

İçerikten / From the content

**Modified Low Glycemic Index Ingredients in Noodle Processing: Rheology and Microstructural Characteristics**

Erişte Üretiminde Modifiye Düşük Glisemik İndeksli Bileşenlerin Kullanımı: Reoloji ve Mikroyapı Özellikleri

**Optimized Top-Spray Fluidized Bed Coating Method of Rice Coated with Bauhinia strychnifolia Craib. Solution**

Bauhinia strychnifolia Craib. Çözeltisi ile Kaplanmış Pirincin Optimize Edilmiş Üst Sprey Akışkan Yatak Kaplama Yöntemi

**Bioutilization of Cheese Whey and Corn Steep Liquor by Heterotrophic Microalgae Cryptocodium cohnii for Biomass and Lipid Production**

Peyniraltı Suyu ve Mısır İslatma Şurubunun Heterotrofik Mikroalg Cryptocodium cohnii ile Biyokütle ve Yağ Üretimi Amacıyla Biyolojik Olarak Değerlendirilmesi

**Inactivation of Salmonella Enteritidis on Almonds by Pulsed Light Treatment**

Atımlı Işık Uygulaması ile Bademde Salmonella Enteritidis İnaktivasyonu

**Isıl İşlem Görmüş İçme Sütlerinde (Pastörize, UHT ve Laktozsuz UHT Süt) Hidroksimetilfurfural İçeriğinin Belirlenmesi**

Determination of Hydroxymethylfurfural Content of Heat-Treated Milk (Pasteurized, UHT and Lactose-Hydrolysed UHT Milk)

**Farklı Oranlarda Peynir Altı Suyu Kullanımı ile Üretilen Ayranların Bazı Özellikleri**

Some Properties of Ayran Samples Produced with Different Ratios of Whey

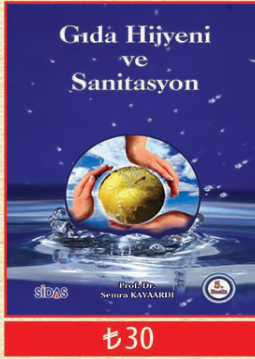
**Açıkta ve Ambalajlı Olarak Satışa Sunulan Kırmızıbiberlerde Sentetik Boya Varlığı**

Presence of Synthetic Dyes in Red Peppers Sold in Bulk and Packages

**Nar Sosunda Kromatografik Yöntemle Bazı Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Analizi**

Chromatographic Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Pomegranate Sauces

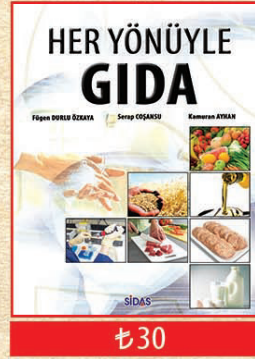
SIDAS MEDYA 2017 KİTAP FİYAT LİSTESİ



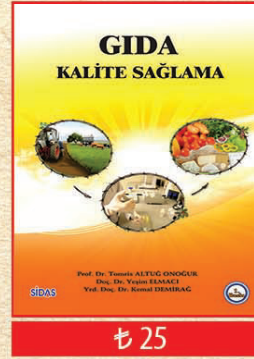
₺30



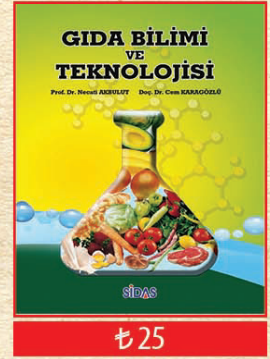
₺30



₺30



₺25



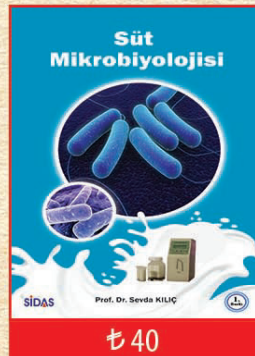
₺25



₺30



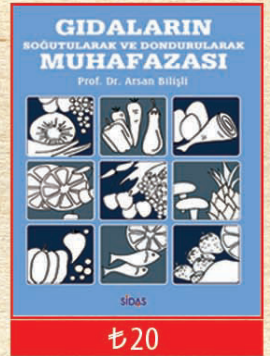
₺20



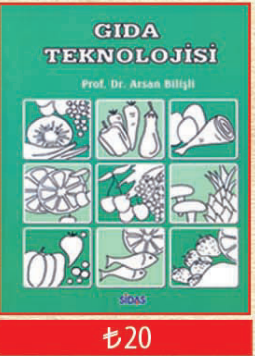
₺40



₺30



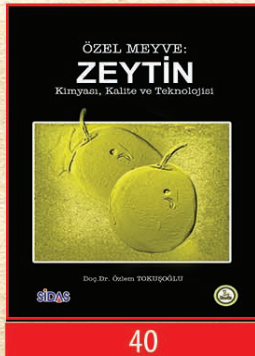
₺20



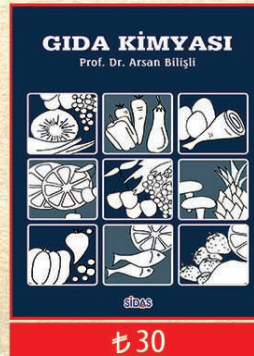
₺20



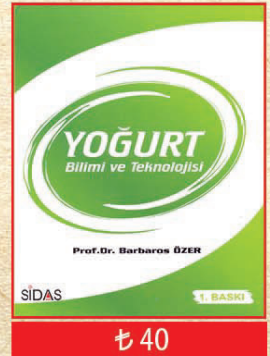
₺30



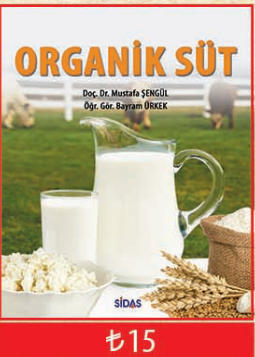
40



₺30



₺40



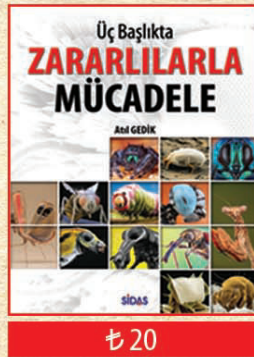
₺15



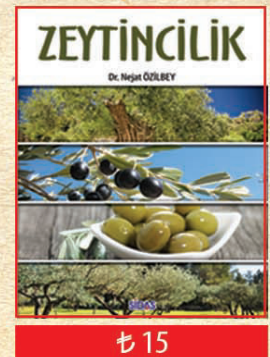
₺50



₺15



₺20



₺15



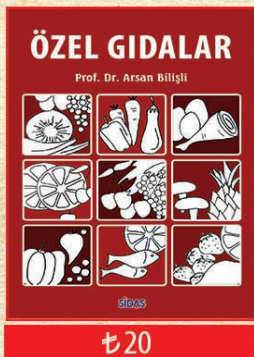
₺20



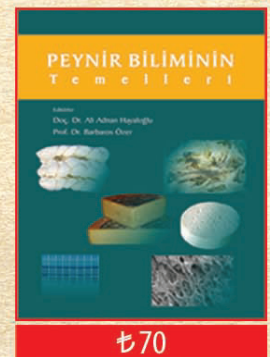
₺20



₺20



₺20



₺70

SİDAS MEDYA

www.academicfoodjournal.com

ISSN Online 2148-015X

ACADEMIC FOOD JOURNAL
AKADEMİK GIDA[®]
Gıda Bilimi ve Teknolojisi Dergisi

• Cilt/Volume:15 • Sayı/Number:3 • Yıl/Year:2017

www.akademikgida.com

ACADEMIC FOOD JOURNAL
A JOURNAL ON FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY

AKADEMİK GIDA®
ACADEMIC FOOD JOURNAL

Akademik Gıda® Dergisi Gıda Bilimi ve Teknolojisi alanında hazırlanmış özgün araştırma ve derleme makalelerin yayımlandığı hakemli bir dergidir. Araştırma notu ve editöre mektup gibi yazılar da yayın için değerlendirilmektedir. Dergi 3 ayda bir basılmakta olup 4 sayıda bir cilt tamamlanır. Dergide Türkçe ve İngilizce makaleler yayınlanır.

Akademik Gıda® dergisi CAB Abstracts®, EBSCO, Index Copernicus, Food Science and Technology Abstracts (FSTA®) ve TÜBİTAK ULAKBİM Yaşam Bilimleri Veri Tabanı tarafından indekslenmektedir.

Editör / Editor

Oğuz Gürsoy

(Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi)

Yardımcı Editörler / Associate Editors

Özer Kınık (Ege Üniversitesi)

Ramazan Gökçe (Pamukkale Üniversitesi)

Yusuf Yılmaz (Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi)

Teknik Editör / Technical Editor

Kübra Kocatürk (Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi)

International Editorial Board / Uluslararası Yayın Kurulu

- Mohamed H. Abd El-Salam (National Research Center, Egypt)
Sibel Akalın (Ege University, Turkey)
Abdullah Akdoğan (Pamukkale University, Turkey)
Nihat Akın (Selçuk University, Turkey)
Nesimi Aktaş (Nevşehir Hacı Bektaş Veli University, Turkey)
Tapani Alatossava (University of Helsinki, Finland)
Patricia-Munsch Alatossava (University of Helsinki, Finland)
Muhammet Arıcı (Yıldız Technical University, Turkey)
Iuliana Aprodu (Dunarea de Jos University of Galati, Romania)
Adriana Pavesi Ariseto (State University of Campinas, Brazil)
Ahmet Ayar (Sakarya University, Turkey)
Zehra Ayhan (Sakarya University, Turkey)
Jurislav Babić (University of Osijek, Croatia)
Chockry Barbana (Canadian Food Inspection Agency, Canada)
Ali Bayrak (Ankara University, Turkey)
Noredine Benkerroum (Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Morocco)
Yavuz Beyatlı (Gazi University, Turkey)
Kamil Bostan (Istanbul Aydın University, Turkey)
Rajka Božanić (University of Zagreb, Croatia)
Cengiz Caner (Çanakkale Onsekiz Mart University, Turkey)
Oana Emilia Constantin (Dunarea de Jos University of Galati, Romania)
Abdullah Çağlar (Afyon Kocatepe University, Turkey)
İbrahim Çakır (Abant İzzet Baysal University, Turkey)
Songül Çakmakçı (Atatürk University, Turkey)
İlyas Çelik (Pamukkale University, Turkey)
Utku Çopur (Uludağ University, Turkey)
Ahmet Hilmi Çon (Ondokuz Mayıs University, Turkey)
Mehmet Demirci (Namık Kemal University, Turkey)
Cynthia Ditchfield (University of Sao Paulo, Brazil)
Maria Elisabetta Guerzoni (University of Bologna, Italy)
Fahrettin Göğüş (Gaziantep University, Turkey)
Şebnem Harsa (İzmir Institute of High Technology, Turkey)
Arif Hepbaşlı (Ege University, Turkey)
Seda Ersus (Ege University, Turkey)
Adnan Hayaloğlu (İnönü University, Turkey)
Yekta Göksungur (Ege University, Turkey)
Mehmet Güven (Çukurova University, Turkey)
Filiz İçier (Ege University, Turkey)
Kadir Halkman (Ankara University, Turkey)
Hasan Fenercioğlu (Çukurova University, Turkey)
Mükerrem Kaya (Atatürk University, Turkey)
Semra Kayaardı (Celal Bayar University, Turkey)
Yonca Karagül-Yüceer (Çanakkale Onsekiz Mart University, Turkey)
Harun Kesenkaş (Ege University, Turkey)
Meral Kılıç (İstanbul Technical University, Turkey)
Piotr Koczon (Warsaw University of Life Sciences, Poland)
Celalettin Koçak (Ankara University, Turkey)
Ergun Köse (Celal Bayar University, Turkey)
Ahmet Küçükçetin (Akdeniz University, Turkey)
Mine Anđ Küçükker (İstanbul University, Turkey)
Erdoğan Küçüköner (Süleyman Demirel University, Turkey)
Jung Hoon Lee (Fort Valley State University, USA)
Sebahattin Nas (Pamukkale University, Turkey)
Gülден Ova (Ege University, Turkey)
Zümrüt B. Ögel (Konya Food and Agriculture University, Turkey)
Semih Ötleş (Ege University, Turkey)
Halil Özbaş (Süleyman Demirel University, Turkey)
Beraat Özçelik (İstanbul Technical University, Turkey)
Filiz Özçelik (Ankara University, Turkey)
Sami Gökhan Özkal (Pamukkale University, Turkey)
Mustafa Zafer Özel (University of York, UK)
Barbaros Özer (Ankara University, Turkey)
Edward Pospiech (Poznan University of Life Sciences, Poland)
Konstantinos Petrotos (Technological Educational Institute of Larissa, Greece)
Pican Prabasanar (CSIR-Central Food Technological Research Institute, India)
Jenny Ruales (Escuela Politécnica Nacional, Ecuador)
Osman Sağdıç (Yıldız Technical University, Turkey)
Saulius Satkauskas (Vytautas Magnus University, Lithuania)
Meltem Serdaroğlu (Ege University, Turkey)
Reyad R. Shaker (Jordan University of Science & Technology, Jordan)
Romeo Toledo (University of Georgia, USA)
Mahir Turhan (Mersin University, Turkey)
Yahya Tülek (Pamukkale University, Turkey)
Harun Uysal (Ege University, Turkey)
Mustafa Üçüncü (Ege University, Turkey)
Y. Sedat Velioğlu (Ankara University, Turkey)
Ünal Rıza Yaman (Ege University, Turkey)
Ayдын Yapar (Pamukkale University, Turkey)
Hasan Yetim (Erciyes University, Turkey)
Atıla Yetişemiyen (Ankara University, Turkey)
Metin Yıldırım (Ömer Halisdemir University, Turkey)
Ufuk Yücel (Ege University, Turkey)

AKADEMİK GIDA

ABSTRACTED / INDEXED / LISTED IN

1. Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases
 2. Academic Index
 3. Academic Keys
 4. AgBiotech News and Information
 5. AgBiotechNet
 6. Agricultural Economics Database
 7. Agricultural Engineering Abstracts
 8. Agroforestry Abstracts
 9. Animal Breeding Abstracts
 10. Animal Production Database
 11. Animal Science Database
 12. Biocontrol News and Information
 13. Biofuels Abstracts
 14. Botanical Pesticides
 15. CAB Abstracts
 16. CAB Direct
 17. Crop Science Database
 18. Dairy Science Abstracts
 19. Directory of Research Journals Indexing (DRJI)
 20. EBSCO
 21. Environmental Impact
 22. Environmental Science Database
 23. Eurasian Scientific Journal Index
 24. Field Crop Abstracts
 25. Food Science and Technology Abstracts (FSTA)
 26. Forest Science Database
 27. Global Health
 28. Google Scholar
 29. Horticultural Science Abstracts
 30. Horticultural Science Database
 31. Index Copernicus
 32. Impact Factor Services for International Journals (IFSIJ)
 33. International Innovative Journal Impact Factor (IIJIF)
 34. Ideal Online
 35. Journal Index Net
 36. Maize Abstracts
 37. Nutrition Abstracts and Reviews Series A: Human and Experimental
 38. Nutrition Abstracts and Reviews Series B: Livestock Feeds and Feeding
 39. Nutrition and Food Sciences Database
 40. Ornamental Horticulture
 41. Parasitology Database
 42. Plant Breeding Abstracts
 43. Plant Genetic Resources Abstracts
 44. Plant Genetics and Breeding Database
 45. Plant Protection Database
 46. Postharvest Abstracts
 47. Potato Abstracts
 48. Poultry Abstracts
 49. Protozoological Abstracts
 50. Review of Agricultural Entomology
 51. Review of Aromatic and Medicinal Plants (RAMP)
 52. Review of Medical and Veterinary Entomology
 53. Review of Medical and Veterinary Mycology
 54. Review of Plant Pathology
 55. Rice Abstracts
 56. Rural Development Abstracts
 57. Science Library Index
 58. Scientific Indexing Services (SIS)
 59. Seed Abstracts
 60. Soil Science Database
 61. Soils and Fertilizers Abstracts
 62. Soybean Abstracts
 63. Sugar Industry Abstracts
 64. Tropical Diseases Bulletin
 65. The Turkish Academic Network and Information Centre Life Sciences Database (TÜBİTAK-ULAKBİM Yaşam Bilimleri Veritabanı)
 66. Veterinary Science Database
 67. VetMed Resource
 68. Weed Abstracts
 69. Wheat, Barley and Triticale Abstracts
 70. World Agricultural Economics and Rural Sociology Abstracts (WAERSA)
-
-

Akademik Gıda 15 (3) (2017)
İÇİNDEKİLER / CONTENTS

■ Editörden / Editorial

■ MAKALELER / PAPERS

■ Araştırma Makaleleri / Research Papers

Modified Low Glycemic Index Ingredients in Noodle Processing: Rheology and Microstructural Characteristics / Erişte Üretiminde Modifiye Düşük Glisemik İndeksli Bileşenlerin Kullanımı: Reoloji ve Mikroyapı Özellikleri / Srinivasan Bharath Kumar, Pichan Prabhasankar

211-221

Optimized Top-Spray Fluidized Bed Coating Method of Rice Coated with Bauhinia strychnifolia Craib. Solution / Bauhinia strychnifolia Craib. Çözeltisi ile Kaplanmış Pirincin Optimize Edilmiş Üst Sprey Akışkan Yatak Kaplama Yöntemi / Wasan Duangkhamchan, Sudathip Inchuen, Srinual Jantathai, Kriangsak Banlue, Sirithon Siriamornpun

222-232

Bioutilization of Cheese Whey and Corn Steep Liqour by Heterotrophic Microalgae Cryptocodium cohnii for Biomass and Lipid Production / Peyniraltı Suyu ve Mısır Islatma Şurubunun Heterotrofik Mikroalg Cryptocodium cohnii ile Biyokütle ve Yağ Üretimi Amacıyla Biyolojik Olarak Değerlendirilmesi / Müge Isleten-Hosoglu, Murat Elibol

233-241

Inactivation of Salmonella Enteritidis on Almonds by Pulsed Light Treatment / Atımlı Işık Uygulaması ile Bademde Salmonella Enteritidis İnaktivasyonu / Manolya Eser Oner

242-248

Isıl İşlem Görmüş İçme Sütlerinde (Pastörize, UHT ve Laktozsuz UHT Süt) Hidroksimetilfurfural İçeriğinin Belirlenmesi / Determination of Hydroxymethylfurfural Content of Heat-Treated Milk (Pasteurized, UHT and Lactose-Hydrolysed UHT Milk) / Müge Urgan, Turkuaz Ecem Saatli, Aysin Türk, Nurcan Koca

249-255

Farklı Oranlarda Peynir Altı Suyu Kullanımı ile Üretilen Ayranların Bazı Özellikleri / Some Properties of Ayran Samples Produced with Different Ratios of Whey / Nazlı Türkmen, Ceren Akal, Celalettin Koçak

256-260

Açıkta ve Ambalajlı Olarak Satışa Sunulan Kırmızıbiberlerde Sentetik Boya Varlığı / Presence of Synthetic Dyes in Red Peppers Sold in Bulk and Packages / Hasan Yiğit, Ahmet Levent İnanç,

261-268

Nar Sosunda Kromatografik Yöntemle Bazı Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Analizi / Chromatographic Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Pomegranate Sauces / Bugra Dayi, Hatice Ardağ Akdoğan, Abdullah Akdoğan

269-273

Kabak (Cucurbita pepo L.) Tozunun Kek Üretiminde Potansiyel Kullanımı ve Kek Kalite Parametrelerine Etkisi / Potential Use of Pumpkin (Cucurbita pepo L.) Powder in Cake Production and its Effect on Cake Quality Parameters / Cem Baltacıoğlu, Mehmet Uyar

274-280

■ Derleme Makaleler / Review Papers

Elektropüskürtme Yönteminin Probiyotik Mikroorganizmaların Mikrokapsülasyonunda Kullanımı / Use of Electrospray Technique in Microencapsulation of Probiotic Microorganisms / Firuze Ergin, Ahmet Küçükçetin, Ayhan Oral, Oğuz Gürsoy

281-287

Nisinin Sinerjistik Antimikrobiyel Etkisi / Synergistic Antimicrobial Effect of Nisin / Burcu Özel, Ömer Şimşek,

288-299

Geleneksel Fermente Bir İçecek: Boza / A Traditional Fermented Beverage: Boza / Hacer Levent, Özge Algan Cavuldak

300-307

Farklı Tuz Konsantrasyonlarının Beyaz Peynirlerdeki Starter Kültür Bakterilerinin Canlılıklarına Etkisi / Effect of Different Salt Concentrations on Starter Culture Viability in White Cheese Brines / Reyhan İrkin

308-314

Yağlı Tohum Kabuklarının Biyoaktif Bileşen Potansiyeli ve Gıdalarda Kullanımı / Bioactive Component Potential of Oilseed Hulls and their Use in Food Products / Elif Öztürk, Gülden Ova

315-321

■ Akademik Gıda Dergisi Yazım Kuralları / Guidelines to Authors



Sahibi

SİDAS MEDYA AJANS TANITIM
DANIŞMANLIK LTD. ŞTİ. Adına
İmtiyaz Sahibi ve Yazı İşleri Sorumlusu
Şakir SARIÇAY

Genel Yayın Yönetmeni

Şakir SARIÇAY
info@akademikgida.com
ssaricay@gmail.com

Editör

Prof. Dr. Oğuz GÜRSOY
ogursoy@yahoo.com

Yardımcı Editörler

Prof. Dr. Özer KINIK
Prof. Dr. Ramazan GÖKÇE
Prof. Dr. Yusuf YILMAZ

Reklam Müdürü

Nurcan AKMAN ŞENGÖR

Hukuk Danışmanı

Av. Yrd. Doç. Dr. Murteza AYDEMİR

Abone Sorumlusu

Halil SOLAK

Grafik Tasarım

İrem ŞİMŞEK ÇETİNKAYA

Yönetim Yeri

Fevzipaşa Bulv. Çelik İş Merkezi
No:162 Kat:3 D:302 Çankaya/İZMİR
Tel: 0 232 441 60 01
Fax: 0 232 441 61 06

Üç Ayda Bir Yayınlanan Dergimiz
Basın Meslek İlkelerine Uymaktadır.

Yıl / Cilt: 15

Sayı: 77

Temmuz - Eylül 2017

ISSN Print 1304-7582

ISSN Online 2148-015X

Akademik Gıda Dergisi

Bir **SİME-DYAR** Yayınıdır.

GRUP

Yayın Türü: Yerel Süreli
Akademik Gıda Dergisi Hakemli Dergidir.

Akademik Gıda dergisinin 15. yayın yılının üçüncü sayısında sizlerle birlikteyiz. Bu sayımızda 9 araştırma ve 5 derleme çalışması olmak üzere toplam 14 makale yer almaktadır.

TÜBİTAK-ULAKBİM'in Haziran ayında tarafımıza gönderdiği bir yazıda, yazar adından yapılan yayın/atıf taramalarında isim benzerlikleri, soyadı değişikliği, Türkçe harf içeren isimler, farklı yazımlar, kurum değişiklikleri gibi durumların sorun oluşturabildiği ve bu nedenle araştırmacıların tanımlayıcı kimlik/numara (ID) edinmelerinin önemli olduğu vurgulanmıştır. ULAKBİM TR Dizin sistemlerinde tanımlayıcı ID bilgilerine yer vereceğinden ve standardizasyonun sağlanabilmesi ve YÖK ile birlikte yürütülecek ortak çalışmalarda ORCID® kullanılacağı için, TR Dizin'de yer alan veya yer almak üzere başvuran dergilerin, yazarlardan ORCID® bilgilerini talep etmeleri ve dergide/makalelerde bu bilgiye yer vermeleri tavsiye edilmiştir. ORCID®, Open Researcher ve Contributor ID'nin kısaltmasıdır. ORCID®, Uluslararası Standart Ad Tanımlayıcı (ISNI) olarak da bilinen ISO Standardı (ISO 27729) ile uyumlu 16 haneli numaralı bir URI'dir. ORCID® numarası olmayan araştırmacılar <http://orcid.org> adresinden bireysel ORCID® numarası için ücretsiz kayıt oluşturabilmektedir. Dergimizde makale yazarlarının ORCID® numaralarının verilmesi uygulaması 2017 yılı ikinci sayımızda başlamıştır. Dergimize yeni makale gönderecek olan araştırmacıların makalelerine tüm yazarların ORCID® numaralarını eklemeleri gerekmektedir. Tüm yazarların ORCID® numara bilgisi sağlanmayan makaleler dergimizde yayımlanmayacaktır.

Bu yıl ve önümüzdeki yıllarda daha fazla ulusal ve uluslararası veri tabanı ve indekste dizinlenmek ve derginin uluslararası düzeyde tanınırlığını arttırmak için çalışmalarımızı sürdürüyoruz. Dergimizin kalitesini ve uluslararası alanda saygınlığını arttırabilmemiz için etki faktörünün yükseltilmesi başlıca hedeflerimiz arasındadır. Bu nedenle siz değerli bilim insanlarından gerek dergimize ve gerekse diğer ulusal ve uluslararası dergilere gönderdiğiniz makalelerde Akademik Gıda dergisinde yayımlanan makalelere mümkün olduğunca atıf yapmanızı tekrar rica ediyoruz.

Katkılarınızla dergimizin daha iyi noktalara geleceğine yürekten inanıyoruz. Ayrıca, dergimizde araştırma makalelerinin ve İngilizce olarak yazılan makalelerin değerlendirme ve yayınlanma sürelerinin diğer makalelere kıyasla oldukça kısa olduğunu yazarlarımıza tekrar hatırlatmak istiyoruz.

Bu sayının oluşmasında katkıda bulunan; çalışmalarını yayımlanmak üzere dergimize gönderen yazarlara ve bu çalışmaları titizlikle değerlendiren yayın kurulu üyelerimiz ve hakemlerimize teşekkürlerimizi sunuyoruz.

Saygılarımızla.

Prof. Dr. Oğuz Gürsoy
Editör

Prof. Dr. Özer Kinik
Prof. Dr. Ramazan Gökçe
Prof. Dr. Yusuf Yılmaz
Yardımcı Editörler

BİLİMSEL ETKİNLİKLER

The 8th International Symposium EuroAliment

Romanya'da bulunan Galati Dunarea de Jos Üniversitesi Gıda Bilimi ve Mühendisliği Fakültesi tarafından 7-8 Eylül 2017 tarihlerinde the 8th International Symposium EuroAliment isimli sempozyum düzenlenecektir. Sempozyumla ilgili bilgilere www.euroaliment.ugal.ro/ adresinden ulaşılabilir.

International Honey Commission Congress 2017

Uluslararası Bal Komisyonu tarafından 25-28 Eylül 2017 tarihlerinde Maritim Pine Beach Hotel'de (Belek, Antalya) gerçekleştirilecek olan Uluslararası Bal Komisyonu Kongresi 2017 ile ilgili detaylı bilgilere <http://ihc2017antalya.com/> adresinden ulaşılabilir.

İç Anadolu Bölgesi 3. Tarım ve Gıda Kongresi

Tarım ve gıda alanındaki gelişmeleri gündeme getirmek ve yeni işbirliklerine olanak sağlamak amacıyla düzenlenen İç Anadolu Bölgesi Tarım ve Gıda Kongresi'nin (TARGID) 3'sü 26-28 Ekim 2017 tarihlerinde uluslararası katılımlı olarak Cumhuriyet Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünün ev sahipliğinde Sivas'ta gerçekleştirilecektir. Kongre ile ilgili bilgilere <http://www.targid.org/> adresinden ulaşılabilir.

10. Gıda Mühendisliği Kongresi

Gıda Mühendisleri Odası tarafından iki yılda bir düzenlenmekte olan Gıda Mühendisliği Kongrelerinin onuncusu 9-11 Kasım 2017 tarihlerinde Side La Grande Resort Hotel & SPA'da (Side, Antalya) gerçekleştirilecektir. Kongre ile ilgili bilgilere www.gidamuhendiliginkongresi.org adresinden ulaşılabilir.

II. Uluslararası Turizm ve Mikrobiyal Gıda Güvenliği Kongresi

Akdeniz Üniversitesi Manavgat MATSO Turizm Fakültesi tarafından düzenlenmekte olan Uluslararası Turizm ve Mikrobiyal Gıda Güvenliği Kongresinin ikincisi 13-14 Aralık 2017 tarihlerinde Trendy Verbena Beach (Side, Antalya) otelde gerçekleştirilecektir. Kongre ile ilgili bilgilere <http://www.turizmve mikrobiyalgidaguenligi.com> adresinden ulaşılabilir.

4th International Symposium on Traditional Foods from Adriatic to Caucasus

Namık Kemal Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü tarafından 2010 yılından bu yana bir farklı ülkelerde gerçekleştirilen Adriyatik'ten Kafkaslara Geleneksel Gıdalar Sempozyumlarının dördüncüsü 19-21 Nisan 2018 tarihlerinde Namık Kemal Üniversitesi ve Yakın Doğu Üniversitesi işbirliği ile Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde gerçekleştirilecektir. Kongre ile ilgili bilgilere <http://traditionalfoods2018.com/> adresinden ulaşılabilir.

3rd International Congress on Food Technology

Üçüncü Uluslararası Gıda Teknolojisi Kongresi 7-9 Kasım 2018 tarihlerinde Kapadokya'da gerçekleştirilecektir. Kongre ile ilgili bilgilere <http://www.intfoodtechno2018.org/> adresinden ulaşılabilir.

Modified Low Glycemic Index Ingredients in Noodle Processing: Rheology and Microstructural Characteristics

Srinivasan Bharath Kumar , Pichan Prabhasankar 

Flour Milling Baking and Confectionery Technology Department, CSIR-Central Food Technological Research Institute, Mysore 570 020, India

Received (Geliş Tarihi): 23.03.2017, Accepted (Kabul Tarihi): 04.10.2017

✉ Corresponding author (Yazışmalardan Sorumlu Yazar): psankar@cftri.res.in (P. Prabhasankar)

☎ 91 821 2517730 📠 91 821 2517233

ABSTRACT

Low glycemic index ingredients are now getting attention due to their effect on human nutrition and health. Modification of these ingredients further enhances the beneficial properties of food products. Objective of the study was to modify some of the low GI ingredients such as *rajma*, guar, guar seed and oats with different chemical treatments. These chemical treatments were earlier used for the modification of starches. Studies on the modification of complex foods having both starch and proteins were scanty. These modification techniques yielded some ingredients which had improved rheological behavior and also enhanced product quality parameters. Modification of ingredients has become a new innovation in food technology, with ease of preparation and utilization. These ingredients can be used in a variety of foods from bakery to pasta products. These are having worthy nutritive principles which are beneficial for several health related issues. Further study is needed to understand the molecular changes during modification.

Keywords: Modified low glycemic index ingredients, Chemical modification, Succinic anhydride, Rheology, Scanning electron microscope

Erişte Üretiminde Modifiye Düşük Glisemik İndeksli Bileşenlerin Kullanımı: Reoloji ve Mikroyapı Özellikleri

ÖZ

Düşük glisemik indekse sahip gıda bileşenleri insan beslenmesi ve sağlığı üzerindeki etkileri nedeniyle son yıllarda dikkat çekmektedir. Bu bileşenlerin modifikasyonu, ürünün yararlı özelliklerini daha da iyileştirmektedir. Bu çalışmanın amacı, *rajma*, guar, guar tohumu ve yulaf gibi bazı düşük glisemik indekse sahip bileşenlerin farklı kimyasal işlemlerle modifikasyonudur. Bu kimyasal işlemler daha önce nişastaların modifikasyonu için kullanılmıştır. Nişasta ve protein içeren kompleks gıdaların modifikasyonu üzerine çalışmalar oldukça yetersizdir. Bazı bileşenlere uygulanan modifikasyon teknikleri, reolojik davranışları iyileştirdiği gibi ürün kalite parametrelerini de geliştirmiştir. Gıda bileşenlerinin modifikasyonu, hazırlanma ve kullanma kolaylığı ile gıda teknolojisinde bir yenilik haline gelmiştir. Söz konusu bileşenler fırıncılık ürünlerinden makarna ürünlerine kadar birçok gıdada kullanılabilir. Bunlar sağlık ile ilgili birçok konuda faydalı olan değerli besleyici özelliklere sahipler. Bileşenlerin modifikasyonu sırasında ortaya çıkan moleküler değişiklikleri anlamak için daha fazla çalışmanın yapılması gereklidir.

Anahtar Kelimeler: Modifiye düşük glisemik indeksli bileşenler, Kimyasal modifikasyon, Süksinik anhidrit, Reoloji, Taramalı elektron mikroskobu

INTRODUCTION

Glucose is one of the major energy sources for human body. Glucose is used by brain, muscle and other organs as a fuel to perform their regular action. Glycemic index of glucose is set at 100 and all other food groups are compared to this and classified as low medium and high glycemic index (GI) foods. Foods having GI of less than 55, 55-69 and more than 70 are known as low, medium and high GI respectively. Low GI foods affect blood glucose and also insulin sensitivity, with slow digestion and absorption properties. Low GI foods are boon for the diabetics, as this assists in maintaining their blood glucose levels for a normal living [1]. Low GI ingredients occur in all food groups, in pulses pea, lentil, rajma, chickpea. In vegetables all high fiber vegetables, among which cluster bean (guar) stands first. Green leafy vegetables are also known to be low GI [2]. Some earlier studies reported tubers also show low GI after consumption [3].

Modification of low GI ingredients helps in improving the physico-chemical and organoleptic characteristics of the products. With modification there was improvement in texture and sensory characteristics of the noodles [4]. Plenty of studies emphasized on the influence of modified starches on the product quality features. Modified starches have shown positive effect in product structure, flavour and also nutritional aspects [5]. To improve the nutritional properties of the products different modification techniques like chemical and enzyme methods were used. Some of the earlier study reported the modification of a complex matrix (cereal flours), which consists of starch and proteins [6].

Even though there are enormous sources of low GI ingredients there lays a lacuna in utilizing these food groups in routine life. Some of the ingredients are not consumed by majority of the population. So, a carrier is needed to ensure the delivery of these beneficial ingredients for the people in need. In this background, noodle is selected as carrier because of its increasing popularity among all the age groups and also for its ease of preparation. Objective of the present study is to modify different low glycemic index ingredients and looking at the aspects of its effect on rheological and microstructural characteristics. It was also planned to use the modified ingredients in noodle processing and observing the effect on its product quality parameters.

MATERIALS and METHODS

Procurement and Processing of Raw Materials

Main raw material for noodle processing is *T. durum* semolina. Same was purchased from local market. Low GI ingredients such as rajma bean (*Phaseolus vulgaris* L.), oats flour (*Avena sativa*) and guar (*Cyamopsis tetragonoloba*) were also obtained from local market. Other raw material guar seed was gifted by Lotus Gums & Chemicals (Rajasthan, India). The procured materials (rajma and guar seeds) were cleaned and ground in chakki flour mill to required particle size and stored until further use. Guar was blanched according to

method described by Ranganna [7] and dried in cabinet air drier, until completely dried. Dried guar pods were then powdered and stored. Selection of low GI ingredients was based on the preliminary optimization studies, in which GI of the ingredients were analyzed and formulations were optimized accordingly. Enzymes like pepsin, invertase, amyloglucosidase and pancreatic α -amylase were procured from Sigma Chemicals, USA. All other chemicals used for modification were of analytical grade unless and otherwise mentioned.

Optimization Studies

Initially noodles were formulated using different low GI ingredients such as rajma flour (GI-32), oats flour (GI-52), guar flour (GI-32) and guar seed flour (GI-41) with base material *T. durum* (GI-75). These low GI ingredients were blended with *T. durum* flour at different proportions. Blends were subjected to rheological characterization. Noodles were prepared with the blends utilizing the method of Bharath Kumar and Prabhasankar [8]. Prepared noodles were analyzed for its physico-chemical, sensory and *in vitro* digestibility properties. Results of the above products were analyzed and an optimized formulation was finalized for further modification to improve product quality characteristics. On basis of this, 20% rajma flour, 30% oats flour, 10% guar powder and 7.5% guar seed powder was taken for the modification study.

Rheological Characteristics of Modified Flour Blends

Rheological study of the unmodified and modified optimized blends were carried out using Farinograph (AACC, 54-21) reports water absorption, dough development time and dough stability which plays a vital role in product quality. Amylograph (AACC, 22-10.01) to understand the pasting properties and amylase enzyme activity of the modified flour blends. Alveograph (AACC, 54-30A) to recognize the visco-elastic properties of the dough. Rheological properties were determined according to the standard AACC methods [9].

Modification of Ingredients and Noodle Formulation

Optimized levels of the low GI ingredients were set and taken for modification. Modification was carried out by altering pH to alkaline condition using sodium bicarbonate, esterification with succinic anhydride, octenylsuccinic anhydride and treating with potassium permanganate solution. Modification procedure was adopted by Bharath Kumar and Prabhasankar [6] with some variations. In brief; optimized blends were brought to respective alkaline pH while mixing in the Spar mixer with the addition of sodium bicarbonate, while dough was checked frequently for the pH with dough pH analyzer. For esterification [6,10] octenylsuccinic anhydride (3.0% of the weight of starch in the sample) and succinic anhydride (4% starch basis) were added, by maintaining the pH of the dough at 8.5. Another modification using potassium permanganate solution was also carried out by adopting the method used by

Takizawa [11], with some minor modification for this 0.01% of potassium permanganate was used in acidic condition during dough forming. Use of all the chemicals for modification is according to Food and Drug Administration (FDA) regulations. Noodles were formulated according to the method followed by Bharath Kumar and Prabhasankar [8]. Modified dough was rested for 5-10 min and later it was sheeted and cut into noodles using lab scale noodle making machine (Imperia Restaurant, Italy). Then noodles were dried at 50°-55°C for 2 h in a cabinet tray drier. The dried noodles were cooled and packed until further utilization in poly propylene packages.

Chemical Composition

Noodles were analysed for protein and dietary fiber according to the AOAC methods [12]. Micro-Kjeldahl method was used to determine nitrogen contents noodles [13]. In order to calculate protein content from nitrogen determination a conversion factor 5.7 was used for control noodles and a contribution of nitrogen from non-wheat ingredients was calculated using factor of 6.25. All the values were reported on dry basis.

Cooking Quality of Noodles

Prepared noodles both unmodified and modified were subjected for cooking quality evaluation adopting the method from AACC (66-50) [9]. Noodles were cut to 5cm approximately by length. Weighed amount of sample (25g) was put in 250mL of boiling water and examined the time until noodles were completely cooked. Gruel was drained and collected for the solid

leach out analysis. Cooked samples were analyzed for its texture, colour and sensory properties.

Sensory Analysis using Quantitative Descriptive Analysis (QDA)

Prepared products were evaluated for their quality characteristics and for its acceptance. Panelists who regularly participate in evaluating the noodles were selected (Male and Female; 10-15). QDA method to analyze the products was used for the study. This methodology was developed by Stone and Sidel [14]. Method for the sensory evaluation was followed according to Bharath Kumar and Prabhasankar [8]. Later obtained results were correlated and graphically represented as sensory profiles.

Percentage of Starch Gelatinization

Percentage starch gelatinization was estimated using the method of Bharath Kumar and Prabhasankar [15]. In brief, cooked noodles were freeze dried and approximately 2g of the powdered samples was taken in 100mL of distilled water and mixed for 2min using magnetic stirrer at room temperature (27°C). Suspension was centrifuged at 1500g for about 10min. 1 mL of supernatant was mixed with 1mL of iodine solution (4% potassium iodide and 1% resublimed iodine). This solution mixture was made upto 10mL with distilled water and absorbance was read at 600nm immediately (A_1). 1mL iodine solution made upto 10mL was served as a blank (A_2). Absorbance was taken in triplicates. Percentage starch gelatinization was calculated using the equation-1;

$$\text{Percentage starch gelatinization (\%)} = \frac{A_1}{A_2} \times 100 \quad (1)$$

Instrumental Colour Measurement of Noodles

Cooked noodles were analysed for its colour attribute using Lab scan-XE (Reston, USA) equipped with a D65 illuminant with a 2° view angle and slit width of 2 mm. The 10g samples were placed in a quartz container provided with the equipment and placed on the slit opening. Surface colour of the noodles was measured. Measurement was carried out in triplicates and average value of the same was reported. The parameters L^* , a^* and b^* , indicating lightness ($L=100$) /darkness ($L=0$) dimensions, redness (+ve) to greenness (-ve) and yellowness (+ve) to blueness (-ve) of the samples respectively were recorded for the samples [16].

Instrumental Firmness of Noodles

Firmness of unmodified and modified noodles was measured using Texture analyzer model TA-XDi (Stable Micro Systems, UK) equipped with Warner Bratzler Blade for shear. Analysis was carried out with the procedure followed as Bharath Kumar and Prabhasankar [15]. The data thus obtained were analyzed statistically.

Microstructural characterization

Cooked and freeze dried fresh and dried noodle samples were scanned under scanning electron microscope according to the method described in Prabhasankar [17]. The samples were mounted on the specimen holder and sputter-coated with gold. Then, each sample was transferred to electron microscope (LEO 435 VP, USA) and observed for microstructural characteristics.

Statistical Analysis of Data

The mean scores ($n=4$) of individual attributes of all the tests were calculated. Duncan's new multiple range test [18] was applied to the data to find the significance difference between mean values of the samples.

RESULTS and DISCUSSION

Rheological Properties

Unmodified and modified flour blends were subjected to different rheological analysis using amylograph, farinograph and alveograph. Results of the same are

given in Table 1 and Fig.1, Fig.2. Amylograph analysis (Table 1) indicated that peak viscosity increased and also decreased with the modification of ingredients. This indicates the action of chemicals in both improving and inhibiting the pasting properties of the flour blends. Increase in peak viscosity may be due to inhibition of the amylase enzyme activity in the samples with the modification. Amylograph expresses the pasting characteristics and also amylase enzyme activity of the samples. It is clearly seen that with the increase in pH for rajma blends, swelling of the starch granules reduced with delay in the start of gelatinization time and temperature, which was 68.7°C (10.25min) for unmodified and increased to 80.7°C (12.17) for modified blends. Also there was a significant increase in the peak viscosity from 390 to 434BU, this is mainly because of the inhibited enzyme activity in the blend. Hot paste and cold paste viscosity indicates the pasting behavior, which was changed after modification. In case of potassium permanganate treated blends there was a reduction in stability of the paste compared to unmodified blends, indicated by the reduced hot paste viscosity from 379 to 292BU. The instability may be because of the oxidation of the starch and other protein molecules in the blends. The initiation of gelatinization also delayed compared to unmodified samples, as the oxidation of starch reduces the swelling power of starch molecules [19,20]. Even though CBSP has the highest

peak viscosity among all the samples, its stability was quite low. Hot paste viscosity reduced from 542 to 418BU, cold paste viscosity also followed the same trend with reduction from 884 to 621BU. Hot paste and cold paste viscosity of the unmodified blends was the highest among all the samples. This is due to its galactomannan content in guar seeds, which has high viscosity compared to any other ingredients [21]. Modified samples of CBP with OCT showed delayed gelatinization time from 9.80min (64.5°C) to 11.25min (78.4°C) with increase in gelatinization temperature. Also with modification there was a drastic reduction in peak viscosity from 392 to 285BU. Hot paste viscosity (292BU) and cold paste viscosity (411BU) was the lowest for this modified sample among all the samples. This may be correlated with the results of earlier study where jack beans starch was modified and observed changes in the peak viscosity [22]. Sample (oats) modified using SUCC showed higher initial gelatinization temperature from 63.5°C to 68.3°C. Also peak viscosity increased from 467 to 484BU and the paste was relatively stable compared to other pastes [23]. Stability of the paste is due to the high soluble fiber content in the sample. Cold paste viscosity reduced from 741 to 694BU, which shows the degradation of starch molecules after modification. Results were in line with earlier study where on modification with SUCC, the starch was reasonably stable [24].

Table 1. Amylograph analysis results

Samples	Beginning of gelatinization		Peak viscosity (BU)	Hot paste viscosity (BU)	Cold paste viscosity (BU)
	Time (min)	Temperature (°C)			
RF	10.25 ^b ±1.01	68.7 ^{bc} ±0.2	390 ^b ±10	381 ^b ±11	763 ^d ±21
RF 9.0	12.17 ^c ±1.11	80.7 ^e ±0.5	434 ^c ±8	464 ^{cd} ±20	542 ^b ±11
CBSP	9.64 ^a ±0.69	63.2 ^a ±0.9	498 ^c ±11	542 ^{cd} ±14	884 ^d ±14
CBSP KMnO ₄	10.41 ^b ±1.01	69.1 ^c ±0.4	451 ^c ±9	418 ^c ±15	621 ^c ±19
CBP	9.80 ^a ±0.98	64.5 ^b ±0.1	392 ^b ±7	379 ^b ±14	689 ^c ±17
CBP OCT	11.25 ^b ±1.25	78.4 ^d ±0.7	285 ^a ±6	292 ^a ±19	411 ^a ±15
OATS	9.71 ^a ±1.21	63.5 ^a ±0.5	467 ^c ±9	451 ^c ±22	741 ^d ±15
OATS SUCC	10.24 ^b ±1.11	68.3 ^{bc} ±0.4	484 ^c ±11	444 ^c ±14	694 ^c ±11

Values are mean±SD, n=4, Means in the same column with different letters differ significantly (p≤0.05), RF - 20% rajma flour with T. durum in noodles; RF 9.0 - RF modified with pH9.0; CBSP - 7.5% guar seed powder with T. durum in noodles; CBSP KMnO₄ - CBSP treated with potassium permanganate; CBP - 10% dried guar powder with T. durum in noodles; CBP OCT - CBP treated with octenyl succinic anhydride, OATS - 30% oats with T. durum in noodles; OATS SUCC - OATS treated with succinic anhydride.

Farinograph results (Fig. 2) showed that with modification there was an increase in the water absorption except in case of RF and its modified variants. Increase in water absorption from 68% to 73% was the highest in case of oats sample and reduction of water absorption from 64.9% to 60.4% was the lowest. Increase in the water absorption is mainly because of the dilution of gluten, which is one of the key factors to determine the water absorption and also water holding capacity of the dough. As the starch and also gluten component in the flour is modified with chemicals, dough development time significantly increased reaching close to 20 min, which is the maximum time for the test. Results of the study mimic the earlier study where addition of different edible fiber to the flour blend increased the water absorption and dough development time [25]. With the modification there exists a competition between starch and protein for water. Due to this dough will lose the property to hold water and lose its stability. Stability of modified flour differed

significantly from the unmodified flour samples. With the highest variation in CBP samples, where stability increased from 2.9 to 10.5, which was due to increase in insoluble fiber content in the CBP sample. Stability of the dough is mainly dependent on the gluten content in the dough. But here with the modification of RF with pH 9.0 increased the stability of the dough, which is because of the interference caused by the alkaline agent to the degradation of gluten [26]. It can be seen that with the modification of flours, time of breakdown for the dough increased significantly, this may be because of the modification which makes the dough to form gluten in the slower rate compared to the unmodified flour blends. Results can be comparable with the earlier study where addition of some hydrocolloids delayed the formation of gluten in the flour [27].

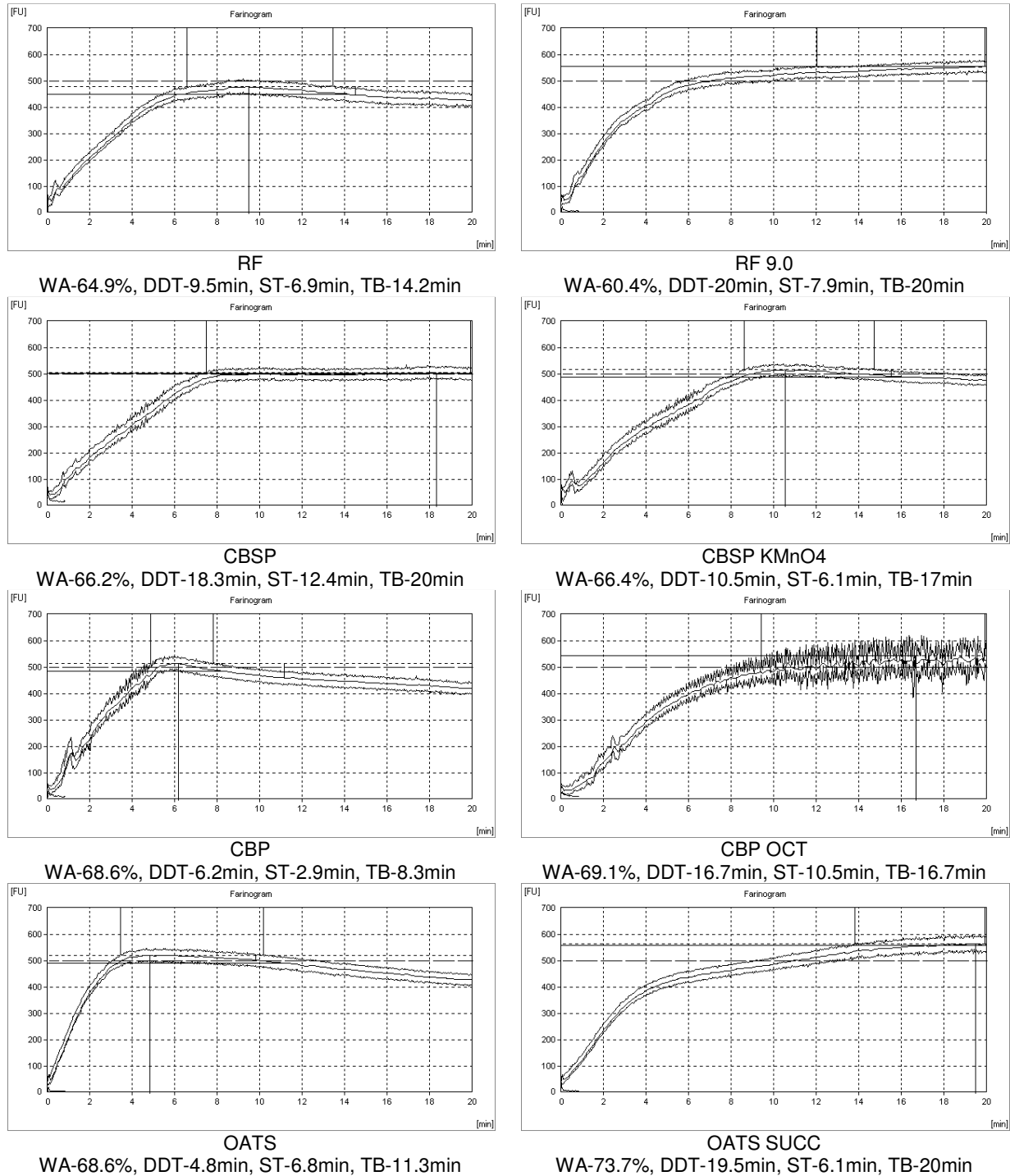


Figure 1. Farinograph characteristics of modified and unmodified flour blends (Sample name abbreviations are as per Table 1; WA-water absorption, DDT-dough development time, ST-stability, TB-time to breakdown)

Results of the alveograph (Fig. 3) revealed that with the modification 'P' value increased significantly which can be correlated with the results of farinograph, where stability of the dough increased with modification in flour blends. This may be because of the more pressure required for the dough to make it swell. But on the other hand index of swelling 'G' was reduced in the modified flour blends, this may be due to under-formation and

also breakdown of gluten in the dough with the modification. Also during modification using pH 9.0, there forms a polymeric complex in the sample, which is hard to break. So the instrument is blowing air to break the structure with increasing the maximum over-pressure (P). Deformation energy of the dough 'W' increased significantly, this is due to the deformation of starch and proteins in the dough during modification.

Higher P and W value indicates the strength of the dough. Among all the samples, oats flour modified with succinic anhydride showed higher 'P' value, indicating its strong fiber network, especially of soluble dietary

fiber. Upon esterification with succinic anhydride and octenyl succinic anhydride, a strong network was formed which has resisted the pressure applied.

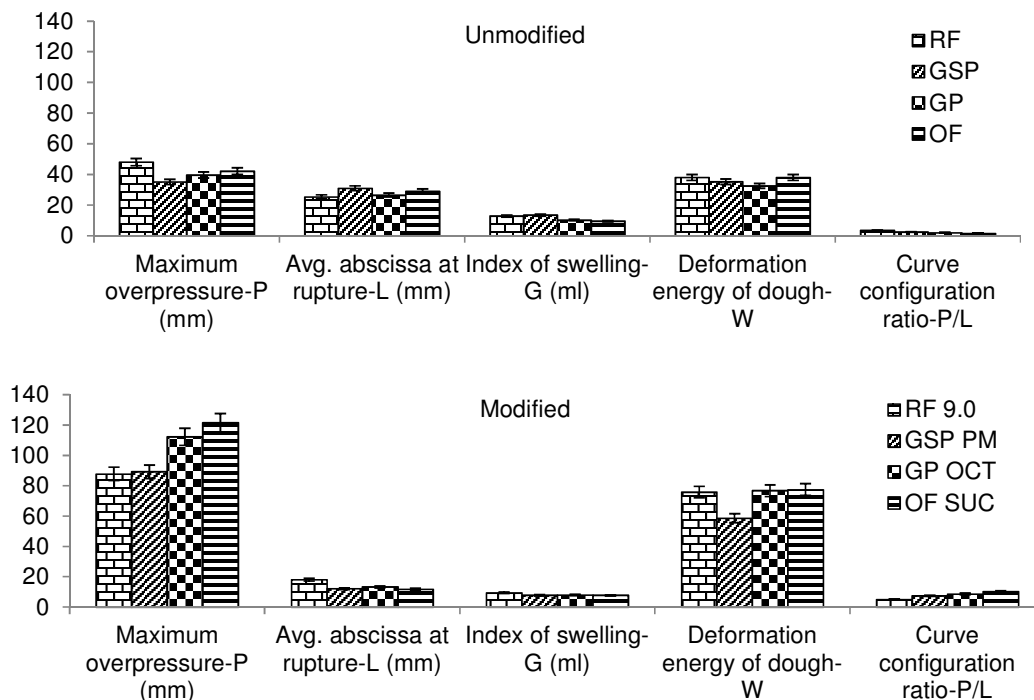


Figure 2. Alveograph characteristics of modified and unmodified blends (Sample name abbreviations are as per Table 1)

In a study Wang [25] observed that decrease in dough height expressed a decrease in extensibility and increased resistance to measurement. According to Van Vliet [28], a too high resistance can cause a limited and slow expansion, which can be suitable for the preparation of extrude products. Where, retention of gas cells and maximum expansion of the dough is not necessary. With SUC modification for oats sample there was highest P value among all the samples, may be due to high content of both soluble and insoluble fibers contributes to the increase in maximum overpressure. Results can be correlated with the earlier study of Dapcevic Hadnadev [24].

Chemical Composition

Chemical composition of modified and unmodified samples (Table 2) did not show any significant difference in terms of proteins. With highest protein content of 14% in RF incorporated samples and lowest in CBP containing samples (10.5%). Highest protein content in RF samples is due to the addition of pulse samples, usually pulses are rich source of proteins [29]. Lowest was seen on CBP samples, as this is a vegetable and having very less amount of proteins. Other samples like CBSP and oats also showed protein

content of around 13.9% and 11.2% respectively. Upon modification of samples there was no significant difference regarding protein content. Due to modification there were changes in dietary fiber content, which is evident by rheological analysis. Samples with RF showed reduced insoluble and enhanced soluble fiber content after modification (from 12.8% to 10.5% / from 1.5% to 2.1%). This may be due to action of alkali on fiber content of the noodles [30, 31]. There was some degradation of soluble dietary fiber in case of CBSP samples due to action of alkali. As CBSP is rich in soluble dietary fiber (galactomannans) action of alkali has reduced the soluble dietary fiber content in the sample from 4% to 2.5%. This may be due to entanglement of the fibers during modification and later on drying the properties of the fiber are reducing [32]. Apart from these two samples from CBP and oats did not show any significant difference in dietary fiber content. This shows oxidation of samples using potassium permanganate did not have any effect on the dietary fiber content of the samples. All the samples were having higher soluble dietary fiber content before and after modification. So, these samples will be beneficial for the people with different life style disorders [33].

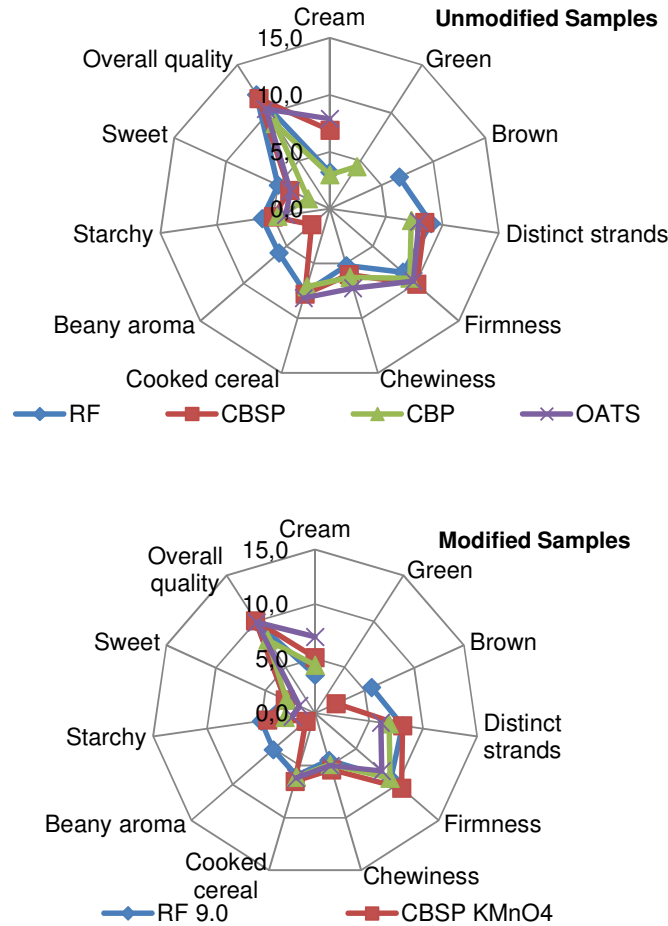


Figure 3. Sensory profile of unmodified and modified noodle samples (Sample name abbreviations are as per Table 1)

Table 2. Chemical composition and product characteristics as influenced by modification of ingredients

Parameter	RF	RF 9.0	CBP	CBP KMnO ₄	CBSP	CBSP OCT	OATS	OATS SUCC
Cooked weight (g)	53.8 ^b ±0.8	42.0 ^a ±1.0	48.4 ^a ±1.5	42.8 ^a ±1.8	57.9 ^b ±1.5	50.0 ^{ab} ±0.9	54.5 ^b ±1.1	50.8 ^{ab} ±0.4
Solid leach out (%)	5.0 ^b ±0.7	4.1 ^b ±0.1	6.9 ^c ±0.5	6.1 ^c ±0.0	3.2 ^a ±0.4	4.9 ^b ±0.2	5.5 ^b ±0.0	5.6 ^b ±0.0
Firmness (N)	2.14 ^b ±0.41	2.85 ^b ±0.42	2.43 ^b ±0.40	1.89 ^a ±0.12	3.11 ^c ±0.31	2.54 ^b ±0.20	2.99 ^{bc} ±0.11	2.11 ^b ±0.09
Colour	L*	53.1 ^b ±1.1	55.2 ^b ±2.1	41.9 ^a ±1.5	38.4 ^a ±1.1	56.2 ^b ±1.5	58.5 ^{bc} ±1.8	63.1 ^c ±1.5
	a*	5.7 ^b ±0.9	6.1 ^c ±0.5	1.87 ^a ±0.1	6.2 ^c ±0.2	2.5 ^a ±0.7	3.1 ^{ab} ±0.9	3.5 ^b ±0.2
	b*	12.5 ^b ±1.1	12.6 ^b ±1.5	22.9 ^a ±1.1	18.3 ^b ±0.8	18.4 ^b ±1.1	17.4 ^b ±1.2	17.7 ^b ±0.9
Protein (%)	14.1 ^b ±0.0	14.2 ^b ±0.0	10.5 ^a ±0.2	10.4 ^a ±0.5	13.9 ^b ±0.0	13.5 ^b ±0.7	11.2 ^a ±0.9	11.5 ^a ±0.0
Dietary fiber	Insoluble (%)	12.8 ^c ±0.8	10.5 ^b ±0.5	11.5 ^b ±0.8	10.2 ^b ±0.5	9.2 ^a ±0.2	9.5 ^a ±0.7	10.1 ^b ±0.7
	Soluble (%)	1.5 ^a ±0.3	2.1 ^b ±0.1	2.7 ^b ±0.1	3.0 ^c ±0.8	4.0 ^d ±0.1	2.5 ^b ±0.4	3.8 ^{cd} ±0.5
Percent gelatinization (%)	31 ^b ±1.2	20 ^a ±0.5	32 ^b ±0.9	21 ^a ±0.1	39 ^c ±0.8	32 ^b ±0.1	49 ^d ±0.4	45 ^d ±0.2

Values are mean±SD, n=4, * Freeze dried, Means in the same row with different letters differ significantly (p≤0.05), Sample name abbreviations are as per Table 1.

Cooking Quality of Noodles

Cooking quality of noodles plays a vital role in deciding the product quality characteristics. Results of the cooking quality are depicted in Table 2. Results revealed that with modification there was decrease in the cooked weight for all the samples, with highest reduction in case of RF incorporated noodles, this can be supported with the farinograph results, with reduced water absorption. Cooked weight reduced from 53.8g to 42g in RF samples. Least reduction is seen in oats and its modified variants (54.5g to 50.8g), this may be due to its difference in the dietary fiber content of the samples. Chemical modification also had an effect on solid leach out. Results revealed that with modification there was

reduction in solid leach out of RF and CBP samples. Reduction was from 5% to 4.1% (RF) and from 6.9% to 6.1% (CBP). This may be due to formation of strong network due to alkali treatment, which is evident from SEM results. Whereas, in case of CBSP and oats samples there was a slight increase was observed. Reduction of solid loss is due to less absorption of water during cooking and also reduced cooking time compared to unmodified samples [34]. Increase in solid loss is attributed to increase in the dietary fiber content in the samples. As the dietary fiber content increases, it disrupts the starch-protein matrix and starch is tending to leach out more. Results can be correlated with the earlier study where, with increase in the pea fiber in the pasta increased the solid loss in the samples [35].

Instrumental Colour Measurement of Noodles

Colour analysis (Table 2) of the sample revealed that with modification there was some notable changes in the samples. Lightness value (L^*) showed significant decrease in case of potassium permanganate treated sample with 41.9 for unmodified to 38.4 for modified. This is due to oxidation reaction, which made to change the colour of the samples. Increased L^* value was seen in pH modified samples, as alkali reaction reduced the pigments of RF and lightened the samples. Regarding a^* (redness/greenness), there was a significant change in CBP sample treated with potassium permanganate, which darkened the colour of the noodles. a^* value elevated from 1.87 to 6.2. Apart from this all other samples did not show any difference in a^* value. Now to explain b^* value (yellowness/blueness), again for CBP sample it was reduced after modification, indicating the reaction of permanganate on the sample. All other samples remained with slight change in the value.

Instrumental Firmness of Noodles

Noodles with good acceptance and palatability should have appealing texture and mouthfeel. Cooking procedure, cooking time and modification techniques also have effect on noodle firmness [36]. Results of the noodle firmness analysis were represented in Table 2. Noodles are analyzed mainly for their firmness property. Firmness of the noodles significantly reduced except in case of RF, where it was increased from 2.1N to 2.8N. Results showed that dietary fiber from the modified RF increased the firmness, which may be due to compact structure formation due to alkali treatment. Compact structure is contributed from protein and dietary fiber present in it. This is evident from the SEM analysis. Maximum reduction of firmness was seen in CBP and its modified variants, with 2.4N for unmodified and 1.9N for modified samples.

Sensory Analysis

For a product to be acceptable it should have appealing colour, flavour, texture and mainly taste. These parameters decide the quality of a product [37]. Sensory profile of unmodified and modified noodle samples was graphically represented as Fig. 3. Unmodified samples used for the study were optimized earlier to assess its quality parameter. These samples were further modified to improve the product quality and study the influence of modification on it. Upon modification major attributes required to judge the noodle quality remained unchanged. Surface colour of the modified samples slightly differed from the unmodified samples. Strands were distinct even after modification. Firmness score of the noodle strands increased in RF samples from 8.5 to 9.2, which can be correlated with the firmness analysis. As a desirable attribute chewiness did not change significantly still after modification. Overall quality score of the samples were above 7.5, so all the samples were acceptable. Highest overall quality score was obtained by RF (11.9) and lowest was CBP OCT (8.0) on a 15cm sensory scale.

Percentage of Starch Gelatinization

In cereal based foods like pasta and noodles, starch gelatinization plays a vital role for the depiction of product quality. As the product to be cooked under high heat condition (boiling), it should be kept in mind that product should not lose its structure during cooking. So, here gelatinization is crucial stage during cooking. Over and under gelatinized starches in products have some adverse effect during digestion of the food matrix. In this study it can be seen that with modification percentage of starch gelatinization reduced significantly among all the samples, with maximum reduction in case of RF and CBP treated with pH 3.0 and potassium permanganate respectively. Reduction of gelatinization is a positive sign for its slow releasing property of starch during digestion and absorption. Percentage gelatinization reduced from 31 to 20 (RF) and 32 to 21 (CBP), while for *T. durum* noodles it will be around 60%. So, reduction of percentage gelatinization has shown reducing starch digestibility [15]. In case of CBSP and oats treated with OCT and SUCC respectively, showed reduction to some extent from 39 to 32 (CBSP) and 49 to 45 (oats). Less reduction in gelatinization percentage is mainly due to its high dietary fiber content in the samples. Also in case of CBSP increased protein content can be seen, which also a reason to reduce the gelatinization. Negative effect of proteins on gelatinization was observed in previous study where sorghum was used as a protein source [38].

Microstructural Characterization

Microstructural analysis has to be carried out to understand the internal changes of the particles due to modification. Correlation of these results with other product quality characteristics gives firm knowledge about what is happening during modification. For example; this can be correlated with water absorption, firmness, starch digestibility and so on. Results of microstructural studies (Fig.4) indicated that with modification of RF using increased pH, there was a formation of polymerized structure. This explains the reduction of water absorption in farinograph analysis. Also reduced swelling of starches can be seen in the modified sample. In case of CBSP unmodified sample fiber matrix can be clearly seen, but with oxidation with potassium permanganate, disruption of the same can be seen. Starch granules and galactomannans from the guar were oxidized and less exposed in the matrix. In case of CBP, fiber matrix can be clearly visible with thread like structure in the unmodified sample. But in modified sample these type of structure is missing due to modification with OCT. As OCT act as emulsifier, a compact structure is seen in the modified samples. In case of oats, modification has disrupted the matrix. In unmodified samples starch granules were exposed and the same is absent in modified samples. These results can be correlated with the results of rheological data. Higher peak viscosity was observed in CBSP sample, here it can be seen that sample is having higher amount of starch granules embedded in protein matrix from both wheat and guar. Stability of modified CBP sample reduction in amylograph also explained here with

disruption of matrix, which losses holding capability. These fiber matrix aid in slow release of glucose during digestion and absorption, this is markedly reported by IVSD results. Also reduction in percentage gelatinization after modification in all the samples is also explained

well from the microstructural results. Results are comparable to earlier study where pea flour incorporated noodles made the structure firm, due to its fiber content [8].

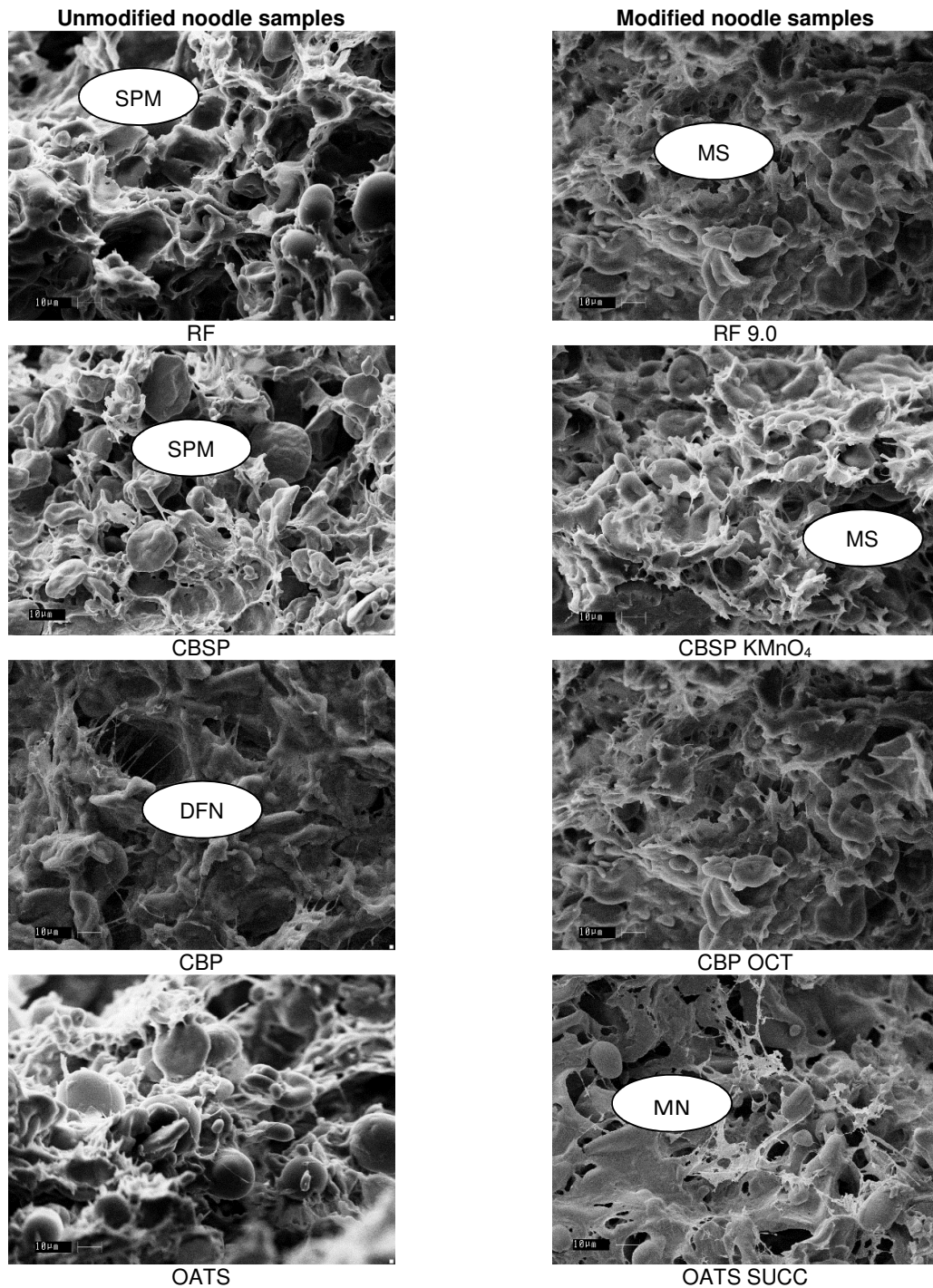


Fig. 4 Microstructural characterization of modified and unmodified ingredients in noodles (Sample name abbreviations are as per Table 1; SPM-starch protein matrix, MS-modified starches, MN-modified network, DFN-dietary fiber network)

CONCLUSION

Starch plays a vital role in deciding the end product quality. Also along with starch protein and other constituents also helps to improve the quality parameters. Present study aims to understand the relation and influence of chemically modified low GI ingredients on the rheological and microstructural properties on noodle dough. It is observed that upon modification several changes in their structural and functional properties have occurred. There was some changes in amylograph pasting characteristics, farinograph water absorption and alveograph maximum overpressure. These results were strongly evident by the microstructural representation. Also product quality like solid leach out, colour, texture (firmness) also showed some positive changes during analysis of modified samples, compared to their unmodified samples. After modification RF sample increased firmness and also soluble dietary fiber content. Colour of the potassium permanganate treated samples varied significantly due to its oxidative effect. Solid leach out of the modified and unmodified samples were within the acceptable level (<8%). So, these modified samples can be used in different product formulations to aid the people in need.

ACKNOWLEDGEMENT

The author Bharath Kumar S thanks Council of Scientific and Industrial Research (CSIR), New Delhi for the grant of senior research fellowship, Lotus Gums and Chemicals, Rajasthan for providing guar seeds at the required time as a gift and also CSIR-CFTRI for providing the necessary facilities to carry out this research work.

REFERENCES

- [1] Ludwig, D.S., 2002. The glycemic index: physiological mechanisms relating to obesity, diabetes, and cardiovascular disease. *The Journal of the American Medical Association* 287(18): 2414-2423.
- [2] Onayemi, O., Badifu, G.I.O., 1987. Effect of blanching and drying methods on the nutritional and sensory quality of leafy vegetables. *Plant Foods for Human Nutrition* 37(4): 291-298.
- [3] Yang, Y., Wang, H., Cui, H., Wang, Y., Yu, L., Xiang, S., Zhou, S., 2006. Glycemic index of cereals and tubers produced in China. *World Journal of Gastroenterology* 12(21): 3430-3433.
- [4] Bharath Kumar, S., Prabhasankar, P., 2014. Low glycemic index ingredients and modified starches in wheat based food processing: A review. *Trends in Food Science & Technology* 35(1): 32-41.
- [5] Singh, J., Kaur, L., McCarthy, O.J., 2007. Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications—A review. *Food Hydrocolloids* 21(1): 1-22.
- [6] Bharath Kumar, S., Prabhasankar, P., 2013. Modified ingredients in noodle processing and its effect on *in vitro* starch digestibility. Presented in 7th International Food Convention (IFCON), Mysore, India, December 18-21, 2013.
- [7] Ranganna, S., 1986. *Handbook of Analysis and Quality Control for Fruit and Vegetable Products*. India: Tata McGraw-Hill Education.
- [8] Bharath Kumar, S., Prabhasankar, P., 2015a. A study on noodle dough rheology and product quality characteristics of fresh and dried noodles as influenced by low glycemic index ingredient. *Journal of Food Science and Technology* 52(3): 1404-1413.
- [9] American Association of Cereal Chemists (AACC), 2009. Approved Methods of the AACC, 10 th edition. AACC Method 44-15A, One Stage Moisture Air Oven Method; AACC Method 08-01, Ash-Basic Method; AACC Method 46-13, Micro-Kjeldahl Method; AACC Method 22-10A; AOAC 991.43; Dietary fiber, AACC Method 16-50; Pasta Cooking Time- 66-50, AACC, AACC 2, method 54-21 St. Paul, Minnesota: AACC.
- [10] Han, J.A., BeMiller, J.N., 2007. Preparation and physical characteristics of slowly digesting modified food starches. *Carbohydrate Polymers* 67(3): 366-374.
- [11] Takizawa, F.F., Silva, G.O., Konkel, F.E., Demiate, I.M., 2004. Characterization of tropical starches modified with potassium permanganate and lactic acid. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 47(6): 921-931.
- [12] Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 2007. Official methods of analysis (18th ed.). Washington, DC, USA.
- [13] Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1995. Official methods of analysis (16th ed.). Washington, DC, USA.
- [14] Stone, H., Sidel, J.L., 1998. Quantitative descriptive analysis: developments, applications, and the future. *Journal of Food Technology* 52: 48-52.
- [15] Bharath Kumar, S., Prabhasankar, P., 2015b. A study on starch profile of *rajma* bean (*Phaseolus vulgaris*) incorporated noodle dough and its functional characteristics. *Food Chemistry* 180: 124-132.
- [16] Hutchings, J.B., 1994. Food color and appearance. Chapman and Hall, Blackie Academic and Professional, Great Britain and London.
- [17] Prabhasankar, P., Ganesan, P., Baskar, N., 2009. Influence of Indian brown seaweed (*Sargassum marginatum*) as an ingredient on quality, bio-functional and microstructure characteristics of pasta. *Food Science and Technology International* 15: 471-479.
- [18] Duncan, B.D., 1955. Multiple range and multiple F-tests. *Biometrics* 11:1-42.
- [19] Xiao, H., Lin, Q., Liu, G., Yu, F., 2012. A comparative study of the characteristics of cross-linked, oxidized and dual-modified rice starches. *Molecules* 17: 10946-10957.
- [20] Yeates, T.E., Babcock, G.E., Mehlretter, C.L., 1963. Permanganate oxidation of corn starch. Presented in 144th meeting of American Chemical

- Society, Los Angeles, California*, March 31- April 5, 1963.
- [21] Goycoolea, F.M., Morris, E.R., Gidley M.J., 1995. Viscosity of galactomannans at alkaline and neutral pH: evidence of 'hyperentanglement' in solution. *Carbohydrate Polymers* 27(1): 69-71.
- [22] Yusuf, A.A., Ayedun, H., Logunleko, G.B., 2007. Functional properties of unmodified and modified Jack bean (*Canavalia ensiformis*) starches. *Nigerian Food Journal* 25(2): 141-149.
- [23] Anttila, H., Sontag-Strohm, T., Salovaara, H., 2004. Viscosity of beta-glucan in oat products. *Agricultural and Food Science* 13: 80-87.
- [24] DapcevicHadnadev, T.R., Dokic, L.P., Hadnadev, M.S., Pojic, M.M., Torbica A.M., 2014. Rheological and breadmaking properties of wheat flours supplemented with octenyl succinic anhydride-modified waxy maize starches. *Food and Bioprocess Technology* 7(1): 235-247.
- [25] Wang, J., Rosell, C.M., Benedito de Barber, C., 2002. Effect of the addition of different fibres on wheat dough performance and bread quality. *Food Chemistry* 79(2): 221-226.
- [26] Shiau, S., Yeh, A., 2001. Effects of alkali and acid on dough rheological properties and characteristics of extruded noodles. *Journal of Cereal Science* 33: 27-37.
- [27] Rosell, C.M., Rojas, J.A., Barber, C.B., 2001. Influence of hydrocolloids on dough rheology and bread quality. *Food Hydrocolloids* 15(1): 75-81.
- [28] Van Vliet, T., Janssen, A.M., Bloksma, A.H., Walstra, P., 1992. Strain hardening of dough as a requirement for gas retention. *Journal of Texture Studies* 23: 439-460.
- [29] Nielsen, M.A., Sumner, A.K., Whalley, L.L., 1980. Fortification of pasta with pea flour and air-classified pea protein concentrate. *Cereal Chemistry* 57(3): 203-206.
- [30] Heller, S.N., Rivers, J.M., Hackler, L.R., 1977. Dietary fiber: the effect of particle size and pH on its measurement. *Journal of Food Science* 42(2): 436-439.
- [31] Plaami, S.P., 1997. Content of dietary fiber in foods and its physiological effects. *Food Review International* 13(1): 29-76.
- [32] Doyle, J.P., Lyons, G., Morris, E.R., 2009. New proposals on "hyperentanglement" of galactomannans: Solution viscosity of fenugreek gum under neutral and alkaline conditions. *Food Hydrocolloids* 26(6): 1501-1510.
- [33] Tosh, S.M., Yada, S., 2010. Dietary fibres in pulse seeds and fractions: Characterization, functional attributes, and applications. *Food Research International* 43(2): 450-460.
- [34] Walker, A.F., Kochhar, N., 1982. Effect of processing including domestic cooking on nutritional quality of legumes. *Proceedings of the Nutrition Society* 41(1): 41-51.
- [35] Tudorica, C.M., Kuri, V., Brennan, C.S., 2002. Nutritional and physicochemical characteristics of dietary fiber enriched pasta. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 347-356.
- [36] Epstein, J., Morris, C.F. Huber, K.C., 2002. Instrumental texture of white salted noodles prepared from recombinant inbred lines of wheat differing in the three granule bound starch synthase (waxy) genes. *Journal of Cereal Science* 35(1): 51-63.
- [37] Murray, J.M., Delahunty, C.M., Baxter, I.A., 2001. Descriptive sensory analysis: past, present and future. *Food Research International* 34: 461-471.
- [38] Chandrashekar, A., Kirleis, A.W., 1988. Influence of protein on starch gelatinization in sorghum. *Cereal Chemistry* 65(6): 457-462.

