

GIDA

THE JOURNAL OF FOOD



E-ISSN 1309 - 6273, ISSN 1300 - 3070

CİLT / VOLUME : 45

SAYI / NUMBER : 1

YIL / YEAR : 2020

GIDA TEKNOLOJİSİ DERNEĞİ YAYINI

*PUBLISHED BY THE ASSOCIATION OF
FOOD TECHNOLOGY IN TURKEY*

Sahibi / Owner

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

Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

Yönetim Kurulu Başkanı / President of the Association

Editörler / Editors	Danışma Kurulu / Advisory Board
<p>ÇAKIR, İbrahim (Editor in chief); <i>Bolu Abant İzzet Baysal University, Turkey</i> AVCI, Ayşe; <i>Sakarya University, Turkey</i> ÇOLAKOĞLU, A. Sinan; <i>Kabramanmaraş Sütçü İmam University, Turkey</i> EYİLER, Esen; <i>Akdeniz University, Turkey</i> TABAN, Birce M.; <i>Ankara University, Turkey</i></p>	<p>Akköse, Ahmet; <i>Atatürk University, Turkey</i> Ank, Gökşen G.; <i>Balıkesir University, Turkey</i> Atalar, İlyas; <i>Bolu Abant İzzet Baysal University, Turkey</i> Baysal, A. Handan; <i>İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Turkey</i> Bezirtzoğlu, Eugenia; <i>Democritus University of Thrace, Greece</i> Bozkır, Hamza; <i>Sakarya Uygulamalı Bilimler University, Turkey</i> Çılak, Gizem Ö.; <i>Hittit University, Turkey</i> Draughon, Ann <i>Tennessee University, USA</i> El Soda, <i>Morsi University of Alexandria, Egypt</i> Erbay, Zafer; <i>Adana Bilim ve Teknik University, Turkey</i> Evren, Mustafa; <i>Ondokuz Mayıs University, Turkey</i> Fogliano, Vincenzo <i>University of Napoli Federico II, Italy</i> Gerçekaslan, K. Emre; <i>Neşehir Hacı Bektaş Veli University, Turkey</i> Ghosh, Bikash C. <i>National Dairy Research Institute, India</i> Gollop, Natan <i>The Volcani Center, ARO, Israel</i> Griffiths, Mansel <i>University of Guelph, Canada</i> Güneşer, Onur; <i>Uşak University, Turkey</i> Güven, Esra Ç.; <i>İstanbul Teknik University, Turkey</i> Ho, Chi-Tang <i>The State University of New Jersey, USA</i> Hoşoğlu, Müge I.; <i>Gebze Teknik University, Turkey</i> Hüner, İrem D.; <i>Trakya University, Turkey</i> Kahraman, Kevser; <i>Abdullah Gül University, Turkey</i> Karaca, Hakan; <i>Pamukkale University, Turkey</i> Koçan, Deniz; <i>Aksaray University, Turkey</i> Konuskan, Dilşat B.; <i>Mustafa Kemal University, Turkey</i> Kuleşan, Hakan; <i>Süleyman Demirel University, Turkey</i> Meral, Raciye; <i>Yüzüncü Yıl University, Turkey</i> Mete, Aylin A.; <i>Mersin University, Turkey</i> Morales, Francisco J. <i>CSIC Instituto del Fr o, Spain</i> Muhtaba, Mustafa G. <i>Florida Gulf Coast University, USA</i> Mutlu, Türkan K.; <i>Çukurova University, Turkey</i> Öztürk, Fatma; <i>Kâtip Çelebi University, Turkey</i> Paalme, Toomas <i>Tallinn University of Technology, Estonia</i> Parlar, Harun <i>Technical University of Munich, Germany</i> Raspor, Peter <i>University of Primorska, Slovenia</i> Rezessy-Szabo, Judit M. <i>Corvinus University of Budapest, Hungary</i> Sanı, Ferda; <i>Cumhuriyet University, Turkey</i> Şengün, İlkin Y.; <i>Ege University, Turkey</i> Soyer, Yeşim; <i>Orta Doğu Teknik University, Turkey</i> Toğay, Sine Ö.; <i>Bursa Uludağ University, Turkey</i> Toker, Ömer S.; <i>Yıldız Teknik University, Turkey</i> Velioglu, Murat; <i>Namık Kemal University, Turkey</i> Yemiş, Gökçe P.; <i>Sakarya University, Turkey</i> Yolaçaner, Elif; <i>Hacettepe University, Turkey</i> Yorulmaz, Aslı; <i>Adnan Menderes University, Turkey</i> Zorba, Murat; <i>Çanakkale Onsekiz Mart University, Turkey</i></p>
<p>Yönetim Yeri Adres / Address Büyükelçi Sokak No: 18/1 Kavaklıdere/Ankara Turkey</p>	
<p>Tel: (+90) 0534 968 5994 • Faks: (+90) 312 317 8711 E-posta / E-mail: dergi@gidadernegi.org URL: http://www.gidadernegi.org</p>	
<p>Yayın Türü: Yaygın süreli ve hakemli</p>	
<p>Hazırlayan / Prepared Sim Ajans 58. Sokak No: 20/1 Bahçelievler / Ankara Tel : (+90) 312 925 25 95 e-mail: simajans@simajans.com</p>	
<p>Yayın Tarihi / Publication Date 15 02 2020</p>	

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

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

İçindekiler / Content

Araştırmalar (İngilizce) / Researches (English)

- Oz, E. *Effects of smoking with different wood chips and barbecuing on some properties of salmon fish* / Farklı odun talaşları ile tütüleme ve mangalda pişirmenin somon balığının bazı özellikleri üzerine etkileri **1-8**
- Suna, S., Çiftçi, K., Tamer, C. E. *Determination of physicochemical and sensory properties of kombucha beverage prepared with saffron* / Safran kullanılarak hazırlanan kombucha içeceğinin fizikokimyasal ve duyuşal özelliklerinin belirlenmesi **20-30**
- Yazgan, H. *Biogenic amine production in histidine decarboxylase broth by selected lactic acid bacteria strains* / Bazı laktik asit bakterisi üyelerinin histidin dekarboksilaz sıvısında biyojen amin üretimleri **31-38**
- Ermis, E., Karasu, E. N. *Spray drying of de-oiled sunflower protein extracts: functional properties and characterization of the powder* / Püskürtmeli kurutucu ile yağ alınmış ayçiçeği protein ekstraktı tozu üretimi: fonksiyonel özellikleri ve toz karakterizasyonu ... **39-49**
- Kuşçu, G., Öztürk, B. *Physical, chemical and sensory properties of fresh orange juice fortified with reishi (Ganoderma lucidum) extract* / Reishi (Ganoderma lucidum) ekstraktı katkılı taze portakal suyunun fiziksel, kimyasal ve duyuşal özellikleri **81-91**
- Gülşah Çalışkan Koç, G., Çabuk, B. *Characterization of the foam-mat dried egg white powder* / Köpük kurutma yöntemi ile kurutulmuş yumurta beyazı tozlarının karakterizasyonu **150-160**

Araştırmalar (Türkçe) / Researches (Turkish)

- Karakaya, H., Yılmaztekin, M. *Pseudomonas putida ile izoöjenolden doğal vanilin üretiminde bazı ortam koşullarının molar verim üzerine etkisi / Effect of culture conditions on molar yield of natural vanillin production from isoeugenol by Pseudomonas putida* . **9-19**
- Ketenoğlu, O. *Yer fıstığı (Arachis hypogaea L.) yağının farklı çözücüler kullanılarak değişken güç ve frekanslarda ultrason destekli ekstraksiyonu / Ultrasound-assisted extraction of peanut (Arachis hypogaea L.) oil under varying power and frequencies using different solvents* **61-71**
- Erdoğan, S. F. Bostancı, B. *Kefir örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, identifikasyonu ve antimikrobiyal etkilerinin değerlendirilmesi / Isolation and identification of lactic acid bacteria from kefir samples and evaluation of their antimicrobial effects* **72-80**
- Yücel Şengün, İ., Kırmızıgül, A., Özyayın, İ., Yarım, H. *Tüketicilerin probiyotik ve prebiyotik gıdalara yönelik bilgi düzeyleri ve tüketim durumlarının belirlenmesi: İzmir/Bornova örneği / Determination of knowledge level and consumption status of consumers on probiotic and prebiotic foods: A sample of Izmir/Bornova* **103-114**
- Sarıcaoğlu, F. T. *Yüksek basınç homojenizasyon işlemi uygulanmış fındık proteinlerinden üretilen yenilebilir filmlerin mekanik ve bariyer özellikleri / The effect of high pressure homogenization on the mechanical and barrier properties of edible films produced from cold press hazelnut meal proteins* **115-124**
- Cansız, Z., Candal Uslu, C., Mutlu, C., Arslan Tontul, S., Ercan, R., Erbaş, M. *Farklı oranlarda peynir altı suyu kullanımının beyaz ve tam buğday unlarından üretilen ekmeklerin bazı özellikleri üzerine etkisi / The effects of whey addition at different ratios on the properties of breads produced from white and whole wheat flour* **125-138**
- Şanlı, T., Anlı, E. A. *Çökelek peyniri üretiminde alternatif kaynak olarak kefir kullanımı / Use of kefir in cheese production* **139-149**
- Korkut Altıntaş, A., Kuleşan, H. *Soğuk sıkma ve soğuk maserasyon yöntemiyle elde edilen bitki ekstraktlarının yaygın patojenler üzerindeki etkileri / Antimicrobial effects of plant extracts obtained by cold press and cold maceration methods on some pathogens* **161-170**
- GD19154 Koç, E., Yolcu Ömeroğlu, P. *Geleneksel anjelika reçelinin toplam antioksidan kapasite, toplam fenolik madde ve in vitro sindirim modeli ile biyoerişilebilirliğinin belirlenmesi / Determination of total phenolic compound, antioxidant capacity of the traditional angelica jam and their bioaccessibility with in vitro digestive model* **171-181**
- GD19115 Büyüksınt Bedir, T., Kuleşan, H. *Doğal mayaların yaygın patojenler üzerindeki inhibitör etkileri / Inhibitory effects of natural yeasts on common pathogens* ... 182-191

Derlemeler (Türkçe) / Reviews (Turkish)

- Eker, T., Cabaroğlu, T. *Yoğurt matriksinin tüketim sırasında in vivo aroma salınımı üzerine etkileri / The impact factors of yogurt matrix on in vivo aroma release during consumption of yogurt* **50-60**
- Mutlu, C., Erbaş, M. *D-glikozdan D-sorbitol ve L-askorbik asit üretimi: Bu bileşiklerin özellikleri, kullanım alanları ve sağlık üzerine etkileri / Production of D-sorbitol and L-ascorbic acid from D-glucose: Their properties, fields of usage and effects on health* **92-102**



EFFECTS OF SMOKING WITH DIFFERENT WOOD CHIPS AND BARBECUING ON SOME PROPERTIES OF SALMON FISH

Emel Oz*

Department of Food Engineering, Faculty of Agriculture, Ataturk University, Erzurum, Turkey

Received / Geliş: 29.09.2019; Accepted / Kabul: 15.11.2019 Published online / Online baskı: 28.11.2019

Öz, E. (2020). *Effects of smoking with different wood chips and barbecuing on some properties of salmon fish*. GIDA (2020) 45 (1): 1-8 doi: 10.15237/gida.GD19128

Öz, E. (2020). Farklı odun talaşları ile tütsüleme ve mangalda pişirmenin somon balığının bazı özellikleri üzerine etkileri. GIDA (2020) 45 (1): 1-8 doi: 10.15237/gida.GD19128

ABSTRACT

In the present study, the effects of smoking with different wood chips and barbecuing on some properties (moisture content, pH value and lipid oxidation) of salmon fish were investigated. The smoking process was carried out by cold smoking method using five different wood chips: oak, apple, bourbon soaked oak, cherry and hickory. The lowest moisture content was determined in the samples smoked with bourbon soaked oak wood chips. Smoking and barbecuing caused an increase in the pH values and the highest pH value was determined in the samples smoked with hickory wood chips. In addition, both processes had a significant effect on TBARS value of salmon ($P < 0.05$). Wood chip types showed both antioxidant and prooxidant effects in the present study. The lowest TBARS values in smoking and barbecuing processes were determined in the samples smoked with hickory wood chips.

Keywords: Smoking, wood chips, barbecue, lipid oxidation, salmon

FARKLI ODUN TALAŞLARI İLE TÜTSÜLEME VE MANGALDA PIŞİRMENİN SOMON BALIĞININ BAZI ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

ÖZ

Bu çalışmada, farklı odun talaşları ile tütsüleme ve mangalda pişirmenin somon balığının bazı özellikleri (nem içeriği, pH değeri ve lipid oksidasyonu) üzerine etkileri araştırılmıştır. Tütsüleme işlemi beş farklı odun talaşı (meşe, elma, burbon, kiraz ve ceviz) kullanılarak soğuk tütsüleme yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. En düşük nem içeriği burbon odun talaşı ile tütsülenen örneklerde belirlenmiştir. Tütsüleme ve mangalda pişirme işlemleri pH değerinde artışa neden olmuştur ve en yüksek pH değeri ceviz odun talaşı ile tütsülenen örneklerde belirlenmiştir. Ayrıca, her iki uygulama TBARS değeri üzerinde önemli ($P < 0.05$) etki göstermiştir. Odun talaşı tipleri bu çalışmada hem antioksidan hem de prooksidan etki göstermiştir. Tütsüleme ve mangalda pişirme işlemlerinde en düşük TBARS değeri ceviz odun talaşı kullanılan örneklerde belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Tütsüleme, odun talaşı, mangal, lipid oksidasyonu, somon

* Corresponding author /Yazışmalardan sorumlu yazar;

✉ emel.oz@atauni.edu.tr

☎ (+90) 442 231 16 25

☎ (+90) 442 231 58 78

Emel Oz; ORCID no: 0000-0003-3766-2713

INTRODUCTION

In recent years, there has been increased awareness of the beneficial effects of fish consumption on nutrition and health. Therefore, the demand for fresh and processed fish products in the world is increasing day by day (Guizani et al., 2014). The nutritional benefits of fish consumption are related to the use of certain vitamins and minerals, as well as the high quality protein content of the fish. In addition, fish also contain omega-3 polyunsaturated fatty acids that play an important role in human health (Sidhu, 2003). Especially fatty fishes such as salmon are noted as a good source of docosahexaenoic acid (C22:6n-3) and eicosapentaenoic acid (C20:5n-3) (Guizani et al., 2014).

Besides its high nutritional value, fresh fish is also an easily degradable protein source due to its high water content (Slamova et al., 2017). Therefore, various methods are used to maintain and extend the shelf life of fish and other seafood (Chang et al., 1998; Guizani et al., 2014). In this context, one of the oldest methods of fish preservation is the smoking and the smoking is still widely used in fish processing. In the report published by FAO (2016), in 2014, it was reported that while 46 % (67 million tonnes) of the fish production were presented to direct human consumption, about 12% of the rest of the production for edible purposes were dried, salted or smoked. Some components with antioxidant and antimicrobial activity found in smoke increase the shelf life of fish by acting on enzymes and microorganisms. In addition, the sensory properties of the product are also improved as a result of smoking (Sunen et al., 2001; Slamova et al., 2017).

While wood chips used in smoking are generally composed of 50% cellulose, 25% hemicellulose and 25% lignin, the cellulose and hemicellulose content may vary depending on the type of wood chips. This may cause the smoke forming temperatures of the wood chips types to differ (Pöhlmann et al., 2012; Malarut and Vangnai, 2018). Therefore, in addition to factors such as smoking temperature and duration, fish type and fat content, wood chips type is also among the factors affecting the quality of smoked product

(Slamova et al., 2017). Hardwoods such as beech, cherry, oak and softwoods such as pine fir are the most common types of wood chips (Stolyhwo and Sikorski, 2005).

The fish is usually cooked using different techniques, such as frying, oven, grilling or barbecuing before being consumed. However, one of the most common methods used especially in the preparation of fatty fishes is the barbecuing (Costa et al., 2009). Barbecuing is frequently used in the preparation of fatty fishes such as salmon in Turkey (Öz et al., 2010a, 2010b; Öz and Kotan, 2016).

Although there are many studies to determine the qualitative properties of smoked fish (Leroi and Joffraud, 2000; Espe et al., 2001; Espe et al., 2002; Lin et al., 2003; Martinez et al., 2007; Guizani et al. 2014; Messina et al., 2018), these studies have focused on salting conditions and smoking time and temperature. In addition, to the best of our knowledge, a study investigating the effects of smoking and barbecuing on some qualitative characteristics of salmon has not been found in the literature. Therefore, in the present study, it is aimed to determine the effects of smoking with different types of wood chips and barbecuing on moisture content, pH and TBARS values of salmon.

MATERIAL AND METHODS

Material

In the present study, salmon (*Salmo salar*) fishes (n=14), grown in Black Sea, were used as material. The fishes were obtained as frost from a local fish store, Erzurum. Frozen fishes were brought to the laboratory, and the fillets were prepared in the laboratory.

Smoking

Salmon fillets were separated to seven groups and these groups were smoked with cold smoking method. Smoking process was performed by using a smoking device (Polyscience, the smoking gun PRO, ÖRKA, Turkey) in a special sealed pouch (ÖRKA, Turkey) for 3 hours at 24°C. To determine the effect of only smoking, fish fillets were not subjected to salting. Two different

control groups were used in order to determine the changes in the control group during 3-hour smoking.

Barbecuing

Wood charcoal was used in barbecuing process of the salmon fishes and after all flames had subsided, salmon fillets were barbecued. The surface temperature of the grill was measured by using a digital thermocouple with a surface probe (0603 1992, Testo 926, Lenzkirch, Germany) and the temperature was approximately 200 °C.

All fillets were turned over at half of (4 min) the total cooking time (8 min). The experiment was carried out in two replications and two different salmon fillets were used for each group. After barbecuing, the fillets were cooled to room temperature. Then the skins of the fillets were removed and homogenized for analysis.

Determination of moisture content

The moisture contents of the salmon fillets were determined as weight loss of approximately 10 g homogenized samples after drying at 100 ± 2 °C for 24 h (Gökalp et al., 2010).

Determination of pH values

To determine of pH values of the salmon fillets, 10 g sample with 100 mL distilled water were homogenized with an ultra turrax (IKA Werk T 25, Germany), then pH of the samples were measured using a pH-meter (ATI ORION 420, MA 02129, USA). The pH meter was calibrated using suitable buffer solutions (pH 4.0 and pH 7.0) (Gökalp et al., 2010).

Determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) values

In the determination of lipid oxidation, analysis of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) value was used. TBARS value was determined by the method of Kılıç and Richards (2003). In this method, 2 g samples were taken and 12 mL trichloroacetic acid (TCA) solution (7.5% TCA, 0.1% EDTA, 0.1% propyl gallate, 1-propyl gallate dissolved in 3 mL of ethanol) was added on them, they were homogenized for 15–30 s and filtered with Whatman 1 filter paper. 3 mL of the

obtained filtrate was taken in a tube and 3 mL 0,02 M thiobarbituric acid (TBA) solution was added on it. These mixtures were kept in boiling water bath for 40 min, cooled under tap water for 5 min and centrifuged at 2000 g for 5 min. Afterwards, absorbance of the sample was measured at 532 nm wavelength against blind. 3 mL TBA solution was added on 3 mL TCA extract for blind and the steps for the samples were applied likewise. 1,1,3,3- tetraethoxypropane was used for the calculation of k value. TBARS values were given as mg malondialdehyde (MDA)/kg.

Statistical analysis

The data obtained in the present study were subjected to analysis of variance. The experiment was a completely randomized design with two replications. Duncan multi comparison test was applied to the data in order to determine the statistical differences between the values detected by using the Statistical Package for the Social Sciences 11.5 statistical software package.

RESULTS AND DISCUSSION

Moisture content, pH and TBARS values of salmon fishes non-smoked and smoked with different wood chips

Moisture content, pH and TBARS values of the salmon fillets non-smoked and smoked with oak, apple, bourbon soaked oak, cherry and hickory wood chips were given in Table 1.

As can be seen from the Table 1, smoking process had a significant ($P < 0.05$) effect on moisture content and TBARS value and a very significant ($P < 0.01$) effect on pH value of the samples. The average moisture content in the non-smoked and non-stored control group samples was determined as 72.56%. The moisture content of raw salmon fillets was determined as 72.02% by Öz and Kotan (2016) and as 72.1% by Mol et al. (2008). These results are consistent with the moisture content of the raw material used in the present study. In the present study, the moisture content of the samples smoked with different wood chips varied between 66.80 and 72.93%. Moisture content was determined as 60.7% in smoked salmon samples by Mol et al. (2008), as ranged from 50.7 to 71.6% in the hot smoked

salmon by Lin et al. (2003). It is thought that the difference in moisture content of the smoked salmon is related to the variety of salmon, processed applied to the fish (salting etc.), smoking method and wood chips type. In addition, Espe et al. (2002) reported that structure of the raw material had an important effect on the chemical composition of smoked fish. In the present study, it was determined that the lowest

moisture content belonged to the samples smoked with bourbon soaked oak wood chips. This could be due to the smoke generation temperatures of the wood chips used for the smoking in the present study. Indeed, it was reported that the smoke generation temperatures of wood chips varied depending on the total cellulose and hemicellulose content of the wood chips (Malarut and Vangnai, 2018).

Table 1. Moisture content, pH and TBARS values of the salmon fillets non-smoked and smoked with oak, apple, bourbon soaked oak, cherry and hickory wood chips (Mean \pm SD)

Group	n	Moisture content (%)	pH	TBARS (mg MDA/kg)
C-I	2	72.56 \pm 0.93 ^a	6.36 \pm 0.01 ^c	0.21 \pm 0.06 ^c
C-II	2	70.87 \pm 1.14 ^a	6.37 \pm 0.03 ^c	0.40 \pm 0.11 ^{ab}
S-I	2	72.93 \pm 0.55 ^a	6.44 \pm 0.07 ^c	0.28 \pm 0.02 ^{abc}
S-II	2	70.74 \pm 0.06 ^a	6.69 \pm 0.06 ^b	0.37 \pm 0.03 ^{abc}
S-III	2	66.80 \pm 1.44 ^b	6.58 \pm 0.09 ^b	0.35 \pm 0.11 ^{abc}
S-IV	2	72.86 \pm 1.32 ^a	6.43 \pm 0.01 ^c	0.41 \pm 0.07 ^a
S-V	2	71.11 \pm 2.89 ^a	7.03 \pm 0.02 ^a	0.22 \pm 0.01 ^{bc}
Sign		*	**	*

C-I: control group salmon fillets non-smoked, non-stored; C-II: control group salmon fillets non-smoked, stored; S-I: salmon fillets smoked with oak smoking wood chips; S-II: salmon fillets smoked with apple smoking wood chips; S-III: salmon fillets smoked with bourbon soaked oak smoking wood chips; S-IV: salmon fillets smoked with cherry smoking wood chips; S-V: salmon fillets smoked with hickory smoking wood chips; Sign: significance; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; SD: Standard deviation

The average pH value of raw salmon fillets was determined as 6.36 (Table 1). The pH value of raw salmon fillets was determined as 6.29 by Öz and Kotan (2016) and as ranged between 6.29 and 6.73 by He et al. (2014). These results are consistent with the pH values of the raw material used in the present study. In the present study, smoking process caused an increase in pH values compared to those of the raw salmon fillets non-smoked, however, this increase was not statistically significant in the raw salmon fillets smoked with oak and cherry smoking wood chips. On the other hand, there are studies showing that smoking process caused decrease in pH values of salmon fishes (Espe et al., 2002; Messina et al., 2018). This difference is thought to result from

the lack of application of salting process prior to smoking in the present study. Indeed, it was declared that ionic strength increased as a result of the combined effect of salt and smoke and this situation leads to a decrease in pH value (Leroi and Joffraud, 2000). In addition, the authors also reported that salt is 3-4 times more effective than phenols in smoke on pH decrease.

As can be seen from Table 1, TBARS value, 0.21 mg MDA/kg in raw material, varied between 0.22 and 0.41 mg MDA/kg in smoked salmon fillets depending on the type of wood chips used. It was determined that the storage of the raw salmon fillets at 24°C for 3 h and the smoking with cherry wood chips of the salmon fillets significantly

increased TBARS values, while TBARS values of the other samples were not significantly different from each other ($P > 0.05$). Similarly, Espe et al. (2002) reported that smoked salmon samples had slightly higher TBARS values than fresh salmon fillets. On the contrary, Martinez et al. (2007) reported that TBARS values of salmon smoked with beech and oak chips were lower than those of non-smoked salmon fishes. In the present study, compared to the salmon fillets non-smoked and stored at 24°C for 3 h, it is determined that the smoking with all of wood chips, except for the

cherry smoking wood chips, caused a reduction in the TBARS values, but this decrease was not statistically significant ($P > 0.05$).

Moisture content, pH and TBARS values of barbecued salmon fishes non-smoked and smoked with different wood chips

Moisture contents, pH and TBARS values of the barbecued salmon fillets non-smoked and smoked with oak, apple, bourbon soaked oak, cherry and hickory wood chips were given in Table 2.

Table 2. Moisture content, pH and TBARS values of barbecued salmon fillets non-smoked and smoked with different wood chips (Mean \pm SD)

Group	n	Moisture content (%)	pH	TBARS (mg MDA/kg)
C-I	2	65.74 \pm 0.46 ^a	6.44 \pm 0.04 ^d	0.42 \pm 0.02 ^a
C-II	2	66.59 \pm 0.99 ^a	6.43 \pm 0.05 ^d	0.36 \pm 0.12 ^{ab}
S-I	2	66.45 \pm 0.86 ^a	6.59 \pm 0.01 ^{cd}	0.39 \pm 0.13 ^{ab}
S-II	2	65.05 \pm 0.62 ^a	6.85 \pm 0.11 ^b	0.43 \pm 0.11 ^a
S-III	2	64.30 \pm 2.33 ^a	6.72 \pm 0.16 ^{bc}	0.27 \pm 0.02 ^{ab}
S-IV	2	66.81 \pm 1.20 ^a	6.60 \pm 0.01 ^{cd}	0.35 \pm 0.07 ^{ab}
S-V	2	65.71 \pm 1.20 ^a	7.12 \pm 0.01 ^a	0.17 \pm 0.01 ^b
Sign		ns	**	*

C-I: control group salmon fillets non-smoked, non-stored; C-II: control group salmon fillets non-smoked, stored; S-I: salmon fillets smoked with oak smoking wood chips; S-II: salmon fillets smoked with apple smoking wood chips; S-III: salmon fillets smoked with bourbon soaked oak smoking wood chips; S-IV: salmon fillets smoked with cherry smoking wood chips; S-V: salmon fillets smoked with hickory smoking wood chips; Sign: significance; ns: not significant; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; SD: Standard deviation

As can be seen from the Table 2, barbecuing had no significant effect on the moisture content of the samples, but had a very significant ($P < 0.01$) effect on the pH value and a significant ($P < 0.05$) effect on the TBARS value. The moisture content of the barbecued salmon fishes varied between 64.30 and 66.81%. Similarly, Öz and Kotan (2016) reported that the average moisture content of barbecued salmon fillets was 65.17%. In the present study, it was found that the significant effect of the smoking process on the moisture content of the samples disappeared with the barbecuing. This result is thought to be due to

the fact that the temperature achieved during the barbecuing is more dominant than the effect of the smoking. Compared to salmon samples before barbecuing, barbecuing resulted in a decrease in the moisture content of all samples as expected. Sanchez del Pulgar et al. (2012) reported that three main processes cause water losses in meat after cooking. First, water in meat can be evaporated due to increased temperature. Second, increased temperature during cooking cause myofibrillar proteins to shrink. Due to this shrink, a parallel decrease occurs in the interfibrillar volume, which in turn leads to a

reduction in the myofibril's ability to hold water. Third, a contraction of the perimysial connective tissue seems to take place, causing a compression of the muscle fiber bundles, which in turn encourages water to be released from the meat cut.

The average pH value of the barbecued salmon fishes non-smoked was determined as 6.44 (Table 2). The pH value increased in barbecued samples smoked with different wood chips and the highest pH value was determined in the samples smoked with hickory wood chips. The pH value influences spoilage of fish because of its effect on the microorganism and enzyme activity (Ashie et al., 1996). The variation in pH value was reported to influence proteolytic activity of salmon (Hultman et al., 2004; He et al., 2014). Hultman and Rustad (2002) reported that proteolytic enzyme activity was highest at pH values close to neutrality or higher. Therefore, it is thought that fish samples smoked with hickory may be more sensitive to deterioration due to the high pH value. On the other hand, the increase in pH value of the salmon fishes non-smoked and smoked with different wood chips after barbecuing is attributed to the cleavage of bonds involving imidazole, sulfhydryl and hydroxyl groups (Girard, 1992).

The TBARS values of the barbecued samples varied between 0.17 and 0.43 mg MDA/kg and the lowest TBARS values were found in the barbecued samples smoked with hickory wood chips. In addition, TBARS values of the samples non-smoked and non-stored and the samples smoked with apple wood chips were higher than those of the samples smoked with oak, bourbon soaked oak and cherry wood chips. It is thought that these results may be due to different antioxidant activities of the wood chips. Pöhlmann et al. (2013) reported that phenolic compounds found in the wood chips at different levels play an important role in antioxidative activity of smoked products. On the other hand, the effect of meat cooking process on TBARS values of meat is still contradictive. Although it is known that many factors such as temperature, oxygen, light, catalysts etc. affect lipid oxidation

in foods, cooking is more effective on the level of lipid oxidation in meat and meat products. Therefore, it is expected that lipid oxidation will increase by cooking of meat and meat products due to the fact that the iron released from myoglobin and hemoglobin that are denatured by the cooking process catalyzes the lipid oxidation (Rojas and Brewer, 2007). In addition, cooking destroys the cell structure of meat and can cause prooxidant interactions with polyunsaturated fatty acids that promote lipid oxidation (Ramirez et al., 2005). On the other hand, there are also studies in the literature showing that cooking does not affect lipid oxidation due to the reaction of the highly reactive compound measured by the TBARS test with various compounds such as proteins and amino acids present in the meat. (Serrano et al., 2007; Weber et al., 2008; Alfaia et al., 2010).

CONCLUSION

As a result of the present research, it was determined that smoking and barbecuing had varying effects on the moisture content, pH and TBARS values of salmon fishes examined in the research. In addition, it was found that the type of wood chips used in the smoking process caused differences in the moisture content, pH and TBARS values of the salmon fishes. It was determined that the barbecuing was more effective than the smoking process on the moisture content. In addition, TBARS values, an indicator of lipid oxidation in meat and meat products, have proved that the type of wood chips used may have antioxidant or prooxidant effect. On the other hand, it is thought that the use of different types of wood chips in the smoking process should be examined for some harmful components (polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic aromatic amines) that may occur as a result of smoking and/or barbecuing.

REFERENCES

Alfaia, C.M.M., Alves, S.P., Lopes, A.F., Fernandes, M.J.E., Costa, A.S.H., Fontes, C.M.G.A., Castro, M.L.F., Bessa, R.J.B., Prates, J.A.M. (2010). Effect of cooking methods on fatty acids, conjugated isomers of linoleic acid and

- nutritional quality of beef intramuscular fat. *Meat Sci.* 84: 769-777.
- Ashia, I.N.A., Smith, J.P., Simpson, B.K. (1996). Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and sellfish. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36:1-2, 87-121.
- Chang, K.L.B., Chang, J., Shiau, C.Y., Pan, B.S. (1998). Biochemical, microbiological, and sensory changes of sea bass (*Lateolabrax japonicus*) under partial freezing and refrigerated storage. *J. Agr. Food Chem.* 46: 2682–2686.
- Costa, M., Viegas, O., Melo, A., Petisca, C., Pinho, O., Ferreira, I.M. (2009). Heterocyclic aromatic amine formation in barbecued sardines (*Sardina pilchardus*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Agr. Food Chem.* 57: 3173-3179.
- Espe, M., Nortvedt, R., Lie, Ø., Hafsteinsson, H. (2001). Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) as raw material for the smoking industry. I: effect of different salting methods on the oxidation of lipids. *Food Chem.* 77: 41-46.
- Espe, M., Nortvedt, R., Lie, Ø., Hafsteinsson, H. (2002). Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) as raw material for the smoking industry. II: Effect of different smoking methods on losses of nutrients and on the oxidation of lipids. *Food Chem.* 75: 411-416.
- FAO. (2016). The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 200 pp.
- Girard, P.J. (1992). Cooking. Technology of meat and meat products. France, 32-83.
- Gökalp, H.Y., Kaya, M., Tulek, Y., Zorba, O. (2010). Guide for quality control and laboratory application of meat products. (5th ed.) Atatürk University Publication No 751, Faculty of Agriculture No 318, Erzurum, Turkey.
- Guizani, N., Rahman, M.S., Al-Ruzeiqi, M.H., Al-Sabahi, J.N., Sureshchandran, S. (2014). Effects of brine concentration on lipid oxidation and fatty acids profile of hot smoked tuna (*Thunnus albacares*) stored at refrigerated temperature. *J. Food Sci. Technol.* 51: 577–582.
- He, H.J., Wu, D., Sun, D.W. (2014). Rapid and non-destructive determination of drip loss and pH distribution in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets using visible and near-infrared (Vis-NIR) hyperspectral imaging. *Food Chem.* 156: 394–401.
- Hultmann, L., Bencze Rora, A.M., Steinsland, I., Skara, T., Rustad, T. (2004). Proteolytic activity and properties of proteins in smoked salmon (*Salmo salar*) - effects of smoking temperature. *Food Chem.* 85: 377-387.
- Hultmann, L., Rustad, T. (2002). Textural changes during iced storage of salmon (*Salmo salar*) and cod (*Gadus morhua*). *J. Aquat. Food Prod. Tech.* 11 (3–4): 105-123.
- Kilic, B., Richards, M.P. (2003). Lipid oxidation in poultry döner kebab: Pro-oxidative and anti-oxidative factors. *J. Food Sci.* 68: 686-689.
- Leroi, F., Joffraud, J.J. (2000). Salt and smoke simultaneously affect chemical and sensory quality of cold-smoked salmon during 5 degrees C storage predicted using factorial design. *J. Food Prot.* 63: 1222–1227.
- Lin, M., Cavinato, A.G., Huang, Y., Rasco, B.A. (2003). Predicting sodium chloride content in commercial king (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum (*O. keta*) hot smoked salmon fillet portions by short-wavelength near-infrared (SW-NIR) spectroscopy. *Food Res.Int.* 36: 761-766.
- Malarut, J-A., Vangnai, K. (2018). Influence of wood types on quality and carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) of smoked sausages. *Food Cont.* 85: 98-106.
- Martinez, O., Salmeron, J., Guillen, M., Casas, C. (2007). Sensorial and physicochemical characteristics of salmon (*Salmo salar*) treated by different smoking processes during storage. *Food Sci. Techn. Int.* 13: 477-84.
- Messina, C.M., Bono, G., Arena, R., Randazzo, M., Morghese, M., Manuguerra, S., Barbera, L.L., Ozogul, F., Sadok, S., Santulli, A. (2019). The combined impact of cold smoking and natural antioxidants on quality and shelf life of dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) fillets. *Food Sci. Nutr.* 7: 1239-1250.
- Mol, S., Alakavuk, D.U., Tosun, Ş.Y. (2008). Effects of different processing technologies on

- the chemical composition of seafoods. *Food Sci. Techn. Res.* 14: 467-470.
- Öz, F., Kaban, G., Kaya, M. (2010a). Effects of cooking methods and levels on formation of heterocyclic aromatic amines in chicken and fish with oasis extraction method. *LWT-Food Sci. Techn.* 43: 1345-1350.
- Öz, F., Kaban, G., Kaya, M. (2010b). Effects of cooking techniques and levels on the formation of heterocyclic aromatic amines in chicken and fish. *J. Anim. Vet. Advan.* 9: 1259-1264.
- Öz, F., Kotan, G. (2016). Effects of different cooking methods and fat levels on the formation of heterocyclic aromatic amines in various fishes. *Food Cont.* 67: 216-224.
- Pöhlmann, M., Hitzel, A., Schwägele, F., Speer, K., Jira, W. (2013). Influence of different smoke generation methods on the contents of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and phenolic substances in Frankfurter-type sausages. *Food Cont.* 34: 347-355.
- Ramirez, M.R., Morcuende, D., Estevez, M., Lopez, R.C. (2005). Fatty acid profiles of intramuscular fat from pork loin chops fried in different culinary fats following refrigerated storage. *Food Chem.* 92: 159-167.
- Rojas, M.C., Brewer, M.S. (2007). Effect of natural antioxidants on oxidative stability of cooked, refrigerated beef and pork. *J. Food Sci.* 72: 282- 288.
- Sanchez del Pulgar, J., Gázquez, A., Ruiz-Carrascal, J. (2012). Physico-chemical, textural and structural characteristics of sous-vide cooked pork cheeks as affected by vacuum, cooking temperature and cooking time. *Meat Sci.* 90: 828-835.
- Serrano, A., Librelotto, J., Cofrades, S., Sánchez-Muniz, F., Jiménez-Colmenero, F. (2007). Composition and physicochemical characteristics of restructured beef steaks containing walnuts as affected by cooking method. *Meat Sci.* 77: 304-313.
- Sidhu, K.S. (2003). Health benefits and potential risks related to consumption of fish or fish oil. *Regul.Toxic. Pharma.* 38: 336-344.
- Slamova, T., Frankova, A., Hubackova, A., Banout, J. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons in Cambodian smoked fish. *Food Add. Cont. Part B.* 10: 248-255.
- Stolyhwo, A., Sikorski, Z.E. (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish. *Food Chem.* 91: 303-311.
- Sunen, E., Fernandez-Galian, B., Aristimuno, C. (2001). Antibacterial activity of smoke wood condensates against *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* at low temperature. *Food Mic.* 18: 387-393.
- Weber, J., Bochi, V.C., Ribeiro, C.P., Victório, A.D.M., Emanuelli, T. (2008). Effect of different cooking methods on the oxidation, proximate and fatty acid composition of silver catfish (*Rhamdia quelen*) filets. *Food Chem.* 106: 140-146.

***Pseudomonas putida* İLE İZOÖJENOLDEN DOĞAL VANİLİN ÜRETİMİNDE BAZI ORTAM KOŞULLARININ MOLAR VERİM ÜZERİNE ETKİSİ**

Hüseyin Karakaya, Murat Yılmaztekin*

İnönü Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Malatya, Türkiye

Geliş / Received: 29.07.2019; Kabul / Accepted: 19.11.2019; Online baskı / Published online: 24.12.2019

Karakaya, H., Yılmaztekin, M. (2020). *Pseudomonas putida* ile izoöjenolden doğal vanilin üretiminde bazı ortam koşullarının molar verim üzerine etkisi. *GIDA* (2020) 45 (1): 9-19 doi: 10.15237/gida.GD19112.

Karakaya, H., Yılmaztekin, M. (2020). *Effect of culture conditions on molar yield of natural vanillin production from isoeugenol by Pseudomonas putida*. *GIDA* (2020) 45 (1): 9-19 doi: 10.15237/gida.GD19112.

ÖZ

Vanilin, dünyada en çok kullanılan aroma maddelerinden biridir. Son yıllarda, doğal vanilin üretimindeki yetersiz arz ve yüksek maliyet nedeniyle araştırmalar biyodönüşüm yolları üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmada, *Pseudomonas putida* (HUT 8100) kültürü kullanılarak izoöjenolden doğal vanilin üretim imkânı araştırılmış; sıcaklık, pH ve havalandırma koşullarının vanilin üretimi üzerine etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, kullanılan *P. putida* kültürünün tek karbon kaynağı olarak izoöjenolü kullanabildiği ve bunu vaniline dönüştürme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir. En yüksek vanilin üretim kapasitesine 28°C'de, biyodönüşüm ortamının başlangıç pH'sı 6.3 olarak ayarlandığında ulaşılmıştır. Havalandırmanın kesilmesiyle biyokatalistin üretkenliğinde belirgin bir düşüş gözlenmiştir. Üretim için en uygun şartların seçilmesiyle 120 saat sonunda %25.1 molar verimle 877.9 mg/L düzeyinde bir üretim gerçekleştirilmiştir. Yapılacak daha ileri optimizasyon çalışmaları ile birlikte üretilen vanilin miktarının artırılabilmesi ve yöntemin endüstriyel proseslere uygun hale getirilebileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Vanilin, izoöjenol, biyodönüşüm, doğal aroma, *Pseudomonas putida*

EFFECT OF CULTURE CONDITIONS ON MOLAR YIELD OF NATURAL VANILLIN PRODUCTION FROM ISOEUGENOL BY *Pseudomonas putida*

ABSTRACT

Vanillin is one of the most widely used aroma compounds in the world. In recent years, studies are focused on bioconversion routes due to insufficient supply and high cost of natural vanillin production. In this study, possibility of natural vanillin production by using *Pseudomonas putida* and effects of temperature, pH and aeration conditions on the production yield were investigated. Results showed that *P. putida* culture had ability to use isoeugenol as sole carbon source and convert it into vanillin. The highest production yield was reached at 28°C when setting the initial pH of bioconversion medium at 6.3. A distinct fall was observed in productivity of biocatalyst by interruption of aeration. Using optimal conditions, 877.9 mg/L vanillin production was achieved with 25.1% molar yield in 120 h. It is thought that produced vanillin may be enhanced with further optimization studies and the method can be made suitable for industrial processes.

Keywords: Vanillin, isoeugenol, bioconversion, natural aroma, *Pseudomonas putida*

* Yazışmalardan sorumlu yazar/Corresponding author:

✉ murat.yilmaztekin@inonu.edu.tr

☎ (+90) 422 377 4784

☎ (+90) 422 341 0046

Hüseyin Karakaya; ORCID no: 0000-0002-6311-473X

Murat Yılmaztekin; ORCID no: 0000-0002-5667-9169

GİRİŞ

Vanilin (4-hidroksi-3-metoksibenzaldehit) vanilya bitkisinin karakteristik aroma bileşeni olup gıda, içecek, parfümeri ve farmasötik endüstrisinde sıkça kullanılan oldukça değerli bir üründür (Gonzalez vd., 2018; Ostovar vd., 2018). Günümüzde doğal vanilin üretimi sadece vanilya bitkisi ile sınırlı kalmıştır (Wang vd., 2018). Orkidelerin düşük gelişim hızı ve tohum zarflarında az miktarlarda vanilin ihtiva etmelerinden ötürü vanilinin botanik kaynaklardan saflaştırılması oldukça zahmetli ve pahalı bir yöntemdir. Ayrıca yıllık üretim miktarı iklim koşulları, bitki hastalıkları ve ticaret politikalarına bağlı olarak da değişkenlik gösterebilmektedir (Gallage ve Moller, 2018). Küresel ölçekte vaniline olan talep 2016 yılı için 18700 ton olarak belirlenmiştir. Tohum zarflarından elde edilen ekstrakt miktarı yıllık 40-50 ton civarında iken bu miktar ihtiyacın %1'inden daha azını karşılamaktadır (Fache vd., 2016; Wongtanyawat vd., 2018). Talebin büyük bir kısmı özellikle guaiacol ve glioksilik asit gibi petrol türevi bileşiklerden elde edilen vanilin ile giderilmektedir. Bu süreçte Riedel prosesi gibi çevre dostu olmayan ve düşük kaliteli son ürün veren kimyasal uygulamalardan faydalanılmaktadır (Ostovar vd., 2018). Pazar ihtiyacının %80-85'lik kısmını karşılayan guaiacol sentezinin yanı sıra, kalan %12-15'lik kısım da lignin içeriği yüksek atıkların sülfitle muamelesiyle elde edilen vanilin ile giderilmektedir (Wangrangsimagul vd., 2012; Fache vd., 2016). Vanilya zarflarından elde edilmiş vanilinin ticari değeri enflasyondan bağımsız olarak 1200-4000 USD/kg arasında değişmektedir (Perkins vd., 2015; Marquez-Medina vd., 2018). Ancak yapay vanilin formlarının değeri yalnızca 10 USD/kg civarındadır (Wilde vd., 2019). Kimyasal prosesler istenmeyen bazı durumları beraberinde getirmektedir. Kiral moleküller için enantiyomerik spesifikliğin olmaması, ekstrem proses uygulamaları gerektirmesi ve düşük etkinlik sıklıkla karşılaşılan sorunlardandır (Perkins vd., 2015). Ayrıca çevreye zararlı uygulamalar içermesi, tüketici sağlığına üzerine endişeler (Banerjee ve Chattopadhyay, 2019), ürün güvenliğine ilişkin şüpheler ve yüksek enerji ihtiyacı da kimyasal sentezin taşıdığı diğer

olumsuzluklar arasındadır (Wangrangsimagul vd., 2012).

Biyovanilin üretimi pazar ihtiyacının karşılanması için botanik kaynağından ekstraksiyon ve kimyasal sentez yöntemlerine alternatif üçüncü bir seçenek sunmaktadır. Doğal hammadde kullanılarak biyoteknolojik yöntemlerle elde edilen vanilin Avrupa Birliği mevzuatlarınca (EC 1334/2008) 'doğal aroma maddesi' olarak kabul edilmektedir. Ürünün 'doğal' olarak sınıflandırılması ürüne pazarlama açısından oldukça güçlü bir nitelik kazandırmaktadır (Wilde vd., 2019). Pek çok bakteri türünün ferulik asit, öjenol, izoöjenol ve sinamik asit türevlerini (*p*-kumarik asit gibi) kullanışlı aromatik maddelere dönüştürme yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir (Taira vd., 2018). Doğal vanilin üretimi için yapılan çalışmalar da özellikle bu bileşikler gibi yenilenebilir kaynaklar üzerine yoğunlaşmıştır (Wangrangsimagul vd., 2012). Kullanılacak doğal ferulik asit biyodönüşüm prosesleri için pahalı ve yetersiz bir kaynak oluştururken, izoöjenol ise ucuz ve temini kolay bir hammadde olarak öne çıkmaktadır (Zhang vd., 2006).

Rekombinant *Escherichia coli* kültürleri ile yapılan çalışmalarda oldukça yüksek biyodönüşüm verimleri elde edilmiştir (Yamada vd., 2008; Zhao vd. 2018). Ancak genetik modifiye gıdaların tüketici nezdinde çoğunlukla olumsuz bir görüş oluşturduğu da bilinmektedir (Funk vd., 2015). Bu nedenle çalışmalar çoğunlukla genetik modifikasyon uygulaması içermeyen alternatifler üzerinde yoğunlaşmıştır. Zhao vd. (2005), *Bacillus fusiformis* kültürünü %60 izoöjenol içeren çift fazlı biyodönüşüm ortamında kullanarak 32.5 g/L düzeyinde vanilin üretmeyi başarmışlardır. Ancak substrat büyük oranda tüketilmeden ortamda kaldığından endüstriyel uygulamalar için verim oldukça düşük kalmıştır. *B. pumilis*'in kullanıldığı biyodönüşüm çalışmasında ise 150 saat sonunda 10 g/L izoöjenolden %40.5'lik molar verimle 3.75 g/L vanilin üretilmiştir (Hua vd., 2007). Ayrıca, *Pseudomonas* türlerinin de izoöjenolden vanilin üretme yeteneğine sahip olduğu pek çok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur (Furukawa vd., 2003; Yamada vd., 2007; Kasana vd., 2007; Ashengroph vd., 2010; Ashengroph

vd., 2011; Vasudevan ve Bhat, 2011). *P. chlororaphis* ile 24 saatte 10 g/L izoöjenolden 1.2 g/L vanilin üretilebildiği bildirilmiştir (Kasana vd., 2007). Bu çalışmada elde edilen molar verim %13 olarak hesaplanmıştır. Biyokatalist olarak *P. aeruginosa* ile çalışıldığında ise %17.3 molar verimle 1.62 g/L düzeyinde vanilin elde edilmiştir (Ashengroph vd., 2011). Biyodönüşüm verimleri aynı cins içerisinde yer alan mikroorganizma türlerine göre değişkenlik gösterebildiği gibi ortam koşullarına bağlı olarak da farklılık arz edebilmektedir. *Psychrobacter* sp. CSW4 suşuyla başlangıçta %16.4 olan biyodönüşüm verimi çalışma koşullarının optimize edilmesiyle %36.3'e kadar artırılmıştır (Ashengroph vd., 2012; Ashengroph vd., 2013). *Pseudomonas* sp. KOB10 kültürü ortam bileşiminin optimizasyonu ile 15 g/L izoöjenolden 3.14 g/L vanilin üretimi gerçekleştirmiş olup; 88 saatte %22.5'lük molar verim değeri yakalanmıştır (Ashengroph vd., 2010). Yamada vd. (2007), *P. putida* IE27 suşunu kullanarak 24 saatte %71'lik bir molar verimle izoöjenolün vaniline biyodönüşümünü gerçekleştirmeyi başarmışlardır.

Doğal ürünlere olan ilgi her geçen gün artarken; üretimde de daha çevreci, sağlıklı, güvenilir ve ekonomik yaklaşımlar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Gıda ve içecek sanayiinde en çok kullanılan aroma maddelerinden biri olan vanilinin doğal formu mevcut talebi karşılamaya yetmemektedir. Bu çalışmada, *P. putida* (HUT 8100) kültürünün biyodönüşüm ile izoöjenolden vanilin üretme potansiyeli araştırılmış; sıcaklık, ortam pH'sı ve havalandırmanın biyokatalist üretkenliği üzerine etkileri incelenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

P. putida kültürü (HUT 8100) HUT Culture Collection'dan (Hiroşima, Japonya) temin edilmiştir. Kültür +4°C'de IFO 802 besiyeri ortamında muhafaza edilmiştir. Besiyeri içeriği 10 g/L pepton, 2 g/L maya ekstraktı 1 g/L MgSO₄.H₂O ve 15 g/L agar olacak şekilde hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılan bitkisel kökenli izoöjenol ve diğer tüm mikrobiyolojik bileşenler Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir.

Ekstraksiyon için gerekli gıda kullanımına uygun etanol (%96) Tekkim (Bursa, Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Asetik asit Carlo Erba (Milano, İtalya) firmasından; geri kalan tüm kromatografik saflıktaki kimyasallar ise Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir. Yüksek saflıktaki azot gazı (%99.9) yerel firmalardan tedarik edilmiştir.

Mikroorganizma Kültürünün ve Biyodönüşüm Ortamının Hazırlanması

Zhao vd. (2005) tarafından önerilen bileşimde küçük modifikasyonlar yapılarak Glukoz-Maya-Pepton (GMP) besi ortamı hazırlanmıştır. Ortam 5 g glukoz, 5 g maya ekstraktı, 5 g pepton, 14 g K₂HPO₄.3H₂O, 5.2 g KH₂PO₄ ve 1 g MgSO₄.7H₂O bir litre distile su içerisinde çözüldürülerek hazırlanmıştır. *P. putida* kültürü 50 mL steril GMP besiyeri içeren erlen içerisine inoküle edilmiştir. Kültür, 28°C'de ve 180 devir/dakika (d/d) çalkalama hızı eşliğinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon 7 gün devam ettirilmiş ve periyodik olarak ekim sonuçları alınmıştır.

Durağan faza giren hücreler besi ortamı ile birlikte santrifüj tüplerine alınarak, karışım +4°C'de 3600 g kuvvetle 15 dk santrifüj edilmiştir. Besi ortamını oluşturan supernatant kısmı uzaklaştırılarak 0.62 g yaş biyokütle (0.12 g kuru biyokütle) elde edilmiştir. Kuru biyokütle ağırlığı, 105°C'de sabit tartıma ulaşana kadar kurutulan yaş numune esas alınarak hesaplanmıştır (Ashengroph vd., 2012). Tüpte kalan pellet 20 mL steril biyodönüşüm ortamı ile sulandırılarak erlen içerisine alınmıştır. Biyodönüşüm ortamı sırasıyla pH 5.3 için 0.40 g/L K₂HPO₄ ve 15.53 g/L KH₂PO₄; pH 6.3 için 4.84 g/L K₂HPO₄ ve 16.65 g/L KH₂PO₄; pH 7.3 için 14.0 g/L K₂HPO₄ ve 5.2 g/L KH₂PO₄ ve pH 8.3 için 21.62 g/L K₂HPO₄ ve 0.82 g/L KH₂PO₄ içerecek şekilde ayarlanarak denemeler gerçekleştirilmiştir. Tüm denemelerde izoöjenol başlangıç konsantrasyonu %1 (w:v) olarak ayarlanmıştır.

Sıcaklık, pH ve Havalandırma Koşulları

P. putida kültürü tarafından izoöjenolün vaniline biyodönüşüm sürecinde her denemede tek değişken esasında göre hareket edilmiştir. Her bir denemede hem vanilin üretimi hem de izoöjenol

tüketimi göz önünde bulundurularak en iyi sonucu veren uygulama seçilmiş ve bu uygulama bir sonraki deneme için sabit kabul edilmiştir. Tüm denemelerde 180 d/d çalkalama ile 120 saatlik bir biyodönüşüm süresi uygulanmıştır. Biyodönüşüm ortamındaki vanilin ve izoöjenol miktarlarının tespiti için periyodik olarak ortamdan örnek alınmış ve etanol ekstraksiyonunu takiben HPLC analizleri gerçekleştirilmiştir.

Sıcaklık denemesinde ortamın başlangıç pH'sı 7.3 olarak ayarlanmıştır (Zhao vd., 2005). 24, 28 ve 32°C olmak üzere 3 farklı sıcaklık değerinde kültürün vanilin üretme kapasitesi incelenmiştir. pH'nın vanilin üretimi üzerine etkisini incelemek için ortamın K₂HPO₄.3H₂O ve KH₂PO₄ içeriği düzenlenerek pH 5.3, 6.3, 7.3 ve 8.3'te denemeler gerçekleştirilmiştir. Uygulanacak sıcaklık değeri bir önceki denemede elde edilen sonuca göre belirlenmiştir.

Havalandırmanın mikroorganizmanın üretkenliği üzerine etkisini incelemek için kültür inoküle edilmiş biyodönüşüm ortamı içeren şişelerin tepe boşluğu azot gazı ile doldurulmuştur. Kontaminantları tutmak için 0.22 µm'lik steril naylon membran filtreden geçirilen gazın 1 dk boyunca tepe boşluğuna dolması sağlanmıştır. Havalandırmasız ortamın sağlanabilmesi için şişelerin kapakları sıkı bir şekilde kapatılmış ve biyodönüşüm süresince açılmamıştır. Yarı havalandırmalı ortam denemeleri ise ağız sadece pamukla kapatılmış erlenlerde gerçekleştirilmiştir. Havalandırma denemesinde uygulanacak sıcaklık ve pH değerleri daha önceki deneme bulgularına göre ayarlanmıştır.

Canlılık Testi

Kültürün canlılık durumu *p*-iyodonitrotetrazolyum (INT) indikatörü kullanılarak kontrol edilmiştir. Her deneme için ayrıca hazırlanmış 2 mL biyodönüşüm ortamı içeren deney tüpleri içerisine inkübasyon süreleri sonunda 100 µl INT (0.2 mg/mL distile su) indikatörü eklenmiştir. 28°C'de 30 dk'lık ilave

inkübasyonun ardından deney tüplerinde kırmızı halka oluşumu bakteriyel canlılık ile ilişkilendirilmiştir (Al-Bayati, 2008).

Kültür Ortamındaki Vanilin ve İzoöjenol Miktarının Belirlenmesi

Periyodik aralıklarla biyodönüşüm ortamından alınan örnekler 50 mL'lik tüplere aktarılmış, %96'lık etanol ile 1:1 (v/v) oranında seyreltilmiş ve 1 dk boyunca homojenize edilmiştir. Elde edilen süspansiyon daha sonra +4°C'de 3600 g kuvvetle 15 dk santrifüj edilmiştir ve süpernatant yeni bir tüpe aktarılmıştır. Geriye kalan biyokütlede 2 kez daha 7.5 mL %96'lık etanol ile ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen ekstraktlar birleştirilmiş ve 0.45 µm'lik naylon membran filtrelerden geçirilerek HPLC ile analiz edilmiştir.

Vanilin ve izoöjenol miktarlarının belirlenmesinde Shimadzu marka HPLC (Shimadzu, Japonya) sistemi kullanılmıştır. Sistem UV-görünür bölge dedektörü, gaz giderici ve otomatik örnekleme ünitelerinden oluşmaktadır. Kromatografik ayırım Licospher RP18 (0.25 m, 6.35x4.60 mm, 5.5 µm partikül boyutu) kolonda oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz A olarak %0.01 asetik asit içeren su ve hareketli faz B olarak ise kromatografik saflıkta (%99.9) metanol kullanılmıştır. Akış profili için Li vd. (2004) tarafından belirtilmiş prosedürler esas alınmış olup; metotta analiz süresini kısaltacak küçük modifikasyonlar yapılmıştır. Buna göre akış 0-3 dk arası %60 B, 3-5 dk arası %60-50 B, 5-9 dk arası %50-100 B, 9-13 dk arası %100 B, 13-15 dk arası %100-60 B ve bir sonraki enjeksiyona hazırlık için 15-18 dk arası %60 B olacak şekilde programlanmıştır. Eluat sürekli olarak 270 nm'de UV dedektör ile görüntülenmiştir. Tanımlama, izoöjenol ve vaniline ait doğal standartlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Molar verim, aşağıda verilen [1] no'lu denklige göre hesaplanmıştır:

$$\text{Molar verim (\%)} = \frac{\text{Üretilen vanilin (g)} \times \text{İzoöjenolün molar ağırlığı} \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)}{\text{Tüketilen izoöjenol (g)} \times \text{Vanilin molar ağırlığı} \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)} \times 100 \quad [1]$$

İstatistiksel Analizler

Analizler 3 tekrar halinde gerçekleştirilmiş olup, sonuçlar ortalama±standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. İstatistiksel değerlendirmeler için SPSS 16.0 yazılımı kullanılmış ve veriler tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ile incelenmiştir. Denemeler arasındaki farkları karşılaştırmak amacıyla Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Sonuçlar $P < 0.05$ önem seviyesinde değerlendirilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Mikroorganizmanın Gelişme Durumu

GMP broth ortamına inoküle edilen başlangıç mikroorganizma sayısı yaklaşık 1.9×10^6 kob/mL olarak hesaplanmıştır. Popülasyon en yüksek değerine (6.8×10^8 kob/mL) 48. saatte ulaşmıştır. Mikroorganizma sayısı 36 ve 48. saatler arasında artış göstermekle birlikte logaritmik artış ivmesini kaybettiği görülmüştür. 48. saatten itibaren kalan 5 günlük inkübasyon boyunca popülasyonda önemli bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir ($P < 0.05$).

Yapılan çalışmalar, substrat ile besleme zamanının mikrobiyal vanilin üretiminde oldukça önemli olduğunu ifade etmektedir (Ashengroph vd., 2010). Geç logaritmik evre veya durağan fazdaki hücreler biyodönüşüm çalışmaları için daha elverişli olmaktadır. Kullanılan substrat henüz olgunluğa erişmemiş genç hücreler üzerinde toksik etki gösterebilmektedir (Hua vd., 2007; Ashengroph vd., 2011). Bu nedenle 48. saatte durağan faz başlangıcındaki hücreler biyodönüşüm ortamında kullanılmak üzere seçilmiştir.

Olgun hücrelerden oluşan ve gelişmeyi sürdüren popülasyonlarda enerjinin büyük kısmı biyokütleyi arttırmak ve çoğalmak amacıyla kullanılmaktadır. Bu durum özellikle biyodönüşüm çalışmalarında verimin düşmesine neden olmaktadır. Bunun yanı sıra, statik hücreler (nicelik olarak artış göstermeyen ancak metabolik aktivitelerine devam eden) yüksek spesifik aktivite ve ürün verimi gerektiren biyokatalitik süreçlerde daha etkin bir performans ortaya koymaktadır (Julsing vd., 2012). Bu hücrelerin kullanımı sadece

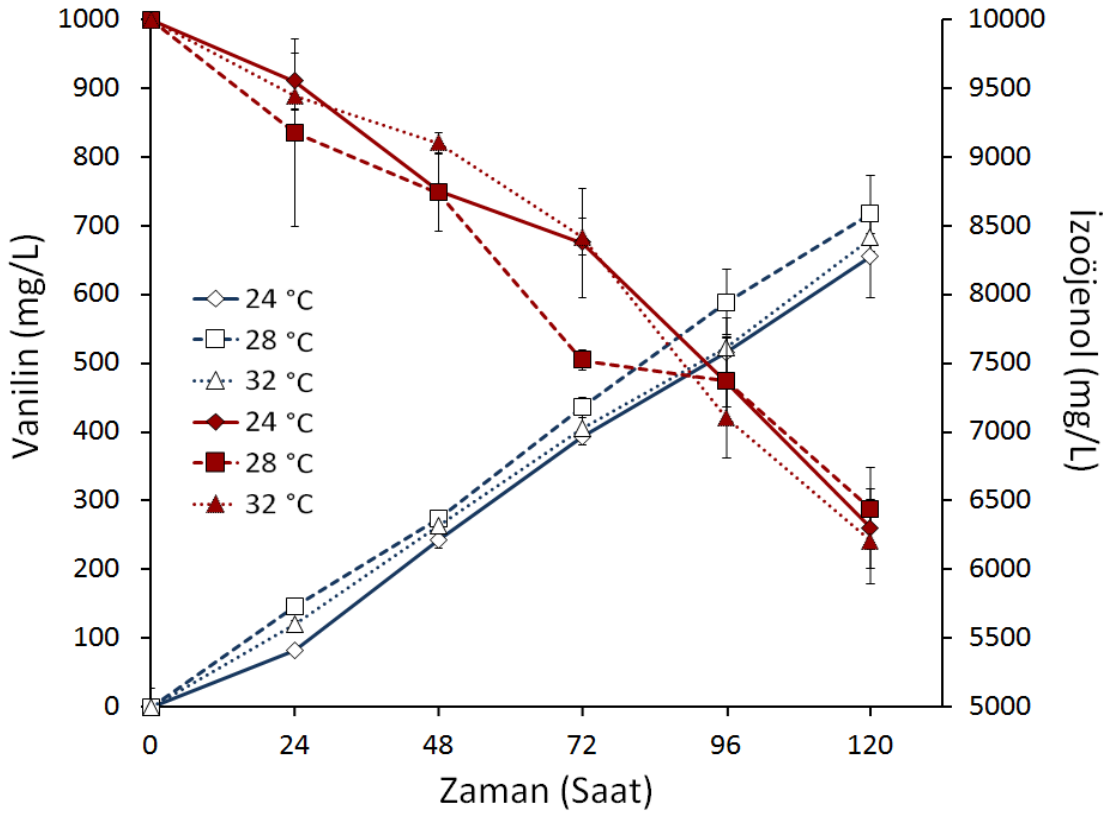
vanilin üretimini arttırmakla kalmayıp aynı zamanda reaksiyon süresini kısaltmaktadır (Ashengroph vd., 2012). Biyodönüşüm süresince hücrelerin statik şekilde kalabilmelerini sağlamak amacıyla biyodönüşüm ortamında substrat dışında yalnızca K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 tuzları kullanılmıştır.

İzoöjenol Varlığında Mikroorganizmanın Canlılığı

P. putida kültürünün kullanıldığı tüm denemelerde vanilin oluşumu gözlenirken; kültür inoküle edilmemiş kontrol erlenlerinde vanilin oluşumuna rastlanmamıştır. Bu durum, izoöjenolün vaniline abiyotik olarak dönüşemediğinin bir kanıtı olarak gösterilebilir. Oluşabilecek substrat toksisitesine bağlı olarak kültürün canlılığını koruyup korumadığı INT indikatörü ile incelenmiştir. Renksiz görünümde bir elektron alıcısı olan tetrazolyum tuzu indirgenğinde kırmızı renkli formazan oluşturmaktadır. Meydana gelen renk değişimi biyolojik aktivitenin bir sonucu kabul edilmektedir (Al-Bayati, 2008). Kültür içermeyen kontrol ortamlarında indikatöre bağlı renk değişimi gözlenmemiştir. Ancak biyodönüşümüne konu olan deneme ünitelerinin tamamında kırmızı renk oluşumu gözlenmiş olup; kültürün canlılığını koruduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular ışığında *P. putida* (HUT 8100) suşunun tek karbon kaynağı olarak izoöjenolu kullanabildiği ve vanilin üretme yeteneğine sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Sıcaklığın Vanilin Üretimine Etkisi

Farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen biyodönüşüm denemelerine ilişkin sonuçlar Şekil 1'de verilmiştir. 120 saat sonunda en yüksek vanilin üretimi 718.8 ± 43.7 mg/L ile $28^\circ C$ 'de gerçekleşmiştir. Bu şartlarda tüketilen izoöjenol miktarı 3556.2 ± 298.1 mg/L olarak belirlenmiştir. 24 , 28 ve $32^\circ C$ 'de elde edilen biyodönüşüm molar verimleri sırasıyla %19.1, %22.0 ve %19.5 olarak hesaplanmıştır. Uygulanan sıcaklık değerleri arasında gerek vanilin üretimi gerekse izoöjenol tüketimi açısından anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır ($P > 0.05$).



