii GA2016 ile bakteriyel selüloz üretimi ve karakterizasyonu / Production and characterization of bacterial cellulose with Komagataeibacter hansenii GA2016* 620-633
- Kıralan, M., Kara, H. H., Çalıkoglu, E., Bayrak, A. *Ege bölgesi zeytinyağlarında altı karbonlu / uçucu aroma bileşenlerinin belirlenmesi / Determination of six-carbon volatile aroma components in Aegean region olive oils* 634-642

Derlemeler (Türkçe) / Reviews (Turkish)

- Yenioglu Demiralp, Ş., Demirok Soncu, E., Kolsancı, N. *Oleojeller ve emülsifiye et ürünlerinde kullanımı / Oleogels and their utilization in emulsified meat products* 505-513
- Kutlu, N., Yeşilören, G., İşci, A., Şakıyan, Ö. *Konvansiyonel ekstraksiyona alternatif: Yeşil teknolojiler / Alternative to conventional extraction: Green technologies* ... 514-526
- Öztürk, B., Serdaroglu, M. *Et ve et ürünlerinde fosfatlar: İşlevleri ve ikame olanaklarının güncel çerçevede değerlendirilmesi / Phosphates in meat and meat products: Current perspective on evaluation of their functions and replacement possibilities* 535-545

Editörden,

Merhaba,

Dergimizin 5. sayısını (Eylül-Ekim 2017), Kasım 2017 ortasında 1 ay gecikme ile yayımlayabildik. Oysaki, en az 2 yıldan bu yana, dergimizi hep yaklaşık 1 ay önce tam sayı olarak yayımlardık.

Bu gecikmenin birkaç temel nedeni var:

-Bu sayımızdan başlayarak dergimizde 18 makale basmaya karar verdik. Kapak sayfaları hariç olmak üzere bu sayımız 166 sayfa olarak yayımlanıyor. Kâğıt baskı yaptığımız 2016 yılına kadar dergimiz en fazla 60 sayfa oluyordu. Şimdi bunun 2,5 misli sayfaya sahip dergi yayımlıyoruz.

-Her ne kadar makalelerin DergiPark adresine yüklenmesi sırasında yazarlardan kural uyumu açısından son kontrol listesi alıyorsak da, bundan sonra ikinci bir son kontrol listesi isteyeceğiz. Bu şekilde tüm işlemleri bitmiş olan makalelerin daha çabuk olarak elektronik ortamda yayımlanmasını hedefliyoruz.

Bu dergimizde 8 adet İngilizce araştırma, 7 adet Türkçe araştırma ve 3 adet Türkçe derleme var. Dergimizin uluslararası platformda tanınırlığını artırmak ve SCI kapsamına girmesini sağlamak için İngilizce araştırmaları öncelikli olarak yayımlamaya ağırlık vereceğiz.

Dergimizde yayım kuralları değişikliğine bağlı olarak daha önce yaşadığımız metin içindeki kaynak ile metin sonundaki kaynakça verilmesi arasındaki uyumsuzluk artık bitmiştir. Artık tüm makaleler aynı standart şekilde yayımlanıyor.

3. Uluslararası Gıda Teknolojisi Kongresi ile ilgili olarak www.gidadernegi.org sayfamızdan bizi takip edin. Kongre sitesi açıldı; <https://intfoodtechno2018.org/> Kongre kayıt günleri ile ilgili herhangi bir uzatma olmayacağını, geç gelen bildirimler için geç kayıt ücreti alınacağını bir kez daha hatırlatmak isterim.

Sevgi ve saygılarımla,

Prof. Dr. A. Kadir Halkman
GIDA Dergisi Editörü

A Message from the Editor-in-Chief

Hello,

We publish the 5th issue (September-October 2017) of our journal in the mids of November 2017 with a delay of 1 month. However, since at least 2 years, we have been publishing our journal as a whole issue for about a month ago.

There are several basic reasons for this delay:

-Starting from this issue, we decided to print 18 articles in our journal. This issue is published as 166 pages, excluding the cover pages. Our journal had at most 60 pages till the year of 2016 that we had published paper- printed journal. Now we publish a journal that has 2.5 times more pages.

-Although we have been receiving the final checklist from the authors in compliance with the journal policy rules during the submission of the articles via Dergi Park address, we will then ask for a second final checklist from the authors. In this way, we aim to publish the articles of which all procedures are finished, more quickly in electronic form.

In this journal, there are 8 research articles in English, 7 research articles in Turkish and, 3 review articles in Turkish. We will focus primarily on publishing research articles in English in order to increase international recognition of our journal and to make it be indexed in the SCI.

The incompatibility between the style of the reference used in the text and the reference list at the end of the text which we had been lived before due to the changes in the publication policy in our journal, is now finished. Now all articles are published in the same standardized way.

Follow us about the 3rd International Congress on Food Technology at www.gidadernegi.org. The Congress web site has been opened; <https://intfoodtechno2018.org/>. I would like to remind you once again that there will be no extension regarding the Congress' registration days and a late registration fee will be charged for the late-submitted abstracts.

Best Regards,

Prof. A. Kadir Halkman
Editor of Journal of FOOD

FERMENTE GIDALARDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN ANTİFUNGAL AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Merih Kıvanç*, Pınar Kovancı

Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Eskişehir, Türkiye

Geliş / *Received*: 18.01.2017; Kabul / *Accepted*: 07.05.2017; Online baskı / *Published online*: 08.06.2017

Kıvanç, M, Kovancı, P. (2017). Fermente gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin antifungal aktivitesinin belirlenmesi. *GIDA* (2017) 42 (5): 477-484 doi:10.15237/gida.GD17012

Öz

Bu çalışmada fermente ürünlerden izole edilen 45 laktik asit bakterisinin antifungal etkileri araştırılmıştır. Laktik asit bakterileri, mikotoksigenik *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus* ile *Cladosporium cladosporioides*, *Gibberella accuminata*, *Gibberella intricans*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium incarnatum*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus stolonifer*'e karşı çift tabakalı kültür yöntemi ve kuyu yöntemi kullanılarak antifungal aktivite açısından taranmıştır. Dokuz laktik asit bakteri izolatu çift tabakalı agar yöntemi ile antifungal aktivite gösterirken, on dokuz laktik asit bakterisinin süpernatantı bir veya daha fazla küfe karşı antifungal aktivite göstermiştir. Yüksek etkili olarak belirlenen *L. brevis* KL7'nin süt tozu ortamında *A. parasiticus* ve *P. chrysogenum*'a olan etkisi araştırılmış ve 120 saatte her iki küf de inhibe ettiği saptanmıştır. Gıda üretiminde ve gıdaların raf ömrünün uzatılmasında *L. brevis* KL7 ümit vaat eden bir izolat olarak belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Laktik asit bakterileri, küf, antifungal aktivite, süpernatant

SCREENING OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM FERMENTED FOODS

Abstract

In this study, we investigated the antifungal effects of 45 lactic acid bacteria (LAB) that were isolated from fermented products. Lactic acid bacteria were screened for antifungal activity by using dual agar overlay and well method against mycotoxigenic *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Gibberella accuminata*, *Gibberella intricans*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium incarnatum*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus stolonifer*. Nine LAB isolates showed antifungal activity with dual agar overlay method. Cell free supernatant of 19 LAB isolates showed antifungal activity against one or more fungi species. The effects of *L. brevis* KL7, which was determined as high effective, against *A. parasiticus* and *P. chrysogenum* in the milk medium were investigated; and it was found that both fungi were inhibited by *L. brevis* KL7 at 120 hours. *L. brevis* KL7 can be a promising isolate for food production and extension of the shelf life of the food.

Keywords: Lactic acid bacteria, mold, antifungal activity, supernatant

* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ mkivanc@anadolu.edu.tr,

☎ (+90) 222 335 0580,

☎ (+90) 222 320 4910

GİRİŞ

Fermente gıdaların hazırlanmasında laktik asit bakterileri çok eski zamanlardan beri kullanılmaktadır. Laktik asit bakterileri gıdaların korunmasında oynadığı temel rol yanında gıdalarında besinsel, duyuşal ve sağlık özelliklerine sağladığı katkılar nedeniyle geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bunların yanında hayvan yemlerinin hazırlanmasında da laktik asit bakterilerinden yararlanılmaktadır. Laktik asit bakterileri sağlığa zararlı olmayan güvenli (GRAS) bakteriler olarak kabul edilmektedir (1).

Gerek gıdalarda ve gerekse yemlerde küfler tehlike arz etmektedirler. Bulaşlı ürünler insan ve hayvan sağlığını tehdit etmesinin yanında önemli ekonomik kayıplara da neden olmaktadır (2, 3). Bu nedenle dünyada üretilen gıdaların % 5-10'u küf bulaşması nedeniyle kaybedilmektedir (4, 5). Karsinojenik, toksijenik, immünotoksik, nörotoksik, teratoksijenik, hepatoksik, nefrotoksik ve allerjik etkileri olan *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium* ve *Rhizopus* cinslerine ait türler önemli gıda bozulmalarına ve sağlık problemlerinin ortaya çıkmasına neden olabilirler (2, 6-8).

İnsan ve hayvan sağlığını korumak ve küfleri kontrol altına almak, gelişmelerini engellemek için çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemler uygulanmaktadır. Günümüzde doğal ürünlere olan talebin artması ile gıdaların biyokoruyucular ile korunmasını gündeme getirmiştir. Bunların içinde de biyokoruyucu olarak laktik asit bakterilerinin önemi gittikçe artmaktadır. Günümüzde bu konuda yapılan çalışmalar hız kazanmıştır (9-14).

Laktik asit bakterilerinin antifungal aktivitesi organik asit üretmeleri, besin maddeleri için rekabet etmeleri ve antifungal bileşikler sentezlemelerinden kaynaklanmaktadır (15). Metabolitlerin küflere karşı filament gelişimini ve spor gelişimini tamamen engelleme ya da geciktirme gibi çeşitli etkileri vardır (16). Bu da laktik asit bakterilerini kimyasal koruyuculara karşı bir alternatif haline getirmektedir.

Bu çalışmada çeşitli fermente ürünlerden izole edilmiş olan laktik asit bakterilerinin antifungal aktivitesi taranarak gıdalar için biyokoruyucu olarak kullanılabilme potansiyeline sahip laktik asit bakteri izolatlarının belirlenmesi hedeflenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Test Mikroorganizmaları

Fermente ürünlerden daha önceki çalışmalarda izole edilen ve %20'lik gliserolde -85°C stoklanan 45 laktik asit bakterisi (Çizelge 1) kullanılmıştır.

Laktik asit bakteri suşlarının antifungal aktivitelerinin saptanması için kullanılan küfler daha önce yapılan çalışmalarda gıdalardan izole edilen *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Gibberella acuminata*, *Gibberella intricans*, *Fusarium incarnatum*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus stolonifer* Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Mikrobiyoloji Biriminden sağlanarak kullanılmıştır.

Test Mikroorganizmalarının Geliştirilmesi ve Küflerin Spor Süspansiyonunun Hazırlanması

Stoktan çıkarılan laktik asit bakterileri de Man Rogasa Sharp (MRS) Brotha ekilerek 35°C de %5 CO₂ içeren ortamda 24-48 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra MRS Agara ekim yapılarak 35°C de %5 CO₂ içeren ortamda 24-48 saat süre ile inkübe edilmiştir. Daha sonra koloniler incelenerek saflıkları kontrol edilmiş ve saf olanlar çalışmalarda kullanılmıştır.

Test mikroorganizması olarak seçilen küfler Patates Dekstroz Agara (PDA) ekilerek 7-10 gün süre ile 28°C sporlanıncaya kadar inkübe edildikten sonra sporlar %1'lik Tween 80 ile toplanarak steril bir tüp içine alınmıştır. Tüp içindeki spor süspansiyonundaki spor sayısı Thoma lamı kullanılarak belirlenmiştir.

Laktik Asit Bakterilerinin Antifungal Aktivitesinin Belirlenmesi

Laktik asit bakterilerinin antifungal aktivitesi çift tabakalı dökme kültür yöntemi ile belirlenmiştir (14). Laktik asit bakterileri MRS Brotha ekilerek 35°C de %5 CO₂ içeren ortamda 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. Bu kültürlerden MRS Agar içeren Petrilere her bir kültürden 10µL ekim yapılmıştır. Petrilere 48 saat 35°C de %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiştir. Yumuşak PDA hazırlanmış ve içine 10⁵ spor/mL olacak şekilde spor solüsyonundan aktarılarak iyice karıştırılmış ve içinde laktik asit bakterilerinin geliştirildiği

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan laktik asit bakterileri ve izole edildiği gıdalar
Table 1. LAB that were used in this study and the foods, which were the sources of isolates.

Laktik Asit Bakterileri <i>Lactic acid bacteria</i>	İzole Edildiği Fermente Ürün Source
BZ1, ES2, EZ8	Yeşil zeytin (<i>Olea europaea</i> L.) Green olive
KB8, KB9, Q1, Q6, Q7, Q8, Y3, Y7, Y8, Y11, Y12, X1, X3, X4, X14, Z2, X13, X8, X9, X10, Z4, Z9	Boza Boza
KL3, KL4, KL7	Kelek turşusu (<i>Cucumis melo</i> L.) Pickled Raw melon
KM5, MK1	Kefir Kefir
KR2	Kornişon turşusu (<i>Cucumis sativus</i> L.) Pickled gherkins
KT5, KT13	Kabak turşusu (<i>Cucurbita pepo</i> L.) Pickled cucurbita
LT1, LT3, MN3, LT6,	Lahana turşusu (<i>Brassica oleracea</i> L.) Cabbage pickles
MN2, MN5,	Mantar turşusu (<i>Agaricus bisporus</i>) Pickled mushroom lmbach
MT2	Mısır turşusu (<i>Zea mays</i> L.) Pickled corn
MY1	Ekmek mayası Bread dough
PT13	Patlıcan turşusu (<i>Solanum melongena</i> L.) Pickled eggplant
SZ1, SZ5	Siyah zeytin (<i>Olea europaea</i> L.) Black olive
TR1	Tarhana Tarhana

Petriler üzerine 7 mL olacak şekilde dökülerek yayılmıştır. Peti kutuları 28°C de 7 gün süre ile inkübasyona bırakılmışlardır. Günlük olarak misel gelişimi ve spor oluşumu yönünden Petrilere takip edilmiştir. Yedinci gün laktik asit bakterileri etrafında oluşan zon ölçülerek değerlendirilmiştir. Çalışmalar iki paralel olarak yürütülmüştür.

Laktik Asit Bakteri Süpernatantlarının Antifungal Aktivitesi

Laktik asit bakteri izolatları ayrı ayrı MRS Brotha inoküle edilip, 35 °C de, 48 saat %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra kültürler 10.000 rpm de 10 dakika 4°C de santrifüj edildikten sonra süpernatant 0.2 µm çaplı filtreden geçirilmiştir. Steril bir mantar delici ile Müler Hilton Agar içeren Petrilere kuyucuk açılarak her filtrattan 100'er µL aktarılmıştır. Daha sonra üzerlerine test küflerinin 10⁵ spor/mL olacak şekilde ayarlanmış spor solüsyonlarını içeren yumuşak PDA dökülerek Petrilere 7 gün

süre ile 28°C inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası kuyucuklar etrafında oluşan inhibisyon zon çapları ölçülerek değerlendirme yapılmıştır. Çalışmalar çift paralel olarak yürütülmüştür (14).

L. brevis KL7'nin *A. parasiticus* ve *P. chrysogenum* Üzerine Antifungal Etkisinin Belirlenmesi

L. brevis KL7, 500 mL MRS Brothta ekilerek 35 °C de, 48 saat %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kültür 8000 rpm de 15 dk. 4°C de santrifüj edilmiştir. Pelet kısmı alınmış ve 3 kez steril fosfat tamponlu su ile yıkanarak mililitrede 10¹⁰ bakteri olacak şekilde stok kültürü hazırlanmıştır. *A. parasiticus* ve *P. chrysogenum*'a ait spor solüsyonunda yukarıda verildiği gibi hazırlanmıştır. Hazırlanan solüsyonlardaki spor sayıları belirlenmiştir.

Steril 200 mL %10'luk süt tozu ortamına, *L. brevis* KL7 kültüründen mL de 10⁸ bakteri hücresi

olacak şekilde ilave edilmiştir. *A. parasiticus* ve *P. chrysogenum*'a ait spor solüsyonlarından da ayrı ayrı mL de 10^5 spor olacak şekilde ekim yapılmıştır. Erlenler 30°C inkübasyona bırakılmıştır. Erlenlerden 120 saat boyunca her gün örnek alınarak *L. brevis* KL7 için MRS Agara, *A. parasiticus* ve *P. chrysogenum* için PDA besiyerine ekim yapılmıştır. MRS Agar plakları %5 CO₂ ortamında 35 °C'de inkübasyona bırakılmış. PDA plakları ise 28 °C'de inkübe edilmiştir. Petride gelişen koloniler sayılarak değerlendirilmiştir (14). Ayrıca her gün alınan örneklerin pH'sı pH metre ile ölçülmüştür.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Çift tabakalı dökme kültür yöntemine göre test edilen 45 adet laktik asit bakterisinin hepsi test edilen küflere karşı az veya çok antifungal aktivite

göstermiştir. Kırk beş laktik asit bakterisinden 9'u yüksek antifungal aktivite gösterirken (Çizelge 2) diğerleri düşük oranda (Çizelge 2 de gösterilmemiştir) aktivite göstermiştir. Bütün laktik asit bakteri izolatları *G. acuminata*, *C. cladosporioides*, *G. intricans*'a karşı çok düşük bir antifungal aktivite göstermiştir. Etkili olan laktik asit bakterilerin ise geniş spektrum gösterdikleri görülmüştür. *L. brevis* LT1, LT3, LT6, *L. curvatus* MN2 ve *L. plantarum* MK1 suşları *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. parasiticus*, *F. oxysporum*, *F. incarnatum*, *P. chrysogenum* ve *R. stolonifer*'e karşı antifungal aktivite göstermişlerdir (Şekil 1).

Laktik asit bakterileri, patojenlerde sporlanmayı da geciktirmiştir. Test mikroorganizması *P. chrysogenum* 7. günde sporlanma gösterirken, *A. parasiticus* ve *A. flavus* 15. günde sporlanma göstermiştir.

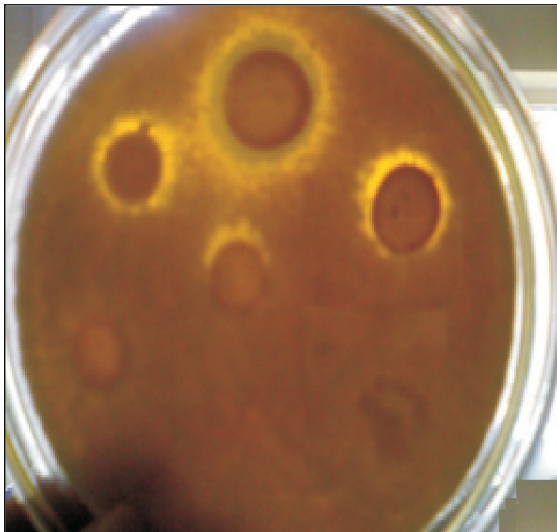
Çizelge 2. Laktik asit bakterilerinin test küfleri üzerine inhibisyon etkisi (zon çapı mm)

Table 2. Inhibition effects of LAB on tested fungi (zone diameter mm)

Laktik asit bakterileri Lactic acid bacteria	<i>R. stolonifer</i>	<i>P. chrysogenum</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>F. incarnatum</i>
<i>L. paracasei</i> sp. <i>paracasei</i> KT5	+	20	12	13	17	+	+
<i>L. brevis</i> KT13	+	27	9	21	20	+	+
<i>L. brevis</i> LT1	20	5	5	13	18	20	21
<i>L. brevis</i> LT3	12	8	12	13	17	11	23
<i>L. brevis</i> LT7	11	20	21	16	21	18	22
<i>L. brevis</i> MN3	10	+	+	14	22	11	24
<i>L. curvatus</i> MN2	16	20	7	18	22	21	23
<i>L. plantarum</i> MN5	20	+	+	+	21	20	25
<i>L. plantarum</i> MK1	10	12	12	20	18	17	24

¹- : etkisiz, + : etkili ancak belirgin bir zon oluşumu yok.

-: ineffective +: effective but no zone



Şekil 1. *L. brevis* LT7, *L. plantarum* MK1, *L. curvatus* MN2'nin *A. parasiticus* ve *A. flavus* üzerine inhibisyon etkisi
Figure 1. Inhibition effect of *L. brevis* LT7, *L. plantarum* MK1, *L. curvatus* MN2 on *A. parasiticus* and *A. flavus*

Tropcheva ve ark (17) süt ürününden izole ettikleri *L. brevis* izolatlarının antifungal aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar dört *L. brevis* izolatının *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* ve *Trichoderma* üzerine etkili olduğunu rapor etmişlerdir. *L. brevis* KR3, KR4 ve KR5 suşları *P. claviforme*, *A. awamori* ve *A. nigeri* tamamen baskıladığını saptamışlardır. Araştırmacılar bizim bulgularımız gibi antifungal aktivitenin suşa göre değiştiğini bildirmişlerdir. Benzer olarak yapılan başka bir çalışmada da *A. flavus*'un *L. brevis* ile kontrol edildiği bildirilmiştir (18). Güley (19) küflü peynirlerden izole ettiği *L. brevis* ve *L. plantarum*'un *A. flavus* ve *A. parasiticus*'a karşı antifungal aktivite gösterdiğini gözlemiştir. Araştırmacı, inhibisyonun rekabet ile ilişkili olduğunu vurgulamıştır. Matel ve Cornea (20) bitkisel kaynaklı *A. ochraceus*, *P. digitatum* ve *Alternaria solani*'nin laktobasillus türleri ile gelişmelerinin kontrol altına alındığını bildirmişlerdir. Kimchiden izole edilen 120 laktik asit bakterisinden sadece *Lactobacillus cruvatus*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. casei*, *L. pentosus* ve *L. sakei*'nin *A. fumigatus*, *A. flavus*, *Fusarium moniliforme*, *Penicillium commune* ve *Rhizopus oryzae* karşı kuvvetli inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir (21). Erginkaya ve ark (22) yoğurtlarda probiyotik laktik asit bakterilerinin *A. flavus* üzerine depolamanın 8. gününe kadar etkili olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar *L. rhamnosus* ve

Bifidobacterium longum'un en yüksek antifungal aktivite gösterdiği saptamışlardır. Erginkaya ve ark (23) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCC 855, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCC 861 ve ticari yoğurt kültürlerinin (Visbyvac Joghurt 709) *Penicillium expansum*'un gelişimini inhibe ettiği belirlenmiştir. Ekşi hamurdan izole edilen *Lactobacillus paraplantarum* N-15 ve *L. paralimentarius* E-106'nın *A. niger* ve *P. chrysogenum* karşı inhibitör etki gösterdiği bildirilmiştir (24)

Laktik asit bakterilerine ait süpernatantların antifungal etkisi Çizelge 3'te verilmiştir. Kırk beş laktik asit bakterisinden 19'unun süpernatantı en az bir küfe karşı antifungal etkili bulunmuştur. *A. flavus*, *A. fumigatus*, *F. incarnatum*, *G. intricans* küflerine karşı ise test edilen laktik asit bakterilerinden hiç birinin süpernatantı antifungal aktivite göstermemiştir. *L. brevis* KL3'e ait süpernatant *R. stolonifer*, *P. chrysogenum*, *F. oxysporum*, *C. cladosporides*'e karşı antifungal etki gösterirken *L. brevis* KL7'ye ait süpernatant ise *R. stolonifer*, *P. chrysogenum*, *A. parasiticus*, *C. cladosporides* karşı antifungal aktivite göstermiştir. Laref ve Guessas (25), *L. plantarum* ve *Lactobacillus farciminis*'in süpernatantlarının *Trichoderma* spp. *Penicillium* spp. *Fusarium roseum* ve *Stemphylium* spp karşı antifungal aktivite

Çizelge 3. Laktik asit bakterilerine ait filtratların test küfleri üzerine etkisi.

Table 3. The effects of substrate, which belongs to the LAB, on tested fungi.

Bakteriler	<i>R. stolonifer</i>	<i>P. chrysogenum</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>G. acuminata</i>	<i>C. cladosporides</i>
<i>L. brevis</i> BZ1	-	+	-	+	-	-
<i>L. brevis</i> ES2	+	-	-	+	+	-
<i>L. brevis</i> EZ8	-	-	+	+	+	-
<i>L. brevis</i> KB8	-	-	+	+	-	-
<i>L. brevis</i> KL3	+	+	-	+	-	+
<i>L. brevis</i> KL7	+	+	+	-	-	+
<i>L. brevis</i> KR2, LT1	-	+	-	+	-	+
<i>L. brevis</i> KT13	-	+	-	-	-	-
<i>L. brevis</i> MN3	-	-	-	+	-	-
<i>L. brevis</i> PT13	-	+	-	-	-	-
<i>L. brevis</i> LT6	-	+	-	-	+	-
<i>L. delbrueckii</i> sp. <i>delbrueckii</i> KB9	-	-	-	+	-	-
<i>L. delbrueckii</i> sp. <i>delbrueckii</i> KM5	-	+	+	-	-	+
<i>L. paracasei</i> sp. <i>paracasei</i> KL4	-	-	-	+	-	-
<i>L. paracasei</i> sp. <i>paracasei</i> KT5	-	+	-	+	-	+
<i>L. paracasei</i> sp. <i>paracasei</i> LT3	-	-	-	-	-	+
<i>L. plantarum</i> MK1	-	+	-	-	+	-
<i>L. plantarum</i> Q1	-	+	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> Q7	-	+	+	-	-	-

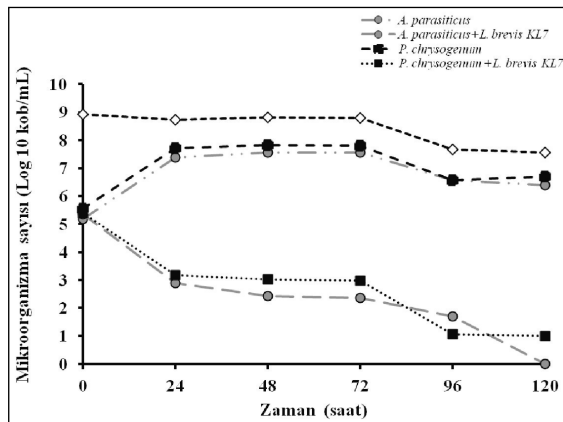
- : etkisiz substrat, + : etkili substrat

:- ineffective substrate, +: effective substrate

göstermediğini bildirmişlerdir. Benzer olarak Miescher ve Meile (26), Lan ve ark, (27) *Propionibacterium* spp; *Weissella cibaria* 861006 ve *Weissella paramesenteroides* 860509'un süpernatantının antifungal aktivite göstermediği bildirilmiştir.

L. lactis subsp. *lactis* CHD 28.3 *A. flavus* NCIM 555, *A. parasiticus* NCM 898 ve *Fusarium* türlerinin gelişmesini engellemiştir (15). Djossou ve ark (28) kahve pulp silajından izole edilen *L. plantarum*'un okratoksijenik *Aspergillus carbonarius*'un gelişmesini inhibe ettiğini saptamışlardır. Çalışmamızda bozadan elde edilen *L. plantarum* Q7'nin süpernatantı toksijenik *A. parasiticus*'in gelişmesini inhibe etmiştir.

L. brevis KL7'nin *A. parasiticus* ve *P. chrysogenum*'un gelişmesi üzerine etkisi %10'luk süt tozu ortamında test edilmiştir. Her iki küfün gelişme durumu 120 saat süresince günlük olarak takip edilmiştir (Şekil 2). *L. brevis* KL7 120 saat süresince %10'luk süt tozu ortamında 10^7 - 10^8 kob/mL civarında kalırken *L. brevis* KL7'nin ilave edildiği kültürlerde gerek *A. parasiticus* ve gerekse *P. chrysogenum* sayısı zamana bağlı olarak azalmıştır. *P. chrysogenum* 120. saatte sayılamazken, *A. parasiticus* sayısı azalmıştır. *L. brevis* KL7'nin ilave edilmediği ortamda ise her iki küf sayısı da yüksek olarak saptanmıştır (Şekil 2). Ortamların pH değişimleri Şekil 3'te verilmiştir. Her iki uygulamada pH değeri birbirine yakın olup 120. saatte pH 4 olarak belirlenmiştir. Kivanç ve ark (11) *Enterococcus durans*'ın *P. chrysogenum*'u 48 saat te inhibe ederken *P. griseofulvum*'un ise

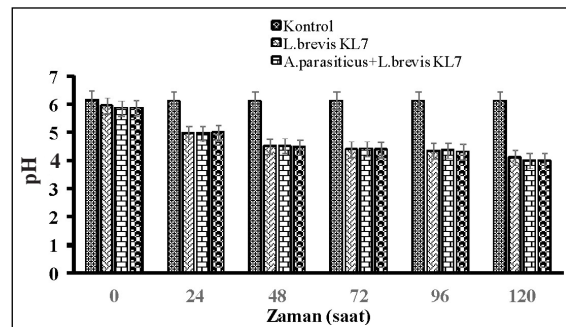


Şekil 2. *L. brevis* KL7'nin süt %10 süt tozu ortamında *A. parasiticus* ve *P. chrysogenum* gelişimi üzerine etkisi
Figure 2. Effect of *L. brevis* KL7 on development of *A. parasiticus* and *P. chrysogenum* into the medium with 10% milk powder.

144. saatte inhibe olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar *E. durans*'ın *A. fumigatus* ve *A. parasiticus* 144. saatte inhibe ettiğini rapor etmişlerdir.

Kim (21), *L. sakei* KC-1004'ün MRS ortamında *A. fumigatus*'un biyomas oluşumuna etkisini test etmiş ve 14 gün süresince değişimi takip etmiştir. İlk hafta *A. fumigatus*'ta artış olduğunu bundan sonra kontrole göre düşme gözlemlendiğini bildirmiştir. Laktik asit bakterilerinin antifungal aktivitesinin laktik asitin sinerjistik etkisi nedeniyle olduğu belirlenmiştir (29). Bu bulguların aksine Magnusson ve ark. (9) antifungal aktiviteye sahip olmayan laktik asit bakterilerinin de yüksek miktarda laktik asit ürettiklerini ve bu laktik asit bakterilerine ait filtratların değişen oranlarda antifungal aktivite gösterdiklerini belirtmişlerdir. Çalışmamızda da laktik asit bakterilerine ait süpernatantların farklı oranlarda antifungal aktivite gösterdiği izlenmiştir. Antifungal aktivite laktik asit bakterilerinin ürettiği çeşitli bileşikler nedeniyle olabilir. Ström ve ark. (30), Magnusson ve ark (9) *L. plantarum*'dan cyclo(L-Phe-L-Pro), *L. pentosaceus* 'dan cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) ve *L. sakei*'den fenilasetik asiti antifungal substrat olarak saflaştırmışlardır. *L. plantarum* ve *L. farciminis*'in, *Aspergillus* spp., *Fusarium roseum*, *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp. ve *Stemphylium* spp.'ye karşı aktif antifungal bileşikler ürettikleri saptanmıştır (21). Araştırmacılar antifungal aktivitenin ağırlıklı olarak organik asitler nedeni ile olduğunu bildirmişlerdir.

L. brevis KL7'nin gerek *A. parasiticus* ve gerekse *P. chrysogenum*'u %10'luk süt tozu ortamında inhibe etmesi süt ürünlerinin üretiminde *L. brevis*



Şekil 3. Yüzde 10'luk süt tozu ortamında *L. brevis* KL7 ile *A. parasiticus* ve *P. chrysogenum*'un bulunduğu ortamda pH'nın zamana bağlı değişimi.

Figure 3: Change of pH by time into the medium with *L. brevis* KL7, *A. parasiticus* and *P. chrysogenum*, and 10% milk powder.

KL7'den yararlanılabileceğine işaret etmektedir. Diğer laktik asit bakterilerinin de patojen ve mikotoksijenik küfler üzerine antifungal etkisinin ortaya konması gıda üretimi ve gıdaların raf ömrünün uzatılması açısından yararlı olabilecektir. Ancak bu konuda detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Gerez, C.L., Torres, M.J., de Valdez, G.F., Rollan, G. (2013). Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biol Control*, 64:231-237.
- Berikten, D., Kivanc, M. (2012). Fungal contaminations of some foods, their mycotoxin production and effects of antifungal agents on these fungi. In: *Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges* A. Mendez-Vilas (Ed) World Scientific Publishing Co. pp. 268-272.
- Bryden, W.L. (2012). Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Anim Feed Sci Technol*, 173: 134-158.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. (2009). *Fungi and food spoilage*. Springer US. pp. 383-400.
- Fisher, M.C., Henk, D.A., Briggs, C.J., Brownstein, J.S., Madoff, L.C., McCraw, S.L., Gurr, S.G. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, 484 (7393):186-204.
- Bryden, W.L. (2007). Mycotoxin in the food chain: Human health implications. *Asia Pac J Clin Nutr*, 16: 95-101.
- Wild, C.P., Gong, Y.Y. (2009). Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Oxf J Carcinogen*, 31:71-82.
- Gerez, C.L., Torino, I.M., Rollan, G., Fond de Valdez, G. (2009). Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control*, 20:144-148.
- Magnusson, J., Strom, K., Roos, S., Schnurer, J. (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 220: 129-135.
- Trias, R., Baneras, L., Montesinos, E., Badosa, E. (2008). Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *Int Microbiol*, 11:231-236.
- Dinçer, E., Kıvanç, M., Karaca, H. (2010). Bi-yokoruyucu olarak laktik asit bakterileri ve bakteriyosinler. *Gıda*, 35 (1): 55-62.
- Mauch, A., Dal Bello, F., Coffey, A., Arendt, E.K. (2010). The use of *Lactobacillus brevis* PS1 to in vitro inhibit the outgrowth of *Fusarium culmorum* and other common *Fusarium* species found on barley. *Int. Food Microbiol*, 141:116-121.
- Voulgari, K., Hatzikamari, M., Delepoglou, A., Georgakopoulos, P., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N. (2010). Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products. *Food Control*, 21:136-142.
- Kıvanç, M., Kıvanç, S.A., Pektaş, S. (2014). Screening of lactic acid bacteria for antifungal activity against fungi. *J Food Process Technol*. 5(3):1-5.
- Dalie, D.K.D., Deschamps, A.M., Richard-Forget, F. (2010). Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*, 21:370-380.
- Varsha, K.K., Nampoothiri, K.M. (2016). Appraisal of lactic acid bacteria as protective cultures. *Food Control*, 69:61-64.
- Tropcheva, R., Nikolova, D., Evstatieva, Y., Danova, S. (2014). Antifungal activity and identification of *Lactobacilli*, isolated from traditional dairy product "katak". *Anaerobe*, 28:78-84.
- De Muynck, C., Leroy, A.I., De Maeseneire, S., Arnaut, F., Soetaert, W., Vandamme, E.J. (2004). Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. *Microbiol Res*, 159 (4):339-346.
- Güley, Z. (2008). Doğal üretilen küflü peynirlerden izole edilen bazı laktik asit bakterilerinin aflatoksin B1 ve aflatoksin M1 üzerine etkisinin araştırılması. Ege üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi. Bornova, İzmir, Türkiye, 259s.
- Matei, A., Cornea, C.P. (2014). Antifungal activity of some lactic acid bacteria isolated from materials of vegetal origin. *Sci Bul Series F. Biotechnol*, 18:42-47.
- Kim, J.D. (2005). Antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from kimchi against *Aspergillus fumigatus*. *Mycobiology*, 338:210-214.

22. Erginkaya, Z., Güven, M., Kavas, C., Var, I., Kabak, B., Karaca, O.B. (2003). Farklı laktik asit kültürleriyle üretilen yoğurtlarda laktik asit bakterilerinin *Aspergillus flavus* üzerine antifungal etkisi. *Gıda Müh Derg*, 7 (15):31-36.
23. Erginkaya, Z., Kavas, C., Var, I., Kabak, B., Güven, M. (2005). Bazı laktik asit bakterileri ve bifidobakterin antifungal etkileri. www.mikrobiyoloji.org/pdf/702050703.pdf (Erişim tarihi 28.03.2017).
24. Demirbaş, F., İspirli, H., Kurnaz, A.A., Yılmaz, M.T., Dertli, E. (2017). Antimicrobial and functional properties of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs. *LWT - Food Sci Technol*, 79: 361-366.
25. Laref, N., Guessas, B. (2013). Antifungal activity of newly isolates of lactic acid bacteria. *Innov Rom Food Biotechnol*. 13: 80-88.
26. Miescher, S.S., Meile, L. (2004). A Mixed culture of *Propionibacterium jensenii* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* inhibits food spoilage yeasts. *Syst Appl Microbiol*, 27:229-237.
27. Lan, W., Chen, Y., Hui-Chung, W., Yanagida, F. (2012). Bio-protective potential of lactic acid bacteria isolated from fermented wax gourd. *Folia Microbiol*, 57: 99-105.
28. Djossou, O., Perraud-Gaime, I., Mirleau, F.L., Rodriguez- Serrano, G., Karou, G., Niamle S., Ouzari, I., Boudabous, A., Roussos, S. (2011). Robusta coffee beans post-harvest microflora: *Lactobacillus plantarum* sp. as potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*. *Anaerobe*, 17:267-272.
29. Cabo, M.L., Braber, A.F., Koenraad, P.M. (2002). Apparent antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the medium. *J. Food Prot*, 65(8): 1309-1316.
30. Ström, K., Sjögren, J., Broberg, A. and Schnürer, J. (2002). *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro), and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and phenylacetic acid. *Appl Environ Microbiol*. 68: 4322-4327.

THE RELATIONSHIP BETWEEN ANTIOXIDANT ACTIVITIES AND PHENOLIC COMPOUNDS IN SUBCRITICAL WATER EXTRACTS FROM ORANGE PEEL

Evrim Özkaynak Kanmaz¹, Özlem Saral²

¹Artvin Çoruh University, Faculty of Health Sciences, Nutrition and Dietetics Department

²Recep Tayyip Erdoğan University, Health College, Nutrition and Dietetics Department

Geliş / Received: 10.03.2017; Kabul / Accepted: 21.04.2017; Online baskı / Published online: 08.06.2017

Özkaynak Kanmaz, E, Saral, Ö. (2017). The relationship between antioxidant activities and phenolic compounds in subcritical water extracts from orange peel. *GIDA* (2017) 42 (5): 485-493 doi: 10.15237/gida.GD17029

Abstract

Subcritical water extraction, also called green technology, is used to extract phytochemicals from different plants and foods. Orange peel, a valuable by-product in the food industry, is a rich source of antioxidant compounds such as phenolics, β -carotene and essential oils. In this study, determination of the relationship between antioxidant activities and phenolic compounds in subcritical water extracts from orange peel was aimed. For this aim, The Ferric Reducing Antioxidant Assay (FRAP), The Cupric Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC) and DPPH radical scavenging activity (IC_{50}) of subcritical water extracts were measured. Total phenolic contents were statistically significant ($P < 0.01$) correlated as $r^2 = 0.98$ and 0.92 with FRAP and CUPRAC values in subcritical water extracts obtained from orange peel. Also, total flavonoid contents were statistically significant ($P < 0.01$) correlated as $r^2 = 0.97$ and 0.93 with FRAP and CUPRAC values in subcritical water extracts from orange peel. Besides, total phenolic and total flavonoid content in subcritical water extracts from orange peel were statistically significant ($P < 0.01$) correlated as $r^2 = -0.68$ and -0.70 with IC_{50} value, respectively.

Keywords: Antioxidant activity, DPPH, orange peel, subcritical water extraction, phenolics, flavonoids.

PORTAKAL KABUĞUNDAN ELDE EDİLEN KRİTİK ALTI SU EKSTRAKTLARINDA ANTİOKSİDAN AKTİVİTE DÜZEYLERİ İLE FENOLİK BİLEŞİKLER ARASINDAKİ İLİŞKİ

Öz

Yeşil teknoloji olarak da adlandırılan kritik altı su ekstraksiyonu işlemi farklı bitkilerden ve gıdalardan fitokimyasal bileşiklerin ekstrakte edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde değerli bir yan ürün olan portakal kabuğu fenolik bileşikler, β -karoten ve esansiyel yağlar gibi antioksidan bileşikler açısından zengin bir kaynaktır. Bu çalışmada, portakal kabuğundan elde edilen kritik altı su ekstraktlarında antioksidan aktivite değerleri ile fenolik bileşikler arasındaki ilişkinin saptanması amaçlanmıştır. Bu amaçla, kritik altı su ekstraktlarının Demir indirgeme Gücü Aktivitesi (FRAP), Bakır indirgeme Gücü Aktivitesi (CUPRAC) ve DPPH radikal süpürme aktivitesi (IC_{50}) ölçülmüştür. Portakal kabuğundan elde edilen kritik altı su ekstraktların toplam fenolik madde içeriği ile FRAP ve CUPRAC değerleri arasındaki ilişki istatistiksel ($P < 0.01$) açıdan önemli olup sırası ile $r^2 = 0.98$ ve 0.92 düzeylerinde bulunmuştur. Aynı zamanda, portakal kabuğundan elde edilen kritik altı su ekstraktların toplam flavonoid içeriği de FRAP ve CUPRAC değerleri ile istatistiksel ($P < 0.01$) açıdan önemli düzeyde ilişkilidir (sırası ile $r^2 = 0.97$ ve 0.93). Ayrıca, portakal kabuğundan elde edilen kritik altı su ekstraktların toplam fenolik madde ve toplam flavonoid içerikleri ile IC_{50} değeri arasındaki ilişki sırası ile $r^2 = -0.68$ ve -0.70 düzeylerinde olup istatistiksel ($P < 0.01$) açıdan önemlidir.

Anahtar kelimeler: Antioksidan aktivite, DPPH, portakal kabuğu, kritik altı su ekstraksiyonu, fenolikler, flavonoidler.

* Corresponding author / Yazışmalarda sorumlu yazar

✉ evrimka2000@yahoo.com,

☎ (+90) 466 215 1063 / 2127,

☎ (+90) 466 215 1064

INTRODUCTION

Subcritical water extraction has an increasing attention due to short extraction time and high extraction yield as compared with conventional extraction methods. Furtherly, subcritical water is an alternative extraction solvent against to the toxic organic solvents such as especially methanol and acetone (Ko et al., 2011). In the literature, it was reported that especially fruit, vegetable and oilseed waste products were rich sources of different bioactive compounds. Subcritical water was used for phenolic compounds extraction from grape skins and defatted grape seeds (Duba et al., 2015), olive fruit dreg (Yu et al., 2015), flaxseed meal (Özkaynak Kanmaz, 2014), onion peel (Lee et al., 2014), various food by-products (Ko et al., 2014), also antioxidant compounds from grape pomace (Vergara-Salinas et al., 2015), β -glucan from barley (Kodama et al., 2016), resveratrol from Barks of *Shorea Roxburghii* G. Don. (Chainukool et al., 2014), secoisolariciresinol diglucoside (SDG) lignan from flaxseed (Özkaynak Kanmaz and Ova, 2013).

Polyphenols are major antioxidants in human diet. Polyphenols protect cell constituents against oxidative damage and therefore, limit the risk of various degenerative diseases associated with oxidative stress (Jiménez, 2005). Citrus peels contain main flavanone glycosides (hesperidin and naringin), polymethoxylated flavones and numerous hydroxycinnamates (Manthley and Grohman, 2001). The attention on food by-products are notecably increasing because of the recycling processes or environmental purposes for the future. Citrus by-products have been used for animal feeding, pectin production and fuel production. Orange and grapefruit have high amount of peel and these peels are discarded as by-product in the food industry (Lagha-Benamrouchea and Madania, 2013). However, citrus peels have high concentration of flavonoids as compared citrus fruits. Orange (*C. sinensis* L.) peel is also a rich source of phenolic compounds and contains narirutin and hesperidin flavonoids which have antioxidant effect (Sawalha et al., 2009).

In the literature, there is not information about the effect of extraction temperature and static extraction time on antioxidant compounds in subcritical water extracts from orange peel using accelerated solvent extractor. Also, there is a lack

of publication regarding the correlation between antioxidant activities and phenolic compounds in subcritical water extracts from orange peel by accelerated solvent extractor. The aim of the present study was to determine the effect of extraction temperature (from 50 to 180°C) and static extraction time (5 and 15 min) on antioxidant activities, total phenolic content and total flavonoid content of subcritical water extracts from orange peel using accelerated solvent extractor. Also, the correlations between antioxidant activities and phenolic compounds in subcritical water extracts from orange peel were investigated in this study.

MATERIAL AND METHOD

Material

Sweet Washington oranges (*C. sinensis* L.) were used in this study. Oranges were cultivated with natural farming and were harvested in November 2014 from a natural orchard in Köyceğiz, Muğla. The orange peels were not covered with wax and they were peeled with a stainless steel knife and then dried in the vacuum air oven at 50°C until constant weight. Dried orange peels were vacuum packed for prevention of oxidation and then stored at -20°C until the extraction process. Samples were ground with a coffee grinder (Bosch, KM 13) between 600 and 1500 μ m just before the extraction.

All the chemicals and solvents were analytical or HPLC grade. The chemicals and reagents used in this study were Folin-ciocalteau phenol reagent, luteolin, aluminium chloride, sodium hydroxide, methanol, ethanol, DPPH, acetate buffer, hydrochloric acid, 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (tptz), iron (III) chloride hexahydrate, iron(II) sulfate heptahydrate, copper(II) chloride, neocuproine, ammonium acetate, trolox (Sigma); sodium carbonate, sodium nitrite (Merck); ferrulic acid (Fluka).

Method

Subcritical water extraction

Subcritical water extracts from orange peel were obtained using accelerated solvent extractor (ASE 350, Dionex Corporation). During subcritical water extraction, temperature is the most important

parameter so wide temperature range (50, 100, 120, 140, 160 and 180°C) was used in this study. Besides, static extraction time is one of the most effective parameters during subcritical water extraction (Çam and Hışıl, 2010; Özkaynak Kanmaz and Ova, 2013). In this study, short extraction time was aimed so only 5 and 15 min were chosen as static extraction time. It is not possible to change the pressure in the Dionex ASE 350 system so 1500 psi pressure was used in this study. Particle size is also an effective parameter and higher extraction efficiency was obtained between 600 and 1500 µm during subcritical water extraction by Çam and Hışıl (2010). In this study, the particle size was used between these values. Subcritical water extraction was carried out in a metal extraction cell (10 mL) and 1 g of dried orange peel was used for each extraction process. Besides, flush volume was used as a fixed factor because it has no effect on the extraction yield during subcritical water extraction (Çam and Hışıl, 2010). In this study, the least flush volume (5%) was used to decrease the volume of water extract because water extracts were adjusted to 25 mL and then, subcritical water extracts were stored at -20°C. The extraction procedure was carried out two times.

Determination of antioxidant activities

The Ferric Reducing Antioxidant Assay (FRAP) was carried according to the method of Benzie and Starin (1999). FRAP reagent was prepared by mixing 25 mL of 300 mM acetate buffer (pH 3.6) with 2.5 mL of 10 mM 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (tptz) solution in 0.5 mL of HCl (40 mM) and 2.5 mL of 20 mM iron (III) chloride hexahydrate solution. 3 mL FRAP reagent was mixed with 100 µL of sample extract and incubated at 37°C for 4 min. Absorbance of the solutions was measured by a Shimadzu UV-VIS 1800 spectrophotometer at 595 nm against a reagent blank containing distilled water. Trolox was used a positive control to construct a reference curve (62.5-1000 µM). FRAP values were expressed as µmol iron (II) sulfate heptahydrate equivalent of g.

The scavenging activity of DPPH radical was determined using the method of Molyneux (2004). 1.5 mL of the sample extract was mixed with 1.5 mL of DPPH (0.1 mM in methanol),

vortexed and incubated at room temperature in the dark for 50 min. Absorbance of the solutions was measured by spectrophotometer at 517 nm. Besides, the control solution without sample extract was used. The results were expressed as IC₅₀ (mg/mL), which was calculated from the curves by plotting absorbance values. IC₅₀ values represent the concentration of the extract (mg/mL) required to inhibit 50% of the radicals.

The Cupric Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC) was determined according to the method of Apak et al. (2004). 1 mL of Copper(II) chloride solution (1.0×10^{-2} M), 1 mL of ethanolic neocuproine solution (7.5×10^{-3} M) and 1 mL of ammonium acetate (1M, pH 7.0) were mixed in a test tube. The sample extract with different concentrations was added to the initial mixture. The tubes were stoppered and the absorbance of the solutions was measured by spectrophotometer at 450 nm against a reagent blank after 30 min. The result was calculated using the molar absorption coefficient (ϵ ; 1.7×10^4 L.mol⁻¹.cm⁻¹) against trolox, which was the standard reference compound. The result was expressed as mM Trolox/100 g.

Determination of total phenolic and total flavonoid content

Total phenolic content of subcritical water and solvent extracts was assayed as described by Skerget et al. (2005). 0.5 mL of extract was mixed with 2.5 mL of 0.2 N Folin-Ciocalteu reagent and 2 mL of 7.5% sodium carbonate and then the solution was incubated at 50°C for 5 min in the (Memmert, WNB 14) and cooled immediately. The absorbance was measured by spectrophotometer at 760 nm. The calibration curve was prepared with ferrulic acid solutions at five concentrations of aqueous methanol (80%). The results were expressed as ferrulic acid equivalent (mg of ferrulic acid per L of extract).

Total flavonoid content of subcritical water and solvent extracts was analysed by a spectrophotometric method by Chang et al. (2006). 0.5 mL of extract was mixed with 2.5 mL of distilled water and 150 µL of 5% sodium nitrite solution. The vortexed solution was allowed to stand for 5 min and then 300 µL of 10% aluminium chloride solution was

added to the mixture and allowed to stand for 5 min. Lastly, 1 mL of 1 M sodium hydroxide was added and 450 µL distilled water was added and final solution was vortexed at medium speed. The absorbance was measured by spectrophotometer at 510 nm. The calibration curve was prepared with luteolin solutions at five concentrations aqueous methanol (80%). The results were expressed as luteolin equivalent (mg of luteolin per L of extract).

Statistical analysis

One-way analysis of variance, least significant difference (LSD) for extraction temperature and t-test for static extraction time and also univariate analysis of variance for the temperature effect, time effect and temperature-time interaction was applied at significance level 0.05 using SPSS statistical package whereas, Pearson's correlation coefficients were at significance level 0.01. All the analyses were performed in triplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

Antioxidant activities are generally related with phenolic compounds in plants due to their redox properties, which help them to act as hydrogen donors, singlet oxygen quenchers and reducing agents (Chang et al., 2001). For IC₅₀ test, there is a negative correlation between IC₅₀ value and antioxidant activity so, the lowest IC₅₀ value was the highest antioxidant activity. Also, IC₅₀ value of subcritical water extracts from orange peel was compared with IC₅₀ value of trolox in this study. Besides, ferric reducing antioxidant power (FRAP) and the cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) were measured to evaluate the antioxidant activity of subcritical water extracts from orange peel.

In the present study, the effect of extraction temperature and static extraction time on antioxidant activities, total phenolic content and total flavonoid content of subcritical water extracts from orange peel were determined statistically significant ($P < 0.05$) and also there was a statistically significant ($P < 0.05$) interaction between extraction temperature and static extraction time in subcritical water extracts obtained from orange peel.

The correlation between antioxidant activities and total phenolic content in subcritical water extracts from orange peel

In this study, total phenolic content of subcritical water extracts from orange peel had statistically significant ($P < 0.01$) positive correlations as $r^2 = 0.98$ and 0.92 with FRAP and CUPRAC values (Table 1). In the literature, it was also reported that there was a strong correlation ($r^2 = 0.81$) between FRAP value and total phenolic content of orange peel (Lagha-Benamrouchea and Madania, 2013). Fu et al. (2011) also determined high correlation ($r^2 = 0.84$) between total phenolic content and FRAP value of 62 fruits. Ozgen et al. (2008) also reported statistically significant ($P < 0.05$) correlation as $r^2 = 0.93$ between total phenolic content and FRAP value of the eight pomegranate cultivars.

Table 1. The Pearson's correlation coefficients* in subcritical water extracts obtained from orange peel.

Trait	IC ₅₀	CUPRAC	TPC	TFC
IC ₅₀		-0.85*	-0.68*	-0.70*
FRAP	-0.78*	0.96*	0.98*	0.97*
CUPRAC			0.92*	0.93*
TPC				0.99*

* Correlation is significant at the $P < 0.01$ level

Besides, in this study, the negative correlation between total phenolic content and IC₅₀ value was determined statistically significant ($P < 0.01$) and the correlation coefficient was found as $r^2 = -0.68$ in subcritical water extracts from orange peel (Table 1). In the literature, Çam et al. (2009) also observed statistically significant ($P < 0.01$) negative correlation as $r^2 = -0.81$ between total phenolic content and EC₅₀ value of pomegranate juices. Besides, Tan et al. (2015) determined statistically significant ($P < 0.05$) negative correlation ($r^2 = -0.71$) between total phenolic content and DPPH radical in the different polar solvent extracts of *Magnolia officinalis* leaves. However, Lagha-Benamrouchea and Madania (2013) reported a strong negative correlation ($r^2 = -0.92$) between DPPH radical and total phenolic content of orange (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) peel. These results suggested that phenolic acids played a significant role in the antioxidant mechanism with the DPPH radical. In the literature, Wiboonsirikul et

al. (2007) also reported that the strong radical scavenging activity against the DPPH radical mainly resulted from the phenolic substances.

Besides, in this study, subcritical water extracts from orange peel at 180°C and 15 min had great attention due to its statistically ($P < 0.05$) highest IC_{50} value (Table 2 and Figure 1). Also, the statistically ($P < 0.05$) highest FRAP (76.29 $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$) and CUPRAC (102.39 mM troloks/g) value in subcritical water extracts from orange peel were found at 180°C and 15 min (Table 2, Figure 2 and 3). Subcritical water extracts from orange peel at 180°C and 15 min also had great attention due to its statistically ($P < 0.05$) highest total phenolic content (Table 2 and Figure 4). In the literature, it was reported that high extraction temperature decrease the surface tension of water to penetrate into the sample well and also improve the mass transfer of bioactive compounds from the sample to the water in the extraction cell during subcritical water extraction. Static extraction time was also reported an effective parameter which is related with the exposure between water and the sample during subcritical water extraction but, it is not as effective as extraction temperature (Çam and Hışıl, 2010; Özkaynak Kanmaz, 2014).

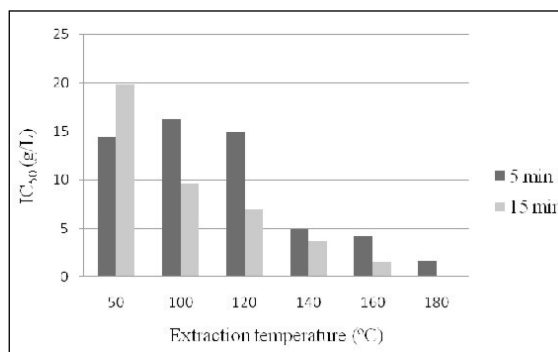


Figure 1. IC_{50} value of subcritical water extracts from orange peel.

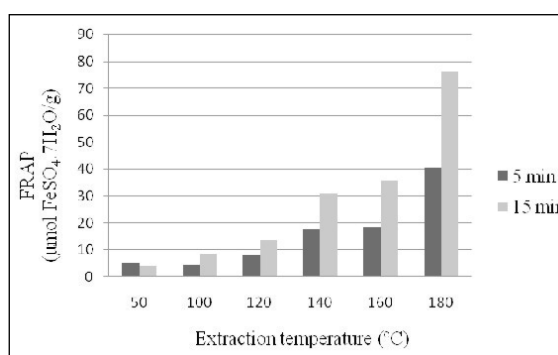


Figure 2. FRAP value of subcritical water extracts from orange peel.

Table 2. Antioxidant activity and phenolic content of subcritical water extracts from orange peel.

Extraction temperature (°C)	Extraction time (min)	IC_{50} (g/L)	FRAP* (μmol FeSO ₄ ·7H ₂ O/g)	CUPRAC# (mM troloks/g)	TPC (g/L)	TFC (g/L)
50	5	14.44±0.00 ^b	5.25±0.19 ^d	6.37±0.09 ^d	1.36±0.04 ^o	0.71±0.04 ^e
100		16.25±0.22 ^a	4.58±0.24 ^d	6.16±0.28 ^d	1.28±0.06 ^o	0.64±0.06 ^f
120		14.93±1.28 ^b	8.04±0.12 ^c	14.67±0.88 ^e	1.93±0.08 ^d	0.80±0.06 ^d
140		4.93±0.15 ^c	17.86±0.45 ^b	31.61±0.48 ^b	4.17±0.32 ^b	1.17±0.06 ^b
160		4.22±0.41 ^c	18.48±0.68 ^b	35.07±0.36 ^b	3.59±0.12 ^c	0.92±0.07 ^c
180		1.70±0.19 ^d	40.72±1.26 ^a	85.14±4.79 ^a	11.96±1.09 ^a	2.87±0.19 ^a
50	15	19.82±0.57 ^a	4.10±0.39 ^f	4.51±0.06 ^f	0.99±0.05 ^f	0.62±0.00 ^e
100		9.64±0.36 ^b	8.38±0.49 ^e	9.85±0.28 ^e	2.32±0.07 ^o	0.88±0.06 ^d
120		6.94±0.25 ^c	13.62±0.23 ^d	21.83±1.07 ^d	2.64±0.12 ^d	0.89±0.06 ^d
140		3.72±0.04 ^d	30.87±1.24 ^c	48.68±1.91 ^c	5.57±0.46 ^c	1.37±0.09 ^c
160		1.55±0.05 ^e	35.64±1.30 ^b	68.31±3.85 ^b	10.07±0.58 ^b	2.81±0.22 ^b
180		0.20±0.01 ^f	76.29±0.03 ^a	102.39±1.63 ^a	26.26±2.23 ^a	5.13±0.30 ^a
Trolox		0.06±0.00				

Values are means±standard deviations of three (n=3) measurements

^{a-f} Values with different superscript letters within a column are significantly different at $P < 0.05$

*: $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$

#: mM troloks/g

TPC: Total phenolic content

TFC: Total flavonoid content

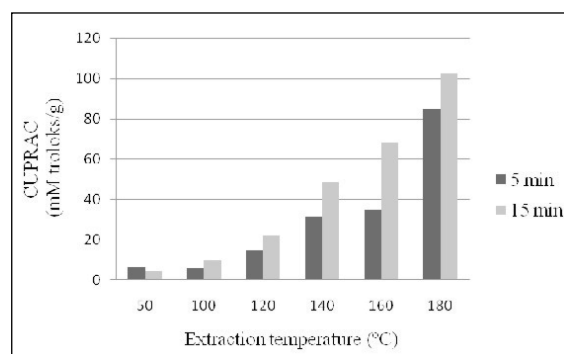


Figure 3. CUPRAC value of subcritical water extracts from orange peel.

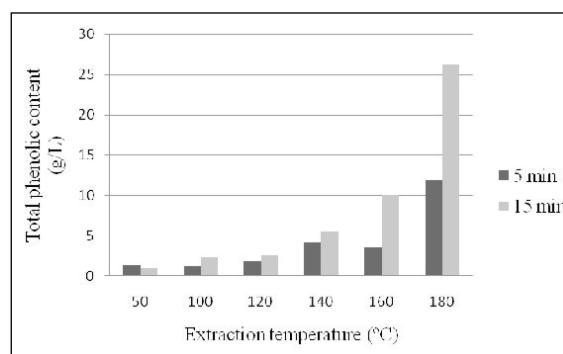


Figure 4. Total phenolic content of subcritical water extracts from orange peel.

Özkaynak Kanmaz and Ova (2013) also reported that SDG lignan content of subcritical water extracts from flaxseed meal increased 15.6 times as extraction temperature increased from 120 to 180°C. Besides, Duba et al. (2015) found that total polyphenols of subcritical water extracts from grape skin (from 44.3 to 77 mg/g) and defatted seeds (44 to 124 mg/g) significantly increased as the extraction temperature increased from 80 to 120°C. Yu et al. (3) also reported that total phenolic content of subcritical water extracts of olive fruit dreg increased as extraction temperature increased remarkably from 100 to 160°C.

The correlation between antioxidant activities and total flavonoid content in subcritical water extracts from orange peel

In this study, total flavonoid content of subcritical water extracts from orange peel had statistically significant ($P < 0.01$) positive correlations as $r^2 = 0.97$ and 0.93 with FRAP and CUPRAC values (Table 1). These results suggested that flavonoids played a major role in the antioxidant mechanism with FRAP and CUPRAC test. Also, the negative correlation between total flavonoid content and IC_{50} value in subcritical water extracts from orange peel was statistically significant ($P < 0.01$) and the correlation coefficient was found as $r^2 = -0.70$ in subcritical water extracts from orange peel (Table 1). In the literature, Tan et al. (2015) also determined a statistically significant ($P < 0.05$) negative correlation as $r^2 = -0.80$ between total flavonoid content and DPPH radical in the different polar solvent extracts of *Magnolia officinalis* leaves. These results suggested that flavonoids also played a significant role in the

antioxidant mechanism with DPPH radical. Also, melanoidins could played a significant role in the antioxidant mechanism with DPPH radical because melanoidins were occurred during Maillard reaction at high extraction temperatures. In this study, the colour of water extracts from orange peel turned to dark brown at high extraction temperatures and long static extraction times during subcritical water extraction (Figure 5). In the literature, it was also reported that melanoidins showed high correlation with DPPH radical (Delgado-Andrade et al., 2005). Manzocco et al. (2001) also reported that antioxidant activity increased with the increasing heating time during the Maillard reaction. However, to better understand the benefits of melanoidins, these compounds need to be chemically characterised and the in vivo biological effects of these compounds should be investigated.

Besides, IC_{50} value of subcritical water extracts from orange peel decreased 2.5 times (from 4.22 to 1.70 g/L) and 7.8 times (from 1.55 to 0.20 g/L) as extraction temperature increased from 160 to 180°C for 5 and 15 min, respectively (Table 2 and Figure 1). Besides, CUPRAC and FRAP value of subcritical water extracts from orange peel increased 2.43 and 2.20 times as extraction temperature increased from 160 to 180°C for 5 min. Also, CUPRAC and FRAP value of subcritical water extracts increased 1.5 and 2.1 times as extraction temperature increased from 160 to 180°C for 15 min (Table 2, Figure 2 and 3). Total flavonoid content of subcritical water extracts from orange peel increased 3.1 times (from 0.92 to 2.87 g luteolin equivalent/L) and 1.8 times (from 2.81 to 5.13 g luteolin equivalent/L) as extraction temperature increased from 160 to 180°C for 5 and 15 min, respectively in this study

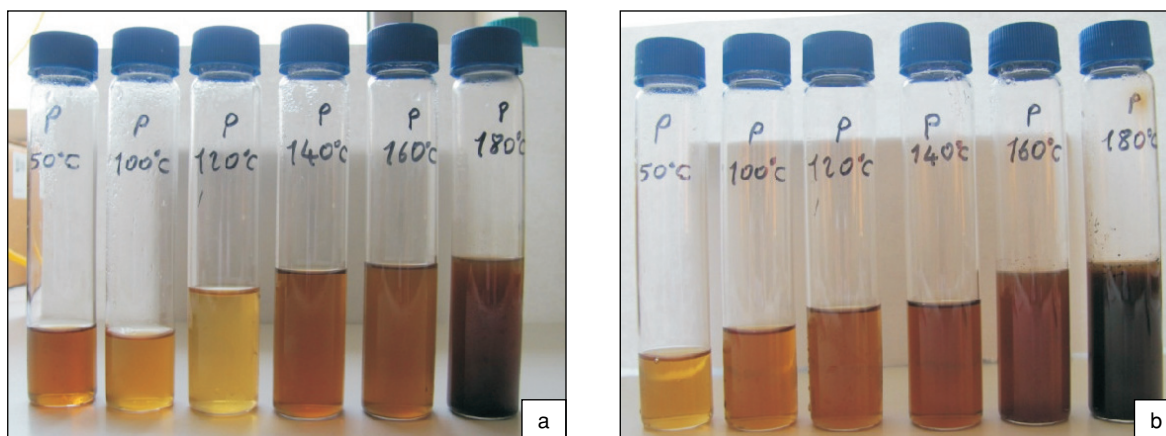


Figure 5. Subcritical water extracts from orange peel at different extraction temperatures for 5 (a) and 15 (b) min by accelerated solvent extractor, respectively.

(Table 2 and Figure 6). Subcritical water extracts from orange peel at 180°C and 15 min also had great attention due to its highest total flavonoid content (5.13 g luteolin equivalent/L). The statistically ($P < 0.05$) second highest total flavonoid content (2.87 g luteolin equivalent/L) was found at 180°C for 5 min in this study. These results might be explained with decreasing of water polarity and dielectric constant as extraction temperature increased up to 180°C during subcritical water extraction. High extraction temperatures decrease the hydrogen bonding strength and also polarity of the water so selection of the extraction parameters is too important for the extraction of polyphenols (Duba et al., 2015). In the literature, it was also reported that the molecule structure of compounds in the material had an important effect on the extraction yield and flavonoids with OH side chain were highly extracted at lower temperatures than O-CH₃ side chains during subcritical water extraction (Ko et al., 2014).

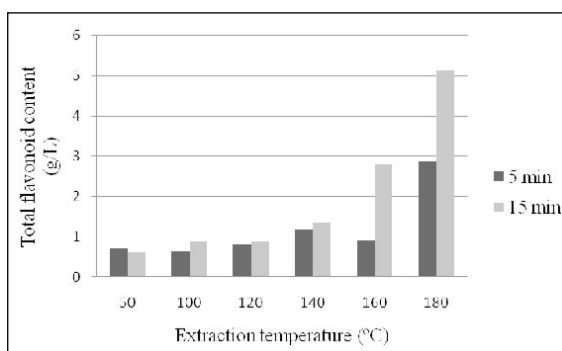


Figure 6. Total flavonoid content of subcritical water extracts from orange peel.

Ko et al. (2014) studied with subcritical water extraction of flavonoids from different materials using accelerated solvent extractor and the highest extracts were obtained for quercetin at 170°C/10 min (from onion skins), kaempferol and luteolin at 190°C/15 min (from carrots), naringin at 170°C/10 min and naringenin at 170-190°C/15 min (from grapefruit peels), hesperidin at 170°C/10 min (from orange peels) and also hesperetin at 190°C/10 min (from lemon peels). Furtherly, in this study, it was reported that the glycoside forms including sugar were highly extracted at lower temperatures than that of less polar aglycones and also, flavonoids with double bonds were highly extracted at higher temperatures during subcritical water extraction (Ko et al., 2014).

CONCLUSION

Phenolics and flavonoids played significantly higher role in the antioxidant mechanism with FRAP and CUPRAC value than IC₅₀ value in subcritical water extracts from orange peel. These results suggested that other antioxidant compounds such as β-caroten, essential oils and also melanoidins could played a major role in the antioxidant mechanism with DPPH radical. Subcritical water extracts obtained from orange peel could be alternative functional ingredients to produce functional water or functional drink in the food industry because of their high phenolic content and antioxidant activity.

ACKNOWLEDGEMENT

The author thanks "Food Safety and Agricultural Research Center" in Akdeniz University for the help to obtain subcritical water extracts from orange peel by accelerated solvent extractor, ASE 350.

REFERENCES

1. Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *J Agric Food Chem*, 52: 7970-7981. doi: 10.1021/jf048741x
2. Chainukool, S., Goto, M., Hannongbua, S., Shotipruk, A. (2014). Subcritical water extraction of resveratrol from barks of shorea roxburghii G. Don. *Separation Science Technol*, 49: 2073-2078. doi: 10.1080/01496395.2014.905595
3. Chang, C. H., Lin, H. Y., Chang, C. Y., Liu, Y. C. (2006). Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze dried and hot air dried tomatoes. *J Food Eng*, 77: 478-485. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2005.06.061
4. Chang, S. T., Wu, J. H., Wang, S. Y., Kang, P. L., Yang, N. S., Shyur, L. F. (2001). Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and hearthwood. *J Agric Food Chem*, 49, 3420-3424. doi: 10.1021/jf0100907
5. Benzie, J. F. F., Strain, J. J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Meth. Enzymology*, 299: 15-27. doi: 10.1016/S0076-6879(99)99005-5
6. Çam, M., Hışıl, Y. (2010). Pressurized water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chem*, 123: 878-885. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.05.011
7. Çam, M., Hışıl, Y., Durmaz, G. (2009). Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chem*, 112: 721-726. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.06.009
8. Delgado-Andrade, C., Rufián-Henares, J. A., Morales, F. J. (2005). Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. *J Agric Food Chem*, 53 (20): 7832-7836. doi: 10.1021/jf0512353
9. Duba, K. S., Casazza, A. A., Mohamed, H. B., Perego, P., Fiori, L. (2015). Extraction of polyphenols from grape skins and defatted grape seeds using subcritical water: Experiments and modeling. *Food Bioproducts Process*, 94: 29-38. doi: 10.1016/j.fbp.2015.01.001
10. Fu, L., Xu, B. T., Xu, X. R., Gan, R. Y., Zhang, Y., Xia, E. Q., Li, H. B. (2011). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chem*, 129: 345-350. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.04.079
11. Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 45: 287-306. doi: 10.1080/1040869059096
12. Ko, M. J., Cheigh, C. I., Cho, S. W., Chung, M. S. (2011). Subcritical water extraction of flavonol quercetin from onion skin. *J Food Eng*, 102: 327-333. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2010.09.008
13. Ko, M. J., Cheigh, C. I., Chung, M. S. (2014). Relationship analysis between flavonoids structure and subcritical water extraction (SWE). *Food Chem*, 143: 147-155. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.07.104
14. Kodama, S., Shoda, T., Machmudah, S., Wahyudiono, K. H., Goto, M. (2016). Extraction of β -glucan by hydrothermal liquidization of barley grain in a semi-batch reactor. *Separation Sci Technol*, 51 (2): 278-289. doi: 10.1080/01496395.2015.1086377
15. Lagha-Benamrouchea, S., Madania, K. (2013). Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Ind Crops Products*, 50: 723-730. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.07.048
16. Lee, K. A., Kim, K. T., Kim, H. J., Chung, M. S., Chang, P. S., Park, H., Paik, H. D. (2014). Antioxidant activities of onion (*Allium cepa* L.) peel extracts produced by ethanol, hot water, and subcritical water extraction. *Food Sci Biotechnol*, 23(2): 615-621. doi: 10.1007/s10068-014-0084-6

17. Manthley, J. A., Grohman, K. (2001). Phenols in Citrus Peel Byproducts. Concentrations of Hydroxycinnamates and Polymethoxylated Flavones in Citrus Peel Molasses. *J Agric Food Chem*, 49 (7), 3268-3273. doi: 10.1021/jf010011r
18. Manzocco, L., Calligaris, S., Mastrocola, D., Nicoli, M. C., Lerici, C. R. (2001). Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends Food Sci Technol*, 11: 340-346. doi: 10.1016/S0924-2244(01)00014-0
19. Molyneux. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J Sci Technol*, 26: 211-219.
20. Ozgen, M., Durgaç, C., Serçe, S., Kaya, C. (2008). Chemical and antioxidant properties of pomegranate cultivars grown in the Mediterranean region of Turkey. *Food Chem*, 111: 703-706. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.04.043
21. Özkaynak Kanmaz, E. (2014). Subcritical water extraction of phenolic compounds from flaxseed meal sticks using accelerated solvent extractor (ASE). *Eur Food Res Technol*, 238: 85-91. doi: 10.1007/s00217-013-2088-5
22. Özkaynak Kanmaz, E., Ova, G. (2013). The effective parameters for subcritical water extraction of SDG lignan from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) using accelerated solvent extractor. *Eur Food Res Technol*, 237(2): 159-166. doi: 10.1007/s00217-013-1974-1
23. Sawalha, S. M. S., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2009). Quantification of main phenolic compounds in sweet and bitter orange peel. *Food Chem*, 116: 567-574. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.03.003
24. Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, A. R., Simoncic, M., Knez, Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem*, 89: 191-198. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.02.025
25. Tan, L. T., Zhang, D., Yu, B., Zhao, S. P., Cao, W. G. (2015). Antioxidant activity of the different polar solvent extracts of *Magnolia officinalis* leaves and purification of main active compounds. *Eur Food Res Technol*, 240: 815-822. doi: 10.1007/s00217-014-2387-5
26. Vergara-Salinas, J. R., Vergara, M., Altamirano, C., Gonzalez, A., Correa, J. R. (2015). Characterization of pressurized hot water extracts of grape pomace: chemical and biological antioxidant activity. *Food Chem*, 171: 62-69. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.08.094
27. Wiboonsirikul, J., Kimura, Y., Kadota, M., Tsuno, T., Adachi, S. (2007). Properties of extracts from defatted rice bran by its subcritical water treatment. *J Agric Food Chem*, (55): 8759-8765. doi: 10.1021/jf072041l
28. Yu, X. M., Zhu, P., Zhong, Q. P., Li, M. Y., Ma, H. R. (2015). Subcritical water extraction of antioxidant phenolic compounds from XiLan olive fruit dreg. *J Food Sci Technol*, 52(8): 5012-5020. doi: 10.1007/s13197-014-1551-z



DETERMINATION OF SOME PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF WHITE, GREEN AND BLACK TEAS (*CAMELLIA SINENSIS*)

Derya Atalay*, Hande Selen Erge

Abant İzzet Baysal University, Faculty of Engineering and Architecture,
Food Engineering Department, Campus of Gölköy Bolu-Turkey

Geliş / Received: 22.02.2017; Kabul / Accepted: 26.04.2017; Online baskı / Published online: 14.06.2017

Atalay, D., Erge, H.S. (2017). Determination of some physical and chemical properties of white, green and black teas (*Camellia sinensis*). *GIDA* (2017) 42 (5): 494-504 doi: 10.15237/gida.GD17024

Abstract

Tea is an evergreen plant that enjoys rainy and warm climates, and classified in the *Theaceae* family. Tea, which is one of the most widely consumed beverages in the world, receives interest due to the flavor and aroma besides beneficial health effects. It is categorized into three major types; not fermented (green and white tea), partially fermented (oolong tea) and fermented (black tea). The objective of this study is to determine physical properties (water activity and color) and chemical properties (antioxidant activity, content of ash, total phenolics, total flavonoids, caffeine and some phenolic compounds) of white, green and black teas. Green tea stands out in terms of bioactive compounds compared to white and black tea. The reason can be explained by nonoxidation of phenolic compounds because of steam treatment to rolled leaves during the production of green tea.

Keywords: Green tea, white tea, black tea, antioxidant activity, phenolic compounds

BEYAZ, YEŞİL VE SİYAH ÇAYLARIN (*CAMELLIA SINENSIS*) BAZI FİZİKSEL VE KİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Öz

Çay; her zaman yeşil olan, yağmurlu ve ılık iklimleri seven *Theaceae* familyasında bulunan bir bitkidir. Dünya'da en yaygın tüketilen içeceklerden biri olan çay, sağlık üzerine pozitif etkisinin yanında lezzet ve aromasından dolayı ilgi çekmektedir. Çay; fermente olmayan (yeşil ve beyaz), kısmen fermente olan (oolong) ve fermantasyona uğrayan çay (siyah) olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır. Bu çalışmadaki amaç; beyaz, yeşil ve siyah çayda su aktivitesi ve renk gibi fiziksel; kül, toplam fenolik, toplam flavonoid madde miktarı, antioksidan aktivite ile kafein ve bazı fenolik bileşik içeriği gibi kimyasal özelliklerin belirlenmesidir. Yeşil çay, beyaz ve siyah çaya göre biyoaktif bileşenler açısından ön plana çıkmaktadır. Bunun sebebi ise yeşil çay üretiminde kıvrılan yapraklara buhar uygulaması nedeniyle fenolik bileşiklerin okside olmaması şeklinde açıklanmaktadır.

Anahtar kelimeler: Yeşil çay, beyaz çay, siyah çay, antioksidan aktivite, fenolik bileşikler

* Corresponding author / Yazışmalarda sorumlu yazar

✉ deryaatalay@ibu.edu.tr,

☎ (+90) 374 254 10 00/ 4845,

☎ (+90) 374 253 45 58

INTRODUCTION

The tea shrub, classified in the Theaceae family and having mainly of two varieties *Camellia sinensis* var. *sinensis* and *Camellia sinensis* var. *assamica*, is a perennial, evergreen plant, leafy crop that enjoys warm and humid climates (Caffin et al. 2004; Çelik, 2006; Carloni et al. 2013). The major tea producers are Southeast Asia including China, India, Japan, Taiwan, Sri Lanka, and Indonesia and in central African countries (Lin et al. 2003; Mehra and Baker 2007). Tea cultivation in Turkey is carried out in the Eastern Black Sea Region, from the border of Georgia to Fatsa in the west (Sari, 2010). According to Food and Agricultural Organization (FAO) in the year of 2014 data, production of tea is 5561339 tonnes in the world and 226800 tonnes in Turkey (FAOSTAT, 2017).

Freshly, plucked leaves are processed to obtain different tea products. Tea is the second most widely drink in the world after water. The reasons for popularity of tea are known as unique aroma and flavor besides, its positive health benefits like antioxidant, cholesterol lowering, anti-inflammatory, reducing risk of cancer and obesity, anti-mutagenic, antibacterial, preventive of cardiovascular diseases, antidiabetic and anti-ager (McKay et al. 2002; Çelik, 2006; Sharangi, 2009; Unachukwu et al. 2010; Kim et al. 2011; Carloni et al. 2013).

There are three types of tea according to the level of fermentation. It can be categorized into not fermented (green and white tea), semi fermented (oolong tea) and fermented (black tea) (Fig. 1) (Horzic et al. 2009; Namita et al. 2012; Carloni et al. 2013; Dias et al. 2013). To produce green tea, the young leaves are rolled and steamed to

minimize oxidation and inactivate polyphenol oxidase before drying. In the production of black tea, leaves are rolled, and phenolic compounds begin to contact with polyphenol oxidase after cellular compartmentation. The *C. sinensis* leaves undergo oxidation for 90-120 min before drying. Desired colour and aroma are obtained as a result of oxidation of catechins to theaflavins (Del Rio et al. 2004; Rusak et al. 2008; Dias et al. 2013). White tea is prepared from very young tea leaves or buds covered with tiny, silvery hairs. The buds are preserved from sunlight during growth to decrease the formation of chlorophyll, for white appearance of young leaves. White tea is steamed and dried at once (Rusak et al. 2008; Dias et al. 2013).

Green tea is known 'non-fermented' tea and contains more catechins (20-30 % of the dry weight) than black tea or oolong tea (Wang et al. 2000; Kodama et al. 2010; Namita et al. 2012). Besides catechins in green tea have strong antioxidant activities *in vitro* and *in vivo* conditions, the contents of certain vitamins (vitamin C) and minerals (Cr, Mn, Se and Zn) of green tea also increase the antioxidant activity (Cabrera et al. 2006; Namita et al. 2012). White tea is becoming an increasingly common consumed beverage because of having a characteristic taste and a wide range of health benefits such as antioxidant, antimicrobial and anticancer effects. Its lipolytic activity and ability to inhibit adipogenesis have received particular attention especially by obesity patients (Unachukwu et al. 2010; Damiani et al. 2014). Due to possible beneficial health effects, white tea is being searched in recent years (Dias et al. 2013).

Tea is stated to contain nearly 4000 bioactive compounds of mostly polyphenols. These

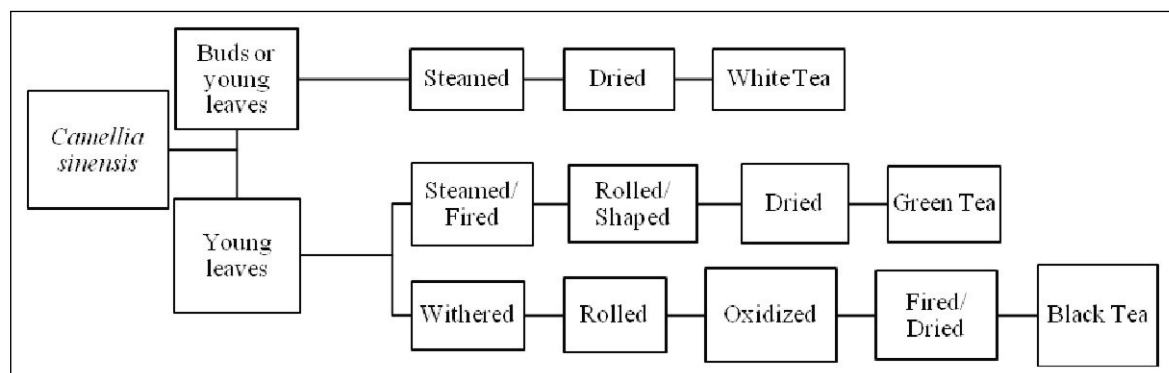


Figure 1. Schematic representation of tea production (Dias et al. 2013)

compounds are alkaloids (caffeine and theobromine), polyphenols, amino acids, proteins, chlorophylls, carbohydrates, volatile organic compounds, fluoride, aluminum, minerals and trace elements (McKay et al. 2002; Çelik, 2006; Mahmood et al. 2010; Namita et al. 2012). Primary compounds belonging to tea polyphenols are gallic acid, catechin, gallic acid, catechin, epicatechin, epigallocatechin, epicatechin gallate and epigallocatechin gallate (Fig. 2) (Poon, 1998; Zuo et al. 2002; Rusak et al. 2008; Horzic et al. 2009; Jeszka-Skowron et al. 2015).

It has been reported that the amount of polyphenols in tea varies depending on the variety, soil and climatic conditions, the period of shoot, the age of the plant and the processes applied during the production (Hanay, 2011). During the fermentation of *C. sinensis* leaves, monomeric flavan-3-ols (catechin and derivatives) expose oxidative polymerisation converting into theaflavins as exhibited in Fig. 3 (Haslam, 2003; Kim et al. 2011). For example, the amount of monoterpene alcohols increases with the decrease in the amount of catechin during black tea production. The

changes in catechins provide the characteristic flavor, color and aroma of each type of tea (Hanay, 2011).

It is known that tea polyphenols (catechins) have strong antioxidant activity, antimutagenic and anticarcinogenic effects. Among catechins, (-)-epigallocatechin gallate has the highest antioxidant activity; this is followed by (-)-epicatechingallate, (-)-epigallocatechin, (-)-epicatechin and (+)-catechin respectively (Gramza and Korczak, 2005; Hanay, 2011).

Caffeine, member of methylxanthines, which comprise theobromine (3,7-dimethylxanthine), paraxanthine (1,7-dimethylxanthine) and methyluric acids, is known as purine alkaloids and found in tea and coffee. It is reported that caffeine reduces fatigue and improves performance. However, it is also stated that excessive intake of caffeine may cause negative effects such as involuntary contraction of the muscles, coma, failure of respiration and heart, headache and migraine (Ashihara and Crozier, 2001; Khanchi et al. 2007; Smith, 2002; Wanyika et al. 2010).

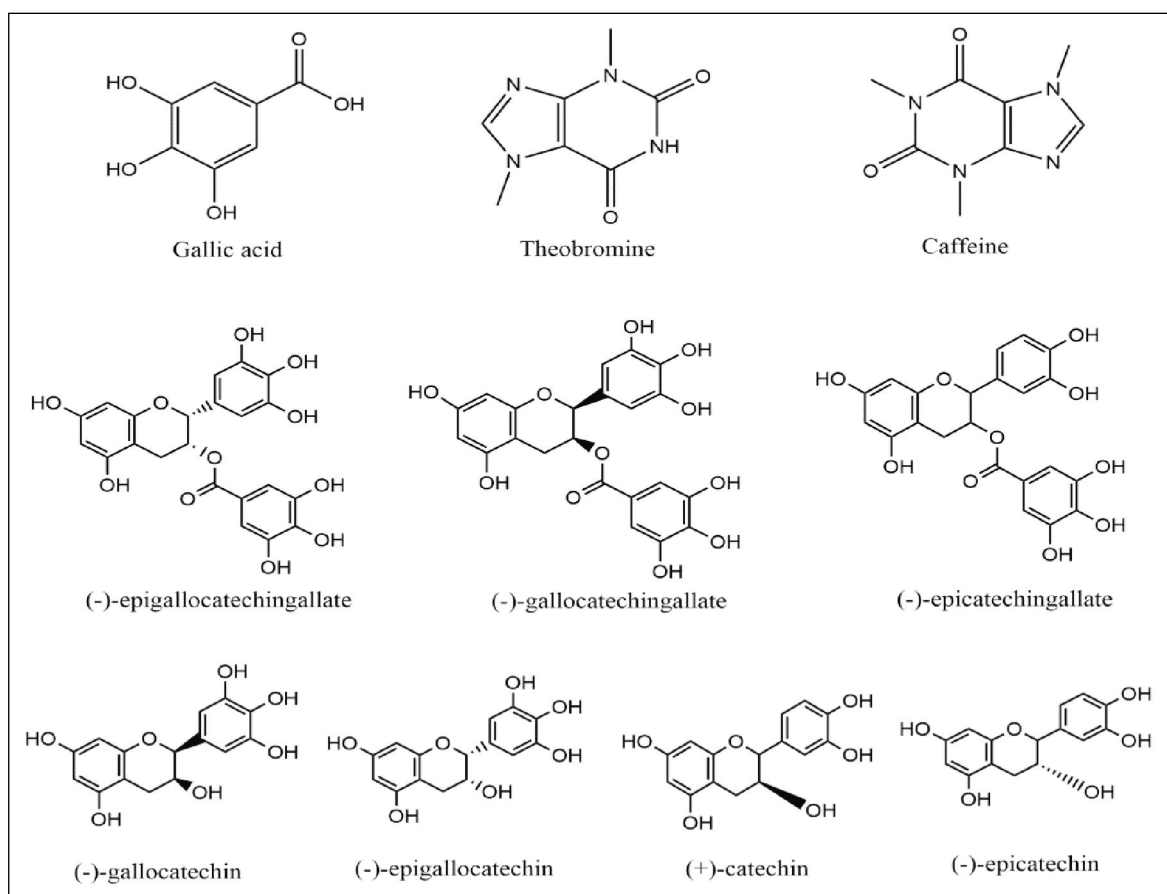


Figure 2. Molecule structure of the main components in tea (Yi et al. 2015)

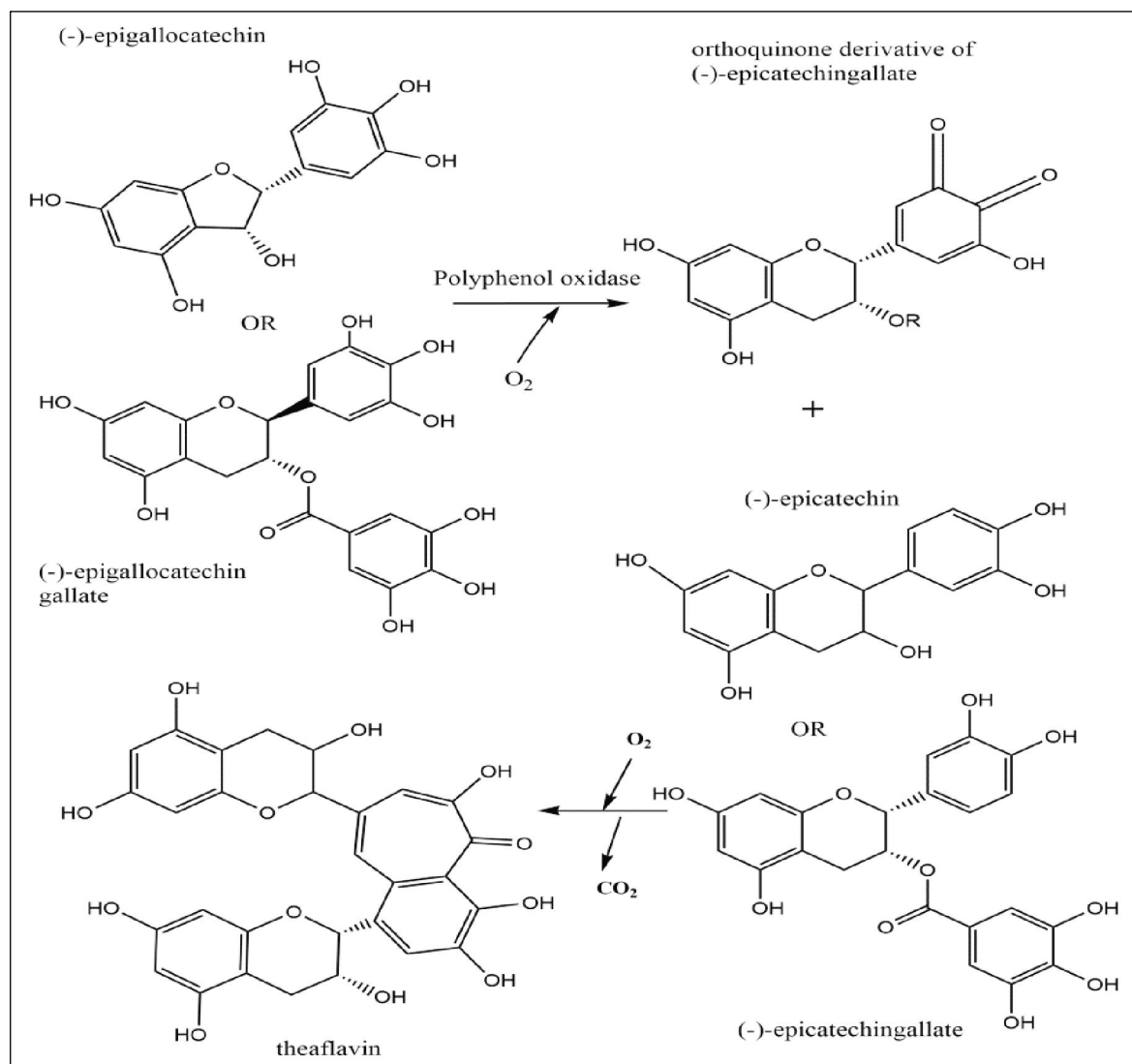


Figure 3. Oxidation of catechins to theaflavin (Kim et al. 2011)

In this study, total phenolics and total flavonoids, ash and moisture content, antioxidant activity, color, water activity, caffeine and some phenolic compounds of 1st and 2nd genus black tea, green and white tea obtained from Rize were determined.

MATERIALS AND METHODS

Materials

White, green and black teas (1st and 2nd genus) (*Camellia sinensis*) were provided from a private company in Rize, Turkey. These teas were purchased in dried form and ready to consumption. Analysis of ash and moisture content, water activity and color were carried out. Extraction method mentioned below was applied for

spectrophotometric and chromatographic analyses. Content of caffeine, gallic acid, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechingallate, (-)-epicatechingallate and (-)-gallocatechin of teas were determined with HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Extraction and analyses were performed with two replicates.

Methods

Moisture Analysis, Water Activity and Ash Content

AOAC (1990) and AOAC (2000) methods were used determination of moisture and ash contents of samples, respectively. The water activities of the teas were detected using a water activity meter Aqualab 3TE (Decagon, Pullman, USA).

Color

The color characteristics of white, green and black teas were measured using CIE L*a*b* with Minolta CR-400 (Osaka, Japan). The instrument was calibrated using a white tile and the samples analyzed in triplicate. In this method; L*, a*, b*, C* (Chroma) and h (hue angle) parameters indicate lightness, redness-greenness, yellowness-blueness, color saturation and color tone, respectively (Bakker et al. 1986).