Optimized Top-Spray Fluidized Bed Coating Method of Rice Coated with *Bauhinia strychnifolia* Craib. Solution

Wasan Duangkhamchan , Sudathip Inchuen , Srinual Jantathai , Kriangsak Banlue ,
Sirithon Siriamornpun 

Research Unit of Process and Product Development of Functional Foods, Department of Food Technology and Nutrition,
Faculty of Technology, Mahasarakham University, Kamriang, Kantarawichai, Maha Sarakham 44150, Thailand

Received (Geliş Tarihi): 15.08.2017, Accepted (Kabul Tarihi): 06.10.2017

✉ Corresponding author (Yazışmalardan Sorumlu Yazar): wasan.d@msu.ac.th (W. Duangkhamchan)

☎ +66 4375 4321 📠 +66 4375 4609

ABSTRACT

A top-spray fluidized bed coating method aiming at improving health benefits of white rice using *Bauhinia strychnifolia* Craib. (BSC) solution, containing bioactive compounds was optimized in this study. The BSC solution was mixed with maltodextrin as a coating solution, and dextrose equivalent (DE) of maltodextrin was varied (DE10 and DE20). Both milled and instant rice were coated by using the top-spray fluidized bed coater with an optimal coating condition. Chlorophyll *a* and *b* and total phenolic content (TPC), as well as antioxidant activities (DPPH and FRAP assays) of BSC coated rice samples before and after cooking were analyzed. In addition, textural properties of both BSC coated milled and instant rice were evaluated. Results showed higher chlorophyll *a* and *b* as well as total phenolic contents in coated milled rice compared with coated instant rice. However, percent loss of these compounds for instant rice was lower after cooking. DPPH and FRAP values showed improvement of antioxidant activity after cooking for both coated milled and instant rice. Results suggested that factors influencing BSC coating included the coating and sample preparation methods as well as the nature of sample. Moreover, the appropriate coating method was to coat instant rice with DE10 maltodextrin as a carrier in coating material to obtain the minimal loss of bioactive compounds and maximum antioxidant activities, while the coated rice maintained good textural qualities compared with those of the conventionally cooked rice.

Keywords: Dextrose equivalent, Fluidization, Spray granulation, DPPH, FRAP

Bauhinia strychnifolia Craib. Çözeltisi ile Kaplanmış Pirincin Optimize Edilmiş Üst Sprey Akışkan Yatak Kaplama Yöntemi

ÖZ

Biyoaktif bileşenler içeren *Bauhinia strychnifolia* Craib. (BSC) çözeltisi kullanarak beyaz pirincin sağlığa olan faydalarını artırma amacıyla bir üst sprej akışkan yatak kaplama yöntemi optimize edilmiştir. BSC çözeltisi kaplama çözeltisi olarak dekstroz eşdeğeri (DE) farklı (DE10 ve DE20) maltodekstrin ile karıştırılmıştır. Öğütülmüş ve instant pirinç, optimum spreyleme koşuluyla üst sprej akışkan yataklı kaplayıcı kullanılarak kaplanmıştır. BSC kaplı pirinç numunelerinin pişirme öncesi ve sonrasında klorofil *a*, klorofil *b*, toplam fenolik içeriği (TPC) yanı sıra antioksidan aktiviteleri (DPPH ve FRAP testleri) de analiz edilmiştir. Ayrıca, hem BSC kaplı öğütülmüş hem de instant pirincin tekstürel özellikleri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, kaplanmış instant pirinç ile karşılaştırıldığında, kaplanmış öğütülmüş pirincin, daha yüksek toplam fenolik içeriği ve klorofil *a* ve *b* içerdiğini göstermiştir. Bununla birlikte, instant pirinç numunesi için bu bileşiklerin yüzde kaybının pişirmeden sonra düşük olduğu görülmüştür. DPPH ve FRAP değerleri, hem kaplanmış öğütülmüş hem de instant pirinç için pişirmeden sonra antioksidan aktivitesinin iyileştğini göstermiştir. Bulgularımız, BSC kaplamayı etkileyen faktörlerin sadece kaplama yöntemi değil aynı zamanda numune hazırlama ve numunenin doğası olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, kaplanmış pirinç, konvansiyonel olarak pişirilmiş

pirincinkine kıyasla iyi tekstürel niteliklerini korumuştur. En uygun kaplama yöntemi, biyolojik olarak az miktarda biyoaktif bileşik kaybı ve maksimum antioksidan aktivite elde edilen kaplama materyalinde bir taşıyıcı olarak DE10 maltodekstrin ile kaplanan instant pirinçte elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Dekstroz eşdeğeri, Akışkanlaştırma, Püskürtme granülasyonu, DPPH, FRAP

INTRODUCTION

White rice or milled rice has been preferred by consumers due to its flavor and texture even though brown rice has been alternatively consumed as a result that it contains higher nutritional value and phytochemicals content [1]. Up to date, many attempts have been made to improve health benefits of white rice by adding natural extract containing bioactive compounds [1, 2].

Bauhinia strychnifolia Craib. (BSC) is one of many phytochemical plants which contain bioactive compounds, including chlorophylls and phenolic compound. It is the green leafy plant (*Leguminosae-Caesalpinaceae* spicies) mainly containing chlorophylls. As medicinal plants, BSC's green leaves with the obovate shape are commonly as a tonic and detoxification products [3]. In addition, their leaves and stems have been used to alleviate alcoholic toxication, fever, cancer and allergy in Thai traditional medicine [3, 4, 5]. However, when applying these compounds in food processes, heat degradation has to be taken into account as a result that chlorophylls are susceptible to pH, light, oxygen, enzymatic activities, and especially heat [6]. Therefore, the appropriate processes should be considerably chosen.

Among rotating drum, rotating pan, mixer and fluidized bed, the latter associated with coating spray has been used as the value-added means for grains [1, 2, 7] due to its high reproducibility and coating uniformity [2, 8]. As a unique operation in which coating and drying processes take place simultaneously in only one equipment, fluidized bed coating has been successfully used in order to improve health promoting properties in white rice, as reported by Palamanit et al. [2] and Duangkhamchan and Siriamornpun [1]. In addition, functional properties of other grain products have been promoted by means of fluidized bed coating process; for instance, Solís-Morales et al. [9] applied a top-spray fluidised bed reactor to increase sweetness of puffed wheat with sweet chocolate, and Duangkhamchan and Inchuen [7] enhanced the antioxidant properties of puffed pounded-unripe rice by spraying marigold extract in the fluidized bed coating equipment.

Therefore, in this work, we improved the health promoting properties of milled rice by means of a top-spray fluidized bed coating process along with BSC coating solution. However, milled rice coated with the extract still needs to be cooked prior to consuming which could affect the bioactive compounds. In addition to investigation of applying the fluidized bed coating process to promote health benefits in milled rice, in this work, we also studied the effects of cooking processes, including instant rice cooking, on bioactive compounds

and antioxidant properties as well as textural properties of cooked coated rice. Moreover, due to chemical-structure change of maltodextrin with different dextrose equivalents (DEs), influence of coating solution with varied DEs of maltodextrin was also investigated. We expect to obtain an appropriate coating and cooking process for preserving not only bioactive compounds but also textural properties of rice coated with BSC.

MATERIALS and METHODS

Materials

Rice Samples

Milled rice (Chainat variety: CNTBR82075-43-2-1) was purchased from the local market in Maha Sarakham province, Thailand. Comparing with Khao Dawk Mali 105 (KDML 105), it is not preferred by consumers due to its texture and aroma. It was therefore chosen as a sample to be value-added in this work. Prior to each experiment, initial moisture content of the rice sample was measured regarding the standard procedure for grain moisture content analysis [10].

Bauhinia strychnifolia Craib. (BSC) Solution

BSC leaves obtained from Maha Sarakham province, Thailand were firstly sorted by selecting only the green ones with the size of 3-7 cm wide and 6-12 cm long and cleaned with tap water. The BSC leaves were added into distilled water with a ratio of 1:2 (w/v), then blended with speed of 10,000 revolutions per minute for 2-3 min. The resultant mixture was filtered using cotton cloth to provide the solution. In order to minimize degradation of chlorophylls, the BSC solution was stored in a dark container under 4-5°C until used.

Coating Solution

The prepared BSC solution was mixed with maltodextrin with different values of dextrose equivalent (DE10 and DE20) in order to study its effect on encapsulability of bioactive compounds. The resultant concentration of coating solution was kept constant as 10°Brix. The coating solution was stored in a dark container under cold condition, 4±1°C, until used.

Preparation of Instant Rice

Instant rice was prepared by using the microwave-hot air drying method. The cooked milled rice sample was dried under air temperature of 80°C combined with 300-W microwave and air velocity of 1±0.05 m/s until its moisture content reached approximately 10% (wet basis). Air temperature and velocity were measured by a

hot-wire anemometer (Testo, testo425). Domestic microwave oven (Samsung, ME711K/XST) was connected to the hot-air supply system of the top-spray fluidized bed coating unit when producing instant rice. Details of instant rice preparation were referred to Jiao et al. (2014). The instant rice was kept in an aluminum-foil bag under cold storage ($4\pm 1^\circ\text{C}$) until used. In the final stage of investigation, bioactive compounds including chlorophyll *a*, *b* and total phenolic content and antioxidant activities as well as textural qualities of coated rice cooked by different methods were evaluated. Therefore, the rehydration condition of coated instant rice was first optimized by means of response surface method (RSM). The details regarding the RSM were described in section 2.7.

Coating Procedure

Rice samples including milled rice and instant rice were subjected to coating process using a top-spray fluidized bed coating reactor, as shown in Fig. 1. Five hundred grams of rice sample was coated with BSC coating solution under optimal coating condition reported in our previous study [1]. Briefly, an inlet temperature, spraying time, feed rate and fluidization air velocity were 50°C , 15 min, 10 mL/min and 4.7 m/s, respectively. The BSC coated rice sample was sealed in a laminated bag and stored under $4\pm 1^\circ\text{C}$ until analysis. Each experiment was carried out in triplicate.

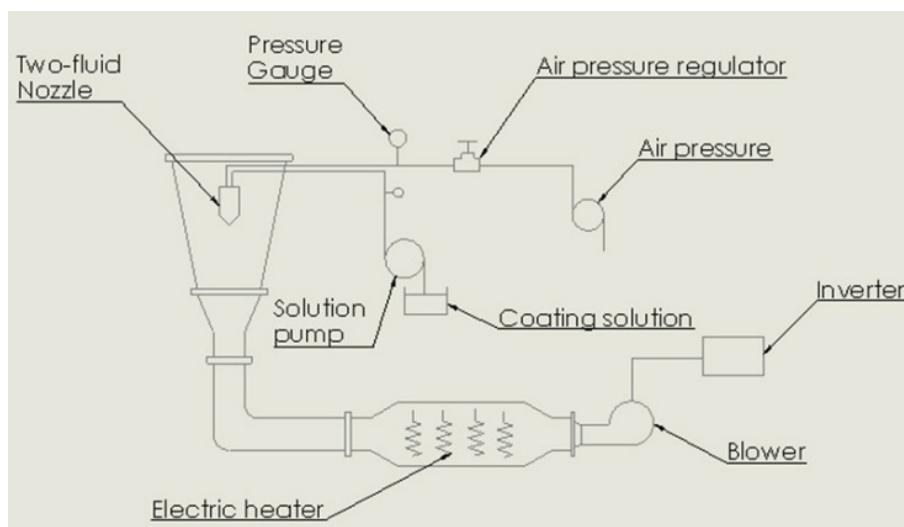


Figure 1. Schematic diagram of the top-spray fluidized bed coating unit [1].

Texture Analysis

The textural properties of cooked rice (milled rice) and rehydrated rice (instant rice) were determined by using a texture analyzer (Stable Micro System, TA-XT2i, Surrey, UK) with a rice extrusion rig. Twenty three grams of cooked rice was immediately placed in the rig's testing cell. It was pushed down by a plunger of similar cross-section to the cell, compressing the sample and extruding it at test and post-test speed of 1.6 and 10 mm/s, respectively, through holes in the base extrusion plate. A force time curve was obtained from the test and the measurements of hardness and stickiness were computed using the Texture Expert software supplied with the instrument.

Bioactive Compounds Analysis

Chlorophyll Analysis

In this work, total chlorophyll *a* and *b*, mostly found in green leafy plants such as BSC [11] were chosen for analysis. As modified from Chen and Pei [12], the BSC coated samples were extracted with 80% acetone. The mixture was then centrifuged at 8000 g for 15 min and filtered through Whatman paper no.1. Chlorophyll *a* and *b* were measured using a double beam

spectrophotometer (UV-160 A, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) associated with absorbance at 663 nm and 645 nm, respectively. The following correlations were used to calculate the content of chlorophyll *a* (chl-*a*) and chlorophyll *b* (chl-*b*).

$$\text{Chl-}a = 12.72A_{663} - 2.59A_{645} \quad (1)$$

$$\text{Chl-}b = 22.9A_{645} - 4.67A_{663} \quad (2)$$

Total Phenolic Content

Total phenolic content (TPC) in the BSC coated rice samples was determined using the Folin-Ciocalteu reagent as following the methods of Zhou and Yu [13], and Kubola and Siriamornpun [14]. Briefly, Folin-Ciocalteu reagent was first diluted 10-fold with distilled water, and 2.25 mL of this was subsequently mixed with 30 μL of the sample extract. After leaving under room condition for 5 min, the resultant mixture was added by 2.25 mL of sodium carbonate solution with concentration of 60 g/mL, and then was stabilized at room temperature for 90 min. The total phenolic content was eventually determined using the absorbance of the sample mixture at 725 nm associated with the standard curve obtained from gallic acid. Therefore, the total phenolic content was reported as milligram gallic acid equivalents per gram dry matter (mg GAE/g DM).

Antioxidant Activity Analysis

We selected two different methods for determining the antioxidant activities on basis of their chemical mechanism. The first DPPH radical scavenging assay, which is routinely practiced for assessment of free radical scavenging potential of an antioxidant molecule, measures the antioxidant content of plant tissues in different solvent systems including ethanol, aqueous acetone, methanol, aqueous alcohol, and benzene [15]. On the other hand, FRAP assay measures the reducing potential of an antioxidant reducing with a ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) complex and producing a colored ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+} -TPTZ) [16]. Generally, the reducing properties are associated with the presence of compounds which exert their action by breaking the free radical chain by donating a hydrogen atom [17].

DPPH Radical Scavenging Activity

As described in Braca et al. [18], the antioxidant activity of the BSC coated rice samples, the scavenging activity was determined based on the stable 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical. Briefly, the sample extract (0.1 mL) was added to 3 mL of a 0.004% MeOH solution of DPPH, and subsequently its absorbance was measured at 517 nm by a spectrometer. The inhibition activity was calculated as $[(A_0 - A_e)/A_0] \times 100$, where A_0 and A_e is absorbance without and with extract, respectively. The antioxidant activity measured by this method was presented in mg Trolox/100 g dry matter.

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i x_i + \sum_i a_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n a_{ij} x_i x_j \quad (3)$$

In equation (3), the coefficients a_0 is the constant; a_i and a_{ii} are the linear and quadratic effects, respectively, while the interaction effect between them is denoted by a_{ij} . x_i ($n = 2$) is the actual value of the i^{th} factor.

The estimated response obtained from equation (3) was subsequently transformed into a scale free value (d_i) called desirability ranging from 0 to 1 of which 0 represents one or more responses are being outside their acceptable limits and 1 indicates the ideal case. Various desirability functions $d_i(Y_i)$ can be used depending on a particular response which can be

$$d_i(Y_i) = \begin{cases} 0 & \text{if } Y_i(x) < L_i \\ \left(\frac{Y_i(x) - L_i}{T_i - L_i} \right)^s & \text{if } L_i \leq Y_i(x) \leq T_i \\ \left(\frac{Y_i(x) - U_i}{T_i - U_i} \right)^t & \text{if } T_i \leq Y_i(x) \leq U_i \\ 0 & \text{if } Y_i(x) > U_i \end{cases} \quad (5)$$

where L_i , U_i and T_i are the lower, upper and target value, respectively.

Ferric Reducing/Antioxidant Power (FRAP) Assay

The FRAP assay adapted from Moyer et al. [19] was used to determine the antioxidant activity of the BSC coated rice samples. Briefly, the FRAP reagent was freshly prepared by mixing 100 mL of acetate buffer (300 mM, pH 3.6), 10 mL TPTZ solution (10 mM TPTZ in 40 mM/HCl), 10 mL $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (20 nM) in a ratio of 10:1:1 and 12 mL distilled water, at 37°C. The FRAP reagent (1.8 mL) was then added into 180 μ l Milli-Q water and 60 μ L of the sample extract, followed by standard or blank. After incubation at 37°C for 4 min, an absorbance of the resultant mixture was subsequently measured at 593 nm by a spectrometer associated with the FRAP working solution as a blank. The antioxidant activity of sample was determined against a standard curve of ferrous sulphate ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) with concentrations ranging from 0 to 3 nM in Milli-Q water or methanol with 0.1% (v/v) HCl. The antioxidant activity measured by FRAP assay was reported in mg Fe^{2+} /100 g dry matter.

Response Surface Method and Desirability Approach

Response surface method has been widely used to determine the appropriate process condition for multivariate problems. In this work, RSM and desirability approach were employed for two circumstances – determinations of optimal rehydration condition and coating process. In this work, a second-order polynomial equation was applied to describe the effects of factors on responses, expressed as follows [20].

maximized or minimized or assigned to a target value. The individual desirabilities were subsequently combined using the geometric mean providing the overall desirability, D [21].

$$D = (d_1(Y_1) d_2(Y_2) \dots d_k(Y_k))^{1/k} \quad (4)$$

Where k denotes the number of responses. If a response was assigned to a target value, the individual desirability function was

If a response value was minimum, the $d_i(Y_i)$ function was expressed as

$$d_i(Y_i) = \begin{cases} 1 & \text{if } Y_i(x) < T_i \\ \left(\frac{Y_i(x) - U_i}{T_i - U_i}\right)^s & \text{if } T_i \leq Y_i(x) \leq U_i \\ 0 & \text{if } Y_i(x) > U_i \end{cases} \quad (6)$$

If a particular response was maximized, the individual desirability function was

$$d_i(Y_i) = \begin{cases} 0 & \text{if } Y_i(x) < L_i \\ \left(\frac{Y_i(x) - L_i}{T_i - L_i}\right)^s & \text{if } L_i \leq Y_i(x) \leq T_i \\ 1 & \text{if } Y_i(x) > T_i \end{cases} \quad (7)$$

The exponents *s* and *t* in equations (5-7) determine how important it is to hit the target value. Details concerning the desirability approach have been described in Derringer and Suich [21].

In order to optimize a rehydration condition for coated instant rice, a full factorial experimental design was employed with two factors including a ratio of rice to water (1:1.5 and 1:2) and microwave heating time (1 and 2 min). A microwave power was kept constant as 800 W. Hardness and stickiness of rehydrated sample were used as responses in order to provide the consistency with the factors.

Finally, suitable coating process with respect to bioactive compounds and their antioxidant activities as well as textural qualities was examined by means of desirability approach associated with RSM as aforementioned. The particular responses were first estimated and subsequently transformed into an individual desirability function. Four categories of coating process were coded as A denoting a type of rice sample (-1 for milled rice and 1 for instant rice) and B representing a level of DE (-1 for DE10 and 1 for DE20). The overall desirability for each coded coating process was determined based on the criteria of minimized %loss of chlorophylls and TPC, maximized antioxidant activities for both assays (DPPH and FRAP), and targeted textural qualities (hardness and stickiness). The

coating process with highest overall desirability was considered the appropriate one.

RESULTS and DISCUSSION

Our study had applied various fluidized bed coating methods, including coating milled and instant rice with BSC solution with variation of dextrose equivalent of maltodextrin, in order to improve health promoting properties. The experiments were divided into two steps. Firstly, the optimal rehydration condition of instant rice was determined by means of response surface method associated with the targeted textural properties as desirability criteria. Subsequently, bioactive compounds, including chlorophyll *a* and *b* and total phenolic content, and their antioxidant activities measured by DPPH and FRAP assays of coated rice prepared by different methods were both qualitatively and quantitatively compared.

Optimization of Rehydration Condition of Instant Rice Coated with BSC Extract

The ratio of rice to water (RW) and microwave heating time (HT) were varied, while the microwave power was kept constant at 800W. The rehydration condition was optimized associated with the desirability criteria of the targeted hardness and stickiness of conventionally cooked rice, as a control sample. Table 1 shows the hardness and stickiness of rehydrated rice compared with those of the control sample.

Table 1. Textural qualities of rehydrated coated instant rice and control rice

Rehydration condition		Hardness (N)		Stickiness (N)	
RW	HT (min)	DE10	DE20	DE10	DE20
1:1.5	1	120.78±20.98 ^c	112.53±18.67 ^C	13.08±2.48 ^b	16.08±5.84 ^B
1:1.5	2	197.91±30.89 ^a	185.67±14.93 ^A	35.05±3.45 ^a	30.62±2.07 ^A
1:2	1	80.72±16.40 ^d	74.47±8.31 ^D	12.19±3.36 ^b	11.15±4.13 ^B
1:2	2	84.90±15.18 ^{cd}	80.10±13.81 ^{CD}	13.37±2.23 ^b	12.74±4.33 ^B
Control		157.40±4.31 ^{bb}		5.83±1.17 ^{cc}	

Different superscripts with small letters in the same column denote significant difference at *p*<0.05 for DE10.

Different superscripts with capital letters in the same column denote significant difference at *p*<0.05 for DE20.

Table 1 shows the comparison of textural qualities of rehydrated coated instant rice and control rice at various rehydration conditions and different types of

maltodextrin (DE) as a carrier in coating solution. From this table, hardness and stickiness of rehydrated coated

instant rice changed with different rehydration conditions.

Taking the hardness value of rehydrated instant rice into consideration, it can be observed from Table 1 that at the RW of 1:1.5, HT resulted in higher hardness, while it did not change with heating time when using the same ratio of 1:2 for both DEs. In addition, the influence of RW was also found from Table 1. At the same HT, the hardness of rehydrated sample was dramatically decreased with increasing amount of water. When compared to that of the control sample, most rehydrated instant rice tended to have softer texture.

In addition to the hardness value, stickiness at variations of RW and HT was also investigated, as shown in Table

1. At all rehydration conditions, the rehydrated instant rice was stickier than that of the control rice cooked by a conventional cooking method. The stickiness values of rehydrated instant rice were in a range of about -11 and -35 N, while the control sample had lower value (-6 N). Except at the RW of 1:1.5 and the HT of 2 min, the stickiness values of rehydrated was not changed with varied rehydration conditions. It can be also observed from Table 1 that the dextrose equivalent value of maltodextrin used as a carrier in coating solution did not affect the texture of rehydrated instant rice.

Furthermore, the correlations of hardness and stickiness as a function of RW and HT were obtained by means of RSM, as expressed below.

For DE10;

$$\text{Hardness} = -55.02 + 65.78(\text{RW}) + 295.98(\text{HT}) - 145.9(\text{RW})(\text{HT}); R^2=0.88 \quad (8)$$

$$\text{Stickiness} = 68.59 - 39.8(\text{RW}) - 84.34(\text{HT}) + 41.58(\text{RW})(\text{HT}); R^2=0.94 \quad (9)$$

For DE20;

$$\text{Hardness} = -48.96 + 58.9(\text{RW}) + 275.67(\text{HT}) - 135.02(\text{RW})(\text{HT}); R^2=0.93 \quad (10)$$

$$\text{Stickiness} = 22.52 - 16.04(\text{RW}) - 53.39(\text{HT}) + 25.9(\text{RW})(\text{HT}); R^2=0.83 \quad (11)$$

It can be observed from equations (8-11) that the second-order terms were omitted due to their insignificance. Both hardness and stickiness for both DEs correlated well with RW and HT as high determination coefficient ($R^2 > 0.8$). However, determination of an appropriate rehydration condition for coated instant rice was dependent on both RW and HT. The simultaneous optimization of hardness and stickiness values was therefore investigated by defining

a 2-dimension global desirability plot, as shown in Fig. 2. Based on the targeted values regarding the hardness and stickiness values of the control sample, the highest desirability values were 0.79 and 0.86 for coating solution using DE10- and DE20-maltodextrin, respectively, which corresponded to the RW of 1:1.6 and HT of 2 min. Consequently, this rehydration condition was used for the next step.

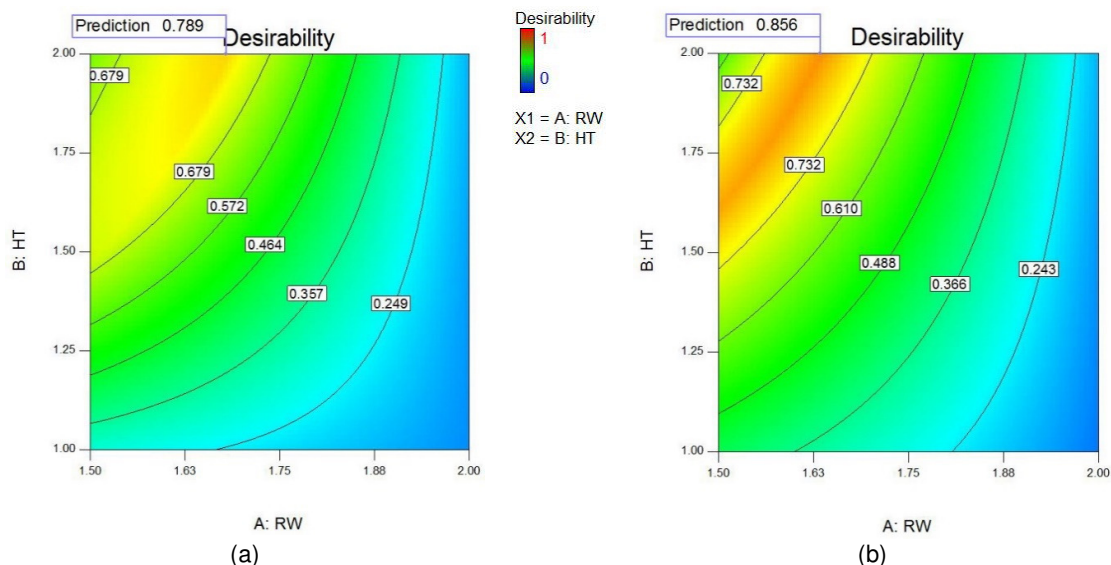


Figure 2. Desirability of rehydration condition of instant rice coated by BSC solution: (a) DE10 and (b) DE20

Optimization of Coating Method

Textural Properties of the BSC Coated Rice

Table 2 shows the variations of hardness and stickiness values affected by the BSC extract coating process. Regarding the hardness value, the highest one can be found when the rice sample was conventionally cooked using a domestic rice cooker, as the control sample, while the lowest hardness value was obtained from the fluidized-bed coating method for milled rice with the use of the DE10 maltodextrin as a carrier in coating solution. Using the same process of coating milled rice, it can be observed that DE value affected the hardness of cooked rice; the higher DE, the harder texture. Dextrose equivalent is a measure of amount of reducing sugar. Higher DE means higher amount of reducing sugar

(monosaccharide), which is any sugar that is capable of acting as a reducing agent because it has a free aldehyde group or a free ketone group [22]. Therefore, it could be explained that when using maltodextrin with higher DE, monosaccharide reducing sugar could diffuse into the molecule of the rice grains by replacing water molecule, hence increasing total solid of the grains. Unlikely, the hardness of cooked rice was not affected by the DE value when coating the instant rice. Crystalline structure which is responsible for water barrier on its surface could be possible explanation of this result. The formation of amylose-lipid complexes (V-type crystalline structure) occurred during heat-moisture treatment in instant rice process [23, 24]. This pattern of crystalline was detected either because more complexes were formed during heating or crystalline regions had increased in size after gelatinization [25].

Table 2. Textural qualities of cooked rice coated with BSC using different processes

Coating process	Hardness (N)	Stickiness (N)
Coating milled rice (DE10)	83.16±2.39 ^c	5.40±0.86 ^c
Coating milled rice (DE20)	136.89±6.05 ^b	12.81±2.54 ^b
Coating instant rice (DE10)	131.53±9.76 ^b	20.19±3.39 ^a
Coating instant rice (DE20)	127.43±5.24 ^b	19.51±3.08 ^a
Control	157.40±4.31 ^a	5.83±1.17 ^c

Different superscripts in the same column denote significant difference at $p < 0.05$.

When stickiness of cooked rice was concerned, it can be found from Table 2 that it changed with different coating methods, ranging from 5.40 to 20.19 N. The highest value was obtained from the coated instant rice for both DEs, while the lowest one was found when milled rice was coated with BSC and DE10 maltodextrin which was consistent with that of the control sample.

It can be seen from Table 2 that different coating methods affected both hardness and stickiness of cooked coated rice. Therefore, the correlations of these responses as a function of coating method were determined in order to optimize the overall desirability based on all responses in the final step. The correlations between hardness and stickiness as a function of coating method are expressed as,

$$\text{Hardness} = 119.75 + 9.73A + 12.41B - 14.46AB \quad ; R^2 = 0.94 \quad (12)$$

$$\text{Stickiness} = -14.48 - 5.37A - 1.68B + 2.02AB \quad ; R^2 = 0.88 \quad (13)$$

Where A and B denote type of rice sample (-1 for milled rice and 1 for instant rice) and DE level (-1 for DE10 and 1 for DE20), respectively. Again, the second-order terms were not found in equations (12-13) indicating that the first-order function was sufficient to describe the relation between the coating method and the textural properties of cooked coated samples.

Chlorophyll Contents

In addition to the texture of cooked rice coated with BSC solution by various methods, we also aimed at investigating the stability of chlorophyll *a* and *b* as presented in term of % loss after cooking process, as shown in Tables 3 and 4, respectively.

In Table 3, chlorophyll *a* content was varied depending on coating conditions with a range of 19.92-42.67 and 9.51-13.36 $\mu\text{g/g}$ dry matter for the BSC coated rice before and after cooking, respectively. From this table, cooking process obviously affected the chlorophyll *a* as presented in term of %loss for all cases. In comparison to the BSC coated instant rice, the coated milled rice

had higher %loss of chlorophyll *a* (67-68%). This could be due to longer cooking time (~18 min) needed for coated milled rice, resulting in higher loss of heat-sensitive compounds. Chlorophyll *a* content of coated milled rice samples was higher than that of coated instant ones. This could be due to the microstructural change on instant rice surface (amylose-lipid complex) [24], where the coating droplets could not easily deposited onto its surface. In a production process of instant rice, the fully or partially gelatinized grains are dried to specific moisture content, and subsequently rehydrated with optimal condition before consuming [26], leading to higher V-type crystallinity in comparison with milled rice grains [23, 25]. However, chlorophyll *a* retention after cooking/rehydration could be more concerned in order to examine the suitable way of promoting health benefits to milled rice. In Table 3, chlorophyll *a* content for all cases was not significantly different, except for instant rice coated with BSC and DE10 maltodextrin, which was the lowest value. Less number of ramifications with the hydrophilic groups in lower DE maltodextrin resulting in less hydrolysis and water adsorption [27] could be possible explanation.

Table 3. Chlorophyll *a* content of the rice samples coated with BSC extract by different methods.

Sample	Chlorophyll <i>a</i> ($\mu\text{g/g}$ dry matter)		%loss Chlorophyll <i>a</i>
	Before cooking	After cooking	
Coated milled rice (DE10)	42.67 \pm 2.35 ^a	13.36 \pm 1.19 ^a	68.60 \pm 3.80 ^a
Coated milled rice (DE20)	37.59 \pm 1.85 ^b	12.43 \pm 1.38 ^a	67.01 \pm 2.12 ^a
Coated instant rice (DE10)	19.92 \pm 1.51 ^d	9.51 \pm 0.69 ^b	51.95 \pm 6.44 ^b
Coated instant rice (DE20)	24.37 \pm 0.59 ^c	12.24 \pm 0.84 ^a	49.75 \pm 3.69 ^b

Different superscripts in the same column denote significant difference at $p < 0.05$.

Similar trend to chlorophyll *a* was observed for chlorophyll *b*, as shown in Table 4. Chlorophyll *b* contents were in a range of 4.60-23.15 and 3.32-10.51 $\mu\text{g/g}$ dry matter for the BSC coated rice samples before and after cooking, respectively. Stability of chlorophyll *b* was also determined in term of %loss after cooking. Table 4 shows that the BSC coated milled rice lost more chlorophyll *b* (higher %loss of approximately 52-57%), while the coated instant samples did only 29% loss. As described earlier, more chlorophyll *b* degraded with longer cooking time for coated milled rice. Noticeably, higher amount of chlorophyll *b* was found in the BSC coated milled rice before cooking, as also observed previously for chlorophyll *a*. This could be also explained by higher V-type crystallinity of the instant rice surface compared to milled rice [24]. In addition, DE of maltodextrin did not affect chlorophyll *b* of the BSC coated milled rice, while the higher amount was found with higher DE for the coated instant sample, meaning better enhancement of encapsulability.

Antioxidant Properties

In addition to chlorophyll contents, we investigated the effects of coating methods on total phenolic content

together with its antioxidant activities, as shown Tables 5 and 6, respectively.

TPC of BSC milled rice were higher than coated instant rice in all samples, as seen in Table 5. Most of TPC are soluble in water. It could be more uptaken into milled rice more easily than did instant rice in which crystalline structure barrier. Possible explanation could be similar to that described for chlorophylls analysis.

After cooking, TPC was decreased up to $\approx 50\%$ for milled rice, while a slightly less decrease was found in coated instant rice. For all coated samples, they were subjected to heat during conventional cooking in a domestic cooker and rehydration process associated with microwave heating for the BSC coated milled rice and BSC coated instant one, respectively. The former cooking process led to a higher degradation of phenolic because they are highly thermo-sensitive [28], hence higher loss percentage of TPC.

Table 4 Chlorophyll *b* content of the rice samples coated with BSC extract by different methods.

Sample	Chlorophyll <i>b</i> ($\mu\text{g/g}$ dry matter)		%loss Chlorophyll <i>b</i>
	Before cooking	After cooking	
Coated milled rice (DE10)	23.15 \pm 2.67 ^a	9.78 \pm 1.52 ^a	57.60 \pm 5.81 ^a
Coated milled rice (DE20)	22.08 \pm 1.35 ^a	10.51 \pm 0.72 ^a	52.18 \pm 5.58 ^a
Coated instant rice (DE10)	4.60 \pm 1.10 ^c	3.32 \pm 1.26 ^b	29.02 \pm 11.60 ^b
Coated instant rice (DE20)	7.19 \pm 1.13 ^b	5.01 \pm 0.79 ^b	29.71 \pm 11.23 ^b

Different superscripts in the same column denote significant difference at $p < 0.05$.

By means of RSM, correlations of %loss of chlorophyll *a* and *b* as a function of fluidized-bed coating method are expressed as,

$$\% \text{loss of chlorophyll } a = 59.33 - 8.48A - 0.95B - 0.15AB \quad ; R^2 = 0.86 \quad (14)$$

$$\% \text{loss of chlorophyll } b = 42.13 - 12.76A - 1.18B + 1.53AB \quad ; R^2 = 0.75 \quad (15)$$

Table 5. Total phenolic content (mg Gallic acid equivalent/100 g dry matter) of cooked rice coated with BSC solution by different methods.

Sample	Total phenolic (mg gallic acid equivalent/100 g dry matter)		%loss
	Before cooking	After cooking	
Coated milled rice (DE10)	67.27 \pm 3.89 ^a	36.52 \pm 1.27 ^a	45.67 \pm 1.26 ^b
Coated milled rice (DE20)	69.92 \pm 2.58 ^a	33.51 \pm 2.01 ^a	52.10 \pm 1.11 ^a
Coated instant rice (DE10)	14.60 \pm 0.32 ^c	7.91 \pm 0.21 ^c	45.82 \pm 0.25 ^b
Coated instant rice (DE20)	16.15 \pm 0.38 ^b	10.84 \pm 0.55 ^b	32.91 \pm 1.83 ^c

Different superscripts in the same column denote significant difference at $p < 0.05$.

Table 6. Antioxidant activity (DPPH and FRAP) of cooked rice coated with BSC solution by different methods.

Sample	DPPH (mg Trolox/100 g dry matter)		FRAP (mg Fe ²⁺ /100 g dry matter)	
	Before cooking	After cooking	Before cooking	After cooking
	Coated milled rice (DE10)	150.45±1.27 ^{bb}	199.11±16.23 ^{aa}	38.74±0.79 ^{bb}
Coated milled rice (DE20)	189.22±8.17 ^{ab}	218.02±15.13 ^{aa}	44.75±1.36 ^{ab}	53.61±2.27 ^{aa}
Coated instant rice (DE10)	116.27±8.38 ^{da}	116.48±9.50 ^{ca}	23.25±0.65 ^{db}	57.13±1.30 ^{aa}
Coated instant rice (DE20)	135.22±9.00 ^{ca}	138.86±7.66 ^{ba}	25.02±0.39 ^{cb}	29.46±0.88 ^{ba}

Different small letter superscripts in the same column denote significant difference at $p < 0.05$.

Different capital superscripts in the same row denote significant difference at $p < 0.05$.

For our present study, we found that FRAP values were significantly increased after cooking in all samples studied ($p < 0.05$), as shown in Table 6. However, DPPH values were significantly increased after cooking for coated milled rice but not for coated instant ones. The reason to explain this phenomenon is that thermal process may enhance the antioxidant activity by activating some bioactive compounds. Mostly, heat highly causes degradation of bioactive compounds such as phenolics, flavonoids and anthocyanins [28]. However, many studies have revealed that it could cause not only losses, but also no change or even

improvement of antioxidant properties [29]. Food processing can improve the properties of native antioxidants or induce the formation of new compounds with antioxidant properties so the overall antioxidant activity increases [30] in some products such as in dried mulberry leaves using far infrared drying [31]. Our findings were in agreement with those described above.

The %loss of TPC and antioxidant activities for both assays (DPPH and FRAP) correlated well with high R^2 (> 0.8), as expressed below.

$$\% \text{loss of TPC} = 44.13 - 4.76A - 1.62B - 4.84AB \quad ; R^2 = 0.98 \quad (16)$$

$$\text{DPPH} = 168.28 - 40.28A + 10.49B + 1.03AB \quad ; R^2 = 0.94 \quad (17)$$

$$\text{FRAP} = 49.85 - 6.55A - 8.31B - 5.52AB \quad ; R^2 = 0.96 \quad (18)$$

Overall Desirability

Finally, all estimated responses (equations 12-18) were transferred into individual desirability function, and the overall desirability value was determined based on the minimized %loss of chlorophylls and TPC, maximized

antioxidant activities for both assays (DPPH and FRAP), and targeted textural qualities (hardness and stickiness). The overall desirabilities for all coating methods and their corresponding values of each response are presented in Table 7.

Table 7. Overall desirabilities of all fluidized-bed coating method

Coded coating method		Desirability
A	B	(-)
1	-1	0.405
-1	1	0.363
1	1	0.348
-1	-1	0.267

It can be concluded from Table 7 that the coded coating method of A(1) and B(-1), corresponding to the method of coating instant rice with the use of DE10 maltodextrin as a carrier in coating material was an appropriate method based on highest overall desirability (0.405). Therefore, we recommend this coating method to obtain the minimal loss of chlorophyll contents, total phenolic and antioxidant activities, while the coated rice maintains good textural qualities compared with those of the conventionally cooked rice.

CONCLUSIONS

Our study has revealed that BSC coated milled and instant rice enhanced health promoting properties by adding chlorophyll contents (*a* and *b*), total phenolic content and antioxidant activities. Coating effectiveness involved not only coating parameters (e.g. spray time, inlet temperature and solution feed rate), but also

properties of coating solution and nature of core materials. For instance, the DE value resulted in chlorophylls attachment onto the core materials. In addition, the higher V-type crystallinity in instant rice caused lower chlorophylls and phenolic encapsulability. Our findings have provided valuable information for selecting appropriate coating process in terms of natural bioactives and antioxidant properties.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Mahasarakham University Research Fund for financial support (No.5812002/2558). Thanks are also to Mahasarakham University Development Fund for Travel grant.

REFERENCES

- [1] Duangkhamchan, W., Siriamornpun, S., 2015. Quality attributes and anthocyanin content of rice coated by purple-corn cob extract as affected by coating conditions. *Food and Bioprocess Processing* 96: 171-179.
- [2] Palamanit, A., Soponronnarit, S., Prachayawarakorn, S., Tuntrakul, P., 2013. Effects of inlet air temperature and spray rate of coating solution on quality attributes of turmeric extract coated rice using top-spray fluidized bed coating technique. *Journal of Food Engineering* 114: 132-138.
- [3] Yuenyongsawad, S., Bunluepuech, K., 2013. Anti-cancer activity of compounds from *Bauhinia strychnifolia* stem. *Journal of Ethnopharmacology* 150: 765-769.
- [4] Bunluepuech, K., Wattanapiromsakul, C., Madaka, F., Tewtrakul, S., 2013. Anti-HIV-1 integrase and anti-allergic activities of *Bauhinia strychnifolia*. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 35(6): 659-664.
- [5] Kaewpiboon, C., Lirdprapamongkol, K., Srisomsap, C., Winayanuwattikun, P., Yongvanich, T., Puwaprisirisan, P., Svasti, J., Assawalapsakul, W., 2012. Studies of the in vitro cytotoxic, antioxidant, lipase inhibitory and antimicrobial activities of selected Thai medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12: 217.
- [6] Saéñz, C., Tapia, S., Chávez, J., Robert, P., 2009. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry* 114: 616-622.
- [7] Duangkhamchan, W., Inchuen, S., 2017. Texture and antioxidant properties of puffed pounded-unripe rice coated by marigold extract as affected by fluidized-bed coating conditions. *Key Engineering Materials* 718: 115-119.
- [8] Maronga, S., 1998. On the optimization of the fluidized bed particulate coating process. Ph.D. Thesis, Department of Chemical Engineering and Technology, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden.
- [9] Solís-Morales, D., Sáenz-Hernández, C.M., Ortega-Rivas, E., 2009. Attrition reduction and quality improvement of coated puffed wheat by fluidized bed technology. *Journal of Food Engineering* 93: 236-241.
- [10] AOAC, 1995. Official Methods of Analysis, 16th ed. Association of Official Agricultural Chemists, Washington, DC.
- [11] Francis, F.J., 2002. Food coloring. In: Macdougall, D.B. (Ed.), *Colouring in Food: Improving Quality*. Woodhead Publishing Ltd, Abington.
- [12] Chen, X., Pei, Y., 2016. Effects of sodium pentaborate pentahydrate exposure on *Chlorella vulgaris* growth, chlorophyll content, and enzyme activities. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 132: 353-359.
- [13] Zhou, K., Yu, L., 2006. Total phenolic contents and antioxidant properties of commonly consumed vegetables grown in Colorado. *LWT – Food Science and Technology* 39: 1155-1162.
- [14] Kubola, J., Siriamornpun, S., 2008. Phenolic content and antioxidant activities of bitter melon (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. *Food Chemistry* 110: 881-890.
- [15] Cheng, Z., Moore, J., Yu, L., 2006. High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(20): 7429-7436.
- [16] Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239: 70-79.
- [17] Duh, P.D., Du, P.C., Yen, G.C., 1999. Action of methanolic extract of mung hulls as inhibitors of lipid peroxidation and non-lipid oxidative damage. *Food and Chemical Toxicology* 37: 1055-1061.
- [18] Braca, A., De Tommasi, N., Di Bari, L., Pizza, C., Politi, M., Morelli, L., 2001. Antioxidant principles from *Bauhinia tarapotensis*. *Journal of Natural Products* 64: 892-895.
- [19] Moyer, R.A., Hummer, K.E., Finn, C.E., Frei, B., Wrolstad, R.E., 2002. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small flowers: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 519-525.
- [20] Singh, B., Panesar, P.S., Nanda, V., Gupta, A.K., Kennedy, J.F., 2006. Application of response surface methodology for the osmotic dehydration of carrots. *Journal of Food Process Engineering* 29: 592-614.
- [21] Derringer, G., Suich, R., 1980. Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology* 12(4): 214-219.
- [22] Dzedzic, S.Z., Kearsley, M.W., 1995. *Handbook of starch hydrolysis products and their derivatives*. London: Blackie Academic & Professional.
- [23] Prasert, W., Suwannaporn, P., 2009. Optimization of instant jasmine rice process and its physicochemical properties. *Journal of Food Engineering* 95: 54-61.
- [24] Shih, F., King, J., Daigle, K., An, H.J., Ali, R., 2007. Physicochemical properties of rice starch modified by hydrothermal treatment. *Cereal Chemistry* 84(5): 527-531.
- [25] Pilli, T.D., Jouppila, K., Ikonen, J., Kansikas, J., Derossi, A., Severini, C., 2008. Study on formation of starch-lipid complexes during extrusion-cooking of almond flour. *Journal of Food Engineering* 87(4): 495-504.
- [26] Jiao, A., Xu, X., Jin, Z., 2014. Modelling of dehydration-rehydration of instant rice in combined microwave-hot air drying. *Food and Bioprocess Processing* 92: 259-265.
- [27] Negrão-Murakami, A.N., Nunes, G.L., Pinto, S.S., Murakami, F.S., Amante, E.R., Carlos Cunha Petrus, J., Prudêncio, E.S., Amboni, R.D.M.C., 2017. Influence of DE-value of maltodextrin on the physicochemical properties, antioxidant activity, and storage stability of spray dried concentrated mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). *LWT – Food Science and Technology* 79:561-567.
- [28] Tonon, R.V., Brabet, C., Hubinger, M.D., 2010. Anthocyanin stability and antioxidant activity of

- spray-dried acai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International* 43: 907-914.
- [29] Nicoli, M.C., Anese, M., Parpinel, M., 1999. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends Food Science and Technology* 10: 94-100.
- [30] Tomaino, A., Cimino, F., Zimbalatti, V., Venturi, V., Sulfaro, V., De Pasquale, A., Saija, A., 2005. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chemistry* 89: 549-554.
- [31] Wanyo, P., Siriamornpun, S., Meeso, N., 2011. Improvement of quality and antioxidant properties of dried mulberry leaves with combined far-infrared radiation and air convection in Thai tea process. *Food Bioproducts Processing* 89: 22-30.
-

Bioutilization of Cheese Whey and Corn Steep Liquor by Heterotrophic Microalgae *Cryptocodinium cohnii* for Biomass and Lipid Production

Müge Isleten-Hosoglu¹, Murat Elibol²¹Canakkale Onsekiz Mart University, Food Engineering Department, Terzioğlu Campus, Canakkale, Turkey²Ege University, Bioengineering Department, EBILTEM Hall, Bornova, İzmir, Turkey

Received (Geliş Tarihi): 09.11.2016, Accepted (Kabul Tarihi): 21.06.2017

✉ Corresponding author (Yazışmalardan Sorumlu Yazar): muge.isleten@gmail.com (M. Isleten Hosoglu)

☎ +90 286 218 00 18 📠 +90 286 259 19 80

ABSTRACT

Many different wastewater and by-products derived from industrial activities potentially support microalgal growth by providing a cost-effective and sustainable solutions. In this present study, it was aimed to biologically utilize cheese whey (CW) and corn steep liquor (CSL) for microalgal biomass and lipid production by using these wastes in culture media for heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* cultivation. To determine nutrient requirements for *C. cohnii* growing in a medium prepared with CSL and in CW, statistical screening tools were used. CSL significantly enhanced microalgal growth and it could be an alternative to yeast extract as the primary nutrient source. As for CW, it served as a good culture medium for *C. cohnii* with the supplement of some of nutrients and eliminated the need for fresh water. Thus, a new culture medium was developed by combining undiluted CW and CSL and optimized for the growth of *C. cohnii*. Lastly, in a scale-up attempt by using this new medium, microalgal production was performed in a 3 L stirred tank bioreactor. *C. cohnii* yielded relatively high biomass productivity (2.28 g/L.d) and lipid content (28.7% dry weight) in the optimized medium. Although *C. cohnii* was known for its ability to accumulate high amounts of docosahexaenoic acid (DHA), it transformed its fatty acid composition to an increased proportion of saturated and monounsaturated fatty acids (C16:0-C18:1) that comprise ~70% of total fatty acids (TFA) when it was cultivated in CW mainly supplemented with CSL. Thus, *C. cohnii* seemed to be more feasible for biodiesel production than any other purposes when it was cultivated in this new medium.

Keywords: *Cryptocodinium cohnii*, Corn steep liquor, Cheese whey, Optimization, Lipid

Peyniraltı Suyu ve Mısır İslatma Şurubunun Heterotrofik Mikroalg *Cryptocodinium cohnii* ile Biyokütle ve Yağ Üretimi Amacıyla Biyolojik Olarak Değerlendirilmesi

ÖZ

Endüstriyel faaliyetlerden elde edilen birçok farklı atık su ve yan ürünler maliyet-etkin ve sürdürülebilir mikroalg kültürasyonu için potansiyel kaynaklardır. Mevcut çalışmada, heterotrofik mikroalg *Cryptocodinium cohnii* kültürasyonu için kültür besiyerinde peynir altı suyu (CW) ve mısır ıslatma şurubu (CSL) kullanılarak, bu atıkların mikroalgal biyokütle ve yağ üretimi amacıyla biyolojik olarak değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Organizmanın, her iki ortamdaki (CW ve CSL) besin ihtiyaçlarını belirlemek amacıyla istatistiksel tarama metodları kullanılmıştır. CSL'nin *C. cohnii* biyokütle gelişimini olumlu yönde desteklediği ve organizmanın kültür ortamında kullanılan maya ekstraktının alternatifi olarak kullanılabileceği belirlenmiştir. Peyniraltı suyunun ise, organizma için gerekli mineraller açısından önemli bir kaynak olduğu ve CW'in doğrudan kullanımıyla kültür ortamındaki su ihtiyacını karşılama avantajına sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Bu şekilde *C. cohnii* kültürasyonunda kullanılacak yeni kültür ortamı seyreltilmemiş CW ve CSL'nin birlikte kullanımı ile geliştirilmiştir ve optimizasyonu yapılmıştır. Son olarak, yapılan ölçek büyütme çalışmalarında yeni kültür ortamı kullanılarak 3 L'lik karıştırmalı tank biyoreaktörde

üretimler gerçekleştirilmiştir. Optimizasyonu yapılan kültür ortamında kısmen yüksek biyokütle verimliliği (2.28 g/L.gün) ve yağ oranı (% 28.7 kuru ağırlık) sağlanmıştır. *C. cohnii* biyokütlede son derece yüksek oranlarda dokozaheksanoik asit (DHA) üreticisi bir tür olarak bilinmesine rağmen, CSL ile zenginleştirilmiş CW ortamında biyokütlesindeki yağ asidi kompozisyonunu değiştirerek, daha çok tekli doymuş ve tekli doymamış yağ asitlerinde (C16:0-C18:1) zengin bir yağ profiline (toplam yağ asidi kompozisyonunun ~70%'i) sahip olduğu saptanmıştır. Buna göre, endüstriyel atıkların değerlendirildiği bu kültür ortamında yetiştirilen *C. cohnii*'nin biyodizel üretimi için uygun bir kaynak olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Cryptocodinium cohnii*, Mısır ıslatma şurubu, Peynir altı suyu, Optimizasyon, Yağ

INTRODUCTION

The heterotrophic marine microalga *Cryptocodinium cohnii* is particularly known for its ability to accumulate lipid (20-50% of cell dry weight) with high amounts of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6) which is very important for nutritional and pharmaceutical applications [1]. Researchers have been trying to produce sustainable and low-cost microalgal biomass and lipid production which have been currently used as a dietary supplement in food and beverages, health foods, animal feeds and maricultural products [1-2]. In addition to these application areas for microalgal lipid, extracellular polysaccharides (EPSs) that form the basis for a wide range of applications in food, pharmaceuticals, petroleum and other industries could be produced by *C. cohnii* and might attract a commercial interest in the future for microbial EPSs production by algae [3].

A wide variety of by-products and raw materials such as cheese whey, corn steep liquor, olive-mill waste water and carob pulp syrup from the food and/or agriculture industries have been employed for microbial cultivation due to their considerable availability and low cost [4-6]. Annual world cheese-whey (CW) production is continuously increasing and new bioproducts are being sought through biotechnology in order to get full use of the produced cheese whey [7, 8]. Corn steep liquor (CSL) has also been used as an inexpensive source of essential microbial nutrients for a variety of purposes [9, 10]. Even though there exist a number of technological developments and bioproducts in the transformation of CW or CSL to other useful products [7, 10], utilization of these by-products to cultivate heterotrophic microalgae offers a new application area.

The first step in the optimization of growth medium is screening of the important factors affecting the production [11]. Taguchi orthogonal array design and Plackett-Burmann (PB) are widely used statistical techniques in industrial process design, principally in the developmental trials [12, 13]. The basic principle of these methods serve as screening filters which examine the effects of many process variables and identify factors which have major effects on process parameters with a few experiments [11]. Screening experiments are followed by response surface methodology to optimize the culture medium composition factors which have a major effect on biomass productivity [11, 14]. Response surface methodology is an approach that combines various statistical and mathematical techniques, and is useful for developing, improving and optimizing a process [11, 15]. There are many applications of

response surface methodology related to optimization of the composition of the growth media for microalgal growth [15-17].

In the present study, it was aimed to biologically utilize cheese whey (CW) and corn steep liquor (CSL) for microalgal biomass and lipid production by using said wastes in culture medium for heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* cultivation. Firstly, CSL and CW were separately used as cultivation medium for growing *C. cohnii*. Statistical experimental tools were used to screen the important medium components which have a significant effect on the biomass productivity by *C. cohnii* in medium containing CW and CSL, separately. Once the significant factors were revealed in screening experiments, a response surface approach had been used for optimization of predetermined medium components in the alternative cultivation medium of *C. cohnii*. Total lipid content and DHA production by *C. cohnii* in the recently formulated medium were also compared with previous results.

MATERIAL and METHODS

Microalgae and Culture Conditions

Cryptocodinium cohnii CCMP 316 obtained from the Culture Collection of Marine Phytoplankton (CCMP, USA) culture was maintained in modified ATCC 30772 cultivation medium. The modified ATCC 30772 medium contained, per liter: 1 g of yeast extract (Merck), 25 g of sea salt, 0.01 g FeCl₃.6H₂O, 0.15 g Na₂ β-Glycerophosphate, 0.05 g (NH₄)₂SO₄, 1.5 g Tris (Tris(hydroxymethyl)amino methane) buffer (Sigma), 0.01 g K₂HPO₄, 30 mg EDTA, 1.5 mg FeCl₃.6H₂O, 30 mg H₃BO₃, 4.5 mg MnCl₂.4H₂O, 0.3 mg ZnCl₂, 0.15 mg CoCl₂.6H₂O, 0.003 mg biotin, 1 mg thiamine and 9 g glucose as a carbon source. Glucose was separately sterilized in a different bottle in an autoclave at 121 °C for 20 min and aseptically added (9 g/L) into the medium. The inoculum was prepared by growing the microalga in a 250 mL Erlenmeyer flask containing 75 mL of the modified ATCC 30772 medium incubated at 24°C for 72 h with orbital shaking at 130 rpm. The inoculum size was 10% of the total liquid volume in flasks. The inoculated flasks were then incubated at 24°C in a rotary shaker and agitated at 130 rpm in the dark condition. During the experiments, the initial pH of the growth medium was adjusted to 6.5±0.1.

Characterization of Cheese Whey and Corn Steep Liquor (CSL)

Fresh raw cheese whey was obtained from Pınar Inc., a large dairy factory in Izmir, Turkey. It had a pH of 4.7, chemical oxygen demand (COD) of 86.3 g/L, total sugars (as lactose) of 42.6 g/L, suspended solids of 6.9 g/L, and a total nitrogen of 0.2 g/L [7]. Corn steep liquor was obtained from Cargill (Bursa, Turkey) and its pH was 4.5. CSL generally contains water (~50%), nitrogen (3-4.5%), reducing sugars (~10%), minerals and vitamins [9]. Cheese whey and CSL were both kept at -20 °C until used.

Lipid Analysis, Methyl Ester Preparation and Analysis

The culture samples taken from the shake flasks were harvested by centrifugation at 1500 *g* for 5 min and washed at least twice with demineralised water. They were stored at -20°C until lyophilization. Lyophilization was performed in a freeze dryer (Christ, Alpha 1-2 LD plus, Germany) in accordance with the previously disclosed procedure [16]. The dried biomass obtained after freeze-drying was stored in air-tight containers at -20°C.

Oil was extracted from lyophilized algal biomass by a modified method of Bligh and Dyer [18]. Freeze-dried cells (100 mg or more) were weighed accurately into a 15 mL centrifuge tube. For extraction, 3 mL chloroform, methanol (2:1) containing 1.0 mg/mL nonadecanoic acid (19:0) and 0.5 mg/mL butylated hydroxytoluene (BHT) were used and the tube was shaken gently overnight at room temperature. After centrifugation at 1500 *g* for 5 min, the supernatant containing the extracted oil was stored at 4°C until being analysed. The extract was evaporated in a water bath (30°C) using a rotary evaporator (Stuart, RE300, UK) to remove solvents. The final lipid amount was determined gravimetrically [1].

Fatty acids were analyzed by gas chromatography (GC) after direct transmethylation with hydrochloric acid in

methanol by small modifications by Christie [19]. The fatty acid methyl esters (FAMES) were extracted with hexane and analyzed by Agilent 7890 gas chromatography equipped with a flame-ionization detector and a Supelco sp-2380 A capillary column (60m x 250µm x 0,2µm) with helium as a carrier gas according to a previously described procedure [16].

Experimental Design and Data Analysis

Fractional factorial designs like Taguchi and PB design are widely used statistical techniques for screening and optimization of medium components at shake-flask level [17, 20]. Since the present study was mainly aimed at screening of the important medium components with respect to their main effects, not the interaction effects between various medium constituents, PB and Taguchi designs were selected [12, 14]. Taguchi's method was applied to determine the medium components which significantly influence the biomass productivity of *C. cohnii* growing in medium containing CSL, while PB design was used to determine influence of medium components in CW medium. According to Taguchi's orthogonal array seven medium components in eight experiments were used to evaluate their influence on biomass productivity by *C. cohnii*. Experiments were performed according to an experimental plan given in Table 1 for medium containing CSL. A 12 run PB design was used to identify medium components having significant effects on biomass productivity in CW medium (Table 2). The low level (-1) and high level (+1) of each factor are listed in Table 2.

The data apart from optimization experiments were analyzed for one-way analysis of variance (ANOVA) and then Tukey's post hoc test was used for multiple comparisons with SPSS statistical software (SPSS for Windows ver.18.0). All statistics were based on a confidence level of 95%, so $p \leq 0.05$ was considered to denote a statistically significant difference, and $p \leq 0.01$ was also used to show the power of the significance.

Table 1. Taguchi design of variables (in actual levels) with the biomass productivity as a response in medium made with corn steep liquor (CSL, 10 g/100mL).

Run	Variables*							Response
	A (g/L)	B (g/L)	C (g/L)	D (mL/L)	E (mL/L)	F (g/L)	G (g/L)	Biomass Productivity (g/L.d)
1	0.01	1	0.01	0.1	3	0.05	0.15	0.86
2	0.001	1	0.15	0.1	0.3	0.05	1.5	0.79
3	0.001	1	0.15	1	3	0.005	0.15	1.06
4	0.01	0.1	0.15	1	0.3	0.05	0.15	0.94
5	0.001	0.1	0.01	0.1	0.3	0.005	0.15	1.25
6	0.01	1	0.01	1	0.3	0.005	1.5	0.82
7	0.01	0.1	0.15	0.1	3	0.005	1.5	0.94
8	0.001	0.1	0.01	1	3	0.05	1.5	0.80

*Seven variables to be screened in Taguchi design (A-G)-i.e., dipotassium hydrogenphosphate, glutamic acid, sodium glycerophosphate, vitamin solution, metal solution, ammonium sulphate, tris buffer.

Table 2. Plackett-Burman design of variables (in actual levels) with the biomass productivity of *C. cohnii* as a response growing in cheese whey (CW).

Run	Variables*											Response
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	Biomass Productivity (g/L.d)
1	0.01	1	1.5	0.1	0.3	0.005	1.5	0.001	0.15	28.0	0.00	0.95
2	0.001	1	1.5	0.1	3	0.05	1.5	0.001	0.00	0.00	10.0	1.28
3	0.001	1	1.5	1	0.3	0.005	0.15	0.01	0.00	28.0	10.0	1.33
4	0.01	1	0.1	0.1	0.3	0.05	0.15	0.01	0.15	0.00	10.0	0.06
5	0.01	0.1	0.1	0.1	3	0.005	1.5	0.01	0.00	28.0	10.0	1.08
6	0.001	0.1	0.1	0.1	0.3	0.005	0.15	0.001	0.00	0.00	0.00	0.25
7	0.01	0.1	1.5	1	0.3	0.05	1.5	0.01	0.00	0.00	0.00	0.87
8	0.001	1	0.1	1	3	0.005	1.5	0.01	0.15	0.00	0.00	0.77
9	0.01	0.1	1.5	1	3	0.005	0.15	0.001	0.15	0.00	10.0	0.12
10	0.001	0.1	1.5	0.1	3	0.05	0.15	0.01	0.15	28.0	0.00	0.62
11	0.01	1	0.1	1	3	0.05	0.15	0.001	0.00	28.0	0.00	0.39
12	0.001	0.1	0.1	1	0.3	0.05	1.5	0.001	0.15	28.0	10.0	1.04

*Eleven variables to be screened in Plackett-Burman design (A-K)-i.e., dipotassium hydrogenphosphate, glutamic acid, yeast extract, vitamin solution, metal solution, ammonium sulphate, tris buffer, Iron(III) chloride hexahydrate, sodium(II) β -glycerophosphate, sea salt, glucose.

Table 3. Experimental range and levels of the independent variables (sea salt, tris buffer, corn steep liquor (CSL)) and central composite design plan in actual value and observed response (biomass productivity, g/L.d).

Variables	Symbol Coded	Actual Levels of Coded Factors				
		-1.682	-1	0	+1	+1.682
Sea salt (g/L)	X1	2.52	9.0	18.50	28.0	34.48
Tris buffer (g/L)	X2	0.22	0.8	1.65	2.5	3.08
CSL (g /100 mL)	X3	0.1	3.0	7.25	11.50	14.40
Runs		X1	X2	X3	Biomass Productivity (g/L.d)	
1		0	0	-1.682	1.29	
2		0	0	0	1.39	
3		0	0	0	1.46	
4		-1	1	-1	0.75	
5		0	0	1.682	1.69	
6		1	-1	1	1.51	
7		-1	-1	-1	0.68	
8		1.682	0	0	1.45	
9		0	0	0	1.39	
10		1	1	1	1.97	
11		0	0	0	1.59	
12		0	0	0	1.54	
13		0	0	0	1.41	
14		0	-1.682	0	1.25	
15		1	1	-1	1.77	
16		-1.682	0	0	1.01	
17		-1	1	1	1.86	
18		1	-1	-1	1.55	
19		0	1.682	0	1.50	
20		-1	-1	1	1.56	

RESULTS and DISCUSSION

Screening of Important Nutrient Components on Biomass Productivity of *C. cohnii* in the Medium Containing CSL

According to the preliminary tests, the concentration of 10 g CSL in 100 mL medium was chosen as the optimum CSL concentration in *C. cohnii* medium for the screening experiments with CSL. The importance of the seven components, namely, dipotassium

hydrogenphosphate (K_2HPO_4), glutamic acid, sodium glycerophosphate, vitamin and metal solution, ammonium sulphate ($(NH_4)_2SO_4$) and tris buffer in a medium supplemented with sea salt (25 g/L) and glucose (9 g/L) was investigated by Taguchi design (Table 1). The biomass productivity by *C. cohnii* in the medium containing CSL (Table 1) were higher at the end of the screening experiments for all runs when compared to results obtained by using only CSL in sea water as a growth medium (data not shown). Based on the statistical analysis, dipotassium hydrogenphosphate

(K₂HPO₄), glutamic acid, vitamin and metal solution, ammonium sulphate ((NH₄)₂SO₄) and tris buffer were identified as the factors having significant effect on the biomass productivity by *C. cohnii* in the medium containing CSL (Table 4). All these factors caused a negative effect on biomass productivity. Thus, their lower concentrations could be used for further optimization process. Corn steep liquor was considered as a very suitable nutritious substrate in industrial fermentations since it typically contains many nitrogen compounds, vitamins, amino acids and mineral matters

which are easily assimilated into normal cell metabolism [9]. In this study, the incorporation of CSL at a concentration of 10 g/100mL to the fermentation medium resulted in elimination of sodium glycerophosphate from the medium and also reduced the levels of other components (K₂HPO₄, vitamin solution, metal solution, glutamic acid, (NH₄)₂SO₄ and tris buffer) for biomass productivity of *C. cohnii*. Our results clearly showed that CSL could be beneficial for the cultivation of *C. cohnii*.

Table 4. Statistical analysis of medium components on the biomass productivity of *C. cohnii* growing: (A) in medium made with corn steep liquor (CSL, 10 g/100 mL) from the results of Taguchi design (B) in cheese whey (CW) from the results of Plackett–Burman design*

Biomass Productivity (g/L.d)				Biomass Productivity (g/L.d)			
Source	MS	F-value	P>F	Source	MS	F-value	P>F
Model	0,029	9370.56	0.0276	Model	2.13	49.93	0.0042
K ₂ HPO ₄	0.014	4643.45	0.0093	K ₂ HPO ₄	0.28	51.75	0.0055
Glutamic acid	0.019	6222.43	0.0081	Glutamic acid	0.057	10.62	0.0472
Metal solution	2.358E-003	767.15	0.0230	Yeast extract	0.21	38.91	0.0083
Vitamin solution	6.694E-003	2178.30	0.0136	Tris buffer	0.88	164.09	0.0010
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.057	18550.90	0.0047	Na(II)	0.23	42.25	0.0074
Tris buffer	0.073	23861.16	0.0041	B-glycerophosphate	0.36	66.5	0.0039
	SS	DF		Sea salt	0.094	17.63	0.0247
Residual	3.073E-006	1	R ² 1.0000	Glucose			
Cor. Total	0.17	7	Adj. R ² 0.9999		SS	DF	
				Residual	0.016	3	R ² 0.9925
				Cor. Total	2.15	11	Adj. R ² 0.9727

A

B

SS, sum of squares; DF, degrees of freedom; MS, mean square

Screening of Important Nutrient Components on Biomass Productivity by *C. cohnii* in CW Medium

According to the preliminary tests, higher biomass productivity and total lipid content by *C. cohnii* were obtained by using CW without any dilution. Plackett–Burman design was preferred as a screening experiment for growth of *C. cohnii* in CW medium. Table 4 represents the PB experimental design for 12 trials with two levels of concentrations for each component and corresponds to the biomass productivity of *C. cohnii*. Based on the statistical analysis, there were no need for using vitamin and metal solution, (NH₄)₂SO₄ and Iron(III)chloride hexahydrate (FeCl₃.6H₂O) in terms of biomass productivity by *C. cohnii* in CW medium (p>0.05). Factors having the significant effect on the biomass productivity by *C. cohnii* growing in CW medium were identified as K₂HPO₄, glutamic acid, yeast extract, tris buffer, sodium glycerophosphate, sea salt and glucose (Table 4). Dipotassium hydrogenphosphate and sodium glycerophosphate had a negative effect on biomass productivity. On the other hand, tris buffer, sea salt, glucose, yeast extract, glutamic acid had a positive effect on biomass productivity. The results indicated that CW serves as a better culture medium with supplementation of some of ingredients found in defined medium. In addition to that, there was no need to freshwater for culturing *C. cohnii* in CW medium.

Optimization of Selected Medium Components Using Response Surface Methodology

It has been reported that *C. cohnii* requires complex nutrients for cell growth [21]. In this current study, these requirements were identified for both CW and CSL containing medium through the screening experiments (Table 4). In CSL containing medium, K₂HPO₄, glutamic acid, vitamin and metal solution, (NH₄)₂SO₄ and tris buffer had negative effect on the growth of *C. cohnii*. In CW medium, tris buffer, sea salt, glucose, yeast extract, glutamic acid had positive effects for the growth of *C. cohnii* (Table 4). The supplementation of nitrogen source was necessary for *C. cohnii* in CW medium. So, effects of both the yeast extract and the glutamic acid were positive for the cell growth. Glucose was used as the main carbon source by *C. cohnii* for both media. The concentration of non-significant and medium components that had negative effect for both CW and CSL containing medium were set to their lowest levels for the new medium formulation. It was concluded that, nitrogen requirement of cells could be met by using CSL in CW medium. Therefore, CSL, sea salt and tris buffer were taken as variables through the central composite design (CCD) for the investigation of their optimum levels on growth of *C. cohnii* in CW medium. In the CCD experimental model, sea salt (9-28 g/L), tris buffer (0.80-2.5 g/L) and CSL (3.0-11.5 g/100 mL) were taken as input variables. According to the implemented design, twenty combinations were performed (Table 3). The values of biomass productivity (g/L.d) which is the

response of the system obtained in different experimental conditions are also given in Table 3. The first order polynomial equation (expressed in terms of

$$Y = 1.43 + 0.20X_1 + 0.11X_2 + 0.21X_3 + 0.038 X_1X_2 - 0.23X_1X_3 + 0.058 X_2X_3 \quad (\text{Eq. 3})$$

where Y was the predicted response, i.e. the biomass productivity (g/L.d), and X_1 , X_2 , and X_3 were the coded values of the test variables, sea salt (g/L), tris buffer (g/L) and CSL concentrations (g/100 mL), respectively. As shown in Table 3, the biomass productivity was significantly improved with the optimized medium in comparison to that obtained with the medium containing CSL (Table 1) and CW medium (Table 2). The statistical analysis of the model was accomplished in the form of variance analysis (ANOVA) (Table 5). The model F-value of 13.96 indicated that the model was significant ($p < 0.01$). The statistical analysis indicated that sea salt and CSL had a mutual effect on biomass productivity while tris buffer was fixed at its intermediate level ($p < 0.01$). The 3-dimensional contour plot was given to illustrate the relationship between the response (biomass productivity) and the variables (sea salt and CSL) (Fig. 1). As shown in Fig. 1, there were two optimum regions for the biomass productivity by *C. cohnii* in CW medium containing CSL as the main nitrogen source. One of these optimum areas occurred in the region where the sea salt concentration was high and the concentration of CSL was low. The other one occurred in the region where the concentration of CSL was high and the sea salt concentration was low. Marine unicellular algae are generally considered to be tolerant and adaptable to a wide salinity range and several studies have been reported about the effect of salinity on cell growth of the marine dinoflagellate *C. cohnii* [21, 22]. In this study, sea salt concentrations were investigated in the range of 9-28 g/L. The biomass productivity increased with increasing salinity which had been reported before [22]. The results obtained in the current study revealed that the sea salt concentration of 9 g/L was also sufficient for *C. cohnii* CCMP316 to achieve the similar biomass productivity with the sea salt concentration of 28 g/L (Fig. 1). The sea salt concentration of 9 g/L was lower than the optimum value reported before for *C. cohnii* CCMP 316 [6]. For large scale cultivations, the sea salt concentration should preferably be as low as possible in order to prevent corrosion problems during the sterilization [23]. A decrease of the biomass productivity at extremely low concentrations of sea salt (comparing run 16 and runs at center points) could also be seen from the Table 3. The stimulation of growth with an increasing salinity to a certain degree was in agreement with the previous data [22]. In most of the cultivation media for *C. cohnii*, yeast extract is the generally used nitrogen source [6, 21, 22]. In a study where diluted carob pulp syrup was used as an alternative low-cost carbon source together with 5 g/L of yeast extract as a nitrogen source yielded lower biomass productivity values (0.096 g/L.d) when compared to the current study [6]. In this study, it has been demonstrated that CSL significantly enhances the growth of *C. cohnii* and it may be an alternative to yeast extract as the primary medium component.

coded values) fitted to the experimental CCD data for predicting the biomass productivity was given in the following equation:

It has been reported that the optimum pH for growth of *C. cohnii* is 6.5-6.6 [6,21-24]. After pH 7.0, cell growth starts to slow down [24]. So, the tris was used for buffering the pH. The statistical analysis indicated that tris buffer had a positive effect on the biomass productivity of *C. cohnii* (Table 5). Such a positive effect of buffer on cell growth could be due to its effect by keeping cells in logarithmic phase of growth to a higher cell density [21-23].

Total lipid content of *C. cohnii* cultivated in different conditions varied between 20-33% (w/w) of cell dry weight. The lipid production of *C. cohnii* CCMP 316 in optimized CW medium containing CSL was obviously superior to that achieved with the other *C. cohnii* strains using medium containing glucose (9 g/L) and yeast extract (0-10 g/L) as principal carbon and nitrogen sources [22]. In addition to that, the lipid production by *C. cohnii* CCMP316 in the alternative medium was superior than the 4 strains of *C. cohnii* tested in pH-auxostat cultures [25]. The influence of sea salt and yeast extract concentrations on lipid accumulation by *C. cohnii* ATCC 30772 had been studied in shake-flask culture [22, 23]. In this study, it was determined that the center point of the experimental design (Table 3) in which the concentration of CSL was 7.25 g/100mL, the concentration of tris buffer was 1.65 g/L and the concentration of sea salt was 18.5 g/L was good for lipid production. The seawater salinity was slightly above the average seawater salinity (15 g/L) and it was sufficient to get an appropriate lipid content (average 27% of cell dry weight). This seawater salinity requirement for the lipid production by *C. cohnii* was in agreement with the previous data [22].

The major fatty acids found in *C. cohnii* were C12:0; C14:0, C16:0, C18:0, C18:1 and C22:6 [6, 21, 24]. In this study, the percentage of C12:0, C14:0, C16:0, C18:0 and C18:1 were within the ranges of 2.0-3.4%, 12.0-16.8%, 24-38.7%, 11.2-14.4% and 20-26% respectively. C22:6 (DHA) percentage of all 20 runs ranged from 8.5 to 17% of the total fatty acids (TFA). Regarding to fatty acid composition of *C. cohnii*, the extraordinary amount of DHA (approx. 50% of fatty acids in a vigorously-aerated culture) has been the characteristic for that microalgae [22-24]. In this work, DHA percentage of TFA was lower than the above mentioned studies. Saturated fatty acids C18:0 (11.2-14.4%), C16:0 (24-38.7%), C14:0 (12.0-16.8%) and the monounsaturated fatty acid C18:1 (20-26%) were abundant in *C. cohnii* grown in CW medium containing CSL. An increased synthesis of saturated fatty acids such as C14:0 (29.98%) and C16:0 (32.05%) and a decreased DHA proportion (16.79%) were observed previously when the cultivation temperature was higher [26]. Fatty acid composition of algal cells may also be influenced by the medium composition as the organism usually modifies its biochemical composition in response

to the compositional change [6, 25]. It has been stated that the fatty acid production by *C. cohnii* was regulated by three separate systems, namely by, (1) the biosynthesis of saturated fatty acids, (2) the conversion of saturated fatty acids to monounsaturated fatty acids and (3) the de novo synthesis of DHA with desaturases [24]. According to the fatty acid biosynthesis pathways, the introduction of double bond is an oxidative process requiring molecular oxygen [24]. It is known that oxygen solubility is decreased by the ions and sugars normally added to the fermentation media [27]. The effect on oxygen solubility of ionic and non-ionic solutes such as molasses, corn steep liquor and protein agents has

been reported in several publications [24, 27]. Also, in fermentation processes with non-filamentous microorganisms, the rises in the viscosity of the growth medium are due to the production of extracellular polysaccharides [3]. Thus, a smaller amount of intracellular molecular oxygen was available at high ionic and non-ionic solutes present in CW medium containing CSL. Therefore, it couldn't allow the oxygen-dependent enzymes to catalyze the fatty acid desaturation and made such changes in fatty acid composition.

Table 5. ANOVA for the response surface optimization of medium composition for the biomass productivity (g/L.d) of *C. cohnii* growing in cheese whey (CW) mainly supplemented with corn steep liquor (CSL).

Source	SS	DF	MS	F-value	P>F
Model	1.74	6	0.29	13.96	<0.0001
Sea salt	0.53	1	0.53	25.66	0.0002
Tris buffer	0.16	1	0.16	7.69	0.0158
CSL	0.59	1	0.59	28.25	0.0001
Sea salt*tris buffer	0.012	1	0.012	0.56	0.4672
Sea salt*CSL	0.42	1	0.42	20.31	0.0006
Tris buffer*CSL	0.027	1	0.027	1.30	0.2741
Residual	0.27	13	0.021		
Lack of fit	0.23	8	0.029	4.11	0.0680
Pure error	0.036	5	7.107E-003		
Cor Total	2.01	19			
Std. Dev.	0.14		R-Squared	0.8657	
Mean	1.43		Adj R-Squared	0.8037	
C.V.%	10.06		Pred R-Squared	0,5938	
Press	0.81		Adeq Precision	12.033	

SS, Sum of squares; DF, degrees of freedom; MS, mean square.

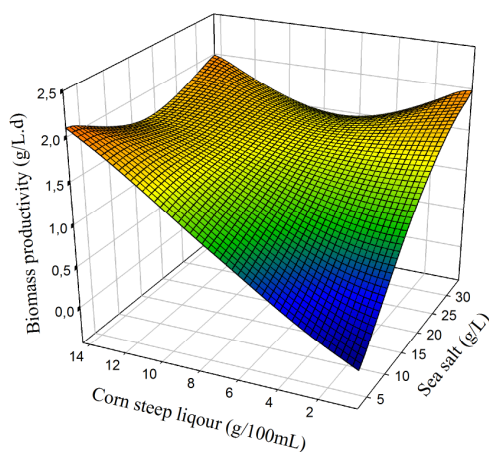


Figure 1. Contour plot of the influence of corn steep liquor (CSL) and sea salt concentrations on the biomass productivity (g/L.d) by *C. cohnii* in cheese whey (CW) medium containing CSL.

Validation of the Optimized Condition

On the basis of medium optimization, the model predicted that the maximum biomass productivity by *C. cohnii* was 1.80-1.81 g/L.d, when the CSL concentration was 11.5 g/L and that of tris buffer was 2.5 g/L when the

sea salt concentration was minimized (9 g/L) and maximized (28 g/L). To verify the predicted results, validation experiments were performed in triplicate tests. Under both optimized conditions, the observed experimental biomass productivity was 1.86 ± 0.06 , suggesting that experimental and predicted values of

biomass productivity by *C. cohnii* were in good agreement.

CONCLUSION

The marine heterotrophic microalga *C. cohnii* was able to grow in cheese whey medium supplemented with corn steep liquor and yielded high biomass productivity and lipid content. In order to develop algal oil production in a cost effective way, researchers should focus on the volumetric productivity. The productivity can be increased by increasing the final algal biomass concentration and the lipid content of the biomass. In the case of *C. cohnii*, heterotrophic growth on the alternative medium revealed that these two improvements were possible in CW medium containing CSL. Firstly, it was concluded that *C. cohnii* cells had high biomass productivity values (up to 1.97 g/L.d) from shake flask cultivations. Secondly, *C. cohnii* cells could contain a lipid content of at least 20% of cell dry weight. Although, it accumulated low percentages of DHA in total fatty acids composition, it still had a higher DHA percentage when compared to other ω -3 fatty acid producer microalgal strains [28, 29]. EPSs are by-products of DHA production process with *C. cohnii* which was reported by de Swaaf et al [3]. Therefore, the growing *C. cohnii* in that alternative medium might attract a commercial interest with regarding EPSs production. Also, the use of CW in the culture medium of *C. cohnii* eliminated the need for using fresh water. It could be the main motivation for production of *C. cohnii* by using CW. Moreover, the use of CW and CSL as feedstock of high value fermentation products may be a useful way of disposing of these by products, thus reducing the industrial residues and contributing to the environmental protection. To the best of our knowledge, this is the first report describing utilization of these by-products by *C. cohnii*.

ACKNOWLEDGEMENTS


This research was supported by The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) with 109M227 project number, and EBILTEM (Ege University Science and Technology Center, 2010/BIL/013 project number).