Şekil 1. *P. putida* kültürünün farklı sıcaklıklardaki biyodönüşüm verimi (Açık işaretçiler: üretilen vanilin, kapalı işaretçiler: ortamda kalan izoöjenol)

Figure 1. Bioconversion yield of *P. putida* culture at different temperatures (Open markers: produced vanillin, closed markers: remained isoeugenol in medium)

Sıcaklık bakteri gelişimi, biyodönüşüm ortamının reolojik özellikleri ve ürün verimi üzerine etkili bir parametredir. Bilindiği üzere fermentasyon proseslerinde mezofilik sıcaklık değerleri daha az ısıtma ve soğutma ihtiyacı gerektirdiğinden enerji tasarrufu sağlamakta; ayrıca substrat stabilitesine de katkıda bulunmaktadır (Yan vd., 2016). Düşük sıcaklık değerleri bakteri gelişimi ve metabolizmasını olumsuz etkilemektedir. 20°C'nin altındaki sıcaklıklarda vanilin üretimin oldukça azaldığı belirtilmiştir (Yamada vd., 2007). Sıcaklık artışı metabolik salgıları arttırabileceği gibi substratın dispersiyonunu da kolaylaştırmaktadır. Yüksek sıcaklığa bağlı düşük viskozite kütle transferini ve yağ fazının difüzyon hızını arttırmaktadır (Yan vd., 2016). 120 saatlik inkübasyon sonunda en yüksek vanilin üretimi 28°C'de gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda elde edilen sonuçlar literatür verileri ile uyumluluk

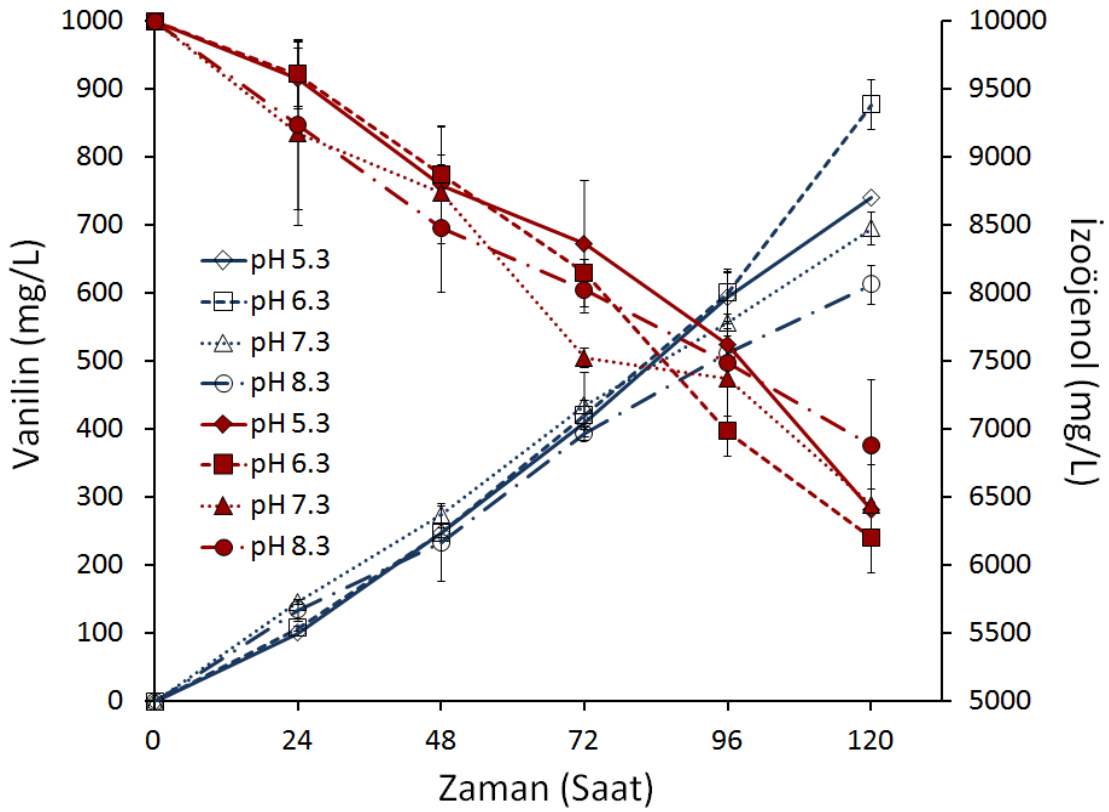
göstermektedir. *P. putida* kültürü kullanılarak gerçekleştirilen izoöjenolden vaniline biyodönüşüm çalışmasında 30°C'lik sıcaklığın vanilin birikimini azalttığı bildirilmiştir. Sıcaklığın 40 ve 50°C'ye çıkarılmasıyla hücrelerin vanilin üretim kapasitesinde sırasıyla %30 ve %100'lük kayıplar meydana gelmiştir. (Yamada vd., 2007). Sıcaklık artışına bağlı olarak vanilin üretiminde gözlenen bu düşüşün, izoöjenolü indirgeyen enzim(ler)in termal olarak stabil olmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Ortam pH'sının Vanilin Üretimine Etkisi

Enzimatik reaksiyon temelli proseslerde pH kilit rol oynamaktadır (Zhao vd., 2006; Yan vd., 2016). Başlangıç pH'sına bağlı olarak biyodönüşüm ortamındaki izoöjenol ve vanilin miktarlarındaki değişim Şekil 2'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre hafif asidik ortam koşullarında

vanilin üretiminin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. pH 6.3'te 877.9 ± 36.1 mg/L vanilin birikimi varken pH 8.3'te bu değer yalnızca 613.2 ± 28.9 mg/L'dir. pH 6.3'te elde edilen vanilin miktarı ile diğer deneme üniteleri arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Ayrıca asitliğin azalması ile kullanılan izoöjenol miktarında bir düşüş meydana gelmiş; dolayısıyla vanilin üretimi de azalış göstermiştir. Ancak tüketilen izoöjenol miktarları arasındaki fark önemli seviyede bulunmamıştır ($P > 0.05$). pH 5.3, 6.3, 7.3 ve 8.3'te elde edilen molar verimler sırasıyla %22.4, %25.1, %21.2 ve %21.4 olarak

hesaplanmıştır. pH'daki değişim enzim ve substratın iyonik durumlarını etkilemekte ve buna bağlı olarak hücrede gerçekleşen biyokimyasal süreçler de etkilenmektedir (Yan vd., 2016). Ortam pH'sının 6.3'ün altına düşürülmesiyle birlikte molar verimin azalması da yine aynı sebeptendir. Ayrıca başlangıç pH'sından bağımsız olarak biyodönüşüm ortamlarının 120 saat sonunda ulaştıkları son pH değerlerinin pH 6.3-7.3 arasında seyrettiği görülmüştür. Bu duruma inkübasyon boyunca başta vanilin olmak üzere ortama bırakılan hücresel metabolitlerin sebep olduğu düşünülmektedir.



Şekil 2. Biyodönüşüm ortamının başlangıç pH'sına bağlı olarak gerçekleşen vanilin üretimleri (Açık işaretçiler: üretilen vanilin, kapalı işaretçiler: ortamda kalan izoöjenol)

Figure 2. Vanillin production affected by initial pH value of bioconversion medium (Open markers: produced vanillin, closed markers: remained isoeugenol in medium)

Havalandırma Koşullarının Vanilin Üretimine Etkisi

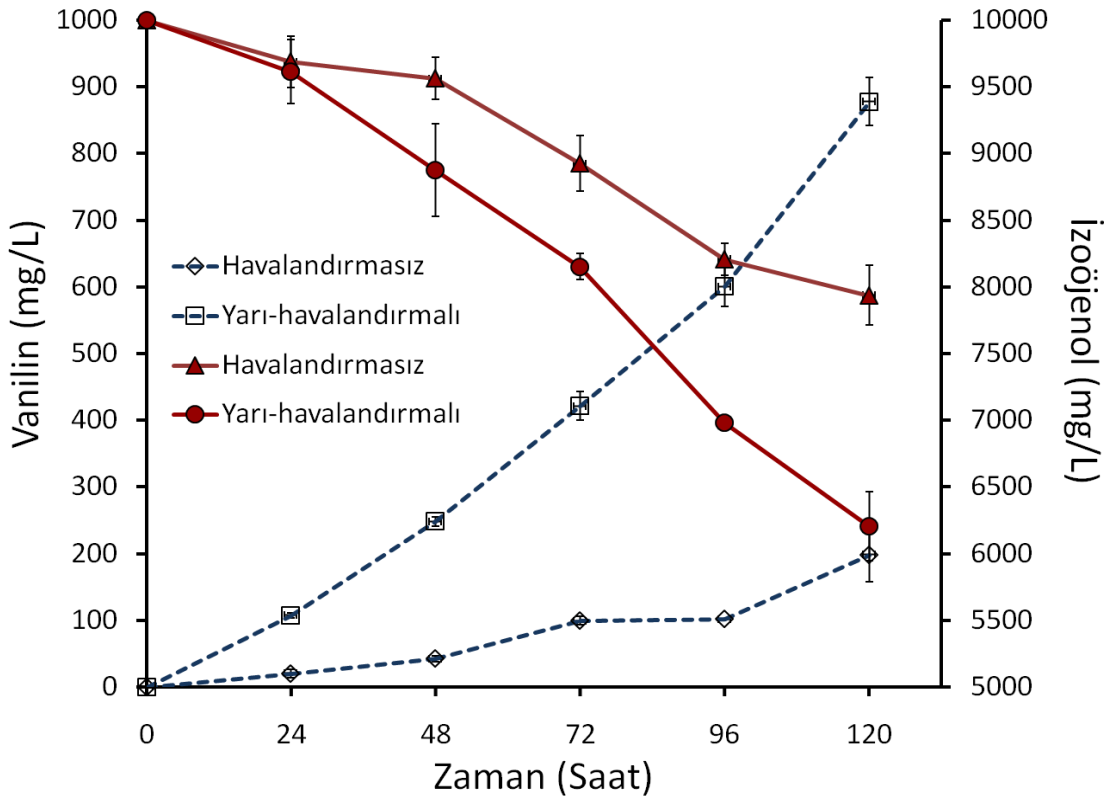
İstenmeyen koşulların ortaya çıkmasıyla mikroorganizmalar yüksek enerji girdili biyosentez mekanizmalarını devreye sokarlar.

Hücrede, besin eksikliği gibi pek çok stres faktöründen sakınmak için sekonder metabolitlerin üretimi başlatılır (Magan ve Aldred, 2007). *Pseudomonas* cinsi bakterilerin aerobik koşullara fazlasıyla bağımlı olduğu bilinen bir

gerçekdir (Molina vd., 2013). Bicas vd. (2010) durağan fazdaki *P. fluorescens* hücrelerini kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada ayçiçek yağı kullanarak biyodönüşüm yüzeyinin atmosferik hava ile temasını kesmiştir. Oksidatif stres, limonenden α -terpineol üretiminde önemli düzeyde bir artışa sebep olmuş ve literatürdeki en yüksek üretim değerine ulaşılmıştır.

Bu çalışmada biyodönüşüm ortam atmosferi azot gazı ile doldurularak kültürün yalnızca sıvı besi ortamındaki çözülmüş oksijenden faydalanması

sağlanmıştır. Oksijen miktarının kısıtlanmasıyla izoöjenol tüketiminde dikkate değer bir azalma görülmüştür. Yarı havalandırma koşullarında izoöjenol tüketimi 3764.6 ± 256 mg/L iken havalandırmanın kesildiği koşullarda bu miktar 2062.0 ± 225 mg/L olarak kalmıştır. Buna paralel olarak vanilin üretiminde de keskin bir düşüş gözlenmiştir (Şekil 3). 120 saat sonunda üretilen vanilin miktarı yalnızca 198.7 ± 28.7 mg/L olarak bulunmuştur. Daha önce yarı havalandırma koşullarında %25.1 olarak kaydedilen molar verim havalandırmasız koşullarda %10.6'ya gerilemiştir.



Şekil 3. Havalandırma koşullarının vanilin üretimine etkisi (Açık işaretçiler: üretilen vanilin, kapalı işaretçiler: ortamda kalan izoöjenol)

Figure 3. Effect of aeration conditions on vanillin production (Open markers: produced vanillin, closed markers: remained isoegenol in medium)

Daha önceki çalışmalarda çözülmüş oksijen konsantrasyonunun bakteri gelişimi ve substrat tüketim oranı üzerinde oldukça etkili olduğu bildirilmiştir (Şeker vd., 1997). Aerobik proseslerde oksijen miktarı transkripsiyon ve enzim sentez süreçlerini etkilemektedir. Dolayısıyla ortamdaki oksijen miktarına bağlı

olarak hücre metabolizması ve üretkenliğinde de farklılıklar meydana gelebilmektedir (Yan vd., 2016). *P. putida* kültürü oksijene bağımlı olduğundan anaerobik koşullarda izoöjenolden vanilin oluşturmadığı belirtilmiştir (Furukawa vd., 2003). Literatürde oksijen miktarının kısıtlandığı durumlarda vanilin üretimine ilişkin yeterli bilgi

bulunmamaktadır. Araştırma sonuçları, biyodönüşüm ortamının hava ile teması kesildiğinde vanilin üretiminin çarpıcı biçimde düştüğünü ortaya koymuştur. *P. putida*'nın kullanıldığı vanilin biyodönüşüm çalışmalarında etkin bir üretim için normal atmosfer koşullarının sağlanması gerektiği sonucuna varılmıştır.

SONUÇ

Aroma pazarında ihtiyaç duyulan doğal vanilin üretimi için son yıllarda alternatif yöntem arayışları devam etmektedir. Bu çalışmada, *P. putida* ile biyodönüşüm yoluyla izoöjenolden vanilin üretimi gerçekleştirilmiş ve molar verim üzerine sıcaklık, başlangıç pH'sı ve havalandırma koşullarının etkisi incelenmiştir. Üretilen vanilin doğal bir öncül madde olan izoöjenolden mikrobiyal dönüşüm ile elde edildiği için Avrupa Birliği mevzuatları açısından da 'doğal aroma maddesi' kapsamında değerlendirilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek vanilin üretimi 28°C'de, 6.3 başlangıç ortam pH'sında ve yarı havalandırma koşullarında gerçekleşmiştir. 120 saatlik biyodönüşümün ardından %25.1 molar verimle 877.9 mg/L vanilin elde edilmiştir. Çalışmanın endüstriyel uygulamalar için kayda değer sonuçlar ortaya koyduğu ve yapılacak ileri optimizasyon çalışmaları ile vanilin miktar ve veriminin arttırılabileceği düşünülmektedir. Yüzey yanıt yöntemi ile farklı değişkenler arası etkileşim incelenerek üretim veriminin daha yüksek bir seviyeye çıkarılabileceği öngörülmektedir. Biyodönüşüm süresinin uzatılması, izoöjenol konsantrasyonu ve çalkalama hızının arttırılarak disperse olan substrat miktarının yükseltilmesi de üzerinde durulması gereken başlıca konulardır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı maddi olarak destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (Proje No: 2015-17) ve mikroorganizma kültürünü sağlayan HUT Kültür Koleksiyonu'na teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

Al-Bayati, F.A. (2008). Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *J*

Ethnopharmacol, 116: 403-406, doi: 10.1016/j.jep.2007.12.003.

Ashengroph, M., Nahvi, I., Amini, J. (2013). Application of Taguchi design and response surface methodology for improving conversion of isoeugenol into vanillin by resting cells of *Psychrobacter* sp. CSW4. *Iran J Pharm Res*, 12(3): 411-421.

Ashengroph, M., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H., Momenbeik, F. (2010). Optimization of media composition for improving conversion of isoeugenol into vanillin with *Pseudomonas* sp. strain KOB10 using the Taguchi method. *Biocatal Biotransformation*, 28(5-6): 339-347, doi: 10.3109/10242422.2010.530660.

Ashengroph, M., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H., Momenbeik, F. (2011). Use of growing cells of *Pseudomonas aeruginosa* for synthesis of the natural vanillin via conversion of isoeugenol. *Iran J Pharm Res*, 10(4): 749-757.

Ashengroph, M., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H., Momenbeik, F. (2012). Conversion of isoeugenol to vanillin by *Psychrobacter* sp. strain CSW4. *Appl Biochem Biotechnol*, 166: 1-12, doi: 10.1007/s12010-011-9397-6.

Banerjee, G., Chattopadhyay, P. (2019). Vanillin biotechnology: the perspectives and future. *J Sci Food Agric*, 99: 499-506, doi: 10.1002/jsfa.9303.

Bicas, J.L., Fontanille, P., Pastore, G.M., Larroche, C. (2010). A bioprocess for the production of high concentrations of R-(+)-a-terpineol from R-(+)-limonene. *Process Biochem*, 45: 481-486, doi: 10.1016/j.procbio.2009.11.007.

Fache, M., Boutevin, B., Caillol, S. (2016). Vanillin production from lignin and its use as a renewable chemical. *ACS Sustain Chem Eng*, 4: 35-46, doi: 10.1021/acssuschemeng.5b01344.

Funk, C., Rainie, L., Page, D. (2015). Public and scientists' views on science and society. www.pewinternet.org/wp-content/uploads/sites/9/2015/01/PI_ScienceandSociety_Report_012915.pdf (Accessed 24 June 2019).

Furukawa, H., Morita, H., Yoshida, T., Nagasawa, T. (2003). Conversion of isoeugenol into vanillic

- acid by *Pseudomonas putida* 158 cells exhibiting high isoeugenol-degrading activity. *J Biosci Bioeng*, 96(4): 401-403, doi: 10.1016/S1389-1723(03)90145-9.
- Gallage, N.J., Moller, B.L. (2018). Vanilla: the most popular flavor. In: *Biotechnology of Natural Products*, Schwab, W., Lange, B.M., Wüst, M. (editors). Springer International Publishing, Switzerland, pp. 3-24, doi: 10.1007/978-3-319-67903-7.
- Gonzalez, C.G., Mustafa, N.R., Wilson, E.G., Verpoorte, R., Choi, Y.H. (2018). Application of natural deep eutectic solvents for the 'green' extraction of vanillin from vanilla pods. *Flavour Fragr J*, 33: 91-96, doi: 10.1002/ffj.3425.
- Hua, D., Ma, C., Lin, S., Song, L., Deng, Z., Maomy, Z., Zhang, Z., Yu, B., Xu, P. (2007). Biotransformation of isoeugenol to vanillin by a newly isolated *Bacillus pumilus* strain: identification of major metabolites. *J Biotechnol*, 130: 463-470, doi: 10.1016/j.jbiotec.2007.05.003.
- Julsing, M.K., Kuhn, D., Schmid, A., Bühler, B. (2012). Resting cells of recombinant *E. coli* show high epoxidation yields on energy source and high sensitivity to product inhibition. *Biotechnol Bioeng*, 109(5): 1109-1119, doi: 10.1002/bit.24404.
- Kasana, R.C., Sharma, U.K., Sharma, N., Sinha, A.K. (2007). Isolation and identification of a novel strain of *Pseudomonas chlororaphis* capable of transforming isoeugenol to vanillin. *Curr Microbiol*, 54: 457-461, doi: 10.1007/s00284-006-0627-z.
- Li, Y.H., Sun, Z.H., Zheng, P. (2004). Determination of vanillin, eugenol and isoeugenol by RP-HPLC. *Chromatographia*, 60: 709-713, doi: 10.1365/s10337-004-0440-4.
- Magan, N., Aldred, D. (2007). Why do fungi produce mycotoxins? In: *Food Mycology: a multifaceted approach to fungi and food*, Dijksterhuis, J., Samson, R.A. (editors), Volume 25, CRC Press, the USA, pp. 121-133.
- Marquez-Medina, M.D., Prinsen, P., Li, H., Shih, K., Romero, A.A., Luque, R. (2018). Continuous-flow synthesis of supported magnetic iron oxide nanoparticles for efficient isoeugenol conversion into vanillin. *ChemSusChem*, 11: 389-396, doi: 10.1002/cssc.201701884.
- Molina, G., Pimentel, M.R., Pastore, G.M. (2013). *Pseudomonas*: a promising biocatalyst for the bioconversion of terpenes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97: 1851-1864, doi: 10.1007/s00253-013-4701-8.
- Ostovar, S., Franco, A., Puente-Santiago, A.R., Pinilla-de Dios, M., Rodriguez-Padron, D., Shaterian, H.R., Luque, R. (2018). Efficient mechanochemical bifunctional nanocatalysts for the conversion of isoeugenol to vanillin. *Front Chem*, 6:77, doi: 10.3389/fchem.2018.00077.
- Perkins, C., Siddiqui, S., Puri, M., Demain, A.L. (2015). Biotechnological applications of microbial conversions. *Crit Rev Biotechnol*, 36(6): 1050-1065, doi: 10.3109/07388551.2015.1083943.
- Şeker, Ş., Beyenal, H., Salih, B., Tanyolaç, A. (1997). Multi-substrate growth kinetics of *Pseudomonas putida* for phenol removal. *Appl Microbiol Biotechnol*, 47: 610-614, doi: 10.1007/s002530050982.
- Taira, J., Toyoshima, R., Ameku, N., Iguchi, A., Tamaki, Y. (2018). Vanillin production by biotransformation of phenolic compounds in fungus, *Aspergillus luchuensis*. *AMB Express*, 8: 40, doi: 10.1186/s13568-018-0569-4.
- Vasudevan, S., Bhat, S.V. (2011). Biotransformation of isoeugenol catalyzed by growing cells of *Pseudomonas putida*. *Biocatal Biotransformation*, 29(4): 147-150, doi: 10.3109/10242422.2011.589898.
- Wang, Y., Sun, S., Li, F., Cao, X., Sun, R. (2018). Production of vanillin from lignin: the relationship between β -O-4 linkages and vanillin yield. *Ind Crops Prod*, 116: 116-121, doi: 10.1016/j.indcrop.2018.02.043.
- Wangrangsimgul, N., Klinsakul, K., Vangnai, A.S., Wongkongkatep, J., Inprakhon, P., Honda, K., Ohtake, H., Kato, J., Pongtharangkul, T. (2012). Bioproduction of vanillin using an organic solvent-tolerant *Brevibacillus agri* 13. *Appl Microbiol Biotechnol*, 93: 555-563, doi: 10.1007/s00253-011-3510-1.
- Wilde, A.S., Frandsen, H.L., Fromberg, A., Smedsgaard, J., Greule, M. (2019). Isotopic characterization of vanillin ex glucose by GC-

- IRMS - new challenge for natural vanilla flavour authentication? *Food Control*, 106: 106735, doi: 10.1016/j.foodcont.2019.106735.
- Wongtanyawat, N., Lusanandana, P., Khwanjaisakun, N., Kongpanna, P., Phromprasit, J., Simasatitkul, L., Amornraksa, S., Assabumrungrat, S. (2018). Comparison of different kraft lignin-based vanillin production processes. *Comput Chem Eng*, 117: 159-170, doi: 10.1016/j.compchemeng.2018.05.020.
- Yamada, M., Okada, Y., Yoshida, T., Nagasawa, T. (2007). Biotransformation of isoeugenol to vanillin by *Pseudomonas putida* IE27 cells. *Appl Microbiol Biotechnol*, 73: 1025-1030, doi: 10.1007/s00253-006-0569-1.
- Yamada, M., Okada, Y., Yoshida, T., Nagasawa, T. (2008). Vanillin production using *Escherichia coli* cells over-expressing isoeugenol monooxygenase of *Pseudomonas putida*. *Biotechnol Lett*, 30: 665-670, doi: 10.1007/s10529-007-9602-4.
- Yan, L., Chen, P., Zhang, S., Li, S., Yan, X., Wang, N., Liang, N., Li, H. (2016). Biotransformation of ferulic acid to vanillin in packed bed-stirred fermentors. *Sci Rep*, 6: 1-12, doi: 10.1038/srep34644.
- Zhang, Y., Xu, P., Han, S., Yan, H., Ma, C. (2006). Metabolism of isoeugenol via isoeugenol-diol by a newly isolated strain of *Bacillus subtilis* HS8. *Appl Microbiol Biotechnol*, 73: 771-779, doi: 10.1007/s00253-006-0544-x.
- Zhao, L., Xie, Y., Chen, L., Xuefeng, X., Zhao, C.X., Cheng, F. (2018). Efficient biotransformation of isoeugenol to vanillin in recombinant strains of *Escherichia coli* by using engineered isoeugenol monooxygenase and sol-gel chitosan membrane. *Process Biochem*, 71: 76-81, doi: 10.1016/j.procbio.2018.05.013.
- Zhao, L.Q., Sun, Z.H., Zheng, P., He, J.Y. (2006). Biotransformation of isoeugenol to vanillin by *Bacillus fusiformis* CGMCC1347 with the addition of resin HD-8. *Process Biochem*, 41: 1673-1676, doi: 10.1016/j.procbio.2006.02.007.
- Zhao, L.Q., Sun, Z.H., Zheng, P., Zhu, L.L. (2005). Biotransformation of isoeugenol to vanillin by a novel strain of *Bacillus fusiformis*. *Biotechnol Lett*, 27: 1505-1509, doi: 10.1007/s10529-005-1466-x.



DETERMINATION OF PHYSICOCHEMICAL AND SENSORY PROPERTIES OF KOMBUCHA BEVERAGE PREPARED WITH SAFFRON

Senem Suna¹, Kübra Çiftçi¹, Canan Ece Tamer^{1*}

¹Bursa Uludağ University, Faculty of Agriculture, Department of Food Engineering, Bursa, Turkey

Received / Geliş: 29.10.2019; Accepted / Kabul: 09.12.2019; Published online / Online baskı: 27.12.2019

Suna, S., Çiftçi, K., Tamer, C.E. (2020). Determination of physicochemical and sensory properties of kombucha beverage prepared with saffron. *GIDA* (2020) 45 (1): 20-30 doi: 10.15237/gida.GD19139

Suna, S., Çiftçi, K., Tamer, C.E. (2020). Safran kullanılarak hazırlanan kombucha içeceğinin fizikokimyasal ve duyuşal özelliklerinin belirlenmesi. *GIDA* (2020) 45 (1): 20-30 doi: 10.15237/gida.GD19139

ABSTRACT

This research aimed to explore the impacts of saffron extract (SE) on composition and sensorial features of kombucha beverage prepared with green tea (GT). For this point, SE was added to GT infusion then fermented at 28 ± 2 °C (120 h). Total acidity of samples prepared with GT (control) and saffron extract added kombucha (SEK) reached to 3.96 and 4.02 g/L, respectively at the end of the fermentation. Total phenolic content (TPC) and total antioxidant capacity (TAC) of the beverages raised in proportion to uncultivated samples. The current findings demonstrated that SE addition to GT infusion resulted with an increment in TPC and TAC. At the end of the fermentation, increase of TPC in control and SEK were determined as 73.51% and 43.85%, respectively. The results revealed that SE addition to GT for kombucha fermentation provided enhanced nutritional properties as well as improving functional and sensorial attributes of the beverage.

Keywords: Kombucha, saffron, fermentation, antioxidant capacity

SAFRAN KULLANILARAK HAZIRLANAN KOMBUCHA İÇECEĞİNİN FİZİKOKİMYASAL VE DUYUSAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

ÖZ

Bu çalışmada safran ekstaktı (SE) kullanımının, yeşil çay (YÇ) ile hazırlanan kombucha içeceğinin bileşimi ve duyuşal özellikleri üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla SE, YÇ infüzyonuna eklenmiş ve 28 ± 2 °C'de (120 saat) fermente edilmiştir. YÇ ile hazırlanmış (kontrol) ve SE ilave edilmiş kombucha örneklerinin toplam asitlik değerleri fermentasyon sonunda sırasıyla 3.96 ve 4.02 g/L'ye ulaşmıştır. İçeceklerin toplam fenolik madde içeriği (TFM) ve toplam antioksidan kapasite değerlerinde (TAK), kültür içermeyen örneklere göre artış görülmüştür. Mevcut bulgular, YÇ infüzyonuna SE ilavesinin, TFM ve TAK değerlerinde artış meydana getirdiğini göstermiştir. Fermentasyon sonunda YÇ ile hazırlanan ve SE ilave edilen kombucha örneklerindeki TFM artışı sırasıyla %73.51 ve %43.85 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmaya ait sonuçlar, kombucha fermentasyonunda kullanılan yeşil çaya safran ekstraktı eklenmesi ile, içeceğin fonksiyonel ve duyuşal özelliklerinin iyileştirilmesinin yanı sıra, besleyici özelliklerinin geliştirildiğini ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: Kombucha, safran, fermentasyon, antioksidan kapasite

* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar;

✉ etamer@uludag.edu.tr,

☎ (+90) 224 294 1501,

☎ (+90) 224 294 1402

Senem Suna; ORCID no: 0000-0002-6947-2167

Kübra Çiftçi; ORCID no: 0000-0002-2647-0946

Canan Ece Tamer; ORCID no: 0000-0003-0441-1707

INTRODUCTION

Customers awareness to consume food products which support the maintenance of a good health and wellness and also prevent the risk of several illnesses through their bioactive components has been substantially increased. This demand had led to the development of functional foods as a major sector in the food market (Salmerón et al., 2015; Mousavi and Mousavi, 2019). Functional beverages are the most rapidly growing segment with strong consumer demand. Therefore, many studies have concentrated on the potential utilization of health promoting ingredients for functional beverages (Marete et al., 2011).

Kombucha is a very popular, non-alcoholic [$<0.5\%$ (v/v)], fermented functional drink consumed worldwide due to many health benefits (i.e. antimicrobial, antioxidant, antidiabetic, and anticancer) (Marsh et al., 2014a; Chakravorty et al., 2019). The sweetened black or green tea and a mixed culture known as SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast) including acetic acid bacteria and yeast species from the genus *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Pichia*, *Brettanomyces*, and *Zygosaccharomyces* are used for kombucha production (Marsh et al., 2014b). Firstly, the yeasts convert the carbon sources to ethyl alcohol, which is subsequently converted to organic acids by the bacteria (Jayabalan et al., 2014). In traditional process, during fermentation, a layer of bio-cellulose pellicule segment is formed. Kombucha has high antioxidant capacity that have been associated with prevention of cancer, supporting of the immune system, improvement of joint rheumatism (Jayabalan et al., 2014, Srihari et al. 2013 a, Deghrigue et al. 2013; Shenoy et al. 2019). Jasmine tea, lemon balm tea, peppermint tea, mulberry tea, echinacea tea and winter savory tea can be used for kombucha production (Velićanski et al., 2007; Cvetković, 2008; Jayabalan et al., 2014). Moreover, these herbs can be used in combination with black or green tea for fermentation. All of these ingredients include many phytochemicals, provide the preferred antioxidant and antimicrobial activity and may prevent diseases related with oxidative stress

(Ćetković et al., 2007; Velićanski et al., 2014; Essawet et al., 2015).

The aim of this study was to reveal the possibility of using saffron as an ingredient with high phytochemical content for kombucha preparation to improve nutritional value, functional and sensory properties of the beverage.

Saffron (*Crocus sativus* L.) is one of the valuable herbs widely cultivated in India, Iran, Turkey, Morocco, Spain, Italy, France and Greece (Paşayeva and Tekiner, 2014; Azarabadi and Özdemir, 2018). It is widely used as a food colouring and flavouring spice, preservative and also utilized in cosmetics, textile, and medical applications (Rahaiee et al., 2015; Bathaie and Mousavi, 2010; Azarabadi and Özdemir, 2018).

The main bioactive compounds of saffron are crocin, picrocrocin and flavonoids (Termentzi and Kokkalou, 2008) presenting many health beneficial features into the food and beverages (Urbani et al., 2016). It also contains carbohydrates, mucilage, starch, gums, proteins, amino acids, fats, anthocyanins, fiber, vitamins (B1 and B2), minerals, alkaloids, saponins, safranal and picrocrocin together with other chemical compounds (Negbi, 1997; Melnyk et al., 2010; Shahi et al., 2016; Serrano-Díaz et al., 2013; Alavizadeh et al., 2014). Azarabadi and Özdemir (2018) analysed volatile compounds in saffron samples and found acetic acid, 2-(5H)-furanone, isophorone, 4-ketoisophorone, 2,6,6-trimethyl-1,4-cyclohexanedione, eucarvone and safranal as significant compounds.

Novel researches have focused on the antioxidant, antidepressant, anticancer, neuroprotective, and cardioprotective effects of bioactives of saffron (Hosseinzadeh et al., 2009; Ghasemi et al., 2015; Ashrafi et al., 2015; Aung et al., 2007; Mehri et al., 2012; Goyal et al., 2010). The research of Akbari- Fakhrebadi et al. (2019) indicated that saffron improved mitochondrial biogenesis, reduced oxidative stress, inflammation, and modulated metabolic biomarkers in exercised rats. Several researches have reported that saffron has also

antiinflammatory, cytotoxic, anticonvulsant, antihypertensive, antitussive, aphrodisiac and immunomodulating effects (Paşayeva and Tekiner, 2014). Melnyk et al. (2010) reported that gastric disorders, cardiovascular disease, insulin resistance, premenstrual syndrome, depression, insomnia and anxiety are alleviated or prevented by saffron constituents. To the best of our knowledge, this was the first study related to the use of saffron in kombucha production.

MATERIALS AND METHODS

Green tea (*Camellia sinensis*) and sucrose were purchased from a local market in Bursa. Saffron stigmas harvested in 2018 was also purchased from Karataş Tic. in Safranbolu, Karabük, Turkey.

Preparation of kombucha

Preparation of sweetened green tea was shown in Figure 1. Firstly, 70 g of sucrose were dissolved in

900 mL of water and pasteurized at 98 °C for 15 min. Then, 8 g of green tea (ready to use tea bags) was infused with this water at 95 °C for 12 min and then filtered. Saffron was extracted according to the previous literature, in which a new saffron-based probiotic beverage was produced (Dabbagh Moghaddam et al., 2018). 1 g of dried saffron stigmas poured into 100 mL distilled water and stirred at 300 rpm overnight at room temperature. According to the results of preliminary tests, saffron extract was added as 10% (v/v) to cooled green tea infusion then inoculated with kombucha culture [10% (v/v)]. Kombucha culture used [10% (v/v)] in this study, was fermentation liquid of kombucha obtained after 2 weeks of fermentation (28±2 °C) on green tea infusion (10 g/L) sweetened with sucrose (70 g/L). Fermentation monitored at 28±2 °C. The green tea kombucha beverage was analyzed as the control sample.

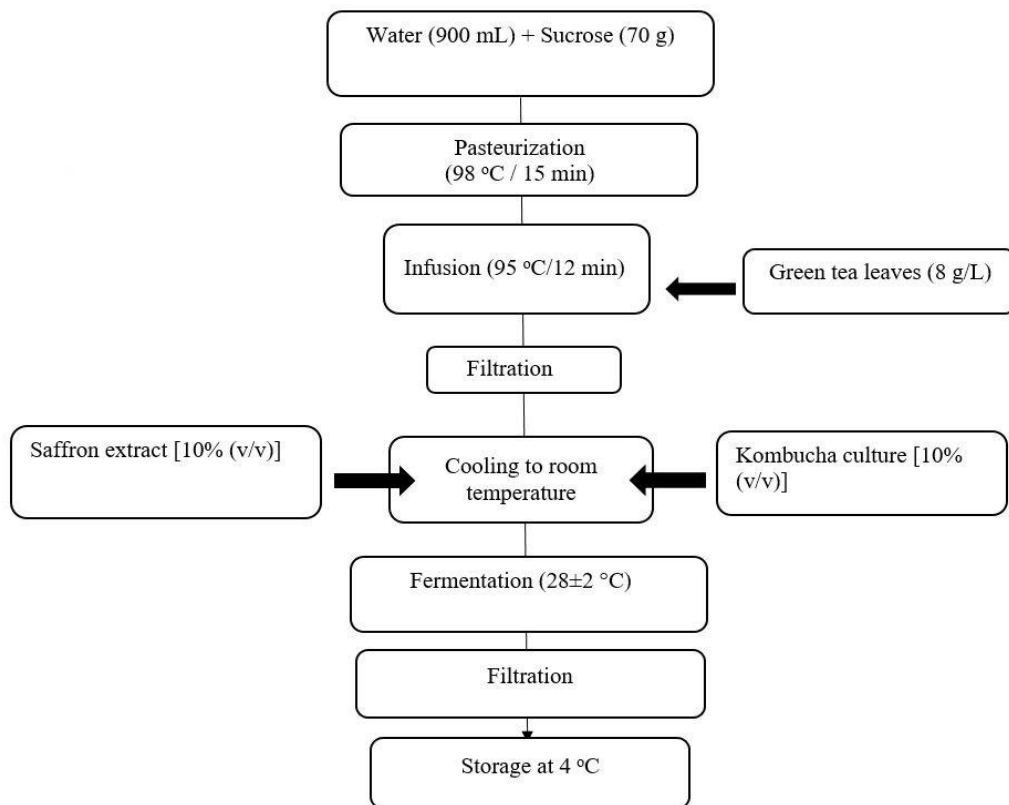


Figure 1. Kombucha beverage production

ANALYSES

Determination of some physical and chemical properties

Total acidity analysis were conducted with the potentiometric method, in which the samples were titrated with 0.1 N NaOH to pH 8.1 and the results were expressed as g/L acetic acid. (Cemeroglu, 2007). The pH was analyzed by a digital pH meter (Mettler Toledo Sevencompact pH/Ion pH meter, Canada). For colour analysis, Konica Minolta Chroma Meter, CR-5 (Japan) was used and L*, a*, b*, chroma (C*) and hue (h°) values were measured. L*, a*, b* values were displayed as lightness/darkness, redness/greenness, and yellowness/blueness respectively. Chroma indicated the colour intensity and it changes from 0 (completely unsaturated) to 100 or more (pure colour) while hue value reflects the tone and is represented by the angles in red, yellow, green, and blue colour (Bakker et al., 1986).

Extraction of Samples

Samples were extracted in accordance with the procedure of Vitali et al. (2009). 2 mL of sample was mixed with 20 mL extraction solution including HCl /methanol/water (1:80:10, v/v) and then shaken in a water bath at 250 rpm for 2 h at 20 °C. Right after, centrifugation was applied to the mixture at 3500 rpm for 10 min at 20 °C then they were stored at -20 °C until analyzed.

Total Phenolic Content and Total Antioxidant Capacity Analyses

Previously prepared extracts (according to Vitali et al., 2009) were used for the determination of total phenolic content (TPC) and total antioxidant capacity (TAC). Shimadzu (UV 1208) spectrophotometer (Japan) was used for TPC and TAC analyses and all trials were performed in triplicate. TPC was determined according to Folin-Ciocalteu (FC) spectrophotometric method (Spanos and Wrolstad, 1990). Gallic acid was used for the calibration of the standard curve ($R^2=0.9835$). 0.2/2.3/0.15 mL of extract/distilled water/ FC were added respectively and vortexed for 15 s. After the addition of 0.3 mL Na_2CO_3 (35%) solution, the test tubes stayed at the dark for 2 h. Absorbance was measured at 725 nm and

the result was calculated as “mg gallic acid equivalent (GAE)/100 mL total soluble solid (tss). Total antioxidant capacity was determined with DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), CUPRAC (Cupric ion reducing antioxidant capacity) and FRAP (Ferric reducing antioxidant power) assays respectively. Trolox were used as the standard for the calibration curve in TAC analyses and determined as $R^2 = 0.9929$, $R^2 = 0.9987$ and $R^2 = 0.9993$ for DPPH, CUPRAC and FRAP methods respectively. All of the TAC results were expressed as $\mu\text{mol trolox/mL tss}$. For the DPPH assay, 0.1 mL extract was mixed with 3.9 mL DPPH radical (6×10^{-5} M) and vortexed for 30 s. Test tubes were stayed in dark at room temperature for 30 min to let the reaction occur and then the absorbance was measured at 515 nm (Katalinic et al. 2006). In CUPRAC method, CuCl_2 (1×10^{-2} M), neocuproine (7.5×10^{-3} M) and ammonium acetate (1M) were mixed for the preparation of CUPRAC. 0.1 mL of extract, 0.9 mL distilled water and 3 mL CUPRAC were mixed and the final absorbance was measured at 450 nm after 30 min (Apak et al., 2008). In FRAP assay, 3 mL of daily prepared FRAP reagent was added to 0.3 mL of distilled water and 0.1 mL of the extract. FRAP was prepared with the mixture of 25 mL of 0.3 mol/L acetate buffer (pH 3.6), 2.5 mL 20 mmol/L $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ and 2.5 mL 10 mmol/L TPTZ solution in mmol/L HCl. The test samples and FRAP solution were incubated at 37 °C for 30 min. Afterwards, absorbance was measured at 595 nm (Benzie and Strain, 1996).

Sensory analysis

Sensory analysis was completed at 0, 1 and 3 storage days. Colour, odour, appearance, sweetness, sourness and overall acceptability of the samples were evaluated. A nine-point hedonic scale test differing from “like extremely (9)” to “dislike extremely (1)” was used for these quality criterias (Altuğ and Elmacı, 2011). Ten panellists scored the beverages coded with three digit random numbers.

Statistical analysis

Statistical evaluation was conducted using JMP software package version 8.0 (SAS Institute Inc. NC, 27513). As the significant differences were

determined ($P < 0.05$), the least significant difference (LSD) test was used in defining the differences among means in three replications (Granato et al., 2014).

RESULTS AND DISCUSSION

pH and Total Acidity

pH and total acidity values of samples were given in Table 1. Samples were analyzed for their physicochemical properties during 120 hours of fermentation. The pH got a dramatic decline. Total acidity of kombuchas prepared with green tea (control) and saffron extract added kombucha

reached to 3.96 g/L and 4.02 g/L, respectively at the end of the 5th days of fermentation. All samples were accepted ready for consumption with these acidities and then stored at 4 °C for 3 days. Depending on the organic acid production, pH of kombucha beverages decreased. During storage, decrease in pH continued. Similar pH values were determined when kombucha beverages were prepared with thyme, lemon balm, peppermint and sage (Velićanski et al., 2013). The pH values of red and black goji berry kombucha beverages were monitored as 3.23 and 3.37, respectively (Abuduaibifu and Tamer, 2019).

Table 1. pH and total acidity of kombucha samples

Samples*	pH	Total acidity (g/L) (as acetic acid)
GTI	7.24±1.53 ^b	0.27±0.00 ^{lm}
GTSI	7.40±1.60 ^a	0.26±0.00 ^{lm}
G1	4.60±0.07 ^c	0.36±0.00 ^k
SK1	4.60±0.05 ^c	0.34±0.00 ^{kl}
G2	4.49±0.02 ^{de}	0.74±0.01 ⁱ
SK2	4.51±0.07 ^d	0.60±0.00 ^j
G3	4.45±0.22 ^{ef}	1.10±0.01 ^h
SK3	4.41±0.21 ^f	1.21±0.00 ^g
G4	4.07±0.16 ^g	2.30±0.00 ^f
SK4	4.04±0.17 ^g	2.64±0.00 ^e
G5	3.81±0.02 ^{hi}	3.96±0.01 ^a
SK5	3.74±0.04 ^j	4.02±0.01 ^a
GS1	3.84±0.03 ^h	3.60±0.00 ^c
SKS1	3.79±0.02 ⁱ	3.87±0.00 ^b
GS3	3.81±0.06 ^{hi}	3.48±0.00 ^d
SKS3	3.70±0.01 ^j	3.59±0.00 ^c

Different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

Samples*:

GTI: Sweetened green tea infusion

GTSI: Sweetened green tea and saffron extract added infusion

G1: 24 h fermented green tea kombucha

SK1: 24 h fermented saffron extract added kombucha

G2: 48 h fermented green tea kombucha

SK2: 48 h fermented saffron extract added kombucha

G3: 72 h fermented green tea kombucha

SK3: 72h fermented saffron extract added kombucha

G4: 96 h fermented green tea kombucha

SK4: 96 h fermented saffron extract added kombucha

G5: 120 h fermented green tea kombucha

SK5: 120 h fermented saffron extract added kombucha

GS1: 24 h stored green tea kombucha

SKS1: 24 h stored saffron extract added kombucha

GS3: 72 h stored green tea kombucha

SKS3: 72 h stored saffron extract added kombucha

Colour analyses

Table 2 represented the colour values of the samples. As visual attribute of beverages, colour is an important for quality and acceptability (Ulusoy and Tamer, 2019). As shown in Table 2, there were significantly different changes ($P < 0.05$) in L^* , a^* , b^* , chroma and hue values of kombucha beverages. While saffron extract addition to green tea infusion decreased L^* and hue values, it caused an increase of a^* , b^* and chroma values. Saffron is able to present a yellow to red range of colours, related with the utilized amount of saffron (Bathaie and Mousavi, 2010).

The effect of pH, temperature, light, and oxygen on the stability in water extracts of pigments of saffron was previously determined (Tsimidou and Tsatsaroni, 1993). During fermentation and storage, L^* values of both green tea kombucha and saffron extract added kombucha increased. Ayed et al. (2017) reported that the change of colour values due to chemical modifications of the phenolics and carotenoids during fermentation and storage. Watawana et al. (2018) indicated that microbial transformation of polyphenols causes the colour decrease in kombucha beverages.

Table 2. Colour values of the samples

Samples*	L^*	a^*	b^*	Chroma (C^*)	Hue (h°)
GTI	85.03±0.01 ^f	2.80±0.16 ⁱ	37.15±0.04 ^b	37.30±0.04 ^e	87.36±3.04 ^{ab}
GTSI	75.27±0.01 ^m	20.04±1.91 ^d	91.64±0.36 ^a	91.77±1.28 ^d	82.07±2.71 ^c
G1	89.32±0.00 ^a	-0.38±0.22 ⁿ	28.68±7.39 ^d	24.42±0.01 ^l	89.71±2.04 ^a
SK1	78.27±0.01 ^h	17.07±1.30 ^h	94.86±0.22 ^a	95.92±0.04 ^c	81.87±0.58 ^c
G2	85.62±0.01 ^e	1.43±0.50 ^j	33.33±7.70 ^{bcd}	37.84±0.02 ^e	87.77±0.67 ^{ab}
SK2	77.30±0.02 ^{ij}	19.05±1.24 ^f	94.55±0.64 ^a	96.62±0.04 ^b	81.52±0.58 ^c
G3	86.39±1.13 ^d	0.84±0.25 ^k	35.16±2.32 ^{bc}	33.83±0.01 ^f	88.80±0.39 ^{ab}
SK3	78.79±0.02 ^g	17.26±1.47 ^g	95.36±0.36 ^a	96.74±0.01 ^b	81.78±0.64 ^c
G4	88.07±0.03 ^b	0.39±0.02 ^l	31.93±1.63 ^{cd}	30.99±0.01 ^g	89.28±0.13 ^{ab}
SK4	77.72±0.00 ⁱ	19.84±0.52 ^e	95.71±0.13 ^a	97.48±0.35 ^a	80.88±0.25 ^c
G5	87.95±0.00 ^b	0.36±0.08 ^l	30.62±0.03 ^{cd}	30.41±0.05 ^g	89.06±0.44 ^{ab}
SK5	77.02±0.02 ^{jk}	20.76±0.59 ^c	95.45±0.26 ^a	97.04±0.06 ^{ab}	80.43±0.28 ^c
GS1	86.92±0.06 ^c	0.86±0.39 ^k	32.69±2.03 ^{bcd}	33.87±0.01 ^f	88.90±0.63 ^{ab}
SKS1	76.66±0.05 ^k	21.83±0.37 ^a	95.19±0.92 ^a	96.98±0.07 ^{ab}	80.15±0.11 ^c
GS3	88.15±0.01 ^b	0.18±0.04 ^m	30.24±3.13 ^d	28.42±0.03 ^h	86.58±3.26 ^b
SKS3	76.00±0.04 ^l	21.22±0.01 ^b	94.74±0.79 ^a	95.73±0.02 ^c	80.28±0.01 ^c

Different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

Samples*:

GTI: Sweetened green tea infusion

GTSI: Sweetened green tea and saffron extract added infusion

G1: 24 h fermented green tea kombucha

SK1: 24 h fermented saffron extract added kombucha

G2: 48 h fermented green tea kombucha

SK2: 48 h fermented saffron extract added kombucha

G3: 72 h fermented green tea kombucha

SK3: 72h fermented saffron extract added kombucha

G4: 96 h fermented green tea kombucha

SK4: 96 h fermented saffron extract added kombucha

G5: 120 h fermented green tea kombucha

SK5: 120 h fermented saffron extract added kombucha

GS1: 24 h stored green tea kombucha

SKS1: 24 h stored saffron extract added kombucha

GS3: 72 h stored green tea kombucha

SKS3: 72 h stored saffron extract added kombucha

Total Phenolic Content and Total Antioxidant Capacity

TPC and TAC results of kombucha samples were given in Table 3. The current findings indicated that saffron extract addition to green tea infusion caused a 33% increase of total phenolics. After 24 h fermentation increase of total phenolics in green tea kombucha and saffron extract added kombucha were determined as 37.96% and 20.57%, respectively. However, at the end of the 5 days fermentation, this increment was monitored as 73.51% and 43.85% for green tea kombucha and saffron extract added kombucha,

respectively. The highest total phenolic content was determined in the saffron extract added kombucha sample which was stored at 4 °C for 3 days. Gismondi et al. (2012) determined the total phenolics of Italian saffron as 53.52 ± 1.75 µg GAE/mg dry weight (DW). Their result was higher than that reported by Rikabad et al. (2019) for Iran saffron (48.08 ± 2.25 mg GAE/g DW). Karimi et al. (2010) also reported the total phenolic content of methanolic extract of saffron as 6.5 mg GAE/g DW.

Table 3. Changes of total phenolic content and total antioxidant capacity of kombucha samples

Samples*	Total Phenolic Content (mg GAE** /100 mL tss***)	DPPH (µmol trolox/mL tss)	CUPRAC (µmol trolox/ mL tss)	FRAP (µmol trolox/ mL tss)
GTI	1923.81±89.52 _g	171.94±11.37 _{fg}	285.26±44.41 _h	303.44±70.37 _f
GTSI	2558.72±383.65 _f	196.92±8.22 _{cde}	382.02±51.33 _g	369.78±40.11 _f
G1	2654.05±588.27 _{ef}	189.52±7.43 _{def}	364.86±33.99 _g	386.02±74.43 _f
SK1	3085.03±630.14 _{de}	234.25±4.96 _a	528.88±50.59 _{bcd}	591.81±13.30 _{de}
G2	2960.41±138.36 _{def}	157.76±6.83 _{gh}	478.33±18.75 _{de}	629.85±97.72 _{cde}
SK2	3370.60±585.96 _{abcd}	211.37±24.97 _{bc}	531.09±58.61 _{bcd}	737.69±93.23 _{bc}
G3	3046.30±129.14 _{def}	193.81±6.42 _{cde}	416.52±17.73 _{fg}	718.16±65.42 _{bc}
SK3	3670.80±71.31 _{ab}	227.73±9.94 _{ab}	578.29±15.69 _{ab}	738.51±69.37 _{bc}
G4	3215.50±215.48 _{bcd}	179.87±4.46 _{ef}	462.23±19.79 _{ef}	723.64±44.65 _{bc}
SK4	3727.35±48.55 _a	245.64±12.62 _a	504.86±27.69 _{cde}	867.82±46.92 _a
G5	3338.09±110.99 _{abcd}	202.25±9.66 _{cd}	487.65±10.10 _{cde}	696.78±52.98 _{bcd}
SK5	3680.69±125.72 _{ab}	237.38±3.10 _a	632.12±37.01 _a	740.56±90.37 _{bc}
GS1	3156.19±251.31 _{cde}	207.96±16.27 _{bcd}	545.70±16.47 _{bc}	774.52±27.01 _{ab}
SKS1	3653.24±121.77 _{abc}	188.13±13.92 _{def}	545.51±31.97 _{bc}	575.82±99.50 _e
GS3	3243.80±28.62 _{abcd}	149.01±24.20 _h	490.69±50.49 _{cde}	573.63±90.57 _e
SKS3	3738.19±95.58 _a	200.91±7.68 _{cd}	521.69±25.32 _{bcd}	544.39±30.62 _e

Different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

Samples*:

GTI: Sweetened green tea infusion

GTSI: Sweetened green tea and saffron extract added infusion

G1: 24 h fermented green tea kombucha

SK1: 24 h fermented saffron extract added kombucha

G2: 48 h fermented green tea kombucha

SK2: 48 h fermented saffron extract added kombucha

G3: 72 h fermented green tea kombucha

SK3: 72h fermented saffron extract added kombucha

G4: 96 h fermented green tea kombucha

SK4: 96 h fermented saffron extract added kombucha

G5: 120 h fermented green tea kombucha

SK5: 120 h fermented saffron extract added kombucha

GS1: 24 h stored green tea kombucha

SKS1: 24 h stored saffron extract added kombucha

GS3: 72 h stored green tea kombucha

SKS3: 72 h stored saffron extract added kombucha

** : GAE: gallic acid equivalent, ***:tss: total soluble solids

After 5 days of fermentation, TAC results determined by the DPPH (17.63%), CUPRAC (70.95%) and FRAP (129.63%) assays of green tea kombucha were significantly increased ($P < 0.05$). Saffron extract addition significantly increased TAC determined by all assays. After 120 h fermentation of saffron extract added sample, TAC values (DPPH, CUPRAC and FRAP) were increased as 20.55%, 65.47% and 100.27%, respectively. Finally, at the end of the kombucha fermentation, DPPH (17.37%), CUPRAC (29.63%) and FRAP (6.28%) values of saffron extract added samples were found higher when compared to control. However, after 3 days of storage, except CUPRAC value of green tea kombucha, total antioxidant capacity of the samples reduced. In a previous study, it was also reported that saffron methanol extract solution

exhibited high antioxidant activity (DPPH) above 2000 ppm (Assimopoulou et al., 2005).

Sensory evaluation

Table 4 displayed the sensory evaluation of kombucha samples. In light of colour and appearance, saffron extract added kombucha samples attained higher scores than green tea kombucha. When odour scores of green tea kombucha and saffron extract added kombucha compared, no statistically significant difference were found between each storage day ($P > 0.05$). Sourness scores of both samples fell during storage. Although sweetness score of saffron extract added kombucha was lower than control after 5 days fermentation, it was higher than control during storage. Green tea kombucha samples attained higher scores by panelists in case of overall acceptability.

Table 4. Sensorial properties of kombucha beverages

Samples*	Colour	Odour	Appearance	Sweetness	Sourness	Overall acceptability
G5	8.00±0.70 ^b	7.80±0.44 ^a	8.40±0.54 ^{ab}	9.40±0.89 ^a	8.60±0.54 ^a	8.20±0.44 ^a
SK5	9.40±0.89 ^a	7.40±0.54 ^{ab}	9.00±0.70 ^a	8.20±0.83 ^{bc}	7.20±0.44 ^b	7.40±0.54 ^b
GS1	6.60±0.54 ^c	6.80±0.83 ^{bc}	7.60±0.54 ^{bc}	8.00±0.70 ^{bc}	7.00±0.70 ^b	7.40±0.54 ^b
SKS1	8.80±1.09 ^{ab}	6.40±0.54 ^c	8.60±0.89 ^a	8.40±0.89 ^{ab}	6.00±0.70 ^c	7.00±0.70 ^b
GS3	6.00±0.70 ^c	6.40±0.54 ^c	6.40±0.54 ^d	7.20±0.83 ^c	5.80±0.83 ^c	6.60±0.54 ^c
SKS3	8.80±0.83 ^{ab}	6.20±0.44 ^c	7.40±1.10 ^c	7.40±0.89 ^{bc}	5.20±0.44 ^c	6.40±0.54 ^c

Different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

Samples*:

G5: 120 h fermented green tea kombucha

GTSK5: 120 h fermented saffron extract added kombucha

GS1: 24 h stored green tea kombucha

SKS1: 24 h stored saffron extract added kombucha

GS3: 72 h stored green tea kombucha

SKS3: 72 h stored saffron extract added kombucha

CONCLUSION

Generally, in the view of current results, it can be concluded that kombucha fermentation significantly increased the nutritional and functional characteristics of the beverages. TPC and TAC values of the kombucha beverages raised in comparison to their infusions. The results of several studies reflect the high nutritional value and antioxidant properties of saffron. Considering the health benefits, saffron is a promising ingredient for functional foods, drinks and kombucha analogs.

REFERENCES

- Abuduaibifu, A., Tamer, C.E. (2019). Evaluation of physicochemical and bioaccessibility properties of goji berry kombucha. *J Food Process Preserv*, <https://doi.org/10.1111/jfpp.14077>
- Akbari-Fakhrabadi, M., Najafi, M., Mortazavian, S., Rasouli, M., Memari, A.H., Shidfar, F. (2019). Effect of saffron (*Crocus sativus* L.) and endurance training on mitochondrial biogenesis, endurance capacity, inflammation, antioxidant, and

- metabolic biomarkers in Wistar rats. *J Food Biochem*, 43(8):12946. doi: 10.1111/jfbc.12946.
- Alavizadeh, S.H., Hosseinzadeh, H. (2014). Bioactivity assessment and toxicity of crocin: A comprehensive review. *Food Chem Toxicol*, (64): 65–80.
- Altuğ, T., Elmacı, Y. (2011). *Gıdalarda Dnyusal Değerlendirme*. 2. Baskı. Sidas Medya, İzmir, Türkiye, 134 s. ISBN:978-9944-5660-8-7.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Çelik, S.E. (2008). Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchim Acta*, 160: 413-419.
- Ashrafi, M., Bathaie, S.Z., Abroun, S., Azizian, M. (2015). Effect of crocin on cell cycle regulators in N-nitroso-N-methylurea-induced breast cancer in rats. *DNA Cell Biol*, 34(11): 684–691. <https://doi.org/10.1089/dna.2015.2951>.
- Assimopoulou, A.N., Sinakos, Z., Papageorgiou, V.P. (2005). Radical scavenging activity of *Crocus sativus* L. extract and its bioactive constituents. *Phytother Res*, (19): 997–1000
- Aung, H.H., Wang, C.Z., Ni, M., Fishbein, A., Mehendale, S.R., Xie, J.T., Yuan, C.S. (2007). Crocin from *Crocus sativus* possesses significant anti-proliferation effects on human colorectal cancer cells. *Exp Oncol*, 29(3):175–180.
- Ayed, L., Abid, S.B., Hamdi, M. (2017). Development of a beverage from red grape juice fermented with the kombucha consortium. *Ann Microbiol*, 67:111–121. <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1242-2>
- Azarabadi, N., Özdemir, F. (2018). Determination of crocin content and volatile components in different qualities of Iranian saffron. *GIDA*, 43(3): 476-489.
- Bakker, J., Bridle, P., Timberlake, C.F. (1986). Tristimulus measurements (CIELAB 76) of port wine colour. *Vitis*, 25: 67-78.
- Bathaie, S.Z., Mousavi, S.Z. (2010). New applications and mechanisms of action of saffron and its important ingredients. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 50:761–786.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal Biochem*, 239: 70-76.
- Cemeroğlu, B.S. (2007). Gıda Analizleri. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, No. 34. Bizim Büro Basımevi, Ankara, Türkiye, 535 s. ISBN: 9759857868.
- Ćetković, G.S., Canadanovic-Brunet, J.M., Djilas, S.M., Tumbas, V.T., Markov, S.L., Cvetković, D.D., (2007). Antioxidant potential, lipid peroxidation inhibition and antimicrobial activities of *Satureja montana* L. subsp. *Kitaiabelii* extracts. *Int J Mol Sci*, 8 (10): 1013–1027.
- Cvetković, D. (2008). Kombucha made from medical herbs biological activity and fermentation parameters. Ph.D Thesis, Faculty of Technology, University of Novi Sad, Republic of Serbia.
- Chakravorty S., Bhattacharya, S., Bhattacharya, D., Sarkar, S., Gachhu, R. (2019). Kombucha: a promising functional beverage prepared from tea. In: Non-alcoholic Beverages, Grumezescu, A. M., Volume 6, Woodhead Publishing, pp.285-327.
- Dabbagh Moghaddam, A., Garavand, F., Razavi, S., Talatappe, H.D. (2018). Production of saffron-based probiotic beverage by lactic acid bacteria. *J Food Meas Charact*, 12: 2708-2717. <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9888-z>
- Deghrigue, M., Chriaa, J., Battikh, H., Abid, K., Bakhrouf, A. (2013). Antiproliferative and antimicrobial activities of kombucha tea. *Afr J Microbiol Res*, 7, 3466–3470.
- Essawet, N.A., Cvetković, D., Velićanski, A., Canadanovic-Brunet, J., Vulic, J., Maksimovic, V., Markov, S., (2015). Polyphenols and antioxidant activities of kombucha beverage enriched with coffeeberry extract. *Chem Ind Chem Eng Q*, 21 (3): 399–409.
- Ghasemi, T., Abnous, K., Vahdati, F., Mehri, S., Razavi, B.M., Hosseinzadeh, H. (2015). Antidepressant effect of *Crocus sativus* aqueous extract and its effect on CREB, BDNF and VGF transcript and protein levels in rat hippocampus. *Drug Res (Stuttg)*, 65(7): 337–343. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1371876>

- Gismondi, A., Serio, M., Canuti, L., Canini, A., (2012). Biochemical, antioxidant and antineoplastic properties of Italian Saffron (*Crocus sativus* L.). *Am J Plant Sci*, (3): 1573–1580. <https://doi.org/10.4236/ajps.2012.311190>.
- Goyal, S.N., Arora, S., Sharma, A.K., Joshi, S., Ray, R., Bhatia, J., Kumari, S., Arya, D.S. (2010). Preventive effect of crocin of *Crocus sativus* on hemodynamic, biochemical, histopathological and ultrastructural alterations in isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats. *Phytomedicine*, 17:227–232.
- Granato, D., Calado, V.M.A., Jarvis, B. (2014). Observations on the use of statistical methods in food science and technology. *Food Res Int*, 55:137–149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.024>
- Hosseinzadeh, H., Shamsaie, F., Mehri, S. (2009). Antioxidant activity of aqueous and ethanolic extracts of *Crocus sativus* L. stigma and its bioactive constituents, crocin and safranal. *Pharmacognosy Mag*, 5(20): 419
- Jayabalan, R., Malbasa, R.V., Loncar, E.S., Vitas, J.S., Sathishkumar, M.A., (2014). Review on Kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, (13): 538–550.
- Karimi, E., Oskoueian, R., Hendra, H.Z., Jaafar, E., (2010). Evaluation of *Crocus sativus* L. stigma phenolic and flavonoid compounds and its antioxidant activity. *Molecules*, (15): 6244–6256. <https://doi.org/10.3390/molecules15096244>.
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem*, 94(4): 550-557.
- Marete, E.N., Jacquier, J.C., O’Riordan, D. (2011). Fever few as a source of bioactives for functional foods: storage in model beverages. *J Funct Foods*, (3), 38–43.
- Marsh, A.J., O’Sullivan, O., Hill, C., Ross, R.P., Cotter, P.D., (2014a). Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiol*, (38): 171–178.
- Marsh, A.J., Hill, C., Ross, R.P., Cotter, P.D., (2014b). Fermented beverages with health-promoting potential: past and future perspectives. *Trends Food Sci Tech*, 38(2):113-124.
- Mehri, S., Abnous, K., Mousavi, S.H., Shariaty, V.M., Hosseinzadeh, H. (2012). Neuroprotective effect of crocin on acrylamide-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Cell Mol Neurobiol*, 32(2): 227–235.
- Melnyk, J.P., Massimo, S.W., Marcone, F. (2010). Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: saffron. *Food Res Int*, 43(8): 1981-1989.
- Mousavi, Z.E., Mousavi, M. (2019). The effect of fermentation by *Lactobacillus plantarum* on the physicochemical and functional properties of liquorice root extract. *LWT*, 105: 164-168.
- Negbi, M. (1997). Saffron cultivation: past, present and future prospects. In: M. Negbi (ed.), *Saffron: Crocus sativus* L., Harwood Academic Publishers, Australia, pp. 1-18.
- Paşayeva L., Tekiner, H. (2014). Türk-İslam tıbbında safranın yeri. *Lokman Hekim J*, (3):11-15.
- Rahaiee, S., Moini, S., Hashemi, M., Shojaosadati, S.A. (2015). Evaluation of antioxidant activities of bioactive compounds and various extracts obtained from saffron (*Crocus sativus* L.): a review. *J Food Sci Technol*, (52): 1881–1888 .
- Rikabad, M.M., Pourakbar, L., Moghaddam, S.S., Popović-Djordjević, J. (2019). Agrobiological, chemical and antioxidant properties of saffron (*Crocus sativus* L.) exposed to TiO₂ nanoparticles and ultraviolet-B stress. *Ind Crops Prod*, (137): 137–143.
- Salmerón, I., Thomas, K., Pandiella S.S. (2015). Effect of potentially probiotic lactic acid bacteria on the physicochemical composition and acceptance of fermented cereal beverages. *J Funct Foods*, (15): 106-115.
- Shenoy, C. Lobo, R.O., Dias, F.O. (2019). Kombucha (bio-tea): an elixir for life? In: *Nutrients in Beverages: Volume 12: The Science of Beverages*. Elsevier. pp. 591-616.