Extraction

The tea samples were extracted according to the method of Yi et al. (2015) for the determination of total phenolics and total flavonoids content, antioxidant activity, caffeine and some phenolic compounds. For each tea samples, 0.5 g was accurately weighted and transferred into a 50 mL conical flask. The tea sample was extracted with 30 mL of distilled water at the temperature of 100 °C for 10 min. After filtration the operations were repeated two times for residue. Obtained filtrates were combined and brought in a 100 mL volumetric flask with distilled water. The extracts were stored at - 18 °C until analysis.

Analysis of Total Phenolics Content

The content of total phenolics was detected by using a modified Folin-Ciocalteu colorimetric method (Shahidi et al. 2001). Firstly, 0.5 mL of the tea extract was mixed with 7 mL of distilled water in a test tube followed by the addition of 0.5 mL of Folin–Ciocalteu and standed for 3 min. Then, 2 mL of sodium carbonate (20 %) was added and mixed well again. Absorbance of the resultant solution was read at 720 nm using a UV/Vis spectrophotometer (UV 1800, Shimadzu, Japan) after 1 h standing in an incubator (Mettler, Germany) at 25 °C. The results were expressed in gallic acid equivalents (mg/g) using a gallic acid (50-150 mg/L) standard curve.

Analysis of Total Flavonoid Content

The content of total flavonoid of samples was determined according to the method recommended by Karadeniz et al. (2005). One milliliter of tea extract was placed in a 10 mL volumetric flask, and 5 mL of distilled water and 0.3 mL of 5 % sodium nitrite were added and mixed. Intervals

of five minutes, 0.6 mL of aluminum chloride hexahydrate (10 %) followed by 2 mL of sodium hydroxide (1 mol) were added and then the volume was made up to 10 mL with distilled water. The solution was mixed and the absorbance was measured immediately at 510 nm using UV/VIS spectrophotometer (UV 1800, Shimadzu, Japan). Flavonoid contents were calculated using a standard calibration curve (50-250 mg/L), prepared from (+) catechin.

Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) by the ABTS Decolorization Assay

The antioxidant activity was estimated by the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) method using UV/VIS spectrophotometer (Re et al. 1999). The principle of the method is based on the reduction of the ABTS*+ radical, which is a mixture of potassiumpersulphate and ABTS (2,2-azinobis (3- ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) solutions, at a specified time interval. The absence of ABTS*+ was determined by measuring the decrease of absorbance at 734 nm for 6 min. Results were analyzed by reference to the Trolox and expressed as micromolar Trolox equivalent antioxidant capacity (µM Trolox/g).

Analysis of DPPH Radical Scavenging Activity

The method is based on the reduction of the relatively stable radical, DPPH, to the formation of a non-radical form in the presence of hydrogen donating antioxidant (Zhang et al. 2013). The tea samples showed antioxidant activity by the reduction of purple colored DPPH to the yellow colored diphenylpicrylhydrazine derivatives. In the analysis, different concentrations of tea extracts (12.5 µL-175 µL) was mixed with 2 mL of 0.1 mmol/L solution of DPPH and kept 15 min in the dark at room temperature. The % inhibition values of the DPPH radical of the samples are calculated by comparison of the absorbance values (517 nm) read after 15 minutes. The sample concentration provided which 50% DPPH inhibition was calculated from the equation obtained after transferring the absorbance values to the graph for different sample concentrations.

$$\% \text{ Inhibition: } (1 - A_s/A_0) \times 100$$

A₀: the absorbance of the control

A_s: the absorbance of the tested sample after 15 min

Determination of Caffeine and Phenolic Compounds with HPLC

Phenolic compounds and caffeine were separated according to method described by Yi et al. (2015) with HPLC (Flexar, Perkin Elmer). Perkin Elmer C 18 column (5 μm , 250 x 4.6 mm i.d.) was operated at a temperature of 30 $^{\circ}\text{C}$, gradient elution system with a flow rate of 1 mL/min. Caffeine and phenolic compounds were detected at 250 nm using PDA (photodiode array) detector. Separations were carried out by varying the proportion of 0.1 % (v/v) formic acid in water (mobile phase A) and 0.1 % formic acid in acetonitrile (mobile phase B). The solvent gradient elution program was as follows: to 2 % B (v/v) in 1 min, to 30 % B at 30 min. The injection volume for all samples and standards was 20 μL .

Identification and Calculation of Caffeine and Phenolic Compounds

Phenolic compounds and caffeine in white, green and black tea are described by comparison the retention times of the peaks belonging to standards and also adding the standards to the samples. Retention times obtained from the applied HPLC conditions are gallic acid (8.9 min), (-)-gallocatechin (13.7 min), (-)-epigallocatechin (17.3 min), caffeine (18.7 min), (-)-epicatechin (21.7 min), (-)-epigallocatechingallate (22 min), (-)-epicatechingallate (26.9 min) (Fig. 4). The concentrations were calculated using the standard calibration curves (5-90 mg/L).

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed with SPSS for Windows (version 20.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois). Significant differences among samples were determined using Duncan (1955) multiple range test with a 5 % level of probability.

RESULTS AND DISCUSSION

In this study, content of ash, color and water activity, antioxidant activity, total phenolics, total flavonoids, caffeine and some phenolic compounds were detected in white, green and black teas and the results of the analyses are shown in Table 1.

It was determined that content of ash, which is indicative of mineral level in tea, changed between 4.868 - 5.3055 % and the variation was found insignificant ($P > 0.05$). According to the color values, higher L^* values (brightness) were found in white (40.75) and green teas (38.21) and was statistically significant ($P < 0.05$). Lower L^* values were present in 1st (31.45) and 2nd genus black teas (31.49) ($P < 0.05$). No significant variation was observed in water activity values and moisture content of white, green, 1st black and 2nd black teas.

The total phenolics and total flavonoids decreased following the sequence: green tea > white tea > 1st genus black tea > 2nd genus black tea (Table 1) ($P < 0.05$). However, it was determined that no statistical difference between 1st and 2nd genus black teas ($P > 0.05$). These results can be attributed

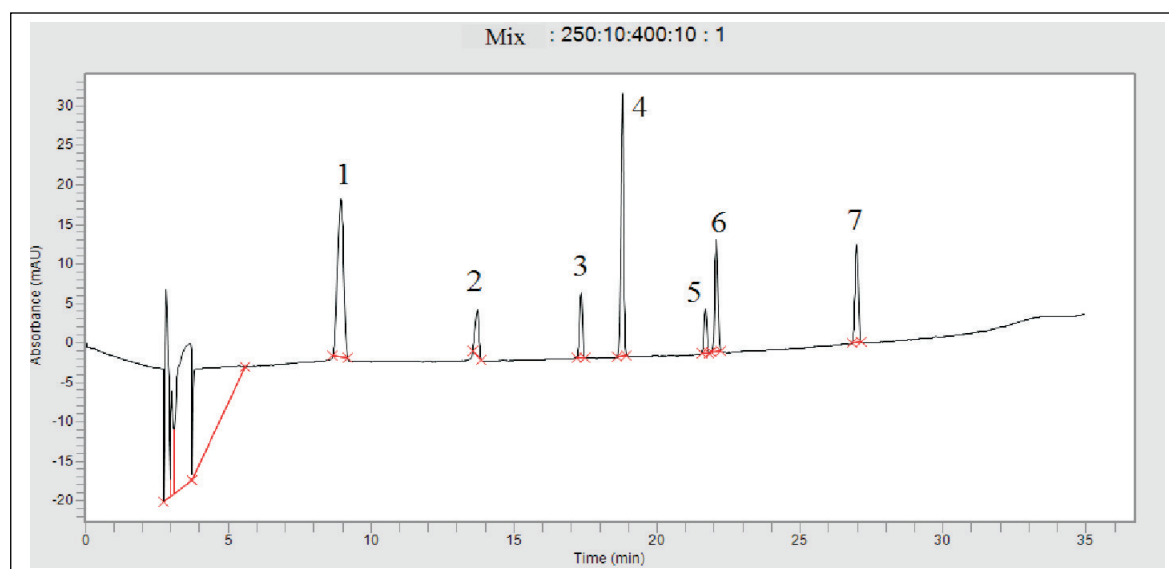


Figure 4. Chromatogram of standard mix (1: gallic acid; 2: gallocatechin; 3: epigallocatechin; 4: caffeine; 5: epicatechin; 6: epigallocatechingallate; 7: epicatechingallate)

to different processing methods for production of each type of tea. According to Kim et al. (2011), total phenolics content of teas (*C. sinensis*) reduced with gradually during tea fermentation process and was determined as 5975.81 mg/L in non-oxidized tea (0 % oxidation, green tea) and 3752.69 mg/L in oxidized tea (80 % oxidation, black tea).

In this study, the higher total phenolics and flavonoids in green tea compared to white tea can be attributed to slight oxidation of white tea polyphenols during processing. White tea is commonly known nonfermented tea but this is not completely true. It is reported that white teas do not undergo the inactivation of enzymes before withering, so enzymes remain active and white tea polyphenols are oxidized slowly (Carloni et al. 2013).

The richest antioxidant activity was found in green tea (9.7 µM TE/g); followed by white tea (8.45 µM TE/g), 1st genus black tea (4.35 µM TE/g) and 2nd genus black tea (2.75 µM TE/g) detected by ABTS decolorization assay ($P < 0.05$). Higher antioxidant activities of white (0.282 mg sample/mL EC₅₀) and green tea (0.073 mg sample/mL EC₅₀) were found significantly different than those of 1st (0.509 mg sample/mL EC₅₀) and 2nd genus black teas (0.497 mg sample/mL EC₅₀) according

to DPPH method ($P < 0.05$). EC₅₀ (Efficient Concentration) is defined as the amount of antioxidant necessary to decrease the initial DPPH concentration by % 50 (Brand-Williams et al. 1995). Therefore, lower EC₅₀ value indicates that higher antioxidant activity. Karori et al. (2007) reported black tea was at least; white tea possessed the highest antioxidant activity determined by DPPH method. The lower antioxidant activity of black tea compared to other teas is interpreted as the oxidation of catechin derivatives during production.

In a research by Carloni et al. (2013) comparing the antioxidant activity of white, green and black teas, using the ABTS, ORAC and LDL assays the following antioxidant activity was obtained: green > white > black. It is stated that green tea demonstrated greater content of total catechins than black tea and high catechins levels were positively correlated with antioxidant activity. Catechin contents of 1.94 mg/mL in green tea, 0.80 mg/mL in white tea and 0.24 mg/mL in black tea are reported.

Kim et al. (2011) stated that the antioxidant activities of teas are 71.08 µmol TE/mL in green tea and 57.18 µmol TE/mL in black tea, correlated with the total phenolics content.

Table 1. Physical and chemical properties of white, green and black teas

	White Tea	Green Tea	1 st Genus Black Tea	2 nd Genus Black Tea
Moisture Content (%)	5.0525±1.36	4.0500±0.37	4.1525±0.36	3.85±0.40
Ash Content (%)	5.1525±0.003	5.3055±0.77	4.868±0.085	5.018±0.35
Color				
L*	40.75±2.77 ^a	38.21±0.86 ^a	31.45±0.08 ^b	31.49±0.02 ^b
a*	-0.78±0.18 ^c	-1.12±0.08 ^c	1.99±0.02 ^a	1.43±0.16 ^b
b*	6.35±0.07 ^b	10.07±1.2 ^a	3.46±0.007 ^c	2.92±0.347 ^c
C*	6.40±0.04 ^b	10.13±1.2 ^a	3.99±0.06 ^c	2.75±0.33 ^c
h	96.35±2.27 ^a	96.25±0.33 ^a	60.10±0.45 ^c	64.13±0.30 ^b
Water Activity (a _w)	0.343±0.08	0.369±0.005	0.333±0.017	0.356±0.005
Total Phenolics Content (mg/g)	83.61±3.48 ^b	105.16±4.95 ^a	61.94±3.70 ^c	58.2±4.67 ^c
Total Flavonoids Content (mg/g)	15.32±1.12 ^b	20.56±0.46 ^a	10.99±1.39 ^c	8.6±1.35 ^c
Antioxidant Activity				
ABTS (µM TE/g)	8.45±0.11 ^b	9.7±0.03 ^a	4.35±0.05 ^c	2.75±0.12 ^d
DPPH (mg sample/mL EC ₅₀)	0.282±0.10 ^b	0.073±0.02 ^b	0.509±0.04 ^a	0.497±0.09 ^a
Individual Compounds (mg/g)				
Gallic acid	2.01±1.51	-	2.38±0.14	2.58±0.40
Gallocatechin	3.28±1.60 ^b	6.17±0.65 ^a	1.02±0.02 ^b	0.89±0.05 ^b
Epigallocatechin	2.31±0.36 ^b	39.44±0.90 ^a	3.33±0.66 ^b	2.48±0.22 ^b
Caffeine	35.83±3.89 ^a	17.37±0.27 ^b	22.34±0.88 ^b	22.21±1.92 ^b
Epicatechin	1.54±0.43 ^b	6.99±0.08 ^a	1.27±0.1 ^b	1.34±0.11 ^b
Epigallocatechingallate	19.58±7.06 ^b	44.71±1.13 ^a	3.96±0.07 ^c	3.86±0.13 ^c
Epicatechingallate	5.59±0.54 ^a	5.62±0.11 ^a	0.661±0.04 ^b	2.92±3.38 ^{ab}

Means within a row followed by different letters are significantly different among samples ($P < 0.05$). Values are mean ± SD of two measurements

In this study, antioxidant activity determined by ABTS decolorization assay was also found to be high correlated with total phenolics ($r=0.959$, $P < 0.05$) and total flavonoids ($r=0.965$, $P < 0.05$) contents of samples. These values for DPPH method among total phenolics and total flavonoids were obtained as 0.995 ($P < 0.05$) and 0.977 ($P < 0.05$), respectively.

In this research, individual phenolic compounds and caffeine content in white, green and black teas can be seen in Table 1. White tea showed significantly higher content of caffeine than that of the other samples ($P < 0.05$). The galocatechin (6.17 mg/g), epicatechin (6.99 mg/g), epigallocatechin

(39.44 mg/g) and epigallocatechingallate (44.71 mg/g) contents of green tea were found significantly higher compared with the other teas ($P < 0.05$). Epicatechingallate content of 1st genus black tea (0.661 mg/g) was found significantly different from white (5.59 mg/g) and green tea (5.62 mg/g), whereas it is obtained similar with 2nd genus black tea (2.92 mg/g) ($P < 0.05$). Gallic acid was not detected in green tea, on the other hand, the difference in gallic acid among the other samples was observed insignificant ($P > 0.05$). Chromatograms of white and green teas and 1st and 2nd genus black teas are shown in Fig. 5 and Fig. 6.

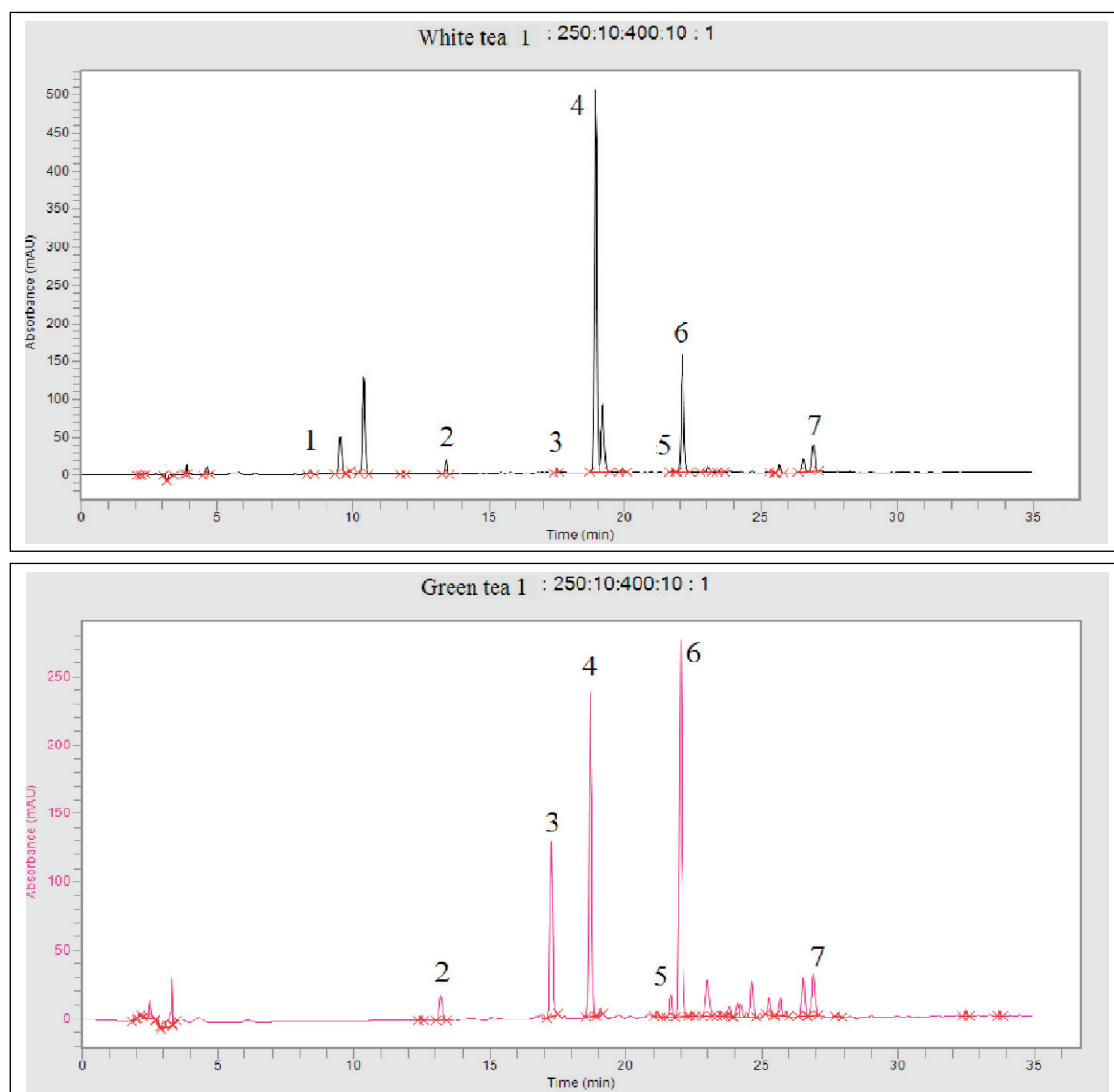


Figure 5. Chromatograms of white and green teas (1: gallic acid; 2: galocatechin; 3: epigallocatechin; 4: caffeine; 5: epicatechin; 6: epigallocatechingallate; 7: epicatechingallate)

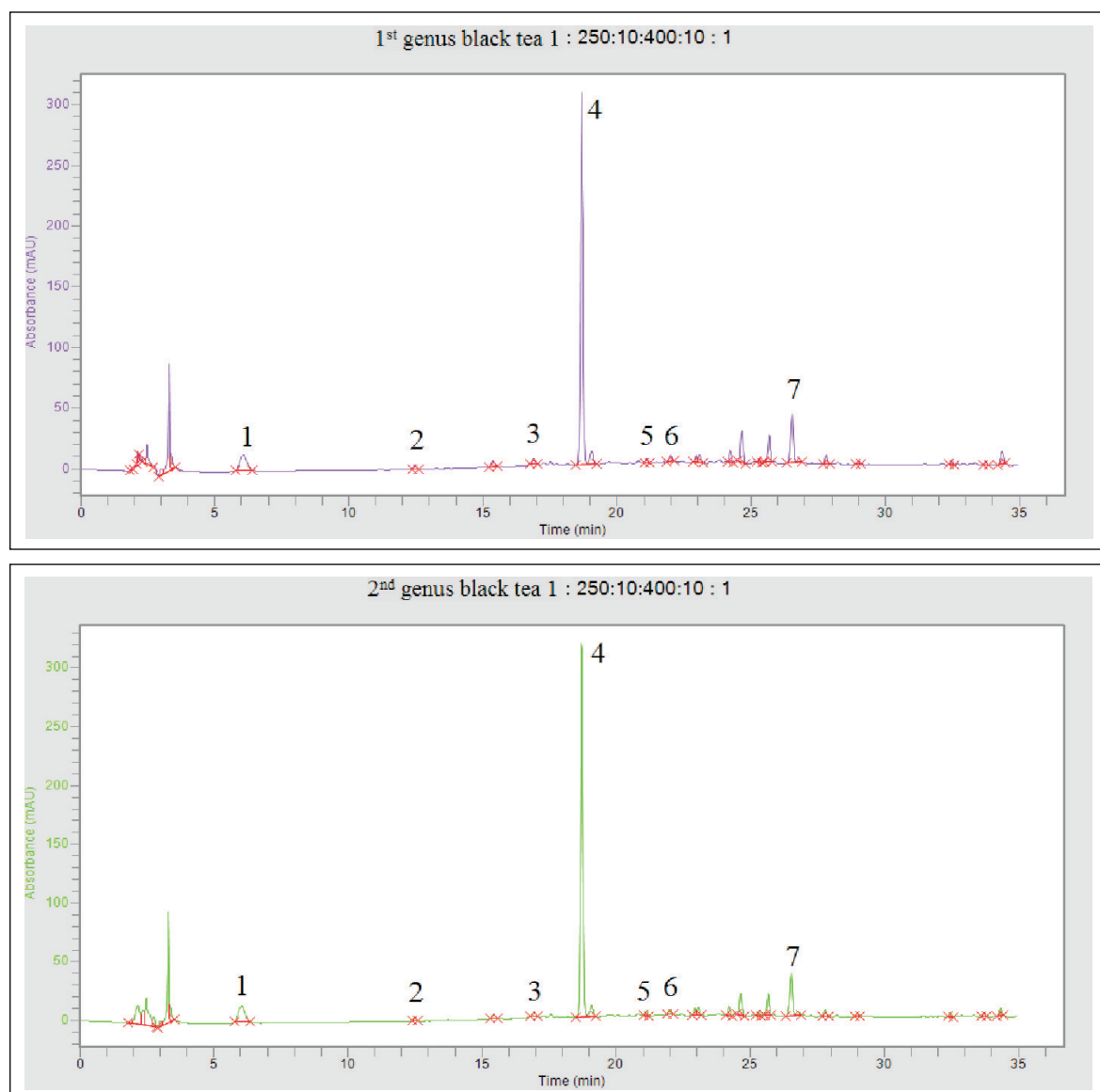


Figure 6. Chromatograms of 1st and 2nd genus black teas (1: gallic acid; 2: galocatechin; 3: epigallocatechin; 4:caffeine; 5: epicatechin; 6: epigallocatechingallate; 7: epicatechingallate)

It was observed in this study that the highest level of epigallocatechin gallate was present in green tea (44.71 mg/g). Higher antioxidant activities in green tea determined by both methods can be attributed to epigallocatechin gallate content. Because, it is indicated that (-)-epigallocatechin gallate showed greater free radical scavenging capacity than the other catechins (Poon, 1998; Gramza and Korczak, 2005; Hanay, 2011).

Content of gallic acid, caffeine, theobromine, catechin and derivatives were researched in green tea, white tea, black tea and the others type of

tea in one study by Yi et al. (2015). According to this research, gallic acid and caffeine is the most abundant component in black tea while the content of caffeine in green tea is significantly increased compared to that in black tea. Green tea possessed the most amount of (-)-epigallocatechingallate, followed by white and black tea. It is stated that quick application of heat to stop oxidation in green tea processing provides to stable most of the catechin derivatives. It is remarked that the caffeine level in black tea were similar in white and green teas by Carloni et al. (2013).

Tea is an important source of dietary polyphenols. It is known that these compounds possess antioxidant capacity. In this research, it is pointed out that white and green tea produced in Turkey have superior potential in terms of total phenolics and total flavonoids contents, antioxidant activity and phenolic compounds than those of black tea consumed commonly.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by research grant 2015.09.04.959-2015.09.04.948 from Scientific Research Projects at Abant İzzet Baysal University, so we would like to thank for their contributions.

REFERENCES

- AOAC (1990). Official methods of analysis. Association of Official Analysis Chemists. Washington DC, USA.
- AOAC (2000). Official methods of analysis. Association of Official Analysis Chemists. Virginia, USA.
- Ashihara, H., Crozier, A. (2001). Caffeine: a well-known but little mentioned compound in plant science. *Trends Plant Sci*, 6(9): 407-413.
- Bakker, J., Bridle, P., Timberlake, C.F. (1986). Tristimulus measurements (CIELAB 76) of port wine colour. *Vitis*, 25: 67-78.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss Technol*, 28: 25-30.
- Cabrera, C., Artacho, R., Gimenez, R. (2006). Beneficial effects of green tea- a review. *J Am Coll Nutr*, 25(2): 79-99.
- Caffin, N., Darcy, B., Yao, L., Rintoul, G. (2004). Developing an index of quality for Australian tea. Australian Government, Rural Industries Research and Development Corporation, 192 p. ISBN: 0 642 58743 4.
- Carlioni, P., Tiano, L., Padella, L., Bacchetti, T., Customu, C., Kay, A., Damiani, E. (2013). Antioxidant activity of white, green and black tea obtained from the same tea cultivar. *Food Res Int*, 53: 900-908.
- Çelik, F. (2006). Tea (*Camellia Sinensis*); Composition, the preventive effects on health and consumption: Review. *J Med Sci*, 26: 642-648.
- Damiani, E., Bacchetti, T., Padella, L., Tiano, L., Carlioni, P. (2014). Antioxidant activity of different white teas: Comparison of hot and cold tea infusions. *J Food Compos Anal*, 33: 59-66.
- Del Rio, D., Stewart, A.J., Mullen, W., Burns, J., Lean, M.E.J., Brighenti, F., Crozier, A. (2004). HPLC-MSⁿ Analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea. *J Agric Food Chem*, 52: 2807-2815.
- Dias, T.R., Tomas, G., Teixeira, N.F., Alves, M.G., Oliveira, P.F., Silva, B.M. (2013). White tea (*Camellia Sinensis* (L.)): Antioxidant properties and beneficial health effects. *Int J Food Sci Nutr Diet*, 2(2): 1-15.
- Duncan, D.B. (1955). Multiple range and multiple F-test. *Biometrics*, 11: 1- 42.
- FAOSTAT (2017). <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Accessed: 17 January 2017)
- Gramza, A., Korczak, J. (2005). Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems. *Trends Food Sci Technol*, 16: 351-358.
- Hanay, N. (2011). Effects of different extraction time and temperature on infusion amount of phenolics and alkaloids. Akdeniz University, Institute of Science and Technology, Department of Food Engineering, Master's Thesis, Antalya, Turkey, 118 p.
- Haslam, E. (2003). Thoughts on thearubigins. *Phytochem*, 64: 61-73.
- Horzic, D., Komes, D., Belscak, A., Ganic, K.K., Ivekovic, D., Karlovic, D. (2009). The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food Chem*, 115: 441-448.
- Jeszka-Skowron, M., Krawczyk, M., Zgola-Grzeskowiak, A. (2015). Determination of antioxidant activity, rutin, quercetin, phenolic acids and trace elements in tea infusions: Influence of citric acid addition on extraction of metals. *J Food Compos Anal*, 40: 70-77.
- Karadeniz, F., Burdurlu, H.S., Koca, N., Soyer, Y. (2005). Antioxidant activity of selected fruits and vegetables grown in Turkey. *Turk J Agric For*, 29: 297-303.
- Karori, S.M., Wachira, F.N., Wanyoko, J.K., Ngure, R.M. (2007). Antioxidant capacity of different types of tea products. *Afr J Biotechnol*, 6(19): 2287-2296.

- Khanchi, A.R., Mahani, M.K., Hajhosseini, M., Maragheh, M.G., Chalooosi, M., Bani, F. (2007). Simultaneous spectrophotometric determination of caffeine and theobromine in Iranian tea by artificial neural networks and its comparison with PLS. *Food Chem*, 103: 1062-1068.
- Kim, Y., Goodner, K.L., Park, J.D., Choi, J., Talcott, S.T. (2011). Changes in antioxidant phytochemicals and volatile composition of *Camellia sinensis* by oxidation during tea fermentation. *Food Chem*, 129: 1331-1342.
- Kodama, D.H., Gonçalves, A.E.S.S., Lajolo, F.M., Genovese, M.I. (2010). Flavonoids, total phenolics and antioxidant capacity: comparison between commercial green tea preparations. *Cienc Tecnol Aliment*, 30(4): 1077-1082.
- Lin, Y.S., Tsai, Y.J., Tsay, J.S., Lin, J.K. (2003). Factors affecting the levels of tea polyphenols and caffeine in tea leaves. *J Agric Food Chem*, 51: 1864-1873.
- Mahmood, T., Akhtar, N., Khan, B.A. (2010). The morphology, characteristics, and medicinal properties of *Camellia sinensis* tea. *J Med Plants Res*, 4(19): 2028-2033.
- McKay, D.L., Blumberg, J.B. (2002). The role of tea in human health: An update. *J Am Coll Nutr*, 21(1): 1-13.
- Mehra, A., Baker, C.L. (2007). Leaching and bioavailability of aluminium, copper and manganese from tea (*Camellia sinensis*). *Food Chem*, 100: 1456-1463.
- Namita, P., Mukesh, R., Vijay, K.J. (2012). *Camellia Sinensis* (Green Tea): A review. *Global J Pharmacol*, 6(2): 52-59.
- Poon, G.K. (1998). Analysis of catechins in tea extracts by liquid chromatography– electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 794: 63-74.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical caption decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26: 1231-1237.
- Rusak, G., Komes, D., Likic, S., Horzic, D., Kovac, M. (2008). Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chem*, 110: 852-858.
- Sarı, F. (2010). Variations in theanine content during tea processing. Ankara University, Graduate School of Natural and Applied, Department of Food Engineering, Ph D. Thesis, Ankara, Turkey, 99 p.
- Shahidi, F., Chavan, U.D., Naczk, M., Amarowicz, R. (2001). Nutrient distribution and phenolic antioxidants in air-classified fractions of beach pea (*Lathyrus maritimus L.*). *J Agric Food Chem*, 49: 926-933.
- Sharangi, A.B. (2009). Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis L.*) – A review. *Food Res Int*, 42: 529-535.
- Smith, A. (2002). Effects of caffeine on human behavior. *Food Chem Toxicol*, 40(9): 1243-1255.
- Unachukwu, U.J., Ahmed, S., Kavalier, A., Lyles, J.T., Kennelly, E.J. (2010). White and green teas (*Camellia sinensis* var. *sinensis*): variation in phenolic, methylxanthine, and antioxidant profiles. *J Food Sci*, 75(6): 541-548.
- Wang, H., Provan, G.J., Helliwell, K. (2000). Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis. *Trends Food Sci Technol*, 11: 152-160.
- Wanyika, H.N., Gatebe, E.G., Gitu, L.M., Ngumba, E.K., Maritim, C.W. (2010). Determination of caffeine content of tea and instant coffee brands found in the Kenya market. *Afr J Food Sci*, 4(6): 353-358.
- Yi, T., Zhu, L., Peng, W.L., He, X.C., Chen, H.L., Li, J., Yu, T., Liang, Z.T., Zhao, Z.Z., Chen, H.B. (2015). Comparison of ten major constituents in seven types of processed tea using HPLC-DAD-MS followed by principal component and hierarchical cluster analysis. *LWT-Food Sci Technol*, 62: 194-201.
- Zhang, Y., Li, Q., Xing, H., Lu, X., Zhao, L., Qu, K., Bi, K. (2013). Evaluation of antioxidant activity of ten compounds in different tea samples by means of an on-line HPLC–DPPH assay. *Food Res Int*, 53: 847-856.
- Zuo, Y., Chen, H., Deng, Y. (2002). Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta*, 57: 307-316.

OLEOJELLER VE EMÜLSİFİYE ET ÜRÜNLERİNDE KULLANIMI

Şeyma Yeniöglü Demiralp*, Eda Demirok Soncu, Nuray Kolsarıcı

Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara, Türkiye

Geliş / *Received*: 03.02.2017; Kabul / *Accepted*: 06.05.2017; Online baskı / *Published online*: 19.06.2017

Yeniöglü Demiralp, Ş, Demirok Soncu, E, Kolsarıcı, N. (2017). Oleojeller ve emülsifiye et ürünlerinde kullanımı, *GIDA* (2017) 42 (5): 505-513 doi: 10.15237/gida.GD17017

Öz

Son yıllarda, gıdaların yüksek yağ içeriği ile ilişkili olan sağlık problemlerinin önlenmesi için yağ azaltma stratejileri geliştirilmektedir. Oleojelasyon bu amaçla uygulanan ve gıdalarda doymuş yağ ile trans yağ miktarını azaltmak amacıyla kullanılan güncel tekniklerden biridir. Oleojel, tüketilebilir bir bitkisel yağ içerisinde düşük molekül ağırlığına sahip bir jel ajanın kristalleşerek oluşturduğu üç boyutlu, sürekli ve termo dönüşümlü jel formu olarak tanımlanır. Yapılan çalışmalar oleojellerin unlu mamuller, çikolata, margarin ve emülsifiye et ürünlerinde kullanılabildiğini göstermiştir. Araştırmacılar, emülsifiye et ürünlerinde hayvansal yağ yerine oleojel kullanımının ya da oleojelin belirli oranlarda hayvansal yağ ile ikamesinin, et ürünlerinde doymamış yağ asidi içeriğiyle birlikte duyusal ve teknolojik kaliteyi arttırdığını, tekstürü iyileştirdiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada, organojelasyon tekniği, organojel/oleojel oluşum ve etki mekanizması, oleojel uygulama alanları, oleojel hazırlamada kullanılan bileşenler ve farklı oleojellerin emülsifiye et ürünlerinde kullanımının ürün özellikleri üzerine etkisi yapılan araştırmalara dayanılarak derlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Oleojelasyon, oleojel, doymuş yağlar, doymamış yağlar, emülsifiye et ürünleri, sos, yağ azaltma stratejisi

OLEOGELS AND THEIR UTILIZATION IN EMULSIFIED MEAT PRODUCTS

Abstract

In recent years, fat reduction strategies have been developed to prevent the health risks related to high fat content of foods. Oleogelation is one of the current techniques applied for that purpose in which the saturated fat and trans fat amounts is reduced in foods. Oleogel is defined as a three dimensional, continue and thermoreversible gel which is formed by crystallization of oleogelator with low molecular weight into the vegetable fats. Previous studies demonstrated that oleogels have been recently used in chocolate, margarine, bakery products, dairy products and emulsified meat products. Researchers have been showed that the unsaturated fat content as well as the sensory and technological quality were increased and texture were improved by the use of oleogels instead of animal fats or partial replacement of animal fats by oleogels in emulsified meat products. In this study, organogelation technique, formation and impact mechanism of organogelation/oleogelation, oleogel technique application areas, compounds which are used in oleogel preparation and the effects of oleogels on the quality properties of emulsified meat products were reviewed.

Keywords: Oleogelation, oleogel, saturated fats, unsaturated fats, emulsified meat products, sausage, fat reduction strategies

* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

demiralpseyma@gmail.com,

(+90) 312 203 3639,

(+90) 312 317 8711

GİRİŞ

Son yıllarda günlük beslenme ile sağlık arasındaki ilişkiye verilen önem artış göstermiş, özellikle obezite, kalp rahatsızlıkları ve bazı kanser türlerinin günlük yağ tüketimine bağlı olduğu yapılan araştırmalar sonucunda belirtilmiştir (Berasategi vd., 2014; Grasso vd., 2014). Dünya Sağlık Örgütü, günlük alınan toplam enerji içerisinde yağlardan karşılanacak değer %15 ile %30 arasında olabileceğini, doymuş yağların bu değer %10'unu oluşturabileceğini, kalan kısmın doymamış yağlar ile karşılanabileceğini ve günlük kolesterol tüketiminin 300 mg'dan az olması gerektiğini vurgulamıştır (Jiménez Colmenero, 2000). Doymuş yağların ve kolesterolün belirtilen yüzdelerden fazla tüketilmesinin "kötü kolesterol" olarak bilinen LDL miktarını arttırdığı bilinmektedir (Co ve Marangoni, 2012). Bu sebeple yüksek kolesterol düzeyi ile düşük çoklu doymamış yağ/doymuş yağ oranı arasında ilişki bulunmakta, koroner kalp rahatsızlıklarının artışında bu ilişkinin etkileri üzerinde durulmaktadır (Youssef ve Barbut, 2009; 2011). Son dönemlerde, insan sağlığını ilgilendiren bu konular tüketicilerin satın alma alışkanlıklarını ve algılarını değiştirmekte ve yağ içeriği azaltılmış ürünlere olan taleplerini giderek arttırmaktadır (Herrero vd., 2012; Barbut vd., 2016a; 2016b; 2016c). Bu doğrultuda, besleyici değeri yüksek ve önemli bir protein kaynağı olan et ürünleri, doymuş yağ içerikleri sebebiyle sağlık açısından risk oluşturmakta ve bu durum pek çok gıdada olduğu gibi et ürünlerinde de yağ azaltma çalışmalarının yapılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Yüksek tüketim hacmine sahip emülsifiye et ürünlerinde, arzu edilen tekstür, reolojik yapı ve teknolojik özellikler ile renk, gevreklik, lezzet ve sululuk gibi duyuşal özellikler %30 ile %40 düzeylerinde doymuş yağların kullanılmasıyla sağlanabilir (Bloukas vd., 1997; Stortz vd., 2012; Barbut vd., 2016b; 2016c; Panagiotopoulou vd., 2016). Bu nedenle emülsifiye et ürünlerinde söz konusu kalite özellikleri yitirilmeden doymuş yağ ve kolesterol düzeyinin azaltılarak, yağ asidi profilinin doymamış yağ asidi yönünde zenginleştirilmesine yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır. Hayvansal yağ yerine bitkisel yağ kullanımı bu stratejilerden biri olup, araştırmalar emülsifiye et ürünlerinde bitkisel yağ kullanımının düşük emülsiyon stabilitesi ve düşük proses verimi,

renk, tekstür, lezzet ve sululuk gibi duyuşal özellikler ile dilimlenebilirlik, pişirme verimi ve su tutma kapasitesi gibi teknolojik özelliklerde kayıp, oksidatif stabilitede azalış ile sonuçlandığını göstermiştir (Paneras ve Bloukas, 1994; Bloukas vd., 1997; Youssef ve Barbut, 2009; Chung vd., 2013; Berasategi vd., 2014; Jiménez Colmenero vd., 2015). Ayrıca, diyet liflerinin, hayvansal orijinli olmayan bir protein ile önceden hazırlanan emülsiyonların, hidrokolloidlerin ve suyun hayvansal yağ ikame maddesi olarak kullanımı da bilinen diğer yöntemlerdir. Araştırmacılar, emülsifiye et ürünlerinde doymuş yağ miktarını azaltmak için hayvansal yağın su ile ikamesinin duyuşal ve tekstürel özellikleri geliştirdiğini ancak pişirme kaybında artış oluşturduğunu belirtmişlerdir. Öte yandan, bağ doku proteini, soya proteini ve aljinat, karragenan, ksantan gam, keçiboynuzu gamı, selüloz türevleri, nişasta, pektin gibi hidrokolloidlerin su bağlayabilme ve jel oluşturabilme özelliklerine bağlı olarak emülsifiye et ürünlerinde kullanımının, söz konusu dezavantajları ortadan kaldırarak emülsiyon stabilitesini sağladığı ve tekstürel özellikleri iyileştirdiği de yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Candoğan ve Kolsarıcı, 2003; Chung vd., 2013; Olmedilla-Alonso vd., 2013; Triki vd., 2013; Herrero vd., 2014). Bu doğrultuda geleneksel yağ/su emülsiyonlarına kıyasla, su tutma kapasitesi yüksek ve katı benzeri yapı gösteren hidrokolloidlerle jelleştirilmiş emülsiyonların emülsifiye et ürünlerinde kullanılması, arzu edilen duyuşal, tekstürel ve kalite özelliklerini sağlayabilmekte ve oluşturulan jel yapı bileşiminde bulundurduğu bitkisel yağları üretim prosesi ve depolama aşamalarında kalite kayıplarına karşı koruyabilmektedir. (Poyato vd., 2014; Poyato vd., 2015).

Bu noktadan hareketle, son zamanlarda, bitkisel yağların emülsifiye et ürünlerinde kullanılarak ürün kompozisyonunun tekli ve çoklu doymamış yağ asitleri açısından zenginleştirilmesi amacıyla yürütülen araştırmalarda katı benzeri jel yapıların kullanımı popülerite kazanmıştır. (Jiménez Colmenero vd., 2015). Hidrojenasyon, fraksiyone kristalizasyon ve interesterifikasyon gibi mevcut yöntemler uzun yıllardan beri bitkisel yağların yapılandırılmasında ve katı benzeri form kazandırılmasında kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemlerin bazı dezavantajları araştırmacıları son zamanlarda yeni teknikler üzerinde çalışmaya

yönlendirmiş ve bu noktada yağ asitlerinin yapısında herhangi bir kimyasal değişime neden olmaksızın kullanılabilen organojelasyon tekniği popüler ve yeni bir teknik olarak karşımıza çıkmıştır (Lupi vd., 2012a; Zetzel vd., 2012). Organojelasyon, organik çözümlerin düşük molekül ağırlıklı bileşenler ya da yağda çözünür polimerler aracılığıyla sıvı fazı hapseden üç boyutlu katı benzeri jel yapıların oluşturulması olarak tanımlanır (Lupi vd., 2012a). Organojelasyon tekniği birçok ürüne uygulanabilecek önemli bir teknik olarak görülmekte (Patel vd., 2014) ve yapılan çalışmalar bu tekniğin unlu mamuller, çikolata, margarin, süt ürünlerinin yanı sıra emülsifiye et ürünlerinde yağ taklitçisi olarak hayvansal yağ yerine kullanımının trans yağ ve doymuş yağ asidi miktarının azaltılmasına, emülsiyonun stabilizasyonuna, yağ sızıntısının engellenmesine ve arzu edilen tekstürel ve duyuşal özelliklerin oluşturulmasına olanak sağladığını göstermiştir (Wassell vd., 2010; Gravelle vd., 2012; Toro Vazquez vd., 2013).

ORGANOJELLERİN/OLEOJELLERİN OLUŞUM VE ETKİ MEKANİZMASI

Organojelasyon tekniğinde sıvı fazı ya da organik çözümler ya da ham/bitkisel yağ, jel ajanını (olejelatör) da düşük molekül ağırlıklı organik jelatörler ya da polimerik jelatörler oluşturur. Genellikle "organojel" olarak isimlendirilen jel yapı, bitkisel yağ kullanıldığı durumlarda "olejel", jel ajanı "olejelatör" ve kullanılan teknik de "olejelasyon" olarak adlandırılır (Co ve Marangoni, 2012; Lupi vd., 2013). Sıvı fazın jel ağı içerisinde immobilizasyonu, polimerik jelatörlerin fiziksel ve kimyasal interaksiyonlar sonucu çapraz ya da karışık bağlar kurması, düşük molekül ağırlıklı organik jelatörlerinde fiziksel interaksiyonlar sonucu iri agregatlar oluşturması ile sağlanır. Sonrasında jel yapı, hidrojen bağları, van der Waals kuvvetleri ve π - π etkileşimi gibi zayıf zincirler arası interaksiyonlar ile kuvvetlenir (Pieve vd., 2010; Shapiro, 2011). Oluşan jel yapının kategorizasyonunda bileşimindeki jelatörün molekül yapısı (düşük molekül ağırlıklı organik bileşenler, polimerik bileşenler veya inorganik bileşenler), jelatörün kimyasal yapısı (yağ bazlı olan veya olmayan), kullanılan jelatör sayısı (tek jelatörün veya jelatör kombinasyonlarının kullanıldığı jeller) ve jelin yapısı (kristal yapı ve

ağ oluşumu, kendiliğinden oluşan kristal olan veya olmayan ağlar, polimerik lifler, parçaçıklı ağlar) gibi birçok faktör dikkate alınır (Patel ve Dewettinck, 2016).

Oleojelasyon tekniği günümüzde, emülsifiye et ürünlerinde arzu edilen yapıyı oluşturmak için kullanılacak geleneksel emülsiyon tekniğine alternatif bir yöntem olarak düşünülmektedir. Oleojel; tüketilebilir bir bitkisel yağ içerisinde, düşük molekül ağırlıklı ve sınırlı çözünebilirliğe sahip olejelatörün asimetrik kristalizasyon ya da kendiliğinden kümeleşme ile oluşturduğu sürekli, termo dönüşümlü ve üç boyutlu ağ yapısına sahip jel formudur (Hughes vd., 2009; Lupi vd., 2012b; Shapiro, 2011; Co ve Marangoni, 2012; Lupi vd., 2012a; Zetzel vd., 2014; Moschakis vd., 2016). Olejel hazırlama işlemi, olejelatöre ve bitkisel yağa göre değişmekle birlikte, genel olarak yüksek sıcaklıkta ve kesikli sistemde, olejelatörün ve bitkisel yağın karıştırılmasıyla gerçekleştirilir. Yüksek sıcaklıklara çıkan bitkisel yağ içerisinde olejelatörün erimesi sağlanırken, bu aşamada doymamış yağ asitlerinin oksidasyona karşı duyarlılıklarının da göz önünde bulundurulması önemlidir (Jiménez Colmenero vd., 2015). Isıl işlem sırasında karıştırma işlemi gerçekleştirilerek mekanik etki de sağlanır. Solüsyonun belirli sıcaklık derecesine ulaştıktan sonra kısa süreli tutulması ve ardından 20°C'ye kadar soğutulup, jelin içeriğine göre 4-5°C sıcaklıkta 24 saat bekletilmesi gerekir. Böylece bitkisel yağ, olejelatörler aracılığı ile oluşturulan bağlar arasında tutularak jel haline dönüşür (Barbut vd., 2016a; 2016b).

Oleojeller şekil alabilme ve elastikiyet sağlama gibi reolojik özellikleri sayesinde doymuş yağlara benzer yapısal etki gösterir. Emülsiyon stabilitesini sağlarken, aynı zamanda emülgatörler gibi birbirine karışmayan iki farklı sıvı arasında yüzeysel aktif bağlantı sağlayarak yağ globüllerinin emülsiyondan ayrılmasını da engeller (Lupi vd., 2012b; Co ve Marangoni, 2012; Lupi vd., 2012a; Lupi vd., 2013). Jel ajanı olarak kullanılabilen jelatörler amfililik karakterlidir (Pernetti vd., 2007a). Hem hidrofilik (OH) hem de hidrofobik uca (yağ asitleri) sahip olma özellikleri ile oluşturdukları jel yapının polar kısmıyla (hidrofilik) emülsiyonun sulu fazında, apolar kısmıyla da (lipofilik) emülsiyonun yağ fazında bulunurlar. Oluşan jelin ağ yeteneğinin korunmasını; karıştırma düzeyi, soğutma hızı,

kristalleşme derecesi, dallanma oranı, porların büyüklüğü, ağın katılığı, bitkisel yağ ile ağ arasındaki ara yüzey alanının değişimi ve depolama koşulları belirler (Rogers, 2009a; Wassell vd., 2010).

OLEOJEL OLUŞUMUNDA KULLANILAN BİLEŞENLER

Olejelasyon için gereken sıvı fazı bitkisel yağ oluştururken, oleojel ajanını da polimerik veya düşük molekül ağırlıklı jelatörler oluşturur (Stortz vd., 2012). Oleojel yapımında, sıvı faz olarak ayçiçek yağı, zeytinyağı, kanola yağı, susam yağı, mısır yağı ve hint yağı tercih edilebilir. Yapılan çalışmaya ve ürüne göre kullanılan bitkisel yağ türü değişmekte, bitkisel yağın seçiminde yağ asidi profili ön plana çıkmaktadır. Bu bağlamda çalışmalar, oleojel yapımında özellikle kanola yağı ve zeytinyağını işaret etmektedir. Kanola yağı, %6 gibi düşük doymuş yağ oranına sahip olmakla birlikte bileşiminde tokoferol bulundurulur. Ayrıca kanola yağının bileşiminde bulunan yağ asitlerinin vücutta sindirimi esnasında omega-3 yağ asitlerine dönüşümü de bu yağı avantajlı kılmaktadır (Youssef ve Barbut, 2009; Stortz vd., 2012; Barbut vd., 2016a; 2016c). Zeytinyağı ise, %56.3-86.5 aralığında tekli doymamış yağ asidi, %3.6-21.5 aralığında çoklu doymamış yağ asidi ve %8-25 aralığında doymuş yağ asidi içeriğine sahiptir. Ayrıca fenolik bileşenler, E vitamini, tokoferoller ve karoten gibi antioksidan özellikteki bileşenlerce zengin olması, zeytinyağını oleojel yapımında ön plana çıkarmaktadır (Del Nobile vd., 2009; Utrilla vd., 2014).

Organojel/oleojel yapımında kullanılan jel ajanları; kendiliğinden oluşan düşük molekül ağırlıklı organik bileşenler, kendiliğinden oluşan polimerik bileşenler, kristal parçacıklı sistemler ve inorganik bileşenlerden oluşmaktadır (Patel ve Dewettinck, 2015). Oleojel ajanı seçilirken; gıdaya uygun olmasına, ekonomik olmasına, düşük konsantrasyonlarda etkili olmasına, yerine kullanılacağı yağın fiziksel özelliklerine benzer ve uyumlu olmasına dikkat etmek gerekir (Co ve Marangoni, 2012). Jel ajanı olarak mono, di ve triaçilgliseroller, yağ asitleri, yağ alkoller, vaksar, vaks esterleri, sorbitan monostearat, 12-Hidroksi-stearik asit, etilselüloz, sorbitan tristearat, lesitin, sterol ve orizanol kullanılır (Pernetti vd., 2007a; Lupi vd., 2012a). Jel ajanları tek başlarına farklı

konsantrasyonlarda kullanılabildikleri gibi yağ asitleri-yağ alkoller, lesitin-sorbitan tristearat, fitosterol-orizanol şeklinde birlikte ya da emülsiyon halinde kullanılabilmektedir (Zetzi vd., 2012; Patel ve Dewettinck, 2015; 2016). Bitkisel yağları jelleştirmek amacıyla %0.5-%2 aralığında düşük molekül ağırlıklı jel ajanlarının kullanımının yeterli olduğu bilinmektedir (Hughes vd., 2009; Burkhardt vd., 2016). Jel ajanları kullanılacağı sektöre göre değişiklik gösterir ve gıda araştırmalarında genellikle Çizelge 1'de özetlenen düşük molekül ağırlıklı ajanlar tercih edilmiştir (Co ve Marangoni, 2012).

OLEOJELLERİN EMÜLSİFİYE ET ÜRÜNLERİNDE KULLANIMI

Organik fazların jelleştirilmesi ile oluşan jel yapı gıda dışı alanlarda (kozmetik ve ilaç endüstrisi) uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Ancak yöntemin tüketilebilir bitkisel yağlarla uygulanması yeni bir alandır (Lupi vd., 2012b; Ögütçü ve Yılmaz, 2012; Burkhardt vd., 2016; O'Sullivan vd., 2016). Son dönemde, özellikle gıda sektörü içerisinde; unlu mamullerde, çikolatada, margarinde, süt ürünlerinde ve emülsifiye et ürünlerinde kullanımına ilişkin çalışmalar üzerinde yoğunlaşmıştır (Co ve Marangoni, 2012; Ögütçü ve Yılmaz, 2012; Patel ve Dewettinck, 2016; Demirkesen, 2017). Unlu mamullerin üretiminde kullanılan yağın kandelila mumu oleojeli ile belirli oranlarda birlikte kullanılmasının, kabul edilebilir hamur özellikleri oluşturduğu dolayısıyla unlu mamullerde kullanılmasının doymuş yağ azaltmak için uygun bir yöntem olacağı belirtilmiştir (Mert ve Demirkesen, 2016). Ayçiçeği mumundan ve balmumundan elde edilen oleojelin unlu mamullerde kullanılmasına ilişkin yapılan bir diğer çalışmada ise tekstürel ve duyuşsal sonuçların olumlu bulunduğu ve oleojellerin kullanımının mümkün olduğu vurgulanmıştır (Yılmaz ve Ögütçü, 2015). Süt ürünleri içerisinde, dondurma ve peynir üretiminde doymuş yağ miktarını azaltmak amacıyla oleojel kullanımıyla ilgili çalışmalar da yapılmıştır (Zulim Botega vd., 2013; Bemer vd., 2016). Gıda sektöründe ayrıca yağ sızıntısının engellenmesi, biyoaktif ve fonksiyonel bileşenlerin mide sindiriminde kontrollü salınımına ilişkin araştırmalarda mevcuttur (Co ve Marangoni, 2012). Emülsifiye et ürünlerinde oleojellerin kullanımına ilişkin çalışmalar ise Çizelge 2'de özetlenmiştir.

Olejeller ve Emülsifiye Et Ürünlerinde Kullanımı

Çizelge 1. Oleojel yapımında kullanılan jelatörler ve özellikleri

Jelatör	Yapısal özelliği ve kaynağı	Jel Oluşturabilme Özelliği	Kaynak
12-Hidroksi-stearik asit	Hint yağının bileşimindeki stearik asitten elde edilir.	Düşük molekül ağırlığına sahip bu jelatör, risinelaidik asit, stearik asit ve stearyl alkol gibi bileşenlerle modifiye edildiğinde oleojel yapımında kullanılabilir.	Rogers vd., 2009b Stortz vd., 2012 Burkhardt vd., 2016
Mono, di ve triağlisitler	Gliserol molekülüne ester bağı ile kovalent bağlanmış yağ asidinden oluşan gliseritlerdir.	Yaygın kullanılır. Amfifilik karakteridir.	Pieve vd., 2010 Lopez-Martinez vd., 2015
Etilselüloz	Selüloz polimerinin eterifikasyonu ile elde edilir.	Tek başına ya da sorbitan monostearat ile birlikte kullanılır. Jelleşme sağlayabilmesi için 140°C 'ye kadar bitkisel yağ ile birlikte ısıtılması gerekir.	Co ve Marangoni, 2012 Gravelle vd., 2012
Sorbitan monostearat	Sorbitan ve stearik asit esteridir.	Tek başına ya da etilselüloz ile birlikte kullanılır. Zeytinyağı, susam yağı ve kanola yağının jelleştirebilme özelliğine sahiptir.	Co ve Marangoni, 2012 Rogers, 2009b
Sorbitan tristearat	Sorbitan ve stearik asitten oluşan ester yapısındaki bileşiklerdir.	Lesitin ile birlikte kullanıldığında kristal yapı oluşturur.	Pernetti vd., 2007b
Fitosteroller	Düşük molekül ağırlıklı bitkisel sterollerdir. LDL kolesterolü düşürücü etki gösterirler.	Fitosteroller ve γ -orizanol sırasıyla 40:60 oranında birlikte kullanıldığında kristalleşme göstererek sıkı, dayanıklı ve sert bir yapı gösteren jel oluşturabilir.	Duffy vd., 2009 Wassell vd., 2010 Co ve Marangoni, 2012
γ -Orizanol	Pirinç kepeği yağından elde edilir. Antioksidan özellik gösterir.		
Lesitin	Glikolipitler, triglisitler ve fosfolipitlerden oluşur.	Sorbitan tristearatla kullanıldığında jel yapı oluşturur. Emülgatör olarak yaygın kullanılır. Kolay temin edilir.	Pernetti vd., 2007b Han vd., 2014

Çizelge 2. Emülsifiye et ürünlerinde oleojel kullanımına ilişkin çalışmalar

Ürün	Bitkisel yağ	Jelatör	Kaynak
Frankfurter sosis	Kanola yağı	Etilselüloz (%8, %10, %12, %14) Sorbitan monostearat (%1.5, %3)	Barbut vd., 2016a
Kahvaltılık sosis	Kanola yağı	Etilselüloz (%8, %10, %12, %14) Sorbitan monostearat (%1.5, %3)	Barbut vd., 2016b
Frankfurter sosis	Kanola yağı	Etilselüloz (%8, %10) Sorbitan monostearat (%1.5, %3)	Barbut vd., 2016c
Frankfurter sosis	Ayçiçek yağı	γ -Orizanol:Fitosterol (30:70) γ -Orizanol:Fitosterol (60:40)	Panagiotopoulou vd., 2016
Sosis (Venison salchichon)	Zeytin yağı	Soya proteini konsantresi	Utrilla vd., 2014
Frankfurter sosis	Soya yağı Organik keten yağı Kanola yağı	Etilselüloz	Zetzel vd., 2012

Barbut vd. (2016a) frankfurter sosis üretiminde hayvansal yağ ikame maddesi olarak kanola yağı ve etiliselüloz ya da etiliselüloz+sorbitan monostearat kullanarak hazırladıkları oleojellerin ürünün tekstürel ve duyuşal özellikleri üzerine etkisini incelemişlerdir. Hayvansal yağ yerine sadece kanola yağı kullanıldığında çok küçük yağ globüllerinin oluştuğunu, tekstürel olarak daha sert yapıda ürün elde edildiğini, ancak etiliselüloz ve sorbitan monostearat ile kanola yağına jel yapı kazandırılıp sosis üretiminde kullanıldığında tekstürel özellikler açısından hayvansal yağ kullanılarak üretilen sosise kıyasla bir fark olmadığını vurgulamıştır. Ancak, pişirme kaybı oleojel kullanılarak üretilen sosislerde yağ globül boyutlarının hayvansal yağla kıyasla biraz daha küçük olması nedeniyle azalma göstermiştir. Araştırmacılar tarafından aynı oleojel kahvaltılık sosis (Barbut vd., 2016b) üretiminde de hayvansal yağ yerine kullanılmış, oleojelin hayvansal yağla göre daha açık renkli ve şeffaf yapılı olması nedeniyle sosilerin L^* değerinde azalış tespit edilirken, a^* ve b^* değerlerinde bir değişim gözlenmemiştir. Duyusal panelde oleojel kullanılarak üretilen kahvaltılık sosisler daha az sulu ve daha az yağlı olarak değerlendirilmiştir. Araştırmacılar bir diğer çalışmalarında da kanola yağı-etiliselüloz ya da kanola yağı-etiliselüloz-sorbitan monostearat oleojelini frankfurter sosis üretiminde %20, %40, %60 ve %80 oranlarında hayvansal yağ ile ikame etmişler ve sosis bileşimindeki oleojel oranı arttıkça yağlılık hissinin hayvansal yağ ile üretilen sosise kıyasla arttığını gözlemlemişlerdir (Barbut vd., 2016c).

Panagiotopoulou vd. (2016) frankfurter sosislerde hayvansal yağın %10 oranında ayçiçeği yağı ve γ -orizanol+fitosterol ile hazırlanan oleojel ile ikamesinin, pH değerini değiştirmedeğini, dış yüzey renginde daha koyu ve daha kırmızı, iç yüzey renginde ise daha açık bir renk oluşumu ile sonuçlandığını ve tiyobarbitürik asit reaktif madde (TBARM) değerinin doymamış yağ asidi içeriğinin artması sebebiyle yüksek bulunduğunu belirtmişlerdir. Oleojel kullanılarak üretilen sosislerde tekstürel ölçümlerde ve duyuşal puanlarda düşüş gözlenmiştir. Bir diğer çalışmada da, Utrilla vd. (2014) sosis üretiminde zeytinyağı ve soya proteini konsantresi kullanarak hazırlanan oleojelin %15, %25, %35, %45 ve %55 oranlarında hayvansal yağ yerine kullanımının üretim prosesi

boyunca lipolizis ve lipit oksidasyonu reaksiyonlarını engellemediğini, renk, pH ve su aktivitesi değerlerini etkilemediğini, sosislerin kalite özelliklerini koruduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, oleojel ikame oranı arttıkça sosislerin tekli doymamış yağ asidi oranlarının da artış gösterdiği belirtilmiştir. Oleojel kullanılan tüm sosisler duyuşal olarak kabul edilebilir düzeydedir, ancak %15 ve %25 oranında oleojel kullanılarak üretilen sosislere daha yüksek duyuşal puanlar verilmiştir. Zetzl vd. (2012) %10 etiliselüloz ve %90 bitkisel yağ (soya yağı, keten tohumu yağı, kanola yağı) kullanarak hazırladıkları oleojellerin mekanik özelliklerini incelemişler ve yağın doymamışlık oranı arttıkça jelin sertliğinin de arttığını tespit etmişlerdir. Kullanılan yağın, etiliselülozun polimer molekül ağırlığının ve polimer konsantrasyonunun, jelin mekanik özellikleri üzerine önemli etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, kanola yağı ve etiliselüloz kullanarak hazırladıkları oleojel ile üretilen sosislerin, çignenebilirlik ve sertlik düzeylerinin hayvansal yağ ile üretilen sosis ile benzer olduğunu ifade etmişlerdir.

SONUÇ

Günümüzde tüketicilerin düşük yağlı gıdalara olan taleplerinin giderek artması, gıdalarda yağın azaltılmasını ve kullanılan yağın doymamış yağ asitleri açısından zenginleştirilmesini zorunlu hale getirmiştir. Özellikle emülsifiye et ürünlerinde, istenen yapının oluşturulabilmesi ve stabil kalabilmesi için yüksek oranda hayvansal yağ kullanılmakta ve bu ürünlerin tüketimi kalp damar hastalıkları ve obezite gibi önemli sağlık problemlerine neden olmaktadır.

Son araştırmalarda doymuş yağların yerine alternatif olarak kullanılacak, emülsifiye ürün üretimine uygun stratejiler üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Bu stratejilerden biri de oleojelasyon tekniği olup, araştırmalarda oleojellerin emülsifiye et ürünlerinde etkili bir şekilde kullanılabilmesi ve böylece doymuş yağ asidi ve kolesterol oranı düşük, doymamış yağ asitlerince zengin, besinsel kalitesi yüksek ve sağlıklı ürünler elde edilebileceği vurgulanmıştır. Aynı zamanda çalışmalarda, emülsifiye et ürünlerinin tekstürü, reolojik ve duyuşal özellikleri değerlendirilmiş, çoğunlukla olumlu sonuçların alındığı belirtilmiştir. Özetle, oleojelasyon tekniği, kalite ve teknolojik özellikleri

yitirmeden emülsifiye et ürünlerinde doymuş yağ oranının azaltılması amacıyla kullanılabilir yeni, başarılı ve etkili bir yöntem olarak görülmektedir. Ancak, yöntemin ticari olarak uygulanabilirliğini sağlamak için ürüne en uygun bitkisel yağ-oleojelatör kombinasyonunun belirlenmesi, bu hedef doğrultusunda farklı kombinasyonlar ve konsantrasyonlar üzerinde daha fazla araştırma yapılması ve ürünün teknolojik, mikrobiyolojik, fizikokimyasal, reolojik, tekstürel ve duyu kalite özelliklerinin hem üretim hem de depolama aşamalarında detaylıca incelenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Barbut, S., Wood, J., Marangoni, A.G. (2016a). Potential use of organogels to replace animal fat in comminuted meat products. *Meat Sci*, 122: 155-162.
- Barbut, S., Wood, J., Marangoni, A.G. (2016b). Quality effects of using organogels in breakfast sausage. *Meat Sci*, 122: 84-89.
- Barbut, S., Wood, J., Marangoni, A.G. (2016c). Effects of organogel hardness and formulation on acceptance of frankfurters. *J Food Sci*, 81(9): 2183-2188.
- Bemer, H.L., Limbaugh, M., Cramer, E.D., Harper, W.J., Maleky, F. (2016). Vegetable organogels incorporation in cream cheese products. *Food Res Int*, 85: 67-75.
- Berasategi, I., Garcia-Iniguez de Ciriano, M., Navarro-Blasco, I., Calvo, M.I., Cavero, R.Y., Astiasaran, I., Ansorena, D. (2014). Reduced-fat Bologna sausages with improved lipid fraction. *J Sci Food Agric*, 94: 744-751.
- Bloukas, J.G., Paneras, E.D., Fournitzis, G.C. (1997). Effect of replacing pork backfat with olive oil on processing and quality characteristics of fermented sausages. *Meat Sci*, 45(2): 133-144.
- Burkhardt, M., Laurence, N., Gradzielski, M. (2016). Organogels based on 12 – hydroxy stearic acid as leitmotif: Dependence of gelation on chemical modifications. *J Col Int Sci*, 466: 369-376.
- Candoğan, K., Kolsarıcı, N. (2003). The effects of carrageenan and pectin on some quality characteristics of low-fat beef frankfurters. *Meat Sci*, 64: 199-206.
- Chung, C., Degner, B., McClements, D.J. (2013). Designing reduced-fat food emulsions: Locust bean gum- fat droplet interactions. *Food Hydrocoll*, 32: 263-270.
- Co, E.D., Marangoni, A.G. (2012). Organogels: An alternative edible oil-structuring method. *J Am Oil Chem Soc*, 89: 749-780.
- Del Nobile, M.A., Conte, A., Incoronato, A.L., Panza, O., Sevi, A., Marino, R. (2009). New strategies for reducing the pork back-fat content in typical Italian salami. *Meat Sci*, 81: 263-269.
- Demirkesen, İ. (2017). Rheological and textural characteristics of oleogels formed by different waxes. *Gıda*, 42(1): 50-57.
- Duffy, N., Blonk, H.C.G., Beindorff, C.M., Cazade, M., Bot, A., Duchateau, G.S.M.J.E. (2009). Organogel- based emulsion systems, microstructural features and impact on in vitro design. *J Am Oil Chem Soc*, 86: 733-741.
- Grasso, S., Brunton, N.P., Lyng, J.G., Lalor, F., Monahan F.J. (2014). Healthy processed meat products-Regulatory, reformulation and consumer challenges. *Trends Food Sci Technol*, 39: 4-17.
- Gravelle, A.J., Barbut, S., Marangoni, A.G. (2012). Ethylcellulose oleogels: Manufacturing considerations and effects of oil oxidation. *Food Res Int*, 48: 578-583.
- Han, L., Lin, L., Bing, L., Zhao, L., Liu, G., Liu, X., Wang, X. (2014). Structure and physical properties of organogels developed by sitosterol and lecithin with sunflower oil. *J Am Oil Chem Soc*, 91: 1783-1792.
- Herrero, A.M., Carmona, P., Jimenez-Colmenero, F., Ruiz-Capillas, C. (2014). Polysaccharide gels as oil bulking agents: Technological and structural properties. *Food Hydrocoll*, 36: 374-381.
- Herrero, A.M., Carmona, P., Pintado, T., Jimenez-Colmenero, F., Ruiz-Capillas, C. (2012). Lipid and protein structure analysis of frankfurters formulated with olive oil-in-water emulsion as animal fat replacer. *Food Chem*, 135: 133-139.
- Hughes, N.E., Marangoni, A.G., Wright, A.J., Rogers, M.A., Rush, J.W.E. (2009). Potential food applications of edible oil organogels. *Trends Food Sci Technol*, 20: 470-480.
- Jiménez Colmenero, F. (2000). Relevant factors in strategies for fat reduction in meat products. *Trends Food Sci Tech*, 11: 56-66.

- Jiménez Colmenero, F., Sandoval, L.S., Bou, R., Cofrades, S., Herrero, A.M., Ruiz-Capillas, C. (2015). Novel applications of oil structuring methods as a strategy to improve the fat content of meat products. *Trends Food Sci Technol*, 44: 177-188.
- Lopez-Martinez, A., Charó-Alonso, M.A., Marangoni, A.G., Toro-Vazquez, J.F. (2015). Monoglyceride organogels developed in vegetable oil with and without ethylcellulose. *Food Res Int*, 72: 37-46.
- Lupi, F.R., Gabriele, D., Facciolo, D., Baldino, N., Seta, L., Cindio, B. (2012a). Effect of organogelator and fat source on rheological properties of olive oil-based organogels. *Food Res Int*, 46: 177-184.
- Lupi, F.R., Gabriele, D., Cindio, B. (2012b). Effect of shear rate on crystallisation phenomena in olive oil based organogels. *Food Bioprocess Technol*, 11(2): 5(7): 2880-2888.
- Lupi, F.R., Gabriele, D., Greco, V., Baldino, N., Seta, L., Cindio, B. (2013). A rheological characterisation of an olive oil/fatty alcohols organogel. *Food Res Int*, 51: 510-517.
- Mert, B., Demirkesen, I. (2016). Reducing saturated fat with oleogel/shortening blends in a baked product. *Food Chem*, 199: 809-816.
- Moschakis, T., Panagiotopoulou, E., Katsanidis, E. (2016). Sunflower oil organogels and organogel-in-water emulsions (part I) : Microstructure and mechanical properties. *LWT-Food Sci Technol*, 73: 153-161.
- Olmedilla-Alonso, B., Jimenez-Colmenero, F., Sanchez-Muniz, F.J. (2013). Development and assessment of healthy properties of meat meat products designed as functional foods. *Meat Sci*, 95: 919-930.
- O'Sullivan, C.M., Barbut, S., Marangoni, A.G. (2016). Edible oleogels for the oral delivery of lipid soluble molecules: Composition and structural design considerations. *Trends Food Sci Technol*, 57: 59-73.
- Öğütcü, M., Yılmaz, E. (2012). Margarinlere Alternatif Olabilecek Yeni Bir Ürün: Oleojeller-I. *Dünya Gıda*, 01: 68-73.
- Panagiotopoulou, E., Moschakis, T., Katsanidis, E. (2016). Sunflower oil organogels and organogel-in-water emulsions (part II) : Implementation in frankfurter sausages. *LWT-Food Sci Technol*, 73: 351-356.
- Paneras, E.D., Bloukas, J.G. (1994). Vegetable oils replace pork backfat for low-fat frankfurters. *J Food Sci*, 59(4): 725-728.
- Patel, A.R., Dewettinck, K. (2016). Edible oil structuring: An overview and recent updates. *Food Funct*, 7: 20-29.
- Patel, A.R., Dewettinck, K. (2015). Comparative evaluation of structured oil systems: Shellac oleogel, HPMC oleogel, and HIPE gel. *Euro J Lipid Sci Technol*, 117(11): 1772-1781.
- Patel, A.R., Cludts, N., Sintang, M.D.B., Lesaffer, A., Dewettinck, K. (2014). Edible oleogels based on water soluble food polymers: preparation, characterization and potential application. *Food Funct*, 5(11): 2833-2841.
- Pernetti, M., Malssen, K., Kalnin, D., Flöter, E., Bot A. (2007a). Structuring of edible oils by alternatives to crystalline fat. *Curr Opin Coll Int Sci*, 12: 221-231.
- Pernetti, M., Malssen, K., Kalnin, D., Flöter, E. (2007b). Structuring edible oil with lecithin and sorbitan tri-stearate. *Food Hydrocoll*, 21: 855-861.
- Pieve, S., Calligaris, S., Co, E., Nicoli, M.C., Marangoni, A.G. (2010). Shear Nanostructuring of monoglyceride organogels. *Food Biophys*, 5: 211-217.
- Poyato, C., Astiasaran, I., Barriuso, B., Ansorena, D. (2015). A new polyunsaturated gelled emulsion as replacer of pork back-fat in burger patties: Effect on lipid composition, oxidative stability and sensory acceptability. *LWT-Food Sci Technol*, 62: 1069-1075.
- Poyato, C., Ansorena, D., Berasategi, I., Navarro-Blasco, I., Astiasaran, I. (2014). Optimization of a gelled emulsion intended to supply ω -3 fatty acids into meat products by means of response surface methodology. *Meat Sci*, 98: 615-621.
- Rogers, M.A., Wright, A.J., Marangoni, A.G. (2009a). Nanostructuring fiber morphology and solvent inclusions in 12-hydroxystearic acid / canola oil organogels. *Curr Opin Coll Int Sci*, 14: 33-42.
- Rogers, M.A. (2009b). Novel structuring strategies for unsaturated fats – Meeting the zero-trans, zero-saturated fat challenge: A review. *Food Res Int*, 42: 747-753.
- Shapiro, Y.E. (2011). Structure and dynamics of hydrogels and organogels: An NMR spectroscopy approach. *Prog Polym Sci*, 36: 1184-1253.

- Stortz, T., Zetzl, A., Barbut, S., Cattaruzza, A., Marangoni, A.G. (2012). Edible oleogels in food products to help maximize health benefits and improve nutritional profiles. *Lipid Technol*, 24(7): 151-154.
- Toro-Vazquez, J.F., Mauricio-Perez, R., Gonzalez-Chavez, M.M., Sanchez-Becerril, M., Ornelas-Paz, J.J., Perez-Martinez, J.D. (2013). Physical properties of organogels and water in oil emulsions structured by mixtures of candelilla wax and monoglycerides. *Food Res Int*, 54: 1360-1368.
- Triki, M., Herrero, A.M., Rodriguez-Salas, L., Jimenez-Colmenero, F., Ruiz-Capillas, C. (2013). Chilled storage characteristics of low-fat, n-3 PUFA – enriched dry fermented sausage reformulated with a healthy oil combination stabilized in a konjac matrix. *Food Control*, 31(1): 158-165.
- Utrilla, M.C., Ruiz, A.G., Soriano, A. (2014). Effect of partial replacement of pork meat with an olive oil organogel on the physicochemical and sensory quality of dry-ripened. *Meat Sci*, 97: 575-582.
- Wassell, P., Bonwick, G., Smith, C.J., Almiron-Roig, E., Young, N.W.G. (2010). Towards a multidisciplinary approach to structuring in reduced saturated fat-based systems- a review. *Int J Food Sci Technol*, 45: 642-655.
- Yılmaz, E., Ögütçü, M. (2015). The texture, sensory properties and stability of cookies prepared with wax oleogels. *Food Funct*, 6(4): 1194-1204.
- Youssef, M.K., Barbut, S. (2011). Fat reduction in comminuted meat products-effects of beef fat, regular and pre-emulsified canola oil. *Meat Sci*, 87: 356-360.
- Youssef, M.K., Barbut, S. (2009). Effects of protein level and fat/oil on emulsion stability, texture, microstructure and color of meat batters. *Meat Sci*, 82: 228-233.
- Zetzl, A.K., Gravelle, A.J., Kurylowicz, M., Dutcher, J., Barbut, S., Marangoni, A.G. (2014). Microstructure of ethylcellulose oleogels and its relationship to mechanical properties. *Food Struct*, 2(1): 27-40.
- Zetzl, A.K., Marangoni, A.G., Barbut, S. (2012). Mechanical properties of ethylcellulose oleogels and their potential for saturated fat reduction in frankfurters. *Food Funct*, 3: 327-337.
- Zulim Botega, D.C., Marangoni, A.G., Smith, A.K., Goff, H.D. (2013). The potential application of rice bran wax oleogel to replace solid fat and enhance unsaturated fat content in ice cream. *J Food Sci*, 78(9): 1334-1339.

KONVANSİYONEL EKSTRAKSİYONA ALTERNATİF: YEŞİL TEKNOLOJİLER

Naciye Kutlu, Gülen Yeşilören*, Aslı İşçi, Özge Şakıyan

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

Geliş / Received: 31.01.2017; Kabul / Accepted: 12.06.2017; Online baskı / Published online: 11.07.2017

Kutlu, N., Yeşilören, G., İşçi, A., Şakıyan, Ö. (2017). Konvansiyonel ekstraksiyona alternatif: Yeşil teknolojiler. *GIDA* (2017) 42 (5): 514-526 doi: 10.15237/gida.GD17016

Öz

Ekstraksiyon, endüstriyel uygulamalar ve analitik amaçlar için oldukça önemlidir. Bu alandaki çalışmalar çoğunlukla gıdaların fonksiyonel özelliklerinin zenginleştirilmesinde kullanılan antosiyanin, fenolik bileşikler gibi gıda bileşiklerinin eldesinde yoğunlaşmaktadır. Bu noktada, çalışılan ekstraksiyon tekniğinin çevre dostu olması yanında, ekstraksiyonu hedeflenen bileşik üzerinde meydana gelebilecek olumsuz etkilerin de azaltılması önem taşımaktadır. Bu amaçla birçok yeni teknik geliştirilmekte ve çeşitli gıdalarda çalışmalar yürütülmektedir. Son yıllarda, geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine alternatif olarak geliştirilen yeşil ekstraksiyon yöntemleri ile solvent kullanımının ve ekstraksiyon süresinin azaltılması yanında verimin artırılması da hedeflenmektedir. Bu derleme, son yıllarda sıklıkla kullanılan yeşil ekstraksiyon tekniklerinin (mikrodalga, ultrases, yüksek basınç, vurgulu elektrik alan, ohmik ve süperkritik akışkan ekstraksiyon) prensiplerine, avantajlarına ve kullanım alanlarına odaklanmaktadır.

Anahtar kelimeler: Mikrodalga destekli ekstraksiyon, ultrases destekli ekstraksiyon, ohmik destekli ekstraksiyon, vurgulu elektrik alan destekli ekstraksiyon, yüksek basınç destekli ekstraksiyon, süperkritik akışkan ekstraksiyon.

ALTERNATIVE TO CONVENTIONAL EXTRACTION: GREEN TECHNOLOGIES

Abstract

Extraction is an important method for analytical and industrial applications. The studies related to this subject mostly focus on the extraction of compounds such as anthocyanins, phenolic compounds which can be used for the production of functional foods. It is important to protect not only the extracted compounds from the adverse effects of extraction but also the environment by employing green extraction techniques. Hence, new technologies are being developed and studies are being conducted with different foods. Recently, it is aimed to reduce the solvent consumption and extraction time by employing new green extraction methods which are developed as alternatives to conventional methods. This article reviews the most commonly employed green extraction methods (microwave, ultrasound, high pressure, pulsed electric field, ohmic and supercritical fluid extraction) by focusing on the principals, advantages and applications of the new methods.

Keywords: Microwave assisted extraction, ultrasound assisted extraction, ohmic assisted extraction, pulsed electric field assisted extraction, high pressure assisted extraction, supercritical fluid extraction.

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ gulenyeshiloren@gmail.com,

☎ (+90) 505 632 5905,

☎ (+90) 0312 317 8711

GİRİŞ

Gıda proseslerinde ekstraksiyon, hammaddeden bir veya birden fazla değerli bileşenin ayrılması olarak tanımlanmaktadır (Lebovka vd., 2011). Ekstraksiyon işlemi gıda üretiminde çok önemli bir basamaktır. Birçok gıda üretim prosesinde ekstraksiyon işleminden yararlanılmaktadır. Örneğin ekstraksiyon işlemi, portakal kabuğundan pektin eldesinde (Hosseini vd., 2016), karanfilden esansiyel yağ eldesinde (Tekin vd., 2015) ya da mor patatesten antosiyanin eldesinde (Cai vd., 2016) kullanılmaktadır.

En çok kullanılan konvansiyonel yöntemler başta sokselet ekstraksiyonu olmak üzere maserasyon ve perkolasyondan oluşmaktadır. En eski ve geleneksel ayırma yönteminin sokselet ekstraksiyonu olduğu bilinmektedir (Herrero vd., 2010). 20. yy ortalarında revaçta olan bu yöntem, hala birçok laboratuvarında kullanılmakta olsa da, uzun saatler sürmesi, otomasyona uygun olmaması, yüksek solvent tüketimi, deney örneklerinin hazırlanmasındaki zorluklar gibi nedenlerden dolayı yerini daha modern tekniklere bırakmaktadır (Wan ve Wong, 1996).

Özellikle materyallerden biyoaktif maddelerin ayrıştırılmasında, çevre dostu olarak bilinen, yüksek kalite ve verimde ekstrakt eldesi sağlayan, geleneksel olmayan yöntemlerin kullanılması son 50 yıldır önem kazanmıştır (Azmir vd., 2013). Son yıllarda yapılan çalışmalara bakıldığında, mikrodalga destekli ekstraksiyon, enginardan biyoaktif karbonhidrat (inositol ve inulin) eldesinde (Ruiz-Aceituno vd., 2016), portakal kabuğundan pektin eldesinde (Hosseini vd., 2016), ultrases destekli ekstraksiyon karanfilden esansiyel yağ eldesinde (Tekin vd., 2015), mor patatesten antosiyanin eldesinde (Cai vd., 2016), ohmik destekli ekstraksiyon *Myrtus communis* ve nane bitkilerinden esansiyel yağ eldesinde (Gavahian vd., 2013; Gavahian vd., 2015), vurgulu elektrik alan destekli ekstraksiyon mantardan toplam polifenol eldesinde (Parniakov vd., 2014) ve kanola küspesinden polifenol eldesinde (Teh vd., 2015), yüksek basınç destekli ekstraksiyon domates atığından karetonoid eldesi (Strati vd., 2015) ve yeşil çaydan polifenol eldesinde (Xi vd., 2015), süperkritik akışkan ekstraksiyon ise Sandalos sakızının (*Tetraclinis articulata*) kimyasal kompozisyonunun belirlenmesinde (Herzi vd.,

2013) ve kavundan bazı değerli bileşiklerin eldesinde (Bimacr vd., 2016) kullanıldığı görülmektedir.

Bu çalışmada, modern ekstraksiyon yöntemleri başlığı altında, mikrodalga destekli, ultrases destekli, yüksek basınç destekli, ohmik destekli, vurgulu elektrik alan destekli ve süperkritik akışkan ekstraksiyon yöntemleri ve bunlar ile ilgili çalışmalar hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır. Tüm yöntemler için örnek çalışmalar Çizelge 1'de verilmiştir.

KONVANSİYONEL EKSTRAKSİYON

Konvansiyonel ekstraksiyon yöntemlerinin başında sokselet ekstraksiyonu gelmektedir. Maserasyon ve perkolasyon yöntemleri de diğer önemli konvansiyonel yöntemlerdendir. Sokselet ekstraksiyonu, katı-sıvı ekstraksiyon için kullanılan en eski ve en yaygın yöntemlerdendir. Sokselet ekstraksiyonunun, maliyet düşüklüğü, eş zamanlı birden fazla ve yüksek miktarda ekstrakt eldesi gibi avantajları bulunmaktadır. Soxhlet ekstraksiyonunun kullanımı oldukça kolaydır. Uzun işlem süresi, yüksek miktarda hammadde ihtiyacı ve olumsuz çevresel etkileri önemli dezavantajlarındandır. Ekstraksiyon boyunca örnek, yüksek sıcaklıklara uzun süre maruz kaldığından, sıcaklığa karşı hassas materyallerde kullanımı uygun değildir. Son yıllarda sokselet ekstraksiyon, diğer gelişmiş ekstraksiyon yöntemlerine destek olarak kullanılmaktadır (Luque de Castro ve Priego-Capote, 2010). Maserasyon yönteminde, örnek, gerekli boyut küçültme işlemlerinden sonra, solvent içerisinde çoğunlukla oda sıcaklığında belli bir süre bekletilerek ekstrakt elde edilmektedir. Maserasyon işlemi oldukça kolay ve ekonomiktir, fakat ürün verimi oldukça düşüktür (Cannell, 1998). Perkolasyon yönteminde ise, örnek perkolatöre konular ve belli zamanlarda içerisindeki solvent yenilenerek ekstraksiyon gerçekleştirilmektedir (Kayahan ve Tekin, 2006). Bu yöntem maserasyona göre daha etkilidir (Cannell, 1998). Perkolasyon sonucunda elde edilen ürün kalitesi çok yüksek olmasına karşın, uzun ekstraksiyon süresi ve aynı zamanda yüksek miktarlarda solvent kullanılması, bu yöntemin kullanımını sınırlayan nedenlerdendir. Bu yöntemler, özellikle hammaddeden yağ eldesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar (Handa vd., 2008). Ayrıca, yapılan çalışmalarda Sokselet

Çizelge 1. Alternatif ekstraksiyon yöntemleri ile ilgili son yıllarda yapılan çalışmalar

Yöntem	Matris	Ekstrakte edilen bileşik	Bağımsız değişkenler	Bağımlı değişkenler	Kaynak
Ultrases destekli ekstraksiyon	Şeker pancar melası	Fenolik bileşikler ve antosiyaninler	Solvent Sıcaklık (20-60 °C) Süre (30-90 dk)	Toplam fenolik madde miktarı Antioksidant aktivite (ABTS) Toplam antosiyanin miktarı	(Chen vd., 2015)
	Böğürtlen	Antosiyanin	Sıcaklık (25 ve 40 °C) Süre (15 ve 30 dk)	Toplam fenolik madde miktarı Toplam antosiyanin miktarı Toplam tanin miktarı Antioksidan aktivite (DPPH) Antioksidan aktivite (FRAP)	(Ivanovic vd., 2014)
	Kuş kirazı meyve suyu atığı	Antosiyanin	Süre (0-240 dk) Sıcaklık (20,45,70 °C) Solvent (0-50% etanol-su) Ultrason gücü (0-100W)	Toplam fenolik bileşik miktarı Antioksidan aktivite (DPPH)	(D'Alessandro vd., 2014)
	Ahududu	Antosiyanin	Katı:solvent oranı Ultrason gücü Süre	RSM ile optimizasyon	(Chen vd., 2007)
	Karadut şırası	Fitokimyasallar	Enzim konsantrasyonu Maserasyon süresi	RSM ile optimizasyon Toplam fenolik bileşik miktarı Toplam flavanoid miktarı Toplam antosiyanin miktarı - Renk Esmerleşme indeksi	(Tchabo vd., 2015)
	Şarap Tortusu	Fenolik bileşikler	Süre (10,20,30,40,50 dk) Sıcaklık (30, 40,50,60 °C) Solvent katı oranı (30:1, 40:1, 50:1)	Optimizasyon Toplam fenolik bileşik miktarı Toplam antosiyanin miktarı	(Tao vd., 2014)
Mikrodalga destekli ekstraksiyon	Üzüm kabuğu	Antosiyanin	Sıcaklık (50-150 °C) Solvent (50-80% metanol-su) Süre (5-20 dk.) Mikrodalga gücü (100-500 W) Ekstraksiyon hacmi (25-50 mL)	HPLC ile antosiyanin geri kazanımı	(Liazid vd., 2011)
	Pirinç tanesi	Fenolik bileşikler	Sıcaklık (125-175 °C) Mikrodalga gücü (500-1000 W) Süre (5-15 dk) Solvent Solvent:Katı oranı (20:1, 10:1)	RSM ile optimizasyon HPLC ile fenolik bileşiklerin tespiti	(Setyaningsih vd., 2015)
	Dut yaprağı	Polisakkaritler	Mikrodalga gücü (50, 150, 250W) Süre (5, 10,15 dk)	RSM ile optimizasyon FR-IR spektroskopisi ile polisakkarit analizi	(Thirugnanasambandham vd., 2015)
	Yabanmersini	Antosiyanin	Süre (2, 5, 8, 11, 14 dk) Sıcaklık (30,50,70,90,110 °C) Etanol konsantrasyon (%v/v, 0-100) Katı:solvent oranı (1:10 - 1:50)	Ekstraksiyon kinetiği -	(Zheng vd., 2013)
	Kiraz	Antosiyanin	Saflaştırma	HPLC ile antosiyaninlerin tespiti	(Grigoros vd., 2012)
	Vişne	Antosiyaninler ve fenolik asitler	Sıcaklık (50-70 °C) Süre (5-12 dk.) Güç (350-500 W)	RSM ile optimizasyon HPLC ile fenolik bileşiklerin tespiti	(Garofulic vd., 2013)

Çizelge 1. Alternatif ekstraksiyon yöntemleri ile ilgili son yıllarda yapılan çalışmalar

Yöntem	Matris	Ekstrakte edilen bileşik	Bağımsız değişkenler	Bağımlı değişkenler	Kaynak
Yüksek basınç destekli ekstraksiyonu	Siyah Havuç	Antosiyanin	Asitlendirilmiş su Sıcaklık (50, 75, 100 °C)	HPLC ile antosiyaninlerin tespiti	(Gizir vd., 2008)
	Nar Kabuğu	Polifenoller	Partikül büyüklüğü Sıcaklık	Toplam fenolik bileşik miktarı Antioksidan aktivite - Toplam flavanoid miktarı HPLC ile polifenollerin tespiti	(Çam ve Hışıl, 2010)
	Yabamersini atıkları	Fenolik bileşikler ve antosiyaninler	Solvent çeşidi	Toplam fenolik bileşik miktarı Antioksidan aktivite Toplam antosiyanin miktarı	(Paes vd., 2014)
	Mor tatlı patates	Antosiyanin	Solvent Süre	Renk Toplam antosiyanin miktarı RSM ile optimizasyon	(Truong vd., 2012)
	Üzüm Posası	Antosiyanin	Sabit basınç Süre Sıcaklık	Toplam fenolik bileşik miktarı Antioksidan aktivite - Toplam antosiyanin miktarı HMF	(Vergara-Salinas vd., 2015)
	Beyaz üzüm posası	Polifenoller	Solvent Sıcaklık Solvent oranı	RSM ile optimizasyon Toplam fenolik bileşik miktarı Antioksidan aktivite Toplam flavanoid miktarı	(Álvarez-Casas vd., 2014)
Ormik destekli ekstraksiyon	Kırmızı soğan	Antosiyanin	Sabit basınç Sabit sıcaklık	Verim Degradasyon	(Petersson vd., 2010)
	Pirinç kepeği	Esansiyel yağ	Elektrik alan kuvvetleri (60, 100 ve 140 V/cm) Nem içerikleri (%10.5, %21 ve %30)	Ekstraksiyon verimi Serbest yağ asidi	(Lakkakula vd., 2004)
	Kırmızı üzüm posası	Polifenol	Elektrik alan kuvvetleri (100-800 V/cm) Etanol/su oranı (%10, %20, %30 ve %50)	Ekstraksiyon kinetiği Toplam polifenol verimi	(El Darra vd., 2013)
Vurgulu elektrik alan destekli ekstraksiyon	Siyah pirinç kepeği	Antosiyanin	Elektrik alan kuvvetleri (50, 100, 150 ve 200 V/cm) Nem içerikleri (%30 ve %40)	Kimyasal analizler (nem, kül, ham protein, yağ, toplam diyet lif) Fiziksel özellikler (çözünürlük, renk ve yağın yoğunluk) Toplam antosiyanin miktarı	(Loypimai vd., 2015)
	Kırmızı pancar	Betalain	Elektrik alan kuvvetleri (375, 1000 ve 1500 V/cm) Süre (100 µs) Darbe sayısı (0-20)	Betalain miktarı Aktivasyon enerjisi	(Loginova vd., 2011)
	Mor tatlı patates	Antosiyanin	Elektrik alan kuvveti (1-5 kV/cm) Süre (3 µs) Darbe sayısı (3-35)	Ekstraksiyon verimi Toplam antosiyanin miktarı	(Puértolas vd., 2013)
Süperkritik akışkan ekstraksiyon	Yaban mersini	Meyve suyu verimi	Elektrik alan kuvvetleri (1, 3 ve 5 kV/cm) Süre (20 µs) Kare dalga	Toplam polifenol miktarı Toplam antosiyanin miktarı Antioksidan aktivite	(Lamauskas vd., 2015)
	Keçiboynuzu	Fenolik bileşik	Basınç (15-22 MPa) Sıcaklık (40-70 °C)	Antioksidan aktivite Toplam fenolik bileşik miktarı Ekstraksiyon verimi	(Bernardo-Gil vd., 2011)
	Kurutulmuş kekik	Esansiyel yağ	Basınç 35x10 ³ kPa Sıcaklık 35 °C	Antioksidan aktivite	(Rodriguez vd., 2013)
	Cennet hurması	Karotenoid	Basınç 100, 200 ve 300 bar Sıcaklık 40, 50 ve 60 °C Etanol oranı (%5, %15 ve %25) Akış hızı (1, 2 ve 3 mL/dk) Süre (30, 70 ve 110 dk)	Ekstraksiyon verimi Karotenoid miktarı	(Zaghdoudi vd., 2016)

ekstraksiyon çıktılarının diğer yöntemler ile karşılaştırılması ve değerlendirilmesi de tek başına kullanımını sınırlandırmıştır. Örneğin, Kala vd. (2017), karahindiba bitkisinden fenolik bileşik ekstraksiyonunda mikrodalga ekstraksiyon yöntemini kullanmışlardır ve sonuçlarını konvansiyonel yöntemlerden sokselet ekstraksiyonu ve maserasyon ile karşılaştırmışlardır. Sokselet ekstraksiyon ve maserasyon 36 saat boyunca devam etmiştir. Mikrodalga ekstraksiyon ile ise maksimum 6 dakika boyunca işlem yapılmıştır. En yüksek fenolik bileşik miktarı 6 dakika ekstraksiyon süresi ve 160 W mikrodalga gücü ile işlem gören örnekte görülmüştür. Toplam fenolik bileşik ve flavonoid verimleri karşılaştırıldığında mikrodalga ekstraksiyonunun sokselet ekstraksiyonuna göre sırasıyla %60 ve %25 daha yüksek olduğu görülmüştür.