REFERENCES

- [1] De Swaaf, M.E., Sijtsma, L., Pronk, J.T., 2003. High-cell-density fed-batch cultivation of the docosahexaenoic acid producing marine alga *Cryptocodinium cohnii*. *Biotechnology and Bioengineering* 81: 666–672.
- [2] Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101: 87–96.
- [3] De Swaaf, M.E., Grobbsen, G.J., Eggink, G., De Rijk, T.C., Van der Meer, P., Sijtsma, L., 2001. Characterisation of extracellular polysaccharides produced by *Cryptocodinium cohnii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 395–400.
- [4] Morillo, J.A., Antizar-Ladislao, B., Monteoliva-Sanchez, M., Ramos Cormenzana, A., Russell, N.J., 2009. Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82: 25–39.
- [5] De Lima, C.J.B., Coelho, L.F., Blanco, K.C., Contiero, J., 2009. Response surface optimization of D (-)-lactic acid production by *Lactobacillus* SMI8 using corn steep liquor and yeast autolysate as an alternative nitrogen source. *African Journal of Biotechnology* 8: 5842–5846.
- [6] Mendes, A., Guerra, P., Madeira, V., Ruano, F., da Silva, T.L., Reis, A., 2007. Study of docosahexaenoic acid production by the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP316 using carob pulp as a promising carbon source. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 1209–1215.
- [7] Azbar, N., Dokgoz, F.T., Keskin, T., Eltem, R., Korkmaz, K.S., Gezgin, Y., Akbal, Z., Oncel S., Dalay, M.C., Gonen, C., Tutuk F., 2009. Comparative evaluation of bio-hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic and mesophilic anaerobic conditions. *International Journal of Green Energy* 6: 192–200.
- [8] Pesta, G., Meyer-Pittroff, R., Rus, W., 2007. Utilization of Whey. In Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry, Edited by V. Oreopoulou and W. Russ, Springer Science Business Media, LLC, New York, USA, 193 p.
- [9] Liggett, R.W., Koffler, H., 1948. Corn steep liquor in microbiology. *Bacteriological Reviews* 12: 297–311.
- [10] Maddipati, P., Atiyeh, H.K., Bellmer, D.D., Huhnke, R.L., 2011. Ethanol production from syngas by *Clostridium* strain P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract. *Bioresource Technology* 102: 6494–6501.
- [11] Mandenius, C.F., Brundin, A., 2008. Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology. *Biotechnology Progress* 24: 1191–1203.
- [12] Plackett, R.L., Burman, J.P., 1946. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika* 33: 305–325.
- [13] Antony, J., 2006. Taguchi or classical design of experiment: a perspective from a practitioner. *Sensor Review* 26: 227–230.
- [14] Gao, H., Liu, M., Liu, J., Dai, H., Zhou, X., Liu, X., Zhuo, Y., Zhang, W., Zhang, L., 2009. Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology. *Bioresource Technology* 100: 4012–4016.
- [15] Li, Z., Yuan, H., Yang, J., Li, B., 2011. Optimization of the biomass production of oil algae *Chlorella minutissima* UTEX2341. *Bioresource Technology* 102: 9128–9134.
- [16] Isleten-Hosoglu, M., Gultepe, I., Elibol, M., 2012. Optimization of carbon and nitrogen sources for biomass and lipid production by *Chlorella saccharophila* under heterotrophic conditions and development of Nile red fluorescence based

- method for quantification of its neutral lipid content. *Biochemical Engineering Journal* 61: 11–19.
- [17] Chi, Z., Pyle, D., Wen, Z., Frear, C., Chen, S., 2007. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. *Process Biochemistry* 42: 1537–1545.
- [18] Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemical Physiology* 37: 911–917.
- [19] Christie, W.W., 2003. Preparation of derivatives of fatty acids. In *Lipid Analysis: Isolation, Separation and Structural Analysis of Lipids*, Edited by W.W. Christie, J. Barnes and Associates, Dundee, Scotland, 205 p.
- [20] Liu, C., Liu, Y., Liao, W., Wen, Z., Chen, S., 2003. Application of statistically-based experimental designs for the optimization of nisin production from whey. *Biotechnology Letters* 25: 877–882.
- [21] Tuttle, R.C., Loeblich, A.R., 1975. An optimal growth medium for the dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *Phycology* 14: 1-8.
- [22] Jiang, Y., Chen, F., 1999. Effects of salinity on cell growth and docosahexaenoic acid content of the heterotrophic marine microalga *Cryptocodinium cohnii*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 23: 508–513.
- [23] De Swaaf, M.E., de Rijk, T.C., Eggink, G., Sijtsma, L., 1999. Optimization of docosahexaenoic acid production in batch cultivations by *Cryptocodinium cohnii*. *Journal of Biotechnology* 70: 185–192.
- [24] De Swaaf, M.E., de Rijk, T.C., de van der Meer, P., Eggink, G., Sijtsma, L., 2003. Analysis of docosahexaenoic acid biosynthesis in *Cryptocodinium cohnii* by ¹³C labelling and desaturase inhibitor experiments. *Journal of Biotechnology* 103: 21-29.
- [25] Ratledge, C., Kanagachandran, K., Anderson, A.J., Grantham, D.J., Stephenson, J.C., 2001. Production of docosahexaenoic acid by *Cryptocodinium cohnii* grown in a pH-auxostat culture with acetic acid as principal carbon source. *Lipids* 36: 1241-1246.
- [26] Jiang, Y., Chen, F., 2000. Effects of Temperature and Temperature Shift on Docosahexaenoic Acid Production by the Marine Microalga *Cryptocodinium cohnii*. *The Journal of the American Oil Chemists' Society* 77: 613-617.
- [27] Chen, M., Tang, H., Ma, H., Holland, T.C., Simon-Ng, K.Y., Salley, S.O., 2011. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology* 102: 1649–1655.
- [28] Brennan, L., Owende, P., 2010. Biofuels from microalgae— A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable Sustainable Energy Revolution* 14: 557–577.
- [29] YouWen, Z., Chen, F., 2001. Optimization of nitrogen sources for heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*. *Enzyme and Microbial Technology* 29: 341–347.

Inactivation of *Salmonella* Enteritidis on Almonds by Pulsed Light Treatment

Manolya Eser Oner 

Alanya Alaaddin Keykubat University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Alanya, Antalya, Turkey

Received (Geliş Tarihi): 20.05.2017, Accepted (Kabul Tarihi): 13.10.2017

✉ Corresponding author (Yazışmalardan Sorumlu Yazar): manolya.oner@alanya.edu.tr (M.E. Oner)

☎ +90 242 510 60 60 📠 +90 242 518 22 77

ABSTRACT

The effect of pulsed light treatment on the inactivation of *Salmonella* Enteritidis PT 30 on almonds was determined based on voltage, distance between sample and lamp and treatment time. Almonds were spot-inoculated with 20 µL of *Salmonella* Enteritidis PT 30 culture and then dried for 24 h at an ambient temperature. Almonds were treated with pulsed light at 3000, 3400 and 3800V at distances of 14.1 or 19.1 cm for 20 or 60 s. Pulsed light treatments reduced *Salmonella* populations by 0.44 to 4.14 log CFU/almond. Almonds treated with 3800V at 14.1 cm distance for 60 s resulted in a reduction by 4.14 log CFU/almond in *Salmonella* counts on TSAYE and 4.09 log CFU/almond on XLD agar. After pulsed light exposure, almond surface temperature increased from 25 to 35-50°C depending on treatment conditions. Results indicated that pulsed light had a potential to be used in the microbial inactivation of *Salmonella* in almonds and other low moisture foods.

Keywords: *Salmonella*, Almonds, Microbial inactivation, Surface temperature, Pulsed light

Atımlı Işık Uygulaması ile Bademde *Salmonella* Enteritidis İnaktivasyonu

ÖZ

Atımlı ışık uygulamasının badem yüzeyindeki *Salmonella* Enteritidis PT 30 inaktivasyonuna etkileri farklı voltaj, numune ile lamba mesafesi ve işlem süresi bakımından değerlendirilmiştir. Bademlerin yüzeyine 20 µL *Salmonella* Enteritidis PT 30 kültürü ekimi yapıp, sonra 24 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Ekim yapılmış bademlere, üç değişik voltajda (3000, 3400 ve 3800V); iki farklı numune ile lamba mesafesinde (14.1 ve 19.1 cm) 20 ya da 60 s süresince atımlı ışık uygulanmıştır. Badem yüzeyindeki *Salmonella* popülasyonu 0.44 ile 4.14 log CFU/badem oranında azalmıştır. Proses faktörlerinden 3800 V, 14.1 cm ve 60 s ile atımlı ışık uygulaması *Salmonella* miktarını TSAYE’de 4.14 log, XLD agarda ise 4.09 log CFU/badem azaltmıştır. Atımlı ışık yöntemi, uygulanan proses faktörlerine bağlı olarak, badem yüzeyindeki sıcaklığı 25’den 35-50°C’ye kadar yükseltmiştir. Bu çalışmaya göre atımlı ışık teknolojisi badem gibi nem oranı düşük olan gıdaların *Salmonella* mikrobiyal inaktivasyonda uygulanabileceği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Salmonella*, Badem, Mikrobiyal inaktivasyon, Yüzey sıcaklığı, Atımlı ışık

INTRODUCTION

Low moisture foods are considered to be safe; however, researches indicate that pathogens, including *Salmonella*, can survive in low moisture environment for

long time [17, 20, 21]. Besides the low moisture environment conditions, *Salmonella* can also adapt to varied pH (3.8 and 9.5) and temperatures (2-54°C). Many seeds and nuts including sesame seeds, coconuts, macadamia nuts, pistachios, peanuts, and

almonds have been recalled in recent years due to contamination with pathogenic microorganisms [7]. Almonds, in particular, were associated with two recorded outbreaks of salmonellosis [2, 19], which led to the establishment of U.S. regulations that require treatment achieving a minimum 4-log reduction in *Salmonella* for California-grown almonds [10]. There are several treatments that can be used to meet the minimum reduction requirement including blanching [14], oil roasting [8], and propylene oxide fumigation [5, 6]. However, blanching and oil roasting technologies may lead to undesirable loss of nutritional and physical quality and propylene oxide fumigation was found less attractive treatment for pathogen reduction due to its toxicity.

Pulsed light, a U.S. FDA (U.S. Food and Drug Administration) approved novel technology that rapidly inactivates bacteria, mold, yeasts, spores, and viruses on food surfaces, food contact surfaces, and packaging materials, may be a good alternative to conventional thermal or chemical decontamination processes [31]. It targets DNA of the microorganisms, inactivates DNA repair system thereby irreparable damage and then death occurs. This technology also utilizes intense, short-duration pulses of broad-spectrum light ranging from UV to infrared (100 to 1100 nm); UV light (100–400 nm), visible light (400–700 nm), and near-infrared light (700–1100 nm), which cause germicidal effects due to photochemical, photothermal and photophysical exposure [9, 4].

There have been several studies regarding with the microbial decontamination of foods by using pulsed light technology. It has been used in disinfection of fresh produce, meat and fish, beverages, and some other foods [24, 33]. In fresh produce, pulsed light applied to raspberries and strawberries [1], avocados [28], watermelon [29], mangoes [3], green onions [32], and apple [18]. Studies indicated that 1 to 3 log reduction is achievable in fresh-cut products in terms of microbial safety risks and quality. Maximum inactivation with pulsed light was about 1 to 2.5 log reduction in meat and fish products because intense treatments may lead to quality changes as in raw salmon [26], chicken frankfurter [22], and beef and tuna carpaccio [15]. Pulsed light was effective in microbial disinfection of highly transparent fluids compared to turbid fluids; however combined treatments such as ultrasound [11] and thermosonication [25] increased microbial inactivation.

The objective of this study was to investigate the effectiveness of pulsed light technology on inactivation of *Salmonella* Enteritidis PT 30 inoculated on the surfaces of almonds. Treatment parameters such as distance from the lamp, treatment time, and voltage were investigated. The almond surface temperature resulting from pulsed light treatments was also evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Stock Culture Preparation

The almond outbreak isolate of *Salmonella* enterica Serovar Enteritidis phage type 30 (PT 30) was obtained from the culture collection of Dr. Linda Harris at the University of California, Davis and stored among the culture collection at the Institute for Food Safety and Health (Bedford Park, IL). A cryobead of the culture was removed from storage at -80°C , quickly thawed, transferred to 10 mL tryptic soy broth (TSB) (Becton, Dickson and Co., Franklin Lakes, NJ), mixed thoroughly with a vortex (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), and then incubated at 37°C for 18 to 24 hr. After incubation, one sterile disposable loop-full of inoculum was plated on a tryptic soy agar supplemented with yeast extract (TSAYE, Becton, Dickson and Co.) and stored at 4°C . This pure culture of *Salmonella* Enteritidis PT 30 was used for the preparation of working cultures, which were utilized in subsequent experiments.

Inoculum Preparation

An isolated colony was transferred from the previously described working culture to TSB and incubated at 37°C for 24 h. Then, 100 μL of culture was spread evenly over the surface of TSAYE plates ($n=3$) with an L-shaped spreader which were then incubated at 37°C for 24 h. Cells were harvested by adding 1 mL of phosphate buffered saline (PBS, 98.8 g in 1 L water) to the plate and then an L-shaped spreader was used to gently scrape the agar surface. The resultant suspension was removed with a sterile pipette and deposited in a sterile 50-mL conical tube (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) along with cell suspensions from the other plates. The pooled culture was enumerated by serial dilution in buffered peptone water (BPW) followed by spreading on TSAYE and incubation at 37°C for 24 h.

Almond Inoculation

Almonds (Sincerely Nuts, Brooklyn, NY) were stored at ambient temperature and humidity until treatment. Twenty microliters of pooled inoculum was spot-inoculated onto each of the almonds at the approximate geometric center of one side of the sample. A total of 50 almonds were inoculated per experiment, two of which were used as untreated controls. Spot-inoculated almonds were allowed to dry in a petri dish for 24 h at ambient temperature ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$).

Treatment of Almonds

Almonds were treated with Steripulse XL-3000 pulsed light system (Xenon Corporation, Wilmington, MA). The system operated at 3 pulses/s, produced polychromatic radiation in the wavelength range of 100 to 1100 nm and generated 1.27 J/cm^2 per pulse at 3800 V based on the manufacturer's specifications. One almond per trial was placed in a sample holder located at the axial and longitudinal center of lamp and affixed to a movable shelf. Almonds were treated at three different voltages

(3000, 3400 and 3800 V) and two different distances (14.1 and 19.1 cm) as measured from sample to quartz window for two different treatment times (20 and 60 s) to determine inactivation of *Salmonella* Enteritidis PT 30. Each treatment condition was replicated 5 times.

In separate trials aimed at measuring almond heating during pulsed light treatment, a K-type thermocouple (Model HH306, Omega Engineering Inc., Stamford, CT) was inserted into a 0.41 mm diameter drilled hole from the underside of the almond until it was 0.5 mm below the top surface. Thermocouple equipped almonds were treated at 3 different voltages (3000, 3400 and 3800 V) and distances (14.1, 16.6 and 19.1 cm) for 6 different treatments times (0, 20, 30, 40, 50 and 60 s). Each treatment was replicated 3 times.

Microbial Enumeration

After pulsed light treatment, each treated almond was placed in sterile 50-mL conical tube to which 10 mL of BPW was added and then the tube was vortexed for 1 min. The resultant suspension was serially diluted in BPW and spread-plated in duplicate on TSAYE and xylose lysine deoxycholate (XLD, Becton, Dickson and Co.) agar plates which were then incubated at 37°C for 24 h prior to enumeration.

Statistical Analysis

The experimental design was a completely randomized, 3-way factorial ($3 \times 2 \times 2$) design with five replications. Microbial data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) using JMP software (JMP version 9.0; Cary, NC, USA). Tukey's multiple comparison at 95% level was performed to determine significant differences between treatments.

RESULTS and DISCUSSION

Effect of Pulsed Light Treatment on Microbial Inactivation

Initial populations of spot-inoculated almonds were 6.96 ± 0.37 log CFU/almond and 6.66 ± 0.49 log CFU/almond as enumerated on TSAYE and XLD agars, respectively. As shown in Table 1, pulsed light treatments reduced *Salmonella* populations on almonds by 0.44 ± 0.44 to 4.14 ± 1.45 log CFU/almond when plated on TSAYE. Results were comparable using XLD agar indicating that cells exposed to pulsed light were inactivated rather than injured. Thus, reductions reported hereafter refer to those determined with TSAYE. As expected, treatment at the highest voltage (3800 V), closest distance (14.1 cm) and longest time (60 s) resulted in the greatest reductions of *Salmonella* (4.14 ± 1.45 log CFU/almond). However, treatment time had a significant effect ($p < 0.05$) on inactivation levels achieved as a 2.79 ± 0.75 log CFU/almond reduction was observed with 20 s treatment at the same voltage (3800 V) and distance (14.1 cm). Greater variability in log reduction was seen as treatment time increased. These results are consistent with the findings of other studies.

After pulsed light treatment of inoculated raspberries at distance of 5 cm to quartz window, 1.1 and 4.3 log *Salmonella* reduction was determined at 5 and 60 s of treatment times, respectively [1]. In addition, similar results were obtained in inactivation of *Salmonella* and *E. coli* on blueberry surface by using pulsed light technology [35]. Researchers found that higher frequency (100Hz) did not affect the microbial inactivation when compared to lower frequencies (1.8 or 3 Hz) [34]. However, reducing voltage from 3800 V to 3400 and 3000 V resulted in significantly less microbial inactivation ($p < 0.05$). At a lamp distance of 14.1 cm and treatment time of 20 s, voltages of 3800, 3400, and 3000 V reduced *Salmonella* by 2.79, 1.29, and 0.89 log CFU/almond, respectively. Statistical analysis confirmed that voltage, distance and treatment time were factors significantly affecting *Salmonella* inactivation, and that there were interaction effects between these treatment parameters.

Sample position and orientation to the lamp and the distance between the sample and the lamp are important parameters for microbial inactivation by pulsed light. Others have shown that the greater the distance between the sample and the lamp, the lower the lethality [16, 30]. Results obtained in this study are consistent with these findings as *Salmonella* was reduced by 4.14 log CFU/almond at 14.1 cm and 3.01 log CFU/almond at 19.1 cm for treatments at 3800 V for 60 s. Similar results were obtained in treatments at 3400 and 3000 V and 60 s treatment time. Since only one almond was treated at a time, additional consideration will have to be given in order to scale-up the technology as efficacy is expected to be lower due to lamp position and orientation if a cluster of almonds were to be placed very close to the lamp [13]. There were no visually observable changes in almond quality for samples treated for up to 60 s.

Effect of Pulsed Light Treatment on Surface Temperature

In pulsed light treatments, when the light intensity is high or treatment duration is long, the product surface temperature may increase and ultimately lead to product burning. There have been several studies that indicate surface temperature of food product increases when exposed to pulsed light treatment [16, 12, 26]. As seen in Figures 1,2 and 3 after pulsed light exposure, temperature at 1 mm below the almond surface increased from 25 up to 50°C depending on the treatment conditions of voltage, distance and time. At 14.1 cm, the highest temperatures (48 to 50°C) after 60 s treatment were obtained in samples regardless of system input voltage. At each distance, temperature increased significantly with treatment time. Similar results obtained in decontamination of *Listeria monocytogenes* on inoculated unpackaged and packaged chicken frankfurters by using pulsed light system. The temperature difference between the treated and untreated (initial) unpackaged samples varied between 2.4 and 46.5°C depending on treatment conditions [22]. At 3800 and 3400 V, little difference in almond temperatures were observed at 16.6 and 19.1 cm; however, at lower voltage (3000 V) there existed

greater differentiation between temperature with respect to distance. None of the temperatures reached just below the almond surface with up to 60 s treatment were high enough to contribute thermal inactivation of *Salmonella* [27, 23]. Nevertheless, in other study, temperature increased to higher levels on skin sides of

salmon fillets within 60 s of pulsed light treatment; 100, 86, 76°C at 3, 5, and 8 cm distances to quartz window, respectively, indicating that surface temperature may vary based on food type as well [26].

Table 1. Log reductions of *Salmonella* Enteritidis PT 30 on almonds after pulsed light treatment.

Pulse Light Treatment Conditions ^b			<i>Salmonella</i> Reduction log (CFU/almond) ^a	
Voltage (V)	Distance (cm)	Time (s)	TSAYE	XLD
3800	14.1	20	2.79±0.75 ^B	3.01±0.84 ^{AB}
		60	4.14±1.45 ^A	4.09±1.48 ^A
	19.1	20	0.84±0.75 ^{CD}	0.93±0.93 ^D
		60	3.01±1.19 ^B	3.02±1.56 ^{AB}
3400	14.1	20	1.29±0.46 ^{CD}	1.60±1.05 ^{BCD}
		60	3.54±1.18 ^{AB}	3.87±1.48 ^A
	19.1	20	0.44±0.44 ^D	0.44±0.17 ^D
		60	1.52±0.74 ^C	1.75±0.59 ^{BCD}
3000	14.1	20	0.89±0.47 ^{CD}	0.83±0.34 ^D
		60	2.86±0.67 ^B	2.66±1.38 ^{ABC}
	19.1	20	0.50±0.39 ^D	0.38±0.32 ^D
		60	1.46±0.65 ^C	1.32±0.43 ^D

^a Values in the same column followed by different letters are significantly different (p<0.05). Experiment was replicated five times. ^b Initial populations of spot-inoculated almonds are 6.96±0.37 log CFU/g and 6.66±0.49 log CFU/g on TSAYE and XLD agars, respectively.

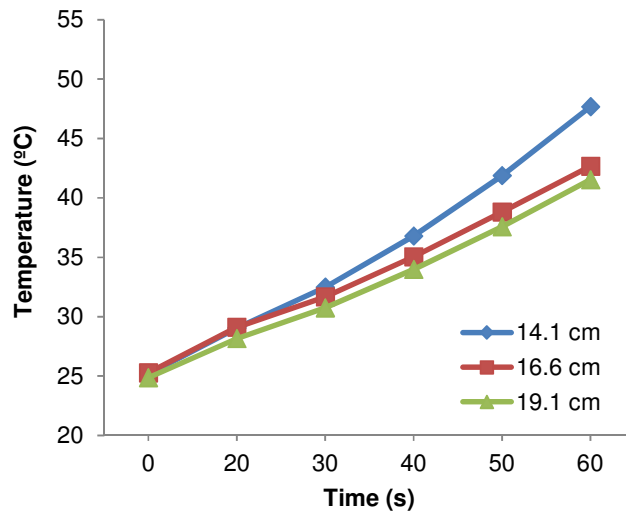


Figure 1. Change in surface temperature of almonds during pulsed light treatment with 3800 V.

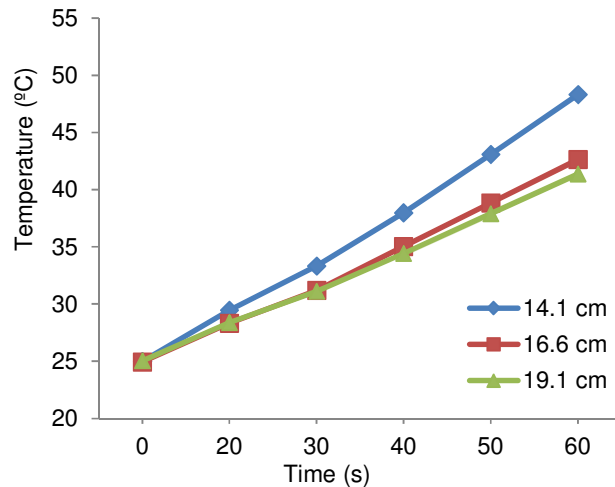


Figure 2. Change in surface temperature of almonds during pulsed light treatment with 3400 V

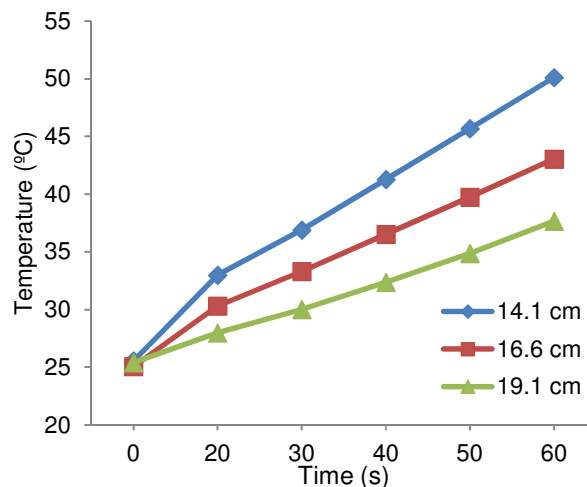


Figure 3. Change in surface temperature of almonds during pulsed light treatment with 3000 V.

CONCLUSION

The highest voltage, the shortest distance and the longest treatment time increased the inactivation of *Salmonella* Enteritidis PT 30 on the surface of almonds. The maximum microbial inactivation was observed in almond treated with 3800 V, 14.1 cm distance, 60 s and the surface temperature reached to 48°C. There were no visually observable changes in almonds for samples treated for up to 60 s. Results of this study indicate that pulsed light technology is a promising technology for microbial inactivation of *Salmonella* Enteritidis PT 30 on almonds. However, further studies are needed to determine the effectiveness of pulsed light on other low moisture food products including, nuts, peanuts, and sesame seeds. In addition, scaling-up pulsed light system with a proper design of lamp position and an orientation should be evaluated; thereby cluster of food pieces might be treated homogeneously by using this

technology instead of treating one spot on the surface of the food product.

ACKNOWLEDGEMENTS

Special thanks to Kathiravan Krishnamurthy at the Institute for Food Safety and Health, Illinois Institute of Technology and Nathan M. Anderson at the US Food and Drug Administration (FDA) for their assistance in the laboratory and the use of pulsed light equipment.

REFERENCES

- [1] Bialka, K.L., Demirci, A., 2008. Efficacy of pulsed UV-light for the decontamination of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. on raspberries and strawberries. *Journal of Food Science* 73: M201-M207.

- [2] Centers for Disease Control and Prevention (CDC)., 2004. Outbreak of *Salmonella* serotype Enteritidis infections associated with raw almonds—United States and Canada, 2003–2004. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)* 53(22): 484–487. Available at: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5322a8.htm> (Accessed October 2015).
- [3] Charles, F., Vidal, V., Olive, F., Filgueiras, H., Sallanon, H., 2013. Pulsed light treatment as new method to maintain physical and nutritional quality of fresh-cut mangoes. *Innovations in Food Science and Emerging Technologies* 18: 190–195.
- [4] Condon, S., Alvarez, I., Gayan, E., 2014. Pulsed UV Light in *Encyclopedia of Food Microbiology* 3: 974-981.
- [5] Danlyuk, M.D., Harris, L.J., Schaffner, D.W., 2006. Monte Carlo simulations assessing the risk of Salmonellosis from consumption of almonds. *Journal of Food Protection* 69(7): 1594-1599.
- [6] Danyluk, M.D., Uesugi, A.R., Harris, L.J., 2005. Survival of *Salmonella Enteritidis* PT 30 on inoculated almonds after commercial fumigation with propylene oxide. *Journal of Food Protection* 68: 1613–1622.
- [7] Danlyuk, M.D., Abd, S.J., Jones, T.M., Schlitt-Dittrich, F., Jacobs, M., Harris, L.J., 2007. Prevalence and amounts of *Salmonella* found on raw California almonds. *Journal of Food Protection* 70(4): 820-827.
- [8] Du, W.X., Abd, S.J., McCarthy, K.L., Harris, L.J., 2010. Reduction of *Salmonella* on inoculated almonds exposed to hot oil. *Journal of Food Protection* 73: 1238–1246.
- [9] Elmnasser, N., Guillou, S., Leroi, F., Orange, N., Bakhrouf, A., Federighi, M., 2007. Pulsed-light system as a novel food decontamination technology: a review. *Canadian Journal of Microbiology* 53(7): 813-21.
- [10] Federal Register. 2007. Almonds grown in California; outgoing quality control requirements. *Federal Register*, 72, 15021–15036 Available at: <http://www.gpo.gov/fdsys/granule/FR-2007-03-30/07-1557> (Accessed October 2015).
- [11] Ferrario, M., Guerrero, S., 2016. Effect of a continuous flow-through pulsed light system combined with ultrasound on microbial survivability, color and sensory shelf life of apple juice. *Innovations in Food Science and Emerging Technologies* 34: 214–224.
- [12] Fine, F., Gervais, P., 2004. Efficiency of pulsed UV light for microbial decontamination of food powders. *Journal of Food Protection* 67: 787-792.
- [13] Gomez-Lopez, V.M., Devlieghere, F., Bonduelle, V., Debevere, J., 2005. Factors affecting the inactivation of micro-organisms by intense light pulses. *Journal of Applied Microbiology* 99(3): 460-70.
- [14] Harris, L.J., Uesugi, A.R., Abd, S.J., McCarthy, K.L., 2012. Survival of *Salmonella Enteritidis* PT 30 on inoculated almond kernels in hot water treatments. *Food Research International* 45: 1093-1098
- [15] Hierro, E., Ganan, M., Barroso, E., Fernandez, M., 2012. Pulsed light treatment for the inactivation of selected pathogens and the shelf-life extension of beef and tuna carpaccio. *International Journal of Food Microbiology* 158: 42–48.
- [16] Hillegas, S.L., Demirci, A., 2003. Inactivation of *Clostridium sporogenes* in clover honey by pulsed UV-light treatment. *Agricultural Engineering International: The CIGR (Commission Internationale du Génie Rural) Journal of Scientific Research and Development* 7: FP03-009.
- [17] Hiramatsu, R., Matsumoto, M., Sakae, K., Miyazaki, Y., 2005. Ability of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. to survive in a desiccation model system and in dry foods. *Applied and Environmental Microbiology* 71(11): 6657-63.
- [18] Ignat, A., Manzocco, L., Maifreni, M., Bartolomeoli, I., Nicoli, M.C., 2014. Surface decontamination of fresh-cut apple by pulsed light: effects on structure, colour and sensory properties. *Postharvest Biology and Technology* 91: 122–127.
- [19] Isaacs, S., Aramini, J., Ciebin, B., Farrar, J.A., Ahmed, R., Middleton, D., Chandran, A.U., Harris, L.J., Howes, M., Chan, E., Pichette, A.S., Campbell, K., Gupta, A., Lior, L.Y., Pearce, M., Clark, C., Rodgers, F., Jamieson, F., Brophy, I., Ellis, A., 2005. An international outbreak of salmonellosis associated with raw almonds contaminated with a rare phage type of *Salmonella Enteritidis*. *Journal of Food Protection* 68:191–198.
- [20] Janning, B., in't Veld, P.H., Notermans, S., Kramer, J., 1994. Resistance of bacterial strains to dry conditions: use of anhydrous silica gel in a desiccation model system. *Journal of Applied Bacteriology* 77: 319-324.
- [21] Juven, B.J., Cox, N.A., Bailey, J.S., Thomson, J.E., Charles, O.W., Shutze, J.V., 1984. Survival of *Salmonella* in dry food and feed. *Journal of Food Protection* 47: 445-448.
- [22] Keklik, N.M., Demirci, A., Puri, V.M., 2009. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on unpackaged and vacuum packaged chicken frankfurters using pulsed UV-light. *Journal of Food Science* 74: M431–M439.
- [23] Keller, S., Grasso, E., Halik, L., Fleischman, G., Chirtel, S., Grove, S., 2012. Effect of growth on the thermal resistance and survival of *Salmonella* Tennessee and Oranienburg in peanut butter,

- measured by a new thin-layer thermal death time device. *Journal of Food Protection* 75: 1125-1130.
- [24] Kramer, B., Wunderlich, J., Muranyi, P., 2016. Recent findings in pulsed light disinfection. *Journal of Applied Microbiology* 122: 830-856.
- [25] Munoz, A., Palgan, I., Noci, F., Morgan, D.J., Cronin, D.A., Whyte, P., Lyng, J.G., 2011. Combinations of high intensity light pulses and thermosonication for the inactivation of *Escherichia coli* in orange juice. *Food Microbiology* 28: 1200–1204.
- [26] Ozer, N.P., Demirci, A. 2006. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* inoculated on raw salmon fillets by pulsed UV-light treatment. *International Journal of Food Science and Technology* 40: 1-7.
- [27] Podolak, R., Enache, E., Stone, W., Black, D.G., Elliott, P.H., 2010. Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of *Salmonella* in low-moisture foods. *Journal of Food Protection* 73: 1919–1936.
- [28] Ramos-Villarreal, A.Y., Martin-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R., 2011. Bacterial inactivation and quality changes in fresh-cut avocado treated with intense light pulses. *European Food Research and Technology* 233: 395–402.
- [29] Ramos-Villarreal, A.Y., Aron-Maftei, N., Martin-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R., 2012. Influence of spectral distribution on bacterial inactivation and quality changes of fresh-cut watermelon treated with intense light pulses. *Postharvest Biology and Technology* 69: 32–39.
- [30] Sharma, R.R., Demirci, A., 2003. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on inoculated alfalfa seeds with pulsed ultra violet light and response surface modelling. *Journal of Food Science* 68:1448-1453.
- [31] U.S. Food and Drug Administration (FDA), 1996. Pulsed light for the food treatment. 21 CFR 179.41. Available at: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=179.41> (Accessed October 2015).
- [32] Xu, W., Chen, H., Huang, Y., Wu, C., 2013. Decontamination of *Escherichia coli* O157: H7 on green onions using pulsed light (PL) and PL–surfactant–sanitizer combinations. *International Journal of Food Microbiology* 166: 102–108.
- [33] Pala, C.U., Toklucu, A.K., 2010. Ultraviyole ışın (UV) teknolojisinin meyve sularına uygulanması. *Akademik Gıda* 8(1): 17-22.
- [34] Harguindeguy, M., 2016. Efficacy of pulsed light technology for the inactivation of *Salmonella* Enteritidis PT 30 on almond kernel surface. MSc Thesis, Illinois Institute of Technology, Chicago IL, USA.
- [35] Bialka, K.L., Demirci, A., 2007. Decontamination of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Enterica on blueberries using ozone and pulsed UV-light. *Journal of Food Science* 72(9): M391-M396.
-

Isıl İşlem Görmüş İçme Sütlerinde (Pastörize, UHT ve Laktozsuz UHT Süt) Hidroksimetilfurfural İçeriğinin Belirlenmesi

Müge Urgu , Turkuaz Ecem Saatli , Aylin Türk , Nurcan Koca  

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

Geliş Tarihi (Received): 02.06.2017, Kabul Tarihi (Accepted): 27.09.2017

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): nurcan.koca@ege.edu.tr (N. Koca)

☎ 0 232 311 30 29 📠 0 232 342 75 92

ÖZ

Isıl işlem uygulaması sırasında gerçekleşen Maillard reaksiyonları (enzimatik olmayan esmerleşme) ürün kalitesi açısından önemlidir. Bu reaksiyonun ara ürünlerinden biri olan hidroksimetilfurfural (HMF), üretim ve depolama aşamasında özellikle sıcaklığa bağlı olarak değişim göstermektedir. Bu çalışmada, piyasadaki farklı yağ oranlarına sahip pastörize ve UHT sütlerin toplam HMF miktarları belirlenmiş ve ayrıca laktozun hidrolize edilmesinin HMF değeri üzerine etkisi saptanmıştır. Bunun yanı sıra, sütlerin bileşim ve renk değerleri de tespit edilmiştir. Toplam HMF değerleri, pastörize süt örneklerinde 1.15-4.78 µmol/L, UHT süt örneklerinde 2.16-12.74 µmol/L, laktozsuz UHT süt örneklerinde ise 27.35-35.73 µmol/L aralığında tespit edilmiştir. Her ne kadar ısı artışı ile HMF değerlerinde artış tespit edilse de, bu değerler HMF içeren birçok gıdaya göre oldukça düşük bulunmuştur. UHT sütlerin yağ içeriğinin artması ile HMF değerlerinde düşük seviyelerde artış gözlenmesine karşın, en yüksek değerler laktozun hidrolize edildiği laktozsuz UHT sütlerde elde edilmiştir. Ayrıca, laktozsuz UHT sütlerin kırmızılık değeri daha yüksek bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: İçme sütü, Hidroksimetilfurfural, Isıl işlem

Determination of Hydroxymethylfurfural Content of Heat-Treated Milk (Pasteurized, UHT and Lactose-Hydrolysed UHT Milk)

ABSTRACT

Maillard reaction (non-enzymatic browning) formed during heat treatment is an important for the quality of foods. Hydroxymethylfurfural (HMF) is an intermediate compound of this reaction and can be changed with temperature during production and storage in dairy products. In this study, the HMF levels of pasteurized and UHT milks with different fat contents were determined. In addition to the effect of hydrolysis of lactose on HMF contents, the composition and colour values of milk samples were also determined. Total HMF values varied from 1.15 to 4.78 µmol/L in pasteurized milk, 2.16 to 12.74 µmol/L in UHT milk and 27.35 to 35.73 µmol/L in lactose hydrolysed milk. Although increase in heat intensity resulted in an increase in HMF values, levels were still lower than those in other food products. HMF values of UHT milk slightly increased with an increase in milk fat. The highest level was obtained in lactose hydrolysed UHT milk. Moreover, the redness values of lactose hydrolysed UHT milks were high.

Keywords: Milk, Hydroxymethylfurfural, Heat treatment

GİRİŞ

İçme sütleri, çiğ sütlerin mikrobiyolojik açıdan güvenilir hale getirilmesi amacıyla ısı işlem uygulamalarına tabi

tutulmaktadır. Nitekim Türk Gıda Kodeksi, Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği'ne göre ısı işlem görmüş içme sütü; pastörizasyon, UHT veya

sterilizasyon işlemlerinden biriyle ısı işlem yaparak tüketiciye sunulan süt olarak tanımlanmaktadır [1].

Isıl işlem uygulamaları sütün yapısında kimyasal ve biyokimyasal reaksiyonlara neden olarak özellikle protein, karbonhidrat ve vitaminler başta olmak üzere bileşiminde birtakım farklılıkların oluşmasına yol açmakla birlikte besinsel kalite ile duyu özellikleri değiştirebilmektedir [2; 3]. Isıl işlem uygulamaları ile ortaya çıkan reaksiyonların başında proteinlerin serbest amino grupları ile indirgen şekerlerin serbest aldehit grupları arasında gerçekleşen enzimatik olmayan Maillard reaksiyonu gelmektedir [4; 5; 6]. Maillard reaksiyonu mekanizması oldukça kompleks olmakla birlikte temel olarak başlangıç, ileri ve son aşamadan oluşmaktadır [7]. Sütte Maillard reaksiyonunun başlangıç aşamasında, indirgen şeker olan laktoz ile lizin arasında kondensasyon reaksiyonu Schiff bazı oluşmakta ve daha sonra Amadori yeniden düzenlenmesi ile Amadori ürünü olarak bilinen laktulosillisin ortaya çıkmaktadır [6]. Tepkimenin ileri aşamasında, oluşan Amadori ürününün parçalanması ile furfural veya hidroksimetilfurfural (HMF), fizyon ürünleri (asetol, diasetil, pirüvaldehit vb.), redüktonlar, dehidroredüktonlar, aldehitler, aldoller ve N içermeyen polimerler esterler gibi birçok bileşik pH'ya bağlı olarak oluşmaktadır. Reaksiyonun son aşamasında ise, ortaya çıkan bu bileşiklerin kahverengi azotlu polimerler ve kopolimerlere (melanoidinlere) dönüşümü gerçekleşmektedir [8]. Reaksiyon sonucunda reaksiyona katılan yarıyapılı lizin miktarında azalma, protein polimerizasyonu, lezzet bileşenleri ve mutajenik, antioksidatif ve antikarsinojenik bileşenler oluşmaktadır. Reaksiyonun derecesi ise ısı işlem indikatörleriyle belirlenebilmektedir; bu amaçla reaksiyonun ilk aşamasında ortaya çıkabilen furosin ve karboksimetillisin, laktozun izomerizasyonu ile oluşan laktuloz ve ileri aşamada oluşabilen hidroksimetilfurfural ısı işlem indikatörleri olarak kullanılabilir [6]. Reaksiyon sonucunda oluşan ürünlerin hem çeşitliliği hem de karmaşık yapıya sahip olması bu konu üzerine yapılan çalışmaların artmasına yol açmıştır [6, 8, 9].

Isıl işlem uygulanan sütlerde Maillard reaksiyonu sonucunda ortaya çıkan ara ürünlerden biri olan HMF, sütlere uygulanan ısı işlem şiddetinin ve kalitenin belirlenmesinde kullanılmaktadır [6, 10]. HMF miktarı; süte uygulanan ısı işlemin yoğunluğuna, sütün bileşimine ve depolama koşullarına bağlı olarak değişebilmektedir. Nitekim Morales ve ark. [11] tarafından, ısı işlem yoğunluğunun artmasıyla birlikte HMF değerlerinin yükseldiği tespit edilmiştir. HMF değerleri, düşükten yükseğe doğru pastörizasyon, direkt UHT işlemi, indirekt UHT işlemi ve klasik sterilizasyon işlemi uygulanan sütler olarak sıralanmıştır. Benzer şekilde, Akalın ve Göncü [12] tarafından yapılan çalışmada indirekt UHT işlemine tabi tutulan sütlerde HMF oranı direkt UHT işlemi uygulanan sütlere göre daha yüksek bulunmuştur. HMF tayininde, basit ve düşük maliyetli olması sebebiyle sıklıkla kolorimetrik yöntem kullanılmaktadır. Ancak, kromatografik (RP-HPLC) yöntemin daha kesin sonuç verdiği belirtilmiştir. Morales ve ark. [13], süte uygulanan ısı işlemle oluşan HMF miktarını kromatografik ve kolorimetrik yöntemler

ile ölçerek yöntem kıyaslaması yapmışlardır. Çalışma sonucunda, kolorimetrik yöntem ile elde edilen HMF değerlerinin, kromatografik yöntemle kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu fark, kolorimetrik yöntemde TBA'nın HMF yanı sıra, özellikle aldehitlerle de reaktivite gösterebilmesine bağlanmıştır. Buna karşın, iki yöntemde de örnekler arasındaki artış ve azalış eğilimleri benzer bulunmuştur. Ayrıca, pastörize ve UHT sütlerde metotlar arasındaki fark daha az bulunmuş ve şişede sterilizasyonda yani daha uzun süreli yüksek ısı işlemde farkın belirginleştiği vurgulanmıştır.

Sütte Maillard reaksiyonunu, ısı işlem derecesinin yanı sıra reaksiyona giren şeker kompozisyonu da etkilemektedir. Monosakkaritler ve indirgen disakkaritler reaksiyona girmekle birlikte, monosakkaritlerin disakkaritlere kıyasla daha hızlı reaksiyona girdiği bildirilmiştir [14, 15]. Laktozsuz sütlerde laktozun enzimatik hidrolize uğrayarak glikoz ve galaktoza dönüşmesi, aminlerle (proteine bağlı lizin ve diğer NH-uçları) daha yüksek reaktivite göstermesine yol açarak Maillard reaksiyonu için daha uygun bir ortam oluşturmaktadır [16, 17]. Ayrıca, laktozsuz sütlere ilave edilen laktaz enziminin de proteolitik aktiviteler gibi istenmeyen uç aktiviteler ile serbest aminoasit miktarında artışa neden olarak reaksiyonu etkilediği bildirilmiştir [16]. Literatürde ısı işlem görmüş sütlerin HMF oranlarına dair kısıtlı sayıda çalışma bulunmakla birlikte, laktozsuz sütlerin HMF değerlerine ilişkin bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak, laktozun hidrolizasyonu ile ortaya çıkan indirgen şekerlerin Maillard reaksiyonunu hızlandırdığı, diğer ısı işlem indikatörleri olan laktuloz ve furosin miktarları belirlenerek ortaya konulmuştur [16, 18-20].

Isıl işlem sonucunda ortaya çıkan ürünlere süt yağının etkisi ise birçok araştırmacı tarafından çalışılmasına rağmen netlik kazanmamıştır. Claeys ve ark. [21] ve Berg [22] tarafından, süt yağının ısı işlem uygulaması sonucunda ortaya çıkan ürünler üzerine etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Buna karşın, Pellegrino [23] tarafından, ısı işlem sırasında süt yağının ısı transferini azaltarak bileşenler üzerinde koruyucu etki yarattığı ifade edilmiştir. Diğer taraftan, yüksek ısı işlem sırasında oluşan lipid degradasyon ürünlerinin Maillard reaksiyonuna katkıda bulunabileceği de belirtilmiştir [24-26].

Ülkemizde ısı işlem görmüş içme sütü üretimi artmakta ve her yıl sektöre yeni firmalar katılmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada, ülkemizde satışa sunulan ısı işlem görmüş sütlerin son yıllardaki durumunu ortaya koymak amacıyla farklı firmalar tarafından satışa sunulan pastörize ve UHT sütlerin toplam HMF değerleri belirlenmiştir. Bununla birlikte, piyasada UHT sütler farklı yağ oranlarında ve laktozsuz formda (laktoz hidrolize) bulunmaktadır. Dolayısıyla, çalışma içerisinde yağ oranının ve laktozun hidrolize edilmesinin, UHT sütün HMF değeri üzerine etkisi de araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Çalışmada İzmir'de bulunan büyük marketlerden sağlanan, farklı firmalara ait inek sütü kullanılarak üretilmiş içme sütleri kullanılmıştır. Bu kapsamda, 6 adet pastörize süt örneği (1 adet tam yağlı, 5 adet yağlı) ve 29 adet UHT süt örneği (14 adet yağlı, 11 adet yarım yağlı, 4 adet yağsız) ve 2 adet laktozsuz UHT süt örneği (yarım yağlı) satın alınmıştır. Süt örnekleri 2016 yılının Nisan ayında büyük marketlerden birbirine yakın tarihlerde üretilmiş olmasına dikkat edilerek her marka için 2 örnek olacak şekilde toplanmıştır. UHT sütlerin yaklaşık depolama sürecinin (oda sıcaklığı) birinci ayında, pastörize sütlerin ise depolamanın (buzdolabı koşulları) birinci gününde olmasına dikkat edilmiştir. Örnekler analizler süresince 4°C'de saklanmıştır.

Metot

Kimyasal Analizler

Süt örneklerinin kurumadde ve kül oranları gravimetrik yöntemle, yağ oranı Gerber yöntemiyle, protein miktarı Kjeldahl yöntemiyle, asitlik değeri % laktik asit cinsinden titrasyon yöntemiyle TS 1018'e göre belirlenmiştir [27]. Karbonhidrat miktarı hesaplama yöntemiyle tespit edilmiştir. pH değeri pH metre (pH 320, WTW, 82362 Weilheim, Almanya) ile, yoğunluk değeri ise laktodansimetre kullanılarak saptanmıştır.

Toplam HMF Analizi

Süt örneklerinin toplam HMF miktarı, Keeney ve Bassette [28] tarafından tanımlanan spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Süt örnekleri çalkalanıp homojen hale getirildikten sonra 10 mL alınarak üzerine 5 mL oksalik asit (0.3N) ilave edilmiştir. Hazırlanan örnekler vorteks ile karıştırıldıktan sonra bir saat süre ile su banyosunda (WNB 14, Memmert, Schwabach, Almanya) bekletilmiştir. Su banyosundan alınan örnekler oda sıcaklığına gelene kadar soğutulduktan sonra 5 mL %40'lık trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi ilave edilmiş ve Whatman No.42 filtre kağıdı kullanılarak süzümüştür. Filtrattan 4 mL alınarak üzerine 1 mL 0.05 M tiyobarbitürik asit (TBA) çözeltisi eklenmiştir. Ardından örnekler 40°C'lik su banyosunda 30 dakika bekletildikten sonra 443 nm'de (A_{443}) absorbansları spektrofotometre (Varian, Cary 50 Bio UV-Visible Spectrophotometer, Palo Alto, CA) ile ölçülmüştür. HMF değerleri aşağıdaki eşitlik (1) ile hesaplanmış ve sonuçlar $\mu\text{mol/L}$ olarak ifade edilmiştir:

$$\text{HMF değeri } (\mu\text{mol/L}) = (A_{443} - 0.055) \times 87.5 \quad (1)$$

Renk Değerlerinin Belirlenmesi

Süt örneklerinin renk ölçümü Hunter renk ölçüm cihazı (CFLX 45-2 Model Colorimeter, HunterLab, Reston, VA) ile gerçekleştirilmiştir. Her bir örnek ölçümden önce homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra L (parlaklık), a (yeşillik/kırmızılık), ve b (mavilik/sarıklık) değerleri belirlenmiştir. Analizler sonucunda elde edilen renk değerlerinden renk değişimi (ΔE , referans olarak 1 numaralı pastörize tam yağlı süt örneği kullanılmıştır), kroma ve esmerleşme indeksi (BI) değerleri aşağıdaki eşitlikler (2), (3) ve (4) ile hesaplanmıştır [29].

$$\Delta E = \sqrt{(L_0 - L)^2 + (a_0 - a)^2 + (b_0 - b)^2} \quad (2)$$

$$\text{Kroma} = \sqrt{a^2 + b^2} \quad (3)$$

$$\text{BI} = \frac{100 \times \left[\frac{(a+1.75 \times L)}{(5.645 \times L + a - 3.012 \times b)} - 0.31 \right]}{0.17} \quad (4)$$

İstatistiksel Değerlendirme

İncelenen örneklerin istatistiksel değerlendirme için SPSS istatistik paket programı (SPSS ver. 20, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kullanılmıştır. Örnekler arasındaki farklılıkların önemi tek yönlü varyans analizi ile saptanmış, %95 güven aralığına göre örnekler Duncan testi ile gruplanmıştır. Örneklerin HMF miktarları ile pH ve renk değerleri arasındaki ilişkiyi saptamak amacıyla Pearson korelasyon testi uygulanmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

İçme Sütü Örneklerinin Kimyasal Bileşimi

İncelenen toplam 37 adet pastörize ve UHT süt örneklerinin bileşimleri, titrasyon asitlikleri ile yoğunluk değerleri Tablo 1'de verilmiştir. Örneklerin kurumadde içerikleri %8.98-12.21, protein içerikleri %2.8-3.0 aralığında değişmektedir. Yapılan çalışmada süt örneklerinin laktik asit cinsinden titrasyon asitliğinin %0.125-0.152, pH değerinin 6.56-6.73 ve yoğunluk değerinin 1.031-1.034 g/mL aralığında değiştiği saptanmıştır. Türk Gıda Kodeksi Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliğinde [1] pastörize ve UHT sütlerin bileşimlerine yönelik yağ oranları dışında bir değer verilmemekle birlikte kullanılacak çiğ inek sütünün içermesi gereken protein miktarının en az %2.8 ile yoğunluk değerinin 1.028 g/mL olması gerektiği belirtilmiştir. Bu durumda örneklerin protein ve yoğunluk değerlerinin uygun olduğu saptanmıştır. Aynı tebliğde en az %3.5 yağ içeren içme sütleri tam yağlı, %3.0 yağ içerenler yağlı, %1.5 yağ içerenler yarım yağlı ve %0.15'ten az yağ içerenler ise yağsız sınıfına dahil edilmiştir. Değerler incelendiğinde süt örneklerinin yağ içeriklerinin de yasal sınırlara uygun olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 1. Pastörize ve UHT süt örneklerinin bileşimi (ortalama \pm standart sapma)

Numune	Yağ (%)	KM (%)	Protein (%)	Kül (%)	Karbonhidrat (%)	Asitlik ¹ (%)	pH	Yoğunluk (g/mL)
P-TY (n=2)	3.6 \pm 0.1 ^a	12.21 \pm 0.02 ^a	2.9 \pm 0.0 ^a	0.65 \pm 0.05 ^c	5.13 \pm 0.00 ^{ab}	0.152 \pm 0.003 ^a	6.70 \pm 0.01 ^a	1.032 \pm 0.000 ^b
P-Y (n=10)	3.1 \pm 0.1 ^b	11.17 \pm 0.20 ^b	2.8 \pm 0.1 ^a	0.68 \pm 0.03 ^{bc}	4.70 \pm 0.21 ^c	0.133 \pm 0.009 ^b	6.73 \pm 0.04 ^a	1.030 \pm 0.001 ^c
UHT-Y (n=28)	3.1 \pm 0.1 ^b	11.21 \pm 0.38 ^b	2.8 \pm 0.2 ^a	0.68 \pm 0.03 ^{bc}	4.62 \pm 0.30 ^c	0.126 \pm 0.007 ^b	6.63 \pm 0.06 ^b	1.031 \pm 0.001 ^c
UHT-YY (n=22)	1.6 \pm 0.1 ^c	9.97 \pm 0.29 ^c	3.0 \pm 0.3 ^a	0.69 \pm 0.04 ^b	4.77 \pm 0.22 ^c	0.125 \pm 0.005 ^b	6.67 \pm 0.06 ^{ab}	1.032 \pm 0.002 ^b
UHT-YS (n=8)	<0.1 ^d	8.98 \pm 0.35 ^d	2.9 \pm 0.1 ^a	0.74 \pm 0.01 ^a	5.29 \pm 0.39 ^a	0.131 \pm 0.005 ^{ab}	6.62 \pm 0.03 ^{bc}	1.034 \pm 0.001 ^a
L-UHT-YY (n=4)	1.5 \pm 0.0 ^c	9.95 \pm 0.31 ^c	2.8 \pm 0.1 ^a	0.67 \pm 0.01 ^{bc}	4.94 \pm 0.18 ^{bc}	0.130 \pm 0.005 ^{ab}	6.56 \pm 0.01 ^c	1.033 \pm 0.001 ^{ab}

P-TY: Pastörize-Tam Yağlı, P-Y: Pastörize-Yağlı, UHT-Y: UHT-Yağlı, UHT-YY: UHT-Yarım Yağlı, UHT-YS: UHT-Yağsız, L-UHT-YY: Laktozsuz UHT-Yarım Yağlı, ¹: Laktik asit cinsinden. Küçük harfler her bir sütündeki farkı göstermektedir ($P < 0.05$).

İçme Sütü Örneklerinin Hidroksimetilfurfural İçerikleri

Piyasada yer alan farklı markalara ait pastörize ve UHT süt örneklerinin HMF miktarları Tablo 2 ve Şekil 1'de verilmiştir. HMF değerleri pastörize süt örneklerinde 1.15-4.78 $\mu\text{mol/L}$, UHT süt örneklerinde 2.16-12.74 $\mu\text{mol/L}$, laktozsuz süt örneklerinde ise 27.35-35.73 $\mu\text{mol/L}$ aralığında tespit edilmiştir. UHT sütlerde pastörize sütlerle kıyasla daha yüksek değerlerin elde edilmesi ısı işlem yoğunluğunun artması ile HMF değerinin arttığını göstermiştir. Benzer şekilde, Morales ve ark. [11]; HMF değerlerinin pastörize sütlerde 2.49 $\mu\text{mol/L}$, UHT sütlerde 5.6 (direkt) ve 8.7 (indirekt) $\mu\text{mol/L}$, şişe sterilizasyonu uygulanmış sterilize sütlerde ise 22 $\mu\text{mol/L}$ olduğunu tespit etmişler ve ısı işlem yoğunluğunun HMF değerleri üzerinde önemli bir etkisi olduğunu vurgulamışlardır. Ayrıca ısı işlemin etkileri laktuloz miktarıyla da belirlenmiş ve pastörize sütlerde miktar tespiti yapılamazken, direkt ve indirekt UHT işlemlerinde sırasıyla 12.0 ve 250 mg/L, sterilize sütlerde ise 1120 mg/L laktuloz saptamışlardır. Pereda ve ark. [30] tarafından, süte uygulanan ısı işlem yoğunluğunun furosin ve laktuloz üzerindeki etkileri incelenmiş ve pastörize sütlerde en düşük, şişede sterilize edilmiş sütlerde ise en yüksek değerler elde edilmiştir. Ayrıca, süte uygulanan sıcaklığın artmasıyla birlikte maillard reaksiyonuna katılan yarıyaşlı lizin miktarının azaldığı da saptanmıştır [13]. Buna karşın, sütlerle uygulanan ısı işlemlerde tespit edilen bu seviyelerin sağlık riskine ve mutajenik bir etkiye sebep olduğu görülmemiştir [31].

Maillard reaksiyonu her ne kadar ısı işlem ile hızlansa da depolama sırasında da reaksiyon devam ederek HMF miktarı etkilenmektedir. Richards ve ark. [32] tarafından 3 ve 9 ay boyunca depolanan UHT sütlerde toplam HMF değerinin 6.21 değerinden 11.40 $\mu\text{mol/L}$ değerlerine yükseldiği saptanmıştır. Ancak, çalışma kapsamında benzer üretim tarihlerindeki sütler kullanılarak depolama süreci göz ardı edilmiştir.

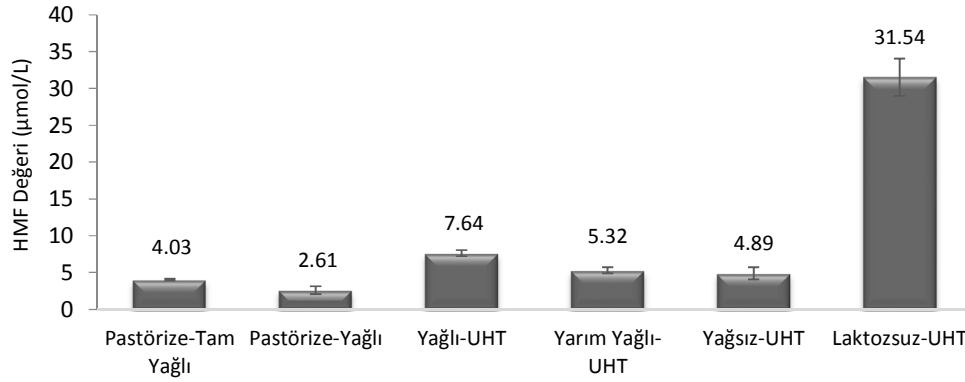
Yağ miktarları ile HMF değerleri arasındaki ilişki sadece UHT süt örneklerinde ele alınmıştır. Pastörize sütlerde tam yağlı örnek sayısının az olması sebebiyle bu anlamda değerlendirilmemiştir. UHT sütlerin ortalama HMF değerleri incelendiğinde yağ içeriğindeki artış ile birlikte, HMF değerlerinin arttığı, ancak bu artışın

istatistiksel anlamda önemli olmadığı tespit edilmiştir. Bu durum aynı UHT ekipmanının kullanıldığı, yağsız, yarım yağlı ve yağlı örneklerin bulunduğu markalar (Marka 1, 3 ve 11) üzerinden de değerlendirilmiştir (Tablo 2). Aynı ekipmanda üretilen yağsız ve yarım yağlı UHT sütlerin HMF değerleri benzer bulunurken, yağlı UHT sütlerin HMF değerleri daha yüksek bulunmuştur ($P < 0.05$). Yarım yağlı ile yağlı UHT örneklerine sahip markalarda da yağlı UHT sütlerin HMF değerleri ise daha yüksek bulunmuştur. Yağ oranının Maillard reaksiyonu ürünleri üzerine etkisinin incelendiği çalışmalarda farklı görüşler elde edilmiştir. de Koning ve ark. [33] tarafından Maillard reaksiyonu sonucunda ortaya çıkan ürünlerden biri olan laktuloz miktarının yağ oranı yüksek sütlerde daha fazla olduğu vurgulanmıştır. Morales ve Jiménez-Pérez [4], UHT ve sterilize sütlerde yağ miktarı ile toplam HMF değerlerinin negatif korelasyon gösterdiği, ancak Claeys ve ark. [21], yağ oranındaki artışın HMF ve laktuloz değerlerini etkilemediği, furosin değerlerini ise arttırdığı sonucuna ulaşmışlardır. Çalışmalarda HMF değerleri toplam ve serbest HMF olarak verilebilmektedir. Toplam ve serbest HMF farklı yollardan oluşmaktadır; serbest HMF Amadori ürünü yani laktulosilisinin parçalanması ile oluşurken, toplam HMF asit katalizle hem Amadori ürününden hem de laktuloz ve diğer Maillard ara ürünlerinden oluşabilmektedir [4; 34]. Kromatografik yöntem ile belirlenen toplam ve serbest HMF değerleri üzerine yağın etkisi, süt ve laktuloz/kazeinat model sistemlerinde karşılaştırılmış ve toplam HMF miktarında düşük görülürken, yağdaki artış serbest HMF oluşumunu süte teşvik etmiştir. Ancak laktuloz/kazeinat model sisteminde herhangi bir etki saptanmamıştır [4]. Yaptığımız çalışmada, kolorimetrik yöntem ile HMF tayini yapılmıştır. Bu yöntemde yağlardan gelebilecek bileşenler ile de TBA'nın reaksiyona girmesinin, yağlı örneklerde HMF değerinde artışa sebep olabileceği düşünülmüştür. Buna karşın, Claeys ve ark. [21] yaptıkları çalışmada, sütün yağ içeriğinin HMF değeri üzerine etkisinin olmadığını kolorimetrik yöntemle HMF tayini kullanarak belirlemişlerdir. Yöntemin yanısıra, Maillard reaksiyonunun lipid degradasyon ürünleri ile de ilişkili olduğu bilinmektedir. Lipid degradasyonu ve oksidasyonu sonucunda ortaya çıkan karbonil içeren parçalanma ürünleri ile amino grupları reaksiyona girerek Maillard reaksiyonunun bir parçası olmaktadır [24-26]. Dolayısıyla, yüksek sıcaklıklarda arttığı bilinen yağ oksidasyonunun Maillard reaksiyonu ürünleri üzerinde etkisinin olabileceği de düşünülmüştür.

Tablo 2. Farklı markalara ait içme sütü örneklerinin toplam HMF değerleri (ortalama \pm standart sapma)

Markalar	Toplam HMF değerleri ($\mu\text{mol/L}$)					
	Pastörize Tam Yağlı	Pastörize Yağlı	UHT Yağlı	UHT Yarım Yağlı	UHT Yağsız	UHT Laktozsuz
1	-	-	4.90 \pm 0.27 ^{hA}	3.44 \pm 0.20 ^{fB}	3.52 \pm 0.18 ^{bB}	35.73 \pm 2.35 ^a
2	-	1.48 \pm 0.13 ^b	6.99 \pm 0.70 ^f	-	-	27.35 \pm 0.21 ^b
3	-	1.15 \pm 0.04 ^b	8.10 \pm 0.30 ^{deA}	7.81 \pm 0.03 ^{bAB}	7.49 \pm 0.11 ^{aAB}	-
4	4.03 \pm 0.16	-	5.72 \pm 0.10 ^{ghA}	3.80 \pm 0.19 ^{fB}	-	-
5	-	-	5.92 \pm 0.15 ^{gA}	4.89 \pm 0.21 ^{eB}	-	-
6	-	4.30 \pm 0.92 ^a	8.77 \pm 0.45 ^{cdA}	5.29 \pm 0.14 ^{deB}	-	-
7	-	-	12.74 \pm 0.63 ^{aA}	5.72 \pm 0.44 ^{dB}	-	-
8	-	-	9.55 \pm 0.20 ^{bcA}	5.91 \pm 0.46 ^{cdB}	-	-
9	-	-	6.01 \pm 0.28 ^{gA}	3.71 \pm 0.06 ^{fB}	-	-
10	-	-	9.04 \pm 0.23 ^{bcA}	-	6.39 \pm 0.61 ^{aB}	-
11	-	1.34 \pm 0.11 ^b	4.91 \pm 0.14 ^{hA}	2.50 \pm 0.30 ^{gB}	2.16 \pm 0.37 ^{cb}	-
12	-	-	7.46 \pm 0.13 ^{ef}	-	-	-
13	-	-	9.71 \pm 0.19 ^{ba}	8.89 \pm 0.18 ^{aA}	-	-
14	-	-	7.09 \pm 0.06 ^f	-	-	-
15	-	-	-	6.52 \pm 0.16 ^c	-	-
16	-	4.78 \pm 0.42 ^a	-	-	-	-
n	n=2	n=10	n=28	n=22	n=8	n=4
Ortalama \pm SD	4.03 \pm 0.16 ^C	2.61 \pm 1.71 ^C	7.64 \pm 2.19 ^B	5.32 \pm 1.94 ^{BC}	4.89 \pm 2.47 ^{BC}	31.54 \pm 5.93 ^A

n= Analiz edilen örnek sayısı, SD: Standart sapma, Küçük harfler her bir sütündeki farkı göstermektedir ($P<0.05$). Büyük harfler aynı satırdaki UHT sütlerin (yağlı, yarım yağlı ve yağsız UHT) arasındaki farkı göstermektedir ($P<0.05$).



Şekil 1. İçme sütü örneklerinin HMF değerleri

Örneklerin HMF değerlerindeki değişimler Şekil 1'de daha belirgin görülmektedir. Özellikle laktozsuz sütlerde HMF'nin artışı dikkati çekmektedir. Laktozsuz sütlerde laktozun enzimatik hidrolize uğrayarak daha yüksek reaktiviteye sahip olan glikoz ve galaktoza dönüşmesi, lisinlerle daha hızlı reaksiyona girmesine yol açmaktadır ve bu durumda HMF oluşumu hızlanmaktadır. Benzer şekilde, sütlerde laktoz hidrolizasyonunun furosos miktarını attırdığı ve Maillard reaksiyonuna uygun bir ortam oluşturduğu bildirilmiştir [16, 18-20].

Maillard reaksiyonu oluşumunun ısı işlem ve laktoz hidrolizasyonuna bağlı olarak değişimi yanısıra farklı pH'ların da etkisi olduğu bilinmektedir. En uygun pH aralığının 8-10 olduğu belirtilmiştir. Bu aralık, süt ve ürünlerinin pH değerlerinden daha yüksek olsa da, süt ürünlerinde de pH değişimlerin reaksiyonu etkilediği vurgulanmıştır [6]. Buna karşın, analize alınan süt örneklerinin pH değerlerinin birbirine çok yakın olması sebebiyle HMF değerlerinde elde edilen farklılıkların pH ile ilişkili olmadığı düşünülmüştür.

İçme Sütü Örneklerinin Renk Değerleri

İçme sütü örneklerinin *L*, *a*, *b*, Kroma, BI ve ΔE değerleri Tablo 3'de gösterilmiştir. Örneklerin *L* değerlerinin pastörize ve yağlı UHT sütlerde en yüksek, yağsız UHT sütlerde ise en düşük değerlerde olduğu tespit edilmiştir. Değerlere bakıldığında, sütlerin parlaklık değerlerinde yağ içeriğinin belirleyici öneme sahip olduğu görülmüş, özellikle UHT sütlerde yağ içeriğinin artmasıyla *L* değerlerinin arttığı belirlenmiştir ($P<0.05$). Laktozsuz UHT sütlerde *a* değerinin önemli ölçüde yüksek olduğu belirlenmiştir. Nitekim analizler sırasında da diğer süt örnekleriyle kıyaslandığında bu örneklerde kırmızı rengin daha belirgin olduğu dikkati çekmiştir. Sütlerin *b* değerleri incelendiğinde, en düşük değerin yağlı sütlerde, en yüksek değerlerin ise yarım yağlı ve yağsız UHT sütlerde olduğu tespit edilmiştir.

Örneklerin renk özelliklerinin ve bu özelliklerdeki değişimin daha net tespit edilebilmesi için kroma değerlerine bakılmıştır. Değerler incelendiğinde, renk farklılıklarının en çok UHT yarım yağlı sütlerde, en az ise

pastörize tam yağlı sütler ile yağlı UHT ve laktozsuz UHT sütlerde olduğu saptanmıştır. Kroma değerlerindeki bu değişimin *b* değerlerine benzer bir eğilim gösterdiği görülmüştür.

Sadece bir markaya ait örnek grubu olduğu için pastörize tam yağlı süt kontrol kabul edilerek örneklerin

ΔE değerleri hesaplanmış, en düşük ΔE değerlerinin yağlı pastörize ve yağlı UHT sütlerde, en yüksek ΔE değerlerinin ise yağsız UHT sütlerde olduğu belirlenmiştir. Çalışmada da laktozsuz süt örneklerinde hafif kırmızılık algılanırken, yağsız örneklerde yeşillik algılanmıştır. Nitekim, ΔE değeri 3'ten büyük olduğunda gözle rahatlıkla ayırt edilebildiği belirtilmiştir [35].

Tablo 3. Pastörize ve UHT süt örneklerinin renk özellikleri (ortalama \pm standart sapma)

Numune	<i>L</i> değeri	<i>a</i> değeri	<i>b</i> değeri	Kroma	BI	ΔE
P-TY (n=2)	95.33 \pm 0.03 ^a	-0.77 \pm 0.02 ^b	9.38 \pm 0.01 ^c	9.42 \pm 0.01 ^d	9.51 \pm 0.02 ^c	-
P-Y (n=10)	95.45 \pm 0.18 ^a	-0.97 \pm 0.21 ^b	10.34 \pm 0.49 ^{ab}	10.38 \pm 0.48 ^{bc}	10.43 \pm 0.65 ^{bc}	1.03 \pm 0.46 ^c
UHT-Y (n=28)	94.98 \pm 0.69 ^a	-0.49 \pm 0.60 ^b	9.73 \pm 0.77 ^{bc}	9.76 \pm 0.76 ^{cd}	10.17 \pm 1.18 ^{bc}	1.19 \pm 0.54 ^c
UHT-YY (n=22)	93.78 \pm 1.00 ^b	-0.23 \pm 0.87 ^{ab}	11.07 \pm 0.50 ^a	11.11 \pm 0.48 ^a	12.10 \pm 1.21 ^a	2.57 \pm 0.97 ^b
UHT-YS (n=8)	91.98 \pm 0.48 ^c	-2.08 \pm 1.16 ^c	10.69 \pm 0.33 ^a	10.94 \pm 0.18 ^{ab}	10.37 \pm 1.32 ^{bc}	3.98 \pm 0.59 ^a
L-UHT-YY (n=4)	92.82 \pm 1.39 ^c	0.62 \pm 1.22 ^a	9.91 \pm 0.19 ^{bc}	9.99 \pm 0.11 ^{cd}	11.53 \pm 0.93 ^{ab}	2.99 \pm 1.70 ^b

P-TY: Pastörize-Tam Yağlı, P-Y: Pastörize-Yağlı, UHT-Y: UHT-Yağlı, UHT-YY: UHT-Yarım Yağlı, UHT-YS: UHT-Yağsız, L-UHT-YY: Laktozsuz UHT-Yarım Yağlı. Küçük harfler her bir sütündeki farkı göstermektedir ($P<0.05$).

Pastörize ve UHT sütlerin renk değerleri ile HMF arasındaki ilişkinin ortaya konulması amacıyla Pearson korelasyon testi uygulanmıştır. Testin sonuçlarına göre hem pastörize hem UHT süt örneklerinde parlaklık değerlerinin HMF ile korelasyon göstermediği saptanmıştır ($P>0.05$). Ancak örneklerin *a* değerleri HMF miktarı ile pozitif korelasyon göstermiştir ($P<0.05$). Buna karşın, UHT süt örneklerinde özellikle *b* değeri ile HMF değerleri arasında ilişki saptanmamıştır. Ayrıca esmerleşme indeksi değerleri ile HMF değerleri arasında da belirgin bir ilişki ortaya konulamamıştır. Benzer şekilde, model süt sistemlerinde yapılan çalışmada esmerleşme indeksi değeri ile Maillard reaksiyon ürünleri ile ilişki tespit edilememiş ve söz konusu ilişkinin olabilmesi için farkın gözle rahatlıkla görülebilir olması gerektiği belirtilmiştir [36]. Dolayısıyla, piyasadaki laktozsuz hariç diğer sütler uygulanan ısı işlemlerin gözle görülür bir renk değişimine neden olacak düzeyde Maillard reaksiyonuna sebep olmadığını söylemek mümkündür. Maillard reaksiyonu sonucunda ortaya çıkan önemli renk değişimlerinin özellikle reaksiyonun son aşamasında, diğer basamaklarda ortaya çıkan reaktif bileşenlerden oluşan kahverengi bileşiklerden yani melanoidinlerden kaynaklandığı belirtilmiştir [6].

SONUÇ

Bu çalışmada marketlerde satışa sunulan UHT ve pastörize sütlerin HMF değerleri ile bileşimleri ve renk özellikleri ortaya konulmuştur. Isıl işlem yoğunluğunun artması ile HMF değerlerinin arttığı, pastörize sütlerde düşük değerler elde edildiği görülmüştür. HMF değerleri açısından en dikkat çekici olan örnek grubu laktozsuz UHT sütlerdir. Laktozsuz sütlerde laktozun daha yüksek reaktiviteye sahip olan glikoz ve galaktoza dönüşmesi HMF değerlerinde önemli bir artışa neden olmuştur. Örnekler renk özellikleri açısından değerlendirildiğinde, HMF değeri ile kırmızılık değerleri arasında pozitif bir ilişki olduğu, özellikle laktozsuz süt örneklerinde kırmızı rengin daha belirgin olduğu görülmüştür. Örneklerde esmerleşme indeksi ile HMF değeri arasında ise bir ilişki saptanmamıştır. Her ne kadar sütler uygulanan ısı işleminin ve laktozun hidrolizasyonunun HMF değerlerini arttırdığı görülse de, süt ve süt ürünleri birçok gıdaya kıyasla oldukça düşük HMF değerlerine sahiptir.

KAYNAKLAR

- [1] Anonim, 2000. Türk Gıda Kodeksi Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği. T.C. Resmi Gazete, Sayı: 23964. Tarım ve Köyşleri Bakanlığı, Ankara.
- [2] Ferrer, E., Alegria, A., Courtois, G., Farré, R., 2000. High-performance liquid chromatographic determination of Maillard compounds in store-brand and name-brand ultra-high-temperature-treated cows' milk. *Journal of Chromatography A* 881(1-2): 599–606.
- [3] Arena, S., Renzone, G., D'Ambrosio, C., Salzano, A.M., Scaloni, A., 2017. Dairy products and the Maillard reaction: A promising future for extensive food characterization by integrated proteomics studies. *Food Chemistry* 219: 477–489.
- [4] Morales, F.J., Jiménez-Pérez, S., 1999. HMF formation during heat-treatment of milk-type products as related to milkfat content. *Journal of Food Science* 64(5): 855-859.
- [5] Pellegrino, L., Resmini, P., Luf, W., 1995. Assessment (indices) of heat treatment of milk. In: Heat-induced changes in milk, Edited by P.F. Fox, Brussels, International Dairy Federation, 9501: 409–453 p.
- [6] Van Boekel, M.A.J.S., 1998. Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chemistry* 62(4): 403-414.
- [7] Yıldız, O., Sahin, H., Kara, M., Aliyazıcıoğlu, R., Tarhan, Ö., Kolaylı, S., 2010. Maillard reaksiyonları ve reaksiyon ürünlerinin gıdalardaki önemi. *Akademik Gıda* 8: 44-51.
- [8] Martins, S.I.F.S., Jongen, W.M.F., Van Boekel, M.A.J.S., 2001. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science & Technology* 11: 364–373.
- [9] Ames, J.M., 1998. Applications of the Maillard reaction in the food industry. *Food Chemistry* 62(4): 431-439.
- [10] Berg, H.E., Van Boekel, M.A.J.S., 1994. Degradation of lactose during heating of milk. 1. reaction pathways. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 48: 157-175.

- [11] Morales, F.J., Romero, C., Jiménez-Pérez, S., 2000. Characterization of industrial processed milk by analysis of heat-induced changes. *International Journal of Food Science and Technology* 35(2): 193-200.
- [12] Akalin, A.S., Gönç, S., 1997. Lactulose and HMF contents in market milks. *Milchwissenschaft* 52(7): 377-380.
- [13] Morales, F.J., Romero, C., Jiménez-Pérez, S., 1996. Study on 5-hydroxymethylfurfural Formation During UHT Treatment Measured by Two Analytical Procedures. In *Heat Treatments & Alternative Methods*, International Dairy Federation, Brussels, Belgium, 464p.
- [14] Leiva, G.E., Naranjo, G.B., Malec, L.S., 2017. A study of different indicators of Maillard reaction with whey proteins and different carbohydrates under adverse storage conditions. *Food Chemistry* 215: 410-416.
- [15] Ledesma-Osuna, A.I., Ramos-Clamont, G., Vázquez-Moreno, L., 2008. Characterization of bovine serum albumin glycated with glucose, galactose and lactose. *Acta Biochimica Polonica* 55(3): 491-497.
- [16] Jansson, T., Clausen, M.R., Sundekilde, U.K., Eggers, N., Nyegaard, S., Larsen, L.B., Ray, C., Sundgren, A., Andersen, H.J., Bertram, H.C., 2014. Lactose-hydrolyzed milk is more prone to chemical changes during storage than conventional ultra-high-temperature (UHT) milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(31): 7886-7896.
- [17] Milkovska-Stamenova, S., Hoffmann, R., 2016. Hexose-derived glycation sites in processed bovine milk. *Journal of Proteomics* 134: 102-111.
- [18] Evangelisti, F., Calcagno, C., Nardi, S., Zunin, P., 1999. Deterioration of protein fraction by Maillard reaction in dietetic milks. *Journal of Dairy Research* 66: 237-243.
- [19] Messia ve M.C., Candigliota, T., Marconi, E., 2007. Assessment of quality and technological characterization of lactose-hydrolyzed milk. *Food Chemistry* 104: 910-917.
- [20] Tossavainen, O., Kallioinen, H., 2007. Effect of lactose hydrolysis on furosine formation in skim milk during pasteurisation. *Milchwissenschaft* 62(2): 188-191.
- [21] Claeys, W.L., Van Loey, A.M., Hendrickx, M.E., 2003. Kinetics of hydroxymethylfurfural, lactulose and furosine in milk with different fat content. *Journal of Dairy Research* 70(1): 85-90.
- [22] Berg, H.E., 1993. Reactions of lactose during heat treatment of milk: a quantitative study. Ph.D Thesis, Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
- [23] Pellegrino, L., 1994. Influence of fat content on some heat-induced changes in milk and cream. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 48: 71-80.
- [24] Zamora, R., Hidalgo, F.J., 2005. Coordinate contribution of lipid oxidation and Maillard reaction to the nonenzymatic food browning. *Critical Reviews Food Science Nutrition* 45: 49-59.
- [25] Newton, A.E., Fairbanks, A.J., Golding, M., Andrewes, P., Gerrard, J.A., 2012. The role of the Maillard reaction in the formation of flavour compounds in dairy products – not only a deleterious reaction but also a rich source of flavour compounds. *Food and Function* 3: 1231-1241.
- [26] Sunds, A.V., 2016. Evaluation of accelerated shelf life testing of UHT milk. Master Thesis. Aarhus University, Department of Food Science, Denmark.
- [27] Anonim., 2002. Çiğ Süt Standardı. TS 1018. Türk Standartları Enstitüsü (TSE), Ankara.
- [28] Keeney M., Bassette R., 1959. Detection of intermediate compounds in the early stages of browning reaction in milk products. *Journal of Dairy Science* 42(6): 945-960.
- [29] Askari, G.R., Emam-Djomeh, Z., Mousavi, S.M., 2008. Investigation of microwave treatment on the optical properties of apple slices during drying. *Drying Technology* 26(11): 1362-1368.
- [30] Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J.M., Guamis, B., Trujillo, A.J., 2009. Heat damage evaluation in ultra-high pressure homogenized milk. *Food Hydrocolloids* 23:1974-1979.
- [31] Berg, H.E., Van Boekel, M.A.J.S., Jongen, W.M.F., 1990. Heating milk: a study on mutagenicity. *Journal of Food Science* 55(4): 1000-1017.
- [32] Richards, M., Buys, E.M., De Kock, H.L., 2016. Survival analysis, consumer perception and physico-chemical analysis of low fat UHT milk stored for different time periods. *International Dairy Journal* 57: 56-61.
- [33] de Koning, P.J., Badings, H.T., van der Pol, J.J.G., Kaper, J., Vos-Klomp maker, E.A.J., 1990. Effect van hittebehandeling en vetgehalte op UHT-melk. *Voedingsmiddelentechnologie* 23: 11-14.
- [34] Deeth, H.C., Lewis, M.J., 2017. Changes During Heat Treatment of Milk. In: *High Temperature Processing of Milk and Milk Products*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 584p.
- [35] Francis, F.J., Clydesdale, F.M., 1977. Food colorimetry: theory and applications. *Molecular Nutrition and Food Research* 21(1): 90-91.
- [36] Stanciuc, N., Rapeanu, G., Stanciu, S., 2010. Quantitative evaluation of colour development in milk model systems during heat treatment: a kinetic study. *Romanian Biotechnological Letters* 15(3): 5331-5341.

Farklı Oranlarda Peynir Altı Suyu Kullanımı ile Üretilen Ayranların Bazı Özellikleri

Nazlı Türkmen¹, Ceren Akal², Celalettin Koçak³

Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Süt Teknolojisi Bölümü, Ankara

Geliş Tarihi (Received): 20.09.2016, Kabul Tarihi (Accepted): 18.12.2016

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): nazli.turkmen@ankara.edu.tr (N. Türkmen)

☎ 0 312 596 13 46 📠 0 312 318 22 19

ÖZ

Bu çalışmada ayran üretiminde kullanılan çiğ sütün kurumadde standardizasyonunda farklı oranlarda (su yerine seyreltme sıvısının %25, 50, 75 ve 100'ü kadar) peynir altı suyu (PAS) kullanılarak üretilen ayranların nitelikleri incelenmiştir. Ayran üretiminde su yerine, çoğunlukla atık olarak görülen PAS kullanılarak ayranın besleyici özelliğini artırmak ve PAS'a kullanım alanı yaratmak bu çalışmanın esas amacıdır. Ayran örneklerinde depolamanın 1., 7. ve 15. günlerinde serum ayrılması (%), titrasyon asitliği (°SH), pH-değeri, görünür viskozite (cP), kurumadde (%), yağ içeriği (%) ve duyu özellikleri belirlenmiştir. Belirtilen özellikler açısından %25, 50 ve 75 oranında PAS ilave edilmiş örneklerin kontrol örneğine benzer sonuçlar verdiği görülmüştür. Ayrıca duyu değerlendirme sonuçlarına göre bu örneklerin beğenilirliği kontrol örneğine göre daha yüksek bulunmuştur. %100 oranında PAS ilave edilmiş örnek ise incelenen özellikler açısından kabul edilemez nitelikte bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Ayran, Peynir altı suyu, Duyusal değerlendirme

Some Properties of Ayran Samples Produced with Different Ratios of Whey

ABSTRACT

In this study, some properties of ayran diluted with whey at different ratios (25, 50, 75 and 100% of diluent) were determined. The main objective was to increase nutritional quality of ayran by using whey instead of water and to create a new area of utilization for whey, which is generally regarded as a waste product. The serum separation (%), titratable acidity (°SH), pH value, viscosity (cP), total solid (%), fat content (%) and sensory properties of ayran samples were determined on the 1st, 7th and 15th days of storage. Results revealed that samples diluted with whey at ratios of 25, 50 and 75% were comparable to control sample. Furthermore, according to sensory evaluation results these samples diluted with whey were more acceptable than the control sample. The sample diluted with whey at a ratio of 100% was unacceptable in terms of properties analyzed.