- Srihari, T., Arunkumar, R., Arunakaran, J., Satyanarayana, U. Rihari, T., Arunkumar, R., Arunakaran, J., Satyanarayana, U. (2013). Downregulation of signalling molecules involved in angiogenesis of prostate cancer cell line (PC-3) by kombucha (lyophilized). *Biomed Prev Nutr*, 3, 53–58.
- Spanos G.A., Wrolstad, R.E. (1990) Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. *J Agric Food Chem*, 38: 1565–1571. <https://doi.org/10.1021/jf00097a030>
- Serrano-Díaz, J., Sánchez, A.M., Martínez-Tomé, M., Winterhalter, P., Alonso, G.L (2013). A contribution to nutritional studies on *Crocus sativus* flowers and their value as food. *J Food Compos Anal*, (31): 101–108.
- Shahi, T., Assadpour, E., Jafari, S.M. (2016). Main chemical compounds and pharmacological activities of stigmas and tepals of red gold saffron. *Trends Food Sci Technol*, (58): 69-78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.010>
- Termentzi, A., Kokkalou, E. (2008). LC- DAD-MS (ESI+) analysis and antioxidant capacity of *Crocus sativus* petal extracts. *Planta Med*, 74(5);573–581. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1074498>
- Tsimidou, M., Tsatsaroni, E. (1993). Stability of saffron pigments in aqueous extracts. *J Food Sci*, 58:1073-1075.
- Ulusoy, A., Tamer, C.E. (2019). Determination of suitability of black carrot (*Daucus carota* L. spp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) juice concentrate, cherry laurel (*Prunus laurocerasus*), blackthorn (*Prunus spinosa*) and red raspberry (*Rubus idaeus*) for kombucha beverage production. *J Food Meas* *Charact*, 13:1524–1536. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00068-w>.
- Urbani, E., Blasi, F., Simonetti, M.S., Chiesi, C., Cossignani, L. (2016). Investigation on secondary metabolite content and antioxidant activity of commercial saffron powder. *Eur Food Res Technol*, 242: 987–993.
- Velićanski, A.S., Cvetković, D.D., Markov, S.L., Tumbas Šaponjac, V.T., Vulić, J.J., (2014). Antioxidant and antibacterial activity of the beverage obtained by fermentation of sweetened lemon balm (*Melissa officinalis* L.) tea with symbiotic consortium of bacteria and yeasts. *Food Technol Biotechnol*, 52 (4): 420–429.
- Velićanski, A., Cvetković, D., Markov, S. (2013). Characteristics of kombucha fermentation on medicinal herbs from Lamiaceae family. *Rom Biotechnol Lett*, 18(1): 8034–8042.
- Velićanski, A.S., Cvetković, D.D., Markov, S.L., Tumbas, V.T., Savatovic, S.M., (2007). Antimicrobial and antioxidant activity of lemon balm kombucha. *Acta Period Technol*, (38): 165–172.
- Vitali, D., Dragojević, I. V., Šebečić, B. (2009). Effects of incorporation of integral raw materials and dietary fibre on the selected nutritional and functional properties of biscuits. *Food Chem*, 114(4): 1462-1469.
- Watavana, M.I., Jayawardena, N., Waisundara, V.Y. (2018). Value-added tea (*Camellia sinensis*) as a functional food using the Kombucha ‘tea fungus’. *Chang Mai J Sci*, 45(1): 136-146.

BIOGENIC AMINE PRODUCTION IN HISTIDINE DECARBOXYLASE BROTH BY SELECTED LACTIC ACID BACTERIA STRAINS

Hatice Yazgan*

Department of Food Hygiene and Technology, Faculty of Ceyhan Veterinary Medicine, University of Cukurova, Adana, Turkey

Received / Geliş: 23.07.2019; Accepted / Kabul: 29.12.2019 Published online / Online baskı: 15.01.2020

Yazgan, H. (2020). Biogenic amine production in histidine decarboxylase broth by selected lactic acid bacteria strain. GIDA (2020) 45 (1): 31-38 doi: 10.15237/gida.GD19108

Yazgan, H. (2020). Bazı laktik asit bakteri üyelerinin histidin dekarboksilaz sıvısında biyojen amin üretimleri. GIDA (2020) 45 (1): 31-38 doi: 10.15237/gida.GD19108

ABSTRACT

The purpose of the current study was to investigate the biogenic amine production of lactic acid bacteria (LAB) strains (*Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus raffinolactis*, *Pediococcus pentosaceus* and *Leuconostoc mesenteroides*) which in fermented foodstuff. Biogenic amine production of LAB strains was monitored in histidine decarboxylase broth using HPLC method. Significant differences were observed on ammonia (AMN) and biogenic amines accumulation among LAB strains ($p<0.05$). Although *P. acidilactici* produced lesser AMN than other LAB, it was observed that all LAB strains produced high amount of AMN. LAB strains produced all amines in amounts between 1.48 and 1187.50 mg/L. Histamine production by LAB was in range from 17.20 mg/L by *P. acidilactici* to 126.26 mg/L by *Lb. fermentum*. The lowest tyramine concentration was observed by *P. acidilactici* with value of 14.66 mg/L whilst the highest tyramine production was found by *L. raffinolactis* with value of 64.43 mg/L.

Keywords: biogenic amine, lactic acid bacteria, histamine, tyramine

BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİ ÜYELERİNİN HİSTİDİN DEKARBOKSİLAZ SIVISINDA BİYOJEN AMİN ÜRETİMLERİ

ÖZ

Bu çalışmada fermente gıda ürünlerinden izole edilen yedi laktik asit bakteri türünün (*Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus raffinolactis*, *Pediococcus pentosaceus* ve *Leuconostoc mesenteroides*) biyojen amin üretimi araştırılmıştır. LAB üyelerinin, histidin dekarboksilaz sıvısında biyojen amin üretimleri HPLC yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. LAB üyeleri arasında amonyak (AMN) ve biyojen amin üretimi bakımından istatistiksel farklılıklar gözlenmiştir ($p<0.05$). *P. acidilactici* diğer LAB'lardan daha az amonyak üretmesine rağmen bütün LAB suşlarının yüksek miktarda biyojen amin ürettiği gözlenmiştir. LAB suşları bütün aminleri 1.48 ila 1187.50 mg/L arasında çeşitli miktarlarda üretmiştir. En düşük histamin üretimi 17.20 mg/L ile *P. acidilactici* tarafından üretilirken en yüksek histamin üretimi 126.26 mg/L ile *Lb. fermentum* tarafından gerçekleştirilmiştir. En düşük tiramin konsantrasyonu 14.66 mg/L ile *P. acidilactici* bakterisinde belirlenirken en yüksek tiramin üretimi 64.43 mg/L ile *L. raffinolactis* bakterisinde gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: biyojen amin, laktik asit bakterileri, histamin, tiramin

* Corresponding author /Yazışmalardan sorumlu yazar;

✉ hyazgan@cu.edu.tr

☎ (+90)322 613 3507

☎ (+90) 322 613 3507

Hatice Yazgan; ORCID no: 0000-0002-7520-3342

INTRODUCTION

The consumption of foods with high quantities of biogenic amines especially histamine and tyramine can be implicated in various pharmacological reactions or demonstrate toxicological effect on the consumer's health (Spano et al., 2010). Therefore, the formation of biogenic amines such as histamine, cadaverine and putrescine in fish is an important concern for consumers since they are responsible for histamine poisoning and are indicator for spoilage of fish (Jorgensen et al., 2000; Alberto et al., 2002; Kuley et al., 2013). Histamine, tyramine, putrescine, cadaverine, tryptamine, agmatine, spermine and spermidine are the basic biogenic amines found in fish, fish products and fermented foods such as dairy and meat products and beverage such as beer and wine (Visciano et al., 2012).

The interest of the food biotechnology sector and researchers towards lactic acid bacteria has increased recently since LAB have the potential to inhibit disagreeable spoilage and pathogenic bacterial growth and have an important function in reducing biogenic amine formation. However, some species of lactic acid bacteria are able to convert amino acids into amine containing compounds called biogenic amines by means of decarboxylase activity during fermentation processes of different food products such as seafood, meat, dairy products, vegetables and wine (Griswold et al., 2006; Coton et al., 2010; Özogul and Hamed 2018). Therefore, lactic acid bacteria are considered to be the major biogenic amine producer in fermented foods. Certain lactic acid bacteria strains produce histamine due to their capacity to own the histidine decarboxylase gene (Landete et al., 2005; Lucas et al., 2005; Kuley et al., 2013; Gezginc et al., 2013). Tyramine is also the most widely detected biogenic amine in cheese and fermented meat product. LAB strains such as *Enterococcus* and *Lactobacillus* are responsible for the tyramine accumulation in these products. In particular, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, and *Enterococcus durans* are regarded as main tyramine-producer (Russo et al., 2010). Some LAB strains e.g. *Lactobacillus fermentum*, and *Lactobacillus paracasei* isolated from meat, cheese and sausage are able to accumulate

putrescine (Wunderlichova et al., 2014; Özogul and Hamed, 2018). Several LAB strains are commonly used as starter culture in fermented food products. They are used in foodstuff because of their inhibitory constituents against fish spoilage and food borne pathogen bacteria (Galvez et al., 2010).

Biogenic amine accumulations have been reported in seafood products such as fish salads, cold-smoked fish, fish paste and fish sauce (Leuschner and Hammes, 1999; Petaja et al., 2000; Yongsawatdigul et al., 2004; Jorgensen et al., 2000; Gonzalez-Rodriguez et al., 2002; Thapa et al., 2006; Udomsil et al., 2010; Zhong-Yi et al., 2010). Lorencova et al., (2012) reported that most of the tested LAB isolated from dairy products and beer demonstrated decarboxylase activity. Thus, it is important to determine biogenic amine producing LAB strains in these product due to providing food safety. The purpose of the current study was to investigate the biogenic amine production potential of selected LAB possess of bioprotective properties in fermented foodstuff.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains

The lactic acid bacteria used in this research were *Lb. pentosus*, *Lb. plantarum*, *P. acidilactici*, *Lb. paraplantarum*, *Lb. fermentum*, *L. raffinolactis*, *P. pentosaceus* and *Leu. mesenteroides* that were isolated from various fermented foods commercially available in market. In our previous (unpublished) study, the LAB strains were identified using biochemical (API 50 CHL) and molecular tests (polymerase chain reaction; PCR). The food sources for isolation of lactic acid bacteria were as follow; *Lb. pentosus* and *Lb. plantarum* from marinated and smoked fish, *P. acidilactici* and *Leu. mesenteroides* from Turkish traditional cheese, *Lb. paraplantarum* from butter, *Lb. fermentum* from smoked salmon, *L. raffinolactis* and *P. pentosaceus* from kefir.

Culture Media and Bacterial Extraction for Biogenic Amine Analysis

Histidine decarboxylase broth (HDB) proposed by Klausen and Huss (1987) was used to monitor biogenic amine production of *Lactobacillus* strains.

HDB was prepared using 1 g peptone, 0.5 g Lab-Lemco powder (Oxoid CM0017, Hampshire, England), 2.5 g NaCl (Merck 1.06404.1000, Darmstadt, Germany), 4.01 g L-histidine HCl (Sigma H8125, Steinheim, Germany) and 2.5 mg pyridoxal-HCl (Sigma P9130, Steinheim, Germany) in 500 mL distilled water. The pH (5.5-6.8) were adjusted according to their optimum growth pH 1 KOH (Riedel-deHaen 06005, Seelze, Germany) or 6% TCA (Riedel-deHaen 27242, Seelze, Germany). HDB was pipetted in 10 mL microbiologic tube and then autoclaved at 121 °C in 15 min prior to use. After propagation of *Lactobacillus* strains, 0.5 mL of bacterial cultures ($\sim 10^8$ cfu/mL) was removed and put into 10 mL of HDB. Samples were incubated at 30 °C for 72h. Extraction process and derivatization of biogenic amines were performed according to the method of Kuley and Ozogul (2011). For the extraction, 5 mL of the HDB including LAB strain was removed to separate microbiologic tube and then 2 mL of sulphosalicylic acid was added. They were centrifuged at 3000 g for 10 min and then filtered through a filter paper (Whatman GmbH, Dassel, Germany). Afterwards, 4 mL of bacterial supernatant was taken to derive from each of LAB strains.

Preparation of Standard Amine Solutions for HPLC Analysis

The biogenic amine standards used in current study were purchased from Sigma Alderich (Munich, Germany). The mobile phase consisting of acetonitrile and HPLC grade water were also used for amine analysis. Ammonia chloride (296.9 mg), putrescine dihydrochloride (182.9 mg), cadaverine dihydrochloride (171.4 mg), spermidine trihydrochloride (175.3 mg), Tryptamine hydrochloride (122.8 mg), 2-phenylethylamine hydrochloride (130.1 mg), spermine tetrahydrochloride (172.0 mg), 5-hydroxytryptamine (serotonin) (133.9 mg), trimethylamine hydrochloride (161.7 mg), 3-hydroxytyramine hydrochloride (dopamine) (123.8 mg), agmatine sulphate (175.4 mg), tyramine hydrochloride (126.7 mg), and histamine dihydrochloride (165.7 mg) were dissolved in 10 mL HPLC grade water.

Derivatization Procedure

To increase the reaction with amines, a stock solution was prepared by dissolving 2% benzoyl chloride in acetonitrile. Briefly, 100 μ L was taken (4 mL for extracted bacterial culture) from each free base standard solution (Sigma Alderich, Munich, Germany) at 10 mg/mL to derive the standard amine solution and mixed with 1 mL sodium hydroxide (2 M). After that 1 mL of 2% benzoyl chloride (dissolved in acetonitrile) was added and the solution was stirred in a vortex shaker for 1 min. The reaction mixture was left at ambient temperature to reacted for 5 min and then centrifuged for 10 min. Afterwards, the benzoylation was stopped by adding 2 mL of saturated sodium chloride solution and the solution extracted twice with 2 mL diethyl ether. The upper organic layer was transferred into a clean tube after mixing. Then, the organic layer was evaporated to dryness in stream of pure nitrogen (99.9%, Linde Gas, Adana, Turkey). The residue was dissolved in 1 mL of acetonitrile, and 5 μ L aliquots were injected into the HPLC.

Analytical Method

The confirmation of biogenic amine production was carried out using a rapid HPLC method (Özogul, 2004) with a reversed-phase column by using a gradient elution program. For ammonia and trimethylamine (TMA) analysis, same analytic method was conducted.

Statistical Analysis

To find the average value and standard deviation, the data obtained from the three samples for each treatment was used. The significance of differences ($P < 0.05$) was determined using Duncan's multiple comparison test with SPSS version 19.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULT AND DISCUSSION

Ammonia and biogenic amine production by selected LAB isolates in HDB were presented in Table 1. Significant differences were observed on ammonia (AMN) and biogenic amines accumulation among LAB strains ($p < 0.05$). Although *P. acidilactici* produced lesser AMN than other LAB strains, it was observed that all LAB

strains produced high amount of AMN (Table 1). On the other hand, AMN production of LAB strains including *P. pentosaceus*, *Lb. fermentum*, *Lb. paraplantarum*, *Lb. pentosus* and *Lb. plantarum* were found to be statistically similar. Similar results were also obtained by Özoğul et al. (2012) who reported that LAB strains of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lb. plantarum* and *Streptococcus thermophilus* produced high amount of AMN in arginine decarboxylase

broth at level of 2554.86, 2349.01, 1872 and 1079 mg/L. In other study conducted by Arena et al. (1999), AMN production by *Lb. plantarum* N8 and N4 strains in arginine decarboxylase broth was reported to be over 1070 mg/L. In the current study, putrescine production of LAB strains except for *Lb. fermentum* and *Lb. paraplantarum* were detected low concentration in range of 17.80-96.24 mg/L.

Table 1. Ammonia and biogenic amines production (mg/L) of selected LAB strains in histidine decarboxylase broth (HDB)

Ammonia and Biogen Amines	Lactic Acid Bacteria							
	<i>P. pentosaceus</i>	<i>Leu. mesenteroides</i>	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. paraplantarum</i>	<i>Lb. pentosus</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>P. acidilactici</i>	<i>L. raffinolactis</i>
AMN	2413.8 ^{ax} (235.32) ^y	2067.76 ^{bx} (129.20) ^y	2358.86 ^{ax} (32.27) ^y	2355.26 ^{ax} (21.97) ^y	2376.18 ^{ax} (151.91) ^y	2166.46 ^{abx} (7.77) ^y	1490.12 ^{ex} (29.81) ^y	2008.16 ^{bx} (10.57) ^y
PUT	63.06 ^d (4.10)	20.40 ^f (0.56)	887.04 ^a (18.57)	801.46 ^b (12.36)	96.24 ^c (5.65)	43.76 ^c (2.26)	17.80 ^f (0.79)	21.46 ^f (0.70)
CAD	183.9 ^c (6.64)	128.10 ^d (1.72)	131.18 ^d (8.73)	1187.50 ^a (0.31)	931.24 ^b (35.18)	105.34 ^{de} (4.94)	89.82 ^c (3.87)	206.04 ^c (7.58)
SPD	136.46 ^b (5.06)	20.68 ^e (0.96)	220.22 ^a (7.38)	133.82 ^b (1.44)	97.28 ^c (3.84)	136.22 ^b (5.79)	36.62 ^d (2.29)	30.00 ^{de} (1.41)
TRP	34.9 ^c (1.72)	0.00 ^f	264.70 ^a (10.77)	98.44 ^b (43.33)	17.10 ^d (1.66)	4.94 ^c (1.32)	3.90 ^e (0.28)	0.00 ^f
PHEN	140.86 ^c (2.96)	92.28 ^e (1.81)	167.40 ^b (4.24)	0.00 ^g	145.72 ^c (3.39)	78.72 ^f (2.09)	237.02 ^a (1.83)	123.48 ^d (0.19)
SPN	0.00 ^d	0.00 ^d	0.00 ^d	56.62 ^b (0.02)	0.00 ^d	119.76 ^a (1.52)	43.20 ^c (1.97)	0.00 ^d
SER	140.48 ^d (1.13)	36.80 ^g (0.84)	348.42 ^c (1.66)	401.80 ^b (2.37)	414.90 ^a (1.41)	45.28 ^e (1.69)	35.94 ^g (2.40)	41.02 ^f (1.21)
TMA	75.85 ^c (0.07)	125.80 ^b (9.67)	207.68 ^a (10.86)	0.00 ^g	46.60 ^d (1.35)	11.18 ^{ef} (0.19)	1.48 ^f (0.04)	21.48 ^e (0.73)
DOP	312.32 ^b (0.22)	85.62 ^d (1.66)	85.96 ^d (3.90)	19.98 ^f (1.44)	86.68 ^d (2.54)	321.26 ^a (2.40)	78.86 ^e (2.06)	244.32 ^c (0.96)
AGM	234.90 ^a (12.30)	104.40 ^b (1.24)	10.86 ^f (0.84)	27.62 ^e (0.70)	42.98 ^d (2.51)	55.26 ^c (0.65)	21.56 ^e (0.79)	4.46 ^f (0.14)

Explanation; AMN, ammonia; PUT, putrescine; CAD, cadaverine; SPD, spermidine; TRP, tryptamine; PHEN, 2-Phenyl-ethylamine; SPN, spermine; SER, serotonin; TMA, trimethylamine; DOP, Dopamine. AGM, agmatine. x: Values represents mean, y: Values mean standard deviation. The same superscript (a-f) in the same row was not significantly different ($P>0.05$)

Cadaverine were also produced in various amounts by the tested all of the LAB strains. However, the highest cadaverine formation were observed with values 931.24 and 1187.50 mg/L by *Lb. pentosus* and *Lb. paraplantarum* respectively. Spermidine, tryptamine, 2-phenyl-ethylamine,

spermine, serotonin, dopamine, agmatine were also produced all LAB strains in various amounts ranging from 1.48 to 414 mg/L. However, spermine was not produced by *P. pentosaceus*, *Leu. mesenteroides*, *Lb. fermentum*, *Lb. pentosus*, *L. raffinolactis*. In addition, tryptamine was not

produced by *Leu. mesenteroides* and *L. raffinolactis* (Table 1). Özogul (2011) found that in HDB, three LAB strains containing *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (MG 1363), *Lactococcus lactis* subsp. *lactic* (IL1403), *Lactobacillus plantarum* (FI8595) strains produced putrescine, spermidine, 2-phenyl-ethylamine, dopamine, agmatine, tyramine, trimethylamine (TMA), tryptamine and serotonin. Similarly, in the present study 2-phenylethylamine and TMA were not produced by *Lb. paraplantarum*. It has been reported that *Leu. mesenteroides*, *Lb. brevis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *P. pentosaceus* isolated from fermented Uzicka sausage displayed very low concentration of biogenic amines production in vitro. Histamine, spermine and tyramine formation were observed with values 12.76-20.42 µg/mL, 5.54-14.93 µg/mL and 16.39-21.92 µg/mL by various isolates of *Leu. mesenteroides*. *Lb. brevis* produced histamine and tyramine up to 12.45 and 15.10 µg/mL (Moracanin et al., 2015). Buňková et al., (2009) demonstrated that LAB strains containing *Lc. Lactis* subsp. *cremoris*, *Strep. thermophilus* and *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* produced tyramine but did not produce other biogenic amines such as histamine, putrescine, cadaverine, agmatine,

spermidine and spermine, which is in no agreement with this study since all LAB used in the present study produced these biogenic amines. In another research conducted by Thapa et al., (2006), it was reported that none of strains of *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *lactic*, *Lb. plantarum*, *Leu. mesenteroides* and *P. pentosaceus* isolated from traditionally processed fish products produced biogenic amines.

In this research, low amount of histamine production was detected in all of monitored LAB bacteria. Histamine production by LAB strains were the lowest by *P. acidilactici* (17.20 mg/L) and the highest by *Lb. fermentum* (126.26 mg/L). *P. acidilactici* and *Leu. mesenteroides* produced histamine at very low concentration with value of 17.20 and 47.8 mg/L (Figure 1.). Gezginc et al. (2013) found that most of 58 isolates of *Streptococcus thermophilus* isolated from home-made natural yogurt formed low amounts of histamine (1–50 mg/L) from histidine amino acids. Histamine production by *Lb. plantarum* strains grown in MRS broth supplemented with L-histidine monohydrochloride was also reported as below the 250 mg/L by Alan et al. (2018).

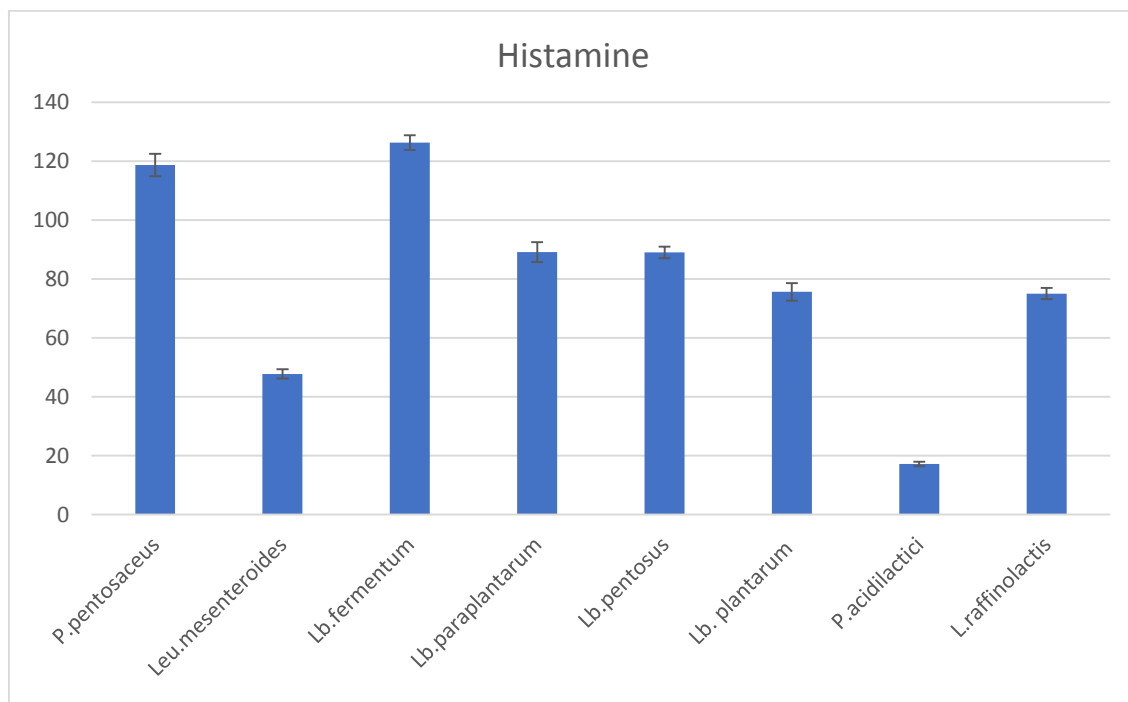


Figure.1 Histamine production of LAB strains in histidine decarboxylase broth.

All LAB strains produced not only histamine but also produce tyramine in HDB. Tyramine production by LAB strains were range from 14.66 to 64.43 mg/L. The lowest concentration of tyramine was produced by *P. acidilactici* with value of 14.66 mg/L whilst the highest concentration of that was produced by *L. raffinolactis* with value of 64.43 mg/L (Figure 2). *P. acidilactici* produced particularly low quantities both histamine (17.20 mg/L) and tyramine (14.66 mg/L). Forty-seven isolates of *S. thermophilus* from home-made natural yogurt were reported to produce tyramine at low concentration (1-100 mg/mL), while the other ten isolates were reported to produce tyramine at

medium concentration (101-500 mg/mL). Furthermore, most of the *S. thermophilus* isolates were reported to produce low amount of histamine (1-50 mg/mL) (Gezginc et al., 2013). It has been also reported that *Lactobacillus casei* (isolated from different fermented food products) produced high quantities of histamine (1820.9 mg/L) and tyramine (5486.99 mg/L) in MRS broth enrichment with histidine and tyrosine amino acids while *Lactobacillus delbrueckii* (isolated from different fermented food products) produced only histamine (459.1 mg/L) in MRS broth enrichment with histidine (Deepika Priyadarshani et al., 2011).

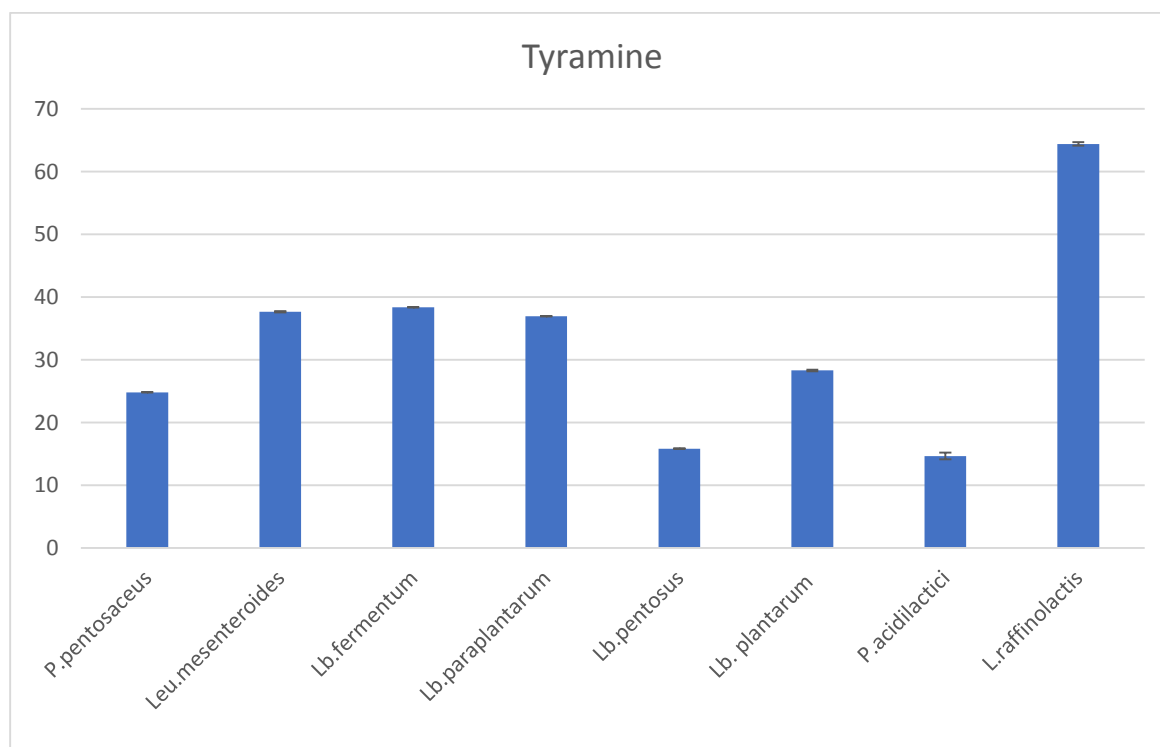


Figure 2. Tyramine production of LAB strains in histidine decarboxylase broth

CONCLUSION

The results of current study demonstrated that all LAB strains tested had the capability to produce twelve biogenic amines mainly cadaverine, serotonin, dopamine, agmatine and spermidine in HDB. They formed histamine and tyramine at low concentrations, which are the most important amines for human health. Our results emphasize the potential use of LAB as a bio-protective agent in the food industry. Further research should be

done to understand their exact antimicrobial mechanism in food system.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by Cukurova University for Department of Scientific Research Projects (TSA-2018-11188). The author thanks the Department of Scientific Research Projects at Cukurova University for supporting this research.

REFERENCES

- Alan, Y., Topalcengiz, Z., Diğrak, M. (2018). Biogenic amine and fermentation metabolite production assessments of *Lactobacillus plantarum* isolates for naturally fermented pickles. *Food sci Technol*, 98, 322-328.
- Alberto, M.R., Arena, M.E., Manca, D.E., Nadra, M.C. (2002) A comparative survey of two analytical methods for identification and quantification of biogenic amines. *Food Control*, 13:125- 129.
- Arena, M.E., Saguir, F.M., Manca D.E., Nadra, M.C. (1999) Arginine dihydrolase pathway in *Lactobacillus plantarum* from orange. *Int J Food Microbiol*, 47, 203-209.
- Bunkova, L., Bunka, F., Hlobilova, M., Vanatkova, Z., Novakova, D., Drab, V. (2009). Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *Eur Food Res Tech*, 229:533–538.
- Coton, M., Romano, A., Spano, G., Ziegler, K., Vetrana, C., Desmarais, C., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., Coton, E. (2010). Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food Microbiol*, 27:1078–1085.
- Deepika Priyadarshani, W. M., Rakshit, S. K. (2011). Screening selected strains of probiotic lactic acid bacteria for their ability to produce biogenic amines (histamine and tyramine). *Int J Food Sci Technol*, 46(10), 2062-2069.
- Galvez, A., Abriouel, H., Benomar, N., Lucas, R. (2010). Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. *Curr. Opin. Biotechnol*, 21:142–148.
- Gezginc, Y., Akyol, I., Kuley, E., Özogul, F. (2013). Biogenic amines formation in *Streptococcus thermophilus* isolated from home-made natural yogurt. *Food Chem*, 138(1), 655-662.
- Gonzalez-Rodriguez, M.N., Sanz, J., Santos, J.Á., Otero, A., Garcia-Lopez, M.L. (2002) Numbers and types of microorganisms in vacuum-packed cold-smoked freshwater fish at the retail level. *Int J Food Microbiol*, 77:161-168.
- Griswold, A.R., Jameson-Lee, M., Burne, R.A. (2006) Regulation and physiologic significance of the agmatine deiminase system of *Streptococcus mutans* UA159. *J Bacteriol*, 188:834–841.
- Jorgensen, L.V., Huss, H.H., Dalgaard, P. (2000) The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon. *J Appl Microbiol*, 89:920-934.
- Klausen, N.K., Huss, H.H. (1987) A rapid method for detection of histamine-producing bacteria. *Int J Food Microbiol*, 5:137–146.
- Kuley, E., Özogul, F. (2011). Synergistic and antagonistic effect of lactic acid bacteria on tyramine production by food-borne pathogenic bacteria in tyrosine decarboxylase broth. *Food Chem*, 127:1163–1168.
- Küley, E., Özogul, F., Balikçi, E., Durmus, M., Ayas, D. (2013). The influences of fish infusion broth on the biogenic amines formation by lactic acid bacteria. *Braz J Microbiol*, 44(2):407-415.
- Landete, J.M., Ferrer, S., Pardo, I. (2005) Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine. *J Appl Microbiol* 99:580-586.
- Leuschner, R.G., Hammes, W.P. (1999) Formation of biogenic amine in mayonnaise, herring and tuna fish salad by lactobacilli. *Int J Food Sci Nutr* 50:159-64.
- Lorencová, E., Buňková, L., Matoulková, D., Dráb, V., Pleva, P., Kubáň, V., Buňka, F. (2012). Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer. *Int J Food Sci Technol*, 47(10):2086-2091.
- Lucas, P.M., Wolken, W.A., Claisse, O., Lolkema, J.S., Lonvaud-Funel, A. (2005) Histamine-producing pathway encoded on an unstable plasmid in *Lactobacillus hilgardii* 0006. *Appl Environ Microbiol*, 71:1417-1424.
- Moracanin, S. V., Stefanovic, S., Radicevic, T., Borovic, B., Djukic, D. (2015). Production of biogenic amines by lactic acid bacteria isolated from Uzicka sausages. *Procedia Food Sci*, 5:308-311.
- Özogul, F. (2004). Production of biogenic amines by *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* and *Hafnia alvei* using a rapid HPLC method. *Eur Food Res Technol*, 219:465–469.

- Özogul, F. (2011). Effects of specific lactic acid bacteria species on biogenic amine production by foodborne pathogen. *Int J Food Sci Tech*, 46(3), 478-484.
- Özogul, F., Hamed, I. (2018). The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amines formation: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 58(10):1660-1670.
- Özoğul, F., Kuley, E., ÖZOĞUL, Y., ÖZOĞUL, İ. (2012). The function of lactic acid bacteria on biogenic amines production by food-borne pathogens in arginine decarboxylase broth. *Food Sci Technol Res*, 18(6):795-804.
- Petaja, E., Eerola, S., Petaja, P. (2000) Biogenic amines in cold smoked fish fermented with lactic acid bacteria. *Eur Food Res Technol*, 210:280-285.
- Russo, P., Spano, G., Arena, M. P., Capozzi, V., Fiocco, D., Grieco, F., Beneduce, L. (2010). Are consumers aware of the risks related to biogenic amines in food. *Curr. Res. Technol. Edu. Top Appl Microbiol Microb Biotechnol*. 1087–1095.
- Spano, G., Russo, P., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., Alexandre, H., Grandvalet, C., Rattray, F. (2010). Biogenic amines in fermented foods. *Eur J Clin Nutr*, 64(S3), S95.
- Thapa, N., Pal, J., Tamang, J.P. (2006) Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas. *Int J Food Microbiol* 107:33-38.
- Udomsil, N., Rodtong, S., Tanasupawat, S., Yongsawatdigul, J. (2010) Proteinase-producing halophilic lactic acid bacteria isolated from fish sauce fermentation and their ability to produce volatile compounds. *Int J Food Microbiol*, 141:186-194.
- Visciano, P., Schirone, M., Tofalo, R., Suzzi, G. (2012). Biogenic amines in raw and processed seafood. *Front Microbiol*, 3:1–10.
- Wunderlichov_a, L., Bu_nkov_a, L., Koutn_y, M., Jan_cov_a, P. and Bu_nka, F. (2014) Formation, degradation, and detoxification of putrescine by foodborne bacteria: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf*, 13:1012–1030.
- Yongsawatdigul, J., Choi, Y.J., Udornporn, S., (2004) Biogenic amines formation in fish sauce prepared from fresh and temperature abused Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). *J Food Sci*, 69:312-319.
- Zhong-Yi, L., Zhong-Hai, L., Miao-Ling, Z., Xiao-Ping, D., (2010) Effect of fermentation with mixed starter cultures on biogenic amines in bighead carp surimi. *Int J Food Sci Technol* 45:930-936.

SPRAY DRYING OF DE-OILED SUNFLOWER PROTEIN EXTRACTS: FUNCTIONAL PROPERTIES AND CHARACTERIZATION OF THE POWDER

Ertan Ermis*, Erva Nur Karasu

Istanbul Sabahattin Zaim University, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Food Engineering
Department, Istanbul, Turkey

Received /Geliş: 21.06.2019; Accepted / Kabul: 09.12.2019; Published online /Online baskı: 17.01.2020

Ermis, E., Karasu, E.N.. (2020). *Spray drying of de-oiled sunflower protein extracts: functional properties and characterization of the powder. GIDA (2020) 45 (1): 39-49 doi: 10.15237/gida.GD19096*

Ermis, E., Karasu, E.N.. (2020). Spray drying of de-oiled sunflower protein extracts: functional properties and characterization of the powder. *GIDA (2020) 45 (1): 39-49 doi: 10.15237/gida.GD19096*

ABSTRACT

The proteins were extracted from de-oiled sunflower seed cake and protein powder was produced using a pilot-scale spray dryer. Mild-acidic protein extraction and co-extraction of phenolic compounds were employed in order to obtain protein extracts. A pilot-scale spray dryer was used to convert protein extracts into protein powder. Micro-spherical particles were obtained having irregular surface properties. The protein powders showed poor flow behaviour having hausner ratio and angle of repose values around 1,58 and 49°, respectively. They showed poor solubility, sufficient emulsifying and oil-binding capacity. Despite their poor solubility, they had moderate wettability. The denaturation temperature of sunflower protein powder was found around 80 °C from DSC thermogram. FTIR spectrum was found to be very similar to those of soy protein and milk protein extract powders reported previously.

Keywords: sunflower protein, protein powder, de-oiled sunflower meal, spray dryer, powder properties

PÜSKÜRTMELİ KURUTUCU İLE YAĞI ALINMIŞ AYÇİÇEĞİ PROTEİN EKSTRAKTİ TOZU ÜRETİMİ: FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİ VE TOZ KARAKTERİZASYONU

ÖZ

Bu çalışmada yağı alınmış ayçiçeği çekirdeği küspesinden protein fraksiyonu ekstrakte edilerek pilot ölçekli püskürtmeli kurutucu kullanılarak protein tozu üretilmiştir. Protein ekstraktlarını elde etmek için asidik protein ekstraksiyonu kullanılmıştır. Protein ekstraktı çözeltisini protein tozuna dönüştürmek için pilot ölçekli püskürtmeli kurutucu kullanılmıştır. Elde edilen protein tozunda düzensiz yüzey özelliklerine sahip mikro küresel parçacıklar gözlemlenmiştir. Protein tozlarının, sırasıyla yaklaşık olarak 1.58 ve 49 ° Hausner oranına ve duruş açısına sahip oldukları ve zayıf akış davranışı gösterdikleri tespit edilmiştir. Protein tozları zayıf çözünürlük, orta seviyede emülsifiye etme ve yağ bağlama kapasitesi göstermişlerdir. Zayıf çözünürlüklerine rağmen, orta derecede ıslanabilirlik özelliklerine sahip oldukları anlaşılmıştır. Ayçiçeği proteini tozunun denatürasyon sıcaklığı, DSC termogramında yaklaşık 80 °C olarak belirlenmiştir. FTIR spektrumunun, daha önce bildirilen soya proteini ve süt proteini ekstraktı tozlarına çok benzer olduğu bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: ayçiçeği proteini, protein tozu, yağsız ayçiçeği küspesi, püskürtmeli kurutucu, toz özellikleri

* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar;

✉ ertan.ermis@gmail.com ,

☎ (+90) 212 692 9722,

☎ (+90) 212 693 8229

Ertan Ermis; ORCID no: 0000-0002-1461-7357

Erva Nur Karasu; ORCID no: 0000-0001-5861-3086

INTRODUCTION

There has been an increase in demand to plant proteins due to the growing population, changing consumer preferences and increasing awareness of their importance for health and nutrition (Amagliani et al., 2016; Egerton et al., 2018). Soy and dairy are the main sources of proteins used in food industry even though proteins derived from wheat, rice, corn, pea, canola and potato are also commercially available. However, food processing by-products may have significant amount of proteins which could be utilized by food industry due to their nutritional, functional and technological properties (Pickardt et al., 2015). After extracting oil from sunflower seeds, the remaining part is called as cake or meal which are rich in proteins (Ivanova et al., 2012). Due to low amounts of antinutritive compounds and no toxic substances found in these raw materials, they can be counted as promising sources for food proteins (González-Pérez and Vereijken, 2007).

Sunflower seeds may contain from 1 to 4% phenolic compounds (Weisz et al., 2009). The phenolic compounds present in sunflower press-cakes were reported to be responsible for the dark colour, bitter taste and astringency (González-Pérez and Vereijken, 2007; Pickardt et al., 2015). For these attributes, the press-cakes have been used as low-value animal feed to date (Ivanova et al., 2012). Sunflower proteins were reported as comparable to soy and other leguminous proteins in terms of functional properties and nutritive value except low lysine content (González-Pérez and Vereijken, 2007). Therefore, removing the phenolic substances from protein extracts from de-oiled sunflower press cakes would result in high quality protein ingredient for the food industry. The technological functional properties (i.e. emulsifying capacity, solubility, oil binding capacity) of sunflower proteins need to be evaluated in order to better understand their potential use in food applications and therefore those properties need to be determined (Romero et al., 2012).

Proteins are usually produced in powder form at industrial scale to increase the shelf life and to

preserve the nutritional, organoleptic and physicochemical properties and spray drying has been a widely used method for the production of protein powders due to its low cost and availability in industrial production (Amagliani et al., 2016; Khanji et al., 2018; Torres et al., 2017). The behaviour of food powders such as flowability is affected by several factors such as temperature, humidity, particle-particle interactions, particle properties, and bulk properties of powders (Fitzpatrick et al., 2004). It is crucial to understand, predict and control the behaviour of powder material to improve the effectiveness of the processes like storage, discharge, mixing, rehydration etc. Even though some of the functional characteristics have been studied, no information has been found in literature about particle and powder properties of sunflower seed cake protein powders.

This study aimed to determine the feasibility of producing protein powder from de-oiled sunflower seed cake using a selected isolation method and a pilot scale spray dryer unit. Some of the physicochemical, functional, particle and powder properties of the extracted protein isolates were investigated in order to elucidate their suitability to be used in food processing.

MATERIALS AND METHODS

Materials

De-oiled sunflower seed cakes were obtained from a local oil manufacturing company (Trakya Birlik, Edirne, Turkey). The cakes were in dry and ground form (a mix of fine and coarse particles) containing husks. The cakes were sieved using laboratory-scale sieve shaker (AS200, Retsch, Germany) and the size fractions below 500 µm were used in protein extraction process. Salt was purchased from a local market. The chemicals were obtained from Sigma Aldrich (Taufkirchen, Germany). The miracloth filter (Calbiochem, 22-25 µm pore size) was purchased from Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and Styrene-divinylbenzene Copolymer resin (18-100 mesh size) was purchased from Sigma Aldrich (Taufkirchen, Germany).

Methods

Protein extraction and spray drying

The method given by Pickardt et al. (2015) has been used with some little modifications to extract proteins. For this purpose, the de-oiled cakes were soaked in salt (table salt) solution containing approximately 2% salt. One kg of cake was added to 9 L of salt solution (cake to water ratio was 1:9). The pH of the slurry was adjusted to 6 by using HCl or NaOH solutions and kept at room temperature (21 ± 2 °C) for one hour while stirring at 150 rpm. The liquid part containing proteins were separated from precipitated part by centrifugation (INO HT, Inovia, Istanbul, Turkey). To remove the phenolic compounds, Styrene-divinylbenzene resin was added to the solution (around 50 g per L) and kept at room temperature for 4 hours while stirring at 150 rpm. The resins with phenolics adsorbed were removed by filtering through a miracloth filter. The solution was kept at 4-6 °C until conducting the protein recovery procedure.

HCl solution was added to the protein solution until the pH decreased to 4.0 to precipitate proteins. Precipitated proteins were separated by using a centrifuge (3300 g for 10 min) and the separated proteins were washed twice by using distilled water. The washed protein mass was mixed with deionized water at a ratio of 1:8 and the mixture was homogenized using a homogenizer (WiseTis HG-15A, witeg Labortechnik GmbH, Wertheim, Germany) and neutralized to pH 7.0 by adding NaOH solution. The homogenized and neutralized protein solution was spray-dried using a pilot-scale spray drying unit (Toption Instruments, TP-S100, China) equipped with a disc atomizer. The spray dryer was operated at an inlet temperature of 175 ± 5 °C and outlet temperature of 80 ± 4 °C. Atmospheric air was used as the drying gas at a flow rate of 290 kg/h. The flow rate of the protein solution was set to 2 L/h (34 mL/min).

Proximate analysis

Ash, moisture and dry matter contents were determined using AOAC 942.05 and 925.10 standard methods, respectively. The protein and lipid contents were determined based on total N

content by Kjeldahl method (981.10) and Soxhlet method (920.39), respectively (AOAC, 2000).

Particle morphology by SEM imaging

For investigation of microstructure and surface properties of the particles, scanning electron microscopy experiments (Philips ESEM XL30 FEG, Netherlands) were performed. Before coating with gold (to avoid the charge buildup under the electron beam), particles were mounted onto a adhesive tape on a stub. The images of the particles were captured at different magnifications (100x to 10000x).

Determination of Angle of repose and Hausner Ratio values

For evaluation of the flowability of sunflower seed cake protein powder (SPP), angle of repose (Fraczek et al., 2007) and Hausner Ratio (HR) values were determined. To determine the angle of repose, a steel funnel was used. It was positioned on a stand and placed at a height of 10 cm over the flat surface of a counter. 5 gram of SPP sample was poured into the funnel to let it flow by gravity to form a heap on the counter surface. An image of cross section of the heap was captured (Figure 1) and the angle of the triangular base was measured using an image analysis software (Image J, open Java source code). The Hausner Ratio (HR) (Eq. 3) was calculated from the bulk (ρ_b) and tapped density (ρ_t) values (Hausner, 1967). The flow behaviour of SPP was evaluated based on the data given in Table 1 (Ermis et al., 2018).

$$HR = \rho_t / \rho_b \tag{1}$$

Table 1. Evaluation of flowability of powders

Hausner Ratio	Angle of repose	Flowability
1.00-1.11	<25 °	Excellent
1.12-1.18	25-30°	Good
1.19-1.25	30-38°	Satisfactory
1.26-1.34	38-45°	Poor
1.35-1.45	45-55°	Very poor
1.46-1.59	>55°	Cohesive

Source: (Ermis et al., 2018)

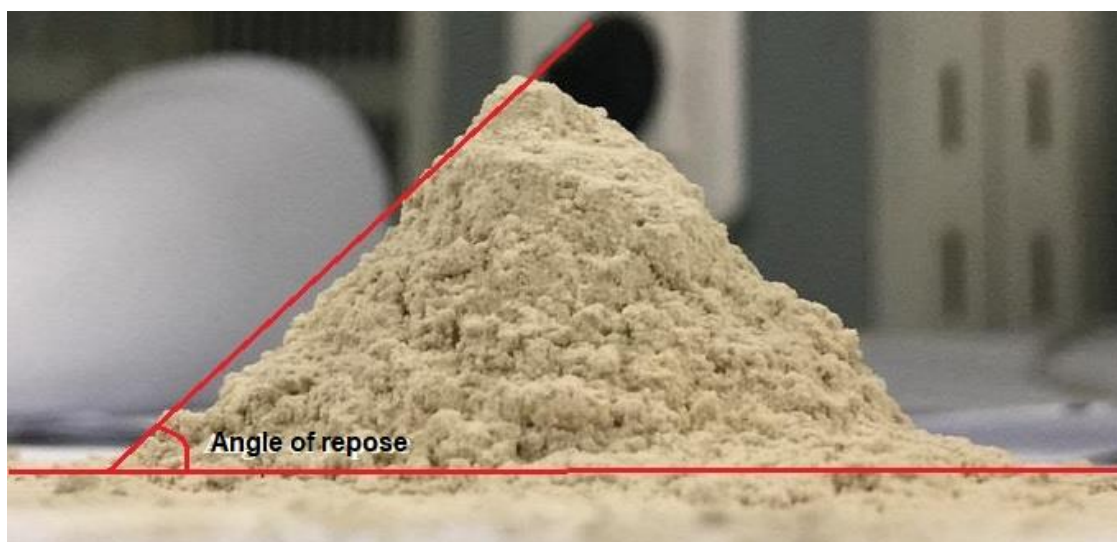


Figure 1. Angle of repose profile of SPP

Determination of the emulsifying properties

The methods given by previous researchers (Sila et al., 2014; Zhang and Zhao, 2013) were used to determine emulsion stability index (ESI) and emulsion activity index (EAI) with slight modifications. One gram of SPP sample was dissolved in distilled water (10 mL) to final concentration of 10% (w/v). SPP solution was mixed with 5 mL of olive oil and homogenized for one min at room temperature. 50 μ L of the emulsion was taken immediately after the homogenization and 10 min after. The aliquots were diluted with 0.1% SDS solution (w/v) at a ratio of 1:100 and mixed for 10 s. The absorbance was measured using a Shimadzu UV-1280 UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu Co. Ltd., Kyoto, Japan) at 500 nm wavelength.

The ESI and EAI were calculated using the equations given below (Egerton et al., 2018; Sila et al., 2014; Zhang and Zhao, 2013):

$$\text{EAI (m}^2/\text{g)} = (2 \times 2.303 \times A_0) / (0.25 \times \text{protein weight (g)}) \quad (2)$$

$$\text{ESI (\%)} = (A_{10} / A_0) \times 100 \quad (3)$$

Where A_0 and A_{10} were absorbance values at 0 min and 10 min, respectively.

Determination of the oil binding capacity

Oil binding capacity (OBC) of SPP was determined by using a method described by

Egerton et al. (2018) and Zhang and Zhao (2013) with some modifications. 1 g of SPP solution was taken into a tube containing 10 mL of refined olive oil and kept for 30 min at room temperature. The mixture was centrifuged (5000 x g) for 25 min at room temperature and the volume of supernatant was determined. OBC was calculated using equation given below:

$$\text{OBC (mL/g proteins)} = (V_1 - V_2) / (\text{protein weight (g)}) \quad (4)$$

where V_1 was the initial volume of oil and V_2 was the volume of supernatant after centrifugation

Solubility Analysis

The solubility of SPP was evaluated using the method given by Shittu and Lawal (2007) and Zungur Bastoğlu et al. (2016). For this purpose, 1 g was taken from SPP sample and mixed with 10 mL distilled water in a tube. The mixture was homogenized at 50 Hz for 10 min. The supernatant was transferred into an eppendorf tube and centrifuged at 6000 rpm for 10 min. After centrifugation, the supernatant was taken to an aluminium plate and dried for 24 h at 105 °C. The solubility percentage (mass of soluble powder / mass of total powder) was calculated by the weight difference.

Wettability analysis

Dynamic wettability was evaluated using the Washburn method given by Washburn (1921) (Ji et al., 2015) with small modifications. The method measures the wettability of powder based on capillary rise. To measure the dynamic wettability, 1 g of SPP was taken into a plastic tube (2 cm diameter) which is covered by filter paper fixed with parafilm at the bottom to prevent powder discharge. The weight of whole tube containing powder sample was determined (m_1). The tube was placed and fixed on the surface of distilled water ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) to allow capillary rise for 10 min. The tube was weighed after 10 min (m_2). The amount of water absorbed by SPP was calculated per g of powder $[(m_2 - m_1)/g \text{ sample}]$.

Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and differential scanning calorimetry (DSC) characterization

The chemical structure of SPP was observed using FT-IR (Fourier Transform Infrared) Spectroscopy. A Shimadzu IRTracer-100 (Shimadzu Co. Ltd., Kyoto, Japan) spectrophotometer equipped with an ATR (Attenuated Total Reflectance) (Shimadzu MIRacle) accessory was used to obtain the spectrum. The spectra of SPP was recorded with a resolution of 2 cm^{-1} (accumulating 16 scans per spectra). The absorbance values were obtained from 4000 cm^{-1} to 600 cm^{-1} . Crystal surface was cleaned using a piece of a soft tissue paper wetted with ethanol and a background (air) scan was done prior to analysis (Ermis et al., 2018). The thermal behaviour of SPP was characterized using a Shimadzu differential scanning calorimeter, DSC-60 Plus (Shimadzu Co. Ltd., Kyoto, Japan). Around 2-3 milligrams of sample were sealed in a hermetic aluminium pan and heated from 25 to 100°C at a rate of $10^\circ\text{C}/\text{min}$. An empty aluminium pan was considered as reference (Ermis et al., 2018).

Statistical analysis

The mean values and standard deviations were calculated using the data obtained from the experiments performed in triplicate.

RESULTS AND DISCUSSION**Proximate composition of press cake**

The grounded cake with husks contained around $35 \pm 4\%$ protein (conversion factor=5.6), $6.9 \pm 0.6\%$ ash and $1.4 \pm 0.4\%$ crude fat content based on dry matter (around $90 \pm 1\%$ total dry matter).

Protein extraction

Production of sunflower protein extracts from de-oiled sunflower seed cake has been demonstrated by some previous researchers on a pilot plant scale Pickardt et al., (2011) and Salgado et al., (2012) while some of the research works have been performed on a laboratory scale (Pickardt et al., 2009; Taha et al., 1981). However, those researchers have not characterized the particle and powder properties of protein powders they obtained. The optimised conditions given by Pickardt et al. (2011) and Weisz et al. (2010) were used for absorption of phenolic substances to obtain a light-colored protein powder with improved economic viability.

The low yield of precipitated protein from de-oiled sunflower seed cake protein extracts (around 30% of total proteins) was noted in this study and this could be attributed to decreased protein solubility due to denaturation occurring during oil production (Ivanova et al., 2012). According to a recent study (Pickardt et al., 2011), approximately 3/4 of the extracted protein could be precipitated. In addition, Pickardt et al. (2015) reported that the washing precipitated proteins with water account for losses up to 17% of the precipitated proteins. Despite the loss of proteins during precipitation and purification, the percentage of protein fraction in precipitated proteins was quite high (around 90% in dry basis) and was in agreement with the previous researchers' findings (González-Pérez et al., 2002; Pickardt et al., 2015; Shchekoldina and Aider, 2012).

Microstructure analysis

The morphology of protein particles was investigated using scanning electron images (Figure 2). The SEM images revealed that the SPP consisted of varied size fractions of particles. As can be seen in Figure 3, the particles had irregular

and wrinkled surface properties. Amagliani et al. (2016) reported similar particle properties of rice protein concentrate powder. They also reported that the particle properties such as irregular,

fractured, hollow, wrinkled and porous were typical of spray-dried protein powders.

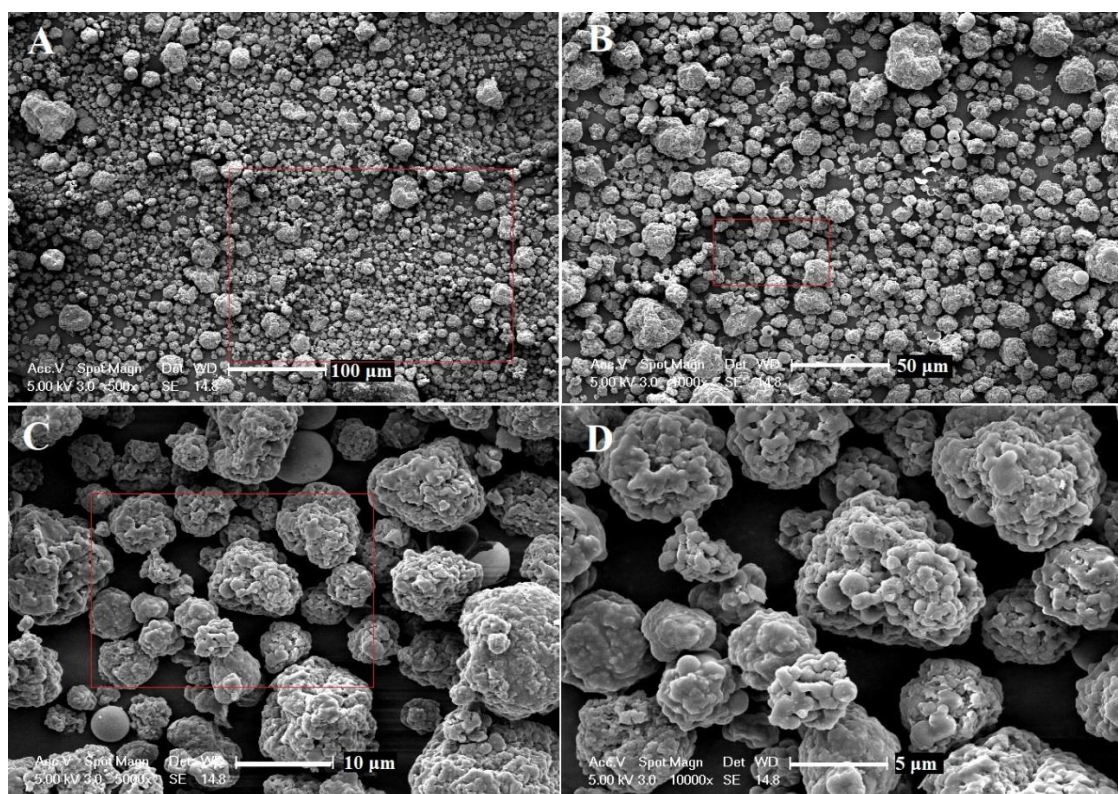


Figure 2. SEM images (A:500x , B:1000x, C:5000x, D:10000x).

Flowability and compressibility

Determination of flow properties is needed to predict the behaviour of a powder material during processing steps such as storage, handling, transportation and discharge to prevent flow problems (i.e. rat-holing, arching, erratic flow and flooding) (Ermiş et al., 2018). The compressibility of SPP was found to be high and this might be attributed to the closer particle packing, irregular particle properties and increase in inter-particle surface contact (Amagliani et al., 2016). It was reported by Babu et al. (2018) that the higher protein content, irregular particle shape, existence of interparticle voids and surface irregularity/roughness resulted in high degree of compressibility and cohesion (as a result of Van der Waals forces and mechanical interlocking) which agreed with the findings of this study. High

cohesive behaviour and high compressibility lead to poor flowability. The values of tapped density (ρ_t) and bulk (poured) density (ρ_b) determined for SPP were around 639 and 403 kg.m⁻³, respectively. The hausner ratio (ρ_t/ρ_b) of SPP was found to be around 1.58 which corresponded to cohesive attribute and hence very poor flow behaviour (Table 1). The degree of angle of repose (around 49°) also confirmed that the flowability of SPP was very poor. Therefore SPP might have a greater tendency to compress under self-weight during storage in silos, which may adversely affected their handling properties (Crowley et al., 2014).

Emulsifying properties

Due to the diversity of methods used and pretreatments applied in the literature,

quantitative comparison with other studies was found to be difficult in terms of emulsifying properties and oil binding capacity. It has been previously reported that sunflower proteins can form stable emulsions (González-Pérez et al., 2005). In addition, it has been shown that sunflower proteins showed similar or better emulsifying properties compared to soy proteins, carotenoproteins, skim milk powder and egg powder (González-Pérez and Vereijken, 2007; Shchekoldina and Aider, 2012; Sila et al., 2014).

The emulsifying properties (EAI and ESI) for soy protein isolate were reported as 99.7 m².g⁻¹ and 12.1%, respectively (Zhang and Zhao, 2013). In this study, those values (EAI and ESI) were determined as around 74 m².g⁻¹ and 5.25%, respectively (Table 2). Even though EAI of SPP was found lower than that of soy protein isolate, the data derived from this study indicated that SPP can be potentially used in food formulations.

Table 2. Some physico-chemical and powder properties of SPP

Angle of repose (°)	Hausner Ratio	Bulk density (kg.m ⁻³)	Tapped density (kg.m ⁻³)	Solubility (%)	Wettability (g water)	OBC (mL/g)	Emulsifying properties	
							EAI (m ² /g)	ESI (%)
49±2	1.58±0.11	403±14	639±19	3.75±0.52	0.39±0.03	2.85±0.43	73.69±0.44	5.25±0.15

EAI: emulsion activity index, ESI: emulsion stability index, OBC: oil binding capacity

The oil binding capacity (OBC) of proteins contribute to functional characteristics and taste of the food products particularly for meat and confectionery products (Pickardt et al., 2015). In addition, OBC is closely related to texture of food product and OBC is affected by bulk density of protein powder (Tanuja et al., 2012). The OBC value obtained from this study (2.85 mL.g⁻¹) was found to be lower than that of soy protein isolate (4.00 mL.g⁻¹) (Zhang and Zhao, 2013).

Solubility and wettability

Since the solubility of proteins is as an important phenomenon in terms of functional and technological properties, it needs to be determined and evaluated (González-Pérez and Vereijken, 2007; Saeed and Cheryan, 1988). Functional properties such as emulsifying and foaming properties are directly affected by solubility and lowest solubility of proteins was reported at around pH 4.0 (Karayannidou et al., 2007; Sila et al., 2014). Solubility may vary due to net charge of peptides and surface hydrophobicity (Sila et al., 2014). SPP had the solubility value around 3.75% in water (21 ± 2 °C) at pH 7.0. This is very low when compared with the data reported previously (Pickardt et al., 2011, 2015). They report the solubility of sunflower proteins in the

range from 7 to 13% depending on the type of production process they applied. The denaturation of proteins due to thermal and chemical treatment during processing, binding of phenolics during extraction and precipitation and formation of firm aggregates during precipitation and separation might be considered to be responsible for low solubility of SPP (González-Pérez and Vereijken, 2007; Ivanova et al., 2012; Pickardt et al., 2011). It was reported that the increase in protein content resulted in decreased solubility (Babu et al., 2018) which explains the low solubility obtained from SPP in this study.

Wettability of powders are influenced by the size of the particles, the size of the pores in between and also contact angles and powders with high protein content lead to poor wettability and dispersibility (Ji et al., 2015). The wettability for milk protein isolate powder containing around 86% protein was reported as 0.236 g water (Ji et al., 2015). The wettability of SPP was found to be higher (0.390 g water) than that value in this study. The reason might be attributed to the variation of size of the particles used, particle surface properties and the gaps between the particles.

FTIR characterization

The FTIR spectrum of SPP is given in Figure 3. As can be seen in Figure, the peak around 3290 cm^{-1} was assigned to O-H and N-H group stretching vibration. The peak located around 3080 cm^{-1} was assigned to C-H stretching vibration. A component close to 2960 cm^{-1} was assigned to CH_3 asymmetrical stretching. Peaks around 1640 cm^{-1} and 1535 cm^{-1} were assigned to Amide I (protein C=O stretch) and Amide II

(protein N-H bend, C-N stretch) groups, respectively. In addition, peaks around 1450 cm^{-1} and 1240 cm^{-1} were assigned to CH_2 bending vibration and C-N stretching properties, respectively (Chen et al., 2013; Kher et al., 2007). The FTIR spectrum of SPP exhibited similar peaks to those of soy proteins (Chen et al., 2013) and milk protein concentrate powders (Kher et al., 2007).

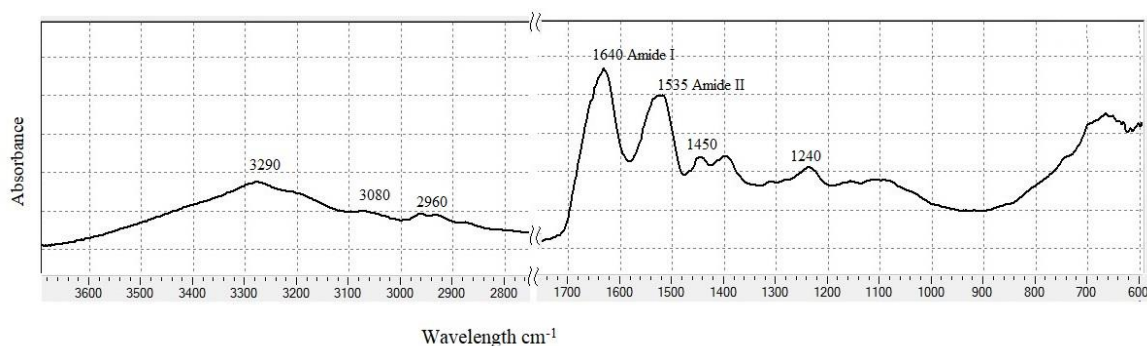


Figure 3. FTIR spectra of SPP

DSC characterization

The thermal properties of SPP was determined using differential scanning calorimetry and DSC curve is shown in Figure 4. SPP showed an endothermic peak at around 80 $^{\circ}\text{C}$ which was in agreement with the findings of previous

researchers (Amagliani et al., 2016; Fitzsimons et al., 2007). The curve in the temperature range of 40–80 $^{\circ}\text{C}$, indicated denaturation of the protein structures (Hashimoto et al., 2004) and thus it could be used to evaluate the thermal stability.