MİKRODALGA DESTEKLİ EKSTRAKSİYON

Mikrodalgalar elektromanyetik spektrumda kızılötesi ışınlar ile radyo frekansları arasında 300 MHz-300 GHz frekans aralığında uzanmakta, dalga boyu ise 1-100 cm aralığındadır. Endüstriyel ya da bilimsel amaçla dört farklı frekans (915±25, 2450±13, 5800±75 ve 22125±125 MHz) kullanılmakla birlikte en yaygın olanları 915±25 ve 2450±13 MHz frekanslarıdır (Lebovka vd., 2011). Mikrodalgalar, iyonik parçacıkların göçü ya da dipolar parçacıkların rotasyonu ile moleküler bir harekete sebep olurlar. İyonik iletim, uygulanan elektromanyetik alandaki titreşen iyonların göç etmesi, dipol rotasyon ise polarize olmuş moleküllerin bir hizaya sokulması anlamına gelmektedir (Sumnu, 2001). Mikrodalga destekli ekstraksiyon iki farklı teknikte uygulanabilmektedir. Bunlardan ilki, kapalı kap uygulamalarıdır ve sıcaklık ve basınç kontrol altındadır, diğeri ise açık kap uygulamasıdır ve sistem atmosferik basınç altındadır (Gupta vd., 2012). Kapalı kap uygulamaları daha çok uçucu bileşen ekstraksiyonlarında uygulanmaktadır. Kapalı kap uygulamaları ile karşılaştırıldığında açık kap uygulamaları daha güvenlidir ve ayrıca daha fazla örnek ekstrakte etmeye olanak sağlamaktadır (Kaufmann ve Christen, 2002).

Mikrodalga destekli ekstraksiyon sistemi hızlı ısı üretimi sayesinde daha kısa sürede ve daha iyi kalitede ekstrakt elde edilmesine olanak sağlar

(Dahmoune vd., 2015; Setyaningsih vd., 2015). Ekstraksiyon süresini ve solvent tüketimini azalttığı, ekstraksiyon verimini ise arttırdığı bildirilmiştir (Svarc-Gajic vd., 2013). Yöntemin etkinliği ekstraksiyon süresine, sıcaklığa, sıvı-katı oranına, kullanılan çözücünün türüne ve konsantrasyonuna göre değişebilir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon koşulları ile ekstrakte edilmesi hedeflenen bileşiklerin kararlılığı ve kimyasal yapıları arasında net bir ilişki vardır. Örneğin fenolik bileşiklerin fazla sayıda hidroksil grubu içermeleri sebebiyle mikrodalga sırasında meydana gelen ani sıcaklık yükselmelerinden daha kolay etkilendiği tespit edilmiştir (Setyaningsih vd., 2015). Bununla birlikte yüksek mikrodalga gücü ve uzun süreler de hedef bileşiklerin degradasyonuna sebep olabilmektedir. Ayrıca solventin dielektrik özelliklerine göre ekstraksiyonun veriminin değişebileceği ve yüksek etanol içeriğinin mikrodalga ile kombine edildiğinde ekstraksiyonu olumsuz etkileyebileceği belirtilmiştir. (Zheng vd., 2013, Dahmoune vd., 2015; Setyaningsih vd., 2015). Mikrodalga gücü ve örnek miktarının ekstraksiyon verimine etkisinin incelendiği çalışmalar bulunmaktadır (Liazid vd., 2011; Setyaningsih vd., 2015; Thirugnanasambandham vd., 2015). Pirinç tanesinden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda denenen yöntemde kullanılan solvent ve sürenin, ekstraksiyon verimi üzerine etkili olduğu tespit edilmiş, optimum ekstraksiyon koşulları 1000 W mikrodalga gücüyle 20 dakika ekstraksiyon olarak belirlenmiş ve solvent olarak %100 metanol, 1:10 katı:solvent oranı önerilmiştir (Setyaningsih vd., 2015). Thirugnanasambandham vd. (2015) dut yaprağından polisakkaritlerin eldesi için mikrodalga destekli ekstraksiyonu denemiş ve örnek miktarının ekstraksiyon verimi üzerine etkili olduğunu belirtmişlerdir. Optimum örnek miktarının 20g olarak belirlendiği çalışmada bu değer üzerine çıkıldığında ekstraksiyon veriminin olumsuz etkilendiği tespit edilmiştir. Yabanmersini ile yapılan bir başka çalışmada verim üzerindeki en etkili paramatrenin katı:solvent oranı olduğu, bunu etanol konsantrasyonu ve ekstraksiyon sıcaklığının izlediği belirtilmiştir. Optimum ekstraksiyon koşulları 47 °C ekstraksiyon sıcaklığı 7 dakika ekstraksiyon süresi %55.5 (v/v) etanol konsantrasyonu ve 1:34 (g/mL) katı:sıvı oranı olarak belirtilmiştir (Zheng vd., 2013). Mikrodalga destekli ekstraksiyonun solvent kullanılmadan denendiği bir çalışmada ise 50 g

kiraz örneği 1000 W mikrodalga gücünde 180 saniye ekstrakte edilmiştir. Mikrodalga sayesinde hedeflenen bileşikler içeren hücreler parçalanmış ve hücre içerisindeki sıvı açığa çıkarılmıştır. Verimli, ekonomik ve çevre dostu bir yöntem olarak önerilmiştir (Grigoras vd., 2012).

ULTRASES DESTEKLİ EKSTRAKSİYON

Ultrases destekli ekstraksiyon sistemlerinin prensibi örneğe uygulanan akustik titreşimlerin içinden geçtiği sıvıda kavitasyon meydana getirmesi ve bu yolla partiküllerin kopması esasına dayanır (Cheok vd., 2013). Ultrases destekli ekstraksiyonun işlem süresini azaltabileceği ve fenoliklerin, antioksidanların ve antosiyaninlerin ekstraksiyonunda yüksek sıcaklığa ve uzun süreye ihtiyaç duyulan diğer ekstraksiyon türlerine göre daha etkili olabileceği bildirilmiştir (Chen vd., 2015).

Chen vd. (2015)'nin yaptığı bir çalışmada, şeker pancarı melasından fenoliklerin, antioksidanların ve antosiyaninlerin ultrases destekli ekstraksiyonunun optimizasyonunda yanıt yüzey yöntemi kullanılmıştır. Solvent olarak asitlendirilmiş etanolün kullanıldığı çalışmada, melas 35 kHz'de 450 W'da ultrasonik uygulamaya tabi tutulmuş ve optimum koşullar 1.55-1.72 mol/L HCl konsantrasyonu, %57-63 etanol konsantrasyonu, 41-48 °C ekstraksiyon sıcaklığı, ve 66-73 dakika ekstraksiyon süresi olarak belirlenmiştir. Düşük HCl konsantrasyonlarının, ultrases destekli ekstraksiyonda hücre duvarının parçalanması ve fenoliklerin ekstrakte edilmesinde faydalı olduğu rapor edilmiştir. Başka bir çalışmada benzer şekilde sonikasyon süresinin ve sıcaklığın ekstraksiyon verimini etkilediği bulunmuştur (Ivanovic vd., 2014). Asitlendirilmiş etanol ile oda sıcaklığında ve 40 °C'de ekstraksiyonun yüksek verimli (%5.3-6.3) ve hızlı (15-30 dk) olduğu ve 40 °C'de 30 dakika sonunda elde edilen ekstraktlarda antosiyaninlerin bozulmadığı belirtilmiştir. Şarap tortusundan fenoliklerin ekstraksiyonu için denenen yöntemde de ekstraksiyon süresi, sıcaklığı ve partikül büyüklüğünün verime etkili olduğu bulunmuştur. Fenoliklerin %90'ının 10 dakikalık ultrases uygulaması ile ekstrakte edilebildiği ve ekstraksiyon veriminin sıcaklık ile birlikte arttığı tespit edilmiştir. Ancak çok yüksek sıcaklıkların fenolik bileşiklere zarar verebileceğine de dikkat çekilmiştir (Tao vd., 2014). Ahudududan ultrases ile antosiyanin ekstraksiyonunun denendiği başka

bir çalışmada, geleneksel ve ultrases destekli ekstraksiyon sonunda meyveler SEM ile görüntülenmiş ve ultrases uygulamasının hücrelerde yüksek bir parçalanmaya sebep olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca ultrases destekli ekstraksiyonun verimi arttırmasına rağmen ekstraktların antosiyanin profilini değiştirmediği tespit edilmiştir (Chen vd., 2007).

YÜKSEK BASINÇ DESTEKLİ EKSTRAKSİYON

Basıncılı sıvı ekstraksiyonu literatürde hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu olarak da yer almaktadır. Solvent olarak suyun kullanıldığı teknik ise basınçlı su veya sub-kritik su ekstraksiyonu olarak adlandırılmaktadır. Bu ekstraksiyonun mekanizması yüksek oranda inert bir materyal (çoğunlukla kum) ve örnek ile doldurulmuş ekstraksiyon hücresinde birbirini takip eden dört sıralı adımda gerçekleşir. İlk adım, basınçlı ve yükseltilmiş sıcaklık koşulları altında örnek matrisindeki çeşitli aktif bölgelerden çözünenlerin ayrılmasıdır. İkinci basamak matris içindeki ekstraksiyon solventinin difüzyonunu içerir. Sonraki basamak örnek matrisine bağlı olarak çözünen maddeler ekstraksiyon solventine geçer ve son olarak ekstrakte edilen analit toplama kabında toplanır. Basıncılı sıcak su terimi suyun 100 °C ile 374 °C arasında yoğunluk faz bölgesini belirtmek için kullanılır. Ekstraksiyon süresince suyu yoğunluk fazda tutmak için 200 °C'de 15 bar 300 °C'de 85 bar gibi değerlerde basınç uygulaması gereklidir. 25 °C'de yaklaşık 80 olan suyun dielektrik sabiti, suyu yüksek sıcaklıkta sıvı fazda tutmak için gerekli basınçta (250 °C ve 50 bar), metanol ($\epsilon=33$) ve etanolün ($\epsilon=24$) 25 °C'de sahip olduğu dielektrik sabiti arasında bir değere kadar düşer ($\epsilon=27$). Bu koşullarda su geniş bir aralıkta polariteye sahip analitleri çözebilen organik bir çözücü gibi davranır (Teo vd., 2010). Suyun çözücü olarak kullanımı, yeşil prosesler için oldukça önemlidir. Çünkü su, toksik ve parlayıcı olmayan, güvenilir ve ucuz bir solventtir ve yüksek basınç ve sıcaklıkta hızlı ekstraksiyona olanak sağlamaktadır (Paes vd., 2014). Diğer yeşil ekstraksiyon tekniklerine benzer olarak en önemli avantajı organik solvent kullanımını azaltmasıdır. Bu ekstraksiyon yöntemi 5 ile 250 bar gibi çok geniş bir aralıkta uygulanabilmektedir (Kim vd., 2009; Ong vd., 2007; Ortiz vd., 2015). Ancak orta seviye basınçların (10-80 bar) ekstraksiyon verimliliği üzerine az

etkisi olduğu vurgulanmıştır (Teo vd., 2010). Bu yöntemde ekstraksiyonun etkinliği sıcaklık, basınç, ekstraksiyon süresi, partikül boyutu, solvent çeşidi, örnek miktarı gibi faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir.

Basınçlı sıvı ekstraksiyonu ile nar kabuğu (Çam ve Hışıl, 2010), yaban mersini posası (Paes vd., 2014), mor tatlı patates (Truong vd., 2012), kırmızı ve beyaz üzüm posası (Ivarez-Casas vd., 2014; Vergara-Salinas vd., 2015), kırmızı soğan (Petersson vd., 2010) ve siyah havuçtan (Gizir vd., 2008) fenolik bileşiklerin ve antosiyaninlerin ekstraksiyonu araştırılmıştır. Siyah havucun ekstraksiyonunda sülfirik asit kullanımının polimerizasyona ve esmerleşmeye neden olduğu, bu nedenle yüksek sıcaklıklarda yüksek verimli antosiyanin ekstraksiyonu için organik asitlerin daha uygun olduğu ve bu denemede laktik asit kullanımının en iyi sonucu verdiği bildirilmiştir (Gizir vd., 2008). Çam ve Hışıl (2010), tarafından yapılan çalışmada, nar kabuğu polifenollerinin ekstraksiyonunda basınçlı su ekstraksiyonu atmosferik basınçta su ekstraksiyonundan üç kat daha etkili bulunmuştur. Ekstraksiyonu etkileyen parametreler sıcaklık, süre, partikül boyutu olarak belirtilirken optimum koşullar; 40 °C sıcaklık, 5 dakika ekstraksiyon süresi ve 65 µm'den küçük olmamak üzere olabildiğince küçük partikül boyutu olarak bildirilmiştir. Üzüm posasında yapılan bir çalışmada ise sabit sıcaklık, basınç ve akış hızında (40 °C, 20 MPa ve 10 ml/min) farklı oranlarda su, asitlendirilmiş su, etanol ve aseton solvent olarak denenmiş ve en yüksek antioksidan aktivite ve fenolik bileşik konsantrasyonu etanol-su ve su kullanımında, en yüksek antosiyanin konsantrasyonu ise asitlendirilmiş su kullanımında bulunmuştur (Paes vd., 2014).

OHMİK DESTEKLİ EKSTRAKSİYON

Ohmik ısıtma, gıdanın içerisinde elektrik akımının geçişi ile uygulanan bir prosestir. Joule ısıtma, elektro ısıtma, elektriksel direnç ısıtma olarak da bilinmektedir. Ohmik ısıtma, gıdanın elektriksel direncine bağlı olarak, elektrik enerjisinin ısı enerjisine dönüşmesi ile gerçekleşmektedir. Başka bir deyişle, gıda, akıma karşı bir direnç gösterirken içerisinde ısı oluşumu görülmektedir. Bir gıdanın elektriksel direnci ne kadar yüksek ise o kadar homojen ısıtma sağlanmaktadır.

Dolayısı ile katı materyallerin iletkenliği daha yüksek olduğu için, proses koşulları doğru uygulanırsa, sıvı materyallere göre daha hızlı ısınmaktadır (Baysal vd., 2011). Ohmik ısıtmanın avantajlarından biri, gıdayı homojen olarak ve çok hızlı ısıtmasıdır. Isıtma sırasında yüzeyde sıcak bölgenin oluşmamasından dolayı sıcaklığa hassas materyaller için oldukça uygundur (Ramaswamy vd., 2014). Sistemin, yüksek kalitede ürün sağlaması, sessiz çalışması, partiküllü gıdalar içinde kullanılabilmesi, önemli diğer avantajlarından (Baysal vd., 2011). Ohmik ısıtmanın başarılı olabilmesi, öncelikle ısı üretim hızına, gıdanın elektriksel iletkenliğine, gıdanın bileşimine, elektrik alan şiddetine ve kalma süresine bağlıdır.

Ohmik ısıtma sistemlerinin, ekstraksiyon proseslerinde ön-işlem olarak kullanıldığı çalışmalara örnek olarak, Lakkakula vd. (2004)'nın, farklı elektrik alan şiddetleri (60, 100 ve 140 V/cm) ve nem içerikleri (%10.5, %21 ve %30) ile 60 Hz frekansta pirinç kepeğine ön-işlem uygulayıp, solvent ekstraksiyonu ile yağ ekstrakte etmeleri gösterilebilir. Ohmik ısıtma ile ön-işlem yapılan örneklerde verim %49-92 arasında değişmiş olup, ön-işlemsiz örneklerde verim %53 olarak bulunmuştur. El-Darra vd. (2013), kırmızı üzüm posasından vurgulu ohmik ısıtma destekli (VOI) ekstraksiyon ile polifenol elde etmişlerdir. 50 °C'de yapılan VOI işleminin, ekstraksiyon kinetiği ve toplam polifenol verimi üzerine belirgin bir etkisi olduğu gözlenmiştir. Loypimai vd. (2015) ise siyah pirinç kepeğinden, ohmik ısıtma destekli solvent ekstraksiyon ile antosiyanin elde etmişler ve ekstraktların doğal gıda boyası olarak kullanımı üzerine çalışmışlardır. Sonuçlar karşılaştırıldığında, ohmik destek kullanılarak elde edilen verim %19.67-%20.63 aralığında değişirken, buharlı solvent ekstraksiyon veriminin %17.64-%17.95 aralığında olduğu görülmüştür.

VURGULU ELEKTRİK ALAN DESTEKLİ EKSTRAKSİYON

Vurgulu elektrik alan, ısı olmayan gıda işleme yöntemlerinden biridir. Vurgulu elektrik alan sisteminin temel prensibi, elektrot arasına yerleştirilen gıdanın, mikro ya da milisaniye aralıklarla ve 10-80 kV/cm etki şiddet aralıklarında

kısa elektrik vurgulara maruz kalmasına dayanmaktadır. Geleneksel yöntemler ile karşılaştırıldığında vurgulu elektrik alan uygulamaları gıdanın kalite özellikleri için daha uygundur. Gıdanın duyuşsal ve fiziksel özelliklerindeki değişim, minimum düzeydedir (Mohamed ve Eissa, 2012). En büyük avantajlarında birisi, işlenmemiş gıdalarda, proses sıcaklığının düşük olmasından dolayı besin değeri, renk, tekstür ve aromayı en iyi şekilde koruyarak, mikroorganizmaların inaktivasyonunda etkin bir şekilde kullanılabilmesidir (Barbosa-Cánovas ve Zhang, 2001). Aynı zamanda vurgulu elektrik alan prosesinde enerji verimliliği yüksektir ve ürün daha az maliyet ile elde edilir. Son yıllarda özellikle biyolojik materyallerden, değeri bileşiklerin ekstraksiyonu çalışmalarında kullanılmaktadır (Dons vd., 2010; Lebovka vd., 2011; Martín-Belloso ve Soliva-Fortuny, 2011). Prosesin başarılı olabilmesi için elektrik alan gücü, vurgu şekli (üssel azalma veya kare dalga) ya da sayısı önemli faktörlerin başında gelmektedir (Loeffler, 2006). Üssel azalma vurgusu, zamanla elektrik alan gücünün artmasıyla artmakta ve hızlı bir şekilde maksimum noktaya ulaşır tekrar sıfıra inmektedir. Kare dalga ise, maksimum noktaya çıktıktan sonra belli bir süre o değerde kalmakta ve sonra sıfıra düşmektedir. Elektrik alanın uygulanması, hücre zarı boyunca kritik bir elektrik potansiyeline neden olmaktadır. Bu durum hücrenin yapısını hızlı bir şekilde bozmakta ve yapısal değişimlere neden olmaktadır (Angersbach vd., 2000).

Vurgulu elektrik alan prosesinin ekstraksiyon işlemlerinde kullanıldığı çalışmalara örnek olarak, kırmızı pancardan vurgulu elektrik alan destekli ekstraksiyon işlemi ile renklendirici eldesi üzerine çalışmalar gösterilebilir. Solvent olarak su kullanılan çalışmada, örnekler 10 mm kalınlığında ve 41 mm çapında hazırlanmış, 375, 1000 ve 1500 V/cm elektrik alan güçlerinde 100 mikro saniyelik 20 darbe uygulanmıştır. Sonuç olarak, vurgulu elektrik alan uygulamasının betalain ekstraksiyonunu arttırdığı ve ekstraksiyon süresini düşürdüğü bulunmuştur Loginova vd. (2011). Puértolas vd. (2013) mor patatesten antosiyanin eldesinde bu yöntemi uygulamışlardır. Çalışmada, 3.4 V/cm elektrik alan gücü ile 3 mikro saniyelik süreyle 35 darbe uygulamışlardır. Solvent olarak su ve etanol kullanmışlardır. En düşük ekstraksiyon sıcaklığında, solvent su olduğu halde, antosiyanin

veriminin çok yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bu yönüyle yöntemin çevreci özelliğine vurgu yapmışlardır. Lamanauskas vd. (2015) yaban mersinini, farklı elektrik alan güçlerinde (1, 3 ve 5 kV/cm) 20 mikro saniyelik kare dalgalara maruz bırakmışlardır. Vurgulu elektrik alan işleminin hücre geçirgenliğini etkilediğini belirtmişler ve elde edilen yaban mersini ekstraktında toplam polifenol, antosiyanin içeriği ve antioksidan aktivite değişkenlerini incelemişlerdir. Sonuç olarak, elektrik alan uygulanan örneklerde, uygulanmayan örneklere göre toplam polifenol, antosiyanin ve antioksidan aktivite veriminin, sırasıyla %8, %8.3 ve %16.7 oranlarında arttığı rapor edilmiştir.

SÜPERKRİTİK AKIŞKAN EKSTRAKSİYONU

Bir madde kritik sıcaklık (T_c) ve kritik basınç (P_c) değerleri üzerine çıkarıldığında katı, sıvı ve gaz fazları dışında bir faza geçmektedir. Bu faza geçen maddeye "süperkritik akışkan" adı verilmektedir. Süperkritik ekstraksiyonun çalışma prensibi, depolanan akışkan bir kompresör veya pompayla istenen basınca kadar sıkıştırılır ve istenen sıcaklığa gelmesi için bir ısıtıcıdan geçirilir. Sonra ekstraksiyon tankında bulunan ham maddeyle teması geçer ve bileşenlerden biri ya da daha fazlasını seçici olarak ekstrakte eder. İstenebileşikleri içeren çözücünün basınç ve sıcaklığı düşürülerek ayırma tankında ekstraktlar çöktürülür ve çözücüyle birbirinden ayrıştırılır. Çözücü prosese geri gönderilir ve ekstraktlar ayırma tankından alınır (Bozkurt, 2011). Daha basit bir ifadeyle, bir maddenin, süperkritik koşullardaki bir akışkan içinde çözünmesi ve daha sonra basınç azaltılarak ürünün akışkandan ayrılması olarak tanımlanmaktadır (Güvenç, 1997).

Süperkritik akışkanın en önemli özelliği, yoğunluğunun basınç ve sıcaklığa bağlı olarak değişebilmesidir. Kritik nokta civarında sıcaklık ya da basınç değerlerinde yapılan ufak değişimler, çözünürlük özelliğinde 100 kata varan değişimlere neden olabilmektedir (Çolak ve Tülek, 2003). Diğer bir önemli özelliği ise, ısıl iletkenlikleridir. Isıl iletkenlik (λ), sıcaklık, basınç ya da sıvının yoğunluğuna bağlı olarak değişmektedir ve süperkritik şartlarda ısıl iletkenlik sıcaklığın artması ile azalmaktadır (Balaban, 1989). Süperkritik akışkanlar kullanılacakları uygulamaya uygun olarak seçilmekte ve akışkanın ucuz olması,

kolay bulunabilmesi, yanıcı ve yakıcı olmaması, çevreye ve ürüne zararlı olmaması ve inert olması gibi özellikler aranmaktadır. Seçilecek akışkanın T_c ve P_c değerleri de enerji tüketimi açısından önem taşımaktadır (Nakamura vd., 1986). Süperkritik akışkan ekstraksiyonunun avantajlarından birisi, difüzyon katsayılarının yüksek ve viskozitelerinin düşük olmasından dolayı normal akışkanlara göre katılara daha hızlı nüfuz edebilmeleridir. Çözme gücünün sıcaklık veya basınç ile değişebilmesi ve bu değişikliğin kontrol edilebilir olması uygulamalar için çok önemlidir. Bu yöntemde kullanılan akışkan miktarı oldukça azdır (yaklaşık 1-2 g). Isıya karşı hassas olan ürünlerin ekstraksiyonunda da kullanımı oldukça uygundur ve çok az miktarda örnek ile analiz gerçekleştirilebilmektedir. Prosesin başarılı olabilmesi için kritik sıcaklık ve kritik basıncın uygun bir şekilde belirlenmesi çok önemlidir (Kayan, 2009).

Bernardo-Gil vd. (2011) öğütülmüş keçiyoynuzunu süperkritik CO_2 ile ekstrakte etmişlerdir. Elde edilen ekstraktların antioksidan kapasitesi ve toplam fenolik içeriği incelenmiştir. Verim açısından değerlendirildiğinde en iyi proses koşulları, 22 MPa basınç, 40 °C sıcaklık, 0.27 mm partikül boyutu ve 0.29 kg/h akış hızı olarak belirtilmiştir. Rodriguez vd. (2013), farklı sıcaklık ve hava hızlarında kurutulmuş kekik örneklerini süperkritik CO_2 ile ekstrakte etmiş ($T_c=35$ °C, $P_c=35 \times 10^3$ kPa) ve elde edilen esansiyel yağın antioksidan kapasitesini incelemişlerdir. Daha kısa sürede kurutulan örneklerden elde edilen ekstraktların, antioksidan kapasitesinin maksimum olduğu görülmüştür. Zaghdoudi vd. (2016), cennet hurması meyvesinden, süperkritik CO_2 ekstraksiyon yöntemi ile karotenoid elde etmişlerdir. CO_2 sıcaklığı, basınç, akış hızı, etanol oranı ve ekstraksiyon süresinin ekstraksiyona etkilerini, yüzey yanıt yöntemi ile incelemişlerdir. En iyi ekstraksiyon verimi, 300 bar basınç, 60 °C sıcaklık, %25 etanol oranı, 3 ml/dk akış hızı ve 30 dakika ekstraksiyon süresi koşullarında elde edilmiştir. Sokselet ekstraksiyonu ile karşılaştırıldığında, süperkritik akışkan ekstraksiyonunun ortalama %135 daha yüksek verime sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

SONUÇ

Sonuç olarak, ekstraksiyon yöntemleri her geçen gün yenilenerek ve çevreye daha az olumsuz etki gösterecek şekilde gelişmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda etkili bulunan yöntemlerin, mikrodalga destekli, ultrases destekli, ohmik destekli, vurgulu elektrik alan destekli, yüksek basınç destekli ve süperkritik akışkan ile yapılan ekstraksiyon olduğu görülmüştür. Alternatif yöntemler, konvansiyonel yöntemler ile kombine olarak da kullanılabilir. Bu şekilde kombine kullanım, sadece geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinin kullanıldığı çalışmalara göre, zaman tasarrufu, düşük solvent tüketimi ve kaliteli son ürün elde edilmesine olanak sağlamaktadır. Araştırma aşamasında olan alternatif yöntemler geliştirilerek endüstriyel olarak da kullanıma geçebilecek ve etkileri daha iyi görülecektir.

KAYNAKLAR

- Ivarez-Casas, M., Garc a-Jares, C., Llompart, M., Lores, M. (2014). Effect of experimental parameters in the pressurized solvent extraction of polyphenolic compounds from white grape marc. *Food Chem*, 157, 524-532.
- Angersbach, A., Heinz, V., Knorr, D. (2000). Effects of pulsed electric fields on cell membranes in real food systems. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 1(2), 135-149.
- Azmir, J., Zaidul, I., Rahman, M., Sharif, K., Mohamed, A., Sahena, F., Omar, A. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *J Food Eng* 117(4), 426-436.
- Balaban, M. (1989). Supercritical extraction: Recovering process materials. *Agr Eng*, 24-25.
- Barbosa-Cánovas, G.V., Zhang, Q.H. (2001). *Pulsed electric fields in food processing: fundamental aspects and applications*: CRC Press.
- Baysal, T., İçier, F., Baysal, A. (2011). Güncel Elektriksel Isıtma Yöntemleri. *Sidas Yayınları, İzmir*.

- Bernardo-Gil, M.G., Roque, R., Roseiro, L.B., Duarte, L.C., G rio, F., Esteves, P. (2011). Supercritical extraction of carob kibbles (*Ceratonia siliqua* L.). *J Supercrit Fluid*, 59, 36-42.
- Bimakr, M., Rahman, R.A., Ganjloo, A., Taip, F.S., Adzahan, N.M., Sarker, M.Z.I. (2016). Characterization of valuable compounds from winter melon (*Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn.) seeds using supercritical carbon dioxide extraction combined with pressure swing technique. *Food Bioprocess Technol*, 9(3), 396-406.
- Bozkurt, P.A. (2011). *Atık Lastik-Kömür Karışımlarının Piroлиз Ve Kritik Üstü Ekstraksiyonla Değerli Ürünler'e Dönüştürülmesi* (Doktora Tezi), Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Cai, Z., Qu, Z., Lan, Y., Zhao, S., Ma, X., Wan, Q., Li, P. (2016). Conventional, ultrasound-assisted, and accelerated-solvent extractions of anthocyanins from purple sweet potatoes. *Food Chem*, 197, 266-272.
- Cannell, R.J.P. 1998. *Natural Products Isolation*, Humana Press Inc 999 Rtvervtew Drive, Suite 208 Totowa, New Jersey, 475 s.
- Chen, F., Sun, Y., Zhao, G., Liao, X., Hu, X., Wu, J., Wang, Z. (2007). Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Ultrason Sonochem*, 14(6), 767-778.
- Chen, M., Zhao, Y., Yu, S. (2015). Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses. *Food Chem*, 172, 543-550.
- Cheok, C., Chin, N., Yusof, Y., Talib, R., Law, C. (2013). Optimization of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) extractions from mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) hull using ultrasonic treatments. *Ind Crops Prod*, 50, 1-7.
- Çam, M., Hışıl, Y. (2010). Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chem*, 123(3), 878-885.
- Çolak, N., Tülek, Y. (2003). Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu. *GIDA*, 28(3).
- D'Alessandro, L.G., Dimitrov, K., Vauchel, P., Nikov, I. (2014). Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) wastes. *Chem Eng Res Des*, 92(10), 1818-1826.
- Dahmoune, F., Nayak, B., Moussi, K., Remini, H., Madani, K. (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chem*, 166, 585-595.
- Dons, F., Ferrari, G., Pataro, G. (2010). Applications of pulsed electric field treatments for the enhancement of mass transfer from vegetable tissue. *Food Eng Rev*, 2(2), 109-130.
- El Darra, N., Grimi, N., Vorobiev, E., Louka, N., Maroun, R. (2013). Extraction of polyphenols from red grape pomace assisted by pulsed ohmic heating. *Food Bioproc Technol*, 6(5), 1281-1289.
- Garofulic, I.E., Dragovic-Uzelac, V., Jambrak, A.R., Jukic, M. (2013). The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. *Marasca*). *J Food Eng*, 117(4), 437-442.
- Gavahian, M., Farahnaky, A., Javidnia, K., Majzoobi, M. (2013). A novel technology for extraction of essential oil from *Myrtus communis*: Ohmic-assisted hydrodistillation. *J Essent Oil Res*, 25(4), 257-266.
- Gavahian, M., Farhoosh, R., Javidnia, K., Shahidi, F., Farahnaky, A. (2015). Effect of applied voltage and frequency on extraction parameters and extracted essential oils from *Mentha piperita* by ohmic assisted hydrodistillation. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 29, 161-169.
- Gizir, A.M., Turker, N., Artuvan, E. (2008). Pressurized acidified water extraction of black carrot [*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.] anthocyanins. *Eur Food Res Technol*, 226(3), 363-370.
- Grigoras, C.G., Destandau, E., Zubrzycki, S., Elfakir, C. (2012). Sweet cherries anthocyanins: An environmental friendly extraction and purification method. *Sep Purif Technol*, 100, 51-58.
- Gupta, A., Naraniwal, M., Kothari, V. (2012). Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *Int J Appl N Sci*, 1(1), 8-26.

- Güvenç, A. (1997). *Etanolün fermantasyon çözeltilisinden süperkritik CO₂ ile ekstraksiyonu*. (Doktora tezi), Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Handa, S.S., Khanuja, S.P.S., Longo, G., Rakesh, D.D. 2008. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants, International Centre For Science and High Technology, Trieste, Italy, 266 s.
- Herrero, M., Mendiola, J.A., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2010). Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *J Chromatogr A* 1217(16), 2495-2511.
- Herzi, N., Bouajila, J., Camy, S., Romdhane, M., Condoret, J.S. (2013). Comparison of different methods for extraction from *Tetraclinis articulata*: Yield, chemical composition and antioxidant activity. *Food Chem*, 141(4), 3537-3545.
- Hosseini, S.S., Khodaiyan, F., Yarmand, M.S. (2016). Optimization of microwave assisted extraction of pectin from sour orange peel and its physicochemical properties. *Carbohydr Polym* 140, 59-65.
- Ivanovic, J., Tadic, V., Dimitrijevic, S., Stamenic, M., Petrovic, S., Zizovic, I. (2014). Antioxidant properties of the anthocyanin-containing ultrasonic extract from blackberry cultivar "Cacanska Bestrna". *Ind Crops Prod*, 53, 274-281.
- Kala H. K., Metha R., Sen K. K., Tandey R., Mandal V. (2017). Strategizing method optimization of microwaveassisted extraction of plant phenolics by developing standard working principles for universal robust optimization. *Analytical Methods*, 9, 2089-2103.
- Kaufmann, B., Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochem Anal* 13(2), 105-113.
- Kayahan M, Tekin A. (2006). Zeytinyağı Üretim Teknolojisi. TMMOB Gıda Mühendisleri Odası, Kitaplar Serisi.15 198.s Ankara.
- Kayan, B. (2009). *Taxus baccata l'nin farklı ekstraksiyon yöntemleri ile ekstraksiyonu ve ekstraksiyon verimlerinin karşılaştırılması*. (Doktora tezi), Mersin Üniversitesi.
- Kim, J.W., Nagaoka, T., Ishida, Y., Hasegawa, T., Kitagawa, K., Lee, S.C. (2009). Subcritical water extraction of nutraceutical compounds from citrus pomaces. *Separ Sci Technol*, 44(11), 2598-2608.
- Lakkakula, N.R., Lima, M., Walker, T. (2004). Rice bran stabilization and rice bran oil extraction using ohmic heating. *Bioresource Technol*, 92(2), 157-161.
- Lamanauskas, N., Bobinaite, R., Satkauskas, S., Viskelis, P., Pataro, G., Ferrari, G. (2015). Pulsed electric field-assisted juice extraction of frozen/thawed blueberries. *Zemdirbyste-Agri*, 102(1), 59-66.
- Lebovka, N., Vorobiev, E., Chemat, F. (2011). *Enhancing extraction processes in the food industry*: CRC Press.
- Liazid, A., Guerrero, R., Cantos, E., Palma, M., Barroso, C. (2011). Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Food Chem*, 124(3), 1238-1243.
- Loeffler, M.J. (2006). Generation and application of high intensity pulsed electric fields *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry* (pp. 27-72): Springer
- Loginova, K., Lebovka, N., Vorobiev, E. (2011). Pulsed electric field assisted aqueous extraction of colorants from red beet. *J Food Eng*, 106(2), 127-133.
- Loypimai, P., Moongngarm, A., Chottanom, P., Moontree, T. (2015). Ohmic heating-assisted extraction of anthocyanins from black rice bran to prepare a natural food colourant. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 27, 102-110.
- Luque de Castro, M.D., Priego-Capote, F. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2383-2389.
- Martin-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R. (2011). Pulsed electric fields processing basics. In V. M. B.-C.G.H.Q. Zhang, V. Balasubramaniam, C.P. Dunne, D.F. Farkas, J. T. C. Yuan (Ed.), *Nonthermal processing technologies for food* (pp. 155-175): Blackwell Publishing Ltd.
- Mohamed, M.E.A., Eissa, A.H.A. (2012). Structure and Function of Food Engineering. In A.A. Eissa (Ed.), *Pulsed Electric Fields for Food Processing Technology* (pp. 275-306)
- Nakamura, K., Chi, Y.M., Yamada, Y. (1986). Lipase activity and stability in supercritical carbon dioxide. *Chem Eng Commun*, 45, 207-212.
- Ong, E.S., Heng, M.Y., Tan, S.N., Hong Yong, J.W., Koh, H., Teo, C.C., Hew, C.S. (2007). Determination of gastrodin and vanillyl alcohol in *Gastrodia elata* Blume by pressurised liquid extraction at room temperature. *J Sep Sci*, 30(13), 2130-2137. doi: 10.1002/jssc.200700002

- Ortiz, R.W.P., Benincá, C., Zanoelo, E.F. (2015). Cyclically pressurized extraction of solutes from ground coffee: Kinetic experiments and modeling. *Sep Purif Technol*, 141, 256-262.
- Paes, J., Dotta, R., Barbero, G.F., Mart nez, J. (2014). Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus L.*) residues using supercritical CO₂ and pressurized liquids. *J Supercrit Fluid*, 95, 8-16.
- Parniakov, O., Lebovka, N., Van Hecke, E., Vorobiev, E. (2014). Pulsed electric field assisted pressure extraction and solvent extraction from mushroom (*Agaricus bisporus*). *Food Bioprocess Technol*, 7(1), 174-183.
- Petersson, E.V., Liu, J., Sjöberg, P.J., Danielsson, R., Turner, C. (2010). Pressurized hot water extraction of anthocyanins from red onion: A study on extraction and degradation rates. *Analytica chimica acta*, 663(1), 27-32.
- Puértolas, E., Cregenzán, O., Luengo, E., Ivarez, I., Raso, J. (2013). Pulsed-electric-field-assisted extraction of anthocyanins from purple-fleshed potato. *Food Chem*, 136(3), 1330-1336.
- Ramaswamy, H.S., Marcotte, M., Sastry, S., Abdelrahim, K. (2014). *Ohmic heating in food processing*: CRC press.
- Rodriguez, J., Melo, E., Mulet, A., Bon, J. (2013). Optimization of the antioxidant capacity of thyme (*Thymus vulgaris L.*) extracts: Management of the convective drying process assisted by power ultrasound. *J Food Eng*, 119(4), 793-799.
- Ruiz-Aceituno, L., Garc a-Sarrió, M.J., Alonso-Rodriguez, B., Ramos, L., Sanz, M.L. (2016). Extraction of bioactive carbohydrates from artichoke (*Cynara scolymus L.*) external bracts using microwave assisted extraction and pressurized liquid extraction. *Food Chem*, 196, 1156-1162.
- Setyaningsih, W., Saputro, I., Palma, M., Barroso, C. (2015). Optimisation and validation of the microwave-assisted extraction of phenolic compounds from rice grains. *Food Chem*, 169, 141-149.
- Strati, I.F., Gogou, E., Oreopoulou, V. (2015). Enzyme and high pressure assisted extraction of carotenoids from tomato waste. *Food Bioprod Process*, 94, 668-674.
- Sumnu, G. (2001). A review on microwave baking of foods. *Int J Food Sci Technol*, 36(2), 117-127.
- Svarc-Gajic, J., Stojanovic, Z., Carretero, A.S., Román, D.A., Borrás, I., Vasiljevic, I. (2013). Development of a microwave-assisted extraction for the analysis of phenolic compounds from *Rosmarinus officinalis*. *J Food Eng*, 119(3), 525-532.
- Tao, Y., Wu, D., Zhang, Q.A., Sun, D.W. (2014). Ultrasound-assisted extraction of phenolics from wine lees: Modeling, optimization and stability of extracts during storage. *Ultrason Sonochem*, 21(2), 706-715.
- Tchabo, W., Ma, Y., Engmann, F.N., Zhang, H. (2015). Ultrasound-assisted enzymatic extraction (UAEE) of phytochemical compounds from mulberry (*Morus nigra*) must and optimization study using response surface methodology. *Ind Crop Prod*, 63, 214-225.
- Teh, S.S., Niven, B.E., Bekhit, A.E.D.A., Carne, A., Birch, E.J. (2015). Microwave and pulsed electric field assisted extractions of polyphenols from defatted canola seed cake. *Int J Food Sci Technol*, 50(5), 1109-1115.
- Tekin, K., Akalın, M.K., Şeker, M.G. (2015). Ultrasound bath-assisted extraction of essential oils from clove using central composite design. *Ind Crops Prod*, 77, 954-960.
- Teo, C.C., Tan, S.N., Yong, J.W.H., Hew, C.S., Ong, E.S. (2010). Pressurized hot water extraction (PHWE). *J Chromatogr A* 1217(16), 2484-2494.
- Thirugnanasambandham, K., Sivakumar, V., Maran, J.P. (2015). Microwave-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves. *Int J Biol Macromol*, 72, 1-5.
- Truong, V.D., Hu, Z., Thompson, R., Yencho, G.C., Pecota, K. (2012). Pressurized liquid extraction and quantification of anthocyanins in purple-fleshed sweet potato genotypes. *J Food Comp Anal*, 26(1), 96-103.
- Vergara-Salinas, J., Vergara, M., Altamirano, C., Gonzalez, J., Pérez-Correa, J. (2015). Characterization of pressurized hot water extracts of grape pomace: chemical and biological antioxidant activity. *Food Chem*, 171, 62-69.

Wan, H., Wong, M. (1996). Minimization of solvent consumption in pesticide residue analysis. *J Chromatogr A* 754(1), 43-47.

Xi, J., He, L., Yan, L. (2015). Kinetic modeling of pressure-assisted solvent extraction of polyphenols from green tea in comparison with the conventional extraction. *Food Chem*, 166, 287-291.

Zaghdoudi, K., Framboisier, X., Frochot, C., Vanderesse, R., Barth, D., Kalthoum-Cherif, J., Guiavarch, Y. (2016). Response surface methodology applied to Supercritical Fluid Extraction (SFE) of carotenoids from Persimmon (*Diospyros kaki L.*). *Food Chem*, 208, 209-219.

Zheng, X., Xu, X., Liu, C., Sun, Y., Lin, Z., Liu, H. (2013). Extraction characteristics and optimal parameters of anthocyanin from blueberry powder under microwave-assisted extraction conditions. *Sep Purif Technol*, 104, 17-25.

KARBONDİOKSİT UYGULAMASININ BEYAZ PEYNİR KALİTESİNE ETKİSİ*

Beyza Yıldız, Zübeyde Öner**

Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta/ Türkiye

Geliş / *Received*: 21.02.2017; Kabul / *Accepted*: 26.04.2017; Online baskı / *Published online*: 03.07.2017

Yıldız, B, Öner, Z. (2017). Karbondioksit uygulamasının beyaz peynir kalitesine etkisi. *GIDA* (2017) 42 (5): 527-534 doi: 10.15237/gida.GD17022

Öz

Bu çalışmada, süte karbondioksit uygulamasının beyaz peynir kalitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Çiğ süt, karbondioksit uygulanmış çiğ süt, ön ısıtma işlemi uygulanmış starter ilave edilmiş süt, ön ısıtma işlemi ile karbondioksit uygulanmış süt ve ön ısıtma işlemi ve karbondioksit uygulanmış starter ilave edilmiş süt ile 5 farklı peynir üretimi yapılmıştır. Bu peynirler 4°C'de 4 ay boyunca olgunlaştırılmış her ay fizikokimyasal değişimleri izlenmiştir. Uygulanan farklı peynir denemeleri ve olgunlaşma sürecinde ki değişimin açısından Beyaz peynir örneklerinin toplam kuru madde, kuru maddede yağ, kuru maddede tuz, pH, SH, toplam protein, suda çözünen protein, olgunlaşma indeksi üzerine etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Peynirlerde yapılan organik asit tayininde laktik asit ile beraber asetik, sitrik, pirtüvik ve malik asit saptanmış ve bu asitlerin olgunlaşma boyunca miktarlarının değişim gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Beyaz peynir, CO₂, kimyasal özellikler, organik asitler.

THE EFFECT OF CARBONDIOXIDE APPLICATION ON THE QUALITY OF BEYAZ CHEESE

Abstract

In this study; on Beyaz (White) cheese quality the effect of carbon dioxide application was investigated. Five different kind of cheese made of raw milk, raw milk with carbon dioxide application, starter added milk with pre-heating application, milk with carbon dioxide and pre-heating applications and starter added milk with carbon dioxide and pre-heating applications. These cheeses matured under 4°C for 4 months while their physicochemical analyses were determined. The effects of Beyaz cheese samples in terms of various cheese trials and changes of during maturation on total solid, fat, salt, SH, pH, total protein, water soluble protein, ripening index had statistically been found significant ($P < 0.05$). Acetic, citric, pyruvic and malic acids along with lactic acid have been found in the cheese and amount of these acids have been tracked during ripening period.

Keywords: Beyaz cheese, CO₂, chemical properties, organic acids.

* Bu çalışma, 2015 yılında 9. Gıda Mühendisliği kongresinde "Karbondioksit Uygulamasının Beyaz Peynir Kalitesine Etkisi" başlığıyla sözlü bildirim olarak sunulmuştur. Özeti kongre kitabında basılmıştır / *This study was presented as an oral declaration in the title of "The Effect of Carbon dioxide Application on the Quality of Beyaz Cheese" at the 9th Food Engineering Congress 2015. The abstract was printed in the congress book.*

** Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ beyzyildiz@hotmail.com, ☎ (+90) 246 211 1766, 📠 (+90) 246 211 1538

GİRİŞ

Beyaz peynir; inek, koyun ve keçi sütünden yapılan yarı sert ve salamurada olgunlaştırılan bir üründür (Hayaloğlu vd. 2002; Çelik ve Uysal 2009). Türkiye’de en fazla rağbet gören peynir çeşidi olup peynir üretiminin yaklaşık %70’lik kısmını oluşturmaktadır (Anonymous, 2013).

Değişen yaşam koşullarıyla beraber günümüzde tüketiciler taze veya çok az işlem görmüş, mikrobiyolojik açıdan güvenilir ve kararlı olan gıdaları tercih etmektedirler ve bu durum yeni işleme ve muhafaza tekniklerinin araştırılıp geliştirilmesine neden olmuştur. Geliştirilen bu yeni yöntemler seçilirken gıdaların tekstürüne, tat ve aromasına, rengine ve özellikle peynir gibi süt ürünlerinin doğal florasına ve daha sonra ilave edilen starter kültürlerle zarar vermemelidir.

Uygun koşullarda üretilen ve depolanan süt ürünlerinin büyük bir kısmı depolama süresince önemli bir değişime uğramazken, peynir, biyolojik olarak oldukça dinamik bir yapı göstermekte ve zamana bağlı olarak yapı, bileşim, mikrobiyolojik ve tekstürel özelliklerinde değişimler meydana gelmektedir (Atasoy vd. 2003). Gıdaların işlenmesi ve korunmasında uzun yıllar boyunca kullanılan ısıl işlemin gıdanın duyuşal özelliklerini ve besin içeriğini olumsuz etkileyebileceğinden soğuk pastörizasyon olarak da adlandırılan karbondioksit uygulaması günümüzde araştırılan bir konu haline gelmiştir. Çeşitli araştırmalar karbondioksitle muamele edilmiş sütteki gazın varlığının pıhtılaşma süresini ve pıhtılaşma için gereken maya miktarını da azalttığını ortaya koymuştur. Böylece araştırmacılar enzim kullanılarak koagüle edilen peynir üretiminde karbondioksit uygulamasının faydalı olduğunu bildirmişlerdir (Calvo vd. 1993; McCarney vd. 1995; Montilla vd. 1995; Uceda vd. 1994). Bu çalışmada karbondioksit uygulanmış süt kullanılarak beş farklı uygulama ile beyaz peynir üretilmiş ve peynirler 4 ay süreyle olgunlaştırılmıştır. Olgunlaşma boyunca peynirlerin kimyasal özelliklerindeki değişim aylık periyotlar halinde analiz edilerek belirlenmiş ve bu sayede karbondioksit uygulamasının Beyaz peynir kalitesine etkisi araştırılmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Araştırmada inek sütü kullanılarak peynir üretimi 2 tekerrür halinde yapılmıştır. 5 farklı beyaz peynir denemesi laboratuvar şartlarında üretilmiş ve steril kavanozlar içerisinde 4 °C’ de 120 gün süreyle depolanmıştır. 0. gün başlangıç olmak üzere 30, 60, 90 ve 120. günlerde fizikokimyasal analizleri izlenmiştir.

Peynir yapımında hayvansal şirden peynir mayası kullanılmış ve starter kültür ilave edilen peynirlerde ise *Lactococcus lactis* (% 1) + *Enterococcus faecium* (% 1) + *Lactobacillus plantarum* (% 1) içeren kültür kombinasyonu (Ertürkmen, 2014) kullanılmıştır.

Yöntem

Beyaz peynir üretimi Süleyman Demirel Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Süt Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiştir.

Peynir üretimi çiğ süt (1), karbondioksit uygulanmış çiğ süt (2), ön ısıl işlem uygulanmış, starter ilave edilmiş süt (3), ön ısıl işlem ve karbondioksit uygulanmış süt (4) ve ön ısıl işlem ile karbondioksit uygulanmış ve starter katılmış süt (5) olmak üzere 5 ayrı deneme peynir grubu şeklinde üretilmiştir. Çiğ süttten üretilen peynirler dışındaki peynir sütlerine 65-66 °C’de 11 dakika süreyle ön ısıl işlem yapılmış, karbondioksit ilavesi ise pH 6.02-6.03 seviyesine ininceye dek uygulanmıştır. Peynirler iki tekerrür, analizler iki paralel olarak yapılmıştır.

Peynirlerde yapılan fizikokimyasal analizler

Peynirlerde kuru madde tayini Anonymous (2000) Türk Gıda Kodeksi’ne göre, yağ tayini Gerber yöntemiyle Anonymous (1978)’e göre, tuz tayini Mohr titrasyon yöntemi Bradley (1992)’ye göre, titrasyon asitliği Soxhlet Henkel yöntemi, Anonymous (2006)’ya göre yapılmıştır. Toplam protein AOAC (1990)’a göre, suda çözünen protein IDF (1993)’e göre, olgunlaşma indeksi Alais (1984)’e göre yapılmıştır.

Organik asit tayini

Örnekler Kavaz vd. (2013)'e göre hazırlanmıştır Analiz Kaminarides vd. (2007)'in çalışmasından modifiye edilmiştir. HPLC (LC-20AT, Shimadzu) ile analiz yapılmıştır.

İstatistik değerlendirmeler

Peynir denemelerindeki istatistiksel analizler, SPSS version 18.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Depolamanın ardından olgunlaşma süresince peynir örnekleri arasındaki farklılığı belirlemek amacıyla tek değişkenli (Univariate) analiz yöntemine başvurulmuştur. Analiz sonucundaki önemli veriler Duncan çoklu karşılaştırma testine göre en az $P < 0.05$ önem düzeyinde test edilmiş ve peynir örnekleri gruplandırılmıştır.

Çizelge 1. Peynirlerde fizikokimyasal analiz sonuçları
Table 1. Physicochemical analysis results of the cheeses

		FARKLI PEYNİR DENEMELERİ / DIFFERENT CHEESE SAMPLES				
GÜNLER DAYS		1*	2	3	4	5
SH	0	92±0.0 ^{ABab}	77.5±6.4 ^{ABCb}	83.8±8.1 ^{Cab}	58.3±3.9 ^{Cc}	96±22.6 ^{Aa}
	30	75±4.2 ^{Ca}	73.5±0.0 ^{BCa}	64.8±7.4 ^{Db}	57.5±7.1 ^{Cb}	65±9.9 ^{Bb}
	60	83±3.5 ^{Ba}	79.8±5.3 ^{ABa}	79.8±10.3 ^{Ca}	67.3±8.1 ^{Bb}	74.5±6.4 ^{Bab}
	90	78±2.8 ^{Cb}	73±6.36 ^{Cb}	95.3±9.5 ^{Ba}	75.3±8.8 ^{Bb}	79.8±5.3 ^{Bb}
	120	77.3±5.3 ^{Cc}	81.3±3.2 ^{Abc}	107.3±4.6 ^{Aa}	88±7.8 ^{Ab}	81±8.5 ^{ABbc}
pH	0	4.9±0.19 ^{ABb}	4.9±0.13 ^{BCb}	4.9±0.24 ^{Ab}	5.3±0.03 ^{Aa}	4.9±0.15 ^{Ab}
	30	4.9±0.03 ^{ABb}	4.8±0.09 ^{Cb}	4.9±0.09 ^{Ab}	5.1±0.11 ^{Aa}	4.7±0.11 ^{Ac}
	60	4.8±0.25 ^{Bab}	4.6±0.23 ^{Db}	4.7±0.33 ^{ABa}	5.1±0.18 ^{ABa}	4.6±0.52 ^{Ab}
	90	4.8±0.03 ^{Ba}	5.1±0.19 ^{Aa}	4.8±0.29 ^{Aa}	4.8±0.42 ^{Ba}	4.8±0.31 ^{Aa}
	120	5±0.14 ^{Aa}	5.0±0.01 ^{ABa}	4.8±0.09 ^{Ab}	4.9±0.07 ^{Bab}	4.9±0.28 ^{Ab}
Kuru Madde (%) Total Solid (%)	0	47.1±2.45 ^{Aa}	48.3±1.8 ^{Aa}	47.0±3.82 ^{Aa}	47.6±1.1 ^{Aa}	40.6±3.3 ^{Ab}
	30	40.4±0.2 ^{Cab}	41.1±0.69 ^{Ba}	34.8±3.63 ^{Cc}	38.5±1.68 ^{Bb}	33.1±0.52 ^{Cc}
	60	42.9±0.29 ^{Bab}	44.7±7.25 ^{ABa}	40.4±1.5 ^{Bab}	42.4±6.8 ^{Bab}	37.4±3.11 ^{BCb}
	90	43.0±0.5 ^{Bab}	40.8±0.1 ^{Bbc}	44.8±0.57 ^{Aa}	39.6±4.9 ^{Bc}	35.9±0.84 ^{BCd}
	120	42.3±0.19 ^{Bab}	42.1±0.01 ^{Bab}	44.9±5.05 ^{Aa}	41.6±0.93 ^{Bb}	35.4±1.84 ^{BCc}
Kuru Maddede Yağ (%) Fat in Dry Matter (%)	0	54.6±3.91 ^{Ba}	52.4±3.39 ^{Bab}	53.5±0.21 ^{Bbc}	50.4±0.36 ^{Bcd}	51.3±2.47 ^{Bcd}
	30	52.6±1.18 ^{Ca}	52.9±1.70 ^{Cab}	49.8±6.16 ^{Cbc}	48.1±0.26 ^{Ccd}	46.9±0.30 ^{Cod}
	60	50.9±0.08 ^{Ca}	50.7±0.09 ^{Cab}	49.8±0.28 ^{Cbc}	49.5±0.36 ^{Cd}	49.5±0.59 ^{Cod}
	90	56.6±1.32 ^{Aa}	55.7±3.28 ^{ABa}	55.2±0.70 ^{Abc}	52.4±4.63 ^{Ad}	57.4±0.09 ^{Acod}
	120	57.6±2.66 ^{Aa}	54.3±3.69 ^{ABa}	54.5±3.71 ^{Abc}	53.5±5.44 ^{Ad}	50.7±5.36 ^{Acod}
Kuru Maddede Tuz (%) Salt in Dry Matter (%)	0	6.5±1.89 ^{Ba}	8.5±1.46 ^{Ba}	5.5±1.83 ^{Ca}	5.1±2.59 ^{Ba}	7.4±4.14 ^{Ca}
	30	11±0.27 ^{Acod}	12.2±0.88 ^{Ac}	15.5±1.86 ^{Ab}	9.8±0.97 ^{Ad}	17.9±0.88 ^{Aa}
	60	10.1±1.80 ^{ABab}	11.2±1.53 ^{ABa}	11.0±0.15 ^{Bab}	9.7±2.49 ^{Ab}	11.9±1.55 ^{Ba}
	90	11.6±3.21 ^{ABab}	11.9±0.06 ^{ABa}	9.8±1.35 ^{Bab}	9.3±1.78 ^{Ab}	12.4±2.35 ^{Ba}
	120	10.6±0.93 ^{Abc}	11.8±1.43 ^{ABa}	10.4±1.81 ^{Bbc}	9.8±0.19 ^{Ac}	12.9±2.09 ^{Ba}

*1. Çiğ süttten yapılan peynir, 2. Karbondioksit uygulanmış çiğ süttten yapılan peynir, 3. Ön ısıl işlem uygulanmış, starter ilave edilmiş süttten yapılan peynir, 4. Ön ısıl işlem ve karbondioksit uygulanmış süttten yapılan peynir, 5. Ön ısıl işlem ile karbondioksit uygulanmış ve starter katılmış süttten yapılan peynir. Küçük harfler peynir çeşitleri arasındaki farklılığı, büyük harfler ise peynir çeşitlerinin günler arasındaki farklılığı göstermektedir ($P < 0.05$).

*1. Raw milk cheese, 2. Cheese made from carbon dioxide treated raw milk, 3. Cheese made from pre-heating process and starter added milk, 4. Cheese made from milk with pre-heating process and carbon dioxide applications 5. Cheese made from pre-heat treated, starter added and carbon dioxide treated milk. Small letters describe difference between varieties of cheese, capital letters describe the difference between days of storage in each variety of cheese ($P < 0.05$).

Özer vd. (2002) çiğ koyun sütünden ürettikleri Urfa peynirinde toplam kuru madde değerinin depolama süresince azaldığını belirlemişlerdir.

Çiğ süttten yapılan 1 ve 2 numaralı peynirler karşılaştırıldığında karbondioksit uygulamasının kuru madde üzerine etkisi istatistiksel olarak önemsiz olarak bulunmuştur ($P > 0.05$). Ön ısı işlem uygulanmış 3, 4 ve 5 numaralı peynirler karşılaştırıldığında ise olgunlaşmanın başlangıcında 5 numaralı peynirin kuru madde değeri diğerlerinden farklı bulunmuştur ($P < 0.05$). Olgunlaşmanın sonunda ise ön ısı işlem uygulanmış tüm peynirlerde ki kuru madde oranı arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$) ve karbondioksit uygulamasının kuru madde miktarını azaltıcı yönde etki ettiği tespit edilmiştir. Araştırma sonuçlarına paralel olarak Beyaz peynirlerde yapılan diğer çalışmalarda da peynir asitliğindeki yüksek pH değerinin peynirin kuru madde miktarını azalttığı tespit edilmiştir. Berg ve Exterkate (1993), salamurada olgunlaştırılan peynirlerin pH değerlerinin 4.70-4.80 olması gerektiğini yüksek pH değerlerinde peynirin tekstüründe problem oluştuğunu bildirmişlerdir. Peynirin yumuşamaması için pH'nın düşük olması, enzimatik ve bakteriyel aktivitenin az olması gerekmektedir. Bu şartlar altında protein parçalanması az olmakta ve peynir tekstürünün yumuşaması gecikmektedir (Gobbetti vd. 2002). Olgunlaşma periyodunda çiğ süttten yapılan peynirlerin SH değerleri üzerine karbondioksit uygulamasının etkisi istatistik olarak önemsiz bulunmuşken ($P > 0.05$) ön ısı işlem uygulanmış peynirlerde önemli olarak bulunmuştur ($P < 0.05$). Olgunlaşma başlangıcında en düşük asitlik gelişimi ön ısı işlem ve karbondioksit uygulamasının yapıldığı peynir çeşitinde (4 numaralı) meydana gelmiştir. Olgunlaşma sonunda ise asitlik gelişimini karbondioksit uygulamasının etkilediği görülmektedir. Olgunlaşma sonunda en yüksek SH değeri 3 numaralı peynirde gözlenmiştir ve bu durum peynire ilave edilen starter kültürün aktivitesinin bir sonucu olarak değerlendirilmiştir. Olgunlaşma süresince peynirlerin pH değerlerinin düşmesi, yani asitlik derecesinin yükselmesi, kazeinin yapısında daha az su tutmasına yani peynirlerin kuru madde oranının artmasına neden olmaktadır. Beyaz peynirlerde depolama boyunca meydana gelen kuru maddede % yağ oranlarının değişimi incelendiğinde çiğ süttten

yapılan ve ön ısı işlem uygulanan tüm peynirlerde karbondioksit uygulamasının etkisi istatistik olarak önemsiz olarak bulunmuştur ($P > 0.05$). Buna bağlı olarak olgunlaşma boyunca örneklerin kuru madde oranlarındaki değişimle orantılı yağ oranlarında da değişim meydana geldiği görülmektedir. Peynirlerin kuru maddede yağ oranları olgunlaşma süresince artmış, bu durumun kuru madde oranlarındaki azalıştan kaynaklandığı birçok araştırmacı tarafından doğrulanmıştır. Peynirlerde tuz oranı peynirin aromasını, reolojisini, tekstürel özelliklerini ve toplam kalitesini önemli oranda etkilemektedir (Guinee, 2004). Peynir örneklerinin tuz içeriği olgunlaşma süresi boyunca artış göstermiştir. Karbondioksit uygulamasının kuru maddede % tuz oranına etkisi istatistik olarak önemsizdir ($P > 0.05$). Olgunlaşma sonunda tuz oranının en fazla olduğu 5 numaralı örneğin kuru madde değerinin de en düşük örnek olması yumuşak peynir kitlesine tuz geçişinin daha fazla olduğunu göstermektedir. Araştırmacılar asitlik arttıkça salamuradan çekilen tuz miktarındaki azalmanın nedenini, hem düşük pH'larda pıhtıdaki tuzun eriyebilirliğinin daha az olması, hem de yüksek asitlikte sineresiz artacağından peynirdeki nem içeriğinin azalması şeklinde açıklamaktadırlar (Guinee, 1993).

Farklı peynir denemelerinin olgunlaşma periyodu boyunca belirlenen toplam protein oranları ve değişimleri incelendiğinde protein değerlerinde bazen azalmalar bazen de artışlar görülmüştür. Çiğ süttten yapılan ve ön ısı işlem uygulanan süttten yapılan peynirler karşılaştırıldığında karbondioksit uygulamasının toplam protein miktarı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($P > 0.05$). Olgunlaşma periyodunca tüm peynir denemelerinde suda çözünen protein değerleri artış göstermektedir. Farklı peynirlerin depolama süresi içerisinde suda çözünen protein değerlerinin arttığı birçok araştırmacı tarafından bildirilmektedir (Keçeli vd. 2006; Yaşar, 2007). Peynirde suda çözünen protein miktarı oluşan asitlik ve proteoliz bakterilerin metabolik faaliyeti ile ilgilidir. Suda çözünen protein değerleri olgunlaşma periyodunca incelendiğinde karbondioksit muamelesinin etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($P > 0.05$). Olgunlaşma indeksi değerleri proteoliz boyunca olgunlaşmadaki değişimi ifade etmektedirler. Suda çözünür azotlu maddeler olgunlaşma süresince proteolize bağlı olarak gelişen peynir

Karbon dioksit uygulamasının Beyaz Peynir Kalitesine Etkisi

Çizelge 2. Peynirlerde toplam protein ve suda çözünen protein
Table 2. Total protein and soluble nitrogen concentrations of the cheeses

		FARKLI PEYNİR DENEMELERİ/DIFFERENT CHEESE SAMPLES				
GÜNLER DAYS		1	2	3	4	5
Toplam Protein(%) Total Protein(%)	0	14.5±2.62 ^{Aa}	14.6±2.43 ^{Aa}	10.9±0.0 ^{Ac}	15.1±0.8 ^{Ab}	13.2±0.1 ^{Ac}
	30	15.1±3.7 ^{ABa}	14.7±4.78 ^{ABa}	10.7±4.17 ^{ABc}	13.3±0.13 ^{ABb}	10.4±0.76 ^{ABc}
	60	16.2±2.02 ^{Ba}	14.8±1.07 ^{Ba}	9.7±1.52 ^{Bc}	11.7±2.34 ^{Bb}	9.7±2.65 ^{Bc}
	90	13.5±0.32 ^{Ba}	13.9±3.48 ^{Ba}	10.6±2.02 ^{Bc}	12.4±1.96 ^{Bb}	9.9±2.21 ^{Bc}
	120	13.6±0.04 ^{Ba}	13.6±3.12 ^{Ba}	10.9±0.76 ^{Bc}	10.8±1.52 ^{Bb}	10.7±1.27 ^{Bc}
Suda Çözünen Protein(%) Water Soluble Protein(%)	0	2.4±0.58 ^{Ea}	2.4±0.32 ^{Ea}	1.5±0.20 ^{Eb}	0.2±0.08 ^{Ec}	1.5±0.18 ^{Eb}
	30	2.6±0.83 ^{Da}	2.8±0.79 ^{Da}	2.7±0.94 ^{Db}	0.6±0.14 ^{Dc}	1.6±0.28 ^{Db}
	60	3.2±0.03 ^{Ca}	2.9±0.38 ^{Ca}	2.1±0.61 ^{Cb}	1.6±0.30 ^{Cc}	2.1±0.75 ^{Cb}
	90	3.4±0.18 ^{Ba}	3.7±0.39 ^{Ba}	2.9±0.54 ^{Bb}	2.2±0.36 ^{Bc}	2.8±0.67 ^{Bb}
	120	3.9±0.08 ^{Aa}	4.0±0.92 ^{Aa}	3.3±0.30 ^{Ab}	2.5±0.49 ^{Ac}	3.3±0.48 ^{Ab}
Olgunlaşma İndeksi(%) Ripening Index(%)	0	16.2±1.08 ^{Da}	16.3±0.55 ^{Da}	13.6±1.85 ^{Eb}	1.6±0.59 ^{Ec}	11.4±1.28 ^{Ed}
	30	17.2±1.34 ^{Da}	18.8±0.73 ^{Ca}	17.9±1.27 ^{Da}	4.1±1.00 ^{Dc}	15.6±1.60 ^{Db}
	60	19.6±2.2 ^{Cab}	19.3±1.16 ^{Cb}	21.8±2.92 ^{Ca}	13.3±0.07 ^{Cc}	21.7±1.7 ^{Cab}
	90	24.8±1.89 ^{Bb}	26.7±3.8 ^{Bab}	28.2±0.32 ^{Ba}	17.9±0.07 ^{Bc}	28.3±0.45 ^{Ba}
	120	29.1±0.69 ^{Ab}	29.8±0.1 ^{Aab}	30.8±0.64 ^{Aa}	22.9±1.27 ^{Ac}	30.6±0.85 ^{Aa}

1. çiğ süttten yapılan peynir, 2. karbondioksit uygulanmış çiğ süttten yapılan peynir, 3. ön ısıt işlem uygulanmış, starter ilave edilmiş süttten yapılan peynir, 4. ön ısıt işlem ve karbondioksit uygulanmış süttten yapılan peynir, 5. ön ısıt işlem ile karbondioksit uygulanmış ve starter katılmış süttten yapılan peynir

*Küçük harfle işaretlenmiş ortalamalar peynir çeşitleri arasındaki farklılığı, büyük harfle işaretlenmiş ortalamalar günler arasındaki farklılığı göstermektedir ($P < 0.05$).

1. raw cheese, 2. cheese made from carbon dioxide treated raw milk, 3. cheese made from pre-heating process and starter added milk, 4. cheese made from milk with pre-heating process and carbon dioxide applications 5. cheese made from pre-heat treated and starterd with carbon dioxide treated milk.

*Small letters describe difference between varieties of cheese, capital letters describe the difference between days of storage in each variety of cheese ($P < 0.05$).

tekstürü, tat-koku ve yapısı açısından olgunlaşma seyrine ilişkin önemli ipuçları veren bir parametredir (Ong vd. 2009). Olgunlaşma indeksi tüm peynir örneklerinde aylara göre artış göstermektedir. Çiğ süttten yapılan peynirler karşılaştırıldığında karbondioksit uygulamasının olgunlaşma indeksi üzerine etkisi istatistik olarak önemsizken ($P > 0.05$) ön ısıt işlem uygulanarak yapılan peynirlerde istatistik olarak fark bulunmuştur ($P < 0.05$). Ön ısıt işlem uygulanmış süttlerden yapılan peynirlerde başlangıçta karbondioksit uygulaması olgunlaşma düzeyini yavaşlatırken olgunlaşma sonunda bu durum etkisini kaybetmiştir. En düşük olgunlaşma düzeyi karbondioksit uygulaması ve ön ısıt işlemin yapıldığı ve starter kültürün ilave edilmediği 4. örnekte gözlenmiştir.

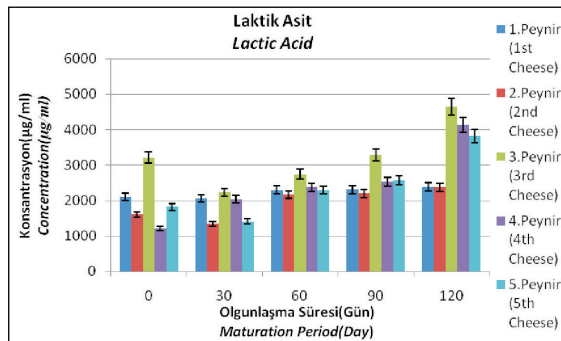
Organik asit analiz sonuçları

Süt ve ürünlerinin temel bileşeni olan yağ, protein ve süt şekeri olan laktoz serbest organik asitlerin oluşmasında kaynak teşkil eder ve genel olarak

lipoliz, proteoliz ve glikoliz reaksiyonları sonucunda serbest organik asitler meydana gelmiştir. Çalışma kapsamında yapılan tüm farklı peynir deneme gruplarında laktik asidin yanı sıra asetik, sitrik, pirüvik ve malik asitin miktarları ($\mu\text{g/ml}$) tespit edilmiştir.

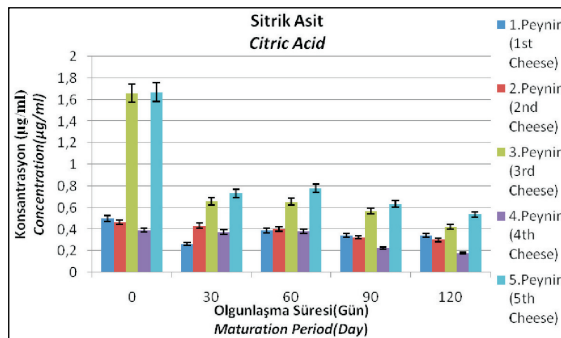
Şekil 1'de görüldüğü gibi laktik asit olgunlaşma periyodunun sonunda tüm peynirlerde artış göstermiştir. Çiğ süttten yapılan peynirlere ait sonuçlar incelendiğinde olgunlaşma periyodunun başlangıcında karbon dioksit uygulanmış süttten yapılmış peynirlerde daha az miktarda laktik asit meydana gelmişken olgunlaşmanın sonunda her iki peynirde birbirine yakın miktarda laktik asit meydana gelmiştir. Ön ısıt işlem uygulanmış süttten yapılan peynirlere ait sonuçlar karşılaştırıldığında olgunlaşmanın başlangıcında ve sonunda en fazla laktik asit starter kültürün ilave edildiği 3. örnekte meydana gelmiştir. Bu durum kullanılan laktik asit bakterilerinin laktozu parçalaması sonucunda meydana gelmiştir. Başlangıçta en düşük laktik asit 4 numaralı peynirdedir. Ön ısıt işlem ve

karbondioksit uygulamasının birlikte uygulandığı peynirlerde laktik asit bakterilerinin hem ısı işlem hem de karbondioksit uygulama sonucunda azalma göstermesi nedeni ile meydana gelmiştir. 4 numaralı peynirde laktik asit oluşumuna bağlı olarak başlangıçta pH değeri de diğer peynirlerden daha yüksek olarak bulunmuştur. Olgunlaşmanın sonunda ise 1 ve 2. örnekler ile 3 ve 5. örnekler karşılaştırıldığında laktik asit üretiminin çok fazla değişmediği görülse de karbondioksit uygulanan peynirlerde daha az miktarda laktik asit oluştuğu gözlenmiştir. Buradaki sonuçlar Ruas-Madiedo vd. (2002), çalışmaları ile paralellik göstermektedir.



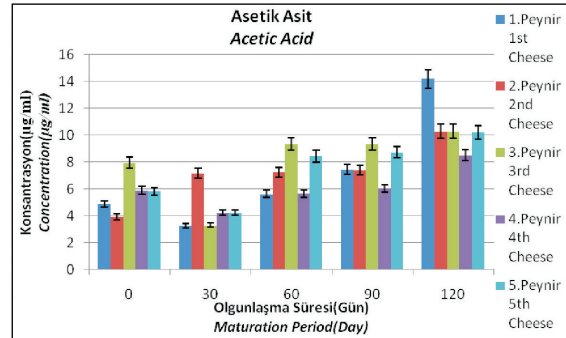
Şekil 1. Peynirlerde değişen laktik asit miktarları
Figure 1. Changes of lactic acid in cheeses

Sitrik asit üretimi olgunlaşma periyodunun başlangıcında ve sonunda en fazla (Şekil 2) starter kültür katılarak üretilen peynirlerde görülmüştür. Olgunlaşmanın sonunda tüm peynir çeşitlerinde sitrik asit miktarı azalmıştır. 3 ve 5. peynir karşılaştırıldığında karbondioksit uygulamasının sitrik asit üretimine olumsuz etkisinin olmadığı düşünülmektedir.

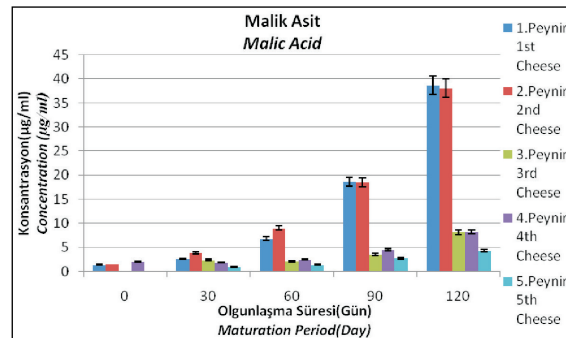


Şekil 2. Peynirlerde değişen sitrik asit miktarları
Figure 2. Changes of citric acid in cheeses

Peynir denemelerinin tümünde asetik asit (Şekil 3) ve malik asit (Şekil 4) miktarı olgunlaşma periyodu boyunca artış göstermiştir; fakat bu artış karbon dioksit uygulanmış sütlerden yapılan peynirlerde daha az olmuştur.

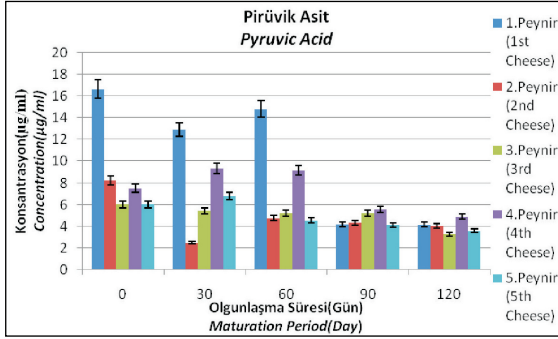


Şekil 3. Peynirlerde değişen asetik asit miktarları
Figure 3. Changes of acetic acid in cheeses



Şekil 4. Peynirlerde değişen malik asit miktarları
Figure 4. Changes of malic acid in cheeses

Şekil 5'te görüldüğü üzere pirüvik asit çiğ süten üretilen peynirlerde en yüksek oranda belirlenmiştir. Tüm peynirlerde olgunlaşma periyodunda pirüvik asit miktarı azalmıştır. Pirüvik asit, birçok organizmanın karbonhidrat, aminoasit ve sitrat metabolizmasında oluşan ara üründür. Mikroorganizmalar tarafından, alaninin oksidatif deaminasyonu ve laktozun parçalanması sırasında oluşur. Bu nedenle pirüvik asit miktarının bakteriyel parçalanmadan etkilenen süten biyokimyasal yapısını tayin etmek için uygun bir parametre olduğu düşünülmektedir. Pürüvat, fermantasyonda son ürün değil geçiş ürünüdür. Yani pürüvat miktarı metabolik aktiviteye bağlı olarak değişir. Pirüvik asit hem yağ, hem şeker hem de protein parçalanmasından meydana geldiği için mikrobiyolojik değerlendirmede pirüvik asit ölçü olarak ele alınır. Ruas-Madiedo vd. (2002), çalışmalarına paralel olarak çiğ süten yapılan peynirlerde daha yüksek oranlarda pirüvik asit tespit edilmiştir.



Şekil 5. Peynirlerde değişen pirüvik asit analiz miktarları
Figure 5. Changes of pyruvic acid in cheeses

SONUÇ

Bu çalışmada, 5 farklı deneme peynir grubu üretilmiş ve karbondiyoksit uygulamasının beyaz peynir kalitesine etkisi araştırılmıştır. Karbondiyoksit uygulaması yapılan sütlerde ilk pıhtının görülme anı kısalmış ve buna bağlı olarak kullanılan maya miktarı da azalmıştır. Olgunlaşma süresince organik asit miktarındaki değişim üzerine karbondiyoksit uygulamasının olumsuz bir etkisi belirlenmemiştir.

Uygulanan farklı peynir denemeleri ve olgunlaşma süresi boyunca peynir örneklerinin toplam kuru madde, kuru maddede yağ, kuru maddede tuz, pH, SH, toplam protein, suda çözünen protein ve olgunlaşma indeksinde meydana gelen değişim istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Ancak bu değişimlerin direk olarak karbondiyoksit ile muamelenin bir sonucu olmadığı tespit edilmiştir. Peynir örneklerinin çeşitli özellikleri göz önüne alınacak olunursa karbondiyoksit uygulamasının beyaz peynir üretiminde ön ısıtma işlem ve starter ilavesi gibi uygulamalarla kombine edilerek kullanılabilirliği; fakat beyaz peynir üretiminde karbondiyoksit uygulamasının endüstriyel düzeyde tek başına kullanımının yetersiz olduğu sonucuna varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (3704 - YL 1 - 13) tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Alais, C. (1984). Science Du Lait. 4. Edition, SEPAIC, Paris, 814 p.
- Anonymous (1978) Türk standartları enstitüsü, Peynirde Yağ Miktarı Tayini (Van Gulik Metodu), Ankara.
- Anonymous (2000). Türk gıda kodeksi. Çiğ süt ve ısıtma işlem görmüş içme sütleri tebliği (2000). 14 Şubat 2000 tarih ve 23964: 27-37 sayılı Resmi Gazete, Ankara.
- Anonymous (2006). Beyaz peynir standardı. Türk standartları enstitüsü, TS 591, Ankara.
- Anonymous (2013). Türkiye İstatistik Kurumu. Süt ve süt ürünleri raporu, sayı: 13461. Gıda, araştırmaları 14 (3): 149-154.
- AOAC (1990). Official methods of analysis, 15th Edition, Association of Official Analysis Chemists: Arlington, VA, USA.
- Atasoy, F., Özer, B., Türkoğlu, H. (2003). Çiğ ve pastörize inek sütlerinden üretilen geleneksel ve ultrafiltre Urfa peynirlerinde olgunlaşma ve tekstürel özellikler. GAP III. Tarım Kongresi, 02-03 Ekim 2003, Şanlıurfa, Türkiye, 55-60.
- Berg, G., Exterkate, F.A. (1993). Technological Parameters involved in Cheese Ripening. *Int Dairy J*, 3 (4-6): 485-507.
- Bradley, R.L., Arnold, E., Barbano, D.M., Semerad, R.G., Smith, D.E., Vines, B.K. (1992). Chemical and physical methods. In: Marshall, T. (ed.), standart methods for the examination of dairy products. American Public Health Association, Washington Dc, Pp, 433-531.
- Calvo, M.M., Montilla, M.A., Olano, A. (1993). Rennet clotting properties and starter activity on milk acidified with carbon dioxide. *J Food Protect*, 56, 1073-1076.
- Çelik, Ş., Uysal, Ş. (2009). Beyaz peynirin bileşim, kalite, mikroflora ve olgunlaşması. *Atatürk Univ Ziraat Fak Der*, 40 (1): 141-151.
- Ertürkmen, P. (2014). Beyaz peynir üretimi için starter kültür izolasyonu ve bu kültürlerin peynirin özellikleri üzerine etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi, Isparta, Türkiye, 107 s.

- Gobbetti, M., Morea, M., Baruzzi, R., Corbo, A., Matarante, T., Considine, R., Dicagno, T., Guinee, T.P., Fox, P.F. (2002). Microbiological, compositional, biochemical and textural characterisation of caciocavallo pugliese cheese during ripening. *Int Dairy J*, 12 (6): 511-523 [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00042-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00042-0)
- Guinee, T.P., Fox, P.F. (1993). Salt In Cheese: Physical, chemical and biological aspects. "In Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, General Aspects, Fox, P.F. (ed.), Chapman and Hall, London, England, Vol. 1, P, 257-302.
- Guinee, T.P. (2004). Salting and the role of Salt In Cheese. *Int J Dairy Technol*, 57, 99-109.
- Hayaloğlu, A.A., Güven, M., Fox, P.F. (2002). Microbiological biochemical and technological properties of Turkish White Cheese "Beyaz Peynir". *Int Dairy J*, 12, 635-648.
- IDF (1993). Milk determination of nitrogen content. IDF: 20B, International Dairy Federation, 41, Brussels, 12 p.
- Kaminarides, S., Stamou, P., Massouras, T. (2007). Changes of organic acids, volatile aroma compounds and sensory characteristics of Halloumi Cheese kept in brine. *Food Chem*, 200, 219-225.
- Kavaz, A., Bakırcı, İ., Kaban, G. (2013). Some physico-chemical properties and organic acid profiles of herby cheeses. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 19 (1): 89-95.
- Keçeli, T., Şahan, N., Yaşar, K. (2006). The effect of pre-acidification with citric acid on reduced-fat kashar cheese. *J Dairy Technol*, 61 (1): 32-36.
- Mccarney, T., Mullan, W.M.A., Rowe, M.T. (1995). Effect of carbonation of milk on cheddar cheese yield and quality. *Milchwissen*. 50, 670-674.
- Montilla, A., Calvo, M.M., Olano, A. (1995). Manufacture of cheese made from CO₂-treated milk. *Eur Food Res Technol*, 200, 289-292.
- Ong, L., Shah, N.P. (2009). Probiotic cheddar cheese: influence of ripening temperatures on survival of probiotic microorganisms, cheese composition and organic acid profiles. *Food Sci Technol*, 42, 1260-1268.
- Özer, B.H., Robinson, R.K., Grandison, A.S. (2002). Textural and microstructural properties of Urfa Cheese (a white-brined Turkish Cheese). *Int J Dairy Technol*, 56, 171-176.
- Ruas-Madiedo, P., Alonso, L., Delgado, T., Bada-Gancedo, J.C., De Los Reyes-Gavilan, C.G. (2002). Manufacture of Spanish hard cheeses from CO₂ treated milk. *Food Res Int*, 35, 681-690.
- Uceda, R., Picon, A., Guillen, A.M., Gaya, P., Medina, M., Nunez, M. (1994). Characteristics of manchego cheese manufactured from ewe raw milk preserved by addition of carbon dioxide or by activation of the lactoperoxidase system. *Milchwissen*. 49, 678-683.
- Yaşar, K. (2007). Farklı pıhtılaştırıcı enzim kullanımının ve olgunlaşma süresinin kaşar peynirinin özellikleri üzerine etkisi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana, Türkiye, 134 s.

ET VE ET ÜRÜNLERİNDE FOSFATLAR: İŞLEVLERİ VE İKAME OLANAKLARININ GÜNCEL ÇERÇEVDE DEĞERLENDİRİLMESİ

Burcu Öztürk*, Meltem Serdaroğlu

Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Bornova, İzmir, Türkiye

Geliş / *Received*: 06.03.2017; Kabul / *Accepted*: 26.04.2017; Online baskı / *Published online*: 07.07.2017

Öztürk, B., Serdaroğlu, M. (2017). Et ve et ürünlerinde fosfatlar: işlevleri ve ikame olanaklarının güncel çerçevede değerlendirilmesi, *GIDA* (2017) 42 (5): 535-545 doi: 10.15237/gida.GD17026

Öz

Et ve et ürünlerinde fosfatlar, su tutma kapasitesini yükselterek ürün verimini arttıran, renk, lezzet ve tekstürü geliştirme özelliğine sahip ve antioksidan etki gösteren çok fonksiyonlu ve ekonomik bileşiklerdir. Son yıllarda diyetle gıda katkı maddesi kaynaklı fosfatların yüksek oranda tüketiminin sağlık üzerinde önemli risklere neden olduğunun anlaşılması ile birlikte, fosfat kullanımının sınırlandırılması gerekliliği gündeme gelmiştir. Et ürünlerinde fosfatın gösterdiği farklı fonksiyonları karşılayabilme potansiyeli olan doğal bileşenlerin kullanımı ile ilgili araştırmalara ağırlık verilmiştir. Bu derlemede, fosfatların et ve et ürünlerinde başlıca işlevleri, diyetle fazla miktarda tüketimlerinin sağlık üzerine etkileri ve alternatif doğal bileşenlerle ikame olanaklarının tartışılması amaçlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Fosfat, polifosfat, ikame, sağlıklı et ürünü

PHOSPHATES IN MEAT AND MEAT PRODUCTS: CURRENT PERSPECTIVE ON EVALUATION OF THEIR FUNCTIONS AND REPLACEMENT POSSIBILITIES

Abstract

Phosphates are multi-functional and low-cost compounds enhancing product yield by increasing water holding capacity, improve colour, flavor and texture as well as having antioxidant functions. In recent years, due to health issues led by consuming highly amount of food additive sourced phosphates, necessary limitation of their usage has come into prominence. Recent studies have many focused on utilization of natural ingredients that have ability to meet different functions of phosphates in meat products. Within this review, it was objected to discuss the primary functions of phosphates, health impacts of excess dietary phosphate intake and replacement possibilities of phosphates with alternative natural ingredients in meat and meat products.

Keywords: Phosphate, polyphosphate, replacer, healthier meat products

* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ burcu.ozturk@ege.edu.tr,

☎ (+90) 232 311 3026,

☎ (+90) 232 342 7592

GİRİŞ

Et, yüksek biyoyararlılığa sahip protein ve esansiyel aminoasitleri içeren, demir, çinko gibi mineraller ve B vitaminlerinin ana kaynağı olan, besleyici değeri yüksek bir gıdadır. Yüksek aminoasit ve peptit içeriğinin yanı sıra et; biyoaktif hidrolizatlar, bağ doku bileşenleri, nükleotit ve nükleozitler, fitanik asit, konjuge linoleik asit ve antioksidanların da önemli bir kaynağıdır (Young vd., 2013). Günümüzde tüketim alışkanlıklarının değişmesi ve teknolojideki gelişmelere paralel olarak işlenmiş gıda üretim ve tüketimi oldukça yaygın bir hale gelmiştir. Bu doğrultuda, doğrudan tüketilebilen veya kısa sürede tüketime hazır hale getirilebilen et ürünlerine olan talebin de arttığı gözlenmektedir. Buna rağmen, et ürünleri üretiminde yüksek sıcaklık uygulamaları, kullanılan bazı katkı maddeleri ve ürünlerin doymuş yağ asidi ve kolesterol içeriğinin yüksek olması, önemli sağlık risklerini tetiklemekte ve tüketiciler üzerinde olumsuz izlenime neden olmaktadır (Jiménez-Colmenero vd., 2001; Young vd., 2013; Grasso vd., 2014; Hygreeva vd., 2014; Jiang ve Xiong, 2016). Et ürünleri; üretim, depolama ve pazarlama aşamalarında birçok kimyasal değişikliğe uğramakta, bu değişiklikler sonucunda ürün kompozisyonlarında artan doymuş yağ asidi içeriği, kolesterol ve tuz miktarının yanı sıra polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), nitrozaminler ve oksidasyon ürünleri gibi birçok zararlı bileşik oluşabilmektedir (Jiménez-Colmenero vd., 2001; Jiang ve Xiong, 2016). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından 2015 yılında yayınlanan raporda, işlenmiş et karsinojen (Grup-1) ve kırmızı et olası karsinojen (Grup-2A) olarak sınıflandırılmıştır (Jiang ve Xiong, 2016). Bu nedenle, asgari düzeyde işlem görmüş ve katkı maddesi kullanımı en aza indirilmiş "temiz etiket"li et ürünlerine olan talep artmakta ve yenilikçi üretim stratejilerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Et ve et ürünlerinde kimyasal katkı maddeleri kaynaklı potansiyel tehlikeleri en aza indirmek, daha sağlıklı ve fonksiyonel ürünler elde etmek için çeşitli stratejiler geliştirilmektedir. Bu stratejilerin bazıları;

-Karkas kompozisyonunun modifikasyonu (genetik seleksiyon, hayvan besleme yöntemlerinde modifikasyonlar ve hayvan gelişimini teşvik eden uygulamalar)

-Kullanılan hammadde kompozisyonunun değiştirilmesi (karkastan yağın tıraşlanarak uzaklaştırılması vb. uygulamalar),

-Ürünlerin yeniden formüle edilmesi;

-Hayvansal yağ ve kolesterol içeriğinin azaltılması ve yağ asidi kompozisyonunun modifiye edilmesi,

-Ürünün enerji değerinin düşürülmesi,

-Ürünün alerjenlerden arındırılması,

-Ürün formülasyonlarında bazı fonksiyonel bileşenlerin (diyet lifleri, oligosakkaritler, şekerler/alkoller, amino asit, peptid ve proteinler, glikozitler, izopren ve vitaminler, kolin, laktik asit bakterileri, mineraller, doymamış yağ asitleri, antioksidanlar) kullanımı

-Ürün formülasyonlarında sodyum, nitrit ve fosfat içeriğinin azaltılması veya bu katkı maddelerinin doğal bileşenler ile ikame edilmesi olarak sıralanabilir (Jiménez-Colmenero vd., 2001; Decker ve Park, 2010; Olmedilla-Alonso vd., 2013; Grasso vd., 2014; Hygreeva vd., 2014).

Yukarıda sıralanan tüm bu stratejiler göz önünde bulundurulduğunda, et ürünleri formülasyonlarında sıklıkla kullanılan katkı maddelerinden biri olan fosfatların ikame olanaklarının değerlendirilmesi güncel bir yaklaşım olarak ön plana çıkmaktadır. Et ve et ürünlerinde fosfatlar temel olarak; su bağlama özelliğinin geliştirilerek ürün veriminin artırılması, tekstür, renk, lezzet gibi kalite parametrelerinin iyileştirilmesi ve antioksidan fonksiyonları nedeniyle kullanılan katkı maddeleridir. Son yıllarda yapılan araştırmalara göre, fosfat tuzlarının neden olduğu birtakım sağlık riskleri nedeniyle ürün formülasyonlarında kullanım miktarlarının azaltılması veya etkilerini karşılama potansiyeli olan doğal bileşenlerle ikame edilmesi seçenekleri gündeme gelmiştir. Bu derleme kapsamında; fosfatların et ve et ürünlerinde etki mekanizması ve kullanım avantajları, diyetle yüksek oranda tüketimlerinin sağlık üzerine etkileri ve et ürünleri formülasyonlarında ikame olanaklarının değerlendirilmesine yönelik konuların güncel çalışmalar ışığında irdelenmesi amaçlanmıştır.

ET VE ET ÜRÜNLERİNDE FOSFATLARIN FONKSİYONLARI

Fosfatlar, fosforik asitin farklı kimyasal formlarda (ortofosfatlar, pirofosfatlar, tripolifosfatlar ve polifosfatlar) bulunabilen tuzlarıdır. Gıda katkı

maddesi olarak et ve et ürünlerinde kullanılan fosfatlar, temel olarak pH değerini yükselterek su tutma ve su bağlama kapasitesini arttıran bileşiklerdir. Fosfatlar kürlenmiş et ürünleri formülasyonlarında emülsiyon stabilitesi, jel oluşturma, pişirme verimi, gevreklik ve sululuk gibi kalite parametrelerini geliştirmekte, ambalaja sızıntıyı azaltmakta, lezzet ve renk stabilitesini korumakta, ayrıca yeniden yapılandırılmış et ürünlerinde protein çözünürlüğünü artırarak et parçalarının bağlanma özelliğini iyileştirmekte ve böylece son ürün veriminde artış sağlamaktadır (Hayes vd., 2006; Sebranek, 2008; Hurtado vd., 2011; Lampila, 2013; Petracci vd., 2013; Şimşek ve Kılıç, 2017).