Keywords: Ayran, Whey, Sensory evaluation

GİRİŞ

Ayran, Fermente Süt Ürünleri Tebliği'ne [1] göre, yoğurda su katılarak veya kurumaddeyi ayarlanan süte *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'ün kültürleri katılarak hazırlanan fermente süt ürünüdür. Ayran bazı ülkelerde içilebilir

yoğurt, yoğurt içeceği, sıvı yoğurt gibi farklı şekilde adlandırılmakta ve literatürde de ayran yerine bu isimlerin kullanıldığı görülebilmektedir [2].

Türkiye İstatistik Kurumu'nun [3] 2015 yılı verilerine göre yaklaşık 4 milyon ton olan süt ürünleri üretiminin yaklaşık 627 bin tonunu ayran üretimi oluşturmaktadır.

Bu verilere göre ayran üretimi; içme sütü, yoğurt ve peynir üretiminden sonra 4. sırada yer almaktadır.

Yaz aylarında daha fazla tüketilen ayran, yoğurt gibi beslenme değeri yüksek fermente bir süt ürünüdür [4]. Ayrıca, laktik asit bakterilerinin faaliyetinden dolayı yoğurdun sindirilebilirliğinin süte göre daha kolay olduğu, kalsiyum ve fosfordan yararlanmayı arttırdığı, daha yüksek oranda vitamin içerdiği bilinmektedir [4-7]. Ayranın yoğurdun tüm besleyici unsurlarını katılan su miktarına bağlı olarak değişik oranlarda içermesinden dolayı bahsedilen bu yararlar ayran için de geçerlidir [8].

Yukarıda da belirtildiği gibi ayran yoğurdun sulandırılması ya da belirli oranlarda sulandırılan sütün fermente edilmesi ile üretilmektedir. Yalnız, sütün sulandırılması yönteminin daha iyi sonuçlar verdiği belirtilmektedir [9]. Bu nedenle bu çalışmada sütün sulandırılması yöntemiyle ayran üretimi tercih edilmiş ve su yerine PAS kullanımı üzerinde durulmuştur.

Bilindiği gibi, peynir üretiminde pıhtıdan ayrılan sıvı PAS olarak adlandırılmaktadır [10]. Bir süt yan ürünü olan PAS, başlıca laktoz olmak üzere, serum proteinleri, mineral madde ve az miktarda yağ içermektedir [11, 12]. Ülkemizde peynir üretimi sonucu yaklaşık 2 milyon ton/yıl PAS yan ürün olarak açığa çıkmaktadır [13]. Bu yan ürünün bir kısmı lor peyniri yapımında, bir kısmı PAS tozu üretiminde kullanılırken, önemli bir bölümü de değerlendirilmeden kanalizasyona bırakılmaktadır. Bu nedenle bu yan ürünün en iyi şekilde değerlendirilmesi, ekonomik kayıpların önlenmesi, çevrenin korunması ve katma değer kazanılması bakımlarından önemlidir. Bu çalışmada da, PAS için yeni bir kullanım alanı oluşturulması, PAS'ın zengin besin içeriğinden yararlanılması ve ayran üretim maliyetinin düşürülmesi amacıyla sütün seyreltilmesinde kullanılabilirliği araştırılmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışmada, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Eğitim, Araştırma ve Uygulama İşletmesi'nden temin edilen çiğ inek sütü, yoğurt kültürü (CHR- HANSEN DVS YO-FLEX YC X₁₆) ve işletmedeki Beyaz Peynir üretiminden elde edilen PAS kullanılmıştır.

Ayran üretiminde hammadde olarak kullanılacak çiğ süt, yağ içeriği yaklaşık %1.5 olacak şekilde standardize edildikten sonra 5 kısma (her biri 3 L) ayrılmıştır. Bunların toplam protein içerikleri de farklı şekillerde seyreltme yapılarak ~%2 olacak şekilde ayarlanmıştır. Birinci kısmın toplam protein içeriği içme suyu ile ~%2'e ayarlanırken (A örneği), ikinci, üçüncü, dördüncü ve beşinci kısımlar için süte ilave edilecek seyreltme sıvısının sırasıyla %25'i (B), %50'si (C), %75'i (D) ve %100'ü (E) PAS olacak şekilde bir ayarlama yapılmıştır. Buradaki hesaplamalar, toplam örnek miktarı her bir örnek için 4.5 L olacak şekilde yapılmıştır. Daha sonra

örneklerin tamamına 95°C'de 5 dakika ısı işlem uygulanmıştır. İnkübasyon sıcaklığına (43°C) soğutulan örnekler %2 oranında starter kültür ilave edilmiş ve örnekler 43°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Örneklerin inkübasyonu, asitlik yaklaşık 4.3 pH değerine ulaşıldığında, inkübasyon süreleri kaydedilerek sonlandırılmıştır. Karıştırılarak 10-15°C'ye soğutulan örnekler, %0.5 oranında tuz ilave edildikten sonra paketlenerek +4°C'de depolanmıştır. Örneklerin analizleri 1., 7. ve 15. günlerde gerçekleştirilmiştir.

Ayran örneklerinin ve PAS'ın titrasyon asitliği değerleri [14], toplam kurumadde değerleri (Gravimetrik yöntem ile), yağ içerikleri (Gerber yöntemi) ve toplam azot değerleri [15] belirlenmiştir. Örneklerin pH-değerleri birleşik elektrotlu dijital pH-metre (Mettler Toledo MP 225) ile, görünür viskozite değerleri ise HAAKE VT 181 / VTR 24 viskozimetresi ile MV II başlığı kullanılarak ölçülmüştür. Viskozite ölçümleri 4°C sıcaklıkta, 1 ayarında yapılmış, görünür viskozite değerleri elde edilen ölçümler aşağıdaki formülde yerine konularak hesaplanmıştır.

Görünür Viskozite (cP) = Okunan ölçüm değeri × Okumanın yapıldığı ayar × 100 (Başlık sabiti)

Örneklerin ayrıca serum ayrılması değerleri [16]'e göre belirlenmiş, duyu analizler ise 7 yarı eğitimli panelistin katılımıyla tüketim sıcaklığında (+4°C) sunulan örnekler için puanlama testi kullanılarak yapılmıştır [17].

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

ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Ayran üretiminde hammadde olarak kullanılan çiğ sütün özellikleri standart sapmalarıyla birlikte Tablo 1'de verilmiştir. Tablo 1 incelendiğinde, ayran üretiminde hammadde olarak kullanılan çiğ sütün yağ, toplam kurumadde, protein ve titrasyon asitliği değerlerinin, 2000/6 numaralı Türk Gıda Kodeksi "Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği"ne uygun olduğu görülmektedir [18].

Ayran üretiminde kullanılan PAS'ın özellikleri standart sapmalarıyla birlikte Tablo 2'de verilmiştir. Araştırmada seyreltme sıvısına farklı oranlarda ilave edilen PAS'ın Tablo 2'de belirtilen nitelikleri, yapılan çeşitli araştırmalarda belirlenen PAS bileşimlerine yakın değerler göstermektedir [12, 19]. Yalnız, PAS'ın yağ oranı, önceki çalışmalarda [12, 19] belirtilen yağ oranlarına göre biraz yüksek bulunmuştur. Bu durumu, yüksek yağ oranına sahip süttten peynir yapımına ve pıhtı kesim büyüklüğü gibi üretim parametrelerine bağlamak mümkündür [20].

Tablo 1. Hammadde çiğ sütün bazı nitelikleri (n=2)

Nitelikler	Değerler
pH değeri	6.72±0.04
Titrasyon Asitliği (°SH)	8.02±0.15
Yağ içeriği (%)	3.55±0.05
Protein içeriği (%)	3.24±0.12
Toplam kurumadde içeriği (%)	12.98±0.12

Tablo 2. Peynir altı suyunun bazı nitelikleri (n=2)

Nitelikler	Değerler
pH değeri	6.05±0.10
Titrasyon asitliği (°SH)	5.26±0.12
Yağ içeriği (%)	1.25±0.05
Protein içeriği (%)	0.52±0.15
Toplam kurumadde içeriği (%)	7.13±0.08

Tablo 3. Ayran örneklerinin bazı nitelikleri (n=2)

Örnek	Yağ (%)	Kurumadde (%)	Protein içeriği (%)	İnkübasyon Süresi (dk.)
A	1.48±0.11	8.12±0.03 ^D	2.01±0.01	275.0±14.1 ^C
B	1.45±0.07	8.50±0.05 ^C	2.01±0.03	252.5±3.5 ^C
C	1.43±0.04	9.11±0.06 ^B	2.03±0.03	247.5±3.5 ^C
D	1.60±0.18	9.38±0.10 ^A	2.04±0.01	322.5±10.6 ^B
E	1.65±0.04	9.49±0.06 ^A	2.05±0.02	385.0±7.1 ^A

A: Kontrol (PAS içermeyen örnek), B: Seyreltme sıvısının %25'i oranında PAS ilave edilen örnek, C: Seyreltme sıvısının %50'si oranında PAS ilave edilen örnek, D: Seyreltme sıvısının %75'i oranında PAS ilave edilen örnek, E: Seyreltme sıvısının %100'ü oranında PAS ilave edilen örnek. Aynı sütündeki farklı üstel harfler örnekler arasındaki farklılığın önemli olduğunu ifade etmektedir (P<0.01).

Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği'ne [1] göre, ayranın toplam protein oranının en az %2 olması gerekirken, yağ ve kurumadde yönünden uyulması gereken bir değer bulunmamaktadır. Tablo 3 incelendiğinde tüm örneklerin protein oranları yönünden tebliğe uygun olduğu görülmektedir. Örneklerin yağ oranları arasındaki fark, yağ standardizasyonuna bağlı olarak önemsiz bulunmuştur (P>0.01). Örneklerin toplam kurumadde içerikleri arasındaki fark ise önemli bulunmuştur. Seyreltme sıvısında kullanılan PAS oranları arttıkça ayran örneklerinin kurumadde içeriklerinde de artış görülmüştür (Tablo 3) (P<0.01). Bu durum, PAS'ın sudan farklı olarak yüksek oranda laktoz, mineral madde ve serum proteini içermesinden kaynaklanmaktadır [12].

Ayran örneklerinin, depolamanın 1., 7. ve 15. günlerinde belirlenen pH ve titrasyon asitliği (°SH) değerleri Tablo 4'te verilmiştir. Tablo 4'te görüldüğü gibi pH değerleri açısından örnekler arasındaki fark önemsiz bulunmuştur (P<0.01). Fermente süt ürünlerinde laktik asit bakterilerinin faaliyetine bağlı olarak depolama süresince pH değerinde düşmeler görüldüğü bilinmektedir. Bu çalışmada da depolama süresince örneklerin tamamının pH değerlerinde düşüş gözlenmiştir. Titrasyon asitliği değerleri açısından örnekler ve depolama günleri arasındaki interaksyon önemli bulunmuştur (P<0.01). Depolama süresince her örnek için titrasyon asitliği değeri artmıştır. Üretimde kullanılan laktik asit bakterileri ve bunların ürettiği enzimlerin aktivitelerine bağlı olarak fermente süt ürünlerinin asitliğinin depolama süresi boyunca arttığı birçok çalışmada belirtilmiştir [21- 24]. Tablo 4'te de görüldüğü gibi E örneğine ait asitlik değerleri (pH ve °SH) diğer örneklerinkinden düşüktür. Bunun sütün seyreltilmesinde sadece PAS kullanılmasıyla ilgili olarak söylenilebilir. Çünkü yüksek laktoz oranı su aktivitesini etkilemekte, bu da starter kültürün çalışmasını yavaşlatmaktadır. Tablo 3'te görüldüğü gibi E örneğinde inkübasyon süresinin uzamasında da bu faktör etkili olmuştur. Örneklerin inkübasyon süreleri incelendiğinde, kontrol örneği ile B ve C örnekleri arasında fark bulunmamıştır (P>0.01). Ancak yüksek

oranda PAS kullanımının ayran örneklerinin inkübasyon süresini uzattığı görülmüştür.

Ayran örneklerinin serum ayrılması ve görünür viskozite değerleri Tablo 5'te verilmiştir. PAS ilavesiz olan A örneğinin serum ayrılması değeri ile PAS ilaveli B, C ve D örneklerinin serum ayrılması değerleri arasında, depolamanın 1 ve 7. günlerinde fark önemsiz bulunurken (P>0.05), depolamanın 15. gününde A örneğinin B, C ve D örneklerinden daha yüksek serum ayrılması değeri gösterdiği ve bunun önemli olduğu (P<0.05) belirlenmiştir. Bilindiği gibi ayran stabilitesinde seyreltme oranı arttıkça, başka bir deyişle toplam kurumadde içeriği azaldıkça viskozite düşmekte ve serum ayrılması artmaktadır [4]. Ayrıca serum proteini oranının artması ve kazein-serum proteini interaksyonu süt ürünlerinde su tutma kapasitesini artırmaktadır [4, 25, 26]. Dolayısıyla, belirli oranda PAS içeren örneklerin (B, C ve D) serum ayrılması değerlerinin kontrol örneğinkinden daha düşük olması, yukarıda belirtilen nedenlerden ileri gelmiş olabilir. Ayran üretiminde sütün seyreltilmesi amacıyla %100 oranında PAS kullanılan E örneğinin serum ayrılması değerlerinin diğer örneklerden oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Bu örnekte laktoz oranının yüksek olması su aktivitesini etkileyerek starter kültürün çalışmasını olumsuz yönde etkilemekte ve asitlik gelişimi engellenmektedir (Tablo 4). Bunun yanı sıra starter kültürün oluşturduğu polisakkaritler de serum ayrılmasının engellenmesinde ve viskozite artışında etkili olmaktadır. Polisakkarit oluşumunun da yetersiz olması, E örneğindeki durumun ortaya çıkmasındaki önemli etkenlerdendir.

Tablo 5 incelendiğinde, A örneğinin en yüksek görünür viskozite değerine sahip olduğu ve kullanılan PAS miktarının artması ile örneklerin görünür viskozite değerlerinin giderek azaldığı görülmektedir. Ayrıca burada da viskozitede starter kültürün oluşturduğu polisakkarit düzeyinin en önemli parametre olduğunu belirtmek gerekir. Depolamanın sonunda bütün örneklerin görünür viskozite değerleri depolamanın 1. günündeki değerlerden daha düşük bulunmuştur. Bu durumun, depolama süresince titrasyon asitliği

değerlerinin artması sonucunda, örneklerin su tutma kapasitesinin gerilemesinden ileri geldiği söylenebilir [4].

Tablo 4. Ayran örneklerinin pH ve titrasyon asitliği değerleri (n=2)

	pH Değeri			Titrasyon Asitliği (°SH)		
	1. Gün	7. Gün	15. Gün	1. Gün	7. Gün	15. Gün
A	4.41±0.04 ^a	4.36±0.08 ^b	4.30±0.06 ^c	22.24±0.21 ^{Cc}	23.44±0.21 ^{Bb}	24.84±0.08 ^{Ca}
B	4.42±0.04 ^a	4.37±0.03 ^b	4.33±0.02 ^c	25.53±0.21 ^{Ab}	26.63±0.08 ^{Aa}	27.10±0.11 ^{Ba}
C	4.47±0.02 ^a	4.41±0.01 ^b	4.36±0.02 ^c	24.52±0.05 ^{Bc}	26.82±0.49 ^{Ab}	28.50±0.19 ^{Aa}
D	4.48±0.04 ^a	4.40±0.03 ^b	4.37±0.06 ^c	24.14±0.16 ^{Bb}	26.50±0.11 ^{Aa}	27.48±0.21 ^{Cb}
E	4.59±0.06 ^a	4.51±0.04 ^b	4.46±0.01 ^c	17.29±0.26 ^{Dc}	18.12±0.08 ^{Cb}	19.64±0.11 ^{Da}

A: Kontrol (PAS içermeyen örnek), B: Seyreltme sıvısının %25'i oranında PAS ilave edilen örnek, C: Seyreltme sıvısının %50'si oranında PAS ilave edilen örnek, D: Seyreltme sıvısının %75'i oranında PAS ilave edilen örnek, E: Seyreltme sıvısının %100'ü oranında PAS ilave edilen örnek. Aynı sütündeki farklı üstel büyük harfler örnekler arasındaki farklılığı önemli olduğunu ifade etmektedir (P<0.01). Aynı satırdaki farklı üstel küçük harfler depolama günleri arasındaki farklılığın önemli olduğunu ifade etmektedir (P<0.01).

Tablo 5. Ayran örneklerinin serum ayrılması ve görünür viskozite değerleri (n=2)

	Serum Ayrılması (mL/100mL)			Görünür Viskozite (cP)		
	1. Gün	7. Gün	15. Gün	1. Gün	7. Gün	15. Gün
A	36.0±2.83 ^{Cb}	47.0±4.24 ^{Bca}	50.5±4.95 ^{Ba}	3975±106.1 ^{Aa}	3100±141.4 ^{Ab}	3275±176.8 ^{Ab}
B	34.0±2.83 ^{Cb}	39.5±3.54 ^{Ca}	42.5±2.12 ^{Ca}	3350±141.4 ^{Ba}	2450±282.8 ^{Bb}	2600±282.8 ^{Bb}
C	36.0±1.41 ^{Cb}	43.5±0.71 ^{Ca}	45.0±1.41 ^{Ca}	3250±70.7 ^{Ba}	2275±35.4 ^{Bc}	2900±70.7 ^{Ab}
D	37.5±0.71 ^{Cb}	44.0±1.41 ^{Cab}	46.0±2.83 ^{Ca}	2950±35.4 ^{Ba}	2150±141.4 ^{Bc}	2575±106.1 ^{Bb}
E	71.5±3.54 ^{Ab}	75.0±5.66 ^{Aa}	76.0±5.66 ^{Aa}	1450±141.4 ^{Ca}	1025±176.8 ^{Cb}	1175±176.8 ^{Cab}

A: Kontrol (PAS içermeyen örnek), B: Seyreltme sıvısının %25'i oranında PAS ilave edilen örnek, C: Seyreltme sıvısının %50'si oranında PAS ilave edilen örnek, D: Seyreltme sıvısının %75'i oranında PAS ilave edilen örnek, E: Seyreltme sıvısının %100'ü oranında PAS ilave edilen örnek. Aynı sütündeki farklı üstel büyük harfler örnekler arasındaki farklılığın önemli olduğunu ifade etmektedir (P<0.05). Aynı satırdaki farklı üstel küçük harfler depolama günleri arasındaki farklılığın önemli olduğunu ifade etmektedir (P<0.05).

Serum ayrılması ve görünür viskozite özellikleri açısından örnekler incelendiğinde, PAS kullanımı ile laktoz ve serum proteini içeriğinin B, C ve D örneklerinde olduğu gibi belirli bir miktara kadar artırılmasının ayranın karakteristik özelliklerini bozmadığı görülmüştür. Ancak, PAS ilaveli ayran üretiminde, çiğ sütün kurumadde standardizasyonunun yapılmasında kullanılan seyreltme sıvısının tamamının

PAS olması durumunda (E örneği), ayranın yapısal özelliklerinin olumsuz etkilendiği belirlenmiştir. Ayrıca yukarıdaki değerlendirmelerde de görüleceği gibi, elde edilen serum ayrılması değerleriyle görünür viskozite değerleri birbirine paralel sonuçlar vermiştir.

Ayran örneklerine ait 7 panelist ile gerçekleştirilen duyuusal değerlendirme sonuçları Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Ayran örneklerinin duyuusal değerlendirme sonuçları (n=2x7)

	Görünüş			Yapı			Lezzet		
	1. Gün	7. Gün	15. Gün	1. Gün	7. Gün	15. Gün	1. Gün	7. Gün	15. Gün
A	4.00±0.68 ^A	4.21±0.97 ^A	4.21±0.80 ^A	4.00±0.55 ^A	3.93±0.92 ^A	4.21±0.80 ^A	4.07±1.00 ^A	4.07±0.83 ^A	4.36±0.74 ^A
B	3.77±1.07 ^A	3.79±1.02 ^A	4.14±0.77 ^A	3.86±1.10 ^A	3.86±1.10 ^A	4.00±0.68 ^A	3.79±0.89 ^A	4.07±1.07 ^A	3.93±0.73 ^A
C	4.07±1.00 ^A	4.14±0.95 ^A	4.29±0.99 ^A	4.14±0.86 ^A	4.5±0.76 ^A	4.29±0.73 ^A	4.00±0.68 ^A	4.07±1.07 ^A	4.57±0.65 ^A
D	3.57±0.76 ^A	3.74±0.84 ^A	4.06±0.86 ^A	3.73±0.51 ^A	3.69±0.47 ^A	3.90±0.76 ^A	3.71±0.90 ^A	3.93±1.00 ^A	3.84±1.03 ^A
E	1.93±0.62 ^B	3.14±1.01 ^B	2.64±1.02 ^B	1.86±0.86 ^B	2.86±1.05 ^B	2.43±1.02 ^B	1.79±0.70 ^B	2.86±1.09 ^B	2.64±1.04 ^B

A: Kontrol (PAS içermeyen örnek), B: Seyreltme sıvısının %25'i oranında PAS ilave edilen örnek, C: Seyreltme sıvısının %50'si oranında PAS ilave edilen örnek, D: Seyreltme sıvısının %75'i oranında PAS ilave edilen örnek, E: Seyreltme sıvısının %100'ü oranında PAS ilave edilen örnek. Aynı sütündeki farklı büyük harfler örnekler arasındaki farklılığın önemli olduğunu ifade etmektedir (P<0.05)

İncelenen görünüş, yapı ve lezzet özellikleri açısından, depolamanın 1., 7. ve 15. günleri için A, B, C ve D örnekleri arasındaki fark önemli bulunmamıştır (P>0.05). E örneği ise, bahsedilen bütün özellikler açısından diğer örnekler göre daha düşük puanlar almıştır. E örneğinin, görünüş ve yapı özellikleri açısından çok düşük puanlar almış olmasının, serum ayrılması değerinin oldukça yüksek ve görünür viskozite değerinin de çok düşük olması ile ilişkilendirmek mümkündür. Depolamanın, örneklerin tamamı için duyuusal özellikler üzerine önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür (P>0.05). E örneğinin depolamanın tüm günlerinde kabul edilemez nitelikte bulunmuş olması, PAS ilaveli ayran üretiminde

seyreltme sıvısının tamamının PAS olması durumunda ürünün tüketilebilir nitelikte olamayacağını göstermektedir.

SONUÇ



Bu çalışmada, ülkemizde tüketimi en yaygın fermente süt ürünlerinden biri olan ayran üretiminde, çiğ sütün kurumadde standardizasyonunda kullanılan seyreltme sıvısında belirli oranlarda PAS kullanım olanakları araştırılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre, seyreltme sıvısının %25, 50 ve 75'i PAS olan örneklerin, incelenen bütün özellikler açısından kabul edilebilir niteliklere

sahip olduğu görülmüştür. Özellikle C örneğinin lezzet özelliği açısından PAS ilavesiz örnek dahil diğer tüm örneklerden daha çok beğenildiği panelistler tarafından belirtilmiştir. E örneğinin ise, incelenen bütün özellikler yönünden kabul edilemez nitelikte olduğu görülmüştür. PAS ilaveli örnekler, PAS'ın yüksek oranda mineral madde içermesinden dolayı panelistler tarafından daha tuzlu algılanmıştır. Dolayısıyla konu üzerinde çalışmalar yapılarak, yüksek oranda tüketimi sağlık açısından risk taşıyan tuzun ayran üretiminde kullanım oranının düşürülmesinin olanakları araştırılabilir.




KAYNAKLAR

- [1] Anonim, 2009. Tük Gıda Kodeksi. Fermente Süt Ürünleri Tebliği (2009/25). Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. 16 Şubat 2009 tarih ve 27143 sayılı Resmi Gazete, Ankara.
- [2] Akın, N., 2006. Modern Yoğurt Bilimi ve Teknolojisi. Damla Ofset, Konya.
- [3] TÜİK 2015. Süt ve Süt Ürünleri Üretimi İstatistikleri. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=85&locale=tr> [Erişim Tarihi: 09.08.2016]
- [4] Özer, B., 2006. Yoğurt Bilimi ve Teknolojisi. Sidas Medya Ltd. Şti., İzmir, Türkiye.
- [5] Yaygın, H., 1981. Yoğurdun beslenme değeri ve sağlıkla ilgili Özellikleri. *Gıda* 6(5): 17-22.
- [6] Sezgin, E., 2010. Fermente Süt Ürünleri Teknolojisi In Süt Teknolojisi, Edited by Yetişemiyen, A. Ankara Üniversitesi Yayınları No: 249, Ankara.
- [7] Tamime, A.Y., Robinson, R.K., 2007. Tamime and Robinson's Yogurt Science and Technology, 3rd Edition. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.
- [8] Tamuçay Özünlü, B., Koçak, C., 2010. Süte farklı ısıtım uygulamalarının ayran kalitesine etkisi. *Gıda* 35(5): 355-362.
- [9] Köksoy, A., Kılıç, M., 2003. Effects of water and salt level on rheological properties of ayran, a Turkish yoghurt drink. *International Dairy Journal* 13: 835-839.
- [10] Dinçoğlu, A.H., Ardiç, M., 2012. Peynir altı suyunun beslenmemizdeki önemi ve kullanım olanakları. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1(1): 54-60.
- [11] Karagözlü, C., Bayarar, M., 2004. Peyniraltı suyu proteinlerinin fonksiyonel özellikleri ve sağlık üzerine etkileri. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 41(2): 197-207.
- [12] Gürsel, A., 2015. Peynir altı Suyu Teknolojisi. Ankara Üniversitesi Yayınları, No: 451, Ankara.
- [13] Mete, H., 2012. Peynir altı suyu'nun ekmeçilikte değerlendirilmesi ve ekonomik önemi. *TSMMMO Sosyal Bilimler Dergisi* 1: 1-10.
- [14] TSE, 2002. Pastörize süt. TS 1019. Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
- [15] Gripon, J.C., Desmazeud M.J., Et le Baes, D., Bergere, J.H., 1975. role des microorganismes et des enzymes du cours de la maturation. *Le Lait* 55(548): 502-516.
- [16] Atamer, M., Sezgin, E., 1986. Yoğurtta kurumadde artırımının fiziksel özellikler üzerine etkisi. *Gıda* 11: 327-331.
- [17] Meilgaard, M., Civille, G.V., Carr, T., 1999. Sensory Evaluation Techniques, 2nd Edition, CRC Press, USA, 354 p.
- [18] Anonim, 2000. Türk Gıda Kodeksi. Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği (2000/6). Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. 14 Şubat 2000 tarih ve 23964 sayılı Resmi Gazete, Ankara.
- [19] Yerlikaya, O., Kınık, Ö., Akbulut, N., 2010. Peyniraltı suyunun fonksiyonel özellikleri ve peyniraltı suyu kullanılarak üretilen yeni nesil süt ürünleri. *Gıda* 35(4): 289-296.
- [20] Fagan, C.C., Castillo, M., Payne, F.A., O'Donnel, C.P., O'Callaghan, D.J., 2007. Effect of cutting time, temperature, and calcium on curd moisture, whey fat losses, and curd yield by response surface methodology. *Journal of Dairy Science* 90: 4499-4512.
- [21] Atamer, M., Gürsel, A., Tamuçay, B., Gençer, N., Yıldırım, G., Odabaşı, S., Karademir, E., Şenel, E., Kırdar, S., 1999. Dayanıkları ayran üretiminde pektin kullanım olanakları üzerine bir araştırma. *Gıda Teknolojisi Dergisi* 24(2): 119-126.
- [22] Rasic, J.L., Kurmann, J.A., 1978. Yoghurt. Volume I. Distributed by Technical Dairy Publishing House, Copenhagen, Denmark, 427 p.
- [23] Aydar, K., 1996. Ayran Üretiminde Karboksümetil Selüloz Kullanımı. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Süt Teknolojisi Anabilim Dalı, Ankara.
- [24] Altınayar, A., 1997. Farklı Yöntemlerle Ayran Üretiminde Karboksümetil Selüloz Kullanımı. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Süt Teknolojisi Anabilim Dalı, Ankara.
- [25] Özcan, T., Delikanlı, B., 2011. Gıdaların tekstürel özelliklerinin geliştirilmesinde peynir altı suyu protein katkılarının fonksiyonel etkileri. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 25(2): 77-88.
- [26] Özen, A.E., Kılıç, M., 2007. Peynir altı suyundan elde edilen serum proteinlerinin fonksiyonel özellikleri. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi* 3: 45-49.

Açıkta ve Ambalajlı Olarak Satışa Sunulan Kırmızıbiberlerde Sentetik Boya Varlığı

Hasan Yiğit¹ , Ahmet Levent İnanç² ¹Müsan Gıda Sanayi ve Ticaret A.Ş., Kahramanmaraş²Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Kahramanmaraş

Geliş Tarihi (Received): 14.10.2016, Kabul Tarihi (Accepted): 06.08.2017

 Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): linanc@ksu.edu.tr (A.L. İnanç) 0 344 300 20 84  0 344 300 16 02

ÖZ

Baharatlık kırmızıbiberlerde (n=50) suda ve yağda çözünen sentetik boyaların miktarları HPLC (yüksek basınçlı sıvı kromatografisi) ile belirlenmiştir. Dökme ve ambalajlı pul kırmızıbiber örnekleri pazar ve marketlerden temin edilmiştir. Kinolin sarısı, Sunset Yellow FCF, Azorubin, Amarant, Eritrosin, Allura Red AC, Patent Blue V, İndigotin, Brilliant Blue FCF, Sudan III ve Sudan para red B hiçbir örnekte tespit edilebilir düzeyde bulunmamıştır. Sudan I 0.81-996.77 mg/kg aralığında, Sudan II iki örnekte 1.88 ile 4.62 mg/kg seviyesinde, Sudan para red 0.89-21.33 mg/kg aralığında, Sudan IV sadece bir örnekte 8.34 mg/kg miktarında biberlere katıldığı bulunmuştur. Dökme kırmızıbiber örneklerinin %4'ünde Tartrazin, %24'ünde Ponceau 4R bulunmuş, ambalajlı ürünlerde %4 oranında Ponceau 4R tespit edilmiştir. Dökme kırmızıbiber örneklerinin %20'sinde Sudan I, %4'ünde Sudan II ve %12'sinde Sudan para red belirlenirken, ambalajlı kırmızıbiber örneklerinin %12'sinde Sudan I, %4'ünde Sudan II, %4'ünde Sudan IV ve %12'sinde Sudan para red varlığı tespit edilmiştir. Baharatlık kırmızıbiberin rengini iyileştirmek için sentetik boya maddeleri kullanılmaktadır. Fakat suda ve yağda çözünen sentetik boyalar kanserojen ve teratojenler olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, sadece Türkiye değil, aynı zamanda AB, bu renk maddelerin gıda katkı maddesi olarak kırmızıbiberde kullanılmasına izin vermemektedir. Sonuç olarak, yasal kurumlar tarafından tüketicinin sağlığının korunması için kırmızıbiberde sentetik boyaların tespiti için düzenli bir tarama programı gereklidir.

Anahtar Kelimeler: HPLC, Kırmızıbiber, Suda çözünen sentetik boyalar, Yağda çözünen sentetik boyalar

Presence of Synthetic Dyes in Red Peppers Sold in Bulk and Packages

ABSTRACT

The presence and concentration of water- and oil-soluble synthetic dyes in spice red pepper in red pepper were determined. Packaged and bulk red peppers were obtained from bazaar and market. Quinoline yellow, Sunset Yellow FCF, Azorubine of Amarante, Erythrosine, Allura Red AC, Patent Blue V, Indigotina, Brilliant Blue FCF Sudan III and Sudan para red B were not detected in any sample at detectable level. It was found that Sudan II were present in the range of 0.81 to 996.77 mg/kg, Sudan II at a level of 1.88 and 4.62 mg / kg in two samples, Sudan red para in the range of 0.89 to 21.33 mg/kg and Sudan IV in the range of 8 to 34 mg/kg in just a sample among red peppers. Whereas Tartrazine and Ponceau 4R were detected in 4% and 24% of bulk red pepper samples, only Ponceau 4R was found in the packaged red pepper samples at the ratio of 4%. The presence of Sudan I was detected in 20% of the bulk red peppers, Sudan II in 4% and Sudan para red in 12%. For packaged red pepper samples, Sudan I was detected in 12%, Sudan II in 4%, Sudan IV in 4% and Sudan para red in 12%. Synthetic dyes are usually used in order to intensify the colour of spice red pepper. However, water- and oil- soluble synthetic are considered to be carcinogens and teratogens. Therefore, Turkey and the EU do not permit the use of these colours as food additives. As a result, a regular screening program for the determination of synthetic dyes in red pepper is required in order to ensure consumers' health by legal organizations.

Keywords: HPLC, Red pepper, Synthetic dyes, Water-soluble, Oil-soluble

GİRİŞ

Gıda üretimi ve ürün geliştirme alanlarında yapılan çalışmalar dikkate alındığında, gıdalara kendine özgü renk veren renk pigmentleri; gıda işleme prosesleri, depolama ve satış gibi çeşitli aşamalarda ısı, ışık (UV-radyasyon), pH, oksidasyon, su aktivitesi ve metal gibi fiziksel ve kimyasal şartlara bağlı olarak renk solması veya renk kaybına uğramaktadırlar. Ancak bu durumu tolere etmek için gıda üreticileri, gıda işleme sırasında ortaya çıkan renk farklılıklarını ve kayıplarını karşılayarak gıdanın homojen renk dağılımını korumak için gıda boya larını ürünlerinde kullanabildikleri gibi, ürünün renk tek düzelikliğini sağlama, yeni ve değişik bir renk oluşturarak görünümü daha çekici hale getirmek amacıyla da kullanılmaktadırlar [1].

Gıdalarda gıda boya larının kullanılması tarih öncesi zamanlara kadar uzanmaktadır. Tarih öncesi dönemlerde sadece bitki ve hayvanlardan elde edilen doğal boya maddeleri kullanılmıştır [2]. M.Ö. 1500 yılları öncesinde Mısır da şeker üreticilerinin gıdaların görünümünü iyileştirmek için gıdalara doğal özütler ve şarap eklemesiyle başladığı düşünülmektedir [3]. İlk sentetik boya ise 1856 yılında İngiliz bilim adamı Sir Elvin Perkin tarafından sentezlenmiştir ve 19. yüzyılın sonlarına doğru on bin yeni sentetik boya madde geliştirilmiş ve üretilmiştir [4].

JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives - Gıda Katkı Maddeleri Ortak Uzmanlar Komitesi) dünyada her çeşit katkı maddesi üzerinde yürütülen çalışmaları periyodik toplantılarda ele alarak değerlendirmektedir. Bu çalışmaların sonuçlarına dayanarak FD&C boya ları için ADI (Acceptable Daily Intakes - Önerilen Günlük Tüketim Miktarı) değerlerini belirlemede ve gerekli gördükleri durumlarda gerekli değişiklikleri yapmaktadır [5-6-7].

Gıda üretiminde renklendirici olarak kullanılan birçok sentetik boyanın kullanıldığı bazı gıdalar: şekerlemeler, dondurma, içecekler, salata sosları, konserve, sakızlar, sosis, reçel, unlu gıdalar, balık, hazır çorbalar, alkolsüz meşrubatlar, ketçap, yoğurt, şeker ve bisküvidir [8].

Doğal boya lar hayvansal ve bitkisel kaynaklardan elde edilirler. Gıdalarda doğal olarak bulunan bu boya lar, farklı kimyasal yapılar a sahip oldukları için bazıları suda çözünürken bazıları da suda çözünmezler. Doğal boya ların gıdalarda kullanımları çeşitli problemlere yol açmasına ve ısı, sıcaklık, pH gibi etkilere karşı kararlılıklarının düşük olmasına rağmen, bu boya ların yapılan araştırmalarda sağlık üzerine yaptıkları olumlu etkiler nedeniyle son yıllarda kullanımları artmıştır [9]. Yapay boya lar ise kimyasal yapıları itibarıyla doğada bulunmayan, kimyasal sentez yoluyla elde edilen boya lar dır. Fizikokimyasal özellikleri bakımından yapay boya lar gıda sanayinde daha çok tercih edilmektedir. Yapay boya lar, suda ve yağda kolayca çözünürler [10]. Yapay boya ların insan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri vardır. Örneğin sentetik (yapay) boya grubunda olan azo boya lar, vücuda alınması durumunda aromatik aminlere parçalanmakta; bu da yetişkinlerde baş ağrısına neden

olurken çocuklarda dikkat dağınıklığı ve hiperaktiviteye neden olmaktadır [11]. Bu sebeple gıdalarda kullanılan sentetik boya ların içeriğinin ve miktarının kontrol edilmesi gerekmektedir. Avrupa Komisyonu tarafından gıdalara ilave edilebilecek ve maksimum kullanım miktarları olan boya lar belirtilmiştir. Bu sentetik gıda boya ları şu şekildedir: Tartrazin, Kinolin Sarısı, Sunset Yellow FCF, Karmin, Amarant, Ponceau 4R, Eritrosin, Allura Red, Patent Blue V, Brilliant Blue FCF. Avrupa komisyonu tarafından izin verilen bu sentetik gıda boya larının gıdalarda kullanım miktarları, insan sağlığı üzerindeki potansiyel tehlikelerden dolayı sıkı bir şekilde denetlenmektedir. Sudan I-II-III-IV, Sudan Red B ve Sudan Para Red kırmızı boya ların gıda maddelerinde kullanılması yasaktır [12-13].

Kırmızıbiberin ticari değerini belirleyen önemli kriterlerden biri renktir. Tüketici hemen her gıda ürünü gibi kırmızıbiberinde fiziksel görünüş ve rengine bakar. Tüketici açısından bakıldığında, kırmızıbiberlerin rengi satın alma ve tercih edilme bakımından en dikkat çekici özelliğidir. Suda ve yağda çözünen sentetik boya lar düşük kaliteli kırmızıbiberleri daha üstün göstermek, işleme ve depolama sırasında kaybolan doğal rengi yeniden kazandırmak, zayıf olan rengi kuvvetlendirmek, gerçekte renksiz olan besine renk vermek, düşük kaliteyi gizleyerek tüketici beğenisi kazanmak ve tüketiciyi aldatıcı özellikler kazandırmak amacıyla kırmızıbiberlere uygulanan taşıyıcı yöntemlerinin en başında gelmektedir.

Bu çalışmada, piyasada satışa sunulan kırmızıbiberlere renk vermek için katılan suda çözünen sentetik boya lar dan; Tartrazin, Kinolin Sarısı, Sunset Yellow FCF, Azorubin, Amarant, Ponceau 4R, Eritrosin, Allura Red AC, Patent Blue V, İndigotin, Brilliant Blue FCF ve yağda çözünen sentetik boya lar dan; Sudan I, Sudan II, Sudan III, Sudan IV, Sudan para red ve Sudan red B sentetik boya ların varlıkları ve miktarları araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Materyal

25 adet dökme (açıkta satılan) kırmızı pul biber (500 g) ve 25 adet kırmızı pul biber 500 g orijinal ambalajında olmak üzere toplam 50 adet kırmızıbiber Ankara ili halk pazarları ve marketlerinden 2015 yılı Haziran ayı içerisinde satın alınmıştır. Açıkta satılan kırmızıbiberlerde, kırmızıbiberi tanıtan ambalaj, paket, doküman, bildirim, etiket gibi hiçbir yazı, bilgi, ticari marka, marka adı, resimli unsur veya işaret bulunmamaktadır. Ambalajlı kırmızıbiberlerde ise üretim bilgileri mevcuttur. Örnekler numaralandırılarak kodlanmıştır. Dökme örnekler 1-25, ambalajlı örnekler ise 26-50 arasında numaralandırılmıştır.

Boya Standart Çözeltileri (Sunset Yellow FCF, Tartrazin, Kinolin Sarısı, Amarant, Ponceau 4R, Allura Red AC, Azorubin, Eritrosin, Brilliant Blue FCF, İndigotin, Patent Blue V, Sudan; I, II, III, IV, Para red, Red B) ve diğer kimyasallar (amonyak, metanol, susuz sodyum sülfat, asetonitril, aseton, potasyum fosfat, tetrabütil amonyum

bromid) Merck (İstanbul, Türkiye) firmasından satın alınmıştır.

Metot

Suda Çözünen Sentetik Boya Tayini

Örnek Hazırlama ve Ekstraksiyon İşlemi

50 mL'lik falkon tüpüne 5 g numune tartılmış, üzerine 10 mL ılık su ve 10 mL amonyak-metanol (v:v; 5:95) çözeltisi ilave edilerek, 2 dk 4000 rpm'de ve 10 dk santrifüj edilmiştir. Ekstrakt başka bir falkon tüpüne aktarılarak 50°C'lik su banyosu ve azot atmosferi altında içerisinde bulunan amonyak-metanol muhtevası uçana kadar bekletilmiştir. Çözelti 50 mL'lik balon jöjeye aktararak ultra saf su ile hacme tamamlanmıştır. 10 mL çözelti şartlandırılmış C18 Sep-Pak (Waters Corp.) kartuştan geçirilmiştir. Kartuştaki boya maddesi 2 mL metanol (HPLC saflıkta) ile 15 mL'lik falkon tüpü içerisine alınmış ve 2 mL ultra saflıkta su üzerine eklenmiştir. 50°C'deki su banyosu ve azot atmosferi altında metanol uzaklaştırılmıştır. 10 mL lik balon jöje içerisine aktarılan örnek ultra saf su ile hacme tamamlanmıştır. Kartuştan boyayı geçirdikten sonra örnek çözeltiden (0.1 g/mL) 1 mL alınarak ultra saf suyla

hacmi 20 mL'ye tamamlanması ile de seyreltme faktörü (SF) 20'ye ayarlanmıştır. Örnek enjeksiyonundan önce tüm çözeltiler 0.45 µm'lik tek kullanımlık şırınga filtresinden geçirilmiştir C18 kartuşun şartlandırılması için 5 mL metanol ve 5 mL TBA-II çözeltisi her biri 1 damla/s olacak şekilde kartuştan geçirilmiştir. 1-2 defa hava geçirilerek kartuştan fazlalıklar alınarak, TBA Buffer-II çözeltisi 1 hacim TBA buffer-I ve 3 hacim ultra saf su olacak şekilde hazırlanmıştır. HPLC cihazında kalibrasyon grafiklerinin (pik alanı-konsantrasyon grafiği) oluşturulmasında 0.25, 0.50, 1, 2.5, 5, 10 ve 20 mg/L konsantrasyonlarında çalışılan suda çözünen sentetik boyaların standartları kullanılmıştır [14].

HPLC Çalışma Şartları

NKLM-130 metodu esas alınarak, İntersil ODS 3V 4-5µm 4.6x250 mm (GL sciences Inc./Japan) kolonlu ve DAD Dedektörlü HPLC (Shimadzu LC 20A) cihazı 1.2 mL/dakika akış hızına, 40°C kolon sıcaklığına şartlandırılmıştır [14]. Taşıyıcı A fazı (10 mM Disodyum hidrojen fosfat pH: 7.0) ve B fazı (metanol, HPLC saflıkta) izokrotik olarak pompalanmıştır. 20 µl örnek enjekte edilmiştir. Gradient akış programı aşağıda Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Gradient Akış Programı

Zaman (dakika)	Taşıyıcı faz A (%)	Taşıyıcı Faz B (%)
0.01	95	5
4.00	70	30
10.00	60	40
15.00	60	40
20.00	60	40
37.00	5	95
39.00	5	95
40.00	95	5
45.00	Stop	Stop

İstatistiksel Analiz

Kalibrasyon çözeltileri ile çizilen kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak bulunan boyaların miktarları, seyreltme faktörü ile çarpılarak numunedeki boya miktarı mg/kg olarak bulunmuştur. Metodun analitik verileri Tablo 2'de gösterilmiştir. Tayin sınırı (TS), kör örneklerinin analizlenerek analitik geri zemin cevabının ölçülmesi ve bu değerlerin standart sapmanın faktörle çarpılması sonucu elde edilmiştir.

Yağda Çözünen Sentetik Boya Tayini

Örnek Hazırlama ve Ekstraksiyon İşlemi

5 g kırmızı pul biber numunesi 50 mL'lik falkona aktarılmış ve üzerine 10 g susuz sodyum sülfat ve 15 mL asetonitril eklenmiştir. Vorteks yardımıyla karıştırılmış ve daha sonra 3000 rpm'de 2 dakika santrifüjlenmiştir. Çözelti alınmış ve kalan örneğe 3 kez tekrar işlem yapılmıştır. 45 mL'lik çözeltiden 10 mL alınmış ve üzerine 10 mL su eklenmiştir. C18 500 mg (CNW) kartuştan geçirilerek temizleme yapılmıştır. 45 mL 80:20 asetonitril/aseton karışımı ile geri alınmıştır. 45 mL çözelti azot gazı altında kuruluğa kadar uçurma

işlemi yapılmış ve 1 mL asetonitril ilave edilerek seyreltme faktörü 0.9'a ayarlanmıştır. Hazırlanan örnek 0.45 µm'lik gözenekli şırınga filtresinden geçirilerek analize alınmıştır. 0.25, 0.50, 1, 2.50, 5, 10, 25, 50 ve 100 mg/L konsantrasyonlarında boya maddelerinin standart çözeltileri hazırlanmış ve kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur [15].

HPLC Çalışma Şartları

İntersil ODS 3V 4- 5µm 4.6x250 mm (GL sciences Inc./Japan) kolonlu ve DAD Dedektörlü HPLC (Shimadzu LC 20A) cihazı 1 mL/dk Akış Hızına, 30°C Kolon Sıcaklığına şartlandırılmıştır. Taşıyıcı izokrotik A fazı; 0.34 g KH₂PO₄ ile 1.01 g Tetrabütül Amonyum Bromid tartılmış ve 1000 mL'lik balon jöjeye konularak su ile 1000 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Taşıyıcı izokrotik B fazı; metanoldur (HPLC derecesinde). 20 µl hacminde örnek enjekte edilmiştir. Deneyin tamamlanmasının ardından kolon, asetonitril:su (%50-%50) karışımı ile yaklaşık 10 dk. Yıkanmıştır. Gradient akış programı analiz süresi boyunca %95 B %5 A'dır [15].

Kalibrasyon çözeltileri ile çizilen kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak Sudan Boyası miktarı, mg/kg cinsinden

seyreltme faktörü (SF:9) ile çarpılarak hesaplanmıştır. Metodun analitik verileri Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 2. Suda Çözünen Sentetik Boyaların HPLC Verileri

Sentetik Boya	TS	D	G	B	λ	Kalibrasyon fonksiyonu
Tartrazin	3.36	0.25-20	91	0.08	426	$y = 49622x + 1567.2$ $r^2 = 0.9999$
Kinolin Sarısı	4.61	0.25-20	91	0.07	414	$y = 43336x + 1881.7$ $r^2 = 0.9999$
Sunset Yellow FCF	4.39	0.25-20	94	0.06	483	$y = 49732x + 3661.9$ $r^2 = 0.9999$
Azorubin	5.04	0.25-20	84	0.11	522	$y = 43336x + 1881.7$ $r^2 = 0.9999$
Amarant	5.02	0.25-20	91	0.07	524	$y = 46892x - 2797.5$ $r^2 = 0.9999$
Ponceau 4R	5.27	0.25-20	93	0.07	510	$y = 55359x + 802.98$ $r^2 = 1$
Eritrosin	4.77	0.25-20	86	0.12	531	$y = 122967x - 1011.3$ $r^2 = 0.99999$
Allura Red AC	3.67	0.25-20	94	0.07	510	$y = 63443x + 6471.3$ $r^2 = 0.9998$
Patent Blue V	5.77	0.25-20	90	0.09	643	$y = 208295x - 70607$ $r^2 = 0.9954$
İndigotin	3.58	0.25-20	90	0.07	643	$y = 141594x - 9841.8$ $r^2 = 0.9992$
Brillant Blue FCF	3.42	0.20-16	85	0.10	643	$y = 145994x - 8595.8$ $r^2 = 0.9995$

TS: Tayin alt sınırı; D: Doğrusallık (mg/kg); G: Geri Kazanım (%); B: Belirsizlik (mg/kg); λ : Dalga Boyu (nm)

Tablo 3. Yağda Çözünen Sentetik Boyaların HPLC Verileri

Sentetik Boya	TS	D	G	B	λ	Kalibrasyon fonksiyonu
Sudan Red B	1.12	0.25-100	93	0.10	511	$y = 77066x + 1424.1$ $r^2 = 0.9997$
Para Red	0.74	0.25-100	92	0.14	481	$y = 102046x - 3220.5$ $r^2 = 0.9996$
Sudan I	0.53	0.25-100	95	0.11	482	$y = 26757x - 634.01$ $r^2 = 0.9975$
Sudan II	0.86	0.25-100	89	0.13	498	$y = 26757x - 424.01$ $r^2 = 0.9921$
Sudan III	1.03	0.25-100	90	0.14	510	$y = 26451x - 621.01$ $r^2 = 0.9983$
Sudan IV	1.33	0.25-100	96	0.10	515	$y = 24511x - 4511.01$ $r^2 = 0.9981$

TS: Tayin alt sınırı; D: Doğrusallık (mg/kg); G: Geri Kazanım (%); B: Belirsizlik (mg/kg); λ : Dalga Boyu (nm)

İstatistiksel Analizler

Örnek ortalamalarının arasında istatistiksel farklılıkların belirlenmesinde tek yönlü varyans analizi yapılmıştır. Farklılıkların hangi örnekler arasında olduğunu belirlemek için Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. İstatistiksel farklılıklar %5 önem seviyesine göre belirlenmiştir. Analizler 3 tekrarlı olarak yürütülmüştür. Veriler SPSS Statistics 23 paket programı (IBM, ABD) kullanılarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Suda Çözünen Sentetik Boyalar

Dökme ve ambalajlı kırmızıbiberlerin suda çözünen sentetik boya maddesi miktarları Tablo 4'de verilmiştir. 5 dökme örnekte suda çözünen sentetik boyalardan sadece Ponceau 4R tespit edilirken 1 örnekte Ponceau 4R ve Tartrazin bir arada tespit edilmiştir. 19 örnekte tespit edilebilir düzeyde suda çözünen sentetik boya bulunmamıştır. 16 nolu örnekte suda çözünen sentetik boyalardan tartrazin 4.66 mg/kg olarak tespit edilmiştir. 4, 8, 9, 10, 16 ve 21 nolu örneklerde Ponceau 4R miktarları sırasıyla 103.18, 61.39, 28.43, 110.62, 7.59 ve 21.61 mg/kg olarak bulunmuştur.

Ambalajlı kırmızıbiber örneklerinden 1 örnekte suda çözünen sentetik boyalardan Ponceau 4R tespit edilirken 24 örnekte tespit edilebilir düzeyde suda çözünen sentetik boyaya rastlanılmamıştır. 37 nolu örnekte Ponceau 4R 15.59 mg/kg miktarda tespit edilmiştir.

İstatistiksel olarak; suda çözünen sentetik boyalardan Tartrazin sadece 1 örnekte 4.66 mg/kg miktarda tespit edildiğinden, Kinolin Sarısı, Sunset Yellow, Azorubin, Amarant, Eritrosin, Allura Red, Patent Blue, İndigotin, Brilliant Blue hiçbir örnekte tespit edilebilir düzeyde bulunmadığından istatistik olarak değerlendirme yapılmamıştır. Ponceau 4R için istatistik değerlendirme yapılmış ve örnekler arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P < 0.001$).

Suda çözünen sentetik boyalı kırmızıbiber örneklerinin yüzdeleri kıyaslandığında, farklı 50 örnekte aranan suda çözünen renklendiricilerden Kinolin Sarısı, Sunset Yellow, Azorubin, Amarant, Eritrosin, Allura Red, Patent Blue, İndigotin, Brilliant Blue tespit edilebilir düzeyde bulunmamıştır. Dökme kırmızıbiber örneklerinin %4'ünde Tartrazin ve %24'ünde de Ponceau 4R tespit edilmiştir. Ambalajlı kırmızıbiber örneklerinin ise %4'ünde Ponceau 4R tespit edilmiştir (Şekil 1).

Kırmızıbiberlerle ilgili literatürde suda çözünen sentetik boya çalışmalarına rastlanılmamıştır. Bu çalışmada araştırılan suda çözünen sentetik boyalardan Tartrazin ve Ponceau 4R hariç diğer boyalarla aynı sonuçları Yentür ve ark. [16] alkolsüz içeceklerde tespit etmiş, iki çalışmada da Türk Gıda Kodeksinde belirtilen yasal limitlere uygun sonuçlar bulunmuştur. Garcia ve Gandara [17] ise farklı olarak 9 adet alkolsüz aromalı içecekde Tartrazin ve Ponceau 4R de dahil olmak üzere, Kinolin Sarısı, Sunset Yellow FCF ve Azorubin sentetik gıda boyası miktarlarını Türk Gıda Kodeksinde belirtilen yasal limitlere değil de 1994 Avrupa Birliği Direktiflerinde belirtilen limitlere uygun bulmuştur. Ayrıca bu çalışmadan farklı olarak Erdoğan [2] yaptığı çalışmada alkolsüz aromalı içeceklerin %55'de sentetik

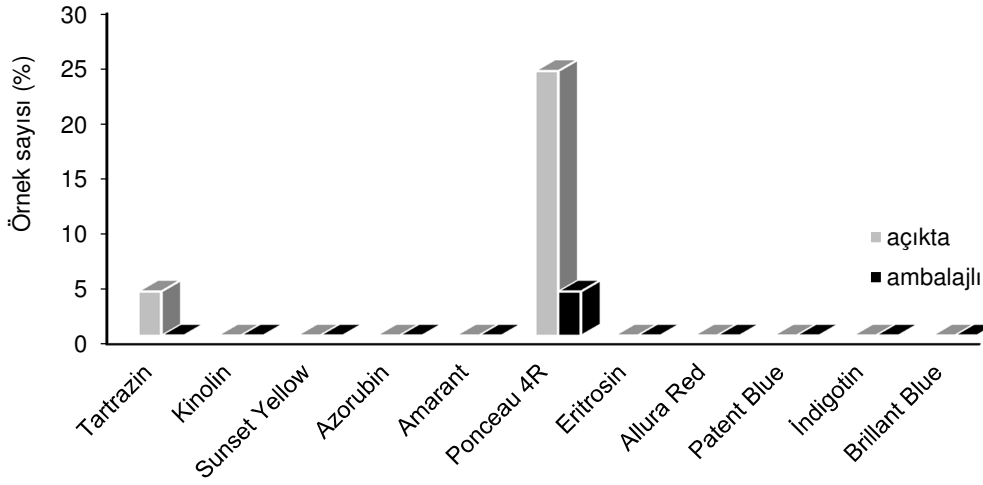
gıda boyasına rastlamışken Güler [18] yaptığı çalışmada, 96 adet içecek tozunun tamamında (%100) Türk Gıda Kodeksinde belirtilen değerlerin üzerine gıda boyası olduğunu tespit etmiştir. Şekerlemelerde yapılan çalışmalardan Dinç ve Arıcı'nın [19] yaptıkları çalışmada elde edilen suda çözünen sentetik boya sonuçları, kırmızıbiberlerde yapılan bu çalışma sonuçları ile Tartrazin ve Ponceau 4R hariç benzerlik göstermekte ve

yasal limitlere uygun sonuçlar elde edilmektedir. Fakat Güler'in [18] yaptığı çalışmada, bu çalışma ve Dinç ve Arıcı'nın [19] yaptıkları çalışmadan farklı olarak 140 adet şekerlemenin 135 adedinde (%96.40) Türk Gıda Kodeksinde belirtilen değerlerin üzerinde gıda boyası olduğunu tespit etmiştir.

Tablo 4. Kırmızıbiberlerde tespit edilen suda çözünen sentetik boya miktarları (ortalama \pm standart sapma mg/kg)

Örnek	Tartrazin	Ponceau 4R
4	<TS	103.18 \pm 0.37
8	<TS	61.39 \pm 1.99
9	<TS	28.43 \pm 2.32
10	<TS	110.62 \pm 0.92
16	4.66 \pm 0.13	7.59 \pm 1.38
21	<TS	21.61 \pm 3.46
37	<TS	15.59 \pm 0.26

<TS: Tespit edilebilir düzeyde bulunamamıştır.



Şekil 1. Suda çözünen sentetik boyalı kırmızıbiber örneklerinin yüzdeleri

Yentür ve ark. [16] reçel, meyveli yoğurt ve meyve suyu örneklerinde bu çalışmada kırmızıbiberlerde elde edilen suda çözünen sentetik boya sonuçları (Tartrazin ve Ponceau 4R sonuçları hariç) ile benzer sonuçları elde etmiş ve suda çözünen sentetik boya varlığına rastlanmamıştır. Yenilebilir buzlarda Dinç ve Arıcı'nın [19] yaptıkları çalışmada suda çözünen sentetik boyalardan Tartrazin miktarı ile bu çalışmada elde edilen tartrazin miktarı sonuçlarında birer örnek yasal limitlerin üzerinde bulunarak benzer sonuçlar elde edilmiştir. Fakat Dinç ve Arıcı'nın [19] yaptıkları çalışmada bu oran %11.10 ile bu çalışmadan farklı olmuştur. Alkolsüz aromalı içeceklerde yasal limitin üzerinde olan Ponceau 4R %3.69 tespit edilerek bu çalışmadan farklı bir sonuç elde edilmiştir [19]. Erdoğan [2] ise alkolsüz aromalı içeceklerden 11 adet örnekte, suda çözünen sentetik boyalardan Ponceau 4R ve Azorubin'i bir arada belirlemiştir. Bu çalışmada da 1 örnekte Tartrazin ve Ponceau 4R bir arada tespit edilmiştir.

Yağda Çözünen Sentetik Boyalar

Kırmızıbiber örneklerinde bulunan yağda çözünen sentetik boya maddelerin miktarları Tablo 5'da gösterilmiştir. Dökme kırmızıbiber örnekler arasında 5 örnekte yağda çözünen sentetik boyalardan Sudan I 7, 12, 17, 18 ve 24 nolu örneklerde sırasıyla 5.18, 0.81, 7.16, 50.20 ve 996.77 mg/kg miktarda tespit edilmiştir. 20 örnekte tespit edilebilir düzeyde Sudan I bulunmamıştır. 25 örnekten 1 örnekte yağda çözünen sentetik boyalardan Sudan II 18 nolu örnekte 4.62 mg/kg miktarda tespit edilmiştir. 24 örnekte tespit edilebilir düzeyde Sudan II'ye rastlanılmamıştır. 25 örnekten 3 örnekte yağda çözünen sentetik boyalardan Sudan Para Red 7. 17 ve 18 nolu örneklerde sırasıyla 7.62, 8.05 ve 2.13 mg/kg miktarda tespit edilmiştir. 22 örnekte tespit edilebilir düzeyde Sudan para red bulunmamıştır. 25 örneğin tamamında tespit edilebilir düzeyde Sudan III, Sudan IV ve Sudan red B'ye rastlanılmamıştır.

Tablo 5 Kırmızıbiberlerde tespit edilen yağda çözünen sentetik boya miktarları (ortalama \pm standart sapma mg/kg)

Örnek	Sudan I	Sudan II	Sudan IV	Sudan para red
7	5.18 \pm 0.16	<TS	<TS	7.62 \pm 0.022
12	0.81 \pm 0.05	<TS	<TS	<TS
17	7.16 \pm 0.91	<TS	<TS	8.05 \pm 1.23
18	50.20 \pm 0.95	4.62 \pm 1.38	<TS	2.13 \pm 0.04
24	996.77 \pm 0.81	<TS	<TS	<TS
28	1.23 \pm 0.08	1.86 \pm 0.11	<TS	<TS
33	<TS	<TS	<TS	0.89 \pm 0.06
35	<TS	<TS	<TS	2.230 \pm 0.09
36	1.15 \pm 0.55	<TS	8.34 \pm 0.93	13.31 \pm 0.46
41	0.91 \pm 0.04	<TS	<TS	<TS

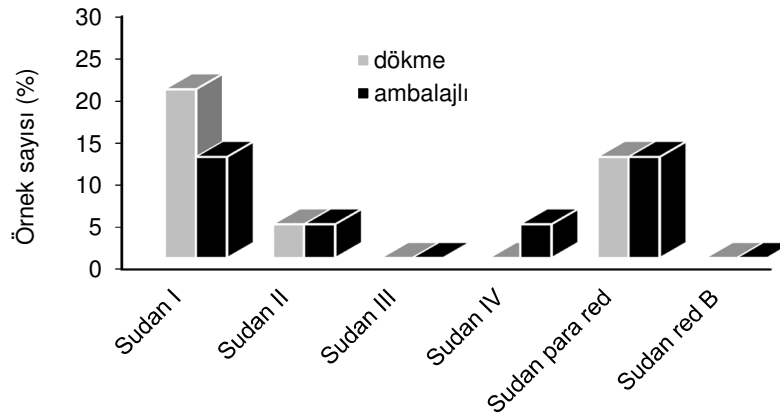
<TS: Tespit edilebilir düzeyde bulunamamıştır.

Ambalajlı kırmızıbiber örnekleri içerisinde 3 örnekte yağda çözünen sentetik boyalardan Sudan I; 28, 36 ve 41 nolu örneklerde sırasıyla 1.23, 1.15 ve 0.91 mg/kg miktarda tespit edilmiştir. 22 örnekte tespit edilebilir düzeyde Sudan I bulunmamıştır. 1 örnekte yağda çözünen sentetik boyalardan Sudan II 28 nolu örnekte 1.88 mg/kg miktarda tespit edilmiştir. 24 örnekte tespit edilebilir düzeyde Sudan II'ye rastlanılmamıştır. 25 örnekte 1 örnekte yağda çözünen sentetik boyalardan Sudan IV 36 nolu örnekte 8.34 mg/kg miktarda tespit edilmiştir. 24 örnekte tespit edilebilir düzeyde Sudan IV bulunmamıştır. 3 örnekte yağda çözünen sentetik boyalardan Sudan Para Red 33, 35 ve 36 nolu örneklerde sırasıyla 0.89, 2.23 ve 13.31 mg/kg miktarda tespit edilmiştir. 22 örnekte tespit edilebilir düzeyde Sudan Para Red bulunmamıştır. 25 örneğin tamamında tespit edilebilir düzeyde Sudan III ve Sudan red B'ye rastlanılmamıştır.

Kırmızıbiberlerdeki Sudan I miktarları arasındaki farklar $P < 0.001$ düzeyinde önemli bulunmuştur. 12, 41, 36, 28 nolu örnekler arasında Sudan I boya miktarları bakımından fark bulunmamıştır. 7, 17, 18 ve 24 nolu örnekler arasında ise istatistiksel olarak önemli farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Sudan para red değerleri ise 4 farklı grup oluşmuştur. 9 ve 35 nolu örneklerde Sudan para red boya miktarları 2. grupta ve aynı çıkmıştır. 17 ve 18 nolu örneklerde Sudan para red boya miktarları 3.

grupta ve aynı bulunmuştur. En çok Sudan para red boyası ihtiva eden 36 nolu örnek olmuştur.

Farklı 50 adet kırmızıbiber örneğinde aranan yağda çözünen sentetik renklendiriciden Sudan III ve Sudan red B hiçbir örnekte tespit edilebilir düzeyde bulunmazken, dökme kırmızıbiber örneklerinin %20'sinde Sudan I, %4'ünde Sudan II, %12'sinde Sudan para red tespit edilmiştir. Ambalajlı kırmızıbiber örneklerinin %12'sinde Sudan I, %4'ünde Sudan II, %4'ünde Sudan IV, %12'sinde Sudan para red tespit edilmiştir (Şekil 2). Fakat Kılınçer [20] ise yaptığı çalışmada bu çalışmadan farklı olarak kırmızı pul biber örneklerinde Sudan (I-IV) boyalarına rastlamamıştır. Zhang ve ark. [21] yaptıkları çalışmada bir adet toz biber örneğinde Sudan III boyasını 6.79 μ g/kg ve Sudan II boyasını 8.30 μ g/kg olarak tespit etmişlerdir. Ertaş ve ark. [22] 80 adet kırmızıbiber örneğinde sadece bir tanesinde Sudan IV tespit ederken Sudan II boyası bulunmamıştır. Mustafa ve ark. [23] toz biber örneklerinde Sudan I boyasına rastlamışlardır. Botek ve ark. [24] tatlı biber, köri, ve acı biber örneklerinde Sudan Para red miktarını 35-40 mg/kg tespit etmiştir. Sudan para red boyasına rastlanılma oranı %15 olurken yapılan bu çalışmada bu oran %12 olmuştur. Sun ve ark. [25] bu çalışmadan farklı olarak kırmızıbiber gibi gıda ürünlerinde Sudan (I-IV), Sudan Red B ve Sudan Para Red varlığına rastlamamışlardır.



Şekil 2. Yağda çözünen sentetik boyalı kırmızıbiber örneklerinin yüzdeleri

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi BAP Müdürlüğü "Kırmızıbiberlerde Suda ve Yağda Çözünen Sentetik Boyaların Varlığının Araştırılması" başlıklı projesi (2014/4-7 YLS) tarafından desteklenmiştir.

SONUÇ

Çalışmada iki farklı tarzda satışa sunulan kırmızıbiberlerde suda çözünen sentetik boyalardan Ponceau 4R ve Tartrazine, yağda çözünen sentetik boyalardan Sudan I, Sudan II ve Sudan para red varlığı araştırılmıştır.

Suda çözünen sentetik boyalardan Ponceau 4R'nin ambalajlı örneklerle kıyasla dökme örneklerde daha fazla olduğu görülmüştür. Tartrazine, toplam 50 örnekten yalnızca dökme biberlerin bir tanesinde tespit edilmiştir. Yağda çözünen sentetik boyalarda ise Sudan I dökme kırmızıbiberlerin %20'sinde ve ambalajlı olanların %12'sinde tespit edilmiştir. Sudan II ve Sudan IV boyar maddesi sadece 1 örnekte (ambalajlı) tespit edilebilir düzeyde bulunmuştur. Suda çözünen sentetik boya içeren kırmızıbiber örneklerinin hiçbirinde tespit edilebilir düzeyde yağda çözünen sentetik boya varlığına rastlanılmamıştır. Aynı şekilde yağda çözünen sentetik boya içeren kırmızıbiber örneklerinin hiçbirinde de suda çözünen sentetik boya varlığı tespit edilmemiştir. Araştırma sonuçlarına göre açıkta satılan kırmızıbiberlerdeki sentetik renk maddesi ilavesi ambalajlı ürünlere göre daha yüksek çıkmıştır. Türk Gıda Kodeksi Baharat Tebliği kapsamında yer alan ürünlerden kırmızıbiberlere Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliğinde yer alan hükümlere göre boyar madde kullanılmaması gerekmektedir [26]. Kırmızıbiberlerin ticari değerini düşürmemek, tüketicilere sağlıklı ürün ulaştırmak, tağşiş ve taklidi önlemek için ambalajlı (paketli) kırmızıbiber üretimi yaygınlaştırılmalı, ürün etiket bilgileri olmayan açıkta kırmızıbiber satışı sıkı denetlenmeli ve tüketiciler açıkta satılan ve markasız olan ürünleri almama ve tüketmeme konusunda bilinçlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

- [1] Yetim, H., Kesmen, Z., 2009. Gıda Analizleri. Erciyes Üniversitesi Yayınları No: 163. Erciyes Üniversitesi Matbaası, Kayseri, 346 s.
- [2] Erdoğan, Ş., 2007. Ankara piyasasında satışa sunulan bazı gıdalarda sentetik boya miktarlarının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Analizleri ve Beslenme Bilim Dalı, Ankara.
- [3] Madhava Naidu, M., Sowbhagya, H., 2012. Technological advances in food colours. *Chemical Industry Digest* 79-88.
- [4] Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., Nigam, P., 2001. Remediation of dyes in textile effluent: A critical review on current treatment technologies

- with a proposed alternative. *Bioresource Technology* 77(3): 247-255.
- [5] Bayhan, A., Yentür, G., 1988. Research on the existence of synthetic dyes in some samples of çemen, sumac and red pepper collected from local markets in Ankara. *Gazi Eczacılık Fakültesi Dergisi* 5(2): 175-183.
- [6] Yaman, M., 1996. Bazı gıda maddelerine katılan sentetik boyaların miktarlarının araştırılması, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Analizleri ve Beslenme Bilim Dalı, Ankara.
- [7] Özcan, G., Artık, N., Üner, Y., 1997. Gıda katkı maddelerinin tüketici bilinci ve insan sağlığı açısından irdelenmesi, TMMOB, Eylül, s.31.
- [8] Omaye, S.T., 2004. *Food and nutritional toxicology*. New York: CRC Press.
- [9] Kucharska, M., Grabka, J., 2010. A review of chromatographic methods for determination of synthetic food dyes. *Talanta* 80(3): 1045-1051.
- [10] Altuğ, T., 2001. Gıda Katkı Maddeleri, Meta Basım, İzmir.
- [11] McCann, D., Barrett, A., Cooper, A., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw, K., 2007. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: A randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *The Lancet* 370(9598): 1560-1567.
- [12] Avrupa Komisyonu, 1994. European Parliament and Council Directive 94/36/EC of 30 June 1994 on colours for use in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L237/13, 10.9.94
- [13] Belitz, H., Grosch, W., Schieberle, P., 2004. *Food Chemistry*, Berlin: Springer.
- [14] NMKL, 1989. Nordic Committee on Food Analysis: Colours, synthetic water soluble, liquid chromatographic determination in foods. UDC 667.28:543.544 130.
- [15] FSA, 2003. Collaborative trial 145 of a method for the detection and determination of Sudan I in chili products by HPLC, Method 145b, Food Standards Agency.
- [16] Yentür, G., Erdoğan, Ş., Er, B., Demirhan, B., Bayhan, A., 2009. Ankara bölgesinde tüketime sunulan bazı gıda maddelerinde sentetik boya düzeylerinin araştırılması. *Gıda* 20(3): 1-5.
- [17] Garcia, M.S., Gandara, J., 2005. Determination of food dyes in soft drinks containing natural pigments by liquid chromatography with minimal clean-up, *Food Control* 16(3): 293-297.
- [18] Güler, Z., 2005. Determination of synthetic colorants in confectionery and instant drink powders consumed in Turkey using UV/VIS spectrophotometry. *Journal of Food Quality* 28(1): 98-108.
- [19] Dinç, M., Arıcı, M., 2008. Gıdalara katılan suda çözünen bazı sentetik boyaların belirlenmesi. Türkiye 10. Gıda Kongresi; 21-23 Mayıs 2008, Erzurum.
- [20] Kılınçer, M., 2014. Gıda Ürünlerinde Sudan Boyalarının Analizinde Yeni Sıvı Ekstraksiyonu Tekniklerinin Geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir.

- [21] Zhang, C., Li, G., Zhang, Z., 2015. A hydrazone covalent organic polymer based micro-solid phase extraction for online analysis of trace Sudan dyes in food samples. *Journal of Chromatography A* 1419: 1–9.
- [22] Ertaş, E., Özer, H., Alasalvar, C., 2007. A rapid HPLC method for determination of Sudan dyes and Para Red in red chilli pepper. *Food Chemistry* 105: 756–760.
- [23] Mustafa, S., Nasir, N., Mahmood, T., Mahmood, I., 2013. Spectrophotometric determination of Sudan I-IV dyes in selected chili samples: A Survey of Karachi City, Pakistan. *European Academic Research* 1(6): 1-14.
- [24] Botek, P., Poustka, J., Hajšlová J., 2007. Determination of banned dyes in spices by liquid chromatography mass spectrometry. *Czech J. Food Sci.* 25(1): 17–24.
- [25] Sun, H.W., Wang, F.C., Ai, L.F., 2007. Determination of banned 10 azo-dyes in hot chili products by gel permeation chromatography-liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1164(1-2): 120-128.
- [26] TGK, 2013. Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Resmî Gazete, Sayı 28693.
-

Nar Sosunda Kromatografik Yöntemle Bazı Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Analizi

Bugra Dayı¹ , Hatice Ardağ Akdoğan¹ , Abdullah Akdoğan² 

¹Pamukkale Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Denizli

²Pamukkale Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Denizli

Geliş Tarihi (Received): 18.06.2017, Kabul Tarihi (Accepted): 13.09.2017

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): hardag@pau.edu.tr (H. Ardağ Akdoğan)

☎ 0 258 296 36 10 📠 0 258 296 35 35

ÖZ

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), insanlar ve hayvanlar için son derece toksik özellikte ve kanserojendir. Bu bağlamda güvenli gıda üretimi açısından, üretimi yapılan ticari nar soslarında bu bileşiklerin oluşumu ve düzeyleri önemli bir konudur. Bu çalışmada Türkiye’de satışa sunulan sekiz farklı nar sosu kullanılmıştır. Yüksek performanslı sıvı kromatografi-UV detektör (HPLC-UV) ile on üç tane PAH analizi yapılmıştır. Sekiz farklı nar sosu örneği için basit, hassas ve maliyeti düşük bir katı faz ekstraksiyonu (SPE) tekniği kullanılarak, PAH’ların ön deriştirilmesi gerçekleştirilmiştir. Nar sosu numunelerinin optimum SPE koşullarında elde edilen ekstraktları, daha sonra ters fazlı HPLC-UV dedektörü ile analiz edilmiştir. Veriler değerlendirildiğinde, toplam PAH miktarlarının 1.5 mg/L ile 16.6 mg/L arasında değiştiği tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: HPLC, Polisiklik aromatik hidrokarbonlar, Nar, Nar sosları

Chromatographic Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Pomegranate Sauces

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are highly toxic and carcinogenic to humans and animals. In terms of safe food production, the formation and levels of these compounds in commercial pomegranate sauces are important. This study was carried out on eight different pomegranate sauces sold in Turkey. Thirteen PAH analyzes were performed with high performance liquid chromatography-UV detector (HPLC-UV). Pre-concentration of PAHs was performed by a simple, precise and low cost solid phase extraction (SPE) technique for eight different pomegranate sauces samples. Extracts of pomegranate sauce samples obtained under optimum SPE conditions were then analyzed by reversed-phase HPLC-UV detector. Results indicated that the total amounts of PAHs varied from 1.5 mg/L to 16.6 mg/L.

Keywords: HPLC, Polycyclic aromatic hydrocarbons, Pomegranate, Pomegranate sauces

GİRİŞ

Nar (*Punica granatum*, *Punicaceae*), insan sağlığı üzerindeki çok faydalı etkileri nedeniyle büyük ilgi gören, fonksiyonel bir besin olup, bilinen en eski yenilebilir meyvelerdendir ve birçok ülkede ise halk hekimliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır [1]. Meyvenin yenilebilir

kısmı önemli mineraller yanında asitler, şekerler, vitaminler, polisakkaritler ve polifenoller içerir [2-4]. Nar suyu, polifenolikler, taninler ve antosiyaninler nedeniyle yüksek anti-oksitatif özellikler sunar [5]. Meyve taze olarak veya meyve suyu, şurup (grenadin), reçel, sos ve şarap haline getirilerek tüketilebilir. Nar sosu sektöründe, uygun sos bileşimi ile yüksek sos veren nar

türlerinin kullanılabilirliği önemlidir. Son yıllarda popülerlik kazanan nar ve nar ürünleri, Bakteriyel enfeksiyon, mantar enfeksiyonu, immüno modülasyon, gıda zehirlenmesi, ateroskleroz/arteryoskleroz, parazitler enfeksiyon ve periodontal hastalık içeren birçok potansiyel kullanım alanı için incelenmiştir. Nar konsantresi sosları genellikle salatalar için ve Türkiye'de birçok yemek için kullanılmaktadır [2]. Büyük ölçekli üretime sahip firmalar tarafından sağlansa da, bölgelere göre değişen geleneksel yöntemlerle küçük ölçeklerde de üretilmektedir.

PAH'lar su içerisinde düşük çözünürlüğe sahiptir ancak yüksek oranda lipofilik özelliği göstermektedirler. Özellikle kömür ve ham petrolün işlenmesi, doğal gazın yanması, çöp yakma, motorlu taşıtlardan, tütün kullanma ve pişirme gibi endüstriyel ve diğer insan faaliyetleri sırasında organik materyallerin eksik yanması ve ayrıca karbonizasyon gibi doğal işlemler ile esasen pirolitik süreçlerin bir sonucu olarak oluşurlar. Buna ek olarak, PAHlar pişirme, koruma ve depolamanın moduna bağlı olarak çok çeşitli et, balık, sebze ve meyvelerde bulunurlar. Doğada 100'den fazla PAH bulunmuştur; Bununla birlikte, Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından bunların oluşumu ve kanserojenliği göz önüne alındığında öncelikli kirlenici olarak sadece 16 tanesi belirlenmiştir [6-8]. Bunların en tanınmışları benzo[a]piren (BaP)'dir. DNA gibi hücre makromoleküllerine kovalent olarak bağlanan kimyasal olarak reaktif ara maddelere biyotransformasyon yoluyla mutajenik ve kanserojenik aktivitelerini uygularlar. Hayvanlardaki bireysel PAH metabolitlerinin tümöre özdeşliği üzerine yoğun ve sistematik çalışmalar incelendiğinde, diol epoksitlerinin alternatif bölgesi PAH'ların mutasyona uğramış ve kansinojenik türleri oldukları sonucuna varılmıştır. Fakat sadece bunlardan ibaret değildir [9-12]. Bu diol epoksitler, epoksit halkasının açılmasıyla, DNA bazlarına ve proteinlerde kovalent olarak nükleofilik alanlara bağlanan alkilleyici maddeler olan elektrofilik karbonium iyonlarına kolaylıkla dönüştürülür. Buna ek olarak birçok PAH, deney hayvanlarında tümör oluşturabilir. BaP ve başka PAH çeşitleri ağız yoluyla çeşitli kemirgen hayvan dokularına uygulandığında, karın, karaciğer, akciğerler ve meme bezleri gibi vücudun çeşitli bölgelerinde tümörler üretmiştir [13-14]. Toprak, gıda, hava ve su gibi matrislerdeki PAH'ların belirlenmesi için ekstraksiyon işlemi ile temizlenmesi gerekmektedir.

Numune olarak sulu örnekleri almak için Çevre kontrol sistemlerine katılan birçok laboratuvar, rutin bir numune hazırlama aracı olarak, katı faz ekstraksiyonunu (SPE) kullanır. SPE, 10 ng/L'den 10 µg/L'ye kadar olan konsantrasyon düzeyinde birçok bileşik için yüksek zenginleştirme oranı ve iyi geri kazanım sağlayan iyi bir laboratuvar yöntemi haline gelmiştir. Silika içeren SPE kartuşları kromatografi kolonları yerine başarıyla kullanılmıştır. Bu teknik istenen ayırımı gerçekleştirmek için kullanılabilen çok çeşitli ekstraksiyon koşullarından dolayı potansiyel olarak mükemmel bir seçiciliğe sahiptir [14]. Bu teknik, istenilen ayırımı elde etmek için kullanılabilen çok çeşitli ekstraksiyon koşullarından dolayı potansiyel olarak mükemmel bir seçiciliğe

sahiptir. Sıvı fazdan matrisleri, PAH'ları zenginleştirmek ve temizlemek için Octadecyl (C18) silika bağlı SPE kartuşları kullanılmıştır [15-16]. PAH'ları ayırmak ve tayin etmek için en sık kullanılan kromatografik yöntemler gaz kromatografisi [17] ve yüksek performanslı sıvı kromatografisidir [18].

Bu çalışmada PAH grubundan seçilen bileşiklerle nar soslarının kontaminasyonunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Örneklerden elde edilen numunelerde 13 farklı PAH'in analizi yapılmıştır. Bu PAH'lar; antrasen, benzo(a)antrasen, benzo(a)fluoren, benzo(b)fluoren, benzo(e)piren, Benzo(g,h,i)-perilen, krizen, dibenzo (a,c) antrasen, dibenzo (a,h) antrasen, flüoranten, flüoren, fenantren ve piren'dir. Nar sosu örneklerinde üretim prosesine bağlı olarak PAH oluşum seviyeleri incelenmiştir.

DENEYSEL ÇALIŞMA

Reaktifler ve Kullanılan Çözeltiler

Asetonitril, metanol, diklorometan ve heksan Merck (Darmstadt,Almanya) firmasından temin edilmiştir ve tümü HPLC safıktadır. Seyreltme işlemi için ultra saf su (Human Corporation Zeneer Power I S-UV) kullanılmıştır.

Kullanılan PAH'lar (antrasen (A), benzo(a)antrasen (BaA), benzo(a)fluoren (BaF), benzo(b)fluoren (BbF), benzo(e)piren (BeP), Benzo(g,h,i)-perilen (BgHiP), krizen (CHR), dibenzo (a,c) antrasen (DBacA), dibenzo (a,h) antrasen (DBahA), flüoranten (FL), flüoren (F), fenantren (Pa) ve piren (P)) Sigma firması (Missouri, ABD) tarafından temin edilmiştir. Kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik safıktadır ve Merck firması (Darmstadt, Almanya) tarafından temin edilmiştir. C-18 SPE kartuşları (500 mg/unit) Whatman (Clifton, New Jersey, USA) tarafından temin edilmiştir.