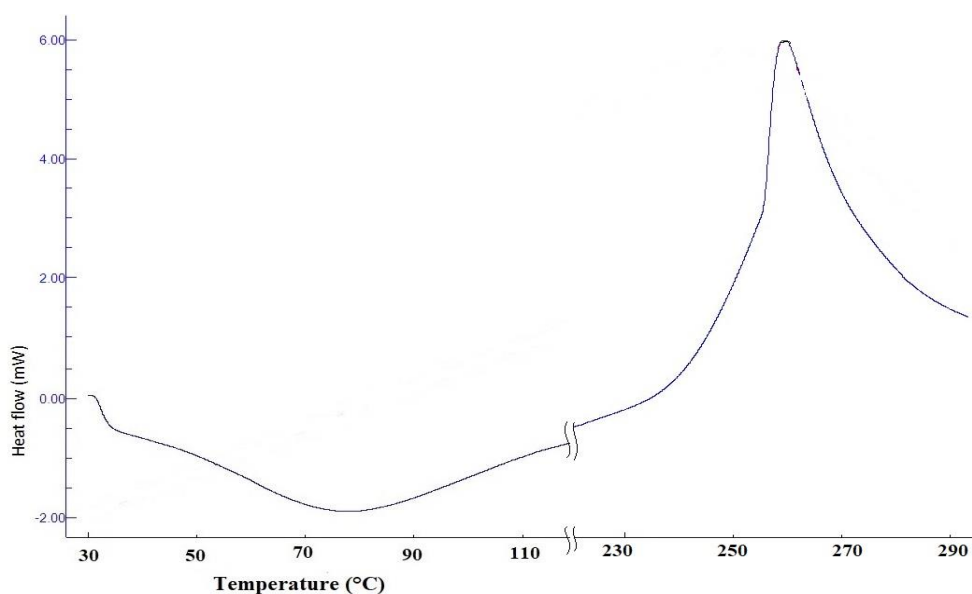


Figure 4. DSC thermogram of SPP

CONCLUSION

In this study, proteins were extracted from de-oiled sunflower seed cake (a by-product of industrial oil production from heat-treated sunflower seeds), precipitated and its powder form was obtained using a pilot scale spray dryer. Some physical, functional and microstructural attributes were investigated. The powders exhibited varying physical and functional characteristics which adversely affected the flowability. Low flowability indicated the challenges in bulk flow of the powders and the need for higher energy to make the powder flow at unconfined conditions. The powders exhibited low solubility while the emulsifying and wettability properties were found to be satisfying. The results obtained in this study provided useful information for the evaluation of the behaviour of SPP at industrial applications such as storage, handling and processing and of potential use in formulations of vegan, confectionary and meat products.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Yaz Foods Ltd. and Ceneviz Foods Ltd. for material and technical support.

Declaration of interest statement

The authors declare that there is no conflict of interest related to this study.

REFERENCES

- Amagliani, L., Regan, J.O., Kelly, A.L., and Mahony, J.A.O. (2016). Physical and flow properties of rice protein powders. *J. Food Eng.* 190, 1–9.
- AOAC (2000). Official Methods of Analysis of AOAC International. *Assoc. Off. Anal. Chem. Int. Method ce 2-66*.
- Babu, K.S., Siliveru, K., Amamcharla, J.K., Vadlani, P. V., and Ambrose, R.P.K. (2018). Influence of protein content and storage temperature on the particle morphology and flowability characteristics of milk protein concentrate powders. *J. Dairy Sci.* 101, 7013–7026.
- Chen, X., Ru, Y., Chen, F., Wang, X., Zhao, X., and Ao, Q. (2013). FTIR spectroscopic characterization of soy proteins obtained through AOT reverse micelles. *Food Hydrocoll.* 31(2), 435-437.
- Crowley, S. V., Gazi, I., Kelly, A.L., Huppertz, T., and O'Mahony, J.A. (2014). Influence of protein concentration on the physical characteristics and flow properties of milk protein concentrate powders. *J. Food Eng.* 135, 31-38.
- Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., and Ross, R.P. (2018). Characterization of protein hydrolysates from blue whiting (*Micromesistius poutassou*) and their application in beverage fortification. *Food Chem.* 245, 698-706.
- Ermis, E., Güner, K.Ö., and Yilmaz, M.T. (2018). Characterization of Hazelnut Milk Powders: A Comparison of Spray-Drying and Freeze-Drying. *Int. J. Food Eng.* 14(11-12)
- Fitzpatrick, J.J., Iqbal, T., Delaney, C., Twomey, T., and Keogh, M.K. (2004). Effect of powder properties and storage conditions on the flowability of milk powders with different fat contents. *J. Food Eng.* 64, 435-444.
- Fitzsimons, S.M., Mulvihill, D.M., and Morris, E.R. (2007). Denaturation and aggregation processes in thermal gelation of whey proteins resolved by differential scanning calorimetry. *Food Hydrocoll.* 21, 638-644.
- Fraczek, J., Złobecki, A., and Zemanek, J. (2007). Assessment of angle of repose of granular plant material using computer image analysis. *J. Food Eng.* 83, 17-22.
- González-Perez, S., Van Koningsveld, G.A., Vereijken, J.M., Merck, K.B., Gruppen, H., and Voragen, A.G.J. (2005). Emulsion properties of sunflower (*Helianthus annuus*) proteins. *J. Agric. Food Chem.* 53(6), 2261-7
- González-Pérez, S., and Vereijken, J.M. (2007). Sunflower proteins: Overview of their physicochemical, structural and functional properties. *J. Sci. Food Agric.* 87(12), 2173-2191
- González-Pérez, S., Merck, K.B., Vereijken, J.M., Van Koningsveld, G.A., Gruppen, H., and Voragen, A.G.J. (2002). Isolation and characterization of undenatured chlorogenic acid

- free sunflower (*Helianthus annuus*) proteins. *J. Agric. Food Chem.* 50(6):1713-9
- Hashimoto, T., Suzuki, T., Hagiwara, T., and Takai, R. (2004). Study on the transition for several processed fish muscles and its protein fractions using differential scanning calorimetry. *Fish. Sci.* 70(6):1144 - 1152.
- Hausner, H.H. (1967). Friction Conditions in a Mass of Metal Powder. *Int. J. Powder Metall.* 3, 7-13.
- Ivanova, P., Chalova, V., Koleva, L., Pishtiyski, I., and Perifanova-Nemska, M. (2012). Optimization of protein extraction from sunflower meal produced in Bulgaria. *Bulg. J. Agric. Sci.* 18, 153-160.
- Ji, J., Cronin, K., Fitzpatrick, J., Fenelon, M., and Miao, S. (2015). Effects of fluid bed agglomeration on the structure modification and reconstitution behaviour of milk protein isolate powders. *J. Food Eng.* 167, 175-182.
- Karayannidou, A., Makri, E., Papalamprou, E., Doxastakis, G., Vaintraub, I., Laptewa, N., and Artico, G. (2007). Limited proteolysis as a tool for the improvement of the functionality of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates produced by seeds or industrial by-products (solvent cake). *Food Chem.* 104(4):1728-1733.
- Khanji, A.N., Michaux, F., Petit, J., Salameh, D., Rizk, T., Jasniewski, J., and Banon, S. (2018). Structure, gelation, and antioxidant properties of curcumin-doped casein micelle powder produced by spray-drying. *Food Funct.* 9, 971-981.
- Kher, A., Udabage, P., McKinnon, I., McNaughton, D., and Augustin, M.A. (2007). FTIR investigation of spray-dried milk protein concentrate powders. *Vib. Spectrosc.* 44, 375-381.
- Pickardt, C., Neidhart, S., Griesbach, C., Dube, M., Knauf, U., Kammerer, D.R., and Carle, R. (2009). Optimisation of mild-acidic protein extraction from defatted sunflower (*Helianthus annuus* L.) meal. *Food Hydrocoll.* 23(7) 1966-1973.
- Pickardt, C., Hager, T., Eisner, P., Carle, R., and Kammerer, D.R. (2011). Isoelectric protein precipitation from mild-acidic extracts of de-oiled sunflower (*Helianthus annuus* L.) press cake. *Eur. Food Res. Technol.* 233(1):31-44
- Pickardt, C., Eisner, P., Kammerer, D.R., and Carle, R. (2015). Pilot plant preparation of light-coloured protein isolates from de-oiled sunflower (*Helianthus annuus* L.) press cake by mild-acidic protein extraction and polyphenol adsorption. *Food Hydrocoll.* 44, 208-219.
- Romero, A., Beaumal, V., David-Briand, E., Cordobes, F., Guerrero, A., and Anton, M. (2012). Interfacial and emulsifying behaviour of rice protein concentrate. *Food Hydrocoll.* 29, 1-8.
- Saeed, D.M., and Cheryan, M. (1988). Sunflower Protein Concentrates and Isolates' Low in Polyphenols and Phytate. *J. Food Sci.* 53(4), 1127-1131.
- Salgado, P.R., Drago, S.R., Molina Ortiz, S.E., Petrucci, S., Andrich, O., González, R.J., and Mauri, A.N. (2012). Production and characterization of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein-enriched products obtained at pilot plant scale. *LWT - Food Sci. Technol.* 45(1), 65-72.
- Shchekoldina, T., and Aider, M. (2012). Production of low chlorogenic and caffeic acid containing sunflower meal protein isolate and its use in functional wheat bread making. *J. Food Sci. Technol.* 51(10)
- Shittu, T.A., and Lawal, M.O. (2007). Factors affecting instant properties of powdered cocoa beverages. *Food Chem.* 100, 91-98.
- Sila, A., Sayari, N., Balti, R., Martinez-Alvarez, O., Nedjar-Aroume, N., Moncef, N., and Bougatef, A. (2014). Biochemical and antioxidant properties of peptidic fraction of carotenoproteins generated from shrimp by-products by enzymatic hydrolysis. *Food Chem.* 148C:445-452
- Taha, F.S., Abbasy, M., El-Nockrashy, A.S., and Shoeb, Z.E. (1981). Countercurrent extraction-isoelectric precipitation of sunflower seed protein isolates. *J. Sci. Food Agric.* 32, 166-174.
- Tanuja, S., Viji, P., Zynudheen, A., and Joshy, C. (2012). Composition, functional properties and antioxidative activity of hydrolysates prepared from the frame meat of Striped catfish

- (Pangasianodon hypophthalmus). *Egypt. J. Biol.* 14, 27-35.
- Torres, J.K.F., Stephani, R., Tavares, G.M., de Carvalho, A.F., Costa, R.G.B., de Almeida, C.E.R., Almeida, M.R., de Oliveira, L.F.C., Schuck, P., and Perrone, Í.T. (2017). Technological aspects of lactose-hydrolyzed milk powder. *Food Res. Int.* 101, 45-53.
- Washburn, E.W. (1921). The Dynamics of Capillary Flow. *Physical Rev.* XVII.
- Weisz, G.M., Kammerer, D.R., and Carle, R. (2009). Identification and quantification of phenolic compounds from sunflower (*Helianthus annuus* L.) kernels and shells by HPLC-DAD/ESI-MSn. *Food Chem.* 115(2):758-765
- Weisz, G.M., Schneider, L., Schweiggert, U., Kammerer, D.R., and Carle, R. (2010). Sustainable sunflower processing - I. Development of a process for the adsorptive decolorization of sunflower [*Helianthus annuus* L.] protein extracts. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11, 733-741.
- Zhang, Y.N., and Zhao, X.H. (2013). Study on the functional properties of soybean protein isolate cross-linked with gelatin by microbial transglutaminase. *Int. J. Food Prop.* 16(6), 1257-1270.
- Zungur Bastoğlu, A., Tomruk, D., Koç, M., and Ertekin, F.K. (2016). Spray dried melon seed milk powder: physical, rheological and sensory properties. *J. Food Sci. Technol.* 53, 2396-2404.



YOĞURT MATRİKSİNİN TÜKETİM SIRASINDA *IN VIVO* AROMA SALINIMI ÜZERİNE ETKİLERİ

Tülin Eker¹, Turgut Cabaroğlu^{2,*}

¹Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Osmaniye, Türkiye
²Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Adana, Türkiye

Geliş / Received: 26.06.2019; Kabul / Accepted: 09.12.2019; Online baskı / Published online: 19.01.2020

Eker, T., Cabaroğlu, T. (2020). Yoğurt matriksinin tüketim sırasında *in vivo* aroma salınımı üzerine etkileri. *GIDA* (2020) 45 (1): 50-60 doi: 10.15237/gida.GD19103

Eker, T., Cabaroğlu, T. (2020). *The impact factors of yogurt matrix on in vivo aroma release during consumption of yogurt.* *GIDA* (2020) 45 (1): 50-60 doi: 10.15237/gida.GD19103

ÖZ

Aroma, tüketicilerin yoğurt tercihlerini etkileyen ana etkidir. Gıdayı tüketirken oluşan aroma algısı, ağızda salınan aroma bileşiklerinin gıda matriksi ve insan tükürüğü arasındaki etkileşimlerine bağlıdır. Yapılan araştırmalar, aroma algısının ve yoğurttan *in vivo* aroma salınımının birçok faktörden etkilendiğini göstermiştir. Yağ bileşeninin, yoğurdun aromasının tutuklanmasında ve algılanmasında önemli rolü vardır. Özellikle yağ azaltılmış yoğurtlarda, aromanın kontrollü salınmasını desteklemek için ilave edilen protein, yağ, aroma tutuklayıcı bileşenlerin, kıvam verici maddelerin ve tatlandırıcıların *in vivo* aroma salınımı ve aroma algısı üzerine farklı etkileri vardır. Bununla birlikte yoğurdun formüle edilmesi sırasında değişen tekstür de ağızda aroma salınımını etkilemektedir. Yoğurttan aroma algısı üzerine etki eden faktörleri anlamak, gıda sanayinde yenilikçi ve kabul gören gıda ürünleri üretmede önemlidir. Bu derlemede yoğurdun *in vivo* tüketimi sırasında matriksin etkisini ortaya koyan çalışmalar incelenmiştir.

Anahtar kelimeler: Yoğurt matriksi, *In vivo* aroma salınımı, protein, yağ, aroma tutuklayıcı, kıvam verici, tatlandırıcı

THE IMPACT FACTORS OF YOGURT MATRIX ON *IN VIVO* AROMA RELEASE DURING CONSUMPTION OF YOGURT

ABSTRACT

The flavour is the main factor affecting consumers' preferences in yogurts. Flavour perception while eating depends on the volatile compounds release in the mouth influenced by the interactions of those compounds between both food components and human saliva. Several studies reported that flavour perception and *in vivo* aroma release from yogurt were impacted by many factors. The fat component has an important role in retention and perception of yogurt aroma. Particularly in light yogurts, protein, fat, encapsulating agent, thickening agent and sweetener added to promote controlled release of aroma, have different effects on *in vivo* aroma release and perception. In addition to this, the texture formed during the formulation of yogurt affects the release of aroma in the mouth. Understanding impact factors on flavour perception in yogurt is an important challenge for food-processing industry to produce innovative and appreciated food products. In this article, the studies determined the effect of the matrix during *in vivo* consumption of yogurt were reviewed.

Keywords: Yogurt matrix, *in vivo* aroma release, protein, fat, aroma encapsulating, thickening agent, sweetener

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ tcabar@cu.edu.tr,

☎ (+90) 322 338 6997,

☎ (+90) 322 338 6614

Tülin Eker; ORCID no: 0000-0001-9726-160X

Turgut Cabaroğlu; ORCID no: 0000-0003-1489-9929

GİRİŞ

Üstün özelliklere sahip bir gıda maddesi olan süt, fermantasyon süreciyle, raf ömrü uzatılmış, tat ve aroması farklılaşmış, sindirilebilirliği artmış ve fonksiyonel özellik kazanmış bir ürün olan yoğurda dönüşmektedir. Yoğurdun sağlık üzerine etkilerini belirleyen çalışmalar neticesinde yoğurdun tüketimine ilişkin tüketici bilinci gittikçe artmaktadır (Kızılaslan ve Solak, 2016). Tüketiciler, tam yağlı yoğurdun tekstürel özelliklerine ve aromasına sahip ancak az yağlı veya yağsız aynı zamanda da katkısız yoğurt talep etmektedir. Bu nedenle yoğurt pazarı tüketici beklentisini karşılayacak şekilde, yoğurdun güncel teknolojik uygulamalar ile birlikte fonksiyonel (probiyotikler, lif, omega yağ asitleri) ve yağlı ikame edecek doğal bileşenlerle desteklenmesi ile her geçen gün büyümektedir (Soukoulis vd., 2012).

Bir gıdanın ağızda çiğnenmesi sırasında, aroma bileşikleri, çiğneme hareketleri ve tükürük-gıda maddesi etkileşimi ile ağız boşluğuna yayılır ve bu bileşenler koklama veya geniz yoluyla algılanırlar (Boesveldt ve de Graaf, 2017; Mosca ve Chen, 2017). Gıda matriksinin, ağızda çiğneme koşullarının veya kişiler arası farklılıkların aroma salınımı üzerine etkisini anlamak için gıdaların tüketimi sırasında kişilerin burun veya ağızlarından nefes örneği almaya yarayan ve bu nefes kompozisyonunu belirleyen teknikler geliştirilmiştir (Esteban-Fernández vd., 2016; Ployon vd., 2017; Frank vd., 2017; Pu vd., 2019). Bu teknikler genel olarak, gıdalardan aroma salınımını gıdanın tüketilmesiyle eş zamanlı bir şekilde belirlenmesi veya kişilerin nefeslerindeki (*in vivo*) aroma bileşenlerinin gıdanın tüketilmesi sırasında bir polimere tutturulması esasına dayanır. Aroma salınımı çalışmalarında kullanılan *in vivo* ve *in vitro* yöntemler daha önceki bir çalışmada detaylı olarak açıklanmıştır (Eker ve Cabaroğlu, 2018).

Tüketici tarafından kabul edilebilirliği büyük oranda duyuşsal özelliklerine bağlı olan yoğurt, *in vivo* ve *in vitro* yöntemlerinin kullanıldığı birçok aroma salınımı çalışmasına konu olmuştur (Saint-Eve vd., 2006b; Kant vd., 2004; Decourcelle vd., 2004; Mei vd., 2004). Dinamik gıda tüketimi süreci boyunca gıdadan salınan aroma maddeleri,

özellikle yoğurt gibi ağızda kalma süresi kısa olan ürünler için önemli bir rol oynamaktadır (Mesurolle vd., 2013). Aroma salınımını ve algılamasını arttırmak için, ağızda aroma salınımını etkileyen faktörlerin daha iyi anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Yoğurtta aroma algısını düzenleyen mekanizmaların daha iyi anlaşılması için literatürde tekstür-aroma veya matriks-aroma ilişkilerini araştıran çok sayıda araştırma yapılmıştır (Kant vd., 2004; Decourcelle vd., 2004; Mei vd., 2004).

Bu çalışmada, yoğurtta gıda otoritelerince kullanımına izin verilen gıda katkı maddelerinin yoğurt matriksi içinde *in vivo* aroma salınımına katkısını ve duyuşsal özelliklerine etkisini araştıran çalışmalar derlenmiştir.

YOĞURDUN BİLEŞENLERİ VE AROMA ETKİLEŞİMLERİ

Yoğurt yarı-katı fermente bir süt ürünüdür. Neredeyse dünyanın tüm ülkelerinde bilinmekte ve tüketilmektedir. Kıvam, lezzet ve aroma bakımından bir bölgeden diğerine farklılık gösterse de temel bileşenleri ve üretimi genel olarak aynıdır (Yıldız, 2016). Yoğurt, su moleküllerinin geniş bir zayıf protein ağı içinde tutuklandığı karmaşık, koloidal bir sistemdir. Yoğurttaki aroma algısı, matriksinin bileşimsel, koloidal, yapısal ve reolojik karakteri kadar sütün laktik asit bakterileri tarafından fermantasyonu sırasında meydana gelen biyokimyasal reaksiyonlar sonucu oluşur (Soukoulis vd., 2012). Birçok çalışmada yağ, protein türü (β -laktoglobulin, α -laktobumin ve kazeinler), polisakkaritler, şekerler ve tatlandırıcı gibi bileşenler ile yapay aroma maddeleri ilave edilmiş model yoğurt matriksinden salınan aroma bileşenleri arasındaki ilişki araştırılmıştır (Saint-Eve vd., 2006a; Saint-Eve vd., 2006b; Déleris vd., 2007; Chua et al. 2017). Bu faktörlerden biri olan yağ, yoğurt pıhtısını oluşturan ağ yapıdaki temel bileşenlerden biridir. Yoğurt pıhtısı, ısı işlem ve asitlik etkisiyle κ -kazein ve β -laktoglobulin arasında oluşan interaksiyon sonucu proteinlerin hidrofilik niteliklerinin artmasını sağlar. Bu ağ yapının içine yağ globülleri de girmekte ve böylece pıhtı daha stabil olmaktadır. Yağ yoğurt tekstürünü iyileştirir. Genellikle tam yağlı yoğurtlar daha sıkı, daha viskoz ve daha elastik

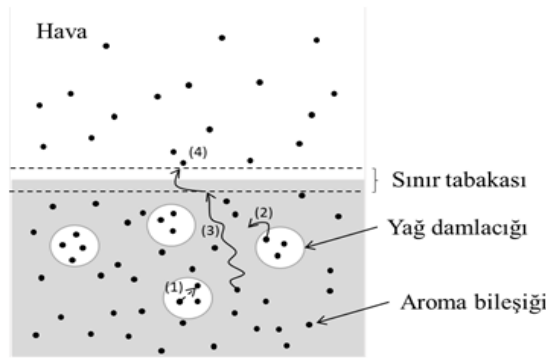
özellikler gösterir (Chua vd., 2017). Yoğurt üretiminde yağın bu kadar önemli olmasının yanında son yıllarda fazla yağ tüketiminin neden olduğu sağlık problemleri nedeniyle tüketiciler az yağlı veya yağsız ürünler ile birlikte antioksidan içeriği yüksek gıdaları tüketme eğilimi göstermektedir (Zhao vd., 2018). Tüketim eğilimindeki değişiklikler ile birlikte yağı ikame edici bileşenlerle (nişasta, pektin, guar gam, keçiyoynuzu gamı) zenginleştirilmiş az yağlı yoğurtlar ve çeşitli meyve püreleri, meyve karışımları, dondurulmuş meyveler, meyve reçelleri veya meyve konsantreleri ile aromalandırılmış yoğurtlar üretilmeye başlanmıştır (Voşgan vd., 2016).

Yoğurdun aromasına katkıda bulunan etmenler; i) laktik asit, ii) sütte bulunan aroma bileşenleri ve iii) fermantasyon ile oluşan spesifik aroma bileşikler olarak sınıflandırılabilir (Tian vd., 2017; Tian vd., 2019). Yoğurt içinde alkoller, aldehitler, ketonlar, asitler, esterler, laktonlar, sülfürlü bileşikler, pirazinler ve furan türevlerini içeren 90'dan fazla farklı uçucu bileşen tespit edilmiştir (Zhao vd., 2018). Henüz kesin olmamakla birlikte yoğurtta istenen aromadan sorumlu karakteristik bileşiklerin laktik asit, asetaldehit, diasetil, asetoin ve 2-bütanon olduğu bildirilmiştir (Chen et al. 2017). Yoğurtta aroma salınımını etkileyen matris kaynaklı faktörler aşağıda başlıklar halinde tartışılmıştır.

Yağ bileşeninin aroma salınımına etkisi

Aroma bileşikler ile gıda bileşenleri arasındaki moleküler etkileşimler, aromanın gıdadan

salınımını etkiler. Aroma bileşiklerinin hidrofobik-hidrofilik karakterleri birbirinden farklıdır. Hidrofilik aroma bileşiklerinin salınımı yağ bileşeninden bağımsız iken, hidrofobik aroma bileşiklerinin salınımı gıda içerisindeki yağ miktarı arttıkça azalır. Düşük ve yüksek miktarda yağ içeren peynirlerde yapılan bir çalışmada, hidrofobik aroma bileşenlerinin öncelikle yağ fazı içinde dağılacaklarını ve gıdayı tüketirken aroma bileşenlerinin uçuculuğunun yavaşlayacağı bildirilmiştir (Delahunty vd., 1996). Çoğu aroma bileşiği hidrofobik karakterinden dolayı lipitler içinde çözünür. Yağ hidrofobik aroma bileşenleri için çözgen görevi görür ve gıdanın hem dokusunu etkiler hem de aroma salınımını ve algısını değiştirir (Chua vd., 2017). Bu nedenle az yağlı yoğurdun aroma salınımı ile tam yağlı yoğurdun aroma salınımı aynı değildir. Az yağlı yoğurtlar tüketici beklentisini kompozisyon olarak karşılar ancak duyuşsal olarak daha zayıf özelliktedir. Brauss vd. (1999), *in vivo*, Nongonierma vd. (2006), *in vitro* koşullarda, yağın aroma bileşenlerinin salınımını yavaşlattığını ve salınım süresini uzattığını bildirmiştir. Aroma salınımının eşzamanlı olarak izlenmesine olanak sağlayan atmosferik basınç iyonizasyonu-kütle spektrometresi (API-MS) sonuçları aroma bileşenlerinin az yağlı yoğurtlardan (%0.2) daha hızlı ve daha yoğun bir şekilde salınırken bu bileşiklerin %0.2 yağ içeren ortamda, %3.5 ve %10 yağ içeren yoğurtlara göre daha az kalıcı olduklarını göstermiştir (Brauss vd., 1999).



Şekil 1. Gıdadan ağız boşluğuna salınan aroma bileşiklerinin adım adım salınımını gösteren şematik diyagram

Yağsız yoğurt, proteinler ve polisakaritlerden oluşan kompleks bir matristir. Gıda sistemleri içinde bulunan protein ve polisakarit bileşenlerinin birbiri ile etkileşime girdiği bilinmektedir. Her iki makro molekülün elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağları ve Van der Waals kuvvetleri gibi kovalent olmayan etkileşimler ile kurdukları ağ, aroma salınımlarında rol oynayan karmaşık bir yapı oluşturur (Lubbers vd., 2004).

Manda sütü yoğurdunda yağ içeriği arttıkça L* değeri, viskozite ve tutunabilirlik değeri artarken a* değeri, serum ayrılması, sertliği ve esnekliği azalmıştır. Yoğurt örneklerinin yağ içeriğindeki düşüş yapışkanlık, çignenebilirlik gibi tekstürel özellikleri yanında titrasyon asitliği, b* değeri ve *Streptococcus thermophilus* popülasyonunda anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır (Akgun vd., 2016).

Önceki araştırmalar, aroma salınımlarının yalnızca toplam yağ içeriğine değil, aynı zamanda yağın fizikokimyasal özelliklerine de bağlı olduğunu göstermiştir (Heilig vd., 2016). Ayed vd. (2018), model ağız yöntemiyle gerçek tükürük ve yapay tükürük eşliğinde, farklı yağ-protein tipinin ve miktarının bir süt ürünü olan dondurmanın aroma salınımlarına etkisini araştırmıştır. Yağ tipinin aroma üzerindeki etkisi yağ miktarı ile kıyaslandığında daha az olarak bildirilmiştir. Yağ aroma salınımlarını proteinden daha çok etkilemiş ve yağ oranı arttıkça hidrofobik aroma bileşimi salınımları azalmıştır.

İlginç bir şekilde, bazı aroma maddelerinin de yağ ile ilgili duyuşsal algıyı (yağlılık ve kremsilik gibi) etkilediği bildirilmiştir. Yağı azaltılmış, pıhtısı kırılmış yoğurtlara hindistan cevizi ve tereyağı aromaları ilave edildiğinde bu yoğurtlar yeşil elma ve badem aroması ilave edilenlere kıyasla daha kıvamlı olarak algılanmıştır. Yağ ile ilgili aroma maddelerinin ilavesi, çeşitli gıda maddelerinde yağ ile ilgili duyuşsal özelliklerin algılanmasını arttırmıştır (Saint-Eve vd., 2004; Syarifuddin vd., 2016; Schoumacker vd., 2017).

Aroma tutuklayıcı bileşenlerin aroma salınımlarına etkisi

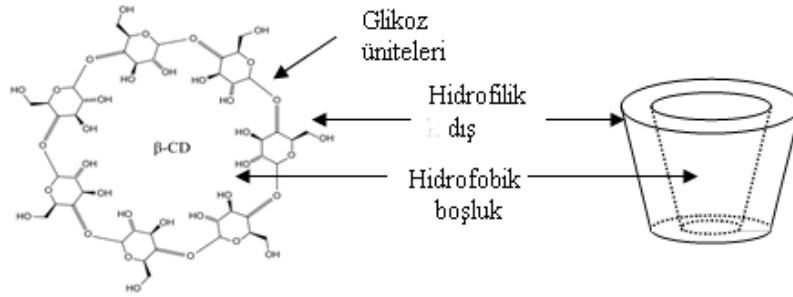
Aroma bileşiklerinin gıda üretim sürecinde gıda bileşenleri ile tutuklanması (enkapsülasyonu) ve gıdanın tüketilmesi sırasında salınımlarının kontrol edilmesi gıda üreticileri ve aroma bilimi ile ilgilenen araştırmacılar için ilgi konusu olmuştur. Aroma bileşenlerinin gıda sistemine tutuklanması ile gıdanın işlenmesi veya depolanması sırasında, aroma bileşenlerinin kimyasal olarak değişiminin veya kaybının önlenmesi hedeflenmektedir. Bu sebeple doğal bileşenlerin tutuklama ajanı olarak kullanılması tüketici beklentisini karşılamaktadır (Reineccius, 2019).

Aroma tutuklanmasında öncelikli hedef, aroma bileşiminin başarılı bir şekilde kapsüle edilmesi ve stabilize edilmesidir (Reineccius, 2019). Aroma maddelerinin çok uçucu olması, polarlıklarının değişkenlik göstermesi, özellikle küçük molekül ağırlığına sahip olanlarının tutuklandığı kapsül duvarından kolaylıkla difüze olması ve oksidasyona duyarlı olmaları sebebi ile tutuklama işleminin diğer bileşenlere kıyasla bazı zorlukları vardır. Aromanın algılanabilmesi için ise gıda tüketilirken aroma bileşiminin gıdadan serbest kalması önemlidir. Aksi takdirde aroma başarılı bir şekilde tutuklansa bile gıdayı tüketen kişi tarafından algılanamaz. Tutuklanmış aroma bileşiklerinin yeniden salınma oranı kapsül duvarının bozulması, şişmesi ve erimesi yolu ile kontrol altına alınabilmektedir. Aroma bileşiklerinin gıdadan kontrollü bir şekilde salınmasında proteinler ve karbonhidratlar gibi doğal ürünlerden elde edilen tutuklayıcı ajanların kullanımı daha ön plandadır (Goncalves vd., 2016; Tan vd., 2019; Reineccius, 2019).

α -1,4-glikozidik bağlı glukopiranoz alt birimlerinden oluşmuş, halkalı yapıdaki nişasta türevleri olan siklodesktrinler aroma tutuklanmasında kullanılan en basit moleküllerdir. β -siklodesktrin aroma tutuklanmasında en çok kullanılan moleküldür. Molekül yapısında hidrofobik boşluk vardır ve aroma bileşenlerini burada tutarak kompleks oluşturur. Bu kompleksin stabilitesi tutuklanmış molekülün büyüklüğüne ve hidrofobik özelliklerine bağlıdır. Aroma bileşenleri hidrofobik özellikleri,

moleküler büyüklüğü ve geometrisine bağlı olarak β -siklodesktrin ile sitokiyometrik olarak 1:1 oranlı bir şekilde kompleks oluşturur. Aroma maddesinin β -siklodesktrin ile kararlı bir kompleks oluşturması için, aroma bileşeninin hidrofobik boşluğa sığacak uygun büyüklükte bir apolar kısım ve siklodekstrinin dışında kalan, moleküle hidrojen bağları ile stabilize olan polar bir kısım içermesi gereklidir (Voilley ve Etiévant

2006). Sun vd. (1999), β -siklodesktrin ile yapılarında düz bir karbon zinciri veya polar olmayan bir fenil grubu içeren n-bütanol, benzaldehit ve siklopentanon arasında kararlı bir etkileşim olduğunu bildirmiştir. Kant vd. (2004), β -siklodesktrin ilave edilmiş yağsız yoğurtta yapay limon aroma salınımının normal yağ içeren yoğurtla benzer olduğunu bildirmiştir.



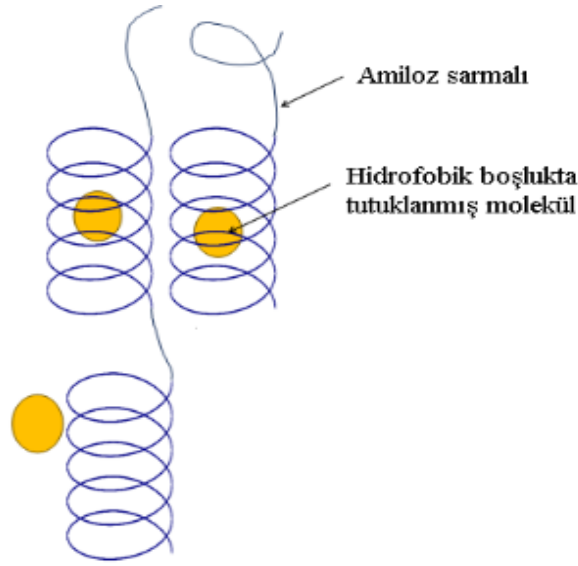
Şekil 2. β -siklodesktrin'in molekül yapısı ve şematik gösterimi

Kıvam arttırıcı ve tatlandırıcı bileşenlerin aroma salınımına etkisi

Kıvam arttırıcı bileşenlerin iki önemli görevi vardır; i) suyu tutmak ve ii) viskoziteyi arttırmak. Kıvam arttırıcı bileşenler, üç boyutlu bir jel ağı oluşturur ve bu ağ serbest suyu bağlayarak süt bileşenlerinin (özellikle proteinlerin) su bağlama kapasitesini artırır. Yağı azaltılmış yoğurtlarda yapı, tekstür ve aroma algısını iyileştirmek için kıvam arttırıcı ajanların etkisinin belirlendiği birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda meyve pektini, modifiye nişasta, guar gam, keçi boynuzu gamı, ksantan, karragenan ve jelatin gibi hidrokolloitlerin kıvam arttırıcı özellikleri incelenmiştir (Aziznia vd., 2008; Decourcelle vd., 2004; Mei vd., 2004).

Nişasta içindeki glikoz molekülleri, düz (amiloz) veya dallı zincir (amilopektin) halinde bağlanmışlardır. Özellikle, düz amiloz fraksiyonu, iyot, lipidler, alkoller, aldehytler, terpenler ve laktonlar gibi düşük molekül ağırlıklı aroma bileşikleri ile kompleks oluşturma yeteneğine sahiptir ve bu etkileşimi tanımlamak için ligand

bağlanma teorisi geliştirilmiştir. Uygun bir molekülün varlığında amiloz zinciri hidrojen bağları ile kuvvetlenerek sarmal yapıyı oluşturur. Bu sarmal yapının iç yüzeyi hidrofobik iken dış yüzeyi hidrofiliktir. Genel olarak bağlanma kuvveti, terpen gibi hacimli moleküllere kıyasla uzun ve doğrusal moleküllerde daha yüksektir (Conde-Petit vd., 2006). Nişasta-aroma kompleksi nişasta tipi, nişastanın fizikokimyasal karakteristiği, fiziksel durumu, aroma maddesinin moleküler ağırlığı ve uzunluğundan etkilenir. Farklı nişasta tipinin on farklı aroma bileşiğinden oluşan çilek aroma kompleksinin salınımı üzerine etkisi *in vitro* (katı faz mikroekstraksiyonu-gaz kromatografisi-kütle spektrometresi, (SPME-GC-MS)) koşullarda belirlenmiş ve nişastanın sulu çözeltilerinden, tepe boşluğuna en çok salınan bileşik metil-hekzanoat olurken cis-3-hekzenol bu sistemde en güçlü tutulan bileşik olmuştur. Hazırlanan model nişasta tipinin aroma bileşiklerinin salınımı üzerine etkili olduğu bulunmuştur (Vidrih vd., 2009).



Şekil 3. Amiloz sarmal yapısı ve hidrofobik boşlukta tutulan molekülün şematik gösterimi

Yoğurda nişasta, pektin ve guar gam gibi hidrokolloitlerin ilavesinin, esterlerin aroma salınımını etkilediği bildirilmiştir (Lubbers vd., 2004). Decourcelle vd., (2004) *in vitro* koşullarda yağsız, pıhtısı kırılmış yoğurtlarda viskozite ile birlikte tatlandırıcılar, nişasta, pektin, keçi boynuzu gamı (LBG) ve guar gum gibi kıvam arttırıcı ajanların kullanımının aroma salınımı üzerine etkisini araştırmıştır. Tatlandırıcı ve guar gamın aroma salınımı üzerine etkisi önemsiz bulunurken, LBG ve nişastanın etkisi önemli bulunmuştur. Nişastanın sarmal zincir yapısı ile aroma bileşenleri arasındaki moleküler etkileşimler tepe boşluğuna salınan aroma bileşiklerinin konsantrasyonunu azaltmıştır. LBG, ortamda serbest halde bulunan suyu bağlayarak (salting-out etkisi) tepe boşluğuna salınan aroma bileşiklerinin konsantrasyonunu arttırmıştır. Mei vd. (2004), ise *in vivo* koşullarda, yapay çilek aroması ilave edilmiş model yoğurtlarda tatlandırıcıların (%8 ve 12 şeker, aspartam ve früktoz şurubu-özellikle früktoz şurubunun) etil-bütanoat salınımını azalttığını, tatlandırıcıların aroma salınımı üzerine etkisinin kıvam arttırıcı ajanlardan daha fazla olduğunu bildirmiştir. Pektin ve modifiye nişastanın etil-bütanoat, etil-3-metilbütanoat ve (Z)-3-hekzanol aroma salınımı üzerine etkisi önemsiz bulunmuştur. Bununla birlikte, yağ ikame maddelerinin %1,5'den yüksek konsantrasyonlarda kullanılması yoğurdun fiziksel

ve duyuusal özelliklerini zayıflatmıştır. Aynı zamanda mısır şurubunun, pektin jelinde de aroma salınımını yavaşlattığı ve aroma algısını azalttığı bilinmektedir (Lubbers vd., 2004). Pektinin ve viskozitenin aroma salınımı üzerine etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada, düşük şeker içerikli model gıda matrisinde pektinin *in vitro* aroma salınımı üzerindeki etkisi önemsiz bulunmuştur (Bylaite vd., 2003). Hidroksipropilmetil selüloz (HPMC) veya karragenan ile kıvamı arttırılmış model viskoz sistemlerde *in vivo* aroma konsantrasyonunun değişmediğini ancak yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında, duyuusal analiz ile belirlenen aroma yoğunluğunun azaldığı bildirilmiştir. İlave edilen kıvam arttırıcı maddeler ile birlikte aroma algısındaki bu düşüş i) aroma maddelerinin polimere tutunması/bağlanması veya ii) oluşan polimer ağı nedeniyle viskozitenin artması ve aroma bileşenlerinin difüzyonunun azalması ile açıklanmıştır (Cook vd., 2003).

Başka bir çalışmada sakkaroz konsantrasyonundaki artış uçuculuğu yüksek bileşiklerin (etil asetat, 2-pentanon) salınımını arttırmış, uçuculuğu az olan bileşiklerin aroma salınımını yavaşlatmıştır. Sodyum siklamatin etkisi ise önemsiz bulunmuştur (Nahon vd., 1998). Bununla birlikte, analitik olarak tespit edilen bu farklılıklar, duyuusal algıda önemli bir farklılığa

neden olmamıştır. Şeker ilavesinin aroma salınımını arttırması sıvı fazda bulunan uçuculuğu yüksek aroma bileşenlerinin konsantrasyonlarının artması ile açıklanabilir. Daha az uçucu bileşikler için aroma salınımında gözlemlenen azalma, viskozitenin artışına bağlı olarak aroma bileşiklerinin difüzyonunun yavaşlaması ile açıklanmıştır (Guichard, 2002). Bununla birlikte, benzer viskoziteye sahip hidrokolloit çözeltileri aynı aroma salınımı göstermemiştir. Bu da aroma bileşenlerinin salınımında hem viskozitesinin hem de aroma bileşenlerinin kıvam arttırıcı ajanlara bağlanmasının etkili olduğunu göstermektedir. Malkki vd. (1993), aroma bileşiklerinin hidrokolloitlere tutunmasının ve bu maddelerin tüketim sırasında ağızdaki davranışının bazı durumlarda viskoziteden daha büyük etkiye sahip olabileceğini öne sürmüşlerdir. Polisakkaritler, polisakkarit matriksinin fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak aroma bileşiklerinin alkonmasını, salınmasını ve algılanmasını etkilemektedir. Polisakkaritin viskozitesi ve yutulabilme kabiliyeti aroma moleküllerinin matriksten salınımını etkilemektedir. Bunun da aroma algısı üzerine etkisi vardır (Cook vd., 2018). Bu durum düşük yağlı sistemlerde aromanın dengelenmesinde bir avantaj olabilir (Cook vd., 2017).

Protein bileşeninin aroma salınımı üzerine etkisi

Kazein, kazeinat, peyniraltı suyu proteinleri, β -laktoglobulin ve sığır serum albüminleri gibi süt proteinlerinin emülsifiye edici özellikleri çok uzun zamandır bilinmektedir ve süt ürünlerinde jelleştirme, koyulaştırma, emülsifikasyon ve köpürme gibi çeşitli özelliklerinden faydalanmak için gıda katkıları olarak kullanılırlar (Böttger vd., 2019). Globüler yapılarından dolayı denge koşulları altında bulunduğu çevre ile hidrodinamik, hidrostatik, hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri ve konfigürasyonel etkileşimlerde bulunurlar (Voilley ve Etiévant, 2006). Globüler proteinlerde yapıyı stabilize eden ana etken hidrofobik etkileşimlerdir; çünkü sistem, polar olmayan gruplar ve su arasındaki temas yüzey alanını sürekli olarak azaltma eğilimindedir (Chen ve Engelen, 2012). Süt proteinleri arasında β -Laktoglobulin (β -LG) en

çok çalışılan protein olmuştur. β -LG birbirinden bağımsız iki bağlanma bölgesi içerir. β -LG, tersiyer yapısının bir parçası olan, retinol bağlanma bölgesi olarak da bilinen, molekülün merkezinde hidrofobik bir boşluğa sahiptir. Model sulu çözeltilerde yapılan çalışmalarda β -LG'nin hidrofobik aroma bileşiklerini merkezindeki boşluğunda ahkoyarak bu bileşiklerin uçuculuğunu azalttığı bildirilmiştir (Guichard ve Langourieux, 2000; Guichard, 2002; Paravisini ve Guichard, 2016). Hidrofobik bileşikler, β -LG'nin merkezinde bulunan protein boşluğuna hidrofobik etkileşimler ile bağlanmaktadır (Guichard ve Langourieux, 2000). Bu etkileşimler pH, sıcaklık, basınç gibi çevre koşullarından etkilenir (Voilley ve Etiévant, 2006).

Saint-Eve vd. (2006a), *in vitro* (SPME) koşullarda, kazeinat (CAS) ilavesinin yoğurtların aroma salınımını, peyniraltı suyu proteini (WP) ve süt tozu (MPO) ilaveli yoğurtlardan daha fazla geciktirdiğini bildirmiştir. Yoğurtta kazeinat konsantrasyonu arttıkça, yoğurt daha kıvamlı ve daha granüler bir yapı kazanmıştır. Aynı matriks kompozisyonunda olsa da viskozite aroma salınımı ve algısını etkilemiş, aroma salınımı düşük viskoziteli yoğurtlarda daha fazla olmuştur. Protein ilavesi yoğurtların viskozitesi ve tekstürü değiştiğinde ancak aroma salınımı üzerine etki etmiştir. Yoğurt tüketimi sırasında, düşük viskoziteli yoğurtlar ağız ve boğazdaki mukoza zarını daha geniş ölçüde kaplar ve *in vivo* olarak yoğurttan nefese salınacak aroma bileşikleri için daha geniş bir yüzey alanı oluşur. Tüketim sırasında, gıdadan ağız/burun boşluğuna salınan aroma bileşiği miktarı, transferin olacağı yüzey alanı ne kadar yüksek olursa o kadar yüksek olur (Saint-Eve vd., 2006b).

Chua vd. (2017), yağsız süt proteini, peynir altı suyu proteini ve sodyum kazeinat ilaveli yağsız yoğurtlarda *in vitro* (SPME) aroma salınımı ile birlikte reolojik özellikleri incelemiştir. %0,5 konsantrasyonunda peynir altı suyu proteini ile zenginleştirilmiş yağsız yoğurtlar aroma salınımı ve reolojik özellikleri bakımından tam yağlı yoğurtlar ile benzer özellikler göstermiştir. Peynir altı suyu proteini, yağsız süt proteini ve sodyum

kazeinata kıyasla diasetil salınımını daha da azaltırken, bu proteinin asetaldehit ve bütirik asit salınımı üzerine etkisi önemsiz bulunmuştur. Başka bir çalışmada ise peyniraltı suyu proteini ilavesi sodyum kazeinattan daha iyi tekstürel özellikler göstermiştir (Akalın vd., 2012).

Bruzantin vd. (2016), yağsız keçi yoğurdunun fiziksel ve duyuşal özelliklerini iyileştirmek amacı ile farklı oranlarda kıvam arttırıcı ve yağsız süt tozu ilavesi ile yaptığı formülasyonlarda süt tozu ilaveli yoğurtların ticari olarak üretilen yoğurtlara en benzeyeni ve duyuşal olarak en beğenileni olmuştur. Gursel vd. (2016), keçi sütüne ilave edilen peyniraltı protein izolatının ve konsantrasyonunun keçi sütü yoğurdundaki asetaldehit konsantrasyonunu arttırdığını bildirmiştir.

Meyve ve diğer bileşenlerin yoğurda ilavesinin aroma salınımı üzerine etkisi

Yoğurt endüstrisinde kullanılan meyve karışımları i) doğrudan meyve olarak veya (ii) yapay aroma bileşikleri ile birlikte meyve parçaları şeklinde olmak üzere iki farklı şekilde ilave edilebilir (Yıldız, 2016). Mesurolle vd. (2013), meyve sertliğinin ve parçacık büyüklüğünün *in vivo* koşullarda yağsız, pıhtısı kırılmış yoğurda aroma salınımı üzerine etkisini incelemiştir. Sertliği en yüksek meyve parçası (armut) ilaveli yoğurtlarda, *in vivo* koşullarda özellikle yutmadan önce, nerdeyse tüm aroma bileşenlerinin salınımı artmıştır.

Celik vd. (2006), meyve ezmesi ve şeker ilavesinin yoğurdun viskozitesini düşürdüğünü ve peynir altı suyunun ayrılmasını arttırdığını bildirmiştir. %10 meyve ezmesi ve %20 şeker ilavesi duyuşal analizde tüm parametreler bakımından kabul edilebilir bulunmuştur, ancak sonuçlar arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur.

Günümüzde gıda sanayinde doğal bileşenlerin kullanımına olan eğilim artmıştır. Keten tohumu müsilağı (FSM) sağlığa faydalı özellikleri ile ön plana çıkmaktadır. Basiri vd. (2018), FSM ile birlikte karboksimetilselüloz (CMC) ilavesinin yoğurt özelliklerine etkisini incelemiştir. FSM ve FSM + CMC ilavesi yoğurda viskoziteyi arttırarak

serum ayrılmasını azaltmıştır. Ancak FSM ve CMC ilaveli yoğurtların genel kabul edilebilirlik puanları, kontrol grubuna kıyasla düşük çıkmıştır. Kiros vd. (2016), %10-15 havuç suyu ve %0.7 stabile edici madde ilavesinin yoğurdun besin değerini ve toplam karotenoid içeriğini arttırarak serum ayrılmasını baskıladığını bildirmiştir.

SONUÇ

Farklı gıdalardaki aroma salınımının esaslarını anlamak, gıdaların tüketilmesi sırasında ortaya çıkacak aroma algısını açıklamak için güçlü bir araçtır. Bu anlayış ile birlikte bir ürünün geliştirilmesi veya formülasyonu sırasında gıda bileşiminin istenen aroma salınımını sağlayacak şekilde değiştirilmesi mümkündür. Yoğurt bileşiminde yağ bileşeninin aroma bileşiklerinin alkonması üzerine önemli bir etkisi vardır. Yağ aroma bileşiklerini çözerek yoğurdun tüketimi sırasında aroma bileşiklerinin salınımını yavaşlatarak aroma algısını arttırmıştır. Yoğurt formülasyonunda kullanılan farklı polisakarit ve kıvam arttırıcı maddeler, fizikokimyasal özelliğine ve miktarına bağlı olarak aroma alkonmasında, salınımında ve algılanmasında farklı etkiler göstermiş ancak genel olarak artan viskoziteye bağlı olarak aroma salınımını azaltmıştır. Bu da düşük yağ içeriğine sahip yoğurtlarda aromanın dengelenmesinde bir avantaj olarak gözükmektedir. Siklodekstrinler, moleküler boyutlarına ve geometrilerine bağlı olarak farklı aroma bileşikleri ile inklüzyon kompleksleri oluşturabilen en yaygın ve en basit tutuklama/kapsülleme sistemlerinden biridir. Gıdalarda en yaygın kullanılan tutuklama ajanı olan β -CD, yoğurda bazı aroma bileşiklerini tutarak bu bileşiklerin salınımını azaltmış ve β -CD ilaveli yağsız yoğurdun aroma salınımını normal yağlı yoğurt ile benzer olmuştur.

Tüketici taleplerini karşılamak üzere sağlıklı, az yağlı veya düşük şekerli gıdaların yeniden formüle edilmesi ürünün aroma salınımını etkilemektedir. İstenen aroma profilini elde etmek için formülasyonu yapılan bileşenlerin ürünlerdeki aroma salınımını *in vivo* koşullarda nasıl değiştirdiğinin bilinmesi ürünün son aroma algısı hakkında fikir vermesi bakımından önemlidir.

KAYNAKLAR

- Akalın, A. S., Unal, G., Dinkci, N., Hayaloglu, A.A. (2012). Microstructural, textural, and sensory characteristics of probiotic yogurts fortified with sodium calcium caseinate or whey protein concentrate. *J Dairy Sci*, 95(7): 3617-3628.
- Akgun, A., Yazici, F., Gulec, H.A. (2016). Effect of reduced fat content on the physicochemical and microbiological properties of buffalo milk yoghurt. *LWT-J Food Sci Technol*, 74: 521-527.
- Ayed, C., Martins, S.I., Williamson, A.M., Guichard, E. (2018). Understanding fat, proteins and saliva impact on aroma release from flavoured ice creams. *Food Chem*, 267: 132-139.
- Aziznia, S., Khosrowshahi, A., Madadlou, A., Rahimi, J. (2008). Whey protein concentrate and gum tragacanth as fat replacers in nonfat yogurt: chemical, physical, and microstructural properties. *J Dairy Sci*, 91(7): 2545-2552.
- Basiri, S., Haidary, N., Shekarfroush, S.S., Niakousari, M. (2018). Flaxseed mucilage: A natural stabilizer in stirred yogurt. *Carbohydr Polym*, 187: 59-65.
- Boesveldt, S., de Graaf, K. (2017). The differential role of smell and taste for eating behavior. *Percept*, 46(3-4): 307-319.
- Böttger, F., Dupont, D., Marcinkowska, D., Bajka, B., Mackie, A., Macierzanka, A. (2019). Which casein in sodium caseinate is most resistant to in vitro digestion? Effect of emulsification and enzymatic structuring. *Food Hydrocoll*, 88: 114-118.
- Brauss, M.S., Linforth, R.S., Cayeux, I., Harvey, B., Taylor, A.J. (1999). Altering the fat content affects flavor release in a model yogurt system. *J Agric Food Chem*, 47(5): 2055-2059.
- Bruzantin, F.P., Daniel, J.L.P., da Silva, P.P.M., Spoto, M.H.F. (2016). Physicochemical and sensory characteristics of fat-free goat milk yogurt with added stabilizers and skim milk powder fortification. *J Dairy Sci*, 99(5): 3316-3324.
- Bylaite, E., Meyer, A.S., Adler-Nissen, J. (2003). Changes in macroscopic viscosity do not affect the release of aroma aldehydes from a pectinaceous food model system of low sucrose content. *J Agric Food Chem*, 51(27): 8020-8026.
- Celik, S., Bakırcı, I., Şat, I.G. (2006). Physicochemical and organoleptic properties of yogurt with cornelian cherry paste. *Int J Food Prop*, 9(3): 401-408.
- Chen, C., Zhao, S., Hao, G., Yu, H., Tian, H., Zhao, G. (2017). Role of lactic acid bacteria on the yogurt flavour: A review. *Int J Food Prop*, 20(sup1): S316-S330.
- Chen, J., Engelen, L. (eds) (2012). *Food oral processing: fundamentals of eating and sensory perception*. Blackwell Publishing, UK, 114 p.
- Chua, D., Deeth, H.C., Oh, H.E., Bansal, N. (2017). Altering the casein to whey protein ratio to enhance structural characteristics and release of major yoghurt volatile aroma compounds of non-fat stirred yoghurts. *J Dairy Sci*, 74: 63-73.
- Conde-Petit, B., Nuessli, J., Heinemann, C., Escher, F. (2006). From Helical Starch Inclusion Complexes to Supramolecular Starch Assemblies. In NSTI Nanotech 2006: 2006 NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show, Boston, May 7-11, 2006, NSTI, p701-704.
- Cook, D.J., Linforth, R.S., Taylor, A.J. (2003). Effects of hydrocolloid thickeners on the perception of savory flavors. *J Agr Food Chem*, 51(10): 3067-3072.
- Cook, S.L., Bull, S.P., Methven, L., Parker, J.K., Khutoryanskiy, V.V. (2017). Mucoadhesion: A food perspective. *Food Hydrocoll*, 72: 281-296.
- Cook, S.L., Methven, L., Parker, J.K., Khutoryanskiy, V.V. (2018). Polysaccharide food matrices for controlling the release, retention and perception of flavours. *Food Hydrocoll*, 79: 253-261.
- Decourcelle, N., Lubbers, S., Vallet, N., Rondeau, P., Guichard, E. (2004). Effect of thickeners and sweeteners on the release of blended aroma compounds in fat-free stirred yoghurt during shear conditions. *Int Dairy J*, 14(9): 783-789.
- Delahunty, C.M., Piggott, J. R., Conner, J.M., Paterson, A. (1996). Comparison of dynamic flavour release from hard cheeses and analysis of headspace volatiles from the mouth with flavour perception during consumption. *J Sci Food Agric*, 71(3): 273-281.

- Dél  ris, I., Lauverjat, C., Tr  l  a, I. C., & Souchon, I. (2007). Diffusion of aroma compounds in stirred yogurts with different complex viscosities. *J Agric Food Chem*, 55(21): 8681-8687.
- Eker, T., Cabaroğlu, T. (2018). Gıdaların T  ketilmesi Sırasında Retronazal Yolla Aroma Salınımının Belirlenmesi. *GIDA*, 43(1): 64-77.
- Esteban-Fern  ndez, A., Rocha-Alcubilla, N., Mu  oz-Gonz  lez, C., Moreno-Arribas, M.V., Pozo-Bay  n, M.  . (2016). Intra-oral adsorption and release of aroma compounds following in-mouth wine exposure. *Food Chem*, 205: 280-288.
- Frank, D., Kaczmarska, K., Paterson, J., Piyasiri, U., Warner, R. (2017). Effect of marbling on volatile generation, oral breakdown and in mouth flavor release of grilled beef. *Meat Sci*, 133, 61-68.
- Goncalves, A., Estevinho, B.N., Rocha, F. (2016). Microencapsulation of vitamin A: A review. *Trends Food Sci Technol*, 51: 76-87.
- Guichard, E. (2002). Interactions between flavor compounds and food ingredients and their influence on flavor perception. *Food Rev Int*, 18(1): 49-70.
- Guichard, E., Langourieux, S. (2000). Interactions between β -lactoglobulin and flavour compounds. *Food Chem*, 71(3): 301-308.
- Guichard, E., Salles, C., Morzel, M. Le Bon A. M. (eds) (2017). *Flavour: From food to perception*, John Wiley & Sons, Ltd. Published.
- Gursel, A., Gursoy, A., Anli, E. A. K., Budak, S. O., Aydemir, S., Durlu-Ozkaya, F. (2016). Role of milk protein-based products in some quality attributes of goat milk yogurt. *J Dairy Sci*, 99(4): 2694-2703.
- Heilig, A., Heimpel, K., Sonne, A., Schieberle, P., Hinrichs, J. (2016). An approach to adapt aroma in fat-free yoghurt systems: Modelling and transfer to pilot scale. *Int Dairy J*, 56: 101-107.
- Kant, A., Linforth, R.S., Hort, J., Taylor, A.J. (2004). Effect of β -cyclodextrin on aroma release and flavor perception. *J Agric Food Chem*, 52(7): 2028-2035.
- Kızılaslan, N. ve Solak,   . (2016). Yoğurt ve İnsan Sağlığı   zerine Etkileri. *Gağiosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*, (12): 52-59.
- Kiros, E., Seifu, E., Bultosa, G., Solomon, W.K. (2016). Effect of carrot juice and stabilizer on the physicochemical and microbiological properties of yoghurt. *LWT- J Food Sci Technol*, 69: 191-196.
- Lubbers, S., Decourcelle, N., Vallet, N., Guichard, E. (2004). Flavor release and rheology behavior of strawberry fatfree stirred yogurt during storage. *J Agric Food Chem*, 52(10): 3077-3082.
- Malkki, Y., Heinio, R.L., Autio, K. (1993). Influence of oat gum, guar gum and carboxymethyl cellulose on the perception of sweetness and flavour. *Food Hydrocoll*, 6(6): 525-532.
- Mei, J.B., Reineccius, G.A., Knighton, W.B., Grimsrud, E.P. (2004). Influence of strawberry yogurt composition on aroma release. *J Agric Food Chem*, 52(20): 6267-6270.
- Mesurole, J., Saint-Eve, A., D  l  ris, I., Souchon, I. (2013). Impact of fruit piece structure in yogurts on the dynamics of aroma release and sensory perception. *Molecules*, 18(5): 6035-6056.
- Mosca, A.C., Chen, J. (2017). Food-saliva interactions: Mechanisms and implications. *Trends Food Sci Technol*, 66: 125-134.
- Nahon, D. F., Navarro y Koren, P.A., Roozen, J.P., Posthumus, M.A. (1998). Flavor release from mixtures of sodium cyclamate, sucrose, and an orange aroma. *J Agric Food Chem*, 46(12): 4963-4968.
- Nongonierma, A.B., Springett, M., Le Qu  r  , J.L., Cayot, P., Voilley, A. (2006). Flavour release at gas/matrix interfaces of stirred yoghurt models. *Int Dairy J*, 16(2): 102-110.
- Paravisini, L., Guichard, E. (2016). Interactions between aroma compounds and food matrix. In E. Guichard, C. Salles, M. Morzel, & A. Le Bon (Eds.), *Flavour: From food to Perception*, Chichester, West Sussex, UK: John Wiley & Sons., p208-234.

- Ployon, S., Morzel, M., Canon, F. (2017). The role of saliva in aroma release and perception. *Food Chem*, 226: 212-220.
- Pu, D., Zhang, H., Zhang, Y., Sun, B., Ren, F., Chen, H., Xie, J. (2019). Characterization of the oral breakdown, sensory properties, and volatile release during mastication of white bread. *Food Chem*, 298 (2019): 125003.
- Reineccius, G. (2019). Use of proteins for the delivery of flavours and other bioactive compounds. *Food Hydrocoll*, 86: 62-69.
- Saint-Eve, A., Kora, E. P., Martin, N. (2004). Impact of the olfactory quality and chemical complexity of the flavouring agent on the texture of low fat stirred yogurts assessed by three different sensory methodologies. *Food Qual Prefer*, 15(7-8); 655-668.
- Saint-Eve, A., Martin, N., Guillemin, H., Sémon, E., Guichard, E., Souchon, I. (2006a). Flavored yogurt complex viscosity influences real-time aroma release in the mouth and sensory properties. *J Agric Food Chem*, 54(20): 7794-7803.
- Saint-Eve, A., Lévy, C., Martin, N., Souchon, I. (2006b). Influence of proteins on the perception of flavored stirred yogurts. *J Dairy Sci*, 89(3): 922-933.
- Schoumacker, R., Martin, C., Thomas-Danguin, T., Guichard, E., Le Quéré, J. L., Labouré, H. (2017). Fat perception in cottage cheese: The contribution of aroma and tasting temperature. *Food Qual Prefer*, 56, 241-246.
- Soukoulis, C., Biasioli, F., Aprea, E., Schuhfried, E., Cappellin, L., Märk, T.D., Gasperi, F. (2012). PTR-TOF-MS analysis for influence of milk base supplementation on texture and headspace concentration of endogenous volatile compounds in yogurt. *Food Bioprocess Tech*, 5(6): 2085-2097.
- Sun, D., Chen, J., Lu, W., Zheng, X. (1999). Heats of adsorption of some organic compounds on β -cyclodextrin determined by gas-solid chromatography. *J Chromatogr*, 864(2): 293-298.
- Syarifuddin, A., Septier, C., Salles, C., Thomas-Danguin, T. (2016). Reducing salt and fat while maintaining taste: An approach on a model food system. *Food Qual Prefer*, 48: 59-69.
- Tan, S., Ebrahimi, A., Langrish, T. (2019). Smart release-control of microencapsulated ingredients from milk protein tablets using spray drying and heating. *Food Hydrocoll*, 92: 181-188.
- Tian, H., Shen, Y., Yu, H., He, Y., Chen, C. (2017). Effects of 4 probiotic strains in coculture with traditional starters on the flavor profile of yogurt. *J Food Sci*, 85(5): 1693-1701.
- Tian, H., Shi, Y., Zhang, Y., Yu, H., Mu, H., Chen, C. (2019). Screening of aroma-producing lactic acid bacteria and their application in improving the aromatic profile of yogurt. *J Food Biochem*, e12837.
- Vidrih, R., Zlatic, E., Hribar, J. (2009). Release of strawberry aroma compounds by different starch-aroma systems. *Czech J Food Sci*, 27: S58-S61.
- Voilley, A., Etiévant, P. (eds.). (2006). *Flavour in Food*. Taylor & Francis, CRC Press, the USA, 177p.
- Voşgan, Z., Dumuța, A., Mihali, C., Mihalescu, L., Dippong, T., Moldovan, A. (2016). The Influence of the Fruits Addition on the Quality Characteristics of Yogurt. *J Anim Sci Biotechnol*, 49(2): 86-90.
- Yildiz, F. (ed). (2016). *Development and manufacture of yogurt and other functional dairy products*. CRC press, the USA, 5p.
- Zhao, L., Feng, R., Ren, F., Mao, X. (2018). Addition of buttermilk improves the flavor and volatile compound profiles of low-fat yogurt. *LWT- J Food Sci Technol*, 98: 9-17.