Fosfatlar, et proteinlerinin fonksiyonel özelliğini birbirleri ile ilişkili olan birtakım yollarla geliştirebilmektedir:

1. pH değerini yükselterek ette son pH ve izoelektrik noktadaki pH değerleri arasındaki farkı arttırmakta ve böylece su tutma kapasitesinin artmasını sağlamaktadır.
2. Ölüm sertliği sırasında aktin ve miyosin arasında oluşan kalsiyum köprülerini yıkarak aktomiyosin kompleksini çözmektedir.
3. Kas proteinlerinde elektrostatik itme kuvvetini arttırarak, aktin ve miyosin arasındaki boşluğu genişletmekte ve bu boşluklarda daha fazla suyun tutulmasını sağlamaktadır.
4. İyonik kuvveti arttırarak kas fibrillerinin şişme özelliğini ve protein aktivasyonunu yükseltmektedir. İyonik kuvvetin artması, kas proteinlerinin negatif yüklü bölgelerinin serbest kalmasını sağlamakta ve böylece proteinlere daha fazla su molekülü bağlanabilmektedir (Desmond, 2006; Petracci vd., 2013).

Fosfatlar doğrudan antioksidan sınıfında incelenmemekle birlikte, özellikle nitrit içermeyen et ürünlerinde fosfatların lipit oksidasyonunu başlatan metalleri şelatlama aktiviteleri ile dolaylı olarak oksidasyona karşı koruyucu rol oynadıkları bilinmektedir (Molins, 1990; Detienne ve Wicker, 1999). Fosfatların antioksidan etkisi özellikle ısı işlem görmüş et ürünlerinde daha güçlü bir şekilde açığa çıkmakta, soğukta depolanan pişmiş et ve et ürünlerinde yeniden ısıtma sonucu oluşan ve arzu edilmeyen bayat-okside lezzet olarak tanımlanan "Warmed-Over Flavor (WOF)" problemi fosfat kullanımı ile azaltılabilmektedir (Trout ve Dale, 1990). Böylece fosfatlar lipit oksidasyonunu

sınırlandırmakta, renk koruyucu etki göstermekte ve oksidasyona bağlı acılaşmayı geciktirmektedir (Şimşek ve Kılıç, 2017). Ancak, ette doğal olarak bulunan fosfataz enzimi, fosfatları kısa zincir uzunluğuna sahip birimlere parçaladığı için fosfatların antioksidan etkisini kısıtlayabilmektedir (Jung vd., 2000). Bu nedenle, fosfatların et ürünleri formülasyonlarına enkapsüle edilerek taşınması, böylece fosfataz aktivitesinden korunması ve depolama boyunca antioksidan işlevlerinin sürdürülmesinin mümkün olduğu belirtilmiştir (Sickler vd., 2013; Kılıç vd., 2016).

Fosfatların yukarıda sıralanan işlevleri haricinde dolaylı olarak antimikrobiyel etkilerinin de olduğu belirtilmektedir. Bu etkinin, bakteri gelişimini kontrol altına alarak raf ömrünün uzamasına katkı sağlamasından kaynaklandığı belirtilmiş, ancak kürlenmiş et ürünlerinde kullanılan diğer mikrobiyel inhibitörlerin varlığından dolayı fosfatların antimikrobiyel etkisinin net olarak anlaşılamadığı bildirilmiştir (Ertaş, 1992; Sebranek, 2008). Lee vd. (1994) polifosfatların mikroorganizma hücre duvarına tutunarak Ca^{+2} ve Mg^{+2} metalleri ile şelat oluşturduğu ve bu metallerin salınmasını engelleyerek bakterisidal etki gösterebileceğini öne sürmüştür. Diğer bir varsayım ise polifosfatların mikroorganizma enzim sistemlerini inhibe ederek hücre zarından madde geçişini engellediği yönündedir (Ertaş, 1992). Buna ek olarak, sodyum asit pirofosfat gibi asidik fosfatlar ortam pH'sını düşürerek hücre duvarı bütünlüğü ve/veya hem/hemin kullanımını bozarak hücre morfolojisinde değişikliğe neden olmakta ve oksidatif stresi arttırarak antimikrobiyal etki göstermektedir (Şimşek ve Kılıç, 2017). Fosfatların mikrobiyal gelişimi engellemesinde etkili olan olası faktörler; fosfat tipi ve konsantrasyonu, ürünün pH değeri, NaCl miktarı, ortamda diğer inhibitörlerin (nitrit, askorbat, sorbat, vb.) varlığı, bulaşan tipi ve düzeyi, özel ürün bileşimleri, ısı işlem, depolama koşulları ve diğer bilinmeyen değişkenlerdir (Ertaş, 1992). Farklı gıdalarda %0.2-0.8 oranında polifosfat kullanımının *Salmonella*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* ve *Clostridium* türleri üzerinde inhibitör etkilerinin olduğu belirtilmektedir (Akhtar vd., 2008). Et ürünlerinde fosfat kullanımının birincil amacı mikrobiyal inhibisyonu sağlamak olmadığından, fosfatların etkilerini öncelikli olarak fiziksel, kimyasal, duyuşsal ve teknolojik kalite bakımından değerlendirmek gerektiği düşünülmektedir.

Fosfatlar, yapılarına göre genel olarak dört ana grupta incelenebilmektedir:

1. Ortofosfatlar: En basit yapıdaki grup olup, tekli fosfat (PO_4) birimlerinden oluşmaktadır. İşlenmiş et ürünlerinde sodyum veya potasyum tuzları kullanılabilir. Ortofosfatların birçoğu (asidik monosodyum ve monopotasyum fosfat hariç) alkalidir. Alkali ortofosfatların %1'lik çözeltilerindeki pH değeri 9.1-11.9 aralığındadır.

2. Pirofosfatlar: Basit fosfat birimleri, ikili fosfat birimleri (difosfat) ile birleşerek daha uzun zincirler halinde pirofosfatları oluşturmaktadır. Çoğu alkali olup (kürlenme reaksiyonunu hızlandıran sodyum asit pirofosfat hariç) sodyum veya potasyum tuzları halinde kullanılabilir. Alkali pirofosfatların %1'lik çözeltilerindeki pH değeri 9.9-10.7 aralığındadır.

3. Tripolifosfatlar: Uzun zincirli, üçlü fosfat zincirlerinden oluşan fosfatlardır. Sodyum veya potasyum tuzları halinde kullanılabilen, ancak suda çözünürlükleri önemli ölçüde değişebilmektedir. %1'lik çözeltilerindeki pH değeri 9.5-10.2 arasındadır.

4. Polifosfatlar: 10-25 fosfat biriminden oluşan daha uzun zincirli fosfatlar olup, %1'lik çözeltilerindeki pH değeri 6.3-7.7 arasındadır (Molins, 1990; Çakmakçı, 1994).

Bu grupların dışında incelenen metafosfatlar, halka yapısında olan ve gıdalarda kullanım alanı olmayan çoklu fosfat birimleridir. Sodyum heksametafosfat, aslında gerçek bir metafosfat olmayıp, 10-15 fosfat biriminden oluşan bir polifosfattır (Molins, 1990).

Et endüstrisinde birçok polifosfat yaygın olarak kullanılmakta olup, bu fosfatların karakteristik özelliklerine göre işlevleri farklılık gösterebilmektedir. Düşük polimerizasyon derecesine sahip mono ve difosfatlar su tutma kapasitesinin artmasını sağlamakta, ancak bu fosfatların düşük çözünürlükte olmaları özellikle soğuk marinasyonda kullanımlarını sınırlamaktadır. Buna karşın, tripolifosfatlar oldukça kolay ve hızlı bir şekilde çözünmekte, ancak bu tip fosfatların ise su tutma kapasitesi üzerinde etki gösterebilmesi için öncelikle pirofosfatlara hidrolize olması gerekmektedir (Dusek vd., 2003). Bu nedenle et ve et ürünlerinde tipik olarak farklı zincir uzunluğunda alkali polifosfatların karışım halinde uygulanması

ve ürünün fonksiyonel özelliklerinin artırılması tavsiye edilmektedir (Dusek vd., 2003; Petracci vd., 2013).

Et ürünlerinde fosfatların tuz ile birlikte kullanımının protein fonksiyonelliğini arttırdığı bilinmektedir. Bu mekanizma şu şekilde özetlenebilir: Formülasyona eklenen tuzda ($NaCl$) bulunan klorür (Cl^-) iyonları miyofilamentlerin içerisine nüfuz ederek şişmelerini sağlamakta, sodyum (Na^+) iyonları ise filamentler arasında bir iyon bulutu oluşturmaktadır. Ortamda oluşan konsantrasyon farkı osmotik basıncın yükselmesine neden olmakta, aynı zamanda ortamda negatif yükün ve itme kuvvetinin artmasıyla filament boşluğu genişlemektedir. Bu ortama fosfatların ilavesi ile pH değeri yükselerek iyonik kuvvet artmakta, bunun yanı sıra aktomiyosin köprüleri yıkılmakta ve filament boşluğunun genişleyerek tuzun ortamda yarattığı değişikliklere benzer değişikliklerin oluşması sağlanmaktadır (Puolanne vd., 2001). Sonuç olarak kas proteinlerinin çözünürlüğü gelişmekte, çözünen proteinler daha yüksek oranda su bağlayabilmekte, ilave edilen yağı daha yüksek oranda emülsifiye edebilmekte ve böylece pişirme kayıpları azaltılabilmektedir (Dimitrakopoulou vd., 2005; Petracci vd., 2013). Fosfatlar ve tuzun arasındaki bu sinerjist etki, aynı zamanda bu bileşenlerin birbirleri yerine kullanılabilmesine olanak vermekte, bu nedenle fosfatlardan tuzu azaltılmış et ürünleri üretiminde yararlanılabilmektedir (Sofos, 1985; Jiménez-Colmenero vd., 2001; Ruusunen ve Puolanne, 2005; Sebranek, 2008; Petracci vd., 2013; Resconi vd., 2016). Ancak, fosfatların sağlık üzerine olumsuz etkilerinin son yıllarda önemli bir tartışma konusu haline gelmesi nedeniyle et ürünleri formülasyonlarında kullanılmaması konusunda artan bir eğilim bulunmaktadır.

DIYETTE YÜKSEK MİKTARDA FOSFAT TÜKETİMİNİN SAĞLIK ÜZERİNE ETKİLERİ

Diyette yüksek miktarda tuz tüketiminin sağlık üzerine olan olumsuz etkileri uzun zamandır bilinmesine rağmen, normal seviyelerin üzerinde fosfat tüketiminin neden olabileceği sağlık riskleri ile ilgili çalışmalara genel olarak 2000'li yılların başından itibaren ağırlık verilmiştir. Yapılan araştırmalar, diyetle yüksek oranda fosfat tüketiminin başta böbrek ve kemik hastalıkları riskini

yükselttiğini, bunun yanı sıra potansiyel kalp-damar ve akciğer hastalıklarını tetikleyebileceğini göstermektedir. Fosfatların vücutta kalsiyum, demir ve diğer metal iyonları ile bağlanarak çözünmeyen tuzları oluşturduğu ve bu minerallerin bağırsak yolunda emilimini azalttığı bildirilmiştir (Petracci vd., 2013). Bu nedenle yüksek oranda fosfat tüketimi vücutta kalsiyum, demir, magnezyum ve D vitamini dengesinin bozulmasına yol açabilmekte ve bu durumda damar kalsifikasyonu, böbrek fonksiyonlarında bozulma ve osteoporoz (kemik erimesi) riskleri tetiklenmektedir (Dimitrakopoulou vd., 2005; Petracci vd., 2013; Takeda vd., 2014; Uribarri ve Calvo, 2017; Watanabe vd., 2016). Kronik böbrek hastalıklarında, vücuda alınan fosfatların kaynağına göre farklı düzeyde emilim göstermeleri sonucunda risk düzeyi değişebilmektedir. Bitkilerde şelat ve fitat formunda bulunan fosfatlar, sindirim sisteminde oldukça düşük düzeyde emildiği halde, gıda katkı maddeleri kaynaklı fosfatların inorganik karakterlerinden dolayı emilim düzeyi daha yüksektir. Bu nedenle diyetle inorganik kaynaklı fosfatların tüketimi, serum fosfat seviyelerini yüksek oranda etkileyen ve kronik böbrek hastalıklarını tetikleyen bir faktördür (Watanabe vd., 2016). Diyetle fosfat tüketiminin %50'ye yakın bir oranının gıda katkı maddeleri kaynaklı olduğu bildirilmektedir (Itkonen vd., 2017). Özellikle yüksek miktarda protein içeren işlenmiş gıdalarda fosfat miktarı ve fosfat:protein oranı, kronik böbrek hastalarında "fosfatemi" adı verilen kanda fosfat tuzlarının birikimi riskini doğrudan etkilemektedir (Watanabe vd., 2016). Yüksek protein içerikleri nedeniyle et ürünlerinin bu riski tetikleyen başlıca gıdalar arasında olduğu söylenebilir. Yapılan bir araştırmada, işlenmiş sığır eti ve kanatlı eti ürünlerinde fosfat:protein oranının doğal ürünlere kıyasla oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (Sherman ve Mehta, 2009).

Bu risklere ek olarak, Jin vd. (2009) fosfatların akciğer tümörlerinin oluşum riskini yükselttiğini, bu nedenle akciğer kanserinden korunmada diyetle inorganik fosfat tüketimi seviyesinin kritik öneme sahip olduğunu vurgulamıştır. Calvo ve Uribarri (2013) serum fosfat seviyelerinin normal sınırı aşması durumunda, büyüme faktörü ve paratroid hormonlarında düzensizlik görüldüğü ve bu durumun kalp-damar hastalıkları riskini yükselttiğini bildirmiştir.

Yukarıda değinilen tüm sağlık riskleri göz önünde bulundurulduğunda, özellikle işlenmiş et ürünlerinde yüksek inorganik fosfat seviyelerinin önemli sağlık sorunlarını beraberinde getirebileceği açıkça görülmektedir. Bu duruma bağlı olarak, son yıllarda ürün formülasyonlarında fosfat kullanım miktarlarının azaltılması hedefi ile et ürünlerinde kullanımına izin verilen fosfat seviyeleri değiştirilerek, bazı ülkelerde et ürünlerinde fosfat tuzlarının kullanımı yasaklanmıştır. ABD ve Kanada gibi ülkelerde et ürünlerinde kullanımına izin verilen fosfat miktarı %0.5 olup, bazı Avrupa ülkelerinde çeşitli fosfat tuzlarının kullanımına izin verilmemektedir (Trespacios ve Pla, 2007; Petracci vd., 2013). Pek çok ülkede gıda işleme endüstrisinde yalnızca zincir fosfatların kullanımına izin verilmektedir. Et ürünlerinde kullanıma izin verilen fosfatlar; monosodyum fosfat (MSP), monopotasyum fosfat (MKP), disodyum fosfat (DSP), dipotasyum fosfat (DKP), sodyum asit pirofosfat (SAPP), sodyum tripolifosfat (STPP), potasyum tripolifosfat (KTPP), tetrasodyum pirofosfat (TSPP), tetrapotasyum pirofosfat (TKPP) ve sodyum heksametafosfat (SHMP) olarak sıralanabilir (Şimşek ve Kılıç, 2017). Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği'ne göre ısıtılma işlem görmüş ve görmemiş işlenmiş etler ve kahvaltılık soslerde kullanımına izin verilen fosforik asit-fosfatlar, di-, tri- ve polifosfatların (E 338-452) maksimum miktarı 5000 mg/kg'dır (Anonymous, 2013). Fosfatlar ile ilgili sıralanan risklerin dikkate alınarak, et ürünleri formülasyonlarında kullanılan fosfatların son üründe de miktarlarının belirlenmesi ve kritik seviyeleri aşmaması için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulduğu düşünülmektedir.

ET VE ET ÜRÜNLERİNDE FOSFAT KULLANIMINA YÖNELİK ALTERNATİF YAKLAŞIMLAR

Günümüzde küresel beslenme algısı ve tüketicilerin gıdalarla ilgili beklentilerinin değişimi ile birlikte daha sağlıklı et ürünlerine olan talebin arttığı görülmektedir. Derlememizin daha önceki bölümlerinde de bahsedildiği gibi, daha sağlıklı ve katkı maddesi kullanımı en aza indirilmiş gıda maddelerine olan talebin artışı ve fosfatların neden olduğu sağlık riskleri dikkate alınarak, günümüzde et ve et ürünleri formülasyonlarında fosfatların kullanım miktarlarının azaltılması veya etkilerini sağlama potansiyeli olan çeşitli bileşenlerle

ikame edilmesi yönünde birtakım araştırmalar yapılmaktadır. Özellikle işlenmiş et ürünleri formülasyonlarında kürlenmeye yardımcı bileşen olarak fosfatların kullanımı, son üründe fosfat miktarını önemli ölçüde yükseltmektedir. Watanabe vd. (2016), taze ette fosfat miktarının 153.6 mg/100 g olduğunu, buna karşın işlenmiş et ürünlerinde bu değer 553.3 g/100 g'a yükseldiğini bildirmiştir. Sebranek (2008), kürlenmiş et ürünlerinde fosfatların nitrit ve tuz gibi ayırt edici bileşenlerden olmadığını, böylece fosfat kullanılmaksızın tüketici kabul edilebilirliği yüksek et ürünleri üretiminin mümkün olabileceğini önermiştir. Ürünlerde tuz azaltma hedefi sağlanırken, eşzamanlı olarak fosfatın formülasyondan çıkarılması yaklaşımı ile her iki katkı maddesinin zararlı etkilerini bertaraf etmek mümkündür. Ruusunen vd. (2003), ürün formülasyonlarında et proteini miktarının artırılması veya ilave edilen suyun azaltılması yaklaşımları ile fosfatsız ve düşük sodyum içeren et ürünlerinin geliştirilebileceğini belirtmiştir.

Duyusal kalite bakımından incelendiğinde, tuzlu tat algısı üzerine sodyum ve klorür iyonlarının birlikte etkisinin olduğu ve bu iyonların dildeki tuz reseptör hücrelerini aktive ettikleri bildirilmektedir. Yüksek molekül ağırlığına sahip fosfatların sodyum tuzları ise bu reseptörlerin aktivasyonunu etkilememekte ve tuzlu tat algısını arttıramamaktadır (Busch vd., 2013). Diğer yandan, sodyum polifosfat %31.24 oranında Na içermekte ve et ürünleri formülasyonlarında tipik olarak %0.5 oranında kullanılmakta, NaCl ise %39.34 oranında Na içermekte ve formülasyonlarda %2-4 oranında kullanılmaktadır (Desmond, 2006). Bu durumda fosfat tuzlarının, dildeki tuz reseptörlerini etkilememesi ve üründe toplam Na miktarına oldukça düşük bir katkı sağlaması nedeniyle, formülasyondan çıkarılmasının duyusal kaliteyi önemli ölçüde etkilemeyeceği söylenebilir. Aynı zamanda, et ürünü formülasyonlarında %0.5'in üzerinde fosfat kullanımının bazı durumlarda acımsı tat ve metalik-sabunumsu lezzet oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (Ranken, 2000; Barbut, 2002).

Çeşitli et ürünleri formülasyonlarından fosfatın tamamen veya kısmi olarak çıkarıldığı ve fosfat ikame maddelerinin kullanımının araştırıldığı güncel çalışmaların özeti Çizelge 1'de sunulmaktadır. Çizelgeden görülebileceği üzere, et ürünleri formülasyonlarında fosfat ikame edici bileşenlerin kullanımı ile ilgili araştırmaların oldukça sınırlı

sayıda olduğu görülmektedir. Yapılan çalışmalarda, fosfatın işlevlerini yerine getirme potansiyeli olan kalsiyum laktat, kalsiyum/ sodyum karbonat ve sodyum aljinat tuzları, tapyoka, buğday ve pirinç nişastaları, β -laktoglobulin, peynir altı suyu ve kan plazması proteinleri, transglutaminaz enzimi, erik ve yer elması tozu gibi doğal lifli bileşenler, tek başına veya karışım halinde ürün formülasyonlarında kullanılmıştır. Bu bileşenlerin büyük bir çoğunluğunun fiziksel, kimyasal ve duyu kalite parametreleri bakımından fosfatların özelliklerini karşılama potansiyellerinin olduğu anlaşılmaktadır.

Bodner ve Sieg (2009), özellikle lifli bileşenlerin fosfat azaltma yaklaşımlarına önemli bir katkı sağladığını vurgulamıştır. Araştırmacılar, liflerin fosfatlar gibi aktomiyosin kompleksi üzerinde moleküler seviyede etki gösterememesine rağmen, su bağlama yetenekleri ve tekstür geliştirici etkilerine bağlı olarak farklı tipte işlenmiş et ürünlerinde fosfat ikamesi olarak kullanılabileceğini önermektedir. Nitekim Öztürk ve Serdaroğlu (2016), Öztürk vd. (2016) ve Serdaroğlu vd. (2016) tarafından yapılan çalışmalarda, lifli bir bileşen olan yer elması tozunun sodyum karbonat ile birlikte kırmızı et ve kanatlı eti ürünlerinde birçok kalite parametresi bakımından fosfatın özelliklerini karşılayıcı etkilerinin olduğu tespit edilmiştir.

Et ürünleri formülasyonlarında fosfat miktarının azaltılmasında önerilen bir diğer teknolojik yaklaşım, alternatif üretim uygulamalarından biri olan yüksek basınç teknolojisi. Yüksek basınç uygulamalarının proteinlerin jelleşme, kümelene, çözünürlük ve emülsifikasyon gibi fonksiyonel özelliklerini etkilediği ve son ürün kalitesi üzerinde önemli değişikliklere neden olduğu bilinmektedir (Grossi vd., 2012; O'Flynn vd., 2014). O'Flynn vd. (2014), 150 MPa altında basınç uygulaması yapılan kahvaltılık sosis formülasyonlarında kullanılan fosfat miktarının %0.25'e düşürülmesi ile emülsiyon stabilitesi, doku ve genel kabul edilebilirliğin korunduğunu ve bu uygulama ile fosfat seviyelerinin azaltılabileceğini önermiştir. Bir diğer çalışmada, mikrobiyal transglutaminaz ve yumurta proteinleri ile hazırlanan tavuk eti jellerinde 700 MPa yüksek basınç uygulaması sonucunda tüketici kabul edilebilirliği yüksek, az yağlı, az tuzlu ve fosfatsız ürünlerin geliştirilebileceği belirtilmiştir (Trespacios ve Pla, 2007).

Çizelge 1. Çeşitli et ürünlerinde fosfat alternatifi olarak kullanılan farklı bileşenlerin kalite üzerine başlıca etkileri

Fosfat Alternatifi	Kullanıldığı Ürün	Temel Bulgular	Kaynak
Kalsiyum laktat, kalsiyum karbonat, sodyum aljinat	Yeniden yapılandırılmış domuz rulo	Kullanılan ikame maddeleri çiğ üründe donma firesini azaltarak bağlanma gücünü iyileştirmiş, duyuşal özellikler fosfat içeren örneklere yakın bulunmuştur.	Devatkal ve Mendiratta (2001)
Soya protein izolatu, kazein, peynir altı suyu tozu ve transglutaminaz (TG)	Tavuk sosis	Formülasyonda fosfat miktarı düşürülen sosislerde kazein hariç, TG ve farklı biyopolimer karışımlarının kullanımı tekstürü geliştirmiştir.	Muguruma vd. (2003)
Modifiye tapyoka nişastası, buğday kepeği ve sodyum sitrat	Frankfurter sosis	Nişasta ve sodyum sitrat pişirme kayıplarını azaltmış, nişasta su ve yağ bağlama oranını arttırmıştır.	Ruusunen vd. (2003)
Kalsiyum laktat, et suyu ve biberiye ekstraktı	Sığır fileto	Fosfat ve tuz içeren gruplarda pH, ürün verimi, su bağlama kapasitesi ve duyuşal analiz puanları diğer gruplara kıyasla daha yüksektir. Kalsiyum laktat solüsyonu kullanımı, renk stabilitesini koruyarak aromayı geliştirmiştir.	Lawrence vd. (2004)
Transglutaminaz (TG)	Yeniden yapılandırılmış domuz eti	TG ilavesi duyuşal analizde genel kabul puanlarını yükseltmiş, tuzu azaltılmış fosfatsız ürünlerde kullanım potansiyeli olduğu bildirilmiştir.	Dimitrakopoulou vd. (2005)
β -laktoglobulin, peynir altı suyu (PAS) protein konsantresi	Domuz fileto	β -laktoglobulin ve PAS protein konsantresi içeren marinatların, tekstürel ve duyuşal kalite bakımından fosfatın etkilerini karşılama potansiyeli olduğu bildirilmiştir.	Hayes vd. (2006)
Kan plazması	Frankfurter sosis	Plazma kullanımı ile nem miktarı ve su tutma kapasitesi değişmemiş, protein oranı artmış, süngerimsi ağ yapısı fosfat gruplarına benzer bulunmuştur.	Hurtado vd. (2011)
Kan plazması	Frankfurter sosis	Plazma içeren ürünlere su tutma kapasitesi, pişirme kaybı ve tekstür fosfat içeren örneklere benzer bulunmuştur.	Hurtado vd. (2012)
Erik tozu, erik lifi ve erik konsantresi	Marine tavuk göğüs	Erik bileşenlerinin duyuşal özellikler, marinat tutunma oranı, damlama ve pişirme kayıpları açısından fosfatın özelliklerini karşıladiğı bildirilmiştir.	Jarvis vd. (2012)
Turuncgil tozu ve sodyum karbonat	Marine tavuk eti	Fosfat alternatifi karışımın marinasyon çözültisinde kullanımı ile marinat tutunma oranı, pişirme verimi ve tekstür açısından fosfat içeren ürünlere eşdeğer sonuçlar elde edilmiştir.	Casco vd. (2013)
Patates nişastası ve sodyum karbonat	Domuz fileto	Fosfatsız et ürünü formülasyonlarında, sodyum karbonatın pH yükseltme ve patates nişastasının su tutma kapasitesini artırarak pişirme ve ambalaja sızıntı kayıplarını azalttığı belirtilmiştir.	Prabhu ve Husak (2014)
Yer elması tozu (YET) ve sodyum karbonat (SK)	Emülsifiye tavuk köftesi	YET ve SK kullanımı köfte emülsiyonunda stabilite ve pişirme verimini arttırmış, ambalaja sızıntı miktarını azaltarak, lipid oksidasyonu seviyesinin kontrol grubuna yakın olmasını sağlamıştır.	Öztürk ve Serdaroğlu (2016)
Yer elması tozu (YET) ve sodyum karbonat (SK)	Emülsifiye tavuk köftesi	YET ve SK karışımı kullanılan ürünlere donuk depolama boyunca pH, çözünme kaybı, TBARS ve karbonil değerlerinin fosfat içeren kontrol gruplarına yakın olduğu bulgulanmıştır.	Öztürk vd. (2016)
Pirinç nişastası ve frukto-oligosakkarit (FOS)	Domuz jambon	Nişasta ve FOS kullanımının enstrümantal ve kimyasal parametreler ve teknolojik kaliteyi koruduğu, bu bileşenlerin formülasyonlarda fosfat miktarını azaltma amacıyla kullanılabileceğı belirtilmiştir.	Resconi vd. (2016a)
Patates ve pirinç nişastası	Domuz jambon	Nişasta kullanımı pişirme kaybı, tekstür ve duyuşal özellikleri geliştirmiş, formülasyonda nişasta kullanılması durumunda, standart fosfat miktarının yarıya indirilmesinin mümkün olabileceğı bildirilmiştir.	Resconi vd. (2016b)
Yer elması tozu (YET) ve sodyum karbonat (SK)	Model sistem dana eti emülsiyonu	YET ve SK içeren örneklere su tutma kapasitesi, emülsiyon stabilitesi ve lipid oksidasyonu bakımından fosfatın etkilerinin karşıladiğı tespit edilmiştir.	Serdaroğlu vd. (2016)

SONUÇ

Et ürünleri formülasyonlarında tuzun azaltılmasına yönelik uzun yıllardır yapılan birçok araştırma bulunmakta, buna rağmen fosfatların neden olduğu sağlık risklerinin son yıllarda daha net anlaşılmasından dolayı, azaltılmaları veya ikame edilmelerine yönelik yenilikçi yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla gerçekleştirilen çalışmalarda farklı doğal bileşenlerin fosfatların su tutma ve su bağlama kapasitesi, ürün verimi, tekstür, renk ve lezzet stabilitesi ve antioksidan etkileri gibi çoklu etkilerini karşılama yeteneklerinin olduğu görülmektedir. Et ürünleri formülasyonlarında kullanılan fosfatların azaltılması ve/veya doğal bileşenlerle ikame edilmesine yönelik çalışmaların genişletilmesi, bu bileşenlerin ürün matriksindeki davranışlarının ve kalite üzerine etkilerinin geniş kapsamda incelenmesi ve alternatif bileşenlerin fosfat ikamesi olarak kullanımının önerilmesi, daha sağlıklı et ürünü formülasyonlarının geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, T.C. Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı tarafından, Abalıoğlu Yem, Soya ve Tekstil San. A.Ş. ile ortaklaşa yürütülen 0764.STZ.2014 numaralı SAN-TEZ projesi literatür verilerini içermektedir.

KAYNAKLAR

Akhtar, S., Paredes-Sabja, D., Sarker, M.R. (2008). Inhibitory effects of polyphosphates on *Clostridium perfringens* growth, sporulation and spore outgrowth. *Food Microbiol*, 25(6): 802-808, doi: 10.1016/j.fm.2008.04.006.

Anonymous (2013). Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği (28693). Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. 30.06.13 tarih ve 28693 sayılı Resmi Gazete, Ankara.

Barbut, S. (2001). *Poultry Products Processing: An Industry Guide*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 560 p.

Bodner, J.M., Sieg, J. (2009). Fiber. In: *Ingredients in Meat Products: Properties, Functionality and Applications*, R. Tarté (Ed.), Springer Publishing, USA, pp. 83-109.

Busch, J.L.H.C., Yong, F.Y.S., Goh, S.M. (2013). Sodium reduction: Optimizing product composition and structure towards increasing saltiness perception. *Trends Food Sci Technol*, 29(1): 21-34, doi: 10.1016/j.tifs.2012.08.005.

Calvo, M.S., Uribarri, J. (2013). Public health impact of dietary phosphorus excess on bone and cardiovascular health in the general population. *Am J Clin Nutr*, 98(1): 6-15. doi: 10.3945/ajcn.112.053934.

Casco, G., Veluz, G.A., Alvarado, C.Z. (2013). SavorPhos as an all-natural phosphate replacer in water- and oil-based marinades for rotisserie birds and boneless-skinless breast. *Poult Sci*, 92: 3236-3243. doi: 10.3382/ps.2013-03142.

Çakmakçı, S. (1994). Gıda katkı maddesi olarak fosfatlar. *GIDA*, 19(1): 63-71.

Decker, E.A., Park, Y. (2010). Healthier meat products as functional foods. *Meat Sci*, 86(1): 49-55. doi: 10.1016/j.meatsci.2010.04.021.

Desmond, E. (2006). Reducing salt: A challenge for the meat industry. *Meat Sci*, 74(1): 188-196. doi: 10.1016/j.meatsci.2006.04.014.

Detienne, N.A., Wicker, L. (1999). Sodium chloride and tripolyphosphate effects on physical and quality characteristics of injected pork loins. *J Food Sci*, 64(6): 1042-1047. doi: 10.1111/j.1365-2621.1999.tb12278.x.

Devatkal, S., Mendiratta, S.K. (2001). Use of calcium lactate with salt-phosphate and alginate-calcium gels in restructured pork rolls. *Meat Sci*, 58(4): 371-379. doi: 10.1016/S0309-1740(01)00032-8.

Dimitrakopoulou, M.A., Ambrosiadis, J.A., Zetou, F.K., Bloukas, J.G. (2005). Effect of salt and transglutaminase (TG) level and processing conditions on quality characteristics of phosphate-free, cooked, restructured pork shoulder. *Meat Sci*, 70(4): 743-749. doi: 10.1016/j.meatsci.2005.03.011.

Dusek, M., Kvasnicka, F., Lukásková, L., Krátká, J. (2003). Isotachophoretic determination of added phosphate in meat products. *Meat Sci*, 65(2): 765-769. doi: 10.1016/S0309-1740(02)00279-6.

Ertaş, A. H. (1992). Tuz oranı düşük et ürünlerinde fosfatların kullanımı. *GIDA*, 17(6): 413-418.

Grossi, A., Søltoft-Jensen, J., Knudsen, J.C., Christensen, M., Orlien, V. (2012). Reduction of salt in pork sausages by the addition of carrot fibre or potato starch and high pressure treatment. *Meat Sci*, 92(4): 481-489. doi: 10.1016/j.meatsci.2012.05.015.

- Grasso, S., Brunton, N.P., Lyng, J.G., Lalor, F., Monahan, F.J. (2014). Healthy processed meat products-regulatory, reformulation and consumer challenges. *Trends Food Sci Technol*, 39(1): 4-17. doi: 10.1016/j.tifs.2014.06.006.
- Hayes, J.E., Desmond, E.M., Troy, D.J., Buckley, D.J., Mehra, R. (2006). The effect of enhancement with salt, phosphate and milk proteins on the physical and sensory properties of pork loin. *Meat Sci*, 72(3): 380-386. doi: 10.1016/j.meatsci.2005.05.009.
- Hurtado, S., Dagà, I., Espigulé, E., Parés, D., Saguer, E., Toldrà, M., Carretero, C. (2011). Use of porcine blood plasma in "phosphate-free frankfurters." *Procedia Food Sci*, 1: 477-82. doi: 10.1016/j.profoo.2011.09.073.
- Hurtado, S., Saguer, E., Toldrà, M., Parés, D., Carretero, C. (2012). Porcine plasma as ployphosphate and caseinate replacer in frankfurters. *Meat Sci*, 90(3): 624-628. doi: 10.1016/j.meatsci.2011.10.004.
- Hygreeva, D., Pandey, M.C., Radhakrishna, K. (2014). Potential applications of plant based derivatives as fat replacers, antioxidants and antimicrobials in fresh and processed meat products. *Meat Sci*, 98(1): 47-57. doi: 10.1016/j.meatsci.2014.04.006.
- Itkonen, S.T., Rita, H.J., Saarnio, E.M., Kemi, V.E., Karp, H.J., Kärkkäinen, M.U., Pekkinen, M.H., Laitinen, E.K., Risteli, J., Koivula, M.K., Sievänen, H., Lamberg-Allardt, C.J. (2017). Dietary phosphorus intake is negatively associated with bone formation among women and positively associated with some bone traits among men- a cross-sectional study in middle-aged Caucasians. *Nutr Res*, 37: 58-66. doi: 10.1016/j.nutres.2016.12.009.
- Jarvis, N., Clement, A.R., O'Bryan, C.A., Babu, D., Grandall, P.G., Owens, C.M., Meullenet, J.F., Ricke, S.C. (2012). Dried plum products as a substitute for phosphate in chicken marinade. *J Food Sci*, 77(6): S253-257. doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02737.x.
- Jiang, J., Xiong, Y.L. (2016). Natural antioxidants as food and feed additives to promote health benefits and quality of meat products: A review. *Meat Sci*, 120: 107-117. doi: 10.1016/j.meatsci.2016.04.005.
- Jiménez-Colmenero, F., Carballo, J., Cofrades, S. (2001). Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat Sci*, 59(1): 5-13. doi: 10.1016/S0309-1740(01)00053-5.
- Jin, H., Xu, C., Lim, H., Park, S., Shin, J., Chung, Y., Park, S.C., Chang, S.H., Youn, H.J., Lee, K.H., Lee, Y.S., Ha, Y.C., Chae, C.H., Beck, G.R. Jr., Cho, M.H. (2009). High dietary inorganic phosphate increases lung tumorigenesis and alters Akt signaling. *Am J Respir Crit Care Med*. 179(1): 59-68. doi: 10.1164/rccm.200802-306OC.
- Jung, S., Ghoul, M., de Lamballerie-Anton, M. (2000). Changes in lysosomal enzyme activities and shear values of high pressure treated meat during ageing. *Meat Sci*, 56(3): 239-246. doi: 10.1016/S0309-1740(00)00048-6.
- Kılıç, B., Şimşek, A., Claus, J.R., Atılğan, E. (2016). Melting release point of encapsulated phosphates and heating rate effects on control of lipid oxidation in cooked ground meat. *LWT - Food Sci Technol*, 66: 398-405. doi: 10.1016/j.lwt.2015.10.065.
- Lampila, L.E. (2013). Applications and functions of food-grade phosphates. *Ann N Y Acad Sci*, 1301: 37-44. doi: 10.1111/nyas.12230.
- Lawrence, T.E., Dikeman, M.E., Hunt, M.C., Kastner, C.L., Johnson, D.E. (2004). Effects of enhancing beef longissimus with phosphate plus salt, or calcium lactate plus non-phosphate water binders plus rosemary extract. *Meat Sci*, 67(1): 129-137. doi: 10.1016/j.meatsci.2003.09.015.
- Lee, R., Hartman, P., Olson, D.G., Williams, F.D. (1994). Bactericidal and bacteriolytic effects of selected food-grade phosphates, using *Staphylococcus aureus* as a model system. *J Food Prot*, 57(4): 276-283. doi: 10.4315/0362-028X-57.4.276.
- Molins R. (1990). *Phosphates in Food*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 272 p.
- Muguruma, M., Tsuruoka, K., Katayama, K., Erwanto, Y., Kawahara, S., Yamauchi, K., Sathe, S.K., Soeda, T. (2003). Soybean and milk proteins modified by transglutaminase improves chicken sausage texture even at reduced levels of phosphate. *Meat Sci*, 63(2): 191-197. doi: 10.1016/S0309-1740(02)00070-0.
- O'Flynn, C.C., Cruz-Romero, M.C., Troy, D., Mullen, A.M., Kerry, J.P. (2014). The application of high-pressure treatment in the reduction of salt levels in reduced-phosphate breakfast sausages. *Meat Sci*, 96(3): 1266-1274. doi: 10.1016/j.meatsci.2013.11.010.

- Olmedilla-Alonso, B., Jimenez-Colmenero, F., Sanchez-Muniz, F.J. (2013). Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. *Meat Sci*, 95(4): 919-930. doi: 10.1016/j.meatsci.2013.03.030.
- Öztürk, B., Serdaroğlu, M. (2016). Incorporation of jerusalem artichoke powder and sodium carbonate in emulsified chicken meatballs as phosphate replacers. The 7th International Conference on the Quality and Safety in Production Chain, 23-24 June 2016, Wroclaw, Poland.
- Öztürk, B., Serdaroğlu, M., Zungur-Bastioğlu, A. (2016). Physical and oxidative stability of phosphate-free meatballs produced with jerusalem artichoke powder during frozen storage. 2nd Congress on Food Structure Design. 26-28 October 2016, Antalya, Turkey.
- Petracci, M., Bianchi, M., Mudalal, S., Cavani, C. (2013). Functional ingredients for poultry meat products. *Trends Food Sci Technol*, 33(1): 27-39. doi: 10.1016/j.tifs.2013.06.004.
- Prabhu, G., Husak, R. (2014). Use of sodium carbonate and native potato starch blends as a phosphate replacer in natural enhanced pork loins. *Meat Sci*, 96(1): 454-455. doi: 10.1016/j.meatsci.2013.07.068.
- Puolanne, E.J., Ruusunen, M.H., Vainionpää, J.I. (2001). Combined effects of NaCl and raw meat pH on water-holding in cooked sausage with and without added phosphate. *Meat Sci*, 58(1): 1-7. doi: 10.1016/S0309-1740(00)00123-6.
- Ranken, M.D. (2000). *Handbook of Meat Product Technology*. Blackwell Science Ltd., Malden, MA, USA, 212 p.
- Resconi, V.C., Keenan, D.F., Barahona, M., Guerrero, L., Kerry, J.P., Hamill, R.M. (2016a). Rice starch and fructo-oligosaccharides as substitutes for phosphate and dextrose in whole muscle cooked hams: Sensory analysis and consumer preferences. *LWT - Food Sci Technol*, 66: 284-292. doi: 10.1016/j.lwt.2015.10.048.
- Resconi, V.C., Keenan, D.F., Garcia, E., Allen, P., Kerry, J.P., Hamill, R.M. (2016b). The effects of potato and rice starch as substitutes for phosphate in and degree of comminution on the technological, instrumental and sensory characteristics of restructured ham. *Meat Sci*, 121: 127-134. doi: 10.1016/j.meatsci.2016.05.017.
- Ruusunen, M., Puolanne, E. (2005). Reducing sodium intake from meat products. *Meat Sci*, 70(3): 531-541. doi: 10.1016/j.meatsci.2004.07.016.
- Ruusunen, M., Vainionpää, J., Puolanne, E., Lyly, M., Lähteenmäki, L., Niemistö, M., Ahvenainen, R. (2003). Effect of sodium citrate, carboxymethyl cellulose and carrageenan levels on quality characteristics of low-salt and low-fat bologna type sausages. *Meat Sci*, 64(4): 371-381. doi: 10.1016/S0309-1740(02)00178-X.
- Sebranek, J. (2009). Basic curing ingredients. In: *Ingredients in Meat Products: Properties, Functionality and Applications*, R. Tarté (Ed.), Springer Publishing: USA, pp. 1-23.
- Serdaroğlu, M., Öztürk, B., Nacak, B., Durdu, B., Yaşar, H., Göral, Ş. (2016). Quality characteristics of phosphate-free beef emulsions manufactured with jerusalem artichoke powder. 62th International Congress of Meat Science and Technology, 14-19 August 2016, Bangkok, Thailand.
- Sherman, R.A., Mehta, O. (2009). Phosphorus and potassium content of enhanced meat and poultry products: Implications for patients who receive dialysis. *Clin J Am Soc Nephrol*, 4(8): 1370-1373. doi: 10.2215/CJN.02830409.
- Sickler, M.L., Claus, J.R., Marriott, N.G., Eigel, W.N., Wang, H. (2013). Antioxidative effects of encapsulated sodium tripolyphosphate and encapsulated sodium acid pyrophosphate in ground beef patties cooked immediately after antioxidant incorporation and stored. *Meat Sci*, 94(3): 285-288. doi: 10.1016/j.meatsci.2013.03.011.
- Sofos, J. (1985). Influence of sodium tripolyphosphate on the binding and antimicrobial properties of reduced NaCl-comminuted meat products. *J Food Sci*, 50(5): 1379-1383. doi: 10.1111/j.1365-2621.1985.tb10481.x.
- Şimşek, A., Kılıç, B. (2017). Et ürünlerinde kullanılan fosfatların antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri. *Türk Tarım- Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi (TURJAF)*, 5(4): 299-307. doi: 10.24925/turjaf.v5i4.299-307.1049.
- Takeda, E., Yamamoto, H., Yamanaka-Okumura, H., Taketani, Y. (2014). Increasing dietary phosphorus intake from food additives: potential for negative impact on bone health. *Adv Nutr*, 5: 92-97. doi: 10.3945/_an.113.004002.

Trespacios, P., Pla, R. (2007). Synergistic action of transglutaminase and high pressure on chicken meat and egg gels in absence of phosphates. *Food Chem*, 104(4): 1718-1727. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.01.077.

Trout, G., Dale, S. (1990). Prevention of warmed-over flavor in cooked beef: effect of phosphate type, phosphate concentration, a lemon juice/phosphate blend, and beef extract. *J Agric Food Chem*, 38(3): 665-669. doi: 10.1021/jf00093a017.

Uribarri, J., Calvo, M.S. (2017). Molecular mechanisms of adverse health effects associated with excess phosphorus intake. In: *Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals*, J. Collins (Ed.), Elsevier Inc., UK, pp. 429-436.

Watanabe, M.T., Araujo, R.M., Vogt, B.P., Barretti, P., Caramori, J.C.T. (2016). Most consumed processed foods by patients on hemodialysis: Alert for phosphate-containing additives and the phosphate-to-protein ratio. *Clin Nutr ESPEN*, 14: 37-41. doi: 10.1016/j.clnesp.2016.05.001.

Young, J.F., Therkildsen, M., Ekstrand, B., Che, B.N., Larsen, M.K., Oksbjerg, N., Stagsted, J. (2013). Novel aspects of health promoting compounds in meat. *Meat Sci*, 95(4): 904-11. doi: 10.1016/j.meatsci.2013.04.036.

DETERMINATION OF MERCURY, LEAD, CADMIUM, COPPER, IRON AND MANGANESE IN SHEEP, COW AND CHICKEN LIVER SAMPLES IN TURKEY

Onur Yayayürük*, Aslı Erdem Yayayürük

Ege University, Faculty of Science, Department of Chemistry, İzmir, Turkey

Geliş / Received: 13.02.2017; Kabul / Accepted: 01.06.2017; Online baskı / Published online: 07.07.2017

Yayayürük, O., Erdem Yayayürük, A. (2017). Determination of mercury, lead, cadmium, copper, iron and manganese in sheep, cow and chicken liver samples in Turkey. *GIDA* (2017) 42 (5): 546-552 doi: 10.15237/gida.GD17018

Abstract

Liver is the most important organ involved in metabolic processes and is considered to be one of the most eloquent witnesses of any disturbance in the body. The aim of the present study is to determine mercury, lead, cadmium, copper, iron and manganese concentrations in sheep, cow and chicken liver samples. The validation of the method was confirmed by analysis of standard reference material (BCR CRM 422 Cod Muscle). Levels of copper in the sheep and cow 640 and 675 mg/kg, respectively and were the highest in the animal livers examined. The concentration of other metals in liver samples were found in the range of 17.2-402 µg/kg for mercury, 129-411 mg/kg for iron and 30.2-141 mg/kg for manganese. Chicken liver samples were found to contain the highest amount of the mercury and manganese analyzed. With regard to the fact that in some samples maximum allowable limits for liver samples were exceeded, effective ecological measures should be taken that would have a beneficial effect on the landscape and environment.

Keywords: Liver, heavy metal, sheep, cow, chicken.

TÜRKİYE'DEKİ KOYUN, DANA VE TAVUK KARACİĞER ÖRNEKLERİNDE CİVA, KURŞUN, KADMİYUM, BAKIR, DEMİR VE MANGAN TAYİNİ

Abstract

Karaciğer, metabolik süreçlerde yer alan en önemli organ olup, vücudun herhangi bir rahatsızlığının en belirgin tanıklarından biri olarak değerlendirilir. Bu çalışmanın amacı, koyun, dana ve tavuk karaciğer örneklerindeki cıva, kurşun, kadmiyum, bakır, demir ve mangan derişimlerini tayin etmektir. Metot validasyonu, standart referans materyalin (BCR CRM 422 Morina balığı kası) analizi ile gerçekleştirilmiştir. İncelenen hayvan karaciğerlerinden koyun ve danada bakır seviyesi 640-675 mg/kg aralığında bulunmuştur. Karaciğer örneklerinde diğer metallerin derişimleri sırasıyla cıva için 17.2-402 µg/kg, demir için 129-411 mg/kg ve mangan için 30.2-141 mg/kg aralığında bulunmuştur. Cıva ve mangan ise tavuk karaciğer örneklerinde en yüksek miktarda bulunmuştur. İncelenen bazı karaciğer örneklerinde, izin verilen maksimum sınırların aşıldığı belirlendiğinden etkili ekolojik önlemlerin alınması toplum ve çevre üzerinde yararlı bir etkiye sahip olacaktır.

Anahtar kelimeler: Karaciğer, ağır metal, koyun, dana, tavuk.

* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar

✉ onur.yayayuruk@ege.edu.tr,

☎ (+90) 232 311 1770,

☎ (+90) 232 388 8264

INTRODUCTION

Heavy metals are recognized as important contaminants in environmental systems due to their high potential to accumulate and enter in food chains (Sipahi et al., 2013; Erdoğan and Erbilir, 2007). The main sources of heavy metal pollution are the industry, agriculture and mining activities (Kumar et al., 2007). Heavy metals can be classified as potentially toxic (mercury, cadmium, aluminum, arsenic, lead, etc.), probably essential (cobalt, vanadium and nickel) and essential (iron, selenium, copper, zinc and manganese) (Jalbani et al., 2007; Munoz-Olivas and Camara, 2001; Falandysz et al., 2007). If the toxic elements are ingested over a long period, they can be very harmful even at low concentrations. In addition to this, essential metals can also produce toxic effects when the metal intake is excessively elevated (Pouretedal and Rafat, 2007; Tuzen, 2003; Celik and Oehlschlager, 2007).

The improvements in the food production and processing technology increased the chances of contamination of food with various environmental pollutants, especially heavy metals. Therefore the risk associated with the exposure to heavy metals present in foodstuffs represents a concern in human health (Yüzbaşı and Sezgin, 2002). The understanding of the total level of heavy metals in foodstuffs is very important in order to set dietary requirements. Moreover determination of the concentration of the distinct element species in foodstuffs is also required to estimate the nutritional quality and food safety.

Liver is the most important organ involved in metabolic processes and considered to be one of the most eloquent witnesses of any disturbance in the body, as it is the subject of different types of infectious, toxic, metabolic, nutritional, traumatic attacks or diseases (Doneley, 2004). Moreover due to the presence of metal-binding proteins in liver, heavy metals can accumulate at high concentrations; therefore special attention should be given in order to determine the concentration of heavy metals in this organ. Sedki and his coworkers (2003) have determined zinc (Zn) cadmium (Cd) and copper (Cu) levels in muscle, bone, liver and kidney of bovine grazing on the municipal wastewater spreading field of Marrakech City (Morocco). Bovines were found to be seriously contaminated by toxic metals,

especially cadmium. The levels of metals were found to highest in liver and kidney which are known as specific target organs for metal bioaccumulation. The arithmetic mean concentrations of zinc, copper and cadmium in liver and kidney were 126, 112 and 5.1 mg/g in liver; 89, 33 and 10.µg/g in kidney, respectively. Oyaro et al. (2007) have determined Pb, Zn, Cd and Cu contents in meat samples of the kidney, liver and muscles from various cattle taken from Nairobi and its surroundings. The overall concentration of Pb, Cu, Cd and Zn were below 2 mg/L. It was evaluated that the muscle had high concentrations of Pb and Cd as compared with kidney and liver. This situation was associated with the butcherries located along the highway with high vehicular density, so there was a high possibility of direct deposition of Pb and Cd in the meat samples. Koréneková et al. (2002) have analyzed muscle and liver samples of 21 cattle from an area polluted by a metallurgical plant for the presence of Cd, Pb, Ni, Zn, Cu and Fe. The highest mean levels of heavy metals were recorded in the liver as Pb 1.072; Cd 0.456; Zn 79.946; Cu 84.091; Fe 146.822; Ni 0.231 mg/kg, respectively. The highest mean levels in the muscle were Pb 0.671; Cd 0.126; Zn 81.180; Cu 6.312; Fe 51.800; Ni 0.350 mg kg⁻¹, respectively. The results obtained in the study indicated that the contents of heavy metals in the vicinity of the metallurgical plant are ecologically important, mainly of Cd and Pb.

The aim of the present study is to determine Hg, Pb, Cd, Cu, Fe and Mn concentrations in sheep, cow and chicken liver samples by cold vapor atomic fluorescence spectrometry and/or flame atomic absorption spectrometry after open digestion. Moreover, the data were assessed by comparing estimates of dietary exposures with recommended dietary allowances (RDA) recommended by the World Health Organization (WHO, 1993).

EXPERIMENTAL

Samples

Liver samples of sheep, cow and chicken were collected randomly from the different retail markets and butchers in İzmir, the third most populous city of Turkey. A total of thirty liver

samples were collected from these areas, kept in refrigerator prior to digestion and analyzed after open digestion.

Reagents

All reagents were of analytical reagent grade unless otherwise stated. All the plastic and glassware were cleaned by soaking in dilute HNO_3 (1 + 9) and rinsed with distilled water prior to use. Ultra-pure water (18.2 $\text{M}\Omega$) was used for all dilutions. HNO_3 and H_2O_2 were of suprapure quality (Merck, Germany). A 1000 mg/L mercury stock solution was prepared by dissolving 0.100 g of elemental mercury in 7.0 mL of concentrated (14.3 M) HNO_3 and diluted to 100.0 mL with ultra-pure water. 1000 mg/L lead, cadmium, copper, iron and manganese stock solutions were prepared from analytical reagent grade compounds (Merck, Germany). Standards with lower concentrations were prepared daily in 0.01 M HCl from their stock standard solutions. For mercury determinations, SnCl_2 (3% w/v) was prepared daily in HCl (15% v/v) and used as the reducing agent.

Instrumentation

A PSA 10.004 Merlin Plus atomic fluorescence spectrometer (Kent, UK) was used for the

determination of mercury. The scheme of the fluorescence measurement system and the measurement conditions can be found in Figure 1 and Table 1, respectively. All measurements were carried out using high-purity argon gas as a carrier and drying gas. The peak height was used for quantitation. Varian SpectraAA 220 FS model atomic absorption spectrometer with an air-acetylene flame with respective hollow cathode lamps was used for the determination of Cu, Cd, Fe, Mn and Pb. Deuterium background correction was used in all determinations.

Sample digestion

The liver samples collected were homogenized with a stainless steel knife and dried in the oven (100 °C) for 24 h before digestion. Accurately weighed aliquots (0.3 g) of each dried samples were digested with 5.0 mL of concentrated HNO_3 and 5.0 mL of concentrated H_2O_2 on a hotplate and heated for 3.0 h. After digestion, sulfamic acid was added (it is necessary for matrix removal in mercury determination) and heated for 5.0 minutes and then the volume of the solutions were adjusted to 25.0 mL with ultra-pure water. A blank digest was carried out in the same way. All sample solutions were clear. The accuracy of the digestion method was checked by a standard reference material (BCR CRM 422 Cod Muscle).

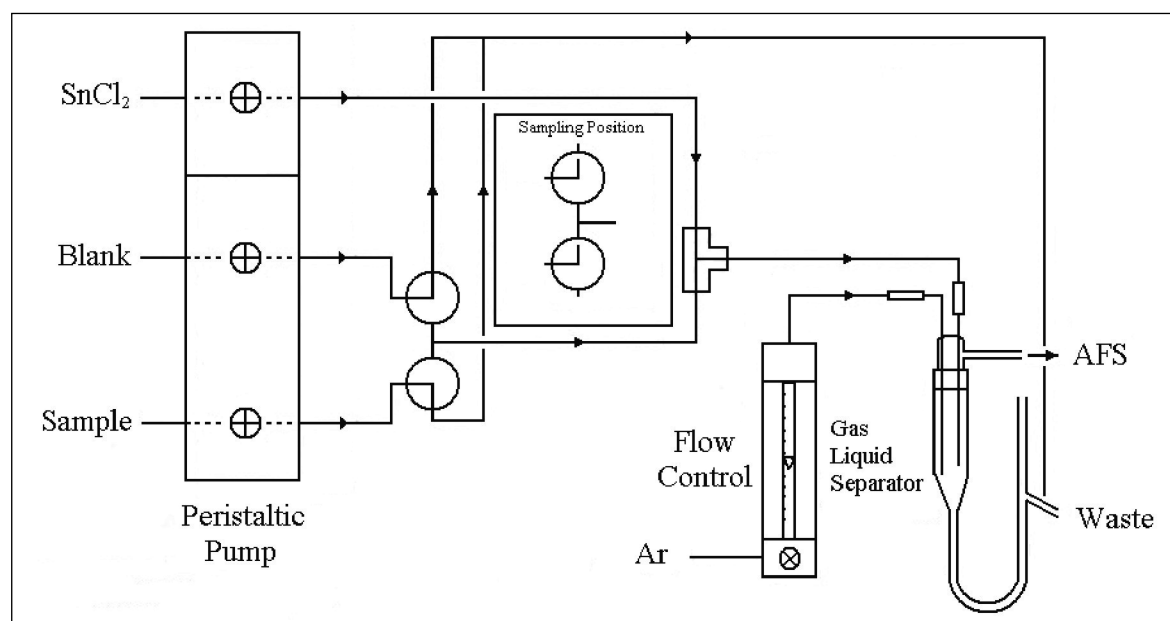


Figure 1. Diagram of the mercury flow system.

Table 1. Instrumental operating parameters for FAAS and CV-AFS.

FAAS	Element	Cu	Fe	Mn
	System type	Flame	Flame	Flame
	Lamp current (mA)	3.0	7.0	5.0
	Wavelength (nm)	324.7	248.3	279.5
	Spectral bandpass (nm)	0.5	0.2	0.2
	Slit height	Normal	Normal	Normal
	Instrument mode	Absorbance BC on	Absorbance BC on	Absorbance BC on
	Sampling mode	Manuel	Manuel	Manuel
	Flame type	Air-Acetylene	Air-Acetylene	Air-Acetylene
	Acetylene flowrate (L min ⁻¹)	1.65	1.65	1.65
	Air flowrate	10.6	10.6	10.6
	Read time (s)	10	10	10
	Replicates	3	3	3
Measurement mode	Peak height	Peak height	Peak height	
CV-AFS	Element	Hg		
	Delay time	5-10 sec		
	Rise time	25 sec		
	Analysis time	0.5 min		
	Memory time	40 sec		
	Carrier gas (Ar)	0.55 L min ⁻¹		
	Shield gas (Ar)	0.1 L min ⁻¹		
	Dryer gas (Ar)	1.5 L min ⁻¹		
	Blank and sample solution	7 mL min ⁻¹		
	SnCl ₂ solution (3%)	3 mL min ⁻¹		

RESULTS AND DISCUSSION

The detection limit values of elements as milligram per kilogram were found to be 2.1 for Cu, 0.75 for Cd, 4.16 for Fe, 1.66 for Mn, 5.0 for Pb and 3.0 µg/kg for Hg. The detection limits of the analyzed elements were determined from the concentration corresponding to three times the standard deviation of ten blanks. The validation of the method used in this study was realized through the analysis of a standard reference material (SRM) using the same procedure by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. Student's t-test was used for determining the difference between the certified and determined values. The percent recovery obtained for the SRM was in good agreement with the certified values and within 5% of the certified values for Hg, Cu, Mn and Fe (Table 2). Moreover, no significant difference between the certified values and those that have been obtained in this work was observed according to a Student's t-test on a 95% confidence level for all of the elements analyzed.

Table 2. Recovery results of certified reference material (Cod muscle -BCR 422).

Element (µg/g)	Certified value	Found value	Recovery (%)
Hg	0.559 ± 0.016	0.542 ± 0.025	96.9 ± 4.5
Cu	1.05 ± 0.07	1.01 ± 0.05	96.2 ± 4.8
Fe	5.46 ± 0.30	5.51 ± 0.41	101 ± 7.5
Mn	0.543 ± 0.028	0.53 ± 0.039	97.6 ± 7.2

Trace element levels in sheep, cow and chicken liver are listed in Table 3. Pb and Cd levels in the samples were below the detection limit of flame atomic absorption spectrometry for all of the samples. The concentrations of elements in liver samples were found to be in the range of 26.4–676 mg/kg for copper, 129–411 mg/kg for iron, 17.2–402 µg/kg for mercury and 30.2–141 mg/kg for manganese. According to these results, copper has the highest concentration in the samples investigated followed by iron, manganese and mercury (Figure 2).

Copper is considered to be an essential element both for mammals and plants, and it is required at very low levels (~40 µg/L daily intake) for the lipid and carbohydrate metabolism of the living organisms. High levels of copper may cause several diseases (e.g. nausea, diarrhea) and/or give damage to organs. A high concentration of copper in foods originates mainly from fungicide residues containing this metal used in agriculture and from water plumbing (Gouda and Amin, 2014). The copper contents of samples ranged 223–641, 95–676 and 26.4–50.4 mg/kg for sheep, cow and chicken liver samples, respectively, cow liver has the lowest copper concentration, while chicken recorded the highest value. Although copper is an essential element, high intakes of

Table 3. Results of liver samples analysis (mg/kg dry weight).

		Sheep Liver	Cow Liver	Chicken Liver
Hg ^a	M	30.4	28.1	252
	SD	4.64	7.45	101
	Min.	26.2	17.2	107
	Max.	36.3	33.4	402
Cu	M	414	250	37.2
	SD	150	247	7.86
	Min.	223	95	26.4
	Max.	641	676	50.4
Fe	M	237	180	287
	SD	114	52	72.6
	Min.	129	158	205
	Max.	411	251	385
Mn	M	39.3	39.6	119
	SD	6.77	6.85	18.8
	Min.	34.4	30.2	102
	Max.	47.4	49.2	141

^aµg/kg for Hg, M: mean, SD: standard deviation, Min: minimum, Max: maximum

copper may cause damages to health. The maximum copper concentration for meat and meat products for one person was proposed as 0.9-30 mg per day. In literature, copper levels in liver samples have been reported in the range of 0.070-4.55 mg/L in Kenya, 76-156 µg/g in France. The copper concentrations obtained in this study were higher than those recorded by Uluozlu et. al (2009). This situation may be due to different sampling areas and the butchereries located along the highway with high vehicular density, so there is a high possibility of direct deposition of copper in the samples. Moreover the farm animals reared freely on pasture are the indicators of environmental pollution. By respiration of polluted air and intake of contaminated feed, heavy metal bio accumulates increasingly in organs and tissues of animals.

Iron is the most abundant transition metal in the living system and it is required for a number of vital functions (e.g. to carry oxygen). It is also essential for the proper functioning of numerous enzymes involved in energy metabolism, DNA synthesis, and protection against free radicals and microbes. Excess intake of iron may cause siderosis while its deficiency causes anemia which is widely prevalent in developing countries, especially in the low socio-economic classes of the population. This may cause a major public health problem with many adverse consequences especially in young generation (Alamin et al., 2007). Therefore the levels of iron should be

under control especially in food stuffs. The lowest and highest iron concentrations were found as 129 mg/kg and 411 mg/kg in sheep liver, respectively. No significant difference was evaluated for iron content in sheep, cow and chicken liver samples and higher results were obtained for chicken liver samples when compared with literature (Uluozlu et al., 2009; Alamin et al., 2007). This situation may be due to the high content of iron in the fertilizers which are added to the soil to provide the essential growth of plants.

Manganese is both an essential microelement for human body but also a toxic element for living beings depending on the concentration level. It plays an important role in the proper function of carbohydrate and lipid metabolism, enzymes such as dipeptidase, arginase and phosphatase

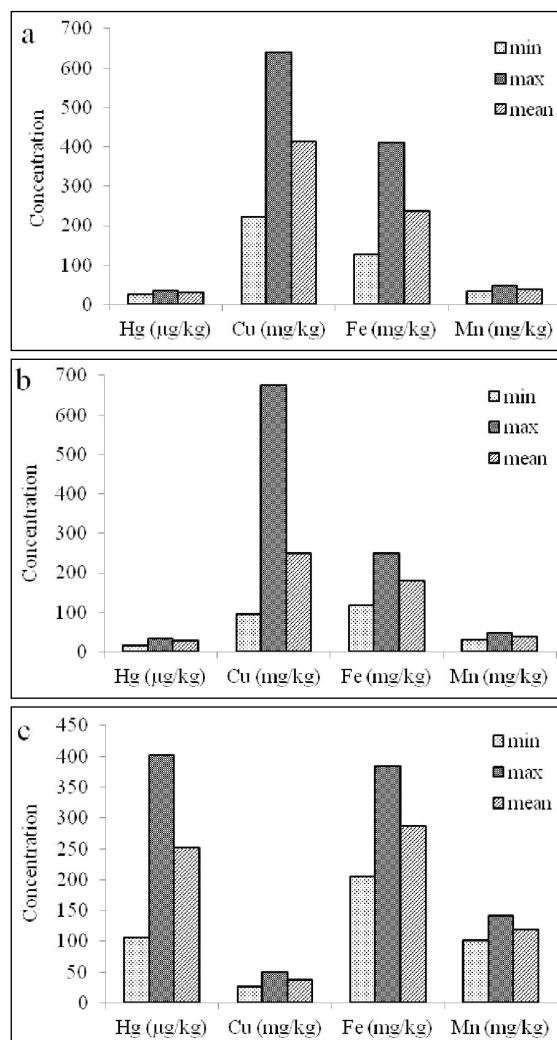


Figure 2. Trace element levels in (a) Sheep liver, (b) Cow liver and (c) Chicken liver.

and in bone and tissue formation. If the dietary intake of manganese is significantly higher, it causes deficiency related to hypercholesterolaemia and delayed blood coagulation (World Health Organization, 1996). A daily dietary intake of 2 to 5 mg is estimated to be adequate for adults (Institute of Medicine, 2003). Chicken liver samples were found to contain the highest amount of manganese (141 mg/kg) while sheep and cow liver samples contained almost the same. This situation may be due to the several commercial organic manganese sources, including amino acid complexes, chelates, and proteinates which have been developed as supplements to chicken feeds (Li et al., 2011).

Mercury is considered as a global pollutant with a high environmental risk which results from both natural and anthropogenic activities. Natural mercury arises from the degassing of the earth's crust through volcanoes and probably by evaporation from the oceans. It also results from burning of petroleum and coal products. Mercury can be accumulated in tissues of animal's organisms which will influence the food chain. It can readily be absorbed by the human body causing damages in the central nervous system (Shah et al., 2010). Moreover, concentration of mercury exceeding the maximum permissible limit (30 µg/kg) in food and food stuff cause serious health problems such as loss of vision, hearing and mental retardation (Khan et al., 2015). The mercury concentrations in the liver samples were significantly higher in chicken than in cows and sheep samples. The mercury concentrations were found in chicken liver samples were found to range between 107-402 µg/kg. Shah et. al have stated that the accumulation of mercury in the tissues of broiler chickens may due to feed prepared from low grade grains and small sea fishes (Shah et al., 2010). This evaluation is in accordance with our study where high levels of mercury have been found in especially chicken liver samples.

CONCLUSIONS

Consumption of foodstuff is one the major ways of human exposure to heavy metals which will threaten population health leading serious diseases. The results obtained in this study have

indicated that sheep, cow and chicken liver samples contained high amounts of copper, iron, manganese and mercury. Levels of copper in the sheep and cow of were the highest in the animal livers examined. This situation may be due to the fact that the farm animals reared freely on pasture so there is high possibility of respiration of polluted air and intake of contaminated feed. Therefore heavy metals may bio accumulate in organs and tissues of animals. Chicken liver samples were found to contain the highest amount of the mercury and manganese analyzed. Since chicken is used as most consumable food item in many countries in the world due to low cost, easily availability and being rich in protein, special consideration should be given to handling and processing of the raw materials. The better selection of the raw material, including an analysis for toxic trace elements prior to processing, could surely improve the present situation.

REFERENCES

- Alamin MB, Mhapes AA, Bejey AM, Sadek A, Atweer RH, Dubali K, Saad DM. 2007. Determination of essential and toxic elements in Libyan foodstuff using instrumental neutron activation analysis (INAA). *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 271(1): 247-250.
- Celik U, Oehlerschlager J. 2007. High contents of cadmium, lead, zinc and copper in popular fishery products sold in Turkish supermarkets. *Food Control*, 18: 258-261.
- Doneley B. 2004. Treating liver disease in the avian patient. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 13: 8-15.
- Erdoğan Ö, Erbilir F. 2007. Heavy metal and trace elements in various fish samples from Sir Dam Lake, Kahramanmaraş, Turkey. *Environ. Monit. Assess.*, 130: 373-379.
- Falandysz J, Frankowska A, Mazur A. 2007. Mercury and its bioconcentration factors in King Bolete (*Boletus edulis*), *J. Environ. Sci. Health.*, Part A., 42A: 2089-2095.
- Gouda AA, Amin AS. 2014. Cloud-point extraction, preconcentration and spectrophotometric determination of trace quantities of copper in food, water and biological samples. *Spectrochim. Acta, Part A*, 120: 88-96.

- Institute of Medicine. 2003. Dietary reference intakes: applications in dietary planning. Subcommittee on interpretation and uses of dietary reference intakes and the standing committee on the scientific evaluation of dietary reference intakes. Institute of Medicine of the National Academies, The National Academies Press, Washington, DC, 248.
- Jalbani N, Kazi TG, Jamali MK, Arain MB, Afridi HI, Sheerazi ST, Ansari R. 2007. Application of fractional factorial design and doehlert matrix in the optimization of experimental variables associated with the ultrasonic-assisted acid digestion of chocolate samples for aluminum determination by atomic absorption spectrometry. *J. AOAC Int.*, 90: 1682-1688.
- Khan Md, Linkon MR, Satter MA, Jabin SA, Abedin N, Islam MF, Lisa LA, Paul DK. 2015. Mineral and Heavy Metal Contents of Some Vegetable Available In Local Market of Dhaka City in Bangladesh. *JESTFT*, 9(5): 1-6.
- Koréneková B, Skalická M, Na P. 2002. Concentration of some heavy metals in cattle reared in the vicinity of a metallurgic industry. *Veterinarski Arhiv*, 72 (5): 259-267.
- Kumar Singh R, Chavan SL, Sapkale PH. 2007. Heavy metal concentrations in water, sediments and body tissues of red worm (*Tubifex* spp.) collected from natural habitats in Mumbai, India. *Environ. Monit. Assess.*, 129: 471-481.
- Li S, Li L, Hao S, Wang Y, Zhang L, Liu S, Liu B, Kui L, Luo X. 2011. Dietary Manganese Modulates Expression of the Manganese-Containing Superoxide Dismutase Gene in Chickens. *J. Nutr.*, 141(2): 189-194.
- Munoz-Olivas R, Camara C. 2001. Speciation related to human health, in: Ebdon L, Pitts L, Cornelis R, Crews H, Donard OFX, Quevauviller P. (Eds.), Trace Element Speciation for Environment, Food and Health. The Royal Society of Chemistry, 331-353.
- Oyaro N, Juddy O, Murago EMM, Gitonga E. (2007). The contents of Pb, Cu, Zn and Cd in meat in Nairobi, Kenya. *JFAE*, 5(3-4): 119-121.
- Pouretedal HR, Rafat M. 2007. Simultaneous determination of nickel(II) and copper(II) by second-derivative spectrophotometric method in micellar media. *J. Chin. Chem. Soc.*, 54: 157-164.
- Sedki A, Lekouch N, Gamon S, Pineau A. (2003). Toxic and essential trace metals in muscle, liver and kidney of bovines from a polluted area of Morocco. *Sci. Total Environ.*, 317: 201-205.
- Shah AQ, Kazi TG, Baig JA, Afridi HI, Kandhro GA, Arain MB, Kolachi NF, Wadhwa SK. 2010. Total mercury determination in different tissues of broiler chicken by using cloud point extraction and cold vapor atomic absorption spectrometry. *Food Chem. Toxicol.*, 48(1): 65-69.
- Shah AQ, Kazi TG, Baig JA, Afridi HI, Kandhro GA, Khan S, Kolachi NF, Wadhwa SK. 2010. Determination of total mercury in chicken feed, its translocation to different tissues of chicken and their manure using cold vapour atomic absorption spectrometer. *Food Chem. Toxicol.*, 48(6): 1550-1554.
- Sipahi N, Mutlu C, Akkan T. 2013. Giresun ilinde tüketime sunulan bazı balıklardan izole edilen enterobacteriaceae üyelerinin antibiyotik ve ağır metal dirençlilik düzeyleri. *GIDA*, 38 (6): 343-349.
- Tuzen M. 2003. Determination of heavy metals in fish samples of the middle Black Sea (Turkey) by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Food Chem.*, 80(1): 119-123.
- Uluozlu OD, Tuzen M, Mendil D, Soylak M. 2009. Assessment of trace element contents of chicken products from turkey. *J. Hazard. Mater.*, 163: 982-987.
- World Health Organization. 1996. Trace Elements in Human Nutrition and Health. Geneva, 163-167.
- Yüzbaşı N, Sezgin E. 2002. Süt ve süt ürünlerindeki bazı metal kontaminantların toksikolojik etkileri. *GIDA*, 27(2): 211-127.

TANE NAR İLAVELİ LOKUM ÜRETİMİ VE VAKUM AMBALAJLAMANIN RAF ÖMRÜ ÜZERİNE ETKİSİ

İbrahim Hayoğlu*, Bülent Başyigit, Aylin Dirik

Harran Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Şanlıurfa, Türkiye

Geliş / Received: 22.02.2017; Kabul / Accepted: 01.06.2017; Online baskı / Published online: 16.07.2017

Hayoğlu, İ, Başyigit, B, Dirik, A. (2017). Tane nar ilaveli lokum üretimi ve vakum ambalajlamanın raf ömrü üzerine etkisi. *GIDA* (2017) 42 (5): 553-560 doi: 10.15237/gida.GD17023

Öz

Bu çalışmada biyoaktif özellikleri yüksek olan narın lokum sanayinde kullanım olanakları araştırılmıştır. Farklı çeşit lokumlar üretilmiş ve meyve olarak Hicaz nar çeşidi kullanılmıştır. Üretilen lokumlar arasında ise Hicaz nar çeşidinin görünüş ve tat açısından saray lokumuyla daha iyi uyum sağladığı saptanmıştır. Bu yüzden asıl denemede bu lokum çeşidi kullanılmıştır. Üretim esnasında meyve oranı arttıkça meyvelerin zedelendiği ve şekil vermenin zorlaştığı belirlenmiştir. %17-19 oranında nar tanesi ilavesinin sultan lokumu üretimi için ideal noktalar olduğu belirlenmiştir. Üretilen bu lokumlar vakumlu ve vakumsuz olarak ambalajlanarak 6 aylık depolama süresince fiziksel, kimyasal ve duyu analizlere tabi tutulmuştur. Depolamanın ikinci ayında vakumla ambalajlanan ürünlerin bozulduğu saptanmıştır. Bu ürünlerde ilk gün ve 2. ayda kuru madde, kül, sakkaroz, invert şeker, asitlik (sitrik asit), pH değerleri sırasıyla %86.39-85.54, %0.29-0.28, %81.98-79.48, %51.45-52.65, %1.74-1.92, 4.79-4.24 olduğu belirlenmiştir. Vakumsuz olarak ambalajlanan ürünlerde ise kuru madde, kül, sakkaroz, invert şeker, asitlik (sitrik asit), pH değerleri sırasıyla %86.42-94.65, %0.29-0.30, %77.60-82.01, %51.47-52.86, %1.74-2.18, 3.39-4.83 arasında değiştiği tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Nar, lokum, ambalajlama

PRODUCTION OF TURKISH DELIGHT WITH POMEGRANATE AND EFFECT OF VACUUM PACKING ON SHELF LIFE

Abstract

Usage possibilities of pomegranate in Turkish delight industry were investigated in this study. Different variety Turkish delights were produced and Hicaz pomegranate was used as fruit. Sultan Turkish delight with Hicaz pomegranate among the Turkish delights was the most suitable for production. Therefore, Sultan Turkish delight with Hicaz pomegranate was produced and analyzed. Fruits in product were damaged and It was difficult to shape to the product when ratio of fruits in product increased. Usage of pomegranate seeds in the range of 17-19% was optimum for Sultan delight production. Sultan Turkish delights with Hicaz pomegranate were packed in vacuum and non-vacuum packaging. They were be stored 6 months and the product characteristics were be analyzed by physical, chemical and sensorial techniques. Products packaged with vacuum were damaged in the second month during storage time. In these products, dry matter, ash, sucrose, invert sugar, acidity (as citric acid), pH in the first day and second month 86.39-85.54%, 0.29-0.28%, 81.98-79.48%, 51.45-52.65%, 1.74-1.92%, 4.79-4.24 respectively. Dry matter, ash, sucrose, invert sugar, acidity (as citric acid), pH of products packaged with non-vacuum ranged from 86.42-94.65%, 0.29-0.30%, 77.60-82.01%, 51.47-52.86%, 1.74-2.18%, 3.39-4.83 respectively.

Keywords: Pomegranate, Turkish delight, packing

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ ihayoglu@harran.edu.tr,

☎ (+90) 505 356 8297,

☎ (+90) 414 318 1583

GİRİŞ

Günümüzde, gelişmiş ülkelerde özellikle gıda endüstrisi alanında yeni ürünlerin piyasadaki potansiyelinde bir artış görülmektedir. Ülkemizde de benzer bir durum gözlenmekte olup kitle iletişim araçları ile tüketiciye yeni gıdalar tanıtılmaktadır. Bu konuda geleneksel ürünlerin farklı tekniklerle ve formülasyonlarla üretilerek gıda sanayiye kazandırılması son zamanlarda üzerinde yoğun çalışmalar yapılan önemli konulardan bir tanesidir.

Nar (*Punicagranatum* L.) eski zamanlardan beri bilinen yenilebilir bir meyve türüdür. Yaygın olarak tropikal ve subtropikal bölgelerde yetiştirilmektedir. Günümüzde İran dünyadaki en önemli nar üreticisi ülkelerden biridir (Tehranifar ve ark., 2011; Yasoubi ve ark., 2009). Nar son yıllarda üzerine en çok araştırma yapılan meyvelerdendir. Nar suyunun antioksidan (Çam ve ark., 2009), antihipertansif (Aviram&Dornfeld, 2001), anti-kanser (Malik ve ark., 2005) etkisi üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda nar kabuğu, nar suyu ve çekirdeğinden elde edilen ekstraktların yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu (Singh ve ark., 2002) ve yapılarında antosiyaninler, ellajik asit, punicalagin, punicalin ve flavonoidler gibi fenolik maddeler bulundurmaktadır (Gonzalez-Molina ve ark., 2009).

Lokum geleneksel bir gıda olup adını Osmanlıca rahat ul-hulküm, yani boğaz rahatlatan kelimesinden almıştır. Lokumun tarihsel gelişimi detaylı olarak bilinmemektedir. Ancak yüzyıllardır Osmanlı topraklarında varlığını sürdürmektedir. Avrupada ise "Turkish delight" olarak adlandırılmaktadır (Batu ve Kırmacı, 2006). Lokum bir nişasta jölesidir. Ülkemizde açık kazanlarda, işlem görmemiş doğal nişasta kullanılarak üretilmekte ve üretimi sırasında herhangi bir objektif ölçüm (Kuru madde, viskozite, kaynama sıcaklığı) yapılmamaktadır. Tamamen ustanın maharetine göre üretilmektedir (Altan, 2005). Lokumun birçok çeşidi piyasada mevcuttur ve insanlar tarafından sevilerek tüketilmektedir. Özellikle içermiş olduğu karbonhidrat potansiyelinden dolayı böbrek hastalarına tavsiye edilen lokum, doğal ve sağlıklı bir besin kaynağıdır (Doyuran ve ark., 2004). Lokum tebliğine göre sade, çeşnili, kaymaklı, sultan ve sucuk tipi olmak üzere 6 farklı lokum

çeşidi mevcuttur. Çeşnili lokumlarda çeşni olarak sakız, kakao, çikolata, susam, haşhaş tohumu, hindistan cevizi rendesi, fındık, fıstık gibi kuru-sert kabuklu meyveler kullanılmaktadır. Sultan lokumu ise şeker ağdasının çöven ekstraktı ile ağartılmasından sonra sade lokuma katılmasıyla üretilmektedir (Anonim, 2004).

Şekerleme ürünlerinde ve tüketim alışkanlıklarında bölgelerarası farklılık görülmektedir. Sosyo-ekonomik yapısı iyi olan bölgelerde lüks çikolatalar ve şekerlemelerin tüketim oranı fazla iken bu oran sosyo-ekonomik yapısı düşük olan bölgelerde daha azdır. Bu durum geleneksel ürünlere talebin yıllar içerisinde dalgalanmasına neden olmaktadır. Ancak yapılan araştırmalarda toplam talepte çok bir değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir (Karabayır, 2000). Bu farklılıklar ve devam eden talepler üreticileri yeni arayışlara yöneltmiştir.

Bu çalışmada biyoaktif özellikleri yüksek olan narın lokum üretiminde kullanım olanakları araştırılmış ve üretilen lokumlar oda şartlarında vakumlu ve vakumsuz ambalajlarda 6 ay depolamaya alınarak ürünlerin fiziksel, kimyasal ve duyuşsal özelliklerinde meydana gelen değişimler incelenmiştir.

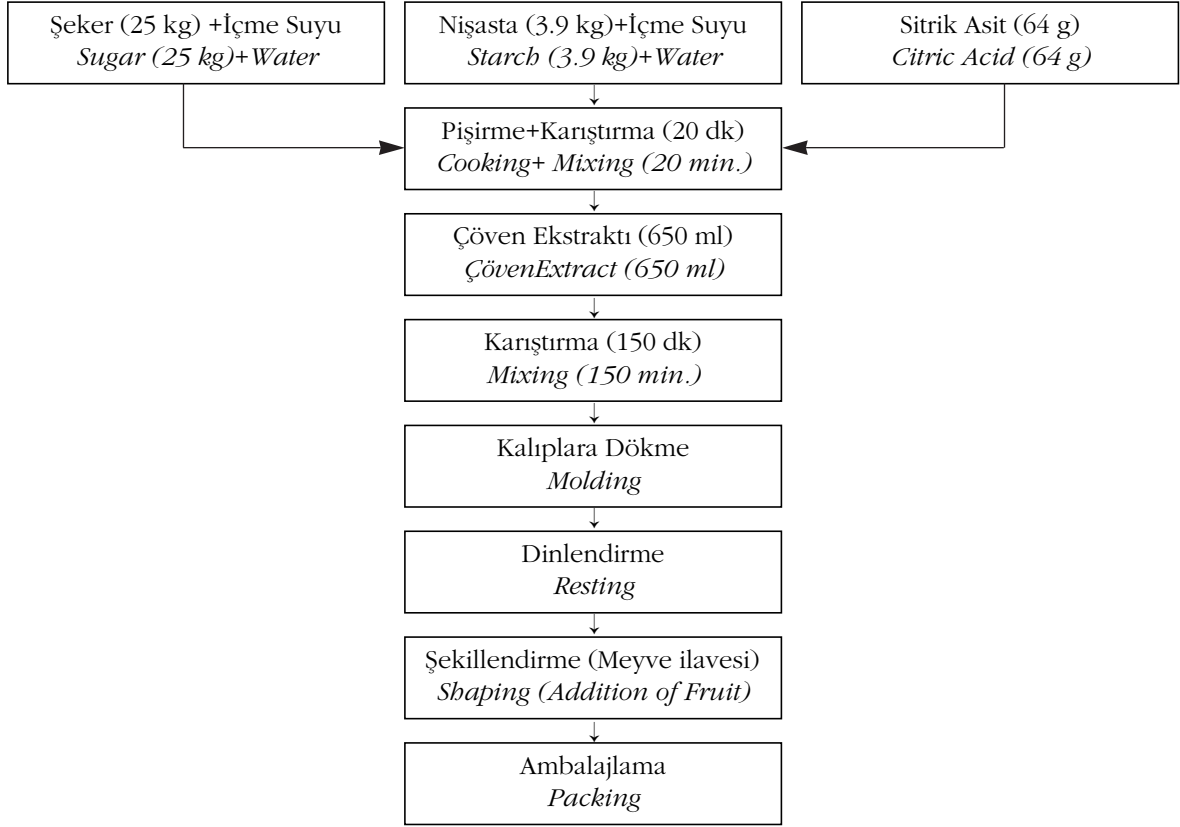
MATERYAL VE METOT

Materyal

Lokum üretiminde ön denemelerde kullanılan hicaz nar çeşidi yerel marketlerden temin edilmiştir. Analizlerde kullanılan reaktifler ve solventler analitik saflıkta olup yerel firmalardan temin edilmiştir. Çalışmada içme kalitesindeki şehir şebeke suyu kullanılmıştır.

Lokum üretimi

Sultan lokumu üretimi özel bir lokum üretim tesisinde (Ceyhan, Adana, Türkiye) gerçekleştirilmiştir. Üretimde 25 kg şeker, 3.9 kg nişasta, 64 g sitrik asit, 18.75 kg içme suyu, 650 ml çöven ekstraktı kullanılmıştır. Üretim esnasında lokumlara farklı oranlarda (% 15, 20, 25) nar tanesi ilave edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Sultan lokumu üretim akış şeması
Figure 1. Flow chart of Sultan Turkish delight production

Toplam kuru madde

Kurutulup darası alınmış meyveli lokum örneklerinden (meyve içermeyen) 2-3 g tartılmış ve tartılan örnekler 70 °C'ye ayarlanmış vakumlu etüvde sabit ağırlığa ulaşınca kadar bekletilmiştir. Örneklerin toplam kuru madde miktarı formül 1'e göre hesaplanmıştır (Anonim, 1983).

$$\%Kuru\ madde = \frac{m3 - m1}{m2 - m1} \times 100 \quad (1)$$

m1: Kurutulmuş boş kurutma kabı ve kapağın ağırlığı (g)

m2: İçerisinde deney örneği bulunan kurutma kabı ve kapağının kurutma işlemi öncesi ağırlığı (g)

m3: İçerisinde deney örneği, kurutma kabı ve kapağının kurutma işlemi sonrası ağırlığı (g)

Kül tayini

Darası alınmış krozelere 3-5 gr meyveli lokum örneklerinden (meyve içermeyen) alınarak 550°C'deki kül fırınlarında yaklaşık 3 saat

yakılmıştır. Örneklerin tamamen yanmalarını sağlamak için üzerlerine %95'lik etil alkol ilave edilmiştir. Kroze içerisindeki örneklerde beyaza yakın kül rengi elde edildiğinde örnekler kül fırınlarından çıkarılıp soğumaları için desikatöre alınmış ve örneklerin % kül miktarı formül 2'ye göre hesaplanmıştır (Altuğ ve ark, 1993).

$$\%Kuru\ madde = \frac{M2 - M1}{m} \times 100 \quad (2)$$

M2: Yakmadan sonraki kül + kroze (g)

M1: Sabit tartıma getirilen krozenin ağırlığı (g)

m: Alınan örnek ağırlığı (g)

Şeker tayini

Şeker miktarının tayini için Lane Eynon yöntemi kullanılmıştır. İvert şeker tayini için 5 g meyveli lokum örneklerinden (meyve içermeyen) tartılarak balona alındıktan sonra bir miktar su ilave edilmiş ve üzerine Carez-I, Carez-II çözeltileri eklenmiştir. Balon saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır. Filtre

kağıdından süzülerek berrak süzüntü elde edilmiştir. Diğer taraftan 5ml Fehling I ve 5 ml Fehling II çözeltileri bir erlene konularak içerisine kaynama boncukları atılmış ve bek üzerinde kaynatılmıştır. Kaynama başladığı anda berrak süzüntü ile metilen mavisi indikatörlüğünde titre edilmiştir. Renk maviden kiremit kırmızısına döndüğünde titrasyona son verilmiştir. Toplam şeker miktarı tayini için 50 ml berrak filtrattan alınarak üzerine 5 ml % 37'lik HCl eklenmiş ve 67°C'deki su banyosunda 5 dakika süreyle tutulmuştur. Birkaç damla fenolfitalein damlatılarak 5 N'lik NaOH ile pembe renk oluşuncaya kadar titre edilmiştir. Nötrleme işlemi uygulanmış çözelti 100 ml'ye tamamlanmıştır. Diğer taraftan 5 ml Fehling I ve 5 ml Fehling II çözeltileri bir miktar saf su ile birlikte erlene konarak kaynama boncuğu eklenmiş ve bek üzerine yerleştirilmiştir. Kaynama başlayınca pembe renkli çözelti ile titre edilmiştir. Renk kiremit kırmızısına yaklaştığında birkaç damla metilen mavisi ilave edilerek kiremit kırmızısı renk oluşana kadar titrasyona devam edilmiştir. Elde edilen bulgulardan yararlanılarak invert şeker ve sakaroz cinsinden toplam şeker miktarları hesaplanmıştır (Acar ve ark., 1999).

Toplam asitlik

10 gr meyveli lokum örneklerinin (meyve içermeyen) üzerine 10 ml saf su ilave edilmiş ve örnek karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Homojen hale getirilen örnek pH 8.1 olana kadar 0.1 NaOH ile titre edilmiştir. Sonuç formül 3'e göre sitrik asit cinsinden hesaplanmıştır (Altan, 1992).

$$\text{Toplam asitlik} = \frac{S \times N \times me \times f}{10} \times 100 \quad (3)$$

S: NaOH sarfiyat

N: NaOH çözeltisinin normalitesi

me: Sitrik asitinmiliesdeğer ağırlığı

f: Kullanılan NaOH çözeltisinin faktörü

pH tayini

Blender yardımıyla yüksek hızda parçalanmış meyveli lokumdan 10 g meyveli lokum örneklerinden (meyve içermeyen) alınarak 100 ml saf su içerisinde süspansiyon haline getirilmiştir ve pH metre (Hanna HI 9321) ile oda sıcaklığında ölçüm yapılmıştır (Cemeroğlu, 2015).

Renk tayini

Örneklerin renk ölçümü HunterLab ColorQuest XE (HCL-405) ile okuma yapılarak (D65/10°) belirlenmiştir. Bu amaçla meyveli lokum örnekleri renk ölçüm haznesine yerleştirilmiş ve CIE L*, a* ve b* değerleri ölçülmüştür (Başoğlu, 1992).

Duyusal değerlendirme

Örneklerin kantitatif tanımlayıcı duyu analizleri görünüş, tat-koku, tekstür ve renk özellikleri baz alınarak Harran Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Öğretim elemanlarından oluşan 1'i bayan 9'u erkek 10 kişilik eğitimli bir panelist grubuyla gerçekleştirilmiştir.

İstatistiksel analiz metotları ve depolama

Örnekler serin ve kuru oda koşullarında vakumlu ve vakumsuz olarak ambalajlanmıştır. Ambalajlanan örnekler 6 ay depolamaya alınarak 2'şer ay aralıklarla analizleri tekrarlanmıştır. Bulguların değerlendirilmesinde ise faktöriyel deneme planına göre varyans analizi uygulanmış ve elde edilen veriler $P < 0.05$ önem seviyesinde LSD testi ile yorumlanmıştır. Duyusal analiz sonuçları Fredmann testi kullanılarak değerlendirilmiştir (Bek ve Efe, 1988).

BULGULAR VE TARTIŞMA

Lokum üretimi

Sultan lokumu kullanılarak üretim yapılmıştır. Üretim sırasında meyve oranının artışına paralel olarak lokuma şekil vermenin zorlaştığı gözlemlenmiştir. Ayrıca meyve oranı arttıkça nar tanelerinin şekil verme sırasında zedelendiği ve ezildiği saptanmıştır. Yapılan ön denemler sonucunda % 17-19 oranında nar tanesi ilavesinin sultan lokumu üretimi için ideal noktalar olduğu belirlenmiştir.

Sultan lokumu üretiminde kullanılan narın birleşimi: kabuk oranı % 44.2, meyve suyu oranı % 39.6, tane oranı % 55.8, asitlik (sitrik asit) % 1.4, pH 3.6, suda çözünür kuru madde (briks) % 5.5, 100 tane ağırlığı (g) 33.3, tane rengi kırmızı-bordo, tat mayhoş-tatlı olarak belirlenmiştir.

Depolama süresince meyveli lokumlarda yapılan fiziksel ve kimyasal analizler sonucunda elde edilen değerler Çizelge 1'de verilmiştir. Çizelge 1'de depolamanın başlangıcında (0. ay) ve 2. aylarda vakumlu ambalajlanmış nar taneleri ilave edilmiş sultan lokum örneklerinde uygulanan analizlere ait değerler verilirken, 2. aydan sonra örneklerde bozulmalar meydana geldiğinden, 4. ve 6. aylarda vakumlu ambalajlarda muhafaza edilen örneklerle ait herhangi bir analiz yapılmamış dolayısıyla çizelgede herhangi bir değer verilmemiştir.