Çalışma Örnekleri

PAH analizi yapılmak için Türkiye'de marketlerde bulunan ticari nar soslarından satın alınmıştır. Farklı markalarda sekiz nar sosu örneği laboratuvarında cam elyaf filtreden geçirilmiştir. Daha sonra örnekler +4°C'de saklanmak üzere koyu kahverengi cam şişelere aktarılmıştır.

Katı Faz Ekstraksiyon (SPE) Prosedürü

SPE yönteminin performansı, nar sosları örneklerine uygulanmadan önce standart PAH'lar ile test edilmiştir. Bunun için, 13 PAH'ın her birinde 10 µg/L'lik bir model çözeltiden 500 mL kullanılmıştır. Bilinen ve bilinmeyen PAH örneklerini deriştirmek için bir C-18 SPE kartuş kullanıldı. Numune, 5 mL 1:1 (h/h) su-metanol ile yıkanan ve vakumla tamamen kurutulan 500 mg/unit C-18 SPE kartuştan geçirildi. Daha sonra kartuşun vakum altında tamamen kurduğundan emin olunduktan sonra PAH'lar 5 mL heksan ile elue edilmiştir. Toplanan eluent azot atmosferinde konsantre edilmiş ve elde edilen tortu 1mL asetonitril ile çözümlenerek HPLC'ye 20 µL enjektörde edilmiştir.

HPLC Analizi

Her bir PAH'nin kalitatif ve kantitatif tayinleri için ters faz HPLC Thermo Separation Products (TSP), Spectra serisi P200 pompa, UV 150 dedektör ve TSP Chromjet Integrator (Spectra-Physics Analytical, Fremont, CA, USA) sistemi kullanılmıştır. Analizde PAH'ların kolonda ayrılmalarında, ters faz (Reverse Phase; RP) Supelcosil™ sütun LC-18 kolonu kullanılmıştır. (4,6 mm x 250 mm, Supelco, Bellefonte, PA).

İstatistiksel Analiz

Örnekler 3 tekrar halinde çalışılmış ve sonuçların standart sapmaları Microsoft Excel Spreadsheet programında hesaplanmıştır.

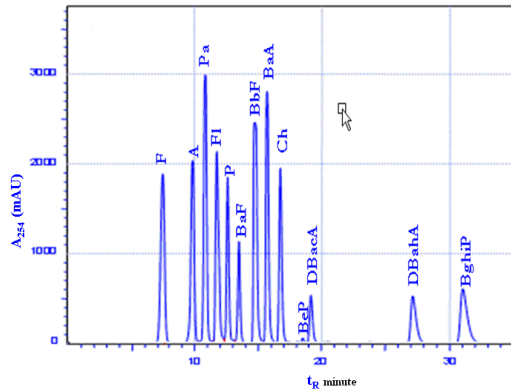
SONUÇ ve TARTIŞMA

Ekstraksiyon Prosedürünün Optimizasyonu

Seçilmiş PAH'lar için gerçek örnek analizine geçilmeden önce HPLC-DAD sisteminde ayırma şartları incelenmiştir. Daha sonra belirlenen ayırma şartlarında model çözelti kullanılarak, 13 PAH'nin ekstraksiyon şartları araştırılmış ve gerçek nar sosu örneklerine uygulanmıştır. Ayrıca optimize edilen ekstraksiyon yöntemine ait analitik parametrelerde incelenmiştir.

HPLC Çalışma Şartları

PAH'ların HPLC de ayrılması için izokrotik elüsyon şartlarında, hareketli faz olarak asetonitril:su (70:30, V:V) kullanılmıştır. Analiz, akış hızı 0.5 mL /dakika, DAD detektör de ölçümler 254 nm'de ve kolon fırın sıcaklığı 25°C'ye optimize edildi. PAH ların ayrılmasında kolon olarak C18 kolonu tercih edilmiştir. Şekil 1'de, 10 µg/L derişimdeki 13PAH standart karışımına ait kromatogram verilmiştir. Kromatogram incelendiğinde tüm analitler için ayırıcılık (Rs) değerlerinin 1.3 den büyük olduğu görülmüştür.



Şekil 1. 10 µg/L standart 13 PAH karışımının HPLC-DAD kromatogramı

Standart karışımın 20 µL'sini on kez enjekte edilerek sistemin tekrarlanabilirliği test edildi. Bağıl standart sapma % 0.9-3.3 aralığındadır.

Ekstraksiyon Şartlarının Optimizasyonu

Çoğu çalışmada PAH'ların sulu ortamlardan ayrılmalarında SPE tekniği kullanılmaktadır [17]. Özellikle SPE kartuş olarak C18 ya da yağlı matrisler için Silica tipi kartuşlar kullanılmaktadır. Bu çalışma içinde, nar sosu örneklerinde PAH'ları zenginleştirmede, örnek matrisi yağ içeriği çok düşük olduğu için Silica katı faz kartuş yerine C18 katı faz kartuşu kullanmaya karar verildi. Numuneden PAH'ların ekstraksiyonunda organik çözücü türü kritik bir parametredir. Eğer organik çözücünün polaritesi çok düşükse, ağır PAH'ları çözmek için yeterli olmayabilir, fakat çok yüksek olmasında, çok düşük atılma hacmi olacağından SPE kartuşu üzerinde kalmayacaktır. Çeşitli çözücülerle (asetonitril, metanol, aseton ve hekzan) çalışıldı. En iyi geri kazanım hekzan ile gerçekleştirildi. Düşük molekül ağırlıklı PAH'lar, buharlaşma basamağı sırasında buharlaşma basıncının düşmesi nedeniyle en yüksek geri kazanımlar hekzan ile elde edildi. Ağır PAH'ların polaritesi düşük olduğundan apolar çözücülerle birbirinden daha kolay ayrılır. PAH'lar için ekstraksiyon geri kazanım sırası incelendiğinde elüsyon çözeltisi sıralaması hekzan>asetonitril>metanol>aseton şeklinde olmuştur. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, hekzan en iyi elüsyon çözeltisi olarak seçildi ve tüm PAH'lar için geri kazanım yüzdeleri %94'ün üzerinde ve % bağıl standart sapma (BSS) değerleri <7.6 olarak hesaplandı. Literatürde yapılan diğer bir çalışmada da, C18 SPE kartuşları kullanılarak yapılan PAH ekstraksiyonu için elüsyon çözeltisi olarak hekzanın kullanıldığı görülmüştür [6].

Miktarları bilinen 13 PAH maddesi kullanılarak optimum SPE koşulu belirlendi. Bu deney için, sulu çözeltide 13 PAH'nin her birinden 10 µg/L içeren 500 mL'lik bir çözelti kullanıldı. İncelenen 13 PAH'nin kantitatif geri kazanımı (%90-104) sağlandı. Daha uçucu olan ve bu nedenle buharlaştırma adımı sırasında kısmen kaybolan düşük molekül ağırlıklı PAH'lar (F, Pa, A, FI) hariç ortalama geri kazanımlarda iyi sonuçlar elde edildi. Sonuçlar, aynı şartlarda yapılan altı deneyin ortalamasıdır ve bağıl standart sapmalar %2-8 aralığındadır. (Tablo 1).

Yöntemin Analitik Değerlendirmesi

Analitik değerlendirme için öncelikle kalibrasyon eğrileri incelenmiştir. Kalibrasyon doğruları için kullanılan standartlar ekstraksiyon çözeltileri dikkate alınarak hazırlanmıştır. Ekstraksiyon çözeltileri, analit içermediğinden emin olunan örneklerle uygulanan ekstraksiyon sonucu elde edilmiştir. Bu çözeltilere değişen derişimlerde PAH ilavesi yapılarak kalibrasyon doğruları türetilmiştir (Tablo 2). Kalibrasyon eğrileri, HPLC cihazının kendi yazılım programıyla oluşturulmuştur. Yöntemin analitler için gözlenebilir sınırlarının (LOD) belirlenmesi için, çalışılan optimum şartlarda analit içermeyen 10 tane kör çözelti hazırlandı ve bu çözeltilerden 20 µL alınarak HPLC'ye enjekte edildi. Analitlerin alıkonma zamanındaki piklerin pik alan değerleri ve standart sapmaları hesaplandı. Ortalama pik alan değeri, standart sapmasının 3 katı ile çarpılarak elde edilen pik alan değeri kalibrasyon doğrusunda yerine konarak gözlenebilir sınırları belirlendi (S/N=3). Tayin sınırı ise (LOQ) ise ortalama pik alan değeri,

standart sapmasının 10 katı alınarak kalibrasyon denkleminde yerine koyulup hesaplanmıştır. Bu çalışmalar sonunda elde edilen sonuçlar Tablo 2.'de verilmiştir.

Tablo 1. Model çözelti içindeki 13PAH için geri kazanım ve standart sapma değerleri

PAH	Geri Kazanım (%)	Standart Sapma
F	90	4
Pa	89	5
A	92	7
FL	91	5
P	99	3
BaF	97	4
BbF	96	5
BaA	104	4
CHR	102	3
BeP	99	8
DBacA	100	6
DBahA	98	3
BghiP	96	6

antrasen (A), benzo(a)antrasen (BaA), benzo(a)fluoren (BaF), benzo(b)fluoren (BbF), benzo(e)piren (BeP), Benzo(g,h,i)-perilen (BghiP), krizen (CHR), dibenzo (a,c) antrasen (DBacA), dibenzo (a,h) antrasen (DBahA), flüoranten (FL), flüoren (F), fenantren (Pa) ve piren (P)

Tablo 2. Yöntemin analitik verileri

PAH	Derişim aralığı (µg/L)	r ²	LOD (S/N=3) (µg/L)	LOQ (S/N=10) (µg/L)
F	0.2-10	0.963	0.01	0.33
Pa	0.5-10	0.994	0.03	0.10
A	0.2-10	0.998	0.02	0.06
FL	0.2-10	0.995	0.01	0.33
P	0.2-10	0.978	0.01	0.33
BaF	0.5-10	0.988	0.03	0.10
BbF	0.5-10	0.976	0.04	0.13
BaA	0.2-10	0.997	0.01	0.33
CHR	1-10	0.995	0.06	0.20
BeP	0.5-10	0.995	0.03	0.10
DBacA	2-10	0.992	0.15	0.50
DBahA	2.5-10	0.987	0.17	0.57
BghiP	1-10	0.996	0.09	0.30

antrasen (A), benzo(a)antrasen (BaA), benzo(a)fluoren (BaF), benzo(b)fluoren (BbF), benzo(e)piren (BeP), Benzo(g,h,i)-perilen (BghiP), krizen (CHR), dibenzo (a,c) antrasen (DBacA), dibenzo (a,h) antrasen (DBahA), flüoranten (FL), flüoren (F), fenantren (Pa) ve piren (P)

Yöntemin Nar Soslarına Uygulanması

Çalışmada ticari olan ve marketlerden temin edilmiş sekiz adet farklı markalarda nar sosu örnekleri ele alınmıştır. Elde edilen sonuçlar için bağıl standart sapma değerleri % 14'ten düşük bulunmuştur. İncelenen nar sosu örneklerinde tespit edilen PAH düzeyleri, 6, 7 ve 8 no'lu numunelerde diğer örneklerden daha yüksek bulundu (Tablo 3). Tablo 3 incelendiğinde örneklerin hemen hemen tamamında, F, Pa, A, FL, Ch, BeP ve DB(c,c)A PAH'larının varlığını rastlanırken bir kısmında ise P, BaF, BbF, BaA, DB(a,h) ve BghiP PAH'larının varlığı tespit edilmiştir.

Tablo 3. Gerçek nar sosu örneklerindeki PAH içerikleri*

Örnek	PAH derişimi (µg/L, $\bar{x} \pm sd$), (n=3)													Toplam PAH
	F	Pa	A	FL	P	BaF	BbF	BaA	CHR	BeP	DBacA	DBahA	BghiP	
1	0.35±0.02	0.21±0.03	<LOD	0.42±0.02	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.24±0.02	0.35±0.04	<LOD	<LOD	1.57
2	0.32±0.02	0.24±0.01	0.22±0.02	0.34±0.02	0.43±0.03	0.31±0.03	0.84±0.06	0.43±0.02	0.21±0.03	0.53±0.03	0.35±0.03	<LOD	<LOD	4.22
3	0.53±0.03	0.22±0.02	0.34±0.04	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.22±0.02	0.24±0.04	0.73±0.07	<LOD	<LOD	<LOD	2.28
4	0.24±0.02	0.53±0.06	0.71±0.07	2.07±0.10	1.11±0.20	0.43±0.03	<LOD	<LOD	0.55±0.05	0.42±0.05	0.33±0.06	0.25±0.03	0.34±0.03	6.98
5	0.54±0.03	0.45±0.02	0.62±0.06	0.41±0.06	0.53±0.05	0.34±0.03	0.85±0.09	<LOD	0.32±0.05	3.94±0.50	2.10±0.70	<LOD	<LOD	10.10
6	0.24±0.04	1.25±0.06	2.04±0.07	2.54±0.20	<LOD	4.23±0.14	<LOD	<LOD	<LOD	0.44±0.05	2.25±0.06	0.62±0.05	0.74±0.07	14.35
7	0.74±0.05	1.43±0.10	1.25±0.05	3.52±0.28	2.21±0.30	2.34±0.10	3.45±0.32	1.22±0.07	1.04±0.06	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	17.20
8	0.54±0.05	0.95±0.08	0.62±0.04	<LOD	3.71±0.26	1.73±0.32	<LOD	<LOD	1.42±0.03	2.13±0.27	2.05±0.02	1.13±0.04	<LOD	14.28

*: antrasen (A), benzo(a)antrasen (BaA), benzo(a)fluoren (BaF), benzo(b)fluoren (BbF), benzo(e)piren (BeP), Benzo(g,h,i)-perilen (BghiP), krizen (CHR), dibenzo (a,c) antrasen (DBacA), dibenzo (a,h) antrasen (DBahA), flüoranten (FL), flüoren (F), fenantren (Pa) ve piren (P)

Birinci nar sosu örneğinde toplam altı farklı PAH gözlenmiş, 0.42 µg/L maksimum konsantrasyonunda FL tespit edilmiştir. Bu altı PAH'ın toplam konsantrasyonu 1.57 µg/L dir. Örnekler arasındaki korelasyonlar değerlendirildiğinde; F, Pa, A, FL, CHR ve DB(a,c)A PAH'lar düşük düzeyde de olsa tüm sos örneklerinde görülmüştür. Bununla birlikte, BbF sadece örnek 2, 5 ve 7'de bulunmuştur. BaA ise 2, 3 ve 7 nolu örneklerde tespit edilmiştir. Ayrıca, DB(a,h)A ve Bghi yalnızca örnek 4, 6 ve 8'de bulunmuştur. Örnekler 5, 6, 7 ve 8'in dışında, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) değerlendirilmesine göre [19], nar sosu, yüksek konsantrasyonlarda PAH içeren başlıca gıdalar arasında bulunmamaktadır. BaA, CHR ve BbF

bakımından incelendiğinde, tüm nar sosu örneklerinin Avrupa Birliğinin 4 PAH için belirlemiş olduğu kalıntı düzeyleri bakımından kabul edilebilir olduğu görülmüştür. Bazı ülkelerde, özellikle Avrupa'da nar sosu tüketimi oldukça fazladır. Bununla birlikte bu çalışmada görüldüğü gibi nar sosları PAH içerebilir. Nar sosu tüketimi fazla olduğunda günlük PAH alımı artmaktadır. Sonuç olarak, nar soslarının pazara arzında güvenli gıda tüketimi bağlamında incelenmesi gereken önemli bir konu olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca, çalışmada önerilen yöntem, nar soslarındaki PAH'ların kantitatif geri kazanımlarla hızlı ve doğru bir şekilde tespit edilebileceğini göstermiştir. Bütün bunların yanında, PAH bakımından kirli olduğu belirlenen nar

sosları insan sağlığı içinde risk taşımaktadır. Bu açıdan, nar soslarının üretiminde yanma işlemine tabi tutulması, nar soslarındaki PAH varlığının da bir göstergesidir.

KAYNAKLAR

- [1] Alessandra, M., Andrea, C., Eugenio, L., Luciana, M., Patrizia, P., Stefania, C., 2016. Evaluation of different extraction methods from pomegranate whole fruit or peels and the antioxidant and antiproliferative activity of the polyphenolic fraction. *Food Chemistry* 202: 59–69.
- [2] Maskan, M., 2006. Production of pomegranate (*Punica granatum* L.) juice concentrate by various heating methods: colour degradation and kinetics. *Journal of Food Engineering* 72(3): 218-224.
- [3] Vardin, H., Fenercioglu, H., 2003. Study on the development of pomegranate juice processing technology: clarification of pomegranate juice. *National Center for Biotechnology Information* 47(5): 300-3.
- [4] Cemeroglu, B., Artik, N., Erbas, S., 1992 Gewinnung von Granatapfelsaft und seine Zusammensetzung. *Flussiges Obst* 59(6): 335-340.
- [5] Hamid, R.R., Mohammad, A., Seyed, N.O., 2012. A comprehensive review of *Punica granatum* (pomegranate) properties in toxicological, pharmacological, cellular and molecular biology Researches. *Iran Journal of Pharmaceutical Research* 11(2): 385–400.
- [6] Barranco, A., Alonso-Salces, R.M., Bakkali, A., Berrueta, L.A., Gallo, B., Vicente, F., Sarobe, M., 2003. Solid-phase clean-up in the liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils. *Journal of Chromatography A* 988(1): 33-37.
- [7] Buseti, F., Heitz, A., Cuomo, M., Badoer, S., Traverso, P., 2006. Determination of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous and solid samples from an Italian wastewater treatment plant. *Journal of Chromatography A* 1102(1-2): 104-115.
- [8] Simko, P., 2002. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke favouring food additives. *Journal of Chromatography B* 770(1-2): 3-18.
- [9] Tehranifar, A., Selahvarzi, Y., Kharrazi, M., Bakhsh, V.J., 2011. High potential of agroindustrial by-products of pomegranate (*Punica granatum* L.) as the powerful antifungal and antioxidant substances. *Industrial Crops and Products* 34(3): 1523-1527.
- [10] Macek, T., Mackova, M., Kas, J., 2000. Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnology Advances* 18(1): 23-34.
- [11] Mackova, M., Dowling, D.N., Macek, T., 2006. Phytoremediation and rhizoremediation. *Focus on Biotechnology*, vol. 9A. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- [12] Harvey, P.J., Campanella, B.F., Castro, P.M.L., Harms, H., Lichtfouse, E., Schaufner, A.R., Smrcek, S., Werck-Reichhart, D., 2002. Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenols. *Environmental Science and Pollution Research* 9(1): 29-47.
- [13] Rezek, J., Wiesche, C., Mackova, M., Zadrazil, F., Macek, T., 2008. The effect of ryegrass (*Lolium perenne*) on decrease of PAH content in long term contaminated soil. *Chemosphere* 70(9): 1603-1608.
- [14] Shami, S.G., Wolff, R.K., Hahn, F.F., Brooks, A.L., Griffith, W.C., 1985. Early cytokinetic and morphological response of rat lungs to inhaled benzo(a)pyrene, gallium oxide, and SO₂. *Environmental Research* 37(1): 12-25.
- [15] Kira, S., Sakano, M., Nugami, Y., 1997. Measurement of a time-weighted average concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic environment using solid phase extraction cartridges and a portable pump. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 58(6): 878-884.
- [16] Masih, A., Taneja, A., 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) concentrations and related carcinogenic potencies in soil at a semi-arid region of India. *Chemosphere* 65(3): 449-456.
- [17] Countway, R.E., Dickhut, R.M., Canuel, E.A., 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) distribution and associations with organic matter in surface waters of the York River, VA Estuary. *Organic Geochemistry* 34(2): 209-224.
- [18] Luthe, G., Broeders, J., Brinkman, U.A.T.H., 2001. Mono fluorinated polycyclic aromatic hydrocarbons as internal standards to monitor trace enrichment and desorption of their parent compound during solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* 933(1-2): 27-35.
- [19] World Health Organization Regional Office for Europe, 1987. Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH), Air quality guidelines for Europe; Copenhagen, 105-117.

Kabak (*Cucubita pepo* L.) Tozunun Kek Üretiminde Potansiyel Kullanımı ve Kek Kalite Parametrelerine Etkisi

Cem Baltacıoğlu , Mehmet Uyar 

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

Geliş Tarihi (Received): 13.04.2017, Kabul Tarihi (Accepted): 13.10.2017

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): cembaltacioglu@ohu.edu.tr (C. Baltacıoğlu)

☎ 0 388 225 42 27 📠 0 388 225 01 12

ÖZ

Bu çalışmada kabak çekirdeği için üretilen kabaktan elde edilen tozdan kek üretimi amaçlanmıştır. Kek üretiminde kabak tozu %15, 30 ve 45 oranlarında buğday unu ile yer değiştirme yöntemiyle kek hamuruna ilave edilmiştir. Kek hamuruna ilave edilen kabak tozu hamurda yüksek oranda viskozite artışına neden olurken, keklerde ise pH değerinde azalma gözlenmiştir. Keklerin renk değerleri incelendiğinde ise standart kek formülüne göre, keklerde katılan kabak tozu oranı arttırıldığında L* değerlerinde azalma yani daha koyu bir ürün elde edildiği belirlenmiştir. Fakat a* ve b* değerlerinde artma olduğu gözlenmiştir. Tekstür değerlerinde ise kuvvet, sertlik, yapışkanlık, esneklik, çiğnenebilirlik ve elastikiyette azalma gözlenmiştir. Duyusal analiz sonuçlarına göre ise en yüksek puan %30 kabak tozu ilaveli kek olduğu belirlenmiştir. Bütün bu bilgiler sonucunda kabak tozu ilavesinin kek endüstrisi için önem arz ettiği düşünülmektedir ve bundan sonra yapılacak çalışmalara ışık tutması beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kabak tozu, Kek, Tekstür, Duyusal, Renk

Potential Use of Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) Powder in Cake Production and its Effect on Cake Quality Parameters

ABSTRACT

In this study, potential use of pumpkins, which are byproducts of pumpkins grown for their seeds only, was determined in cake production. Pumpkin powder was added into cake dough by means of displacement with wheat flour at rates of 15, 30 and 45%. While an increase in viscosity of cake dough was observed due to the use of pumpkin powder, a decrease in pH value of cake was determined. In terms of color values of cakes, L* values decreased by an increase in the rates of pumpkin powder, meaning that darker product was obtained in comparison to the control cake formula. On the other hand, a* and b* color values increased by an increase in the rates of pumpkin powder. Texture values for fracture force, hardness, adhesiveness, springiness, chewiness and resilience decreased. Results of sensory analysis indicated the highest score was the cake prepared with 30% pumpkin powder. In conclusion, the incorporation of pumpkin powder into cake formulation may be important for the cake industry, and results of this present study may be valuable for future studies.

Keywords: Pumpkin powder, Cake, Texture, Sensory, Color

GİRİŞ

Yumuşak buğday ürünlerinden olan kek, üretimi ve tüketimi, gelir dağılımı alışkanlıkları, nüfus artışı

şehirleşme olgusu, ulaşım imkanlarının gelişmesi ve yeni tekniklerin uygulanması ile artmaktadır. Kek pek çok ülkede üretilen besleyici değeri yüksek, tüketimi kolay, göz ve damak zevkine hitap edebilen çeşitlilikte,

farklı formülasyonlarda ve şekillerde üretilen hazır bir gıda ürünüdür. Kek ürünleri çok çeşitli formlarda bulunabilen ve unlu mamuller endüstrisinin en önemli ürünlerindedir. Endüstrideki kek çeşitlerinin ve kek formüllerinin çokluğu nedeniyle kekin tanımını yapmak oldukça zordur. Bununla birlikte, çok genel bir ifadeyle kek; un, şeker, yağ, yumurta, kabartma tozu, su (bazen süt) ve tatlandırıcı kullanılarak hazırlanan hamurun pişirilmesiyle elde edilen unlu mamul olarak tanımlanabilir [1]. Çekirdekleri çıkarıldıktan sonra hayvan yemi veya gübre olarak değerlendirilen kabaklar ekonomik bir değer içermemektedir. Gıda sanayinde kullanım alanı bulunmayan kabak çekirdeği elde etmek üzere üretilen kabak (*Cucurbita pepo* L.) bitkisi kullanılarak üretilen bir gıda maddesi ya da katkısı bulunmamaktadır.

Bu çalışmada çekirdekleri ayrıldıktan sonra atık olarak değerlendirilen kabak bitkisinden kabak tozu elde edilmiştir. Elde edilen bu tozun ticari olarak üretilen kek formülasyonuna farklı oranlarda ilave edilmiştir. Böylece kabak bitkisinden ve kabağın beslenme açısından içeriğinden faydalanılmıştır. Kek üretiminde kullanılan kabak tozunun kek hamuru, kek tekstürü ve kalite özellikleri üzerine etkileri incelenmiştir.

MATERYAL ve METOT

Kabak Tozu Üretimi

Nevşehir bölgesindeki üreticiden temin edilen %91±1.2 (yaş ağırlık) kabaklar nem kaybetmemesi için laboratuvara getirilince zaman kaybetmeden parçalayıcıda (Beko Robokit 2154, Türkiye) parçalanıp %10 nem seviyesinin altına kadar hava sirkülasyonlu kurutucuda (Termal, Türkiye) yaklaşık 8 saat sürede 60°C'de kurutulmuştur ve kabak tozu üretimi için laboratuvar tipi değirmende (Ika MF10, Almanya) öğütülmüştür. Elde edilen tozlar hava geçirmez ambalajlarda kek üretimi amacıyla derin dondurucuda (Nüve FR490, Türkiye) -40°C'de depolanmıştır.

Kabak Tozunda Yapılan Analizler

Kabaktan elde edilen tozda yağ miktarı Soxhlet ile AOCS Am 2-93'e, nem miktarı ICC Standart Metot No: 110/1 [2]'e, kül miktarı ICC Standart Metot No: 104/1 [2]'e, protein miktarı AACC Standart Metot No: 46-12 [3]'e göre belirlenmiştir.

Lif Tayini

Tayin için 3 gram numune kabak tozu tartılmış, üzerine 50 mL %5'lik sülfürik asit ilave edilerek hacim 150 mL saf su ile tamamlanmıştır. Karışım 30 dakika kaynatılmıştır. Kaynama sırasında su eksildikçe hacim 200 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır. Kaynama sırasında karışım cam çubukla karıştırılmıştır. Daha sonra Macherey-Nagel No:840W filtre kâğıdından süzölmüştür. Asit reaksiyonu tamamen kayboluncaya (mavi turnusol kâğıdı süzöntüye değdirildiğinde renk mavi kaldığında) kadar sıcak saf su ile yıkama yapılmıştır. Filtre kâğıdı üzerinde kalan kalıntı filtre kâğıdı çapındaki bir saat camı üzerinden piset ile

yıkamak suretiyle behere tekrar aktarılmıştır. Üzerine bu kez 50 mL %5'lik NaOH ve 150 mL saf su ilave edilerek 30 dakika kaynatılmıştır. Kaynatma bitiminde yıkama ve süzmeden sonra kalan kalıntı tekrar behere aktarılmış, oradan da 110°C'de kurutulmuş, ağırlığı hassas terazi ile belirlenen yukarıda verilen filtre kâğıdı üzerine aktarılmıştır. Önce saf su ile sonra 3 defa %95 etil alkol ve eterle yıkanmış ve filtre kâğıdı ile birlikte bir kroze içinde 110°C'de etüvde kurutulmuştur. Tamamen kuruduktan sonra desikatörde soğutularak hassas terazide tartılmıştır.

Yağ, Nem, Protein Miktarı, Su Aktivitesi ve Kül Analizleri

Kabak tozunun yağ içeriği yağ miktarı Soxhlet ile AOCS Am 2-93'e göre, nem içeriklerinin belirlenmesinde ICC Standart metot No 110/1 [2]. Örneklerde protein miktarı AACC Standart Metot No: 46-12 [3]'e göre yapılmıştır. Örneklerin su aktivitesi Novasina (İsviçre) su aktivitesi ölçüm cihazı ile yapılmıştır. Kül tayini AACC 08.01 [4] metoduna göre yapılmıştır.

Kek Üretimi

Kek üretimi için uluslararası standart formülasyon ve yöntem olan AACC No:10.90.01 [4] yöntemi izlenmiştir. Yönteme göre hazırlanan kek hamurları 190°C'de 30 dakika tek kullanımlık kek kalıplarında tezgah üstü ticari bir fırında (Korkmaz, Fornella XL60 Inox A497, Türkiye) pişirilmiştir. Bir pişirme işlemi 4 adet kek pişirilmiştir. Standart yöntemle üretilen kekler kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Bu yöntemde kullanılan buğday unu miktarı ağırlıkça %15, 30 ve 45 oranında kabak tozu ile yer değiştirilmiştir. Diğer işlemler uluslararası yöntemde olduğu gibi devam etmiştir.

Hamurda Yapılan Analizler

Kek hamurunun viskozitesi kontrol grubunda ve belirlenen oranlarda kabak tozu ilave edilmiş olarak hazırlanan hamurlarda LV-04 (64) uç ile 10 devir/dakika hızda oda sıcaklığında (25°C) belirlenmiştir (Brookfield Viscometer-DV2T Extra, ABD).

Kekte Yapılan Analizler

pH ve Hacim Analizi

Kek örneklerinde pH analizi için 130°C'de 55 dakika kurutulmuş keklerden 10 g alınmıştır 90 mL distile su ile 10 dakika laboratuvar tipi parçalayıcıda yüksek devirde (WiseTis HG15A, Kore) homojenize hale getirilmiştir ve bu süre sonunda pH metre (Phenomenal VWR, Almanya) kullanılarak pH belirlenmiştir. Keklerde pişirme işleminden 2 saat sonra oda sıcaklığında soğutulup kolza tohumu kullanılarak yer değiştirme metodu ile pişmiş kek numunelerinin hacimleri belirlenmiştir.

Renk Analizi

Pişmiş kek örneklerinin 2 saat oda sıcaklığında soğutulmasının ardından yüzeyden ve yatay orta nokta

kesiminden elde edilen yüzeyden farklı noktalardan renk ölçümü yapılmıştır (Konica Minolta CR400, Japonya). Renk ölçümleri CIE (L*, a*, b*) renk sistemi ile ifade edilmiştir. Renk ölçümü oda şartlarında beş paralel ve her örnek için üç bölgede yapılmıştır ve bu değerlerin ortalaması o örneğin rengini ifade etmiştir.

Tekstür

Kek örneklerinde pişirme işleminin ardından 2 saat sonra TPA (Texture Profile Analysis) yapılmıştır (TA-XT Plus Texture Analyzer, İngiltere). Analizde SMS P/35 silindirik aparat kullanılmıştır ve test konfigürasyonu ön test hızı 1 mm/s, test hızı 2 mm/s, test sonrası hız 1 mm/s, gerilme (strain) %40, zaman 5 s, trigger gücü 5 g olarak ayarlanmıştır. Tekstür analizinde sertlik (hardness), yapışkanlık (adhesiveness, cohesiveness, gumminess), esneklik (springiness), çiğnenabilirlik (chewiness), elastikiyet (resilience) değeri ölçülmüştür. Kek numuneleri 38 × 38 × 21 mm (genişlik × derinlik × yükseklik) boyutlarında kesilerek tekstür analizi gerçekleştirilmiştir.

Duyusal Değerlendirme

Örneklerin duysal analizleri eğitimsiz (test öncesi bilgilendirme yapılmış) 9 panelist tarafından gerçekleştirilmiştir [5]. Panelistler 20-50 yaş grubundan seçilmiştir. Tanımlama testlerinde olduğu gibi referanslar, kalibrasyon gibi uygulamalar yer almamaktadır. Tüketici beğenisini ifade edecek şekilde skala hazırlanmıştır. Örnekler 9-nokta hedonik test (9-nokta hedonik test, aşırı beğenmedim:1, aşırı beğendim: 9) göre kabul edilebilirlik testine tabi olmuştur. 9-nokta hedonik test yöntemi diğer tüm yöntemler içerisinde ürün kabul edilebilirliği ve görünüşünü değerlendirmesi nedeniyle dikkat çekmektedir. Analizler floresan ışık (gün ışığı) altında kontrollü oda sıcaklığında ayrı masalarda gerçekleştirilmiştir. Tüm panelistlere su ve kraker (tuzsuz) verilmiştir.

İstatistiksel Değerlendirme

Kontrol gruplarında üretim üç tekerrürlü ve analizler üç paralel olarak yapılmıştır, ortalama değerler verilmiştir. İstatistiksel farkları belirlemek için varyans analizi (ANOVA, Minitab Ver.17) kullanılmıştır. Grup içi değerlendirmeler SPSS (Ver.15) ile yapılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Hammaddede Yapılan Analizler

Bu projede Nevşehir bölgesinden temin edilen ve atık olarak görülen kabak çekirdeği üretiminde kullanılan kabak (*Cucurbita pepo* L.) bitkisinden öncelikle kurutularak kabak tozu elde edilmiştir. Elde edilen kabak tozunda yapılan lif, nem ve su aktivitesi değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Bu incelemeler sonunda yağ miktarı, meyve ve sebzelerde beklenen düzeyde bulunmuştur. Literatür çalışmalarında meyve ve sebzelerin yağ oranı %0.1–0.3 arasında olduğu belirlenmiştir [6]. Keke ilave edilen kabak tozunda yapılan yağ analizi sonucunda yağ miktarının fazla çıkması kabak bitkisinin çeşidinden ve

kuruyemiş olarak tüketilen kabak çekirdeği üretiminde kullanılan kabak olduğundan ileri geldiği düşünülmüştür. Ponka ve ark. [7] ve Fennema ve ark. [8] yaptıkları çalışmalara göre 5 farklı kabak çeşidinin analizleri sonucunda kül miktarını 0.3±0.7 ile 1.3±0.5 (g/100 g yaş ağırlık) olarak belirlenmiştir. Literatür çalışmalarındaki değerden yüksek çıkması kabak bitkisinden elde edilen unun daha fazla mineral madde içeriğine sahip olduğunu düşündürmektedir. Ekinci'ye [9] göre protein miktarı 100 gram yaş ağırlıkta 1.4 g protein olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada protein miktarının literatüre kıyasla daha yüksek olduğu bulunmuştur ve buda kek üretimi açısından avantaj olarak görülmüştür. Üretilen kabak tozu ilaveli kekler daha yüksek protein oranına sahip olmaktadır buda yeni bir ürün olarak pazarlanmasında önemli önem taşımaktadır. Kabak tozunun günlük diyet lifi açısından zengin olduğu yapılan Pratt ve ark. [10] yaptığı çalışmalarda da belirtilmiştir.

Tablo 1. Kabak tozunun yaklaşık bileşimi ve su aktivitesi

Parametre	Değer
Kül (%)	4.747±0.055
Lif (%)	13.393±0.426
Yağ (%)	0.543±0.042
Nem (%)	4.143±0.764
Protein (%)	8.500±0.070
Su Aktivitesi	0.232±0.120

Kek Hamurunda Yapılan Analizler

Yapılan çalışmada kabak tozu ilavesi oranı arttıkça viskozitenin arttığı belirlenmiştir (Tablo 2). Bunun sebebinin ise kabak tozunun lif içeriğinden dolayı kek hamurunda kıvamı artırıcı bir etki yaratmış olduğu düşünülmektedir. Ertaş ve Çoklar'ın [11] yaptıkları bir çalışmada farklı pekmez ilavesi ile elde edilen kek hamurlarının viskoziteleri ölçülmüş ve andız pekmezinde ölçüm yapılan bütün devirlerde kek hamuru viskozitesinde artış gözlenmiştir ve kabak tozunun yarattığı etkiye benzer sonuçlar elde edilmiştir. Kek üretiminde yani bir bakış açısı kazandırması açısından bu çalışmalar önem arz etmektedir.

Kekin Fiziksel ve Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi

Kabak tozundan yapılan keklerin pH ve hacim değerleri Tablo 2'de verilmiştir. Analiz sonuçları incelendiğinde keklerle ilave edilen kabak tozu oranı arttıkça kekin pH'sında düşme olduğu belirlenmiştir. Bunun sebebinin ise kabak tozunun pH'sının düşük olmasından kaynaklandığı belirlenmiştir. Baik ve ark. [12] yaptıkları çalışmada 6.78–8.55 arasında pH değerleri elde ederken, Masoodi ve ark. [13] 6.82–7.19 arasında bulmuşlardır. Farklı oranlarda kabak tozu ilave edilen keklerde hacim analizi yapılmıştır. Bu çalışmada keklerle ilave edilen farklı oranlarda kabak tozunun oranı arttıkça hacimdeki değişiklik Tablo 2'de gösterilmiştir. Kek hacmi üzerine sadece %15 oranında kabak tozu ilavesinin önemli etki yaptığı görülmektedir (p<0.05). Hacim üzerinde önemli bir değişim olmaması kek üretiminde kabak tozu kullanımının görünüşte bir olumsuzluk yaratmayacağı olarak da yorumlanabilmektedir. Doğan ve ark. [14] tarafından yapılan bir çalışmada

ekzopolisakkarit çözeltisi kullanılarak üretilen keklerin hacimleri 202–242 cm³ arasında bulmuşlardır ve

ekzopolisakkarit ilavesinin kek hacmi üzerine önemli bir etkisi bulunmadığı tespit edilmiştir.

Tablo 2. Kekte pH, hacim ve kek hamurunda viskozite değerleri

	Viskozite (cp)	pH	Hacim (mL)
%0 kabak tozu (Standart)	3.24±0.05 ^a	7.15±0.14 ^c	57.4±3.1 ^a
%15 Kabak tozu	42.31±0.13 ^b	6.61±0.21 ^b	76.0±3.8 ^b
%30 Kabak tozu	130.26±1.01 ^c	6.60±0.18 ^b	60.0±4.7 ^a
%45 Kabak tozu	167.16±2.60 ^d	6.02±0.17 ^a	59.0±4.1 ^a

*: Aynı harfle işaretli olan ortalamalar istatistiki açıdan farksızdır (p≥0.05)

Renk Analizi

Renk, bir gıdanın tüketici açısından beğenilebilirliğini etkileyen önemli özelliklerden biridir. Standart, %15,

%30 ve %45 oranlarında kabak tozu ilave edilen keklerde kabukta ve iç bölgede yapılan renk analizi değerleri belirlenmiş ve sonuçlar Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Kek örneklerinde renk değerleri

	Renk ölçülen bölge	L*	a*	b*
%0 (Standart kek)	Kabuk	43.42±1.06 ^a	15.63±0.17 ^a	26.23±0.88 ^a
%15	Kabuk	39.80±0.78 ^a	16.27±0.43 ^a	25.39±0.79 ^a
%30	Kabuk	49.73±5.87 ^b	16.10±0.91 ^a	38.94±1.15 ^b
%45	Kabuk	54.07±2.53 ^b	14.74±1.70 ^a	38.44±1.26 ^b
%0 (Standart kek)	İç	80.77±1.09 ^d	2.88±0.02 ^a	18.36±0.77 ^a
%15	İç	71.02±2.53 ^c	-0.27±0.33 ^b	25.90±0.73 ^b
%30	İç	65.53±1.49 ^b	1.36±0.51 ^c	28.77±0.82 ^c
%45	İç	61.45±1.60 ^a	2.77±0.57 ^d	31.46±0.68 ^d

*: Aynı harfle işaretli olan ortalamalar istatistiki açıdan farksızdır (p≥0.05)

Lu ve ark. [15] tarafından yeşil çay tozu ile elde edilmiş kek üretimi hakkında yapılan çalışma sonucunda benzer L* 42.98-49.02, daha düşük a* 5.60-11.68 ve b* 14.60-17.62 değerleri elde edilmiştir. Gomez ve ark. [16] kek ile yaptıkları çalışma sonucunda daha yüksek L* 49.16-48.67, benzer a* 14.25-15.00 ve daha düşük b* 18.23-19.29 değerleri elde edilmiştir. Keke ilave edilen kabak tozu oranı arttıkça kabukta ölçülen L* değerlerinde azalma yani daha koyu bir ürün elde edilmiştir ve b* değerinde ise önemli bir artış gözlenmiştir (p<0.05). Bunun aksine a* değerlerinde ise önemli bir değişiklik gözlenmemiştir (p≥0.05). Pongjanta ve ark. [17] yaptıkları çalışmada kabak tozu ilavesinin fırıncılık ürünleri üzerine etkisini incelemişler ve sonuçta renk üzerine elde ettikleri sonuçlarda L* değerinde azalma a* ve b* değerlerinde artış gözlemlemişlerdir. Elde edilen renk değerleri yorumlandığında kabak tozu oranı artması kekin parlaklığını azaltmış, kırmızılığını ve sarılığını arttırmıştır (Şekil 1 ve 2). Keke katılan kabak tozu oranının artması kekin daha kırmızımsı ve daha

sarımsı renge sahip olmasına neden olmuştur ve bu durumun sebebi ise kabak tozunun renginin koyu sarı renkte olmasından kaynaklanmaktadır. Kabak tozu ilavesi arttıkça kekin daha koyu bir hal almasının sebebi ise pişirme sırasında şekerin karamelizasyonundan kaynaklandığı ayrıca aminoasitler ve şekerler arasında meydana gelen Maillard reaksiyonlarından kaynaklandığı düşünülmektedir [16, 18, 19]. Bunun yanı sıra kekin buğday unu yerine başka bir un ile yapılması kekin bu unun tipi ve rengini almasını sağlamaktadır [20]. Bu çalışmada kabak tozu renginin de elde edilen keklerde etkin olması beklenen bir durum olmaktadır. Bir gıdanın rengi tüketici tarafından tüketilmesi için önemli bir parametredir. Kekte renk oluşumu pişirme işleminin tamamlanmasıyla ortaya çıkmaktadır. Genel olarak ürünün rengini hamurun pH'sı, su içeriği, indirgen şeker ve aminoasit miktarı gibi fizikokimyasal özellikleri ve pişirme süresi, pişirme yöntemi, fırın özellikleri, pişirme sıcaklığı, bağıl nem gibi işlem koşulları da etkilemektedir.



Şekil 1. Kabak tozu ilaveli keklerin kabuk görüntüsü (A: %0 kabak tozu, B: %15 kabak tozu, C: %30 kabak tozu, D: %45 kabak tozu)



Şekil 2. Kabak tozu ilaveli keklerin iç kesit görüntüsü (A: %0 kabak tozu, B: %15 kabak tozu, C: %30 kabak tozu, D: %45 kabak tozu)

Tekstür

Kabak tozu kullanılarak elde edilen keklerde yapılan tekstür çalışmalarında elde edilen sonuçlar Tablo 4'te verilmiştir. Bu değerlerde ilave edilen kabak tozu oranına göre keke uygulanan kuvvet değerlerinin önemli bir değişim gösterdiği saptanamamıştır ($p \geq 0.05$). Kabak tozu ilavesinde en yüksek kuvvet değeri standart kekta elde edilmiştir. Bunun yanı sıra %45 kabak tozu ilave edilerek yapılan keklerde ise en düşük kuvvet değeri kaydedilmiştir. Lee ve ark. [21] yaptıkları çalışmada kabak tozu ilavesinin eriştelere sertliklerini azalttığını vurgulamışlardır ve bu çalışmadaki kek sonuçlarına paralellik göstermektedir. Yapılan diğer çalışmalarda Chueamchaitrakun ve ark. [20] pirinç unu ile elde ettikleri kek 0.69-1.82 N sertlik değeri görülürken, Paraskevopoulou ve ark. [22] yaptıkları çalışmada yumurta sarısı konsantresi ile zenginleştirilmiş kekta 2.8-7.8 N, Kim ve ark. [20] pandispanya keki üzerine yaptıkları çalışmada 4.63-6.41 N, Lu ve ark. [15] ise yeşil çay tozu ile zenginleştirilmiş kekta 1.73-3.27 N, De La Hera ve ark. [23] mercimek unu ile elde ettikleri kek 2.38-8.27 N ve sertlik değerleri elde etmişlerdir. Bu çalışmada literatürde yapılan çalışmalardan pirinç unu ilaveli ve yeşil çay tozu ilaveli keklerle yakın özellikler elde edilmiştir. Farklı kombinasyonlarda kabak tozu ilavesi ile elde edilen keklerdeki sonuçlar değerlendirildiğinde sertlik değerlerinde yaklaşık %47'lik bir azalma olduğu gözlemlenmiştir. Keklerde ölçülen bir

diğer tekstür parametresi olan yapışkanlık değeri bir malzemeyi kendine yapıştırabilme özelliğini ve gıda yapısının iç direncini gösteren bir özelliktir [15, 23]. Gomez ve ark. [18] nohut unu ile zenginleştirilmiş keklerde 0.47 – 0.76 g \times s, Kim ve ark. [20] lif açısından zenginleştirilmiş kekta 0.61-0.69 g \times s, ve Chuang ve ark. [25] pirinç unu kullanarak elde ettikleri kekta 0.83–1.11 g \times s yapışkanlık değerleri elde edilmiştir. [22]'de nohut unu ile zenginleştirilmiş kek 0.35 – 0.65 g \times s yapışkanlık değerleri elde etmişlerdir. Sonuçlar incelendiğinde (Tablo 4) yapışkanlık değeri %30 kabak tozu oranına kadar düşme göstermiş, %45 kabak tozu ilavesinde ise bir miktar artış gözlemlenmiştir. Kabak tozu ilavesinin yapışkanlık üzerinde önemli bir etkisinin olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Esneklik terimi ise ürüne bir kuvvet uygulandıktan sonra eski haline geri dönebilme yeteneğidir [25]. Farklı oranlarda ilave edilen kabak tozu ile yapılan keklerdeki esneklik değerleri Tablo 4'de verilmiştir. Kekle ilgili yapılan çalışmalarda pirinç unu ile zenginleştirilmiş keklerde 1.26–1.98 [25], mercimek unu ile zenginleştirilmiş kekta 0.66-0.91 [27] ve Al-Muhtaseb ve ark. [28] maderia keki üzerine yaptıkları çalışmada 0.71–0.91 arası sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada kabak tozu ilavesi arttıkça esneklik değerlerinde bir düşüş söz konusu olmuştur. Sadece %40 kabak tozu ilavesi istatistiksel açıdan fark yaratmıştır ($p < 0.05$). Bunun sebebinin kabak tozunun viskoziteyi arttırmış ve pişirme işlemi sonrasında keke sert bir yapı kazandırmış olduğu düşünülmektedir.

Tablo 4. Kabak tozu ilaveli keklerde yapı (tekstür) özellikleri

	Kuvvet (g)	Sertlik (g)	Yapışkanlık (g \times s)	Esneklik	Bağlılık	Sakızimsılık	Çiğnenebilirlik	Elastikiyet
% 0	1792 \pm 35 ^a	1865 \pm 54 ^a	0.53 \pm 0.12 ^b	0.97 \pm 0.21 ^a	0.86 \pm 0.18 ^a	1609 \pm 32 ^d	1.554 \pm 0.07 ^d	0.43 \pm 0.09 ^a
%15	1195 \pm 31 ^a	1295 \pm 48 ^a	-0.03 \pm 0.00 ^a	0.89 \pm 0.18 ^a	0.73 \pm 0.24 ^a	940 \pm 31 ^c	0.841 \pm 0.05 ^c	0.35 \pm 0.08 ^a
%30	1127 \pm 28 ^a	1262 \pm 60 ^a	-1.08 \pm 0.18 ^c	0.81 \pm 0.22 ^a	0.61 \pm 0.14 ^a	768 \pm 24 ^b	0.625 \pm 0.05 ^b	0.26 \pm 0.08 ^a
%45	912 \pm 34 ^a	999 \pm 45 ^a	-0.02 \pm 0.00 ^a	0.74 \pm 0.20 ^b	0.66 \pm 0.13 ^a	654 \pm 21 ^a	0.486 \pm 0.04 ^a	0.28 \pm 0.07 ^a

*: Aynı harfle işaretli olan ortalamalar istatistiksel açıdan farksızdır ($p \geq 0.05$)

Çiğnenebilirlik katı gıdaların tüketimini kolaylaştırmak için gıdalara uygulanan kuvveti göstermektedir [28]. Bu çalışmada kabak tozu ilavesi arttıkça çiğnenebilirlik değerinde azalma kaydedilmiştir ve buda elde edilen ürünün daha zor çiğnendiği anlamına gelmektedir. Benzer sonuçlar, pirinç unu içeren kekta 1.40–2.68 [24] ve margarin ve ekstra saf zeytinyağı kullanarak elde ettikleri kekta 1.10–1.60 [23], pirinç unu ile zenginleştirilmiş kekta 0.52–4.92 [29], kek üzerine yapılan çeşitli çalışmalarda 2.95–4.34 [16], ve nohut unu ile zenginleştirilmiş kekta 1.96–4.73 [18] değerlerini elde edilmiştir. Kabak tozu ilavesinin kekin çiğnenebilirlik değerleri üzerine etkisinin istatistiksel açıdan önemli olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). Kabak tozu kullanılarak

elde edilen keklerde yapılan tekstür çalışmalarında keklerle uygulanan kuvvet değerleri Tablo 4'te verilmiştir. Bu değerlerde ilave edilen kabak tozu oranına göre keke uygulanan kuvvet değerlerinin değişim gösterip değerlerin azaldığı tespit edilse de bu sonuçlar istatistiksel açıdan önemli olmadığı kaydedilmiştir ($p \geq 0.05$). Bu değerler ışığında kabak tozunun keke yumuşaklık kazandırdığı ve elastikiyet özelliğini arttırdığı belirlenmiştir. Guadarrama-Lezama ve ark. [30] yaptığı çalışmada kek formülasyonuna farklı oranlarda ilave edilen mısır nişastası ilavesi ile kekta sertlik değeri 4893 g'dan 3402 g'a azaldığı görülmüştür. Bunun nedeni olarak mısır nişastasının yapısının buğday ununda bulunan proteinlerden farklı olduğu ileri

sürülebilmektedir. Jeddou ve ark. [31] yaptığı çalışmada patates kabuğu ilavesinin kek hamuru üzerindeki etkisi incelendiğinde hamurun elastikiyet değerini azalttığı görülmüştür. Kabak tozu ilavesinin de kek yapısı üzerinde elastikiyeti azalttığı gözlenmiştir ancak istatistiksel açıdan önemli bir değişim olduğu ifade edilememektedir ($p \geq 0.05$).

Duyusal Analiz

Farklı oranlarda kabak tozu ilavesi ile üretilen keklere ait duyusal analiz sonuçları Tablo 5'te verilmiştir. Genel olarak bir değerlendirilme yapılırsa panelistlerin belirlenen kriterlerine göre değerlendirdiklerinde en beğenilen kekin 8.01 genel kriter puan ortalamasıyla %30 kabak tozu ilaveli kek belirlenmiştir. İkinci olarak ise 7.30 genel puan ortalamasıyla %15 kabak tozu ilaveli kek olduğu belirlenmiştir. 6.64 genel puan ortalamasıyla en beğenilen üçüncü kek ise standart (%0 kabak tozu ilaveli) kek olduğu sonucuna varılmıştır. En beğenilmeyen kekin ise genel kek kriterleri

değerlendirilme sonuçları ortalamasına göre 6.04 genel puan ortalaması ile %45 kabak tozu ilaveli kek olduğu belirlenmiştir.

SONUÇ

Bu çalışmada Nevşehir bölgesinden temin edilen ve atık olarak görülen kabaklar kullanılmış ve bu kabaklardan toz elde edilmiştir. Hammadde özelliklerini incelemek amacıyla kabak tozunda hammadde analizleri (lif, yağ, nem, protein miktarı ve su aktivitesi) yapılmıştır. Kabak tozunun kek formülasyonunda kullanımını incelemek için kek hamuruna farklı oranlarda kabak tozu ilavesi yapılmıştır. Yapılan hammadde analizlerinde yağ, kül, protein, lif ve nem değerlerinin literatüre göre yüksek çıktığı görülmüştür. Keklere farklı oranlarda yer değiştirme metoduna göre ilave edilen kabak tozunun kekin fiziksel özelliklerine etkisi incelenmiş ve ilave edilen kabak tozu oranı arttıkça kek viskozitesinde bir artış olduğu belirlenmiştir.

Tablo 5. Farklı oranlarda kabak tozu kullanımının keklerin duyusal özellikleri üzerine etkileri

Duyusal Özellik	Kabak Tozu Oranları (%) [*]				Ortalama
	0	15	30	45	
Kabuk Rengi	8.10±1.02 ^a	7.10±0.98 ^a	8.60±0.65 ^b	7.20±0.95 ^a	7.75±0.90
İç Renk	6.30±0.91 ^a	8.00±0.95 ^b	8.00±0.58 ^b	6.30±0.84 ^a	7.15±0.82
Gözenek Homojenliği ve Büyüklüğü	7.90±1.01 ^b	8.00±0.86 ^b	8.50±0.86 ^b	6.00±0.81 ^a	7.60±0.88
Koku	7.70±0.95 ^b	7.50±0.87 ^b	7.90±0.74 ^b	5.90±0.94 ^a	7.25±0.87
Tat	7.00±0.91 ^a	7.80±0.65 ^b	8.40±0.68 ^b	5.80±0.82 ^a	7.25±0.76
Yumuşaklık	6.20±0.86 ^a	7.70±0.47 ^b	8.50±0.69 ^b	6.00±0.73 ^a	7.10±0.68
Ağızdaki Dağılım	5.30±0.84 ^a	7.10±0.84 ^b	8.20±0.51 ^b	6.00±0.75 ^a	6.65±0.73
Ağızda Islaklık Hissi	5.80±0.91 ^{a,b}	6.50±0.67 ^{a,b}	7.50±0.67 ^b	5.40±0.65 ^a	6.30±0.72
Ağızda Yağlılık Hissi	5.50±0.94 ^a	6.00±0.76 ^a	6.50±0.57 ^a	5.80±0.69 ^a	5.95±0.74
Ortalama	6.64±0.92	7.30±0.78	8.01±0.66	6.04±0.80	

*: Aynı harfe sahip olan değerler istatistiksel açıdan farklıdır ($p \geq 0.05$)

Ancak kabak tozu ilavesi arttıkça kekin pH değerinde bir azalış olduğu görülmüştür. Renk özellikleri incelendiğinde ise standart kek formülüne göre yapılan keklerle kıyaslandığında, keklere katılan kabak tozu oranı artırıldığında L* değerlerinde azalma yani daha koyu bir ürün elde edildiği belirlenmiştir. Fakat a* ve b* değerlerinde artma olduğu gözlenmiştir. Kabak tozu oranının artırılması kekin parlaklığında azalmaya neden olurken kırmızılığının ve sarılığının artmasını sağladığı belirlenmiştir. Aynı şekilde kabak tozu oranı artırılarak yapılan keklerin hacimlerinde bir artış olduğu gözlenmiştir. Kek örneklerinin farklı oranlarda kabak tozu ilavesi ile zenginleştirilmesinin sonuçları standart kekle kıyaslandığında sertlik değerlerinde standart keke göre bir azalma, yapışkanlık değerleri incelendiğinde ise bu değerlerin %30 kabak tozu oranına kadar düşme göstermiştir. Esneklik değerleri incelendiğinde ise kabak tozu oranı arttıkça esneklik değerlerinde düşme kaydedilmiş ve çiğnenebilirlik değerlerinde ise azalma olduğu gözlenmiştir. Kuvvet ve elastikiyet değerleri incelendiğinde ise kabak tozu ilavesinin artırılmasıyla kuvvet ve elastikiyet değerlerinin düştüğü belirlenmiştir. Bütün bu bilgiler ışığında kabak tozunun sağlık açısından olumlu etkileri de göz önüne alındığında kabak tozu ilaveli keklerin insanlar tarafından beğenilerek tüketileceği düşünülmektedir. Duyusal analiz sonuçlarına göre ise en beğenilen kekin %30

kabak tozu ilaveli kek olduğu belirlenmiştir. Bütün bu bilgiler sonucunda kabak tozu ilavesinin kek endüstrisi için önem arz ettiği düşünülmektedir ve bundan sonra yapılacak çalışmalara ışık tutması beklenmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK 2209/B-Sanayi Odaklı Lisans Bitirme Tezi Destekleme Programı kapsamında gerçekleştirilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Mercan, N., Boyacıoğlu, M.H., Boyacıoğlu, D., 2000. Kek kalitesi üzerine bazı emülgatörlerin etkilerinin araştırılması. *Dünya Gıda Dergisi* 57: 75-81.
- [2] Anonymous. 2002. Standard Methods of International Association for Cereal Science and Technology (ICC). Vienna, Austria.
- [3] Anonymous. 2000. Approved Methods of American Association of Cereal Chemists (AACC). The Association: St. Paul, MN.
- [4] AACC. 2000. Approved methods of the American Association of Cereal Chemists. (10th ed.) Methods 44-15A, 02-52, 76-21, 10-90, 10-91, 10-05 St. Paul, MN.

- [5] Demirkesen, I., Mert, B., Sumnu, G., Sahin, S., 2010. 'Rheological properties of gluten free bread formulations. *Journal of Food Quality* 96(2): 295-303.
- [6] Cemeröğlu, B.S., 2013. Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi Cilt1. Nobel Akademi. 728p.
- [7] Ponka, R., Bouba, A.A., Fokou, E., Tambe, S.T., Beaucher, E., Piot, M., Leonil, J., Gaucheron, F., 2015. Protein, mineral and amino acid content of some Cameroonian traditional dishes prepared from pumpkin (*Cucurbita maxima* Duch.) *Journal of Food Composition and Analysis* 43: 169-174.
- [8] Fennema, O., Hui, J., Karel, M., 2004. Handbook of Vegetable Preservation and Processing. Marcel Dekker, New York.
- [9] Ekinci, S., 1972. Özel Sebzeçilik. Ahmet Sait Matbaası. İstanbul.
- [10] Pratt, S.G., Matthews, K., 2003. Superfoods. RX: Fourteen Foods that will Change your Life. Harper Collins, New York. 352 p.
- [11] Ertaş, N., Çoklar, H., 2008. Farklı pekmez çeşitlerinin doğal şeker kaynağı olarak kek hamuru ve kek özelliklerine etkisi. *Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 22(46): 51-54.
- [12] Baik, O.D., Marcotte, M., Castaigne, F., 2000. Cake baking in tunnel type multi-zone industrial ovens part II evaluation of quality parameters. *Food Research International* 33: 599-607
- [13] Masoodi, F.A., Sharma, B. and Chauhan, G.S., 2002. Use of apple pomace as a source of diet dry fiber in cakes. *Plant Foods for Human Nutrition* 57: 121-128.
- [14] Doğan, İ.S., Akbaş, Ö., Tunçtürk, Y., 2012. Yağı azaltılmış kek üretiminde ekzopolisakkarit kullanımı. *Gıda Dergisi* 37(3): 141-148.
- [15] Lu, T.M., Lee, C.C., Maud, J.L., Lin, S.D., 2010. Quality and antioxidant property of green tea sponge cake. *Food Chemistry* 119: 1090-1095.
- [16] Gomez, M., Ruiz, E., Oliete, B., 2011. Effect of batter freezing conditions and resting time on cake quality. *LWT - Food Science and Technology* 44: 911-916.
- [17] Pongjanta, J., Naulbunrang, A., Kawngdang, S., Manon, T., Thepjaikat, T. 2006. Utilization of pumpkin powder in bakery products. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 28: 71-79.
- [18] Gomez, M., Oliete, B., Rosell, C. M., Pando, V., Fernandez, E., 2008. Studies on cake quality made of wheat-chickpea flour blends. *LWT - Food Science and Technology* 41: 1701-1709.
- [19] See, E.F., Wan Nadiyah, W.A., Noor Aziah, A.A., 2007. Physico-chemical and sensory evaluation of breads supplemented with pumpkin flour. *Asian Food Journal* 14(2): 123-130.
- [20] Kim, J.H., Lee, H.J., Lee, H.S., Lim, E.J., Imm, J.Y., Suh, H.J., 2012. Physical and sensory characteristics of fibre-enriched sponge cakes made with *Opuntia humifusa*. *LWT-Food Science and Technology* 47: 478-484.
- [21] Lee, C.H., Cho, J.K., Ju, S., Wonbang, K. 2002. Enhancing (Beta) carotene content in Asian noodles by adding pumpkin powder. *Cereal Chemistry* 79(2): 593-595
- [22] Paraskevopoulou, A., Kiosseoglou, V., 1997. Texture profile analysis of heat formed gels and cakes prepared with low cholesterol egg yolk concentrates. *Journal of Food Science* 62(1): 208-211.
- [23] De la Hera, E., Ruiz Paris, E., Oliete, B., Gomez, M., 2012. Studies of the quality of cakes made with wheat-lentil composite flours. *LWT - Food Science and Technology* 49: 48-54.
- [24] Matsakidou, A., Blekas, G., Paraskevopoulou, A., 2010. Aroma and physical characteristics of cakes prepared by replacing margarine with extra virgin olive oil. *LWT-Food Science and Technology* 43: 949-957.
- [25] Chuang, G.C.C., Yeh, A., 2006. Rheological characteristics and texture attributes of glutinous rice cakes (mochi). *Journal of Food Engineering* 74: 314-323.
- [26] Ming Lu, T., Lee, C.C., Mau, J.L., Lin, S.D., 2010. Quality and antioxidant property of green tea sponge cake. *Food Chemistry* 119: 1090-1095.
- [27] Wilderjans, E., Luyts, A., Goesaert, H., Brijs, K., Delcour, J.A., 2010. A model approach to starch and protein functionality in a pound cake system. *Food Chemistry* 120: 44-51.
- [28] Al-Muhtaseb, H., McMinn, W.A.M., Megahey, E., Neill, G., Ronnie, M., Rashid, U., 2013. Textural characteristics of microwave-baked and convective-baked Madeira cake. *Journal of Food Processing Technology* 4(2): 1-8.
- [29] Chueamchaitrakun, P., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V., Suwonsichon, T., Kasemsamran, S., Prinyawiwatkul, W., 2011. Sensory descriptive and texture profile analyses of butter cakes made from composite rice flours. *International Journal of Food Science and Technology* 46: 2358-2365.
- [30] Guadarrama-Lezema A.Y., 2016., Thermal and rheological properties of sponge cake batters and texture and microstructural characteristics of sponge cake made with native corn starch in partial or total replacement of wheat flour. *LWT - Food Science and Technology* 70: 46-54.
- [31] Jeddou, B.K., Bouaziz, F., Zouari-Ellouzi, S., Chaari, F., Ellouz-Chaabouni, S., Ellouz-Ghorbel, R., Ellouz-Nouri, O., 2017. Improvement of texture and sensory properties of cakes by addition of potato peel powder with high level of dietary fiber and protein. *Food Chemistry* 217: 668-677.

Elektropüskürtme Yönteminin Probiyotik Mikroorganizmaların Mikrokapsülasyonunda Kullanımı

Firuze Ergin¹ , Ahmet Küçükçetin¹ , Ayhan Oral² , Oğuz Gürsoy³ 

¹Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya

²Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Çanakkale

³Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Burdur

Geliş Tarihi (Received): 28.06.2017, Kabul Tarihi (Accepted): 22.08.2017

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): kucukcetin@akdeniz.edu.tr (A. Küçükçetin)

☎ 0 242 310 65 69 📠 0 242 310 63 06

ÖZ

Probiyotik bir üründen beklenen faydaların sağlanabilmesi için ürünün raf ömrü sonuna kadar en az 10^8 - 10^9 kob/g düzeyinde canlı probiyotik mikroorganizma bulundurması gerekmektedir. Probiyotik mikroorganizmaları olumsuz koşullara karşı korumak amacıyla çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Konu ile ilgili yapılan çalışmalar, probiyotik mikroorganizmaların canlılığını korumada en etkili yöntemlerden birinin mikrokapsülasyon olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, mikrokapsülasyon işlemi sırasında probiyotik mikroorganizmalar yüksek sıcaklık, dehidrasyon, yüksek osmolarite gibi olumsuz koşullara maruz kalabilmektedir. Elektrohüdrodinamik atomizasyon yani elektroğirme ve elektropüskürtme yöntemleri kullanılarak söz konusu olumsuz koşulların üstesinden gelinebilmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda; yüksek voltaj altında kapsüller (elektropüskürtme) veya lifler (elektroğirme) üretilmesini sağlayan elektrohüdrodinamik atomizasyon tekniğinin, probiyotik mikroorganizmaların canlılıklarının korunması açısından diğer mikrokapsülasyon yöntemlerine alternatif olabileceği belirtilmiştir. Bu derlemede, elektrohüdrodinamik atomizasyon tekniğinin temelleri ve elektropüskürtme yönteminin probiyotik mikroorganizmaların mikrokapsülasyonunda kullanım olanakları ile ilgili bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Probiyotik, Mikrokapsülasyon, Elektropüskürtme

Use of Electrospray Technique in Microencapsulation of Probiotic Microorganisms

ABSTRACT

To provide the expected benefits of probiotic products, a product must contain 10^8 - 10^9 cfu/g of viable probiotic microorganism until end of the shelf life. Numerous methods have been developed to protect probiotic microorganisms against adverse conditions. Studies on the issue show that microencapsulation is one of the most efficient methods for protecting the viability of probiotic microorganisms. However, probiotic microorganisms are exposed adverse conditions such as high temperature, dehydration, high osmolarity etc. during the microencapsulation process. These adverse conditions can be overcome in many cases by using electrohydrodynamic atomization (EHDA), either electrospinning or electrospraying. Recent studies have reported that the electrohydrodynamic atomization technique, which generates the production of capsules (electrospray) or fibers (electrospinning) under high voltage, can be an alternative to other microencapsulation methods in terms of protecting the viability of probiotic microorganisms. In this review, it is aimed to give information about the basics of electrohydrodynamic atomization technique and the possibilities of using electrospray method in microencapsulation of probiotic microorganisms.

Keywords: Probiotic, Microencapsulation, Electrospray

GİRİŞ

Günümüzde tüketicilerin dengeli ve sağlıklı bir diyetle beslenebilmek amacıyla güvenilir ve dengeli beslenme kavramına uygun gıdaları tercih etmesi, probiyotikleri içeren fonksiyonel gıda ürünlerinin geliştirilmesine yönelik ilgiyi arttırmaktadır [1]. Probiyotikler, vücuda yeterli miktarda alındığı zaman konakçıda bağışıklık sistemini düzenleme, bağırsak hastalıklarını engelleme, hipertansiyonu düşürme, kanda kolesterol seviyesini azaltma ve ishali önleme gibi sağlığa yararlı etkiler sağlayan canlı mikroorganizmalardır [2, 3]. Probiyotiklerin sağlığa faydalı etkilerini gösterebilmeleri için ürünlerde en az 10^8 - 10^9 kob/g düzeyinde bulunması gerektiği belirtilmektedir [4, 5]. Fonksiyonel ürünlerin üretimleri ile depolanmaları süresince ve tüketimleri sırasında probiyotik mikroorganizmalar; yüksek sıcaklık, kurutma, dondurma, yüksek basınç, zengin besin maddeleri gereksinimi, rekabetçi mikroorganizmalar, sindirim sistemi enzimleri, yüksek asidik ortam, safra tuzları gibi canlılıklarını olumsuz etkileyen engellerle karşılaşabilmektedir [6, 7]. Probiyotik mikroorganizmaların olumsuz koşullara karşı korunabilmesi için ürünlerde kullanılmak üzere yüksek aside ve safra tuzlarına karşı dirençli suşların seçilmesi, oksijen geçirgenliği olmayan ambalajların kullanımı, iki aşamalı fermentasyon uygulaması, gelişim ortamına peptit ve aminoasit gibi besin maddeleri ile probiyotiklerin dahil edilmesi, stres koşullarına karşı adaptasyon sağlanması ve mikrokapsülasyon işleminin uygulanması gibi farklı yaklaşımlar önerilmektedir [8].

Mikrokapsülasyon, ince film tabakaları veya polimer kapsüller yardımı ile küçük katı partiküllerin sıvı ya da gaz damlacıklarının tutuklanmasına dayanan ve kapsüllenen materyali olumsuz koşullardan koruyan fiziksel bir mikropaketleme tekniği olarak tanımlanmaktadır [9]. Bu tekniğin temel prensibi, probiyotik mikroorganizmaların bir jel içerisinde hapsedilmesi ve bu jel yapısının hedef bölge olan ince bağırsağa ulaşıncaya kadar bütünlüğünü koruyarak, probiyotik mikroorganizmaların zarar görmeden bağırsakta salınımının sağlanması esasına dayanmaktadır [10]. Probiyotik mikroorganizmaların mikrokapsülasyonu için kullanılan en yaygın teknikler ekstrüzyon, emülsiyon, püskürterek kurutma ve dondurarak kurutma olarak sayılabilmektedir. İlk iki teknik genellikle polimer çapraz bağlarla mikroorganizmaları kapsül içinde tutmakta ve kullanılan polimer çözeltileri gıdalarda kalıntı bırakabilmektedir. Püskürterek kurutma tekniğinde ise uygulama sırasında çıkılan yüksek sıcaklık, dehidrasyon ve oksidatif stres, mikroorganizmaların canlılığını olumsuz etkileyebilmektedir. Dondurarak kurutma ise mikroorganizma canlılığı açısından uygun bir yöntem olsa da, uygulamanın kesikli ve diğer yöntemlere göre pahalı olması yaygın kullanımını engellemektedir [11].

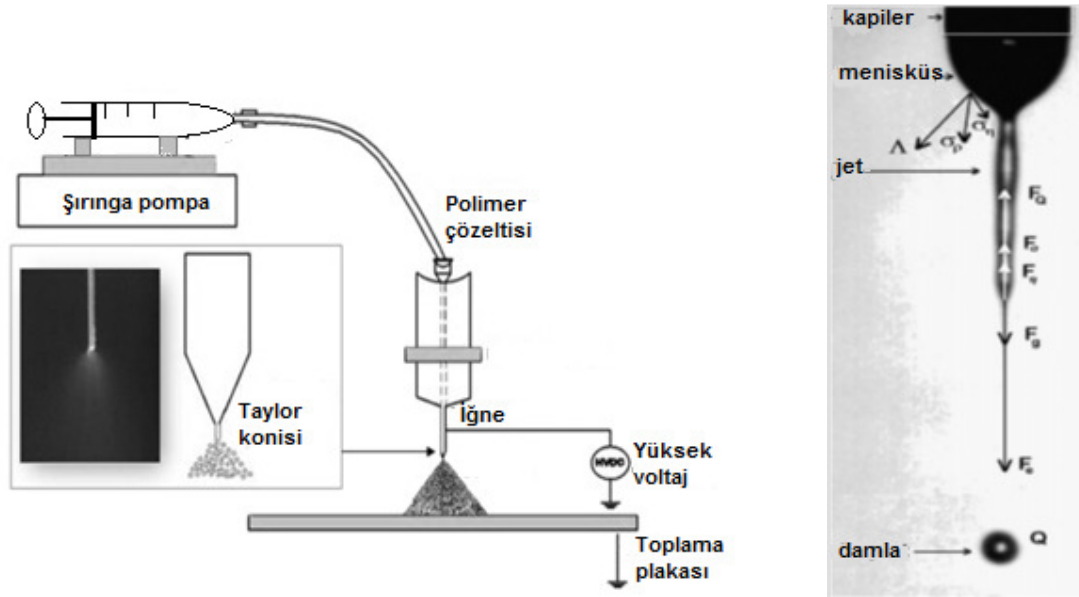
Son yıllarda probiyotik mikroorganizmaların ve biyoaktif gıda bileşenlerinin mikrokapsülasyonunda kullanılmaya başlayan elektropüskürtme yöntemi diğer yöntemlere göre birçok avantaja sahiptir. Elektropüskürtme yöntemiyle mikrokapsülasyon işlemi oda sıcaklığında gerçekleştirilebilmekte, uygulama sırasında suda

çözünebilen biyopolimerlerden yararlanılarak organik çözeltilerin kullanımından kaçınılmakta, işlem değişkenleri ve çözelti özellikleri değiştirilerek yüksek yükleme verimliliğinde mikro-nanokapsüller elde edilebilmektedir [12]. Bu derlemede, elektrohüdrodinamik atomizasyon tekniği ve elektropüskürtme yönteminin probiyotik mikroorganizmaların mikrokapsülasyonunda kullanım olanakları ile ilgili bilgi verilmeye çalışılmıştır.

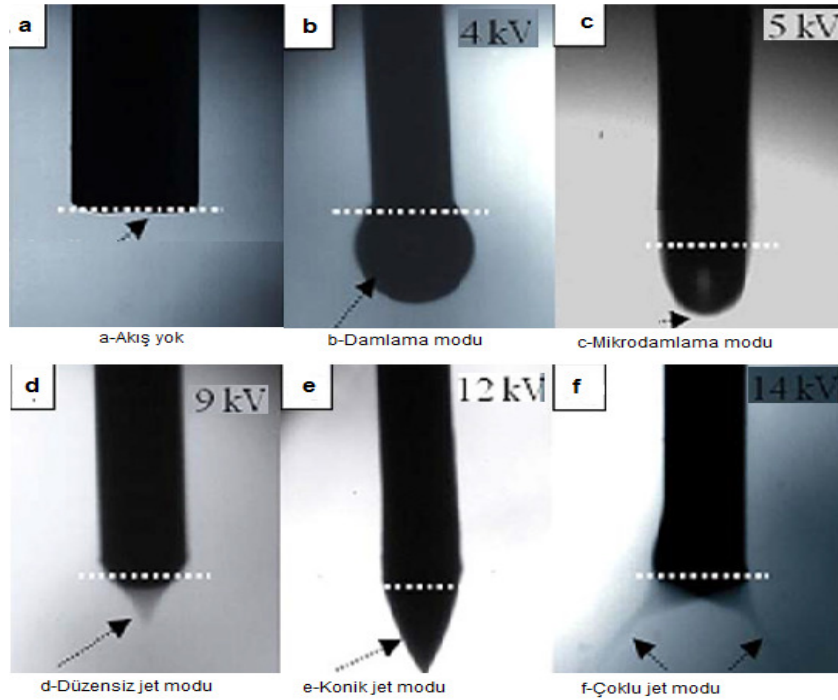
ELEKTROHÜDRODİNAMİK ATOMİZASYON TEKNİĞİNİN ÇALIŞMA PRENSİBİ

İlk olarak Zeleny'nin 1914 yılında farklı sıvıların bulunduğu kapiler boru ile plaka arasındaki elektriksel potansiyel farkı değiştiği zaman sıvıların akış şeklinin değiştiğini gözlemlemesi ile temelleri atılan elektrohüdrodinamik atomizasyon tekniğiyle elektriksel kuvvetler kullanılarak sıvıların atomizasyonu sağlanmaktadır [13]. Elektrohüdrodinamik atomizasyon sistemi, genel olarak kapiler bir püskürtücü iğne, yüksek voltaj güç kaynağı ve halka şeklinde elektrottan meydana gelmektedir (Şekil 1 (a)) [14].

Kapiler püskürtücüye yüksek voltaj uygulandığında iğne ucundaki polimer çözelti damlası elektrostatik kuvvet ile yüklenmektedir. Çözelti sıvısının deforme olup damlamasına, jet üzerindeki yığın kuvvetleri ile sıvı yüzeyindeki normal ve teğetsel gerilmeler (F_0) neden olmaktadır. Jet üzerindeki yığın kuvvetler; elektrik alanının neden olduğu ve elektrik alan ile orantılı olan elektrodinamik kuvvet (F_e), yer çekimi kuvveti (F_g), eylemsizlik (atalet) kuvveti (F_p) ve hareket eden damlacıklar için Stokes kuvveti olarak bilinen sürüklenme kuvveti (F_μ) olarak sayılabilmektedir. Jet yüzeyindeki normal ve teğetsel kuvvetler ise, sıvının yüzey yük yoğunluğundan ve lokal elektrik alandan kaynaklanan elektrodinamik gerilme tensörü, sıvı fazları arasındaki yüzeylerin her iki tarafındaki basınç farkından oluşan gerilme tensörü, sıvının dinamik viskozitesi ve sıvının eylemsizliği nedeniyle oluşan gerilme tensörleridir (Şekil 1 (b)) [17]. Elektrodinamik kuvvet, söz konusu diğer kuvvetleri yendiğinde damlacıklar koniden kopmaya başlayarak bir jet oluşturmaktadır. Bu fenomen ilk defa 1964 yılında Sir Ingram Taylor tarafından açıklandığı için bu jet konisine "Taylor konisi" adı verilmiştir [18]. Yüklü olan damlacıklar, karşı tarafta bulunan elektroda doğru elektriksel alan boyunca hareket etmekte ve polimer çözücünün buharlaşması nedeniyle küçülerek nano ve mikro boyutlarda parçalanmaktadır. Oluşan partiküllerin boyutu ve yapısı, polimer çözeltilerinin elektriksel iletkenliği, yüzey gerilimi, reolojik ve dielektrik özellikleriyle birlikte, üretim aşamasında uygulanan yüksek voltajdan, plaka mesafesinden, polimer çözeltilerinin akış hızından, ortamın sıcaklığı ve nemi gibi birçok faktörden etkilenmektedir [19]. Elektrohüdrodinamik atomizasyon işleminde uygulanan voltaja ve kullanılan sıvının özelliklerine bağlı olarak oluşan partiküllerin yapısı değişmektedir [20]. Elektrohüdrodinamik atomizasyon modları sıvının akış geometrisine bağlı olarak damlatma ve jet olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Damlatma şekilleri, damlama, mikrodamlama, çubuk damlama, çoklu çubuk damlama ve düzensiz damlama olarak; jet modu ise konik jet (Taylor konisi), titrete jet, çoklu jet ve dallanmış jet olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 2) [21].



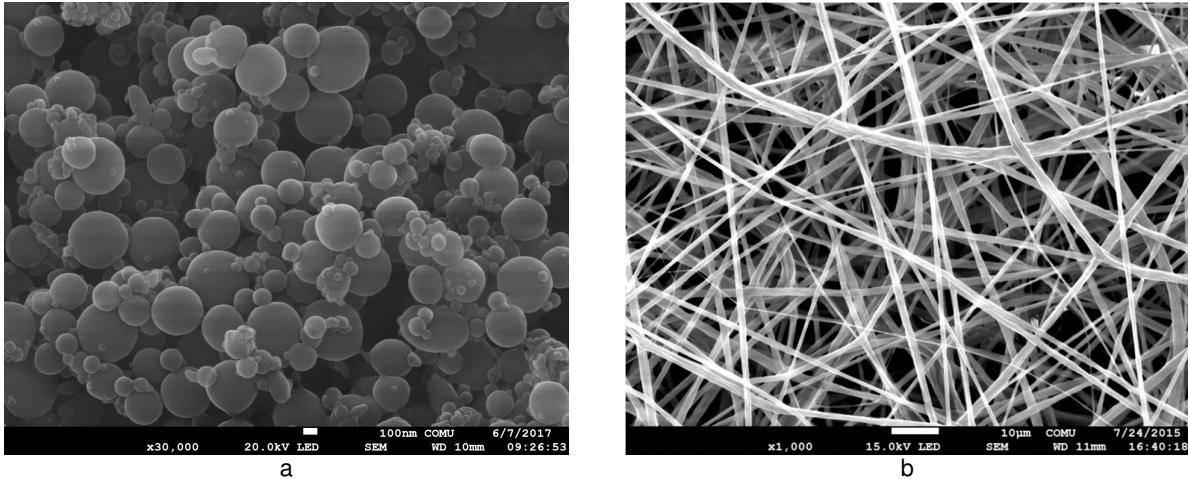
Şekil 1. (a) Elektropüskürtme uygulaması (Anu Bhushani ve Anandharamakrishnan [15]'den uyarlanmıştır), (b) Elektropüskürtme yönteminde polimer jeti oluşumu (Jaworek ve Krupa [16]'den uyarlanmıştır)



Şekil 2. Farklı voltaj değerlerinde elektrohidrodinamik atomizasyon modları; a-akış yok, b-damlama modu, c-mikrodamlama modu, d-düzensiz jet modu, e-konik jet modu, f-çoklu jet modu (Enayati ve ark. [22]'den uyarlanmıştır)

Elektrohidrodinamik atomizasyon yöntemi polimer çözeltisinin konsantrasyonuna bağlı olarak elektroçizme ve elektropüskürtme yöntemi olarak ikiye ayrılmaktadır. Elektroçizme yönteminde polimer çözeltisinin konsantrasyonu yüksek olduğu için oluşan

jet stabilize olmakta ve uzun lifler meydana gelmektedir. Elektropüskürtme yönteminde ise polimer çözeltisinin konsantrasyonu düşük olduğu için Taylor konisi şeklinde oluşan jet sonucunda kapsüller oluşmaktadır [15].