**YER FISTIĞI (*Arachis Hypogaea* L.) YAĞININ FARKLI ÇÖZÜCÜLER
KULLANILARAK DEĞİŞKEN GÜÇ VE FREKANSLARDA
ULTRASON DESTEKLİ EKSTRAKSİYONU**

Onur Ketenoğlu*

Çankırı Karatekin Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Çankırı, Türkiye

Geliş / *Received*: 10.10.2019; Kabul / *Accepted*: 13.01.2020; Online baskı / *Published online*: 19.01.2020

Ketenoğlu, O. (2020). Yer fıstığı (*Arachis Hypogaea* L.) yağının farklı çözücüler kullanılarak değişken güç ve frekanslarda ultrason destekli ekstraksiyonu. *GIDA* (2020) 45 (1): 61-71 doi: 10.15237/gida.GD19132

Ketenoğlu, O. (2020). *Ultrasound-assisted extraction of peanut (*Arachis Hypogaea* L.) oil under varying power and frequencies using different solvents. GIDA (2020) 45 (1): 61-71 doi: 10.15237/gida.GD19132*

ÖZ

Bu çalışmada, ultrason destekli ekstraksiyonla elde edilen yer fıstığı yağının ekstraksiyon verimi ve yağ asidi bileşimi üzerine farklı frekans ve ultrasonik gücün etkileri incelenmiştir. Ayrıca yağ ekstraksiyonunda yaygın olarak tercih edilen hekzan yerine, daha az toksik ve çevreye daha duyarlı bir çözücü olan etanolün kullanılabilirliği araştırılmıştır. Etanol ve hekzana ait en yüksek ekstraksiyon verimleri 37 kHz frekans ve %80 güçte elde edilmiştir ve sırasıyla %40.55 ve %45.19 olarak hesaplanmıştır. Hekzan verimlerinin tüm örneklerde etanole göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. 37 kHz ve 80 kHz frekanstaki etanol ekstraktlarının verimleri arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur. Varyans analizi sonucunda, hekzan verimleri üzerine yalnızca frekansın etkili olduğu belirlenirken, etanol verimleri üzerine işlem koşullarının interaksiyon etkileri tespit edilmiştir. Bulgular frekans artışının verimde azalmaya neden olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, uygulanan farklı işlem koşullarının yağ asidi bileşiminde önemli bir etki göstermediği tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Ultrason destekli ekstraksiyon, etanol, yer fıstığı yağı, oleik asit, frekans, ultrasonik güç

**ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF PEANUT (*Arachis Hypogaea* L.)
OIL UNDER VARYING POWER AND FREQUENCIES USING DIFFERENT
SOLVENTS**

ABSTRACT

The effects of extraction frequency and ultrasonic power on the extraction yield and fatty acid composition of peanut oil were studied. Also, the usability of ethanol as a less toxic and environmentally friendly alternative to hexane –the most common solvent in conventional oil extraction– was investigated. The highest extraction yields for ethanol and hexane were respectively %40.55 and %45.19 at 37 kHz frequency and 80% ultrasonic power. It was determined that all samples extracted with hexane had higher extraction yields than those of ethanol. The differences between the ethanolic extraction yields at 37 and 80 kHz were statistically significant. The major factor affecting the extraction yield was the frequency for hexane; while interactional effects of all process conditions were significant for ethanolic extraction. The increment of ultrasonic frequency caused a decrease in the extraction yields. Results revealed that different processing conditions did not significantly affect fatty acid compositions.

Keywords: ultrasound-assisted extraction, ethanol, peanut oil, oleic acid, frequency, ultrasonic power

* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ ketenoglu@karatekin.edu.tr,

☎ (+90) 376 218 9532,

☎ (+90) 376 218 9536

Onur Ketenoğlu; ORCID no: 0000-0001-7584-8389

GİRİŞ

Yer fıstığı (*Arachis hypogaea* L.), baklagiller familyasına ait Güney Amerika kökenli tek yıllık bir bitki olup, bileşiminde %55'e varan oranlarda yağ içerebilmektedir (Kadiroğlu, 2018). Yer fıstığının insan diyetindeki önemi, içerdiği bu yağın büyük miktarının sağlık üzerine olumlu etkileri bilimsel olarak araştırılmış ve raporlanmış olan tekli (oleik asit) ve çoklu (linoleik asit) doymamış yağ asitlerinden oluşmasıdır. Yer fıstığının bazı rapor edilen oleik ve linoleik asit konsantrasyonları sırasıyla şu şekildedir: %69 ve %43 (Rodriguez-Estrada vd., 2017), %45-60 ve %20-40 (Kadiroğlu, 2018), %35-69 ve %12-43 (Anonim, 2012), %58 ve %21 (Aluyor vd., 2009). Bugün dünyada en fazla yer fıstığı üretimine sahip ülkeler arasında Çin ve Hindistan öne çıkmaktadır. Türkiye'nin 2017 FAO verilerine göre, kabuklu yer fıstığı hasadı yapılan alanı 40 bin hektar civarında olup, üretim kapasitesi ise 165 bin tondur (FAO, 2019). Çin, ülkemize kıyasla ortalama 104 kat daha fazla üretim kapasitesine sahip olup, FAO verilerine göre 2017 yılı üretim miktarı yaklaşık 17 milyon tondur (FAO, 2019). Bilimsel veriler ışığında bu yağların sağlık açısından elzem olan yağ asitleri bakımından zengin olması dolayısı ile üretim ve tüketimi dünyada yaygındır.

Yer fıstığı yağı, yüksek sıcaklığa dayanıklı olup, kızartma işleminde rahatlıkla kullanılabilen bir yağdır (Onat, 2018). Piyasada genellikle rafine edilmiş olarak satışa sunulan bu yağ, tüketicinin işlem görmemiş ve dolayısıyla kalitesinde değişim meydana gelmemiş soğuk sıkım yağ talebine istinaden soğuk pres yöntemiyle de elde edilebilmektedir. Ancak, herhangi bir rafinasyon uygulanmamış yer fıstığı yağı tüketicinin algısında olumsuz etki bırakabilecek yoğun karakteristik tat ve kokuya sahiptir. Ayrıca rafinasyon işlemi, ekstraksiyon sırasında yer fıstığından yağa geçebilecek bazı alerjenlerin de etkisinin azaltılması veya ortadan kaldırılmasında da rol oynamaktadır (Crevel vd., 2000).

Bununla birlikte geleneksel yöntemlerden farklı olarak, yağlı tohum ve meyvelerden yağ eldesinde ısl olmayan yenilikçi teknolojilerin kullanımı giderek önem kazanmaktadır.

Bu teknolojiler arasında popülerite kazanmış olan ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi daha az süre, enerji ve çözücü gereksinimi ve daha yüksek saflıkta ürün eldesi bakımından iyi bir alternatif olarak öne çıkmaktadır (Chemat vd., 2008). Ultrason destekli ekstraksiyonda, ultrasonik banyo veya sonikatör problemler kullanılarak çeşitli frekanslarda ses dalgaları üretilmekte ve bu ses dalgaları biyolojik materyal üzerine gönderilerek akustik kavitasyon yaratılmaktadır. Bunun sonucunda hücre yapısı bozulmakta ve bileşenlerin açığa çıkması sağlanmakta, böylece ekstraksiyon gerçekleştirilmektedir. Temizleme, çözündürme, homojenizasyon, gaz giderme (degassing), emülsiyon oluşturma gibi farklı amaçlar için de kullanılabilen ultrason teknolojisinin ekstraksiyon amacıyla kullanımının diğer avantajları arasında; daha hızlı kütle ve enerji transferi, seçici ekstraksiyon, daha küçük boyutlu ekipman kullanımı, daha homojen ekstraksiyon ortamı oluşturulması ve ekstraksiyon boyunca sıcaklık ve konsantrasyon gradyanı oluşmaması sıralanabilir (Chemat vd., 2008). Tüm bu sıralanan özellikleri bakımından ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi, yağ ekstraksiyonu ile sınırlı kalmamış ve bir çok gıda ürününde kendine uygulama alanı edinmiştir. Bu uygulamalara; çaydan fenolik bileşenlerin ekstraksiyonu (Afroz Bakht vd., 2019), üzüm çekirdeğinden yağ ve fenolik bileşen ekstraksiyonu (Da Porto vd., 2013), medikal bitkilerden antioksidan madde ekstraksiyonu (Dong vd., 2010), mikroalglerden yağ ekstraksiyonu (Escorsim vd., 2018), ultrason destekli kurutma prosesleri (Topdaş ve Ertugay, 2013; Tüfekçi ve Özkal, 2015), ve çeşitli yağlı materyallerden yağ ekstraksiyonu (Chanoti ve Tzia, 2017; Li vd., 2004; Ma vd., 2019; Perrier vd., 2017; Taticchi vd., 2019) örnek olarak gösterilebilir.

Petrol türevi bir bileşen olan heksan polar olmayan yapısı, yağa karşı olan yüksek seçiciliği ve çözücü kabiliyeti nedeniyle, günümüzde geleneksel yağ ekstraksiyonunda en çok tercih edilen çözücüdür. Bununla birlikte, heksan kullanımının insan sağlığı ve çevre üzerine olumsuz bir çok etkisi rapor edilmiştir. Yanıcı ve tahriş edici özelliklerinin yanı sıra, üreme

sistemleri üzerine olan olumsuz etkisi ve çevre açısından tehlikeli bir bileşen olduğu bildirilen hekzana uzun süreli maruz kalmanın merkezi sinir sistemini de olumsuz etkilediği ifade edilmiştir (Li vd., 2014). Bu sebeplerden ötürü, rafinasyon sonrasında yağda kalıntı olarak bulunabilen bu çözücünün yerine geçebilecek alternatif çözücü arayışları üzerine olan ilginin arttığı belirtilmektedir (Baümler vd., 2016). Bu alternatifler arasında ise petrol türevleri yerine çeşitli bitkisel kaynaklardan elde edilen, daha güvenli ve toksisitesi düşük alkol türevleri ön plana çıkmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, yenilikçi ve ısıl olmayan bir teknoloji olan ultrason destekli ekstraksiyon tekniğinde değişken işlem koşullarının (frekans ve güç) elde edilen ekstraktlar üzerine etkilerinin irdelenmesi ve ayrıca hekzan alternatifi olarak öne sürülebilecek etanolün farklı işlem koşullarında yer fıstığı yağı ekstraksiyonundaki kullanılabilirliğinin incelenmesidir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Çalışmada hammadde olarak kullanılan ve herhangi bir ön işleme tabi tutulmamış (tuzlanmamış, kavrulmamış) çiğ yer fıstıkları Çankırı'daki yerel marketlerden satın alınmıştır. Fıstıklardan yağ ekstraksiyonu amacıyla kullanılan analitik saflıktaki etanol ve *n*-hekzan Merck firmasından (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) temin edilmiştir. Yağ asidi metil esteri karışımı (Supelco®, 37 Component FAME Mix) ve yağ asitlerini esterleştirme için gerekli analitik saflıktaki diğer kimyasallar ise Sigma-Aldrich firmasından (Sigma-Aldrich, St. Louis, A.B.D) temin edilmiştir.

Ultrason destekli ekstraksiyon

Çiğ yer fıstıkları bir kahve değirmeni (Sinbo SCM2934, Türkiye) yardımıyla öğütüldükten sonra, 10 ± 0.05 g numune 100 mL ölçekli cam bir behere aktarılarak üzerine 90 mL çözücü ilave edilmiştir. Çözücü olarak etanol ve *n*-hekzan seçilmiştir. Beherler daha sonra maksimum çıkış gücü 580 W olan sıcaklık kontrollü bir ultrasonik su banyosunun (Elmasonic P60-H, Elma Schmidbauer GmbH, Almanya) merkez

noktasına yerleştirilmiştir. Denemede uygulanan değişken ultrasonik frekans ve güç değerleri ile diğer sabit parametreler aşağıdaki gibidir:

- Ekstraksiyon süresi: 8 dakika
- Ekstraksiyon sıcaklığı: 30 ± 2 °C
- Ultrasonik güç: %60 (348 W), %80 (464 W), %100 (580 W)
- Ultrason frekansı: 37 ve 80 kHz

Ultrasonik ekstraksiyon sırasında sıcaklık yükselmesinin önüne geçmek için buz tamponlar kullanılmıştır. Ekstraksiyonu tamamlanan numuneler bir balona aktarıldıktan sonra içerisindeki çözücü döner buharlaştırıcıda (Hei-VAP Precision ML/G1, Heidolph Instruments GmbH & CO.KG, Almanya) 50 °C sıcaklık ve 150-200 mbar vakum altında uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, elde edilen ekstraktlarda mevcut olabilecek çözücü kalıntılarını uzaklaştırmak amacıyla numuneler 40 °C sıcaklıktaki etüvde (Wisd Thermostable, Daihan Scientific, Kore) bir gece bekletilmiştir. Elde edilen numunelere ait ekstraksiyon verimleri Denklem 1'de verildiği şekilde hesaplanmıştır:

$$Verim (\%) = \left(\frac{m_e}{m_b} \right) \times 100 \quad \text{Denklem (1)}$$

Bu denklemde, m_e : elde edilen ekstraktın ağırlığını, m_b : numunelerin başlangıçtaki ağırlığını ifade etmektedir.

Yağ asidi dağılımının gaz kromatografi (GC) ile belirlenmesi

Ekstraktların yağ asidi bileşiminin belirlenebilmesi için öncelikle numuneler ISO standart yöntemde (No: 12966-2:2011) (ISO, 2011) açıklanan şekilde yağ asidi metil esterleri formuna dönüştürülmüştür. Hazırlanan esterler, üzerinde alev iyonlaştırılmalı dedektöre (FID) bağlı 60 m uzunluk \times 0.25 mm iç çap \times 0.20 μ m film kalınlığına sahip bir TR-CN100 (Teknokroma, İspanya) kapiler kolon bulunan bir Shimadzu GC-2010 Plus gaz kromatografi cihazına (Shimadzu, Japonya) enjekte edilmiştir. Gaz kromatografi cihazına ait yöntem parametreleri aşağıdaki gibidir:

- Enjeksiyon bloğu sıcaklığı: 230 °C
- Kolon fırını sıcaklığı: 190 °C

- Dedektör sıcaklığı: 240 °C
- Kolon akış hızı: 0.10 mL/dk
- Akış modu: Split (Split oranı 1:150)
- Taşıyıcı gaz: Helyum

Elde edilen piklerin tanımlanması için yağ asidi metil esteri karışımından (37 Component FAME Mix) ve ön çalışmalardan faydalanılmıştır.

İstatistiksel analiz

Tüm ekstraksiyon işlemleri ve GC analizleri 2 tekerrürlü olacak şekilde yapılmıştır. Elde edilen veriler ortalama±standart hata şeklinde ifade edilmiştir. Farklı çözücüler kullanarak farklı ultrasonik koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyonların, elde edilen ekstraktların oleik asit miktarı ve ekstraksiyon verimleri üzerindeki etkileri Minitab 16 paket programı (Minitab Inc., A.B.D.) yardımıyla yapılan çift yönlü varyans analizi (Two-Way ANOVA) ile belirlenmiştir. Varyans analiz tabloları oluşturulurken uygulanan frekans, ultrasonik güç ve bunların interaksiyonlarının ortalamalar üzerindeki öneminin istatistiksel olarak incelenmesindeki

güven aralığı %95 olarak belirlenmiştir. İstatistik olarak önemli olduğu tespit edilen ortalamaların çoklu karşılaştırmalarında ise yine %95 güven aralığına sahip Tukey testi uygulanmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Ekstraksiyon verimi

Yapılan çalışmada, bir yandan ultrason destekli ekstraksiyon işleminde değişken ultrasonik güç ve frekanslarının yer fıstığı yağı ekstraksiyonuna olan etkileri incelenirken, diğer yandan yağ ekstraksiyonunda geleneksel olarak kullanılan hekzanın yanı sıra toksisitesi daha az ve daha çevre dostu olan bir çözücü olarak etanolün kullanılabilirliği araştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre, tüm çalışma boyunca hekzan ile ekstrakte edilen örneklerin ekstraksiyon verimleri etanol ile ekstrakte edilen gruba göre daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 1). Kullanılan çözücüler karşılaştırıldığında, etanol ve hekzana ait en yüksek verimler 37 kHz ve %80 güçte elde edilmiş olup, sırasıyla %40.55 ve %45.19 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 1. Farklı koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyonlara ait verimler (%)

Table 1. Yields of extractions performed at different conditions (%)

Frekans Frequency (kHz)	Ultrasonik güç Ultrasound power (%)	Verim Yield	
		Etanol Ethanol	Hekzan Hexane
37	60	14.42±0.40 ^B	43.10±0.54 ^{ab}
	80	40.55±3.27 ^A	45.19±0.54 ^a
	100	39.01±1.83 ^A	44.49±1.22 ^a
80	60	4.48±0.87 ^C	29.65±1.32 ^c
	80	4.68±0.17 ^C	36.91±2.33 ^{abc}
	100	4.52±0.10 ^C	32.63±4.00 ^{bc}

*Veriler ortalama±std.hata şeklinde ifade edilmiştir (n=2).

**Farklı büyük harfleri (A, B, C,..) taşıyan ortalamalar çözücü olarak etanol kullanılan örneklere ait olup, aralarındaki fark istatistik olarak önemlidir (P <0.05).

***Farklı küçük harfleri (a, b, c,..) taşıyan ortalamalar çözücü olarak hekzan kullanılan örneklere ait olup, aralarındaki fark istatistik olarak önemlidir (P <0.05).

* Values are expressed as mean±std.error (n=2).

** Difference between means having different uppercase letters for ethanolic extraction are statistically significant (P <0.05).

*** Difference between means having different lowercase letters for hexane extraction are statistically significant (P <0.05).

Uygulanan ultrasonik güç sabit tutulduğunda, her iki grubun 37 kHz frekanstaki ekstraksiyon verimleri 80 kHz'teki verimlere göre daha yüksek bulunmuştur. Örneğin, 37 kHz frekansta %60 güç uygulandığında etanol ve hekzanın ekstraksiyon verimleri sırasıyla %14.42 ve %43.10 olarak tespit edilmişken, aynı güçte frekans 80 kHz'e çıkarıldığında etanol ve hekzan verimlerinde sırasıyla %69 ve %31.2 oranında düşüş saptanmıştır.

Her iki grubun ekstraksiyon verimlerinde her iki frekansta da, uygulanan güç %60'tan %80'e çıkarıldığında artış gözlenmiş, ancak uygulanan güç %100'e çıkarıldığında gözlenen düşüşün istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir ($P > 0.05$). Çizelge 1'e göre, etanol ekstraksiyonu ile elde edilen en düşük verim %4.48 ile 80 kHz frekans ve %60 güç uygulamasında elde edilirken, hekzana ait en düşük verim ise yine aynı ekstraksiyon koşullarında %29.65 olarak bulunmuştur.

Literatür verileri incelendiğinde, ekstraksiyon verimleri kullanılan çözücüye göre kıyaslandığında –kullanılan materyal ve yöntemler değişmekle birlikte– hekzan veriminin etanole göre düşük olduğunu (Breil vd., 2016) ya da verimler arasında önemli bir fark olmadığını belirten çalışmalar (Sbihi vd., 2018) mevcut olsa da, genel olarak kabul edilen kanı, bu çalışmanın sonuçlarına benzer şekilde hekzan veriminin etanol veriminden daha yüksek olduğudur (Ferreira-Dias vd., 2003; Li vd., 2014; Zhuang vd., 2018). Li vd. (2014), etanol veriminin hekzandan daha düşük olmasının sebebinin çözücü polariteleri arasındaki farklılık ile açıklamaktadır. Araştırmacılar, terpen ve alkol gibi maddelerin genellikle *n*-hekzandan daha polar olduklarını ifade etmişlerdir. Ayrıca, etanolün hekzana göre daha az seçici bir çözücü olması sonucunda yağ dışı diğer bileşenleri de çözerek bünyesine kattığı düşünülmektedir. Bunun sonucu olarak bu çalışmadaki göze çarpan diğer bir nokta, hekzan ile elde edilen ekstraktların daha yağa benzer bir yapıya sahip oldukları, buna karşın etanol ekstraktlarının ise daha katı ve sürülebilir bir yapıya sahip olduklarıdır. Nitekim, etanolün daha az seçici olduğu gerçeği daha önceden yapılan çalışmalarda da ifade edilmiştir

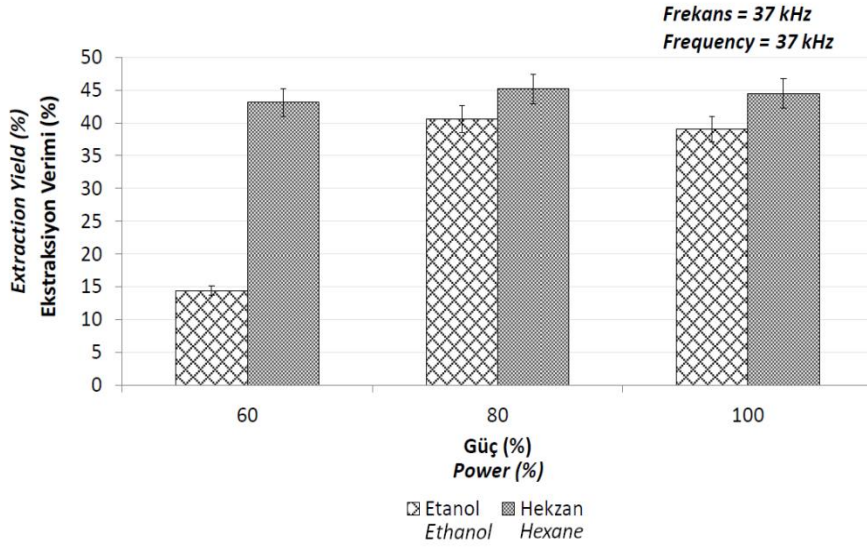
(Bäumler vd., 2016; Bäumler vd., 2017; Ferreira-Dias vd., 2003).

Örneklerin 37 kHz ve 80 kHz frekanslardaki ekstraksiyon verimleri sırasıyla Şekil 1 ve Şekil 2'de gösterilmektedir. Buna göre, etanol veriminin her koşulda hekzana göre düşük bulunduğu ve her iki çözücünün de ekstraksiyon veriminin ise 37 kHz frekanstan 80 kHz frekansa geçildiğinde düşüş gösterdiği açıkça gözlenmektedir. Benzer şekilde, Muatasim vd. (2018) yaptıkları çalışmada ultrason frekansını 20 kHz'ten 50 kHz'e çıkardıklarında ekstraksiyon veriminin yarıya düştüğünü ifade etmişlerdir. Araştırmacılara göre, ihtiyaç duyulan akustik genişleme için gereken zaman yüksek ultrason frekanslarında sağlanamamakta ve bu yüzden ultrasonik kavitasyonda azalma oluşmaktadır. Çözücülerin farklı ultrasonik koşullarda verimlerinin karşılaştırılması ise etanol için Şekil 3'te, hekzan için ise Şekil 4'te verilmektedir. Buna göre, etanol ekstraksiyonunun verimi 37 kHz frekansta, %60 güçten %80 güce çıkıldığında keskin bir artış göstermekle birlikte, benzer bir artış daha ılımlı olmakla birlikte hekzan ile ekstrakte edilen grubun veriminde de gözlenmektedir. Şekil 3 ve 4'te gözlemlendiği üzere frekans artışının verimde azalmaya yol açabileceği önceki çalışmalarda da ifade edilmiştir (Muatasim vd., 2018; Afroz Bakht vd., 2019).

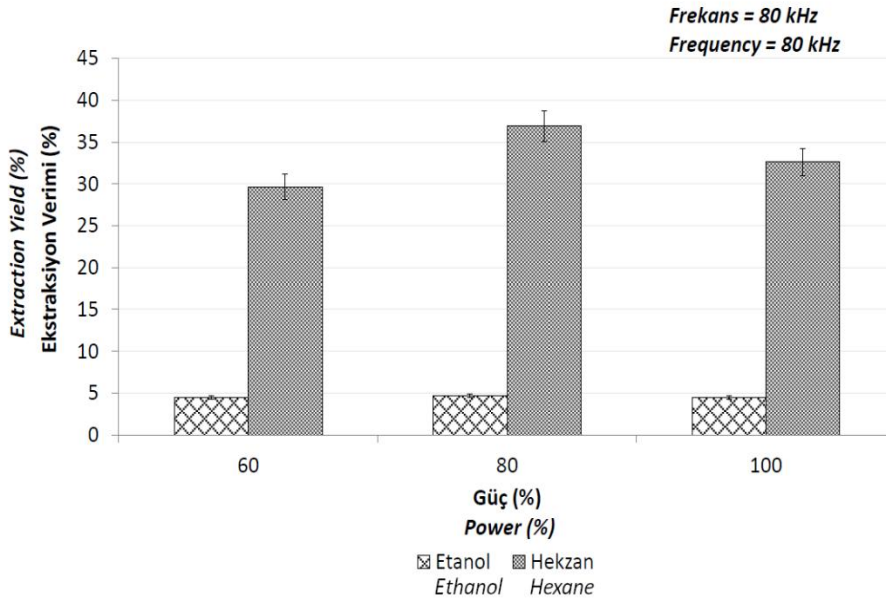
Çizelge 1'e göre, 37 kHz frekansta ve %60 güç uygulandığında etanol için elde edilen verim değeri ile aynı frekansta diğer güç değerlerinde elde edilen verimler arasındaki farklılık istatistik olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Frekans 80 kHz'e çıkarıldığında ise farklı güç değerlerinde elde edilen verimler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmemiştir ($P > 0.05$). Bununla birlikte etanol kullanılarak farklı frekanslarda ve aynı güç değerlerinde elde edilen verim ortalamaları istatistiksel olarak birbirinden farklı bulunmuştur. Hekzan ekstraksiyonunda ise, 80 kHz frekans ve %60 güçteki elde edilen verim ortalaması (%29.65), 37 kHz frekansta elde edilen tüm ortalamalardan farklı bulunmuştur. Çift yönlü ANOVA bulgularına göre, ultrasonik güç ve frekans interaksiyonunun etanol ile ekstrakte edilen örneklerin verim ortalamaları arasındaki

farklara etkilerinin istatistik olarak önemli olduğu ($P < 0.05$) belirlenmiştir. Hekzan ile elde edilen ekstraktların ortalamaları arasındaki fark üzerinde

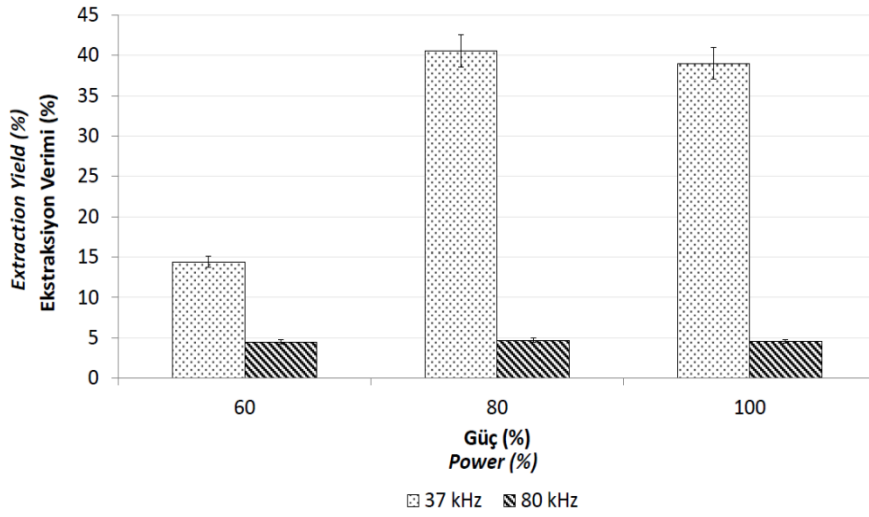
ise sadece uygulanan ultrason frekansının etkili olduğu ve istatistik olarak önem yarattığı ($P < 0.05$) tespit edilmiştir.



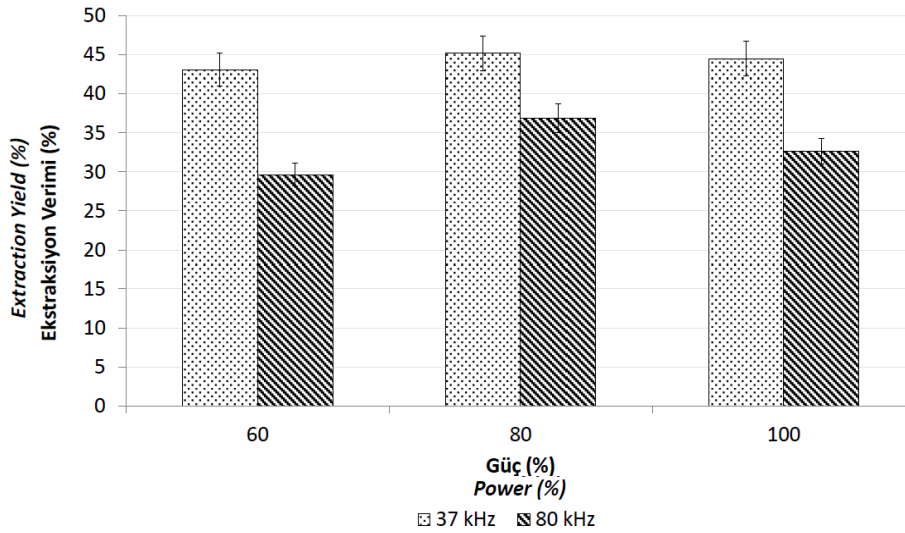
Şekil 1. 37 kHz frekanstaki ekstraksiyon verimleri
Figure 1. Extraction yields at 37 kHz



Şekil 2. 80 kHz frekanstaki ekstraksiyon verimleri
Figure 2. Extraction yields at 80 kHz



Şekil 3. Etanol ile gerçekleştirilen ekstraksiyonların verimleri
 Figure 3. Extraction yields for ethanol



Şekil 4. Hekzan ile gerçekleştirilen ekstraksiyonların verimleri
 Figure 4. Extraction yields for hexane

Yağ asidi bileşimi

Elde edilen ekstraktların yağ asidi bileşimleri incelendiğinde, yer fıstığı yağında yaygın olarak bulunan 7 adet yağ asidi tespit edilmiştir. Bunların bir kısmını palmitik asit (C16:0), stearik asit (C18:0), araşidik asit (C20:0) ve behenik asit (C22:0) gibi doymuş yağ asitleri oluşturmakla birlikte, geri kalan kısmını başta yer fıstığı yağının başlıca yağ asidi olan oleik asit (C18:1), ve daha az miktarlarda olmakla birlikte linoleik asit (C18:2)

ve eikosenoik asit (C20:1) gibi doymamış yağ asitleri oluşturmaktadır. Yer fıstığı yağıyla yapılan diğer çalışmalarda da benzer yağ asitleri tespit edilmiştir (Aluyor vd., 2009; Özcan, 2010; Özcan ve Seven, 2003; Siddeeg ve Xia, 2015). Farklı ultrasonik koşullarda elde edilen etanol ve hekzan ekstraktlarının yağ asidi bileşimleri sırasıyla Çizelge 2 ve Çizelge 3'te verilmektedir. Çizelgeler dikkatle incelendiğinde, ekstraksiyonda uygulanan farklı parametrelerin yağ asidi bileşimlerinde

önemli değişikliklere yol açmadığı görülmektedir. Ultrason destekli ekstraksiyon uygulamalarında yağ asidi bileşiminin değişmediği veya çok az etkilendiği önceki araştırmaların çalışmalarında da ifade edilmiştir (Da Porto vd., 2013; Mohammadpour vd., 2019; Stevanato ve da Silva, 2019). Ekstraktların yağ asidi bileşiminin %94-95 düzeyinde oleik, linoleik ve palmitik asit toplamından oluştuğu görülmüştür. Uygulanan

ultrason gücü ve frekans göz ardı edildiğinde, etanol ile elde edilen ekstraktlarda ortalama oleik asit, linoleik asit ve palmitik asit konsantrasyonları sırasıyla %62.64, %21.68 ve %10.41 seviyelerinde tespit edilmiştir. Hekzan ile elde edilen ekstraktlarda ise, uygulanan koşullardan bağımsız olarak bu ortalamalar sırasıyla %63.07, %21.37 ve %9.51 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 2. Farklı ultrasonik koşullarda etanol ile elde edilen ekstraktların yağ asidi bileşimi (%)

Table 2. Fatty acid composition of the ethanol extracts at different ultrasonic conditions (%)

Frekans Frequency (kHz)	Ultrasonik güç Ultrasound power (%)	Yağ asidi (%) Fatty acids						
		C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C20:0	C20:1	C22:0
37	60	10.35±0.10	2.60±0.15	62.31±0.21	21.36±0.19	0.78±0.04	0.52±0.00	2.09±0.48
	80	10.02±0.17	2.45±0.07	62.96±0.07	21.46±0.21	0.80±0.01	0.57±0.01	1.74±0.38
	100	9.98±0.20	2.67±0.02	62.83±0.06	21.56±0.02	0.77±0.06	0.45±0.01	1.73±0.04
80	60	10.90±0.46	2.27±0.11	62.84±0.26	21.69±0.18	0.56±0.11	0.51±0.01	1.22±0.16
	80	10.58±0.12	2.53±0.20	62.54±0.47	22.11±0.18	0.70±0.05	0.51±0.12	1.04±0.03
	100	10.62±0.19	2.45±0.16	62.37±0.23	21.92±0.05	0.63±0.16	0.52±0.07	1.49±0.07

Veriler ortalama±standart hata şeklinde ifade edilmiştir (n=2).

Values are expressed as mean±std.error (n=2).

Çizelge 3. Farklı ultrasonik koşullarda hekzan ile elde edilen ekstraktların yağ asidi bileşimi (%)

Table 3. Fatty acid composition of the hexane extracts at different ultrasonic conditions (%)

Frekans Frequency (kHz)	Ultrasonik güç Ultrasound power (%)	Yağ asidi (%) Fatty acids						
		C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C20:0	C20:1	C22:0
37	60	9.49±0.09	2.65±0.03	63.07±0.32	21.48±0.07	0.82±0.15	0.52±0.03	1.97±0.26
	80	9.47±0.02	2.59±0.08	62.88±0.10	21.39±0.04	0.80±0.00	0.66±0.02	2.21±0.02
	100	9.61±0.01	2.57±0.00	62.87±0.18	21.33±0.26	0.83±0.02	0.55±0.19	2.24±0.25
80	60	9.52±0.03	2.60±0.04	63.60±0.12	21.09±0.04	0.79±0.07	0.66±0.01	1.73±0.03
	80	9.34±0.06	2.62±0.07	62.73±0.22	21.41±0.04	1.02±0.10	0.76±0.17	2.13±0.09
	100	9.62±0.05	2.62±0.02	63.25±0.02	21.52±0.13	0.82±0.09	0.53±0.05	1.63±0.01

Veriler ortalama±standart hata şeklinde ifade edilmiştir (n=2).

Values are expressed as mean±std.error (n=2).

Uygulanan ekstraksiyon yönteminden bağımsız olarak, genel olarak yağ asidi bileşiminde önemli farklar yaratmamakla birlikte palmitik asidin etanol ekstraktlarında ve oleik asidin hekzan ekstraktlarında bir miktar daha yüksek bulunduğu literatürdeki çalışmalarla da kanıtlanmıştır (Breil vd., 2016; Li vd., 2014; Zhuang vd., 2018). Yer fıstığı yağının bir diğer ayırt edici yağ asidi olan araşidik asit (C20:0) miktarının da uygulanan farklı işlem parametrelerinden etkilenmediği gözlenmiş

olup, etanol ekstraktlarında ortalama %0.71 ve hekzan ekstraktlarında ise ortalama %0.85 düzeyinde araşidik asit tespit edilmiştir. Bununla birlikte diğer tespit edilmiş yağ asitleri olan stearik asit (C18:0), eikosenoik asit (C20:1) ve behenik asit (C22:0) ortalama miktarları ise etanol ve hekzan ekstraktlarında sırasıyla; %2.50–%0.51–%1.55 ve %2.61–%0.61–%1.98 olarak tespit edilmiştir.

İstatistik analiz verilerine göre, ekstraksiyon sırasında uygulanan ultrasonik güç ve frekans interaksiyonlarının hem etanol hem de hekzan ekstraktlarındaki oleik asit konsantrasyonlarında istatistiksel olarak önemli bir fark yaratmadığı belirlenmiştir ($P > 0.05$). Bununla birlikte, oleik asit konsantrasyonları arasındaki fark üzerine frekans ve güç uygulamalarının bireysel etkilerinin de istatistik olarak önemsiz olduğu tespit edilmiştir ($P > 0.05$).

SONUÇ

Elde edilen bulgular sonucunda, yer fıstığı yağının ultrason destekli ekstraksiyonuna ilişkin verimlerin frekans sabit tutulduğunda, uygulanan gücün belli bir seviyeye kadar artışıyla bir miktar arttığı, fakat maksimum güç uygulandığında ise bir miktar düştüğü tespit edilmiştir. Eşit güç uygulamasında ise, düşük frekanstaki ekstraksiyonlarda hem etanol hem hekzan için yüksek frekansa göre daha yüksek verim elde edilmiştir. Çözücülerin kıyaslanması sonucunda ise, etanol ile elde edilen ekstraktların verimlerinin her koşulda hekzan ekstraksiyonu ile elde edilen örneklerle göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Uygulanan ultrason işlem koşullarının yer fıstığı yağ asidi bileşimi üzerine önemli bir etkisi olmadığı yapılan kromatografik analiz sonucunda tespit edilmiştir. Ekstraktlardaki baskın yağ asidi olan oleik asit ortalamalarının hekzan ekstraktlarında etanol ekstraktlarına göre bir miktar fazla olduğu, bununla birlikte palmitik asit ortalamalarında ise bir miktar düşüş olduğu belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonrasında, ultrason destekli ekstraksiyona ait farklı frekans ve ultrasonik güçlerin bireysel etkilerinin elde edilen ekstraktlara ait oleik asit konsantrasyonları üzerinde önemsiz olduğu sonucuna varılmıştır ($P > 0.05$). Tüm bu bulgular ışığında, yenilikçi bir teknoloji olan ultrason tekniğinin yer fıstığı yağı ekstraksiyonunda kullanılabilirliğinin yanında, farklı frekans ve güç uygulamalarının ekstraksiyon verimi ve yağ asidi bileşimi üzerine olan etkileri ortaya konmuştur. Ayrıca, geleneksel çözücü olan hekzanın olumsuz etkilerine alternatif olarak, biyolojik kaynaklardan kolaylıkla elde edilebilen etanolün bu işlem doğrultusunda kullanılabilirliği araştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre tüm denemelerde etanolün

ekstraksiyon verimlerinin hekszana göre düşük bulunması ve etanolün hekzandan daha az seçici bir çözücü olması sebebiyle, bu çözücünün yağ ekstraksiyonu amacıyla kullanımı için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğu kanısına varılmıştır. Bu araştırmadan elde edilen bulguların ileriki araştırmalara ve endüstriyle uygulamalara ışık tutması öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

- Afroz Bakht, M., Geesi, M.H., Riadi, Y., Imran, M., Imtiyaz Ali, M., Ahsan, M.J., & Ajmal, N. (2019). Ultrasound-assisted extraction of some branded tea: Optimization based on polyphenol content, antioxidant potential and thermodynamic study. *Saudi J Biol Sci* 26(5): 1043-1052, doi:10.1016/j.sjbs.2018.07.013
- Aluyor, E., Aluyor, P., Ozigagu, C. (2009). Effect of refining on the quality and composition of groundnut oil. *Afr J Food Sci* 3(8): 201-205.
- Anonim (2012). Türk Gıda Kodeksi. Bitki Adı ile Anılan Yağlar Tebliği (2012/29). Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. 12 Nisan 2012 tarih ve 28262 sayılı Resmî Gazete, Ankara.
- Bäumler, E.R., Carrín, M.E., Carelli, A.A. (2016). Extraction of sunflower oil using ethanol as solvent. *J Food Eng* 178: 190-197, doi:10.1016/j.jfoodeng.2016.01.020
- Bäumler, E.R., Carrín, M.E., Carelli, A.A. (2017). Diffusion of tocopherols, phospholipids and sugars during oil extraction from sunflower collets using ethanol as solvent. *J Food Eng* 194: 1-8, doi:10.1016/j.jfoodeng.2016.09.003
- Breil, C., Meullemiestre, A., Vian, M., Chemat, F. (2016). Bio-Based Solvents for Green Extraction of Lipids from Oleaginous Yeast Biomass for Sustainable Aviation Biofuel. *Molecules* 21(2): 196, doi:10.3390/molecules21020196
- Chanioti, S., Tzia, C. (2017). Optimization of ultrasound-assisted extraction of oil from olive pomace using response surface technology: Oil recovery, unsaponifiable matter, total phenol content and antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol* 79: 178-189, doi:10.1016/j.lwt.2017.01.029

- Chemat, F., Tomao, V., Viot, M. (2008). Ultrasound-Assisted Extraction in Food Analysis. In: *Handbook of Food Analysis Instruments*, Ötleş, S. (Ed.), Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 85-103
- Crevel, R.W.R., Kerkhoff, M.A.T., Koning, M.M.G. (2000). Allergenicity of refined vegetable oils. *Food Chem Toxicol*, 38(4), 385-393, doi:10.1016/S0278-6915(99)00158-1
- Da Porto, C., Porretto, E., Decorti, D. (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrason Sonochem* 20(4): 1076-1080, doi:10.1016/j.ultsonch.2012.12.002
- Dong, J., Liu, Y., Liang, Z., Wang, W. (2010). Investigation on ultrasound-assisted extraction of salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* root. *Ultrason Sonochem* 17(1): 61-65, doi:10.1016/j.ultsonch.2009.05.006
- Escorsim, A.M., da Rocha, G., Vargas, J.V.C., Mariano, A.B., Ramos, L.P., Corazza, M.L., Cordeiro, C.S. (2018). Extraction of *Acutodesmus obliquus* lipids using a mixture of ethanol and hexane as solvent. *Biomass Bioenergy* 108: 470-478, doi:10.1016/j.biombioe.2017.10.035
- FAO (2019). FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, İtalya.
- Ferreira-Dias, S., Valente, D.G., Abreu, J.M.F. (2003). Comparison between ethanol and hexane for oil extraction from *Quercus suber* L. fruits. *Grasas Aceites* 54(4): 378-383, doi:10.3989/gya.2003.v54.i4.225
- ISO (2011). Animal and vegetable fats and oils - Gas chromatography of fatty acid methyl esters - Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids. ISO 12966-2:2011. Geneva, Switzerland: ISO.
- Kadiroğlu, A. (2018). Yerfıstığı Yetiştiriciliği. Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼. <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/batem/Belgeler/Kutuphane/Teknik%20Bilgiler/yerfistigi%20yetistiriciligi.pdf> (Erişim tarihi: 8 Ekim 2019).
- Li, H., Pordesimo, L., Weiss, J. (2004). High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. *Food Res Int* 37(7): 731-738, doi:10.1016/j.foodres.2004.02.016
- Li, Y., Fine, F., Fabiano-Tixier, A.-S., Abert-Vian, M., Carre, P., Pages, X., Chemat, F. (2014). Evaluation of alternative solvents for improvement of oil extraction from rapeseeds. *C R Chim* 17(3): 242-251, doi:10.1016/j.crci.2013.09.002
- Ma, Y., Wu, X., Zhao, L., Wang, Y., Liao, X. (2019). Comparison of the compounds and characteristics of pepper seed oil by pressure-assisted, ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Innov Food Sci Emerg* 54: 78-86, doi:10.1016/j.ifset.2019.03.011
- Mohammadpour, H., Sadrameli, S.M., Eslami, F., Asoodeh, A. (2019). Optimization of ultrasound-assisted extraction of *Moringa peregrina* oil with response surface methodology and comparison with Soxhlet method. *Ind Crop Prod* 131: 106-116, doi:10.1016/j.indcrop.2019.01.030
- Muatasim, R., Ma, H., Yang, X. (2018). Effect of multimode ultrasound assisted extraction on the yield of crude polysaccharides from *Lycium Barbarum* (Goji). *Food Sci Technol* 38: 160-166, doi:10.1590/1678-457X.14417
- Onat, B. (2018). The determination of Tocopherol composition of some peanut cultivars grown in main crop growing conditions in Cukurova Region. *Acta Biol Turc* 31(2): 62-68
- Özcan, M.M. (2010). Some nutritional characteristics of kernel and oil of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *J Oleo Sci* 59(1): 1-5, doi:10.5650/jos.59.1
- Özcan, M., Seven, S. (2003). Physical and chemical analysis and fatty acid composition of peanut, peanut oil and peanut butter from ÇOM and NC-7 cultivars. *Grasas Aceites* 54(1): 12-18.
- Perrier, A., Delsart, C., Boussetta, N., Grimi, N., Citeau, M., Vorobiev, E. (2017). Effect of ultrasound and green solvents addition on the oil extraction efficiency from rapeseed flakes. *Ultrason Sonochem* 39: 58-65, doi:10.1016/j.ultsonch.2017.04.003

- Rodriguez-Estrada, M.T., Paciulli, M., Cerretani, L., Chiavaro, E. (2017). Production of Vegetable Oils from Fruits, Oilseeds, and Beans: Conventional Processing and Industry Techniques. In: *Edible Oils: Extraction, Processing, and Applications*, Chemat, S. (Ed.), Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 1-34
- Sbihi, H.M., Nehdi, I.A., Mokbli, S., Romdhani-Younes, M., Al-Resayes, S.I. (2018). Hexane and ethanol extracted seed oils and leaf essential compositions from two castor plant (*Ricinus communis* L.) varieties. *Ind Crop Prod* 122: 174-181, doi:10.1016/j.indcrop.2018.05.072
- Siddeeg, A., Xia, W. (2015). Oxidative stability, chemical composition and organoleptic properties of seinat (*Cucumis melo* var. tibish) seed oil blends with peanut oil from China. *J Food Sci Technol* 52(12): 8172-8179, doi:10.1007/s13197-015-1889-x
- Stevanato, N., da Silva, C. (2019). Radish seed oil: Ultrasound-assisted extraction using ethanol as solvent and assessment of its potential for ester production. *Ind Crop Prod* 132: 283-291, doi:10.1016/j.indcrop.2019.02.032
- Taticchi, A., Selvaggini, R., Esposito, S., Sordini, B., Veneziani, G., Servili, M. (2019). Physicochemical characterization of virgin olive oil obtained using an ultrasound-assisted extraction at an industrial scale: Influence of olive maturity index and malaxation time. *Food Chem* 289: 7-15, doi:10.1016/j.foodchem.2019.03.041
- Topdaş, E.F., Ertugay, M.F. (2013). Kayisuların Ultrases Yardımlı Ozmotik Kurutulması. *GIDA*, 38(5): 299-306, doi:10.5505/gida.2013.02886
- Tüfekçi, S., Özkal, S.G. (2015). Application of Ultrasound in Food Drying. *Pamukkale Univ Muh Bilim Derg* 21(9): 408-413, doi:10.5505/pajes.2015.05902
- Zhuang, X., Zhang, Z., Wang, Y., Li, Y. (2018). The effect of alternative solvents to n-hexane on the green extraction of *Litsea cubeba* kernel oils as new oil sources. *Ind Crop Prod* 126: 340-346, doi:10.1016/j.indcrop.2018.10.004

KEFİR ÖRNEKLERİNDEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Sevim Feyza Erdoğan^{1*}, Barış Bostancı²

¹Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Şuhot Sağlık Hizmetleri MYO, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Afyonkarahisar, Türkiye

²Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Medikal Biyoloji ve Genetik AbD, Afyonkarahisar, Türkiye

Geliş / Received: 28.07.2019; Kabul / Accepted: 08.12.2019; Online baskı / Published online: 21.01.2020

Erdoğan, S.F., Bostancı, B. (2020). Kefir örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, identifikasyonu ve antimikrobiyel etkinliklerinin değerlendirilmesi. GIDA (2019) 45 (1): 72-80 doi: 10.15237/gida.GD19111

Erdoğan, S.F., Bostancı, B. (2020). Isolation and identification of lactic acid bacteria from kefir samples and evaluation of their antimicrobial effects. GIDA (2019) 45 (1): 72-80 doi: 10.15237/gida.GD19111

ÖZ

Bu çalışmada, Afyonkarahisar İli'nde satışa sunulan markasız, paketsiz kefir örneklerindeki laktik asit bakterilerinin izolasyonu, tanımlanması ve patojen test mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyel etkinliği değerlendirilmiştir. 5 farklı kefir örneğinden 6 adet laktik asit bakterisi izole edilmiş ve izolatların moleküler tanımlanması için 16S rDNA PZR analizi yapılmıştır. İzolatların 16S rDNA sekans analiz sonuçlarına göre, izole edilen bakteriler; *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus durans* türleri olarak tanımlanmıştır. Laktik asit bakteri izolatlarının patojen test mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyel aktivitesini belirlemek için agar spot ve agar kuyu difüzyon testi kullanılmıştır. Tüm izolatlar, test edilen patojen mikroorganizmalar üzerinde farklı seviyelerde antimikrobiyel etki göstermiştir. Laktik asit bakteri izolatları, *Klebsiella pneumoniae* NRRLB 4420, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 11778, *Listeria monocytogenes* ATCC 1911 üzerinde diğer test mikroorganizmalarına (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Bacillus subtilis* NRS-744) göre daha yüksek antimikrobiyel etki göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyel etki, İzolasyon, İdentifikasyon, Kefir, Laktik asit bakterileri

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM KEFIR SAMPLES AND EVALUATION OF THEIR ANTIMICROBIAL EFFECTS

ABSTRACT

In this study, lactic acid bacteria were isolated from unmarked, unpacked kefir samples that sold in Afyonkarahisar province, and their antimicrobial activity on pathogen test microorganisms were evaluated. 6 lactic acid bacteria were isolated from 5 different kefir samples and 16S rDNA PCR analysis was performed for molecular identifications of these isolates. According to results of 16S rDNA PCR analysis; isolated bacteria from kefir samples were identified as *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans*. Agar spot and agar-well diffusion assay methods were used to determine the antimicrobial activity of the lactic acid bacteria isolates on pathogen test microorganisms. All of the isolates showed antimicrobial activity at different levels on the tested pathogenic microorganisms. Lactic acid bacteria isolates showed higher antimicrobial activity on *Klebsiella pneumoniae* NRRLB 4420, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 11778, *Listeria monocytogenes* ATCC 1911 than other test microorganisms (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Bacillus subtilis* NRS-744).

Key words: Antimicrobial effect, Isolation, İdentification, Kefir, Lactic acid bacteria

* Yazışmadan sorumlu yazar/Corresponding author

✉: sfeyza@aku.edu.tr

☎: (+90) 505 494 9906

☎: (+90) 272 718 1159

Sevim Feyza Erdoğan; ORCID no: 0000-0002-4319-7558

Barış Bostancı; ORCID no: 0000-0002-5068-1268

GİRİŞ

Gıdalar, mikroorganizma çeşitliliği bakımından oldukça zengindir. Bunlardan bazıları gıda üretiminde kullanılırken, bazıları ise gıdaların bozulmasına ve gıda kaynaklı hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde antibiyotikler sıklıkla kullanılmaktadır ancak antibiyotiklere karşı mikroorganizmalarda direnç oluşması tüm dünyada önemli bir problem haline gelmiştir (Blaser, 2011; White, 2011; Cooper ve Shlaes, 2011; Arabestani vd., 2014). Mikroorganizmaların faaliyetleri nedeniyle gıda ürünlerinin bozulmaları, yüksek miktarda ekonomik kayıpların meydana gelmesine sebep olmaktadır. Gıdaları mikroorganizmalara karşı korumak amacıyla kullanılan kimyasal katkı maddeleri ise canlılar üzerinde olumsuz etkiler yaratarak çeşitli hastalıkların oluşmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, yüksek kalitede, kimyasal koruyucu katkı maddeleri içermeyen, güvenilir ve raf ömürleri uzun ürünler tüketiciler tarafından tercih edilmektedir (Schnurer ve Magnusson, 2005; Abriouel vd., 2007; Dinçer vd., 2010). Son yıllarda bilim adamları, kimyasal koruyucuların yerini alabilecek alternatif doğal koruyucuların araştırılması üzerine yönelmişlerdir. Özellikle antimikrobiyel bileşenler üretebilme yeteneğine sahip, GRAS (genel olarak güvenli) statüsünde yer alan Laktik asit bakterileri (LAB) araştırmacıların ilgi odağı olmuştur (De Martinis vd., 2002; Eijsink vd., 2002; Corr vd., 2007; Nespolo ve Brandelli, 2010; Goh ve Philip, 2015). LAB'leri gram pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmeyen, anaerob veya fakültatif aerob olup karbonhidratları fermente ederek laktik asit gibi fermantasyon ürünleri oluşturmaktadırlar (Zhang vd., 2014; López-Cuellar vd., 2016). Bu bakteriler tarafından üretilen metabolik ürünler, patojen mikroorganizmaların üremelerini engelleyerek, bağışıklık sistemini güçlendirerek enfeksiyonlara karşı direncin artmasını sağlamaktadır (Amirbozorgi vd., 2016). Pek çok çalışmada, gıda güvenliği için antagonistik mikroorganizmaların ve yine onlar tarafından üretilen, protein yapıdaki antimikrobiyel bileşenler olan bakteriyosinlerin kullanımıyla patojenlerin inaktive edilmesinin hedeflendiği biyokontrol yöntemlerinin kullanılması önerilmektedir (Rodriguez vd., 2000;

Deegan vd., 2006; Evren vd., 2006; Moshood ve Tengku, 2013; Gülgör ve Özçelik, 2014; Yang vd., 2014; Kaur 2015; Goh ve Philip, 2015; López-Cuellar vd., 2016). LAB'leri gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların üremesini engellemek ve gıdaların raf ömrünü arttırmak amacı ile kullanılabilme potansiyeline sahiptirler. Bu nedenle yeni LAB suşların izolasyonu ve identifikasyonu için yapılan çalışmalar oldukça önemlidir.

Bu çalışmada, Afyonkarahisar İli'nde satışa sunulan markasız, paketsiz, doğal yöntemler ile üretilen kefir örneklerinden 6 adet laktik asit bakterisi izole edilerek moleküler identifikasyonları yapılmıştır. Bu laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel bileşik üretme yetenekleri belirlenerek onların patojen mikroorganizmalar üzerine olan antimikrobiyel etkinlikleri değerlendirilmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Kefir Örneklerinin Hazırlanması

Bu çalışmada, Afyonkarahisar İli'nde satışa sunulan markasız, paketsiz, doğal yöntemler ile üretilen beş farklı kefir örneği kullanılmıştır. Kefir örnekleri aseptik koşullar altında toplanıp araştırma laboratuvarına getirilmiş ve steril pipet yardımıyla 10'ar ml alınarak steril 90 ml % 0.1' lik steril peptonlu su çözeltisinde homojenize edilmiştir. Her örnek % 0.1' lik steril peptonlu su içeren tüplerde 1/10 olacak şekilde ardışık olarak seyreltilmiştir.

Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Saflaştırılması

Her bir kefir örneği için 10^{-4} , 10^{-5} dilüsyonlarından 0.1 ml alınarak LAB izolasyonu için seçilen besiyerlerine yayma plak yöntemiyle ekim yapılmış, 37 °C'de oksijenli ve oksijensiz koşullarda 48 saat süre boyunca inkübe edilmiştir. Laktokoklar için M17 agar (Liofilchem 610192), Laktobasiller için Man, Rogosa ve Sharpe (MRS) agar (Oxoid CM0361), Enterokoklar için Nutrient agar (NA) (Oxoid CM0003) ve Kanamycin aesculin azide agarlı (Oxoid CM0591) besiyerleri kullanılmıştır. Oksijensiz ortamda inkübasyon için anaerobik kavanoz (Oxoid Anaero Jar) kullanılmıştır (Azadnia ve Nazer, 2009).

Oksijensiz ortamın sağlanabilmesi için Merck Microbiologia Anaerocult A (1.13829.0001) ve ortamın oksijensiz olup olmadığından emin olabilmek için test indikatörü (Merck Microbiology Anaerostest 1.15112.0001) kullanılmıştır. İnkübasyon sonrasında LAB olma olasılığı olan tüm koloniler seçilerek MRS besiyerine ekilerek seri pasajlamalar yapılmış ve saf kültürler elde edilmiştir (Azadnia ve Nazer, 2009). Laktobasil olması beklenen kolonileri seçerken krem renkli, mat düzgün kenarlı koloniler, laktokoklar için beyaz düz kenarlı parlak koloniler tercih edilmiştir. Enterokok olmasından şüphelenilen koloniler için küçük, beyaz ya da açık renkli ve düz kenarlı tipik kolonilere öncelik verilmiştir. Kanamycin Aesculin Azide agar'da ise siyah zon oluşturan Enterokokların seçimleri yapılmıştır. Elde edilen izolatlar, mikroskop altında incelenerek gram reaksiyonu ve katalaz aktiviteleri belirlenmiştir. İzolatların katalaz enzimine sahip olup olmadıklarını belirlemek amacıyla ilk izolasyon esnasında saflaştırılan izolatlar temiz bir lam üzerine alınıp %3'lük H₂O₂ çözeltisi damlatılmıştır. Gaz kabarcıklarının oluşumu katalaz testi açısından pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2000; Halkman 2005; Özteber 2013).

Genomik DNA İzolasyonu

LAB'ın genomik DNA'larını izole etmek için Roche, High Pure PCR Template Preparation Kit kullanılmıştır. Her bir izolattan MRS sıvı besiyerine ekim yapılarak 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Kit kullanımı için gerekli hazırlıklar yapılarak prosedüre uygun şekilde DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen genomik DNA'ların bütünlükleri agaroz jel elektroforezinde, saflık kontrolleri ve miktar tayinleri spektrofotometrik olarak Thermo Scientific-Nanodrop 2000c cihazı ile yapılmıştır (Turner vd., 2004). Elde edilen genomik DNA'lar kullanılabildiği kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Laktik Asit Bakterilerinin 16S rDNA PZR Yöntemi ile Tanımlanması

LAB izolatlarının 16S rDNA yöntemiyle tanımlanabilmesi için Taq DNA Polimeraz Kiti (Helix Amp TM, (11796828001)) kullanılmıştır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) için; 20F (5'-

AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') ve 1390R (5'- GAC GGG CGG TGT GTA CAA-3') primerleri kullanılarak gen bölgesi PZR (Blue Ray Biotech Turbo Cycler) ile çoğaltılmıştır (Özteber 2013). Baz büyüklüğü tespiti için, markır (Fermentas Gene Ruler TM) kullanılmıştır. PZR tüpüne eklenecek bileşenler ve reaksiyon basamakları kit içeriğine göre düzenlenmiş olup Çizelge 1'de belirtilmiştir. İstenilen gen bölgesini çoğaltabilmek için kullanılan PZR koşulları; 94 °C'de 5 dakika ön denatürasyon, 94 °C'de 30 sn denatürasyon, 55 °C'de 30 sn bağlanma ve 72 °C'de 90 sn uzama oluşan 35 döngümlük amplifikasyon ve 72 °C'de 15 dakika son uzamadan olacak şekilde ayarlanmıştır. PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek UV Jel görüntüleme sistemi cihazı (Quantum, France) kullanılarak görüntülenmiş ve DNA fragmentleri DNA markır ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 1. PZR bileşenleri ve miktarları
Table 1. PCR components and quantities

PZR Bileşenleri	Miktar
<i>PCR Components</i>	<i>Quantity</i>
DNA	5 µL
10X Taq Buffer	5 µL
dNTP	1 µL
Primer – F	1 µL
Primer – R	1 µL
5X Tune Up Buffer	10 µL
Taq Polimeraz	1.25 Unit
Distilled water	50 µL'ye tamamlanır

Nükleotid Sekans Analizi ve Verilerin Değerlendirilmesi

PZR ürünlerinin nükleotid sekans analizlerinin yapılması için hizmet alımı yapılmıştır. Sekans analizi, Sanger dideoksi sekans metoduna dayalı ABI 3730 XL otomatik sekans analiz cihazı kullanılarak Altigen Bio Firması (İzmir/Türkiye) tarafından yapılmıştır. Örneklerin sekans analizi sonuçları Gen Bank (www.ncbi.nlm.nih.gov) adresinde yer alan Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) programı kullanılarak karşılaştırılmış ve her bir izolat için gen bankasındaki homolojileri belirlenmiştir.

Laktik Asit Bakterilerinin Antibakteriyel Etki Spektrumlarının Belirlenmesi

LAB izolatlarının antibakteriyel aktivitesi belirleyebilmek için agar spot test ve kuyu difüzyon yöntemleri kullanılarak test edilmiştir. Agar spot testi için, LAB izolatlarının MRS sıvı besiyerine (Oxoid CM0359) ekimleri yapılarak 37 °C'de bir gün süre ile inkübe edilmiştir. Daha sonra her bir izolattan 2 µl MRS agarlı besiyerine damla şeklinde inoküle edildikten sonra petriler bir gün süre ile 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Kültür koleksiyonumuzda yer alan test mikroorganizmaları (*Listeria monocytogenes* ATCC 1911, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Bacillus subtilis* NRS-744, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* NRRLB 4420, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 11778, *Streptococcus faecalis*) Nutrient broth besiyerinde, 24 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra %0.5 agar ile hazırlanmış 5 ml'lik yumuşak agar içerisine, indikatör test mikroorganizmalarının sıvı kültürlerinden 0.5 ml inoküle edilerek petrilerin yüzeyine dökülmüş ve 37 °C'de, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Schillinger ve Luke, 1989). Agar spot testi sonuçları; +<0.5 cm, 0.5 cm<+++<1 cm, 1.5 cm<++++<2 olacak şekilde değerlendirilmiştir.

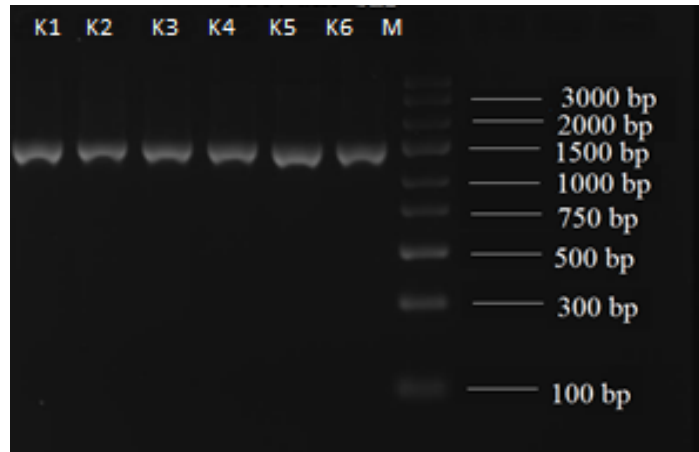
Agar kuyu difüzyon testi için, LAB izolatlarının her birinden 10 ml'lik MRS sıvı besi ortamına ekim yapılarak 37 °C'de, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra sıvı kültürler 8000 rpm' de 10 dakika (+4 °C'de) santrifüjlenmiştir (Nüve NF 1200). Santrifüj işlemini takiben kültür üst sıvıları steril, yeni falkon tüplere aktarılmış ve asit inhibisyonunu ekarte edebilmek için 1 M NaOH/HCl kullanılarak pH: 6.0'ya ayarlanmıştır. Elde edilen bu süpernatantlar steril şırıngalarla çekilerek 0.2 µm por çaplı, steril membran filtreden (GUS 7041361) süzülerek steril deney tüplerinde toplanmıştır. Antimikrobiyel etki spektrumlarını belirleyebilmek için kullanılan indikatör test mikroorganizmaları Nutrient broth besiyerine ekilmiş ve 37 °C'de, 24 saat inkübe edilmişlerdir. Bir günlük kültürlerinden steril distile suda 0.5 McFarland bulanıklığına eşdeğer süspansiyonlar hazırlanmıştır. Her bir indikatör bakteri süşunun Nutrient agar besiyerine, steril eküvyon çubuğu kullanılarak ekimleri yapılmıştır. Steril agar delici kullanılarak agarlı besiyer ortamı

içeren petrilere 6 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. Hazırlanan kuyucuklara daha önce laktik asit bakteri izolatlarından elde etmiş olduğumuz süpernatantlardan (Cell free supernatant) 100 µl koyulmuştur. Petriler 37 °C'de, 24 saat inkübe edildikten sonra oluşan zon çapları ölçülmüş ve kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (Pringsulaka vd., 2012).

BULGULAR

M17, MRS, Nutrient ve Kanamycin aesculin azide agarlı besiyerlerinde üreyen kültürlerden farklı koloniler seçilerek MRS besiyeri kullanılarak saf kültürler elde edilmiştir. 27 adet izolat elde edilmiş ve bunların gram boyaması ve katalaz testleri yapılmıştır. Bu izolatlardan sadece 6 adeti gram (+) ve katalaz (-) olarak belirlenmiştir. Bu altı izolat arasında yer alan K1 ve K4'ün mikroskop altında görünümü çubuk, diğerleri ise yuvarlak (ikili yuvarlak veya zincir şeklinde) olarak gözlenmiştir. LAB'lar katalaz negatif oldukları için bu izolatların moleküler identifikasyonları, 16S rDNA PZR yöntemi kullanılarak yapılmıştır. PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü Şekil 1'de gösterilmiştir. PZR ürünlerin nükleotid sekans analizi sonuçları Gen Bank (www.ncbi.nlm.nih.gov) adresinde yer alan Nucleotide-nucleotide BLAST programı kullanılarak karşılaştırılmış ve her bir izolat için gen bankasındaki homolojileri belirlenmiştir. Karşılaştırma sonucunda, izolatlar ile veri tabanında bulunan diğer türler arasındaki homolojiler yüzde olarak Çizelge 2'de gösterilmiştir. Enterococcus cinsine ait izolatlar, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* olarak tanımlanmıştır. Ayrıca *Lactobacillus fermentum* izolatları tanımlanmıştır.