Nar tanesi ilaveli sultan lokum örneklerinin üretiminden sonra ambalajlama, özellikle vakumlama aşamasında, lokumların iç kısımlarında bulunan nar tanelerinin olumsuz etkilendiği gözlemlenmiştir. Uygulanan vakuma bağlı olarak lokumların iç kısımlarındaki nar tanelerinin bir kısmında bütünlüğün bozulduğu ve ezilmelerin ortaya çıktığı saptanmıştır. Buna bağlı olarak nar suyunun lokumun dış kısmına sızdığı belirlenmiştir. Dış kısma sızan nar sularının görüntü olarak olumsuzluk yaratmasının yanında lokumların su aktivitesini arttırdığı ve mikrobiyel bozulmaya zemin hazırladığı gözlemlenmiştir. Zira depolamanın ikinci ayından itibaren bozulma da kendini göstermiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak vakumlu ambalajlamanın nar tanelerinin paketlenmesine uygun olmadığı saptanmıştır.

Vakum ambalajlama kullanılarak depolanan nar ilaveli sultan lokumu örneklerinin başlangıçta kuru madde miktarı % 86.39 iken 2. ayda yapılan ölçümlerde bu oranın azaldığı görülmüştür. Bu azalmaya vakumun etkisiyle nar tanelerinde meydana gelen patlama sonucunda nar suyunun lokumdan ayrılarak dışarıya çıkması ve ürüne bulaşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Vakumsuz ambalajlamada vakumlu ambalajlamanın aksine örneklerdeki nem miktarının azalmasına bağlı olarak kuru madde miktarının zamanla arttığı görülmüştür. Vakumlu ve vakumsuz ambalajlamada depolamanın başında örneklerin toplam kuru madde miktarı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken, 2. ayda bu durum değişmiş ve ortaya çıkan fark istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur ($P < 0.05$).

Çizelge 1'de görüldüğü gibi başlangıçta nar tanesi içeren sultan lokumların sakaroz miktarının % 80'in üzerinde olduğu belirlenmiştir. Vakumlu ambalajda depolanan örneklerde 2. ayda sakaroz

miktarında meydana gelen azalmanın vakumsuz ambalajda muhafaza edilen örneklerle göre daha fazla olmasında, nar tanelerinin patlaması sonucunda ortaya çıkan nar suyundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü ortaya çıkan nar suyu, ürünün asitliğini düşürerek inversiyona neden olabilmektedir. Depolama sırasında sakaroz seviyesinde meydana gelen bu değişim istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Benzer şekilde vakumlu ambalajda muhafaza edilen örneklerdeki invert şekerdeki artışın vakumsuz ambalajlanan örneklerle göre daha fazla olmasının nar tanelerinin patlamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Depolama sırasında invert şeker seviyesinde meydana gelen değişim istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Vakumsuz ambalajlarda muhafaza edilen örneklerde meydana gelen sakaroz miktarındaki azalma üründe depolama boyunca yavaş da olsa inversiyonun devam ettiğini ve sakarozun parçalandığını göstermektedir. Çizelge 1'de görüldüğü gibi sakaroz miktarında son ayda meydana gelen ani azalmanın örnek alımında ürüne meyve suyunun bulaşmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Zira aynı dönemdeki invert şekerin miktarındaki azalmayla orantılı bir artışın olmaması da bu fikri destekler niteliktedir. Benzer sonuçlara Çetin (2003) tarafından da ulaşılmıştır.

Nar tanesi ilave edilmiş sultan lokum örneklerinde, depolamanın başında % 1.74 olan toplam asitlik miktarı zamana bağlı olarak artış göstermiş ve bu artış istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Vakumlu ambalajda muhafaza edilen örneklerde 2. ayda meydana gelen artışın, vakumsuz ambalajda depolanan örneklerle göre daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu duruma bütünlüğü bozulan nar tanelerinin asitliği arttırmasının sebep olduğu kanaatine varılmıştır. Ayrıca vakumsuz ambalajda muhafaza edilen örneklerde 4. ve 6. aylarda meydana gelen asitlik artışının, örnek alımı esnasında numunelere nar suyu karışmasından ve/veya nem kaybından kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır. Örneklerin pH değerleri için de benzer sonuçlara varılmıştır. Asitlikte olduğu gibi pH bakımından da depolama süresince ortaya çıkan farkın istatistiksel anlamda önemli olduğu görülmüştür ($P < 0.05$). Ancak ilk 2 ay vakumlu ve vakumsuz ambalajlamada istatistiksel olarak önemli bir fark görülmemiştir.

Çizelge 1. Depolanan narlı lokum örneklerinde yapılan bazı analizler ve elde edilen ortalama değerler
Table 1. Some analyzes and obtained mean values in stored samples of Turkish delight

	Depolama süresi (ay) Storage time (month)							
	0		2		4		6	
Analizler Analyses	Vakumlu Ambalaj Vacuum Packaging	Vakumsuz Ambalaj without vacuum Packaging	Vakumlu Ambalaj Vacuum Packaging	Vakumsuz Ambalaj without vacuum Packaging	Vakumlu Ambalaj Vacuum Packaging	Vakumsuz Ambalaj without vacuum Packaging	Vakumlu Ambalaj Vacuum Packaging	Vakumsuz Ambalaj without vacuum Packaging
Kuru Madde (%) DryMatter	86.4 ^{da} ±0.1	86.4 ^d ±0.2	85.5 ^a ±0.4	87.3 ^a ±0.9	ND**	93.0 ^b ±0.3	ND	94.7 ^a ±0.5
Kül Tayini (%) Ash Determination	0.3 ^a ±0.2	0.3 ^a ±0.2	0.3 ^a ±0.1	0.3 ^a ±0.1	ND	0.3 ^a ±0.2	ND	0.3 ^a ±0.06
Sakkaroz (%) Sucrose	81.8 ^a ±0.6	82.0 ^a ±0.4	79.5 ^{bc} ±0.5	80.9 ^b ±0.7	ND	80.0 ^b ±0.3	ND	77.6 ^d ±0.9
İnvert Şeker (%) Invert Sugar	51.5 ^b ±0.3	51.5 ^b ±0.3	52.7 ^a ±0.7	52.0 ^{ab} ±0.5	ND	52.3 ^a ±0.5	ND	52.9 ^a ±0.8
Asitlik (%) Acidity	1.7 ^a ±0.8	1.7 ^a ±0.1	1.9 ^a ±0.6	1.8 ^a ±0.3	ND	2.2 ^a ±0.5	ND	2.2 ^a ±0.3
pH pH	4.7 ^a ±0.1	4.8 ^a ±0.6	4.3 ^{bc} ±0.4	4.5 ^{ab} ±0.5	ND	4.0 ^e ±0.7	ND	3.4 ^e ±0.8

* Aynı satırda farklı harfle gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P < 0.05$)

* The means in the same line followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$)

**ND: Sonuç bulunamamıştır

**ND: Not determined

Üretilen meyveli lokumlarda yapılan renk ölçümlerinde kesit yüzeyi değil doğrudan lokumların beyaz olan dış yüzeylerinde ölçüm yapılmıştır. Lokumlarda ışık değeri ve aydınlık derecesini gösteren L^* değeri depolamanın başlangıcında 79.55 iken zamana bağlı olarak azalma göstermiş ve altı aylık depolama sonucunda 71.57'ye düşmüştür (Çizelge 2). Bu durum duyuşal değerlendirmede de kendini göstermiştir. Zamana bağlı olarak lokumların görünüşünde bir parlaklık kaybı olduğu, beyazlığın azaldığı ve hafif sarımsılığa doğru bir kayma gösterdiği söylenebilir. Yalnız buradaki sarıya

doğru kaymanın, rengin sararmasından değil zaman içerisinde nar tanelerinin renginde meydana gelen matlaşmadan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Görünüş bakımından depolamanın başlangıcında 4.7 puan alan narlı sultan lokum örneklerinde bu değer 4. ayda 4.4'e 6. ayda 3.9'a düşmüştür (Çizelge 3). İlk 4 aylık depolama sonucunda görünüş değerlerinde meydana gelen değişim istatistiksel olarak önemli bulunmamış ancak puanlamada 6. ayda meydana gelen azalma istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Görünüşte meydana gelen bu düşüşün depolama sırasındaki nem kaybından ve süreye bağlı

Çizelge 2. Vakumsuz ambalajlanarak depolanan narlı lokum örneklerine ve nar taneleri ait ortalama renk değerleri
Table 2. Average color values of pomegranate pods and Turkish delight samples stored without vacuuming

Değerler Values	Depolama süresi (ay) Storage time (month)					Nar taneleri Pomegranates
	0	2	4	6		
L^*	79.55±0.59	76.15±0.59	72.22±0.70	71.57±0.57		27.79±0.04
a^*	0.11±0.07	0.41±0.09	0.58±0.01	1.02±0.09		11.65±0.02
b^*	7.61±0.20	8.45±0.26	9.26±0.13	9.18±0.18		5.38±0.02

olarak nar tanelerinin renginde meydana gelen matlaşmanın yanında esmerleşmeden kaynaklandığı saptanmıştır. Benzer şekilde renk değerinde meydana gelen düşüşün de kuruma ve esmerleşmeden kaynaklandığı düşünülmektedir. İlk 2 ayda renk değerlerinde önemli bir değişim gözlenmezken 4. aydan sonra değişim belirginleşmiş ve depolamanın başlangıcında 4.9 olan renk puanı 6. ayda 3.8'e düşmüştür. Bu düşüş istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Fakat Çizelge 3'te de görüldüğü gibi örneklerin koku ve tadında istatistiksel olarak önemli bir değişim görülmemiştir.

nar suyunun lokumun dış kısmına sızdığı belirlenmiştir. Dış kısma sızan nar suları ürünün görünümünü olumsuz etkilemiştir. Ayrıca bu nar sularının ürünün su aktivitesini arttırdığı için mikrobiyel bozulmaya da zemin hazırladığı gözlemlenmiştir. Vakumsuz ambalajlamada 6 aylık depolama sonucunda herhangi bir bozulmaya rastlanmamıştır. Narlı lokum örneklerinin 6 aylık depolama periyodu boyunca yapılan değerlendirmelerde 4. aya kadar ürünün özelliklerinde herhangi bir değişim olmadığı, 6. ayda ise değerlerde düşüş olduğu ve iç kısımdaki nar tanelerinde solma olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 3. Vakumsuz ambalajlama yapılarak depolanan narlı lokum örneklerinin duyusal değerlendirme sonuçlarına ait ortalama değerler
Table 3. Mean values of the results of sensory evaluation of Turkish delight samples stored without vacuum packaging

Özellikler Properties	Depolama süresi (ay) Storage time (month)				Toplam Total
	0	2	4	6	
Görünüş Appearance	4.7 ^{a*} ±0.1	4.7 ^a ±0.7	4.4 ^a ±0.2	3.9 ^{ab} ±0.7	17.65
Renk Color	4.9 ^a ±0.2	4.6 ^a ±0.5	4.2 ^{ab} ±0.2	3.8 ^b ±0.6	17.50
Koku Flavor	4.7 ^a ±0.4	4.7 ^a ±0.7	4.5 ^a ±0.4	4.4 ^a ±0.5	18.30
Tat Taste	4.5 ^a ±0.2	4.5 ^a ±0.6	4.2 ^a ±0.3	4.0 ^a ±0.4	17.20
Yapı-Tekstür Structure-Texture	4.7 ^a ±0.7	4.4 ^a ±0.4	4.1 ^{ab} ±0.1	4.0 ^b ±0.3	17.20
Ağızdaki His Feeling in the mouth	4.5 ^a ±0.3	4.5 ^a ±0.6	4.1 ^{ab} ±0.3	3.8 ^b ±0.7	16.70
Toplam Total	27.8	4.5	25.45	23.90	

* Aynı satırda farklı harfle gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P < 0.05$)

* The means in the same line followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).

Kurumaya ve depolama sırasında ürün yapısında meydana gelen değişime bağlı olarak örneklerin çiğnenme özelliklerinde değişim meydana gelmiştir. Benzer şekilde nar tanelerindeki kurumaya bağlı olarak çekirdekler daha hissedilebilir bir hal almıştır. Çetin (2003) lokumlarda yapı ve tekstürün elastikiyet, sertlik, çiğnenebilirlik ve sakızimsılık özellikleriyle yakından ilgili olduğunu belirtmiştir.

SONUÇLAR

Vakumlu ambalajlama esnasında uygulanan vakuma bağlı olarak lokumların iç kısımlarındaki nar tanelerinin bir kısmında bütünlüğün bozulduğu ve ezilmelerin ortaya çıktığı buna bağlı olarak da

Duyusal değerlendirmeler sonucu, Hicaz nar çeşidinin görünüş ve tat açısından narlı sultan lokumu üretiminde kullanımının uygun olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, narlı sultan lokumunun tüketiciler tarafından da beğenileceğini işaret etmektedir. Daha sonraki çalışmalarda nar tanesi ilavesi yanında, narın jöle, marmelat vb. şekilde lokuma ilave edilmesiyle ilgili araştırmaların yapılması nar gibi biyoaktif özellikleri yüksek bir meyvenin kullanım alanının genişletilmesi, tüketicilere sağlıklı ve çeşitli ürünler sunulması yanında geleneksel gıdamız olan lokumun zenginleştirilmesi ve ekonomiye katma değer sağlanması açısından faydalı olacaktır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın tamamı Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Kurulu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir (HÜBAK, Proje No:864)

KAYNAKLAR

- Acar, J., Gökmen, V., Alper, N. (1999). Meyve Sebze Teknolojisi Kalite Kontrol Laboratuvar Kılavuzu. Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, No:28, Ankara.
- Altan, A. (1992). Laboratuvar Tekniği. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi, No: 36, Adana.
- Altan, A. (2005). Özel Gıdalar Teknolojisi. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi, Adana, Y. No: A-55.
- Altuğ, T. (1993). Duyusal Test Teknikleri. E.Ü. Mühendislik Fakültesi, No:28, İzmir.
- Anonim 2004. Türk Gıda Kodeksi: Lokum Tebliği. Resmi Gazete. 22.05.2004-25469.
- Anonymous (1983). T.C. Tarım ve Köy işleri Bakanlığı Gıda Maddeleri Muayene ve Analiz Yöntemleri Kitabı. Genel Yayın No: 65 Özel Yayın No: 62-105, Ankara.
- Aviram, M., Dornfeld, L. (2001). Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis*, 158: 195-198.
- Başoğlu, F. (1992). Gıda Kalite Kontrol. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bursa.
- Batu, A., Kırmacı, B. (2006). Lokum Üretimi ve Sorunları. *GIDA*, 3: 7-39.
- Bek, Y., Efe, E. (1988). Araştırma Deneme Metodları-1. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Ders Kitabı, Adana, No:71.
- Cemeroğlu, B. (2015). Gıda Analizleri. Bizim büro basımevi.
- Coultate, T.P. (1989). Food-The Chemistry of Its Components. The Royal Society of Chemistry, 2. Edition, Cambridge.
- Çam, M., Hıslı, Y., Durmaz, G. (2009). Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chem*, 112: 721-726.
- Çetin, G. (2003). Bazı Lokum Çeşitlerindeki Kalite Özelliklerindeki Değişimlerin Araştırılması. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, İzmir.
- Doyuran, D.S., Gültekin, M., Güven, S. (2004). Geleneksel Gıdalardan Lokumun Üretimi ve Özellikleri. Poster Bildiri, Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, s:334-338, Van.
- Gonzalez-Molina, E., Moreno, D.A., Garcia-Viguera, C. (2009). A new drink rich in healthy bioactives combining lemon and pomegranate juices. *Food Chem*, 115: 1364-1372.
- Karabayır, C. (2000). Şekerli ve Çikolatalı Mamuller Dış Pazar Araştırması. İhracatı Geliştirme Etüd Merkezi Yayınları, 116 s, Ankara.
- Malik, A., Afaq, F., Sarfaraz, S., Adhami, V.M., Syed, D.N., Mukhtar, H. (2005). Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 14813-14818.
- Singh, R.P., Murthy, C., Jayaprakasha, G.K. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum L.*) peel and seed extract using in vitro models. *J Agric Food Chem*, 50: 81-86.
- Tehraniyar, A., Selahvarzi, Y., Kharrazi, M., Bakhsh, V.J. (2011). High potential of agro-industrial by-products of pomegranate (*Punica granatum L.*) as the powerful antifungal and antioxidant substances. *Ind Crops Prod*, 34: 1523-1527.
- Yasoubi, P., Barzegar, M., Sahari, M.A., Azizi, M.H. (2007). Total phenolic contents and Antioxidant Activity of pomegranate (*Punica granatum L.*) peel extracts. *J. Agric. Sci. Technol*, 9: 35-42.

AN ADAPTATION STRATEGY TO IMPROVE THE PROTEOLYTIC ACTIVITIES OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM PICKLES

Fatma Güler^{1,2}, Filiz Özçelik^{2}**

¹Bülent Ecevit University, Engineering Faculty, Department of Food Engineering, Zonguldak, Turkey

²Ankara University, Engineering Faculty, Department of Food Engineering, Ankara, Turkey

Geliş / Received: 30.06.2017; Kabul / Accepted: 17.07.2017; Online baskı / Published online: 25.07.2017

Güler, F., Özçelik, F. (2017). An adaptation strategy to improve the proteolytic activities of lactic acid bacteria isolated from pickles *GIDA* (2017) 42 (5): 561-567 doi: 10.15237/gida.GD17060

Abstract

This study aimed to increase the proteolytic activity of 10 lactic acid bacteria (LAB) species isolated from pickles, which had low activity. For this purpose, a nine-step adaptation through the gradual addition of MRS Broth with peptone and a subsequent four-step adaptation through the gradual addition of MRS Broth with skim milk were applied. A slight improvement of the proteolytic activity following the gradual addition of MRS Broth with peptone was observed only in six LAB samples, of which *Pediococcus ethanoliduras* 513 showed the highest activity at the ninth step. At the 13th step corresponding to the last step of the skim milk adaptation, only *L. buchneri* 114, *L. brevis* 494, and *L. plantarum* 380 showed slightly higher activity compared to that at the ninth step. In conclusion, peptone and skim milk adaptations did not yield any industrially significant increase in the proteolytic activity of the 10 LAB strains isolated from pickles. An important increase was only obtained in the proteolytic activity of *L. plantarum* 380. Its initial activity of 0.095 mM pNA increased to 0.182 mM pNA and finally to 0.250 mM pNA at the ninth and 13th steps, respectively, but this increase is too small for industrial applications.

Keywords: LAB, proteolytic activity, adaptation, pickles

BİTKİ KAYNAKLI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN PROTEOLİTİK AKTİVİTELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ İÇİN ADAPTASYON ÇALIŞMASI

Öz

Bu çalışmada turşulardan izole edilen bitki kaynaklı ve düşük proteaz aktivitesine sahip 10 adet laktik asit bakterisinin proteolitik aktivitesinin artırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, artan oranda pepton ilave edilmiş MRS Broth besiyerinde 9 aşamalı adaptasyon, ardından süt tozu ilaveli MRS Broth besiyerinde 4 aşamalı adaptasyon gerçekleştirilmiştir. Pepton adaptasyonunun 9. aşamasından sonra, yalnızca 6 adet LAB örneği başlangıca kıyasla bir miktar yüksek aktivite değeri göstermiş; bu aşamada en yüksek aktiviteyi *Pediococcus ethanoliduras* 513 göstermiştir. 13. aşamada (süt tozu adaptasyonu), yalnızca *Lactobacillus buchneri* 114, *L. brevis* 494 ve *L. plantarum* 380 örneklerinin aktivite değerleri 9. aşamaya göre bir miktar artmıştır. Sonuç olarak; pepton ve yağsız süt tozuna adaptasyon çalışmaları, deneme kapsamındaki bitki kaynaklı 10 adet LAB suşuna belirgin bir proteolitik aktivite artışı kazandırmamış, 13 aşamalı adaptasyon çalışması boyunca yalnızca *L. plantarum* 380 örneğinin proteolitik aktivite değerinde, bir miktar artış olduğu saptanmıştır. Başlangıç 0.095 mM pNA olan aktivite, 9. aşamada 0.182 mM pNA ve 13. aşamada 0.250 mM pNA değerine erişmiştir. Proteolitik aktivitelerdeki artışlar, endüstriyel uygulamalar için çok yetersizdir.

Anahtar kelimeler: LAB, proteolitik aktivite, adaptasyon, turşu

* This paper is a part of the first author's MSc thesis. Bu makale birinci yazarın Yüksek Lisans tezinin bir bölümüdür.

** Corresponding author/ Yazışmalardan sorumlu yazar;

✉ fozcelik@ankara.edu.tr,

☎ (+90) 312 203 3300/ 3608,

☎ (+90) 312 317 8711

INTRODUCTION

Lactic acid bacteria (LAB) grow naturally in milk, dairy products, raw plants, and intestinal mucosa of animals and humans (Carr et al., 2002; Karasu, 2006). LAB, which have been used as a starter culture in different fermented food processes, gives aroma and increase acidity during the ripening of the plant, which is linked to the proteolytic enzyme system of LAB. Especially in the cheese process, starter cultures possessing high proteolytic activity have received significant attention since the end of the 20th century (Law and Haandrikman, 1997). Although there are significant differences in the proteolytic activities of LAB species, several have the proteolytic system that makes it possible for them to grow in protein rich substrates, such as milk and meat. These foods include protein and its derivatives; however, their free amino acid concentration is not sufficient for LAB growth. Due to the proteolytic enzyme system, high molecular weight peptides are degraded into short peptides and amino acids, which are essential for the growth of microorganisms. This is one of the basic metabolic activities of LAB (Hansen et al., 2001; Lahtinen et al., 2012).

Since studies on the LAB proteolytic system have mostly been conducted using *Lactococci* genus, the proteolytic system of the *Lactococci* has been detailed (Law, 1997; Liu et al., 2010). The proteolytic system basically consists of extracellular proteinases (PrtP), oligopeptide, di-tripeptide transport system, and some cytoplasmic peptidases (Moulay et al., 2006). The proteolytic pathway initializes with the casein cleavage during the growth of lactic acid bacteria in milk. In the first stage, the cell envelope proteinase (CEP or PrtP) converts casein to oligopeptides. In the second stage, the oligopeptides and di-peptides are carried into the cell by specific oligopeptide (OppT) and di-tripeptide transport systems (DtpT) (Doeven et al., 2005; Kunji et al., 1996). This transport process is completed by the further degradation of oligopeptides and di-peptides to amino acids by cytoplasmic peptidases. After the three aforementioned stages, amino acids are catabolized by the following reactions: deamination, decarboxylation, transamination, and outer chain modification (Kieronczyk et al., 2001).

It is generally known that when a microorganism has been exposed to stress, it can have a response allowing it to survive in different environments. This is defined as an adaptive response, induced tolerance or adaptation (Exterkate, 1985). This mechanism works through the synthesis of specific enzymes as a response to the stimulus of different environments (Murray et al., 2004; Tunail, 2009). In addition, previous studies have shown that a medium can regulate proteinase activity (Exterkate, 1979; Hugenholtz et al., 1984; Laan et al., 1993; Marugg et al., 1995; Meijer et al., 1996; Smid and Konings, 1990).

Daeschel et al. (1987) indicated that LAB of a vegetable origin have limited or no proteolytic activity and their amino acid degradation ability is lower compared to other microorganisms. This study aimed to investigate the positive effect of protein derivative addition on the proteolytic activity and growth of LAB isolated from pickles.

MATERIAL AND METHOD

Microorganism

Ten LAB species from Ankara University Food Engineering Department Culture Collection were used. These species were isolated from pickles selected from the Ankara Çubuk region, which have low proteolytic activity (Tokatlı, 2013). The name of the LAB species and their culture collection numbers are given in Table 1. MRS Broth (Merck) was used for the activation of cultures that were stored at -65 °C in Ankara University Food Engineering Department Culture Collection. The cultures were incubated at 30 °C for 24-48 h.

Table 1. Lactic acid bacteria species used in experiment

Species	Ank. Univ. Food Eng. Dept. Culture Collection No
<i>Lactobacillus namurensis</i>	192
<i>Pediococcus parvulus</i>	233
<i>Lactobacillus buchneri</i>	114
<i>Pediococcus ethanolidurans</i>	513
<i>Lactobacillus brevis</i>	494
<i>Pediococcus ethanolidurans</i>	229
<i>Lactobacillus plantarum</i>	178
<i>Lactobacillus plantarum</i>	4
<i>Lactobacillus plantarum</i>	239
<i>Lactobacillus plantarum</i>	380

Adaptation Plan and Medium Compositions

After the culture activation, two stages of adaptation comprising a total of 13 steps were conducted to adapt the microorganisms to the protein and its derivate. The peptone adaptation stage consisted of nine steps and there were four steps in the skim milk adaptation stage. The details are given in Table 2. Due to the formation of small peptides from peptone, the peptone addition was used as a transitional period prior to the skim milk adaptation and planned to take longer than skim milk adaptation stage. We conducted all the experiments in duplicate.

For the nine-step peptone adaptation stage, the peptone solution was prepared at a concentration of 50 g/L. For the four-step skim milk adaptation stage, a skim milk powder (Sigma) solution was prepared at 10% (w/v). These solutions were gradually added to the MRS Broth (Merck) according to the adaptation plan (10% addition rate). The compositions of the media are shown in Table 2. The inoculation rate was 5% at each step and the LAB were grown at 30 °C for 48-72 h.

Determination of Activation and Growth

The growth of the 10 LAB species were monitored using a UV-Vis spectrophotometer (Shimadzu, UV-1208) at 600 nm in both the activation and peptone adaptation stages. The pH values of the media were determined at the initial, ninth, and 13th steps with a benchtop pH meter (Mettler Toledo Seven Easy pH, China).

Proteolytic Activity Analysis

The chromogenic proteolytic method was used for the analysis of proteolytic activity. The principle of the chromogenic method is based on the degradation of chromogenic peptide to p-nitroanilide (p-NA) by LAB proteinase and the measurement of p-nitroanilide at 410 nm in a UV-Vis spectrophotometer (Savijoki et al., 2006). In this method, the LAB culture incubated in 10 mL MRS-Ca medium (10 mM CaCl₂) at 30°C for 24 hours was centrifuged at 6000 rpm and 4°C for 10 min (Micro 22 Hettich, Germany). The bacterial precipitate was washed twice with a 10 mM CaCl₂-NaCl solution. Then, 5 mL Tris buffer (50 mM, pH 7.8) was added to the cells which were resuspended using a vortex to form an enzyme solution. The 200 µL enzyme solution was transferred to an eppendorf tube, to which 287.5 µL of phosphate buffer (0.2 M, pH 7.0), 225 µL of 5 M NaCl and 20 µL of S-Ala (N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide, 20 mM Sigma) were added. This solution was incubated at 30°C for 30 min in a water bath. To stop the reaction, 175 µL 80% (v/v) acetic acid was added, and then the reaction medium was centrifuged at 15000 rpm for 5 min. The optical density (OD) was measured at 410 nm and the concentration of the released pNA was calculated as mM pNA (Berdal et al., 1983; Savoy and Hebert, 2001).

Table 2. Medium compositions used in the adaptation plan (mL/10 mL)

Stage	Step	Medium Composition (mL/10 mL)		
		MRS broth	Peptone Solution (%5 w/v)	Skim Milk Solution (%10 w/v)
Initial	0	10.00	-	-
Peptone	1	9.00	1.00	-
Adaptation Stage	2	8.00	2.00	-
	3	7.00	3.00	-
	4	6.00	4.00	-
	5	5.00	5.00	-
	6	4.00	6.00	-
	7	3.00	7.00	-
	8	2.00	8.00	-
	9	1.00	9.00	-
	Skim Milk	10	0.84	6.66
Adaptation Stage	11	0.56	4.44	5.00
	12	0.84	6.66	2.50
	13	0.28	2.22	7.50
	13	-	-	10.00

Statistical Analyses

The experimental data were analyzed using the Minitab 16 and the statistical differences among means were determined with Tukey's multiple range tests at the 5 % significance level.

RESULTS AND DISCUSSION

The Effect of Adaptation on LAB Growth

The ODs of LAB at the initial and ninth steps are shown in Tables 3 and 4. The OD values of LAB could not be measured at the 13th step because of skim milk concentration; therefore, the growth of microorganisms was observed based on the coagulation and pH of the media. While the OD of seven species increased from the 1st to 2nd step, the OD of three *Lactobacillus plantarum* species (4, 178 and 239) decreased. After the 2nd step, the OD values of all the samples gradually decreased.

To observe the effect of peptone addition to the medium, we compared the OD of LAB species at the initial step and the 9th step (Table 3). It was found that the OD values of all the species had decreased. *Lb. plantarum* 380 showed the

highest decreasing rate with 44% and *Lb. buchneri* 114 showed the lowest rate of decrease with 18%. This decrease can be attributed to the decreasing nitrogen and carbon ratio in the medium.

The Effect of Adaptation on pH

Figure 1 shows the pH values of the growth medium at the initial, ninth and 13th steps after 48 h of incubation. When these three steps are compared, eight species had lower pH values at the initial step than they had in the next two steps. This shows that the growth at the initial step was better than those at the other steps. *Lb. buchneri* 114 had the highest reducing pH level by 2.39 units at the ninth step. Furthermore, at this step, all species except *Lb. brevis* 494 reduced the pH at the same level. Interestingly, *Lb. brevis* 494 reduced the pH at both the ninth and 13th steps more than at the initial step. The *Pediococcus ethanolidurans* species (229 and 513) and *Lb. plantarum* species (4, 178, 239 and 380) showed similar reductions of the pH levels.

Table 3. Optical density (600 nm) values after 48 h incubation during the peptone adaptation stage (nine-step)

Species	Steps								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Lb. namurensis</i> 192	1.327	2.078	1.984	1.902	1.783	1.654	1.576	1.473	1.184
<i>P. parvulus</i> 233	1.622	2.236	2.260	2.205	2.142	2.054	1.940	1.719	1.516
<i>Lb. buchneri</i> 114	1.671	1.716	1.882	1.931	1.967	1.902	1.986	2.097	1.589
<i>P. ethanolidurans</i> 513	1.709	2.280	2.301	2.270	2.157	2.060	1.927	1.719	1.416
<i>Lb. brevis</i> 494	1.886	2.157	2.051	2.027	1.936	1.869	1.836	1.701	1.492
<i>P. ethanolidurans</i> 229	1.499	2.075	1.995	1.945	1.848	1.722	1.715	1.577	1.430
<i>Lb. plantarum</i> 178	2.285	2.382	2.290	2.250	2.205	2.060	1.878	1.640	1.328
<i>Lb. plantarum</i> 4	2.295	2.275	2.250	2.197	2.201	2.069	1.900	1.668	1.494
<i>Lb. plantarum</i> 239	2.382	2.302	2.270	2.218	2.223	2.094	1.933	1.694	1.465
<i>Lb. plantarum</i> 380	2.142	2.223	2.205	2.146	2.131	1.995	1.821	1.561	1.561

Table 4. Optical density values at the initial and ninth step after 48 h incubation (600 nm)

Species	Step 0 (initial)	Step 9
<i>Lb. namurensis</i> 192	1.998	1.184
<i>P. parvulus</i> 233	2.193	1.516
<i>Lb. buchneri</i> 114	1.815	1.589
<i>P. ethanolidurans</i> 513	2.205	1.416
<i>Lb. brevis</i> 494	2.145	1.492
<i>P. ethanolidurans</i> 229	2.145	1.430
<i>Lb. plantarum</i> 178	2.456	1.328
<i>Lb. plantarum</i> 4	2.232	1.494
<i>Lb. plantarum</i> 239	2.456	1.465
<i>Lb. plantarum</i> 380	2.395	1.348

LAB are known to decrease the pH values of media in parallel with the growth of the bacteria. The OD values decreased gradually with the addition of peptone and skim milk through nine steps. Considering both the OD results and pH values at these three steps, the growth of bacteria was affected negatively by the addition of the protein derivative to media.

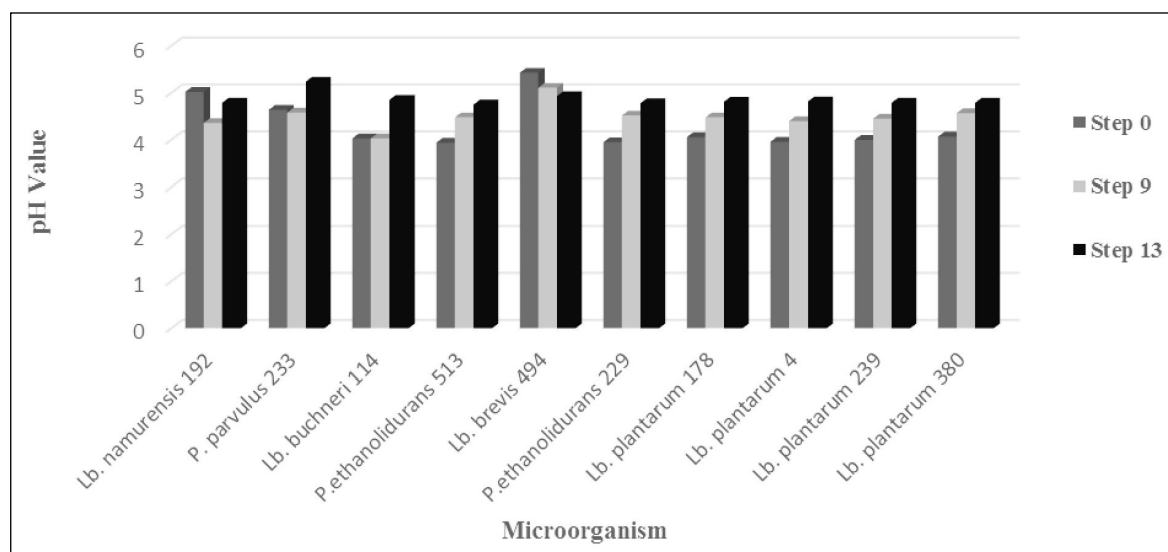


Figure 1. The pH values of species at the initial, ninth and 13th steps after 48 h incubation

The Effect of Adaptation on Proteolytic Activity of LAB

Table 5 shows the proteolytic activities (mM pNA) of LAB after 48-72 h incubation in the MRS-Ca medium. While six samples showed a higher proteolytic activity at the ninth step than at the initial step, four samples (*Pediococcus parvulus* 233, *Lb. buchneri* 114, *Lb. brevis* 494 and *Lb. plantarum* 380) showed lower activity. The highest proteolytic activity was measured as 0.413 mM pNA for *P. ethanolidurans* 513 and the lowest was 0.086 mM pNA for *Lb. buchneri* 114 at the ninth step. At the 13th step, only three species (*Lb. buchneri* 114, *Lb. brevis* 494 and *Lb. plantarum* 380) had higher proteolytic activities

Table 5. Proteolytic activities of LAB at the ninth and 13th steps of adaptation (mM pNA)

Species	Step 0 (initial)	Step 9*	Step 13*
<i>Lb. namurensis</i> 192	0.204	0.227	0.009
<i>P. parvulus</i> 233	0.286	0.240	0.204
<i>Lb. buchneri</i> 114	0.454	0.086	0.182
<i>P. ethanolidurans</i> 513	0.286	0.413	0.227
<i>Lb. brevis</i> 494	0.159	0.141	0.182
<i>P. ethanolidurans</i> 229	0.182	0.390	CD**
<i>Lb. plantarum</i> 178	0.209	0.286	0.182
<i>Lb. plantarum</i> 4	0.354	0.318	0.045
<i>Lb. plantarum</i> 239	0.032	0.182	0.060
<i>Lb. plantarum</i> 380	0.095	0.182	0.250

* A statistically significant difference was found between LAB species ($P < 0.05$)

** CD: could not be detected

compared to their activities at the initial step. The highest proteolytic activity was 0.250 mM pNA for *Lb. plantarum* 380. No pNA was detected for *P. ethanolidurans* 229 at this step. During the adaptation stages, the enhancement in the proteolytic activity was only observed for *Lb. plantarum* 380 throughout the adaptation plan. Its activity was found as 0.095, 0.182 and 0.250 mM pNA at the initial, ninth and 13th steps, respectively.

Daeschel et al. (1987) indicated that LAB of vegetable origin possess limited or no proteolytic activity and their amino acid degradation ability is lower compared to other microorganisms. Karasu (2006) found that *Lb. plantarum* species isolated from pickles and olives had low proteolytic activity (0.056-0.083 mg tyrosine/mL). Similarly, Kivanç et al. (2011) showed similar results for *Lb. plantarum* (0.04-2.57 mg tyrosine/mL) isolated from boza (a traditional fermented Turkish beverage produced with grain). Furthermore, Turhan and Öner (2014) showed that *Lactobacillus* and *Lactococcus* genus species isolated from white cheese had high activity. They classified proteolytic activities as follows; 20 mg tyrosine/mL as high, 10-20 mg tyrosine/mL as medium and 10 mg tyrosine/mL as low. In this regard, these results imply that LAB isolated from dairy products have considerably higher proteolytic activity than those isolated from plants.

Hebert et al. (2000) conducted similar research on *Lactobacillus helveticus* and found that the biosynthesis of cell envelope proteinase (CEP) decreased in peptides and amino acids in an enriched medium (MRS Broth, Casitone, Casamino acid, etc.). Similarly, the CEP activity of *Lactobacillus rhamnosus* was affected by peptide and amino acid concentrations in the medium. In other respects, Sadat-Mekmene et al. (2011) found that *Lb. helveticus* achieved 9-12 times more CEP activity in milk than in the MRS Broth. They emphasized that the peptide-enriched medium repressed the CEP enzyme on the transcription level. Based on the information in the literature, it is clear that the proteolytic system of LAB is affected by the addition of peptides, amino acids, and other protein derivatives. Furthermore, the enzymes of proteolytic systems can be modulated by the medium content.

Tamang et al. (2009) investigated the functional properties of LAB isolated from local fermented vegetables in the Himalayas. The bacteria samples of plant origin were easily adapted to the milk ecology and produced acidity and coagulation. Although these species did not demonstrate any proteinase activity, they resulted in milk coagulation due to their peptidase activity.

In our experiments, we expected to obtain higher activity in both the peptone-added MRS Broth and the skim milk-added MRS Broth as observed by Sadat-Mekmene et al. (2011). Eight of the ten LAB samples following the 13th step adaptation plan showed lower proteolytic activity than at the initial step. For one sample, no activity could be detected and only *Lb. plantarum* 380 had increased proteolytic activity. As in the study by Tamang et al. (2009), coagulation was observed in the skim milk adaptation stage. A possible explanation for this result is the lack of the proteinase enzyme that caused the low proteolytic activity.

CONCLUSIONS

The OD of the 10 LAB species isolated from pickles decreased during growth in peptone-added MRS Broth medium. This decrease shows that peptone added medium is not suitable for growth and the reduced carbon source rate of the medium affected growth of LAB negatively.

A comparison of the proteolytic activity of LAB at the initial and ninth steps showed that the activities of six samples increased slightly. However, the activities of five samples decreased at the 13th step. This result was linked to the presence of small peptides in the peptone, which could be transported to the cell and used by it. Furthermore, casein, a complex molecule unlike peptone, could not be degraded by the cell.

In conclusion, only *Lb. plantarum* 380 was able to increase the proteolytic activity during the adaptation applications of both the peptone-added and skim milk-added broths. The proteolytic activity of *Lb. plantarum* 380 was 0.095, 0.182 and 0.250 mM pNA at the initial, ninth and 13th steps, respectively. This finding indicates that *Lb. plantarum* 380 has a higher activity capacity to adaptation protein-enriched medium than the other LAB species. Currently, this adaptation-increased proteolytic activity is not sufficient for industrial applications; however, to confirm our result, we suggest that further research should be conducted using *Lb. plantarum* 380 but with a longer adaptation period applying different additives.

REFERENCES

- Berdal, B. P., Bovre, K., Olsvik, O., Omland, T. (1983). Patterns of extracellular proline-specific endopeptidase in *Legionella* and *Flavobacterium* spp. demonstrated by use of chromogenic peptides. *J Clin Mic*, 17(6): 970-974.
- Carr, F. J., Chill, D., Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Rev in Microbiol*, 28: 281-370.
- Daeschel, M. A., Anderson, R. E., Fleming, H. P. (1987). Microbial ecology of fermenting plant materials. *FEMS Microbiol Rev*, 46: 357-367.
- Doeven, M. K., Kok, J., Poolman, B. (2005). Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other microorganisms. *Mol Microbiol*, 57: 640-649
- Exterkate, F. A. (1979). Accumulation of proteinase in the cell wall of *Streptococcus cernoris* strain AM1 and its regulation of production. *Arch Microbiol*, 120: 247-254.
- Exterkate, F. A. (1985). A dual-directed control of cell wall proteinase production in *Streptococcus cremoris* AM1: A possible mechanism of regulation during growth in milk. *J Dairy Sci*, 68: 562-571.

- Hansen, B. V., Houlberg, U., Ardö, Y. (2001). Transamination of branched-chain amino acids by a cheese related *Lactobacillus paracasei* strain. *Int Dairy J*, 11: 225-233.
- Hebert, E. M., Raya, R. R., De Giori, G. S. (2000). Nutritional requirements and nitrogen-dependent regulation of proteinase activity of *Lactobacillus helveticus* CRL 1062. *Appl Env Microbiol*, 66: 5316-5321.
- Hughenoltz, J., Exterkate, F. A., Konings, W. N. (1984). The proteolytic system of *Streptococcus cremoris*: An immunological analysis. *Appl Env Microbiol*, 48: 1105-1110.
- Karasu, N. (2006). Turşu ve zeytinden antagonistik ve probiyotik özellikte laktik starter kültür eldesi. Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Denizli, Türkiye, 88 s.
- Kıvanç, M., Yılmaz, M., Çakır, E. (2011). Isolation and identification of lactic acid bacteria from boza, and their microbial activity against several reporter strains. *Turk J Biol*, 35: 313-324.
- Kieronczyk, A., Skeie, S., Olsen, K., Langsrud, T. (2001). Metabolism of amino acids by resting cells of non-starter lactobacilli in relation to flavour development in cheese. *Int Dairy J*, 11: 217-224.
- Kunji, E. R. S., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., Konings, W. N. (1996). The proteolytic system of lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenboek*, 70: 187-221.
- Laan, H., Bolhuis, H., Poolman, B., Abee, T., Konings, W. N. (1993). Regulation of proteinase synthesis in *Lactococcus lactis*. *Acta Biotechnol*, 13: 95-101.
- Lahtinen, S., Ouwehand, A. C., Salminen, S., Von Wright, A. (2012). Lactic acid bacteria; microbiological and functional aspects. 4th edition, CRC Press, New York, the USA, 779 p.
- Law, B. A. (1997). Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk. 2nd edition, Blackie Academic & Professional, the UK, 365 p.
- Law, J., Haandrikman, A. (1997). Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Int Dairy J*, 7: 1-11.
- Liu, M., J., Bayjanov, J., R., Renckens, B., Nauta, A., Siezen R., J. (2010). The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: A genomic comparison. *BMC genomics*, 11(1): 36.
- Marugg, J. D., Meijer, W., van Kranenburg, R., Laverman, P., Bruinenberg, P. G., deVos, W. M. (1995). Medium-dependent regulation of proteinase gene expression in *Lactococcus lactis*: Control of transcription initiation by specific dipeptides. *J Bacteriol*, 177: 2982-2989.
- Meijer, W. M., Marugg, J. D., Hugenholtz, J. (1996). Regulation of proteolytic enzyme activity in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 62: 156-161.
- Moulay, M., Aggad, H., Benmechernene, Z., Guessas, B., Henni, D. E., Kihal, M. (2006). Cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and their proteolytic activity. *WJ Dairy & Food Sci*, 1(1): 12-18.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W. (2004). Harper'in Biyokimyası. Nobel matbaacılık, İstanbul, Türkiye, 928 s.
- Sadat-Mekmene, L., Genay, M., Atlan, D., Lortal, S., Gagnaire, V. (2011). Original features of cell-envelope proteinases of *Lactobacillus helveticus*. *Int J Food Microbiol*, 146: 1-13.
- Savijoki, K., Ingmer, H., Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 71(4): 394-406.
- Savoy, G. G., Hebert, E. M. (2001). Methods to determine proteolytic activity of lactic acid bacteria. *Methods Biotech*, 14: 197-202.
- Smid, E., Konings, W. N. (1990). Relationship between utilization of proline and proline-containing peptides and growth of *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol*, 172: 5286-5292.
- Tamang, J. P., Tamang, B., Schillinger, U., Guigas, C., Holzapfel, W. H. (2009). Functional properties of lactic acid bacteria isolated from ethnic fermented vegetables of the Himalayas. *Int J Food Microbiol*, 135: 28-33.
- Tokatlı, M. 2013. Ankara Çubuk Yöresi Turşularından İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanmaları, Teknolojik ve Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi ve Starter Olarak Kullanılma Olanaklarının Değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Türkiye, 183 s.
- Tunail, N. (2009). Mikrobiyoloji. Pelin Ofset Tipo Matbaacılık, Ankara, Türkiye, 434 s. ISBN: 978-605-603-62-0-0
- Turhan, İ., Öner, Z. (2014). Determination of starter culture properties of lactic acid bacteria isolated from cheese. *GIDA*, 39(1): 9-15.

EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF PECTIN FROM FRESH GLOBE ARTICHOKE AND CANNED ARTICHOKE WASTE

Cagatay Ceylan^{1*}, Oguz Bayraktar², Erhan Atci³, Şahin Sarrafi³

¹ İzmir Institute of Technology, Department of Food Engineering, Urla, İzmir, Turkey

² Ege University, Department of Chemical Engineering, Bornova, İzmir, Turkey

³ İzmir Institute of Technology, Department of Chemical Engineering, Urla, İzmir, Turkey

Geliş / Received: 31.01.2017; Kabul / Accepted: 16.06.2017; Online baskı / Published online: 25.07.2017

Ceylan, C., Bayraktar, O., Atci, E., Sarrafi, Ş. (2017). Extraction and characterization of pectin from fresh globe artichoke and canned artichoke waste. *GIDA* (2017) 42 (5): 568-576 doi: 10.15237/gida.GD17015

Abstract

The pectin contents of fresh globe artichoke (stem, receptacle, and bract) and waste of artichoke canning industry were investigated. The highest pectin amount was found in the stem part of fresh globe artichoke (6.42%) with the highest amount of anhydrogalacturonic acid (AGA) and anhydrouronic acid (AUA) content. The pectin yields of receptacle and bract parts were found to be 5.31 and 4.55%, respectively. The pectin yield from the industrial waste was the lowest, 4.43%. The highest ash content (5.65 %) along with the lowest anhydrouronic acid amount (73.28%) indicated the lowest purity for the industrial waste. The degrees of esterification for the pectin obtained from the stem, receptacle and bract parts were 55.26%, 52.26%, and 56.17%, respectively indicating the presence of high methyl-esterified (HM) pectin. The pectin from the industrial waste had the lowest degree of esterification (46.02%). The FTIR results indicated that acid processing affected the structural properties of pectin from the industrial waste with higher methoxyl content and esterification degree.

Keywords: Globe artichoke, pectin, industrial waste, FTIR

TAZE ENGİNAR VE KONSERVE ENGİNAR ATIĞINDAN PEKTİN EKSTRAKSİYONU VE KARAKTERİZASYONU

Abstract

Bu çalışmada taze enginar (gövde, tabla ve yenilebilir yaprak) ile konserve enginar endüstrisinde çıkan atığın pektin içerikleri incelenmiştir. En yüksek pektin içeriği % 6.42 olarak taze enginarın gövde kısmında bulunmuştur. Pektin içeriğine ek olarak en yüksek anhidrogalakturonik asit ve anhidrouronik asit miktarları da gövde kısmında bulunmuştur. Tabla ve yenilebilir yaprak kısımlarında ise pektin verimi sırasıyla % 5.31 ve % 4.55 olarak bulunmuştur. En düşük pektin verimi % 4.43 ile endüstriyel atıktan elde edilmiştir. En yüksek kül içeriğine (% 5.65) ek olarak en düşük anhidrouronik asit miktarı (% 73.28) en yüksek safsızlığın endüstriyel atık suyunda olduğunu göstermektedir. Gövde, tabla ve yenilebilir yaprak kısımlarındaki esterleşme derecesi sırasıyla % 55.26, % 52.26 ve % 56.71 olarak elde edilmiştir. Bu yüzdeler yüksek metil esterleşmiş pektin olduğunu göstermektedir. % 46.02 ile en düşük esterleşme derecesi endüstriyel atıktan elde edilmiştir. FTIR sonuçlarına göre asit prosesiyle pektinin yapısal özelliklerinin değiştiği ve endüstriyel atıklarda daha yüksek metoksil içeriği ve daha yüksek esterleşme derecesi elde edildiği gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Enginar, pektin, endüstriyel atık, FTIR

* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar

✉ cagatayceylan@iyte.edu.tr,

☎ (+90) 232 750 6328,

☎ (+90) 232 750 6196

INTRODUCTION

Pectin is a biopolymer which is a mixture of polysaccharides occurring naturally. Primary cell walls of many plant cells contain pectin. The uses of pectin are rapidly increasing in the pharmaceutical and biotechnology industry (1, 2). Conventionally, it is used in preparation of jams in order to exploit their gelling and thickening property. Recently, pectin has been used in drug delivery systems and other biotechnological applications. It is also used as a matrix material for entrapment of drugs, proteins and cells. In addition to these examples, several studies have shown that using pectin for diet can reduce levels of serum total cholesterol and low density lipoprotein cholesterol, and moderate the glucose response (3). Several investigations have been carried out to utilize industrial wastes as a pectin source. In addition, several plant materials were also reported as potential sources of pectin (4- 6).

Globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) is a large thistle-like perennial plant that belongs to Asteraceae (or *Compositae*) family, and native to the Mediterranean basin (7). Today, globe artichoke is widely cultivated all over the world; however, it represents a pivotal component of the Mediterranean agricultural economy. The produced artichoke is consumed both in fresh and canned. The leaves of artichoke have been widely used in herbal medicine for treatment of digestive complaints (e.g., nausea, abdominal pains, dyspepsia, loss of appetite), hepatobiliary dysfunction, and for the inhibition of cholesterol absorption (7, 8). Artichoke canning also produces its industrial wastes mostly left unused or used as an animal feed. Therefore it is very important to utilize the waste as a source of pectin.

To the best of our knowledge, only a few studies have been carried out on the determination of pectin content in globe artichoke (5, 9). In addition, the discrete parts of the artichoke have never been scrutinized in this context. In the present study we isolated and characterized the pectin content of three structural sections (stem, receptacle, and bract) of globe artichoke and the industrial waste sample.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Fresh globe artichokes were obtained from various grocery stores located in İzmir, Turkey, from January to March. Artichoke waste samples were obtained from a local canning factory. These wastes consisted of "liquid" materials which were used for blanching fresh artichokes and "processed artichokes" mainly composed of outer and inner bracts of the plant material. All the reagents used in the experiments were of analytical grade and used without further purification.

Preparation of plant raw materials

Fresh artichokes were dissected into four discrete parts including bracts (both outer and inner), receptacle, filament and stem. All the plant parts and solid wastes were dried at 40 °C in oven for four consecutive days-resulting in an average drying loss of 88%. Drying temperature was chosen as 40 °C. The dried samples were finely ground with a grinder. The ground samples were stored in light-protected glass bottles for further analyses.

Extraction and purification of pectin

The extraction method of pectin from fresh and industrial artichokes waste samples was adapted from the method as described (10), and duplicate extractions were carried out in each run. 10 grams of dried and ground plant material were transferred to a 500-ml screw-capped glass bottle containing 400 ml of distilled water. The pH of solution was adjusted to different pH values of 1.5, 3.0 and 4.5 with 1N HCl and heated with shaking at 90 °C for one hour. The extract was rapidly pre-filtered through a 53-µm metal sieve to remove the coarse particles. It was then filtered using Whatman No.4 filter paper. The filtrate was cooled rapidly in an ice bath, and mixed with 95 % ethanol at a volume ratio of 1:1. It was further stirred for 30 minutes, and allowed to stand overnight at 4 °C. The precipitate was centrifuged at 1844 x g for 20 minutes, and washed with 400-ml portions of 70 % ethanol until the precipitate is

essentially chloride ion-free (pH > 4). The precipitate was eventually dried *in vacuo* at 40 °C. The isolated pectin was used for further analysis.

Determination of pectic substances

The colorimetric method (10) was used to determine the pectin content in the artichoke samples. 0.1 gram of dried pectin was weighed, made into solution and diluted to 100 ml with 0.05 N NaOH. The solution was allowed to stand for 30 minutes to de-esterify the pectin. 2 ml of this solution was diluted to 100 ml with distilled water. 1 ml of pectin solution was mixed with 0.5 ml of 0.1% carbazole reagent in a tube. A white flocculent precipitate was formed. 6 ml of concentrated sulfuric acid was added with constant agitation. The tube was closed with rubber stopper and allowed to stand for 10 minutes for the color to develop. 15 minutes after adding the concentrated sulfuric acid, the absorbance of the sample was measured at 525 nm by setting the instrument to 100 % transmittance with the blank. The standard curve of anhydrogalacturonic acid (AGA) was plotted and the percentage content of the AGA was found in the samples. The method is based on the reaction of galacturonic acid, the basic structural unit of pectin molecule, with carbazole in the presence of H₂SO₄ and measurement of the color intensity at 525 nm. It is desirable to report the results as anhydrogalacturonic acid (AGA), since it is the basic structural unit of pectin (Equation 1).

$$\text{AGA}\% = \frac{(\mu\text{g of AGA found in aliquot}) (\text{dilution}) 100}{(\text{ml taken for estimation}) (\text{weight of pectin sample}) 1,000,000} \quad (1)$$

The percentage of anhydrouronic acid content was calculated according to Equation 2 (10) where m.e. = milli equivalents.

$$\text{AUA} (\%) = \frac{(\text{m.e. alkali for free acid} + \text{m.e. Alkali for saponification} + \text{m.e. Titratable ash})(176)(100)}{\text{Weight of sample}} \quad (2)$$

Ash content and alkalinity of the ash

Pectin sample (1 gram) was weighed into a tared crucible and ignited slowly, then heated for 4 hours at 600 °C. The crucible was cooled to room temperature in a desiccator and weighed. To

determine the alkalinity of ash, the ash was dissolved in 25 ml of 0.1 N HCl. The mixture was heated gently to boiling and cooled. It was then titrated with 0.1 N NaOH using phenolphthalein as indicator. A blank titration using 25 ml of the HCl was also carried out.

The ash content of pectin samples was calculated according to Equation 3 (10).

$$\text{Ash content} (\%) = \frac{(\text{Weight of ash})(100)}{(\text{Weight of sample})} \quad (3)$$

The alkalinity of ash is determined from the equation 4 (10).

$$\text{Alkalinity} (\%) = \frac{(\text{Blank} - \text{Titre}) (\text{Normality of alkali})(60)(100)}{(\text{Weight of ash})(1000)} \quad (4)$$

Equivalent weight

Equivalent weight is used for calculating the anhydrouronic acid content and the degree of esterification. 0.5 gram of pectin sample was weighed into a 250-ml Erlenmeyer flask and moistened with 5 ml of pure ethanol. 1 gram of sodium chloride was added to sharpen the end point. 100 ml of carbon dioxide-free distilled water was added. It was ascertained that the entire pectin sample was dissolved and no lumps were retained on the sides of the flask. The solution was titrated slowly to avoid possible deesterification with 0.1 N NaOH by using automatic potentiometric titrator to the end point at pH 7.5. The neutralized solution was used for methoxyl determination. The equivalent weight of the samples was calculated from the equation 5 (10).

$$\text{Equivalent weight} = \frac{(\text{Weight of sample})(1000)}{(\text{Volume of alkali}) (\text{Normality of alkali})} \quad (5)$$

Methoxyl content

To the neutral solution titrated for equivalent weight, containing 0.5 gram of pectin sample, 25 ml of 0.25 N NaOH was added. The mixture was shaken thoroughly and allowed to stand for 30 minutes at room temperature in a stoppered flask. 25 ml of 0.25 N HCl was added and titrated with 0.1 N NaOH by using automatic potentiometric titrator to the end point at pH 7.5. The methoxyl content of pectins was calculated according to the equation 6 (10).

$$\text{Methoxyl content} (\%) = \frac{(\text{Volume of alkali}) (\text{Normality of alkali})(31)(100)}{(\text{Weight of sample})(1000)} \quad (6)$$

The degree of esterification was calculated from methoxyl and anhydrouronic acid contents by using the equation 7 (17).

$$\text{Degree of esterification (\%)} = \frac{(\text{Methoxyl content \%}) (176)(100)}{(\text{Anhydrouronic acid content \%})(31)} \quad (7)$$

FTIR Analyses

The pectin samples were lyophilized in a freeze drier (Labconco, FreeZone 18-l freeze dry system, USA) overnight to remove water. The pectin powder was mixed with dried potassium bromide (KBr) (Sigma-Aldrich, USA) in a mortar (at a ratio of 1:100). The mixture was then pressed to form a pellet. The spectral analysis was carried out using a Perkin-Elmer spectrometer equipped with MIR TGS detector (Perkin Elmer Inc., Norwalk, CT, USA). FTIR spectra of the samples were recorded between 4000 and 450 cm⁻¹. The interferograms were averaged for 20 scans at 4 cm⁻¹ resolution.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of pH on the amount of extracted anhydrogalacturonic acid content (AGA)

The pH of the pectin extraction media is one of the essential parameters determining the pectin yield. To investigate the effect of pH on the pectin yield, a series of experiments were carried out by

extracting the bract part of globe artichoke at three different pH values of 1.5, 3.0 and 4.5. The percentage of anhydrogalacturonic acid content (AGA) was determined and the results are presented in Figure 1. The anhydrogalacturonic acid content increased linearly with decreasing pH of extractant. Similar behavior has been reported for extraction of pectin from different plant materials (11-15). Hence, the maximum pectin yield was obtained at pH 1.5. Therefore the rest of the pectin extraction procedures were conducted at this pH value. Similarly the pectin yield was also determined at the same pH values and similar results were obtained indicating highest pectin extraction at pH value of 1.5.

Characterization of pectin isolated from different parts of artichoke

The pectin from three different structural parts, stem, receptacle and bract of globe artichoke and an industrial waste were characterized in terms of pectin yield, anhydrogalacturonic acid content, anhydrouronic acid content, equivalent weight, total ash content and alkalinity of ash, methoxyl content and degree of esterification. The properties of pectin from different plants are dependent on the source (16). Similarly pectin from different structural parts of globe artichoke appears to have different physicochemical properties.

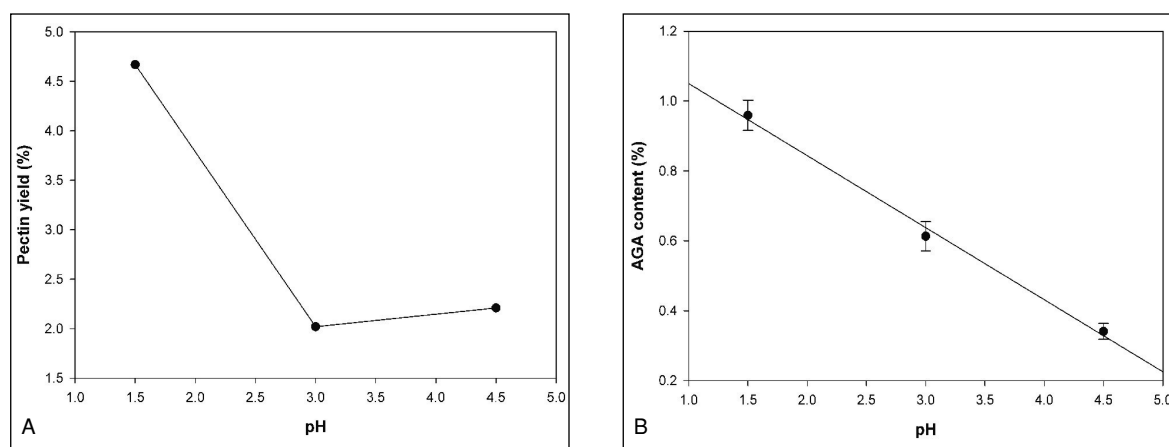


Figure 1. The effect of pH on the a) yield % and b) anhydrogalacturonic acid (AGA) % content of the pectin extracted from bract part of globe artichoke.

Pectin yield and total anhydrogalacturonic acid content

The yield of pectin results for different parts of artichoke are shown in Figure 2 a. As the results suggest the maximum pectin yield was obtained in the stem (6.42 ± 0.41 %). The pectin yields of receptacle and bract parts were found to be 5.31 ± 0.17 and 4.55 ± 0.25 %, respectively. The pectin obtained from the industrial waste yielded the lowest, 4.43 ± 0.19 %. The pectin yields were obtained slightly higher (7.12 %) or lower (2.4 %) than in earlier reports on the pectin from globe artichoke (5, 9). The differences between the pectin yields can be explained due to the methods followed in each study. Orlovskaya et al (9) used a method based on a mixture of oxalic acid and ammonium oxalate in different process parameters. Elwell and Dehn (5) used a consecutive sequence of water and sulfuric acid treatments with different process parameters such as extraction temperature and time. In our study we followed a method based on hydrochloric acid extraction at 90 °C for 1 hour (10).

Anhydrogalacturonic acid (AGA) content is an essential parameter in pectin extraction and characterization, since it is the basic structural unit of pectin molecule. The percentage of anhydrogalacturonic acid (AGA) in all artichoke samples are demonstrated in Figure 2 b. The results showed that the highest amount of AGA%, 1.01 %, was found in the stem part. The higher the AGA% is found in the sample, the higher the amount of pectin is represented in that sample. The lowest amount of AGA% was found in the industrial waste as it was anticipated. The bract and receptacle sections of globe artichokes possess lower amounts of anhydrogalacturonic acid in their plant tissues than that of the stem section.

Anhydrouronic acid content

Determination of percentage of anhydrouronic acid (AUA) content is crucial to verify the purity of extracted pectins, to determine degree of esterification, and to estimate their physical properties (10). Degree of purity and esterification degree are two important parameters in the use of pectin in jams and jellies as gelling agents used in food industry (10) which are closely related with AUA%. In this study the percentage

of anhydrouronic acid (AUA) amount in all artichoke samples are demonstrated in Figure 2c. The results showed that the highest amount of AUA% (78.31 %) was found in the stem samples. The lowest amount of AUA% was found in the receptacle 72.47 ± 2.52 %. The bract samples had the AUA% amount of 75.48 ± 1.70 %. The industrial waste had an AUA value of 73.28 ± 0.92 %. Therefore the stem had the pectin

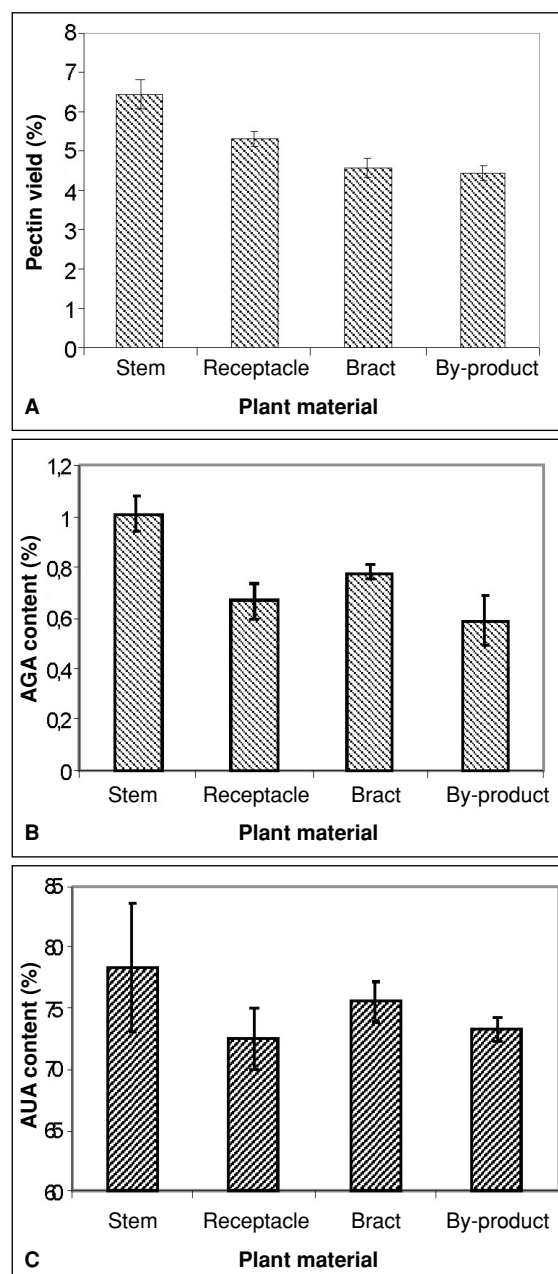


Figure 2. The a) yield percentage, b) percentage of anhydrogalacturonic acid (AGA) and c) anhydrouronic acid (AUA) content of pectin extracted from different parts of globe artichoke samples and industrial waste (By product).

content with the higher purity levels when compared with the other parts of the globe artichoke.

It was reported that the anhydrouronic acid content of pectin extracted from golden delicious pomace, golden delicious partially ripe apple, and that of commercial pectin was 74.1 %, 73.9 %, and 70.5 %, respectively (17). Anhydrouronic acid contents of pectin extracted from artichoke samples were found to be higher than that of commercial samples.

Determination of ash content and alkalinity of the ash

The results of ash content and alkalinity of ash are given in Figure 3a for all of the artichoke samples. The industrial-waste had the highest ash and alkalinity contents when compared with those of the artichoke parts. This indicated the lower purity of pectin in the industrial-wastes.

The ash content of the pectin samples determines

its purity along with anhydrouronic acid (AUA%) value (18). Varying amounts of ash percent from several plants have been reported. The highest ash amount found in the industrial waste indicated the presence of minerals possibly added during the processing of globe artichoke wastes. The ash content of pectin samples was found to vary between 2.40 % and 5.65 %. The lowest ash content was found in the bract samples (2.40 %) and the highest ash content was found in the waste samples ($5.65\% \pm 0.35\%$).

Determination of equivalent weight

The equivalent weight of pectin extracted from the stem, receptacle, bract and waste were found to be 681.93, 576.60, 688.29 and 764.68, respectively as shown in Figure 3b. The equivalent weight of commercial pectin (i.e., extracted from apple) was found to be 1030.9 (17). The equivalent weight of the pectin extracted from artichoke samples was lower than those for the industrial waste sample.

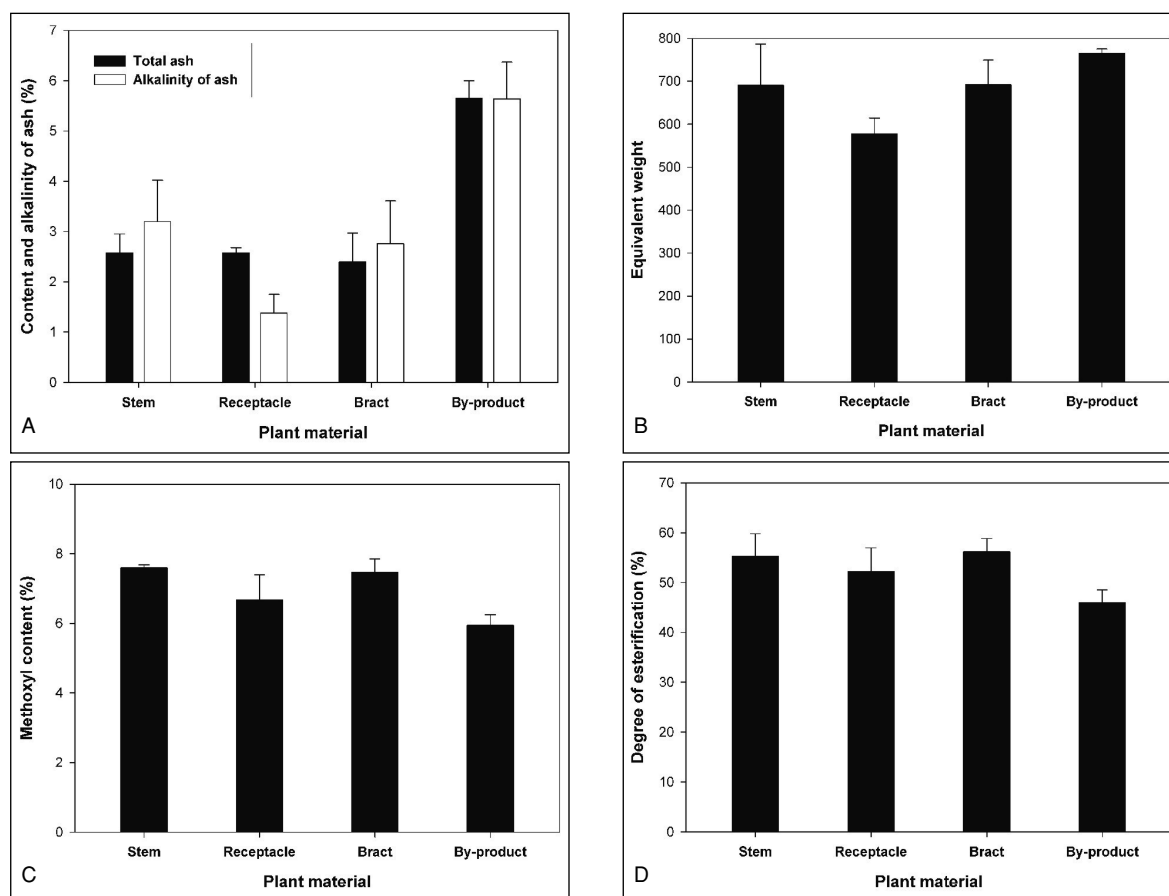


Figure 3. a) The content of total ash and alkalinity of ash, b) the equivalent weight, c) percentage of methoxyl content, d) the degree of esterification of pectin extracted from different parts of globe artichoke samples and the industrial waste (By-product).

Determination of methoxyl content

The methoxyl content is an essential factor governing the setting time of pectins, their gelling properties, and the sensitivity of pectins to polyvalent cations (10). According to the methoxyl content, the stem and bract samples had high methoxyl pectins (methoxyl content more than 7%), and could form high sugar gels with the sugar amount of 65% and more (1086) as shown in Figure 3c. On the other hand, the receptacle and waste samples had low methoxyl pectins that could form gels with lower concentrations of sugar in the presence of polyvalent cations.

Degree of esterification

The degree of esterification values of pectins extracted from the various samples were found to be 55.26%, 52.26%, 56.17%, and 46.02% for the stem, receptacle, bract and industrial waste samples, respectively (Figure 3d). It was reported that the degree of esterification value for the industrial sample was 42.68% (17). The degree of esterification for artichoke pectin was higher than the reported commercial value. Depending upon the degree of methyl esterification, the pectins extracted from stem, receptacle and bract sections of the artichoke are categorized as high methyl-esterified (HM) pectins with the degree of esterification value of higher than 50%. On the other hand, the pectin extracted from artichoke waste was low methyl-esterified (LM) pectin with the degree of esterification value lower than 50%.

FTIR Analyses

The spectral data can be analyzed with many different digital manipulations producing both qualitative and quantitative information considering shifts in peak positions, changes in bandwidths and band intensities to obtain structural and functional information about the systems analyzed (19). In this study, we examined structural features of isolated pectin from different sections of globe artichoke and the industrial waste using FT-IR spectroscopy.

Figure 4a shows the average FTIR spectra for the artichoke and industrial waste samples in different sections of the 3743-860 cm^{-1} spectral region. Since the FTIR spectrum of the pectin samples consists of several bands originating from the contribution

of different functional groups of macromolecules the spectra were analyzed for the following regions: 3743-2791 cm^{-1} and 1804-1484 cm^{-1} , 1484-1183 cm^{-1} , and 1183-863 cm^{-1} . As seen in Figure 4a the band centering around 3287 cm^{-1} which was assigned to be O-H stretching of carbohydrates (20) shifted towards higher wave numbers in 3743-2791 cm^{-1} spectral region indicating the hydrogen bond breakage due to acid based heating step in the industrial waste samples (21, 22). The band is between 3436 and 3444 cm^{-1} for the artichoke samples but shifted up to 3544 cm^{-1} for the industrial waste samples as seen in Figure 4a.

The bands at 2956 cm^{-1} and 2938 cm^{-1} were assigned to the asymmetric stretching of methoxyl groups (23). The increase in the intensity of these bands indicated the increase in the methoxyl bands as seen in Figure 4b. Similarly, the band at 971 cm^{-1} was assigned to O-CH₃ groups of pectin and had higher intensity values for the industrial waste samples as shown in Figure 4d (24). The amount of methoxyl groups for the waste samples was found to be lower in the chemical analyses. The reason for this might be due to higher acid concentrations in the waste samples. Therefore FTIR results can be considered to be more accurate in the determination of the methoxyl amount in the processed artichoke samples. The band at 1323 cm^{-1} was assigned to C-H ringing and was found to have more intensity for the industrial waste samples as seen in Figure 4c.

Since FTIR method is also used for the analysis of degree of esterification in pectin samples (25), the method was used to analyze different parts of artichoke pectin and the industrial waste samples. For this purpose the intensity ratios of the band around 1740 cm^{-1} and the band around 1619 cm^{-1} were calculated (Figure 4b). The degree of esterification was found to be 0.4832, 0.4912, 0.5160 and 0.4949 for the bract, receptacle, stem and industrial waste samples respectively. In this research we tested the both methods for comparison reasons. The esterification degree for the waste samples was found to be slightly higher in the FTIR analyses when compared to those obtained with chemical methods as shown in the previous section. Again this might be due to possible effect of residual acid in the industrial waste samples. The degree of esterification obtained for the three parts of the globe artichoke were slightly lower than those obtained with the biochemical methods.

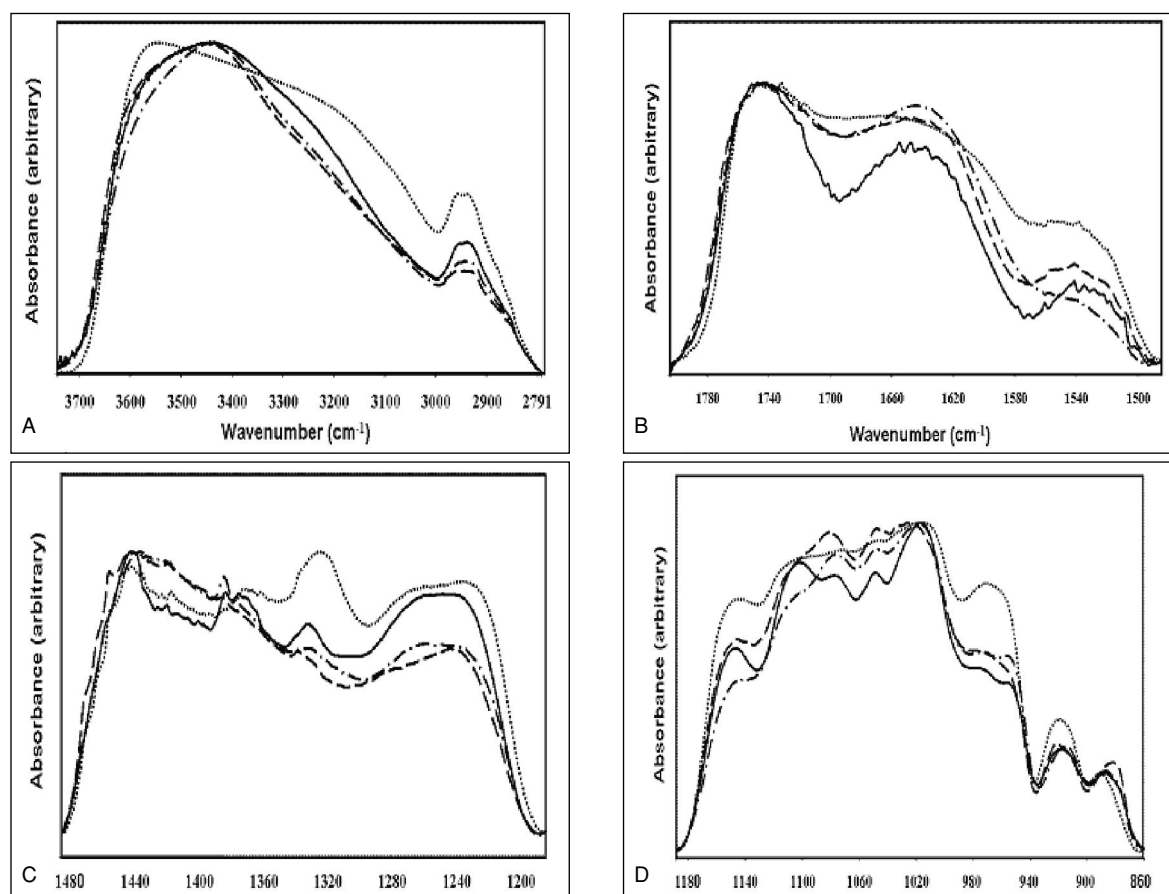


Figure 4. The FTIR analyses of different parts of globe artichoke and the industrial waste pectin samples in the wavenumber ranges of a) 3743-2791 cm^{-1} , b) 1804-1484 cm^{-1} , c) 1484-1183 cm^{-1} , and d) 1183-863 cm^{-1} (straight line (stem), line-dot-line (bract), line-space-line (receptacle), (dotted line (industrial waste))).

CONCLUSIONS

The results indicated that globe artichoke parts were important sources of pectin. The stem part of the plant had the highest pectin yield and anhydrogalacturonic acid content. The highest ash content and the total anhydrouronic acid contents of the industrial waste indicated the lowest degree of purity for the industrial waste. The degree of esterification for all the three different parts of the globe artichoke indicated that their pectin contents were of high methyl-esterified (HM) pectins. In parallel with this result the industrial waste had low methyl-esterified (LM) pectin. The results obtained with FTIR spectroscopy indicated that acid processing affected the structural properties of pectin obtained from the industrial waste with higher

methoxyl content and esterification degree. The spectroscopic examination of the pectin samples indicated that chemical analyses should be compounded by FTIR spectroscopy as well for a better understanding of the process-dependent structural changes in the molecular structure of pectin molecules. As the results suggest globe artichoke can be employed as a source of HM pectin, and the industrial waste can be used as a source of LM pectin or it requires further purification to be used as HM pectin.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the staff of the Biotechnology and Bioengineering Center of İzmir Institute of Technology for their help and technical support.

REFERENCES

1. May, C.D. (1990). Industrial Pectins: Sources, Production and Applications. *Carbohydr Polym*, 12: 79-99.
2. Thakur, B.R, Singh, R.K, Handa, A.K, Rao, M.A. (1997). Chemistry and uses of pectin - a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 37(1): 47-73.
3. Lattanzio, V., Kroon, P.A., Linsalata, V., Cardinali, A. (2009). Globe artichoke: a functional food and source of nutraceutical ingredients. *J Funct Foods*, 1: 131-144.
4. Baker, R.A. (1997). Reassessment of some fruit and vegetable pectin levels. *J Food Sci*, 62: 225-229.
5. Elwell, W.E, Dehn, W.M. (1939). Pectic content of plant materials. *Plant Physiol*, 14 (4): 809-816.
6. Liu, S., Shi, X., Xu, L., Yi, Y. (2016). Optimization of pectin extraction and antioxidant activities from Jerusalem artichoke. *Chin J Oceanol Limnol*, 34(2): 372-381.
7. Khan, I.A., Abourashed, E.A. (2010). *Leung's encyclopedia of common natural ingredients - used in food, drugs, and cosmetics*. 3rd Edition, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 45-48 p.
8. Fratianni, F., Tucci, M., De Palma, M., Pepe, R., Nazzaro, F. (2007). Polyphenolic composition in different parts of some cultivars of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori). *Food Chem*, 104: 1282-1286.
9. Orlovskaya, T.V., Luneva, I.L., Chelombit'ko, V.A. (2007). Carbohydrates from *Cynara scolymus*. *Chem Nat Compd*, 43 (1): 107-108.
10. Ranganna, S. (1986). *Handbook of Analysis and Quality Control of Fruit and Vegetable Products*. 2nd Edition, Tata McGraw-Hill Publishing Co Ltd., New Delhi, 31-65 p.
11. Attri, B.L., Maini, S.B. (1996). Pectin from galgal (*Citrus pseudolimon* Tan.) peel. *Bioresour Technol*, 55 (1): 89-91.
12. Kulkarni, S.G., Vijayanand, P. (2010). Effect of extraction conditions on the quality characteristics of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* L.). *LWT- Food Sci Technol*, 43(7): 1026-1031.
13. Pagán, J., Ibarz, A., Llorca, M., Pagán, A., Barbosa-Cánovas, G.V. (2001). Extraction and characterization of pectin from stored peach pomace. *Food Res Int*, 34(7): 605-612.
14. Phatak, L., Chang, K.C., Brown, G. (1988). Isolation and characterization of pectin in sugar-beet pulp. *J Food Sci*, 53(3): 830-833.
15. Seggiani, M., Puccini, M., Pierini, M., Giovando, S., Forneris, C. (2009). Effect of different extraction and precipitation methods on yield and quality of pectin. *Int J Food Sci Technol*, 44 (3): 574-580.
16. Kumar, A., Chauhan, G.S. (2010). Extraction and characterization of pectin from apple pomace and its evaluation as lipase (steapsin) inhibitor. *Carbohydr Polym*, 82(2): 454-459.
17. Virk, B.S., Sogi, D.S. (2004). Extraction and characterization of pectin from apple (*Malus pumila*. cv amri) peel waste. *Int J Food Prop*, 7 (3): 693-703.
18. Madhav, A., Pushpalatha, P.B. (2002). Characterization of pectin extracted from different fruit wastes. *Int J Trop Agric*, 40: 53-55.
19. Ceylan, C., Severcan, F., Ozkul, A., Severcan, M., Bozoglu, F., Taheri, N. (2012). Biophysical and microbiological study of high hydrostatic pressure inactivation of Bovine Viral Diarrhea virus type 1 on serum. *Vet Microbiol*, 154: 266-271.
20. Movasaghi, Z., Rehman, S., Rehman, I. (2008). Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) of biological tissues. *Appl Spectrosc Rev*, 43: 134-179.
21. Maréchal, Y., Chanzy, H. (2000). The hydrogen bond network in I_β cellulose as observed by infrared spectrometry. *J Mol Struct*, 523: 183-196.
22. Mohammed-Ziegler, I., Billes, F. (2002). Vibrational spectroscopic calculations on pyrogallol and gallic acid. *J Mol Struct : THEOCHEM*, 618: 259-265.
23. Schultz, H., Baranska, M. (2007). Identification and qualification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vib Spectrosc*, 43: 13-25.
24. Shetty, G., Kedall, C., Shepherd, N., Stone, N., Barr, H. (2006). Raman spectroscopy: evaluation of biochemical changes in carcinogenesis of oesophagus. *Br J Cancer*, 94: 1460-1464.
25. Gnanasambandam, R., Proctor, A. (2000). Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chem*, 68: 327-332.

DETERMINATION OF SHELF LIFE OF CHASTE TREE (*Vitex agnus castus*) HONEY AND PINE HONEY

Aytül Uçak Koç^{1*}, Mete Karacaoğlu², Hilal Şahin Nadem³, Mustafa Doğan⁴

¹Adnan Menderes University, Koçarlı Vocational School, Aydın, Turkey

²Adnan Menderes University, Faculty of Agriculture, Department of Animal Science, Aydın, Turkey

³Adnan Menderes University, Engineering Faculty, Food Engineering Department, Aydın, Turkey

⁴Republic of Turkey Ministry of Food Agriculture and Livestock, Denizli Food Control
Laboratory Directorate, Denizli, Turkey

Received / Geliş: 15.02.2017; Accepted / Kabul: 24.06.2017; Published online / Online baskı: 10.08.2017

Uçak Koc, A, Karacaoğlu, M, Şahin-Nadeem, H, Dogan, M. (2017). Determination of shelf life of chaste tree (*Vitex agnus castus*) honey and pine honey. *GIDA* (2017) 42 (5): 577-587 doi: 10.15237/gida.GD17020

Abstract

Chaste tree and pine honeys were bought from three different producers (natural) and three local markets (commercial). The honey samples were stored for 30 months at room temperature. The shelf life of the samples was estimated for indices of HMF and diastase activity. The values for HMF formation and diastase deactivation fitted to a zero-order reaction. The highest rate of HMF formation was observed in the chaste tree honey as 2.674 ± 0.013 mg/kg/month while the least value was observed in the pine honey as 0.435 ± 0.037 mg/kg/month. The maximum diastase deactivation was determined in the natural chaste tree honey as 0.613 ± 0.000 DU/kg/months and the minimum was 0.318 ± 0.002 DU/kg/month for the commercial chaste tree sample. In terms of HMF, all honeys except commercial chaste tree honey, have exhibited longer shelf life than 30 months of storage. The results showed that the shelf life of the commercial honeys depend on the botanical origin, pH, electrical conductivity, temperature and storage.

Keywords: Chaste tree, pine honey, shelf life, HMF, diastase.

HAYIT (*Vitex agnus castus*) VE ÇAM BALININ RAF ÖMRÜNÜN BELİRLENMESİ

Öz

Hayıt ve çam balları üç farklı üretici (doğal) ve üç farklı yerel marketten (ticari) satın alınmış ve bal örnekleri 30 ay oda sıcaklığında depolanmıştır. Bal örneklerinin raf ömrü HMF miktarı ve diastaz aktivite indeksleri üzerinden tahmin edilmiştir. HMF oluşumu ve diastaz deaktivasyonu sıfırıncı dereceden kinetik modele uyumlu bulunmuştur. En yüksek HMF oluşum hızı hayıt ballarında 2.674 ± 0.013 mg/kg/ay olarak hesaplanırken en düşük hız çam balında 0.435 ± 0.037 mg/kg/ay olarak belirlenmiştir. Diastaz sayısı bakımından ise, en yüksek (0.613 ± 0.000 DU/kg/ay) ve en düşük (0.318 ± 0.002 DU/kg/ay) deaktivasyon hızı doğal ve ticari hayıt ballarında belirlenmiştir. Balların 30 ay depolanması sonunda HMF bakımından ticari hayıt balı hariç diğer tüm ballar daha uzun raf ömrüne sahip olmuştur. Bu sonuçlar ticari balların raf ömrünün botanik orjin, pH, elektriksel iletkenlik, sıcaklık ve depolamaya bağlı olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Hayıt balı, çam balı, raf ömrü, HMF, diastaz.

* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar

✉ aucak@adu.edu.tr,

☎ (+90) 2567727348,

☎ (+90) 7727460

INTRODUCTION

Consumer expectations and legislation address the highest guarantees for safety, authenticity and quality. Honey is always considered as a healthy and natural food. It contains several enzymes, water, carbohydrate, acids, dextrin, ash, vitamins, pollen and substance aroma (1-3). The amounts of these components are the most important characteristics that can be used to assess the quality of a honey sample.

The composition and properties of honey are dependent on the season of production, origin of nectar, the flowers visited by the bees and the local climate from which the honey is harvested (4). In addition, the processing, handling and storage of honey may further influence its composition (5, 6). Some honey samples also contain potential toxic compounds such as 5-hydroxymethylfurfural (HMF), which is produced by the Maillard reactions during heat treatment or storage, and commonly observed in foods such as milk, fruit juices and grape molasses (7, 8).

HMF concentrations are used to determine the freshness and shelf life of honey. HMF is usually absent in fresh and untreated honey (9) but its concentration increases because of heating or long-term storage (10, 11). It has been highlighted that the chemical composition plays an important role in the final level of HMF in honey (10, 12-16).

Several factors influence the formation of HMF in honey during storage: humidity, thermal and photochemical stress (17), the use of metallic containers (18) and the physicochemical properties (the pH, total acidity and mineral content) of the honey, related to the floral sources from which the honey has been collected (12). Under dry and pyrolytic conditions, an alternative pathway has been proposed to HMF formation from fructose and sucrose. In acidic conditions, HMF can be formed at low temperatures (19), however, its concentration may also be drastically increase with an increase in temperature and storage. In addition to temperature, the rate of HMF formation in honey is also reported to be dependent on the pH of honey samples (20) as well as the water content (21, 22).

The kinetics of HMF development in unifloral honeys, and its dependence from pH of samples, has been investigated (11). The negative effects

of too restrictive HMF standard in trading, some unifloral honeys have been highlighted and estimated the most probable shelf life for each honey (4, 23).

Diastase and HMF evolution were determined in Spanish honeys after their extraction up to 28 months of storage (24). The evolution of invertase has been studied in honeys of different origin (25, 26) and the effect of heating and filtration on antioxidant activity during storage of unifloral honeys have been studied (27).

The Codex Alimentarius (Alinorm 01/25 2000) has established the HMF concentration in honey after processing and/or blending and the acceptable HMF concentrations in honey samples should be lower than 80 mg/kg. However, the European Union (2002) recommends a lower limit of 40 mg/kg with the following exceptions: 80 mg/kg is allowed for honey that originates from countries or regions with tropical temperatures, while a lower limit of only 15 mg/kg is allowed for honey with low enzymatic levels. HMF standards in Turkey (Turkish Alimentarius Codex 2003) have been adopted from the European Union (EU) (Directive 2001/110 EC 2001), guaranteeing the limits up to the "Sell by" date, usually in 36 months.

Turkey, one of the most important honey producers and exporters in the world, has suitable geographical and climatic conditions for apiculture where approximately 7.5 million hives resided and led to a production of 105000 tons of honey in 2016 (28). Anatolian honeys are rich in pollen types per sample and 85% of the world's floral types can be found in Turkish honeys. Despite the great diversity of honeys produced in Anatolia, there have been limited studies for the characterization and classification by botanical or geographical origin. In addition, most of the studies are limited for the compositional analysis (29-38).

Pine honey is a kind of honeydew. This type of honey is produced by honey bees from excretions of plant-sucking insect (*Marchalina belleanica*) feeding on pine trees (39). Pine honey is a specific endemic product and can be found only in Turkey and Greece. In Turkey, as one of the main pine honey producers, pine honey constitutes most the total production of the country as well as

floral honey. It was reported that the compositions of pine honey and floral honey differ depending on pH, mineral content and sugar profile (40).

Majority of Turkish honey is harvested and marketed by the beekeepers. Therefore, they are fresher and exposed to less heat load than the commercial honeys which undergo subsequent heat treatments for shelf life and filling purposes. Therefore, the purpose of this investigation was to determine the HMF and diastase levels in both natural and commercial pine honey and chaste tree honeys during storage for up to 30 months to develop models to estimate the most probable shelf life for each honey.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Pine honey and chaste tree (*Vitex agnus-castus*) honey samples were obtained from three different beekeepers located in Aydin province in the Aegean Region of Turkey. In addition, processed pine honey and chaste tree honey and samples were bought from three different markets in Aydin. Next, the honey samples were analyzed to determine the moisture, glucose, fructose, pH, free acids, electrical conductivity, ash, diastase activity and HMF content.

Analyses

Moisture content of honey samples were determined by using Abbe refractometer (Pleuger 2WA) reading at 20°C and obtained corresponding percentage moisture according to the TS 13365 (41). For pH, 10g of honey sample was weighed and dissolved in 75 ml of distilled water (TS 1728). Next, the solution was taken into a beaker and the pH value was recorded by a pH meter (WTW, pH 330/SET1).

Acidity of the samples was determined according to the TS 13360. For this, 10 g of honey added into 75 ml distilled water and honey solution was neutralized by using 0.1N NaOH till pH reaches to 8.3. Acidity of the samples was calculated by the following equation:

$$\text{Acidity (meq formic acid/kg honey)} = (F \times N \times V) / m \times 1000$$

Where F, N and V are the factor, normality and used volume of NaOH, respectively and m is the sample amount.