Şekil 3. Elektropüskürtme ve elektroçizme yöntemiyle üretilen mikro/nano kapsüller (a) ve lifler (b)
(Fotoğraflar: Ayhan Oral)

ELEKTROPÜSKÜRTME YÖNTEMİ İLE PROBIYOTİK MİKROORGANİZMALARIN MİKROKAPSÜLASYONU

Probiyotik mikroorganizmalar, raf ömrü sonuna kadar üründe canlı kalabilmeli ve vücuda alındıktan sonra gastrointestinal sistemden geçişleri süresince yüksek asitlik ve enzim gibi sindirim salgılarına maruz kaldıklarında aktivitelerini koruyarak bağırsak hücrelerine kolonize olabilmelidir [23]. Son yıllarda yapılan çalışmalar elektropüskürtme yönteminin probiyotik mikroorganizmaların canlılığını gerek depolama süresince gerekse gastrointestinal sistemden geçişleri sırasında koruyabileceğini ortaya koymaktadır [24].

Elektropüskürtme koşullarının optimizasyonunun yapıldığı bir çalışmada, dondurularak kurutulmuş probiyotik bakterinin elektropüskürtme yöntemiyle mikrokapsülasyonunu incelemek için 37°C'de 24 saat durma evresine kadar geliştirilen *Lactobacillus plantarum* CECT 748 T bakterisi 0.1 g/mL maltodekstrin içeren fosfat tampon tuzu içinde dondurularak kurutulmuştur. Dondurularak kurutulan ve kurutulmayan *L. plantarum* CECT 748 T 9-10 log kob/mL düzeyinde olacak şekilde 0.3 g/mL konsantrasyonunda hazırlanan peyniraltı suyu konsantresi ile karıştırılıp, karışıma farklı oranlarda Fibersol (%0, 10 ve 20) ve Tween 20 (%1, 5 ve 9) eklenerek farklı voltaj koşullarında (10, 12 ve 14 kV), 0.15 mL/saat akış hızında elektropüskürtme yöntemiyle mikrokapsüller üretilmiştir. Çalışmada, farklı üretim koşullarında üretilen, en yüksek bakteri canlılığına ve yükleme verimliliğine sahip olan mikrokapsüller seçilerek %53 ve %75 bağıl nem koşullarına dayanıklılıkları ve simüle sindirim sistemi sıvıları içerisindeki salınımları incelenmiştir. En yüksek yükleme verimliliği değerine, %10 oranında Fibersol ile %9 oranında Tween 20 içeren ve 14 kV voltaj uygulanarak üretilen mikrokapsüllerin sahip olduğu belirlenmiştir. *L. plantarum* CECT 748 T'nin canlılığı üzerine elektropüskürtme sırasında uygulanan voltajın ve kaplama çözeltisine eklenen Fibersol miktarının etkisi olmadığı saptanırken, kaplama çözeltisindeki Tween 20

miktarı arttıkça *L. plantarum* CECT 748 T'nin canlılığının korunduğu tespit edilmiştir. Farklı koşullarda üretilen tüm mikrokapsüller için *L. plantarum* CECT 748 T sayısının 8.7 ile 9.3 log kob/g arasında değiştiği, elektropüskürtme uygulaması sonunda en fazla azalmanın 0.99 log kob/g olduğu belirlenmiştir. Dondurularak kurutulmuş mikrokapsüle *L. plantarum* CECT 748 T sayısının %75 bağıl nem altında bir gün sonunda 1 log kob/g azaldığı ve bir haftalık depolama periyodu sonunda ortamda canlı hücre kalmadığı saptanmıştır. Bağıl nemin %53 olduğu koşullar altında kurutma işlemi uygulanmayan mikrokapsüle *L. plantarum* CECT 748 T'nin sayısının 45 gün sonunda yaklaşık 7.0 log kob/g olduğu tespit edilmiştir. Dondurularak kurutulduktan sonra mikrokapsüllenen *L. plantarum* CECT 748 T sayısının 37°C'de 2 saat süresince simüle mide sıvısına (pepsin (2000 U/mL), pH 3.0) maruz kaldıktan sonra yaklaşık 2.0 log kob/g azaldığı saptanmıştır. Simüle bağırsak sıvısına (safra ekstraktı ile pankreatin, pH 7.0) 2 saat süresince maruz bırakılan dondurularak kurutulmayan *L. plantarum* CECT 748 T içeren mikrokapsüllerdeki bakteri canlılığının, dondurularak kurutulmuş *L. plantarum* CECT 748 T içeren mikrokapsüllerdekine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir [25].

Yapılan bir çalışmada, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 4552 maltodekstrin, peyniraltı suyu konsantresi, zein ve polivinilpirolidon ile elektropüskürtme yöntemi ile kaplanmıştır. Elektropüskürtme uygulaması için %20 oranında maltodekstrin ve %20 oranında peyniraltı suyu konsantresi içeren çözeltiler ile %12'lik zein ve %10'luk polivinilpirolidon çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin viskozitelerinin sırasıyla 2.45, 27.15, 18.77 ve 202.39 cP olduğu belirlenirken, yüzey gerilimi değerlerinin sırasıyla 25.90, 31.73, 25.50 ve 30.30 mN/m olduğu tespit edilmiştir. *B. longum* subsp. *infantis* CECT 4552 bakterisi 48 saat süresince 37°C'de geliştirildikten sonra 10 log kob/mL olacak şekilde %10'luk maltodekstrin çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra kapsülasyon işlemi için kullanılmak üzere dondurularak kurutulmuştur. Elektropüskürtme ile mikrokapsülasyon uygulaması üç aşamada gerçekleştirilmiştir. Birinci

aşamada, farklı kaplama materyalleri kollektör üzerine elektropüskürtülmüştür. İkinci aşamada, dondurularak kurutulmuş toz halindeki *B. longum* subsp. *infantis* CECT 4552 bakterisi kollektör üzerindeki alt katman üzerine serilmiştir. Üçüncü aşamada, tam kapsülasyonu sağlayabilmek için dondurularak kurutulmuş bakteri üzerine tekrar farklı kaplama materyalleri elektropüskürtülmüştür. Maltodekstrin ve peyniraltı suyu konsantresi ile elde edilen partiküllerin küre şeklinde ve ortalama boyutlarının sırasıyla 1.95 ve 2.47 µm olduğu saptanırken, polivinilpirolidon çözeltisi ile elde edilen partiküllerin lif yapısında ve ortalama boyutlarının 0.15 µm olduğu belirlenmiştir. Viskozite ve yüzey gerilimi değerlerinin partiküllerin yapısının şekillenmesinde etkin rol aldığı değerlendirilmiştir. Farklı kaplama materyalleri ile kaplanmış ve serbest formdaki *B. longum* subsp. *infantis* CECT 4552 bakterisi 23°C'de %23 ve %0 bağıl nem değerleri ile 37°C'de %23 bağıl nem değerine sahip koşullarda depolanmış ve bakteri canlılığı incelenmiştir. Depolama sıcaklığının 37°C ve bağıl nemin %23 olduğu ortama maruz bırakılan serbest formdaki *B. longum* subsp. *infantis* CECT 4552'nin 10 günün sonunda canlılığını tamamen kaybettiği saptanırken, polivinilpirolidon ile kaplanan *B. longum* subsp. *infantis* CECT 4552 sayısında 10 günün sonunda yaklaşık 4 log azalma olduğu belirlenmiştir. Depolama sıcaklığının 23°C, bağıl nemin ise %23 ve %0 olduğu koşullar altında serbest formdaki dondurularak kurutulmuş *B. longum* subsp. *infantis* CECT 4552'nin canlılığını sırasıyla 600 ve 700 gün süresince koruduğu tespit edilmiştir. Peyniraltı suyu konsantresi ile kaplanan *B. longum* subsp. *infantis* CECT 4552 sayısının 23°C'de %23 ve %0 bağıl nemde 600 gün sonunda sırasıyla yaklaşık 6.0 ve 4.0 log kob/g olduğu belirlenmiştir. Çalışmada, peyniraltı suyu konsantresinin kaplama materyali olarak kullanıldığı mikrokapsüllerin *B. longum* subsp. *infantis* CECT 4552'nin canlılığını diğer kaplama materyalleri ile üretilen mikrokapsüllerden daha iyi koruduğu değerlendirilmiştir [26].

López-Rubio ve ark. [27] yaptıkları çalışmada, fosfat tampon tuzu ve yağsız sütle hazırladıkları %30'luk peyniraltı suyu konsantresi çözeltisine 10¹⁰ hücre/mL düzeyinde olacak şekilde *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 ekledikten sonra elektropüskürtme tekniğini (0.3 mL/saat akış hızında, 7 cm kollektör uzaklığında ve 12-14 kV yüksek voltaj koşullarında) kullanarak kaplayıp, ürettikleri mikrokapsüllerin morfolojik özellikleri ile farklı depolama koşullarında (4 ve 20°C'de % 0, 11, 53 ve 75 bağıl nemde) mikrokapsüle, serbest ve dondurularak kurutulmuş *B. animalis* Bb 12'nin canlılığını incelemişlerdir. Çalışmanın kontrol gruplarını 10¹⁰ hücre/mL düzeyinde *B. animalis* Bb 12 içeren PBS (fosfat tampon tuzu) ve yağsız süt, %30 oranında peyniraltı suyu konsantresi ve 10¹⁰ hücre/mL düzeyinde *B. animalis* Bb 12 içeren PBS (fosfat tampon tuzu) ve yağsız süt çözeltileri ile söz konusu çözeltilerin dondurularak kurutulmuş formları oluşturmuştur. Peyniraltı suyu konsantresinin yağsız süt ile hazırlanan karışımı ile kaplanarak elde edilen mikrokapsüllerin boyutlarının 1 µm'den büyük olduğu ve elektropüskürtme sırasında iplik yapısının oluşmadığı saptanmıştır. Depolama sıcaklığının 20°C olduğu koşullarda, yağsız sütte 62. günün sonunda, peyniraltı

su konsantresi içeren çözeltilerin dondurularak kurutulmasıyla elde edilen örneklerde 70. günün sonunda ve elektropüskürtme yöntemiyle üretilen mikrokapsül örneklerinde 140. günün sonunda *B. animalis* Bb 12 tespit edilemezken, 4°C'de depolanan mikrokapsül örneklerinde 140. günün sonunda *B. animalis* Bb 12 sayısının 10⁶ hücre/mL olduğu belirlenmiştir. Yüksek bağıl nem koşullarında bakteri canlılığının azaldığı, en yüksek canlılığın %11 bağıl nemde depolanan örneklere ait olduğu tespit edilmiştir. Dondurularak kurutulmuş örneklerde %11 bağıl nemde 82. günün sonunda bakterilerinin tamamının inhibe olduğu saptanırken, mikrokapsül örneklerinde *B. animalis* Bb 12 sayısının 120. günde yaklaşık 10⁶ hücre/mL olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan farklı bir çalışmada, %4.0'lük düşük metoksili sitrik pektin çözeltisi ile desteklenmiş %4.0'lük aljinat çözeltisi ile %3.0'lük aljinat çözeltilerine 11.0 log kob/mL düzeyde olacak şekilde *Lactobacillus plantarum* BL011 eklenmiştir. Hazırlanan karışımlar 2.0 mL/saat akış hızında, 24 kV voltaj altında ve 15 cm uzaklıktan elektropüskürtme cihazı ile 0.5 M CaCl₂ çözeltisi içine püskürtülerek mikrokapsül oluşturulmuş ve mikrokapsüller 4°C'de 21 gün süresince depolanmıştır. Mide sıvısını simüle etmek için 3.0 g/L pepsin ile %0.5 NaCl içeren ve pH değeri 2.0 olan 1.8 mL çözelti içine 0.4 mL serbest ve mikrokapsül formda *L. plantarum* BL011 konulup 37°C'de 120 dakika süresince inkübe edilmiştir. Simüle mide sıvısı içinde 120 dakika sonunda, sadece aljinat ve düşük metoksili sitrik pektin içeren aljinat çözeltileri kullanılarak mikrokapsüllenen *L. plantarum* BL011 sayısının sırasıyla yaklaşık 8.0 ve 7.0 log kob/mL olduğu belirlenirken, serbest formdaki *L. plantarum* BL011 sayısının yaklaşık 4.0 log kob/mL olduğu saptanmıştır. Bağırsak sıvısını simüle etmek için 1.0 g/L safra tuzu ile %0.5 NaCl içeren ve pH değeri 8.0 olan 1.8 mL çözelti içine 0.4 mL serbest ve mikrokapsül formda *L. plantarum* BL011 konulup 37°C'de 120 dakika süresince inkübe edilmiştir. Simüle bağırsak sıvısı içinde 120 dakika sonunda serbest formdaki *L. plantarum* BL011 sayısının yaklaşık 5.0 log azaldığı, sadece aljinat ve düşük metoksili sitrik pektin içeren çözeltileri kullanılarak mikrokapsüllenen *L. plantarum* BL011 sayısının sırasıyla yaklaşık 1.0 ve 1.5 log azaldığı tespit edilmiştir. Depolamanın 21. gününde kaplama çözeltileri içinde saklanan serbest formdaki *L. plantarum* BL011 sayısının 1 log kob/mL olduğu saptanırken, mikrokapsüle *L. plantarum* BL011'in sayısının ise yaklaşık 9 kob log/mL olduğu belirlenmiştir [28].

Coghetto ve ark. [12] yaptıkları diğer bir çalışmada, %3.0 oranında sodyum aljinat çözeltisine 10.5 log kob/mL düzeyinde *Lactobacillus plantarum* BL011 ekleyerek karışımı 2.0 mL/saat akış hızında, 24 kV voltaj altında ve 15 cm uzaklıktan elektropüskürtme cihazı ile 0.5 M CaCl₂ çözeltisi içine püskürtülerek mikrokapsül oluşturulmuştur. Elde edilen mikrokapsüller -50°C'de 24 saat süresince dondurularak kurutulmuş ve 25°C'de 6 ay süresince depolanmıştır. Kurtulmuş mikrokapsüller portakal suyuna *L. plantarum* BL011 sayısı 10 log kob/200 mL olacak şekilde konulmuş ve 0.4 mL portakal suyu 1.8 mL simüle mide (3.0 g/L pepsin ile %0.5 NaCl, pH 2.0) ve bağırsak (1.0 g/L

pankreatin ile %0.5 NaCl ve pH 8.0) sıvıları ile karıştırılarak 37°C'de 120 dakika süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince simüle mide ve bağırsak sıvılarından her 30 dakikada bir örnek alınarak *L. plantarum* BL011 sayısı belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca mikrokapsüle *L. plantarum* BL011 içeren portakal suyunda duyu analizi gerçekleştirilmiştir. Simüle mide ve bağırsak sıvıları için portakal suyu ile verilen mikrokapsüle *L. plantarum* BL011 sayısının 120 dakika sonunda sırasıyla 8.3 ve 9.2 log kob/mL olduğu belirlenmiştir. Çalışmada portakal suyuna ilave edilen serbest formdaki *L. plantarum* BL011'in simüle mide ve bağırsak sıvılarındaki canlılığı incelenmiş ve 120 dakika sonunda mide ve bağırsak sıvıları içindeki *L. plantarum* BL011 sayıları sırasıyla yaklaşık olarak 3.0 ve 4.5 log kob/mL olarak tespit edilmiştir. Yapılan duyu analizi sonucunda mikrokapsüle bakteri içeren portakal suyu ile içinde bakteri bulunmayan portakal suyu arasında görünüş, renk, koku, tat ve kıvam puanları açısından istatistiksel olarak önemli bir farklılık saptanmamıştır. Çalışma sonunda elektropüskürtme yöntemi ile mikrokapsülasyon işleminin probiyotik bakterilerin canlılığını simüle gastrointestinal sıvılar içinde koruduğu ve mikrokapsüllerin ürünün duyu kalitesi üzerine olumsuz etki göstermediği değerlendirilmiştir.

Lactobacillus acidophilus TISTR 1338'in elektropüskürtme yöntemi kullanılarak zein-aljinat çözeltisi ile mikrokapsülendiği bir çalışmada, farklı voltaj (4, 6 ve 10 kV) uygulamalarının mikrokapsüllerin yapısına ve *L. acidophilus* TISTR 1338'in canlılığına olan etkisi incelenmiştir. Mikrokapsüllerin üretilmesi için 20 mL steril %8.0 oranında gliserol içeren %1.4'lük aljinat çözeltisi içine 1.0 mL 10^9 kob/mL düzeyinde *L. acidophilus* TISTR 1338 içeren çözeltiden ilave edilerek, %7.0 oranında hazırlanan zein çözeltisi içerisinde 4, 6 ve 10 kV voltaj altında 10 mL/saat akış hızında, 6 cm uzaklıktan püskürtülmüştür. Mikrokapsüllerin ortalama büyüklüklerinin 4, 6 ve 10 kV değerleri için sırasıyla 543±88, 313±69 ve 259±62 µm olduğu belirlenmiştir. Uygulanan voltaj değeri yükseldikçe yüklü moleküller arasındaki elektriksel itme kuvvetinin artması sonucunda oluşan partiküllerin daha küçük olduğu bildirilmiştir. *L. acidophilus* TISTR 1338 sayısının 4, 6 ve 10 kV uygulanarak üretilen mikrokapsüllerde sırasıyla 8.85±0.21, 8.29±0.41 ve 8.31±0.23 log kob/mL olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada ayrıca simüle mide sıvısında (pH 1.2) mikrokapsüle ve serbest formdaki *L. acidophilus* TISTR 1338'in canlılığındaki değişim belirlenmiştir. Simüle mide sıvısı içinde 37°C'de 2 saat tutulan serbest formdaki *L. acidophilus* TISTR 1338'un sayısının yaklaşık 5.0 log kob/mL azaldığı, 6 ve 10 kV voltaj altında üretilen mikrokapsüle *L. acidophilus* TISTR 1338 sayısının sırasıyla yaklaşık 1.2 ve 1.7 log kob/mL azaldığı saptanmıştır [11].

Elektropüskürtme yöntemiyle probiyotik mikroorganizmaların mikrokapsüllemesinde ajinat başta olmak üzere peyniraltı suyu konsantresi, zein gibi protein yapıdaki bileşikler; maltodekstrin, pektin gibi karbonhidrat yapıdaki bileşikler ile PVP gibi sentetik bileşikler kullanılabilir. Kullanılan kaplama materyallerinin konsantrasyonlarına, viskozitelerine, yüzey gerilim ve iletkenlik değerlerine bağlı olarak elde

edilen mikrokapsüllerin şekil ve büyüklük gibi fiziksel özelliklerinin yanı sıra probiyotik mikroorganizmaların canlılıklarını korumadaki etkinlikleri de değişmektedir. Mikrokapsülasyon sırasında uygulanan voltaj değerlerindeki artış ile birlikte elde edilen mikrokapsüllerin boyutları küçülmektedir [30]. Çalışmalar, elektropüskürtme yöntemiyle üretilen mikrokapsüllerin *in vitro* koşullar altında simüle mide ve bağırsak sıvılarında probiyotik mikroorganizmaların canlılıklarını yeterli düzeyde koruduklarını ortaya koymuştur. Depolama sıcaklığı ile bağlı nemdeki artışın mikrokapsüle probiyotik mikroorganizmaların canlılığını genel olarak olumsuz etkilediği; ancak aynı depolama koşulları altında mikrokapsüle probiyotik bakterilerin canlılıklarının, dondurularak kurutulmuş ve serbest haldeki örneklerle karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu değerlendirilmiştir.

SONUÇ



Elektropüskürtme yöntemi ile mikrokapsülasyon probiyotik mikroorganizmaların canlılıklarının korunması için kullanılabilir geliştirilmekte olan etkili bir kaplama tekniğidir. Yapılan çalışmalar elektropüskürtme yöntemiyle mikrokapsülasyon işleminin probiyotik mikroorganizmaların canlılıklarını farklı depolama koşullarında korumada başarılı olduğunu göstermekle birlikte, elektropüskürtme yöntemiyle üretilen mikrokapsüle probiyotik mikroorganizmaların gıdalarda kullanımına ve depolama süresince gıdalardaki canlılıklarının belirlenmesine yönelik çalışmalar mevcut değildir. Konu ile ilgili yapılacak çalışmalarda, özellikle gıda üretiminde kullanılabilir ve gıdaların raf ömürlerinin sonuna kadar stabilitesini koruyabilecek mikrokapsüllerin oluşturulmasına odaklanılmalıdır. Bununla birlikte elektropüskürtme yöntemiyle üretilen mikrokapsüle probiyotik mikroorganizmaların stabilitesinin insan gastrointestinal sistemini daha iyi simüle edebilecek dinamik *in vitro* sistemlerde ve ayrıca *in vivo* olarak araştırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Terpou, A., Bekatorou, A., Kanellaki, M., Koutinas, A. A., Nigam, P., 2017. Enhanced probiotic viability and aromatic profile of yogurts produced using wheat bran (*Triticum aestivum*) as cell immobilization carrier. *Process Biochemistry* 55: 1-10.
- [2] Riaz Rajoka, M. S., Mehwish, H. M., Siddiq, M., Haobin, Z., Zhu, J., Yan, L., Shao, D., Xu, X., Shi, J., Identification, characterization, and probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from human milk. *LWT - Food Science and Technology*: Accepted manuscript.
- [3] Anonim, 2006. FAO/WHO. Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation.
- [4] Chaikham, P., Kemsawasd, V., Seesuriyachan, P., 2017. Spray drying probiotics along with maoulang juice plus *Tiliacora triandra* gum for exposure to the *in vitro* gastrointestinal environments. *LWT - Food Science and Technology* 78: 31-40.

- [5] Shori, A.B., 2017. Microencapsulation Improved Probiotics Survival During Gastric Transit. *HAYATI Journal of Biosciences* 24(1): 1-5.
- [6] Rather, S. A., Akhter, R., Masoodi, F. A., Gani, A., Wani, S. M., 2017. Effect of double alginate microencapsulation on *in vitro* digestibility and thermal tolerance of *Lactobacillus plantarum* NCDC201 and *L. casei* NCDC297. *LWT - Food Science and Technology* 83: 50-58.
- [7] Çomak Göçer, E. M., Aşçı Arslan, A., Ergin, F., Küçükçetin, A., 2013. Probiyotik Bakterilerin Mikroenkapsülasyonu. *Yetişkin ve Çocuklarda Probiyotikler* (1): 63-69.
- [8] Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., Morales, M. E., 2015. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 27: 15-25.
- [9] Ribeiro, M. C. E., Chaves, K. S., Gebara, C., Infante, F. N. S., Grosso, C. R. F., Gigante, M. L., 2014. Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. *Food Research International* 66: 424-431.
- [10] Eratte, D., Dowling, K., Barrow, C. J., Adhikari, B. P., 2017. *In-vitro* digestion of probiotic bacteria and omega-3 oil co-microencapsulated in whey protein isolate-gum Arabic complex coacervates. *Food Chemistry* 227: 129-136.
- [11] Laelorspoen, N., Wongsasulak, S., Yoovidhya, T., Devahastin, S., 2014. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* in zein-alginate core-shell microcapsules via electrospraying. *Journal of Functional Foods* 7: 342-349.
- [12] Coghetto, C. C., Flores, S. H., Brinques, G. B., Ayub, M. A. Z., 2016. Viability and alternative uses of a dried powder, microencapsulated *Lactobacillus plantarum* without the use of cold chain or dairy products. *LWT-Food Science and Technology* 71: 54-59.
- [13] Karakaya, M. C., Abdullahoğlu, R., Tunçer, O., Kızıl, H., Trabzon, I., 2014. Bir elektrosprey enjektörün deneysel incelenmesi. *Isı Bilimi ve Teknigi Dergisi/Journal of Thermal Science & Technology* 34(1): 63-76.
- [14] Badıllı, U., Tarımcı, N., Elektro-püskürtme yöntemi ve nanoteknolojideki uygulamaları. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi* 38(2): 117-135.
- [15] Anu Bhushani, J., Anandharamkrishnan, C., 2014. Electrospinning and electrospraying techniques: Potential food based applications. *Trends in Food Science & Technology* 38(1): 21-33.
- [16] Jaworek, A., Krupa, A., 1999. Classification of the modes of EHD spraying. *Journal of Aerosol Science* 30(7): 873-893.
- [17] Jaworek, A., Sobczyk, A., 2008. Electrospinning route to nanotechnology: an overview. *Journal of electrostatics* 66(3): 197-219.
- [18] Bock, N., Dargaville, T. R., Woodruff, M. A., 2012. Electrospraying of polymers with therapeutic molecules: state of the art. *Progress in polymer science* 37(11): 1510-1551.
- [19] Okutan, N., Terzi, P., Altay, F., 2014. Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers. *Food Hydrocolloids* 39: 19-26.
- [20] Cloupeau, M., Prunet-Foch, B., 1994. Electrohydrodynamic spraying functioning modes: a critical review. *Journal of Aerosol Science* 25(6): 1021-1036.
- [21] Jaworek, A., Krupa, A., 1999. Jet and drops formation in electrohydrodynamic spraying of liquids. A systematic approach. *Experiments in fluids* 27(1): 43-52.
- [22] Enayati, M., Chang, M.-W., Bragman, F., Edirisinghe, M., Stride, E., 2011. Electrohydrodynamic preparation of particles, capsules and bubbles for biomedical engineering applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 382(1): 154-164.
- [23] Chen, H.-Y., Li, X.-Y., Liu, B.-J., Meng, X. H., 2017. Microencapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* and survival assays under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods* 29: 248-255.
- [24] Ghorani, B., Tucker, N., 2015. Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. *Food Hydrocolloids* 51: 227-240.
- [25] Gomez-Mascaraque, L. G., Morfin, R. C., Pérez-Masiá, R., Sanchez, G., Lopez-Rubio, A., 2016. Optimization of electrospraying conditions for the microencapsulation of probiotics and evaluation of their resistance during storage and in-vitro digestion. *LWT-Food Science and Technology* 69: 438-446.
- [26] Librán, C., Castro, S., Lagaron, J., 2017. Encapsulation by electrospray coating atomization of probiotic strains. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 39: 216-222.
- [27] López-Rubio, A., Sanchez, E., Wilkanowicz, S., Sanz, Y., Lagaron, J. M., 2012. Electrospinning as a useful technique for the encapsulation of living bifidobacteria in food hydrocolloids. *Food Hydrocolloids* 28(1): 159-167.
- [28] Coghetto, C. C., Brinques, G. B., Siqueira, N. M., Pletsch, J., Soares, R. M. D., Ayub, M. A. Z., 2016. Electrospraying microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* enhances cell viability under refrigeration storage and simulated gastric and intestinal fluids. *Journal of Functional Foods* 24: 316-326.
- [29] Khan, M. K. I., Nazir, A., Maan, A. A., 2017. Electrospinning: a Novel Technique for Efficient Coating of Foods. *Food Engineering Reviews*: 1-8.

Nisinin Sinerjistik Antimikrobiyel Etkisi

Burcu Özel¹ , Ömer Şimşek² 

¹Pamukkale Üniversitesi, Çal Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Denizli
²Pamukkale Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Denizli

Geliş Tarihi (Received): 20.05.2017, Kabul Tarihi (Accepted): 19.07.2017

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): omers@pau.edu.tr (Ö.Şimşek)

📞 0 258 216 30 15 📠 0 258 296 32 62

ÖZ

Gıda muhafaza yöntemlerinin birlikte kullanılması, gıda kalitesini ve güvenliğini artırmaktadır. Bu nedenle engeller teknolojisi kapsamında çeşitli doğal koruyucular kullanılarak mikrobiyal risk ortadan kaldırılmaya çalışılmaktadır. Nisin ise *Lactococcus lactis* suşları tarafından üretilen ve gıda sistemlerinde kullanılmasına izin verilmiş (E234) bir doğal koruyucudur. Bu antimikrobiyel ajanın gıda sistemlerinde etkisinin artırılması için çeşitli kimyasal katkı ve fiziksel işlemlerle birlikte kullanılması denenmiştir. Bu derleme çalışmasında da nisinin sinerjistik antimikrobiyel etkisi üzerinde durularak, hem gıda sistemlerinde çeşitli muhafaza yöntemlerinin olumsuz etkilerinin azaltılabildiği hem de nisinin antimikrobiyel aktivitesinin artırılabilirdiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Nisin, Sinerjistik etki, Antimikrobiyel, Engeller teknolojisi

Synergistic Antimicrobial Effect of Nisin

ABSTRACT

Application of food preservation treatments in combinations increases food quality and safety. Therefore, microbial risks can be prevented by using natural preservatives within the concept of hurdle technology. Nisin is a natural preservative (E234) permitted in food production and produced by *Lactococcus lactis*. To increase the effect of this antimicrobial agent in foods systems, it has been tested in combinations with different chemical additives and physical treatments. In this review, the synergistic antimicrobial effect of nisin was emphasized and it was shown that the adverse effects of various preservation methods in food systems can be reduced while the antimicrobial activity of nisin can be increased.

Keywords: Nisin, Synergistic activity, Antimicrobial, Hurdle technology

GİRİŞ

Gıdaların, mikrobiyolojik güvenliğinin sağlanmasında antimikrobiyel etkili ajanların veya fiziksel işlemlerin birlikte kullanılması (Sinerjizm) artan önem kazanmış ve son yıllarda bu yönde yapılan uygulamalar engeller teknolojisi kavramı kapsamında değerlendirilmektedir. Bu sayede gıda ortamında gelişimi engellenemeyen çeşitli bozucu ve patojen nitelikli mikroorganizmaların direnci zayıflatılarak öldürülmesi sağlanmaktadır.

Engeller teknolojisinde antimikrobiyel etkiye sahip uygulamalar sırasıyla (sublethal) veyahutta birlikte (sinerjistik) kullanılmaktadır. Sinerjistik uygulamalar açısından gıdalarda bakteriyosinlerin kullanımı gittikçe artan bir önem kazanmaktadır. İzin verilmiş tek bakteriyosin olan nisinin kullanımını kısıtlayan en temel unsurlardan bazıları bu bakteriyosinin Gram negatif bakteriler üzerinde antimikrobiyel etkisinin bulunmaması ve ayrıca hassas olan bakterilerin de nisine karşı direnç göstermeye başlamasıdır [1, 2]. Bu anlamda özellikle

günümüzde ticari potansiyeli bulunan nisin antimikrobiyel etkisinin geliştirilmesi ve nisin kullanım maliyetinin düşürülmesi için nisinin çeşitli antimikrobiyel ajanlarla veyahutta fiziksel işlemlerle birlikte kullanımı yönünde çalışmalara hız verilmiştir [3, 4].

Nisin, tip I lantibiyotik grubuna dahil olan ve laktik asit bakterileri üyesi *Lactococcus lactis* tarafından sentezlendiği tespit edilmiş ilk bakteriyosindir. Bu bakteriyosin oldukça geniş bir etki spektrumuna sahip olması nedeniyle gıda endüstrisinde koruyucu, medikal alanda ise terapötik ajan olarak kullanılmaktadır. Nisin FDA tarafından GRAS (insan ve hayvan tüketiminde güvenilir) ajan olarak tanımlanmış ve belgelendirilerek (E234) kullanımına izin verilmiştir. Bu bakteriyosin günümüzde 50'den fazla ülkede süt ve süt ürünleri, konserve ürünler ve hazır çorbalar gibi gıdaların korunmasında kullanılmaktadır. Ayrıca diş macunu ve sargı bezlerini içeren çeşitli sağlık ürünlerinde de kullanımı mevcuttur [5].

Birçok Gram pozitif bakteri nisine karşı duyarlıdır. Nisinin Gram pozitif bakterilerin vejetatif formları yanında, *Clostridium* ve *Bacillus* sporlarına karşı da etkili olduğu saptanmıştır. Bu karakteristikleri nedeniyle nisin yüksek sıcaklıktan etkilenen ya da ısı işlem uygulanmayan asidik gıdalarda patojen ya da gıda bozulması etmeni birçok bakterinin vejetatif (*Listeria* ve laktik asit bakterilerinin kontamine üyeleri gibi) ve spor formlarının (*Clostridium* ve *Bacillus* sporları gibi) inhibisyonu amacı ile kullanılmaktadır [5, 7]. Ancak nisinin Gram negatif bakteriler üzerinde çok düşük antimikrobiyel etkisi bulunmaktadır [8]. Bunun temel nedeni nisinin Gram pozitif hücrelerin duvarında bulunan lipit II fraksiyonlarına tutunarak antimikrobiyel etkisini göstermesidir. Diğer taraftan nisine karşı hassas olan bakteriler zamanla direnç kazanmaktadır.

Son yıllarda çeşitli gıdalarda önem taşıyan patojen veya bozucu nitelikteki bakterilerin inhibisyonu amacıyla, nisinin diğer ajanlarla veya fiziksel işlemlerle birlikte kullanımı yönünde araştırmalar yoğunlaşmıştır. Bu araştırmalarda özellikle çeşitli organik asitler (laktik ve asetik asit), bitki ekstraktları (karvakrol, öjenol, timol, sinamik asit), şelatlayıcı bileşikler (EDTA) ve ısı işlemlerin yanında yüksek basınç ve vurgulu elektriksel alan uygulamaları denenmiştir. Bakterilerin engellenmesi yönünde oluşturulan bu antimikrobiyel sistemlerde temel hedef hücrelerin duvar yapısının zayıflatılarak nisinin sitoplazmik membrana ulaşmasının sağlanmasıdır. Böylece nisinin antimikrobiyel etkisi ve spektrumu geliştirilmektedir. Ancak bu noktada dikkati çeken husus nisinin sinerjistik etkisi için birlikte kullanılacak yöntemin gıda ve hedef mikroorganizma türüne göre seçilmesidir. Bu nedenle kullanılan diğer antimikrobiyel engelin nisinin fonksiyonelliğini artırıcı yönde olması gerekmektedir.

Bu derleme çalışmasında bugüne kadar yapılmış, nisinin sinerjistik etkisi kapsamında araştırılan, çalışmaların sonuçları toplanmıştır. Çalışmada nisinin hangi kombinasyonlarda yüksek antimikrobiyel etkinlikte sonuç verebildiği ortaya konulmaya çalışılmıştır. Derlemede öncelikle nisinin antimikrobiyel etki mekanizması

üzerinde durulmuş, takiben nisinin sinerjistik etkisi ile ilgili uygulamalar tartışılmıştır.

NİSİNİN ANTIMİKROBIYEL ETKİ MEKANİZMASI

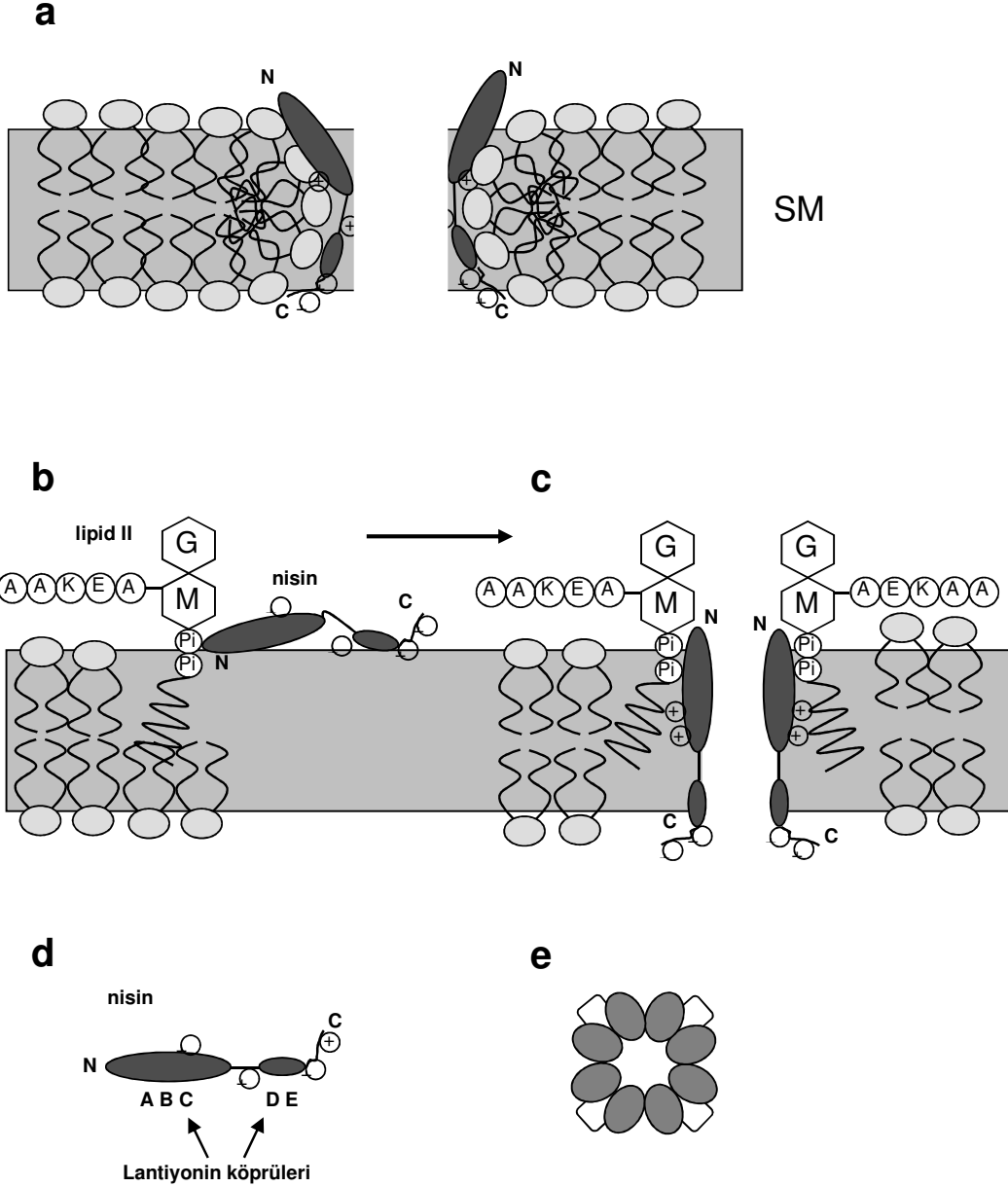
Nisinin antimikrobiyel aktivitesi, hedef hücre sitoplazmik membranında por oluşumunu teşvik etmek ve murein sentezini engellemek suretiyle ortaya çıkmaktadır [9, 10]. Ortama nisin ilavesi durumunda hassas hücrelerde membran potansiyeli düşmekte ve bu durum proton motivasyon gücünün kaybı ile sonuçlanmaktadır [11, 12]. Nisin varlığında porların oluşmasıyla hücreler için gerekli olan aminoasitlerin, ATP ve monovalent katyonların kaybı meydana gelmektedir [9]. Sonuç olarak hassas hücredeki tüm biyokimyasal reaksiyonlar durmaktadır.

Nisin sitoplazmik membran üzerinde por oluşumunu, hem mikromolar hem de nanomolar konsantrasyonda teşvik edebilmektedir. Nisinin membran üzerinde por oluşturma mekanizmasının açıklanmasını sağlayan ilk veriler, bu bakteriyosinin mikromolar konsantrasyonda kullanılmasıyla elde edilmiştir. Yüksek konsantrasyondaki nisinin zwitteriyonik fosfatikolin (PC) yapay membranından 6-karboksiflorasan bileşiklerinin difüzyonunu indüklediğini fakat anyonik karakterli fosfatilgliserol (PG) membranından herhangi bir bileşiğin salınımına yol açmadığı belirlenmiştir [13]. Bu durum nisinin zwitteriyonik fosfolipit yapılarla etkileşime girdiği ve por oluşumuna neden olduğu şeklinde açıklanmıştır. Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda, nisinin yüksek konsantrasyonda bulunması durumunda, sitoplazmik membranda anyonik fosfolipitlerle de etkileşime girerek por oluşturabildiği saptanmıştır [14, 15]. Son olarak nisin molekülünün hücre yüzeylerinde yerleşiminin incelendiği çalışmada; molekülün her iki ucunun da lipit faz içerisine girdiğini ve membran yüzeyine paralel olduğu saptanmıştır [16]. Nisin molekülünün mikromolar konsantrasyondaki por oluşum mekanizması, sıkıştırma (Wedge) modeli olarak adlandırılmıştır (Şekil 1.a). Bu modele göre yüksek konsantrasyondaki nisin, lipit dinamiğini bozmakta ve membrandaki anyonik fosfolipitleri eğerek por oluşumuna yol açmaktadır. Söz konusu porlar, hücrenin membran potansiyelinin ve proton motivasyon gücünün kaybına neden olmaktadır [17].

Nisinin nanomolar konsantrasyondaki antimikrobiyel etki mekanizması, hücre duvarı öncü molekülü lipit II'nin nisinle olan ilişkisinin anlaşılması sonucunda aydınlatılmıştır. Söz konusu ilişki ilk defa lipit II molekülünün birleştirici fonksiyonunun belirlenmesiyle ortaya çıkmıştır [18]. Ancak por oluşumu için gerekli nisin miktarının lipit II tarafından düşürüldüğü ve bunun nisinin etkinliğinde anahtar rol oynadığı deneysel çalışmalarla kanıtlanmıştır [19]. Araştırmacılar, lipozom içerisinde bir molekül lipit II'nin bulunması durumunda bile, nisinin bu moleküle yüksek ilgi gösterdiğini ve model membranlarda por oluşturarak sızıntının meydana gelmesine yol açtığını saptamıştır. İleri çalışmalarda, sitoplazmik membranda por oluşumu için öncelikle nisinin N- ucundaki İle-1 aminoasidinin, lipit II'nin fosfat gruplarına bağlandığı, ardından C- ucunun bu moleküle ilişkilendiği ve son aşamada membrana tutunduğu belirlenmiştir [20, 23]. (Şekil 1 b ve c). Bu bulgulara ilave

olarak, nisin'in tutunması için lipid II üzerinde bir başka ikincil yapının olduğu da öne sürülmüştür [22]. Tüm bu bulgular nisin'in sitoplazmik membran yüzeyinde por oluşumuna yol açabilmek için lipid II'ye gereksinim duyduğuna işaret etmektedir. Nisin'in lipid II ile etkileşimde bulunarak gösterdiği antimikrobiyel aktivite sistemi, fiçı-delme modeli olarak adlandırılmaktadır. Bu model sisteminde 8 adet nisin molekülünün ve 4 adet lipid II'nin etkinlik gösterdiği saptanmıştır [20, 24].

Nisin vejetatif bakteri formlarının yanı sıra spor gelişimini de engellemektedir. Nisin'in sporlar üzerindeki inhibisyon etkisinin, didehidro amino asitlerin membranda bulunan sülfidril grupları ile reaksiyona girmesinden kaynaklandığı görüşü giderek yaygınlık kazanmaktadır [25, 26]. Bu görüşü destekleyen en önemli kanıt, yapısında dehidroalanin yerine, alanin amino asidi bulunan mutant nisin'in, *Bacillus* sporlarına karşı daha düşük inhibisyon etkinliği gösterdiğinin tespiti [27].

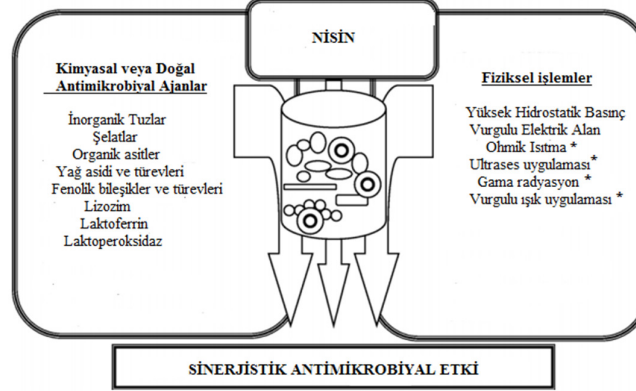


Şekil 1. Nisin tarafından indüklenen membran por modelleri a) Sıkıştırma modeli; hedef bağımsız por. Mikromolar konsantrasyonlarda nisin fosfolipitlerin hidrofilik kısımları ile etkileşimde bulunmakta ve membran bütünlüğünün bozulmasına neden olmaktadır. b) Nisin N- ucu aracılığıyla fosfatların lipid II kısmına bağlanmaktadır. c) Nisin'in C- ucu membran boyunca transloke olmakta ve nisin-lipid II poru oluşmaktadır. d) Nisin'in fonksiyonel açıdan önemli kısımları: N- uç köprüleri, ABC, C- uç köprüleri DE ve aralarında bulunan esnek menteşe bölgesi. e) Nisin-lipid II kompleksinin üstten görünümü. SM: Sitoplazmik membran, G: N-asetilglukozamin, M: N-asetilmuramik asit [20].

NİSİNİN SİNERJİSTİK ANTİMİKROBİYEL ETKİSİ

Nisinin patojen bakteriler üzerindeki antimikrobiyel etkisinin geliştirilmesi amacıyla bu ajanının farklı antimikrobiyel engeller ile kombine edilerek kullanılması yönündeki yaklaşımlar son yıllarda hızla artmaktadır. Bu yönde yapılan çalışmalarda denenen başlıca engeller

Şekil 2'de verilmiştir. Söz konusu bu engellerin nisin ile birlikte kullanılmasında gıda çeşidi ve hedef mikrobiyal çeşitliliği büyük önem arz etmektedir. Ayrıca nisinin yapısal ve kimyasal özellikleri de birlikte kullanılacak antimikrobiyel engelin seçiminde dikkate alınması gereken önemli faktörlerden birisidir.



Şekil 2. Nisinin sinerjistik antimikrobiyel etkisini oluşturan engeller [51]

Nisinin Kimyasal ve Doğal Antimikrobiyel Ajanlarla Birlikte Kullanımı

Antimikrobiyel etkinin geliştirilmesi amacıyla, nisinle beraber NaCl kullanımı ilk uygulamalardan birisidir. Bu yönde yapılan öncü çalışmalarda tuzun nisinin antimikrobiyel aktivitesini artırdığı rapor edilmiştir [28]. Ancak daha sonraki çalışmalarda, tuzun nisinin konformasyonel yapısı üzerinde ve hedef bakterilerdeki hücre duvar yapısında değişikliğe neden olmasından dolayı antimikrobiyel etkide azalmaya yol açtığı tespit edilmiştir [29].

Nisin kullanımı, gıdalarda nitrit kullanımının azaltılması yönünde önemli katkı sağlamıştır. Özellikle fermente et ürünlerinde nisinin nitritle birlikte kombine edilmesiyle botulinum toksin üreticisi (*Clostridium botulinum*) ve diğer spor oluşturan *Clostridium*' ların yanında *L. monocytogenes*' leri de önemli ölçüde engellenmiştir [30]. Son yapılan bir çalışmada 250 mg/kg nisin (10 000 IU/mL) kullanarak, sucuk örneklerinde nitrit kullanımının %50 azaltılabileceği ve bunun da son üründe hem biyojenik amin oluşumunun düşürülmesinde hem de mikrobiyolojik güvenliğin sağlanmasında katkıda bulunduğu tespit edilmiştir [31]. Ancak özellikle yağ içeriği yüksek olan gıdalarda hedef alınan antimikrobiyel etkinliğe ulaşabilmek için birçok çalışmada olduğu gibi yüksek oranlarda nisin kullanılması gerekmektedir [30, 31]. Söz konusu bu durum nisinin hidrofobik yapısından kaynaklanmakta ve bu uygulamalarda nisinin önemli oranda yağ fazında tutulmasından dolayı antimikrobiyel etkinlik düşmektedir.

Gıda sistemlerinde mikroorganizmaların inhibisyonu amacıyla nisinle beraber kullanılan en verimli koruyuculardan birisi organik asit ve tuzlarıdır [32, 33]. Özellikle nisinin asidik ortamlarda daha yüksek oranlarda çözünebilmesi, bu ajanın bakteri hücre duvarına daha fazla nüfuz etmesini sağlayarak

antimikrobiyel etkinliği artırmaktadır [34, 35]. Örneğin, ticari kullanımı bulunan nisin A'nın çözünürlüğü pH 2'de 57 mg/mL iken, pH 6'da 1.5 mg/mL'ye düşmektedir [5, 34]. Çözelti ortamının alkalilik derecesi arttığında oluşan bu farklılık, molekül içi veya moleküller arası kimyasal modifikasyonlar nedeniyle, nisin molekülünde geri dönüşümsüz inaktivasyonun meydana gelmesinden oluşmaktadır [34].

Nisinin asidik koşullardaki yüksek etkinliği bu ajanın organik asitlerle birlikte kombine edilerek başta nisin dirençli *Listeria monocytogenes* olmak üzere, Gram negatif *Escherichia coli* O157:H7 ve *Salmonella* suşları üzerinde inhibisyon etkinliğini geliştirmek üzere birçok çalışma yapılmıştır. 400 IU/mL nisinin laktik asit ile birlikte kullanılması durumunda *L. monocytogenes* sayısında 6.7 log oranında düşüş tespit edilmiştir [36]. Benzer şekilde farklı gıda sistemlerinde yapılan çalışmalarda nisinin laktik asitin sodyum tuzu ile birlikte kullanılması durumunda *Salmonella* suşları üzerinde antimikrobiyel etkinliğin önemli derecede geliştirilebildiği bildirilmiştir [37, 39]. Nisinle birlikte asetik asitin kullanıldığı Ricotta tipi peynirlerde 70 gün boyunca *Listeria* bulaşmasının engellendiği tespit edilmiştir. Fitik asitin nisinle kombine edildiği bir diğer çalışmada ise lahana ve brokoliye aşılanmış *L. monocytogenes* sayısında 2.20 ile 4.35 arasında değişen logaritmik azalma belirlenmiştir [40].

Nisinin Gram negatif bakterilerin inhibisyonu üzerindeki yetersizliği aşılması istenen önemli konulardan birisidir. Bu problemin çözümü yönünde nisinle birlikte kullanılan antimikrobiyel ajanlardan birisi şelatlardır. Gram negatif bakterilerin hücre duvarı yapısındaki lipopolisakarit yapı (LPS) membran proteinlerine lipit A ile ve iki değerlikli katyonların aracılığı ile bağlanmıştır. Bu ajanlar, Gram negatif bakterilerin hücre duvarındaki lipopolisakarit yapının stabilitesini sağlayan Mg²⁺ ve Ca²⁺ katyonlarını tutarak, hücre duvar yapısının zayıflamasına ve geçirgenliğin artışına sebep olarak

nisinin sitoplazmik membrana ulaşmasını kolaylaştırmaktadır [41, 43]. Bu amaç doğrultusunda yaygın kullanımı olan güvenli şelatlar; sitrat, fosfat, heksametafosfat ve etilendiamintetraasetik asit (EDTA)' dir. Bu sayılan şelatlar arasında özellikle EDTA hem antimikrobiyel aktiviteye sahip olması, hem de nisinin antimikrobiyel etkinliğini diğer şelatlarla göre daha fazla artırmadan dolayı gıda uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır. EDTA kullanılarak yapılan bu çalışmalarda özellikle *Salmonella*, *Escherichia*, *Pseudomonas* türlerinin laboratuvar ve gıda ortamında inhibisyonu gösterilmiştir [44, 46]. *E. coli* ve *P. aeruginosa* suşlarının *Salmonella*'ya kıyasla nisin ve EDTA varlığında daha hassas olduğu belirtilmiştir. Ayrıca gıda ortamında yapılan çalışmalarda nisin ile birlikte EDTA kullanımının besiyeri ortamına göre daha düşük düzeyde etkili olduğu ifade edilmektedir. Örneğin %2 yağlı UHT sütte tripton soy besiyerine göre, *S. enteridis* ve *P. fluorescens* suşlarının söz konusu antimikrobiyel kombinasyonlara daha fazla dirençli olduğu saptanmıştır [47]. Başka bir çalışmada ise, EDTA'nın nisin uygulamasından sonra gıdaya katılmasının, eşzamanlı kullanıma göre *E. coli* NCTC12900 üzerinde daha fazla inhibisyon sağlanmıştır [43].

Gıda patojenlerinin inhibisyonu amacıyla nisinle birlikte doğal antimikrobiyel ajanların kombine edilerek kullanılması, son yıllarda dikkati çeken önemli yönelimlerden birisidir [48, 57]. Özellikle tüketici tercihlerinin doğal bileşenlerin kullanılmasından yana olması doğal antimikrobiyel ajanların önemini daha fazla artırmaktadır. Diğer taraftan bu ajanların kullanılması ile bakteriler üzerinde letal etkiye ulaşabilmek için yüksek oranda kullanılmasının gerekliliği, yüksek konsantrasyonlarda kullanılması durumunda ise gıda aroma ve lezzetinde değişimlere ve kayıplara neden olması, bu ajanların nisin gibi diğer antimikrobiyel ajanlarla birlikte sinerjistik kullanımı teşvik etmektedir. Ayrıca bitkisel antimikrobiyel ajanlarla nisin dirençli bakterilerin inhibisyonu da sağlanmaktadır. Çünkü söz konusu bu ajanlar bakteriler üzerindeki antimikrobiyel etkinliğini hücre duvarını bozarak göstermektedir. Nisin de hücre duvarı zarar gören hücrelerin sitoplazmik membranına ulaşarak daha fazla etkili olabilmektedir [50, 51, 54, 55].

Sinerjistik antimikrobiyel etki amacıyla nisinle birlikte kullanılan en önemli doğal antimikrobiyel ajanlar; kekikten ekstrakte edilen karvakrol ve timol, karanfilden ekstrakte edilen öjenol ve tarçından ekstrakte edilen sinamik asittir. Bunların yanında kekik, güveyotu, kimyon, su ladini kozalağı gibi bitkilerin özütü de nisinle birlikte patojen bakterilerin inhibisyonu için denenmiştir [48, 57]. Nisinin karvakrol, timol ve öjenol ile birlikte *B. cereus* ve *L. monocytogenes* suşları üzerinde sinerjistik antimikrobiyel etki gösterdiği tespit edilmiştir [58, 59]. Başka bir çalışmada karvakrol, öjenol ve timolün nisinle birlikte kullanılmasıyla *B. subtilis* ve *L. innocua* suşlarının tamamen inhibe edilebildiği belirlenmiştir [49]. Süt ortamına aşılardan *L. monocytogenes* suşlarında, su ladini kozalağının özütünün nisinle birlikte kullanılması durumunda canlılık tamamen sona erdirilmiştir [54]. Benzer şekilde, doğal antimikrobiyel ajanlar nisinle

birlikte Gram negatif bakterilerin inhibisyonu için de denenmiştir. Sinamik asit ile nisinin kombinasyonu ile yapılan çalışmada elma suyunda *S. typhimurium* ve *E. coli* O157:H7 suşlarının inhibisyonunu hızlandırmıştır [60]. Ancak Olasupo ve ark. [49] 5 farklı organik bileşiğin (karvakrol, öjenol, timol, diasetil ve sinamik asit) *E. coli* ve *S. typhimurium* suşları üzerinde letal etkiye sahip olduğunu ancak bu organik bileşiklerin nisinle birlikte kullanılması durumunda letal etkinin geliştirilemediğini belirtmiştir. *S. enterica* serovar *Typhi* suşu kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada, kekik yağında bulunan ve monoterpen yapısında olan *p*-cymene ve nisin kombinasyonunun 37°C'de yüksek letal etkili iken aynı organik bileşiklerin ayrı uygulamasında herhangi bir inhibisyon tespit edilememiştir. Bu çalışmada *p*-cymene'nin bakterilerin hücre duvarına nisinin difüze olmasını sağlayarak antimikrobiyel etkinin artırıldığı ifade edilmiştir [55].

Bitki özlerinin ve esansiyel yağlarının bakteriler üzerindeki antimikrobiyel etki mekanizması nisinin inhibisyon etkisinin geliştirilmesi yönünde önem taşımaktadır. Her ne kadar bitkisel özütlerin ve esansiyel yağlarının antimikrobiyel etkisinin mekanizması üzerinde farklı yaklaşımlar bulunsa da, özellikle bu doğal antimikrobiyel ajanların hidrofobik karakterde olmalarından dolayı bakterilerin hücre duvarında bulunan yağ tabakasının yapısının bozulması ile geçirgenliğinin artırılması ile ilişkili mekanizmalar ağırlık kazanmıştır [50, 61]. Dolayısıyla bu doğal antimikrobiyel ajanların uygulaması ile bakterilerin hücre duvarında meydana gelen yapısal bozulmalar neticesinde nisinin bakteri hücrelerinin sitoplazmik zarına ulaşmasını kolaylaştırmaktadır. Bu yöndeki yaklaşımlarda özellikle karvakrol ve timolün yapısında yer alan fenolik yapının çeşitli yerlerinde bulunan hidroksil gruplarının hücre duvarı üzerinde etkili olmalarından dolayı sinerjistik antimikrobiyel etki için nisinle birlikte kullanılması açısından ön plana çıkmaktadır [62].

Patojen mikroorganizmaların engellenmesi amacıyla nisinle birlikte antimikrobiyel aktiviteye sahip diğer kimyasal bileşenler de kullanılmaktadır. Örneğin nisin etil alkolle birlikte kullanıldığında *L. monocytogenes* suşlarının canlılıkları tamamen durdurulmuştur [63]. Diğer taraftan içme sütünde manolaurinin nisinle birlikte kullanılması durumunda *L. monocytogenes* suşlarının gelişimi engellenmiştir [64]. Bunların yanında nisinle birlikte bakteriyofajlardan saflaştırılan endolizin proteini (LysH5) denenmiştir. Bu çalışmada endolizin proteini ile nisin pastörize sütte birlikte kullanıldığında *S. aureus* suşlarında sadece nisinden elde edilen antimikrobiyel etkinlikten daha fazlasına ulaşıldığı rapor edilmiştir [65]. Nisin ve lizozime karşı ayrı ayrı dirençli olduğu bilinen *Clostridium difficile* sporları, söz konusu bu iki antimikrobiyel ajan gelişme ortamında aynı anda beraber bulundurulduğunda oluşan sinerjistik etki ile inhibisyonunda artış sağlanmıştır [66]. *Enterococcus faecalis* suşlarına karşı ϵ -polilisinin ve nisin kombinasyonunun antimikrobiyel sinerjistik etkisi membran geçirgenlik analizlerince doğrulanmış, çalışmada ϵ -polilisinin hücre içinde gösterdiği antimikrobiyel etkinin nisinin hücre zarına verdiği tahribatla kolaylaştırıldığı bildirilmiştir [67].

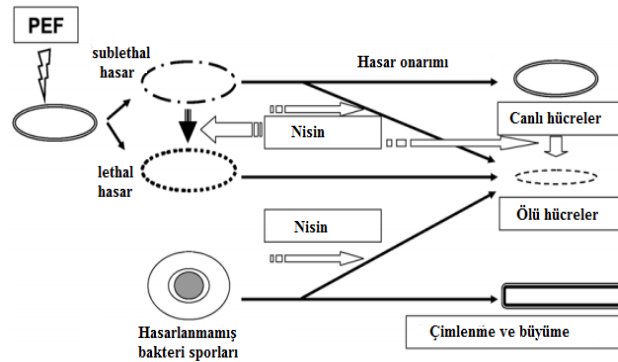
Nisinin Fiziksel İşlemlerle Birlikte Kullanımı

Gıda sistemlerinde mikrobiyal güvenliğin sağlanması amacı ile çoklu antimikrobiyel faktörlerin birlikte kullanımı veya hücre duvarlarını tahrip edici ısı işlem, vurgulu elektrik alan veya yüksek hidrostatik basınç gibi fiziksel uygulamaların antimikrobiyel ajanlarla kombinasyonu sonucu geliştirilen, prensibinde ortak hücre hedefler yer alan engeller teknolojisi hakkında yapılan çalışmalar giderek önem kazanmaktadır [68, 74]. Sadece bir antimikrobiyel etkiye maruz bırakılmış bakteri popülasyonunda gözlemlenebilecek durumlar sırasıyla şöyle özetlenebilir: i) uygulanan antimikrobiyel etkinin derecesi popülasyonda letal etki yaratabilir, ii) ya da antimikrobiyel ajan yeterli letal doza ulaşmadığından uygulama sonunda subletal etki gözlemlenebilir ki bu durumda hücreler strese karşı geliştirdikleri adaptasyon mekanizmaları sayesinde daha dirençli hale gelebilirler, iii) son olarak bakteri popülasyonu doğal olarak ya da sonradan antimikrobiyel ajana direnç gösterebilir. Engeller teknolojisinde ise kullanılan her stres faktörünün letal etkisinin oluşturduğu sinerjistik artıştan faydalanılır.

Gıdalarda raf ömrünün uzatılması için sıklıkla yapılan ısı işlem uygulaması çoğu gıdada besin kayıpları ve kalite kusurlarına neden olur. Alternatif seçenek olan bakteriyosinlerin kullanımı ise oldukça maliyetlidir. Isıl işlem ve nisin birlikte kullanılması halinde hem hedeflenen letal etki düzeyi yükseltilebilir hem de maliyet, besin ve kalite kayıpları önlenir. İstakozda *L. monocytogenes* inhibisyonunun araştırıldığı bir çalışmada nisin ve ısı işlem uygulamasının birlikte kullanılması halinde popülasyondaki letal etkinin arttığı bildirilmiştir [75]. Nisine dirençli *L. monocytogenes* suşları ile yapılan bir başka çalışmada suşlara 55°C ısı işlem uygulanması halinde nisine karşı duyarlılığın önemli ölçüde arttığı vurgulanmıştır [76] Subletal ısı işlem uygulamaları Gram negatif bakterileri nisinle birlikte enterosin, pediosin gibi birçok farklı bakteriyosine karşı da duyarlı hale getirmektedir [77, 80]. Ayrıca yüksek antimikrobiyel etki, bakteriyosin, ısı işlem ve şelatların kombine uygulamalarından elde edildiği de rapor edilmiştir [79, 80, 51] *Clostridium sporogenes* sporlarında sadece nisin uygulaması ile canlılık oranında herhangi bir azalma elde edilemediği, spor

inhibisyonu için nisin kullanımının ısı işlemle birlikte uygulanmasının daha etkili olduğu önerilmiştir [81]. Isıl işlem, asitlendirme ve nisin kombine uygulanması sonucu antimikrobiyel sinerjistik etkinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise; *C. sporogenes* sporlarında D değerlerinin önemli ölçüde düşürüldüğü ve spor inaktivasyonun etkin şekilde başarıldığı rapor edilmiştir [82]. Süt ürünlerinde sorun oluşturan *Bacillus sporothermodurans* sporları ısıya karşı oldukça dirençlidirler. Yapılan bir çalışmada *B. sporothermodurans* sporlarının 15-184 IU/mL nisin konsantrasyonu, 73-106°C ısı işlem kombinasyonu ile beraber kullanıldığında antimikrobiyel etkinin arttığı bildirilmiştir [83]. *Salmonella enteridis* ve *S. senftenberg*'in inhibisyonu için önce 55°C'de 15 dakika gibi bir ısı işlem, sonrasında nisin ve karvakrolun beraber kullanıldığı bir engeller uygulamasında sonuçlar antimikrobiyel içermeyen kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde inhibisyon derecesini yükselttiğini göstermiştir [84]. Aynı sinerjistik etki *Bacillus cereus* sporlarında etkili bir şekilde sağlanmış, hücrelerin çimlenme ve sporülasyon yeteneği ciddi oranda zayıflatılmıştır [85]. Tüm bu özetlenen bilgiler ışığında nisin ile termal inaktivasyon kinetiğinin optimizasyonu gerçekleştirildiğinde, ulaşılacak letal etkinin yüksek olacağı açıktır.

Vurgulu elektrik alan uygulaması (PEF) iki elektrotun arasında oluşturulan yüksek gerilim darbelerinin neden olduğu termal olmayan alternatif bir mikrobiyal inaktivasyon yöntemidir [86]. Burada uygulanan çok yüksek frekansta doğrudan elektrik akım uygulaması bakteri hücre zarı geçirgenliğinde hasara yol açmakta ve hücre ölümüne neden olmaktadır. PEF yöntemi volumetrik etkisinden ötürü akışkan özellikteki gıdalarda gerek yalnız başına gerek sinerjistik sonuç alınan antimikrobiyel ajan, kimyasallar veya fiziksel diğer işlemlerin kombine uygulamalarıyla mikrobiyal güvenlik amacı ile kullanılmaktadır. Engeller teknolojisi kapsamında uygulanan PEF'de, hasar almayan bakteri sporları devamında uygulanan bakteriyosinlerin antimikrobiyel etkisinden kurtulamaz (Şekil 3). Bu sinerjistik etkinlik PEF'e bağlı elektrik alan kuvveti, vurgu sayısı ve vurgu süresi gibi faktörlerin optimize edilmesine bağlı olarak değişiklik gösterir [87, 89].



Şekil 3. PEF yönteminin nisin ile birlikte kullanıldığında mikrobiyal popülasyonlar üzerinde oluşturduğu sinerjistik antimikrobiyel etki mekanizması [51]

PEF yönteminin nisin ile sinerjistik antimikrobiyel etkisinin esas alındığı birçok bilimsel çalışma bu yöntemin gıda muhafazasında ve biyogüvenliğinde kullanılmasına ışık tutmaktadır [3, 4, 90-93]. Nisin gibi antimikrobiyellerin orta derece ısı işlemlerle birlikte gerçekleştirilen PEF uygulamalarında özellikle meyve suyu gibi düşük asitli gıdalarda gelişebilen mikroorganizmaların vejetatif formları üzerinde etkili kontrol sağlanabilmektedir [4]. Ayrıca nisin ve PEF kombin uygulaması, kollajen jel yapılarında soruna neden olan *Staphylococcus epidermis* üzerinde yarattığı sinerjistik antimikrobiyel etkisinden dolayı doku mühendisliğinde de kullanım alanı bulmuştur [90] Nisin ve PEF kombin uygulamasının sinerjistik etkisi, fosfat tamponlu ortamda *Micrococcus luteus*'a, birada *Lb. plantarum*'a, yağsız sütte *S. aureus*'a ve *B. cereus*'un vejetatif hücrelerine de yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir [94, 97].

Birçok çalışmada PEF uygulamasına maruz bırakılmış Gram negatif bakteri hücrelerinin nisine karşı duyarlı olduğu gösterilmiştir [92, 93, 98, 99]. Portakal suyunda *Salmonella* inhibisyonu için yapılan PEF uygulamasını takiben meyve suyuna 27.5 IU/mL nisin ve 690 IU/mL lizozim ilave edilmesi ile oluşturulan sinerjistik antimikrobiyel etki sayesinde hücre canlılığında 2.75 logaritma azalma elde edilmiştir. Nisin ve lizozimin beraber kullanılması PEF ile hücre duvarı hasar gören hücreler üzerinde bakterisidal etkiyi artırmıştır [98]. Benzer bir başka çalışmada ise tarçından ekstrakte edilmiş sinamon ve nisin karışımı PEF ile beraber uygulandığında güçlü patojenitesi bulunan *E.coli* O157:H7 üzerinde 6-8 logaritma azalma sağlamıştır [99]. 1000 IU/mL nisin konsantrasyonu ile 11.25 kv/cm şiddette 3 atım ile gerçekleştirilen bir nisin-PEF uygulamasında elde edilen 4 logaritma azalmanın benzerine ulaşmak için 500 IU/mL nisin konsantrasyonu kullanıldığında ise aynı şiddette 5 atımlı PEF yapılması gerekmiştir [100]. Görüldüğü gibi sinerjistik antimikrobiyel etkinin elde edilebilmesi için kullanılan engellerden birinin gücü düşürüldüğünde diğerinin dengeli bir şekilde yükseltilmesi aynı efektif sonucu almayı sağlamaktadır. Bir diğer çalışmada ise portakal suyunda nisin ve PEF'in (40 Kv/cm, 100 mikrosaniye) sinerjistik antimikrobiyel etkisi *E. coli* K12, *L. innocua* ve *Pichia fermentas*'da sırasıyla 5.6, 7.9 ve 7.8 logaritma azalma olarak belirlenmiştir [3]. Sonuç olarak gıda kaynaklı patojenik veya saprofit mikroorganizmalara karşı PEF uygulamasından nisin ile oluşturduğu olumlu sinerjistik etkisinden dolayı faydalanılabilmektedir. Benzer sinerjistik antimikrobiyel etki diğer bakteriyosin kombinasyonları ile de gözlenmiştir. Fakat burada önemli olan husus kullanılacak olan bakteriyosinin antimikrobiyel engel oluşturabilmesi için PEF uygulamasına karşı dirençli olabilmesi, PEF uygulamasından sonra canlı kalan endosporlar üzerinde inhibitif etki gösterebilmesidir.

Mikrobiyal inaktivasyon amacıyla sıklıkla kullanılan ısı işlemlerin gıdalar üzerinde meydana getirdiği olumsuz etkileri azaltmak için geliştirilen alternatif muhafaza yöntemlerinden bir diğeri de Yüksek Hidrostatik Basınç (HHP) uygulamasıdır. HHP uygulaması, katı ve sıvı gıdaların ambalajlı veya ambalajsız olarak 100-1000

MPa basınca maruz bırakılması işlemi olup, bu basıncın mikroorganizmaların hücre zarında görev bozuklukları (malfonksiyonlar) membran proteinlerinin denatürasyonuna bağlı olarak, aminoasit alımının inhibisyonuna neden olmaktadır. Hücre morfolojisi basınç uygulamasıyla değişir ve hücre bölünmesi yavaşlar. Hücre için önemli enzimlerin denatüre olması ve ribozomun zarar görmesi mikroorganizmanın inaktivasyonuna neden olmaktadır [101]. Nisinin HHP uygulaması ile birlikte gösterdiği sinerjistik antimikrobiyel etki ise söz konusu iki engelin hücre zarında meydana getirdikleri kümülatif hasardan ileri gelmektedir [102, 106]. HHP uygulamasının antimikrobiyel etkinliği uygulanan bakteri popülasyonunun özelliklerine ve hücrelerin buldukları gelişim evrelerine göre değişkenlik gösterir. Nisin Gram negatif bakteriler üzerinde antimikrobiyel etkili olmamasına rağmen, HHP uygulamasından sonra ortama eklendiğinde Gram negatif bakteriler üzerinde güçlü inhibitif etki göstermektedir [107, 110]. Nisin ve pediosin karışımının HHP ile kombinasyonlu uygulanması sonucu *Clostridium* sporları üzerinde de inhibitif etkiye ulaşmıştır [111]. HHP uygulamasının etkinliği ayrıca uygulanan gıdanın biyolojik yapısı ile de ilgilidir. Et ve süt ürünleri kompleks kompozisyonuna sahip olmaları ve nötral pH'larda bulunmalarından dolayı HHP uygulamalarına karşı güçlü bariyer özelliği gösterirler. Fosfat tamponu içerisinde bulunan *E. coli* MG1655 suşunda 400 MPa HHP uygulaması ile canlılık oranında 7 logaritma azalma sağlanırken; aynı suş ile süt ortamında 700 MPa HHP uygulaması ile sadece 3 logaritma azalma sağlanabilmiştir. Süt ortamına ilave edilen 400 IU/mL nisin ve 400 µg/mL lizozimin oluşturduğu sinerjistik antimikrobiyel etki ile inhibisyon oranı artmıştır [112]. Benzer şekilde süt ortamında HHP uygulamalarına karşı direnç gösteren bakterilerin inaktivasyonunun nisin ilavesi ile artırıldığı başka çalışmalarla da gösterilmiştir [110]. Bu çalışmaların en önemli bulgusu HHP uygulamasının yüksek şiddetlerde kullanmak yerine, nisin gibi sinerjistik etkinin oluşturulabileceği alternatif antimikrobiyellerle birlikte kullanılmasıdır. Salatalık suyunda yapılan bir çalışmada, 350 MPa 10 dakika HHP ve 100 IU/mL nisin uygulamasıyla mikroflorada 4.5 logaritma azalma elde edilmiştir [102]. *Bacillus subtilis*'un inaktivasyonu için 100-500 MPa 15 dakika HHP ve 200 IU/mL nisin ile birlikte kullanılmış, hücrelerde meydana gelen ultramakroskopik yapıdaki moleküler değişimler geçirilmiş elektron mikroskopu aracılığıyla gözlemlenmiştir. Nötral pH'da gerçekleştirilen bu çalışma ile nisin+HHP uygulaması *B. subtilis* popülasyonu 2.5 logaritma azaltmış, hücrelerin membran geçirgenliğini %60 artırmıştır. Ayrıca HHP uygulaması hücre membranındaki fosfolipid molekülleri jelimsi bir yapıya dönüştürmüş, böylece nisin hücre içerisine girebildiği bildirilmiştir [103]. 7 logaritma düzeyinde *L. monocytogenes* inoküle edilmiş jambonlarda HHP ve nisin uygulaması ile 3.85 logaritma azalma kaydedilmiş, HHP ve nisin birlikte uygulamasının et ürünlerinin depolamasında mikrobiyal güvenliği desteklediği ifade edilmiştir [104]. *Salmonella enteritidis* suşunun inaktivasyonu, 200 IU/mL nisin ve 200 MPa HHP uygulamalarının ancak ikisi birden kullanıldığında başarılı olmuştur [105] Sıralanan bu bilimsel veriler, HHP ile nisin birlikte kullanılması

durumunda gıda sistemlerinde mikrobiyal riskin önlenmesi açısından önemli olduğunu ispatlamaktadır.

Bir diğer yenilikçi engel uygulaması ise; vurgulu (atımlı) ışık uygulamasıdır. Bu yöntemde infrared bölgeye yakın geniş spektrumlu dalga boyları ($200 \text{ nm}^{-1} \text{ mm}$) kullanılmaktadır. Peynir örneklerinde nisin ile vurgulu ışık uygulamalarının *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* and *Listeria innocua* üzerindeki sinerjistik antimikrobiyel etkisi araştırılmıştır [113]. Araştırmacılar peynir örneklerine nisin ilavesini gerçekleştirdikten sonra PL uygulamasının sinerjistik bir etki yaratmadığını, aksine bakterilerin UV ışıklarını absorbe etmelerinde zayıfladıklarını rapor etmişlerdir. Çalışmada PL ve bakteriyosin kullanım sırasının önem arz ettiği vurgulanmış; *L. innocua*'da 3.73 ± 0.96 logaritma azalmaya 9.22 J/cm^2 şiddetinde PL uygulamasından sonra yapılan nisin ilavesi ile ulaşılmıştır. Aynı örneklerde sadece PL uygulaması gerçekleştirildiğinde ulaşılan mikrobiyal inaktivasyon oranı 3.01 ± 0.48 logaritma olarak rapor edilmiştir. PL uygulamasının antilisteral etkinliğini artırmak için beraberinde nisin kullanıldığı bir başka çalışmada 4°C 'de 48 h depolanan sosis örneklerinde toplam 4.03 logaritma azalma gözlemlendiği kaydedilmiştir. Nisin ve PL'in birlikte uygulandığı bu engeller sistemi hazır gıdaların üretiminde etkin bir antilisteral adım olarak önerilmiştir [114].

SONUÇ

Tüketicilerin koruyucu içeren gıdalara karşı hassasiyeti, gıdaların korunmasında doğal yolların kullanılmasını ön plana çıkarmıştır. Diğer taraftan gıdalarda patojen mikroorganizmaların engellenmesi de tüketici sağlığı veya gıda güvenliği açısından oldukça önemlidir. Nisin, gıda sistemlerinde güvenle koruyucu olarak kullanılan önemli alternatif doğal koruyuculardan birisidir. Nisinin çeşitli kimyasal ve fiziksel işlemler ile birlikte kullanılması gıda sistemlerinde mikrobiyal inhibisyonu geliştirmektedir. Özellikle nisinin etkili olmadığı bakteriler bu şekilde durdurulabilmektedir.

Gıdaların üretiminde uygulanan muhafaza yöntemleri ile birlikte nisinin kullanılması, muhafaza yöntemlerinden kaynaklanan olumsuzlukların giderilmesi açısından da katkı sağlamaktadır. Özellikle gıda sisteminde nisinin kullanılması durumunda muhafaza yönteminin düşük uygulama değerlerinde mikrobiyal inhibisyon başarılılabilmektedir. Söz konusu uygulama ile gıdalarda ısı işlem esnasında karşılaşılan sorunların da önüne geçilebilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Komora, N., Bruschi, C., Magalhães, R., Ferreira, V., Teixeira, P., 2017. Survival of *Listeria monocytogenes* with different antibiotic resistance patterns to food-associated stresses. *International Journal of Food Microbiology* 20(245): 79-87.
- [2] Malekmohammadi, S., Kodjovi, K.K., Sherwood, J., Bergholz, T.M., 2017. Genetic and environmental factors influence *Listeria monocytogenes* nisin

- resistance. *Journal of Applied Microbiology* DOI: 10.1111/jam.13479. Baskıda.
- [3] McNamee, C., Noci, F., Cronin, D.A., Lyng, J.G., Morgan, D.J., Scannell, A.G., 2010. PEF based hurdle strategy to control *Pichia fermentans*, *Listeria innocua* and *Escherichia coli* k12 in orange juice. *International Journal of Food Microbiology* 138(1-2): 13-8.
- [4] Saldaña, G., Minor-Pérez, H., Raso, J., Alvarez, I., 2011. Combined effect of temperature, pH, and presence of nisin on inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. *Foodborne Pathogens and Disease* 8(7): 797-802.
- [5] Hurst, A., 1981. Nisin. *Advances in Applied Microbiology* 27(2): 85-123.
- [6] Abee, T., Rombouts, F.M., Hugenholtz, J., Guihard, G., Letellier, L., 1994. Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 60(4): 1962-1968.
- [7] Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J., Hugenholtz, J. 1996. Applications of bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek* 69(2): 193-202.
- [8] de Vuyst, L., Vandamme, E.J., 1994. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* properties, biosynthesis, fermentation and applications. *In Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. 151-221.
- [9] Ruhr, E., Sahl, H.G., 1985. Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. *Journal of Bacteriology* 27(5): 841-845.
- [10] Kordel, M., Sahl, H.G., 1986. Susceptibility of bacterial, eukaryotic and artificial membranes to the disruptive action of the cationic peptides Pep 5 and nisin. *FEMS Microbiology Letters* 34(2): 139-144.
- [11] Gao, F.H., Abee, T., Konings, W.N., 1991. Mechanism of action of the peptide antibiotic nisin in liposomes and cytochrome c oxidase-containing proteoliposomes. *Applied and Environmental Microbiology* 57(8): 2164-70.
- [12] Garcerá, M.J., Elferink, M.G., Driessen, A.J., Konings, W.N., 1993. In vitro pore-forming activity of the lantibiotic nisin. Role of proton motive force and lipid composition. *European Journal of Biochemistry* 212(2): 417-22.
- [13] Driessen, A.J., van den Hooven, H.W., Kuiper, W., van de Kamp, M., Sahl, H.G., Konings, R.N., Konings, W.N., 1995. Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. *Biochemistry* 34(5): 1606-14.
- [14] Demel, R.A., Peelen, T., Siezen, R.J., De Kruijff, B., Kuipers, O.P., 1996. Nisin Z, mutant nisin Z and lacticin 481 interactions with anionic lipids correlate with antimicrobial activity. A monolayer study. *European Journal of Biochemistry* 235 (1-2):267-74.
- [15] Martin, I., Ruyschaert, J.M., Sanders, D., Giffard, C.J., 1996. Interaction of the lantibiotic nisin with membranes revealed by fluorescence quenching of

- an introduced tryptophan. *European Journal of Biochemistry* 239(1): 156-164.
- [16] Breukink, E., van Kraaij, C., van Dalen, A., Demel, R.A., Siezen, R.J., de Kruijff, B., Kuipers, O.P., 1998. The orientation of nisin in membranes. *Biochemistry* 37(22): 8153-81562.
- [17] Van Den Hooven, H.W., Spronk, C.A., Van De Kamp, M., Konings, R.N., Hilbers, C.W., Van De Van, F.J., 1996. Surface location and orientation of the lantibiotic nisin bound to membrane-mimicking micelles of dodecylphosphocholine and of sodium dodecylsulphate. *European Journal of Biochemistry* 235(1-2): 394-403.
- [18] Brötz, H., Josten, M., Wiedemann, I., Schneider, U., Götz, F., Bierbaum, G., Sahl, H.G., 1998. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Molecular Microbiology* 30(2): 317-327.
- [19] Breukink, E., Wiedemann, I., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Sahl, H.G., de Kruijff, B., 1999. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* 286(48): 2361-2364.
- [20] Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Bierbaum, G., de Kruijff, B., Sahl, H.G., 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *Journal of Biological Chemistry* 276(3): 1772-1779.
- [21] Hsu, S.T., Breukink, E., de Kruijff, B., Kaptein, R., Bonvin, A.M., van Nuland, N.A., 2002. Mapping the targeted membrane pore formation mechanism by solution NMR: the nisin Z and lipid II interaction in SDS micelles. *Biochemistry* 41(24): 7670-7676.
- [22] Bonev, B.B., Breukink, E., Swiezewska, E., De Kruijff, B., Watts, A. 2004. Targeting extracellular pyrophosphates underpins the high selectivity of nisin. *The FASEB Journal* 18(15): 1862-1869.
- [23] Bauer, R., Dicks, L.M., 2005. Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *International Journal of Food Microbiology* 110(2): 201-216.
- [24] Hasper, H.E., Kramer, N.E., Smith, J.L., Hillman, J.D., Zachariah, C., Kuipers, O.P., de Kruijff, B., Breukink, E., 2006. An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II. *Science*. 313(5793): 1636-1637.
- [25] Morris, S.L., Walsh, R.C., Hansen, J.N., 1984. Identification and characterization of some bacterial membrane sulfhydryl groups which are targets of bacteriostatic and antibiotic action. *Journal of Biological Chemistry* 259(21): 13590-13594.
- [26] Buchman, G.W., Banerjee, S., Hansen, J.N., 1988. Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *Journal of Biological Chemistry* 263(31): 16260-16266.
- [27] Chan, W.C., Dodd, H.M., Horn, N., Maclean, K., Lian, L.Y., Bycroft, B.W., Gasson, M.J., Roberts, G.C., 1996. Structure-activity relationships in the peptide antibiotic nisin: role of dehydroalanine 5. *Applied and Environmental Microbiology* 62(8): 2966-2969.
- [28] Harris, L.J., Fleming, H.P., Klaenhammer, T.R., 1991. Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, Scott A and UAL 500 to nisin. *Journal of Food Protection* 54: 836-840.
- [29] Jydegaard, A.M., Gravesen, A., Knøchel, S., 2000. Growth condition-related response of *Listeria monocytogenes* 412 to bacteriocin inactivation. *Letters in Applied Microbiology* 31(1): 68-72.
- [30] Gill, A.O., Holley, R.A., 2003. Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* 180(3): 251-259.
- [31] Kurt, S., Zorba, O., 2010. Biogenic amine formation in Turkish dry fermented sausage (sucuk) as affected by nisin and nitrite. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90(15): 2669-2674.
- [32] Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B., 1995. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiological Reviews* 59(2): 171-200.
- [33] Stiles, M.E., 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70(2-4): 331-345.
- [34] Liu, W., Hansen, J.N., 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 56(8): 2551-2558.
- [35] Rollema, H.S., Kuipers, O.P., Both, P., de Vos, W.M., Siezen, R.J., 1995. Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. *Applied and Environmental Microbiology* 61(8): 2873-2878.
- [36] Buncic, S., Fitzgerald, S., Bell, C.M., Hudson, R.G., 1995. Individual and combined listericidal effects of sodium lactate, potassium sorbate, nisin and curing salts at refrigeration temperatures. *Journal of Food Safety* 15(3): 247-264.
- [37] Nykänen, A., Weckman, K., Lapveteläinen, A., 2000. Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked rainbow trout by nisin and sodium lactate. *International Journal of Food Microbiology* 61(1): 63-72.
- [38] Long, C., Phillips, C.A., 2003. The effect of sodium citrate, sodium lactate and nisin on the survival of *Arcobacter butzleri* NCTC 12481 on chicken. *Food Microbiology* 20(5): 495-502.
- [39] Ukuku, D.O., Fett, W.F., 2004. Effect of nisin in combination with EDTA, sodium lactate, and potassium sorbate for reducing *Salmonella* on whole and fresh-cut cantaloupe. *Journal of Food Protection* 67(10): 2143-2150.
- [40] Bari, M.L., Ukuku, D.O., Kawasaki, T., Inatsu, Y., Isshiki, K., Kawamoto, S., 2005. Combined efficacy of nisin and pediocin with sodium lactate, citric acid, phytic acid, and potassium sorbate and EDTA in reducing the *Listeria monocytogenes* population of inoculated fresh-cut produce. *Journal of Food Protection* 68(7): 1381-1387.
- [41] Boziaris, I.S., Humpheson, I., Adams, M.R., 1998. Effect of nisin on heat injury and inactivation of *Salmonella enteritidis* PT4. *International Journal of Food Microbiology* 43(1-2): 7-13.
- [42] Yethon, J.A., Whitfield, C., 2001. Lipopolysaccharide as a target for the development of novel therapeutics in Gram-negative bacteria.