Laktik asit bakteri izolatlarının antibakteriyel etki spektrumları için agar spot test ve agar kuyu difüzyon testi kullanılmıştır. Agar spot testi sonucunda Çizelge 3'de verildiği gibi örneklerin hepsinin çalışmada kullanılan tüm patojen mikroorganizmalara karşı zon oluşturduğu görülmüştür. İnhibisyon zonlarının çapları +<0.5 cm, 0.5 cm<+++<1 cm, 1.5 cm<++++<2 olarak kontrol grubuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.



Şekil 1. PZR ürünlerinin agaroz jel fotoğrafı [İzolatlar (K1-6), Markır (M)]
Figure 1. Agarose gel photo of PCR products

Çizelge 2. LAB izolatlarının 16S rRNA analiz sonuçları
Table 2. 16S rRNA analysis results of LAB isolates

İzolatlar Isolates	16S rRNA Analiz Sonucu Analysis of 16S rRNA	Karşılaştırılan baz sayısı Compared base number	(%) Benzerlik Smilarity
K1	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU:3341(Sequence ID: MF354239.1)	1402	%98
K2	<i>Enterococcus durans</i> strain CAU6145 (Sequence ID: MF424830.1)	1407	%99
K3	<i>Enterococcus faecium</i> strain BL6-4 (Sequence ID: MF784205.1)	1330	%99
K4	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU:3341 (Sequence ID: MF354239.1)	1402	%98
K5	<i>Enterococcus faecium</i> strain CAU10244 (Sequence ID: MF429017.1)	1377	%99
K6	<i>Enterococcus faecium</i> strain L030(LBF2)D03 (Sequence ID: KM269699.1)	1098	%99

Agar spot test sonuçlarına göre; LAB izolatları deney aşamasında kullanılan patojen test mikroorganizmalarına karşı orta ve\veya yüksek düzeyde antimikrobiyel etkinlik göstermiştir. LAB izolatları en çok, *K. pneumoniae* NRRLB 4420, *S. aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 11778, *L. monocytogenes* ATCC 1911, mikroorganizmaları üzerinde etkili olmuştur. İzolatların antimikrobiyel etki spektrumlarını belirleyebilmek için ayrıca agar kuyu difüzyon testi

uygulanmıştır. Laktik asit bakteri izolatlarının indikatör bakteriler üzerine olan antimikrobiyel etkilerinin sonuçları ise Çizelge 4'de gösterilmiştir. İzolatlar tüm patojen test mikroorganizmaları üzerinde antimikrobiyel etki göstermişlerdir. Özellikle *K. pneumoniae* NRRLB 4420, *P. aeruginosa* ATCC 11778, *L. monocytogenes* ATCC 1911 karşı yüksek antimikrobiyel aktivite belirlenmiştir. Elde edilen zon çapları kontrol grubuna oldukça yakın değerler göstermiştir.

Laktik asit bakterilerinin izolasyonu, identifikasyonu ve antimikrobiyel etkileri

Çizelge 3. LAB izolatlarının indikatör test bakterileri üzerine olan inhibisyon etkisi
Table 3. The inhibitory effect of LAB isolates on indicator test bacteria

İzolatlar Isolates		<i>L. monocytogenes</i> ATCC 1911	<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>B. subtilis</i> NRS-744	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>K. pneumoniae</i> NRRLB 4420	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 11778	<i>S. faecalis</i>
K1	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU:3341	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
K2	<i>Enterococcus durans</i> strain CAU6145	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
K3	<i>Enterococcus faecium</i> strain BL6-4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
K4	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU:3341	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
K5	<i>Enterococcus faecium</i> strain CAU10244	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
K6	<i>Enterococcus faecium</i> strain L030(LBF2)D03	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kontrol Control	10 µg amikasin	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+<0.5 cm, 0.5 cm<++<1 cm, 1.5 cm<+++<2

Çizelge 4. LAB izolatlarının indikatör bakteriler üzerine olan antimikrobiyel etkilerinin agar kuyu difüzyon testi sonuçları (cm)

Table 4. Agar well diffusion test results of antimicrobial effects of LAB isolates on indicator bacteria (cm)

İzolatlar Isolates		<i>L. monocytogenes</i> ATCC 1911	<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>B. subtilis</i> NRS-744	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>K. pneumoniae</i> NRRLB 4420	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 11778	<i>S. faecalis</i>
K1	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU:3341	17	9	10	12	21	18	15
K2	<i>Enterococcus durans</i> strain CAU6145	18	16	13	18	17	23	12
K3	<i>Enterococcus faecium</i> strain BL6-4	18	14	9	14	22	19	16
K4	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU:3341	19	9	11	12	20	18	15
K5	<i>Enterococcus faecium</i> strain CAU10244	18	14	10	15	22	19	16
K6	<i>Enterococcus faecium</i> strain L030 (LBF2)D03	18	14	10	14	22	19	16
Kontrol Control	10 µg amikasin	20	21	22	20	24	20	20

TARTIŞMA

Son yıllarda gıda ve ilaç güvenliğinin geliştirilmesi konusunda giderek artan bir eğilimin olması, araştırmacıları yeni antimikrobiyel alternatifler bulmaya teşvik etmektedir. Bazı mikroorganizmalar antimikrobiyel bileşenler üretebilme yeteneğine sahiptirler (Goh ve Philip, 2015). Bu mikroorganizmalar arasında yer alan laktik asit bakterileri, antimikrobiyel özellikte bakteriyosin üretebilen, gıdalarda uzun yıllardan beri güvenli bir şekilde kullanılan en önemli mikroorganizmalardır (Nespolo ve Brandelli, 2010; Lopez-Cuellar vd., 2016). Bakteriyosinler, üretici hücreler üzerine öldürücü etki göstermeyen, sınırlı sayıda bakterilere etkili olan antagonistik maddeler olduklarından antibiyotikler için alternatif rol oynayabilirler (Evren vd., 2006). Bugüne kadar yapılan pek çok çalışmada; çeşitli gıda ürünlerinden LAB izole edilerek, antimikrobiyel etkinlikleri değerlendirilmiş ve çeşitli bakteriyosinler izole edilerek tanımlanmıştır (Erdoğan vd., 2002; Yang vd., 2014; Wassie ve Wassie, 2016; Masalam vd., 2018). Literatür taramaları sonucunda kefir örneklerinden LAB izolasyonu ve onların antimikrobiyel etkinliklerine dair sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır (Simova 2002). Bu nedenle, LAB bakımından zengin olması beklenen kefir örneklerinin çalışma kapsamında kullanılması tercih edilmiştir.

Bu çalışmada, LAB'ları izole etmek amacıyla Afyonkarahisar İli'nde satışa sunulan paketsiz 5 farklı kefir örneğinden 6 adet LAB izole edilmiştir. Kefir örneklerinden izole edilen LAB'lar 16S rDNA sekans analiz sonuçlarına göre, *Lactobacillus fermentum* (2), *Enterococcus faecium* (3), *Enterococcus durans* (1) türleri olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen bulgular daha önce yapılmış olan bazı çalışmalarla oldukça benzerlik göstermektedir (Simova 2002; Chen vd., 2008; Bennani vd., 2017, Masalam vd., 2018).

Çalışmamızda, LAB izolatlarının antimikrobiyel aktivitelerini belirleyebilmek için agar spot testi ve agar kuyu difüzyon testi yapılmıştır. Agar spot test sonuçlarına göre; elde edilen LAB izolatları, en çok *K. pneumoniae* NRRLB 4420, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 11778, *L. monocytogenes*

ATCC 1911 üzerinde antimikrobiyel etki göstermiştir. Simova vd. (2002); kefir ve kefir tanelerinden LAB izole etmişlerdir. Elde ettikleri izolatları; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplantarum* ve *Lactobacillus brevis* olarak tanımlamışlardır. Başka bir çalışmada Chen vd. (2008); kefir tanelerindeki LAB'lar üzerine mikrobiyolojik bir çalışma yapmıştır. Çalışma sonucunda, kefir tanelerinde, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* türlerinin bulunduğu belirlenmiştir. İşleroğlu vd. (2008), yöresel peynir örneğinden antimikrobiyel aktiviteye sahip bakteri izole etmişlerdir. Karbonhidrat fermantasyonu ile yağ asidi profili testleri sonucunda bakterinin *Enterococcus faecalis* olduğunu saptamışlardır. Bu bakteri tarafından üretilen antimikrobiyel maddenin *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* ve *Listeria monocytogenes*'e karşı inhibitör aktiviteye sahip olduğu, ancak *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus*'a karşı etkili olmadığı gözlenmiştir. Bu çalışmaya benzer olarak bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz verilerde en yüksek antimikrobiyel etki *K. pneumoniae* NRRLB 4420, *P. aeruginosa* ATCC 11778, *L. monocytogenes* ATCC 1911 karşı tespit edilirken *E. coli* ATCC 35218 ve *B. subtilis* NRS-744 üzerinde daha düşük etki tespit edilmiştir. Diğer bir çalışmada ise Bayram ve Yıldırım (2016), yöresel bir peynir çeşidinden izole edilen bakteri ve bu bakterinin ürettiği antimikrobiyel bileşikler karakterize etmişlerdir. İzole edilen bakteri, genel mikrobiyolojik analizler, karbonhidrat fermantasyonu ve yağ asidi profili testleri sonucunda *Enterococcus faecium* BP olarak tanımlanmıştır. Antimikrobiyel bileşiğin antimikrobiyel spektrumu belirlenmiş ve inhibitör aktivitesi üzerine bazı enzimlerin, organik çözücülerin, ısıl işlemin, depolama koşullarının ve üretici bakterinin gelişim fazının etkileri araştırılmıştır. Antimikrobiyel bileşiğin bir bakteriyosin olduğunu ortaya koymuşlardır. Antimikrobiyel bileşiğin, test edilen bazı *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Campylobacter* ve *Citrobacter* cinslerine karşı inhibitör etki gösterdiğini belirlemişlerdir.

Bu çalışmanın sonucunda; kefir örneklerinden izole edilen LAB'ların antimikrobiyel etkili madde\maddeler üretebildikleri ve patojen test mikroorganizmaları üzerinde yüksek antimikrobiyel etkinlikleri olduğu belirlenmiştir. Bundan sonra yapılacak olan çalışmalar ile izole edilen LAB'ların ürettiği bakteriyosin ve\veya bakteriyosin benzeri maddelerin saflaştırılması ve karakterizasyonu hedeflenmelidir. Böylece LAB'lar tarafından üretilen bu antimikrobiyel bileşiklerin hem gıda hem de sağlık sektöründe, biyoteknolojik çalışmalarda potansiyel olarak kullanılabilceği düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma; Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 17.SAĞ.BİL.06 numaralı proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

Abriouel, H., Gálvez, A., López, R.L., Omar, N.B. (2007). Bacteriocin based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol*, 120: 51-70.

Amirbozorgi, G., Samadlouie, H., Shahidi, S.A. (2016). Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from Iranian traditional dairy products. *IBBJ Winter*, 2 (1): 47-52.

Arabestani, M.R., Mousavi, S.M., Alikhani, M.Y. (2014). Bacteriocins as the alternatives to antibiotics. *Avicenna J Clin Microbiol Infect*, doi: 10.17795/ajcmi-21086.

Bayram, M., Yıldırım, Z. (2016). Beyaz peynirden bakteriyosin üreten bakterinin (*Enterococcus faecium*) izolasyonu ve bakteriyosinin karakterizasyonu. *Gaziosmanpaşa Bil Araş Derg*, 13:103-115.

Bennani, S, Mchiouer, K., Rokni, Y., Meziane, M. (2017). Characterisation and identification of lactic acid bacteria isolated from Moroccan raw cow's milk. *J Mater Environ Sci*, 8(S), 4934-4944.

Blaser, M. (2011). Antibiotic overuse: stop the killing of beneficial bacteria. *Nature*, 476 (7361): 393-394.

Chen, C.C., Wang, S.Y., Chen, M.J. (2008)., Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiol*, 25 (3): 492-501.

Cooper, M.A., Shlaes, D. (2011). Fix the antibiotics pipeline. *Nature*, 472 (7341): 32. doi: 10.1038/472032a.

Corr, S.C., Li, Y., Riedel, C.U., O'Toole, P.W., Hill, C., Gahan, C.G. (2007). Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proceed Nat Acad Sci*, 104: 7617-7621.

De Martinis, E.C.P., Alves, V.F., Franco, B.D.G.M. (2002). Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat. *Food Rev Int*, 18 (2): 191-208.

Deegan, L.H., Cotter, P.D., Colin, H., Ross, P. (2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int Dairy J*, 16: 1058-1071.

Diñçer, E., Kıvanç, M., Karaca, H. (2010). Biyokoruyucu olarak laktik asit bakterileri. *Gıda*, 35(1): 1-8.

Eijsink, V.G.H., Axelsson, L., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Holo, H., Nes, I.F. (2002). Production of class II bacteriocins by LAB; an example of biological warfare and communication. *Antonie Leeuwenhoek*, 81: 639-654.

Erdoğan, Ö.Z., Çetin, Ö., Ergün, Ö. (2002). Fermente sucuklardan izole edilen *Pediococcus pentosaceus* suşlarının bazı metabolik ve antimikrobiyel aktiviteleri üzerine çalışmalar. *İstanbul Üni Vet Fak Derg*, 28 (1): 249-254.

Evren, M., Albayram, C., Apan, M. (2006), Laktik asit bakterilerinin oluşturduğu antimikrobiyel maddeler. Türkiye 9. Gıda Kongresi, Mayıs 24-26, Bolu, Türkiye, 977-980.

Goh, H.F., Philip, K. (2015). Purification and characterization of bacteriocin produced by *Weissella confusa* A3 of dairy origin. *PLOS ONE*, | doi:10.1371/journal.pone.0140434.

- Gülgör, G., Özçelik, F. (2014), Bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin probiyotik amaçlı kullanımı. *Akademik Gıda*, 12(1): 63-68.
- İşleroglu, H., Yıldırım, Z., Yıldırım, M. (2008). Yöresel peynirden antimikrobiyel aktiviteye sahip laktik asit bakterisinin izolasyonu ve tanısı. *Gazî Osmanpaşa Üni Ziraat Fak Derg*, 25 (1): 1-6.
- Kaur, S. (2015). Bacteriocins as potential anticancer agents. *Front Pharmacol*. 6: 272, doi: 10.3389/fphar.2015.00272.
- López-Cuellar, R., Rodríguez-Hernández, A.I., Chavarría-Hernández, N. (2016). LAB bacteriocin applications in the last decade. *Biotechnol Biotech Equip*, 30(6): 1039-1050.
- Masalam, M. S, Bahieldin A., Alharbi M.G., Al-Masaudi, S., Al-Jaouni S.K., Harakeh, S.M., Al-Hindi R. (2018). Isolation, molecular characterization and probiotic potential of lactic acid bacteria in Saudi raw and fermented milk. *Evid Based Complement Alternat Med*, doi.org/10.1155/2018/7970463.
- Moshood, A.Y., Tengku, H.A. (2013). Lactic acid bacteria: Bacteriocin producer. *IOSR J Pharmacy*, 3(4): 44-50.
- Nespolo, C.R., Brandelli, A. (2010). Production of bacteriocin-like substances by lactic acid bacteria isolated from regional ovine cheese. *Brazilian J Microbiol*, 41(4): 1009-1018.
- Özteber, M. (2013). Fermente süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençliliklerinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Pringsulaka, O., Thongngam, N., Suwannasai, N., Atthakor, W., Pothivejkul, K., Rangsiroji, A. (2012). Partial characterisation of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from thai fermented meat and fish. *Food Control*, 23: 547-551.
- Rodriguez, E.G.B., Gaya, P., Nanez, M., Medina, M. (2000). Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *Int Dairy J*, 10: 7-15.
- Schnurer, J., Magnusson, J. (2005), Antifungal activity against *Aspergillus parasiticus* of supernatants from whey permeates fermented with kefir grains, antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trend Food Sci Technol*, 16: 70-78.
- Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, T., Frengova, G., Spasov, Z. (2002), Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 28(1):1-6.
- Turner, P.C., McLennan, A.G., Bates, A.D., White, M.R.H. (2004). Moleküler Biyoloji Önemli Notlar, Konuk, M. (Eds) Nobel Yayın, 613: 346 s.
- Wassie, M., Wassie T. (2016). Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw cow milk. *Int J Adv Res Biol Sci*, 3(8): 44-49.
- White, A.R. (2011). Bsac working party on the urgent need: Regenerating antibacterial drug discovery, development. effective antibacterials: at what cost? the economics of antibacterial resistance and its control. *J Antimicrob Chemother*, 66(9):1948–1953.
- Yang, S.C., Lin, C.H., Sung, C.T., Fang, J.Y. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol*, doi: 10.3389/fmicb.2014.00241, 2014.
- Zhang, Z., Vriesekoop, F., Yuan, Q., Liang, H. (2014). Effects of nisin on the antimicrobial activity of d-limonene and its nanoemulsion. *Food Chem*, 150:307-312.



PHYSICAL, CHEMICAL AND SENSORY PROPERTIES OF FRESH ORANGE JUICE FORTIFIED WITH REISHI (*Ganoderma lucidum*) EXTRACT

Gizem Kuşçu, Bengü Öztürk*

Yeditepe University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Kayisdagi Cad., Istanbul, Turkey

Received / Geliş: 01.09.2019; Accepted / Kabul: 11.12.2019; Published online / Online baskı: 21.01.2020

Kuşçu, G., Öztürk, B. (2020). Physical, chemical and sensory properties of fresh orange juice fortified with reishi (*Ganoderma lucidum*) extract. *GIDA* (2020) 45 (1): 81-91 doi: 10.15237/gida.GD19125

Kuşçu, G., Öztürk, B. (2020). Reishi (*Ganoderma lucidum*) ekstraktı katkılı taze portakal suyunun fiziksel, kimyasal ve duyuşsal özellikleri. *GIDA* (2020) 45 (1): 81-91 doi: 10.15237/gida.GD19125

ABSTRACT

In this study, fresh orange juice fortified with reishi (*Ganoderma lucidum*) extract was produced and its quality parameters were investigated. 330 mL and 200 mL of fresh orange juice samples containing different amounts (5 or 10 mL) of reishi extract were formulated. Brix and pH of the samples ranged from 10.9±0.8 to 11.5±1.2, and 3.66 to 3.68, respectively. Ascorbic acid content (mg/100mL) of the samples was between 54.5±2.2 and 64.8±8.5, and total carbohydrate contents (g/L) were found as 12.96±4.19 - 17.34±4.94. Total phenolic contents of the samples were determined as 313.6±3.3 - 329.5±3.3 µg GAE/100 mL. Color measurements indicated no significant difference between the control and fortified samples. Five-point hedonic scale (65 volunteers) and ranking tests (29 volunteers) showed that an alternative functional beverage with acceptable quality properties was produced when recommended daily intake dose of reishi extract (10 mL/day) was added to 330 mL of orange juice.

Keywords: Functional orange juice, reishi extract, physicochemical properties, sensory properties.

REISHI (*Ganoderma lucidum*) EKSTRAKTİ KATKILI TAZE PORTAKAL SUYUNUN FİZİKSEL, KİMYASAL VE DUYUSAL ÖZELLİKLERİ

ÖZ

Bu çalışmada reishi (*Ganoderma lucidum*) ekstraktı içeren taze sıkılmış fonksiyonel portakal suyu üretilmiş olup kalite özellikleri araştırılmıştır. Farklı miktarlarda (5 and 10 mL) ekstrakt içeren 330 mL ve 200 mL hacminde taze sıkılmış portakal suları hazırlanmıştır. Ürünlerin askorbik asit miktarları 54.5±2.2 ve 64.8±8.5 mg/100mL, toplam karbonhidrat miktarları 12.96±4.19 ve 17.34±4.94 g/L arasında değişmiştir. Folin-Ciocalteu metodu ile analiz edilen toplam fenolik madde içerikleri 313.6±3.3 - 329.5±3.3 µg GAE/100 mL olarak bulunmuştur. Ürünlerin Brix ve pH değerleri sırasıyla 10.9±0.8 - 11.5±1.2 ve 3.66 - 3.68 olarak ölçülmüştür. Ekstrakt içermeyen kontrol ürün ile fonksiyonel ürünler arasında denk değerleri arasında önemli fark görülmemiştir. Duyusal analiz çalışmalarına göre, 5-noktalı hedonik skala (65 gönüllü) ve sıralama testleri (29 gönüllü) sonucunda, tavsiye edilen günlük tüketim miktarı 10 mL olan ekstrakt, 330 mL'lik örneklere eklendiğinde kabul edilebilir tatta olduğu bulunmuştur. Reishi içeren fonksiyonel portakal suyunun kalite özellikleri bakımından tüketime uygun alternatif bir içecek olduğu gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Fonksiyonel portakal suyu, reishi ekstraktı, fizikokimyasal özellikler, duyuşsal özellikler.

* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar;

✉ benguozturk@gmail.com,

☎ (+90) 216 578 0480,

☎ (+90) 216 578 0400

Bengü Öztürk; ORCID no: 0000-0002-4925-6678

Gizem Kuşçu; ORCID no: 0000-0002-1474-5885

INTRODUCTION

Trends in the consumption of foods that have good health benefits increases in the last decades due to higher demand on a better life quality. Consumers become more aware about the functional foods with health promoting effects to prevent disease risks, improve body functions, and boost immune system (Siro et al., 2008). Functional foods should consist of some bioactive compounds, such as antioxidants, probiotic microorganisms and prebiotic substances that they affect health in a positive manner (Roberfroid, 1999; Meral and Doğan, 2009; Dayısoylu et al., 2014). According to Turkish Food Law (5179), in addition to their nutritional effects, functional foods have health-protective, corrective or disease-reducing effect due to one or more effective components that are scientifically and clinically proven (Anonymous, 2004).

Mushrooms are food species with more than 2000 types known for centuries but only about 25 types can be consumed. Because of the high nutritional value of the mushroom and its medicinal properties, it is accepted as a functional and nutraceutical food and attracts great attention (Chang, 1996; Cheung, 2008). One of the fungus species with therapeutic properties is Reishi mushroom, also known as *Ganoderma lucidum*. It is widely used in the far eastern countries and it is a species of *Basidiomycetes* fungi comes from the family *Ganodermataceae* (Wachtel-Galor et al., 2011). Some pharmacological properties of the active components of Reishi mushroom - triterpenoids and polysaccharides- were determined as the result of several studies. The effects of polysaccharides, amino acids, triterpenes, ascorbic acid, sterols, lipids, alkaloids and trace elements in the immune system were extensively studied. For example, beta-D-glucans -one group of the polysaccharides- are widely used in the formulation of cancer preventive drugs (Wasser and Weiss, 1999). Reishi mushroom is not edible due to its hard structure. For this reason, it is consumed in two different forms either in the extract or powder form. *Ganoderma* extracts have numerous therapeutic effects including analgesic, anti-allergic, anti-

bronchitis, anti-bacterial, anti-oxidant, antitumor, blood pressure lowering effects. Therefore, it is widely used in the treatment of many diseases including migraine and headache, high blood pressure, arthritis, bronchitis, asthma, anorexia, gastritis, hemorrhoids, high cholesterol, nephritis, constipation, skin tuberculosis, hepatitis, cardiovascular problems and leukemia (Wachtel-Galor et al., 2005; Tang et al., 2006). Because of its health promoting effects, *Ganoderma lucidum* has been used for many nutraceutical and medicinal purposes for years (Deepalakshmi and Mirunalini, 2011; Bishop et al., 2015).

Orange juice is widely consumed beverage all over the world. There are some functional orange juice development studies carried out in the literature. Prebiotics, probiotic bacteria and vitamin fortified orange juice products were formulated and their physicochemical and sensory evaluation studies were performed (Luckow and Delahunty, 2004; Costa et al., 2017). In Pesti et al., 2014, it was explained that fungal extracts would give benefit to the human health by showing anti-cholesterol activity (Gil-Ramírez and Soler-Rivas, 2014). Reis et al., 2017 summarized health benefits of various types of mushroom extracts and mentioned that either mushrooms themselves could be listed as functional foods or their extracts could be incorporated into various nutraceutical formulations (Reis et al., 2017). To our knowledge, there is no any food or beverage formulation including *Ganoderma lucidum* mushroom extracts. Therefore this will be the first study to analyze the quality parameters of functional beverage which is fresh orange juice fortified with *Ganoderma lucidum* extracts.

The aim of this study was to develop a functional orange juice fortified with reishi (*Ganoderma lucidum*) extract and examine the quality parameters of the newly formulated orange juice samples and perform sensory analyses to compare with the control fresh orange juice without the extract.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Ganoderma lucidum extract solutions in 10 mL of dark brown bottles were purchased from Erkel Food Company Ltd. Şti. Oranges were purchased from Carrefour Supermarket, in Istanbul. All chemicals used in the analyses were purchased from Sigma –Aldrich and they were of analytical grade. Double distilled water was taken from Milli-Q Gradient A10 water purification system (Bedford, MA, USA).

Methods

Preparation of fortified orange juice samples

The oranges purchased from the supermarket in Istanbul were freshly squeezed using household

portable juice squeezer, and the pulp was immediately filtered using glasswool. The control sample was defined as freshly squeezed orange juice with no added extract, and the functional juices were prepared according to the commercial serving sizes of canned (330 mL) and tetra-packed (200 mL) fruit juices. Daily consumption of 3 g reishi extract in 10 mL solution is mentioned as the required dose to get benefit from the health promoting effects of the mushroom. Therefore, 5 mL and 10 mL of ready to consume extract solution was added to the freshly squeezed orange juices as to be consumed once or twice with a fruit juice to get the beneficial health effect from the extract (Table 1). These juice samples were freshly prepared prior to the analyses.

Table 1. Formulation of fresh orange juice samples fortified with reishi extract

Sample names	Freshly squeezed orange juice (mL)	Reishi extract (mL)	Concentration of reishi in juices (% v/v)
Control sample	330 or 200	0	0
Sample 1	325	5	1.52
Sample 2	320	10	3.03
Sample 3	190	10	5

Determination of total soluble solids (Brix) and pH

The pH of fresh orange juice with reishi extract was measured by pH meter (Radiometer Analytical PHM210, USA). The amount of total soluble solids (Brix°) in fruit juices was measured using a portable refractometer (Bellingham + Stanley DR103L, UK).

Determination of vitamin C (ascorbic acid) content

Vitamin C (ascorbic acid) analysis of the control and fortified orange juice samples was performed using 2,6-dichloroindophenol titrimetric method (AOAC Method 967.21, 2016).

Determination of total carbohydrate content

The total carbohydrate content of the juice samples were determined by the phenol-sulfuric acid method. Glucose standard solutions (0-100 µg glucose/2 ml) were first prepared. Then the freshly squeezed fortified and control orange juice samples were diluted to 1:2000 ratio with ddH₂O

and 0.05 ml 80% phenol was added to 2 mL of each sample and standart solution and then 5 mL H₂SO₄ was added to the tubes and total volume was vortexed and held in the water bath at 25 °C for 10 min. The absorbances of the samples were measured at 490 nm using UV-VIS spectrophotometer (Thermoscientific, Genesys 10S UV-Vis, USA). The total carbohydrate concentration of each sample was calculated using the equation obtained by calibration curve of standart glucose solutions, and expressed in units of g/L of sample (Nielsen, 2017).

Determination of total phenolic content

Total phenolic content of fresh orange juices fortified with reishi extract were determined by using Folin - Ciocalteu Method (Singleton and Rossi (1965). 0.5 mL of each fruit juice was mixed with 2.5 mL of distilled water. 0.5 mL of F-C reagent was added and incubated for 30 minutes in the dark. 2 mL of sodium carbonate (10% w/v) was added to each tube, and then the tubes were vortexed and the absorbances of reaction mixture

were read at 725 nm in UV-Vis spectroscopy (Thermoscientific, Genesys 10S UV-Vis, USA). A standard curve was plotted using different concentrations of gallic acid standard (0-10 µg/mL). Total phenolic content was estimated as µg gallic acid equivalents (GAE)/mL of fruit juice.

Color measurements

The color characteristics of the control and fortified fresh orange juices were determined using a color analyzer (Konica Minolta CM-5, Japan). L* (lightness), a* (+ redness; - greenness) and b* (+ yellowness; - blueness) values were recorded for each sample of three replicates.

Sensory analyses

Sensory analyses were performed to compare the sensory properties of the control and fortified fresh orange juices with different concentrations of reishi extract. Four samples were coded with three-digit numbers randomly. A panel group of 65 voluntary consumers at the ages of 20 to 45, were asked to rate the taste, odor, appearance, color and overall liking of the samples using 5-point hedonic scale of which level of liking was correlated with the numbers as the followings; 1: Dislike, 2: Like a little, 3: Like moderately, 4: Like, 5: Like very much (Stone et al., 2012). A preference ranking test was applied to express the overall acceptance of the samples by a group of 29 voluntary consumers as in the order from the most liked to the least liked (BS ISO 8587: 2006 + A1: 2013). A group of 36 voluntary consumers were asked to evaluate the taste and aftertaste attributes of 4 samples in terms of unrecognized, sweet, salty, sour and bitter and for whom 'unrecognized' row was checked for any of the sample, description of the taste that they felt were asked to be written. Taste and after taste profiles of the fortified orange juices and the control

sample were constructed using radar graphs (Microsoft Office Excel 2010) for comparison.

Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate, and the results were expressed as mean \pm standard deviation, significant difference analyses at 95% confidence interval were conducted using one-way ANOVA statistical tool of Microsoft Office Excel 2010.

RESULTS AND DISCUSSION

Physicochemical properties of orange juice samples

Total soluble solid content (Brix[°]) of the fresh orange juice samples were measured using refractometer and determined as 11.53, 10.97, 11.43 and 11.07, in the control, sample 1, 2, and 3, respectively (Table 2). According to the Turkish Food Codex Legislation 2014/34, the Brix value should be at least 11.2[°] (Anonymous (2014)). In our study, *pH values* of the samples were also measured using a pH-meter to characterize the fortified orange juice samples, and there was no significant difference between the control and fortified samples that had the pH range of 3.66-3.68 (Table 2). Tüfekçi Benli (2008) investigated the pH values of different commercial orange juices ranged between 3.81 and 4.01. Furthermore, the Brix values changed between 11.23 and 12.27. Brix values of fortified orange juices were very consistent to the limit in the legislation and the findings in the literature as well (Tüfekçi Benli, H., 2008; Anonymous, 2014). Topuz et al. (2005) also indicated that there might be differences in the chemical properties of juices of different orange varieties and they found different pH (3.19 to 3.84), Brix values (11.00-12.82), and vitamin C contents (34.27 - 51.51 mg/100mL) in different orange varieties.

Table 2. pH, Brix, total carbohydrate, ascorbic acid and total phenolic contents of orange juice samples

Sample name	pH	Total soluble solids (Bx [°])	Total carbohydrate (g/L)	Ascorbic acid (mg/100mL)	Total phenolics (µg GAE/100 mL)
Control sample	3.68 \pm 0.12	11.5 \pm 1.2	17.34 \pm 4.94	54.47 \pm 2.22	313.6 \pm 3.3
Sample 1	3.66 \pm 0.14	11.4 \pm 1.0	16.65 \pm 6.25	64.80 \pm 8.49	315.7 \pm 4.6
Sample 2	3.66 \pm 0.13	10.9 \pm 0.8	12.96 \pm 4.19	56.60 \pm 5.23	318.6 \pm 3.3
Sample 3	3.68 \pm 0.13	11.1 \pm 1.1	12.62 \pm 5.97	62.83 \pm 10.17	329.5 \pm 3.3

Ascorbic acid content of orange juice samples

Ascorbic acid content of the functional orange juices and the control sample were analysed by titrimetric method and the values for the control and fortified orange juice samples were given in Table 2. There was no significant difference ($P > 0.05$) between the ascorbic acid contents of the samples. However fortified orange juices had higher amounts of vitamin C (56.60 ± 5.23 to 64.8 ± 8.5 mg/100 mL) than the control fresh orange juice (54.5 ± 2.2 mg/100 mL). Thus, fortification with reishi extract increased vitamin C content of the control sample. In the literature, there were studies on the changes of vitamin C content during shelf life of commercial 100% orange juices and fresh squeezed orange juices (Lee and Goates, 1999; Kabasakalis et al., 2000). Lee and Goates (1999) determined that fresh squeezed orange juice had 40.6 mg/100mL when analyzed by HPLC chromatographic method. Moreover, Kabasakalis et al. (2000) used titrimetric method to analyze vitamin C contents of the orange juice samples, and they found 42.6 mg ascorbic acid/100 mL in commercial 100% orange juice, and 52.3 mg ascorbic acid/100 mL in fresh orange juice. In another study published in 1983, the required amount of ascorbic acid in orange juice was given as 44.5-66.8 mg/100 mL (Park et al., 1983). The results of our study were found similar to the data in the literature.

Total carbohydrate content of orange juice samples

Total carbohydrate contents of the fortified fresh orange juice were analyzed using UV-Vis spectrophotometer and compared with the value of the control orange juice. The values are found as 17.34, 16.65, 12.96, and 12.62 g/L, for the control, sample 1, sample 2, and sample 3, respectively (Table 2). As the concentration of the added reishi extract solution increased, total carbohydrate value of the control fresh orange juice is decreased. It was expected that total carbohydrate level would be increased by the addition of reishi extract to the juice, since reishi was known as the good source of polysaccharides. However, the decrease in total carbohydrate content could be attributed to the dilution of the orange juice by the addition of a diluted reishi extract solution, since the commercial solution

that was used to fortify was containing only 3 g active reishi extract per 10 mL of solution. The sucrose, fructose and glucose levels of the fruit juices were investigated and experimental studies were carried out using HPLC. Once the sum of these sugars were considered, orange juice samples contained a total of 8.07 to 10.89 g/L of carbohydrates which had closer values to the fortified orange juice samples in our study (Leopold et al., 2011). Moreover, in the study of Kelebek et al. (2009), sugar contents of fresh bloody orange juice samples were analyzed by HPLC method, and the total sugars were found as 120.19 g/L. The differences in the resulted values might be derived from the production method of fresh orange juices since almost all the fiber was removed in this study and mono- and di-saccharides were concentrated, or the difference in orange fruit variety might cause the changes in total sugar content in the juices.

Total phenolic content of orange juice samples

Consuming foods or beverages with higher phenolic compounds are of high interest among the consumers since they have great contribution to human health and well-being. It is well known that fruits and vegetables are good sources of these compounds (Crozier et al., 2006). *Ganoderma lucidum* had many functional bioactive compounds, such as polysaccharides, triterpenoids, and the phenolics as well (Ahmad, 2018). Therefore, in order to investigate the quality of the fortified orange juice as the functional beverage, total phenolic content analysis was carried out using Folin-Ciocalteu method. The control, sample 1, 2 and 3 had 313.6 ± 3.3 , 315.7 ± 4.6 , 318.6 ± 3.3 , and 329.5 ± 3.3 $\mu\text{g GAE}/100$ mL of total phenolics, respectively (Table 2). When the concentration of the extract in the orange juice increased, total phenolic content of the sample increased which might be due to the contribution of added reishi extract. However, there was no significant difference observed between the phenolic compound contents in the fortified orange juices ($P > 0.05$). Phenolics of several fruit juices were studied in Gardner et al. 2000, and orange juice sample had total phenolics of 755 $\mu\text{g GAE}/\text{mL}$. Rekha et al. (2012) investigated the total phenolics in fresh

juices of ripe and unripe oranges, and the values were found as 820 and 960 μg GAE/mL in ripe and unripe *Citrus sinensis*, respectively. In another study, fresh orange juice samples obtained from several varieties showed total phenolic content values of 361.4 to 1147.2 μg ferulic acid equivalents/mL (Rapisarda et al., 1999). The differences between the results may be due to the modifications in the methods, such as wavelength in spectrophotometer and variation in the standard solutions.

Color measurements of orange juice samples

According to the results of the color analyses (Figure 1), lightness (L^*) values were decreased by the increased amounts of added reishi extract. This might be due to the original dark brown color of reishi extract which lead to decrease in lightness of the samples. Other hue characteristics, a^* value and b^* values of all samples were in the positive range, and these values were prone to be increased by the addition of increasing amounts of reishi extract (a^* and b^* values of sample 1 < sample 2

< sample 3). Thus, fresh orange juice sample was tended to get more red and yellow color than green or blue when it was fortified with reishi extract. Furthermore, there was no significant difference ($P > 0.05$) in color characteristics of the control and the fortified samples which made it easier to market the newly produced fresh orange juice. In the literature, the color analyses of some orange juice samples were done and the color values were found very compatible with the results of our study. In the study of Tiwari et al. (2008), the effect of sonication parameters on the quality of orange juice was investigated, and L^* , a^* and b^* values of fresh orange juices were changed between 59.69-63.54, 5.04-7.53, and, 56.12-58.94, respectively at different sonication treatments. In another study, color attributes of ultrafrozen orange juice samples were determined as 73.59 ± 1.40 for L^* , 13.71 ± 1.10 for a^* , and 66.80 ± 2.58 for b^* values, which showed similar results to our study with slight changes caused by the treatments applied on the fresh juice (Meleández-Martiánez et al., 2007).

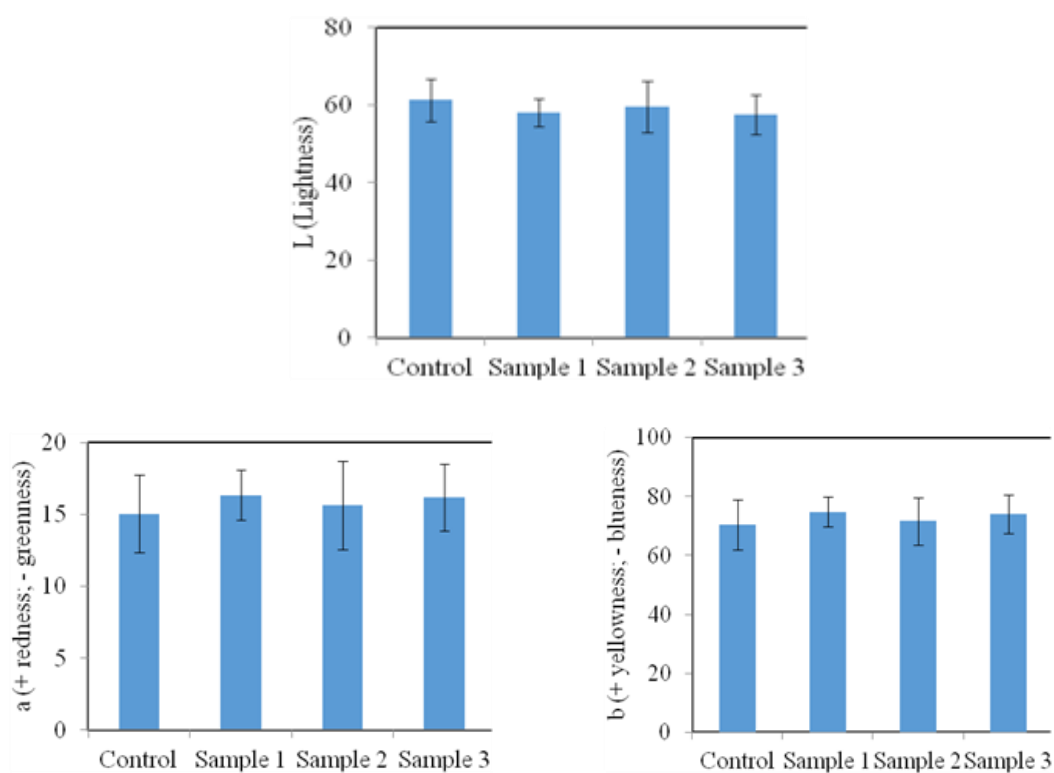


Figure 1. Color values of the control and fortified fresh orange juice samples; L^* (Lightness); a^* (+ redness; - greenness); b^* (+ yellowness; - blueness)

Sensory evaluation of consumer preference and taste profiling of the samples

Overall acceptance values of the samples analyzed by consumer preference tests; 5-point hedonic scale and ranking test were given in Table 3. The control sample got the highest score of odor, appearance and overall liking, whereas Sample 3 which contained app. 5 % (v/v) of reishi extract had the lowest scores in overall attributes. Sample 1 was rated as closest sample which had the most similar taste, odor, appearance to the control sample. Sample 1 and 2 showed very similar overall liking results, however odor scores indicated that the odor had changed a little when the added amount of the reishi extract was

increased to 3 and 5 % (v/v) as in Sample 2 and 3 (Table 3). 6 out of 36 people rated for the unrecognized taste which were perceived as ‘tart’, ‘medicinal’, ‘acidic’, ‘woody’, and ‘earthy’ tastes in the fortified orange juices. These attributes might be derived from the incorporation of reishi mushroom extract. Furthermore, sour and bitter tastes could be perceived more in Sample 3 that contained 5% (v/v) of reishi extract. According to the results of the preference ranking test for which 29 people joined for rating, orange juices fortified with 1.5 and 3 % (v/v) reishi extract were liked moderately, whereas Sample 3 containing 5% (v/v) extract was not liked when compared to the control orange juice sample (Table 3).

Table 3. Consumer preference test results

Samples	125 ^a	762 ^a	427 ^a	328 ^a
Appearance ^b	3.81±1.08	3.39±1.11	3.39±1.09	3.03±1.30
Odor ^b	3.86±1.08	3.25±1.09	2.08±1.09	2.08±1.09
Overall liking ^b	4±1.22	3.09±1.24	3.06±1.11	2.08±1.13
Rank totals ^c	52	69	76	103

^a 3-digit codes for sensory analyses; control sample: 125; fortified orange juice samples 762: Sample 1, 427: Sample 2, 328: Sample 3.

^b 5-point hedonic scale for odor, appearance and overall liking attributes (1: Dislike, 2: Like a little, 3: Like moderately, 4: Like, 5: Like very much)

^c Rank totals as a result of ranking test for 29 persons: <59 Like, 59-86: Like moderately, >86 Dislike.

A five-point hedonic scale evaluation of the orange juices fortified with probiotics and prebiotics were performed in the study of da Costa et al. (2017), and they found that the sensory attributes of functional beverages showed no significant difference with the pure orange juice. Luckow and Delahunty (2004) conducted consumer preference ranking tests to evaluate the conventional and functional orange juices, and the results indicated that a small group of consumers liked the functional orange juices fortified with probiotic/prebiotics. Moreover, functional juices revealed ‘dirty’, ‘medicinal’, and ‘dairy’ which could be attributed to the added probiotics.

Taste and after taste attributes of the samples in four basic tastes (sweet, salty, sour, bitter) were illustrated by taste profiles and a unrecognized category was added in order to allow the panelists

to evaluate the taste they could describe (Figure 2a and 2b). It was observed that the taste profiles of the control sample and Sample 1 which contained 320 mL fresh orange juice plus 5 mL reishi extract were very similar with the highest rating of sweet taste, however Sample 3 which contained app. 5% (v/v) of reishi extract had the lowest scores in overall attributes. When the taste difference in the mouth during tasting and after tasting was examined, the taste profiles of the products were found as similar. As a result of these analyses, fruit juices containing 1.25 g (Sample 1) and 3 g of active extracts (Sample 2 and 3) were compared and it was observed that the amount of added extract had no significant effect on the overall quality characteristics of the fruit juice.

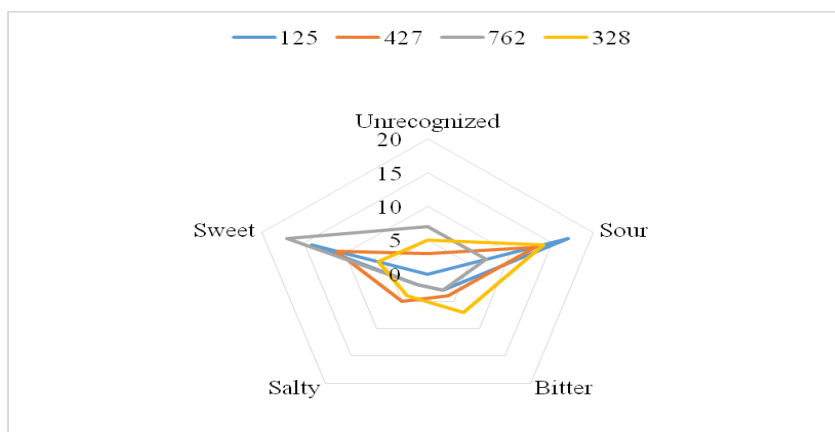


Figure 2a. Taste profiles of the control (125) and fortified orange juice samples (Sample 1: 762; Sample 2: 427; Sample 3: 328)

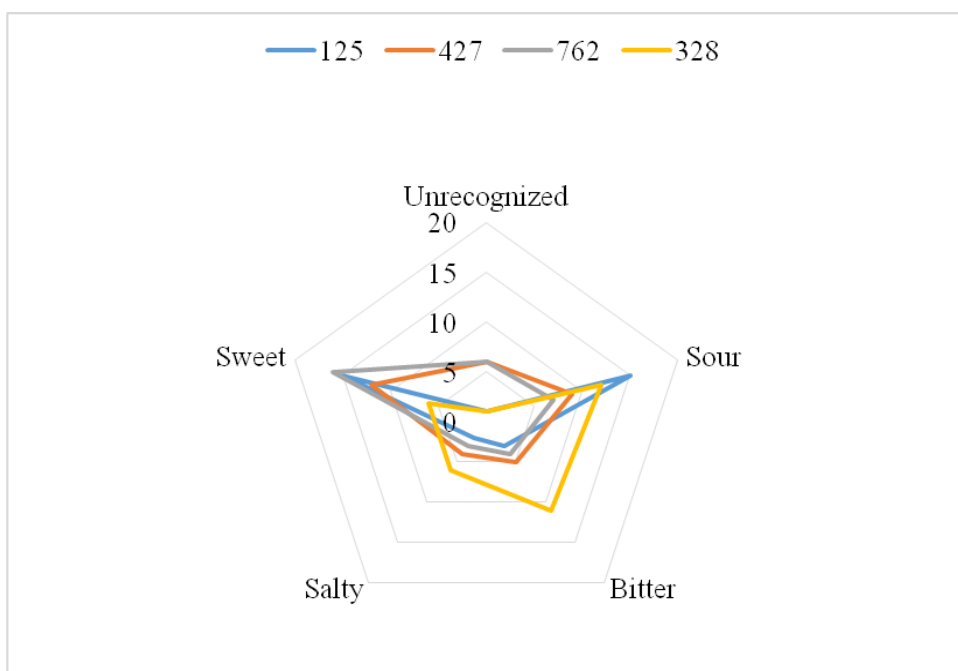


Figure 2b. After taste profiles of the control (125) and fortified orange juice samples (Sample 1: 762; Sample 2: 427; Sample 3: 328)

CONCLUSION

In this study, the effect of addition of health-beneficial reishi extract on the quality properties of fresh orange juice was investigated. Incorporation of reishi extract did not significantly alter the quality characteristics of natural fresh orange juice ($P > 0.05$). However, the most important parameter that distinguished four different samples was the sensory analysis. The

result of 5-point hedonic scale consumer preference study showed that the functional orange juices were moderately appreciated and arised a slight taste difference compared to the fresh orange juice. According to these results, the recommended daily intake dose of the extract (10 ml / day) was acceptable when added to 320 mL of packed orange juice, which could be drunk once a day. When 5 mL extract was added to 325

mL orange juice, 80% of the panelists found it acceptable for consumption, in that way consumers could drink fruit juice twice a day to get suggested amount of the extract for health promoting effects. However, when both the extract's unique bitter taste and the orange juice's own taste were combined, bitter taste of 10 mL extract was perceived more in 200 mL than 330 mL of fruit juice and thus less appreciated by the panelists. Finally, freshly squeezed orange juice may be a very good candidate to mask the bitter taste of reishi extract and consumers can prefer this functional drink as an alternative for their daily diet. Additionally, therapeutic effects of the recommended dose of the extract in functional orange juice would be better to be analyzed in the further studies.

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Ahmad, M. F. (2018). *Ganoderma lucidum*: Persuasive biologically active constituents and their health endorsement. *Biomed Pharmacother*, 107: 507-519, doi: 10.1016/j.biopha.2018.08.036.
- Anonymous (2004). Gıdaların üretimi, tüketimi ve denetlenmesine dair kanun hükmünde kararnamenin değiştirilerek kabulü hakkında kanun (5179). TBMM Genel Kurul. 5 Haziran 2004 tarih ve 25483 sayılı Resmi Gazete, Ankara.
- Anonymous (2014). Türk gıda kodeksi. Meyve suyu ve benzeri ürünler tebliği (2014/34). Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. 06 Agustus 2014 tarih ve 29080 sayılı Resmi Gazete, Ankara.
- AOAC International (2016). Official Methods of Analysis. 20th Edition (On-line). Method 976.21, Rockville, MD., the USA.
- Bishop, K. S., Kao, C. H., Xu, Y., Glucina, M. P., Paterson, R. R. M., Ferguson, L. R. (2015). From 2000 years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals. *Phytochemistry*, 114: 56-65, doi: 10.1016/j.phytochem.2015.02.015.
- BS ISO 8587:2006+A1:2013. Sensory analysis-Methodology-Ranking, BSI Standards Limited 2013.
- Chang, R. (1996). Functional properties of edible mushrooms. *Nutr Rev*, 54(11): 91-93.
- Cheung, P. C. K. (2008). Nutritional value and health benefits of mushrooms. In: *Mushrooms as functional foods*, Cheung, P. C. K. (chief ed.), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, pp.71-99.
- Crozier, A., Yokota, T., Jaganath, I. B., Marks, S. C., Saltmarsh, M., Clifford, M. N. (2006). Secondary metabolites in fruits, vegetables, beverages and other plant based dietary components. In *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, structure and role in the human diet*, Crozier, A., Clifford, M. N., Ashihara, H. (chief eds), Blackwell: Oxford, U.K., pp 208-302.
- da Costa, G. M., de Carvalho Silva, J. V., Mingotti, J. D., Barão, C. E., Klososki, S. J., Pimentel, T. C. (2017). Effect of ascorbic acid or oligofructose supplementation on *L. paracasei* viability, physicochemical characteristics and acceptance of probiotic orange juice. *LWT - Food Sci Technol*, 75: 195-201, doi: 10.1016/j.lwt.2016.08.051.
- Dayısoylu, K.S., Gezginç, Y., Cingöz, A. (2014). Fonksiyonel Gıda mı, Fonksiyonel Bileşen mi? Gıdalarda Fonksiyonellik. *The Journal of Food*, 39 (1): 57-62.
- Deepalakshmi, K., Mirunalini, S. (2011). Therapeutic properties and current medical usage of medicinal mushroom: *Ganoderma lucidum*. *Int J Pharm Sci Res*, 2(8): 1922-1929.
- Gardner, P. T., White, T. A., McPhail, D. B., Duthie, G. G. (2000). The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chem*, 68(4): 471-474, doi:10.1016/S0308-8146(99)00225-3.
- Gil-Ramírez, A., Soler-Rivas, C. (2014). The use of edible mushroom extracts as bioactive ingredients to design novel functional foods with hypocholesterolemic activities. In: *Mushrooms: Biological characterization, antioxidant properties and interactions with human health*, Grigoire Pesti, G. (chief ed.), Chapter 2, Nova Science Publishers, Inc., New York, USA, pp. 43-73.

- Kabasakalis, V., Siopidou, D., Moshatou, E. (2000). Ascorbic acid content of commercial fruit juices and its rate of loss upon storage. *Food Chem*, 70(3): 325-328, doi:10.1016/S0308-8146(00)00093-5.
- Kelebek, H., Selli, S., Canbas, A., Cabaroglu, T. (2009). HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchem J*, 91(2): 187-192, doi: 10.1016/j.microc.2008.10.008.
- Lee, H. S., Coates, G. A. (1999). Vitamin C in frozen, fresh squeezed, unpasteurized, polyethylene-bottled orange juice: a storage study. *Food Chem*, 65(2): 165-168, doi:10.1016/S0308-8146(98)00180-0.
- Leopold, L. F., Leopold, N., Diehl, H-A., Socaciu, C. (2011). Quantification of carbohydrates in fruit juices using FTIR spectroscopy and multivariate analysis. *Spectrosc*, 26 (2): 93-104.
- Luckow, T., Delahunty, C. (2004). Consumer acceptance of orange juice containing functional ingredients. *Food Res Int*, 37(8): 805-814, doi: 10.1016/j.foodres.2004.04.003.
- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M., Heredia, F. J. (2007). Carotenoids, color, and ascorbic acid content of a novel frozen-marketed orange juice. *J Agric Food Chem*, 55(4): 1347-1355, doi:10.1021/jf063025b.
- Meral, R., Doğan, İ.S. (2009). Fonksiyonel öneme sahip doğal bileşenlerin unlu mamullerin üretiminde kullanımı. *GIDA*, 34 (3): 193-198.
- Nielsen, S. S. (2017). Total carbohydrate by phenol-sulfuric acid method. In: *Food analysis laboratory manual*, Nielsen, S. S. (chief ed.), Springer International Publishing, Cham, Switzerland, pp. 137-141.
- Park, G.L., Byers, J.L., Pritz, C.M., Nelson, D.B., Navarro, J.L., Smolensky, D.C., Vandercook, C.E. (1983). Characteristics of California navel orange juice and pulp wash. *J Food Sci*, 48(2): 627-632, doi: 10.1111/j.1365-2621.1983.tb10805.x.
- Rapisarda, P., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Bonina, F., De Pasquale, A., Saija, A. (1999). Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices. *J Agric Food Chem*, 47(11): 4718-4723, doi:10.1021/jf990111l.
- Reis, F. S., Martins, A., Vasconcelos, M. H., Morales, P., Ferreira, I. C. (2017). Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms. *Trends Food Sci Technol*, 66: 48-62, doi: 10.1016/j.tifs.2017.05.010.
- Rekha, C., Poornima, G., Manasa, M., Abhipsa, V., Devi, J. P., Kumar, V. H. T., Kekuda, T. R. P. (2012). Ascorbic acid, total phenol content and antioxidant activity of fresh juices of four ripe and unripe citrus fruits. *Chem Sci Trans*, 1(2): 303-310, doi:10.7598/cst2012.182.
- Roberfroid, M. B. (1999). What is beneficial for health? The concept of functional food. *Food Chem Toxicol*, 37(9-10): 1039-1041, doi: 10.1016/S0278-6915(99)00080-0.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult*, 16(3): 144-158.
- Siro, I., Kápolna, E., Kápolna, B., Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. *Appetite*, 51(3), 456-467, doi:10.1016/j.appet.2008.05.060.
- Stone, H., Bleibaum, R. N., Thomas, H. A. (2012). *Sensory Evaluation Practices*. 4th Edition, Academic Press Elsevier Inc., Oxford, the UK, 438 p.
- Tang, W., Liu, J. W., Zhao, W. M., Wei, D. Z., Zhong, J. J. (2006). Ganoderic acid T from *Ganoderma lucidum* mycelia induces mitochondria mediated apoptosis in lung cancer cells. *Life Sci*, 80(3): 205-211, doi:10.1016/j.lfs.2006.09.001.
- Tiwari, B.K., Muthukumarappan, K., O'Donnell, C.P., Cullen, P.J. (2008). Modelling colour degradation of orange juice by ozone treatment using response surface methodology. *J Food Eng*, 88: 553-560, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2008.03.021.
- Topuz, A., Topakci, M., Canakci, M., Akinci, I., Ozdemir, F. (2005). Physical and nutritional properties of four orange varieties. *J Food*

Eng, 66(4): 519-523, doi: 10.1016 / j.jfoodeng.2004.04.024.

Tüfekçi Benli H. (2008). Piyasada Satılan Bazı Meyve Sularının Özelliklerinin Gıda Mevzuatına Ugunluğunun Araştırılması. (Yayımlanmış Yüksek Lisans Tezi). Çukurova Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

Wachtel-Galor, S., Choi, S. W., Benzie, I. F. F. (2005). Effect of *Ganoderma lucidum* on human DNA is dose dependent and mediated by hydrogen peroxide. *Redox Rep*, 10 (3):145–149, doi:10.1179 / 135100005X57355.

Wachtel-Galor, S., Yuen, J., Buswell, J. A., Benzie, I. F. F. (2011). *Ganoderma lucidum* (Lingzhi or Reishi) A Medicinal Mushroom. In: Herbal Medicine: Biomolecular and clinical aspects, Benzie, I. F. F., Wachtel-Galor S. (chief ed.), CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, FL, USA, pp. 175-199.

Wasser, S., P., Weis, A., L., (1999). Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives (review). *Int J Med Mushrooms*, 1(1): 31–62.



**D-GLİKOZDAN D-SORBİTOL VE L-ASKORBİK ASİT ÜRETİMİ:
BU BİLEŞİKLERİN ÖZELLİKLERİ, KULLANIM ALANLARI
VE SAĞLIK ÜZERİNE ETKİLERİ**

Ceren Mutlu^{1,2*}, Mustafa Erbaş¹

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

²Balıkesir Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Balıkesir, Türkiye

Geliş / *Received*: 06.08.2019; Kabul / *Accepted*: 09.12.2019; Online baskı / *Published online*: 21.01.2020

Mutlu, C., Erbaş, M. (2020). D-glikozdan D-sorbitol ve L-askorbik asit üretimi: bu bileşiklerin özellikleri, kullanım alanları ve sağlık üzerine etkileri. *GIDA* (2020) 45 (1): 92-102 doi: 10.15237/gida.GD19117

Mutlu, C., Erbaş, M. (2020). Production of D-sorbitol and L-ascorbic acid from D-glucose: their properties, fields of usage and effects on health. GIDA (2020) 45 (1): 92-102 doi: 10.15237/gida.GD19117

ÖZ

D-sorbitol birçok meyvede doğal olarak bulunan bir şeker alkolüdür. L-askorbik asit ise bitkiler ve bazı hayvanlar tarafından sentezlenebilen ancak insanlar tarafından L-gulono- γ -lakton oksidaz enzimi eksikliği nedeniyle sentezlenemediği için dışarıdan alınması zorunlu olan bir bileşiktir. D-sorbitol ve L-askorbik asit gıda, kimya, ilaç ve kozmetik sektörlerinde sıklıkla kullanılan ve insan sağlığı üzerine birçok olumlu etkileri bulunan iki üründür. Bu ürünler D-glikozdan kimyasal ve biyokimyasal reaksiyonlar ile ticari olarak üretilmektedirler. Bu bileşiklerin ticari üretiminde genellikle Reichstein-Grüssner veya iki aşamalı fermantasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Bu çalışmada D-sorbitol ve L-askorbik asidin bazı özellikleri, kullanım alanları, sağlık üzerine etkileri ve üretim yöntemleri derlenmiştir.

Anahtar kelimeler: D-glikoz, hidrojenizasyon, fermantasyon, *Gluconobacter oxydans*, *Ketogulonicigenum vulgare*

**PRODUCTION OF D-SORBİTOL AND L-ASCORBİK ACID FROM D-GLUCOSE:
THEIR PROPERTIES, FIELDS OF USAGE AND EFFECTS ON HEALTH**

ABSTRACT

D-sorbitol is a sugar alcohol naturally found in many fruits. L-ascorbic acid is a compound that can be synthesized by plants and some animals but must be externally taken by humans because it cannot be synthesized due to the lack of L-gulono- γ -lactone oxidase enzyme. D-sorbitol and L-ascorbic acid are two ingredients that are frequently used in the food, chemical, pharmaceutical and cosmetic industries and may have a number of positive effects on human health. These ingredients are generally produced commercially from D-glucose by a series of chemical and biochemical reactions. In the commercial production of these compounds, Reichstein-Grüssner or two-step fermentation methods are generally used. In this study; the properties, fields of usage, effects on human health and production methods of D-sorbitol and L-ascorbic acid are reviewed.

Keywords: D-glucose, hydrogenation, fermentation, *Gluconobacter oxydans*, *Ketogulonicigenum vulgare*

* Yazışmalardan sorumlu yazar/ *Corresponding author*

✉ cerenmutlu@akdeniz.edu.tr,

☎ (+90) 242 310 4317,

☎ (+90) 242 310 6306

Ceren Mutlu; ORCID no: 0000-0003-4943-2798

Mustafa Erbaş; ORCID no: 0000-0002-9485-2356

GİRİŞ

D-sorbitol ve L-askorbik asit gıda, kimya, ilaç ve kozmetik sektörlerinde geniş kullanım alanları bulunan iki ticari üründür. Bu ticari ürünler D-glikoz kullanılarak bir seri kimyasal ve biyokimyasal dönüşüm reaksiyonları dizisi ile üretilmekte ve birçok ülkede pazara sunulmaktadır. Dünyada yıllık D-sorbitol ve L-askorbik asit üretimi sırasıyla yaklaşık 800.000 (Zhang vd., 2016) ve 110.000 ton kadardır (Bhand ve Patwardhan, 2015). Sorbitol, tatlılığa ve düşük glisemik indekse sahip olması nedenleriyle diğer şekerlerin yerine gıdalara ilave edilmektedir (Deis ve Kearsley, 2012). L-askorbik asit ise sahip olduğu antioksidan özelliği nedeniyle et, süt, meyve-sebze ve yağ ürünlerine katılarak gıda sanayinde kullanılmaktadır (Delić vd., 1989). Bu çalışmada D-sorbitol ve L-askorbik asidin genel özellikleri, kullanım alanları, sağlık üzerine etkileri ve üretim yöntemleri derlenmiştir.

Sorbitol ve Özellikleri

Birçok meyvede (armut, elma, kayısı, şeftali vb.) doğal olarak bulunan sorbitol ilk olarak 1872 yılında üvez ağacı (*Sorbus aucuparia*) meyvelerinde keşfedilmiştir. Altı karbonlu bir şeker alkolü olan sorbitolün kimyasal formülü $C_6H_{14}O_6$ şeklindedir. Sorbitolün molekül ağırlığı 182.17 g/mol, erime noktası 93-112°C ve suda çözünürlüğü ise 72 g/100 mL olarak bildirilmiştir (Ghosh ve Sudha, 2012). Sorbitol olarak isimlendirilmesinin yanı sıra D-sorbitol, D-glusitol ve sorbol olarak da adlandırılmaktadır (Grembecka, 2015b). Hoş bir tadı olan ve tüketildiğinde ağızda serinlik hissi veren sorbitolün tatlılığının sakkarozun %50 ila %60'ı kadar olduğu bildirilmiştir (Ghosh ve Sudha, 2012). Sorbitolün diğer karbonhidratlarla karşılaştırıldığında tatlılığına rağmen daha düşük kalori ve glisemik indeks değerlerine sahip olduğu, kalorisinin 2.7 kcal/g ve glisemik indeks değerinin ise 9 olduğu bildirilmiştir (Grembecka, 2015b).

Sorbitolün Kullanım Alanları

Sorbitol ticari olarak şurup veya kristal halinde üretilmekte olup (Mishra vd., 2014), dünyada yıllık üretimi yaklaşık olarak 800.000 ton kadardır (Zhang vd., 2016). Üretilen sorbitolün %25 kadarı L-askorbik asit üretiminde hammadde olarak kullanılırken, %25 kadarı ise şeker şurubu

üretiminde değerlendirilmektedir. Sorbitolün geriye kalan %50 kadarından ise kimya, ilaç ve kozmetik sektörlerinde farklı amaçlarla yararlanılmaktadır (Mishra vd., 2014). Gıda sektöründe kullanılan sorbitolün şurup ve toz kristalleri E420 koduyla ifade edilmekte olup, GRAS (Generally Recognised As Safe) listesinde bulunan katkı maddeleri arasında yer almaktadır (Deis ve Kearsley, 2012). Sorbitol, kalori ve glisemik indeks değerlerinin mono ve disakkaritlere göre daha düşük olması nedeniyle diyet ve diyabetik gıdalarda diğer tatlandırıcılarla birlikte istenilen aroma ve tatlılığı ayarlamaya yardımcı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bu özelliği nedeniyle gıdalara ilave edilmesinin yanı sıra tabletler halinde de üretilerek satışa sunulmaktadır.

Sorbitol, tatlılık verici özelliğinin yanı sıra gıdalarda nem çekici, hacim ve kıvam artırıcı ve stabilizatör olarak da değerlendirilmektedir (Grembecka, 2015b). İşlenmiş et ürünlerinin lezzetini geliştirmek ve pişme sırasında mevcut şeklin korunması amacıyla plastikleştirici ajan olarak da bu gibi ürünlere ilave edilmektedir. Ayrıca bu ürünlerde sorbitolün sıcaklık etkisi ile esmerleşmemesi son ürün kalitesi bakımından önemli bir avantajdır (Deis ve Kearsley, 2012). Fırınlanmış ürünlere ve kahvaltılık gevrekler uzun yıllardır ilave edilen sorbitol, higroskopik özelliği nedeniyle ürünün nem içeriğinin sabit tutulması ve raf ömrünün daha uzun olması amaçlarıyla kullanılmaktadır (Ghosh ve Sudha, 2012). Sorbitol sakızlarda plastiğe benzer bir tekstür oluşturarak sakızın nemli bir şekilde kalmasını sağlamakta ve kalıp halinde kurumasını engellemektedir. Bunların yanı sıra ekzotermik olarak çözüldüğünden ağızda bir ferahlık hissi de oluşturmaktadır (Deis ve Kearsley, 2012).