The electrical conductivity was determined by conductivity meter (WTW COND311). Electrical conductivity meter was first calibrated with water and then conductance cell was dipped into honey solution (10.0%) and reading was noted after the instrument was stabilized. Ash content (%) was determined according to the method of TS 2131-ISO928. For this, 2 g of honey was put into a porcelain crucible and the sample was burned at 550±25 °C in the muffle furnace. Brix of honey samples were determined by Abbe refractometer (Pleuger 2WA). The dry matter scale was prepared according to pure sucrose solution at the 20 °C. Diastase in honey was measured using a UV-spectrometer (Shimadzu UV-160A) according to the method of Harmonised Methods of the International Honey Commission, Schade Diastase Determination Method, 34-37, 2002. Harmonised Methods of The International Honey Commission was used to determine HMF contents of the samples. According to this method, 5 g of honey was diluted into 100 mL distilled water, filtered through 0.45 µm and then it was immediately injected into a high-pressure liquid chromatography (HPLC) with a diode array detector (Agilent HP 1100 UV-DAD). The HPLC column used for the measurements was ACE-5 (250 X 4,6 mm, C18). The HPLC conditions were as following: isocratic elution of water: methanol (90:10) mixture, flow rate of 1 mL/min and injection volume of 20 µl. All the solvents used for the measurements were HPLC grade (Merck). The wavelength range was 190–660 nm and the chromatograms were monitored at 285 nm. The compound was identified by spiking the honey peak with an HMF standard (Sigma-Aldrich, H 40807), and by comparing the HMF standard's spectrum with those of the honey samples. HMF was determined from an external calibration curve with the signal at 285 nm. Table 1 shows retention time for HMF peak, correlation coefficient belonging to calibration curve, detection (LOD), limit of quantitation (LOQ) and %R.

Table 1. Retention time (R_T) for HMF peak, correlation coefficient belonging to calibration curve (r^2), detection (LOD), limit of quantitation (LOQ) and %R

R_T	8.96
r^2	0.9999
LOD (mg/kg)	0.95
LOQ(mg/kg)	1.00
% R	98.4

Shelf Life Estimation through HMF and diastase

Honey samples were stored at room temperature (23-25°C) for 30 months in the laboratory and every month small portions of samples were taken for analysis. The kinetic data analysis for HMF formation and diastase deactivation during storage were performed. Average kinetics equations were obtained using the data from Tables 2 and 3. The self-life of the samples was estimated using regression analysis of 30 months long term data which are represented by the zero-order kinetics (Eq. 1) as below;

$$C_t = C_o + k_o t \quad (\text{zero-order kinetics}) \quad (1)$$

Where C_o is the initial concentration of HMF (mg/kg) or diastase activity (DU/kg), k_o is the rate constant (1/month), C_t is HMF concentration or diastase activity after t months of storage at room temperature, t is the storage time of honey samples (42).

Regression analysis (curve fitting) and the calculation of kinetic rate constants were performed using the Microsoft Excel 2013 software. To verify

the validity of the kinetic model and to measure linearity, regression coefficients (R^2) were calculated. The maximum storage period at 95% confidence was also estimated using a lower diastase (<8 DU/kg) and upper HMF (40 mg/kg) levels.

RESULTS AND DISCUSSION

The characterization of the chaste tree and pine honeys from local beekeepers (natural) and local market (commercial) are given in Table 2 and 3. In this study, the moisture values were between $14.86 \pm 0.066\%$ (chaste tree natural-3) and $19.9 \pm 0.066\%$ (pine honey commercial-1). These results were like the some of the studies reported (4, 43-47). Belitz et al. (48) offered 17.1% of moisture gradient as a threshold value for the fermentation of honey. Depending on the characteristics of honeys, there is a risk of fermentation between 17.1% and 20% of moisture contents. However, the risk of fermentation is high over 20% of moisture (48).

In this study, except for one natural pine honey, moisture contents of pine honeys were over 17% (Table 2 and 3) probably due to the harvest season. Chaste tree honeys were harvested towards the end of July (during the highest seasonal temperatures), but pine honeys were harvested from September to December. HMF formation and diastase deactivation values during 30 months of storage are given in Table 4, 5, 6, 7.

Table 2. Characterization of the Chaste tree honey samples

Parameters	Chaste tree honey (natural)			Chaste tree honey (commercial)		
	1	2	3	1	2	3
Moisture %	15.40±0.003	16.72±0.128	14.86±0.066	16.32±0.133	16.45±0.133	15.93±0.066
Glucose %	34.8±0.233	31.1±0.901	31.3±0.081	35.5±0.680	32.4±0.088	34.3±0.594
Fructose %	40.7±0.290	43.0±0.233	39.6±0.326	39.8±0.120	39.0±0.120	42.0±0.348
Sucrose %	0.54±0.005	n.d	n.d	n.d	0.96±0.0120	n.d
Fruc + Gluc %	75.6±0.524	74.1±1041	70.9±0.408	75.3±0.561	71.4±0.066	76.3±0.638
Fruc / Gluc %	1.16±0.003	1.38±0.0226	1.26±0.008	1.11±0.024	1.2±0.005	1.22±0.043
Dry matter %	84.6±0.00	83.2±0.129	85.1±0.066	83.67±0.133	83.5±0.133	84.0±0.066
pH	3.83±0.042	3.63±0.006	3.83±0.062	3.77±0.008	3.77±0.022	3.64±0.018
Acidity meq/kg	34.0±0.45	28.8±0.62	17.2±0.24	34.1±0.23	22.5±0.06	22.5±0.09
Ash %	0.24±0.004	0.21±0.038	0.24±0.010	0.21±0.017	0.16±0.005	0.24±0.003
HMF mg/kg	5.27±0.120	4.73±0.088	4.77±0.088	7.1±0.115	6.83±0.120	7.9±0.057
Conductivity (ms/cm)	0.633±0.002	0.493±0.006	0.264±0.002	0.493±0.022	0.443±0.003	0.271±0.011
Diastase (DU/kg)	27.2±0.10	26.9±0.05	27.45±0.05	24.1±0.1	21.4±0.15	20.95±0.05

n.d.: not detected.

Table 3. Characterization of the pine honey samples

Parameters	Pine honey (natural)			Pine honey (commercial)		
	1	2	3	1	2	3
Moisture %	15.80±0.115	17.62±0.000	17.9±0.057	19.9±0.066	17.3±0.133	17.8±0.033
Glucose %	25.7±0.133	26.4±0.233	25.2±0.233	27.3±0.120	28.0±0.531	27.9±0.472
Fructose %	33.7±0.081	34.3±0.122	37.4±0.033	33.9±0.1	37.4±0.327	36.0±0.041
Sucrose %	n.d	n.d	n.d	0.54±0.005	0.96±0.012	n.d
Fruc + Gluc %	59.4±0.346	60.7±0.100	62.6±0.260	61.2±0.219	65.4±0.204	63.9±0.405
Fruc / Gluc %	1.31±0.005	1.29±0.017	1.48±0.012	1.24±0.003	1.33±0.036	1.28±0.024
Dry matter %	84.2±0.115	82.4±0.133	82.1±0.057	80.1±0.066	82.7±0.133	82.2±0.033
Ph	4.13±0.033	4.02±0.005	3.91±0.0115	4.25±0.028	4.02±0.008	3.91±0.037
Acidity meq/kg	23.3±0.25	26.3±0.1	32.3±0.15	20.9±0.1	25.25±0.05	32.25±0.15
Ash %	0.53±0.005	0.68±0.025	0.37±0.019	0.438±0.010	0.648±0.010	0.357±0.0107
HMF mg/kg	0.56±0.064	0.54±0.024	0.93±0.0305	1.24±0.034	3.27±0.218	10.33±0.185
Conductivity (ms/cm)	1.405±0.001	1.269±0.001	0.827±0.001	1.175±0.005	1.255±0.005	1.134±0.001
Diastase (DU/kg)	31±0.70	19.05±0.15	22.1±0.20	17.55±0.05	16.8±0.175	16.18±0.175

n.d.: not detected.

Table 4. Evolution of HMF (mg/kg) in Chaste tree honey samples during storage at room temperature

Months of storage	Chaste tree honey (natural)			Chaste tree honey (commercial)		
	1	2	3	1	2	3
0	5.3±0.12	4.7±0.09	4.8±0.09	7.1±0.12	6.8±0.12	7.9±0.05
2	5.9±0.03	5.5±0.17	5.4±0.12	7.8±0.26	7.7±0.20	9.5±0.30
4	6.5±0.15	6.9±0.12	7.1±0.15	9.5±0.25	9.2±0.05	10.5±0.15
6	7.3±0.18	7.4±0.01	8.2±0.20	12.3±0.06	11.1±0.17	12.8±0.35
8	10.3±0.17	8.1±0.20	10.7±0.37	16.8±0.35	11.9±0.25	17.5±0.24
10	15.4±0.40	14.6±0.60	14.3±0.11	21.6±0.23	19.4±0.15	23.9±0.00
12	20.4±0.33	17.7±0.23	17.5±0.40	29.9±0.11	22.0±0.20	25.7±0.57
16	24.4±0.45	22.2±0.66	21.6±0.13	40.2±0.18	36.4±0.33	32.6±3.76
20	29.4±0.06	28.3±0.11	26.4±0.28	53.6±0.42	44.3±0.55	41.5±2.74
24	33.9±0.11	32.0±0.02	30.2±0.36	65.5±0.05	58.9±0.20	53.8±5.07
30	33.7±0.11	36.4±0.11	35.0±0.43	82.6±0.59	68.8±0.39	65.6±3.24

Table 5. Evolution of HMF (mg/kg) in pine honey samples during storage at room temperature

Months of storage	Pine honey (natural)			Pine honey (commercial)		
	1	2	3	1	2	3
0	0.6±0.06	0.5±0.02	0.9±0.03	1.2±0.03	3.3±0.22	10.3±0.19
2	0.8±0.04	0.7±0.04	1.2±0.03	1.3±0.02	4.0±0.18	12.6±0.50
4	1.0±0.07	0.8±0.02	1.5±0.04	1.5±0.03	4.9±0.28	14.4±0.57
6	1.2±0.59	1.1±0.05	2.6±0.03	1.8±0.02	6.7±0.03	15.8±0.27
8	2.2±0.14	2.6±0.02	5.4±0.01	2.5±0.15	6.9±0.05	19.2±0.40
10	2.6±0.08	4.5±0.20	6.5±0.23	3.5±0.14	8.4±0.26	21.6±1.65
12	4.3±0.09	6.1±0.15	8.3±0.23	5.6±0.09	10.7±0.17	28.9±0.15
16	6.5±0.67	8.4±1.21	9.2±0.57	7.5±0.70	13.6±1.08	31.3±0.07
20	8.5±0.89	9.9±1.36	10.2±1.12	8.6±0.95	16.5±1.19	34.1±1.01
24	10.1±0.67	11.5±1.37	11.9±1.87	11.9±1.11	18.8±1.00	37.5±0.99
30	12.5±0.5	12.9±1.17	13.8±2.58	14.9±1.37	23.0±1.81	40.0±1.01

The initial HMF amounts of the chaste tree natural honeys were higher than the pine honey natural honeys. In addition, the initial HMF values of the commercial chaste tree and pine honeys were higher than those of the local producer's honeys. This situation showed that the chemical characteristics of the honeys are mainly related

to the the botanical origin, storage period and temperature (11).

Commercial pine honey -3 had the highest HMF content of 10.3 mg/kg however this value did not exceed the allowable limits in 30 months of storage time. Although the initial HMF contents of the commercial chaste tree honeys (7.1, 6.8

Table 6. Evolution of diastase in honeys during storage at room temperature

Months of storage	Chaste tree honey (natural)			Chaste tree honey (commercial)		
	1	2	3	1	2	3
0	27.3±0.20	27.7±0.30	27.3±0.25	24.3±0.05	21.0±0.05	21.3±0.05
2	26.6±0.05	26.5±0.20	26.4±0.15	23.3±0.15	20.5±0.10	20.3±0.20
4	26.2±0.15	25.8±0.05	25.3±0.05	22.2±0.20	19.5±0.30	19.4±0.15
6	25.7±0.05	23.9±0.10	24.4±0.10	21.4±0.15	18.4±0.20	18.4±0.25
8	23.7±0.05	21.8±0.05	22.8±0.10	19.0±0.10	17.5±0.10	16.7±0.12
10	22.8±0.05	19.7±0.10	21.8±0.10	16.6±0.30	16.5±0.30	15.2±0.18
12	21.2±0.05	17.7±0.15	18.9±0.10	15.9±0.10	15.7±0.10	14.3±0.04
16	19.9±0.07	19.7±0.10	16.0±0.20	13.4±0.10	14.1±0.10	13.3±0.10
20	18.5±0.36	17.9±0.03	14.0±0.05	10.9±0.05	13.6±0.15	12.0±0.03
24	16.7±0.11	15.9±0.10	12.3±0.08	9.4±0.20	13.1±1.41	10.9±0.37
30	15.6±0.09	13.9±0.10	10.6±0.24	7.4±0.10	11.2±1.41	9.6±0.37

Table 7. Evolution of diastase in honeys during storage at room temperature

Months of storage	Pine honey (natural)			Pine honey (commercial)		
	1	2	3	1	2	3
0	31.7±0.05	19.2±0.15	22.3±0.1	17.6±0.05	16.7±0.03	16.3±0.05
2	30.0±0.11	18.1±0.08	21.1±0.15	16.9±0.05	14.6±0.23	14.9±0.06
4	28.5±0.17	16.6±0.10	20.0±0.25	15.6±0.08	12.8±0.10	13.2±0.13
6	27.2±0.14	15.4±0.28	18.0±0.04	14.1±0.30	11.3±0.05	12.0±0.25
8	25.6±0.15	13.9±0.15	17.6±0.15	13.3±0.30	10.4±0.30	11.5±0.20
10	24.5±0.26	13.5±0.25	16.0±0.13	12.0±0.24	8.4±0.03	11.0±0.49
12	23.7±0.09	12.1±0.10	14.9±0.20	11.8±0.10	7.9±0.13	8.9±0.05
16	21.8±0.45	10.4±0.41	13.9±1.03	11.2±0.60	7.2±0.26	8.2±0.22
20	20.5±0.90	8.88±0.13	11.3±0.74	10.1±0.55	6.15±0.35	6.9±0.11
24	17.9±8.95	7.69±0.19	9.11±1.09	8.0±0.05	5.1±0.10	5.9±0.37
30	17.1±1.78	5.05±0.45	7.4±1.1	6.19±0.59	4.3±0.29	4.2±0.7

and 7.9 mg/kg, respectively) were in the limit (< 40mg/kg) of the standard, these values exceeded the limit after 20 months of storage. Natural chaste tree and pine honeys had the lower HMF contents than the commercial corresponding samples. Fallico et al. (11, 49) reported that the chestnut honey did not exceed the HMF limit (40 mg/kg) during 18 months of storage at room temperature and reported pH values of the chestnut honey between 4.98 and 6.5. In terms of pH, conductivity and ash content, natural and commercial pine honeys had the higher values than those of the chaste tree honey samples. The pH values of the pine honeys were between 3.9 and 4.3 and these values are in agreement with the values reported by Turhan et al. (50). The results showed that there is a strong relationship between pH and HMF contents of the honeys. The initial HMF contents of the chaste tree honeys were higher than the values of pine honeys probably due to

the lower pH levels of the chaste tree honeys than the pine honeys. As, Souza et al. (51) reported that HMF formation is favored at pH 2.7-3.9.

On the other hand, O'Brien (52) has stated that fructose is much more effective than glucose for the formation of HMF. In this respect, the higher fructose contents of the chaste tree honeys might also caused to the more HMF formation during storage. In addition, heating of the commercial honey samples during packaging caused to increased HMF contents of these samples than the natural honeys. In addition, HMF content of the samples increased linearly by storage. Al-Diab and Jarkas (53) indicated that strong heating and long storage increase the HMF content of the honeys. According to these results, the chaste tree honeys should not be stored longer than 36 months with respect to the HMF values. Table 8 and 9 show the kinetic constants of HMF formation and diastase deactivation during storage.

Table 8. Regression analysis of HMF formation in honey samples at room temperature^a

Samples	k_o (mg/kg/months)	Linear equation	R^2
CTN-1*	1.235±0.009	$t = (C_t - 3.050)/1.235$	0.9704
CTN-2	1.199±0.002	$t = (C_t - 2.333)/1.199$	0.9718
CTN-3	1.099±0.010	$t = (C_t - 3.286)/1.099$	0.9893
CTC-1**	2.674±0.013	$t = (C_t - 0.560)/2.674$	0.9798
CTC-2	2.258±0.013	$t = (C_t - 0.140)/2.258$	0.9673
CTC-3	1.993±0.002	$t = (C_t - 0.351)/1.993$	0.9830
PHN-1+	0.435±0.037	$t = (C_t - 0.645)/0.435$	0.9798
PHN-2	0.479±0.032	$t = (C_t - 0.379)/0.479$	0.9636
PHN-3	0.466±0.116	$t = (C_t - 0.903)/0.466$	0.9530
PHC-1++	0.486±0.026	$t = (C_t - 0.324)/0.486$	0.9686
PHC-2	0.684±0.001	$t = (C_t - 2.390)/0.684$	0.9933
PHC-3	1.079±0.055	$t = (C_t - 10.71)/1.079$	0.9737

^a t: months of storage; C_t :HMF concentration after t months of storage; *CTN: Chaste tree honey-natural; **CTC: Chaste tree honey- commercial; + PHN: Pine honey-natural; ++ PHC: Pine honey-commercial

Table 9. Regression analysis of diastase deactivation in honey samples at room temperature^a

Samples	k_o (DU/kg/months)	Linear equation	R^2
CTN-1*	0.424±0.002	$t = (C_t - 27.3)/-0.424$	0.9761
CTN-2	0.449±0.001	$t = (C_t - 26.34)/-0.449$	0.8899
CTN-3	0.613±0.000	$t = (C_t - 27.33)/-0.613$	0.9745
CTC-1**	0.605±0.008	$t = (C_t - 23.94)/-0.605$	0.9752
CTC-2	0.318±0.002	$t = (C_t - 20.33)/-0.318$	0.9456
CTC-3	0.402±0.005	$t = (C_t - 20.39)/-0.402$	0.9523
PHN-1+	0.478±0.058	$t = (C_t - 30.98)/-0.478$	0.9636
PHN-2	0.470±0.014	$t = (C_t - 18.51)/-0.470$	0.9838
PHN-3	0.510±0.043	$t = (C_t - 21.77)/-0.510$	0.9862
PHC-1++	0.373±0.010	$t = (C_t - 16.91)/-0.373$	0.9761
PHC-2	0.396±0.006	$t = (C_t - 14.36)/-0.396$	0.8869
PHC-3	0.394±0.017	$t = (C_t - 15.03)/-0.394$	0.9578

^a t: months of storage; C_t :Diastase activity after t months of storage; *CTN: Chaste tree honey-natural; **CTC: Chaste tree honey- commercial; + PHN: Pine honey-natural; ++ PHC: Pine honey-commercial

The k_o values for HMF formation ranged between 0.44 and 2.67 ppm/month. These findings agreed with the results of Fallico et al. (4), who determined the K values of some honeys between 0.7 and 2.8 ppm per month. The highest value of k_o (2.674 ppm per month) for HMF formation was calculated for the chaste tree commercial honey while the minimum k_o (0.435 ppm per month) was determined for the natural pine honey. All chaste tree honeys had the higher k_o values than those of the pine honeys. In addition, all commercial samples had the higher k_o values than those of the natural honeys probably due to heat treatment for the commercial samples. Table 9 presents the k_o values of diastase deactivation in honey samples. These values (DU/kg/months) changed in 0.318-0.613 DU/kg per month, which were like the findings (0.258-0.515 DU/kg per month) of Fallico et al. (4). In general, the chaste

tree honeys had the higher rate of diastase deactivation than the pine honeys during storage at room temperature.

In the present research, the shelf lives of the chaste tree natural honeys with respect to HMF level were calculated as 30.1, 30.5 and 33.5 months while those values were determined as 15.1, 17.6, 18.5 months for the commercial chaste tree honeys (Table 10). Estimated shelf lives for the natural pine honeys were 94.1, 87.1 and 89.3 months whereas commercial pine honey samples had 84.5, 55.7 and 26.8 months (Table 10). In keeping with EU and CA criteria, the shelf life of honey is determined to be 36 months. However, the self lives of some honeys (specifically the chaste tree honeys) in this study were determined to be shorter than 36 months. Therefore, the criteria of EU and CA need to be revised depending on the botanical origin of the honeys.

Table 10. Shelf life comparison of honeys using 40 ppm of HMF as limit

Sample	Estimated shelf life (months)			Scheduled shelf life (months)	Difference (months)
	Most likely value	Min	Max		
CTN-1*	30.1	30.0	30.2	36	-5.8
CTN-2	31.5	31.4	31.5	36	-4.5
CTN-3	33.5	33.4	33.7	36	-2.5
CTC-1**	15.1	15.1	15.2	36	-20.9
CTC-2	17.6	17.5	17.6	36	-18.5
CTC-3	18.5	16.9	21.5	36	-17.5
PHN-1+	94.1	84.2	103.4	36	+58.1
PHN-2	87.1	70.1	103.9	36	+51.03
PHN-3	89.3	62.8	109.1	36	+53.30
PHC-1++	84.5	72.1	99.0	36	+48.47
PHC-2	55.7	21.2	64.5	36	+19.67
PHC-3	26.8	26.1	28.5	36	-9.24

*CTN: Chaste tree honey-natural; ** CTC: Chaste tree honey-commercial; + PHN: Pine honey-natural; ++ PHC: Pine honey commercial

According to Table 11, the shelf lives of the natural chaste tree honeys with respect to diastase levels were calculated to be 45.5, 40.8 and 31.5 months while the shelf lives of the commercial chaste tree honeys were 26.5, 38.8, 30.9 months. On the other hand, the shelf lives of the natural pine honeys were estimated as 46.9, 22.4 and 27.2 months whereas the commercial pine honeys had 24.1, 16.0 and 17.9 months.

These results showed that there is a big variation among the commercial honeys (chaste tree and pine honey) depending on the initial HMF and the diastase levels. These findings were in agreement with the previously reported studies (49, 54-55). The shelf life of the commercial honeys depends on the degree and period of heating applied during packaging.

CONCLUSION

This study showed that there are significant differences between natural and commercial processed honeys in terms of quality criteria. The HMF content and diastase level can be sufficiently used to determine the freshness of the honey. HMF formation and diastase deactivation fitted to a zero-order reaction during storage at room temperature. The highest rate of HMF formation and diastase deactivation was determined for the chaste tree honeys. All honeys, except commercial chaste tree honey, have exhibited longer shelf life than 30 months of storage with respect to HMF formation. The present study showed that the shelf life of the commercial chaste tree honeys should be less than 36 months as they have higher initial values of HMF and also, they probably are subjected to high heat treatment before packaging.

Table 11. Shelf life comparison of honeys using 8 DU of diastase as limit

Sample	Estimated shelf life (months)			Scheduled shelf life (months)	Difference (months)
	Most likely value	Min	Max		
CTN-1*	45.5	45.1	45.9	36	+9.45
CTN-2	40.8	40.6	41.1	36	+4.79
CTN-3	31.5	31.3	31.7	36	-4.49
CTC-1**	26.4	26.1	26.6	36	-9.64
CTC-2	38.8	38.6	39.1	36	+2.82
CTC-3	30.9	30.2	31.5	36	-5.15
PHN-1+	46.9	42.1	51.8	36	+10.93
PHN-2	22.4	22.1	22.6	36	-13.64
PHN-3	27.2	25.1	29.3	36	-8.80
PHC-1++	24.1	24.1	24.2	36	-11.87
PHC-2	16.0	15.8	16.3	36	-19.98
PHC-3	17.9	17.2	18.5	36	-18.13

*CTN: Chaste tree honey-natural; ** CTC: Chaste tree honey-commercial; + PHN: Pine honey-natural; ++ PHC: Pine honey-commercial

REFERENCES

1. Bogdanov S, Martin P. 2002. Honey Authenticity: a Review. *MittGeb Lebensmunters Hyg*, 93, 232-254. Address of access. http://www.umf.org.nz/wp-content/uploads/2013/10/Bogdanov-and-Martin_2002_Honey-authenticity-a-review.pdf
2. Silici S. 2002. Chemical and polynological analysis of honey samples belenging to different regions of Turkey. The first German bee products and apitherapy congress, Passau, Germany, 23-24 March 2002, pp.61-61.
3. Fallico B, Zappala M, Arena E, Verzea A. 2003. Effect of conditioning on HMF content in unifloral honeys. *Food Chem*, 85:305-313.
4. Fallico B, Arena E, Zappala M. 2009. Prediction of honey shelf life. *J Food Qual*, 1-17. DOI: 10.1111/j.1745-4557.2009.00253.x
5. Cavia MM, Fernandez-Muinoa MA, Gómez-Alonso E, Montes-Perez MJ, Huidobro JF, Sanchoa MT. 2002. Evolution of fructose and glucose in honey over one year: influence of induced granulation. *Food Chem*, 78:157-161.
6. Andrew BG, Bernard EC, Nicholas BS. 2004. Quality evaluation of honey harvested from selected areas in Tanzania with special emphasis on hydroxymethyl furfural (HMF) levels. *Plant Foods Hum Nutr*, 59:129-132.
7. Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. 2009. *Food chemistry*. 4th revised and extended edn. Berlin (DE): Springer.
8. Khalil MI, Sulaiman SA, Gan SH. 2010. High 5-hydroxymethylfurfural concentrations are found in Malaysian honey samples stored for more than one year. *Food Chem Toxicol*, 48 (8-9):2388-2392.
9. Askar A. 1984. Flavour changes during production and storage of fruit juices. *Fluessiges Obst*, 51:564-569.
10. Bath PK, Singh N. 1999. A comparison between *Helianthus annuus* & *Eucalyptus lanceolatus* honey. *Food Chem*, 67:389-397.
11. Fallico B, Zappala M, Arena E, Verzera A. 2004. Effects of heating process on chemical composition and HMF levels in Sicilian monofloral honeys. *Food Chem*, 85. 305-313.
12. Anam OO, Dart RK. 1995. Influence of metal ions on hydroxymethylfurfural formation in honey. *Anal Proc Incl Anal Commun*, 32:515-517.
13. Singh N, Bath PK. 1997. Quality evaluation of different types of Indian honey. *Food Chem*, 58, 129-133.
14. Singh N, Bath PK. 1998. Relationship between heating and hydroxymethylfurfural formation in different honey types. *J Food Sci Technol*, 35, 154-156.
15. Horn H, Hammes WP. 2002. The influence of temperature on honey quality parameters. *Dtsch Lebensmittel Rundsch*, 98, 366-372.
16. Tosi E, Ciappini MRE, Lucero H. 2002. Honey thermal treatment effects on hydroxymethylfurfural content. *Food Chem*, 77: 71-74.
17. Spano N, Casula L, Panzanelli A, Pilo MI, Piu PC, Scanu R, Tapparo A, Sanna G. 2006. An RP-HPLC determination of 5- hydroxymethylfurfural in honey: The case of strawberry tree honey, *Talanta* 68 (4, 15): 1390-1395.
18. White JW. 1978. Honey. *Adv Food Res*, 24: 287-374.
19. Lee HS, Nagy S. 1990. Relative reactivities of sugars in the formation of 5-hydroxymethylfurfural in sugar-catalyst model systems. *J Food Process Preservation*, 14 (3): 171-178.
20. Gökmen V, Şenyuva HZ. 2007. Effects of some cations on the formation of acrylamide and furfurals in glucose–asparagine model system. *Eur Food Res Technol*, 225 (5): 815-820.
21. Kroh LW. 1994. Caramelisation in food and beverages. *Food Chemistry*, 51, 373-379.
22. Gökmen V, Açar ÖC, Serpen A, Morales FJ. 2008. Effect of leavening agents and sugars on the formation of hydroxymethylfurfural in cookies during baking. *Eur Food Res Technol*, 226, 1031-1037.
23. Fallico B, Arena E, Verzera A, Zappala M. 2006. The European Food Legislation and its impact on honey sector. *Accredit Qual Assur*, 11(1-2):49-54.
24. Sancho MT, Muniategui S, Huidobro JF, Lozano JS. 1992. Aging of honey. *J Agric Food Chem*, 40, 134-138.

25. Persano Oddo L, Pulcini P. 1999. A scientific note on the Phadebas method for honeys with low enzyme content, *Apidologie*, 30:347-348.
26. Sanchez MD, Huidobro JF, Mato I, Muniategui S, Sancho MT. 2001. Correlation between proline content of honeys and botanical origin, *Dtsch Lebensm Rundsch*, 97, 171-175.
27. Wang XH, Gheldof N, Engeseth NJ. 2004. Effect of processing and storage on antioxidant capacity of honey. *J Food Sci*, 69:96-101.
28. Anonymous 2017. www.tuik.gov.tr/Prelstatistik Tablo.do?istab_id=691. Date of access: 11.07.2017.
29. Kucuk M, Kolayli S, Karaoglu S, Ulusoy E, Baltaci C, Candan F. 2007. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chem*, 100(2), 526-534.
30. Silici S, Gokceoglu M. 2007. Pollen analysis of honeys from Mediterranean regions of Anatolia. *Grana*, 46, 57-64.
31. Kayacier A, Karaman S. 2008. Rheological and some physicochemical characteristics of selected Turkish honeys. *J Texture Stud*, 39, 17-27.
32. Senyuva HZ, Gilbert J, Silici S, Charlton A, Dal C, Gurel, N, et al. (2009). Profiling Turkish honeys to determine authenticity using physical and chemical characteristics. *J Agric Food Chem*, 57(9), 3911-3919.
33. Tornuk F, Karaman, S , Ozturk I, Toker OS, Tastemur B, Sagdic O, Dogan M, Kayacier A. 2013. Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. *Ind Crops Prod*, 46: 124-131.
34. Silici S, Karaman K, 2014. Chemometric approaches for the characterization of Turkish rhododendron and honeydew honeys depending on amino acid composition. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 37(6): 864-877.
35. Can Z, Yildiz O, Sahin H, Turumtay EA, Silici S, Kolayli S, 2015. An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. *Food Chem*, 180: 133-141.
36. Kılıc O, Kutlu MA, Ozdemir FA. 2016. Examination of the various chemical properties of the Hizan region (Bitlis-Turkey) honey types. *Prog Nutr*, 18(4):411-420.
37. Kolaylı S, Can Z, Yildız O, Sahin H, Karaoglu SA. 2016. A comparative study of the antihyaluronidase, antiurease, antioxidant, antimicrobial and physicochemical properties of different unifloral degrees of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) honeys. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 31: 96-104.
38. Kıvrak S, Kıvrak I, Karababa E, 2017. Characterization of Turkish honeys regarding of physicochemical properties, and their adulteration analysis. *Food Sci Technol*, 37(1): 80-89.
39. Karkacier M, Gurel F, Ozdemir F. 2000. Identification of different honeys using sugar composition determined by HPLC. *Gıda (Food)*, 25:69-73.
40. Karkacier M, Gurel F, Efendi Y, Yaygın E, Mutaf S. 1999. Effects of different storage conditions on the quality of flowers honey and honeydew. *J Fac Agric, Akdeniz University*, 8, 35-43.
41. Anonymous 2008. Turkish Standards Institution TS 13365. Bal-Su muhtevası tayini - Refraktometrik metot; Determination of water content of honey- Refractometric method
42. Chen L, Huang H, Liu W, Peng N, Huang X. 2010. Kinetics of the 5-hydroxymethylfurfural formation reaction in Chinese rice wine. *J Agric Food Chem*, 58: 3507-3511.
43. Yılmaz H, Küfrevioglu İ. 2001. Composition of Honeys Collected from Eastern and South-Eastern Anatolia and Effect of Storage on Hydroxymethylfurfural Content and Diastase Activity. *Turk J Agric For*, 25:347-349.
44. Sanz ML, Polemis N, Morales, V. et al. 2005. In vitro investigation into the potential prebiotic activity of honey oligosaccharides. *J Agric Food Chem*, 53:2914-2921.
45. Sahinler N, Gul A. 2005. Effect of heating and storage on honey hydroxy methylfurfural and diastase activity. *J Food Technol*, 3(2): 152-157.
46. Zappala M, Fallico B, Arena E, Verzera A. 2005. Methods for the determination of HMF in honey: a comparison. *Food Control*, 16. 273-277.

47. Çınar SB, Ekşi A. 2012. Türkiye'de üretilen çam balının kimyasal profili. *GIDA*, 37 (3): 149-156.
48. Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. 1992. *Food chemistry*. 4th revised and extended edn. Berlin (DE): Springer.
49. Fallico B, Arena E, Zappala M. 2008. Degradation of 5-hydroxymethylfurfural in honey. *J Food Sci*, 73: 625-631.
50. Turhan I, Tetik N, Karhan M, Gürel F, Tavukçuoğlu HR. 2008. Quality of honeys influenced by thermal treatment. *Swiss Soc Food Sci Technol, LWT* 41: 1396-1399.
51. Souza RL, Yu H, Rataboul F, Essayem N. 2012. 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) production from hexoses: limits of heterogeneous catalysis in hydrothermal conditions and potential of concentrated aqueous organic acids as reactive solvent system. *Chall*, 3: 212-232.
52. O'Brien J. 1996. Stability of trehalose, sucrose and glucose to nonenzymatic browning in model systems. *J Food Sci*, 61: 679-682.
53. Al-Diab D, Jarkas B. 2015. Effect of storage and thermal treatment on the quality of some local brands of honey from Latakia markets. *J Entomol Zool Stud*, 3: 328-334.
54. Singhal RS, Kulkarni PR, Rege DV. 1997. Honey Quality Criteria in: Handbook of Indices of Food Quality and Authenticity, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, England.
55. Bogdanov S, Ruoff K, Persano Oddo L. 2004. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie*, 35: 4-17.

ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF THYME (*Thymus vulgaris* L.), ROSEMARY (*Rosmarinus officinalis* L.) AND LAUREL (*Lauris nobilis* L.) ESSENTIAL OILS AND THEIR MIXTURES

Serpil Tural¹, Sadettin Turhan^{2,*}

¹Veterinary Control Institute, Ministry of Food Agriculture and Livestock, Samsun, Turkey

²Department of Food Engineering, Engineering Faculty, Ondokuz Mayıs University, Samsun, Turkey

Received / Geliş: 13.03.2017; Accepted / Kabul:06.07.2017; Published online / Online baskı: 10.08.2017

Tural, S., Turhan, S. (2017). Antimicrobial and antioxidant properties of thyme (*Thymus vulgaris* L.), rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and laurel (*Lauris nobilis* L.) essential oils and their mixtures. *GIDA* (2017) 42 (5): 588-596 doi: 10.15237/gida.GD17030

Abstract

In this study, the antimicrobial and antioxidant properties of thyme (TEO), rosemary (REO) and laurel essential oils (LEO) and their mixtures (TEO/REO, TEO/LEO, REO/LEO, 1/1, v/v and TEO/REO/LEO, v/v/v, 1/1/1) were investigated. The antimicrobial activity was measured by the agar well diffusion method, while antioxidant capacity was measured using the FRAP and DPPH scavenging activity methods. All essential oils and their mixtures showed antimicrobial activity and antioxidant capacity. The highest antimicrobial activity against *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* was determined in TEO with zone diameters of 39.33, 28.00 and 30.67 mm, respectively. In general, essential oil mixtures negatively affected the antimicrobial activity compared to essential oils alone, and *E. coli* O157:H7 was less sensitive to the inhibitory activity of essential oils and their mixtures than *S. aureus* and *L. monocytogenes*. The FRAP values of all essential oils and mixtures ranged from 3.67 (REO) to 40.30 mg/mL (LEO), while the DPPH scavenging activity values ranged from 21.31 (REO) to 89.48% (TEO/LEO). These results suggest that essential oils obtained from thyme, rosemary, laurel and their mixtures have potential to be used as natural antimicrobial and antioxidant agents in the food industry.

Keywords: Antimicrobial activity, antioxidant capacity, thyme essential oil, rosemary essential oil, laurel essential oil

KEKİK (*Thymus vulgaris* L.), BİBERİYE (*Rosmarinus officinalis* L.) VE DEFNE (*Lauris nobilis* L.) UÇUCU YAĞLARININ VE KARIŞIMLARININ ANTİMİKROBİYAL VE ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİ

Öz

Bu çalışmada, kekik (KUY), biberiye (BUY) ve defne uçucu yağlarının (DUY) ve karışımlarının (KUY/BUY, KUY/DUY, BUY/DUY, 1/1, v/v ve KUY/BUY/DUY, v/v/v, 1/1/1) antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri araştırılmıştır. Uçucu yağların antimikrobiyal aktiviteleri agar kuyu difüzyon metodu ile belirlenirken, antioksidan kapasiteleri, FRAP ve DPPH radikal söndürücü kapasite yöntemleri ile belirlenmiştir. İncelenen tüm uçucu yağlar ve karışımları antimikrobiyal aktivite ve antioksidan kapasite göstermiştir. *S. aureus*, *E. coli* O157: H7 ve *L. monocytogenes*'e karşı en yüksek antimikrobiyal aktivite, sırasıyla 39.33, 28.00 ve 30.67 mm zon çapı ile KUY'de belirlenmiştir. Genel olarak, uçucu yağ karışımları, tek başına uçucu yağlara oranla antimikrobiyal aktiviteyi negatif etkilemiş ve *E. coli* O157: H7, uçucu yağ ve karışımlarının inhibitör etkisine *S. aureus* ve *L. monocytogenes*'den daha az duyarlı olmuştur. Uçucu yağ ve karışımlarının FRAP değerleri 3.67 (BUY) ile 40.30 mg/mL (DUY), DPPH radikal söndürücü kapasite değerleri ise %21.31 (BUY) ile 89.48 (KUY/DUY) arasında belirlenmiştir. Bu sonuçlar kekik, biberiye ve defneden elde edilen uçucu yağların ve karışımlarının gıda endüstrisinde doğal antimikrobiyal ve antioksidan ajan olarak kullanım potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyal aktivite, antioksidan kapasite, kekik uçucu yağı, biberiye uçucu yağı, defne uçucu yağı

* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar

✉ sturhan@omu.edu.tr, © (+90) 362 312 19 19,

☎ (+90) 362 457 60 94

INTRODUCTION

In recent years there has been increasing concern over the safety of synthetic food additives including the possible toxicity of those synthetic chemicals that are used as antimicrobials and antioxidants. Therefore, interest has been focused on the use of natural antimicrobial and antioxidant compounds to prolong the shelf life of food products in the food processing sector (Burt, 2004; Sacchetti et al., 2005; Santoyo et al., 2006). When compared to synthetic food additives, natural additives are readily acceptable by consumers. They are considered to be safe, no safety tests are required by legislation, they are identical to the food that people have eaten for hundreds of years or have been mixing with food, and they not only prolong the shelf life of foods but also add to the nutraceutical value of the foods (Pokorny, 1991).

Essential oils are plant secondary metabolites (Zaouali et al., 2010) and are extracted from different parts of plants such as leaves, barks, flowers, seeds, buds, twigs and fruits. They can be obtained from plant material by extraction, expression, fermentation or enfleurage but distillation is the most common method for the production of essential oil (Burt, 2004). It is reported that many different essential oils are important sources of natural antioxidants and antimicrobials (Sacchetti et al., 2005; Lin et al., 2009) and they have long been used in pharmacology, medicine, food and the cosmetic industry (Zaouali et al., 2010; Bayaz, 2014). The efficiency of essential oils depends on the nature of active ingredients (Toroğlu and Çenet, 2006). The composition and amount of essential oil vary depending on the harvesting season (Burt, 2004), the type and part of plant, the geographical structure and climate of the region where it is cultivated (Bayaz, 2014) and the extraction method (Mith et al., 2014).

Thyme (*Thymus vulgaris* L.), rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and laurel (*Lauris nobilis* L.) grow naturally in Turkey (Dadalioglu and Akdemir Evrendilek, 2004; Önenç and Açıkgöz, 2005). Among these plants, thyme, a plant of the Labiatea family (Önenç and Açıkgöz, 2005), possesses many beneficial effects such as carminative, antiseptic, antioxidant and antimicrobial properties (Lee et al., 2005; Bozin et al., 2006). Thyme essential oil (TEO) contains various terpenoids

such as α -pinene, myrcene, p-cymene, γ -terpinene, linalool, thymol and carvacrol (Youdim and Deans, 2000). Quantitatively, thymol and carvacrol are major components of thyme extract (Lee et al., 2005). Thymol and other phenolic components inhibit microorganisms causing an increase in the permeability of the cell membrane and reduction of vital intracellular substances or disruption bacterial enzyme systems (Ouattara et al., 2001). The antioxidant capacity of TEO comes from its active compounds such as thymol and carvacrol (Ruberto and Baratta, 2000).

Rosemary, a member of the Lamiaceae family (Perez et al., 2007), grows naturally on dry rocky slopes and hillsides or in pine forests and is used fresh, dried or as an essential oil (Özcan and Chalchat, 2008). It is well known that rosemary essential oil (REO) has antimicrobial and antioxidant properties (Sacchetti et al., 2005; Gachkar et al., 2007; Genena et al., 2008; Zaouali et al., 2010; Ojeda-Sana et al., 2013). Rosemary contains flavones, steroids, diterpenes and triterpenes. Carnosol and carnosic acid are primarily responsible for its antioxidant capacity, while α -pinene, bornyl acetate, camphor and 1,8-cineole are related to antimicrobial activity (Genena et al., 2008).

Laurel, a plant of the Lauraceae family (Erkmen and Özcan, 2008), is an evergreen bush native to the Mediterranean region and its essential oil is used as a flavoring additive in the culinary and food industry (Santoyo et al., 2006). It is reported that the laurel plant has antimicrobial and antioxidant effects (Ramos et al., 2012; El et al., 2014) and the predominant components of its essential oil are 1,8-cineole, α -terpinene and sabinene (Dadalioglu and Akdemir Evrendilek, 2004). The antioxidant capacity of laurel essential oil (LEO) comes from its eugenol and methyl eugenol contents (El et al., 2014).

There are many studies on the antimicrobial and antioxidant properties of thyme, rosemary and laurel plants and their essential oils. However, there is no study on the antimicrobial activity and antioxidant capacity of mixtures of TEO, REO and LEO in the literature. Hence, this study aimed to determine antimicrobial and antioxidant properties of TEO, REO and LEO and their mixtures. The determinations included antimicrobial activity against *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* and antioxidant capacity tests such as FRAP and DPPH scavenging activity.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials

Dried thyme (*Thymus vulgaris* L.), rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and laurel (*Lauris nobilis* L.) plants were purchased from a local market in Samsun, Turkey in June 2015, powdered using a household coffee grinder (Sinbo, 2909 model, Istanbul, Turkey) and kept in bottles under cool conditions until use.

Bacterial strains

Staphylococcus aureus (ATCC 25923), *Escherichia coli* O157:H7 (NCTC 12900) and *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111) were used as test organisms. These microorganisms were provided by The Food Control Laboratory Directorate, Samsun, Turkey.

Essential oil extraction

The essential oils used in this study were extracted by hydro-distillation using a Clevenger apparatus (Sesim Kimya Laboratuvar, Ankara, Turkey). For this purpose, a 50 g sample of each plant powder was mixed with 500 mL distilled water and placed in the apparatus for 3 h of distillation. The extracted essential oils were dehydrated using anhydrous sodium sulphate and then stored in dark glass bottles at +4 °C until use. The essential oil yields (v/w) of dried thyme, rosemary and laurel plants were 1.35, 0.98 and 1.04%, respectively.

Determination of antimicrobial activity

The antimicrobial activity of essential oils alone and their mixtures (TEO/REO, TEO/LEO, REO/LEO, 1/1, v/v and TEO/REO/LEO, v/v/v, 1/1/1) were determined by the agar well diffusion method according to Rather et al. (2012). Firstly, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* were grown in Brain Heart Infusion (BHI) broth at 37 °C for 24 h. After incubation, each of the bacterial suspensions was adjusted to a turbidity of 0.5 Mc Farland units in BHI. 0.1 mL from the bacterial suspension was spread on the surface of Mueller Hinton Agar (MHA, Oxoid) and the plates were allowed to dry. Then, 5 mm diameter wells were punched into the agar plate surfaces

under aseptic conditions and 50 µL of each essential oil and essential oil mixture were placed in the well on the inoculated plates. These plates were incubated at 37 °C for 24 h. After incubation, total diameters of inhibition zones (bacterial growth free diameter, mm) were measured in mm, including diameter of the well (5 mm). All tests were performed in triplicate and results are expressed as average values of zone diameter.

Determination of antioxidant capacity

The antioxidant capacity of essential oils and their mixtures was determined using two different methods: the ferric reducing antioxidant power (FRAP) method according to Gao et al. (2000) and the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging activity method according to Nakajima et al. (2004) with some modifications.

For the FRAP determination, the essential oils and their mixtures were diluted with methanol for a suitable concentration and then 50 µL of diluted samples were mixed with 0.95 mL of ferric-2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) reagent (prepared by mixing 300 mM acetate buffer, pH 3.6, 10 mM TPTZ in 40 mM HCl and 20 mM FeCl₃ in the ratio 10/1/1). The absorbance was measured with a UV-VIS spectrophotometer (Helios Gamma, Thermo Spectronic, USA) at 593 nm. Trolox standard curves (12.5-125 ppm, R²=0.999) were used to calculate FRAP values and antioxidant capacity of the samples defined as mg Trolox/mL.

For the DPPH scavenging activity determination, essential oils and their mixtures were dissolved in methanol and then diluted samples were added to 1 mL of DPPH methanol solution (6 x 10⁻⁵ M). After vigorous shaking, the mixture was left to stand for 30 min at room temperature and the absorbance was measured at 517 nm using a UV-VIS spectrophotometer (Helios Gamma, Thermo Spectronic, USA). DPPH scavenging activity was calculated by:

$$\text{DPPH scavenging activity (\%)} = \frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} \times 100 \quad (1)$$

where A_{blank} is the absorbance of the control, and A_{sample} is the absorbance of the sample.

Statistical analysis

Values were expressed as mean \pm standard deviation. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and significant differences of the mean values were compared using the Duncan's multiple range test. Analysis was performed using the SPSS statistical package program (SPSS 17.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A significance level of 0.05 was chosen.

RESULTS AND DISCUSSION

Antimicrobial activity

The antimicrobial activity results of the essential oils and their mixtures against the test microorganisms are shown in Fig. 1. As can be seen, all of the essential oils and their mixtures showed an inhibitory effect against all the test microorganisms and the inhibition zones ranged from 9.67 to 39.33 mm. Among the essential oils studied, the highest antimicrobial activity against *S. aureus* was determined in TEO with a zone diameter of 39.33 mm, followed by REO with a zone diameter of 20.00 mm, and the lowest activity was

determined in LEO with a zone diameter of 17.67 mm ($P < 0.05$). Among the essential oil mixtures, the highest antimicrobial activity was determined in the mixture of TEO/LEO, while the lowest activity was determined in the mixture of REO/LEO ($P < 0.05$). Similar to *S. aureus*, the highest antimicrobial activity against *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* was determined in TEO with inhibition zone diameters of 28.00 and 30.67 mm, respectively ($P < 0.05$). In general, essential oil mixtures negatively affected the antimicrobial activity compared to essential oils alone.

The antimicrobial properties of plant essential oils are due to the phenolic compounds present in their composition. In general, essential oils containing phenolic compounds such as carvacrol, eugenol and thymol at high levels show a strong antimicrobial effect against pathogenic microorganisms (Cosentino et al., 1999; Lambert et al., 2001). These compounds may inactivate the essential enzymes, react with the cell membrane activity, or disturb the genetic material functionally and disturb energy production and structural component synthesis (Celikel and Kavas, 2008). Diameters of the inhibition zones of essential oils

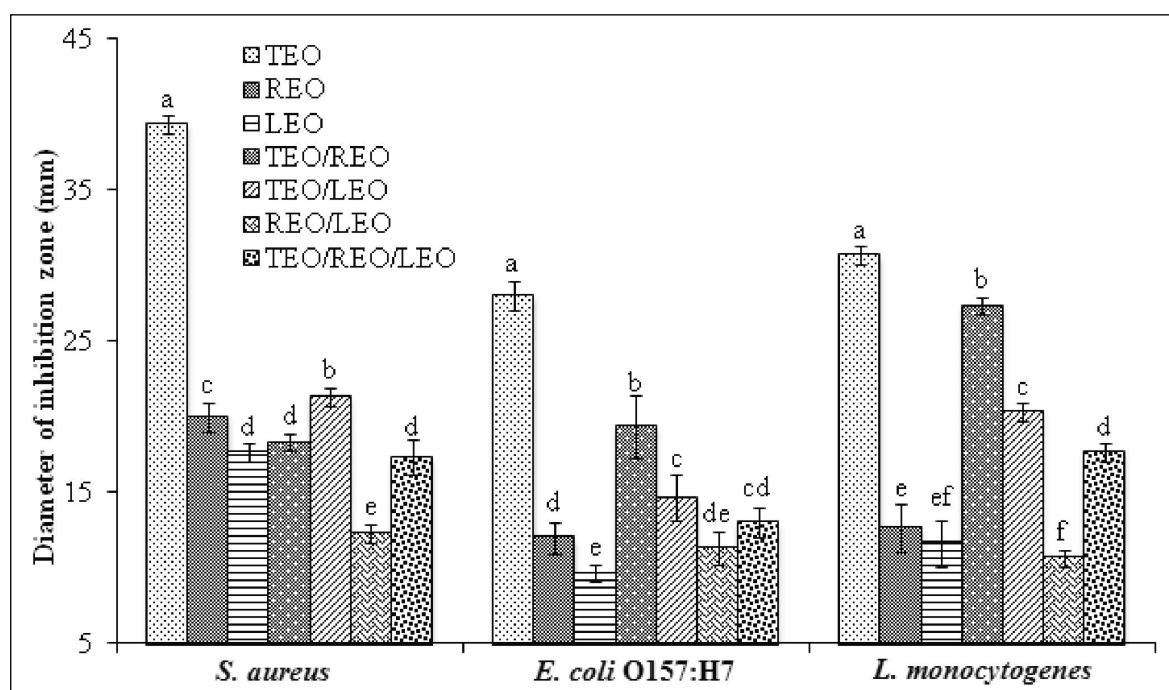


Fig. 1. Antimicrobial activity of thyme (TEO), rosemary (REO) and laurel essential oils (LEO) and their mixtures against *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes*. Bars represent means \pm SD of three replicates. Different letters (a-f) on the bars in each group indicate significant differences ($P < 0.05$).

and their mixtures vary according to their components (Abdullah et al., 2015) and bacteria strains (Lambert et al., 2001). The higher antimicrobial activity of TEO could be attributed to its thymol content, a monoterpene with a phenolic ring (Miladi et al., 2013). However, the main component of REO and LEO is 1,8-cineole belonging to the ethers group (Celikel and Kavas, 2008; Miladi et al., 2013). Similar to our findings, Abdollahzadeh et al. (2014) showed that TEO oil had a higher antimicrobial activity than REO against *L. monocytogenes* (PTCC 1163).

Antimicrobial activity of TEO, REO and LEO has also been reported by various researchers. The inhibitory effect of two thyme (*Thymus vulgaris* L. and *Thymus serpyllum* L.) hydrosols, widely used in food products against pathogenic bacteria, was tested by Sağdıç (2003) who found that hydrosols had inhibitory effects against *E. coli* (ATCC 25922), *E. coli* O157: H7 (ATCC 33150) and *S. aureus* (ATCC 2392) with inhibition zone diameters of 14-14, 12-12 and 17-18 mm, respectively. Gachkar et al. (2007) examined the chemical and biological characteristics of REO and reported that it showed 16.67, 8.33 and 16 mm inhibition zones against *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25923) and *L. monocytogenes* (PTCC 1298). Also, Fu et al. (2007) reported that REO showed inhibitory effect against *S. aureus* (ATCC 6538) and *E. coli* (ATCC 8739) and the diameters of the inhibition zone were measured as 18.5 and 100 mm respectively.

Dadaloğlu and Akdemir Evrendilek (2004) reported that the inhibitory effect of LEO on the pathogens was in the following order: *E. coli* O157:H7 > *S. aureus* > *L. monocytogenes*. The inhibitory effect of LEO against various microorganisms using the agar well diffusion method was investigated by Yilmaz et al. (2013) who reported that LEO showed antibacterial activity against *E. coli* O157:H7 (33 mm), *S. aureus* (ATCC 25923) (10 mm) and *L. monocytogenes* (ATCC 7644) (22 mm). Antimicrobial activity of essential oil obtained from laurel against *L. monocytogenes* (ATCC 7644), *E. coli* O157:H7 (ATCC 8739) and *S. aureus* (ATCC 25923) was also determined by Ekren et al (2013). Kon and Rai (2012) researched the antibacterial activity of

TEO alone and in combination with other essential oils. The results showed that REO produced inhibition zones of 7.0 mm (*S. aureus*) and 7.4 mm (*E. coli*) while LEO produced inhibition zones of 10.9 mm (*S. aureus*) and 6.9 mm (*E. coli*). However, TEO alone had 22.7 and 22.5 mm inhibition zones against *S. aureus* (ATCC 25923) and *E. coli* (ATCC 25922), in combination with REO had 14.6 and 15.7 mm inhibition zones, and in combination with LEO had 17.6 and 16.2 mm inhibition zones, respectively. LEO or REO were demonstrated higher antimicrobial activity when used in combination with TEO. The results of the present study are similar to the above results with slight differences. The differences could be attributed to varied environmental and ecological characteristics of the plants, extraction method of the essential oils, method of analysis and bacterial strains.

As seen in Fig. 1, in general *E. coli* O157:H7 was less sensitive to the inhibitory activity of TEO, REO and LEO and their mixtures than *S. aureus* and *L. monocytogenes*. Generally, Gram-positive bacteria are known to be more susceptible to the essential oils or antibacterial compounds than Gram-negative bacteria, which are in a good agreement with previous findings (Miladi et al., 2013; Mith et al., 2014). This resistance could be attributed to the structure of cellular walls of Gram-negative bacteria, mainly with regard to the presence of lipoproteins and lipopolysaccharides that form a barrier to restrict entry of hydrophobic compounds (Mith et al., 2014).

Antioxidant capacity

In general, the single method is not recommended for the determination of the antioxidant activities of plant extracts because of their complicated composition (Bozin et al., 2006). Therefore, two different assays were applied to determine the antioxidant activities of essential oils: FRAP and DPPH scavenging activity. These assays have different mechanisms. The DPPH method is based on the ability of antioxidants to act as radical scavengers while the FRAP method measures the ability of antioxidants to perform as reducing agents (Prusinowska and Smigielski, 2015). The antioxidant capacity results of the essential oils and their mixtures are shown in Fig. 2.

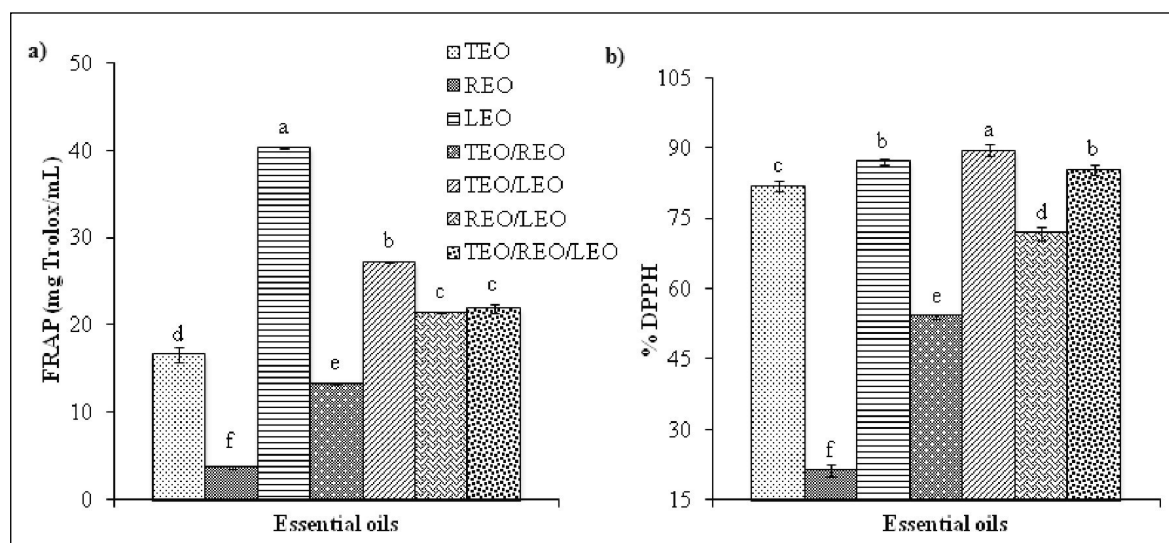


Fig. 2. Antioxidant capacity [a) FRAP and b) DPPH scavenging activity] of thyme (TEO), rosemary (REO) and laurel essential oils (LEO) and their mixtures. Bars represent means \pm SD of three replicates. Different letters (a-f) on the bars indicate significant differences ($P < 0.05$).

As can be seen, all the essential oils and their mixtures exhibited antioxidant capacity while the highest antioxidant capacity among the essential oils alone was determined in LEO in both methods, followed by TEO and the lowest antioxidant capacity was observed in REO ($P < 0.05$). However, the highest antioxidant capacity among the essential oil mixtures was obtained in the mixture of TEO/LEO. When the essential oils and their mixtures were evaluated together, the highest antioxidant capacity was determined in LEO based on the FRAP assay (Fig. 2a), while the highest value was determined in the mixture of TEO/LEO based on the DPPH test (Fig. 2b) ($P < 0.05$). Despite this difference, the antioxidant capacity values determined by both methods were generally parallel to each other.

It is considered that the antioxidant capacity of LEO is related to its eugenol and methyl eugenol content (El et al., 2014), while the antioxidant capacity of TEO may be explained by its thymol and carvacrol content, two phenolic compounds with known antioxidant capacity (Ruberto and Baratta, 2000). However, the antioxidant capacity of REO comes from its epirosmanol, carnosol, rosmanol, carnosic acid, rosmaridiphenol, rosmadial, rosmarinic acid, isorosmanol and rosmariquinone content (Yanishlieva-Maslarova and Heinonen, 2001). These compounds delay oxidation by inhibiting the formation of free fatty acid radicals at the beginning with giving hydrogen

from phenolic hydroxyl groups (Üstün and Turhan, 1999). Several researchers have also reported that essential oils and extracts obtained from laurel, thyme and rosemary are effective antioxidants (Bozin et al., 2006; Santoyo et al., 2006; Gachkar et al., 2007; Lie et al., 2009; Basmacıoğlu Malayoğlu et al., 2011; Yılmaz et al., 2013; Fadda et al., 2014).

In an earlier study, REO showed about 23% DPPH inhibition while DPPH inhibition of TEO was determined as 69.3% (Gachkar et al., 2007). Basmacıoğlu Malayoğlu et al. (2014) reported that DPPH inhibition for LEO and REO was 39.70 and 32.00%, respectively. El et al. (2014) studied the antioxidant capacity of essential oils extracted from laurel leaves using solvent-free microwave and hydrodistillation and reported that DPPH inhibition of LEO obtained by hydrodistillation was 83.3%. Similar to our results, Sachetti et al. (2005) reported that the DPPH scavenging activity of TEO was higher than REO. In another study, FRAP values of the essential oils obtained from six different rosemary varieties were found to be between 16.53 and 21.77 mmol/L (Zaouali et al., 2010). The results of the present study are similar to those in the above literature with some differences. These differences may be due to the variety and harvesting time of plants, environmental and regional conditions, amount of active substance, extraction method and solvent type.

CONCLUSION

In recent years, studies have focused on natural additives such as essential oils because of the toxicity and carcinogenicity of synthetic additives. The results of this study showed that all the essential oils studied and their mixtures exhibited both antimicrobial activity and antioxidant capacity. Among the essential oils, the highest antimicrobial activity was determined in TEO while the highest antioxidant capacity was determined in LEO. According to these results, TEO, REO and LEO alone and their mixtures can be used as natural antimicrobials and antioxidants in food processing.

ACKNOWLEDGEMENTS

Part of this study was taken from Serpil Tural's PhD thesis and supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) (Project no. 114O854). The authors would like to thank TUBITAK for financial support.

REFERENCES

- Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., Hosseini, H. (2014). Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*, 35(1): 177-183.
- Abdullah, B.H., Hatem, S.F., Jumaa, W. (2015). A comparative study of the antibacterial activity of clove and rosemary essential oils on multidrug resistant bacteria. *UK J Pharm Biosci*, 3(1), 18-22.
- Basmacıoğlu Malayoğlu, H., Aktaş, B., Yeşil Çelikleş, Ö. (2011). Bazı bitki türlerinden elde edilen uçucu yağların toplam fenol içerikleri ve antioksidan aktiviteleri. *Ege Univ Ziraat Fak Derg*, 48(3): 211-215.
- Bayaz, M. (2014). Esansiyel yağlar: antimikrobiyal, antioksidan ve antimutajenik aktiviteleri. *Akademik Gıda*, 12(3): 45-53.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N., Anackov, G. (2006). Characterization of the volatile composition of essential oils of some *Lamiaceae* spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J Agric Food Chem*, 54(5): 1822-1828.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int J Food Microbiol*, 94(3): 223-253.
- Celikel, N., Kavas, G. (2008). Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech J Food Sci*, 26(3): 174-181.
- Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M.L., Mascia, V., Arzedi, E., Palmas, F. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian thymus essential oils*. *Lett Appl Microbiol*, 29(2): 130-135.
- Dadaloğlu, I., Akdemir Evrendilek, G. (2004). Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. *J Agric Food Chem*, 52(26): 8255-8260.
- Ekren, S., Yerlikaya, O., Tokul, H.E., Akpınar, A., Accedil, M. (2013). Chemical composition, antimicrobial activity and antioxidant capacity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Afr J Microbiol Res*, 7(5): 383-388.
- El, S.N., Karagozlu, N., Karakaya, S., Sahin, S. (2014). Antioxidant and antimicrobial activities of essential oils extracted from *Laurus nobilis* L. leaves by using solvent-free microwave and hydrodistillation. *Food Nutr Sci*, 5(2): 97-106.
- Erkmen, O., Özcan, M.M. (2008). Antimicrobial effects of Turkish propolis, pollen, and laurel on spoilage and pathogenic food-related microorganisms. *J Med Food*, 11(3): 587-592.
- Fadda, A., Serra, M., Molinu, M.G., Azara, E., Barberis, A., Sanna, D. (2014). Reaction time and DPPH concentration influence antioxidant activity and kinetic parameters of bioactive molecules and plant extracts in the reaction with the DPPH radical. *J Food Comp Anal*, 35(2): 112-119.
- Fu, Y., Zu, Y., Chen, L., Shi, X., Wang, Z., Sun, S., Efferth, T. (2007). Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytother Res*, 21(10): 989-994.
- Gachkar, L., Yedegari, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A., Rasooli, I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem*, 102(3): 898-904.

- Gao, X., Björk, L., Trajkovski, V., Uggla, M. (2000). Evaluation of antioxidant actives of rosehip ethanol extracts in different test systems. *J Agric Food Chem*, 80(14): 2021-2027.
- Genena, A.K., Hense, H., Smania Junior, A., Souza, S.M.D. (2008). Rosemary (*Rosmarinus officinalis*): a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. *Food Sci Technol (Campinas)*, 28(2): 463-469.
- Kon, K., Rai, M. (2012). Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential oil alone and in combination with other essential oils. *Nus Biosci*, 4(2): 50-56.
- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J., Nychas, G.J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol*, 91(3): 453-462.
- Lee, S.J., Umano, K., Shibamoto, T., Lee, K.G. (2005). Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chem*, 91(1): 131-137.
- Lin, C.W., Yu, C.W., Wu, S.C., Yih, K.H. (2009). DPPH free-radical scavenging activity, total phenolic contents and chemical composition analysis of forty-two kinds of essential oils. *J Food Drug Anal*, 17(5): 386-395.
- Miladi, H., Slama, R.B., Mili, D., Zouari, S., Bakhrouf, A. (2013). Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Nat Sci*, 5(6): 729-739.
- Mith, H., Dure, R., Delcenserie, V., Zhiri, A., Daube, G., Clinquart, A. (2014). Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Sci Nutr*, 2(4): 403-416.
- Nakajima, J., Tanaka, I., Seo, S., Yamazaki, M., Saito, K. (2004). LC/PDA/ESI-MS profiling and radical scavenging activity of anthocyanins in various berries. *J Biomed Biotechnol*, 2004(5): 241-247.
- Ojeda-Sana, A.M., van Baren, C.M., Elechosa, M.A., Juarez, M.A., Moreno, S. (2013). New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control*, 31(1): 189-195.
- Ouattara, B., Sabato, S.F., Lacroix, M. (2001). Combined effect of antimicrobial coating and gamma irradiation on shelf life extension of pre-cooked shrimp (*Penaeus* spp.). *Int J Food Microbiol*, 68(1-2): 1-9.
- Öneç, S.S., Açıköz, Z. (2005). Aromatik bitkilerin hayvansal ürünlerde antioksidan etkileri. *Hayvansal Üretim*, 46(1): 50-55.
- Özcan, M.M., Chalchat, J.C. (2008). Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. *Int J Food Sci Nutr*, 59(7-8): 691-698.
- Perez, M.B., Calderon, N.L., Croci, C.A. (2007). Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food Chem*, 104(2): 585-592.
- Pokorny, J. (1991). Natural antioxidants for food use. *Trends Food Sci Tech*, 2: 223-227.
- Prusinowska, R., Smigielski, K. (2015). Losses of essential oils and antioxidants during the drying of herbs and spices. A review. *Nauki Inzynierskie i Technologie*, 2(17): 51-62.
- Ramos, C., Teixeira, B., Batista, I., Matos, O., Serrano, C., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Nunes, M.L., Marques, A. (2012). Antioxidant and antibacterial activity of essential oil and extracts of bay laurel *Laurus nobilis* Linnaeus (Lauraceae) from Portugal. *Nat Prod Res*, 26(6): 518-529.
- Rather, M.A., Dar, B.A., Dar, M.Y., Wani, B.A., Shah, W.A., Bhat, B.A., Ganai, B.A., Bhat, K.A., Anand, R., Qurishi, M.A. (2012). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oil of *Juglans regia* L. and its constituents. *Phytomedicine*, 19(13): 1185-1190.
- Ruberto, G., Baratta, M.T. (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem*, 69(2): 167-174.

- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem*, 91(4): 621-632.
- Sağdıç, O. (2003). Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. *LWT-Food Sci Technol*, 36(5): 467-473.
- Santoyo, S., Lloria, R., Jaime, L., Ibanez, E., Senorans, F.J., Reglero, G. (2006). Supercritical fluid extraction of antioxidant and antimicrobial compounds from *Laurus nobilis* L. chemical and functional characterization. *Eur Food Res Technol*, 222(5-6): 565-571.
- Toroğlu, S., Çenet, M. (2006). Tedavi amaçlı kullanılan bazı bitkilerin kullanım alanları ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılan metodlar. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(2): 12-19.
- Üstün, N.Ş., Turhan, S. (1999). *Yağ oksidasyonu ve antioksidanlar*. OMÜ Ziraat Fakültesi Yardımcı Ders Notu, No:11, Samsun, Türkiye, 81 s.
- Yanishlieva-Maslarova, N.V., Heinonen, I.M. (2001). Sources of natural antioxidants: vegetables, fruits, herbs, spices and teas. In: *Antioxidants in foods*, Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (eds), CRC Press, Cambridge, the UK, pp. 210-263.
- Yılmaz, E.S., Timur, M., Aslim, B. (2013). Antimicrobial, antioxidant activity of the essential oil of Bay Laurel from Hatay, Turkey. *J Essent Oil Bear Pl*, 16(1): 108-116.
- Youdim, K.A., Deans, S.G. (2000). Effect of thyme oil and thymol dietary supplementation on the antioxidant status and fatty acid composition of the ageing rat brain. *Brit J Nutr*, 83(1): 87-93.
- Zaouali, Y., Bouzaine, T., Boussaid, M. (2010). Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chem Toxicol*, 48(11): 3144-3152.



EFFECT OF MEMBRANE DEGUMMING CONDITIONS ON PERMEATE FLUX AND PHOSPHOLIPIDS REJECTION

Pınar Boynueğri¹, Fahri Yemişçioğlu², Aytaç S. Gümüşkesen²

¹Yonca Gıda Sanayi A.Ş. Manisa, Turkey

²Ege University, Engineering Faculty, Food Engineering Department, İzmir, Turkey

Received / Geliş: 18.06.2017; *Accepted / Kabul:* 10.08.2017; *Published online / Online baskı:* 19.08.2017

Boynueğri, P, Yemişçioğlu, F, Saygın Gümüşkesen, A. (2017). Effect of membrane degumming conditions on permeate flux and phospholipids rejection. *GIDA* (2017) 42 (5): 597-602 doi: 10.15237/gida.GD17053

Abstract

The objective of this study was to investigate the performance of PVDF membrane in degumming of undiluted crude soybean oil by using reverse osmosis/ultrafiltration module. The effects of membrane degumming conditions including temperature, membrane pressure, feed velocity, and volumetric concentration factor on permeate flux and phospholipids rejection were evaluated statistically. The effect of membrane pressure and volumetric concentration factor on the permeate flux was found to be statistically significant ($P < 0.05$). An 86.11% rejection of phospholipids and average permeate flux of 17.04 L/m².h in total process were achieved at 40°C, 20 bar pressure, and 9L/min feed velocity. As the feed velocity increased to 18 L/min, phospholipids rejection and average permeate flux in total process were determined as 82.81% and 27.51 L/m².h, respectively. The flux behavior of PVDF membrane was also studied. Behavior of permeate flux with process time showed two separate regions namely; falling permeate flux region and constant permeate flux region. A second degree polynomial relationship was observed during falling permeate flux region; whereas a linear dependency was set for constant permeate flux region. A logarithmic equation was obtained when total process behavior was examined.

Keywords: Soybean oil, phospholipids, PVDF membrane, ultrafiltration

MEMBRAN DEGUMMING KOŞULLARININ PERMEAT AKISI VE FOSFOLİPİTLERİN REDDEDİLMESİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Öz

Bu çalışmanın amacı; ters osmos/ ultrafiltrasyon modülü kullanılarak soya yağına uygulanan degumming işleminde polivinilden fulorid (PVDF) membranın performansının araştırılmasıdır. Membran degumming işlem koşullarının (sıcaklık, membran basıncı, besleme hızı, hacimsel konsantrasyon faktörü) permeat akısı ve fosfolipitlerin reddedilme yüzdesi üzerindeki etkisi istatistiksel olarak incelenmiştir. Membran basıncının ve hacimsel konsantrasyon faktörünün permeat akısı üzerindeki etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Membran sıcaklığının 40°C, membran basıncının 20 bar ve besleme hızının 9L/dak olduğu koşullarda fosfolipitlerin reddedilme yüzdesi 86.11, tüm işlemde ortalama permeat akısı ise 17.04 L/m².s olarak belirlenmiştir. Besleme hızının 18L/dak değerine yükselmesi ile fosfolipitlerin reddedilme yüzdesi 82.81, ortalama permeat akısı ise 27.51L/m².s olarak saptanmıştır. Ayrıca PVDF membranın akı davranışı da incelenmiştir. Permeat akısının işlem süresi ile değişimi; akının sürekli düşme gösterdiği birinci bölge ve akının sabit kaldığı ikinci bölge olmak üzere iki bölgede tanımlanmıştır. Düşen akı bölgesi 2. dereceden polinomiyal, sabit akı bölgesi doğrusal, tüm işlem için logaritmik model geliştirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Soya yağı, fosfolipitler, PVDF membran, ultrafiltrasyon

* *Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar;*

✉ agumuskesen@gmail.com,

☎ (+90) 232 311 3019,

☎ (+90) 232 342 75 92

INTRODUCTION

The removal of phospholipids (degumming) is the first step of crude oil conventional refining during which water, steam or dilute acids are added to convert phospholipids into hydratable forms that are insoluble in crude oil and these forms are removed from the crude oil by settling, filtering and centrifuging. The main drawbacks of this process are considerable loss of neutral oil and nutrients, large amounts of wastewater and fairly large energy consumption (Ochoa et al., 2001; Pagliero et al., 2001; Ulusoy et al., 2014; Sehn et al., 2016).

There has been interest in finding alternative methods to degum crude oils. Membrane degumming is one approach that offers advantages over conventional degumming, e.g., minimized the number of steps, process simplification, retention of all of the nutrients as well as other desirable components in the oil, low energy consumption, processing at ambient temperature, no addition of chemicals and low wastewater generation (Ochoa et al., 2001; Manjula and Subramanian, 2006; Roy et al., 2014; Niazmand et al., 2015; Vaisli et al., 2015).

Pressure-driven membrane processes are classified as reverse osmosis, nanofiltration, ultrafiltration and microfiltration depending on the nature of particles or molecular sizes of solute to be separated. Commercial membrane devices are available in four major types, namely plate and frame, tubular, spiral-wound, and hollow fiber (Manjula and Subramanian, 2006; Manjula et al., 2011; Akin et al., 2012).

In non-polar media like hexane or neutral oil, phospholipids molecules tend to form reverse micelles with an average molecular weight (MW) of 20,000 Daltons or more. This large MW enables the separation of phospholipids from either triglycerides (MW \approx 800 Daltons) or triglyceride/hexane mixtures by ultrafiltration using appropriate membranes. Membrane processing has been applied to remove phospholipids from crude oil/hexane mixtures as well as from crude oil itself without addition of organic solvent. The main disadvantage of membrane degumming

crude oil is low permeate flux due to the high oil viscosity (Pagliero et al., 2001). The main problem of membrane degumming crude oil/hexane mixtures is low membrane stability in hexane (Ulusoy et al., 2014). The interaction of the solvent with the membranes may result in swelling, lamination or dissolution of the membrane; this would subsequently cause structural changes to the membrane, leading to changes in the separation properties and reduced mechanical resistance to pressure (Sehn et al., 2016).

Membrane degumming process produces permeate and retentate fractions containing mostly triglycerides and phospholipids, respectively. Colored materials, some free fatty acids, and other impurities are also removed with the retentate fraction along with most of the phospholipids (Pagliero et al., 2001).

In this study, membrane degumming of undiluted crude soybean oil was investigated by using polyvinylidene fluoride (PVDF) ultrafiltration membrane. The effect of process conditions including temperature, membrane pressure, feed velocity, and volumetric concentration factor on permeate flux, and phospholipids rejection was evaluated statistically. Moreover, the changes in permeate flux with process time was studied mathematically.

MATERIALS AND METHODS

Crude soybean oil sample was purchased in a local oil refinery plant in Izmir-Turkey. The free fatty acid content, peroxide value, and phospholipids content of crude soybean oil were given in Table 1.

Table 1. The properties of crude soybean oil

Crude soybean oil	
Free fatty acid (oleic acid %)	1.52
Peroxide value (meqO ₂ /kg oil)	21.50
Phospholipids content (mg/kg oil)	2154

Free fatty acid content, peroxide value and phospholipids content of crude soybean oil were determined according to UIPAC Methods (UIPAC, 1982).

Polyvinylidene fluoride (PVDF) ultrafiltration tubular membranes with molecular weight cut-offs (MWCOs) of 20 kDa, and effective area of 0.0113m² were used (FPA03, ITT PCI Membranes Ltd, England) in membrane degumming process. Membranes were pre-treated by passing them water, water-ethanol mixture (50:50 v/v), ethanol, ethanol-hexane mixture (50:50 v/v) and hexane at 40°C, under increasing pressure (5, 10, 15, 20 bar) for 30 minutes.

Experimental runs were conducted in a reverse osmosis/ultrafiltration system (Armfield FT-018). The module of membrane (PCI Membrane, MICRO-240) was useful for tubular membranes having 12mm diameter and 300mm length. Process temperature, feed velocity (max. 30L/min) and membrane pressure (max. 55bar) were controlled in the reverse osmosis/ultrafiltration system.

Process temperature, membrane pressure, feed velocity and feed volume/retentate volume ratio (volumetric concentration factor, VCF, ml/ml) were determined as independent variables. Membrane degumming was carried out at 30°C and 40°C temperatures, 10 bar and 20 bar membrane pressures and 9 L/min and 18 L/min feed velocities. Each experimental run was duplicated. All data were the average of replicate experiments.

The effects of membrane degumming conditions on the performance of membrane were examined by determining the permeate flux (L/m².h) and rejection of phospholipids (%RP). The concentrations of phospholipids in feed and permeate were measured to determine the membrane phospholipids rejection defined as;

$$\%RP = [1 - (C_p / C_f)] \times 100$$

Where C_p and C_f were phospholipids concentration in permeate and crude oil, respectively.

In this study, the highest volumetric concentration factor was set at 5 and it was predicted that this value is sufficient for industrial scale use of the membrane degumming process (Lin et al., 1997).

All experiments and measurements were carried out duplicate, and the data were subjected to analysis of variance at a significance level of $\alpha = 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of process conditions on permeate flux and phospholipids rejection

Figure 1 shows the change in the permeate flux as a function of process time at different temperature, membrane pressure and feed velocity levels. Permeate flux decreased with process time in all experiment combinations. A sharp decline in permeate flux was observed during the first few minutes, suggesting that fouling of the membranes is an important factor at the beginning of the process. The permeate flux decline is much less pronounced at long times than it is initially; this tendency implies that a gel layer may be affecting the membrane at the final stage. It was found that the effect of membrane pressure and VCF on the permeate flux was statistically significant ($P < 0.05$) and that of the temperature and feed velocity were insignificant ($P > 0.05$). As the membrane pressure was reduced from 20 bar to 10 bar, the permeate flux decreased rapidly at both temperatures (Figure 1). Related literature indicates that the process is pressure-driven at lower pressure applications; whereas it is certainly a mass transfer controlled process at higher pressure levels; which also was satisfied by the findings of this study. It is due to the consolidated gel layer on the membrane surface that the pressure independence of permeate flux was observed (Lin et al., 1997).

Changes in permeate flux, phospholipids content and percentage of phospholipids rejection with process conditions were given in Table 2.

VCF is the ratio of the initial feed volume to the retentate volume, and this factor indicates the degree of separation attained. Permeate flux decreased drastically with VCF ($P < 0.05$). Moreover, VCF was not to be reached to 5 when the membrane degumming process was carried out at 30°C, 10 bar membrane pressure and 9 L/min feed velocity for 1200 minutes. The increase of retentate viscosity and extensive fouling of membrane at high VCF led to the decrease of permeate flux.

The effect of membrane degumming conditions on the phospholipids content and phospholipids rejection of soybean oil was statistically insignificant

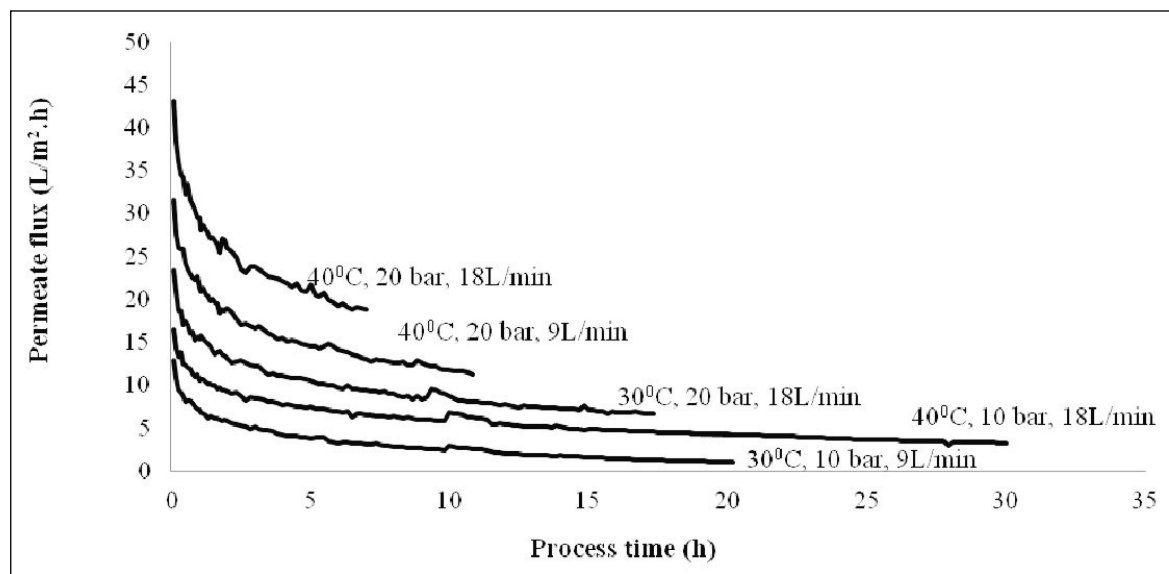


Figure 1. The change in permeate flux with process time

Table 2. The changes in permeate flux, phospholipids content and percentage of phospholipids rejection with process conditions

Temperature (°C)	Membrane pressure (bar)	Feed velocity (L/min)	VCF	Permeate flux (L/m².h)	Phospholipids content (mg/kg.oil)	Phospholipids rejection (%)
40	20	18	1	43.09	3750	82.59
40	20	18	3	20.69	3617	83.21
40	20	18	5	18.81	3702	82.81
40	20	9	1	31.56	3120	85.52
40	20	9	3	12.38	3049	85.85
40	20	9	5	11.19	2993	86.11
40	10	18	1	16.52	2734	87.33
40	10	18	3	4.01	2804	86.98
40	10	18	5	3.26	2760	87.19
30	20	18	1	23.35	2895	86.56
30	20	18	3	7.41	2878	86.64
30	20	18	5	6.61	2790	87.05
30	10	9	1	12.83	2580	88.02

($P > 0.05$). Phospholipids content of crude soybean oil was reduced from 21540 mg/kg to 2580-3750 mg/kg with membrane degumming and percentage of phospholipids rejection was calculated as 82.59-88.02% (Table 2). The molecular weight cut-off value for membranes, which is defined as the smallest molecular weight species for which the membrane has more than %90 rejections, plays a critical role in the maximum retention of phospholipids and permeate flux (Lin et al., 1997).

Flux behavior in PVDF membrane with undiluted crude soybean oil

The flux behavior of PVDF membrane was also studied with undiluted crude soybean oil. Behavior

of permeate flux with process time showed two separate regions namely; falling permeate flux region and constant permeate flux region. A second degree polynomial relationship was observed during falling permeate flux region; whereas a linear dependency was set for constant permeate flux region. A logarithmic equation was obtained when total process behavior was examined (Table 3). Similar behaviors were reported for membrane degumming of mustard oil, groundnut oil, rice bran oil, sunflower oil and coconut oil (Araki et al., 2010; Manjula et al., 2011), sunflower oil (Pagliero et al., 2011), soybean oil (Firman et al., 2013) and macauba oil (Penha et al., 2015).

Table 3. The changes in process time, average permeate flux and permeate ratio for the falling permeate flux region, constant permeate flux region and total process and mathematical models

	40°C 20bar 18L/min	40°C 20bar 9L/min	40°C 10bar 18L/min	30°C 20bar 18L/min	30°C 10bar 9L/min
Falling Permeate Flux Region					
Process time (min)	0-55	0-200	0-330	0-90	0-250
Average permeate flux (L/m ² .h)	34.06	20.96	9.74	16.74	6.56
Permeate ratio ^a (%)	28.00	41.58	30.37	15.02	42.10
Mathematical model	$y=0.16x^2-2.93x+44.42$ R ² =0.93	$y=0.01x^2-0.76x+29.83$ R ² =0.95	$y=0.004x^2-0.33x+114.91$ R ² =0.95	$y=0.04x^2-1.13x+29.83$ R ² =0.91	$y=0.005x^2-0.35x+10.87$ R ² =0.92
Constant Permeate Flux Region					
Process time (min)	60-420	210-650	340-1800	95-1040	260-1200
Average permeate flux (L/m ² .h)	23.24	13.39	4.71	9.06	2.21
Permeate ratio ^a (%)	72.00	58.42	69.63	84.98	57.90
Mathematical model	$y=-0.25x+29.09$ R ² =0.97	$y=-0.10x+15.69$ R ² =0.96	$y=-0.03x+6.57$ R ² =0.95	$y=-0.07x+12.47$ R ² =0.91	$y=-0.03x+3.73$ R ² =0.97
Total Process					
Process time (min)	420	650	1800	1040	1200
Average permeate flux (L/m ² .h)	27.51	17.04	4.71	9.06	2.21
Total permeate volume (L)	1.902	1.897	1.879	1.89	0.684
Mathematical model	$y=-5.32$ $\ln(x)+51.09$ R ² =0.99	$y=-4.11$ $\ln(x)+38.15$ R ² =0.99	$y=-2.21$ $\ln(x)+19.92$ R ² =0.99	$y=-3.03$ $\ln(x)+27.75$ R ² =0.99	$y=-2.03$ $\ln(x)+15.41$ R ² =0.99

^a permeate ratio (%) = permeate volume (L) / total permeate volume (L)

Changes in process time, average permeate flux and permeate ratio for the falling permeate flux region, the constant permeate flux region and the total process were given in Table 3.

Falling permeate flux region was observed to be determinative when the entire process was considered in terms of process time, average permeate flux and permeate ratio. Hence; the stated process factors for this region was announced as critical factors in determining the efficiency of the overall process. Therefore; optimization for an efficient membrane degumming should be carried out at 400C temperature, 20 bar pressure and 18L/min feed velocity, when the phospholipids rejection, the average permeate flux, permeate ratio and the process time required for the VCF to reach 5 were considered (Table 3).

CONCLUSION

Results showed that the membrane degumming process applied on an industrial scale by using porous, tubular, ultrafiltration membranes with a large surface area was an alternative process to the conventional degumming operation. An 82.81% rejection of phospholipids and average permeate flux of 27.51 L/m².h in total process

were achieved at 40°C, 20 bar pressure and 18L/min feed velocity. The process time required for the VCF to reach 5 was determined as 420 min. It was also concluded that data achieved from undiluted crude oil as a result of this study were important in terms of further scale-up studies.

Acknowledgements: This study (TOVAG 107O572) was supported by TÜBİTAK

REFERENCES

- Akın O., Temelli F., Köseoğlu S. (2012). Membrane applications in functional foods and nutraceuticals. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 52(4):347-371, doi:10.1080/10408398.2010.500240.
- Araki M.S., Coutinho C.M., Gonçalves L.A.G., Viotto L.A. (2010). Solvent permeability in commercial ultrafiltration polymeric membranes and evaluation of the structural and chemical stability towards hexane. *Sep. Purif. Technol.*, 71:13-21, doi:10.1016/j.seppur.2009.10.005.
- Firman L.R., Ochoa N.A., Marchese J., Pagliero C.L. (2013). Deacidification and solvent recovery of soybean oil by nanofiltration membranes. *J. Memb. Sci.*, 431:187-196, doi:10.1016/j.memsci.2012.12.040.

- IUPAC (1982). Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Scientific Publications, London.
- Lin L., Rhee K.C., Koseoglu S.S. (1997). Bench-scale membrane degumming of crude vegetable oil: Process optimization. *J. Memb. Sci.*, 134:101-108.
- Manjula S., Subramanian R. (2006). Membrane technology in degumming, dewaxing, deacidifying, and decolorizing edible oils. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 46(7): 569-592, doi:10.1080/10408390500357746.
- Manjula S., Nebetani H., Subramanian R. (2011). Flux behavior in a hydrophobic dense membrane with undiluted and hexane-diluted vegetable oils. *J. Memb. Sci.*, 366:43-47, doi:10.1016/j.memsci.2010.09.041.
- Niazmand R., Razavi S.M.A., Farhoosh R. (2015). Colloid-enhanced ultrafiltration of canola oil: Effect of process conditions and MCO on flux, fouling and rejections. *J. Food Process. Preserv.*, 39:292-300, doi:10.1111/jfpp.122232.
- Ochoa N., Pagliero C., Marchese J., Matea M. (2001). Ultrafiltration of vegetable oils degumming by polymeric membranes. *Sep. Purif. Technol.*, 22-23: 417-422.
- Pagliero C., Ochoa N., Marchese J., Mattea M. (2001) Degumming of crude soybean oil by ultrafiltration using polymeric membranes. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 78(8):793-796.
- Pagliero C., Ochoa N.A., Martino P., Marchese J. (2011). Separation of sunflower oil from hexane by use of composite polymeric membranes. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 88(11):1813-1819, doi: 10.1007/s11746-011-1839-3.
- Penha F.M., Rezzadori K., Proner M.C., Zin G., Fogaça L.A., Petrus J.C.C., De Oliveira V., Di Luccio M. (2015). Evaluation of permeation of macauba oil and n-hexane mixtures through polymeric commercial membranes subjected to different pre-treatments. *J. Food Eng.*, 155:79-86, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2015.01.020.
- Roy B., Dey S., Sahoo G.C., Roy S.N., Bandyopadhyay S. (2014). Degumming, dewaxing and deacidification of rice bran oil-hexane miscella using ceramic membrane: Pilot plant study. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1453-1460, doi:10.1007/s11746-014-2473-7.
- Sehn G.A.R., Gonçalves L.A.G., Ming C.C. (2016). Ultrafiltration-based degumming of crude rice bran oil using a polymer membrane. *Grasas Aceites*, 67(1), doi:10.3989/gys.0498151.
- Ulusoy B.O., Tur E., Akdogan E., Mutlu M. (2014). Plasma polymerization modified polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane development and characterization for degumming of soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 91:1813-1822, doi:10.1007/s11746-014-2522-2.
- Vaisali C., Charanyaa S., Belur P.D., Regupathi I. (2015). Refining of edible oils: a critical appraisal of current and potential technologies. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 50:13-23, doi:10.1111/ijfs.12657.

SALMONELLA, YOĞURT BAKTERİLERİNİN GELİŞİMİNİ ETKİLEYEBİLİR Mİ?*

Derya Savran, A. Kadir Halkman**

Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Gölbaşı, Ankara, Türkiye

Geliş / *Received*: 16.05.2017; Kabul / *Accepted*: 17.08.2017; Online baskı / *Published online*: 19.08.2017

Savran, D., Halkman A. K. (2017). *Salmonella*, yoğurt bakterilerinin gelişimini etkileyebilir mi? *GIDA* (2017) 42 (5): 603-608 doi: 10.15237/gida.GD17048

Öz

Bu çalışmada, *Salmonella* Enteritidis serotipinin yoğurt sütüne bulaşması durumunda yoğurt bakterilerinin gelişimini etkileyip etkilemediği araştırılmıştır. Bu amaçla yoğurt sütüne, *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* yanında 3; 5 ve 7 log KOB/mL düzeyinde *S. Enteritidis* bulaştırılmış, 44±1 °C'ta pH 4.5'e düşüncüye kadar inkübasyona bırakılmıştır. Mikroorganizma sayısı plate count metodu ile belirlenmiştir. Alınan sonuçlara göre, en yüksek düzeyde (7 log KOB/mL) *Salmonella* bulaşmasının dahi, yoğurt bakterilerinin gelişmesi üzerine olumsuz bir etki gösteremediği ($P > 0.05$) görülmüştür. Diğer taraftan, *Salmonella*, fermantasyon sonuna kadar en düşük başlangıç inokülüm düzeyinde (3 log KOB/mL) dahi canlılığını sürdürmüştür. Yoğurdun daha düşük sıcaklıkta fermantasyonu ve fermantasyona 4.5 pH'dan daha yukarıda son verilmesi halk sağlığı açısından sorun oluşturabilir.

Anahtar kelimeler: Yoğurt, *Salmonella* Enteritidis, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*

CAN SALMONELLA AFFECT THE GROWTH OF YOGHURT BACTERIA?

Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of *Salmonella* Enteritidis serotype on the behaviour of yoghurt starter cultures during milk fermentation. For this purpose, milk samples were contaminated with *S. Enteritidis* at the approximate levels of 3; 5 and 7 log CFU/mL, besides *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*, and incubated at 44±1 °C for fermentation until the desired acidity was reached (pH 4.5). The number of microorganisms was determined by the plate count method. According to the results, the behaviour of yoghurt starter cultures was not affected by even high contamination level (7 log CFU/mL) of *Salmonella*. On the other hand, the pathogen could still survive during fermentation even at a low contamination level (3 log CFU/mL). Rather low incubation temperature and the higher ending pH (>4.5 pH) could pose a significant public health issue.

Keywords: Yoghurt, *Salmonella* Enteritidis, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*

* Bu çalışma, birinci yazarın doktora tezinin bir bölümüdür. / *This paper is a part of the first author's Ph.D. thesis. Çalışmanın özeti IAFP Avrupa Sempozyumu 2017'de poster bildiri olarak sunulmuş ve bu özet basılmıştır. / The abstract of the study has been presented as a poster at the IAFP European Symposium 2017 and has been published.*

** Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*

✉ halkman@ankara.edu.tr, © (+90) 312 203 3300/3614-3625, ☎ (+90) 312 317 8711

GİRİŞ

Temel besin öğelerinin başında gelen süt ve ürünleri, beslenme ve sağlık açısından her yaşta insanın yaşamları boyunca tüketmesi gereken besin grupları arasındadır. Yoğurt, en yararlı süt ürünlerinden biridir. Sütteki büyük molekülü proteinler, yoğurda işlenirken daha küçük moleküllere dönüşmekte ve buna bağlı olarak sindirilebilirlik özellikleri artmaktadır. Peynir, kefir ve diğer fermente süt ürünlerinde de aynı durum geçerlidir. Yoğurdun tarihçesi tam olarak bilinmemekle birlikte, çıkış noktasının Orta Asya'da yaşayan göçebe halklar ya da Ortadoğu olduğu en çok kabul edilen görüşler arasındadır. Bununla birlikte, farklı zamanlarda birbirinden bağımsız olarak farklı coğrafyalarda yoğurt yapımına başlanmış olması da mümkündür. Arkeolojik bulgular peynir olarak tanımlanan gıdaların bir kısmının kurutulmuş yoğurt olduğunu göstermiştir (Tamime ve Robinson, 1999; Akın, 2006; Yurdakök, 2015).

Klasik yoğurt, yoğurt bakterileri olarak da bilinen *Lactobacillus bulgaricus* (%1) ve *Streptococcus thermophilus*'un (%1) pastörize edilmiş ve yaklaşık 44 °C'a soğutulmuş süte aşılması ve bu sıcaklıkta yaklaşık 4-4.5 saat inkübasyona bırakılması ile elde edilir. Bu iki bakteri sütte simbiyotik olarak gelişirler. Başlangıçta *L. bulgaricus* tarafından kazeinin parçalanması ile oluşturulan aminoasitler *S. thermophilus*'un gelişimini destekler ve *S. thermophilus* sayısında artış olur. Sonrasında *S. thermophilus* asitliği yükselterek *L. bulgaricus* için daha hızlı gelişme ortamı sağlar. pH'nın düşmesi ile birlikte *S. thermophilus* gelişmesi yavaşlar ve *L. bulgaricus* sayısı, *S. thermophilus* sayısını geride bırakır. Bunun temel nedeni *L. bulgaricus*'un, oluşan asitliği daha fazla tolere ediyor olmasıdır (Tunail ve Köşker, 1989; Yaygın ve Kılıç, 1993; Kılıç, 2001; Kılıç, 2010; Erginkaya ve Kabak, 2011). Yoğurdun ekşimesi özellikle pazarlama aşamasında benimsenmediğinden, günümüzde *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacter* spp. kullanılarak biyoyoğurt üretilmektedir (Yurdakök, 2015).

Yoğurt, düşük pH'sı nedeni ile güvenilir gıdalar arasında sayılmaktadır. Bununla birlikte, hijyen eksikliği ve/veya sabotaj sonucu patojenlerin yoğurt yapılacak süte bulaşması mümkündür. Bu patojenler, yoğurt fermantasyonu sırasında canlılıklarını sürdürebilirler. Klasik yoğurt yapımı

sırasında yoğurt kültürü yanında süte ilave edilen *S. Enteritidis*'in fermantasyon süresince canlılığını sürdürdüğü görülmüştür (Savran ve Halkman, 2017). Ayrıca EFSA ve ECDC raporuna göre, Avrupa'da karşılaşılan shiga toksin üreten *E. coli* ile ilişkili 25 salgın vakasının büyük bir bölümünün, meyve sebze, et ürünleri, süt ürünleri özellikle de pastörize inek sütünden elde edilen taze peynir ve yoğurt ile ilişkili süt ürünleri olduğu belirtilmiştir (Anonymous, 2016). Namei vd. (2015), endüstriyel olmayan 30 yoğurdun, her biri klinik izolat olan 20 *Shigella* ve 15 *Salmonella* izolatına karşı antibakteriyel etkisini incelemişler ve sonuçta bu yoğurtların denenen patojenlere karşı bir antibakteriel etkisinin olmadığını bulmuşlardır.

Bu çalışmada yoğurt sütüne farklı düzeylerde ilave edilen *S. Enteritidis*'in klasik yoğurt kültürleri olan *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* gelişmesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Bakteriler

Bu çalışmada kullanılan *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus*, Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarında izole edilmiştir. Fizyolojik ve biyokimyasal testler ile tanımlamaları yapılan izolatların kesin tanısı, Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (MOBAM) 16S rDNA analizi ile yapılmıştır. Bu bakteriler 2014 Ekim ayından itibaren Atatürk Orman Çiftliği (AOÇ) Süt Fabrikası tarafından üretilmekte olan "Köy Yoğurdu" ve "Evde Yoğurt Yapma" setinde kullanılmaktadır. Buzdolabı sıcaklığında (4 °C) saklanan stok kültürler 44 °C'ta bir gece aktifleştirildikten sonra kullanılmıştır. Aktifleştirme amacı ile *L. bulgaricus* için DeMan, Rogosa ve Sharpe broth (MRS, Merck 1.10661, Germany), *S. thermophilus* için M17 broth (Merck 1.15029, Germany) kullanılmıştır (Anonymous, 2005).

S. Enteritidis (ATCC 13076), adı geçen laboratuvarın kültür koleksiyonundan sağlanmıştır. *S. Enteritidis*, tryptic soy (CASO) broth (TSB, Merck 1.05459, Germany) besiyerinde 37 °C'ta bir gece aktifleştirildikten sonra kullanılmıştır (Anonymous, 2005).

Süt

Yoğurt yapımında kullanılacak süt, ENKA A.Ş.'den (Konya) sağlanan ve antibiyotiksiz olduğu sertifikalandırılmış olan yağsız süt tozu kullanılarak hazırlanmıştır (%10 m/v). İçlerinde manyetik taş ilave edilmiş olarak hazırlanan 400 mL yağsız süt besiyerleri (YSB) otoklavda sterilize edilmiştir (115 °C'ta 10 dk).

Yoğurt kültürü inokülasyonu

Sterilize edilmiş 400 mL'lik kaplardaki YSB'ne %1'er (v/v) olacak şekilde *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* ilave edilmiştir.

Salmonella bulaştırılması

Yoğurt bakterileri ile eş zamanlı olarak 400'er mL YSB'ne yaklaşık 3; 5 ve 7 log KOB/mL düzeyinde *S. Enteritidis* suşu bulaştırılmıştır. *Salmonella* suşunun bu düzeylerde bulaştırılması için aktifleştirilmiş kültürdeki sayıları önceden standart yöntemlerle belirlenmiştir.

Yoğurt yapımı

Yoğurt kültürleri ve *S. Enteritidis* eklenmeden önce, YSB sıcaklığı 44±1 °C'a getirilmiştir. Bakterilerin inokülasyonundan sonra 400'er mL YSB, manyetik karıştırıcı yardımı ile homojenize edilmiş ve 100 mL'lik kaplara aseptik koşullarda yaklaşık 40'er mL olarak dağıtılmış ve 44±1 °C'ta inkübasyona bırakılmıştır. YSB pH'sı 4.5'e düştüğünde inkübasyona son verilmiştir.

Mikrobiyolojik analizler

Inkübasyon süresince her üç bakterinin sayı değişimleri 30 dk aralıklarla belirlenmiştir. Mikrobiyolojik analiz öncesi yoğurt örnekleri yeterince karıştırılmış ve örneklerin homojen hale gelmeleri sağlanmıştır. Sonrasında aseptik koşullarda 5 g örnek alınıp 45 mL maximum recovery diluent (MRD, Merck 1.12535, Germany) içeren dilüsyon sıvısına aktarılarak 10⁻¹ dilüsyon elde edilmiştir (mikrobiyolojik analizlerden geri kalan örnekler pH ölçümü için kullanılmıştır). 10⁻¹ dilüsyondan 1 mL alınıp 9 mL MRD içeren dilüsyon sıvısına aktarılarak ve benzer işlem sonraki dilüsyonlar için de devam ettirilerek seri dilüsyonlar hazırlanmıştır.

S. Enteritidis için yayma plak yöntemi kullanılarak, xylose lysine deoxycholate Agar (XLD, Merck 1.05287, Germany) besiyeri içeren Petri kutularına 0.1 mL örnek aktarılarak ekim yapılmış ve Petri kutuları 37 °C'taki inkübatörde 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır.

L. bulgaricus ve *S. thermophilus* için yine yayma plak yöntemi kullanılmıştır. *L. bulgaricus* sayımı yapılacak Petri kutularındaki besiyeri yüzeyi yayma işlemini takiben % 1'lik olarak hazırlanmış agar agar ile kapatılmıştır (yaklaşık 5 mL). *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* ekimleri için sırasıyla pH'sı 5.3±0.1'e ayarlı MRS agar (Merck 1.10660, Germany) ve M17 agar (Merck 1.15108, Germany) besiyerleri kullanılmıştır (MRS agar besiyerinde pH ayarlama işlemi ile aynı Petri kutusundaki *S. thermophilus*'un gelişiminin önüne geçilmiştir. Diğer taraftan *L. bulgaricus* M17 agar üzerinde gelişmemektedir. Böylelikle iki bakterinin ayrı ayrı sayımı mümkün hale getirilmiştir). Ekim işlemlerinin ardından *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* bakterileri 44 °C'taki inkübatörde 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Sayım için her dilüsyondan 2 Petri kutusuna paralel ekim yapılmıştır. Bakteri sayısı standart formüle göre hesaplanmış, sonuçlar log KOB/mL cinsinden ifade edilmiştir (Anonymous, 2005).

pH ölçümü

Örneklerin pH değerleri sayım yapılan her aşamada ölçülmüştür. pH ölçümü, pH metre (InoLab pH level 2) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanım öncesi pH metre, pH 4 ve pH 7 tampon çözeltileri (MTW) kullanılarak kalibre edilmiştir.

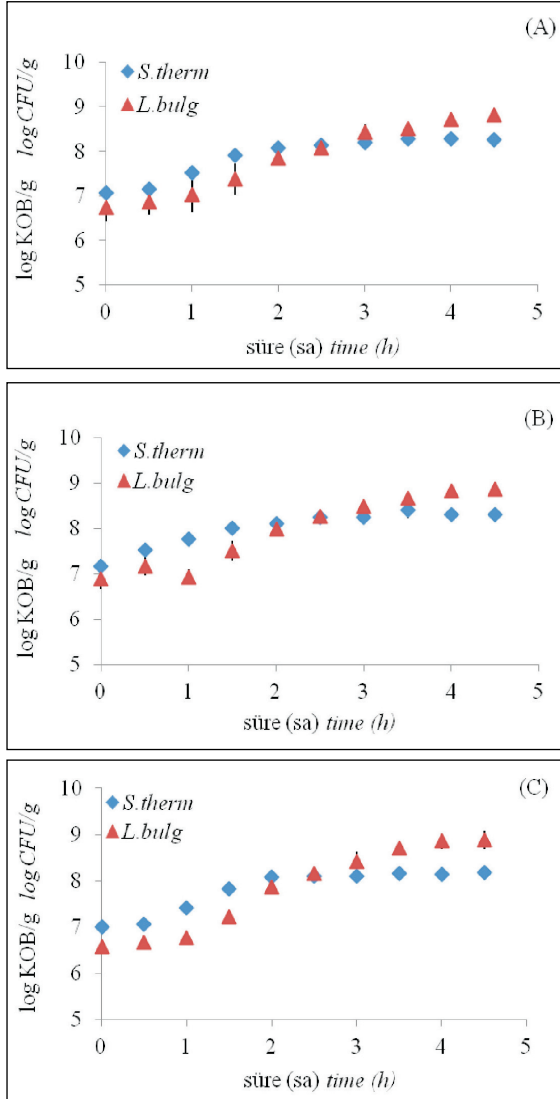
İstatistik analizler

Tüm denemeler 3 tekerrürlü olarak yapılmış, sonuçlar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak analiz edilmiştir. İstatistiksel analizlerde SPSS yazılımı (versiyon 11.5) kullanılmıştır.

ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

L. bulgaricus ve *S. thermophilus*'un fermantasyon sırasındaki gelişimleri şekil 1'de gösterilmiştir. *S. Enteritidis*'in süte farklı düzeylerde inoküle edilmesi ile yürütülen deneylerde, yaklaşık 1:1 oranında ilave edilen yoğurt kültürlerinden önce

S. thermophilus hızla gelişmiş sonrasında *L. bulgaricus*'un gelişimi *S. thermophilus*'u geride bırakmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen yoğurt bakterileri gelişimi literatür ile uyumlu bulunmuştur.



Şekil 1. *S. Enteritidis*'in süte farklı inokülasyon düzeylerinde (3 (A), 5 (B), ve 7 (C) log KOB/mL) ilave edilmesi durumlarında yoğurt bakterilerinin gelişme eğrileri (*S. therm*: *S. thermophilus*, *L. bulg*: *L. bulgaricus*). Barlar ortalama yoğurt bakterileri sayılarının standart sapmalarını göstermektedir.

Figure 1. The growth curves of yoghurt bacteria at the contamination levels of 3 (A), 5 (B), and 7 (C) log CFU/mL *S. Enteritidis* (*S. therm*: *S. thermophilus*, *L. bulg*: *L. bulgaricus*). The bars show the standard deviations of the average viable cell counts of yoghurt bacteria.

Şekil 1'den izleneceği gibi fermantasyonun 2.5-3. saatlerinde *S. thermophilus* sayı artışı durmuştur. Bu inkübasyon süresi içinde pH çok yaklaşık 5'tir. Çeşitli kaynaklara göre *S. thermophilus* pH 4.2-4.8'e kadar gelişmesini sürdürebilir, bu pH'nın altında baskılanır (Tamime ve Robinson, 1999; Kılıç, 2010; Yurdakök, 2015). Yine şekil 1'in incelenmesi ile inkübasyona son verilen pH 4.5'e kadar *L. bulgaricus* sayısında artış olmuştur. *L. bulgaricus*'un *S. thermophilus*'a kıyasla daha fazla asit oluşturduğu/ asitliğe daha dirençli olduğu literatürde bildirilmektedir (Tunail ve Köşker, 1989; Yaygın ve Kılıç, 1993; Kılıç, 2001; Erginkaya ve Kabak, 2011).

S. Enteritidis'in süte yaklaşık 3; 5 ve 7 KOB/mL düzeyinde inoküle edilmesi ile yürütülen deneylerde; *S. thermophilus*'un fermantasyonun başlangıcındaki sayıları sırasıyla 7.07 ± 0.07 ; 7.17 ± 0.15 ve 7.00 ± 0.12 log KOB/g, fermantasyon sonundaki sayıları sırasıyla 8.25 ± 0.06 ; 8.30 ± 0.14 ve 8.18 ± 0.20 log KOB/g olarak bulunmuştur. Gerek fermantasyonun başlangıcında gerek sonunda elde edilen *S. thermophilus* gelişmesi üzerine *S. Enteritidis*'in süte farklı düzeylerde inoküle edilmesinin istatistiksel açıdan önemli ölçüde etki etmediği görülmüştür ($P > 0.05$).

L. bulgaricus'un fermantasyonun başlangıcındaki sayıları 6.74 ± 0.31 ; 6.88 ± 0.22 ve 6.58 ± 0.05 log KOB/g, fermantasyon sonundaki sayıları 8.81 ± 0.11 ; 8.86 ± 0.06 ve 8.89 ± 0.14 log KOB/g olarak bulunmuştur (sırasıyla 3; 5 ve 7 KOB/mL düzeyinde *S. Enteritidis* inoküle edilmesi durumunda). *S. thermophilus* sonuçları ile benzer olarak, *S. Enteritidis*'in süte farklı düzeylerde inoküle edilmesinin fermantasyonun başlangıcında ve sonunda elde edilen *L. bulgaricus* gelişimi üzerine istatistiksel açıdan önemli ölçüde etki etmemiştir ($P > 0.05$).

Genel olarak her üç *Salmonella* bulaştırma düzeyinde yoğurt bakterilerinin gelişiminin, fermantasyon boyunca benzer şekilde devam ettiği, düşük (3 log KOB/mL) orta (5 log KOB/mL) ve yüksek (7 log KOB/mL) *Salmonella* bulaştırılmasının, yoğurt bakterilerinin gelişimi üzerinde etkili olmadığı görülmüştür ($P > 0.05$). *S. Enteritidis* serotipi yoğurt fermantasyonu sırasında yoğurt bakterileri ile rekabet edebilecek, onları baskılayabilecek sayıya ve güce erişmemiştir. Bu sonuç yoğurt ortamının laktik asit bakterilerinin gelişimi için *S. Enteritidis*'e nazaran çok daha uygun bir ortam olması ile ilişkilidir.

Fermentasyon süresince elde edilen pH değişimleri incelendiğinde, *S. Enteritidis*'in farklı inokülasyon düzeylerinde yürütüldüğü tüm deneyler için pH'nın benzer eğilimde devam ettiği ve fermentasyon boyunca 6.3'ten 4.5'e düştüğü görülmüştür.

S. Enteritidis sayısı, yoğurt bakterilerinin varlığına ve düşen pH'ya rağmen belli bir noktaya kadar artış göstermiş ve fermentasyonun son aşamasında azalma göstermiştir. Diğer taraftan, düşük inokülasyon düzeyinde dahi (3 log KOB/mL) fermentasyon boyunca canlılığını koruduğu görülmüştür (Savran ve Halkman, 2017).

Rubin vd. (1982), *Salmonella* Typhimurium üzerinde laktik asit ve HCl inhibisyonunu incelemişler, farklı pH'larda farklı asitlerin dissosiyasyon özelliklerinin, inhibisyon üzerinde etki olduğunu göstermişlerdir.

Yoğurt fermentasyonunda farklı patojen bakterilerin gelişimi, canlı kalması ve indirgenmesi üzerinde çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda, fermentasyonun başlangıcında patojen sayısında bir artış görülmekle beraber fermentasyonun sonuna doğru patojenlerin baskılandığı ancak tümüyle yok olmadıkları ifade edilmiştir (Pazakova vd., 1997; Massa vd., 1997; Bachrouri vd., 2006; Shen vd., 2007; Cirone vd., 2013). Çalışmada elde edilen bulgular önceki çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

SONUÇ

S. Enteritidis serotipi 7 log KOB/mL düzeyinde dahi yoğurt bakterilerinin gelişmesi üzerinde olumsuz etki yapamamıştır. Diğer taraftan fermentasyon süresince *S. Enteritidis*, düşük inokülasyon düzeyinde dahi canlılığını koruyabilmektedir.

Yoğurt düşük pH içeriği ile çoğu zaman güvenilir gıda olarak düşünülmektedir. Her ne kadar fermente ürünlerde laktik asit bakterilerinin var olmaları ürünlerin güvenilir olduklarını düşündürse de alınan bu sonuç yoğurt üretiminde doğru üretim uygulamalarının önemine dikkat çekmektedir. Bu nedenle gıda güvenliği ve halk sağlığı ile ilgili olarak, fermentasyonun patojenler ve bozulma yapan mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyel etkisinin yeterli olmayabileceği ve doğru üretim uygulamalarının bir tamamlayıcısı olduğu dikkate alınmalıdır.

Gıda mikrobiyolojisinde giderek önemi artan engeller teknolojisi, sadece patojenlerin baskılanması için daha az koruyucu kullanılmasını hedeflemez. Bu çalışmada, sadece pH ölçümüne bağlı olarak *S. Enteritidis* sayısında azalma olduğu söylenebilir. Fakat *Salmonella* için maksimum gelişme sıcaklığına yakın bir sıcaklıkta (44±1 °C) inkübasyon ve/veya yoğurt bakterilerinin oluşturduğu bakteriyosinlerin veya diğer fermentasyon ürünlerinin etkisi araştırılmamıştır. Bununla beraber, daha düşük inkübasyon sıcaklıklarında yoğurt yapımı ve/veya daha az ekşi (tatlı) yoğurt yapmak amacıyla pH 4.5 üzerinde inkübasyona son verilmesi koşulunda *Salmonella* canlılığında yeterli bir indirgeme sağlanamayabilir. Ayrıca suş farklılıklarının önemi de dikkate alındığında konu üzerinde engeller teknolojisi esaslı çok daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç vardır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Derya Savran'ın TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Bursu ile desteklediği projenin (1059B141500410) bir bölümünü oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR

Akın, N. (2006). Modern yoğurt bilimi ve teknolojisi. Damla Ofset, Konya, Türkiye. 456 s. ISBN: 975-00594-0-9.

Anonymous (2005). Merck gıda mikrobiyolojisi uygulamaları. Ed: A.K. Halkman. Başak Matbaacılık Ltd. Şt., Ankara, Türkiye, 358 sayfa. ISBN: 975-00373-0-8.

Anonymous (2016). EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). Multi-country outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection associated with haemolytic uraemic syndrome. doi: 10.2903/sp.efsa.2016.EN-1017.

Bachrouri, M., Quinto, E.J., Mora, M.T. (2006). Kinetic parameters of *Escherichia coli* O157:H7 survival during fermentation of milk and refrigeration of home-made yoghurt. *Int Dairy J*, 16(5): 474-481. doi: 10.1016/j.idairyj.2005.06.002.

- Cirone, K., Huberman, Y., Morsella, C., Méndez, L., Jorge, M., Paolicchi, F. (2013). Growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Escherichia coli*, and *Salmonella* Enteritidis during preparation and storage of yogurt. *ISRN Microbiol*, 1-7. doi: 10.1155/2013/247018.
- Erginkaya, Z., Kabak, B. (2011). Fermente gıdalar. Gıda Mikrobiyolojisi. Ed: O. Erkmen, 425-448, Ankara.
- Kılıç, S. (2001). Süt endüstrisinde laktik asit bakterileri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi yayın no 542. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, Türkiye. 451 s. ISBN:975-483-488-1.
- Kılıç, S. (2010). Süt mikrobiyolojisi. Sidas Medya Ltd. Şti. İzmir, Türkiye. 643 s. ISBN: 978-9944-5660-3-2.
- Massa, S., Altieri, C., Quranta, V., De Pace, R. (1997). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in yoghurt during preparation and storage at 4 °C. *Lett Appl Microbiol*, 24, 347-350. doi: 10.1046/j.1472-765X.1997.00067.x.
- Namaei, M. H., Ghannadkafi, M., Ziaee, M. (2015). Antibacterial effect of non-industrial yogurt on *Salmonella* and *Shigella*. *Mod Care J*. 2015;12(3):109-113.
- Pazakova, J., Turek, P., Laciakova, A. (1997). The survival of *Staphylococcus aureus* during the fermentation and storage of yoghurt. *J Appl Microbiol*, 82, 659-662. doi: 10.1111/j.1365-2672.1997.tb03599.x.
- Rubin, H. E., Nerad, T., Vaughan, F. (1982). Lactate aid inhibition of *Salmonella Typhimurium* in yogurt. *J Dairy Sci*, 65 (12): 197-203. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(82)82177-2
- Savran, D., Halkman, A.K. (2017). Yoğurt fermantasyonu sırasında *Salmonella* Enteritidis'in farklı inokülasyon koşullarında canlı kalma durumunun araştırılması. *GIDA* 42(1): 1-7, doi: 10.15237/gida.GD16047.
- Shen H.W, Yu, R.C., Chou, C.C. (2007). Acid adaptation affects the viability of *Salmonella* Typhimurium during the lactic fermentation of skim milk and product storage. *Int J Food Microbiol* 114, 380-385. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.033.
- Tamime, A.Y., Robinson, R.K. (1999). Yoghurt: Science and technology. 2nd Ed. Woodhead Publishing Ltd. Cambridge, England, 619 s. ISBN 1 85573 399 4.
- Tunail, N., Köşker, Ö. (1989). Süt mikrobiyolojisi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın no 1116. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Basım Ünitesi, Ankara, Türkiye. 138 s.
- Yaygın, H., Kılıç, S. (1993). Süt endüstrisinde saf kültür. Altındağ Matbaacılık, İzmir, Türkiye. 108 s.
- Yurdakök, M. (2015). Yoğurdun öyküsü, probiyotiklerin tarihi. Ed. S. Yücecan. Danone Enstitüsü Beslenme Serileri no 6. Matsis Matbaa Hizmetleri, İstanbul Türkiye. sayfa 1-25. ISBN: 978-605-9128-00-1.

FARKLI FERMANTASYON VE KURUTMA YÖNTEMLERİYLE ÜRETİLMİŞ TOZ EKŞİ HAMURUN BAZI MİKROBİYOLOJİK NİTELİKLERİ VE EKMEKTEKİ KÜF GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Müge Hendek Ertop*

Kastamonu Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Kastamonu, Türkiye

Geliş / Received: 26.03.2017; Kabul / Accepted: 25.09.2017; Online baskı / Published online: 15.11.2017

Hendek Ertop, M. (2017). Farklı fermantasyon ve kurutma yöntemleriyle üretilmiş toz ekşi hamurun bazı mikrobiyolojik nitelikleri ve ekmekteki küf gelişimi üzerine etkileri. *GIDA* (2017) 42 (5): 609-619 doi: 10.15237/gida.GD17035

Öz

Bu çalışmanın amacı iki farklı fermantasyon yöntemi ile [Spontan fermantasyon (SPF) ve starter (laktik asit bakterisi) ilaveli fermantasyon (STF)] üretilmiş ve üç farklı yöntemle kurutulmuş (Etüvde kurutma; K_E, Liyofilizasyon; K_L ve Püskürtmeli kurutma; K_P) ekşi hamurların bazı fizikokimyasal ve mikrobiyolojik niteliklerini incelemektir. Toz ekşi hamurların kurutulma koşulları belirlenirken mikrobiyotanın canlılığını koruması hedeflenmiştir. Kurutma öncesi ve sonrası mikrobiyolojik sayımlar yapılmış, kurutma prosesleri mikroflorada azalmaya neden olmakla birlikte, sayım sonuçları starterlerin çoğalabilmesi için genel kabul görmüş 5-7 log (KOB/g) düzeyinin altına düşmemiştir. Ayrıca 6 aylık depolama sonunda yapılan mikrobiyal sayımla canlılık kontrolü gerçekleştirilmiş, toz hamurlar canlılıklarını devam ettirmekle birlikte 2-4 log (KOB/g) düzeyinde kayba uğramışlardır. Elde edilen toz ekşi hamurlar %3, %6 ve %12 oranında hamura ilave edilerek ekmeğin üretilmesi yapılmış ve ekmeğin örnekleri ekşi hamur kullanılmayan kontrol ekmeğine karşın raf ömrü süresince küflenme gelişimi, pH ve toplam titrasyon asitliği açısından karşılaştırılmıştır. Toz ekşi hamur, %12 kullanımda ekmeğin asitliğini ortalama %2.5 arttırmış, pH değerini ise ortalama 0.5 düzeyinde düşürmüştür. Ayrıca kullanım miktarı ve çeşite bağlı olmakla birlikte küf gelişimini de engellediği tespit edilmiştir. Ekşi hamur tozlarının etkileri %12 kullanım oranında belirgin olarak görülmüş, bu oranda en iyi sonuç SPF/K_P kombinasyonu ile alınmıştır.

Anahtar kelimeler: Ekşi hamur, kurutma yöntemleri, ekmeğin, küf

EFFECTS ON MOLD GROWTH IN BREAD AND SOME MICROBIOLOGICAL PROPERTIES OF POWDER SOURDOUGH PRODUCED WITH DIFFERENT FERMENTATION AND DRYING METHODS

Abstract

The aim of this study was to evaluate the some physicochemical and microbiologic properties of dried sourdoughs produced with two different fermentation methods [Spontaneous fermentation (SPF) and starter (lactic acid bacteria) added fermentation (STF)], and three different drying methods (Drying in oven; K_E, Freeze drying; K_L and Spray drying; K_P). While drying process parameters of powdered sourdough were determined, preservation of the viability of microbiota was targeted. Microbiological counts were performed before and after drying. Although the drying processes caused a decrease in microflora, the counts of microflora did not fall below the generally accepted 5-7 log CFU/g level for the reproduction of starters. Moreover, viability control was performed by microbial counting after 6 months of storage. The powdered doughs have had loss at 2-4 log CFU/g level while maintaining their vitality. The breads were produced by adding the dried sourdoughs at rates of 3%, 6% and 12%. The bread samples and control sample produced without sourdough were compared in terms of mold growth, pH and total acidity during shelf life. The results showed that the powder sourdough increased in the acidity of the bread 2.5% by average and decreased the pH value by an average of 0.5 in 12% usage. Moreover they impacted the mold growth depend on usage rate and type. The most effective results was obtained at 12% usage rate of powder sourdoughs and by SPF / KP combination.

Keywords: Sourdough, drying methods, bread, mold

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ muge_ertop@hotmail.com

☎ (+90) 532 667 8240

☎ (+90) 366 280 2968

GİRİŞ

Ekşi hamur ekmek başta olmak üzere çeşitli fırıncılık ürünlerinin kalitesini arttırmak amacıyla kullanılan en eski biyoteknolojik mayalama yöntemlerinden birisidir. Yaklaşık olarak beşbinyıldan buyana kullanılmakta ve her yıl ortalama üç milyon tonun üzerinde üretimi yapılmaktadır. Son yıllarda tüketicilerin özellikle katkısız ve temiz etiketli ürünlere olan eğilimiyle birlikte önemi artmıştır (Messens ve De Vuyst, 2002; Voge vd., 2011). Ekşi hamur çeşitli tahıl unları ve su karışımının laktik asit bakterileri (LAB) ve mayalardan oluşan mikrobiyotası sayesinde, fermantasyon sonucu meydana gelmektedir (Randazzo vd., 2005). Mikrobiyal kompozisyonu, ekmek yapım prosesi ve ingredientleri arasındaki etkileşimden kaynaklanan oldukça kompleks biyolojik bir ekosisteme sahiptir (Gobbetti vd., 1994). Ekşi hamurun kendine özgü karakteristik niteliğini, temel olarak LAB/mayalardan oluşan mikrobiyotası ve bunlar arasındaki interaksiyonlar belirlemektedir (De Vuyst vd., 2014). Organik asitler, eksopolisakkaritler ve enzimler gibi mikrobiyota tarafından üretilen çeşitli metabolitler ekşi hamurun niteliklerini etkiler ve kullanıldığı son ürüne iyileştirilmiş tekstür ve hacim, zengin aroma profili ve uzun raf ömrü sağlar. Ekşi hamur fermantasyonu besinsel niteliklerin iyileştirilmesinin yanı sıra ekmeğin bayatlaması ve mikrobiyolojik raf ömrünün uzatılması üzerinde de olumlu etkilere sahiptir (Martinez Anaya, 1996; Katina vd., 2006; Göçmen vd., 2007; Delcour ve Hosney, 2010; Chavan ve Chavan, 2011).

Ekşi hamur üretiminde en eski ve temel yöntem spontan fermantasyona dayanan çok kademeli fermantasyondur. Ancak bu yöntem iş yoğun ve zaman alan bir yöntemdir. Son yıllarda *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. sanfranciscensis* ve *Lb. fermentum* gibi LAB'lerinin spesifik kültür olarak kullanıldığı ve kontrollü fermantasyon prosesine dayanan yöntemler de kullanılmaktadır. Ancak, bu tekniği kullananlar için temel mikrobiyoloji bilgisi ve altyapısı ile fermantasyon için uygun kültürün temini gerekmektedir. Bu nedenle, doğal bir ingredient olarak ekşi hamurun toz formda üretimiyle, endüstriyel ve evsel

kullanımı üzerindeki araştırmalar devam etmektedir. Bu durum günümüz tüketicisinin doğal ve sağlıklı katkı maddesi beklentisini de karşılayacaktır. Liyofilizasyon olarak dondurarak kurutma, sprey granülasyon olarak da bilinen püskürtmeli kurutucu, tambur kurutucu gibi çeşitli tekniklerin bu amaçla kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Golshan vd., 2013; Khanjani vd., 2015). Bu tekniklerin tümündeki temel nokta mikrobiyal canlılığın korunması ve devamlılığın sağlanmasıdır. Püskürtmeli kurutucuda sıvı formdaki ekşi hamur sıcak hava ortamına pülverize olarak püskürtülür. Yaklaşık %90'lık su içeriği, evapore edilir ve kurumuş partiküller sistemin altında toplanır. Bu proses süresince partiküller yüksek sıcaklıkla çok kısa süre muamele edildiklerinden ve kısa sürede soğuduklarından dolayı esmerleşme reaksiyonuna uğramazlar (Chavan ve Chavan, 2011). Dondurarak kurutma olarak bilinen liyofilizasyon ise *Lb. delbrueckii*, *Lb. fructivorans*, *Lb. plantarum* ve *Lb. brevis* gibi mikroorganizmaların muhafaza sürecinde canlılığının korunması amacıyla kullanılan yöntemlerden birisidir (Hammes ve Gänzle, 1998). Bununla birlikte liyofilizasyon yönteminin, kurutulan materyaldeki aromatik bileşiklerinkaybına neden olduğu da bilinmektedir (Kirchhoff ve Schieberle, 2001).

Bu çalışmanın temel amacı iki farklı fermantasyon yöntemi ile üretilmiş ekşi hamurların mikrobiyal canlılıklarını devam ettirecek işlem koşullarını belirleyerek kuru forma getirilmelerini sağlamaktır. Ayrıca elde edilen toz formların doğal bir katkı olarak gerek evsel gerekse endüstriyel alanda kullanımını önerebilmek için 6 aylık raf ömrü sonrası canlılığın ve kullanıldığı ekmeklerin raf ömrü sürecinde küf gelişimi üzerindeki etkilerinin tespiti de hedeflenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Ekşi hamur ve ekmek üretiminde kullanılan buğday unu (%14.3 rutubet, %0.63 kül, %11.3 protein, %59.2 su absorpsiyonu) yerel bir un fabrikasından temin edilmiştir. Tuz ve instant aktif kuru maya yerel bir süper marketten, kimyasallar ve besiyerleri Merck (Almanya)'dan temin edilmiştir.

Ekşi Hamurların Hazırlanması

Ekşi hamur yapımında performansı etkileyen önemli faktörlerden bir tanesi de un/su oranıdır ve Hamur Verimi (HV) değeri ile ifade edilir. Yapılan çalışmalarda;

$$HV = \frac{\text{Kullanılan su miktarı} + \text{Kullanılan un miktarı}}{\text{Kullanılan un miktarı}} \times 100$$

formülü ile hesaplanan HV=200 değeri yapılan çalışmalarda en iyi sonuçları verdiği için dolayı bu çalışmada da aynı oran kullanılarak ekşi hamur hazırlanmıştır (Chavan ve Chavan, 2011). Ekşi hamurların hazırlanması amacıyla endüstriyel olarak da kullanılan spontan fermantasyon ile laktik asit bakterilerinin starter olarak kullanıldığı 2 tip fermantasyon yöntemi kullanılmıştır.

Spontan fermantasyon: Geleneksel olarak kullanılan çoklu kademeli spontan fermantasyon yöntemi (back-sloping) kullanılmıştır. Buna göre 200 g buğday unu ve 200 g su karıştırılmış, spontan olarak fermantasyona bırakılmıştır ve karışım pH 4.5'un altına 4-6 saatte düşünceye kadar kademe sayısına devam edilmiştir. Dördüncü kademe işleme son verilerek kurutma işlemine geçilmiştir (Akgün, 2007; Chavan ve Chavan, 2011).

Starter LAB ilavesiyle fermantasyon: ARS Kültür koleksiyonundan (Illinois, USA) liyofilize formda temin edilen *Lb. delbrueckii* (B-763), *Lb. brevis* (B-3065) ve *Lb. plantarum* (B-4496) bakterileri önce uygun koşullarda MRS Broth besiyerinde aktifleştirildikten sonra MRS Agara sürmeekim yöntemi kullanılarak ekim yapılmış, 36°C ve 24 saat sonunda tek düşen ve morfolojik olarak da teyit edilen kolonilerden 1'er adet alınarak MRS Broth'a aşılama yapılmıştır. Onsekiz saatlik genç kültürden alınarak tekrar %1 oranında MRS Broth'a tekrar aşılama yapılmıştır. Onsekizsaatlik kültürden mikroorganizmalar santrifüj (3000 devir/dak'da 10 dak) ile ayrılmış, steril fizyolojik su ile iki kez yıkandıktan sonra her bir kültür McFarland:5 ve spektrofotometrede 650 nm dalga boyunda 1.010-1.050 aralığında ölçülerek optik yoğunlukları ayarlanmıştır. Optik yoğunlukları ölçülen hücre süspansiyonlarından dilüsyonlar hazırlanmış ve yayma ekim yöntemi ile LAB sayımı yapılarak ortalama 10^7 KOB/mL konsantrasyonda oldukları teyit edilerek %1 oranında un/su karışımına inoküle edilmişlerdir (Wu vd., 2012).

Kurutma Yöntemleri

Liyofilizatörde kurutma (K_L): Ekşi hamurlar ince bir tabaka halinde yayılarak liyofilizatöre (Xianou-12N, Çin) yerleştirilmiştir. Kurutma -68°C'de gerçekleştirilmiş ve belirli aralıklarla örnek alınıp rutubet kontrolü yapılmıştır. Örneklerin rutubet içeriği %4-5 düzeyine ulaştığında işleme son verilmiştir. Kuruyan tabakalar laboratuvar tipi öğütücüde (IKA, Almanya) ile öğütülerek toz formuna getirilmiştir.

Etüvde kurutma (K_E): Akgün (2007) tarafından yapılan çalışmada etüvde 40 °C'de 3 gün süreyle yapılan kurutma işlemi sonucu LAB ve mayaların canlılıklarını tamamen yitirdikleri bildirildiğinden dolayı bu çalışmada daha düşük sıcaklık (38 ± 1 °C) ve kısa süre (7 ± 1 saat) uygulaması yapılmıştır. Ekşi hamur düz plakalar üzerine ince film tabakası halinde yayılmış ve etüve yerleştirilmiştir. Belirli aralıklarla örnek alınarak rutubet kontrolü yapılmış ve örneklerin rutubeti %4-5 düzeyine ulaştığında işleme son verilmiştir. Kuruyan tabakalar laboratuvar tipi öğütücüde (IKA, Almanya) toz formuna getirilmiştir.

Püskürtmeli kurutucuda kurutma (K_P): Püskürtmeli kurutucuda yüksek sıcaklıklarda ve özellikle rutubet içeriği %4'ün altında işlem sırası ve işlem sonrası temel problem LAB'lerin canlılığının kaybıdır. Çünkü LAB'leri ısıya duyarlı mikroorganizmalardır (Koç vd., 2010). Bu amaçla yapılan ön denemeler sonucunda ekşi hamur, kurutucunun 1mm çaplı püskürtme başlığından geçebilecek düzeye kadar su ile seyreltilmiş, homojenize edilmiş ve kurutucu giriş sıcaklığı 135 ± 5 °C'ye ayarlanarak ürün rutubeti %4-5 olacak şekilde kurutma gerçekleştirilmiştir (Ghandi vd., 2012).

LAB ve Maya Sayımı

Ekşi hamurlar ortalama pH 4.5 düzeyine ulaştıklarında yaş formda ve kurutma sonrası toz formda LAB ve maya sayımları yapılmıştır. Elde edilen toz ekşi hamurlar cam kavanozlarda, ağzı kapalı olarak +12 °C'de 6 ay süreyle depolanmışlardır. Bu süre sonunda LAB ve maya sayımları tekrar yapılmış ve mikrofloranın canlılık kaybı kontrol edilmiştir. Bu amaçla 10 g örnek 90 mL steril fizyolojik tuzlu suda (FTS) homojenize edilerek ardından seri dilüsyonlar hazırlanmış ve

uygun dilüsyonlardan 0.1 mL örnek alınarak MRS Agara yayma kültür yöntemiyle ekim yapılmıştır. Petri kutuları anaerobik kavanozda ve Anaerocult A ile oluşturulan anaerobik koşullarda 36 °C'de 2 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda petri kutularındaki koloniler sayılmıştır (Gürkün ve Halkman, 1990). Maya sayımı için, hazırlanan dilüsyonlardan 1mL alınarak asitlendirilmiş Malt Ekstrakt (ME) Agar ve YGC (Yeast Ekstrakt Glucose Chloromfenicol) agara aseptik şartlarda 0.1 mL yayma kültür yöntemiyle ekim yapılmış ve 25 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

Toz Ekşi Hamur Örneklerinin Suda Çözünürlük Özelliğinin Belirlenmesi

Toz formdaki ekşi hamurun, evsel veya endüstriyel kullanımda suda çözülme ve buna bağlı olarak hamurda homojen dağılımı önemli olduğundan suda dağılımı durumu tespit edilmiştir. Bu amaçla, cam beher içerisindeki ort. 24 °C'deki suya aynı miktarda toz hamur ilave edilerek eş zamanlı olarak karıştırılmıştır. Toz hamur ilavesi bittiginde karıştırmaya son verilmiş, toz hamurların sudaki dağılımı, topaklanma, beher cidarına yapışma durumları gözlemlenmiştir.

Ekmeğin Hazırlanması

Ekmeğin yapımında Keswet vd., (2003)'nin kullandığı direkt hamur yapım yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla %59 su, %1.5 tuz, %2 instant aktif kuru maya, 300 g buğday unu ve % 3, % 6 ve % 9 oranında kurutulmuş toz ekşi hamur, 15 dak mikserde karıştırılmıştır (KitchenAid KSM150PSER, Belgium). Toz mayalar su ile karıştırılarak hamura ilave edilmeden önce 30 dak oda sıcaklığında bekletilmişlerdir. Ekmeğin yapımında karıştırma, yoğurma, 40 dak ana fermentasyon, havalandırma, 25 dak fermentasyon, şekil verme, 50 dak son fermentasyon ve 180 °C'de pişirme aşamaları uygulanmıştır.

pH ve Toplam Titrasyon Asitliği (TTA)

pH ölçümü için örnek ve distile su (1:9, w/v) ultraturaks (IKA, T25, Germany) ile homojenize edilmiştir. Karışım 10 dak bekletilmiş ve pH ölçümü yapılmıştır. Karışım 0.1 N NaOH ile titre edilerek toplam TTA tespit edilmiştir (Rizzello vd., 2016).

Küf Sayımı

Raf ömrü olarak belirlenen 11 günlük süreçte aynı ortam koşullarında bekletilen ekmeklerden 0, 1, 3, 5, 7, 9 ve 11. günlerde alınan örneklerde küf gelişimi olup olmadığı mikrobiyolojik olarak tespit edilmiştir. Yöntem olarak Dal Bello vd. (2007)'nin kullandıkları yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. Ekmekler fırınlandıktan sonra steril bir bıçakla 20 mm kalınlığında dilimlere ayrılmıştır. Dilimler buzdolabı poşeti içerisinde ağızları hava alacak şekilde kapatılmış ve hava alacak şekilde oda koşullarında ve aynı ortamda 11 gün bekletilmişlerdir. Belirlenen günlerde ekmeğin dilimlerinin farklı noktalarından 10 g alınarak 90 mL steril FTS içerisinde homojenize edilmiştir. Seri dilüsyonlardan hazırlanan örnekler, YGC Agara ve karşılaştırma amacıyla asitlendirilmiş ME Agar'a yayma kültür yöntemi ile ekim yapılmıştır. Hazırlanan besiyerleri 25-28 °C'de 2 gün süreyle aerobik inkübasyona bırakılmıştır.

İstatistiksel Analiz

Çalışmada ekmeğin üretimleri 2 tekerrür, ekmeklerde yapılan analizler ise 3 paralel şekilde gerçekleştirilmiştir. Deneylerde elde edilen analiz sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi SPSS 17.0.1 paket programı (SPSS Inc., Chicago, Illinois, US) kullanılarak yapılmıştır. Çoklu varyans analizine tabi tutulan veri ortalamaları arasındaki fark $p < 0.05$ anlamlılık düzeyinde Tukey çoklu karşılaştırma testi yapılarak belirlenmiştir.

ARAŞTIRMA BULGULARI

Toz Ekşi Hamurların Bazı Fizikokimyasal ve Mikrobiyolojik Nitelikleri

Rutubet, pH ve TTA Değerleri

Üretilen toz ekşi hamurların kurutma prosesleri sonunda tekstürel olarak kurudukları belirlendikten sonra rutubet kontrolleri yapılarak istenilen rutubete ulaştıkları tespit edilmiş ve kurutma işlemine son verilmiştir. Kurutma işlemi sırasında istenilen rutubete ulaşılması işleme son verilmesi için kritik kontrol olduğundan, rutubet ölçümü için 10 dak'da ölçüm yapan halojen ısıtıcılı nem tayin cihazı (Ohaus MB45 Nem Tayin Cihazı) kullanılmış, ortalama her 15 dak'da örneklerin kontrolü gerçekleştirilmiştir. Kurutma sonucu

elde edilen ekşi hamur tozlarının pH, rutubet içerikleri tespit edilmiş ve Çizelge 1.'de verilmiştir.

Ekmek hamuruna ilave edilebilecek ekşi hamurların pH 4.0-4.5 asitlik düzeyinde olması beklenmektedir (Czerny ve Schieberle, 2002; De

Vuyst ve Neysens, 2005). Bu nedenle üretilen toz ekşi hamurların da aynı asitlik düzeyine sahip olmaları beklendiğinden pH tayinleri yapılmıştır. Kurutulmuş ekşi hamurların asitlik düzeylerini muhafaza ettikleri tespit edilmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Toz ekşi hamurlara ait pH ve rutubet değerleri
Table 1. pH and humidity values of powder sourdoughs

Fermantasyon yöntemi <i>Fermentation method</i>	Kurutma Yöntemi <i>Drying method</i>	pH	Rutubet % <i>Moisture%</i>
SPF	K _P	4.51±0.02 ^a	4.80±0.02 ^c
	K _L	4.49±0.01 ^a	5.14±0.11 ^b
	K _E	4.46±0.01 ^a	5.95±0.05 ^a
STF	K _P	4.25±0.05 ^b	4.85±0.02 ^{bc}
	K _L	4.14±0.00 ^b	5.02±0.03 ^{bc}
	K _E	4.20±0.01 ^b	6.02±0.05 ^a

SPF: Spontan fermantasyon, STF: Starter (LAB) ilaveli fermantasyon

K_P: Püskürtmeli kurutma, K_L: Liyofilizasyon, K_E: Etüvde kurutma

a-c: Aynı sütundaki birbirinden farklı harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($p<0.05$) olduğunu göstermektedir.

SPF: Spontaneous fermentation; STF: Starter (LAB) added fermentation

K_P: Spray drying, K_L: Freeze drying, K_E: Drying in oven

a-c: Means with different superscripts in the same column are significantly different ($p<0.05$)

Toz Ekşi Hamur Örneklerinin Suda Çözünürlük Özelliğinin Belirlenmesi

Elde edilen toz ekşi hamurların hamura ilave edilmeden önce suda çözünürlük durumları tespit edilmiştir. Toz ekşi hamurların üretildikleri fermantasyon türü, suda çözünme veya hamurda dağılma durumlarını etkilememiştir. Ancak kurutma metodunun toz form üzerinde etkili olduğu gözlemlenmiştir. Püskürtmeli kurutucudan elde edilen ürünler pudra formunda olmuştur. Bunlar hamura ilave edilmeden önce su içerisinde çözülmeye çalışıldığında birbirine ve kabın cidarlarına yapışma eğilimi göstermişlerdir. Liyofilizatörde elde edilen ekşi hamur tozları vakumla kurutulduğundan süngerimsi gözenek yapısına sahip kütleler halinde kurumuş, granüler olarak birbirine yapışmamış, dağılgan ve serbest formda olduğundan kolaylıkla granül toz forma dönüştürülebilmiştir. Toz formdaki dağılgan ve

serbest formlarını su içerisinde de sürdürmüşler, suya içerisinde önce serbest olarak dağılmışlar, daha sonra su alarak çözülmüşlerdir. Kap cidarına yapışma veya topaklanma gözlenmemiştir. Etüvde kurutulan form liyofilizatördeki gibi yayma yöntemi ile yapılmış olmasına rağmen açık hava basıncında kurutulduğundan daha sert plakalar halinde kurumuş, toz formdaki granülleri daha sert yapıda oluşmuştur. Granüller suya ilave edildiğinde topaklanma veya cidara yapışma gözlenmemekle birlikte, daha sert yapıya sahip olduklarından su alarak çözünmeleri daha uzun zaman almış, diğerleriyle aynı sürede karıştırmaya son verildiğinde ağır ve çözünmemiş granüller kap dibine çökme eğilimi göstermişlerdir. Kullanıma elverişlilik göz önünde bulundurulduğunda teknolojik açıdan liyofilizatörde kurutma en ideal yöntem olarak belirlenmiştir.

LAB ve Maya Sayımı

Kurutma yöntemlerinin yaş ekşi hamurdaki LAB ve maya sayısı üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla hem yaş ekşi hamurlarda hem de toz ekşi hamurlarda LAB ve maya sayımları gerçekleştirilmiştir. Çizelge 2'de görüldüğü gibi Spontan fermantasyon yöntemiyle üretilen yaş ekşi hamurlardaki LAB sayısı 9.30 log KOB/g, etüvde 7.70 log KOB/g, liyofilizatörde dondurarak kurutmada 8.60 log KOB/g, püskürtmeli kurutma da ise 9.70 log KOB/g olarak tespit edilmiştir. Yaş ekşi hamurda bu sonuçlara göre püskürtmeli kurutucuda kurutma

LAB sayısında önemli bir etki oluşturmazken liyofilizatör ve etüvde 1 log KOB/g düzeyinde azalma belirlenmiştir. Benzer durum starter fermantasyon yöntemi ile üretilen ekşi hamurlar için de geçerlidir. Maya sonuçları incelendiğinde mikrofloranın en az püskürtmeli kurutucudan etkilendiği tespit edilmiştir. Özellikle vakum altında dondurarak kurutma işleminin yapıldığı liyofilizatör koşullarına mevcut maya mikroflorasının dayanım gösteremeyerek <2 log KOB/g düzeyine düştüğü tespit edilmiştir. Diğer yöntemlerde 1 log KOB/g düzeyinde azalma belirlenmiştir.

Çizelge 2. Kurutma öncesi, kurutma sonrası ve 6 aylık depolama sonu LAB ve maya sayım sonuçları (log KOB/g)

Table 2. LAB and yeast count results before drying, after drying and after 6 months storage (log CFU/g)

Fermantasyon yöntemi <i>Fermentation method</i>	Kurutma yöntemi <i>Drying method</i>	Kurutma sonrası <i>After drying</i>		Altı aylık depolama sonrası <i>After six months storage</i>		
		LAB	Maya <i>Yeast</i>	LAB	Maya <i>Yeast</i>	
SPF	Yaş ekşi hamur	9.30±0.42 ^a	3.48±0.14 ^a	-	-	
	K _P	9.70±0.37 ^a	3.26±0.16 ^a	6.48±0.18 ^a	3.08±0.06 ^a	
	Kuru	K _L	8.60±0.12 ^{ab}	<2 ^c	5.38±0.13 ^{bc}	<2 ^c
	K _E	7.70±0.27 ^b	2.30±0.12 ^b	5.90±0.09 ^{ab}	<2 ^c	
STF	Yaş ekşi hamur	8.48±0.10 ^{ab}	3.30±0.11 ^a	-	-	
	K _P	9.60±0.19 ^a	3.60±0.25 ^a	5.88±0.11 ^{ab}	3.18±0.10 ^a	
	Kuru	K _L	8.30±0.23 ^{ab}	<2 ^c	6.30±0.07 ^a	<2 ^c
	K _E	7.48±0.32 ^b	2.30±0.09 ^b	5.11±0.05 ^c	2.30±0.11 ^b	

SPF: Spontan fermantasyon, STF: Starter (LAB) ilaveli fermantasyon

K_P: Püskürtmeli kurutma, K_L: Liyofilizasyon, K_E: Etüvde kurutma

a-c: Aynı sütündeki birbirinden farklı harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($p < 0.05$) olduğunu göstermektedir.

SPF: Spontaneous fermentation; STF: Starter (LAB), lactic acid bacteria added fermentation

K_P: Spray drying, K_L: Freeze drying, K_E: Drying in oven

a-c: Means with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$)

Elde edilen toz ekşi hamurlar ağzı kapalı olarak cam kavanozlarda, buzdolabında +12 C'de 6 ay süresince depolanmışlardır. Bu süre sonunda LAB

ve maya sayımları tekrar yapılmıştır (Çizelge 2). Yapılan depolama sonrası LAB'nin ilk yapılan sayıma göre 2-4 log KOB/g düzeyinde azaldığı

tespit edilmiştir. Her iki fermantasyon türünde de püskürtmeli kurutucu ile kurutulan numunenin mayalarında raf ömrü sonunda önemli bir değişim olmadığı ($p>0.05$) belirlenmiştir. Her iki fermantasyon yöntemi için etüvde kurutuma işlemi LAB'nin sayım sonuçlarında istatistiki açıdan önemli fark meydana ($p<0.05$) getirmiştir. LAB'nin ısıya hassas bakteriler olduğundan, uzun süre (7 ± 1 saat) etüvde kurutma bakterilerin canlılığını olumsuz yönde etkilemiştir. Liyofilizatörde kurutma yönteminde başta olduğu gibi 6 ay sonra da maya aktivitesi <2 log KOB/g olarak tespit edilmiştir. Mayaların ekşi hamurda

LAB ile beraber bulunduğu ve maya/LAB oranının genellikle 1/100 olduğu bildirilmektedir (Gobbetti vd., 1994). Toz forma getirme sırasında mayaların da proses koşullarından etkilendiği, özellikle dondurarak kurutma uygulanan liyofilizatör koşullarından daha fazla etkilendiği tespit edilmiştir. Yaş ve toz ekşi hamur, maya sayım sonuçları arasındaki fark istatistiki olarak önemli ($p<0.05$) bulunmuştur.

Ekmek Örneklerinin pH ve TTA Değerleri
Ekmek örneklerine ait pH ve TTA sonuçları Çizelge 3'te verilmiştir.

Çizelge 3. Ekmeklere ait pH ve TTA değerleri
Table 3. PH and TTA values of breads

Fermantasyon yöntemi <i>Fermentation method</i>	Kurutma yöntemi <i>Drying method</i>	pH			TTA		
		Kullanım oranı (%) <i>Usage rate (%)</i>			Kullanım oranı (%) <i>Usage rate (%)</i>		
		3	6	12	3	6	12
SPF	K _P	5.69±0.00 ^c	5.65±0.02 ^{bc}	5.54±0.02 ^b	3.81±0.03 ^{bc}	4.30±0.18 ^b	5.22±0.08 ^a
	K _L	5.83±0.00 ^b	5.67±0.02 ^{bc}	5.53±0.03 ^b	3.72±0.11 ^c	4.61±0.12 ^{ab}	5.32±0.05 ^a
	K _E	5.78±0.04 ^{bc}	5.70±0.00 ^b	5.52±0.03 ^b	3.82±0.00 ^{bc}	4.42±0.17 ^{ab}	5.30±0.03 ^a
STF	K _P	5.70±0.03 ^c	5.53±0.01 ^d	5.42±0.00 ^{bc}	4.24±0.06 ^{ab}	4.50±0.10 ^{ab}	5.53±0.06 ^a
	K _L	5.71±0.01 ^c	5.62±0.01 ^c	5.42±0.04 ^{bc}	4.63±0.05 ^a	5.12±0.10 ^a	5.51±0.11 ^a
	K _E	5.80±0.02 ^{bc}	5.66±0.00 ^{bc}	5.36±0.01 ^c	4.32±0.04 ^a	4.53±0.14 ^{ab}	5.37±0.05 ^a
Kontrol		6.01±0.01 ^a	6.01±0.01 ^a	6.01±0.01 ^a	2.90±0.17 ^d	2.90±0.17 ^c	2.90±0.17 ^b

SPF: Spontan fermantasyon, STF: Starter (LAB) ilaveli fermantasyon

K_P: Püskürtmeli kurutma, K_L: Liyofilizasyon, K_E: Etüvde kurutma

a-d: Aynı sütundaki birbirinden farklı harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($p<0.05$) olduğunu göstermektedir.

SPF: *Spontaneous fermentation*; STF: *Starter (LAB) added fermentation*

K_P: *Spray drying*, K_L: *Freeze drying*, K_E: *Drying in oven*

a-d: Means with different superscripts in the same column are significantly different ($p<0.05$)

Aynı konsantrasyonda ekşi hamur tozu kullanılan ekmeklerin pH ve TTA değerleri ile kontrol ekmeği arasındaki fark istatistiki açıdan önemli ($p<0.05$) bulunmuştur. Kullanım oranına bağlı olarak ekşi hamur tozu kullanımı da, kontrol ekmeğine göre pH'yı düşürmüştü ve TTA'ni arttırmıştır. Ekşi hamur tozlarının pH değerleri <4.5 düzeyindedir. Mevcut asitlik düzeyleri, katıldıkları ekmek hamurunun asitlik düzeyini de etkilemiştir. Fermantasyon yöntemleri açısından incelendiğinde ise SPF ile üretilen toz ekşi hamur

kullanılan ekmeklerin pH değerleri STF ile üretilen toz ekşi hamur kullanılan ekmeklere göre daha yüksektir. Bu durumun STF'da starter olarak kullanılan *Lb. plantarum* ve *Lb. brevis*'in heterofermentatif LAB olmaları (Corsetti ve Settanni, 2007) ve metabolit olarak laktik asitin yanı sıra asetik asit de üretmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Kurutma yöntemleri açısından ise belirgin bir fark elde edilememiştir.

Ekmek Örneklerinde Raf Ömrü Süresince Küf Gelişimi

Ekmek numunelerinin oda koşullarında raf ömrü süresince küflenme durumları yayma sayım

yöntemi ile belirlenmiştir. Ekmeklerin 0., 1., 3., 5., 7., 9. ve 11. günlerde küflenme durumları tespit edilmiş ve sonuçlar Çizelge 4'te verilmiştir.

Çizelge 4. Ekmeklerde raf ömrü süresince küf gelişimi (log KOB/g)
Table 4. Mold growth in breads during shelf life (log CFU/g)

Kullanım Oranı % Usage Rate %	Fermantasyon yöntemi Fermentation method	Kurutma yöntemi Drying method	Gün Day						
			0	1	3	5	7	9	11
3	SPF	K _P	-	-	-	+	+	+	+
		K _L	-	-	-	+	+	+	+
		K _E	-	-	-	+	+	+	+
	STF	K _P	-	-	-	-	+	+	+
		K _L	-	-	-	+	+	+	+
		K _E	-	-	-	+	+	+	+
6	SPF	K _P	-	-	-	-	+	+	+
		K _L	-	-	-	+	+	+	+
		K _E	-	-	-	-	-	+	+
	STF	K _P	-	-	-	+	+	+	+
		K _L	-	-	-	+	+	+	+
		K _E	-	-	-	-	-	+	+
12	SPF	K _P	-	-	-	-	-	-	+
		K _L	-	-	-	-	+	+	+
		K _E	-	-	-	-	-	+	+
	STF	K _P	-	-	-	-	+	+	+
		K _L	-	-	-	-	+	+	+
		K _E	-	-	-	-	-	+	+
Kontrol			-	-	-	-	+	+	+

SPF: Spontan fermantasyon, STF: Starter (LAB) ilaveli fermantasyon

K_P: Püskürtmeli kurutma, K_L: Liyofilizasyon, K_E: Etüvde kurutma

*- : Gelişme gözlenmemiştir, +: Gelişme gözlenmiştir

SPF: Spontaneous fermentation; STF: Starter (LAB) added fermentation

K_P: Spray drying, K_L: Freeze drying, K_E: Drying in oven

*- : No growth observed, +: Growth observed

Genel olarak ekmeklerde ilk 3 günlük raf ömrü sürecinde herhangi bir küflenme gözlenmemiştir. Kontrol ekmeğinde, 5. günden itibaren küf tespit edilmiştir. Yüzde 3 ekşi hamur tozu kullanılan ekmeklerin raf ömründe de önemli bir iyileşme tespit edilmeyen STF/K_P kombinasyonunda en iyi sonuç alınmış ve 5. günde küf tespit edilmemiştir.

Genel olarak %6 ekşi hamur tozu kullanımının küf gelişimi üzerinde etkili olduğu, özellikle SPF'da etüv ve püskürtmeli kurutucunun, STF'da ise etüvde kurutmanın etkili olduğu belirlenmiştir.

Yüzde 12 ekşi hamur tozu kullanımının diğer konsantrasyonlara göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu konsantrasyonda en iyi sonuç SPF/K_P kombinasyonunda alınmıştır. Ancak genel olarak ekmeklerin en fazla ilk 5 günlük

süreçte tüketileceği göz önünde bulundurulursa ekşi hamur tozu kullanımının bu konuda etkili olduğu söylenebilir. Starter olarak LAB kullanılan veya spontan ekşi hamur ilaveli ekmeklerde küf gelişiminin yavaşlatılarak mikrobiyal raf ömrünün uzatıldığı daha önceki çalışmalarda da belirtilmektedir (Dal Bellovd., 2007). LAB'nin en önemli özelliği, laktik asit üretimidir (Galle ve Arendt, 2014). Özellikle de heterofermantatif *Lactobacillus* spp. ile yapılan ekşi hamurlarda, homofermantatif türlere göre laktik asitin yanı sıra asetik asit gibi organik asitler de meydana geldiğinden daha yüksek asitlik ve daha düşük pH değerleri sağlandığı bildirilmektedir (De Vuyst ve Neysens, 2005). Bu da pH'ı düşürmekte ve gıdaya kontamine olan bozulma mikroorganizmaları üzerinde engelleyici bir etki yapmaktadır. Organik asit üretimi ve bunların koruyucu etkisi yanında, LAB çok sayıda metabolik aktiviteye sahiptir. Bu metabolitler bakteriyosinler de dâhil olmak üzere, LAB'ne eşlik eden bazı gıda kaynaklı patojenler ve bozulma mikroorganizmalarını inhibe edebilen antimikrobiyal bileşiklere kadar uzanır (Ganzle, 2009).

Yapılan bir çalışmada ekşi hamur kullanım oranının, küf gelişimine karşı dirençte önemli bir faktör olduğu ve % 50 kullanım oranının en etkili sonucu verdiği belirtilmiştir. Bu durumda ekmeğin son pH'sınının 4.3-5.2, ekmeğin küfe dayanım süresinin ise 8-12 gün arasında olduğu belirtilmektedir (Plessas vd., 2008). Bu çalışmada ise ekşi hamurlar toz formda ve en yüksek %12 oranında kullanılmıştır. Yapım tekniği açısından HV=200 olduğu göz önünde bulundurulursa, kurutulmamış olsaydı yaş ağırlık üzerinden yaklaşık %24 oranında kullanılmış olacaktı. Daha yüksek oranda kullanılması durumunda küflenme açısından daha iyi sonuç alınacağı düşünülebilir. Günümüzde Trabzon Vakfı Kebir ekmeği, Gümüşhane Araköy ekmeği gibi kütle fermantasyonu %100 ekşi hamurla ve 6-12 saatte gerçekleştirilen ekmekler de mevcuttur (Kotancılar vd., 2008; Ertop ve Hendek Ertop, 2013)

TARTIŞMA

Bu çalışmanın amacı iki tip fermantasyon yöntemi ile üretilen ekşi hamurların toz forma getirilebilirliğini ve kullanılacak kurutma

yöntemlerinin mikrofloranın canlılığı üzerindeki etkilerini belirlemek ve ekmeğe kullanılabilirliğini tespit etmektir. Alınan sonuçlar toz formda üretimin mümkün olduğunu ortaya çıkarmıştır. Uygulanan kurutma prosesleri doğal olarak mikroflorada azalmaya neden olmakla birlikte, bu düzey starterlerin çoğalabilmesi için genel kabul görmüş 5-7 log KOB/g düzeyinin altına düşmemiştir. Kurutulmuş toz hamurlar ekşi hamurdan beklenen asidik yapılarını korumuşlardır ve bu etkinliklerini ekmeğe kadar taşıyabilmişlerdir. Ekmeğin örnekleri ekşi hamur kullanılmayan kontrol ekmeğine karşı raf ömrü süresince küflenme gelişimi açısından karşılaştırıldığında % 12 kullanım oranında ekşi hamur tozlarının etkileri belirgin olarak görülmüş, bu oranda en iyi sonuç SPF/K_P kombinasyonu ile alınmıştır. Toz ekşi hamurlar raf ömrü olarak öngörülen 6 aylık raf ömrü içerisinde aerobik koşullarda, 12 °C'de depolanmışlar ve mikroflorada 2-4 log KOB/g düzeyinde canlılık kaybına uğramışlardır. LAB'nin mikroaerofilik oldukları yani oksijeni minimum düzeyde talep ettikleri göz önünde bulundurulursa canlılık kaybını en aza indirebilecek, modifiye atmosfer paketlenme denemelerine dayanan raf ömrü çalışmaları da yapılabilir. Bu çalışmada başlangıç aşaması olarak %3, %6, %12 kullanım oranları denenmiş ve etkinlik açısından sonuç alınabilmiştir. Ancak bilimsel açıdan kullanım miktarına dair bir optimizasyon çalışması yapılması, en iyi ekmeğin üretilmesi için yaş/toz maya ile toz ekşi hamur kullanım miktarının formülde optimize edilmesi gerekir. Başlangıç niteliğindeki bu çalışma, mikrobiyotaya ve toz formun raf ömrüne dair sonraki çalışmalarla zenginleştirilme potansiyeline sahip olmakla birlikte, günümüz tüketicisinin katkısız ve doğal ürünler beklentisine de iyi bir alternatif olma niteliği taşımaktadır.

Teşekkür

Bu çalışma Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı-Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) tarafından desteklenen 2013-ARGE/8 numaralı projenin sonuçlarından yararlanarak hazırlanmıştır. Katkılarından dolayı TAGEM'e ve Gümüşhane Üniversitesine teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

- Akgün, F.B. (2007). Ekşi hamur tozu eldesi ve ekmeğin üretiminde kullanılabilme olanakları (Doktora tezi) Pamukkale Üniversitesi, Denizli
- Chavan, R.S., Chavan, S.R. (2011). Sourdough Technology: A Traditional way for whole some foods: A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 10: 170-183.
- Corsetti, A., Settanni, L. (2007). Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Res Int*, 40: 539–558.
- Czerny, M., Schieberle, P. (2002) Important aroma compounds in freshly ground wholemeal and white wheat flour - Identification and quantitative changes during sourdough fermentation. *J Agri Food Chem*, 50: 6835-6840.
- Dal Bello, F., Clarke, C.I., Ryan, L.A.M., Ulmera, H., Schober, T.J., Strom, K., Sjogrend, J., Sinderen, D., Schnurer, J., Arendt, E.K. (2007). Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. *J Cereal Sci*, 45: 309–318.
- De Vuyst, L., Neysens, P. (2005). The sourdough microflora: Biodiversity and metabolic interactions. *Trends Food Sci Technol*, 16: 43-56.
- De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G., Daniel, H.M., Weckx, S. (2014). Microbial ecology of sourdough fermentations: Diverse or uniform?. *Food Microbiol*, 37:11-29.
- Delcour, J.A., Hoseney, R.C. (2010). Principles of cereal science and technology. St. Paul, MN, USA: AACC International.
- Ertop, U., Hendek Ertop M. (2013). The product properties and production methods of traditional Araköy bread. The 2nd International Symposium on Traditional Foods from Adriatic to Caucasus, 24-26 Ekim, s.241, Makedonya.
- Galle, S., Arendt, E.K. (2014). Exopolysaccharides from sourdough lactic acid bacteria. A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 54: 891-901
- Ganzle, M.G. (2009). From gene to function: Metabolic traits of starter cultures for improved quality of cereal foods. *Int J Food Microbiol*, 134: 29–36.
- Ghandi, A., Powell, B., Chen, X.D., Adhikari, B. (2012). The effect of dryer inlet and outlet air temperatures and protectant solids on the survival of *Lactococcus lactis* during spray drying. *Drying Technol*, 30(14): 1649-1657.
- Gobbetti, M., Corsetti, A., Rossi, J. (1994). The sourdough microflora Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of amino acids. *J Microbiol Biotechnol*, 10: 275-279.
- Golshan T.A., Peighambaroust, S., Behnam, F., Bahrami, A., Aghagholizadeh, R., Ghamari, M. (2013). Effects of spray-dried sourdough on flour characteristics and rheological properties of dough. *Czech J Food Sci*, 31: 361–367.
- Göçmen, D., Gürbüz, O., Kumral, A.Y., Dağdelen, A.F., Şahin, İ. (2007). The effects of wheat sourdough on glutenin patterns, dough rheology and bread properties. *Eur Food Res Technol*, 225: 821-830.
- Gürgün, V., Halkman, K. (1990). Mikrobiyolojide sayım yöntemleri, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No:7, Ankara.
- Hammes, W.P., Gänzle, M.G. (1998). Sourdough breads and related products. In: Wood, B.J.B. (Ed.), *Microbiology of Fermented Food*. Chapman and Hall London pp. 199-216.
- Katina, K., Heinio, R.L., Autio, K., Poutanen, K. (2006). Optimization of sourdough process for improved sensory profile and texture of wheat bread. *Food Sci Technol*, 39: 1189-1202.
- Keswet, L.M., Ayo, J.A., Bello, C.B. (2003). The effect of four Nigerian wheat flours on the loaf volume and sensory quality of bread. *Nutr Food Sci*, 33: 34 – 37
- Khanjani, R., Razavi, S.H., Eyvazzadeh, O. (2015). The effect of adding spray dried lactic acid sourdough on quality and organoleptic properties of fermi macaroni. *Int J Farm Allied Sci*, 4 (5): 477-481.

- Kirchhoff, E., Schieberle, P. (2001). Determination of key aroma compounds in the crumb of a three-stage sourdough rye bread by stable isotope dilution assays and sensory studies. *J Agric Food Chem*, 49: 4304–4311
- Koç, B., Sakin, M., Yilmazer Balkır P., Kaymak Ertekin, F. (2010). Spray drying of yogurt: Optimization of process conditions for improving viability and other quality attributes *Drying Technol*, 28: 495–507
- Kotancılar, H.G., Gerçekaslan, K.E., Karaoğlu, M.M. (2008). Effects of loaf weight and storage time on the qualitative properties of white and traditional Vakfikebir breads, *Türk J Agric For*, 32: 459-467.
- Martinez Anaya, M.A. (1996). Enzymes and bread flavour. *J Agricu Food Chem*, 44: 2470-2480
- Messens, W., De Vuyst, L. (2002). Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs- A Review. *Int J Food Microbiol*, 72: 31-43.
- Plessas, P., Bekatorou, A., Gallanagh, J., Nigam, P., Koutinas, A.A., Psarianos, C. (2008). Evolution of aroma volatiles during storage of sourdough breads made by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus* and *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* or *Lactobacillus helveticus*, *Food Chem*, 107: 883–889.
- Randazzo, C.L., Heilig, H., Resestuccia, C., Giudici, P., Caggia, C. (2005). Bacterial population in traditional sourdough evaluated by molecular methods. *J Appl Microbiol*, 99: 251-258.
- Rizzello, C.G., Montemurro, M., Lorusso, A. (2016). Use of sourdough made with quinoa (*Chenopodium quinoa*) our and autochthonous selected lactic acid bacteria for enhancing the nutritional, textural and sensory features of white bread. *Food Microbiol*, 56: 1-13.
- Voge, R.F., Pavlovic, M., Ehrmann, M.A., Wiezer, A., Liesegang, H., Offschanka, S., Voget, S., Angelov, A., Bocker, G., Liebl, W. (2011). Genomic analysis reveals *Lactobacillus sanfranciscensis* as a stable element in traditional sourdoughs. *Microb Cell Fact*, 10 (1):1-11.
- Wu, C., Liu, R., Huang, W., Rayas-Duarte, P., WangF., Yao, Y. (2012). Effect of sourdough fermentation on the quality of Chinese Northern-style steamed breads. *J Cereal Sci*, 56:127-133.

KOMAGATAEIBACTER HANSENII GA2016 İLE BAKTERİYEL SELÜLOZ ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

Melih Güzel^{1*}, Özlem Akpınar²

¹Gümüşhane Üniversitesi, Şiran Mustafa Beyaz Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Gümüşhane, Türkiye
²Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Tokat, Türkiye

Geliş / *Received*: 13.04.2017; Kabul / *Accepted*: 16.09.2017; Online baskı / *Published online*: 15.11.2017

Güzel, M., Akpınar, Ö. (2017). *Komagataeibacter hansenii* GA2016 ile bakteriyel selüloz üretimi ve karakterizasyonu. *GIDA* (2017) 42 (5): 620-633 doi: 10.15237/gida.GD17040

ÖZ

Selüloz, glikopiranoz birimlerinin β -1,4 bağları ile bağlanması ile oluşan ve dünyada en yaygın olarak bulunan polimerdir. Çeşitli mikroorganizmalardan biyosentez yolu ile elde edilen selüloza bakteriyel selüloz (BS) adı verilmektedir. Bu çalışmada, evsel sirkeden selüloz üreticisi bakteri izole edilmiş ve *Komagataeibacter hansenii* GA2016 olarak tanımlanmıştır. BS üreticisi mikroorganizma ile BS üretilmiş ve üretilen BS'nin fiziksel, kimyasal, yapısal ve termal özellikleri belirlenmiştir. *Komagataeibacter hansenii* GA2016'nın yüksek derecede kristaliniteye sahip BS ürettiği bulunmuştur. BS'nin FTIR spektrumunun bitkisel selüloz spektrumuna benzer, ortalama lif çapının bitkisel selülozdan yaklaşık 120 kat daha ince ve termal kararlılığının bitkisel selüloza kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, *Komagataeibacter hansenii* GA2016'nın yüksek oranda ve birçok polimere göre üstün fizikokimyasal özelliklere sahip BS ürettiği, dolayısıyla gıda sanayinde BS üretiminde kullanılabileceği gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Bakteriyel selüloz, karakterizasyon, *Komagataeibacter hansenii*

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIAL CELLULOSE WITH *KOMAGATAEIBACTER HANSENII* GA2016

ABSTRACT

Cellulose is the most common polymer in the world, formed by β -1,4 linked glucopyranose units. Cellulose that is produced by various microorganisms via biosynthesis is called bacterial cellulose (BC). In this study, the cellulose-producing bacteria was isolated from the homemade apple vinegar and identified as *Komagataeibacter hansenii* GA2016. BC was produced with the BC producer microorganism and the physical, chemical, structural and thermal properties of the produced BC were determined. It was found that *Komagataeibacter hansenii* GA2016 produced highly crystalline BC. The FTIR spectrum of the BC was similar to the plant cellulose spectrum, its fiber diameter was about 120 times thinner than plant cellulose and the thermal stability was higher than that of plant cellulose. As a result of this study, it has been shown that *Komagataeibacter hansenii* GA2016 produces BC with high yield and superior physicochemical properties compared to many polymers, and thus it can be used for the production of BC in food industry.

Key words: Bacterial cellulose, characterization, *Komagataeibacter hansenii*

* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ melihguzel010@hotmail.com

☎ (+90) 456 233 1000 / 3608

☎ (+90) 456 511 8679

GİRİŞ

Selüloz, glikopiranoz birimlerinin β -1,4 bağları ile bağlanması ile oluşan ve son yüzyılda yoğun bir şekilde incelenmiş, dünyada en yaygın bulunan polimerdir (Klemm vd., 2005). Hemen hemen tüm bitkilerin iskelet yapısında hemiselüloz ve lignin ile birlikte (%40-60 selüloz, %20-40 hemiselüloz ve %10-25 lignin) bulunmaktadır (Lynd vd., 2002). Bitkilerin yanında bazı bakteriler tarafından da üretilmektedir. Bakteriyel selüloz (BS) olarak adlandırılan bu tip selülozlar, bakteri metabolizmasının ilk ürünü ve hücre dışı bir polimer olup hücreyi koruyucu olarak görev yapmaktadır (Klemm vd., 2005; Lisdiyanti vd., 2006; Perez ve Samain, 2010). BS'nin bakterileri oksijen basıncının yüksek olduğu yüzeye konumlandığı (Iguchi vd., 2000), viskozite ve hidrofilik özellikleri nedeniyle kötü çevre koşullarına (su miktarında azalma, pH değişimleri, patojenik mikroorganizmalar vb.) (Bielecki vd., 2000) ve UV ışınına karşı koruduğu (Ross vd., 1991) belirtilmektedir. BS'nin; bitki orijinli selüloza göre yüksek su tutma kapasitesi (Saibuatong ve Phisalaphong, 2010), benzersiz nano yapı (Chen vd., 2010), yüksek derecede polimerizasyon (Dahman vd., 2010), yüksek mekanik mukavemet (Castro vd., 2011), yüksek kristalinite (Yamanaka ve Sugiyama, 2000; Keshk, 2014) yüksek gerilme direnci, elastikiyet (Watanabe vd., 1998; Yamanaka ve Sugiyama, 2000) gibi birçok üstün özellikleri bulunmaktadır.

BS; *Komagataeibacter* (eski adıyla *Gluconacetobacter*), *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Salmonella* ve *Escherichia* gibi çeşitli bakteri türleri tarafından üretilmektedir (Brown, 2004; Shoda ve Sugano, 2005; Morgan vd., 2013; Huang vd., 2014; Lin vd., 2016). *Komagataeibacter* grubundaki *K. xylinus* (*Acetobacter xylinum*, *Gluconacetobacter xylinus*), *K. hansenii*, *K. europaeus*, *K. oboediens* ve *K. intermedius* en iyi BS üreticisi olarak bilinir (Drysdale ve Fleet, 1988; Yamada, 2000; Akoğlu vd., 2010; Karahan vd. 2011; Ha ve Park, 2012; Lin vd., 2016).

Selüloz gibi insan vücudunda sindirilemeyen (Lin ve Lin, 2004) ve serum trigliserid ve toplam kolesterol seviyesini azaltabilen (Stephens vd., 1990) BS, geleneksel olarak Güney Doğu Asya'da

bazı yerel gıdalarda (Nata de Cocco: jelatin küpü olarak servis edilen üretilen yerel bir gıda) (Shi vd., 2014) ve Japonya'da fonksiyonel içeceklerin (Kombucha ya da Mançurya çayı) (Ng vd., 2004) üretiminde kullanılmaktadır. BS gıda endüstrisi dışında, ilaç, biyoteknoloji, biyomedikal, kozmetik, kağıt ve elektronik alanlarında da kullanımı giderek artmaktadır (Zhu vd., 2010; Shah vd., 2013; Çakar vd., 2014; Shi vd., 2014).

Bu çalışmanın amacı, evsel olarak üretilen sirkeden, BS üreten bakteriyi izole edip tanımlamak ve tanımlanan potansiyel BS üreticisi mikroorganizma ile BS üreterek, üretilen BS'nin fiziksel, kimyasal, yapısal ve termal özelliklerini belirlemektir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Bakteri izolasyonu ve tanımlanması

Evsel olarak üretilen elma sirketi (Ereğli, Konya) BS üreten bakteriyi izole etmek için kullanılmıştır. Sirkeden 1 mL'lik numuneler, Hestrin-Schramm (HS) besiyerine (20 g/L glikoz, 5 g/L maya özütü, 5 g/L pepton, 2.7 g/L Na₂PO₄ ve 1.15 g/L sitrik asit) aktarılmış, 30°C'de 18-24 saat süre ile selüloz üreticisi bakterilerin ön çoğaltması yapılmıştır (Schramm ve Hestrin, 1954). Mikrobiyal gelişme durumunda kültürlerin HS-agar (20 g/L glikoz, 5 g/L maya özütü, 5 g/L pepton, 2.7 g/L Na₂PO₄, 1.15 g/L sitrik asit ve 15 g/L agar) plakaları üzerine ekimi gerçekleştirilmiş ve 30°C'de inkübe edilmiştir (Aydın ve Aksoy, 2013). Mikroorganizmaların morfolojisi ışık mikroskopu ile incelenmiş, Gram boyama ile Gram negatif suşlar seçilmiş, beyaz-krem tonundaki mukoz yapıdaki kolonilerin, HS agara birden fazla ekimleri gerçekleştirilerek, mikroorganizmanın saflaştırılması sağlanmıştır. İzole edilen selüloz üreticisi bakteri HS agarda 4°C'de muhafaza edilmiş ve 16S rRNA dizi analizine göre (Ref-Gen, ODTÜ Teknokent/Ankara) tanımlanması yapılmıştır. Genomik DNA ekstraksiyonu QIAGEN DNeasy Kan ve Doku Kiti (Almanya) kullanılarak izole edilmiş ve 27F ve 1492R, 16S rRNA üniversal primerleri kullanılmış olup 94°C'de 5 dakika + 30X (94 °C'de 30 saniye + 55 °C'de 30 saniye + 72 °C'de 45 saniye) + 72 °C'de 10 dakika PCR koşullarında çalışılmıştır. Elde edilen diziler BLAST araştırması (Blast, 2017)

kullanılarak GenBank veri tabanında mevcut olanlar ile karşılaştırılmış ve en yakın türlerin 16S rRNA gen dizileri veri tabanından alınmıştır.

BS üretimi

HS-agara izolasyonu yapılan BS üreticisi mikroorganizma, öncelikle 10 mL HS besiyerine ekilerek statik koşullarda 48 saat 30°C'de inkübe edilmiştir. Buradan alınan 1 mL'lik örnekler, 1000 mL'lik erlenlerde bulunan 500 mL HS besiyerlerine ekilmiştir. Selüloz üretimine, 28-32°C'de statik koşullarda 21 gün boyunca ve yüzeyde oluşan BS tabana çökene kadar devam edilmiştir. Çöken BS, besiyerinden alınarak 4000xg'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve %4'lük NaOH çözeltisinde 30 dakika kaynayan su içerisinde bekletilmiştir (Son vd., 2002). BS'den NaOH'ın uzaklaşması için BS'ye 5 defa beşer dakika saf su ile durulama işlemi uygulanmış, daha sonra %2 asetik asit çözeltisi içerisinde 15 dakika bekletilmiş ve bu işlemi takiben de saf su ile nötralize edilmiştir. Nötralize edilen BS 50 °C'de etüvde 48 saat kurutulmuş ve BS üretim oranı; bir litre HS besiyerinde üretilen kurutulmuş BS'nin ağırlığı olarak verilmiştir (Gomes vd., 2013). Sonuçlar 3 paralelin ortalaması alınarak, ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

BS'nin nem, kül içeriği ve sıvı tutma kapasitesinin belirlenmesi

Kurutulmuş BS'nin nem ve kül içeriği gravimetrik olarak (AOAC, 1989) belirlenmiştir. Sıvı tutma kapasitesinin belirlenmesi için, 1 g BS, 40'ar g su, aseton, dimetil sülfoksit ve asetik asit ile karıştırılmış, oluşan süspansiyon 2 saat süre ile bekletilmiş, daha sonra 30 dakika boyunca 3500 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılarak ıslak numune tartılmıştır. Sonuçlar, sıvı tutma kapasitesi (%) olarak ifade edilmiş olup örneklerin sıvı tutma kapasiteleri eşitlik 1'e göre hesaplanmıştır (Tappi, 1991). Tüm sonuçlar 3 paralelin ortalaması alınarak, ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

$$\text{Sıvı Tutma Kapasitesi (\%)} = (W_L / W_{BS}) \times 100 \quad (1)$$

Bu bağıntıda; W_L : sıvı ağırlığını (g), W_{BS} : BS miktarını (g) ifade etmektedir.

Fourier transform infrared (FTIR) spektroskopisi

BS potasyum bromür (KBr) diskleri haline getirildikten sonra FTIR analizi (800-400 cm^{-1}) Jasco FT/IR-430 spektrofotometre (Japonya) ile gerçekleştirilmiştir.

Termal analiz (TG-DTA)

BS'nin termal özellikleri; 10°C/dak ile 25-650 °C arasında azot ortamında Perkin Elmer Pyris Diamond TG/DTA Termal Analiz Cihazı (ABD) ile belirlenmiştir.

Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi

BS'nin, altın (Au) kaplama uygulandıktan sonra, taramalı elektron mikroskopunda (SEM) görüntüleri alınarak yapısal ve morfolojik özellikleri incelenmiştir. SEM analizleri QUANTA 450 Field Emission Gun (FEG) SEM Yüksek Çözünürlüklü Taramalı Elektron Mikroskobu (ABD) ile gerçekleştirilmiştir.

X-ışını kırınım (XRD) analizi

BS'nin kristalinite derecesinin belirlenmesi için X-ışını kırınım (XRD) analizi Panalytical Empyrean Yüksek Performans Difraktometre Cihazı (Hollanda) ile yapılmıştır. XRD analizlerinde Ni filtreli Cu X-ışın tüplü cihazlar ile 5°/dk ile 2 θ =10°-50° aralığında tarama yapılmıştır. Kristalinite derecesi (%) Curve Fitting metodu ile eşitlik 2'ye göre hesaplanmıştır (Hermans vd., 1948; Fang ve Catchmar, 2014).

$$\text{CrI (\%)} = (A_{\text{cryst}} / A_{\text{total}}) \times 100 \quad (2)$$

Bu bağıntıda; CrI : Kristalinite derecesini (%), A_{cryst} : kristal bölgenin alanını, A_{total} : toplam alanı ifade etmektedir.

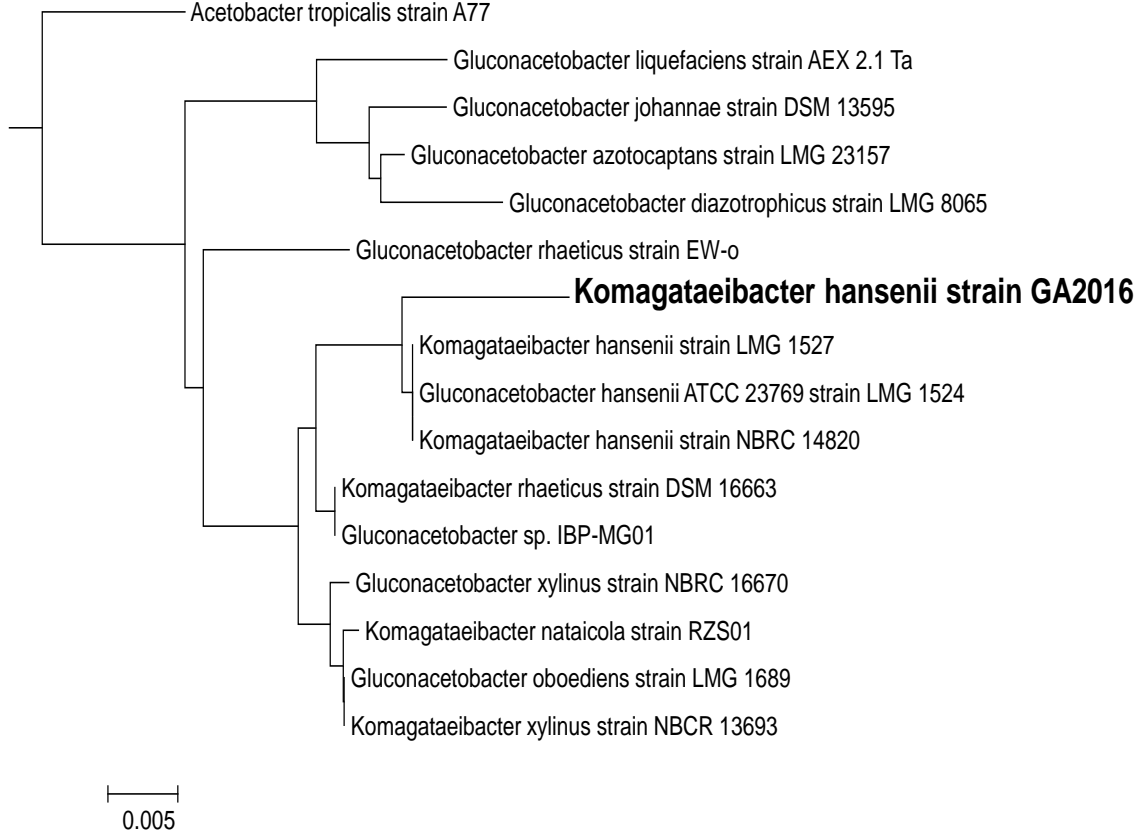
SONUÇ VE TARTIŞMA

Bakteri izolasyonu ve tanımlanması

Evsel sirkeden izole edilen ve BS üretebilme yeteneğine sahip bakterinin gram boyama sonucunda izolatın Gr (-) ve çubuk şeklinde olduğu gözlenmiştir. 16S rRNA dizi analizine göre tanımlanması gerçekleştirilmiş ve izole edilen suş *Komagataeibacter hansenii* LMG 1527 ve NBRC 14820 suşlarına yüksek oranda benzerlik gösterdiğinden, *Komagataeibacter hansenii* GA2016 olarak tanımlanmış ve isimlendirilmiştir. Şekil 1'de 15 farklı suşun 16S rRNA gen dizilerini içeren

filogenetik ağacı gösterilmektedir. Yapılan çalışmalarda *Komagataeibacter hansenii*'nin iyi bir BS üreticisi bakteri olduğu ve BS üretimi amacıyla farklı çalışmalarda kullanıldığı belirlenmiştir (Park vd., 2003a; Park vd., 2003b; Jung vd., 2005; Rani

ve Appaiah, 2013; Aydın ve Aksoy, 2014; Lin vd., 2014; Ko vd., 2015; Lin vd., 2016; Uzyol ve Saçan, 2017).



Şekil 1. *Komagataeibacter hansenii* GA2016 izolatının 16S rRNA dizisi temel alınarak oluşturulan filogenetik ağaç.

Figure 1. Phylogenetic tree of *Komagataeibacter hansenii* GA2016 isolate based on 16S rRNA analysis

Bakteriyel selülozun özellikleri

HS besiyerinde üretilen BS'nin miktarı, nem ve kül içerikleri ile sıvı tutma kapasiteleri Çizelge 1'de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde, bir litre besiyerinden 7.44 g BS üretildiği, üretilen BS'nin nem içeriğinin %10.98 (a/a) ve kül içeriğinin ise %9.43 (a/a) olduğu görülmektedir. BS üretimi; mikroorganizma çeşidi, kültür koşulu, karbon kaynakları ve ortam koşulları gibi pek çok durumdan etkilenmektedir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde farklı mikroorganizmalar, ortam koşulları, karbon kaynakları kullanılarak 0.81-8.79 g/L (Son vd., 2003; Cheng vd., 2009; Neto vd., 2009; Hungund

ve Gupta 2010; Castro vd., 2011, Wee vd., 2011; Gomes vd., 2013) arasında değişen miktarlarda BS üretildiği ancak besiyerine Vitamin C gibi takviyelerin bu miktarı 19.33 g/L'ye (Keshk, 2014) çıkardığı tespit edilmiştir. Sonuçlar karşılaştırıldığında çalışmamızda elde edilen BS miktarının diğer çalışmalara kıyasla (Son vd., 2003; Neto vd., 2009; Hungund ve Gupta, 2010; Castro vd., 2011; Wee vd., 2011; Gomes vd., 2013; Keshk, 2014) yüksek olduğu ve izole edilen *Komagataeibacter hansenii* GA2016 suşunun BS üreticisi olarak kullanım potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir.