- Current Drug Targets. Infectious Disorders* 1(2): 91-106.
- [43] Belfiore, C., Castellano, P., Vignolo, G., 2007. Reduction of *Escherichia coli* population following treatment with bacteriocins from lactic acid bacteria and chelators. *Food Microbiology* 24(3): 223-229.
- [44] Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A., Klaenhammer, T.R., 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 57(12): 3613-3615.
- [45] Cutter, C.N., Siragusa, G.R., 1995. Treatments with nisin and chelators to reduce *Salmonella* and *Escherichia coli* on beef. *Journal of Food Protection* 58(9): 1028-1030.
- [46] Boziaris, I.S., Adams, M.R., 1999. Effect of chelators and nisin produced in situ on inhibition and inactivation of Gram negatives. *International Journal of Food Microbiology* 53(2-3):105-113.
- [47] Jill, K.B., Davidson, J.M., 2004. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *International Journal of Food Microbiology* 90(1): 63-74.
- [48] Periago, P.M., Palop, A., Fernandez, P.S., 2001. Combined effect of nisin, carvacrol and thymol on the viability of *Bacillus cereus* heat-treated vegetative cells. *Food Science and Technology International* 7(6): 487-492.
- [49] Olasupo, N.A., Fitzgerald, D.J., Narrad, A., Gasson, M.J., 2004. Inhibition of *Bacillus subtilis* and *Listeria innocua* by nisin in combination with some naturally occurring organic compounds. *Journal of Food Protection* 67(3): 596-600.
- [50] Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 94(3): 223-253.
- [51] Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L., Omar, N., 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* 120(1-2): 51-70.
- [52] Lee, S.Y., Jin, H.H., 2008. Inhibitory activity of natural antimicrobial compounds alone or in combination with nisin against *Enterobacter sakazakii*. *Letters in Applied Microbiology* 47(4): 315-321.
- [53] Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., Botsoglou, N., 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. *Meat Science* 80(2): 159-166.
- [54] Yoon, J.I., Bajpai, V.K., Kang, S.C., 2011. Synergistic effect of nisin and cone essential oil of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu against *Listeria monocytogenes* in milk samples. *Food and Chemical Toxicology* 49(1): 109-114.
- [55] Rattanachaiyunsopon, P., Phumkhachorn, P., 2010. Synergistic antimicrobial effect of nisin and p-cymene on *Salmonella enterica* serovar *Typhi* in vitro and on ready-to-eat food. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 74(3): 520-524.
- [56] Pajohi, M.R., Tajik, H., Farshid, A.A., Basti, A.A., Hadian, M., 2011. Effects of *Mentha longifolia* L. essential oil and nisin alone and in combination on *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in a food model and bacterial ultrastructural changes. *Foodborne Pathogen and Disease* 8(2): 283-290.
- [57] Pajohi, M.R., Tajik, H., Farshid, A.A., Hadian, M., 2011. Synergistic antibacterial activity of the essential oil of *Cuminum cyminum* L. seed and nisin in a food model. *Journal of Applied Microbiology* 110(4):943-951.
- [58] Periago, P.M., Palop, A., Fernandez, P.S., 2001. Combined effect of nisin, carvacrol and thymol on the viability of *Bacillus cereus* heat-treated vegetative cells. *Food Science Technology International* 7(6): 487-492.
- [59] Yamazaki, K., Yamamoto, T., Kawai, Y., Inoue, N., 2004. Enhancement of antilisterial activity of essential oil constituents by nisin and diglycerol fatty acid ester. *Food Microbiology* 21(3): 283-289.
- [60] Yuste, J., Fung, D.Y., 2004. Inactivation of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice by a combination of nisin and cinnamon. *Journal of Food Protection* 67(2): 371-377.
- [61] Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., Saller, R., 2009. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties—an overview. *Forsch Komplementmed.* 16(2): 79-90.
- [62] Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P., Nychas, G.J.E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 91(3): 453-462.
- [63] Brewer, R., Adams, M.R., Park, S.F., 2002. Enhanced inactivation of *Listeria monocytogenes* by nisin in the presence of ethanol. *Letters in Applied Microbiology* 34(1):18-21.
- [64] Tokarsky, O., Marshall, L.D., 2008. Immunosensors for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 — Perspectives for use in the meat processing industry. *Food Microbiology* 25(1): 1-12.
- [65] Garcia, P., Martinez, B., Rodriguez, L., Rodriguez, A., 2010. Synergy between the phage endolysin LysH5 and nisin to kill *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. *International Journal of Food Microbiology* 141(3): 151-155.
- [66] Chai, C., Lee, K.S., Imm, G.S., Kim, Y.S., Oh, S.W., 2017. Inactivation of *Clostridium difficile* spore outgrowth by synergistic effects of nisin and lysozyme. *Canadian Journal of Microbiology* (Baskıda) doi: 10.1139/cjm-2016-0550.
- [67] Liu, F., Liu, M., Du, L., Wang, D., Geng, Z., Zhang, M., Sun, C., Xu, X., Zhu, Y., Xu, W., 2015. Synergistic antibacterial effect of the combination of ϵ -polylysine and nisin against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Food Protection* 78(12): 2200-2206.
- [68] Moreira, M.R., Álvarez, M.V., Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R., 2016. Effects of pulsed light treatments and pectin edible coatings on the quality of fresh-cut apples: a hurdle technology approach. *Journal of The Science of Food and Agriculture* doi: 10.1002/jsfa.7723.

- [69] Luo, K., Oh, D.H., 2016. Inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* on fresh-cut bell pepper treated with slightly acidic electrolyzed water combined with ultrasound and mild heat. *Food Microbiology* 53(Pt B): 165-171.
- [70] Montiel, R., Martín-Cabrejas, I., Medina, M., 2016. Natural antimicrobials and high-pressure treatments on the inactivation of *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in cold-smoked salmon. *Journal of The Science of Food and Agriculture* 96(7): 2573-2578.
- [71] Liato, V., Labrie, S., Viel, C., Benali, M., Aïder, M., 2015. Study of the combined effect of electro-activated solutions and heat treatment on the destruction of spores of *Clostridium sporogenes* and *Geobacillus stearothermophilus* in model solution and vegetable puree. *Anaerobe*. 35(Pt B): 11-21.
- [72] García-García, R., Escobedo-Avellaneda, Z., Tejada-Ortigoza, V., Martín-Belloso, O., Valdez-Fragoso, A., Welti-Chanes, J., 2015. Hurdle technology applied to prickly pear beverages for inhibiting *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* 60(6): 558-564.
- [73] Tango, C.N., Mansur, A.R., Kim, G.H., Oh, D.H., 2014. Synergetic effect of combined fumaric acid and slightly acidic electrolyzed water on the inactivation of food-borne pathogens and extending the shelf life of fresh beef. *Journal of Applied Microbiology* 117(6): 1709-1720.
- [74] Park, S.Y., Song, H.H., Ha, S.D., 2014. Synergistic effects of NaOCl and ultrasound combination on the reduction of *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* in raw laver. *Foodborne Pathogens and Disease* 11(5): 373-378.
- [75] Budu-Amoako, E., Ablett, R.F., Harris, J., Delves-Broughton, J., 1999. Combined effect of nisin and moderate heat on destruction of *Listeria monocytogenes* in cold-pack lobster meat. *Journal of Food Protection* 62(1): 46-50.
- [76] Modi, K.D., Chikindas, M.L., Montville, T.J., 2000. Sensitivity of nisin-resistant *Listeria monocytogenes* to heat and the synergistic action of heat and nisin. *Letters in Applied Microbiology* 30(3): 249-253.
- [77] Kalchayanand, N., Hanlin, M.B., Ray, B., 1992. Sublethal injury makes Gram negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins pediocin AcH and nisin. *Letters in Applied Microbiology* 15(6): 239-243.
- [78] Boziaris, I.S., Humpheson, I., Adams, M.R., 1998. Effect of nisin on heat injury and inactivation of *Salmonella enteritidis* PT4. *International Journal of Food Microbiology* 43(1-2): 7-13.
- [79] Abriouel, H., Valdivia, E., Gálvez, A., Maqueda, M., 1998. Response of *Salmonella choleraesuis* LT2 spheroplasts and permeabilized cells to the bacteriocin AS-48. *Applied and Environmental Microbiology* 64(11): 4623-4626.
- [80] Ananou, S., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., Valdivia, E., 2005. Synergistic effect of enterocin AS-48 in combination with outer membrane permeabilizing treatments against *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology* 99(6): 1364-1372.
- [81] Ros-Chumillas, M., Esteban, M.D., Huertas, J.P., Palop, A., 2015. Effect of Nisin and Thermal Treatments on the Heat Resistance of *Clostridium sporogenes* Spores. *Journal of Food Protection* 78(11): 2019-2023.
- [82] Naim, F., Zareifard, M.R., Zhu, S., Huizing, R.H., Grabowski, S., Marcotte, M., 2008. Combined effects of heat, nisin and acidification on the inactivation of *Clostridium sporogenes* spores in carrot-alginate particles: from kinetics to process validation. *Food Microbiology* 25(7): 936-941.
- [83] Aouadhi, C., Mejri, S., Maaroufi, A., 2015. Inhibitory effects of nisin and potassium sorbate alone or in combination on vegetative cells growth and spore germination of *Bacillus sporothermodurans* in milk. *Food Microbiology* 46: 40-45.
- [84] Esteban, M.D., Aznar, A., Fernández, P.S., Palop, A., 2013. Combined effect of nisin, carvacrol and a previous thermal treatment on the growth of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella senftenberg*. *Food Science Technology International* 19(4): 357-364.
- [85] Faille, C., Membre, J.M., Kubaczka, M., Gavini, F., 2002. Altered ability of *Bacillus cereus* spores to grow under unfavorable conditions (presence of nisin, low temperature, acidic pH, presence of NaCl) following heat treatment during sporulation. *Journal of Food Protection* 65(12): 1930-1936.
- [86] Vega-Mercado, H., Martín-Belloso, O., Qin, B.L., Chang, F.J., Góngora-Nieto, M.M., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G., 1997. Non-thermal food preservation: pulsed electric fields. *Trends in Food Science and Technology* 8(5): 151-157.
- [87] Wouters, P., Álvarez, I., Raso, J., 2001. Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric field food processing. *Trends in Food Science and Technology* 12(3-4): 112-121.
- [88] Bendicho, S., Barbosa-Cánovas, G.V., Martín, O., 2002. Milk processing by high intensity pulsed electric fields. *Trends in Food Science and Technology* 13(6-7): 195-204.
- [89] Heinz, V., Alvarez, I., Angersbach, A., Knorr, D., 2002. Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields-basic concepts for process design. *Trends in Food Science and Technology* 12(3-4): 103-111.
- [90] Griffiths, S., Maclean, M., Macgregor, S.J., Anderson, J.G., Helen Grant, M., 2011. Decontamination of collagen biomatrices with combined pulsed electric field and nisin treatment. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 96(2): 287-293.
- [91] Galvagno, M.A., Gil, G.R., Iannone, L.J., Cerrutti, P., 2007. Exploring the use of natural antimicrobial agents and pulsed electric fields to control spoilage bacteria during a beer production process. *Revista Argentina de Microbiología* 39(3): 170-176.
- [92] Santi, L., Cerrutti, P., Pilosof, A.M., de Huergo, M.S., 2003. Optimization of the conditions for electroporation and the addition nisin for

- Pseudomonas aeruginosa* inhibition. *Revista Argentina de Microbiología* 35(4): 198-204.
- [93] Terebiznik, M.R., Jagus, R.J., Cerrutti, P., De Huergo, M., Pilosof, A.M., 2002. Inactivation of *Escherichia coli* by a combination of nisin, pulsed electric fields, and water activity reduction by sodium chloride. *J of Food Prot.* 65(8): 1253-1258.
- [94] Dutreux, N., Notermans, S., Góngora-Nieto, M.M., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G., 2000. Effects of combined exposure of *Micrococcus luteus* to nisin and pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology* 60(2-3): 147-152.
- [95] Ulmer, H.M., Heinz, V., Gänzle, M.G., Knorr, D., Vogel, R.F., 2002. Effects of pulsed electric fields on inactivation and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* in model beer. *Journal of Applied Microbiology* 93(2):326-335.
- [96] Sobrino-Lopez, A., Martin Belloso, O., 2006. Enhancing inactivation of *Staphylococcus aureus* in skim milk by combining high-intensity pulsed electric fields and nisin. *Journal of Food Protection* 69(2):345-353.
- [97] Pol, I.E., Mastwijk, H.C., Bartels, P.V., Smid, E.J., 2000. Pulsed-electric field treatment enhances the bactericidal action of nisin against *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 66(1): 428-430.
- [98] Liang, Z., Mittal, G.S., Griffiths, M.W., 2002. Inactivation of *Salmonella typhimurium* in orange juice containing antimicrobial agents by pulsed electric field. *Journal of Food Protection* 65(7): 1081-1087.
- [99] Lu, J., Mittal, G.S., Griffiths, M.W. 2001. Reduction in levels of *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider by pulsed electric fields. *Journal of Food Protection* 64(7): 964-969.
- [100] Terebiznik, M.R., Jagus, R.J., Cerrutti, P., De Huergo, M., Pilosof, A.M., 2000. Combined effect of nisin and pulsed electric fields on the inactivation of *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection* 63(6): 741-746.
- [101] Farkas, D.F., Hoover, D.G., 2000. High pressure processing. In: Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing Technologies. *Journal of Food Science* 12(3): 47-64.
- [102] Zhao, L., Wang, Y., Wang, S., Li, H., Huang, W., Liao, X., 2014. Inactivation of naturally occurring microbiota in cucumber juice by pressure treatment. *International Journal of Food Microbiology* 174: 12-18.
- [103] Qi, W., Qian, P., Yu, J., Zhang, X., Zhang, C., Lu, R., 2011. Synergistic inactivation of *Bacillus subtilis* by high hydrostatic pressure and nisin at neutral pH. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 51(1): 35-42.
- [104] Hereu, A., Bover-Cid, S., Garriga, M., Aymerich, T., 2012. High hydrostatic pressure and biopreservation of dry-cured ham to meet the Food Safety Objectives for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 154(3): 107-112.
- [105] Lee, J., Kaletunç, G., 2010. Inactivation of *Salmonella enteritidis* strains by combination of high hydrostatic pressure and nisin. *International Journal of Food Microbiology* 140(1): 49-56.
- [106] López-Pedemonte, T., Roig-Sagués, A.X., Trujillo, A.J., Capellas, M., Guamis, B., 2003. Inactivation of spores of *Bacillus cereus* in cheese by high hydrostatic pressure with the addition of nisin or lysozyme. *Journal of Dairy Science* 86(10): 3075-3081.
- [107] Kalchayanand, N., Sikes, A., Dunne, C.P., Ray, B., 1994. Hydrostatic pressure and electroporation have increased bactericidal efficiency in combination with bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology* 60(11): 4174-4177.
- [108] Hauben, K.J.A., Wuytack, E.Y., Soontjens, C.C.F., Michiels, C.W., 1996. High pressure transient sensitization of *Escherichia coli* to lysozyme and nisin by disruption of outer membrane permeability. *Journal of Food Protection* 59(4): 350-355.
- [109] Masschalck, B., Van Houdt, R., Michiels, C.W., 2001. High pressure increases bactericidal activity and spectrum of lactoferrin, lactoferricin and nisin. *International Journal of Food Microbiology* 64(3): 325-332.
- [110] Black, E.P., Kelly, A.L., Fitzgerald, G.F., 2005. The combined effect of high pressure and nisin on inactivation of microorganisms in milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 6(3): 286-292.
- [111] Kalchayanand, N., Dunne, C.P., Sikes, A., Ray, B., 2004. Germination induction and inactivation of *Clostridium* spores at medium-range hydrostatic pressure treatment. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 5(3): 277-283.
- [112] Garcia-Graells, C., Masschalck, B., Michiels, C.W., 1999. Inactivation of *Escherichia coli* in milk by high-hydrostatic-pressure treatment in combination with antimicrobial peptides. *Journal of Food Protection* 62(11): 1248-1254.
- [113] Proulx, J., Sullivan, G., Marostegan, L.F., VanWees, S., Hsu, L.C., Moraru, Cl., 2017. Pulsed light and antimicrobial combination treatments for surface decontamination of cheese: Favorable and antagonistic effects. *Journal of Dairy Science* 100(3): 1664-1673.
- [114] Uesugi, AR., Moraru, Cl., 2009. Reduction of *Listeria* on ready-to-eat sausages after exposure to a combination of pulsed light and nisin. *Journal of Food Protection* 72(2): 347-53.

Geleneksel Fermente Bir İçecek: Boza

Hacer Levent¹, Özge Algan Cavuldak²¹Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Karaman²Bülent Ecevit Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Zonguldak

Geliş Tarihi (Received): 27.04.2016, Kabul Tarihi (Accepted): 20.08.2016

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): hacerlevent@hotmail.com (H. Levent)

☎ 0 338 226 21 31 📠 0 338 226 21 34

ÖZ

Gıda üretim ve muhafazasında en eski ve ekonomik yöntemlerden birisi fermantasyon teknolojisidir. Fermente gıdalar sağlık üzerine olumlu etkilerinden dolayı dünya çapında yaygın olarak üretilip tüketilmektedir. Besinsel değer, duyuşal özellikler ile sindirilebilirlik açısından üstün özelliklere sahiptirler. Geleneksel, fermente tahıl bazlı bir içecek olan boza darı, mısır, pirinç, buğday gibi tahıllardan elde edilmektedir. Boza, karakteristik tatlı-ekşimsi bir tada, açık sarı renge ve asidik-alkollü bir kokuya sahiptir. Üretiminde kullanılan hammaddeye ve uygulanan fermantasyon yöntemine bağlı olarak bozanın kalite özellikleri de farklı olabilmektedir. Tatı, lezzeti ve besinsel değeri nedeni ile bozanın geleneksel fermente içecekler arasında önemli bir yeri bulunmaktadır. Özellikle kış aylarının içeceği olan boza dünyanın pek çok ülkesinde bilinmektedir. Bu derlemede bozanın üretimi, ürün özellikleri, muhafazası ve sağlık üzerine etkileri hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Boza, Fermantasyon, Tahıl, Sağlık

A Traditional Fermented Beverage: Boza

ABSTRACT

Fermentation technology is one of the oldest and most economical methods of food production and preservation. Fermented foods are widely produced and consumed worldwide because of their beneficial effects on human health. They have superior properties in terms of nutritional value, sensory properties and digestibility. Boza, a traditional cereal based fermented beverage, is produced with millet, maize, rice and wheat. It has a characteristic sweet-sour taste, light yellow color and acidic-alcoholic odor. The quality parameters of boza may vary with the type of raw materials and fermentation methods used in production. Boza has an important place among traditional fermented beverages, owing to its taste, flavor and nutritive value. Boza, especially consumed in winter, is known in many countries around the world. In this study, production methods, product characteristics, storage and health effects of boza were reviewed.

Keywords: Boza, Fermentation, Cereal, Health

GİRİŞ

Bitkisel protein, karbonhidrat, vitamin, mineral ve posa kaynağı olarak insan beslenmesinde önemli bir yere

sahip olan tahıllar özellikle lizin gibi bazı esansiyel aminoasitler açısından fakirdir. Bu gıdaların besleyici değerini, duyuşal özelliklerini ve fonksiyonel kalitesini artırmak amacıyla uygulanabilecek en basit ve

ekonomik yollardan biri de fermantasyondur [1, 2]. Tahıllar dünyanın pek çok yerinde fermente edilmekte, fermantasyonda farklı hammaddeler, starter kültürler ve fermantasyon koşulları uygulanmaktadır [3]. Fermantasyonda daha çok laktik asit bakterileri ile mayalar kullanılmaktadır. Laktik asit bakterileri ürettikleri çeşitli antimikrobiyal bileşikler ile özellikle gıda maddelerinin bozulmasına ve gıda kaynaklı hastalıklara neden olan bakterilerin gelişimini engellemekte ve böylece gıdaların doğal olarak korunmasında önemli rol oynamaktadır. Ayrıca laktik asit fermantasyonu ile üretilmiş tahıl bazlı fermente ürünlerde çeşitli aroma bileşenleri de üretilmektedir. Mikrobiyolojik olarak daha dayanıklı bir ürün elde edilmesinde fermantasyon sırasında oluşan organik asitler, H₂O₂ ve bakteriyosin gibi metabolitler etkili olmaktadır [3, 4].

Boza kelimesinin esası Farsça'da "darı" anlamına gelen "buze" dir [5]. "Boza" ismi yanında Kafkasya, Balkan ülkeleri, Türk Cumhuriyetleri ile İran, Mısır, Arap ülkeleri ve bazı Afrika kabilelerinde "Buha" ve "Merissa" gibi isimlerle de bilinmektedir [5, 6]. Fermente tahıl bazlı bir içecek olan boza; darı, mısır, pirinç, çavdar, yulaf, buğday gibi tahılların öğütülmesi, su ilave edilerek pişirilmesi ve daha sonra şeker eklenerek maya ile laktik asit fermantasyonuna tabi tutulması ile üretilmektedir. Bozanın kıvamı koyu olup, açık sarı bir renge, tatlı-ekşimsi lezzete ve asidik-alkollü bir kokuya sahiptir [7, 8]. Fermantasyon ürünleri olan laktik asit ve CO₂ bozaya lezzet ve ferahlatıcı özellik vermektedir [5, 9]. Kullanılan tahıl çeşitleri, oransal farklılıkları ve kontrolsüz fermantasyon koşulları üretilen bozanın kompozisyonunda farklılıklara neden olmaktadır [7, 10]. Boza ile bira, ürün özellikleri ve hazırlanma şekilleri bakımından farklı olmakla birlikte, boza en eski bira olarak kabul edilmektedir [11]. Bozada alkol fermantasyonunun yanı sıra laktik asit fermantasyonun da gerçekleşiyor olması ve etil alkol oranının düşük olması (maksimum %2) bozayı biradan ayırmaktadır [5].

Orta Asya Türkleri bozayı çok eski zamanlardan beri üretmektedir. Türkler, Orta Asya'dan göç ettikleri farklı coğrafyalarda o bölge halkına bozayı tanıtmışlar ve bugünkü coğrafi yayılışını da sağlamışlardır [5]. Geleneksel bir Türk içeceği olan boza, Balkanlar, Kırım, Kafkasya, Orta Asya ve Mısır'a kadar yayılmış durumdadır [12, 13]. Ülkemizde ve diğer ülkelerde üretilen boza arasındaki farklılıkların nedeni kullanılan hammaddeler, üretim metodu ve alkol içeriğidir [14]. Ülkemizde üretilen bozada alkol oranının %1 civarında olduğu diğer ülkelerde ise bu oranın %1-6 olduğu bildirilmektedir [5, 9]. Bozanın ilk üreticileri Türkler olmasına rağmen ülkemizde uzun yıllar ihmal edilmiş sadece kışın sokak aralarında satılan ve tüketilen bir ürün olarak tanınmıştır. Bu da Doğu Avrupa ve Balkan ülkelerinin bozayı kendi geleneksel ürünleri arasında tanıtmalarına olanak sağlamıştır [15].

Bu derlemede fermente içecek olan bozanın önemi, üretimi, ürün özellikleri ve sağlık üzerine olumlu etkileri hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

BOZA ÜRETİMİ

Boza Standardı'na (TS 9778) göre boza, "yabancı maddelerinden temizlenmiş darı, pirinç, buğday, mısır ve benzeri hububatın kırma veya unlarından biri veya bir kaçına içme suyu katılarak pişirilmesi ve beyaz şeker ilave edilerek tekniğine uygun olarak alkol ve laktik asit fermentasyonlarına tabi tutulması ile hazırlanan bir mamul" olarak tanımlanmaktadır [16]. Ülkemizde boza üretiminde bütün tahılların unu ya da irmiği kullanılmakla birlikte en uygun tat ve lezzeti olan bozanın darıdan elde edildiği belirtilmektedir [14]. Bozanın ürün özelliklerini etkileyen en önemli faktörler üretiminde kullanılan tahıl ya da tahıl çeşidi, formülasyondaki miktarı, fermantasyon süresi ve sıcaklığıdır [10, 13]. Bozada başlıca iki tip fermantasyon gerçekleşmektedir. Biri maya hücrelerinin gerçekleştirdiği alkol fermantasyonu olup üretilen CO₂ gazı ile hacimsel artış gözlenmektedir. Diğeri ise laktik asit bakterilerinin rol aldığı laktik asit fermantasyonu olup oluşan laktik asit bozanın asidik karakterini sağlamaktadır [14]. Fermantasyon işlemi ile bozada serbest asitlik değeri yükselmekte, pH değeri düşmekte ve laktik asit bakterileri tarafından üretilen metabolit ürünlerle birlikte ürün karakteristik bir lezzet kazanmaktadır [8, 17]. Fermente edilmeyen bozada pH değeri 4.1-6.7 aralığında iken fermantasyon ile 4.0 veya daha da altına düşmektedir [5, 9]. Bozanın üretim basamakları Şekil 1'de özetlenmiştir.

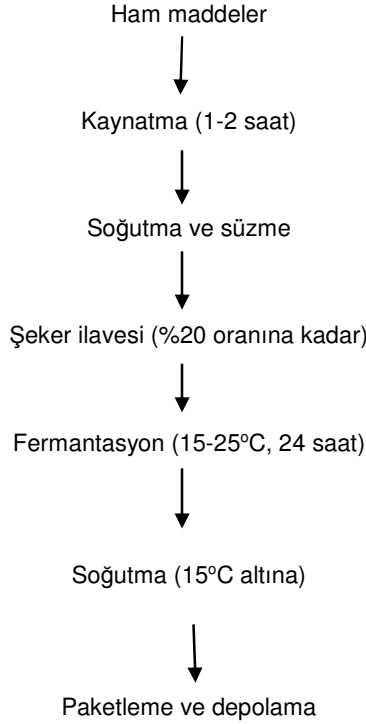
Tamer [18] tarafından yapılan bir çalışmada bozaya çeşitli meyvelerin ilavesiyle besince zenginleştirilmesi, meyve aromalarının eklenmesiyle duyuşal özelliklerinin geliştirilmesi ve pastörizasyon uygulamasıyla da muhafaza süresinin artırılması amaçlanmıştır. Üretilen bozalar arasında karışık meyveli, elmalı ve kayısı bozalar ile kayısı aromalı ve elma aromalı bozalar en çok tercih edilenler olmuştur [18]. Sade, %3, %6 ve %9 oranında keçiyoynuzu unu ilavesi ile üretilen bozaların çeşitli özelliklerinin incelendiği bir çalışmada ise, keçiyoynuzu unu oranının artmasının fermantasyonu hızlandırdığı, asitlik ve alkol miktarında da artışa neden olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada, üretilen boza örnekleri arasında %9 oranında keçiyoynuzu unu içeren boza duyuşal açıdan en düşük kabul edilebilirliği almıştır [19].

Çelik ve ark. [20] tarafından boza üretiminde kullanılan mısır, buğday ve pirinç unu farklı oranlarda leblebi unu ile ikame edilerek boza üretimi gerçekleştirilmiş ve leblebi unu ilavesinin bozanın protein ve mineral miktarını arttırdığı, sadece leblebi unu ile üretilen bozaya göre leblebi unu katkılı örneklerin daha yüksek genel kabul edilebilirlik puanı aldığı bildirilmiştir. Kontrol boza örneği ile karşılaştırıldığında farklı oranlarda leblebi unu içeren örneklerin daha yüksek alkol, asitlik, organik asit ve daha düşük sukroz içeriğine sahip olduğu rapor edilmiştir. Leblebi unu ile üretilen bozanın çölyak hastaları için alternatif bir ürün olabileceği belirtilmiştir [20].

Coşkun ve Çakır [21] tarafından yapılan bir çalışmada ise tarçın, adaçayı, limon ve karanfil ilavesinin bozanın aroması ve raf ömrü üzerine etkisi incelenmiş, ham boza baharatlarla 1 gün fermente edildikten sonra 5 gün

buzdolabında muhafaza edilmiştir. Mezofilik aerobik bakteri sayısında en çok azalma karanfil katkıli bozada; laktik asit bakteri sayısında en çok azalma ise adaçayı katkıli bozada bunun yanısıra maya sayısında en çok azalma da karanfil, tarçın ve adaçayı katkıli bozada

belirlendiği bildirilmiştir. Duyusal analiz sonuçlarına göre, 4 gün depolama sonunda en yüksek görünüş puanını ham boza, aroma ve kıvam puanını ise tarçınli bozanın aldığı belirtilmiştir.



Şekil 1. Boza üretim basamakları [14]

BOZANIN KİMYASAL KOMPOZİSYONU

Boza asitlik değerine göre "tatlı boza" ve "ekşi boza" şeklinde iki sınıfa ayrılmaktadır [16]. Boza Standardı'na (TS 9778) göre bozada toplam kuru madde en az %20, sakkaroz cinsinden toplam şeker en az % 10 olmalı, etil

alkol içeriği ise hacimce %2'yi geçmemelidir. Laktik asit cinsinden asitlik değeri tatlı bozada %0.2-0.5 ekşi bozada ise %0.5-1.0 olmalıdır [16]. Literatürde yapılan çalışmalarda belirlenen, boza örneklerinin kimyasal bileşimine ait sonuçlar Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Bozanın kimyasal bileşimi

Örnek*	Toplam Kurumadde (%)	Protein (%)	Toplam Şeker (%)	Kül (%)	Asitlik**	pH	Alkol (%)	Kaynak
A	18.99-25.70	0.27-0.56	10.64-16.05	0.07-0.17	0.18-0.34			[15]
B	17.26-22.32	-	16.11-22.59	0.02-0.17	0.15-0.50	3.22-3.82	0.03-0.39	[9]
C	15.30-31.10	0.50-0.99	-	-	-	3.16-4.02	-	[22]
D	-	1.870-2.755	-	-	0.21-0.36	3.94-4.63	-	[23]
E	-	-	-	-	-	3.20-3.50	-	[24]
F	5.57-29.82	-	-	-	0.13-0.47	3.11-4.59	-	[6]
G	14.39-24.07	0.46-0.65	6.63-22.62	0.17-0.44	0.25-0.30	3.47-3.95	-	[25]
H	23.40	1.38	16.60	0.33	0.92	3.80	0.42	[26]
I	14.49-28.03	0.477-1.012	7.33-21.89	0.057-0.158	0.242-0.448	2.93-3.72	0.138-0.525	[14, 27]
j	27.46-29.17	1.22-2.00	16.16-19.20	0.81-0.93	-	-	-	[14, 28]
J	25.20-27.90	1.14-1.93	17.10-18.15	0.12-0.18	-	-	-	[29]
J	24.85	1.06	12.3	0.09	0.5	-	-	[29]

*: A: Bursa'daki farklı pastanelerden toplanan 10 boza örneği, B: İzmir'de farklı satış yerlerinden alınan 9 boza örneği, C: Türkiye'de çeşitli marketlerden sağlanan farklı markalarda 10 boza örneği, D: Eskişehir'de yerel marketlerden sağlanan 5 farklı markaya ait boza örneği, E: Bulgaristan'da yerel üreticilerden sağlanan 3 boza örneği, F: Trakya'da 9 farklı üreticiden sağlanan 27 adet boza örneği, G: İstanbul'dan 3 farklı üreticiden temin edilen 3 adet boza örneği, H: İstanbul'da üreticiden temin edilen boza örneği, I: Laboratuvar üretimi boza örneği, I: Laboratuvar üretimi boza örneği, J: Laboratuvar üretimi boza örneği, **: % laktik asit

Hancıoğlu ve Karapınar [17] tarafından, bozada 24 saat fermantasyon süresince kimyasal özelliklerdeki değişim izlenmiş, fermantasyon sonunda toplam asitliğin %0.02'den %0.27'e, alkol içeriğinin %0.02'den %0.79'a yükseldiği; pH değerinin ise 6.13'den 3.48'e düştüğü

belirlenmiştir. Akpınar-Bayizit ve ark. [7] ise yaptıkları çalışmada en yüksek toplam asitlik değerini (%0.61±0.07) buğday bozasında, en düşük toplam asitlik değerini ise (%0.32±0.04) darı bozasında belirlemişlerdir. Aynı çalışmada örneklerin pH değeri

3.43-3.86 aralığında bulunurken, buğday bozasının alkol içeriği (%0.46±0.04) daha düşük bulunmuştur.

Bozanın kimyasal özelliklerinin yanı sıra sağlık üzerine etkilerine dair yapılan araştırmalar bozanın fenolik bileşenler ve antioksidan aktivite açısından önemli bir kaynak olduğunu ortaya koymaktadır. Bozanın hammaddesi olan tam taneli tahıllar fenolik maddeler açısından oldukça zengindir. Fenolik asitler ve flavonoidler gibi çoğu fenolik bileşiğin tahıllarda bulunduğunu gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. Tahıllarda bulunan başlıca fenolik asitler; ferulik ve p-kumarik asit iken başlıca flavonoid ise antosiyaninlerdir [30-33]. Fenolik bileşikler antioksidan özelliklere sahip olup kanser ve kalp hastalıkları gibi serbest radikallerin rol aldığı dejeneratif hastalıklara karşı koruyucu etki göstermektedir [30, 34]. Fenolik bileşiklerin tahılların antioksidatif potansiyeline, diğer bir deyişle sağlık üzerine olumlu etkilerine katkısı olduğu bilinmektedir [35, 36]. Berktaş [37] tarafından yapılan çalışmada, farklı oranlarda darı, bulgur, beyaz pirinç, kepekli pirinç ve mısır kullanılarak boza üretimi gerçekleştirilmiş ve bu hammaddelerin, bozanın toplam fenolik ve flavonoid içeriği ile antioksidan aktivitesine olan etkisi incelenmiştir. Boza üretiminde hammadde olarak bulgurla beraber mısır ya da kepekli pirinç kullanımının, bozanın toplam fenolik içeriğini ve antioksidan aktivitesini ticari boza örneğine göre artırdığı belirlenmiştir. Özpınar [38] ise kefir ve bozanın antioksidan aktivitelerini belirlediği araştırmasında bu ürünlerin sahip oldukları yüksek antioksidan kapasite nedeni ile doğal antioksidan olarak tüketilebileceklerini bildirmiştir. Bosna-Hersek'te bazı geleneksel alkolsüz içeceklerin antioksidan aktivitesinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise, geleneksel olarak hazırlanan içeceklerin ticari üretime göre daha yüksek antioksidan aktivite değerine sahip oldukları belirlenmiştir. Aynı çalışmada araştırılan boza örneklerinin toplam fenolik madde içerikleri 273.15-210.59 mg TAE/L iken, antosiyanidin içerikleri 956.04-1539.83 mg kateşin/L olarak bulunmuştur [39].

Bozanın sağlık üzerine etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada dejeneratif hastalıklar arasında oldukça önemi olan hipertansiyon ile boza ilişkisi incelenmiştir. Hipertansiyon ve buna bağlı kalp damar hastalıklarının tedavisinde ACE (Anjiyotensin I dönüştürücü enzim) inhibitörü etkisine sahip biyoaktif peptitlerin önemi bilinmektedir. Yapılan çalışmada, bozanın kan basıncını düzenleyici (ACE inhibitörü) etkiye sahip peptitler açısından iyi bir kaynak olduğu ve bu nedenle gazlı içecekler yerine tüketicilere bozanın önerilmesi gerektiği bildirilmiştir [40].

BOZANIN MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ

Bozada, laktik asit bakterilerinden *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Weissella* ve mayalardan *Candida*, *Clavispora*, *Coniochaeta*, *Cryptococcus*, *Cystofilobasidium*, *Geotrichum*, *Issatchenkia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Trichosporon* cinslerine ait çok sayıda alt tür izole edilmiştir [3, 10, 17, 24, 41-48]. Bozada laktik asit bakterilerin sayısının maya

sayısından daha yüksek olduğu dolayısıyla laktik asit bakterilerinin bozada dominant mikroflora olduğu belirtilmiştir [49]. Farklı boza örneklerinde, bakteri ve maya popülasyonundaki çeşitliliğin kullanılan hammadde, üretim prosesi ve depolama koşullarından kaynaklanabileceği bildirilmektedir [44]. Bazı patojen mikroorganizmaların da izole edilebilmesi, ticari boza üretiminde GRAS statüsünde starter kültür geliştirilmesinin önemini ortaya koymaktadır [44]. Mısır, pirinç ve buğday unu kullanılarak üretilen bozada en uygun starter kültür kombinasyonu belirlenmeye çalışılmış ve duyuşal özellikler açısından en uygun kombinasyonun *S. cerevisia* + *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* + *L. confusus* olduğu bildirilmiştir [29]. Tornuk ve ark. [50] tarafından yapılan bir başka çalışmada ise boza üretiminde farklı starter kültür kombinasyonları kullanılmış ve ticari boza ve *L. acidophilus* + *L. casei* Shiota kullanılarak fermente edilen bozanın en yüksek duyuşal puanı aldığı belirtilmiştir. Tahıl bazlı içeceklerde starter kültür içinde maya bulunmasının alkol oranını önemli miktarda yüksek olmasını sağladığı rapor edilmektedir [51]. Öztürk ve ark. [52] tarafından yapılan bir çalışmada, probiyotik alkolsüz bozanın *Lb. casei* Shiota kültürü ile üretilebileceği, *Lb. casei* Shiota'nın depolama sırasında adaptasyonu ve canlı kalması konusunda bir sorun olmadığı ve üretilen bozanın genel kabul edilebilirliğinin yüksek olduğu bildirilmiştir.

Fermantasyon sırasında laktik asit bakterilerinin metabolizması sonucu oluşan antimikrobiyal maddelerden biri protein yapısında olan bakteriyosinlerdir [4, 53]. Bakteriyosinler, bakteriler tarafından ribozomal olarak sentezlenen, protein doğasında, antagonistik etkiye sahip bileşiklerdir [54]. Yapılan farklı çalışmalarda bozadan izole edilen laktik asit bakterileri içerisinde yüksek oranda bakteriyosin üreticisi alt türlere rastlanmıştır [12, 41, 43, 55-57]. Çeşitli çalışmalarda laktik asit bakterilerinden *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* tarafından üretilen mesentericin ST99 [58], *Leuconostoc pseudomesenteroides* tarafından üretilen leucocin B-KM432Bz [59], *Pediococcus pentosaceus* tarafından üretilen pediocin ST18 [56], *L. plantarum* tarafından üretilen ST194BZ, ST414BZ ve ST664BZ, *Lactobacillus pentosus* tarafından üretilen ST712BZ, *Lactobacillus rhamnosus* tarafından üretilen ST461BZ ve ST462BZ, *Lactobacillus paracasei* tarafından üretilen ST242BZ ve ST284BZ [43], *L. plantarum* tarafından üretilen JW3BZ ve JW6BZ, *Lactobacillus fermentum* tarafından üretilen JW11BZ ve JW15BZ [57] bakteriyosinleri tanımlanmıştır.

Bozadan izole edilen laktik asit bakterilerinden *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. ile *Leuconostoc* spp. cinslerinin alt türleri özellikle Gram-pozitif bakteriler üzerine antimikrobiyal aktivite göstermektedir [3]. Bazı araştırmacılar bozadan izole edilen suşların Gram-negatif bakterilere karşı da etkili olduğunu belirtmiştir [3, 41, 60]. Kabadjova ve ark. [41] tarafından yapılan çalışmada bozadan izole edilen laktik asit bakterilerinin *Listeria innocua* dahil çeşitli Gram-pozitif bakterilere ve *E. coli* gibi Gram-negatif bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkisinin olduğu saptanmıştır. Bu bakterilerden

Lactococcus lactis subsp. *lactis*'in ürettiği antimikrobiyal bileşik bakteriyosin olarak tanımlanmıştır. Koral ve Tuncer [61] tarafından bozadan izole edilen *L. lactis* subsp. *lactis* GYL32 suşunun nisin Z ürettiği ve bu suşun gıda güvenliğinin artırılması amacı ile starter kültür olarak kullanılabilmesi belirlenmiştir. Ivanova ve ark. [55] Bulgar bozasından izole edilen *L.lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen bakteriyosin B14' ü tanımlamıştır. Bu bakteriyosin Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin gelişimini engellemektedir. Türk bozalarından izole edilen laktik asit bakterilerinin antibakteriyel aktivite özelliklerinin incelendiği bir çalışmada *L. lactis* subsp. *lactis* bakteriyosin üreticisi olarak belirlenmiştir [12, 60]. Kıvanç ve ark. [45]'nin yaptıkları çalışmada boza örneklerinden elde edilen izolatların gıda kaynaklı bakterilerin patojenlere karşı inhibitör etkisi araştırılmış ve *L. lactis* subsp. *lactis* (2 izolat), *Leuconostoc citreum* (5 izolat), *L. brevis* (4 izolat), *L. plantarum* (24 izolat), *L.paraplantarum* (1 izolat), *L. graminis* (4 izolat), *L. paracasei* subsp. *paracasei* (3 izolat), *Enterococcus faecium* (1 izolat), *Pediococcus spp.* (1 izolat) antimikrobiyal aktiviteye sahip olarak tanımlanmıştır. Bozanın çeşitli mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal etkisinin incelendiği bir başka çalışmada ise antimikrobiyal etkinin toplam bakteri > *E.coli* > *L. monocytogenes* > *S. pneumonia* > *B.cereus* olduğu gözlenmiştir [62].

Laktik asit bakterileri, bakteriyosin üretiminin yanı sıra probiyotik olma özellikleri ile de ilgi çekmektedir. Geleneksel bozanın içerdiği bazı mikroorganizmaların probiyotik etkiye sahip olabileceği ancak üretimde belirli bir starter kültür kullanılmaması ve kontrolsüz fermantasyon prosesi nedeniyle bunun kesin olarak nitelendirilmesinin mümkün olmadığı belirtilmektedir [63]. Boza üretimi için geliştirilecek starter kültürlerde probiyotik ve antimikrobiyal özellik gösteren suşlar seçildiğinde ürünün fonksiyonel özelliği de artmış olacaktır [10]. Todorov ve ark. [64] tarafından yapılan çalışmada bozadan izole edilen *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* ve *L. pentosus*'un probiyotik özellikleri değerlendirilmiş ve bozanın fonksiyonel gıda olarak değerlendirilebileceği belirtilmiştir. Arslan ve ark. [63]'nin çalışmasında ise, probiyotik özelliği tescilli mikroorganizmaların (*Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 ve *Bifidobacterium bifidum* BB-12) starter kültür olarak kullanılması ile üretilen bozanın özellikleri incelenmiş ve kesin probiyotik karakterde üretilen ürün yardımıyla toplum sağlığının geliştirilmesine katkıda bulunabileceği belirtilmiştir [63]. Bozanın laktik mikroflorasının belirlendiği ve laktik mikrofloranın emülgatör, stabilizatör gibi özelliklerinin yanı sıra prebiyotik, anti-tümör, anti-ülser etkileri de olan ekzopolisakkaritleri oluşturma kapasitesinin incelendiği bir çalışmada, *Leuconostoc citreum*, *Lactobacillus coprophilus* ve *Leuconostoc mesenteroides/dextranicum* ekzopolisakkaritleri en fazla miktarda üreten türler olarak bildirilmiştir [65]. Heperkan ve ark. [25] yaptıkları çalışmada *Leuconostoc citreum* (E55) ve *Lactococcus lactis* (A47)'in en yüksek miktarda ekzopolisakkarit üreten suşlar olarak belirlendiğini rapor etmişlerdir.

Bozanın mikrobiyolojik özellikleri üzerine yapılan çalışmalar arasında bozada mikotoksin ve biyojen amin

varlığını inceleyen araştırmalar da mevcuttur. Uysal ve ark. [23] tarafından yapılan çalışmada bozada *Aspergillus fumigatus*, *Acremonium spp.*, *Geotrichum candidum*, *G. capitatum*, *Penicillium chrysogenum* ve *Fusarium oxysporum* izole edilmiştir. İncelenen beş boza örneğinin ikisinde okratoksin A saptanmıştır [23]. Boza; mikrobiyal florası, pH değeri, üretimde kullanılan hammaddeler ve kötü sanitasyon koşullarına bağlı olarak fermentasyon süresince biyojen amin oluşumu için uygun koşullara sahiptir [22, 66]. Yeğin ve Üren [22]'in çalışmasında Türkiye'de çeşitli üreticilerden sağlanan bozalarda 11 biyojen amin belirlenirken, örneklerin toplam biyojen amin içeriklerinin 25-69 mg/kg arasında değiştiği; putresin, spermidin ve tiramin' in tüm boza örneklerinde bulunduğu saptanmıştır. 21 boza örneğinde yapılan diğer bir çalışmada ise örneklerin biyojen amin içeriğinde geniş bir çeşitlilik saptanırken toplam biyojen amin içeriği 1.67-101.14 mg/kg aralığında belirlenmiştir [66]. Boza tüketiminin sağlıklı insanlarda güvenilir olduğu ancak özellikle monoaminooksidaz inhibitörü ilaç kullanan hastalarda sağlık problemlerine yol açabileceği vurgulanmıştır [22, 66].

BOZANIN MUHAFAZASI

Boza hem kış aylarında hem de içerdiği laktik asitlerin serinletici etkisiyle yaz aylarında tüketilen geleneksel fermente bir içeceğimizdir. Ancak yüksek sıcaklıkta maya ve asetik asit bakterileri hızla çoğalarak bozanın duyuşsal özelliklerinde değişime neden olmaktadır [7, 67]. Bozanın raf ömrü 15 gün kadar olup fermantasyonun her aşamasında pH değeri 3.5'in altına düşüncüye kadar tüketilebilmektedir [10, 42]. Caputo ve ark. [46] bozanın +4°C'de depolandığında raf ömrünün 1 ya da 2 hafta arasında olduğunu, sonrasında ürün asitliğinin yükselerek tüketilemez hale geldiğini belirtmişlerdir. Probiyotik starter kültür kullanılarak üretilen bozanın raf ömrü ise +4°C'de 12 gün olarak bildirilmiştir [63].

Kentel [68] tarafından yapılan çalışmada bozanın raf ömrünün pastörizasyon, koruyucu madde kullanımı ve soğukta muhafaza gibi yöntemlerle uzatılması amaçlanmıştır. Koruyucu madde kullanımı ve soğukta muhafaza denemelerinde hem yeterince fermente olan, hem de yeterli oranda fermente edilmemiş, mikroorganizma yükü daha az olan boza kullanılmıştır. Pastörize edilen boza örneklerinin (70°C ve 80°C'de 10 dakika) içilebilir özelliklerini 1 aydan fazla koruyabildiği belirtilmiştir. Kimyasal koruyucu maddelerin (Na-benzoat ve K-sorbat) maya gelişmesini baskılamada daha etkili olduğu, bu uygulamanın yeterince fermente edilmemiş bozada özellikle 4°C'deki muhafazada başarılı olduğu ve bozanın raf ömrünün 12 güne kadar uzatılabildiği belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada, soğukta bekletmenin (4°C) yeterince fermente olmamış bozada fermente olmuş bozaya göre daha etkili olduğu ve bozanın 10 gün muhafaza edilebildiği rapor edilmiştir [68].

SONUÇ

Tahıl bazlı fermente ürünlerimiz içinde önemli bir yeri olan boza üstün besinsel özelliklerinin yanısıra

probiyotik, antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri gibi sağlık üzerine olumlu etkileri nedeni ile özellikle çocuklar ve gençler olmak üzere her yaşta kişinin rahatlıkla tüketebileceği bir içecektir. Boza üretimi, ülkemizde evlerde ya da küçük ölçekli işletmelerde yapılmakta olup endüstriyel üretimi henüz yaygınlaşmamıştır. Bozada proses koşulları standardize edilerek ve sertifikalı bir starter kültür kullanılarak hem fizikokimyasal hem de mikrobiyolojik kalite açısından standart bir ürün üretilmesi sağlanmalıdır. Doğal, katkısız ve fonksiyonel gıdalara ilginin ve sağlık konusunda kaygıların arttığı günümüzde yapılacak reklam ve tanıtımlarla boza hak ettiği konuma ulaştırılmalıdır.


KAYNAKLAR

- [1] Karaçıl, M.Ş., Acar Tek, N., 2013. Dünyada üretilen fermente ürünler: tarihsel süreç ve sağlık ile ilişkileri. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 27(2): 163-173.
- [2] Blandino, A., Al-Aseeria, M.E., Pandiella, S.S., Cantero, D., Webb, C., 2003. Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International* 36(6): 527-543.
- [3] Todorov, S.D., Dicks, L.M., 2007. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST712BZ isolated from boza. *Brazilian Journal of Microbiology* 38(1): 166-172.
- [4] Hancıoğlu, Ö., Karapınar, M., 1998. Hububat bazlı fermente ürünler ve fermantasyon işleminin sağladığı avantajlar. *Gıda* 23(3): 211-215.
- [5] Birer, S., 1987. Boza yapımı ve özellikleri. *Gıda* 12(5): 341-344.
- [6] Meriç, A., 2010. Trakya Bölgesinde Üretilen Bozaların Bazı Fizikokimyasal ve Mikrobiyolojik Özellikleri. Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Tekirdağ.
- [7] Akpınar-Bayzıt, A., Yılmaz-Ersan, L., Özcan, T., 2010. Determination of boza's organic acid composition as it is affected by raw material and fermentation. *International Journal of Food Properties* 13(3): 648-656.
- [8] Kabak, B., Dobson, A.D., 2011. An introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51 (3): 248-260.
- [9] Yücel U., Köse, E., 2002. İzmir'de üretilen bozaların kimyasal bileşimi üzerine bir araştırma. *Gıda* 27(5): 395-398.
- [10] Altay, F., Karbancıoğlu-Güler, F., Daskaya-Dikmen, C., Heperkan, D., 2013. A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation process and quality characteristics. *International Journal of Food Microbiology* 167(1): 44-56.
- [11] Pamir, M.H., 1961. Boza Üzerinde Mikrobiyolojik ve Kimyasal Araştırmalar. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Ankara.
- [12] Tuncer, Y., Özden, B., Avşaroğlu M.D., 2008. Bozanın bazı mikrobiyolojik özelliklerinin ve laktik asit bakterisi izolatlarının antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 12(1):19-25.
- [13] Tangüler, 2014. Traditional Turkish fermented cereal based products: Tarhana, boza and chickpea bread, *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology* 2 (3): 144-149.
- [14] Arici, M., Daglioglu, O., 2002. Boza: a lactic acid fermented cereal beverage as a traditional Turkish food. *Food Reviews International* 18(1): 39-48.
- [15] Uylaşer, V., Korukluoğlu, M., Göçmen, D., Şahin, İ., 1998. Bursa'da satışa sunulan bozaların bileşimi ve kalitelerinin araştırılması. *Gıda Mühendisliği Kongresi*, 16-18 Eylül, Gaziantep, 135-141 s.
- [16] Anonim, 1992. TS 9778 Boza Standardı, Türk Standartları Enstitüsü Necatibey Caddesi 112, Bakanlıklar, Ankara.
- [17] Hancıoğlu, Ö., Karapınar, M., 1997. Microflora of boza, a traditional fermented Turkish beverage. *International Journal of Food Microbiology* 35(3): 271-274.
- [18] Tamer, C.E., 2004. Meyveli ve Meyve Aromalı Boza Üretimine Araştırılması. Doktora Tezi. Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- [19] Duran Balkan, N., 2011. Keçiboynuzlu Bozanın Bazı Kalitatif Özelliklerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar.
- [20] ÇelİK, İ., Işık, F., Yılmaz, Y., 2016. Effect of roasted yellow chickpea (leblebi) flour addition on chemical, rheological and sensory properties of boza. *Journal of Food Processing and Preservation* DOI:10.1111/JFPP.12725.
- [21] Coskun, F., Cakır, E., 2014. Effect of the addition of different spices on some characteristics of boza during storage. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 20(5): 1079-1084.
- [22] Yeğin, S., Üren, A., 2008. Biogenic amine content of boza: A traditional cereal-based, fermented Turkish beverage. *Food Chemistry* 111(4): 983-987.
- [23] Uysal, Ü.D., Öncü, E.M., Berikten, D., Yılmaz, N., Tuncel, N.B., Kıvanc, M., Tuncel, M., 2009. Time and temperature dependent microbiological and mycotoxin (Ochratoxin-A) levels in boza. *International Journal of Food Microbiology* 130(1): 43-48.
- [24] Gotcheva, V., Pandiella, S.S., Angelov, A., Roshkova, Z.G., Webb, C., 2000. Microflora identification of the Bulgarian cereal-based fermented beverage boza. *Process Biochemistry* 36(1): 127-130.
- [25] Heperkan, D., Daskaya-Dikmen, C., Bayram, B., 2014. Evaluation of lactic acid bacterial strains of boza for their exopolysaccharide and enzyme production as a potential adjunct culture. *Process Biochemistry*, 49(10): 1587-1594.
- [26] Yavuz, M., 2001. Bozanın Reolojik Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [27] Üstün, N.S., Evren, M., 1998. Değişik hammaddelerden boza üretimi ve üretilen bozaların bileşimi. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 13: 95-106.

- [28] Evliya, B., 1990. A traditional Turkish fermented drink boza. *International Conference on Biotechnology and Food Science Symposium*, Book of Proceedings p. 478.
- [29] Zorba, M., Hancıoğlu, Ö., Genç, M., Karapınar, M., Ova, G., 2003. The use of starter cultures in the fermentation of boza, a traditional Turkish beverage. *Process Biochemistry* 38(10):1405-1411.
- [30] Dykes, L., Rooney, L.W., 2007. Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits. *Cereal Foods World* 52(3):105-111.
- [31] Mattila, P., Pihlava, J., Hellstrom, J., 2005. Contents of phenolic acids, alkyl- and alkenylresorcinols, and avenanthramides in commercial grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(21): 8290–8295.
- [32] Kim, K.H, Tsao, R., Yang, R., Cui, S.W., 2006. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry* 95(3): 466–473.
- [33] Abdel-Aal, E-S.M., Young, J.C., Rabalski, I., 2006. Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(13): 4696-4704.
- [34] Harborne, J.B., Williams, C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55(6): 481-504.
- [35] Adom, K.K., Sorrells, M.E., Liu, R.H., 2003. Phytochemical profiles and antioxidant activity of wheat varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(26):7825-7834.
- [36] Naczki, M., Shahidi, F. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41(5):1523-1542.
- [37] Berktaş, İ., 2012. Bozanın Farklı Hammaddeler Kullanılarak Üretilmesinin Fenolik İçeriğine ve Kalitesine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [38] Özpinar, A., 2012. Kefir ve Bozanın in vitro Antioksidan Aktivitelerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [39] Marjanović, A., Dedibegović, J., Brčaniновиć, M., Omeragić, E., Čaklović, F., Dobrača, A., Šober, M., 2015. Antioxidant potential of selected traditional plant-based beverages in Bosnia and Herzegovina. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina* 45: 9-12.
- [40] Kancabaş, A., Karakaya, S., 2013. Angiotensin-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity of boza, a traditional fermented beverage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93(3): 641-645.
- [41] Kabadjova, P., Gotcheva, I., Ivanova, I., Dousset, X., 2000. Investigation of bacteriocin activity of Lactic acid bacteria isolated from Boza. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 14(1): 56-59.
- [42] Gotcheva, V., Pandiella, S.S., Angelov, A., Roshkova, Z., Webb, C., 2001. Monitoring the fermentation of the traditional Bulgarian beverage boza. *International Journal of Food Science and Technology* 36(2): 129-134.
- [43] Todorov, S.D., Dicks, L.M.T., 2006. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria comparison of the bacteriocins. *Process Biochemistry* 41(1): 11–19.
- [44] Botes, A., Todorov, S.D., Von Mollendorff, J.W., Botha, A., Dicks, L.M.T., 2007. Identification of lactic acid bacteria and yeast from boza. *Process Biochemistry* 42(2): 267–270.
- [45] Kivanç, M., Yılmaz, M., Çakır, E., 2011. Isolation and identification of lactic acid bacteria from boza, and their microbial activity against several reporter strains. *Turkish Journal of Biology* 35(3): 313-324.
- [46] Caputo, L., Quintieri, L., Baruzzi, F., Borcakli, M., Morea, M., 2012. Molecular and phenotypic characterization of *Pichia fermentans* strains found among Boza yeasts. *Food Research International* 48(2): 755-762.
- [47] Göcmen, D., Korukluoglu, M., Uylaser, V., Sahin, I., 2000. The yeast flora of bosan put up for consumption in Bursa. *Advances in Food Sciences* 22(5-6): 145-150.
- [48] Osimani, A., Garofalo, C., Aquilanti, L., Milanović, V., Clementi, F., 2015. Unpasteurised commercial boza as a source of microbial diversity. *International Journal of Food Microbiology* 194: 62-70.
- [49] Arici, M., Tatlısu, N.B.E., Toker, O.S., Yılmaz, M.T., Cankurt, H., Durak, M.Z., Sagdic, O., 2014. Microbiological, steady, and dynamic rheological characterization of boza samples: Temperature sweep tests and applicability of the Cox-Merz rule. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 38(3): 377-387.
- [50] Tornuk, F., Ozturk, I., Karaman, S., Sagdic, O., Yetim, H., 2014. Rheological and some physicochemical properties of probiotic boza beverage fermented with *Lactobacillus casei* Shirota: Application of principal component analysis for the characterisation. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods* 6(2): 237-247.
- [51] Pacala, M.L., Brudiu, L., Lengyel, E., Stegarus, D., Begea, M., 2013. Physicochemical monitoring of the fermentation of mixed cereal-based substrate to obtain a functional beverage. *International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM: Surveying Geology & Mining Ecology Management* 211.
- [52] Öztürk, İ., Karaman, S., Törnük, F., Sağdıç, O., 2013. Physicochemical and rheological characteristics of alcohol free probiotic boza produced using *Lactobacillus casei* Shirota: estimation of apparent viscosity of boza using non-linear modeling techniques. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 37(4): 475-487.
- [53] Holzapfel, W.H., Geisen, R., Schillinger, U., 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology* 24(3): 343-362.

- [54] Akkoç, N., Şanlıbaba, P., Akçelik, M., 2009. Bakteriyosinler: Alternatif gıda koruyucuları. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 25(1-2): 59-70.
- [55] Ivanova, I., Kabadjova, P., Pantev, A., Danova, S., Dousset, X., 2000. Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin substance produced by *Lactococcus lactis* susp. *lactis* B14 isolated from boza – Bulgarian traditional cereal beverage. *Vestnik Moskovskova Universiteta Kimia* 41: 47-53.
- [56] Todorov, S.D., Dicks, L.M.T., 2005. Pediocin ST18, an anti-listerial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* ST18 isolated from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. *Process Biochemistry* 40(1): 365–370.
- [57] Von Mollendorff, J.W., Todorov, S.D., Dicks, L.M.T., 2006. Comparison of bacteriocins produced by Lactic-acid bacteria isolated from Boza, a cereal-based fermented beverage from the Balkan Peninsula. *Current Microbiology* 53(3): 209–216.
- [58] Todorov, S.D., Dicks, L.M.T., 2004. Characterization of mesentericin ST99, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ST99 isolated from boza. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 31(7): 323–329.
- [59] Makhloufi, K.M., Carré-Mlouka, A., Peduzzi, J., Lombard, C., Van Reenen, C.A., Dicks, L.M.T., Rebuffat, S., 2013. Characterization of leucocin B-KM432Bz from *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolated from boza, and comparison of its efficiency to pediocin PA-1. *PloS one* 8(8): e70484.
- [60] Akkoç, N., Ghamat, A., Akçelik, M., 2011. Optimisation of bacteriocin production of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MA23, a strain isolated from Boza. *International Journal of Dairy Technology* 64(3): 425-432.
- [61] Koral, G., Tuncer, Y., 2014. Nisin Z-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GY132 isolated from boza. *Journal of Food Processing and Preservation* 38(3): 1044-1053.
- [62] Pehlivanoğlu, H., Gündüz, H.H., Özülkü, G., Demirci, M., 2015. An investigation of antimicrobial activity of wheat grass juice, barley grass juice, hardaliye and boza. *International Interdisciplinary Journal of Scientific Research* 2(1): 8-14.
- [63] Arslan, S., Durak, A.N., Erbas, M., Tanriverdi, E., Gulcan, U., 2015. Determination of microbiological and chemical properties of probiotic boza and its consumer acceptability. *Journal of the American College of Nutrition* 34(1): 56-64.
- [64] Todorov S.D., Botes M., Guigas C., Schillinger U., Wiid I., Wachsman M.B., Holzapfel W.H., Dicks, L.M.T., 2008. Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 104(2): 465–477.
- [65] Bayram, B., 2015. Laktik Asit Bakterilerinin Sakkaroz Parçalama Aktivitelerinin Bozada İncelenmesi. Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [66] Coşansu, S., 2009. Determination of biogenic amines in a fermented beverage, boza. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 7 (2): 54-58.
- [67] Türker, I. 1974. Fermantasyon Teknolojisi. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, No: 553, Ankara, 231 pp.
- [68] Kentel, Z.B., 2001. Bozanın raf ömrünün uzatılması üzerine çalışma. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Farklı Tuz Konsantrasyonlarının Beyaz Peynirlerdeki Starter Kültür Bakterilerinin Canlılıklarına Etkisi

Reyhan İrkin 

İzmir Demokrasi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Karabağlar, İzmir

Geliş Tarihi (Received): 24.07.2015, Kabul Tarihi (Accepted): 16.02.2016

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): reyhan.irkin@idu.edu.tr (R. İrkin)

☎ 0 232 260 10 01 📠 0 232 260 10 04

ÖZ

“Beyaz peynir” Türkiye’de tüketilen salamurada olgunlaştırılan peynir çeşitleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Beyaz peynirlere üretim sırasında teknoloji gereği peynirde yarar sağlayan starter kültür mikroorganizmaları ilave edilmektedir. Starter kültür mikroorganizmalarının peynirde canlılıklarını koruması ve peynirin yapısal ve duyu özelliklerine katkı sağlaması istenmektedir. Bu bakteriler peynirde proteoliz ve lipoliz reaksiyonları sonucu ürettikleri metabolitler ile tat ve aroma oluşumunu sağlamaktadırlar. Bakterilerin peynir içinde canlılıklarını sürdürebilmelerini etkileyen faktörler; peynirin içinde bekletildiği salamuranın tuz konsantrasyonu, peynirin ve salamuranın asitliği, peynirin kurumadde, salamuranın sıcaklığı vb.’dir. Beyaz peynir için salamuranın optimum şartlarının belirlenmesi hem faydalı mikroorganizmaların canlılıklarını sürdürmesi hem de insan sağlığına faydaları açısından önem taşımaktadır. Bu çalışmada beyaz peynir ve benzeri salamura peynirlerde salamura tuz konsantrasyonunun starter bakterilere olan etkileri ile ilgili çalışmalar derlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Beyaz peynir, Salamura, Starter kültür, Laktik asit bakterisi

Effect of Different Salt Concentrations on Starter Culture Viability in White Cheese Brines

ABSTRACT

“Turkish white cheese” is the first among the cheese varieties that have been ripened in Turkey. Starter culture microorganisms are added to white cheese during production because of their technological benefits. It is desired that protecting viability of starter bacteria in cheese and bringing positively textural and sensory properties. These bacteria are responsible for proteolysis and lipolysis reactions in cheese, resulting in metabolites and taste and aroma formation. Factors affecting the viability of these microorganisms include concentrations of salt in brine solution, acidities of cheese and brine solution, dry matter content of cheese, temperature of brine solution and etc. Determination of the optimum conditions for white brine cheese as well as to maintain the viability of both beneficial microorganisms is important in terms of the benefits to human health. In this study, studies on the effect of brine salt concentration on starter culture bacteria in white cheese and similar brine cheeses were reviewed.

Keywords: White cheese, Brine, Starter culture, Lactic acid bacteria

GİRİŞ

Beyaz peynir, Feta, Teleme, Domiati peynirleri Türkiye, Yunanistan ve Orta Doğu’da yaygın olarak üretilen, salamurada depolanarak olgunlaştırılan peynir türleridir.

Türkiye İstatistik Kurumu’nun verilerine göre ülkemizde üretilen peynirlerin %60’ını “beyaz peynir” oluşturmaktadır. Beyaz peynir ile aynı özelliklere sahip Feta peyniri’nin 12 kg/kişibaşı yıl tüketim ortalamasıyla

tüm dünyada en çok tüketilen peynir türü olduğu ifade edilmektedir [1-4].

Tuzlama, beyaz peynir üretiminde önemli proseslerden biridir ve peynirin karakteristik özelliklerini belirlemektedir. Tuz konsantrasyonu ve peynir kitlesine dağılımı, peynir kalitesini ve tercih edilebilirliğini etkileyen önemli bir parametredir [5]. Salamuradaki tuz peynir için koruyuculuk sağlamakta, tat ve aromayı etkilemekte ve insan metabolizması için gerekli Na^{+2} un sağlanması açısından önem taşımaktadır. Tuz, üründeki su aktivitesini kontrol ederek mikrobiyal gelişmeye engel olmasının yanı sıra, sütün pH ve kalsiyumu ile birlikte para-kazein hidrasyonu veya kümeleşmesini sağlayarak, kazeinin su bağlama kapasitesini ve elde edilen peynirin reolojik, tekstürel karakteristiklerini etkilemektedir. Peynirin yapısında bulunan tuz ile su aktivitesi değerleri, starter kültür bakterileri ve raf ömrünü kısaltan mikroorganizmalar açısından son derece ilişkili parametrelerdir. Peynirdeki tuz konsantrasyonunun ürünün yapısı, pH değeri ve nem miktarına uygun olması önem taşımaktadır. Tuzun gıdada bulunan su içerisinde çözünmesi ile birlikte su aktivitesi düşmekte ve mikroorganizma inhibisyonu oluşmaktadır. Tuz konsantrasyonu (\times ; g/kg) ve su aktivitesi (a_w) ile ilgili bağlantı denkliği aşağıdaki şekilde açıklanmıştır:

$$a_w = -0.0007x + 1.0042$$

Denklemden korelasyon katsayısı (r^2) 0.997'dir. Mikroorganizmalar, peynirin yapısında bulunan su içerisinde çözünen tuz oranına (%Tuz/Nem, %T/N) bağlı olarak gelişebilmekte veya gelişmeleri önlenmektedir [6].

Gıdalarda tuz miktarının optimize edilmesi, gıdalarda fazla tuz kullanımının tüketicilerin sağlığını olumsuz etkilemesine bağlı olarak tuz miktarının azaltılması ile ilgili çalışmalar da günümüzde devam etmektedir [7-10]. Tuz konsantrasyonunun azaltılmasının gıdalarda bozulmaya yol açan mikroorganizmalar üzerine olan etkisinin araştırıldığı bir modelleme çalışmada tuz miktarında yapılan %3'lük azalma ile mikroorganizmaların miktarında kontrol gruplara göre istatistiksel olarak önemli bir düşme gözlenmediği belirtilmektedir. Aynı çalışmada İrlanda Kalp-Damar Sağlığı Kuruluşunun açıkladığı her yıl 10000 kişinin kalp damar sağlığı hastalığından ölmekte olduğu ve gıdalardaki yüksek tuz miktarının düşürülmesi gerektiği ile ilgili açıklamalardan da bahsedilmektedir. Beyaz peynirlerde genellikle kullanılan salamuranın tuz konsantrasyonunun %10-12 g tuz/L olduğu düşünülürse, 100 g peynir tüketen bir kişinin günlük maksimum üst sınır olarak alması gereken 5-6 g tuz miktarını almış olduğunu ve bu duruma çözüm getirilmesinin sağlık yönünden önem taşıdığına dikkat çekilmektedir [11-12].

BEYAZ PEYİR ve STARTER KÜLTÜRLER

Ticari starter kültürler 1970'den beri Türkiye'de kullanılmaktadırlar. Peynirde starter kültür olarak en çok kullanılan mikroorganizmalar *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve *Streptococcus* türleridir.

Lactococcus, *Streptococcus* ve *Lactobacillus* suşları hızlı asit üretimi, proteinlerin hidrolizi ve aroma maddelerinin oluşumunda sorumlu mikroorganizmalardır [13].

Türkiye'de üretilen "Beyaz Peynir" için en yaygın kullanılan starter kültür mikroorganizmalarının aşağıdakiler olduğu belirtilmektedir [10, 14]:

- *Lc. lactis* subsp. *cremoris*+ *Lc. lactis* subsp. *lactis*+ *Leu. cremoris*
- *Enterococcus durans* 41770+ *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
- *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Lb. casei* + *Lb. plantarum*
- *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Lc. lactis* subsp. *lactis*
- *Lc. lactis* subsp. *lactis* + *Lb. casei*
- *Lc. lactis* subsp. *lactis* + *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Lb. sake*
- *Lc. lactis* subsp. *lactis* + *Lb. casei* ve/veya *Lb. plantarum*
- *Lc. lactis* subsp. *lactis* + *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Lb. helveticus*
- *Lc. lactis* subsp. *lactis* + *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris*
- *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* + *Str. thermophilus* (1:1)
- *Lc. lactis* subsp. *lactis* + *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diaceylactis* + *Lb. casei* (1:1:1)
- *Lc. lactis* subsp. *lactis* S1 + *Lb. plantarum* L8 + *Ent. durans* C20
- *Lc. lactis* subsp. *lactis* CH + *Ent. durans* CH + *Ent. faecalis* CH + *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* CH
- *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Lc. lactis* subsp. *lactis* (R707) + *Lb. helveticus* LH1002 + *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
- LB122
- *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Lc. lactis* subsp. *lactis* + *Lb. casei*
- *Lc. lactis* subsp. *lactis* + *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Bif. bifidum* BB12 + *Lb. acidophilus* LA5

TUZUN, BEYAZ PEYİR ve BENZERİ PEYİRLERDEKİ STARTER KÜLTÜR BAKTERİLERİNE ETKİLERİ

Tuz, peynirde starter ve starter olmayan bakteriler üzerine olan etkisi nedeniyle peynirde asit gelişimini ve olgunlaşmayı etkilemektedir. Tuzun laktik asit bakterilerinin faaliyetlerini engelleyici etki yaptığı araştırmalarda belirtilmektedir. Starter kültürlerin tuz toleransı türlerine ve alt türlerine göre değişmektedir. Peynirde laktik asit bakterilerinin yüksek tuz konsantrasyonunda daha hızlı azaldığı belirlenmiştir [15-16].

Velazquez-Varela ve ark. [17], Bakırcı ve ark. [8]'nin çalışmalarında da peynir kalitesini etkileyen en önemli faktörlerden birinin peynire tuz geçişi ve meydana getirdiği etkiler olduğu bildirilmektedir. Feta peynirlerinin olgunlaştırılması aşamasında depolamada salamuradaki

tuz miktarının genellikle 5-7 g/100 g olduğu, bununla birlikte 10-14 g/100 g tuz oranının salamuradaki laktobasillerin ve mayaların gelişimi için uygunluk sağladığı belirtilmektedir. Tuz oranı peynirdeki ikincil mikroflorayı da etkileyen önemli bir faktördür.

Starter kültür bakterileri içerisinde *Lactobacillus* türlerinin tuza (>%6 tuz/nem) en dirençli mikroorganizmalar oldukları, daha sonra <%3 tuz/nem'e olan direnç ile *Str. thermophilus*' un geldiği ifade edilmektedir. *Lactococcus* türleri %4.5-5 tuz/nem değerlerine toleranslı olup, günümüzde peynir endüstrisinde starter olarak *Lactococcus* spp.'lerin tuza daha dirençli olan soylarının tercih edildiği bildirilmektedir [18]. Yapılan çalışmalarda *Lactococcus* spp. suşlarının gelişiminin ortamdaki düşük NaCl konsantrasyonlarında teşvik edilirken, >%5 tuz/nem konsantrasyonlarında suşlar üzerine güçlü inhibisyon etkiler gözlemlendiği, bu durumun mikroorganizma türlerine göre de değişebildiği, örneğin; *Lc. lactis* subsp. *lactis* suşları %4 tuz/nem konsantrasyonunda gelişirken, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*' in %2 tuz/nem konsantrasyonunda gelişmekte olup daha yüksek tuz/nem konsantrasyonlarında gelişemediği bildirilmektedir [19]. Rantsiou ve ark. [20]'nın çalışmasında Feta peynirlerinde baskın mikrofloranın *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. coryniformis*, *Lb. fermentum* olduğu, peynirlere üretimde ilave edilen mezofilik ve termofilik starter kültürlerin düşük pH ve yüksek tuz konsantrasyonu yüzünden etkilenecek canlılıklarını yitirdikleri belirtilmektedir. Salamuralarda NaCl yerine KCl kullanılmasının laktik asit bakterilerine etkilerinin araştırıldığı Ayyash ve ark. [21]'nin çalışmasında NaCl ve KCl ile farklı oranlarda (3NaCl:1KCl, 1NaCl:1KCl veya 1NaCl:3KCl) hazırlanan ve %18 NaCl oranında salamurada bekletilen Hellim peynirlerinde laktik asit bakteri sayıları arasında önemli bir farklılığa rastlanılmadığı belirtilmektedir.

Teleme peyniri üretimi sırasında *Lactococcus* spp. düşük pH ve yüksek tuza bağlı olarak peynirde sadece 5 gün canlı kalabilmektedirler. Feta peynirinde "yoğurt starter kültürü" ("*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* + *Str. thermophilus* (1:1)" kullanılması durumunda olgunlaşmanın erken bir aşamasında mikroorganizmaların canlılıklarını yitirdikleri gözlenmektedir. Bu nedenle starter kültürlerin canlılığını koruması ve peynirde asitliğin gelişebilmesinin salamuranın tuz konsantrasyonuna bağlı olduğu belirtilmektedir. Starter mikroorganizmaların kaybolması peynirde istenmeyen mikrofloranın gelişimine ve olgunlaşmanın kontrol edilememesine neden olmaktadır. Eski salamuralarda toplam canlı sayısı ve toplam laktik asit bakteri sayılarının 10^6 - 10^8 kob/mL olduğu ifade edilmektedir. *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* hücre dışına salgıladığı peptidaz ve esterase aktiviteleri ile Feta peynirinin karakteristik hafif acımsı aromasını oluşturmaktadırlar [22]. Peynir salamuralarında tuza dirençli olarak canlılığını sürdüren laktik asit bakterileri ve mayaların peynirin dış yüzeyinde bir biyofilm tabakası oluşumu ile peynirin ekosistemi içerisinde gelişmelerini sürdürerek tat ve aromaya katkı sağladıkları belirtilmektedir, bu nedenle son yıllarda eski peynir salamuralarının yeni salamuralara ilave edilerek kullanılmaları da yaygınlaşmaktadır [23].

Salamuradaki tuz oranının Beyaz peynir salamurasında sünme gibi en önemli kalite kusurlarına yol açan *Lb. plantarum* ve/veya *Lb. casei* subsp. *casei*, *Lb. plantarum* var. *viscosum*, *Lb. pseudoplantarum* türlerinin canlılığının engellenmesi açısından önemli olduğu belirtilmektedir. Bu kusurun engellenmesi için salamura tuz konsantrasyonunun 8g /100 g'dan yüksek, pH değerinin < 4.5 olması gerektiği belirtilmektedir. Starter kültür olarak yoğurt bakterilerinin kullanılması durumunda 12 g/100 g'ın altındaki tuz konsantrasyonlarında ve pH değerinin 4.5'un üzerinde olduğu durumlarda mikroorganizmaların ekzopolisakkarit üretimine bağlı peynirde sünme kusurunun meydana gelebileceği ifade edilmektedir. Benzer şekilde düşük tuz oranı ve yetersiz asitlik gelişimine bağlı olarak *Lb. brevis*, *Lb. fermentum* ve *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranum* peynirde laktozdan gaz oluşturarak erken şişme kusuruna yol açabilmektedirler [22].

Peynirlerde biyojen amin oluşumunun da tuz konsantrasyonu ile ilişkili olduğu, starter olmayan ve peynir florasında bulunan laktobasillerin biyojen amin oluşumunda etkili oldukları tespit edilmiştir. İran tipi Beyaz Peynirlerle ilgili yapılan bir optimizasyon çalışmasında, biyojen amin oluşumunun engellenmesi için en uygun koşulların %13 (w/v) tuz içeren salamurada 9-14°C'de 43-65 gün süre ile depolama olduğu tespit edilmiştir [24].

Beyaz peynirde bulunan mikroflora peynir kalitesi yönünden büyük önem taşımaktadır. Durlu-Özkaya ve ark. [25]'nin çalışmalarında piyasadan satın alınan beyaz peynirlerden izole edilen en yaygın türlerin *Lc. paracasei*, *Lc. plantarum*, *Lc. lactis*, *Ent. faecium*, *Ent. durans* ve *Ent. hirae* olduğu, türlerin çoğunda proteolitik, lipolitik aktivite ve yüksek oranda asitlendirici etki belirtilmektedir. Benzer şekilde Manolopoulou ve ark. [26]'nin çalışmalarında da keçi ve koyun sütlerinden üretilmiş Feta peynirlerinde ortama hakim mikrofloranın termofilik kok, laktobasiller, mezofilik laktokoklar, *Str. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* ve *Ent. faecium* olduğu ifade edilmektedir. Günümüze dek yapılan çalışmalarda Beyaz Peynir üretiminde, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Str. thermophilus*, *Lb. sake*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. helveticus* bakterilerinden oluşan termofilik ve/veya mezofilik starter kültür kombinasyonlarının kullanıldığı belirtilmektedir. Ancak, söz konusu bakterilerin tuza dirençlerinin düşük olması, alternatiflerinin aranmasını zorunlu kılmaktadır [5]. Sarantinopoulous ve ark. [27], Feta peynirinde *Lc. lactis* ve *Lb. bulgaricus* kültür kombinasyonunun 1:3 oranında kullanılmasının aromayı arttırdığını, Panagou ve ark. [28]'i *Lb. plantarum*, *Ent. faecium* ve *Ent. durans*' in tuza olan dirençliliklerinden ötürü tat ve aroma oluşumu için bir yan kültür olarak kullanılmalarının uygun olacağını ifade etmektedirler. Ayrıca, Balkan ve Feta peynirlerinin doğal florasında bulunan *Lb. plantarum*' un peynirde bulunmasının ürüne probiyotik özellikler kazandıracığı da belirtilmektedir [29].