Sorbitol gıdaların içeriğine ilave edilmekle birlikte; gıda ambalajlarında da ambalajların fiziksel özelliklerini geliştirmek amacıyla plastikleştirici ajan olarak kullanılmaktadır (Sanyang vd., 2015; Kowalczyk vd., 2016; Ma vd., 2018). Sorbitol ayrıca polimer ve ilaç sanayilerinde kullanılan sorbitan veya izosorbitidin (Robinson vd., 2015; Zada vd., 2017) yanı sıra çeşitli düşük molekül ağırlıklı alkollerin ve parafin gibi ürünlerin

sentezinde hammadde olarak da değerlendirilmektedir (García vd., 2019).

Sorbitolün İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

Gıda sanayi, özellikle biyolojik çalışmaların artışı, insanların yaşam tarzlarındaki değişim ve gıda tüketimi ile ilgili sağlıklı beslenme bilincinin yaygınlığına bağlı olarak üretimde sağlık kaygısını daha fazla göz önünde bulundurmaktadır. Yüksek miktarda şeker tüketiminin diyabet ve obezite gibi hastalıkların artmasına neden olduğu bilinen bir gerçektir. Bu hastalıkların önlenmesi veya azaltılması amacıyla gıda sektöründe alternatif tatlandırıcı madde arayışı sonucu sakkaroz, glikoz ve fruktoz gibi diğer ticari karbonhidratların yerine şeker alkollerini kullanılmaya başlanmıştır (Deis ve Kearsley, 2012; Grembecka 2015b). Şeker alkollerinden biri olan sorbitol, sakkaroz ve diğer karbonhidratlara göre çeşitli sağlık avantajlarına sahiptir (Grembecka, 2015b). Sorbitol, reaktif aldehit ve keton gruplarını içermediğinden Maillard reaksiyonuna katılmamakta (Ghosh ve Sudha, 2012) ve bu nedenle ısı işlem uygulanan ürünlerde sağlığı olumsuz etkileyen hidrosimetilfurfural (HMF) gibi ürünlerin oluşumu da gerçekleşmemektedir (Fennema vd., 2008).

Sorbitol, düşük glisemik indekse sahip olması nedeniyle vücut ağırlığının düzenlenmesi ve kilo kaybına yardımcı olması bakımlarından diğer şekerlerin yerine gıdalara ilave edilmektedir (Deis ve Kearsley, 2012). Ayrıca kanda glikoz seviyesini arttırmadığından ve metabolik sindirimi için çok az düzeyde insüline ihtiyaç bulunduğundan diyabet hastalığına sahip kişiler için önemli bir tatlandırıcı kaynağıdır (Ghosh ve Sudha, 2012).

Ağız içerisinde bulunan mikroorganizmalar şekerleri parçalayarak asit oluşumuna neden olmakta ve diş yüzeyindeki pH değerini 5.7'nin altına düşürdüğünde ise diş minesinde dekalsifikasyon meydana getirerek (Deis ve Kearsley, 2012) ağız ve diş sağlığını olumsuz etkilemektedir (Grembecka, 2015b). Sorbitol ise birçok karbonhidrattan farklı olarak ağız içerisinde ve dişlerde bulunan mikroorganizmalar tarafından metabolize edilemediğinden ağız ve diş

sağlığı bakımından bir tehdit oluşturmamaktadır (Grembecka, 2015a).

Yapılan araştırmalarda sorbitolün demirle kompleks oluşturarak gastrointestinal sistemde demirin çözünürlüğünü ve böylece emilimini arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca sorbitolün vitamin sentezi yapan bağırsak mikroflorasının gelişimini destekleyerek de vücutta B₁₂ vitamini sentezini ve emilimini arttırdığı da rapor edilmiştir (Ghosh ve Sudha, 2012). Ayrıca şeker alkollerinin prebiyotik bileşenlere benzer etkiler gösterdiği ve bağırsak fonksiyonlarının düzenlenmesine yardımcı olduğu da rapor edilmiştir. Sorbitol için sağlık açısından yasal olarak sınırlandırılmış bir günlük tüketim limiti bulunmamakla birlikte, Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu tarafından insanlar için kabul edilebilir günlük maksimum sorbitol alım miktarı 50 g olarak önerilmiştir (Sheet vd., 2014). Ancak diğer şeker alkollerinde de olduğu gibi önerilen miktarların üzerindeki tüketimi laksatif etki, şişkinlik ve karın ağrısı gibi rahatsızlıklara neden olmaktadır (Grembecka, 2015a). Bu rahatsızlıkların görülme sıklığının ve şiddetinin şeker alkolü tüketim miktarı ve süresi ile ortaya çıkan adaptasyona bağlı olarak azaldığı bildirilmiştir (Deis ve Kearsley, 2012).

L-Askorbik Asit ve Özellikleri

L-askorbik asit bitkiler ve bazı hayvanlar tarafından sentezlenebilen, ancak insanlar tarafından L-gulono- γ -laktone oksidaz enzimi eksikliği nedeniyle sentezlenemeyen (Delić vd., 1989) ve vücuttaki metabolik fonksiyonların devamlılığı için dışarıdan alınması zorunlu olan bir bileşiktir (Bhand ve Patwardhan, 2015; Padayatty ve Levine, 2016). L-askorbik asit ilk olarak 1928 yılında böbrek üstü bezlerinden izole edilerek kristal hekzo-uronik asit adıyla tanımlanmış ve daha sonra ise bitki dokularında tespit edilmiştir (del Rocío Gómez-García ve Ochoa-Alejo, 2016). L-askorbik asidin C vitamini olarak adlandırılması ise 1965 yılında IUPAC-IUB komisyonu tarafından tavsiye edilmiştir (Vandamme, 2016).

L-askorbik asit beyaz-sarı renkte ve kristal katı formdadır (Delić vd., 1989). Kimyasal formülü C₆H₈O₆ olup, molekül ağırlığı 176.13 g/mol, erime noktası 190-192°C (Vandamme, 2016) ve

suda çözünürlüğü ise 30 g/100 mL olarak bildirilmiştir (Eitenmiller vd., 2016). Oksijene karşı hassas olan L-askorbik asit, kristal formda veya düşük su aktivitesine sahip ortamda bulunduğu oksijen varlığında dahi yüksek stabilite gösterebilmektedir. Ancak yüksek su aktiviteli bir ortamda bulunduğu ise hızla okside olarak dehidroaskorbik aside dönüşmektedir. Dehidroaskorbik asit de daha düşük olmakla birlikte L-askorbik asit gibi biyolojik aktivite göstermekte olup, oksidasyonun ileri aşamalarında biyolojik aktivitesi bulunmayan 2,3-diketo-L-gulonik asit bileşiğine dönüşmektedir. Biyolojik sistemlerde indirgeyici ajanlar ile dehidroaskorbik asit formu L-askorbik aside geri dönüştürülebilirken, 2,3-diketo-L-gulonik asit bileşiği ise geri dönüşümsüz olarak kalmaktadır. Oksijenin yanı sıra sıcaklık, ışık, pH ve metal katalizörler de L-askorbik asit stabilitesi üzerine etki etmektedir (Eitenmiller vd., 2016). L-askorbik asit ışık varlığında ve yüksek sıcaklıkta Fe^{+3} ve Cu^{+2} katalizörlüğünde kolaylıkla okside olmaktadır (Vandamme, 2016).

L-Askorbik Asidin Kullanım Alanları

L-askorbik asit çoğunlukla ilaç, gıda, içecek, yem ve kozmetik sanayilerinde kullanılmakta olup (Zhou vd., 2012; Pappenberger ve Hohmann, 2013; Bhand ve Patwardhan, 2015; Vandamme, 2016), dünyada yıllık üretim miktarı yaklaşık olarak 110.000 tondur (Bhand ve Patwardhan, 2015). Üretilen L-askorbik asidin önemli bir kısmı ilaç sanayinde değerlendirilmektedir. L-askorbik asit, iskorbit hastalığının yanı sıra çeşitli patolojik durumların önlenmesi ve tedavisi için kullanılmakta ve metabolik fonksiyonların sağlıklı bir şekilde sürdürülebilmesini sağlamaktadır. L-askorbik asit bazı anemi türlerinin ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisine ve yaraların iyileştirilmesine yardımcı olmaktadır. Bağışıklık sistemine yönelik uyarıcı rolünden dolayı soğuk algınlığı, grip vb. gibi çeşitli enfeksiyonların önlenmesinde de L-askorbik asit takviyesinden yararlanılmaktadır (Vandamme, 2016).

L-askorbik asit sahip olduğu antioksidan özelliği nedeniyle gıda sektöründe geniş bir uygulama alanına sahiptir. Sıvı ve katı yağlara, et ve süt

ürünlerine, konserve ve dondurulmuş gıdalara ve içeceklere antioksidan madde olarak ilave edilmektedir. Ayrıca L-askorbik asit unlara da ilave edilerek hamurlarda yapı düzenleyicisi olarak kullanılmaktadır (Delić vd., 1989). L-askorbik asit ilavesi ile gıdalarda oksidasyon ve esmerleşme reaksiyonları engellenerek, aroma ve renkte istenilmeyen değişimler azaltılabilmekte veya önenebilmektedir. İçecek endüstrisinde ise belirtilen özelliklerinin yanı sıra antiseptik koruma sağlaması sebebiyle önemli bir katkı maddesi olarak değerlendirilmektedir.

Yem sanayisi hayvanların; strese karşı yeteneklerini arttırmak, bağışıklık fonksiyonlarını geliştirmek, kemik gelişimini hızlandırmak ve üreme yeteneklerini arttırmak gibi amaçlarla yemlere L-askorbik asit ilavesi yapmaktadır. Kozmetik ürünlere ise deride oluşan pigmentlerin önlenmesi, serbest radikallerin parçalanması ve yaşlanma belirtilerinin geciktirilmesi gibi amaçlarla L-askorbik asit katılması yapılmaktadır (Zhou vd., 2012).

L-Askorbik Asidin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

İskorbit, otoimmün idiyopatik trombositopenik purpura, yeni doğan bebeklerde hipoksik-iskemik beyin hasarı, viral miyokarditler, kronik ve akut viral hepatit, askaris, gastrointestinal kanal ülseri, damar setliği, kornea yanması ve konjonktivit, grip, kanser, bronşiyal astım ve nitrit zehirlenmesi gibi sağlık sorunlarının engellenmesinde ve tedavisinde L-askorbik asit kullanılmaktadır (Zhou vd., 2012). L-askorbik asit ökaryot hücre yapısına sahip canlıların hidroksilasyon reaksiyonları gibi metabolik faaliyetlerinde enzim kofaktörü olarak önemli rol oynamaktadır (Canali vd., 2014). Prolin aminoasidi ve kolajen sentezinde kullanılan lisinin hidroksilasyonunda görev alan prolil-3-hidrolaz, prolil-4-hidrolaz ve lisil hidrolaz enzimlerinin aktiviteleri için metabolizmada L-askorbik asit gereksinimi bulunmaktadır. ATP üretiminde yağ asitlerinin mitokondriye taşınması için gerekli olan karnitin bileşiğinin sentezinden sorumlu olan ϵ -N-trimetil-L-lisin hidrolaz ve γ -butirotetain hidrolaz enzimlerinin faaliyetleri için de L-askorbik aside ihtiyaç duyulmaktadır (Vandamme, 2016). L-askorbik asit histonlar ve

nükleik asitlerin demetilasyonuna katkı sağlamaktadır (Camarena vd., 2016). Ayrıca mikrozom metabolizmasında, nörotransmitterlerin sentezinde ve tirozin sentezi ve katabolizmasında yer almaktadır. Antioksidan özelliği nedeniyle demir ve bakır atomlarının indirgenmiş hallerinin korunarak, oksidasyonlarının önlenmesine katkı sağlamaktadır (Vandamme, 2016). Ayrıca bu özelliği ile vücutta sağlık problemlerine neden olan ve metabolik faaliyetler sonucu oluşan hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türlerine ve birçok serbest radikale karşı korunmaya yardımcı olmaktadır (Sies, 2014; Wheeler vd., 2015). Askorbik asit beyindeki oksidasyon-redüksiyon mekanizmasında da rol almakta ve eksikliğin meydana gelen redoks dengesizliği ve oksidatif strese bağlı olarak Alzheimer ve Parkinson gibi sağlık sorunlarının ortaya çıkmasıyla ilişkisinin bulunduğu belirtilmektedir (Covarrubias-Pinto vd., 2015).

Sağlık açısından faydalı özelliklerinin yanı sıra aç olarak yüksek dozda L-askorbik asit tüketildiğinde hazımsızlık ve ishal gibi sorunların ortaya çıkabileceği bildirilmiştir. Ayrıca aşırı tüketimin, demir yükünü arttırdığı ve böbrek taşı oluşumuna neden olduğu da rapor edilmiştir (Thomas vd., 2013). İnsanlarda günlük yaklaşık olarak 60 mg L-askorbik asidin metabolik faaliyetler sırasında parçalandığı belirlenmiştir. Organizma iç ortamında normal dengelerin ve sağlığın korunması için günlük L-askorbik asit tüketim miktarının kadınlarda 70 mg ve erkeklerde ise 90 mg kadar olması gerektiği rapor edilmiştir (Knight vd., 2016).

D-Glikozdan D-Sorbitol ve L-Askorbik Asit Üretimi

Askorbik asidin keşfinden sonra saf L-askorbik asit ihtiyacı ortaya çıkmış ve bu durum 1930'lu yılların başında ticari olarak L-askorbik asit üretim proseslerinin araştırılması için çalışmaların başlamasına yol açmıştır (Pappenberger ve Hohmann, 2013; Vandamme, 2016). 1933-1934 yılları arasında Tadeus Reichstein ve Anton Grüssner isimli bilim adamları tarafından L-askorbik asit üretimi gerçekleştirilmiştir (Vandamme, 2016). Günümüzde Reichstein-Grüssner prosesi olarak bilinen bu yöntem ile

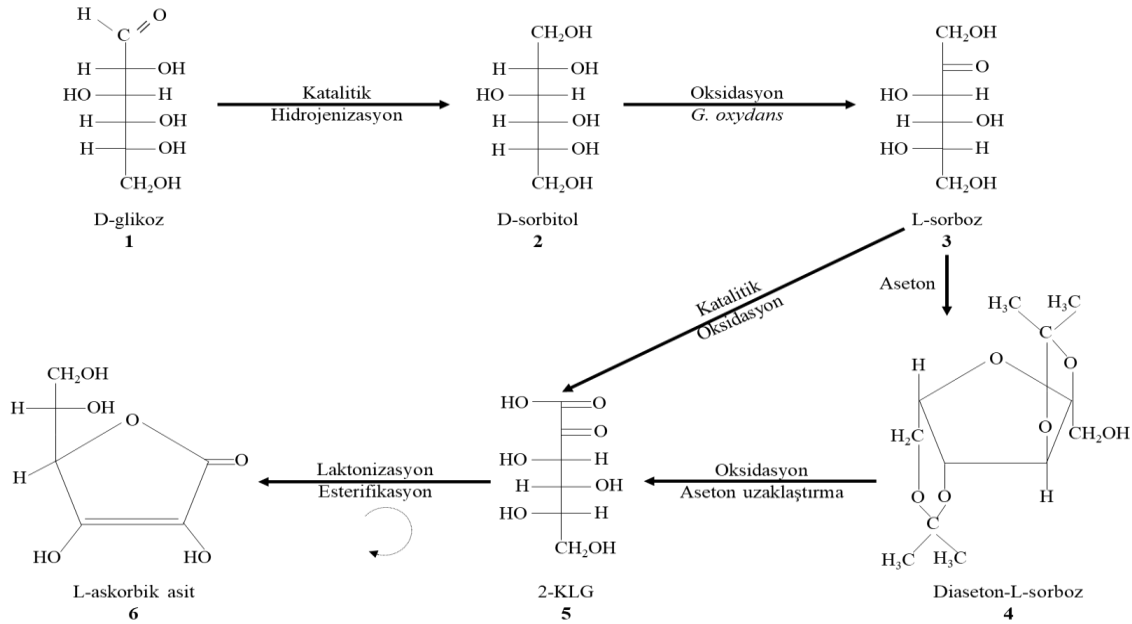
ticari olarak L-askorbik asit üretimi gerçekleştirilmektedir. Ayrıca bu yöntem dışında iki aşamalı fermantasyon yöntemi de L-askorbik asidin öncü maddesi olan 2-keto-L-gulonik asit (2-KLG) üretimi için kullanılmaktadır (Zhou vd., 2012).

Reichstein-Grüssner Yöntemi ile D-Sorbitol ve L-Askorbik Asit Üretimi

Reichstein-Grüssner yöntemi, bir seri kimyasal ve mikrobiyal basamaktan oluşmaktadır (Zhou vd., 2012). Bu yöntem ile L-askorbik asit üretim süresi üç gün ve verim ise yaklaşık %55 kadardır (Bommarius ve Riebel-Bommarius, 2004). Proses sırasında, D-glikozun hidrojenizasyon ile D-sorbitole dönüştürülmesi ve ilerleyen aşamalarda ise L-askorbik asit üretimi gerçekleştirildiğinden tek bir yöntem ile iki farklı ticari ürün elde edilebilmektedir. L-askorbik asit üretim basamakları ve oluşan moleküller Şekil 1'de verilmiştir.

Yöntemin ilk basamağında yüksek sıcaklık (140-150°C) ve basınç (80-125 bar) altında D-glikozun aldehit grubunun hidrojenizasyon ile sorbitole dönüştürülmesi işlemi yer almaktadır. Hidrojenizasyon ile monosakkaritlerde bulunan aldehit veya keton grupları hidrojen ile doyurulmakta ve alkol grupları oluşturulmaktadır (Deis ve Kearsley, 2012). Karbonhidratların hidrojenizasyonu gıda kimyası çalışmalarının temel proseslerinden birisidir ve sorbitol üretimi için yapılan ilk hidrojenizasyon işleminde, D-glikoz bileşiği Raney-nikel (Ni) katalizörü kullanılarak sorbitole dönüştürülmüştür. Ancak daha sonra yapılan araştırmalarda elde edilen ürünlerde nikel kalıntısı tespit edilmiş ve hidrojenizasyon işlemi için nikelin katalitik aktivitesi ve stabilitesinin yeterli olmadığı bildirilmiştir (Zhang vd., 2013; Murzin vd., 2015). Bu nedenlerle sonraki çalışmalarda, Raney-nikel diğer elementler ile kombine edilmiş (Romero vd., 2017) veya doğrudan nikel yerine katalizör olarak rutenyum (Ru) (Guo vd., 2014; Wang vd., 2015; Sulman vd., 2016) ve platin (Pt) (Kobayashi vd., 2014; Lazaridis vd., 2015; Yamaguchi vd., 2016) gibi elementler de kullanılmıştır. Ayrıca sorbitol üretimi için çeşitli çalışmalarda D-glikoz yerine fruktoz şurubu, çeşitli oligosakkaritler, nişasta ve selüloz da

hammadde olarak denenmiştir (Deis ve Kearsley, 2012; Negahdar vd., 2015; Romero vd., 2016; Yamaguchi vd., 2016).



Şekil 1. L-askorbik asit üretim basamakları ve oluşan moleküller

Reichstein-Grüssner prosesinde hidrojenizasyon işlemi için D-glikoz çözeltisi katı katalizörü içeren kolon reaktörüne yüksek basınçlı bir pompa yardımıyla enjekte edilmektedir. Katalizör, reaktör içerisinde amorf bir materyale tutturulmuş ve sabit bir halde bulunmaktadır. D-glikoz ve sisteme beslenen hidrojen, katalizör yüzeyinden geçirilmekte ve uygulanan yüksek sıcaklık ve basınç altında reaksiyona girmektedir (Vandamme, 2016). Yaklaşık iki saatlik bir reaksiyon süresi sonunda D-sorbitol oluşmakta ve elde edilen ürün filtre edildikten sonra aktif karbondan geçirilerek rengi giderilmekte, iyon değişim reçineleri kullanılarak saflaştırılmakta ve evapore edilerek şurup halinde veya püskürtürerek kurutma uygulanarak toz halinde ticari bir ürüne dönüştürülmektedir (Bommarius ve Riebel-Bommarius, 2004).

Prosesin ikinci basamağı üretilen D-sorbitolün mikrobiyal fermentasyon yoluyla L-sorboza okside edilmesinden oluşmaktadır. Biyolojik oksidasyon için *Gluconobacter oxydans* mikroorganizması kullanılmakta ve sorbitolün

oksidasyonu mikroorganizmada bulunan sorbitol dehidrojenaz enzimi ile gerçekleştirilmektedir (Vandamme, 2016). D-sorbitol *G. oxydans* tarafından 30°C sıcaklık ve pH değeri 5-6 olarak ayarlanmış bir ortamda yaklaşık 24 saat süre sonunda (Bommarius ve Riebel-Bommarius, 2004) L-sorboza okside edilmektedir (Vandamme, 2016). Elde edilen ürün filtre edilerek, anyon ve katyon iyon değiştirme reçineleri içeren kolonlardan geçirildikten sonra buharlaştırılarak konsantre edilmekte ve kristalizasyon işleminden sonra ticari bir ürüne dönüştürülmektedir (Delic vd., 1989).

Prosesin üçüncü basamağında L-sorboz bileşiminde bulunan hidroksil gruplarının korunması amacıyla ortama aseton ilave edilmekte ve diaseton-L-sorboz bileşiği oluşturulmaktadır (Pappenberger ve Hohmann, 2013; Vandamme, 2016). Bu işlem 24 saat boyunca L-sorboz, aseton, sülfürik asit ve eter çözeltilerinin 30°C sıcaklıkta birlikte ısıtılması ile gerçekleştirilmektedir. Daha sonra elde edilen karışım filtre edilmekte ve kullanılan çözeltiler vakum distilasyon işlemi ile

uzaklaştırılmaktadır. Bu işlemlerden sonra oluşan diaseton-L-sorboz bileşiği diğer bileşenlerden ayrılarak saflaştırılmaktadır (Bommarius ve Riebel-Bommarius, 2004).

Prosesin dördüncü basamağı diaseton-L-sorboz molekülünün potasyum permanganat katalizörlüğünde okside edilerek diaseton-2-keto-L-gulonik aside dönüştürülmesinden oluşmaktadır (Pappenberger ve Hohmann, 2013). Elde edilen diaseton-2-keto-L-gulonik asit, asetondan ayrılarak 2-KLG bileşiğine hidroliz edilmekte ve yapılan çöktürme ve süzme işlemlerinden sonra kurutulularak kristalize 2-KLG üretilmektedir.

Daha sonraki çalışmalarda üçüncü basamakta gerçekleştirilen L-sorbozun hidroksil gruplarının aseton ile korunduktan sonra 2-KLG bileşiğine okside edilmesi basamaklarını gerçekleştirmeden, doğrudan ikinci basamakta elde edilen L-sorboz molekülünün paladyum katalizörlüğünde, asidik koşullarda, 50°C sıcaklık ve 6 saat süre ile okside edilmesi ile de 2-KLG molekülünün elde edilebileceği belirlenmiştir (Bommarius ve Riebel-Bommarius, 2004).

Prosesin son basamağı ise 2-KLG molekülünün asidik koşullarda ısıtılması ile 1,4-lakton formuna dönüşümü ve enolleşerek L-askorbik asit oluşumu işlemlerini içermektedir. Lakton formu oluşmadan önce 2-KLG molekülünün metanol ile muamele edilerek metil-2-KLG formuna dönüştürülmesinin L-askorbik asit oluşum verimini arttırdığı bildirilmiştir. Esterifikasyon ve laktonizasyon işlemleri 100°C sıcaklıkta ve pH 2 değerinde HCl ve metil alkol çözeltileri kullanılarak iki saatlik reaksiyon süresince gerçekleştirilmektedir. L-askorbik asit üretimi oksijensiz ortamda (N₂ ve CO₂) yapılmakta olup, elde edilen ürüne distilasyon, evaporasyon ve kristalizasyon işlemleri uygulandıktan sonra L-askorbik asit elde edilmektedir (Bommarius ve Riebel-Bommarius, 2004).

İki Aşamalı Fermantasyon Yöntemi ile L-Askorbik Asit Üretimi

Reichstein-Grüssner prosesinde gerekli olan yüksek enerji girdisi (sıcaklık, basınç vb.) ve çevre için zararlı kimyasalların atık olarak ortaya çıkması

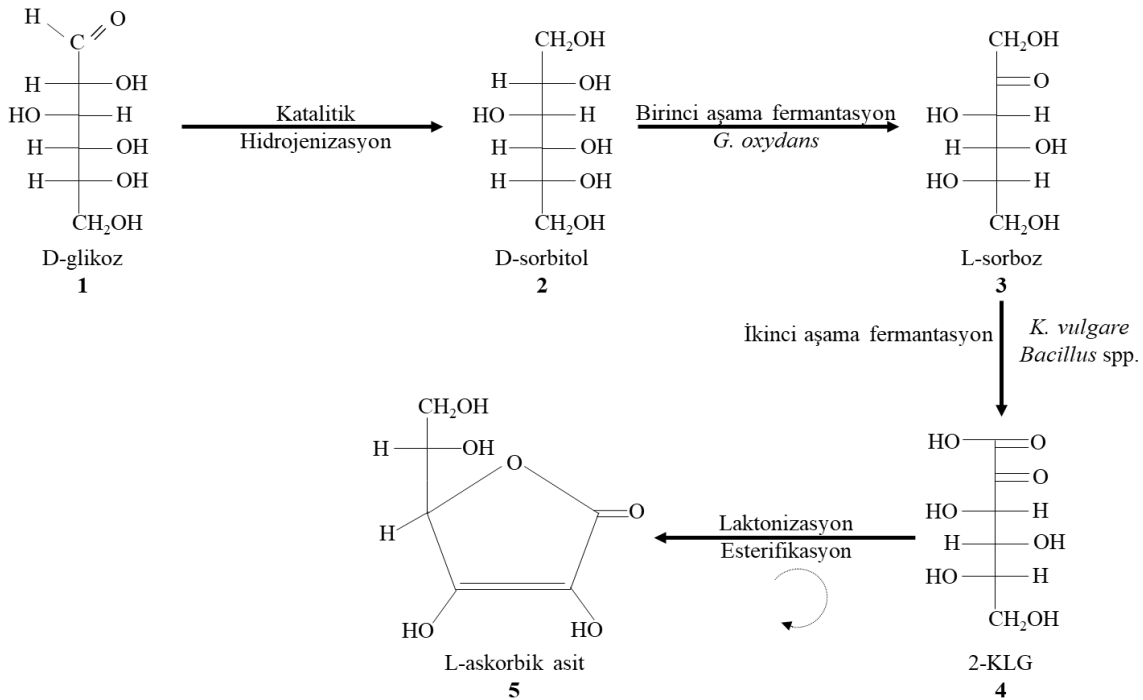
nedenleriyle daha az maliyet gerektiren ve daha az çevre zararı oluşturan mikrobiyal üretim basamaklarının geliştirilmesi önem kazanmıştır. Bu amaçla 1960'lı yıllarda Çin'de iki aşamalı fermantasyon yöntemi denenmiş ve bu yöntem L-askorbik asit üretimi yapan birçok firma tarafından da uygulanmaya başlanmıştır (Zhang vd., 2010). İki basamaklı fermantasyon yöntemi "geliştirilmiş Reichstein-Grüssner prosesi" olarak nitelendirilmekte olup (Vandamme, 2016), günümüzde dünyada üretilen L-askorbik asit miktarının %90 kadarı bu yöntem ile elde edilmektedir (Yang vd., 2017). Reichstein-Grüssner prosesi ve iki aşamalı fermantasyon yöntemleri arasındaki en temel fark, D-sorbitolden fermantasyon yoluyla üretilen L-sorbozun kimyasal prosesler yerine mikrobiyal fermantasyon yoluyla 2-KLG bileşiğine dönüştürülmesidir. İki aşamalı fermantasyonun birinci aşamasında, D-sorbitol fermente edilerek L-sorboza ve ikinci aşamasında ise L-sorboz fermente edilerek 2-KLG bileşiğine dönüştürülmektedir (Vandamme, 2016). L-askorbik asit üretiminde kullanılan iki aşamalı fermantasyon prosesi Şekil 2'de verilmiştir.

İki aşamalı fermantasyon prosesinin ilk aşaması olan D-sorbitolün fermantasyonunda ticari üretim için daha yüksek verimle üretime olanak sağlayan *G. oxydans* mikroorganizması tercih edilmektedir (Ge vd., 2013). Gram negatif bir bakteri olan *G. oxydans*, *Acetobacteraceae* familyasında yer almaktadır. Bu mikroorganizmanın ticari açıdan önemi oksidasyon tepkimesinde rol oynayan dehidrojenaz enzimlerine (pirolokinolin kinon bağımlı D-sorbitol dehidrojenaz (PQQ-SLDH), flavin adenin dinükleotide bağımlı D-sorbitol dehidrojenaz (FAD-SLDH) ve NADP bağımlı D-sorbitol dehidrojenaz (NADP-SLDH)) sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Endüstriyel olarak D-sorbitolden L-sorboz, D-glikozdan D-glukonik asit, 5-keto- ve 2-keto-glukonik asitler ve gliserolden dihidroksiaseton üretmek amaçlarıyla da bu mikroorganizmadan faydalanılmaktadır (Ge vd., 2013; Vandamme, 2016).

İki aşamalı fermantasyon prosesinin ikinci aşaması olan L-sorbozun fermantasyonu,

dönüşümü gerçekleştiren ana mikroorganizma ve onun gelişimini destekleyen yardımcı mikroorganizma olmak üzere iki farklı mikroorganizma ile gerçekleştirilmektedir. Ticari üretim için ana mikroorganizma olarak *Ketogulonicigenum vulgare* kullanılmaktadır (Zhang vd., 2010). *K. vulgare* toprakta bulunan, Gram negatif ve fakültatif anaerob bir mikroorganizmadır. Bu mikroorganizmanın ticari önemi; L-sorbozu, L-askorbik asidin öncü maddesi olan 2-KLG bileşiğine dönüştürebilecek enzimlere (L-sorboz dehidrojenaz ve L-sorbozon dehidrojenaz) sahip olmasından kaynaklanmaktadır (Huang vd., 2018). Bu mikroorganizma L-sorboz, L-guloz, L-sorboson, L-galaktoz ve L-idoz gibi bileşenleri kullanarak 2-KLG bileşiğini sentezleyebilmektedir (Zou vd., 2013). Ticari üretim için çoğunlukla L-sorboz içeren besiyeri kullanılmakta olup, besiyerine yalnızca *K. vulgare* inoküle edildiğinde mikroorganizma gelişiminin oldukça yavaş ve 2-KLG üretiminin ise düşük olduğu (Sun vd., 2018) ve üretim verimini arttırmak amacıyla *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* ve *Bacillus thuringiensis* gibi yardımcı mikroorga-

nizmaların besiyeri ortamına eklendiği bildirilmiştir (Ding vd., 2014; Ma vd., 2014; Jia vd., 2017). Yapılan çalışmalar *K. vulgare* mikroorganizmasının besiyeri ortamına yalnız inoküle edilmesiyle pürin nükleotitlerini ve deoksimidilat ve folat türevlerini yetersiz sentezlemesi nedenleriyle gelişiminin yavaş olduğunu göstermiş ve besiyerine ilave edilen yardımcı suş tarafından salgılanan proteinler, amino asitler, eritroz, eritritol ve inositol gibi endojen ve eksojen metabolitlerin ve yardımcı suşun hücrelerinin parçalanmasından elde edilen pürin substratların *K. vulgare* mikroorganizmasının gelişimini ve böylece 2-KLG birikimini arttırdığı bildirilmiştir (Zhang vd., 2010; Ye vd., 2014; Yang vd., 2015). 2-KLG bileşiğinin üretimi için fermantasyon genellikle 29-30°C sıcaklıkta ve pH 6-7 değerlerinde gerçekleştirilmektedir (Zhang vd., 2010; Yang vd., 2013). Fermantasyon ile elde edilen 2-KLG molekülü Reichstein-Grüssner prosesinde de olduğu gibi esterifikasyon ve laktonizasyon işlemleri ile L-askorbik aside dönüştürülmektedir.



Şekil 2. L-askorbik asit üretiminde kullanılan iki aşamalı fermantasyon süreci

SONUÇ

D-sorbitol ve L-askorbik asit çoğunlukla bitkilerin yapısında bulunan iki bileşendir. Bu bileşenler doğal olarak bulunmalarının yanı sıra Reichstein-Grüssner prosesi veya iki aşamalı fermantasyon yöntemleri gibi kimyasal ve biyokimyasal süreçleri içeren prosesler ile de üretilerek ticari olarak satışa sunulmaktadır. Gıda, kimya, ilaç ve kozmetik sektörleri gibi birçok alanda kullanım ihtiyacı bulunan bu bileşenlerle ilgili üretim yöntemlerinin araştırılması, çalışılarak optimize edilmesi ve dünyanın farklı ülkelerinde üretilen bu katma değeri yüksek iki ticari ürünün ülkemizde de üretilmesine yönelik çalışmalarının yapılmasının önemli bir konu olduğu değerlendirilmiştir. Bu amaçla; bu bileşenlerin genel özellikleri, kullanım amaçları, sağlık üzerine etkileri ve üretim yöntemleri bu derlemede genel olarak açıklanmıştır.

KAYNAKLAR

Bhand, D.V., Patwardhan, A.V. (2015). Statistical optimization of L-ascorbic acid production by *Xanthomonas campestris* MTCC 2286 using sucrose as a cheap carbon source. *J Biochem Technol*, 6(1): 922-928.

Bommarius, A.S., Riebel-Bommarius, B.R. (2004). Biocatalysis: Fundamentals and applications. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGAA*, Weinheim, 611 pp.

Camarena, V., Wang, G. (2016). The epigenetic role of vitamin C in health and disease. *Cell Mol Life Sci*, 73(8): 1645-1658.

Canali, R., Natarelli, L., Leoni, G., Azzini, E., Comitato, R., Sancak, O., Barella, L., Virgili, F. (2014). Vitamin C supplementation modulates gene expression in peripheral blood mononuclear cells specifically upon an inflammatory stimulus: a pilot study in healthy subjects. *Genes Nutr*, 9(3): 390.

Covarrubias-Pinto, A., Acuña, A., Beltrán, F., Torres-Díaz, L., Castro, M. (2015). Old things new view: Ascorbic acid protects the brain in neurodegenerative disorders. *Int J Mol Sci*, 16(12): 28194-28217.

Deis, R.C., Kearsley, M.W. (2012). Sorbitol and mannitol. *Sweeteners and Sugar Alternatives in*

Food Technology (second edition). *Wiley-Blackwell*, 331-346.

del Rocío Gómez-García, M., Ochoa-Alejo, N. (2016). Predominant role of the L-galactose pathway in L-ascorbic acid biosynthesis in fruits and leaves of the *Capsicum annuum* L. chili pepper. *Braz J Bot*, 39(1): 157-168.

Delić, V., Šunić, D., Vlašić, D. (1989). Microbial reactions for the synthesis of vitamin C (L-ascorbic acid). *Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors. Springer*, 299-334.

Ding, M.Z., Zou, Y., Song, H., Yuan, Y.J. (2014). Metabolomic analysis of cooperative adaptation between co-cultured *Bacillus cereus* and *Ketogulonicigenium vulgare*. *Plos One*, 9(4): e94889.

Eitenmiller, R.R., Landen Jr, W., Ye, L. (2016). Vitamin analysis for the health and food sciences. *CRC Press* (second edition), 664 pp.

Fennema, O.R., Damodaran, S., Parkin, K.L. (2008). Fennema's food chemistry. *CRC Press* (fourth edition), 1160 pp.

García, B., Moreno, J., Iglesias, J., Melero, J.A., Morales, G. (2019). Transformation of glucose into sorbitol on Raney nickel catalysts in the absence of molecular hydrogen: sugar disproportionation vs catalytic hydrogen transfer. *Top Catal*, 1-9.

Ge, X., Zhao, Y., Hou, W., Zhang, W., Chen, W., Wang, J., Zhao, N., Lin, J., Wang, W., Chen, M. (2013). Complete genome sequence of the industrial strain *Gluconobacter oxydans* H24. *Genome Announcements*, 1(1): e00003-00013.

Ghosh, S., Sudha, M. (2012). A review on polyols: new frontiers for health-based bakery products. *Int J Food Sci Nutr*, 63(3): 372-379.

Grembecka, M. (2015a). Natural sweeteners in a human diet. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 66(3): 195-202.

Grembecka, M. (2015b). Sugar alcohols-their role in the modern world of sweeteners: a review. *Eur Food Res Technol*, 241(1): 1-14.

Guo, X., Wang, X., Guan, J., Chen, X., Qin, Z., Mu, X., Xian, M. (2014). Selective hydrogenation

- of D-glucose to D-sorbitol over Ru/ZSM-5 catalysts. *Chinese J Catal*, 35(5): 733-740.
- Huang, M., Zhang, Y.H., Yao, S., Ma, D., Yu, X.D., Zhang, Q., Lyu, S.X. (2018). Antioxidant effect of glutathione on promoting 2- keto- L- gulonic acid production in vitamin C fermentation system. *J App Microbiol*, 125(5): 1383-1395.
- Jia, N., Ding, M.Z., Zou, Y., Gao F., Yuan, Y.J. (2017). Comparative genomics and metabolomics analyses of the adaptation mechanism in *Ketogulonigenium vulgare*-*Bacillus thuringiensis* consortium. *Sci Rep-UK*, 7(46759): 1-8.
- Knight, J., Madduma-Liyanaage, K., Mobley, J.A., Assimos, D.G., Holmes, R.P. (2016). Ascorbic acid intake and oxalate synthesis. *Urolithiasis*, 44(4): 289-297.
- Kobayashi, H., Yamakoshi, Y., Hosaka, Y., Yabushita, M., Fukuoka, A. (2014). Production of sugar alcohols from real biomass by supported platinum catalyst. *Catal Today*, 226: 204-209.
- Kowalczyk, D., Gustaw, W., Ziğba, E., Lisiecki, S., Stadnik, J., Baraniak, B. (2016). Microstructure and functional properties of sorbitol-plasticized pea protein isolate emulsion films: Effect of lipid type and concentration. *Food Hydrocoll*, 60: 353-363.
- Lazaridis, P.A., Karakoulia, S., Delimitis, A., Coman, S.M., Parvulescu, V.I., Triantafyllidis, K.S. (2015). D-glucose hydrogenation/hydrogenolysis reactions on noble metal (Ru, Pt)/activated carbon supported catalysts. *Catal Today*, 257: 281-290.
- Ma, Q., Zou, Y., Lv, Y., Song, H., Yuan, Y.J. (2014). Comparative proteomic analysis of experimental evolution of the *Bacillus cereus*-*Ketogulonigenium vulgare* co-culture. *Plos One*, 9(3): e91789.
- Ma, X., Qiao, C., Zhang, J., Xu, J. (2018). Effect of sorbitol content on microstructure and thermal properties of chitosan films. *Int J Biol Macromol*, 119: 1294-1297.
- Mishra, D.K., Dabbawala, A.A., Park, J.J., Jhung, S.H., Hwang, J.S. (2014). Selective hydrogenation of D-glucose to D-sorbitol over HY zeolite supported ruthenium nanoparticles catalysts. *Catal Today*, 232: 99-107.
- Murzin, D.Y., Duque, A., Arve, K., Sifontes, V., Aho, A., Eränen, K., Salmi, T. (2015). Catalytic hydrogenation of sugars. In biomass sugars for non-fuel applications. *Roy Soc Chem*, 89-133.
- Negahdar, L., Hausoul, P.J., Palkovits, S., Palkovits, R. (2015). Direct cleavage of sorbitol from oligosaccharides via a sequential hydrogenation-hydrolysis pathway. *Appl Catal B: Environ*, 166: 460-464.
- Padayatty, S.J., Levine, M. (2016). Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks. *Oral Dis*, 22(6): 463-493.
- Pappenberger, G., Hohmann, H.P. (2013). Industrial production of L-ascorbic acid (vitamin C) and D-isoascorbic acid. *Biotech Food and Feed Adv*, 143: 143-188.
- Robinson, J.M., Wadle, A.M., Reno, M.D., Kidd, R., Barrett Hinsz, S.R., Urquieta, J. (2015). Solvent-and microwave-assisted dehydrations of polyols to anhydro and dianhydro polyols. *Energ Fuel*, 29(10): 6529-6535.
- Romero, A., Alonso, E., Sastre, Á., Nieto-Márquez, A. (2016). Conversion of biomass into sorbitol: cellulose hydrolysis on MCM-48 and D-glucose hydrogenation on Ru/MCM-48. *Micropor Mesopor Mat*, 224: 1-8.
- Romero, A., Nieto-Márquez, A., Alonso, E. (2017). Bimetallic Ru: Ni/MCM-48 catalysts for the effective hydrogenation of D-glucose into sorbitol. *Appl Catal A: Gen*, 529: 49-59.
- Sanyang, M.L., Sapuan, S.M., Jawaid, M., Ishak, M.R., Sahari, J. (2015). Effect of glycerol and sorbitol plasticizers on physical and thermal properties of sugar palm starch based films. In Proceedings of the 13th International Conference on Environment, Ecosystems and Development (EED '15), Kuala Lumpur, Malaysia, p. 157.
- Sheet, B.S., Artık, N., Ayed, M.A., Abdulaziz, O.F. (2014). Some alternative sweeteners (xylitol, sorbitol, sucralose and stevia). *Karaelmas Sci Eng J*, 4(1): 63-70.

- Sies, H. (2014). Role of metabolic H₂O₂ generation redox signaling and oxidative stress. *J Biol Chem*, 289(13): 8735-8741.
- Sulman, E.M., Doluda, V.Y., Matveeva, V.G., Grigorev, M.E., Sulman, M.G., Bykov, A.V. (2016). Ru-containing catalysts in hydrogenation of D-glucose in flow-type microreactor. *Chem Engineer Trans*, 52: 673-678.
- Sun, Z., Wang, R., Han, X., Xu, H., Yang, W. (2018). Enhanced 2-keto-L-gulonic acid production by applying L-sorbose-tolerant helper strain in the co-culture system. *AMB Express*, 8(1): 30.
- Thomas, L.D., Elinder, C.G., Tiselius, H.G., Wolk, A., Åkesson, A. (2013). Ascorbic acid supplements and kidney stone incidence among men: A prospective study. *JAMA Intern Med*, 173(5): 386-388.
- Vandamme, E.J. (2016). Industrial biotechnology of vitamins, biopigments, and antioxidants. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGAA*, Weinheim, 578 pp.
- Wang, S., Wei, W., Zhao, Y., Li, H., Li, H. (2015). Ru-B amorphous alloy deposited on mesoporous silica nanospheres: An efficient catalyst for D-glucose hydrogenation to D-sorbitol. *Catal Today*, 258: 327-336.
- Wheeler, G., Ishikawa, T., Pornsaksit, V., Smirnov, N. (2015). Evolution of alternative biosynthetic pathways for vitamin C following plastid acquisition in photosynthetic eukaryotes. *Elife*, 4: e06369.
- Yamaguchi, A., Sato, O., Mimura, N., Shirai, M. (2016). Catalytic production of sugar alcohols from lignocellulosic biomass. *Catal Today*, 265: 199-202.
- Yang, W., Han, L., Wang, Z., Xu, H. (2013). Two-helper-strain co-culture system: a novel method for enhancement of 2-keto-L-gulonic acid production. *Biotechnol Lett*, 35(11): 1853-1857.
- Yang, W., Liu, C., Xu, H. (2015). L-sorbose is not only a substrate for 2-keto-L-gulonic acid production in the artificial microbial ecosystem of two strains mixed fermentation. *J Ind Microbiol Biot*, 42(6): 897-904.
- Yang, W., Han, L., Mandlaa, M., Zhang, H., Zhang, Z., Xu, H. (2017). A plate method for rapid screening of *Ketogulonigenium vulgare* mutants for enhanced 2-keto-L-gulonic acid production. *Braz J Microbiol*, 48(3): 397-402.
- Ye, C., Wei, Z., Nan, X., Liming, L. (2014). Metabolic model reconstruction and analysis of an artificial microbial ecosystem for vitamin C production. *J Biotechnol*, 182: 61-67.
- Zada, B., Chen, M., Chen, C., Yan, L., Xu, Q., Li, W., Guo, Q., Fu, Y. (2017). Recent advances in catalytic production of sugar alcohols and their applications. *Sci China Chem*, 60(7): 853-869.
- Zhang, J., Li, J.B., Wu, S.B., Liu, Y. (2013). Advances in the catalytic production and utilization of sorbitol. *Ind Engineer Chem Res*, 52(34): 11799-11815.
- Zhang, J., Liu, J., Shi, Z., Liu, L., Chen, J. (2010). Manipulation of *B. megaterium* growth for efficient 2-KLG production by *K. vulgare*. *Process Biochem*, 45(4): 602-606.
- Zhang, X., Durndell, L.J., Isaacs, M.A., Parlett, C.M., Lee, A.F., Wilson, K. (2016). Platinum-catalyzed aqueous-phase hydrogenation of D-glucose to D-sorbitol. *ACS Catal*, 6(11): 7409-7417.
- Zhou, J., Du, G., Chen, J. (2012). Metabolic engineering of microorganisms for vitamin C production. *Reprogramming Microbial Metabolic Pathways*, Springer, 241-259.
- Zou, W., Liu, L., Chen, J. (2013). Structure, mechanism and regulation of an artificial microbial ecosystem for vitamin C production. *Crit Rev Microbiol*, 39(3): 247-255.



TÜKETİCİLERİN PROBİYOTİK VE PREBİYOTİK GIDALARA YÖNELİK BİLGİ DÜZEYLERİ VE TÜKETİM DURUMLARININ BELİRLENMESİ: İZMİR/BORNOVA ÖRNEĞİ

İlkin Yücel Şengün*, Ayşegül Kırmızıgül, İbrahim Özaydın, Hasan Yarım

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

Geliş / Received: 19.08.2019; Kabul / Accepted: 08.12.2019; Online baskı / Published online: 21.01.2020

Şengün, İ.Y., Kırmızıgül, A., Özaydın, İ., Yarım, H. (2020). Tüketicilerin probiyotik ve prebiyotik gıdalara yönelik bilgi düzeyleri ve tüketim durumlarının belirlenmesi: İzmir/Bornova örneği. *GIDA* (2020) 45(1) 103-114 doi: 10.15237/gida.GD19123

Şengün, İ.Y., Kırmızıgül, A., Özaydın, İ., Yarım, H. (2020). Determination of knowledge level and consumption status of consumers on probiotic and prebiotic foods: A sample of İzmir/Bornova. *GIDA* (2020) 45(1) 103-114 doi: 10.15237/gida.GD19123

ÖZ

Bu araştırma, İzmir'in Bornova ilçesinde yaşayan bireylerin probiyotik ve prebiyotik gıdalar hakkındaki bilgi düzeylerini ve tüketim durumlarını belirlemek amacıyla planlanmıştır. Ankete katılan gönüllü 196 kişi tesadüfi örneklem yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Ankete katılan kişilerin %51.5'ini kadın, %48.5'ini erkekler oluşturmuş ve yaş aralığı çoğunlukla (%31.6) 22-24 arasında değişim göstermiştir. Anket sonuçları tüketicilerin %49'unun probiyotik ve prebiyotik kavramını bildiğini ortaya koymuştur. Tüketicilerin %52.3'ünün probiyotik/prebiyotik ürün satın alırken besin etiketine dikkat ettiği, %41'inin haftada en az bir kere probiyotik tükettiği, %54.1'inin ise tükettiği bu gıdalardan yarar gördüğü saptanmıştır. Probiyotik ve prebiyotik gıda tüketenlerin %63.9'unun bu ürünleri sindirim sistemine olan faydalarından dolayı tükettiği belirlenmiştir. Yürütülen bu çalışmanın sonuçları, sağlık üzerine birçok olumlu etkisi olan probiyotik ve prebiyotik ürünlerin önemini vurgulaması ve toplumun bu gıdalarla ilgili olarak doğru bir şekilde bilgilendirmesi gerektiğini ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: Probiyotik, prebiyotik, bilgi düzeyi, anket çalışması, tüketici

DETERMINATION OF KNOWLEDGE LEVEL AND CONSUMPTION STATUS OF CONSUMERS ON PROBIOTIC AND PREBIOTIC FOODS: A SAMPLE OF IZMIR/BORNOVA

ABSTRACT

This research is planned to determine the level of knowledge and consumption status of consumers living in Bornova/Izmir about probiotic and prebiotic foods. 196 volunteers participated in survey were determined by random sampling method. 51.5% females and 48.5% males participated in the survey and the age range consisted between 22-24 years (31.6%). The results of survey show that 49% of the consumers know the definition of probiotic and prebiotic terms. It was detected that 52.3% of the consumers take care of food label, 41% consume probiotics at least once a week and 54.1% take benefit to consume these foods. 63.9% of the consumers declared that they are consuming these foods for their benefits on digestive system. The results of this study show that the importance of probiotic and prebiotic products, which have many positive effects on health, should be emphasized and the public should be informed correctly on these foods.

Keywords: Probiotic, prebiotic, knowledge level, survey, consumer

*Yazışmalardan sorumlu yazar/ Corresponding author

✉ ilkin.sengun@ege.edu.tr

☎ (+90) 232 311 3028

☎ (+90) 232 311 4831

İlkin Yücel Şengün; ORCID no: 0000-0002-9445-5166

Ayşegül Kırmızıgül; ORCID no: 0000-0003-4723-7374

İbrahim Özaydın; ORCID no: 0000-0002-4958-3257

Hasan Yarım; ORCID no: 0000-0002-0184-6177

GİRİŞ

Günümüzde sağlık ve beslenme arasındaki ilişki gündemden güne önem kazanmaktadır. Bazı gıdaların üretiminde rol alan mikroorganizma gruplarının sağlık üzerine önemli etkiler gösterdiği ve çeşitli hastalıkları önlemek amacıyla kullanılabilen yapıları yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir. Tüketici sağlığı üzerinde yarattığı etkilerin detaylı bir şekilde incelendiği mikroorganizma grupları içerisinde yer alan bazı laktik asit bakterileri (LAB) normal floranın bir parçası olmasının yanı sıra çoğu zaman probiyotik özellik de taşıyabilmektedir. Günümüzde immün sistem hastalıklarının ve sindirim sistemi bozukluklarının birçok kişi tarafından yaşanır hale gelmesi, probiyotik ürün sayısı ve çeşitliliğinin ve buna bağlı olarak da bu yöndeki araştırma geliştirme faaliyetlerinin artmasına neden olmuştur. 2018 yılının son çeyreğindeki rakamlar göz önüne alındığında global probiyotik market değerinin 45.6 milyar dolar olduğu, 2024 yılında ise bu değer 65 milyar dolara (Global Market Insights) yükseleceği tahmin edilmektedir (Anonymous, 2018).

Probiyotikler Dünya Sağlık Örgütü tarafından “yeterli miktarda alındığında kişinin sağlığı üzerinde olumlu etki gösteren canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlanmaktadır (FAO/WHO, 2001). Yapılan çalışmalarla probiyotiklerin laktoz intoleransı, alerji, astım, çölyak, diyare gibi hastalıkların; enflamatuvar ve irritabl (hassas bağırsak sendromu) bağırsak hastalıkları gibi birçok gastrointestinal sistem hastalıklarının; HIV ve *Helicobacter pylori* enfeksiyonlarının tedavisinde; ağız, ürogenital ve vajinal sağlığı üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir (Markowiak ve Śliżewska, 2017; Sánchez vd., 2017). *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* ve *Streptococcus*'un bazı türleri ile *Saccharomyces boulardii* en iyi bilinen probiyotik mikroorganizmalar arasında yer almaktadır (Raghuwanshi vd., 2015; Zemzemoğlu vd., 2019). Fermente süt ürünleri, kefir gibi gıdalar, doğal olarak probiyotik özellikte mikroorganizmalar içermektedirler (Yağcı, 2002; Zemzemoğlu vd., 2019). Ancak bir gıdanın probiyotik olarak değerlendirilmesi için içerisinde en az 10^6 kob/g seviyesinde probiyotik özellikte canlı hücre içermesi gerekmektedir (Yurttaş ve

Yılmaz, 2017). Prebiyotikler ise kolonda bulunan bir veya sınırlı sayıdaki bakterinin aktivitesini seçici bir şekilde uyararak konakçı sağlığını olumlu bir şekilde etkileyen, üst gastrointestinal sistemde sindirilemeyen ancak kolonda bulunan bakteriler (*Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türleri) tarafından fermente edilebilen gıda bileşenleri olarak tanımlanmaktadır (Guerreiro vd., 2018). Günlük diyet ile gıda formunda tüketilen, tüketici sağlığı üzerinde olumlu bir etkiye sahip olan ve hastalık riskini azaltarak mevcut sağlığını geliştirdiği düşünülen gıdalar ise fonksiyonel gıdalar olarak tanımlanmaktadır (Mak vd., 2018; Şengün ve Bingöl, 2018). Fonksiyonel gıdaların önemli bir kısmını probiyotik ve prebiyotik özellikteki gıdalar oluşturmaktadır.

Fonksiyonel gıdalara olan tüketici eğilimlerini ve tutumlarını belirlemeye yönelik yurt dışında yapılmış çok sayıda çalışma bulunmasına karşın (Labrecque vd., 2006; Urala ve Lahteenmaki, 2007; Viana vd., 2008; Annunziata ve Vecchio, 2011; Barcellos ve Lionello, 2011; Oliver vd., 2014; Philip vd., 2019), ulusal literatürde bu tür çalışmaların oldukça az ve genellikle de üniversite çevresi ile sınırlı olarak yürütüldüğü (Özdemir vd., 2009; Derin ve Keskin, 2013; Seçer vd., 2014; Yurttaş ve Yılmaz, 2017; Zemzemoğlu vd., 2019) görülmektedir. Bu nedenle, yürütülen çalışma kapsamında İzmir'in Bornova ilçesinde ikamet eden kişilerin probiyotik ve prebiyotik gıdalar hakkındaki bilgi düzeylerinin ve bu ürünleri tüketme durumlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Örneklem

Tüketicilerin probiyotik ve prebiyotik gıdalar hakkındaki bilgi düzeyleri ve tüketim durumlarını saptamak amacı ile 2019 yılı Nisan-Haziran ayları arasında İzmir ilinin Bornova ilçesinde ikamet eden kişiler (N=445.232) üzerinde gerçekleştirilen bu anket çalışması tesadüfi örneklem metodu kullanılarak uygulanmıştır (Baltacı, 2018). Araştırmanın evreni, Türkiye İstatistik Kurumu'ndan (TÜİK, 2018) alınan ana kitle verileri ile Eşitlik 1 kullanılarak belirlenmiştir (n=383.828) (Yükselen, 2009; Dölekoğlu vd., 2015). Anket çalışmasına gönüllü 196 kişi katılmıştır (Katılım oranı: %51.2).

$$n = \frac{N \times Z^2 \times p \times q}{N \times E^2 + Z^2 \times p \times q} \quad (\text{Eşitlik 1})$$

n: örnek hacmi

p: incelenen olayın ana kitle içinde gerçekleşme olasılığı (%50)

q: 1-p

E: örnekleme hatası (%5)

$z_{\alpha/2}$: güvenirlilik derecesi (%95, tablo değeri = 1.96)

N: 445,232

Anket Uygulama

Anket başlamadan önce kişilere araştırma ve uygulama hakkında gerekli açıklamalar yapıldıktan sonra sözel onay alınmış ve anket uygulanmıştır. Anket çalışmasına katılım konusunda gönüllülük esas alınmıştır.

Anket Verilerinin Elde Edilmesi

Araştırmada kullanılan anket formu literatür araştırması sırasında elde edilen bilgiler ışığında ve daha önce yapılmış bazı çalışmalardan (Aydın vd., 2010; Derin ve Keskin, 2013; Zemzemoğlu vd., 2019) yararlanılarak hazırlanmıştır. Veriler, araştırmacılar tarafından hazırlanan online anket formu ve yüz yüze anket tekniğiyle toplanmıştır. Anket formu üç bölümden oluşmaktadır. İlk bölümde cinsiyet, yaş, öğrenim düzeyi sorularak katılımcıların demografik özellikleri saptanmıştır. İkinci bölümde tüketicilerin probiyotik ve prebiyotik gıdaların ne olduğu, bu gıdalar ile ilgili bilgiye ulaşmalarında hangi faktörlerin rol oynadığı ve bu faktörlerin satın almayı nasıl etkilediği ve ayrıca tüketicilerin probiyotik ve prebiyotik gıdalara olan bakışını değerlendirmek üzere bazı sorular sorulmuştur. Son bölümde ise probiyotik ve prebiyotik gıdaları tüketim durumu ve amacına yönelik sorular sorulmuştur. Bazı sorular çoktan seçmeli olurken, bazıları 3 ya da 4'lü likert ölçeği ile yönlendirilmiştir.

Anket Verilerinin Değerlendirmesi

Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesi SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 20 paket programı ile gerçekleştirilmiştir. Tanımlayıcı istatistiklerden yüzde (%), ortalama (\bar{x}) ve standart sapma (S) değerleri kullanılırken kategorik

değişkenler arasındaki ilişkinin belirlenmesi ki-kare (χ^2) testi ile $P < 0.05$ önem seviyesinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler çizelgelerde bölüm bazında sınıflandırılmış, sayı ve yüzde oranları içerecek şekilde verilmiştir. Çizelgelerde verilen bazı yüzdelik oranlar ilgili soruya cevap veren katılımcı sayısı toplamına göre hesaplanmıştır. Bazı sorular ise bir önceki soruya verilen “evet” ya da “hayır” cevabına göre farklı sayıda kişi tarafından cevaplanmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Tüketicilerin Sosyo-Demografik Durumları

Ankete katılan tüketicilerin cinsiyete göre dağılımı incelendiğinde %51.5'inin kadın ve %48.5'inin erkek, eğitim durumları incelendiğinde ise %4.1'inin ortaokul, %21.4'ünün lise, %66.8'inin üniversite mezunu, %6.1'inin yüksek lisans ve %1.5'inin doktora yapmış olduğu ortaya çıkmıştır (Çizelge 1). Lisans ve üzeri eğitime sahip olanların oransal yüksekliğinin nedeni olarak anket çalışmasının üniversite ve çevresinde yapılmış olması gösterilebilir. Ankete katılan tüketicilerin yaş dağılımları incelendiğinde ise %11.2'sinin 45 ve üzeri, %5.6'sının 40-44, %9.7'sinin 35-39, %12.2'sinin 30-34, %13.8'inin 25-29, %31.6'sının 22-24, %15.8'inin 18-21 arasında olduğu görülmektedir (Çizelge 1).

Tüketicilerin Probiyotik ve Prebiyotik Kavramları Hakkındaki Bilgi Düzeyleri

Araştırmaya katılan tüketicilerin “Probiyotik ve prebiyotik kavramlarının ne olduğunu biliyor musunuz?” sorusuna %49'u “evet” ve %51'i “hayır” cevabını vermiştir. Cinsiyete göre bilgi düzeyleri değerlendirildiğinde kadınların %65.3'ünün, erkeklerin ise %31.6'sının probiyotik ve prebiyotik kavramlarını bildiği belirlenmiştir ($P < 0.05$) (Çizelge 2). Eğitim durumuna göre tüketicilerin bu kavramlar hakkındaki bilgi düzeyleri değerlendirildiğinde, kavramlar hakkında bilgiye sahip olan en yüksek grubu (%66.7) yüksek lisans seviyesindeki tüketicilerin oluşturduğu tespit edilmiştir (Çizelge 2). Ayrıca probiyotik ve prebiyotik arasındaki farkı tüketicilerin %71.9'unun bilmediği tespit edilmiştir. Bu sorunun devamında sorulan “Cevabınız evet ise probiyotik ve prebiyotik kavramlarını kısaca açıklayabilir misiniz?” sorusu,

tüketicilerin verdiği cevapların doğruluğunu teyit etmek ve bilgisini daha detaylı bir şekilde ölçmek için hazırlanmıştır. Alınan yanıtlar doğrultusunda probiyotik ve prebiyotik kavramlarının bilindiği ifade edilse de, ilgili sorunun boş bırakıldığı ya da yanlış bir şekilde cevaplandığı tespit edilmiştir. Zemzemoğlu vd. (2019) tarafından yapılan benzer bir çalışmada öğrencilere sorulan “probiyotik nedir biliyor musunuz?” sorusuna alınan cevabın %55.6’sının “evet” ve %44.4’ünün “hayır” olduğu, devamında sorulan “Cevabınız evet ise; probiyotikler ile ilgili bilgi düzeyiniz hangi seviyededir?” sorusuna ise cevap veren öğrencilerin %68.6’sının orta ve %25.4’ünün düşük bilgi düzeyine sahip olduğu belirtilmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada probiyotik ürünler hakkında bilgi düzeyi kız öğrencilerde (%69.2) erkek öğrencilere (%40) göre daha yüksek bulunmuştur (Yabancı ve Şimşek, 2007). Benzer şekilde Zemzemoğlu vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada da cinsiyet ile probiyotik ürünler hakkında bilgi düzeyi karşılaştırıldığında, kız

öğrencilerde bilgi düzeyinin daha yüksek bulunduğu bildirilmiştir ($P < 0.05$). Yapılan başka bir çalışmada da bilgi sahibi olanların %15.1’inin erkeklerden, %31.6’sının bayanlardan oluştuğu, dolayısıyla bayanların erkeklere göre daha fazla bilgi sahibi olduğu bildirilmiştir ($P < 0.05$) (Aslan vd., 2019). Kadınların, probiyotik ve prebiyotik ürünler hakkındaki bilgi düzeyinin yüksek olması, sağlık, beslenme ve vücut görünümüne erkeklerden daha fazla önem vermeleriyle ilişkilendirilebilir. Dolayısıyla bu durum kadınların bilgi seviyesinin ve bu tip ürünleri tüketim miktarının daha fazla olmasını anlamlı kılmaktadır. Bilgi düzeyinin yaş gruplarına göre dağılımı incelendiğinde en yüksek değer 22-24 yaş aralığında olduğu ve artan yaşla beraber bilgi düzeyinin azaldığı görülmektedir (Çizelge 2). Yaş grubu düştükçe bilgi seviyesindeki yükselme, yeni neslin sosyal iletişim kanallarını daha verimli kullanması sonucunda doğru bilgiye ulaşarak sağlıklı beslenmeye verdiği önemin arttığını da göstermektedir.

Çizelge 1. Tüketicilerin sosya-demografik özellikleri
Table 1. Social-demographic characteristics of consumers

Genel bilgiler <i>General information</i>	Sayı (n) <i>Number (n)</i>	(%)
Cinsiyet <i>Gender</i>		
Kadın <i>Female</i>	101	51.5
Erkek <i>Male</i>	95	48.5
Toplam <i>Total</i>	196	100
Yaş (yıl) <i>Age (year)</i>		
18-21	31	15.8
22-24	62	31.6
25-29	27	13.8
30-34	24	12.2
35-39	19	9.7
40-44	11	5.6
45 ve üzeri <i>45 and upper</i>	22	11.2
Toplam <i>Total</i>	196	100
Eğitim Düzeyi <i>Education Level</i>		
Ortaöğretim <i>Secondary School</i>	8	4.1
Lise <i>High School</i>	42	21.4
Üniversite <i>University</i>	131	66.8
Yüksek Lisans <i>Master</i>	12	6.1
Doktora <i>Doctorate</i>	3	1.5
Toplam <i>Total</i>	196	100

Çizelge 2. Tüketicilerin probiyotik ve prebiyotik kavramlarını bilme düzeylerinin cinsiyet ve yaş gruplarına göre dağılımı

Table 2. Distribution of consumers' knowledge level of probiotic and prebiotic terms according to gender and age groups

Cinsiyet <i>Gender</i>	Evet <i>Yes</i>		Hayır <i>No</i>		Ortalama (\bar{x}) <i>Mean (\bar{x})</i>	Standart sapma (S) <i>Standart deviation (S)</i>
	n	%	n	%		
Kadın <i>Female</i>	66	65.3	35	34.7	1.35	0.47
Erkek <i>Male</i>	30	31.6	65	68.4	1.68	0.46
Toplam <i>Total</i>	96	49	100	51		
Öğrenim Durumu <i>Education Level</i>						
Orta öğretim <i>Secondary level</i>	1	12.5	7	87.5	1.87	0.35
Lise <i>High School</i>	25	59.5	17	40.5	1.40	0.49
Üniversite <i>University</i>	62	47.3	69	52.7	1.52	0.50
Yüksek lisans <i>Master</i>	8	66.7	4	33.3	1.33	0.49
Doktora <i>Doctorate</i>	0	0	3	100	2	0
Yaş (yıl) <i>Age (years)</i>						
18-21	17	54.8	14	45.2	1.45	0.50
22-24	30	48.4	32	51.6	1.51	0.50
25-29	13	48.1	14	51.9	1.51	0.50
30-34	11	45.8	13	54.2	1.54	0.50
35-39	10	52.6	9	47.4	1.53	0.51
40-44	4	36.4	7	63.6	1.54	0.51
45+	11	50	11	50	1.50	0.51

Tüketicilerin Probiyotik Mikroorganizmalar Hakkındaki Bilgi Düzeyleri

Bifidobacterium, *Lactobacillus* ve *Streptococcus* türleri ile *Saccharomyces boulardii*, en bilinen ve gıdalarda yaygın olarak bulunan probiyotik mikroorganizmalardır (Raghuwanshi vd., 2015; Zemzemoğlu vd., 2019). Tüketicilere sorulan "hangi probiyotik mikroorganizmaları (*Lactobacillus* türleri, *Bifidobacterium* türleri, *Streptococcus* türleri, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Aspergillus niger*) biliyorsunuz?" sorusu ile tüketicilerin %69.4'ünün probiyotik mikroorganizmaların hiçbirini bilmediği belirlenmiştir. Bilinmeme yüzdesinin yüksek olmasının nedeni olarak tüketicilerin marketlerde gıdaların etiketlerine yeteri düzeyde dikkat

etmemeleri gösterilebilir. Ayrıca öğrenim durumu ile bilinen probiyotik türler arasında yapılan değerlendirme sonucunda istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($P > 0.05$). Probiyotik türler arasında verilen cevaplar istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde ise anlamlı bir farklılık olduğu ($P < 0.05$), en çok verilen cevabın hiçbir mikroorganizmanın bilinmediği (%69.4) yönünde olup, en az verilen cevabın *Streptococcus* spp. (%8.2) olduğu belirlenmiştir.