Sıvı tutma kapasitesi bir polimerin, viskoz çözelti oluşturmak için sıvıyı absorblamak ve muhafaza etmek ile ilgili bir özelliğidir. Yüksek sıvı tutma kapasitesine sahip bir polimer; kullanıldığı gıdanın hacmini artırabilme, kalorisini ise azaltabilme fonksiyonuna sahiptir. Ayrıca gıdanın tekstür ve viskozitesini doğrudan etkilemekte olup, bu gibi nedenlerle sıvı tutma kapasitesi hem fizyolojik hem de teknolojik açıdan önemli bir özelliktir (Rodriguez vd., 2006). Selüloz, kristal yapısından dolayı organik çözücülerin çoğunda çözünmemektedir (Goh vd., 2012). Bununla birlikte belirli çözücülerde kristal içi ve kristaller arası şişme mümkündür (Mantains vd., 1995). Çalışmamızda elde edilen BS'nin çeşitli sıvıları tutma kapasiteleri belirlenmiş olup, su tutma kapasitesinin %609 olduğu tespit edilmiştir. Diğer sıvıları (aseton, dimetil sülfoksit ve asetik asit) tutma kapasitesinin ise %294-637 arasında değiştiği gözlemlenmiştir (Çizelge 1). Bu

çalışmada üretilen BS'nin sıvı tutma kapasitesi Kambucha çayından üretilen BS'nin ve ticari kristal selülozun farklı sıvıları (su, aseton, dimetil sülfoksit ve asetik asit) tutma kapasiteleri ile ilgili yapılan çalışmadan (Goh vd., 2012) daha yüksek bulunmuştur. Yüksek hidrojen bağlama kapasitesi ve yüksek kohesif enerji yoğunluğuna sahip selülozik liflerinin sudaki şişme gücünün dimetil sülfoksitten daha düşük olmasından (Robertson, 1964) dolayı, bu çalışmada da BS'nin dimetil sülfoksit sıvısını tutma kapasitesinin diğer sıvılara kıyasla daha fazla olduğu bulunmuş ve sonuçların diğer çalışmalarla da (Mantains vd., 1995; Goh vd., 2012) uyumlu olduğu belirlenmiştir. Asetonun hidrojen bağlama kapasitesi, diğer üç organik çözücüye kıyasla daha zayıf olmasından (Goh vd., 2012) dolayı, BS'nin aseton sıvısını tutma kapasitesinin diğer sıvılara kıyasla daha az olduğu görülmektedir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Bakteriyel selülozun fizikokimyasal özellikleri
Table 1. Physicochemical properties of bacterial cellulose

Bakteriyel Selüloz (g/L)	7.44±0.09
Nem İçeriği (% a/a)	10.98±0.05
Kül İçeriği (% a/a)	9.43±0.03
Su Tutma Kapasitesi (% a/a)	609.30±0.90
Aseton Tutma Kapasitesi (% a/a)	294.12±8.31
Dimetil Sülfoksit Tutma Kapasitesi (% a/a)	637.31±10.87
Asetik Asit Tutma Kapasitesi (% a/a)	543.73±19.41

FT-IR analizi

Şekil 2'de BS'nin FTIR spektrumu verilmiş olup, laboratuvarımızda bulunan buğday sapından elde edilen bitkisel selülozun (Erdoğan, 2007) FTIR spektrumu ile karşılaştırılmıştır. FTIR ile, moleküler bağların karakterizasyonu yapılarak; organik bileşiklerin yapılarındaki fonksiyonel gruplar, yapıdaki bağların durumu ve bağlanma yerleri belirlenmektedir (Fabio vd., 2013). Şekil 2'de de görüleceği üzere 800 ve 1200 cm^{-1} dalga aralığında bulunan absorpsiyonlar karbonhidratlar için parmak izi bölgesidir ve bu bantların konumu ve yoğunluğu her polisakkarit için spesifik olup polisakkaritlerde önemli kimyasal grupların tanımlanmasına olanak sağlamaktadır (Nesic vd., 2011; Sivam vd., 2012). Yapılan çalışmalarda BS için karakteristik pik

değerlerinin 3400-3440 cm^{-1} 'de hidroksil grupları (-OH), 2800-2900 cm^{-1} 'de metilen gerilme titreşimini (-CH₂-), 1620-1640 cm^{-1} 'de karboksilik grupların varlığını (COOH), 1420-1440 cm^{-1} 'de karbonil grupların varlığını (C=O), 1160 cm^{-1} 'de C-O-C ve 1040-1068 cm^{-1} 'de şeker halkasının C-O-C ve C-O-H germe titreşimi ifade ettiği belirtilmektedir (Park vd., 2003b; Halib vd., 2012; Gao vd., 2014; Gayathry ve Gopalaswamy, 2014). Bitkisel selülozlar için ise 3350 cm^{-1} ve 3400-3500 cm^{-1} civarında O-H, 2800-2900 cm^{-1} 'de C-H, 1300 cm^{-1} civarı C-H, 1160 cm^{-1} civarı C-O-C ve 1035-1060 cm^{-1} civarında C-O gerilmesinden kaynaklandığı belirtilmektedir (Marchessault ve Sundararajan, 1983; Halib vd., 2012). *Komagataeibacter hansenii* GA2016 ile üretilen BS'nin FTIR spektrumunda literatürde bulunan

değerlere benzer pikler görülmüş ve aynı zamanda bitkisel selülozun FTIR spekturumu ile de uyum içinde olduğu saptanmıştır.

Termogravimetrik analiz

Termogravimetrik analiz (TGA) incelenen maddelerin termokimyasal dönüşüm esnasında yarı kantitatif olarak ısıl bozunma süreçleri hakkında bilgi vermektedir (Aydıncak, 2012). BS'nin sıcaklık değişimine karşı kütledeki azalma ölçülmüş ve termogravimetrik ve diferansiyel termal analiz eğrisi bitkisel selüloz için elde edilen eğri ile beraber Şekil 3'te ve TGA değerlerine ilişkin sıcaklık ve kütle kaybı (%) değerleri Çizelge 3'te sunulmuştur. BS'nin sıcaklıkla bozunma eğrisinin bitkisel selüloz ile benzer olduğu ve eğrilerin literatürde bulunan diğer çalışmalarda da görülen (Cheng vd., 2009; Martins vd., 2009; De Souza vd. 2013; Mohammadkazemi vd., 2015; Schröpfer vd., 2015) 0-100 °C, 200-250 °C ve 360-390 °C olmak üzere üç bölgeye sahip olduğu görülmüştür (Şekil 3). İlk bölgede sıcaklık artışına bağlı olarak örneklerde absorbe suyun buharlaşması nedeniyle hafif bir ağırlık kaybı meydana gelmiştir (Yang ve Chen, 2005; Cheng vd., 2009; De Souza vd. 2013; Mohammadkazemi vd., 2015). 200-250 °C arasındaki sıcaklıklarda ikinci bir ağırlık kaybı, hidroksil ve metil hidroksil gruplar gibi küçük molekül ağırlıklı parçaların uzaklaşmasından kaynaklanmaktadır (Yang ve Chen, 2005; Cheng vd., 2009; Mohammadkazemi vd., 2015). 360-390°C arasında meydana gelen önemli ağırlık kaybı (%70-80) ise polimerik zincirler ve pıran yapılarının bozunumundan ileri gelmektedir (Cheng vd., 2009; Vazquez vd., 2013).

Termal bozunum davranışları liflerin moleküler ağırlığı, kristalinitesi ve yönelimi gibi bazı yapısal parametrelerden etkilenmektedir (Barud vd., 2007; Vazquez vd., 2013). Türevsel termogravimetri (DTG) eğrisi üzerindeki en büyük pik (DTG_{max}), bozunma esnasında en keskin ağırlık kaybı eğimini (%/°C) ifade etmektedir. Bu değer BS için 333 °C, bitkisel selüloz için ise 335 °C olarak bulunmuştur (Çizelge 2). Daha önceki çalışmalarda, saf selüloz ve Whatman kağıdı için bu değerlerin 330-350°C civarında, Nata de Coco'dan elde edilen BS'nin 330-370 °C arasında, kağıt yapımında kullanılan

Acetobacter xylinum kültüründe üretilen BS'nin 370°C (Halib vd., 2012), ambalaj kağıdı için 350 °C (Soares vd., 1995), arpa sapından elde edilen bitkisel selülozun ise 333 °C (Sun vd., 2005) olduğu belirtilmiştir. Termal bozunum esnasında BS kütlelerinin yarısının kaybolduğu sıcaklık değerini ifade eden T_{%50} değerleri de BS için 342 °C, bitkisel selüloz için 335 °C olarak belirlenmiştir. 650 °C'deki toplam kütle kaybı ise BS ve bitkisel selüloz için sırasıyla %75 ve %90 olarak belirlenmiş olup, BS'nin termal kararlılığının bitkisel selüloza göre daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 2. Bakteriyel ve bitkisel selüloz örneklerinin termal degradasyon ölçüm değerleri
Table 2. Thermal degradation measurement of bacterial and plant cellulose samples

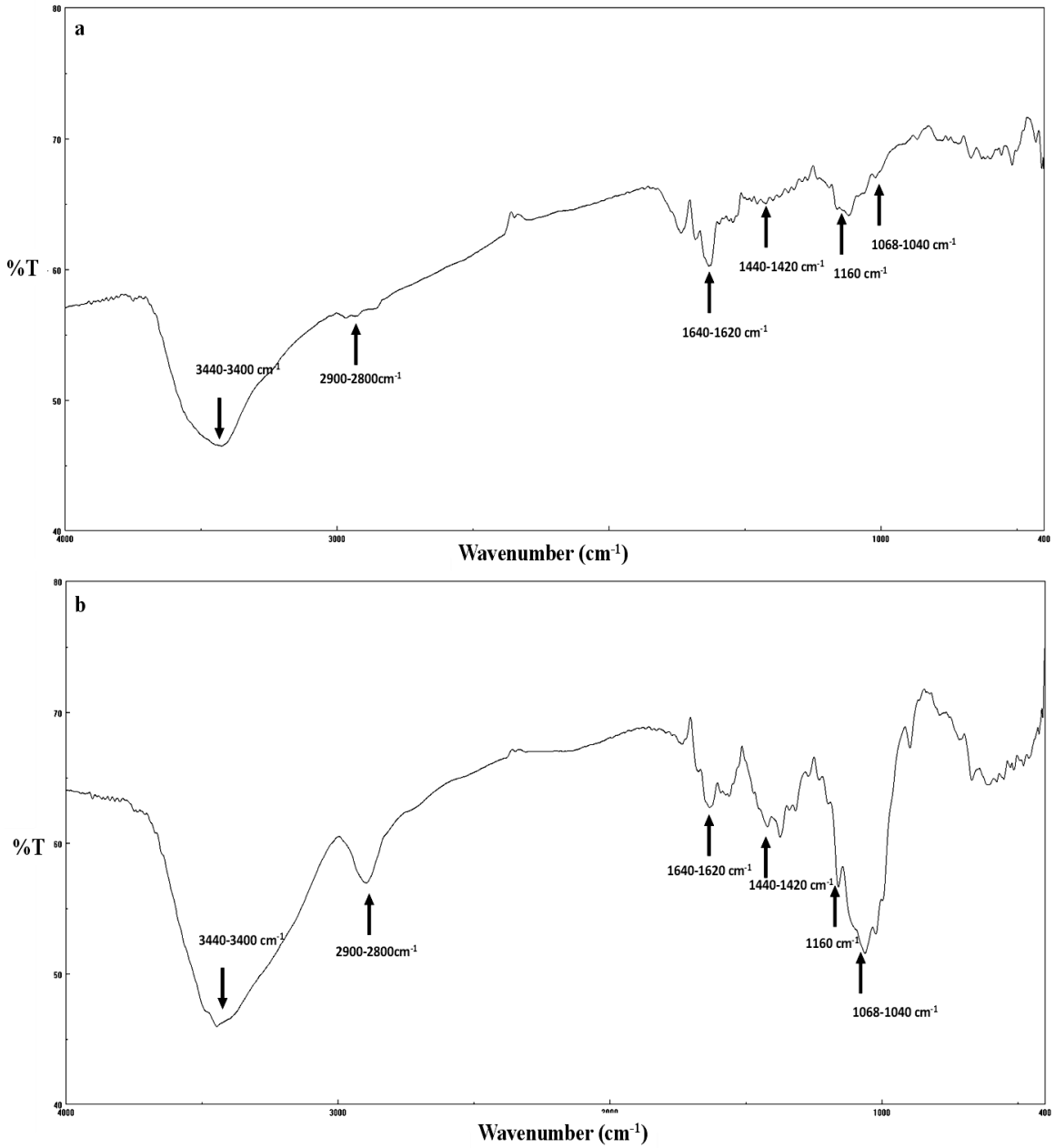
	T _{%50} (°C)	DTG _{max} (°C)	Kütle Kaybı (650 °C) (%)
Bakteriyel Selüloz	342	333	75
Bitkisel Selüloz	335	335	90

SEM analizi

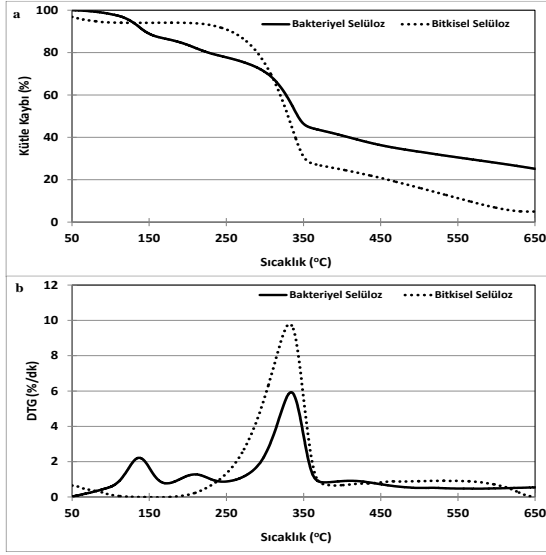
BS'nin görsel yüzey morfoloji özellikleri bitkisel selüloz ile karşılaştırılarak, farklı büyütme değerlerine sahip taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiş ve görüntüleri Şekil 4'te verilmiştir. Görüntüler incelendiğinde BS'nin farklı literatür kaynaklarında belirtilen BS örnekleri ile morfolojik yapıları benzer bulunmuştur (Cheng vd., 2009; Martins vd., 2009; Goh vd., 2012; De Souza vd. 2013; Mohammadkazemi vd., 2015). BS'nin ortalama lif çapı 73.63 nm olarak belirlenmiş olup, bitkisel selüloz lif çapına göre 120 kat daha ince olduğu görülmektedir (Şekil 4). İnce liflere sahip polimerlerin gerilme direnci ve uzama özellikleri gibi mekanik özellikleri artmakta, su buharı geçirgenliği azalmakta ve daha pürüzsüz bir yapı oluşmaktadır (Luddee vd., 2014). Ayrıca daha önceki BS ile yapılan çalışmalarda mikrofibrillerin bitkisel selülozlara kıyasla daha küçük olması ile BS'nin yüzey alanının büyüdüğü ve bu sayede daha büyük ve gözenekli bir hidrojel tabakanın

oluştugu belirtilmiştir (Johnson ve Neogi, 1989; Ross vd., 1991; Jonas ve Farah, 1998; Vandamme vd., 1998; Bielecki vd., 2000). Bu özellikler BS'nin su tutma kapasitesi, termal stabilitesi ve mekanik

mukavemet gibi özelliklerini etkilemektedir (Cheng vd. 2009).



Şekil 2. Bakteriyel (a) ve bitkisel selülozun (b) FTIR spektrumu
Figure 2. FTIR spectrum of bacterial cellulose (a) and plant cellulose (b)



Şekil 3. Bakteriyel ve bitkisel selülozun TGA (a) ve DTA (b) eğrileri

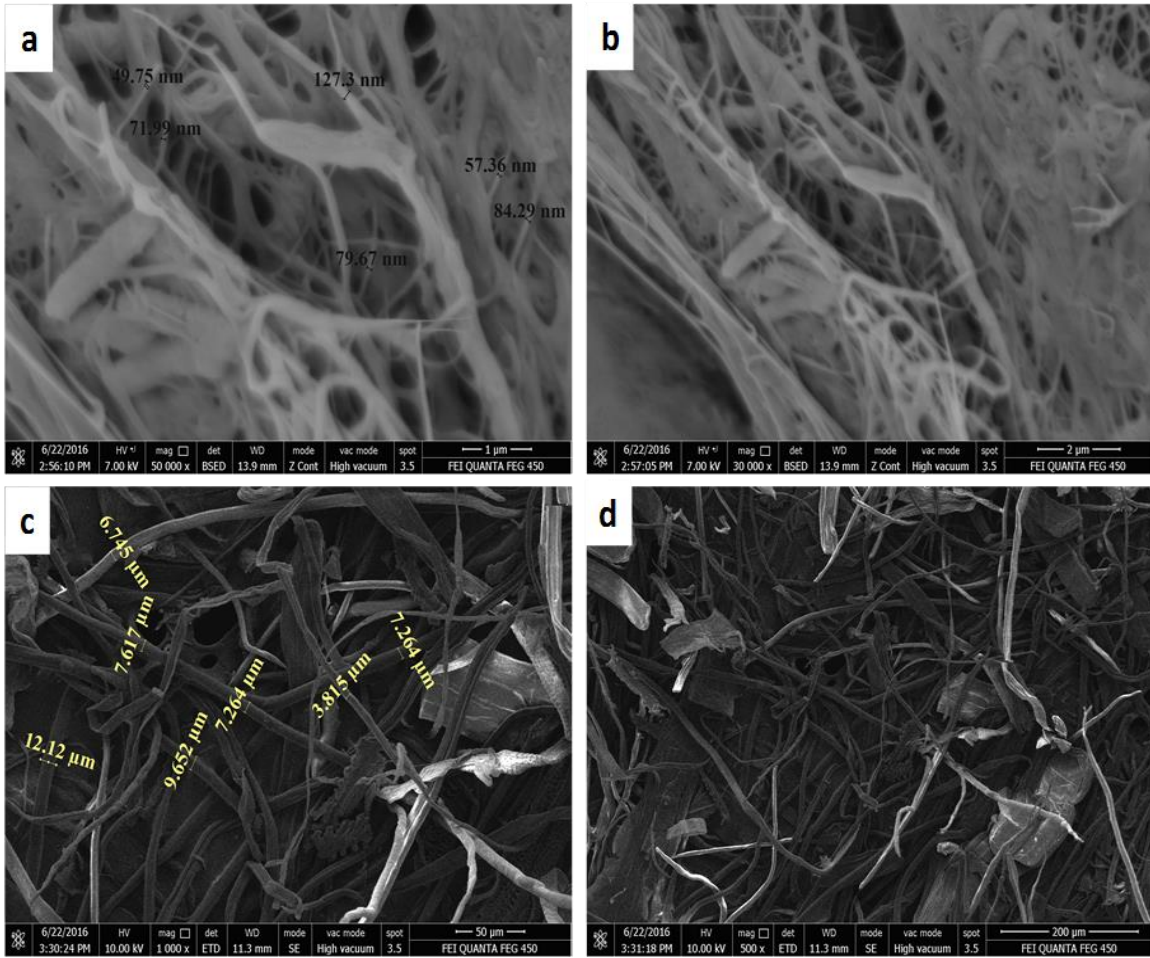
Figure 3. TGA (a) and DTA (b) curves of bacterial cellulose and plant cellulose

XRD analizi

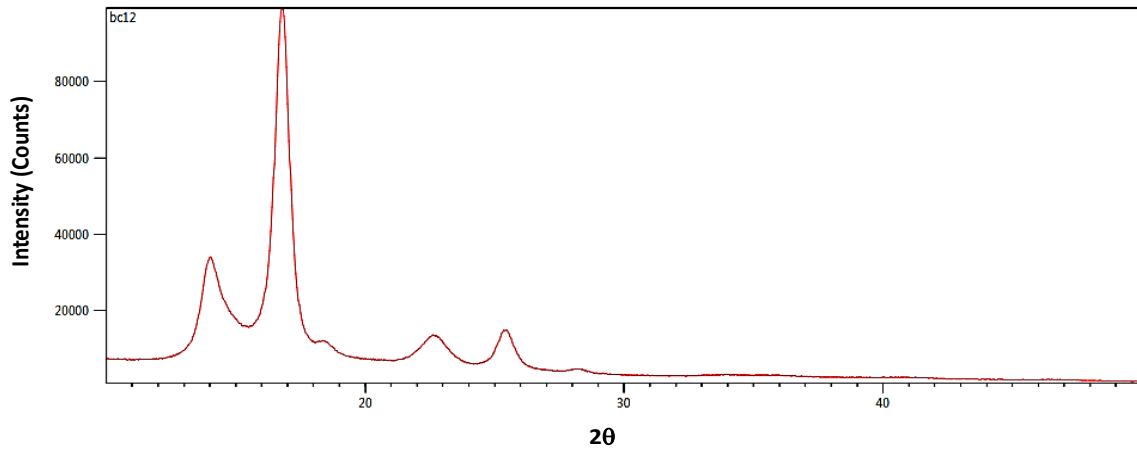
X-ışını kırınımı (XRD), selülozun kristal yapı analizinde en sık kullanılan tekniktir (Mazumdar, 1999; Goh vd. 2012). Selüloz yapısını oluşturan selüloz zincirleri, değişen uzunluk ve genişlikte suda çözünmeyen bir yapı oluşturmaktadır. Bu yapı düzenli (kristal) ve daha az düzenli (amorf) bölgelere sahiptir. Malzemenin kristal kısmı XRD’de keskin kırınım piki verirken, maddenin amorf kısmı ise dağınık pikler vermektedir (Park vd., 2010). BS örneğinin X-ışını difraktogramı Şekil 5’te verilmiştir. Difraktograma göre BS’nin karakteristik 2θ açıları olan 14.00°-16.78° ve 22.60° (Kong vd. 2010; Sun vd., 2010) kristal düzlemlerine karşılık gelen selüloz I kırılma profili gösterdiği belirlenmiştir. BS’nin kristalinite derecesinin hesaplamasında 2θ açısının en büyük olduğu 14.05°-16.77° ve 22.68° kullanılmış olup diğer lineer bölgeler hesaplama dışı bırakılmıştır. Bu şekilde BS’nin kristalinite derecesi %87.47 olarak hesaplanmış olup, sonucun literatürle uyum içinde olduğu gözlenmiştir. Yapılan literatür taramalarında farklı mikroorganizmalar ve farklı karbon kaynakları kullanılarak elde edilen BS’lerin kristalinite derecelerinin %69-89 (Czaja vd., 2004; Cheng vd., 2009; Yang vd., 2012;

Mohammadkazemi vd., 2015), ticari mikrokristalin selülozun kristalinite derecesinin ise %65-83 (Schurz ve Klapp, 1976; Teeäär vd., 1987; Röder vd., 2006; Leppänen vd., 2009; Nada vd., 2009; Goh vd., 2012) olarak belirtilmiştir,

Bu çalışmanın sonucunda, evsel sirkeden izole edilen *Komagataeibacter hansenii* GA2016’nın yüksek oranda BS ürettiği ve elde edilen BS’nin yüksek su tutma kapasitesine, yüksek termal kararlılığa, kristaliniteye ve ince liflere sahip olduğu bulunmuştur. Elde edilen BS’nin, bitkisel selüloza kıyasla liflerinin yaklaşık 120 kat daha ince olmasından dolayı polimerin gerilme direnci ve uzama gibi mekanik özelliklerinin daha iyi olduğu, daha pürüzsüz bir yapıya sahip olduğu, yüzey alanının daha büyük olduğu ve bu sayede daha büyük ve gözenekli bir hidrojel tabaka oluşturduğu söylenebilir (Luddee vd., 2014). Sağlık üzerine olumlu etkileri (sindirimi düzenleyici, serum kolesterol ve kan yağ seviyesini azaltıcı gibi), bitkisel selüloza göre daha saf olması ve üretim sırasında çevreye zararlı kimyasal maddeler kullanılmaması BS’nin diğer avantajlarıdır. BS’nin geniş ölçekli uygulamalarda kullanımı, üretim maliyetinin yüksek ve verimin düşük olması gibi nedenlerden dolayı bulunmamaktadır. Bu nedenle üretim maliyetini azaltmak amacıyla birçok çalışma yapılmaktadır (Watanabe vd., 1998; Ramana vd., 2000; Yamanaka ve Sugiyama 2010). Son zamanlarda tarım, ormancılık ya da endüstriyel atıkların BS üretiminde karbon kaynağı olarak kullanılması ile üretim maliyetlerinin azaltılabilmesi konusunda çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Uraki vd., 2002; Bae ve Shoda, 2005; Hong ve Qiu, 2008; Goelzer vd., 2009; Carreira vd., 2011; Usha ve Appaiah, 2011; Zeng vd., 2011; Chen vd., 2012; Gomes vd., 2013; Lin vd., 2014). Bu çalışmada izole edilen *Komagataeibacter hansenii* GA2016’nın iyi bir BS üreticisi olduğu bulunmuştur. Bu suş ile BS üretiminde karbon kaynağı olarak atık maddelerin kullanımı, hem selüloz üretiminin sürdürülebilirliğinin gelişmesine, hem de endüstriyel atıkların çevreyle dost bir şekilde bertaraf edilmesine katkı sağlayacaktır.



Şekil 4. Bakteriyel ve bitkisel selülozün SEM mikrografı. (a) Bakteriyel selüloz 50000x, (b) Bakteriyel selüloz 30000x, (c) Bitkisel selüloz 1000x, (d) Bitkisel selüloz 500x büyütme
Figure 4. SEM of bacterial and plant cellulose. (a) Bacterial cellulose 50000x, (b) Bacterial cellulose 30000x, (c) Plant cellulose 1000x, (d) Plant cellulose 500x magnification



Şekil 5. Bakteriyel selülozün X-ışını difraktogramı
Figure 6. X-ray diffractogram of bacterial cellulose

Teşekkür

Yazarlar, Fatmagül Halıcı Demir'e evsel sirkeyi sağladığı için teşekkür ederler. Bu proje Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje No:2015/128) tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

Akoğlu, A., Karahan, A.G., Çakır, İ., Çakmakçı, M.L. (2010). Bakteriyel selülozun özellikleri ve gıda sanayinde kullanımı. *GIDA* 35(2): 127-134.

AOAC (1989). Officials methods of analysis. 15th Edition, Washington DC, USA.

Aydın, Y.A., Aksoy, N.D. (2013). Çeşitli gıda atıklarından selüloz üreten asetik asit bakterilerinin izolasyonu ve tanımlanması. *Türk Mikrobiyol. Cem. Dergisi* 43(1):26-35.

Aydın, Y.A., Aksoy, N.D. (2014). Isolation and characterization of an efficient bacterial cellulose producer strain in agitated culture: *Gluconacetobacter hansenii* P2A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98:1065-1075.

Aydıncak, K. (2012). Hidrotermal karbonizasyon yöntemiyle gerçek ve model biyokütlerden karbon nanoküre sentezi ve karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Türkiye.

Bae, S., Shoda, M. (2005). Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* BPR2001 using molasses medium in a jar fermentor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 45–51.

Barud, H. S., Ribeiro, C. A., Crespi, M. S., Martines, M. A. U., Dexpert-Ghys, J., Marques, R. F. C., (2007). Thermal characterization of bacterial cellulose–phosphatecomposite membranes. *J. Therm. Anal. Cal.* 87(3),815–818.

Bielecki, S., Krystynowicz, A., Turkiewicz, M. and Kalinowska, H. (2000). Bacterial Cellulose. In: Steinbuechel A (Ed), Biopolymers: Polysaccharides I, Vol.7, pp. 37-90. Wiley-VCH Verlag GmbH, Munster, Germany.

Blast (2017). Basic Local Alignment Search Tool. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> (Accessed 10 January 2017).

Brown, R.M. (2004). Cellulose Structure and biosynthesis: What is in store for the 21th century. *J Poly Sci: Part A: Polymer. Chem.* 42:487-495.

Carreira, P., Mendes, J.A., Trovatti, E., Serafim, L.S., Freire, C.S., Silvestre, A.J., Neto, C.P.,

(2011). Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. *Bioresour. Technol.* 102: 7354–7360.

Castro, C., Zuluaga, R., Putaux, J.L., Caroa, G., Mondragon, I., Ganán, P., (2011). Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes, *Carbohydr. Polym.* 84(1): 96-102.

Chen, P., Cho, S.Y., Jin, H.J., (2010). Modification and Applications of Bacterial Celluloses in Polymer Science. *Macromol. Res.* 18: 309-320.

Chen, L., Hong, F., Yang, X.X., Han, S.F. (2012). Biotransformation of wheat straw to bacterial cellulose and its mechanism. *Bioresour. Technol.* 135: 464–468.

Cheng, K.C., Catchmark, J.M., Demirci, A. (2009). Effect of different additives on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* and analysis of material property. *Cellulose* 16:1033-1045.

Czaja, W., Romanovicz, D., Brown Jr., R. M. (2004). Structural investigation of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose* 11: 403–411.

Dahman, Y. (2009). Nanostructured biomaterials and biocomposites from bacterial cellulose nanofibers. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 9: 5105-5122.

De Souza, C.F., Lucyszyn, N., Woehl, M.A., Riegel-Vidotti, I.C., Borsali, R., Sierakowski, M.R. (2013). Property evaluations of dry-cast reconstituted bacterial cellulose/tamarind xyloglucan biocomposites. *Carbohydr. Polym.* 93: 144-153.

Drysdale, G. S. and Fleet, G. H. (1988). Acetic acid bacteria in winemaking: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 39(2):143-154.

- Fabio, P.G., Nuno, H.C.S., Trovatti, E., Serafim, L.S., Duarte, M.F., Silvestre, A.J.D., Neto, C.P., Carmen S.R.F. (2013). Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter sacchari* using dry olive mill residue. *Biomass Bioenergy* 55: 205-211.
- Erdoğan, K. (2007). Tütün saplarından ksilooligosakkarit üretimi. (Yüksek Lisans Tezi), Gaziosmanpaşa Üniversitesi. Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Tokat.
- Fang, L., Catchmark, J.M. (2014). Characterization of water-soluble exopolysaccharide from *Gluconacetobacter xylinus* and their impacts on bacterial cellulose crystallization and ribbon assembly. *Cellulose* 21:3965-3978.
- Gao, C., Yan, T., Du, J., He, F., Luo, H., Wan, Y. (2014). Introduction of broad spectrum antibacterial properties to bacterial cellulose nanofibers via immobilising ϵ -polylysine nanocoatings. *Food Hydrocoll.* 36: 204-211.
- Gayathry, G., Gopalaswamy, G. (2014). Production and characterization of microbial cellulosic fibre from *Acetobacter xylinum*. *Indian J. Fibre Text. Res.* 39: 93-96.
- Goh, W.N., Rosma, A., Kaur, B., Fazilah, A., Karim, A.A., Bhat, R. (2012). Microstructure and physical properties of microbial cellulose produced during fermentation of black tea broth (Kombucha). II. *Int. Food Res. J.* 19(1): 153-158.
- Goelzer, F., Faria-Tischer, P., Vitorino, J., Sierakowski, M.R., Tischer, C. (2009). Production and characterization of nanospheres of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* from processed rice bark. *Mater. Sci. Eng.* 29: 546-551.
- Gomes, F.P., Silva, N.H.C.S., Trovatti, E., Serafim, L.S., Duarte, M.F., Silvestre, A.J.D., Neto, C.P., Freire, C.S.R. (2013). Production of bacterial cellulose by *gluconacetobacter sacchari* using dry olive mill residue. *Biomass Bioenergy* 55: 205-211.
- Ha, J. H., Park, J. K. (2012). Improvement of bacterial cellulose production in *Acetobacter xylinum* using byproduct produced by *Gluconacetobacter hansenii*. *Korean J. Chem. Eng.* 29(5): 563-566.
- Halib, N., Iqbal, M. C., Amin. M., Ahmad, I. (2012). Physicochemical properties and characterization of nata de coco from local food industries as a source of cellulose. *Sains Malaysiana* 41(2): 205-211.
- Hermans, P. H., Weidinger, A. (1948). Quantitative x-ray investigations on the crystallinity of cellulose fibers. A background analysis. *J. App. Phy.* 19(5): 491.
- Hong, F., Qiu, K. (2008). An alternative carbon source from konjac powder for enhancing production of bacterial cellulose in static cultures by a model strain *Acetobacter acetisubsp. xylinus* ATCC 23770. *Carbohydr. Poly.* 72: 545-549.
- Huang, Y., Zhu, C., Yang, J., Nie, Y., Chen, C., Sun, D. (2014). Recent advances in bacterial cellulose. *Cellulose* 21(1):1-30.
- Hungund, B.S., Gupta, S.G. (2010). Production of bacterial cellulose from *Enterobacter amnigenus* GH-1 isolated from rotten apple. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26: 1823-1828.
- Iguchi, M., Yamanaka, S., Budhiono, A. (2000). Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts. *J. Mater. Sci.* 35(2):261-270.
- Johnson, D.C. ve Neogi, A.N. (1989). Sheeted products formed from reticulated microbial cellulose. US Patent, 4863565.
- Jonas, R., Farah, L.F. (1998). Production and application of microbial cellulose. *Polym Degrad. Stab.* 59:101-106.
- Jung, J.Y., Park, J.K., Chang, H.N. (2005). Bacterial cellulose production by *Gluconoacetobacter hansenii* in an agitated culture without living non-cellulose producing cells. *Enzyme Microb. Technol.* 37:347-354.
- Karahan A.G., Akoğlu A., Çakır, I., Kart, A., Çakmakçı M.L., Uygun, A., Göktepe, F. (2011). Some properties of bacterial cellulose produced by new native strain *Gluconacetobacter* sp. A06O2 obtained from Turkish vinegar. *J. App. Poly. Sci.* 121(3):1823-1831.
- Kato, N., Sato, T., Kato, C., Yajima, M., Sugiyama, J., Kanda, T., Mizuno, M., Nozaki, K., Yamanaka, S., Amano, Y. (2007). Viability and cellulose synthesizing ability of *Gluconacetobacter*

- xylinus* cells under high-hydrostatic pressure. *Extremophiles* 11(5): 693-698.
- Keshk, S.M.A.S. (2014). Vitamin C enhances bacterial cellulose production in *Gluconacetobacter xylinus*, *Carbohydr. Polym.* 99: 98-100.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.P. (2005). Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material A. Bohn, *Polym. Sci.* 44: 3358-3393.
- Ko, Y. H., Oh, H.J., Lee, H.J. (2015). Use of bacterial cellulose from *Gluconacetobacter hansenii* NOK21 as a proton permeable membrane in microbial fuel cells. *J. Microb. Biochem. Techno.* 7(3): 145-151.
- Kong, F.L., Zhang, M.W., Kuang, R.B., Yu, S.J., Chi, J.W., Wei, Z.C. (2010). Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide purified from pulp tissue of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). *Carbohydr. Polym.* 81:612-616.
- Leppänen, K., Anderson, S., Torkkeli, M., Knaapila, M., Kotelnikova, N., Serimaa, R., 2009. Structure of cellulose and microcrystalline cellulose from various species, cotton and flax studied by x-ray scattering. *Cellulose*, 16: 999-1015.
- Lin, D., Sanchez, P.L., Li, R., Li, Z. (2014). Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917 using only waste beer yeast as nutrient source. *Bioresour Technol.* 151:113-119.
- Lin, S. P., Liu, C. T., Hsu, K. D., Hung, Y. T., Shih, T. Y., Cheng, K. C. (2016). Production of bacterial cellulose with various additives in a PCS rotating disk bioreactor and its material property analysis. *Cellulose* 23(1): 367-377.
- Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T., Komagata, K. (2001). Identification of *Acetobacter* strains isolated from Indonesian sources, and proposals of *Acetobacter syzygii* sp. nov., *Acetobacter cibinongensis* sp. nov., and *Acetobacter orientalis* sp. nov. *J. Gen. Appl. Microbiol* 47: 119-131.
- Luddee, M., Pivsa-Art, S., Sirisansaneeyakul, S., Pechyen, C. (2014). Particle size of ground bacterial cellulose affecting mechanical, thermal, and moisture barrier properties of PLA/BC biocomposites. *Energy Procedia* 56: 211-218.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J. ve Van Zyl, W.H. (2002). Pretorius IS: Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66(3):506-77.
- Mantanis, G. I., Young, R. A., Rowell, R. M. (1995). Swelling of compressed cellulose fiber webs in organic liquids. *Cellulose* 2:1-22.
- Marchessault, R.H., Sundararajan, P.R. (1983). Cellulose. In Aspinall G.O. (editor) *The Polysaccharides*, Volume 2, page 12-95. New York: Academic Press, Inc.
- Martins, I.M.G., Magina, S.P., Oliveira, L., Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D. (2009). New biocomposites based on thermoplastic starch and bacterial cellulose. *Composites Sci Tech.* 69: 2163-2168.
- Mazumdar, S. (1999). A standardless method of quantitative ceramic analysis using X-ray powder diffraction. *J. Appl. Cryst.* 32:381-386.
- Mohammadkazemi, F., Azin, M., Ashori, A. (2015). Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. *Carbohydr. Polym.* 117: 518–523.
- Morgan, J. L., Strumillo, J., ve Zimmer, J. (2013). Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature* 493(7431): 181-186.
- Nada, A.M.A., El-Kady, M.Y., El-Sayed, E.S., Amine, F.M., 2009. Preparation and characterization of microcrystalline cellulose (MCC). *BioResources*, 4:1359-1371.
- Neto, C.P., Mikkelsen, A.G., Flanagan, B.M., Dykes, G.A., Gidley, M.J. (2009). Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. *J. Appl. Microbiol.* 107: 576-583.
- Nesic, A.R., Trifunovic, S.S., Grujic, A.S., Velickovic, S.J., Antonovic, D.G. (2011). Complexation of amidated pectin with poly(itaconic acid) as a polycarboxylic polymer model compound. *Carbohydr. Res.* 346(15): 2463-2468.
- Ng, C., Sheu, F., Wang, C., Shyu, Y. (2004). Fermentation of *Monascus purpureus* on agri-by-

- products to make colorful and functional bacterial cellulose (NATA). *Microbiol. Indones.* 4(1): 6-10.
- Park, J.K., Jung, J.Y., Park, Y.H. (2003a). Cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in a medium containing ethanol. *Biotechnol. Lett.* 25:2055–2059.
- Park, J.K., Park, Y.H., Jung, J.Y. (2003b). Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* PJK isolated from rotten apple. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 8(2):83-88.
- Perez, S., Samain, D. (2010). Structure and engineering of celluloses. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 64: 25-116.
- Ramana, K., Tomar, A., Singh, L., 2000. World Journal of Microbiology and Biotechnology (2000) 16: 245. doi:10.1023/A:1008958014270 y, B.G. (1949). Aqueous colloidal solutions of cellulose micelles. *Acta Chemica Scandinavica*, 3: 649-450.
- Rani, M.U., Appaiah, K.A. (2013). Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* UAC09 using coffee cherry husk. *J. Food. Sci. Technol.* 50(4):755-762.
- Robertson, A.A. (1964). Cellulose-liquid interactions. *Pulp Paper Mag Canada* 65:171-178.
- Rodriguez, R., Jiménez, R., Fernández-Bolaños, J., Guillén, R., Heredia, A. (2006). Dietary fibre from plant products as source of functional ingredients, *Trends Food Sci. Tech.* 17(1): 3-15.
- Ross, P., Mayer, R., Benziman, M. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microb. Rev.* 55 (1): 35-58.
- Röder, T., Moosbauer, J., Fasching, M., Bohn, A., Fink, H.P., Baldinger, T., Sixta, H., 2006. Crystallinity determination of native cellulose comparison of analytical methods. *Lenzinger Berichte* 86:85-89.
- Saibuatong, O.A., Phisalaphong, M. (2010). Novo Aloe Vera-Bacterial Cellulose Composite Film From Biosynthesis. *Carbohydr. Polym.* 79(2): 455-460.
- Saxena, I.M., Lin, F.C., Brown, R.M. (1990). Cloning and sequencing of the cellulose synthase catalytic subunit gene of *Acetobacter xylinum*. *Plant Mol. Biol.*, 15: 673-683.
- Saxena, I.M., Kudlicka, K., Okuda, K., Brown, R.M. (1994). Characterization of genes in the cellulose-synthesizing operon (acs operon) of *Acetobacter xylinum*: implications for cellulose crystallization. *J. Bacteriol.* 176:5735-5752.
- Schramm, M., Hestrin, S. (1954). Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 11: 123-129.
- Schröpfer, S. B., Bottene, M. K., Bianchin, L., Robinson, L. C., Lima, V., Jahno, V. D., Barud, H. S., Ribeiro, S. J. L. (2015). Biodegradation evaluation of bacterial cellulose, plant cellulose and poly (3-hydroxybutyrate) in soil. *Polímeros* 25(2), 154-160.
- Schurz, J., Klapp, H. (1976). Untersuchungen a mikrokristallinen und mikrofeinen cellulosen. *Das Papier* 30:510-513.
- Segal, L., Creely, J. J., Martin, A. E. J., Conrad, C. M. (1959). An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Text Res. J.* 29:786-794.
- Seifert, M., Hesse, S., Kabrelian, V., Klemm, D. (2003). Controlling the water content of never dried and reswollen bacterial cellulose by the addition of water-soluble polymers to the culture medium. *J Poly Sci: Part A: Polym. Chem.* 42:463-470.
- Shi, Z., Zhang, Y., Phillips, G. O., Yang, G. (2014). Utilization of bacterial cellulose in food. *Food Hydrocolloids* 35: 539-545.
- Shoda, M., Sugano, Y. (2005). Recent advances in bacterial cellulose production. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 10: 1-8.
- Sivam, A.S., Sun-Waterhouse, D., Perera, C.O., Waterhouse, G.I.N. (2012). Exploring the interactions between blackcurrant polyphenols, pectin and wheat biopolymers in model breads; a FTIR and HPLC investigation. *Food Chem.* 131(3):802-810.
- Soares, S., Camino, G., Levchik, S. (1995). Comparative study of the thermal decomposition of pure cellulose and pulp paper. *Polymer. Degrad. Stab.* 49: 275-283.

- Son, C., Chung, S., Lee, J., Kim, S. (2002). Isolation and cultivation characteristics of *Acetobacter xylinum* KJ-1 producing bacterial cellulose in shaking cultures. *J. Microb. Biotech.* 12(5):722-728.
- Son, H.J., Kim, H.G., Kim, K.K., Kim, H.S., Kim, Y.G., Lee, S.J. (2003). Increased production of bacterial cellulose by *Acetobacter* sp. V6 in synthetic media under shaking culture conditions. *Bioresour. Technol.* 86: 215-219.
- Stephens, S.R., Westland, J.A., Neogi, A.N. (1990). Method of using bacterial cellulose as a dietary fiber component. *US patent 4960763*.
- Sun, J.X., Xu, F., Sun, X.F., Xiao, B., Sun, R.C. (2005). Physico-chemical and thermal characterization of cellulose from barley straw. *Polym. Degr. Stab.* 88: 521-531.
- Sun, J., Jiang, Y., Shi, J., Wei, X., Xue, S.J., Shi, J., Yi, C. (2010). Antioxidant activities and contents of polyphenol oxidase substrates from pericarp tissues of litchi fruit. *Food Chem.* 119:753-757.
- Tappi (1991). Tappi useful method UM256. Water retention value (WRV), Tappi Useful Methods, Tappi Press, Atlanta, USA.
- Teeäär, R., Serimaa, R., Paakkari, T., 1987. Crystallinity of cellulose, as determined by cp/mas nmr and xrd methods. *Polym. Bull.*, 17: 231-237.
- Uraki, Y., Morito, M., Kishimoto, T., Sano, Y. (2002). Bacterial cellulose production using monosaccharides derived from hemicelluloses in water-soluble fraction of waste liquor from atmospheric acetic acid pulping. *Holzforschung* 56: 341-347.
- Usha, R.M., Appaiah, K.A. (2011). Statistical optimization of medium composition for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* UAC09 using coffee cherry husk extract an agro-industry waste. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 739-745.
- Uzyol, H. K., Saçan, M.T. (2017). Bacterial cellulose production by *Komagataeibacter hansenii* using algae-based glucose. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24:11154–11162
- Vandamme, E.J., De Baets, S., Vanbaelen, A., Joris, K., De Wulf P. (1998). Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polym. Deg. Stab.* 59(1-3) 93-99.
- Vazquez, A., Foresti, M. L., Cerrutti, P., Galvagno, M. (2013). Bacterial Cellulose from simple and low cost production media by *Gluconacetobacter xylinus*. *J. Polym. Environ.* 21(2), 545-554.
- Watanabe, K., Tabuchi, M., Morinaga, Y., Yoshinaga, F. (1998). Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. *Cellulose* 5(3):187-200.
- Wee, Y.J., Kim, S.Y., Yoon, S.D., Ryu, H.W. (2011). Isolation and characterization of a bacterial cellulose-producing bacterium derived from the persimmon vinegar. *Afr. J. Biotechnol.* 10(72): 16267-16276.
- Yamada, Y. (2000). Transfer of *Acetobacter oboediens* and *Acetobacter intermedius* to the genus *Gluconacetobacter* as *Gluconacetobacter oboediens* comb. nov. and *Gluconacetobacter intermedius* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:2225–2227.
- Yamanaka, S. ve Sugiyama, J. (2000). Structural modification of bacterial cellulose. *Cellulose* 7(3):213-225.
- Yang, C.M., Chen C.Y. (2005). Synthesis, characterization and properties of polyanilines containing transition metal ions. *Synth. Met.* 153:133-136.
- Yang, G., Xie, J., Hong, F., Cao, Z., Yang, X. (2012). Antimicrobial activity of silver nanoparticle impregnated bacterial cellulose membrane: Effect of fermentation carbon sources of bacterial cellulose. *Carbohydr. Polym* 87: 839– 845.
- Zeng, X., Small, D.P., Wan, W. (2011). Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* BPR 2001 from maple syrup. *Carbohydr. Polym.* 85: 506– 513.

EGE BÖLGESİ ZEYTİNYAĞLARINDA ALTI KARBONLU UÇUCU AROMA BİLEŞENLERİNİN BELİRLENMESİ

Mustafa Kıralan¹, Hasan Hüseyin Kara^{2**}, Eda Çalıköğlü³, Ali Bayrak⁴

¹Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bolu, Türkiye

²Necmettin Erbakan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Konya, Türkiye

³Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırma ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Ankara, Türkiye

⁴Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Gölbaşı, Ankara, Türkiye

Geliş / *Received*: 08.06.2017; Kabul / *Accepted*: 12.09.2017; Online baskı / *Published online*: 15.11.2017

Kıralan, M., Kara, H H., Çalıköğlü, E., Bayrak, A. (2017). Ege bölgesi zeytinyağlarında altı karbonlu uçucu aroma bileşenlerinin belirlenmesi. *GIDA* (2017) 42 (5): 634-642 doi: 10.15237/gida.GD17052

ÖZ

Yağ üretimi açısından önemli olan Ege bölgesi illerinden (Muğla, Aydın, İzmir ve Manisa) Gemlik, Memecik, Ayvalık, Uslu ve Domat zeytin çeşitlerinden 2007-2008 ve 2008-2009 dönemi olmak üzere 2 yıl hasat edilmiştir. Hasat edilen zeytinler laboratuvar tipi santrifüj sistem kullanılarak yağa işlenmiştir. Tepe boşluğu-katı faz mikroekstraksiyon (HS-SPME) yöntemi yardımı ile yağlardan uçucu aroma bileşenleri ekstrakte edilerek gaz kromatografi-kütle spektrometre (GC-MS) cihazı ile bileşenlerin kalitatif ve kantitatif analizi yapılmıştır. Bu çalışmada, zeytinyağı kalitesi ile ilişkili olan altı karbonlu bileşenler belirlenmiştir. E-2-hekzenal ve hekzenal, çalışılan yağ örneklerinde en fazla oranda bulunan bileşenlerdir. 2007-2008 ve 2008-2009 hasat döneminde E-2-hekzenal bileşeninin sırası ile % 13.05-67.15 ve % 23.03-52.44 aralığında olduğu belirlenirken aynı hasat dönemlerinde % 6.70-39.34 ve % 11.23-59.81 arasında tespit edilen hekzenal bileşeninin, en yüksek salınan uçucu bileşenler arasında ikinci sırada yer aldığı görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Zeytinyağı, C₆ bileşenler, hekzenal, E-2-hekzenal

DETERMINATION OF SIX-CARBON VOLATILE AROMA COMPONENTS IN AEGEAN REGION OLIVE OILS

ABSTRACT

Gemlik, Memecik, Ayvalık, Uslu and Domat olive cultivars were harvested from Aegean region provinces (Muğla, Aydın, İzmir ve Manisa) being important in terms of the oil productions of the Aegean region for two harvest periods as 2007-2008 and 2008-2009. The olives harvested are processed to olive oils using laboratory scale centrifuge system. With the aid of the headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) technique the qualitative and quantitative analyses of compounds were accomplished with the gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) by extracting the volatile compounds of oils via. In the present study, C₆ compounds related to the quality of olive oil were determined. E-2-hexenal and hexenal were found to be most abundant compounds in the oil samples studied. In 2007-2008 and 2008-2009 harvest periods, E-2-hexenal (the most found component) was determined to be in a range of 13.05-67.15% and 23.03-52.44%, respectively whereas hexenal detected between 6.70-39.34% and 11.23-59.81% in the same harvest periods was observed to take the second place among the highest released volatile compounds.

Keywords: Olive oil, C₆ compounds, hexenal, E-2-hexenal.

* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ hasankara@konya.edu.tr

☎ (+90) 332 325 1147

☎ (+90) 332 320 4059

GİRİŞ

Zeytinyağı, zeytin ağacı meyvesinden herhangi bir kimyasal işlem uygulanmadan sadece mekanik veya fiziksel işlemler uygulanarak elde edilen, yeşilden sarıya kadar değişebilen renkte, kendine özgü aroması olan ve doğal halde tüketilebilen yegane bitkisel yağdır. Zeytinyağının kendine özgü eşsiz bir aromaya sahip olması ve sağlık açısından birçok bileşeni içermesinden dolayı bitkisel yağlar içerisinde tüketiciler tarafından en fazla tercih edilenidir (Boskou, 1996).

Zeytinyağının aromasını uçucu ve uçucu olmayan bileşenler oluşturmakta ve bu bileşenlerin çeşit ve miktarları duyu kaliteyi etkilemektedir. Zeytinyağında uçucu olmayan bileşenler kısmını fenolik maddeler oluşturmakta olup tat reseptörleri üzerine dolayısı ile tat üzerine etkilidirler. Aromanın diğer unsuru olan koku kısmını ise uçucu bileşenler oluşturmakta ve koku reseptörleri üzerine etki göstermektedirler (Angerosa vd., 2004). Zeytinyağında aromaya katkı sağlayan bileşikler; aldehitler, ketonlar, alkoller ve esterler gibi bileşiklerdir (Olias vd., 1993; Angerosa vd. 2001).

C₆ ve C₅ bileşikler, özellikle C₆ düz zincirli doymamış ve doymuş aldehitler, yüksek kaliteli olarak sınıflandırılan zeytinyağlarının uçucu bileşiminin önemli bir kısmını oluştururlar. Bu bileşikler, çeşitli enzimler varlığında çoklu doymamış yağ asitlerinden (linoleik asit ve linolenik asit) oluşmaktadır. Bu oluşum yolu lipoksigenaz iz yolu olarak isimlendirilmektedir ve bu bileşenlerin konsantrasyonu lipoksigenaz iz yolunda yer alan enzimlerin aktivitesi ve düzeyine bağlı olarak değişim gösterir (Kiritsakis, 1998; Angerosa vd., 2004; Bertuccioli ve Monteleone, 2014). C₆ bileşik gruplarından aldehitler (hekzenal, Z-3-hekzenal ve E-2-hekzenal), alkoller (hekzenol, Z-3-hekzenol ve E-2-hekzenol) ve bu bileşiklerin asetil esterleri (hekzil asetat, Z-3-hekzenil asetat) zeytinyağının uçucu bileşiminin önemli bir kısmını oluşturmaktadır (Sánchez ve Salas, 2000).

Zeytinyağı üretiminde Türkiye yıllara göre sıralamada değişim gösterse de önemli zeytinyağı üreticisi ülkeler arasında yer almaktadır. Uluslararası Zeytinyağı Konseyinin 2016-2017

tahminlerine göre ilk üç önemli üretici ülke sırası ile İspanya (1.300.000 ton), Yunanistan (260.000 ton) ve İtalya (243.000 ton) iken Türkiye ise 177.000 ton ile 4. sırada yer almaktadır (Anonymous, 2017).

Ulusal Zeytin ve Zeytinyağı Konseyi'nin (UZZK) koordinatörlüğünde "Zeytin ve Zeytinyağı Rekoltesi Ulusal Resmi Tespit Heyeti"nin 2016-2017 tahmini rakamları 177.365 ton zeytinyağı üretileceğini öngörmektedir. Ege bölgesi bu üretim rakamlarına önemli katkılar sağlamaktadır. Bu raporda Ege bölgesinde Manisa (15.596 ton), Aydın (37.554 ton), Muğla (19.312 ton) ve İzmir (23.719 ton) önemli üretici iller olarak yer almıştır (Anonymous, 2016).

Yapılan bu çalışmada, Ege bölgesinde yağ üretimine önemli katkı sağlayan Muğla, Aydın, İzmir ve Manisa illerinden farklı zeytin çeşitlerinden üretilen zeytin yağlarında, aroma karakteristiğinde önemli etkisi bulunan altı karbonlu uçucu aroma bileşenlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, farklı zeytin çeşitleri, lokasyonlar ve iki hasat döneminde yağların aroma profilleri araştırılarak farklılıklar ortaya konulmuştur.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Materyal, Ege Bölgesinin zeytincilik açısından önemli olan; Aydın, Muğla, İzmir ve Manisa illerinden bölgeye özgü Memecik, Gemlik, Domat, Uslu ve Ayvalık çeşitlerden, olgunlaşma indeksleri dikkate alınarak 2007-2008 ve 2008-2009 hasat dönemlerinde elle toplanmıştır. Zeytinlerin örnek kodları, çeşitleri, lokasyonu ve hasat zamanları Çizelge 1'de gösterilmiştir.

Olgunlaşma İndeksinin Belirlenmesi

Zeytin örneklerinin olgunlaşma indeksi, zeytinlerin hasadında kullanılan önemli bir parametre olup, rastgele 100 adet zeytin alınmakta, yüzey-doku rengine göre 7 gruba ayrılmakta ve aşağıdaki formül ile hesaplanmaktadır.

Olgunlaşma

$$\text{indeksi} = \frac{(0x_n0) + (1x_n1) + (2x_n2) + (3x_n3) + (4x_n4) + (5x_n5) + (6x_n6) + (7x_n7)}{100}$$

Yukarıdaki eşitlikte, her bir gruptaki dane adedi ait olduğu grup numarası ile çarpılmakta ve elde edilen değerlerin toplamı 100'e bölünerek olgunlaşma indeksi hesaplanmaktadır (Kiritakis, 1998).

Zeytinden Yağ Üretimi

Zeytinler olgunlaşma indeksi esas alınarak elle hasat edilmiş, hasat edilen zeytinler en kısa sürede laboratuvar tipi santrifüj sistemli ekipmanla

(Hakkı Usta Makine, Aydın, Türkiye) yağa işlenmiştir. Yoğurma işlemi yaklaşık 30°C'da 60 dakika uygulanmıştır. Yağın hamurdan ayrılması için dikey santrifüj kullanılarak sıvı faz (yağ-karasu), katı fazdan ayrılmıştır. Yağda kalan bulanıklık ve safsızlıkların giderilmesi amacıyla pamuk filtreden geçirilmiştir. Elde edilen berrak yağ analiz edilinceye kadar +4 °C'da buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Çizelge 1 Zeytinlerin kodları, çeşitleri, hasat dönemi ve lokasyonları

Table 1 Codes, cultivar, harvest time and locations of olives

2007 – 2008 hasat dönemi 2007-2008 harvest time				2008-2009 hasat dönemi 2008-2009 harvest time			
Kod Code	Çeşit Cultivar	Lokasyon Location	Hasat Zamanı Harvest time	Kod Code	Çeşit Cultivar	Lokasyon Location	Hasat Zamanı Harvest time
E1	Memecik	Aydın/Didim	27.11.2007	F1	Memecik	Aydın/Didim	12.12.2008
E2	Memecik	Muğla/Fethiye	05.12.2007	F2	Memecik	Muğla/Fethiye	18.11.2008
E3	Gemlik	Manisa /Akhisar	19.11.2007	F3	Gemlik	Manisa/Akhisar	20.10.2008
E4	Memecik	Muğla/Zeytinalanı	09.12.2007	F4	Memecik	Muğla/Zeytinalanı	27.12.2008
E5	Ayvalık	Muğla /Yeşilyurt	08.12.2007	F5	Ayvalık	Muğla/Yeşilyurt	15.12.2008
E6	Memecik	Muğla /Yeşilyurt	08.12.2007	F6	Memecik	Muğla/Yeşilyurt	15.12.2008
E7	Memecik	İzmir/Bayındır	17.12.2007	F7	Memecik	İzmir/Bayındır	08.01.2009
E8	Uslu	Manisa /Akhisar	27.12.2007	F8	Uslu	Manisa/Akhisar	19.12.2008
E9	Domat	Manisa /Akhisar	27.12.2007	F9	Domat	Manisa/Akhisar	19.12.2008
E10	Ayvalık	Manisa /Akhisar	27.12.2007	F10	Ayvalık	Manisa/Akhisar	19.12.2008
E11	Gemlik	Muğla /Milas	12.01.2008	F11	Gemlik	Muğla/Milas	17.12.2008
E12	Memecik	Muğla /Milas	13.01.2008	F12	Memecik	Muğla/Milas	26.01.2009
				F13	Ayvalık	Aydın/Didim	15.11.2008
				F14	Gemlik	Aydın/Bozdoğan	02.12.2008
				F15	Memecik	Aydın/Bozdoğan	02.12.2008
				F16	Memecik	Muğla/Milas	12.12.2008
				F17	Memecik	Muğla/Yatağan	14.12.2008
				F18	Memecik	Aydın/Dalaman	10.01.2009

Uçucu Bileşenlerin Belirlenmesi

Yaklaşık 3 g örnek 20 mL'lik küçük şişelere (headspace vialleri) alınarak ağzı hava sızdırmaz teflon kapakla kapatılmıştır. Şişeler, 40 °C'da 10 dakika tutularak örneğin dengeye gelmesi sağlanmıştır. Daha sonra katı faz mikroekstraksiyon için uygun fiber (adsorbant olarak 85 µm kalınlığında karboksen/polidimetilsiloksan (CARB-PDMS)) şişeye daldırılmış ve 40 dakika süre ile tepe boşluğundaki uçucu bileşenleri adsorbe etmiştir. Son olarak fiber, Gaz kromatografisi cihazının enjeksiyon

portunda 10 dakika süre ile kalarak yakalamış olduğu uçucu bileşenleri desorbe ederek GC-MS sistemine aktarmıştır.

Aroma bileşenlerinin analizinde alev iyonlaştırılmalı (FID) dedektör donanımlı Hewlett Packard 7890 gaz kromatografisi cihazı ile kombine HP 5975 MS dedektörü kullanılmıştır. Analizlerde DB-624 (30 m uzunluğunda, 0.25 mm iç çapında, 1.4 µm film kalınlığında) kapiler kolon kullanılmıştır. Çalışma koşulları aşağıda verilmiştir.

Enjeksiyon bloğu sıcaklığı: 250°C; Dedektör sıcaklığı: 250°C; Taşıyıcı gaz: He; Akış hızı: 1 mL/dak; MS kaynağının sıcaklığı: 230 °C; MS kuadropol sıcaklığı: 150 °C; Enjeksiyon modu: Bölünmesiz (Splitless).

Fırın sıcaklık programı: 40°C 5 dakika tutulur; 40°C'dan 110°C'a kadar dakikada 3°C artacak şekilde; 110°C'dan 150°C'a kadar dakikada 4 °C artacak şekilde; 150°C'dan 210°C'a kadar dakikada 10 °C artacak şekilde; 210 °C'da 12 dakika tutulur; Elektron enerjisi: 70 eV; Kütle aralığı: 41-400 atomik kütle ünitesi.

GC/MS analizleri yapılan bileşenlerin kütle spektrumları, Wiley ve NIST kütüphaneleri ile karşılaştırılarak teşhis yapılmıştır. Bunun yanında standart maddeler, sisteme enjekte edilerek hem alıkonma süreleri hem de kütle spektrumlarından yararlanılarak tanımlama yapılmıştır. En son olarak alifatik hidrokarbon standart maddeleri (C₄-C₂₀) verilerek Kovats indeks (Lineer retention indeks) değerleri hesaplanmış ve bu da tanımlamada kullanılmıştır.

İstatistik Analiz

Elde edilen sonuçlar, SPSS paket programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmeye tabi tutulmuştur. Varyans analizi tekniği ile (ANOVA) grup ortalamaları arasındaki fark belirlenmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Olgunlaşma İndeksi

Zeytin örneklerinin olgunlaşma indeksi (OI) Çizelge 2'de sunulmuştur. Olgunlaşma indeksi ilk yıl örneklerinde 1.00-6.20 arasında, ikinci yıl örneklerinde ise 1.00-6.28 arasında değişmiştir. E9 ve F9 kodlu Domat çeşidinde olgunlaşma indeksi her iki yılda da düşük olmasının nedeni bu çeşidin genellikle sofralık olarak değerlendirilmesinden ve renk dönümünün çok geç gerçekleşmesinden kaynaklanmaktadır. İyi kalitede yağ elde etmek için zeytinlerin hasat edildiğinde olgunlaşma indekslerinin 5 olması gerekmektedir (Kiritakis, 1998). Bazı örneklerin olgunlaşma indekslerinin 5 in üzerinde olmasının nedeni örnek alınan lokasyonlarda hasadın yapıldığı dönemin dikkate alınarak yapılmasından kaynaklanmaktadır. Bazı lokasyonlarda erken hasat yapılırken bazılarında geç hasat yapılmaktadır.

Çizelge 2 Zeytin örneklerinin 2 hasat dönemine göre olgunlaşma indeksleri (OI)

Table 2 Maturation index (MI) of olive samples according to two harvest time

2007-2008 hasat dönemi 2007-2008 harvest time		2008-2009 hasat dönemi 2008-2009 harvest time	
Kod Code	OI MI	Kod Code	OI MI
E1	3.02*	F1	3.48
E2	2.86	F2	2.96
E3	4.54	F3	4.58
E4	3.20	F4	3.52
E5	3.84	F5	3.90
E6	4.36	F6	4.48
E7	3.24	F7	3.26
E8	5.40	F8	5.54
E9	1.00	F9	1.00
E10	6.20	F10	6.28
E11	6.20	F11	5.58
E12	6.10	F12	5.56
		F13	2.60
		F14	5.80
		F15	4.90
		F16	2.40
		F17	5.40
		F18	6.10

*OI değerleri iki paralelin aritmetik ortalaması olarak verilmiştir.

* Values for OI are given as mean of two measurements (n=2)Çizelge 2

Uçucu Aroma Bileşenleri

Örneklerde lipoksigenaz iz yolu ile oluşan 6 karbonlu (hekzenal, E-2-hekzenal, hekzan-1-ol, Z-3-hekzenal, E-2-hekzen-1-ol, heksil asetat ve

Z-3-hekzenil asetat) bileşenler tespit edilmiştir. Bu bileşenler, Çizelge 3'de verilmiştir.

Çizelge 3 Zeytinyağlarının 2 farklı hasat döneminde C₆ bileşenlerinin değişimi
Table 3 Changes in C₆ compounds of olive oils according to two harvest time

	Hekzenal <i>Hexanal</i>	Z-3- hekzenal <i>Z-3-hexenal</i>	E-2- hekzenal <i>E-2-hexenal</i>	Hekzenol <i>Hexanol</i>	E-2- hekzen-1-ol <i>E-2-hexen-1-ol</i>	Z-3- hekzenil asetat <i>Z-3-hexenyl acetate</i>	Hekzil asetat <i>Hexyl acetate</i>
KI	836	844	908	918	938	1041	1044
E1	11.02±0.09 ^h	0.13±0.00 ^{de}	47.40±0.14 ^d	0.09±0.01 ^d	0.00±0.00 ^c	0.17±0.01 ^{fg}	0.18±0.01 ^d
E2	15.84±0.17 ^e	0.00±0.00 ^e	49.62±0.42 ^c	0.16±0.01 ^{bc}	0.00±0.00 ^c	0.30±0.00 ^{de}	0.17±0.00 ^d
E3	17.99±0.03 ^d	0.11±0.01 ^{de}	43.61±0.16 ^e	0.28±0.00 ^a	0.00±0.00 ^c	0.14±0.01 ^g	0.00±0.00 ^f
E4	14.50±0.06 ^f	0.83±0.13 ^b	33.85±0.18 ^g	0.00±0.00 ^e	1.71±0.05 ^a	0.36±0.01 ^{cd}	0.24±0.01 ^c
E5	13.35±0.17 ^g	0.00±0.00 ^e	13.05±0.12 ^j	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^c	0.41±0.02 ^c	0.00±0.00 ^f
E6	10.66±0.03 ^h	0.20±0.00 ^{cd}	46.77±0.05 ^d	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^c	0.43±0.01 ^c	0.07±0.00 ^e
E7	13.09±0.03 ^g	0.30±0.00 ^c	39.84±0.10 ^f	0.16±0.00 ^{bc}	0.00±0.00 ^c	0.35±0.00 ^{cd}	0.00±0.00 ^f
E8	29.95±0.27 ^c	0.00±0.00 ^e	33.11±0.31 ^g	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^c	0.25±0.05 ^{ef}	0.00±0.00 ^f
E9	6.70±0.04 ⁱ	0.00±0.00 ^e	67.15±0.35 ^a	0.13±0.00 ^{cd}	0.00±0.00 ^c	0.18±0.00 ^{fg}	0.05±0.00 ^e
E10	36.30±0.49 ^b	0.00±0.00 ^e	18.19±0.20 ^h	0.21±0.06 ^b	0.00±0.00 ^c	1.51±0.03 ^b	0.43±0.01 ^b
E11	39.34±0.29 ^a	0.00±0.00 ^e	16.80±0.07 ⁱ	0.00±0.00 ^e	0.14±0.01 ^b	0.18±0.01 ^{fg}	0.00±0.00 ^f
E12	16.53±0.53 ^e	1.37±0.02 ^a	51.16±0.64 ^b	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^c	1.97±0.06 ^a	0.76±0.03 ^a
F1	33.25±0.44 ^b	1.65±0.02 ^d	23.03±0.33 ^k	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^b	0.17±0.01 ^k	0.14±0.01 ^j
F2	18.31±1.15 ^{fg}	0.00±0.00 ^l	46.43±0.23 ^b	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^b	1.36±0.00 ^d	0.87±0.00 ^a
F3	11.23±0.32 ^l	0.75±0.01 ^h	46.16±0.68 ^{bc}	0.20±0.01 ^a	0.00±0.00 ^b	1.21±0.03 ^e	0.50±0.00 ^c
F4	17.31±0.06 ^g	0.83±0.00 ^f	24.04±0.01 ^{jk}	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^b	1.86±0.03 ^b	0.43±0.01 ^d
F5	22.21±0.08 ^d	0.00±0.00 ^l	12.14±0.07 ^l	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^b	0.59±0.05 ^g	0.00±0.00 ^m
F6	14.08±0.01 ^j	1.23±0.02 ^e	40.11±0.13 ^{ef}	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^b	0.91±0.01 ^f	0.16±0.00 ^j
F7	13.19±0.02 ^{jk}	0.29±0.00 ⁱ	39.59±0.08 ^f	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^b	0.35±0.00 ^{hi}	0.00±0.00 ^m
F8	13.60±0.15 ^{jk}	0.00±0.00 ^l	26.70±0.33 ^h	0.19±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.16±0.00 ^k	0.13±0.00 ^j
F9	12.99±0.22 ^{jk}	0.00±0.00 ^l	52.44±0.17 ^a	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^b	0.11±0.01 ^k	0.00±0.00 ^m
F10	59.81±0.02 ^a	0.00±0.00 ^l	8.30±0.04 ^m	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^b	0.36±0.01 ^h	0.10±0.01 ^k
F11	12.74±0.24 ^k	0.80±0.01 ^g	41.40±0.28 ^e	0.00±0.00 ^d	0.10±0.00 ^a	2.45±0.03 ^a	0.66±0.01 ^b
F12	19.75±0.01 ^e	2.02±0.01 ^c	42.84±0.02 ^d	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^b	0.27±0.04 ^{ij}	0.00±0.00 ^m
F13	13.46±0.16 ^{jk}	0.60±0.01 ⁱ	44.93±0.24 ^c	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^b	0.83±0.05 ^f	0.25±0.02 ^g
F14	17.98±1.01 ^g	0.23±0.01 ^k	26.22±1.53 ^{hi}	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^b	0.56±0.04 ^g	0.22±0.01 ^h
F15	21.60±0.01 ^d	2.14±0.01 ^a	40.66±0.10 ^{ef}	0.10±0.00 ^c	0.00±0.00 ^b	0.29±0.00 ^{hij}	0.06±0.00 ^l
F16	19.38±0.03 ^{ef}	2.06±0.02 ^b	41.50±0.28 ^e	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^b	0.26±0.00 ⁱ	0.00±0.00 ^m
F17	24.68±0.13 ^c	0.27±0.01 ⁱ	35.58±0.14 ^g	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^b	0.84±0.00 ^f	0.38±0.00 ^e
F18	15.86±0.26 ⁱ	0.59±0.00 ^j	25.05±0.34 ^{ij}	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^b	1.49±0.03 ^c	0.31±0.01 ^f

Değerler iki ölçümün ortalama ve standart hatasını göstermektedir

Kolonlarda farklı harfler istatistiksel önemli farkı ($P < 0.05$) göstermektedir

Values are mean ± standard error of two ($n=2$) measurements

Values in a column followed by different superscript letters are significantly ($P < 0.05$) different

E-2-hekzenal, lipoksigenaz iz yolunda linolenik asitten oluşmakta olup, özellikle erken hasat edilen zeytinlerin yağlarında en fazla oranda bulunmaktadır. Zeytinyağına acı badem ve yeşil (Morales vd., 2005), yeşil buruk (Aparicio ve Luna, 2002) hissi uyandırmaktadır.

Örneklerde E-2-hekzenal oranı 2007-2008 hasat dönemi örneklerinde en fazla E9 kodlu Domat çeşidinin yağında belirlenmiş olup oranı % 67.15'dir. 2008-2009 hasat dönemi örneklerinde ise E-2-hekzenal oranı (% 52.44) F9 kodlu Domat çeşidinin yağında belirlenmiştir. En düşük E-2-hekzenal oranı 2007-2008 hasat dönemi örneklerinde E5 kodlu Ayvalık çeşidi Yeşilyurt (Muğla) lokasyonunda (% 13.05), 2008-2009 hasat dönemi ise F10 kodlu Ayvalık çeşidi Akhisar (Manisa) lokasyonunda (% 8.30) belirlenmiştir. Sonuçların bir kısmı yabancı çeşitlerin yağlarından elde edilen verilerden, Cavalli vd. (2003)'nin (% 42.7-58.1), Cavalli vd. (2004)'nin (% 28.3-64.0), Haddada vd. (2017)'nin (% 0.8-78.3), Issaoui vd. (2009)'nin (% 6.30-65.00), Temime vd. (2006)'nin (% 0.1'e eşit ve altında-69.9) Krichene vd. (2010)'nin (% 16.5-65.4), Issaoui vd. (2010)'nin (0-% 37.6), Manai vd. (2008)'nin (% 42.66-74.52) sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Literatürlerde de belirtildiği üzere E-2 hekzenal oranı; çeşit, iklim koşulları, lokasyon, hasat yılı ve yükseklik gibi birçok faktöre bağlı olarak değişim göstermiştir. Sonuçlarda hasat yılına bağlı olarak çeşit ve lokasyona göre istatistik açıdan değişim gözlenmiştir ($p < 0.05$). Çalışmada kullanılan örneklerin çeşitleri ve lokasyonları birbirinden farklı olması, ayrıca iklim koşullarının değişim göstermesi bileşimdeki farklılıkların ana nedeni olduğu düşünülmektedir.

Lipoksigenaz iz yolu ile oluşan önemli bileşenlerden biri de 6 karbonlu aldehitlerden olan hekzenaldir. Hekzenal, farklı eşik değerlerinde farklı algılamalar göstermektedir. Eşik değeri 75 µg/kg yağ olduğunda yeşil-tatlı (Aparicio ve Luna, 2002), 80 µg/kg yağ iken yeşil elma ve çimensi (Morales ve Luna, 2005), 300 µg/kg yağ olduğunda ise yeşil (Reiners ve Grosch, 1998) bir duyuusal algılama oluşturmaktadır.

Yapılan çalışmada örneklerde hekzenal oranı, 2007-2008 hasat dönemi örneklerinde % 6.70-39.34, 2008-2009 hasat dönemi örneklerinde ise % 11.23-59.81 arasında değişmiştir. 2007-2008 hasat dönemi örneklerinde Domat çeşidi Akhisar (Manisa) lokasyonundan elde edilen örnekte en az oranda, Gemlik çeşidinin Milas (Muğla) lokasyonunda en fazla oranda hekzenal vardır. 2008-2009 hasat dönemi örneklerinde en fazla hekzenal oranı Ayvalık çeşidi Akhisar (Manisa) lokasyonunda, en az ise Gemlik çeşidi Akhisar (Manisa) lokasyonunda belirlenmiştir. Çalışmada yer alan örneklerin hekzenal oranı, Manai vd. (2008)'nin, Tunus'da geliştirilen zeytin çeşitlerinin yağlarında bildirdikleri hekzenal oranının (% 1.71-3.86)'dan daha fazladır. Örneklerin bir kısmının sonuçları, Cavalli vd. (2004)'nin verileri (% 1.7-7.4), Haddada vd. (2007)'nin değerleri (% 0-11.4) ile Krichene vd. (2010)'nin değerlerine (% 0.08-7.20) paralellik göstermektedir. Tunus'da yapılan diğer çalışmalarda, Issaoui vd. (2009) yalnızca bir örnekte hekzenal belirlemesine karşın, Temime vd. (2006) ise hiçbir örnekte hekzenal belirleyememiştir. Bunun yanında, Issaoui vd. (2010) bazı örneklerde hiç hekzenal belirleyemezken diğer örneklerinde % 0.1'in altında hekzenal belirleyebilmiştir. Sonuçlar; Tunus'da yapılan çalışmaların sonuçlarına göre oldukça farklılık göstermektedir. Çalışmada yer alan Ayvalık ve Memecik çeşidi örnekleri Kaftan (2007)'nin 2005 yılı örneklerinin bir kısmı ile benzerlik göstermektedir. 2006 yılında Kaftan (2007) hekzenal belirleyememiştir. Örneklerin toplandığı her iki yılda kuraklığın şiddetli geçmesi bu örneklerin hekzenal oranlarının fazla olmasını açıklayacağı düşünülmektedir.

Altı karbonlu bileşenlerden diğer iki önemli bileşen Z-3-hekzenal ve E-2-hekzen-1-ol'dür. E-2-hekzen-1-ol, olgunlaşma ile miktarında artış olmakta ve özellikle E-2-hekzenal düzeyinin yüksek olduğu örneklerde bu bileşende yüksek oranda belirlenmiştir (Benincasa vd., 2003). Z-3-hekzenal, linolenik asitten oluşmaktadır. Z-3-hekzenal stabil olmaması nedeniyle cis-3:trans-2-enal izomeraz enziminin aktivitesi ile kolaylıkla E-2-hekzenale dönüşmektedir (Williams vd., 2000). Z-3-hekzenal oranı, % 0-1.37 (2007-2008 hasat dönemi), % 0-2.14 (2008-2009 hasat dönemi)

arasında belirlenmiştir. Bu bileşen, en fazla Memecik çeşidi Milas (Muğla) lokasyonunda (2007-2008 hasat dönemi) ve Memecik çeşidi Bozdoğan (Aydın) lokasyonunda (2008-2009 hasat dönemi) yer almıştır. Vichi vd. (2007)'nin (% 0.07), Haddada vd. (2007)'nin (% 0-22.2), Krichene vd. (2010)'nin (% 0-9.72) bildirdiği değerlerin çoğuna yakın olmakla birlikte Haddada vd. (2007)'nin ve Krichene vd. (2010)'nin bazı değerlerinden daha düşük oranda belirlenmiştir. Temime vd. (2006), Kaftan (2007), Issaoui vd. (2009; 2010)'nin çalışmalarında bu bileşene rastlanmamıştır. Araştırma sonuçlarının büyük kısmı bu araştırmacıların sonuçları ile uyumludur. E-2-hekzenil-ol, 2007-2008 hasat dönemi örneklerinde (% 0-1.71), 2008-2009 hasat dönemi örneklerinde (% 0-0.10) arasında belirlenmiştir. 2007-2008 hasat dönemi örneklerinde Memecik çeşidi Zeytinlanı (Muğla), 2008-2009 hasat dönemi örneklerinde ise Gemlik çeşidi Milas (Muğla) lokasyonunda bu bileşene en fazla oranda rastlanmıştır. Cavalli vd. (2003)'nin (% 2.3-7.4), Vichi vd. (2007)'nin (% 15.92), Cavalli vd. (2004)'nin (%2.7-9.0), Temime vd. (2006)'nin (% 0-44.5), Haddada vd. (2007)'nin (% 0-52.0), Issaoui vd. (2010)'nin (% 0-8.4), Krichene vd. (2010)'nin (% 0-17.24) değerleri ile araştırma sonuçlarının bir kısmı uyumlu olmakla birlikte literatür değerleri oldukça yüksektir. Kaftan (2007) ve Issaoui vd. (2009) ise bu bileşeni belirleyememiştir ve bu çalışma araştırma sonuçlarının birçoğu ile uyumludur.

Lipoksigenaz enzim aktivitesiyle oluşan diğer iki önemli bileşen hekzil asetat ve Z-3-hekzenil asetatır. Hekzil asetat, yeşil, meyvemsi ve tatlı his (Aparicio ve Luna, 2002), Z-3-hekzenil asetat ise yeşil (Aparicio ve Luna, 2002) ve muz benzeri (Reiners ve Grosch, 1998) his uyandırmaktadır. Bu bileşenler, örneklerde çok az oranda tespit edilmiştir. Hekzil asetat, 2007-2008 hasat dönemi örneklerinin 5 tanesinde belirlenemezken bu bileşenin tespit edilenlerinde % 0.05-0.76, 2008-2009 hasat dönemi örneklerinde ise 5 örnekte bu bileşene rastlanmazken belirlenen numunelerde ise bu bileşen % 0.06-% 0.87 arasında değişim göstermiştir. Örneklerde Z-3-hekzenil asetat oranı, 2007-2008 hasat dönemi örneklerinde %

0.14-1.97 arasında, 2008-2009 hasat dönemi ise % 0.11 ile % 2.45 arasında belirlenmiştir.

Lipoksigenaz iz yolunda linoleik asitten oluşan 6 karbonlu alkollerden olan hekzanol, meyvemsi ve muzsu yumuşak his (Aparicio ve Morales, 1998) uyandırmaktadır. Bu bileşende hekzil asetat ve Z-3-hekzenil asetat gibi düşük oranda tespit edilmiştir. 2007-2008 hasat döneminde 6 örnekte belirlenememiş olup hekzanol tespit edilenlerde en düşük % 0.09 en yüksek ise % 0.28 olarak belirlenmiştir. 2008-2009 hasat döneminde ise 15 örnekte hekzanol belirlenememiş olup tespit edilenlerde hekzanol oranı % 0.10-0.20 arasındadır.

Örneklerin uçucu aroma maddeleri bileşimini ağırlıklı olarak E-2-hekzenal ve hekzanal oluşturmuş, olgunlaşma indeksi düşük olan örneklerde genellikle E-2-hekzenal, olgunlaşması ilerlemiş örneklerde ise genellikle hekzanal ana bileşen olarak bulunmuştur. Örneklerin uçucu aroma bileşimi yıllara göre oldukça değişim göstermiştir. Hasat yıllarının oldukça kurak bir döneme rastlaması uçucu aroma maddeleri bileşiminde de farklılıklara yol açmıştır.

Teşekkür

Bu makale Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü Birimince desteklenen 08B4343006 nolu projenin sonuçlarından yararlanılarak hazırlanmıştır.

KAYNAKLAR

- Angerosa, F., Mostallino, R., Basti, C., Vito, R. (2001). Influence of malaxation temperature and time on the quality of virgin olive oils. *Food Chem.* 72(1): 19-28.
- Angerosa, F., Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposto, S., Montedoro, G. (2004). Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *J Chromatography A*, 1054(1): 17-31.
- Anonim (2016). 2016-2017 Üretim Sezonu Zeytin ve Zeytinyağı Rekoltesi Ulusal Resmi Tespit Heyeti Raporu. Ulusal Zeytin ve Zeytinyağı Konseyi (UZZK). İzmir. http://www.nazillitb.org.tr/Portals/128/dosyalar/TURKIYE_201617_REKOLTE_RAPORU.pdf (Erişim tarihi, 04.06.2017)

- Anonim (2017). Türkiye, zeytinyağı üretiminde artış gösteren tek ülke olacak. Anadolu Ajansı (AA). <http://aa.com.tr/tr/ekonomi/turkiye-zeytinyagi-uretiminde-artist-gosteren-tek-ulke-olacak/784815?amp=1> (Erişim tarihi, 04.06.2016).
- Aparicio, R., Luna, G. (2002). Characterisation of monovarietal virgin olive oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, 104: 614-627.
- Aparicio, R., Morales, M.T. (1998). Characterization of olive ripeness by green aroma compounds of virgin olive oil. *J Agri Food Chem*, 46(3): 1116-1122.
- Benincasa, C., De Nino, A., Lombardo, N., Perri, E., Sindona, G., Tagarelli, A. (2003). Assay of aroma active components of virgin olive oils from southern Italian regions by SPME-GC/ion trap mass spectrometry. *J Agri Food Chem*, 51: 733-741.
- Bertuccioli, M., Monteleone, E. (2014). The sensory quality of extra virgin olive oil. In: *The Extra-Virgin Olive Oil Handbook*. Peri C. (edt). John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex, UK.
- Boskou, D. (1996). *Olive Oil Chemistry and Technology*. AOCS Press, Champaign, IL, USA.
- Cavalli, J.F., Fernandez, X., Lizzani-Cuvelier, L., Loiseau, A.M. (2003). Comparison of Static Headspace, Headspace Solid Phase Microextraction, Headspace Sorptive Extraction, and Direct Thermal Desorption Techniques on Chemical Composition of French Olive Oils. *J Agri and Food Chem*, 51: 7709-7716.
- Cavalli, J.F., Fernandez, X., Lizzani-Cuvelier, L., Loiseau, A.M. (2004). Characterisation of Volatile Compounds of French and Spanish Virgin Olive Oils by HS-SPME: Identification of Quality/freshness Markers, *Food Chem*, 88: 151-157.
- Haddada, F.M, Manai, H., Daoud, D., Fernandez, X., Lizzani-Cuvelier, L., Zarrouk, M. (2007). Profiles of volatile compounds from some monovarietal Tunisian virgin olive oils. Comparison with French PDO. *Food Chem*, 103: 467-476.
- Issaoui, M., Flamini, G., Brahm,i F., Dabbou, S., Hassine, K.B., Taamali, A., Chehab, H., Ellouz, M., Zarrouk, M., Hammami, M. (2010). Effect of the growing area conditions on differentiation between Chemlali and Chétoui olive oils. *Food Chem*, 119: 220-225.
- Issaoui, M., Hassine, K.B., Flamini, G., Brahm,i F., Chehab, H., Aouni, Y., Mechri, B., Zarrouk, M., Hammami, M. (2009). Discrimination of Some Tunisian Olive Oil Varieties According to their Oxidative Stability, Volatiles Compounds and Chemometric Analysis. *J Food Lipids*, 16: 164-186.
- Kaftan, A., (2007). Farklı Yöre Zeytinlerinden Elde Edilen Naturel Zeytinyağının Duyusal Kalitesini Oluşturan Lezzet Maddelerinin SPME/GC/MS ve Lezzet Profili Analizi Teknikleri Kullanılarak Belirlenmesi. Doktora Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 158 s., İzmir.
- Kiritsakis, A.K. (1998). Flavor components of olive oil-a review. *J Am Oil Chemists' Society*, 75(6): 673-681.
- Krichene, D., Haddada, F.M., Fernandez, X., Cuvelier, L.L., Zarrouk, M. (2010). Volatile compounds characterising Tunisian virgin olive oils: the influence of cultivar. *Int J Food Sci Technol*, 45: 944-950.
- Manai, H., Mahjoub-Haddada, F., Oueslati, I., Daoud, D., Zarrouk, M. (2008). Characterization of monovarietal virgin olive oils from six crossing varieties, *Scientia Horticulturae*, 115: 252-260.
- Morales, M.T., Luna, G., Aparicio, R. (2005). Comparative study of virgin olive oil sensory defects. *Food Chem*, 91(2): 293-301.
- Olias, J.M., Perez, A.G., Rios, J.J., Sanz, L.C. (1993). Aroma of virgin olive oil: biogenesis of the "green" odor notes. *Journal of Agricultural and Food Chem*, 41(12): 2368-2373.
- Reiners, J., Grosch, W. (1998). Odorants of virgin olive oils with different flavor profiles. *J Agri Food Chem*, 46(7): 2754-2763.
- Sánchez, J., Salas, J.J. (2000). Biogenesis of Olive Oil Aroma, In: *Handbook of Olive Oil Analysis and Properties*. Harwood J, Aparicio R. (eds). Aspen Publishers, Inc., Maryland.

Temime, S.B., Campeol, E., Cioni, P.L., Daoud, D., Zarrouk, M. (2006). Volatile compounds from Che'toui olive oil and variations induced by growing area, *Food Chem*, 99: 315-325.

Vichi, S., Guadayol, J.M., Caixach, J., López-Tamames, E., Buxaderas, S. (2007). Comparative study of different extraction techniques for the analysis of virgin olive oil aroma. *Food Chem*, 105: 1171-1178.

Williams, M., Salas, J.J., Sanchez, J., Harwood, J.L. (2000). Lipoxygenase pathway in olive callus cultures (*Olea europaea*). *Phytochemistry*, 53(1): 13-19.

İçindekiler / Content

Araştırmalar (İngilizce) / Researches (English)

- Özkaynak Kanmaz, E., Saral, Ö.; *The relationship between antioxidant activities and phenolic compounds in subcritical water extracts from orange peel* / Portakal kabuğundan elde edilen kritik altı su ekstraktlarında antioksidan aktivite düzeyleri ile fenolik bileşikler arasındaki ilişki485-493
- Atalay, D., Selen Erge, H. *Determination of some physical and chemical properties of white, green and black teas (Camellia sinensis)* / Beyaz, yeşil ve siyah çayların (*Camellia sinensis*) bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi 494-504
- Yayayürük, O., Erdem Yayayürük, A. *Determination of mercury, lead, cadmium, copper, iron and manganese in sheep, cow and chicken liver samples in Turkey* / Türkiye'deki koyun, dana ve tavuk karaciğer örneklerinde cıva, kurşun, kadmiyum, bakır, demir ve mangan tayini 546-552
- Güler, F., Özçelik F. *An adaptation strategy to improve the proteolytic activities of lactic acid bacteria isolated from pickles* / Bitki kaynaklı laktik asit bakterilerinin proteolitik aktivitelerinin geliştirilmesi için adaptasyon çalışması561-567
- Çagatay Ceylan, C., Bayraktar, O., Atci, E. Sarrafı, Ş. *Extraction and characterization of pectin from fresh globe artichoke and canned artichoke waste* / Taze enginar ve konserve enginar atığından pektin ekstraksiyonu ve karakterizasyonu..... 568-576
- Uçak Koç A., Karacaoğlu, M. Şahin Nadem, H., Doğan, M. *Determination of shelf life of chest tree (Vitex agnus castus) honey and pine honey / Hayıt (Vitex agnus castus) ve çam balının raf ömrünün belirlenmesi 577-587*
- Tural, S., Turhan, S. *Antimicrobial and antioxidant properties of thyme (Thymus vulgaris L.), rosemary (Rosmarinus officinalis L.) and laurel (Lauris nobilis L.) essential oils and their mixtures* / Kekik (*Thymus vulgaris* L.), biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) ve defne (*Lauris nobilis* L.) uçucu yağlarının ve karışımlarının antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri588-596
- Boynueğri, P., Yemişcioğlu, F., Saygın Gümüskesen, A. *Effect of membrane degumming conditions on permeate flux and phospholipids rejection / Membran degumming koşullarının permeat akışı ve fosfolipitlerin reddedilmesi üzerindeki etkisi..... 597-602*

Araştırmalar (Türkçe) / Researches (Turkish)

- Kıvanç, M., Kovancı, P.; *Fermente gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin antifungal aktivitesinin belirlenmesi / Screening of antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from fermented foods477-484*
- Yıldız, B., Öner, Z. *Karbondioksit uygulamasının Beyaz peynir kalitesine etkisi / The effect of carbon dioxide application on the quality of Beyaz cheese527-534*
- Hayoğlu, İ., Başyigit, B., Dirik, A. *Tane nar ilaveli lokum üretimi ve vakum ambalajlamanın raf ömrü üzerine etkisi / Production of Turkish delight with pomegranate and effect of vacuum packing on shelf life553-560*
- Savran, D., Halkman A. K. *Salmonella, yoğurt bakterilerinin gelişimini etkileyebilir mi? / Can Salmonella affect the growth of yoghurt bacteria? 603-608*
- Hendek Ertop, M. *Farklı fermantasyon ve kurutma yöntemleriyle üretilmiş toz ekşi hamurun bazı mikrobiyolojik nitelikleri ve ekmekteki küf gelişimi üzerine etkileri / Effects on mold growth in bread and some microbiological properties of powder sourdough produced with different fermentation and drying methods609-619*
- Güzel, M, Akpınar, Ö. *Komagataeibacter hansenii GA2016 ile bakteriyel selüloz üretimi ve karakterizasyonu / Production and characterization of bacterial cellulose with Komagataeibacter hansenii GA2016620-633*
- Kıralan, M., Kara, H. H., Çalikoğlu, E., Bayrak, A. *Ege bölgesi zeytinyağlarında altı karbonlu / uçucu aroma bileşenlerinin belirlenmesi / Determination of six-carbon volatile aroma components in Aegean region olive oils634-642*
- Derlemeler (Türkçe) / Reviews (Turkish)**
- Yenioğlu Demiralp, Ş., Demirok Soncu, E., Kolsarıcı, N. *Olejeller ve emülsifiye et ürünlerinde kullanımı / Oleogels and their utilization in emulsified meat products.....505-513*
- Kutlu, N., Yeşilören, G., İşci, A., Şakıyan, Ö. *Konvansiyonel ekstraksiyona alternatif: Yeşil teknolojiler / Alternative to conventional extraction: Green technologies 514-526*
- Öztürk, B., Serdaroğlu, M. *Et ve et ürünlerinde fosfatlar: İşlevleri ve ikame olanaklarının güncel çerçevede değerlendirilmesi / Phosphates in meat and meat products: Current perspective on evaluation of their functions and replacement possibilities.....535-545*