Kayağil ve Candan [13]'nin yaptıkları çalışmada farklı kültürler ile üretilen beyaz peynirlerde %15'lik salamurada +4°C'de depolamanın 2, 15 ve 30. günler

için toplam canlı laktik asit bakteri sayıları *Lc. lactis* subsp. *lactis* + *Lc. lactis* subsp. *cremoris* için sırasıyla 5.2×10^{10} , 2.7×10^8 , 9.9×10^7 kob/g olarak değişirken, *Lc. lactis* subsp. *lactis*+ *Lb. paracasei* için sırasıyla 1.8×10^7 , 4.5×10^7 , 9×10^6 kob/g, peynirlerde en fazla bulunan *Lc. lactis* subsp. *lactis* + *Lb. brevis* + *Lb. paracasei*'nin depolama boyunca sayılarının 5.4×10^9 , 3.2×10^8 , 1.1×10^7 kob/g olduğu ifade edilmektedir.

Litopoulou-Tzanetaki ve Tzanetakis [30]'in çalışmasında 4 günlük taze Feta peynirinde baskın floranın *Leuconostoc* spp., *Lc. lactis* ve *Lb. plantarum* olduğu, daha sonraki depolama sürecinde *Lb. brevis*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. paraplantarum* ve *Lb. pentosus* bakterilerinin de daha sıklıkla bulunduğu belirtilmektedir.

Kılıç ve ark. [31]'nin çalışmasında ticari *L. fermentum* AB5-18, AK4-120 ve *L. plantarum* AB16-65, AC18-82 ilavesiyle (1 mL/100 mL) ürettikleri probiyotik özellikte Beyaz peynirler 13 g/100 g NaCl içeren salamurada 4°C' de 120 gün boyunca depolanmışlardır. Başlangıçta peynirlerde bulunan laktik asit bakteri sayıları 2.7×10^9 kob/g'dan 120 gün sonunda 7.42×10^7 kob/g'a azalmışlardır.

Yapılan bir araştırmada yeni üretilmiş Feta peynirlerinde ilk beş günde daha yüksek oranda laktokokların bulunduğu gözlenmiştir. Feta peynirlerinde 90 gün depolamanın ardından izolatların %81'i heterofermantatif fakültatif laktik asit bakterileri, %13.5 obligat heterofermantatif olarak tespit edilmiştir. Baskın florada *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. brevis*, *Lb. hilgardii* nin ardından *Lb. plantarum* gelmektedir. Domiati peynirlerinde ise düşük pH değerleri ve yüksek tuza bağlı olarak *Lc. lactis* subsp. *lactis*'in 30 gün içerisinde azalma gösterdiği, ayrıca *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. fermenti* ve *Lb. lactis*'in bu peynirde en çok bulunan türler olduğu, olgunlaştırılmış Hellim peynirinde ise *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* ve *Lb. pentosus* ayrıca yeni bir tür olarak *Lb. cypricasei* bulunduğu bildirilmektedir [32].

Buriti ve ark. [33]'nin çalışmalarına benzer şekilde Souza ve Saad [34] teleme tuzlama yapılan Minas taze peynirinde *Lactobacillus acidophilus* ve *Streptococcus thermophilus*'un canlılığını depolama boyunca araştırmış, *Lb. acidophilus*'un depolama boyunca 6 log birimin üzerinde kaldığını, *Str. thermophilus* içeren peynirlerde ise asitlik ve proteolizin daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Özer ve ark. [35] çalışmalarında ürettikleri Türk tipi beyaz peynir üretiminde starter kültür olarak *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lb. acidophilus* LA5, *B. bifidum* BB12 kullanmışlardır. Peynirler $7 \times 7 \times 7$ cm³ boyutlarında kesilerek %12 (w/v)'lik salamurada +4°C'de 90 gün bekletilmişlerdir. Mikroenkapsülasyon tekniği uygulanarak ilave edilen kültürlerin peynirde uzun süre canlı kaldıkları gözlenmiştir.

Sheehan ve ark. [36] *Str. thermophilus*, *Lb. helveticus* ve yan kültür olarak *Propionibacterium freundenrichii* kullanarak ürettikleri peynirleri %23 tuz

konsantrasyonunda depolamış ve *Str. thermophilus*'un sayısının 35 güne dek hızla azaldığını gözlemişlerdir. *Lb. helveticus* ise 154. güne dek azalma göstermiştir. Ayrıca kuru ve salamura tuzlamanın etkisi incelendiğinde kuru tuzlamanın bakterilere doğrudan etki yaptığı için laktik asit bakterilerinde çok hızlı azalmaların meydana geldiği ifade edilmektedir.

Tarakçı ve Tunçtürk'ün [37] çalışmalarında *Lc. lactis*, *Lc. cremoris*'in yanı sıra *Str. thermophilus*, *Lb. bulgaricus* ve ayrıca *Lc. lactis*, *Lc. cremoris* ve *Lb. helveticus*'un birlikte kullanıldığı kültürler ile üretilmiş Beyaz peynirler %14 tuz konsantrasyonundaki salamurada 90 gün boyunca 7°C'de bekletilmiş ve beyaz peynirlerin özellikleri incelenmiştir. Yapılan araştırma sonucu Beyaz Peynir üretiminde her zaman kullanılan starter kültürlerin yanı sıra ilave kültür kullanılmasının peynirde olgunlaşmayı hızlandığı, tat ve aroma gelişimine katkı sağladığı, laktik asit bakterilerine bağlı olarak meydana gelen olumlu özellikler ile depolama maliyetlerinin de düşürülebileceği sonuçları ortaya çıkmıştır. Diğer bir benzer çalışmada da Hayaloğlu [38] farklı starter kültür kombinasyonları kullanılmasıyla üretilen beyaz peynirleri %14 tuz (w/v) konsantrasyonlarındaki salamurada bekletmesinin ardından 90 gün boyunca 6-8°C'de depolamış, laktik asit bakterilerinin oluşturduğu biyokimyasal reaksiyonlar sonucunda peynirlerin daha yüksek duyuşsal puanlar aldığını tespit etmişlerdir.

McMahon ve ark. [2]'nin çalışmasında üretilen Feta peynirleri için salamuraların tuz konsantrasyonları %6.5, 8 ve 9.5 olarak hazırlanmıştır. Peynirlerdeki tuz/nem (T/N) oranı > 5.0 g/100 g yükseldikçe laktokok starter kültürlerinin azaldığı, sadece tuza dirençli olan starter olmayan laktik asit bakterilerinin canlılıklarını koruyabildikleri gözlenmiştir. Salamurada %6.5 gibi düşük tuz konsantrasyonu ve 4.6 g/100 g T/N oranı ile 22°C'de depolanan peynirlerde laktik asit bakterilerinin inhibisyonunun azaldığı ifade edilmektedir.

McMahon ve ark. [39]'nin çalışmasında tuzlama öncesi Cheddar peynirindeki laktokok mikroorganizma sayısı 6×10^8 kob/g iken yüksek ölçüde yapılan tuzlamadan (16-20 g/kg) 1 gün sonra sayısının 8×10^7 kob/g düzeyine azaldığı daha az tuzlama (6.8 g/kg) yapılan peynirlerde ise 4×10^8 kob/g olduğu gözlenmiştir. Tuzun starter laktokokların metabolik fonksiyonlarını baskıladıkları belirtilmektedir. Starter olarak kullanılan *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, T/N oranı 5.25 olduğunda engellenirken, *Lc. lactis* subsp. *lactis*'in engellenmesinde daha yüksek tuz konsantrasyonlarının gerektiği ifade edilmektedir. Ortamdaki Na⁺⁺ iyonlarının %25 azalması durumunda starter olmayan laktik asit bakterilerinin propiyonik asit sentezini arttırdığı ve depolama sırasında laktokok sayısını geçtikleri gözlenmiştir.

Lc. lactis subsp. *lactis* ve *Lc. lactis* subsp. *cremoris* kullanılması ile üretilen Domiati peynirlerinde %3 tuz (w/v) konsantrasyonunda depolanmanın ardından biyokoruyuculuk etkisi meydana geldiği ve üründe sentezlenen folat miktarının arttığı gözlenmiştir [40].

Sheehan ve ark. [41] %23 tuz konsantrasyonunda 24 saat bekletilerek ürettikleri yarı-sert tip peynirlerde *Str. thermophilus*'un 9°C'de depolama sırasında 56 gün

sonra %70-90 oranında canlılığını kaybettiğini, *Lb. helveticus*'un ise 56 günde %99 oranında azaldığını ifade etmişlerdir.

Peynirlerde kullanılan kültürlerin tuza olan dirençleri incelendiğinde kullanılan kültürler arasında *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lb.delbrueckii* subsp. *lactis* gibi laktik asit bakterileri *Lactococcus* türlerine göre salamuradaki tuz miktarına daha az tolerans göstermektedirler [42]. Önemli starter kültürlerden biri olan *Lb. plantarum* halofilik bir mikroorganizma olmamasına rağmen %20 tuz konsantrasyonunun üzerindeki salamurada canlı kalabilmektedir. Bu mikroorganizmadan elde edilen %25 tuza dirençli Lp_3562 isimli lipaz enziminin gıdalarda kullanımı ile ilgili çalışmalar sürdürülmektedir [43].

Bintsis ve Robinson [44]'un yaptıkları çalışmada "Feta" peynirinde kullanılan mezofilik starter kültürlerin %6-8 gibi tuz konsantrasyonlarına dayanıksız oldukları ve peynirde canlı kalamadıkları belirtilmektedir. Feta peynirlerini %6 tuz konsantrasyonundaki salamurada 60 gün boyunca bekletmiş, ayrıca salamurada *Lb. paracasei* ve *Debaromyces hansenii* maya kültürü ilave etmişlerdir. Araştırmacılar bu peynirlerde alkol, ester ve aldehitler gibi tipik Feta peyniri aromasını oluşturan bileşiklerin daha yüksek oranda sentezlendiğini tespit etmişlerdir.

Asteri ve ark. [45]'nin çalışmasında keçi sütünden yumuşak peynir üretilerek, 5°C'de 30 günlük depolama boyunca özellikleri incelenmiştir. Çalışmada *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Str. thermophilus*, *Lb. paracasei*, *Enterococcus faecalis* kültürleri kullanılmıştır. *Lb. delbrueckii* yüksek oranda asit üreten aynı zamanda proteolitik özellikte, *Str. thermophilus* asitleştirici ve peptidolitik aktiviteye sahip, *Lb. paracasei* önemli düzeyde peptidolitik aktiviteye sahip, *E. faecalis* ise lipolitik aktiviteye sahip mikroorganizmalardır. Peynir telemeleri %1 (w/w) olacak şekilde kuru tuzlanmıştır. Çalışmada termofilik laktobasillerin sayılarının 30 gün sonunda 9.26 log kob/g'dan 8.96 log kob/g'a, mezofilik laktobasillerin sayılarının ise 9.26 log kob/g'dan 9.03 log kob/g'a azaldığı, peynirlerin duyuşal özelliklerinin de yumuşak beyaz peynire benzetilerek yüksek puanlar aldığı belirtilmektedir.

SONUÇ

Genel olarak salamurada olgunlaştırılan peynir türleri ve ülkemizde en çok tüketilen peynirlerden beyaz peynire üretim sırasında ilave edilen veya peynirin ikincil florasında yer alan faydalı mikroorganizmalarının canlılığını sürdürebilmesi salamura tuz konsantrasyonu ile oldukça ilgilidir. Salamuranın tuz konsantrasyonunun optimize edilmesi ile hem tüketicilerin sağlığı korunmuş, hem de peynirlerin yapısal, mikrobiyal kaliteleri ve bozulmaya yol açan mikroorganizmaların engellenmesi sonucu ürünün raf ömrü artırılmış olacaktır. Çiğ veya pastörize süttten üretilmiş peynirlerden *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Micrococcus*, *Pediococcus* ve *Enterococcus*'lerin izolasyonu ile yeni starter kombinasyonlarının seçilmesinde tuza olan

dirençliliklerine bakılarak salamura hazırlanmasının önem taşıdığı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Çakmakçı, S., 2011. Türkiye Peynirleri. Peynir Biliminin Temelleri, Editörler: A. A.Hayaloğlu, B. Özer, Sidas Medya Ltd. Şti., İzmir, TR, 585p.
- [2] McMahon, D.J., Motawee, M.M., McManus W.R., 2009. Influence of brine concentration and temperature on composition, microstructure, and yield of feta cheese. *Journal of Dairy Science* 92: 4169-4179.
- [3] Aninfantakis, E.M., Moatsu, G., 2006. Feta and Other Balkan Cheeses. In: Brined Cheeses, Edited by Dr. A. Tamime, Blackwell Publishing Ltd., UK, 347p.
- [4] Toufeili, I., Ozer, B., 2006. Brined Cheeses from the Middle East and Turkey. In: Brined Cheeses, Edited by Dr. A. Tamime, Blackwell Publishing Ltd., UK, 347p.
- [5] Çelik, Ş., Uysal, Ş., 2009. Beyaz peynirin bileşim, kalite, mikroflora ve olgunlaşması. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 40(1): 141-151.
- [6] Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., Cogan, T.M., 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal* 11: 259-274.
- [7] Msagati, T.A.M., 2013. Minerals and Mineral Salts, In: Chemistry of Food Additives and Preservatives, John Wiley Sons Ltd. Publication, Oxford, UK, 172 p.
- [8] Bakırcı, I., Kavaz, A., Macit, E., 2011. Effect of different brine concentrations and ripening period on some quality properties of Turkish white pickled cheese. *African Journal of Biotechnology* 10(56): 11925-11931.
- [9] Üçüncü, M., 2004. A'dan Z'ye Peynir Teknolojisi. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, Bornova, İzmir. 1236 s.
- [10] Hayaloglu, A.A., Guven, M., Fox, P.F., 2002. Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish white cheese 'beyaz peynir'. *International Dairy Journal* 12: 635-648.
- [11] Durack, E., Gomez, M.A., Wilkinson, M.G., 2013. The effect of salt reduction on the growth of food spoilage bacteria in model broth systems and salt-adjusted ready meals. *Journal of Food Safety* 33: 302-312.
- [12] Otaibi, M.M.A., Wilbey, R.A., Robinson, R.K., 2002. Reducing salt in Feta. *Dairy Industries International* 6: 16-18.
- [13] Kayagil, F., Candan, G., 2009. Effects of starter culture combinations using isolates from traditional cheese on the quality of Turkish White Cheese. *International Journal of Dairy Technology* 62(3): 387-396.
- [14] Hayaloglu, A.A., Ozer, B.H., Fox, P.F., 2008. Cheeses of Turkey: Varieties ripened under brine. *Dairy Science and Technology* 88: 225-244.
- [15] Fortin, M.H., Champagne, C.P., Gelais, D.S., Britten, M., Fustier, P., Lacroix, M., 2011. Effect of time inoculation, starter addition, oxygen level and salting on the viability of probiotic cultures during

- Cheddar cheese production. *International Dairy Journal* 21: 75-82.
- [16] Koçak, C., Kılıç-Akyılmaz, M., Turhan, M., 2011. Peynirde Tuzlama. Peynir Biliminin Temelleri. Editörler: A.A., Hayaloğlu, B., Özer, Sidas Medya Ltd. Şti., İzmir, TR, 235p.
- [17] Velazquez-Varela, J., Fito, P. J., Castro-Giraldez, M., 2014. Thermodynamic analysis of salting cheese process. *Journal of Food Engineering* 130: 36–44.
- [18] Johnson, M.E., 2014. Mesophilic and Thermophilic Cultures Used in Traditional Cheesemaking. In *Cheese and Microbes*: Edited by C.W., Donnelly, SM Press, Washington, US, 73 p.
- [19] Gürsoy, O., Kesenkaş, H., 2011. Peynir Mikrobiyolojisi. Peynir Biliminin Temelleri Editörler: A.A., Hayaloğlu, B., Özer, Sidas Medya Ltd. Şti., İzmir, TR, 79p.
- [20] Rantsiou, K., Urso, R., Dolci, P., Comi, G., Coccolin, L., 2008. Microflora of Feta cheese from four Greek manufacturers. *International Journal of Food Microbiology* 126: 36–42.
- [21] Ayyash, M.M., Shah, N.P., 2010. Effect of Partial substitution of NaCl with KCl on Halloumi cheese during storage: chemical composition, lactic bacterial count, and organic acids production. *Journal of Food Science* 75(6): 525-529.
- [22] Bintsis, T., 2006. Quality of Brine. In: *Brined Cheeses*, Edited by Dr. A., Tamime, Blackwell Publishing Ltd., UK, 347p.
- [23] Montel, M.C., Buchin, S., Mallet, A., Paus, C.D., Vuitton, D.A., Desmasure, N., Berthier, F., 2014. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology* 177: 136–154.
- [24] Aliakbarlu, J., Alizadeh, M., Mehdirazavi, R., Naser, A., 2011. Biogenic amines in Iranian white brine cheese: modelling and optimisation of processing factors. *International Journal of Dairy Technology* 64(3): 417-424.
- [25] Durlu- Ozkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N., Tzanetaki, E.L., 2001. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. *Journal of Applied Microbiology* 91: 861- 870.
- [26] Manolopoulou, E., Sarantinopoulos, P., Zoidou, E., Aktypis, A., Moschopoulou, E., Kandarakis, I.G., Anifantakis, E.M., 2003. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *International Journal of Food Microbiology* 82: 153– 161.
- [27] Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou., 2002. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *International Journal of Food Microbiology* 76: 93– 105.
- [28] Panagou, E.Z., Nychas, G.J.E., Sofos, J.N., 2013. Types of traditional Greek foods and their safety. *Food Control* 29: 32- 41.
- [29] Georgieva, R.N., Iliev, I.N., Chipeva, V.A., Dimitonova, S.P., Samelis, J., Danova, S.T., 2008. Identification and in vitro characterisation of *Lactobacillus plantarum* strains from artisanal Bulgarian white brined cheeses. *Journal of Basic Microbiology* 48: 234–244.
- [30] Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N., 2011. Microbiological characteristics of Greek traditional cheeses. *Small Ruminant Research* 101: 17– 32.
- [31] Kilic, B.G., Kuleasan, H., Eralp, I., Karahan A.G., 2009. Manufacture of Turkish Beyaz Cheese added with probiotic strains. *LWT - Food Science and Technology* 42: 1003–1008.
- [32] Bintsis, T., Papademas, P., 2002. Microbiological quality of white-brined cheeses: a review. 55(3): 113-120.
- [33] Buriti, F.C.A., Rocha, J.S., Saad, S.M.I., 2005. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. *International Dairy Journal* 15: 1279–1288.
- [34] Souza, C.H.B., Saad, S.M.I., 2009. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt starter culture and implications on physico-chemical and related properties of Minas fresh cheese during storage. *LWT - Food Science and Technology* 42: 633–640.
- [35] Özer, B., Kırmacı, H.A., Senel, E., Atamer, M., Hayaloglu, A., 2009. Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. *International Dairy Journal* 19: 22–29.
- [36] Sheehan, J.J., Wilkinson, M.G., McSweeney, P.L.H., 2008. Influence of processing and ripening parameters on starter, non-starter and propionic acid bacteria and on the ripening characteristics of semi-hard cheeses. *International Dairy Journal* 18: 905–917.
- [37] Tarakçı, Z., Tunçtürk, Y., 2008. The effect of adjunct cultures on some chemical and biochemical properties of white- brined cheese. *Journal of Food Biochemistry* 32: 490–505.
- [38] Hayaloglu, A.A., Guven, M., Fox, P.F., 2002. Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish White Cheese 'Beyaz Peynir'. *International Dairy Journal* 12: 635-648.
- [39] McMahon, D.J., Oberg, C.J., Drake, M.A., Farkye, N., Moyes, L.V., Arnold, M.R., Ganesan, B., Steele, J., Broadbent, J.R., 2014. Effect of sodium, potassium, magnesium, and calcium salt cations on pH, proteolysis, organic acids, and microbial populations during storage of full-fat Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* 97: 4780-4798.
- [40] Ayad, E.H.E., 2009. Starter culture development for improving safety and quality of Domiati cheese. *Food Microbiology* 26: 533-541.
- [41] Sheehan, J.J., Fenelon, M.A., Wilkinson, M.G., Mcsweeney, P.L.H., 2007. Effect of cook temperature on starter and non-starter lactic acid bacteria viability, cheese composition and ripening indices of a semi-hard cheese manufactured using thermophilic cultures. *International Dairy Journal* 17: 704–716
- [42] Sheehan, J.J., 2007. Salt in Cheese In: *Cheese problems solved*. Edited by P.L.H. Mc Sweeney. Woodhead Publishing Limited and CRC Press Cambridge, England, 424p.

- [43] Esteban-Torres, M., Mancheno, J. M., Rivas, B., Munoz, R., 2015. Characterization of a halotolerant lipase from the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* useful in food fermentations. *LWT - Food Science and Technology* 60: 246-252.
- [44] Bintsis, T., Robinson, R.K., 2004. A study of the effects of adjunct cultures on the aroma compounds of Feta-type cheese. *Food Chemistry* 88: 435-441.
- [45] Asteri, I.A., Kittaki, N., Tsakalidou, E., 2010. The effect of wild lactic acid bacteria on the production of goat's milk soft cheese. *International Journal of Dairy Technology* 63(2): 234-242.
-

Yağlı Tohum Kabuklarının Biyoaktif Bileşen Potansiyeli ve Gıdalarda Kullanımı

Elif Öztürk¹ , Gülden Ova² 

Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İzmir

Geliş Tarihi (Received): 16.11.2016, Kabul Tarihi (Accepted): 26.12.2016✉ *Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): gulden.ova@ege.edu.tr (G. Ova)*

☎ 0 232 311 30 18 📠 0 232 342 75 92

ÖZ

Bu derlemede, gıda sanayisinde işlenen badem, ceviz, kakao, kahve, susam, antepfıstığı, yer fıstığı, kabak çekirdeği, kaju, fındık, keten tohumu ve kolza gibi yağlı tohumların yan ürün olarak açığa çıkan kabuklarının kimyasal bileşenleri, antioksidan aktiviteleri, fenolik bileşenleri, diyet lifi gibi biyoaktif bileşenleri üzerinde yapılmış çeşitli çalışmalara yer verilmiştir. Son yıllarda gıdalara fonksiyonel özellik kazandırabilecek hammaddeler üzerinde araştırmalar önem kazanmıştır. Yağlı tohum kabuklarının gıda artığı olması nedeniyle ucuz hammadde olarak temin edilebilmesi fonksiyonel gıda sanayisinin de ilgisini çekmektedir. Yağlı tohum kabuklarının besin değerleri ve biyoaktif içerikleri konusunda elde edilmiş verilerin fonksiyonel gıda üreticileri için kaynak oluşturmasına yardımcı olmak bu derlemenin amacını oluşturmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Yağlı tohum kabukları, Kimyasal bileşenleri, Diyet lifi, Antioksidan aktivite, Fenolik bileşenler

Bioactive Component Potential of Oilseed Hulls and their Use in Food Products

ABSTRACT

In this review, chemical components, antioxidant activity, phenolic constituents and dietary fiber contents of hulls of oilseeds such as almond, walnut, cocoa, coffee, sesame, pistachio, peanut, pumpkin, cashew, hazelnut, flaxseed and rapeseed as by-products of food industry were discussed. In recent years, research on the raw materials that can provide food functional properties has gained importance. The fact that oilseed shells can be supplied as cheap raw materials attracts the attention of functional food industry. The purpose of this review is to provide a source on nutritional value and bioactive compounds of hulls of oilseeds to functional food producers.

Keywords: Hulls of oilseeds, Chemical compounds, Dietary fiber, Antioxidant activity, Phenolic compounds

GİRİŞ

Yağlı tohum denildiğinde badem, ceviz, kakao, kahve, susam, antepfıstığı, yer fıstığı, kabak çekirdeği, kaju, fındık, keten ve kolza gibi tohumlar akla gelmektedir. Yağlı tohumlar, bitkisel ürünler içinde ayrı bir öneme sahiptir ve gıda sanayisinde işlenmeleri sırasında açığa çıkan yan ürünlerinin değerlendirilmesine yönelik araştırmalar son zamanlarda hız kazanmıştır. Dünyada gıda sanayisinde her yıl milyarlarca ton tarımsal ürün

artığı oluştuğu ve bunların en bol bulunan, ucuz ve yenilenebilir kaynaklar olduğu ifade edilmiştir [1]. 2007/2008 hasat döneminde dünyada yağlı tohum üretimi yaklaşık 388 milyon ton iken protein kaynağı olarak kullanılan yağlı tohum küspesi üretimi de 229 milyon ton civarında gerçekleşmiştir [2]. Tüm Kuruyemiş Sanayicileri ve İş Adamları Derneği'nin Kuruyemiş Sektörü ve Mevcut Durum Analizi Raporu'nda (2014) ülkemizde kuruyemiş sektörünün üretim kapasitesinin yaklaşık 3 milyon ton, 2013 yılı toplam iç pazar

büyükliğünün 6.8 milyar TL olduğu belirtilmiştir. Kuruyemişlerin iç pazar büyüklükleri yer fıstığı için 90 bin ton, fındık için 65 bin ton, antepfıstığı için 45 bin ton, ceviz için 45 bin ton, badem için 35 bin ton, kabak çekirdeği için 25 bin ton, kaju için 10 bin ton civarında hesaplanmıştır [3]. Yağlı tohumlar içinde yer alan soya fasulyesinin işlenmesi sırasında soya fasulyesinin kütütle yaklaşık %8'i kabuk kısmı olarak açığa çıkmakta ve günümüzde bu yan ürünün bir kısmı hayvan yemi üretiminde kullanılmakta fakat büyük miktarı atılmaktadır [4]. Elleuch ve ark. [5], susamın helvaya işlenmeden önce kabuk ayırma işleminden geçirildiği sırada susam kabuklarının yan ürün olarak ortaya çıktığını ve bu çıktının atılmakta olduğunu ya da hayvan yemi olarak kullanılmakta olduğunu belirtmişlerdir. Mandalari ve ark. [6] bademin endüstriyel boyutta işlenmesi sırasında açığa çıkan badem kabuğunun, toplam kabuklu badem ağırlığının %4-8' ini oluşturduğunu vurgulamışlardır. Literatürdeki başka bir çalışmada da kakao çekirdeği işleyen fabrikaların yan ürünü olarak açığa çıkan kakao çekirdeği kabuğunun çekirdeklerin kavrulma işlemi sonrasında açığa çıktığı ve miktarının yüksek olduğu, her yıl tonlarca kakao kabuğunun atıldığı ifade edilmiştir. Kakao kabuklarının gübre, paketleme materyali, teobromin ve kafein üretiminde ikincil kaynak olarak kullanımının yaygın olduğu belirtilmiştir. Kakao kabuklarının yüksek konsantrasyonda çözünür lif ve fenolik bileşen içerdiği ve bu güçlü kanıtlardan dolayı kakao kabuğunun yararlı ve kazançlı bir yan ürün olabileceği öngörülmüştür [7,8]. Yağlı tohumlar ve yan ürünlerinin sağlık açısından etkileriyle ilgili araştırmalar yağlı tohum kabuklarının insan sağlığı ve beslenmesi açısından olumlu katkılarının olabileceğini göstermektedir. Yapılan çalışmalarda, kuruyemiş gibi yağlı tohumlar ve bunların kabuk kısımlarının fitokimyasallarca zengin kaynaklar olduğu, antioksidan aktiviteleri, anti-karsinojenik, antimutajenik etkileri ve anti-proliferatif potansiyelleri bakımından birden fazla fonksiyonel özelliğe sahip oldukları, bu fitokimyasalların ve fenoliklerin zararlı etkilere sahip olan serbest radikallere karşı koruyucu olduğu dolayısıyla belirli kanser tipleri, felç, osteoporoz gibi riskleri azalttığı, aynı zamanda LDL kolesterol düzeyini azaltırken HDL kolesterol seviyesini de arttırdığı rapor edilmiştir [9, 10, 11]. Badem, fındık, yer fıstığı, ceviz gibi kuruyemiş ile yapılmış çeşitli çalışmalar bunların biyoaktif bileşenlerce zengin olduğunu ve doğal katkı maddesi potansiyellerini ortaya koymuştur [1].

YAĞLI TOHUM KABUKLARININ BİLEŞİMİ

Literatürdeki yağlı tohum kabuklarının protein, yağ, mineral gibi temel besin değerleri ve kalite özellikleri incelendiğinde susam kabuğunun protein (%10.2), yağ (%12.2), kül (%23.4) miktarları yanı sıra yağ asitleri kompozisyonu belirlenirken en fazla içerdiği yağ asitlerinin oleik (%43), linoleik (%35), palmitik (%11), stearik (%7) asit olduğu bu asitlerin toplam yağ asitlerinin %96'sını oluşturduğunu tespit edilmiştir. Susam kabuğunun mineral açısından kalsiyumu (%10,5) en yüksek oranda içerdiği ve bu sırayı potasyum, magnezyum ve fosforun takip ettiği bildirilmektedir [12]. Soya kabuklarının ham yağ (34.4 g / kg), kül (49.9 g / kg), ham lif 346.1 (g / kg) ve toplam azot (25.3 g/kg)

miktarları saptanmıştır [4]. Tyug ve ark. [13] da soya kabuklarında kül (%4.21), nem (%9.95), karbonhidrat (%11.5), protein (%4.72), yağ (%1.69) miktarlarını belirlemişlerdir. Yer fıstığı kabuğunda ham protein, hemiselüloz miktarları araştırıldığında ise sonuçlar sırasıyla %8.62, %15.4 olarak elde edilmiştir [14]. Ülkemizde yapılan bir çalışmada fındık kabuğunun yağ (%14.5), protein (%8.2), kül (%1.7) miktarları yağ asitleri kompozisyonu araştırılarak palmitik asit (%6.8), stearik asit (%1.2), oleik asit (%75.2), linoleik asit (%16.2) değerleri belirlenmiştir [15]. Fındık üzerine yapılan diğer bir çalışmada ise fındık kabuğunun organik madde (%97.76), ham protein (%9.47), ham selüloz (%13.92) miktarları saptanmıştır [16]. Arlorio ve ark. [7] kakao çekirdeği kabuğunda yağ (68.1 g/kg), protein (181.2 g/kg), kül (81 g/kg), lif (606 g/kg) miktarlarını belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada kakao çekirdeği kabuğunun 15.82 g/100 g protein, 7.05 g/100 g kül, 2.04 g/100 g yağ, 20.49 g/100 g karbonhidrat içerdiğini belirtmişlerdir [17]. Literatürdeki bir çalışmada kahve çekirdeği zarında da protein (%18.6), yağ (%2.2), karbonhidrat (%62.1), indirgen şeker (%0.21), nem (%7.3), kül (%7) değerleri belirlenmiştir [18].

Yağlı Tohum Kabuklarının Diyet Lif İçerikleri

Lif tayininde kullanılan çeşitli metotların lignin, nişasta içermeyen polisakkaritler, dirençli nişasta, inulin, oligosakkaritler, polidekstroz, dirençli maltodekstrinler, kitin - kitosan, kondrotid sülfat ve karbonhidrat olmayan bileşenlerin bazılarını ya da bir kısmını içerdiği belirtilmiştir [19]. Çeşitli yağlı tohumlarda toplam diyet lif miktarları susam kabuğunda %42, soya fasulyesi kabuğunda %66, kakao kabuğunda %60.6, kahve kabuğunda %62.4, sıcak su ile işlem görmüş badem kabuklarında %45, fındık içi kabuğunda %58.3 olarak tayin edilmiştir [5-7, 18, 20, 21]. Sıcak su ile işlem görmüş badem kabuklarında çözünebilir diyet lifin sadece %3-4 oranında olduğu geri kalanını çözünmeyen diyet lifinin oluşturduğu ifade edilmiştir [6]. Fındık içi kabuğunun çözünür diyet lifi %3.33 iken çözünemeyen diyet lifi %52.7 değerlerinde belirlenmiştir [21]. Soya kabuğunda yapılan diğer bir çalışmada toplam diyet lif miktarı %74.41 olarak bulunmuştur [13]. Özdemir ve ark. [15] fındığın kavrulma işlemi sırasında ortaya çıkan fındık iç kabuğunun kahverengi fonksiyonel katkı maddesi olarak değerlendirilme potansiyelini araştırmışlar ve fındık kabuğunun toplam diyet lif (%67.7), çözünür diyet lif (%10), çözünemeyen diyet lif (%57.7) miktarlarını saptamışlardır. Diyet lifinin gıdanın dokusu üzerine etkisi ile ilgili yapılmış bir çalışmada ise gıdalarda sinerezisin engellenmesinde, yüksek oranlı yağ ve emülsiyon içeren gıdanın yapısının değişmeden kalmasında, dokunun iyileştirilmesinde, geliştirilen gıda formülasyonunun su ve yağ tutma kapasitesinin artırılmasında, viskozite gibi reolojik özelliklerinin geliştirilmesinde fonksiyonel bir bileşen olarak kullanılabilirliği belirtilmektedir [22].

Yağlı Tohum Kabuklarının Fenolik Bileşenleri ve Antioksidan Aktiviteleri

Yağlı tohum kabuklarının içerdikleri fenolik bileşikler ve bu bileşenlerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi ile

gıda sanayisi yan ürünü olarak ortaya çıkan bu hammaddelerin gıda formülasyonlarında doğal antioksidan olarak kullanımları mümkün olacaktır. Contini ve ark. [23] oda sıcaklığında aseton, etanol ve metanol çözücülerinde uzun süre (20 saat, kapalı kap, karanlık) maserasyon işlemi uyguladıktan sonra kavrulmuş fındık iç kabuklarının toplam fenolik bileşen, toplam tannin ve antioksidan aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Ekstraktların toplam fenolik bileşen konsantrasyonları çözügene bağlı olarak değerlendirildiğinde en yüksek değerin etanol ekstraktına (502.3 mg gallik asit (GA)/g), ait olduğu bulunmuştur. Aynı çalışmada, toplam tannin miktarının etanol ekstraktında 357.8 mg tannik asit/g olduğu belirlenmiştir. Çalışmada kavrulmuş fındık kabuğu ekstraktının antioksidan aktivitesinin BHA, BHT, Troloks ve α -tokoferol eşdeğerindeki standart antioksidanlara yakın ya da daha yüksek değerde olduğu bulunmuştur. Fındık içi kabuğunun biyoaktif bileşenlerinin araştırıldığı başka bir çalışmada toplam fenolik bileşenler 664 mg kateşin/g ekstrakt ve DPPH (EC₅₀) cinsinden antioksidan aktivitesi 4.34 μ g ekstrakt/ml olarak belirlenirken, gallik asit (6.21 mg/100 g), prosiyanidin B2 (31.5 mg/100 g), p-hidroksilbenzoik (33.7 mg/100 g), kateşin (250 mg/100 g), epikateşin (34.2 mg/100 g), kuarsetin (85.9 mg/100 g), kaempferol (35.6 mg/100 g) gibi başlıca fenolik bileşenler de tayin edilmiştir [21]. Özdemir ve ark. [15] fındık iç kabuğunda toplam tokoferol miktarını 2.77 μ g/g, (+/-) kateşin miktarını 687 μ g/g ve toplam antioksidan kapasiteyi 2.57 mmol Troloks/g olarak belirlemişlerdir. Bir diğer çalışmada kavrulmuş fındık içi kabuğunun metanol:HCl (1000:1, v/v) ekstraktlarında toplam polifenol içeriği 107 mg GA/g, antioksidan aktivitesi 3.05 mmol Troloks/g olarak, %80 aseton ile hazırlanmış ekstraktlarında ise toplam polifenol içeriği 315 mg GA/g, toplam antioksidan aktivite 5.42 mmol Troloks/g olarak belirlenmiştir [24]. Taş ve Gökmen [25] toplam antioksidan miktarının fındık iç kabuğunda fındığa göre 100 kat, α -tokoferolün iki kat daha fazla olduğunu fındık içi kabuğunun çekirdekle karşılaştırıldığında biyoaktif bileşenlerce zengin bir kaynak olabileceğini belirtmişlerdir. Yağlı tohumlardan biri olan kakao çekirdeğinin işlenmesi sırasında ortaya çıkan kakao kabuğunun toplam fenolik içeriği 18.2 g kateşin/kg olarak belirlenmiştir [7]. Kakao çekirdeği kabuklarının etanol ve metanol:aseton çözümleriyle hazırlanmış ekstraktlarının toplam fenolik bileşen içeriği en yüksek metanol:aseton ekstraktlarında 149.63 mg GA/100 g olarak hesaplanmıştır. Ayrıca antioksidan aktiviteleri miktarları ABTS, DPPH ve FRAP metotlarıyla tayin edilmiştir. En yüksek antioksidan aktivite metanol:aseton ekstraktlarında saptanmıştır. Kakao çekirdeğinin işlenmesi sırasında yan ürün olarak açığa çıkan kakao kabuğunun farkedilir miktarda polifenol madde içermesi nedeniyle gıda endüstrisi için kullanışlı olabileceği sonucuna ulaşılmıştır [17]. Kakao çekirdeği kabuğundan elde edilmiş lifçe zengin üründe toplam fenolik bileşen içeriği (5.78 g GA/100 g) ve FRAP (72.32 μ mol Troloks/g), TEAC (7.73 μ mol Troloks/g) metotları kullanarak antioksidan kapasiteleri hesaplanmıştır [26]. Azizah ve ark. [27] kakao kabuğu ekstraktının antioksidan aktivitesinin çözügen çeşidi, konsantrasyon oranı, sıcaklık ve pH'ya göre değişimini araştırdıklarında ekstraktın konsantrasyonu arttıkça

antioksidan aktivitesinin arttığı, kakao kabuğunun metanol çözügeni içinde antioksidan aktivitesinin en yüksek değerde olduğu ve bunu kloroform, eter ve dikloroeter karışımları ile metanol, kloroform, dikloroetan karışımlarının takip ettiği, ekstraktların antioksidan aktivitelerinin 50°C'nin altında, nötral ya da alkali pH'da değişmediği sonucuna varmışlardır. Ayrıca, kakao yan ürünlerinin antioksidan aktivitesinden flavonoid bileşenlerinin sorumlu olabileceğini ifade etmişlerdir. Ceviz kabuğunun toplam fenolik içeriği ve antioksidan aktivitesi ile ilgili yapılan bir çalışmada ceviz kabuğunun toplam fenolik madde içeriği, saf su ekstraktında 904.7 mg GA/100 g, metanol ekstraktında 664.3 mg GA/100 g, etanol ekstraktında 618.4 mg GA/100 g olarak belirlenmiştir [28]. Literatürdeki başka bir çalışmada öğütülüp toz haline getirilmiş kaju fıstığı kabuğunun etanol ekstraktı veriminin oldukça yüksek (0,45 g/g toz) olduğunu ve toplam fenolik bileşen içeriğinin 243 mg GA/g olduğunu göstermiştir. Araştırma sonucunda kaju fıstığı kabuklarının doğal fenolik bileşen olabileceği ve kabuktaki potansiyel biyoaktif bileşenlerinin varlığının gelecekte gıda ve farmasötik endüstrilerinin ilgisini çekerek ekonomik doğal antioksidan kaynağı olarak değerlendirilebileceği ifade edilmiştir [29]. Kabak çekirdeği kabuğu ile ilgili bir çalışmada p-hidroksibenzoik asitin baskın fenolik bileşen olduğu ve toplam fenolik bileşenlerin %51.4'ünü oluşturduğu saptanmıştır [30]. Monagas ve ark. [31] potansiyel biyoaktif polifenol kaynağı olarak badem kabuğunu incelediklerinde ise kabuk kısmında flavanoller ve flavonol glikozitlerin çoğunlukla bulunan fenolik bileşikler olduğunu, toplam fenolik bileşenlerin %38-57'sini flavanollerin ve %14-35'ini flavonol glikozitlerin oluşturduğunu saptamışlardır. Oksijen radikal absorplama kapasitesi değerlerini de 0.398–0.500 mmol Troloks/g olarak hesaplamışlar ve bu yan ürünün insan beslenmesinde antioksidan bileşence zengin doğal katkı maddesi olarak kullanılabileceği sonucunu ifade etmişlerdir. Badem kabuklarının incelendiği başka bir çalışmada da toplam fenolik bileşenleri 22.8 mg GA/g ve antioksidan kapasitesi 1.07 mmol Troloks/g olarak belirlenmiştir [24]. Antepfıstığı kabuğunun toplam fenolik bileşen miktarı ve antioksidan aktivitesi ile ilgili yapılan bir çalışmada antepfıstığı kabuğunun saf su ile hazırlanmış ekstraktındaki toplam fenolik bileşenleri 2478.5 mg GA/100 g tespit edilmiştir. Antepfıstığı kabuğunun antioksidan aktivitesi belirlenirken antepfıstığının hem su hem de etanolla hazırlanan ekstraktlarının süperoksit anyon radikali giderme aktivitesi incelenmiş ve standart antioksidan madde olarak kullanılan BHT ile karşılaştırılmıştır. Araştırma sonucunda, antepfıstığı kabuğunun etanol ekstraktının süperoksit anyon radikali giderme aktivitesinin (%57.1) standart antioksidan olan BHT (%49)'ye alternatif olduğu dolayısıyla antepfıstığı kabuğunun doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılabileceği belirtilmiştir [28]. Antepfıstığı kabuklarının fitokimyasal ve biyoaktif bileşen analizlerinin yapıldığı bir çalışmada ise bunların büyük bir kısmını anakardik asit (3198 mg/100 g), yağ asitleri (1500 mg/100 g) ve fitosterollerin (192 mg/100 g) oluşturduğu ifade edilmiştir [32]. Soya kabuklarının toplam fenolik bileşen miktarları ve antioksidan kapasitesi ile ilgili yapılmış bir çalışmada, toplam

fenolik madde içeriği 62.44 mg GA/100 g olarak belirlenmiştir. Antioksidan aktivitesi de TEAC (631.90 µmol Troloks/100 g) ve FRAP (340.2 µmol Fe(II)/100 g) metotları ile analiz edilmiştir. Araştırma sonucunda, soya fasulyesinin işlenmesi sırasında açığa çıkan soya kabuklarından elde edilen soya kabuğu tozunun antioksidan aktivitesinin gıda endüstri artığı olmasına rağmen soya sütü tozunun antioksidan kapasitesiyle (TEAC metodu: 1009.5 µmol Troloks/100 g, FRAP metodu: 825.71 µmol Fe(II)/100 g) karşılaştırılabilecek düzeyde olduğu ayrıca soya kabuklarının dikkate değer miktarda fenolik madde içerdiği de ifade edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, ileride sağlığa yararlı nutrasötiklerin geliştirilmesinde soya kabuklarının kullanımını imkânını destekleyen sonuçlar elde edildiği belirtilmiştir [13]. Kahve çekirdeği zarının fonksiyonel özellikleri ile ilgili yapılmış çalışmalar incelendiğinde kahve çekirdeği işlenmesi sırasında oluşan bu yan ürünün aynı zamanda gıda endüstrisinde fonksiyonel bileşen olarak kullanılabilmesi belirtilmiştir [33]. Kahve kabukları ile yapılmış bir çalışmada ise fenolik bileşenler kahve kabuğunda %1,2 civarında tespit edilmiştir [34]. Kahve kabuklarının toplam fenolik bileşenleri ve toplam antioksidan aktivitelerinin belirlendiği bir çalışmada ise sonuçlar sırasıyla 16.1 mg (+/-) kateşin/g ve 138.8 mmol Fe(II)/kg bulunmuştur [35]. Kahve kabukları ile ilgili yapılan bir başka çalışmada antioksidan aktivitesi 1.92 mmol Troloks/100 g olarak belirlenmiştir [18]. Bir diğer çalışmada ise ABTS (3.75 mmol Troloks/100 g), FRAP (7.40 mmol Troloks/100 g) ve DPPH (1.22 mmol Troloks/100 g) metotlarıyla antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir [34]. Yer fıstığı kabuklarının toplam fenolik madde miktarının (91.7 mg GA/g), DPPH radikal temizleme aktivitesinin (%89.97) belirlendiği araştırmanın sonucunda, yüksek miktarda fenolik bileşen içeren ve antioksidan aktivite gösteren bu kabukların, ucuz doğal antioksidan kaynağı ve fonksiyonel gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılabilmesi düşünülmüştür [36]. Liu ve ark. [37] dünyada bitkisel yağın en büyük üçüncü kaynağı olan kolza tohumunun işlenmesi sırasında açığa çıkan kolza tohumu kabuklarının fenolik bileşenleri ile ilgili çok az çalışma olduğunu dile getirerek yağı alınmış kolza tohumu kabuğunun toplam fenolik bileşenlerini (4.47-7.07 mg sinapik asit/g), toplam tannin içeriğini (0.09-0.16 mg kateşin/g) hesaplamışlardır.

YAĞLI TOHUM KABUKLARININ KULLANILDIĞI GIDA FORMÜLASYONLARI

Yağlı tohum kabuklarının biyoaktif bileşenlerinin ve diyet lif içeriklerinin kayda değer miktarda olması son yıllarda çeşitli gıda formülasyonlarında kullanılmasıyla ilgili çalışmalara hız kazandırmıştır. Bu konuda yapılan çalışmalardan biri kahve çekirdeği kabuğunun diyet lif kaynağı olarak ekmekek yapımında kullanılmasıdır. Bu çalışmada öğütülmüş kahve çekirdeği kabuğunun partikül boyutunun ekmekek kalite, raf ömrü, duyu ve görünüş özellikleri ile lif karakteri üzerinde etkili olduğu sonucu elde edilmesinin yanı sıra tasarlanmış formülasyon test edilmiştir ve memnuniyet verici sonuçlar alınmıştır [38]. Susam çekirdeği kabuğu ve hurma posasıyla zenginleştirilmiş emülgatörün diyet lif kaynağı olarak helva yapımında kullanıldığı bir

çalışmada bu bileşenlerin helvaya, yüksek lif içeriği ile su ve yağ tutma potansiyelini arttıracak teknolojik özellikleri kazandırdığı belirtilmiştir. Fonksiyonel özellikteki susam kabuğu ve hurma lifinin polifenol antioksidanları içermesi ve laksatif etki oluşturmasından dolayı beslenme ve sağlık açısından faydalı olabileceği düşünülmüştür. Emülgatörle birlikte ilave edilmiş lifçe zengin yan ürünlerin helvanın lezzet ve stabilize, homojen tekstür, fizyolojik özelliklerini geliştirdiği ve fenolik antioksidanların bulunmasının da sağlık ve besleyici yararlarının olacağı sonucuna varılmıştır [39]. Ma ve ark. [40] öğütülmüş yer fıstığı kabuklarını değişen konsantrasyonlarda (%1.25, 2.5, 3.75 ve 5) yer fıstığı yağına ilave ederek hem toplam fenolik bileşen miktarını hem de antioksidan aktiviteyi artırmışlardır. Kontrol örneği ile karşılaştırıldığında toplam fenolik bileşen miktarında sırasıyla %86, 357, 533 ve 714 artış gözlenmiştir. Toplam proantosiyanidin miktarındaki değişimin ise en düşük konsantrasyonda %633 en yüksek konsantrasyonda %5033 oranında yükseldiği saptanmıştır. Antioksidan aktivite değerleri düşük ve yüksek konsantrasyonlu yer fıstığı kabuğu katkılı yağlarda FRAP metoduna göre %62-829, ORAC metoduna göre de %53-415 arasında artış göstermiştir. Bu çalışmada yer fıstığı kabuğunun diyet lifi içeriği de %55 olarak belirlenmiş ve bu ürünün iyi bir diyet lifi ve bioaktif bileşen kaynağı olarak kullanılması önerilmiştir. Yer fıstığı kabuğu ile zenginleştirilmiş yer fıstığı yağının kalite özellikleri ve tüketiciler tarafından kabul edilebilirliği ile ilgili yapılan bir çalışmada ise ürünün görünüşünde ve fiziksel özelliklerinde ilave edilen yer fıstığı kabuğu miktarının etkili olduğu, duyu panel sonucunda kontrol örneğine göre kıvamın artış gösterdiği, sürülebilirliğin ise azaldığı sonucu elde edilmiştir. Ayrıca kabuk ilavesinin yağların lezzet, doku ve toplam kabul edilebilirliğinden çok görünüş kabul edilebilirliğini azalttığı bulunmuştur [41]. %1.30, 1.80 ve 2.50 oranlarında yer fıstığı kabuğu katılan bisküvilerle ilgili yapılan bir çalışmada çözünmeyen lif miktarının %52'ye kadar arttığı, %2.5 yer fıstığı kabuğu ilavesi ile toplam fenolik bileşen içeriğinin yaklaşık %30 yükseldiği, duyu değerlendirme sonuçlarının kabul edilebilir olduğu görülmüştür [42]. Keten tohumu kabuğu ekstraktı katılarak ekmekek üretiminin denendiği bir çalışmada kontrol örneğine göre 1g keten tohumu ekstraktı ilave edilmiş ekmeğin toplam fenolik bileşen içeriğinin %138.3, antioksidan aktivitenin ise DPPH metoduna göre %90.7, ORAC metoduna göre %67.43 artış gösterdiği ifade edilmiştir. Araştırma sonucunda keten tohumu kabuğu ekstraktının potansiyel fonksiyonel gıda bileşen kaynağı olarak kullanılabilmesi fakat bu konunun hayvan denemeleri ve klinik çalışmalarla da desteklenmesi gerektiği vurgulanmıştır [43]. Öğütülmüş keten tohumu kabuğunun buğday ekmeğine %1-5 arasındaki oranlarda işlenmesi ile ilgili bir çalışmada %5 keten tohumu katkılı ekmeğin kontrol örneğine göre toplam fenolik içeriğinin %93, serbest radikalleri temizleme aktivitesinin %176, indirgeme gücünün %220 yükseldiği belirtilmiştir. Kabuk ilavesinin ekmeğin fiziksel özellikleri üzerindeki etkisi, ekmekek hacminin azalması ekmekek içi sertliğin artması olmuştur. Duyusal değerlendirme sonucunda ise ekmeğin duyu özelliklerinin olumsuz etkilenmesine rağmen tüketici memnuniyetinin sağlandığı belirtilmiştir [44]. Keten

tohumu kabuklarının ekmeğe işlendiği başka bir çalışmada ise %15 oranında zenginleştirme yapılmış ekmeklerin tat ve kabul edilebilirlik açısından kabul edilme seviyesinin altında olduğu sonucu elde edilmiştir [45]. Kahve çekirdeği kabuğunun bisküvide kullanım imkanlarının araştırıldığı bir çalışmada ise doğal renklendirici ve diyet lif kaynağı olarak kahve kabuğunun kullanılabilirliği ifade edilmiştir [46]. Öğütülmüş soya kabuğu ile formüle edilen tavuk etinin kalite özellikleri ve raf ömrü ile ilgili yapılmış bir çalışmada soya kabuğunun iyi bir diyet lif kaynağı olarak tavuk etine fonksiyonel nitelik kazandırabileceği, besleyici değeri geliştirdiği, emülsiyon stabilitesini sağladığı, doku ve renk değerlerinin geliştirilmesine yardımcı olduğu ve raf ömrünün uzattığı sonuçları elde edilmiştir [47].

SONUÇ

Badem, ceviz, kakao, kahve, susam, antepfıstığı, yer fıstığı, kabak çekirdeği, kaju, fındık, keten tohumu ve kolza gibi gıda sanayi artığı olarak açığa çıkan yağlı tohumların kabuklarının temel besin öğeleri, toplam fenolik bileşenleri, antioksidan aktiviteleri, diyet lif miktarları ile ilgili yapılan çalışmalar fonksiyonel ürün geliştirmede etkili ve ucuz hammadde olarak kullanım potansiyeline sahip olduklarını göstermektedir. Lifçe ve fenolik maddelerce zengin ve düşük kalorili gıdaların üretiminde, bu tür yan ürünlerden yararlanılması konusunda araştırmaların sürdürülmesi katma değeri yüksek yeni ürünlerin geliştirmesine olanak sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Valdés, A., Beltrán, A., Garrigós, M.C., 2015. Potential use of nut agricultural by-products in polymer materials: A review, *Agricultural Wastes: Characteristics. Types and Management* 87-106.
- [2] İlikdoğan, U., 2008. Dünya ve Avrupa Birliği'nde Yağlı Tohum Ticaretinde Gelişmeler ve Türkiye Bağlamında Değerlendirme, AB Uzmanlık Tezi, Ankara, Türkiye.
- [3] Tüm Kuruyemiş Sanayicileri ve İş Adamları Derneği, 2014. Kuruyemiş Sektörü Mevcut Durum Analizi, Teknik Raporlar, <http://www.tuksiad.org/sayfa/teknik-raporlar,247.php>
- [4] Sessa, D. J., 2004. Processing of soybean hulls to enhance the distribution and extraction of value-added proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 75-82. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.1612>
- [5] Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C., Attia, H., 2011. Dietary fibre and fibre rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry* 124(2): 411-421
- [6] Mandalari, G., Tomaino, A., Arcoraci, T., Martorana, M., Lo Turco, V., Cacciola, F., Rich, G.T., Bisignano, C., Saija, A., Dugo, P., Cross, K.L., Parker, M.L., Waldron, K.W., Wickham, M.S.J., 2010. Characterization of polyphenols, lipids and dietary fibre from almond skins (*Amygdalus communis* L.). *Journal of Food Composition and Analysis* 23: 166-174
- [7] Arlorio, M., Coisson, J.D., Travaglia, F., Varsaldi, F., Miglio, G., Lombardi, G., Martelli, A., 2005. Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from *Theobroma cacao* hulls extracted with supercritical CO₂. *Food Research International* 38: 1009 - 1014.
- [8] Bruna, C., Eichholz, I., Rohn, S., Kroh, L.W., Huyskens - Keil, S., 2009. Bioactive compounds and antioxidant activity of cocoa hulls (*Theobroma cacao* L.) from different origins, *Journal of Applied Botany and Food Quality* 83: 9-13.
- [9] Alasalvar, C., Shahidi, F., 2008. Tree nuts: Composition, phytochemicals, and health effects: An overview. In C. Alasalvar & F. Shahidi (Eds.), *Tree nuts: Composition, phytochemicals, and health effects* (pp. 1-10). Boca Raton, FL: CRC Press Taylor & Francis Group.
- [10] Alasalvar, C., Hoffman, A.M., Shahidi, F., 2008. Antioxidant activities and phytochemicals in hazelnut (*Corylus avellana* L.) and hazelnut by-products. In C. Alasalvar & F. Shahidi (Eds.), *Tree nuts: Composition, phytochemicals and health effects* (pp. 215 - 235). Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group
- [11] Esfahlan, A.J., Jamei, R., Esfahlan, R.J., 2010. The importance of almond (*Prunus amygdalus* L.) and its by-products, *Food Chemistry* 120: 349-360.
- [12] Elleuch, M., Besbes, S., Roiseux, O., Blecker, C., Attia, H., 2007. Quality characteristics of sesame seeds and by-products. *Food Chemistry* 103: 641-650.
- [13] Tyug, T.S., Prasad, K.N., Ismail, A., 2010. Antioxidant capacity, phenolics and isoflavones in soybean by-products, *Food Chemistry* 123: 583-589.
- [14] Yang, J.M., 2005. Soybean milk residue ensiled with peanut hulls: fermentation acids, cell wall composition, and silage utilization by mixed ruminal microorganisms. *Bioresource Technology* 96(12): 1419-1424.
- [15] Özdemir, K.S., Yılmaz, C., Durmaz, G., Gökmen, V., 2014. Hazelnut skin powder: A new brown colored functional ingredient. *Food Research International* 65: 291-297.
- [16] Ayfer, M., Uzun, A., Baş, F., 1986. 'Türk Fındık Çeşitleri'. Karadeniz Bölgesi Fındık ihracatçıları Birliği, Ankara.
- [17] Martínez, R., Torres, P., Meneses, M.A., Figueroa, J.G., Pérez-Álvarez, J.A., Viuda-Martos, M., 2012. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. *Food Research International* 49: 39-45.
- [18] Borrelli, R.C., Esposito, F., Napolitano, A., Ritieni, A., Fogliano, V., 2004. Characterization of a New Potential Functional Ingredient: Coffee Silverskin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 1338-1343.
- [19] Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. 2001. Dietary reference intakes. Proposed definition of dietary fiber. A report of the panel on the definition of dietary fiber and the standing committee on the scientific evaluation of dietary

- reference intakes. *Washington, DC: National Academy Press.*, <https://www.nap.edu/read/10161/chapter/3#8>
- [20] Yang, J., Xiao, A., Wang, C., 2014. Novel development and characterisation of dietary fibre from yellow soybean hulls. *Food Chemistry* 161: 367–375.
- [21] Montella, R., Coissona, J.D., Travaglia, F., Locatelli, M., Malfa, P., Martelli, A., Arlorioa, M., 2013. Bioactive compounds from hazelnut skin (*Corylus avellana* L.): Effects on *Lactobacillus plantarum* P17630 and *Lactobacillus crispatus* P17631. *Journal of Functional Foods* 306-315.
- [22] Elleuch, M., Besbes, S., Blecker, C., Roiseux, O., Deroanne, C., Drira, N.D., Attia, H., 2008. Date flesh: Chemical composition and characteristics of the dietary fibre. *Food Chemistry* 11: 676–682.
- [23] Contini, M., Baccelloni, S., Massantini, R., Anelli, G., 2008. Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature. *Food Chemistry* 110: 659–669.
- [24] Monagas, M., Garrido, I., Aguiar, R., Cordovés, M., Rybarczyk, A., Amarowicz, R., Bartolome, B., 2009. Comparative flavan-3-ol profile and antioxidant capacity of roasted peanut, hazelnut, and almond skins. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 5: 10590–10599.
- [25] Taş, N.G., Gökmen, V., 2015. Bioactive compounds in different hazelnut varieties and their skins. *Journal of Food Composition and Analysis* 43: 203–208.
- [26] Lecumberri, E., Mateos, R., Izquierdo-Pulido, M., Rupe´rez, P., Goya, L., Bravo, L., 2007. Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Food Chemistry* 104: 948–954.
- [27] Azizah, A.H., Nik Ruslawati, N.M., Swee Tee, T., 1999. Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products. *Food Chemistry* 64: 199 – 202.
- [28] Zoral, F.B., Turgay, Ö., 2014. Çeşitli gıda atıklarının toplam fenolik madde içeriğinin, antioksidan ve antimikrobiyel aktivitelerinin araştırılması. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi* 17(2): 24-33.
- [29] Kamath, V., Rajini, P. S., 2007. The efficacy of cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) skin extract as a free radical scavenger. *Food Chemistry* 103: 428–433.
- [30] Peričin, D., Krimer, V., Trivić, S., Radulović, L., 2009. The distribution of phenolic acids in pumpkin's hull-less seed, skin, oil cake meal, dehulled kernel and hull. *Food Chemistry* 113: 450–456.
- [31] Monagas, M., Garrido, I., Aguiar, R., Bartolome, B., Cordovés, M., 2007. Almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) skins as a potential source of bioactive polyphenols. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 55: 8498–8507.
- [32] Grace, M.H., Esposito, D., Timmers, M.A., Xiong, J., Yousef, G., Komarnytsky, S., Lila, M.A., 2016. Chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory properties of pistachio hull extracts. *Food Chemistry* 210: 85–95.
- [33] Esquivel, P., Jiménez, V.M., 2012. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International* 46: 488–495.
- [34] Sánchez, D.A., Anzola, V.C., 2014. Chemical characterization of the coffee silverskin (*Coffea arabica*) in varieties colombia and caturra. *Revista Colombiana de Química* 41(2): 0120-2804.
- [35] Bresciani, L., Calani, L., Bruni, R., Brighenti, F., Rio, D., 2014. Phenolic composition, caffeine content and antioxidant capacity of coffee silverskin. *Food Research International* 61: 196–201.
- [36] Win, M. M., Abdul-Hamit, A., Baharin, B. S., Anwar, F., Sabu, M.C., Pak-Dek, M.S., 2011. Phenolic compounds and antioxidant activity of peanut's skin, hull, raw kernel and roasted kernel flour. *Pakistan Journal of Botany* 43(3): 1635-1642.
- [37] Liu, Q., Wua, L., Pu, H., Li, C., Hua, Q., 2012. Profile and distribution of soluble and insoluble phenolics in Chinese rapeseed (*Brassica napus*). *Food Chemistry* 135: 616–622.
- [38] Pourfarzad, A., Mahdavian- Mehr, H., Sedaghat, N., 2013. Coffee silverskin as a source of dietary fiber in bread-making: Optimization of chemical treatment using response surface methodology. *Food Science and Technology* 50: 599 – 606.
- [39] Elleuch, M., Bedigian, D., Maazoun, B., Besbes, S., Blecker, C., Attia, H., 2014. Improving halva quality with dietary fibres of sesame seed coats and date pulp, enriched with emulsifier. *Food Chemistry* 145: 765-771.
- [40] Ma, Y., Kerr, W.L., Swanson, R.B., Hargrove, J.L., Pegg, R.B., 2014. Peanut skins-fortified peanut butters: Effect of processing on the phenolics content, fibre content and antioxidant activity. *Food Chemistry* 145: 883–891.
- [41] Sanders III, C.T., DeMasie, C.L., Kerr, W.L., Hargrove, J.L., Pegg, R.B., Swanson, R.B., 2014. Peanut skins-fortified peanut butters: Effects on consumer acceptability and quality characteristics. *LWT - Food Science and Technology* 59: 222-228.
- [42] Camargo, A.C., Vidal, C.M.M., Canniatti-Brazaca, S.G., Shahidi, F., 2014. Fortification of cookies with peanut skins: effects on the composition, polyphenols, antioxidant properties, and sensory quality. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 62: 11228–11235.
- [43] Hao, M., Beta, T., 2012. Development of Chinese steamed bread enriched in bioactive compounds from barley hull and flaxseed hull extracts. *Food Chemistry* 133: 1320–1325.
- [44] Sęczyk, Ł., Świeca, M., Dziki, D., Anders, A., Gawlik-Dziki, U., 2017. Antioxidant, nutritional and functional characteristics of wheat bread enriched with ground flaxseed hulls. *Food Chemistry* 214: 32–38.
- [45] Marpalle, P., Sonawane, S.K., Arya, S.S., 2014. Effect of flaxseed flour addition on physicochemical and sensory properties of functional bread. *LWT – Food Science and Technology* 58: 614–619.
- [46] Garcia-Serna, E., Martinez-Saez, N., Mesias, M., Morales, F.J., Castillo, M.D., 2014. Use of coffee

silverskin and stevia to improve the formulation of biscuits. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 64(4): 243–251.

[47] Kumar, V., Biswas, A.K., Sahoo, J., Chatli, M.K., Sivakumar, S., 2013. Quality and storability of

chicken nuggets formulated with green banana and soybean hulls flours. *Journal of Food Science and Technology* 50(6): 1058–1068.

Akademik Gıda Dergisi Yazım Kuralları

Akademik Gıda dergisi gıda bilimi ve teknoloji alanında hazırlanmış özgün araştırma ve derleme makalelerin yayımlandığı **hakemli** bir dergidir. Araştırma notu, mini derleme, görüş ve editöre mektup gibi yazılar da yayın için değerlendirilir. Dergi 3 ayda bir basılmakta olup 4 sayıda bir cilt tamamlanır. Dergide Türkçe ve İngilizce makaleler yayınlanır.

Akademik Gıda dergisinde yayınlanması istenen çalışmalar derginin www.academicfoodjournal.com web sayfasında bulunan elektronik makale gönderim sistemi üzerinden gönderilmelidir. E-posta ile gönderilen makaleler değerlendirilmeyecektir. Elektronik makale gönderim sistemi ile ilgili sorularınız için ogursoy@yahoo.com e-posta adresinden editörle irtibata geçebilirsiniz.

- Gönderilecek çalışmanın dergide hangi tür makale olarak (Araştırma Makalesi, Derleme Makale, Araştırma Notu, Mini Derleme, Görüş ve Editöre Mektup) yayınlanması istendiği yazar(lar) tarafından mutlaka belirtilmelidir.
- Yazar(lar) tarafından çalışmayı değerlendirebileceği düşünülen ve yazar(lar)la çıkar çatışması/çakışması olmayan en az 3 potansiyel hakem iletişim bilgileri de (yazışma adresi, e-posta ve telefon numarası) verilerek önerilmelidir. Önerilecek hakemler yazarın kendi kurumu dışından olmalıdır.
- Gönderilecek çalışmalar yazım ve imla hataları içermemelidir. İngilizceden Türkçeye tercüme edilen teknik terimler "Gıda Mühendisliği Teknik Terimler Rehberi"nde [Gıda Mühendisleri Odası, Kitaplar Serisi No: 17, Filiz Matbaacılık, Ankara, 232s, ISBN: 978-9944-89-407-4] tavsiye edilen şekliyle kullanılmalıdır.
- Gönderilen çalışmaların daha önce hiç bir yerde yayınlanmadığı yazar(lar) tarafından garanti edilmelidir.
- Çalışmanın özgünlüğü ve çalışma ile ilgili her türlü etik hususdan yazar(lar) sorumludur.
- Yayın Kurulu yayına kabul edilmiş çalışmalarda gerekli değişiklikleri yapmaya yetkilidir.

Makalelerin Değerlendirilmesi

Yayımlanmak üzere Akademik Gıda dergisine gönderilen çalışmalar öncelikle Editörlerin ön incelemesinden geçmektedir. İlk incelemeyi geçen çalışmalar, değerlendirilmek üzere en az iki bağımsız hakeme gönderilmektedir. Çalışmaların değerlendirilmesinde hakemlerin makale yazar(lar)ını, makale yazar(lar)ının hakemleri görmediği çift-kör (double-blind) değerlendirme sistemi kullanılmaktadır.

Editörler (i) dergi kapsamı dışında olan, (ii) teknik açıdan yetersiz, (iii) kendi içerisinde bütünlük ve tutarlılık arz etmeyen sonuçlar içeren veya (iv) kötü yazılmış çalışmaları doğrudan reddetme hakkına sahiptir.

Hızlandırılmış Makale Basımı

Dergide "yayımlanmak üzere kabul edilen makalelerin", derginin takip eden ilk sayısında yayımlanmasını talep eden yazar(lar)ın yayıncı kuruluşa makale başına 750 TL ücret ödemesi gerekmektedir. Bu durum hızlandırılmış basım talebi olmayan makaleler için geçerli olmayıp, Akademik Gıda dergisinde makale basımı için yazar(lar)dan herhangi bir ücret talep edilmemektedir.

Çalışmaların Hazırlanması

1. Çalışmalar A4 boyutunda hazırlanmalı, üstten 2.45 cm, alttan 2.45 cm, sağ ve soldan 1.75 cm boşluk bırakılmalı ve tek kolon olarak hazırlanmalıdır. Metin çift satır aralıklı yazılmalı, paragraflar arasında tek satır boşluk bırakılmalıdır. Metinde bütün satırlar (sürekli) numaralandırılmalıdır.

2. Çalışma başlığı 14 punto Arial, koyu, küçük harflerle ve ortalanmış olarak yazılmalıdır. Başlıktan sonra bir satır boşluk bırakılmalı (11 punto); yazar isimleri (yalnızca ilk harfler büyük) 10 punto Arial ve ortalanmış olarak verilmelidir. Yazarların adresleri, telefon ve faks bilgileri ile yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi hemen alt satırda 9 punto Arial, ilk harfler büyük olacak şekilde ve ortalanmış olarak yazılmalıdır. Yazarların çalıştıkları kuruluşlar (ve/veya adresler) farklı ise her bir yazar isminin sonuna rakamlarla üst indis konulmalıdır.

3. Metin içindeki kısımların başlıkları (ÖZ, ABSTRACT, GİRİŞ vb.) 10 punto Arial ve koyu olarak büyük harflerle yazılmalı, başlıktan sonra bir satır boşluk bırakılarak metine geçilmelidir. Alt başlıklarda ilk harfler büyük, 10 punto Arial ve koyu yazı karakteri kullanılmalıdır. ÖZ'ün altına bir satır boşluk bırakıldıktan sonra en fazla 5 adet Anahtar Kelime konmalıdır. Anahtar Kelimelerden sonra bir satır boşluk bırakılarak İngilizce başlık ve altına ABSTRACT ve Keywords yazılmalıdır. Bir satır boşluk bırakılarak ana metine geçilmelidir.

4. Ana metin 9.5 punto Arial olarak hazırlanmalıdır.

5. Çalışma başlıca şu kısımlardan oluşmalıdır: Başlık, Yazar İsimleri, Adresleri, İletişim Bilgileri, Yazışmalardan Sorumlu Yazarın E-posta adresi, Öz, Abstract, Ana Metin (Giriş, Materyal ve Metot, Bulgular ve Tartışma, Sonuç), Teşekkür (gerekliyse), Kısaltmalar (gerekliyse), Kaynaklar.

6. Öz ve Abstract 250 kelimeyi geçmemeli, çalışmanın amacını, metodunu ve önemli sonuçlarını içermelidir. Öz tek paragraf olarak yazılmalı ve öz içinde kaynaklara atıf yapılmamalıdır.

7. Çalışma içerisinde geçen mikroorganizma isimleri ile Latince ifade ve isimler italik olarak yazılmalı ve kısaltmalarda uluslararası yazım kuralları göz önünde bulundurulmalıdır.

8. Tablo başlıkları tablonun üstüne, şekil başlıkları ise şeklin altına yazılmalı ve numaralandırılmalıdır. Kullanılan tablo ve şekillere metin içinde mutlaka atıf yapılmalıdır. Metin içinde geçen veriler tablo ve şekillerin tekrarı olmamalıdır. Tablo ve şekillerin başlıkları içerikleriyle uyumlu ve anlaşılabilir olmalıdır. Şekiller ve resimlerin siyah-beyaz ve yüksek çözünürlükte olmasına dikkat edilmelidir. Resimler (ve gerekiyorsa Şekiller) *.jpg formatında metin içerisinde yer almalıdır.

9. Metin içerisinde atıflar köşeli parantez içerisinde rakamlarla yapılmalı [1] ve Kaynaklar bölümünde bu numara sırasıyla detayları yazılmalıdır. Kaynakların numaralandırılması MS Word Numaralandırma Kitaplığı kullanılarak yapılmalıdır.

10. Kullanılan matematiksel denklemler numaralandırılmalı ve metin içerisinde bu denklemlere atıf yapılmalıdır.

11. Kaynakların yazımında aşağıdaki örnek yazım biçimleri kullanılmalı ve makalelerin yayınlandığı dergi isimleri italik olarak yazılmalıdır. Web adreslerine atıf yapılacağına (mümkün olduğunca Resmi web sayfalarına atıf yapılmalıdır) mutlaka ilgili web adresine erişim tarihi verilmelidir.

Makale

- [1] Bozkurt, H., İçier, F., 2009. İnegöl köfte üretiminde ohmik pişirmenin uygulanabilirliğinin incelenmesi. *Akademik Gıda* 9(1): 6-12.

Kitap

- [2] Kılıç, S., 2001. Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ege Üniversitesi Matbaası, Bornova, İzmir.

Kitap Bölümü

- [3] Gibson, G.R., Saavedra, J.M., MacFarlane, S., MacFarlane, G.T., 1997. Probiotics and Intestinal Infections. In *Probiotics 2: Applications and Practical Aspects*, Edited by R. Fuller, Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London SE1 8HN, England, 212p.

Kongre-Sempozyum Bildirisi

- [4] Gürsoy, O., Akdemir, O., Hepbaşlı, A., Kınık, Ö., 2004. Recent situation of energy consumption in Turkey dairy industry. *International Dairy Symposium: Recent Developments in Dairy Science and Technology*, May 24-28, 2004, Isparta, Turkey, Book of Proceedings, 10-16p.

12. Hakem görüşleri doğrultusunda düzeltilmek üzere yazar(lar)a gönderilen çalışmaların gerekli düzeltmeleri yapılarak en geç bir ay içerisinde yayın ofisine ulaştırılması gereklidir. Bu süre zarfında gönderilmeyen çalışmalar "ilk defa gönderilmiş çalışma" olarak değerlendirilecektir.

13. Yukarıdaki kurallara uygun olarak hazırlanmamış çalışmalar değerlendirmeye alınmaz.

Guidelines to Authors

Akademik Gıda® (Academic Food Journal) is a peer reviewed journal where original research and review articles are published in the field of food science and technology. Research notes, mini-reviews, opinions and letters to the editor are also considered for publication. The journal is published trimonthly and each volume is composed of 4 issues per year. Journal articles are published either in Turkish or English. Manuscripts in either good American or British English usage are accepted, but not a mixture of these.

Manuscripts for the Akademik Gıda® (Academic Food Journal) must be sent via the electronic article submission system, which can be located in the official website of the journal, www.academicfoodjournal.com. Manuscripts sent by e-mail are not considered for evaluation. For questions related to the electronic article submission system, contact the editor via e-mail at ogursoy@yahoo.com.

- Authors must specify the type of the manuscript (research articles, review articles, research briefs, mini-review articles, comments and letters to the editor).
- Authors should provide at least 3 potential referees and their contact information (mailing address, e-mail address and phone number).
- Manuscripts to be submitted should be free from any spelling or grammatical error.
- Authors must guarantee that the submitted manuscript is not published anywhere previously and will not be submitted to anywhere before the editorial board makes a final decision on the manuscript.
- Authors are responsible from the originality of the study and all kinds of ethical issues related to their study.
- The editorial board is authorized to make necessary changes in manuscripts accepted for publication.

Peer review policy

Manuscripts pass through initial screening in the editorial office followed by internal review by Editors. After the first evaluation, manuscripts are double-blind-reviewed by a peer review system involving at least two independent reviewers to ensure high quality of manuscripts accepted for publication. The Editors have the right to decline formal review of a manuscript if it is (i) on a topic outside the scope of the Journal, (ii) lacking technical merit, (iii) fragmentary and providing marginally incremental results or (iv) poorly written.

Publication fee

Akademik Gıda® (Academic Food Journal) welcomes article submissions and does not charge a publication fee.

Accelerated publication of an article

Articles accepted for publication can be published in the first coming issue of the journal at the charge of €200 per manuscript if the authors request accelerated publication.

Preparation of a manuscript

1. Manuscripts should be prepared in A4 size, and the text must be prepared in a single column format. The text must be double-spaced, and a single space should be left between paragraphs. All lines and pages must be continuously numbered.
2. The title must be 14pt Arial, bold, small letters and centered. A blank line should be left after the title, and the names of authors should be given in 10pt Arial and centered. In addition to each author's contact address, the phone and fax numbers and e-mail address of the corresponding author should be provided. If the institutions of the authors are different, superscript numbers should be used to indicate their addresses.
3. The headings (e.g. Abstract, Introduction, Materials and Methods etc.) must be 10pt Arial, and should be typed in bold capital letters. Each heading should appear on its own separate line. A blank line should be left after each heading. A list of keywords, a maximum of 5, should be provided below the abstract section of the manuscript.
4. The main text should be prepared in 9.5pt Arial.
5. Typical articles mainly consist of the following divisions: Title, Author Names, Addresses, Contact Information, Corresponding author's e-mail address, Abstract, Main text (Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions), Acknowledgements (if necessary), Abbreviations (if necessary) and References.
6. The abstract should not exceed 250 words, and the main purpose and method and the most significant result and conclusion should be presented in the abstract. The abstract should be prepared as a single paragraph, and should not include any citation.

7. Latin names in the text should be in italics, and names and abbreviations should follow international rules. If abbreviations that are not standard are unavoidable, they must be defined at their first mention in the text. Consistency of abbreviations throughout the article must be ensured. Internationally accepted rules and conventions must be followed, and the international system of units (SI) must be used. If other units are mentioned, their equivalents in SI must be provided.

8. Table headings should be on the top of each table and figure captions below each figure. Each table or figure must be numbered consecutively in accordance with their appearance in the text. All figures and tables should be cited in the text. The data presented in the tables and figures should not be repeated in the text. Table headings and figure captions should be self-explanatory. Figures and pictures must be provided in high resolution (black and white), and pictures (and, if necessary figures) should be included in the text as *.jpg format.

9. References in the text should be cited in numbers in square brackets [1] and details of the citations must be provided in the Literature or References section with their respective numbers.

10. Mathematical equations should be numbered and cited in the text.

11. The following formats should be used for the details of cited references, and the journal names must be typed in italics. References to the Web addresses (if necessary, the official web pages should be preferred) must include full web address and the date of access.

Article

- [1] Güzeler, N., Kaçar, A., Say, D., 2011. Effect of milk powder, maltodextrin and polydextrose use on physical and sensory properties of low calorie ice cream during storage. *Akademik Gıda* 9(2): 6-12.

Book

- [2] Kilic, S., 2001. Lactic Acid Bacteria in Dairy Industry. Ege University Faculty of Agriculture Publications, Ege University Press, Bornova, Izmir, Turkey.

Book Chapter

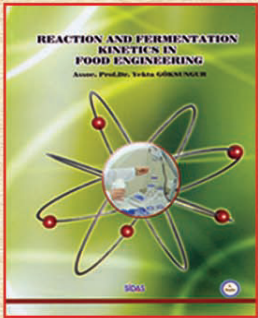
- [3] Gibson, G.R., Saavedra, J.M., MacFarlane, S., MacFarlane, G.T., 1997. Probiotics and Intestinal Infections. In *Probiotics 2: Applications and Practical Aspects*, Edited by R. Fuller, Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London, England, 212p.

Proceedings of the Congress-Symposium

- [4] Gursoy, O., Akdemir, O., Hepbasli, A., Kinik, O., 2004. Recent situation of energy consumption in dairy industry in Turkey. *International Dairy Symposium: Recent Developments in Dairy Science and Technology*, May 24-28, 2004, Isparta, Turkey, Book of Proceedings, 10-16p.

12. A list of the corrections requested by the referees must be provided by the authors, and it must be sent to the editorial office via e-mail within a month.

13. Studies that are not prepared in accordance with the rules above will not be considered for evaluation.



₺15



₺50



₺20



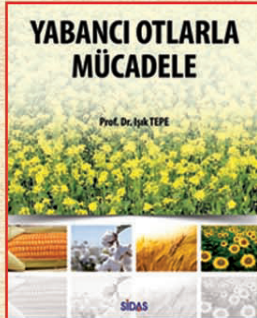
₺30



₺30



₺30



₺20



₺20



₺10



₺10



₺30



₺20



₺20



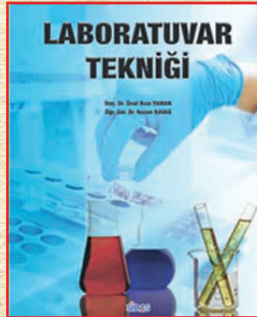
₺50



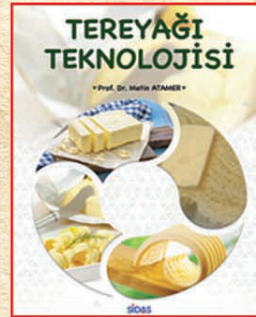
₺30



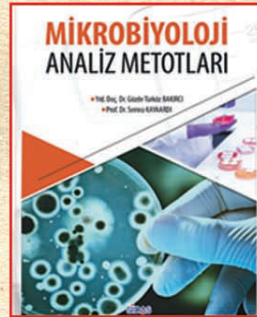
₺15



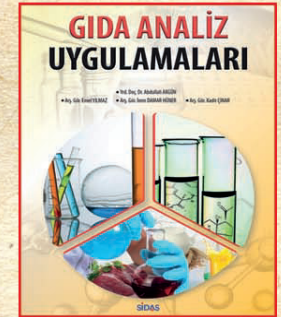
₺15



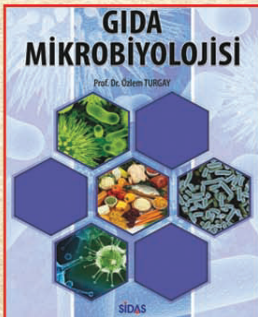
₺20



₺20



₺20



₺30



₺20



₺30

İsteme Adresi: Fevzipaşa Bulv. Çelik İş Merkezi No: 162 K:3 D:302 Çankaya / İZMİR

Tel: 0232 441 60 01

Fax: 0232 441 61 06

sidasmadya@gmail.com

www.gidakitaplari.com

Sektörel Yayıncılıkta Çağdaş Yaklaşım...



SİDAS MEDYA

Fevziyaşa Bulvarı Çelik İş Merkezi No:162/302 Çankaya - İZMİR

Tel: +90 232 441 60 01 Fax: +90 232 441 61 06

www.foodsektor.com

info@foodsektor.com