Tüketicilerin Probiyotik ve Prebiyotik Gıda Tercihleri

Anket çalışmasından elde edilen sonuçlara göre kefir, tüketiciler tarafından en fazla tüketilen probiyotik gıda (%51), kurubaklagiller ise

tüketiciler tarafından en fazla tüketilen prebiyotik gıda (%79) olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3). Probiyotik gıdalara olan ilginin ve marketlerde kefir çeşitliliğinin artması ile tüketicilerin kefir

tüketme oranlarının yüksek olması beklenen bir sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 3. Tüketicilerin probiyotik ve prebiyotik gıda tercihlerinin dağılımı

Table 3. Distribution of probiotic and prebiotic food preferences of consumers

Probiyotik Gıdalar <i>Probiotic Foods</i>	Tercih durumu <i>The status of preference</i>				Toplam <i>Total</i>
	Kadın <i>Female</i>		Erkek <i>Male</i>		
	n	%	n	%	
Probiyotik yoğurt <i>Probiotic yoghurt</i>	66	65.3	31	32.6	49.5
Probiyotik peynir <i>Probiotic cheese</i>	15	14.9	9	9.5	12.2
Kefir <i>Kefir</i>	61	60.4	39	41.1	51
Hiçbiri <i>None</i>	9	8.9	18	18.9	13.8
Prebiyotik Gıdalar <i>Prebiotic Foods</i>					
Kurubaklagiller <i>Dry beans</i>	80	79.2	74	78.7	79
Soya <i>Soybean</i>	25	24.8	21	22.3	23.6
Soğan, sarımsak <i>Onion, garlic</i>	80	79.2	72	76.6	77.9
Buğday, yulaf <i>Wheat, oat</i>	74	73.3	62	66	69.7
Muz, elma <i>Banana, apple</i>	85	84.2	63	67	75.9
Hiçbiri <i>None</i>	3	3	2	2.1	2.6

Cinsiyete göre tüketilen gıdalar arasında istatistiksel açıdan değerlendirme yapıldığında; yoğurt ve kefir tüketiminin cinsiyete bağlı değişiklik gösterdiği ($P < 0.05$); peynir tüketiminde cinsiyete bağlı bir değişim gözlenmediği belirlenmiştir ($P > 0.05$). Zemzemoğlu vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada, öğrencilerin %7.8'i kefir haftada bir kez tüketirken, %73.1'inin hiç tüketmediği belirtilmiştir. Benzer şekilde Tarakçı vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada, tüketicilerin %15.3'ü kefir tüketirken, %84.7'sinin kefir tüketmediği; yoğurt tüketimi ile ilgili olarak ise erkeklerin %53.5'ünün, kadınların %39.3'ünün yoğurt tüketmeyi sevdiği belirlenmiştir. Eser (2017) tarafından yapılan başka bir çalışmada, en fazla tüketilen ürünlerin yoğurt (%39) ve probiyotikli yoğurt (%25) olduğu, kefirin ise (%16) en fazla tüketilen ürün olarak üçüncü sırada yer aldığı bildirilmiştir. Bornova ilçesinde yürütülen bu çalışmada ise, kefir tüketen kişi yüzdesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3). Bunun sebebinin, çalışmanın üniversite çevresinde yapılmış olması ve tüketicilerin kefir konusunda bilgi düzeylerinin yüksek olması ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

Tüketicilerin Probiyotik ve Prebiyotik Gıdaları Tüketme ve Tüketmeme Nedenlerinin Değerlendirilmesi

Probiyotik ve prebiyotik gıda tüketiminin nedenleri incelendiğinde, tüketicilerin %63.9'unun bu ürünleri sindirim sistemi üzerine faydalı olarak görmesi, %19.5'inin kansere karşı koruyucu etkilerinin olduğunu düşünmesi, %49.1'inin bu ürünleri lezzetli bulması, %49.1'inin bu ürünlerin bağışıklık sistemini güçlendirdiğini düşünmesi ve %13'ünün ise reklamların etkisi ile bu ürünleri tükettiği belirlenmiştir (Çizelge 4). Zemzemoğlu vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada probiyotik besin tüketiminde neyin etkisi var sorusuna öğrencilerin %24.6'sı sağlık sorunları ve %11.8'i reklamların etkisi cevabını vermiştir. Yapılan benzer bir çalışmada probiyotik ürün tüketiminde etkili olan faktörler sırasıyla; reklamlar (%31.6), sağlık sorunları (%27.9), tavsiye (%22.1), okulda alınan eğitim (%18.4) olarak belirlenmiştir (Derin ve Keskin, 2013). Bornova ilçesinde yürütülen bu çalışmada da bu ürünleri tüketmede en önemli nedenin, sindirim sistemine olan faydaları olduğu ve tüketicilerin çoğunluğunun (%41) bu ürünleri

haftada 1 kez tükettiği belirlenmiştir. Derin ve Keskin (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, erkek (%31) ve kız (%31.1) öğrencilerin en fazla oranda haftada 1 kez probiyotik ürünleri tükettikleri bildirilmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada ise 116 kişinin probiyotik gıdaları tüketme sıklığının haftada 2-3 kez olduğu bildirilmiştir (Eser, 2017).

“Probiyotik ve prebiyotik gıdaları tüketmiyorsanız nedenleriniz nelerdir?” sorusuna verilen cevaplar incelendiğinde, tüketicilerin bu gıdaları tüketmeme nedenlerinin %55.6’sının ne olduğunu bilmeme, %7.7’sinin doğal bulmama, %34.6’sının ihtiyaç duymama, %30.8’inin pahalı bulma ve %15.4’ünün lezzetsiz bulma olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4). Yapılan başka bir çalışmada, probiyotik ürün tüketmeyen öğrencilerin %54.7’sinin bu ürünü bilmediği, %24.8’inin ihtiyaç duymadığı, %10.4’ünün doğal bulmadığı, %5.8’inin lezzetsiz bulduğu ve %4.4’ünün ise pahalı bulduğu için bu ürünleri tüketmedikleri belirlenmiştir (Aydın vd., 2010). Yabancı ve Şimşek (2007) tarafından yapılan çalışmada ise probiyotik ürünleri tüketmeyen öğrencilerin bu ürünleri bilmedikleri (%43.5), doğal olmadığını düşündükleri (%19.5), ihtiyaç duymadıkları (%14.9), pahalı (%12.9) ve lezzetsiz buldukları (%8.5) için bu ürünleri tüketmedikleri belirlenmiştir. Zemzemoğlu vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada ise “probiyotik besin tüketmiyorsanız nedenleri nelerdir?” sorusuna öğrencilerin %75.7’si ne olduğunu bilmediği ve %11.2’sinin ihtiyaç duymadığı için tüketmediği ortaya konulmuştur. Bu soruyu takiben tüketicilere “probiyotiklerle ilgili endişeniz var mı?”, “cevabınız evet ise nedenleri nelerdir?” sorusu yöneltilmiş ve katılımcıların %52.2’sinin “hazır paketli probiyotik ürünlerin içeriğinden emin değilim” cevabını verdiği bildirilmiştir. Yapılan tüm bu çalışmalar, probiyotikler hakkında bilgi sahibi olunmamasının bu gıdaların tüketimini doğrudan etkilediğini ortaya koymuştur.

Probiyotik ve Prebiyotik Gıdaların Tüketiminde İletişim Araçlarının (reklam, gazete, internet vb.) Etkilerinin Değerlendirilmesi

Araştırma sonucunda iletişim araçlarının, tüketicilerin (%49’unun) probiyotik gıda tüketmeleri üzerine etkisi olduğu belirlenmiştir. Tüketicilerin probiyotik ve prebiyotik gıda tüketiminde reklam, gazete, internet vb. iletişim araçlarının cinsiyete göre etkileri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde kadınların iletişim araçlarından erkeklere göre daha fazla etkilendiği tespit edilmiştir (Çizelge 5) ($P < 0.05$). Yapılan benzer bir çalışmada probiyotik gıda tüketimini etkileyen faktörler birbirleriyle kıyaslanmış, probiyotik tüketimi ile reklamlar arasında anlamlı bir fark bulunduğu belirtilmiştir ($P < 0.05$) (Zemzemoğlu vd., 2019). Zeren (2015) tarafından yapılan çalışmada radyo, gazete ve reklamların probiyotik besin tüketimini nasıl etkilediği incelenmiş ve tüketicilerin %51.8’inin iletişim araçlarından olumlu, %4.4’ünün olumsuz etkilediği, %43.9’unun ise etkilenmediği belirlenmiştir.

Tüketicilerin Probiyotik Kullanımı ile Fayda Görüp Görmedikleri Bilgisinin Değerlendirilmesi

Probiyotik kullanımı ile immün fonksiyonlarının düzenlenmesi, sistemik enfeksiyonların ve kanserin önlenmesi, antibiyotiklerin yan etkilerinin azaltılması, konstipasyonun ve inflamatuvar bağırsak hastalıklarının tedavisi gibi birçok olumlu etkinin elde edildiği, yapılan bilimsel çalışmalarla kanıtlanmıştır (Tiihonen vd., 2010).

Yürütülen bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, tüketicilerin %54.1’lik kısmının probiyotiklerden fayda gördüğü, %39.3’lük kısmının ise bu konuda fikrinin olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 6). Probiyotik gıda tüketiminin tüketicilerin %68.6’sında kabızlığa, %42.3’ünde ishale, %16.7’sinde ise alerjiye iyi geldiği, laktoz intoleransına iyi gelme oranının ise %12.2 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 6). Tüketicilerin büyük bir kısmının probiyotik kaynaklar hakkındaki bilgisinin kısıtlı olması, probiyotik ürünleri tüketmeler dahi faydalarını değerlendirmelerini

zorlaştırmaktadır. 2015 yılında yapılan başka bir çalışmada, katılımcıların %72'si probiyotik gıdalardan fayda gördüğünü belirtirken, %28'i bu gıdalardan fayda görmediğini belirtmiştir (Zeren, 2015). Aynı çalışmada probiyotik ürünlerin etkisi ile katılımcıların %58.2'si kabızlık, %22.4'ü ishal, %29.9'u alerji ve %19.4'u laktoz intoleransında fayda sağladığını belirtmiştir. Üniversite öğrencileri üzerinde yapılan benzer bir çalışmada, probiyotik ürünlerden fayda görenlerin oranı

%84.9 iken, fayda görmeyenlerin oranı %15.1 olarak belirlenmiştir (Yabancı ve Şimşek, 2007). Balkış (2011) yapmış olduğu çalışmada, kız öğrencilerin %31.9'unun, erkek öğrencilerin ise %29.9'unun probiyotik gıdaları tükettiğini, %70.2'sinin bu ürünlerden fayda gördüğü ve fayda gören öğrenciler arasında kız öğrencilerin %71.2, erkek öğrencilerin ise %68.8'i oluşturduğunu belirlenmiştir.

Çizelge 4. Tüketicilerin probiyotik ve prebiyotik gıda tüketme ve tüketmeme nedenleri
Table 4. The reasons of consumers' consumption and nonconsumption of probiotic and prebiotic foods

Tüketim Nedenleri <i>Consumption reasons</i>	Cinsiyet <i>Gender</i>				Toplam <i>Total</i>
	Kadın <i>Female</i>		Erkek <i>Male</i>		
	n	%	n	%	
Sindirim sistemine olan faydaları <i>Benefits to the digestive system</i>	74	79.6	34	44.7	63.9
Kansere karşı koruyucu olduğunun düşünülmesi <i>Thinking that it is protective against cancer</i>	24	25.8	9	11.8	19.5
Lezzetli bulunması <i>Finding delicious</i>	39	41.9	44	57.9	49.1
Bağışıklık sistemini güçlendirmesi <i>Strengthening the immune system</i>	55	59.1	28	36.8	49.1
Reklamlar <i>Advertisements</i>	12	12.9	10	13.2	13
Tüketmeme Nedenleri <i>Nonconsumption Reasons</i>					
Ne olduğunu bilmeme <i>Lack of knowledge</i>	4	50	11	57.9	55.6
Doğal bulmama <i>Not natural</i>	0	0	2	11.1	7.7
İhtiyaç duymama <i>No need</i>	4	50	5	27.8	34.6
Pahalı bulma <i>Finding expensive</i>	2	25	6	33.3	30.8
Lezzetsiz bulma <i>Finding tasteless</i>	1	12.5	3	16.7	15.4
Sağlığa yararlı olmadığını düşünme <i>Thinking that it is not beneficial to health</i>	-	-	-	-	-
Tüketim Sıklıkları <i>Frequency of consumption</i>					
Günde 1 kez <i>Once a day</i>	30	29.7	22	23.4	26.7
Günde 2-3 kez <i>Two and three times a day</i>	7	6.9	1	1.1	4.1
Haftada 1 kez <i>Once a week</i>	40	39.6	40	42.6	41
Ayda 1 kez <i>Once a month</i>	20	19.8	16	17	18.5
Tüketmiyorum <i>I do not consume</i>	4	4	15	16	9.7

Probiyotik/prebiyotik gıdalara yönelik anket çalışması

Çizelge 5. Probiyotik ve prebiyotik gıda tüketiminde iletişim araçlarının etkileri
Table 5. Effects of communication tools on probiotic and prebiotic food consumption

		Olumlu <i>Positive</i>	Olumsuz <i>Negative</i>	Etkilemiyor <i>It does not affect</i>	Toplam <i>Total</i>
Kadın <i>Female</i>	n	65	10	26	101
	%	64.4	9.9	25.7	100
Erkek <i>Male</i>	n	31	7	57	95
	%	32.6	7.4	60	100
Toplam <i>Total</i>	n	96	17	83	196
	%	49	8.7	42.3	100

Çizelge 6. Probiyotik kullanımı sonucu fayda görülüp görülmediğine ilişkin bulgular
Table 6. Findings about the benefit of probiotic use

	Kadın <i>Female</i>		Erkek <i>Male</i>		Toplam <i>Total</i>	
	n	%	n	%	n	%
Evet <i>Yes</i>	69	68.3	37	38.9	106	54.1
Hayır <i>No</i>	4	4	9	9.5	13	6.6
Fikrim yok <i>I have no idea</i>	28	27.7	49	51.6	77	39.3
Toplam <i>Total</i>	101	51.5	95	48.5	196	100
Probiyotik kullanımının iyileştirdiği hastalıklar <i>Diseases that benefit from probiotic use</i>						
Kabızlık <i>Constiveness</i>	63	72.4	44	63.8	107	68.6
İshal <i>Diarrhea</i>	29	33.3	37	53.6	66	42.3
Alerji <i>Allergy</i>	19	21.8	7	10.1	26	16.7
Laktoz intoleransı <i>Lactose intolerance</i>	12	13.8	7	10.1	19	12.2

Tüketicilerin Probiyotik ve Prebiyotik Gıdaları Satın Alırken Göz Önüne Aldığı Kriterlerin Değerlendirilmesi

Tüketicilerin probiyotik ve prebiyotik gıda alırken dikkat ettikleri kriterler incelendiğinde;

katılımcıların %49.7'si ürünün fiyatına, %37.9'u markasına, %52.3'ü besin etiketi ve içeriğine, %7.2'si ise ambalajına bakarak gıdanın alımına karar verdiği görülmüştür (Çizelge 7).

Çizelge 7. Tüketicilerin probiyotik ve prebiyotik gıda satın alma kriterlerine ilişkin bulgular
Table 7. The findings of consumers' probiotic and prebiotic food purchasing criteria

Satın Alma Kriterleri <i>Purchasing criteria</i>	Cinsiyet <i>Gender</i>					
	Kadın <i>Female</i>		Erkek <i>Male</i>		Toplam <i>Total</i>	
	n	%	n	%	n	%
Fiyat <i>Price</i>	52	51.5	45	47.9	97	49.7
Marka <i>Brand</i>	47	46.5	27	28.7	74	37.9
Besin etiketi ve içeriği <i>Product label and content</i>	65	64.4	37	39.4	102	52.3
Ambalaj <i>Package</i>	7	6.9	7	7.4	14	7.2
Satın almıyorum <i>I do not buy</i>	6	5.9	21	22.3	27	13.8

Satın alma kriterleri cinsiyete göre istatistiksel olarak incelendiğinde, kadınların fiyat ($P > 0.05$), marka ($P < 0.05$) ve besin etiketi ve içeriğine ($P < 0.05$), erkeklere göre daha fazla dikkat ettiği belirlenmiştir. Seçer vd. (2014)'nin yaptığı çalışmada, tüketicilerin fonksiyonel gıda satın alırken dikkat ettikleri unsurlar incelenmiş ve tüketicilerin %84.5'inin sağlık faydası; %84'ünün uzmanların verdiği bilgiler; %79.9'unun ise marka cevabını verdiği bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada etiket bilgilerini okuduğunu belirtenlerin %45.4'lük oranla en kalabalık grubu oluşturduğu, markaya önem verenlerin ise %6.2'lik oranla çok düşük grubu oluşturduğu bildirilmiştir (Eser, 2017).

SONUÇ

Dünya'da ve Türkiye'de probiyotik gıda ürünlerine yönelik talep hızla büyümektedir. Bununla birlikte istek ve ihtiyaçlara uygun ürünler geliştirmek için tüketicilerin probiyotik ve prebiyotik gıdalara ilişkin tutumlarını anlamak, tüketici kabulünü arttırmada oldukça önemlidir. İzmir'in Bornova ilçesinde yaşayan kişilerin probiyotik ve prebiyotik gıdalar hakkındaki bilgi düzeylerini ve tüketim oranlarını belirlemek amacıyla tesadüfi olarak seçilen tüketiciler (196 kişi) üzerinde yapılan bu çalışmada, katılımcıların %49'unun probiyotik ve prebiyotik terimlerini bildiği, bununla birlikte %71.9'unun probiyotik ve prebiyotik gıda arasındaki farkı bilmediği belirlenmiştir. Tüketicilerin bu ürünler hakkında yeterli bilgiye sahip olmaması, bu ürünleri ne amaçla kullanılacağını bilmemesine ve bu tür ürünleri satın alırken tereddüt etmelerine neden olmaktadır. Yürütülen bu çalışma kapsamında tüketicilerin probiyotik gıdaların kullanımı konusunda bilinçlendirilmesi gerektiği ortaya konmuştur. Çalışmada probiyotik ve prebiyotik gıda tüketen katılımcıların bu ürünleri tüketim sıklığı en çok %41 ile haftada bir kez olarak belirlenmiştir. Ancak probiyotik ürünlerin kullanımından beklenen faydaların elde edilebilmesi, bu ürünlerin düzenli tüketim ve vücuda alınan hücre sayısının belirli seviyenin üzerinde ($> 10^6$) olmasına bağlıdır. Ayrıca katılımcıların probiyotik ve prebiyotik gıda alırken dikkat ettiği kriterler içerisinde en yüksek sırada %52.3 oranla "besin etiketi ve içeriği" yer alırken

ikinci sırada %49.7 oranla "fiyat" yer almıştır. Sonuç olarak sağlık üzerine birçok olumlu etkiye sahip olan probiyotik ve prebiyotik gıdalar hakkında halk bilinçlendirilmeli, firmalar tüketicilerin isteklerini ve ihtiyaçlarını göz önünde bulundurarak ürün çeşitliliğini, ulaşılabilir fiyat politikaları çerçevesinde geliştirmelidir.

KAYNAKLAR

Annunziata, A., Vecchio, R. (2011). Factors affecting Italian consumer attitudes toward functional foods. *AgBioForum*, 14(1): 20-32.

Anonymous, (2018). The Global Probiotics Markets. www.lumina-intelligence.com. (Accessed 15 May 2019).

Aslan, S., Kara, R., Yaman, H. (2019). Determining the consumption habits related to probiotic products. *Turkish JAF Sci Tech*, 7(6): 861-865.

Aydın M., Açıkgöz I., Şimşek B. (2010). Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi öğrencilerinin probiyotik ürün tüketimlerinin ve probiyotik kavramının bilinme düzeyinin belirlenmesi. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5(2): 1-6.

Balkış, M. (2011). Lise öğrencilerinin beslenme alışkanlıkları, probiyotik süt ürünleri tüketim sıklıkları ve bilgilerinin belirlenmesi: kulu örneği. Selçuk Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Çocuk Gelişimi ve Ev Yönetimi Ana Bilim Dalı Beslenme Eğitimi Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Konya, Türkiye, 140s.

Baltacı, A. (2018). Nitel araştırmalarda örnekleme yöntemleri ve örnek hacmi sorunsalı üzerine kavramsal bir inceleme. *Bitlis Eren Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi*, 7(1), 231-274.

de Barcellos, M.D., Lionello, R.L. (2011). Consumer market for functional foods in South Brazil. *Int J Food System Dynamics*, 2(2): 126-144.

Derin, D.Ö., Keskin, S. (2013). Gıda mühendisliği öğrencilerinin probiyotik ürün tüketim durumlarının belirlenmesi: Ege Üniversitesi örneği. *GIDA*, 38(4): 215-222.

Dölekoğlu, C.Ö., Şahin, A., Giray, F. (2015). Kadınlarda fonksiyonel gıda tüketimini etkileyen

- faktörler: Akdeniz illeri örneği. *J Agric Sci*, 21(4): 572-584.
- Eser, A.G. (2017). Consumers' interest and opinions about probiotics (a sample of Çanakkale-Biga). *Van Vet J*, 28(1): 25-30.
- FAO/WHO (2001). Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria, Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report. www.fao.org/documents/pub_dett.asp?lang=en&pub_id=61756 (Accessed 2 March 2019).
- Guerreiro, I., Oliva-Teles, A., Enes, P. (2018). Prebiotics as functional ingredients: focus on Mediterranean fish aquaculture. *Rev Aquacult*, 10(4), 800-832.
- Labrecque, J., Doyon, M., Bellavance, F., Kolodinsky, J. (2006). Acceptance of functional foods: A comparison of French, American, and French Canadian consumers. *Can J Agr Econ/Revue canadienne d'agroeconomie*, 54(4): 647-661.
- Mak, K.K., Tan, J.J., Marappan, P., Balijepalli, M.K., Choudhury, H., Ramamurthy, S., Pichika, M.R. (2018). Galangin's potential as a functional food ingredient. *J Func Foods*, 46: 490-503.
- Markowiak, P., Śliżewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9), 1021.
- Oliver, L., Rasmussen, H., Gregoire, M.B., Chen, Y. (2014). Health care provider's knowledge, perceptions, and use of probiotics and prebiotics. *Top Clin Nutr*, 29(2): 139-149.
- Özdemir, P.Ö., Fettahloğlu, S., Topoyan, M. (2009). Fonksiyonel gıda ürünlerine yönelik tüketici tutumlarını belirleme üzerine bir araştırma. *Ege Akademik Bakış*, 9(4): 1079-1099.
- Philip, C., Sreedhar, G., Muhammed, A., Majid, S.A. (2019). Knowledge and awareness of probiotics among the dental students in Thodupuzha-A questionnaire study. *Glob J Res Anal*, 8(03): 1-3.
- Raghuwanshi, S., Misra, S., Bisen, P.S. (2015). Indian perspective for probiotics: A review. *Indian J Dairy Sci*, 68(3): 1-12.
- Sánchez, B., Delgado, S., Blanco-Míguez, A., Lourenço, A., Gueimonde, M., Margolles, A. (2017). Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Mol Nutr Food Res*, 61(1), 1600240.
- Seçer, A., Kantar-Davran, M., Tok, N., Emeksiz, F., Akbay, C., Tapkı, N. (2014). Akademisyenlerin fonksiyonel gıdalara yönelik algılarının ve tutumlarının belirlenmesi: Doğu Akdeniz Bölgesi üniversiteleri örneği. XI. Ulusal Tarım Ekonomisi Kongresi, 3-5 Eylül 2014, Samsun, Türkiye, 1277s.
- Şengün, İ.Y., Bingöl, M.G. (2018). Plants as Prebiotic Sources. *Int J Environ Res Technol*, 1(2), 11-14.
- Tarakçı, Z., Karaağaç, M., Çelik, Ö.F. (2015). Ordu il merkezindeki tüketicilerin fermente süt ürünleri tüketim alışkanlıkları. *Akademik Ziraat Dergisi*, 4(2): 71-80.
- Tiihonen, K., Ouwehand, A.C., Rautonen, N. (2010). Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing Res Rev*, 9(2), 107-116.
- Türkiye İstatistik Kurumu-TÜİK (2018). <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=95&locale=tr>. (Erişim tarihi: 27.07.2019).
- Urala, N., Lähteenmäki, L. (2007). Consumers' changing attitudes towards functional foods. *Food Qual Prefer*, 18(1): 1-12.
- Viana, J.V., Da Cruz, A.G., Zoellner, S.S., Silva, R., Batista, A.L. (2008). Probiotic foods: consumer perception and attitudes. *Int J Food Sci Tech*, 43(9): 1577-1580.
- Yabancı, N., Şimşek, I. (2007). Üniversite öğrencilerinin probiyotik ürün tüketim durumları. *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni*, 6(6): 449-454.
- Yağcı, R. (2002). Prebiyotikler ve probiyotikler. *Çocuk Sağlığı Hastalıkları Dergisi*, 45: 337-344.
- Yurttaş, M., Yılmaz, A. (2017). Sağlık yüksekokulu öğrencilerinin probiyotik ürünler hakkında bilgi düzeyinin ve tüketim durumunun belirlenmesi.

Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 6(2):64-69.

Yükselen, C. (2009). Pazarlama Araştırmaları. Detay Yayıncılık, Ankara, Türkiye, 264 s.

Zemzemoğlu, T.E.A., Uludağ, E., Uzun, S. (2019). Üniversite öğrencilerinin probiyotik bilgi düzeyi ve tüketim durumlarının belirlenmesi. *GIDA*, 44(1): 118-130.

Zeren, R. (2015). Yetişkin bireylerin probiyotik besinler hakkında bilgi düzeyi ve tüketim durumlarının belirlenmesi. Haliç Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, Türkiye, 63 s.

YÜKSEK BASINÇ HOMOJENİZASYON İŞLEMİ UYGULANMIŞ FINDIK PROTEİNLERİNDEN ÜRETİLEN YENİLEBİLİR FİLMLEİN MEKANİK VE BARIYER ÖZELLİKLERİ

Furkan Türker Sarıcaoğlu*

Bursa Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bursa, Türkiye

Geliş / Received: 03.12.2019; Kabul / Accepted: 17.01.2020; Online baskı / Published online: 29.01.2020

Sarıcaoğlu, F. T. (2020). Yüksek basınç homojenizasyon işlemi uygulanmış fındık proteinlerinden üretilen yenilebilir filmlerin mekanik ve bariyer özellikleri. *GIDA* (2020) 45 (1): 115-124 doi: 10.15237/gida.GD19156

Sarıcaoglu, F. T. (2020). The effect of high pressure homogenization on the mechanical and barrier properties of edible films produced from cold press hazelnut meal proteins. GIDA (2020) 45 (1): 115-124 doi: 10.15237/gida.GD19156

ÖZ

Bu çalışmada, yüksek basınç homojenizasyon (YBH) işlemi %4 fındık proteini içeren süspansiyonlara 0, 25, 50, 75, 100 ve 150 MPa düzeylerinde uygulanmış ve bu süspansiyonlardan üretilen yenilebilir filmlerin optik, mekanik, bariyer ve mikro-yapısal özellikleri belirlenmiştir. YBH işlemi protein süspansiyonlarının partikül boyut dağılımlarında önemli bir azalma sağlamış ve daha homojen bir protein süspansiyonu oluşturmuştur. Elde edilen filmlerin kalınlıkları artan basıncın etkisiyle kısmen artış sergilerken, L^* ve b^* renk değerlerinde azalma tespit edilmiştir. Basıncın 100 MPa düzeyine kadar çıkması filmlerin ışık geçirgenliğini arttırmış, ancak 150 MPa düzeyinde kontrole yakın bir değer belirlenmiştir. Fındık proteini süspansiyonlarına uygulanan YBH işlemi, üretilen filmlerin su buharı geçirgenliklerini azaltırken, mekanik özelliklerini iyileştirmiş ve bu durum mikro-yapı görüntüleri ile doğrulanmıştır. Protein süspansiyonlarına 75 ve 100 MPa düzeylerinde YBH işleminin uygulanması üretilecek yenilebilir filmlerin mekanik ve bariyer özelliklerini iyileştirme potansiyeline sahiptir. Böylelikle, bu filmlerin gıda ambalajı olarak kullanılabilme potansiyellerinde artış söz konusu olabilecektir.

Anahtar kelimeler: Yüksek basınç homojenizasyon, yenilebilir film, fındık, protein.

THE EFFECT OF HIGH PRESSURE HOMOGENIZATION ON THE MECHANICAL AND BARRIER PROPERTIES OF EDIBLE FILMS PRODUCED FROM COLD PRESS HAZELNUT MEAL PROTEINS

ABSTRACT

In this study, high pressure homogenization (HPH) was applied to hazelnut protein suspensions at 0, 25, 50, 75, 100 and 150 MPa and optical, mechanical, barrier and microstructural properties of edible films produced from these suspensions were determined. HPH treatment resulted in significant reduction to particle size distribution of protein suspensions. The thicknesses of films showed a partial increase due to the effect of increasing pressure, while L^* and b^* values were decreased. Increasing pressure up to 100 MPa increased the light transmittance of films, but light transmittance at 150 MPa was closed to control. HPH treatment improved the mechanical properties of films while reducing the water vapor permeability and these results were confirmed by microstructural images. HPH treatment up to 75 and 100 MPa has the potential to improve mechanical and barrier properties of films. Thus, the potential of these films for food packaging applications may be increased.

Keywords: High pressure homogenization, edible film, hazelnut, protein.

* Yazışmalardan sorumlu yazar /Corresponding author

✉ furkan.sarıcaoglu@btu.edu.tr

☎ (+90) 224 300 3667

☎ (+90) 224 300 3419

Furkan Türker Sarıcaoğlu; ORCID no: 0000-0003-1173-5793

GİRİŞ

Sentetik gıda ambalaj malzemelerinin doğada kaybolmaları yüzlerce yıl sürebilmekte ve bu nedenle biyolojik olarak bozunmayan ambalaj grubunda yer almaktadırlar. Çevresel kirliliğe yol açan sentetik ambalaj maddelerinin kullanımını azaltmak amacıyla protein, karbonhidrat, lipid veya bunların çeşitli karışımları ile yenilebilir film ve kaplama üretimi son dönemlerde oldukça yaygınlaşmıştır. Yenilebilir film ve kaplamalar, gıdalardan nem kaybını azaltmak, oksijen, karbon dioksit ve uçucu aroma bileşiklerinin gıdadan çevreye veya çevreden gıdaya geçişini önlemek, renk değişimini yavaşlatmak, fiziksel olarak gıdayı sarmak ve korumak gibi önemli fonksiyonlara sahiptir (Pavlati ve Orts, 2009; Rocha, vd., 2014; Sarıcaoğlu, vd., 2018b). Son zamanlarda yapılan çalışmalar yenilebilir film ve kaplamaların çeşitli gıdaların raf ömrünü geliştirmede etkili olabileceğini ortaya koymaktadır (Salgado, vd., 2013; Sarıcaoğlu ve Turhan, 2019; Tural ve Turhan, 2017). Bu ambalajlar çevre dostu, doğal, dönüştürülebilir ve biyolojik olarak parçalanabilir özelliğe sahip olduklarından dolayı ilgi görmelerine rağmen, yeterli fiziksel dayanım ve gaz bariyer özelliğine sahip olmadıkları için gıda endüstrisinde yaygın kullanılmamaktadır.

Zengin protein içeriklerine rağmen gıda endüstrisi yan ürünleri günümüzde katma değeri düşük ürünler olarak değerlendirilmekte ve bu da önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bitkisel yağlık tohumlardan soğuk pres tekniği ile yağın alınmasından sonra kalan posa, önemli miktarda protein içermekte ve genellikle hayvansal yem karışımlarında kullanılmaktadır. Ülkemizde fındık (*Corylus avellana* L.), bitkisel yağ ve fındık kreması üretimi gibi sektörlerde kullanılmasının yanı sıra, kavrulmuş veya çiğ olarak da tüketime sunulan önemli bir gıda maddesidir. Dünya geneli fındık üretiminin %75'i ülkemizde gerçekleşmekte ve üretilen fındığın %80'i ihraç edilmektedir (Turan, vd., 2015). Fındığın kimyasal bileşimi incelendiğinde %62 yağ, %16 protein ve %11 karbonhidrat içerdiği görülmekte ve bu bileşimin yetiştiricilik faktörlerine bağlı olarak değiştiği bilinmektedir (Alasalvar, vd., 2003). Yağı alındıktan sonra geriye kalan fındık küspesi %35-41 arasında değişen oranlarda protein

içermektedir. Bu küspeden proteinlerin izole edilmesi ile yenilebilir film ve kaplama üretimi gerçekleştirilebilmekte ve böylece katma değeri daha yüksek ürünler elde edilebilmektedir.

Proteinlerden üretilen yenilebilir filmlerin mekanik ve gaz (su buharı, oksijen, karbon dioksit ve uçucu bileşikler) bariyer özellikleri zayıftır (Jiang ve Tang, 2013; Sarıcaoğlu, vd., 2018b). Bu nedenle filmlerin mekanik dirençlerini ve geçirgenlik özelliklerini iyileştirmek amacıyla enzim uygulamaları, mekanik, ultrasonik veya yüksek basınç homojenizasyon (YBH) gibi tekniklerden yararlanılmaktadır (Kang, vd., 2015; Sarıcaoğlu, vd., 2018b; Yaylı, vd., 2017). Sıvı bir süspansiyona YBH işlemi uygulandığında sıvının dar bir delikten sürekli geçmesi sağlanmakta ve böylece yüksek türbülans, kayma gerilimleri ve kavtasyon kuvvetleri aracılığıyla süspansiyonun akış hızı artmaktadır. Bu kuvvetler, süspansiyonda bulunan makro boyutlardaki moleküllerin bükülmesine, deforme olmasına ve hatta bozulmasına neden olmakta ve bu sayede de makro moleküllerin yapısal ve fonksiyonel özellikleri modifiye edilebilmektedir (Floury, vd., 2004). Yapılan bir çalışmada soğuk pres fındık küspesinden izole edilen proteinlerin fonksiyonel ve reolojik özellikleri üzerine YBH işleminin etkisi incelenmiş ve partikül boyut dağılımının azalması ile proteinlerin suda çözünürlüklerinin, emülsiyon ve köpük oluşturma özelliklerinin arttığı bildirilmiştir (Sarıcaoğlu, vd., 2018a).

Aydemir, vd. (2014) fındık proteininden üretilen yenilebilir filmlerin esnek, suda eriyebilen ve aktif bileşen taşıyıcı ambalaj maddesi olarak kullanılabilirliğini bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada Gul, vd. (2018), karanfil uçucu yağı ile fındık proteini süspansiyonlarına ultrasonik homojenizasyon işlemi uygulayarak ürettikleri filmlerin özelliklerini karakterize etmişlerdir. Görüldüğü gibi, fındık proteinleri ile yenilebilir film üretimi üzerine çalışmalar bulunmasına rağmen, fındık proteini filmlerinin mekanik ve bariyer özellikleri üzerine YBH işleminin etkilerini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma, YBH uygulanmış fındık proteini esaslı yenilebilir filmlerin fiziksel, mekanik, bariyer ve

mikro-yapısal özelliklerinin belirlenmesini amaçlamaktadır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Yenilebilir film üretiminde kullanılan fındık proteinleri Saricaoglu, vd. (2018a) tarafından belirtilen yöntem esas alınarak üretilmiştir. Elde edilen protein tozları %97.36 protein, %0.5 yağ, %0.8 kül ve %1.34 nem (AOAC, 1990) içerecek şekilde ağzı kapalı kavanozlarda buzdolabında muhafaza edilmiştir. Protein saflaştırma ve filmlerin üretilmesinde kullanılan kimyasallar analitik saflıkta temin edilmiştir.

YBH tekniği ile film çözeltilerinin hazırlanması

Film çözeltileri %4 fındık proteini içerecek şekilde saf su ile sulandırılmış (4.11 g protein tozu/100 mL saf su) ve süspansiyon pH'sı 5 M NaOH ile 12'ye ayarlandıktan sonra manyetik karıştırıcı üzerinde 1 saat süreyle karıştırılmıştır. Daha sonra film çözeltisi oda sıcaklığında YBH cihazına (Panda Plus 2000 model, GEA Niro Soavi, İtalya) beslenmiş ve 0 (kontrol), 25, 50, 75, 100 ve 150 MPa basınçlardan tek sefer geçirilerek homojenize edilmiştir. Homojenizatörden çıkan film çözeltilerini hızlı bir şekilde soğutmak için buzlu su banyosu içerisindeki beherde çözeltiler toplanmıştır. Film çözeltileri 90 °C'deki su banyosunda 1 saat süre ile karıştırılmış ve oda sıcaklığına soğutulduktan sonra protein miktarları üzerinden plastikleştirici olarak %40 gliserol ilave edilmiştir. Plastik petri kaplarına (9 cm çaplı) 25 mL film çözeltisi bir pipet yardımıyla aktarılmış ve fanlı etüvde (JSR Research Inc., JSOF-50 Model, Gongju, Korea) 40 °C'de 16 saat süreyle kurutulan filmler daha sonra petri kaplarından soyularak, doygun magnezyum nitrat içeren desikatörde (%54 nemli) 3 gün süreyle bekletilmiştir. YBH işlemi 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve filmler 3 tekrarlı üretilmiştir.

Partikül boyut dağılımı

YBH işleminin film çözeltilerinin partikül boyut dağılımları üzerine etkileri lazer difraksiyon partikül boyut cihazı (Mastersizer 3000 model, Malvern Instruments Ltd., İngiltere) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla film çözeltileri

1:100 oranında ultra saf su ile seyreltilmiş ve süspansiyon dağılım ortamının ışık kırılma gücü suyun kırılma indisine (1.33) ayarlanmıştır.

Film kalınlığı

Filmlerin kalınlıkları 0.001 mm hassasiyete sahip dijital mikrometre (Insize digital outside micrometer, 3101-25A model, Çin) kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla her bir filmin 15 farklı noktasından ölçüm yapılmış ve ortalaması alınmıştır.

Optik özellikler

Filmlerde optik özelliklerden renk, opaklık ve ışık geçirgenliği değerleri ölçülmüştür. Film örneklerinin renk değerleri Hunter L^* , a^* ve b^* renk sistemine göre CR 300, Minolta (Japonya) cihazı ile tespit edilmiştir. Bu amaçla her filmin 5 farklı noktasından ölçüm yapılmıştır.

Opaklık için filmlerin 600 nm dalga boyundaki absorbans değerleri spektrofotometre (Agilent Technologies, Cary 60 model, Avustralya) ile ölçülmüştür. Bu amaçla filmler dikdörtgen (2 x 1 cm) şeklinde kesilerek test hücrelerine yerleştirilmiş ve boş hücre referans olarak kullanılmıştır. Işık geçirgenliği aşağıdaki eşitliğe göre belirlenmiştir:

$$\text{Opaklık} = \frac{\text{Abs}_{600}}{x} \quad (1)$$

Bu eşitlikte Abs_{600} ; 600 nm'deki absorbansı, x ise film kalınlığını (mm) ifade etmektedir.

Su buharı geçirgenliği (SBG)

Filmlerin su buharı geçirgenliği (SBG) 25 °C'de gravimetrik olarak ASTM (2003) yönetiminde bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Bu amaçla 10 mL'lik cam deney tüplerine (iç çap=14 mm) 1 g civarında silika jel tartılmış ve tüpler 105 °C'de %0 nispi nem düzeyine kadar kurutulmuştur. Tüplerin ağzı film örnekleri ile kapatıldıktan sonra saf su içeren desikatöre (%98±2 nispi nem) yerleştirilmiş ve tüp ağırlıkları analitik terazi yardımıyla 8 saat boyunca 1 saat aralıklarla tartılarak aşağıdaki eşitlik yardımıyla SBG değerleri hesaplanmıştır:

$$SBG = \frac{w}{t} \times \frac{x}{\Delta P \times A} \quad (2)$$

Burada; w/t : zamana bağlı ağırlık değişimini (g/saat), x : film kalınlığını (mm), A : film yüzey alanını (m^2), ΔP : basınç farkını (kPa) göstermektedir.

Mekanik özellikler

YBH uygulanmış fındık proteini filmlerinin gerilme (G) ve kopma uzaması (KU) gibi mekanik özellikleri TA-XT Plus Texture Analyser cihazı (TA-XT32, Stable Micro System, Godalming, İngiltere) kullanılarak ASTM (2001) yöntemine göre belirlenmiştir. G ve KU değerlerinin belirlenmesi amacıyla film örnekleri 20 x 40 mm olacak şekilde kesilmiş ve %53 nemli desikatörlerde 3 gün bekletilmiştir. Kesilmiş film örnekleri sabit ve hareketli problara tutturulmuş ve 2 mm/s çekme hızıyla test edilmiştir. Kopma anında filme uygulanan maksimum kuvvet ve kopma uzaması miktarı test cihazına bağlı bilgisayar programı ile kaydedilmiştir.

Mikro-yapısal özellikler

Filmlerin yüzey ve kesit yapıları JSM-7001F Jeol (Japonya) marka taramalı elektron mikroskobu cihazı ile belirlenmiştir. Ölçüm öncesi örneklerin yüzeyi palladyum-altın karışımı ile kaplanmıştır. Film yüzeylerinin ve kesitlerinin görüntülenmesinde sırasıyla x2000 ve x500 büyütme oranları kullanılmıştır.

İstatistiksel analiz

Araştırmada fındık proteini süspansiyonları 2 tekrarlı olacak şekilde YBH işlemine tabi tutulmuş, her bir basınçtan elde edilen film çözeltilerinden 3 tekrarlı olacak şekilde yenilebilir film üretimi gerçekleştirilmiştir. Mikro-yapısal özellikler için yapılan analiz hariç olmak üzere, tüm testler 3 tekrarlı olacak şekilde analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara SPSS paket programı (SPSS 21, IBM, Chicago, IL, USA) kullanılarak tek yönlü varyans analizi uygulanmış ve ortalamalar arasındaki istatistiksel farklılık %95 güven sınırında Duncan çoklu karşılaştırma testleri ile belirlenmiştir. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

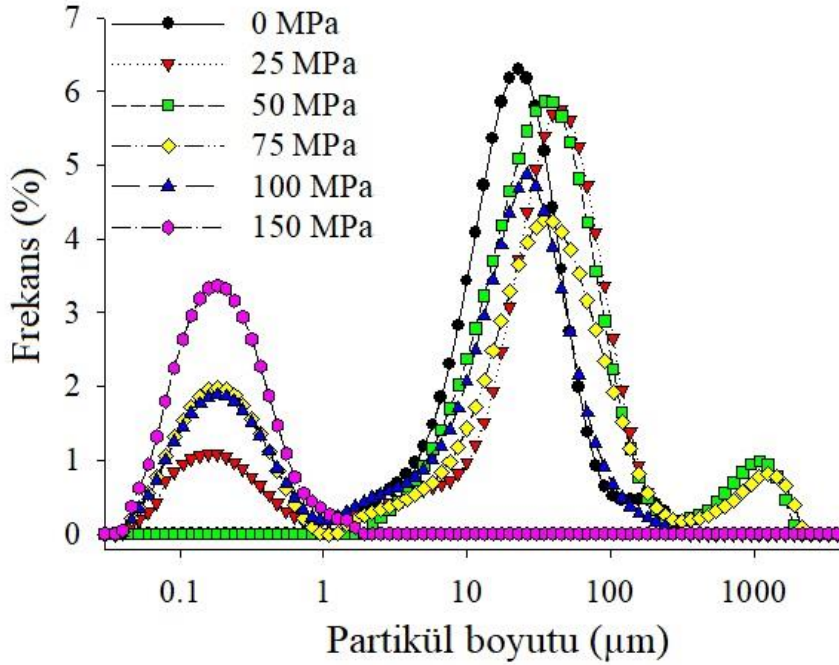
Fındık proteini süspansiyonlarının farklı basınçlarda homojenize edildikten sonra partikül boyut dağılımları ve yenilebilir film oluşturma özelliklerine ait araştırma bulguları alt başlıklar şeklinde aşağıda verilmiştir.

Protein süspansiyonların partikül boyut dağılımları

YBH işlemine tabi tutulan fındık proteini süspansiyonlarının partikül boyut dağılımları Şekil 1'de görülmektedir. Kontrol örneği (0 MPa), homojen bir partikül boyut dağılımı gösterirken, 100 MPa'a kadar basınç uygulanan örnekler homojen olmayan bir partikül boyut dağılımı sergilemiştir. Protein süspansiyonlarının basınç işlemi ile farklı boyutlara indirgenmesi, küçülen partiküllerin birleşerek aglomere olması basınç işlemi ile homojen olmayan bir partikül boyut dağılımı oluşmasına yol açmıştır. Süspansiyonlar 0 ile 1 μm arasında değişen boyutlarda partikül boyut dağılımı sergilemiş ve bu durum homojen olmayan bir süspansiyon yapısının oluşmasına yol açmıştır. Ancak, basıncın 150 MPa seviyelerine çıkarılması bu durumu önlemiş ve daha homojen ve küçük partikül boyutunda süspansiyon oluşmasına vesile olmuştur. Böylelikle 150 MPa basınç uygulama işlemi ile partikül boyut dağılımı önemli ölçüde azaltılmış ve homojen bir süspansiyon oluşması sağlanmıştır. Protein süspansiyonlarının homojenizasyon esnasında dar bir delikten geçirilmesi kavite etkisi yaratarak partiküllerin küçülmesine ve daha homojen bir süspansiyonun oluşmasına yol açmıştır (Keerati-u-rai ve Corredig, 2009; Sarıcaoğlu, vd., 2018b).

Film kalınlığı ve optik özellikler

YBH uygulanan fındık protein süspansiyonlarından elde edilen yenilebilir filmlerin kalınlık ve optik özellikleri Çizelge 1'de verilmiştir. Film kalınlıkları 0.331 ile 0.447 mm arasında değişim göstermiş ve basıncın artması genelde film kalınlığını arttırmıştır. Bu durum muhtemelen artan basıncın etkisiyle proteinlerin suda daha çok çözünmesinden kaynaklanmıştır (Sarıcaoğlu, vd., 2018a). Proteinlerin basıncın etkisiyle suda daha çok çözünmesi film yapısındaki protein miktarını ve dolayısıyla kuru madde oranını arttırmış ve bu durum da kalınlığın artmasına yol açmıştır.



Şekil 1. YBH işleminin fındık proteini süspansiyonlarının partikül boyut dağılımına etkisi

Figure 1. The effect of HPH on particle size distribution of hazelnut meal protein suspensions

Çizelge 1. Filmlerin kalınlık, renk ve ışık geçirgenliği üzerine YBH işleminin etkisi

Table 1. Effect of HPH treatment on thickness, color and light transmission of films

YBH (MPa)	Kalınlık (mm)	L^*	a^*	b^*	Opaklık
HPH (MPa)	Thickness (mm)	L^*	a^*	b^*	Opacity
0	0.331±0.019 ^b	60.68±3.62 ^a	3.21±0.76	22.67±0.36 ^a	1.57±0.22 ^{ab}
25	0.348±0.021 ^b	54.42±0.50 ^b	3.91±0.34	20.53±0.27 ^c	1.75±0.14 ^a
50	0.447±0.071 ^a	55.43±2.82 ^b	4.19±0.63	21.12±0.52 ^{bc}	1.18±0.04 ^c
75	0.347±0.044 ^b	53.59±0.66 ^b	4.49±0.32	20.43±0.39 ^c	1.37±0.08 ^{bc}
100	0.390±0.024 ^{ab}	52.73±1.80 ^b	4.56±0.37	20.31±0.56 ^c	1.28±0.11 ^c
150	0.378±0.034 ^{ab}	55.04±1.64 ^b	4.35±0.30	21.52±0.49 ^b	1.52±0.12 ^{ab}

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Aynı kolonda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P < 0.05$). YBH: Yüksek Basınç Homojenizasyon.

Values are means ± standard deviations. The difference between the means indicated by different letters in the same column is statistically significant. HPH: High pressure homogenization.

Gıda ambalaj materyallerinin optik özellikleri, içerisine yerleştirilecek ürünü olduğu gibi göstermesi açısından son derece önem arz etmektedir. Fındık proteinlerinden üretilen filmlerin L^* değerleri 52.73 ile 60.68 arasında değişim göstermiş ve YBH işleminin L^* değerlerini önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir ($p < 0.05$). Ayrıca, HPH uygulanan protein süspansiyonlarının beyaza yakın bir renge sahip

olması bu süspansiyonlardan elde edilen filmlerin düşük a^* değerine (3.21-4.56) ve yüksek b^* değerine (20.31-22.67) sahip olmasına ve böylece filmlerin sarımsı bir renkte olmasına yol açmıştır. Uygulanan basıncın artması ile film çözümlerinin partikül boyut dağılımlarının azalması, elde edilen filmlerin daha koyu görünmesine neden olmuştur. Nagarajan, vd. (2014) nano-kompozit jelatin filmlerine ait renk değerlerinin homojenizasyon

şartlarından önemli ölçüde etkilenmediğini bildirmişlerdir. Filmlerin opaklık değerleri uygulanan basınçla birlikte önemli değişim göstermiş ($p<0.05$) ve 25 MPa basınç uygulanmış filmler en yüksek opaklık değeri sergilemiştir. Opaklık değerinin yüksek olması, filmlerin ışığı geçirmediği ve yansıttığını ifade etmektedir. Basıncın 50 MPa seviyesine çıkması, opaklık değerini 1.18 düzeyine düşürmüş ve daha yüksek basınçlarda opaklık değerlerinin arttığı tespit edilmiştir. Bu durum muhtemelen artan basıncın etkisiyle süspansiyon içerisinde protein çözünürlüğünün artmasından kaynaklanmıştır. Yapılan bir çalışmada YBH işlemi uygulanmış mekanik ayrılmış tavuk eti proteini filmlerine ait ışık geçirgenliği değerlerinde basınç uygulaması ile önemli bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir (Sarıcaoğlu, vd., 2018b).

Su buharı geçirgenliği (SBG)

Yenilebilir film ve kaplamaların su buharı geçirgenliklerinin (SBG) belirlenmesi, gıdalara uygulanabilirlikleri açısından oldukça önem arz etmektedir. YBH uygulanan fındık proteini süspansiyonlarından üretilen yenilebilir filmlerin SBG değerleri Çizelge 2'de verilmiştir. Görüldüğü

gibi, filmlerin SBG değerleri 1.30 ile 1.80 g·mm/kPa·h·m² arasında değişim göstermiş ve YBH işlemi filmlerin SBG değerini 75 MPa basınca kadar önemli ölçüde azaltmış ($p<0.05$), ancak bu değerden sonra önemli bir değişim gözlenmemiştir ($p>0.05$). Homojenizasyon basıncının artması, protein süspansiyonlarının partikül boyut dağılımlarının azalmasına ve daha stabil bir süspansiyon oluşmasına neden olmuş ve bu durum, basınç uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla filmlerin SBG değerlerinin azalmasını sağlamıştır. Süspansiyonların homojen hale getirilmesi, elde edilen film yüzeylerinin de pürüzsüz olmasını sağlamıştır. Su buharı molekülleri pürüzsüz yüzeyden daha zor geçmekte ve bu nedenle SBG değerlerinde YBH işlemi ile azalma meydana gelmektedir. Mikroakışkanlaştırma işlemi kullanılarak homojenize edilen sodyum kazeinat-oleik asit (Fabra, vd., 2011), kitosan-oleik asit (Vargas, vd., 2011), jelatin-zeytinyağı (Ma, vd., 2012) emülsiyon esaslı filmlerin SBG değerleri homojenizasyon koşullarına bağlı olarak azalma göstermiş ve bu durum partikül boyut dağılımının azalması ile ilişkilendirilmiştir.

Çizelge 2. YBH işleminin filmlerin su buharı geçirgenliği ve mekanik özellikleri üzerine etkisi

Table 2. Effect of HPH treatment on water vapor permeability and mechanical properties of films

YBH (MPa)	SBG (g·mm/kPa·h·m ²)	G (MPa)	KU (%)
HPH (MPa)	WVP (g·mm/kPa·h·m ²)	TS (MPa)	EAB (%)
0	1.80±0.04 ^a	3.03±0.24 ^c	193.06±8.09 ^a
25	1.68±0.04 ^b	4.12±0.79 ^b	152.94±8.75 ^c
50	1.55±0.04 ^c	4.04±0.34 ^b	177.48±9.95 ^b
75	1.37±0.03 ^d	6.29±0.38 ^a	114.26±9.19 ^d
100	1.32±0.05 ^d	5.66±0.23 ^a	108.46±7.29 ^d
150	1.30±0.11 ^d	5.66±0.34 ^a	61.01±4.62 ^c

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Aynı kolonda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$). YBH: Yüksek Basınç Homojenizasyon; SBG: Su buharı geçirgenliği; G: Gerilme; KU: Kopma uzaması.

Values are means ± standard deviations. The difference between the means indicated by different letters in the same column is statistically significant. HPH: High pressure homogenization; WVP: Water vapor permeability; TS: Tensile strength; EAB: Elongation at break.

Filmlerin mekanik özellikleri

Gerilme (G) ve kopma uzaması (KU) analizleri ile filmlerin mekanik özelliklerinin belirlenmesi, film dayanıklılığı ve gıdaların mekanik bütünlüğünün sağlanması açısından önemlidir (Sothornvit ve Krochta, 2000). Ambalaj materyali olarak kullanılmak istenen yenilebilir filmlerin ürünleri

sarma esnasında esnek olması arzu edilirken, nakliye sırasında ürün bütünlüğünü sağlamak için gerilme değerlerinin yüksek olması istenmektedir (Nuthong, vd., 2009). YBH uygulanan fındık süspansiyonu filmlerinin G ve KU değerleri Çizelge 2'de verilmiştir. Homojenizasyon basıncının 75 MPa seviyesine kadar artması,

filmlerin G değerlerini önemli ölçüde arttırmıştır ($p < 0.05$). Basıncın 75 MPa'dan 100 MPa seviyesine çıkması G değerini azaltmış ($p > 0.05$) ve bu durum, artan basıncın etkisiyle proteinlerin aglomere olması ile ilişkilendirilmiştir (Sablani, vd., 2009). Mekanik ayrılmış tavuk eti proteinlerinden üretilen süspansiyonlara uygulanan YBH işlemi, bu süspansiyonlardan üretilen filmlerin mekanik özelliklerinden G değerlerinin 5.13 MPa'dan 13.25 MPa seviyesine çıkmasını sağlamış ve bu durum artan basıncın etkisiyle protein-protein etkileşimlerinin artması ile ilişkilendirilmiştir (Saricaoglu, vd., 2018b). Fu, vd. (2011) nişasta esaslı film çözeltilerine YBH işlemi uygulamış ve elde edilen filmlerin G değerlerinin arttığını belirlemiştir.

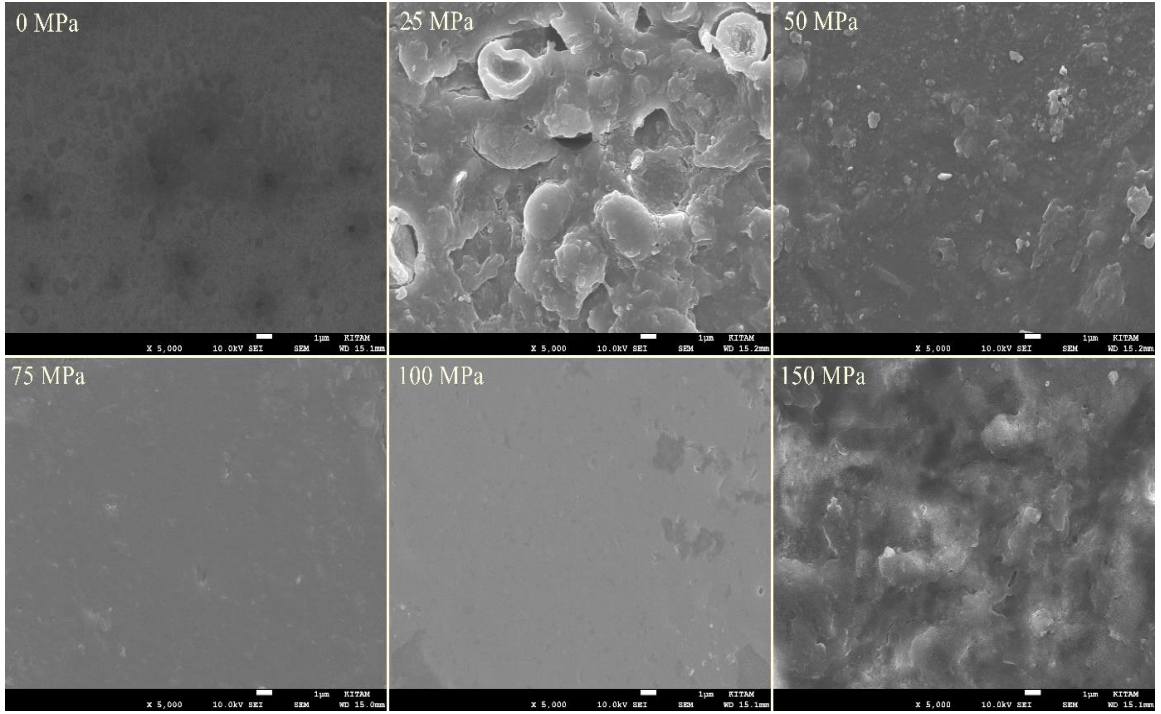
Fındık proteini süspansiyonlarına YBH işlemi uygulandıktan sonra elde edilen filmlerin KU değerleri, G değerlerinin aksine artan basıncın etkisiyle azalma göstermiştir. En yüksek KU değeri kontrol filmde belirlenirken, en düşük değer 150 MPa basınç ile muamele edilmiş fındık süspansiyonundan elde edilen filmlerde belirlenmiştir. Basıncın etkisiyle proteinlerin suda çözünürlüklerinin artması ve protein süspansiyonunun partikül boyutu yönünden daha homojen hale gelmesi, filmlerin KU değerlerinin azalmasına neden olmuştur. Ayrıca, basıncın 50 MPa'dan daha yüksek değerlere çıkarılması, proteinlerin muhtemelen aglomere olmasına neden olmuş ve bu durum daha sert ve esnek olmayan bir film yapısının oluşmasına yol açmıştır (Sablani, vd., 2009). Saricaoglu, vd. (2018b), YBH işlemi uygulanmış mekanik ayrılmış tavuk eti protein süspansiyonlarından üretilen filmlerin KU değerlerini kontrol filmlerinde %275.60 olarak belirlemişler ve basıncın artmasıyla KU değerlerinin önemli azaldığını bildirmişlerdir.

Mikro-yapısal özellikler

Doğal biyopolimerlerden üretilen filmlerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri, filmlerin mikro yapısal görüntülerinin alınmasını sağlamakta ve bu bilgiler sayesinde filmlerin SBG değerleri, mekanik, optik ve gözenek yapıları hakkında detaylı bilgiler elde edilebilmektedir. YBH işlemi uygulanmış fındık proteini süspansiyonlarından üretilen yenilebilir filmlerin yüzey ve kesitlerine ait mikro yapısal görüntüleri

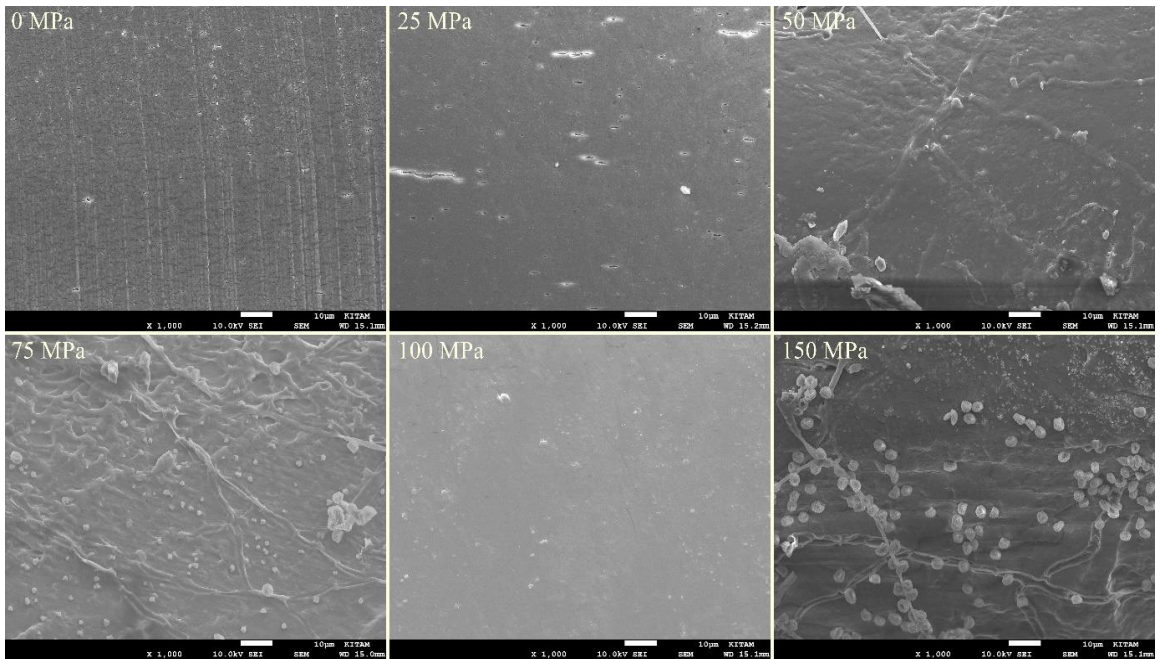
Şekil 2 ve Şekil 3'te gösterilmiştir. Filmlerin yüzey görüntüleri bazı örneklerde (kontrol, 25 ve 50 MPa) çözünmeyen protein parçacıklarının olduğunu, basınç düzeyinin 75 ve 100 MPa düzeyine çıkması ile çözünürlüğün artarak, bu çözünmeyen kısımların ortadan kaybolduğunu göstermektedir. Ancak, basıncın 150 MPa düzeyine çıkması, küçülen protein parçacıklarının basıncın etkisiyle aglomere olmasına neden olmuş ve neticesinde pürüzlü bir yüzey yapısı gözlemlenmiştir. Film yüzeyinin pürüzlü olması filmlerin daha yüksek SBG değeri sergilemesine ve mekanik özelliklerinin zayıf olmasına yol açmaktadır. Bu nedenle kontrol, 25 ve 50 MPa basınçlarla muamele edilmiş protein süspansiyonlarından elde edilen filmlerin SBG ve G değerlerinin düşük olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda, yüzey pürüzlülüğünün azalması ve homojen bir yüzey görüntüsünün oluşması, filmlerin optik özelliklerini iyileştirerek şeffaf filmlerin oluşmasına vesile olmaktadır. Bu bağlamda filmlerin mikro yapısal görüntüleri optik özellikler, mekanik ve SBG değerleri ile örtüşmekte ve bulgularımızı doğrulamaktadır. Benzer sonuçlar YBH işlemi uygulanmış mekanik ayrılmış tavuk eti protein süspansiyonlarından üretilmiş filmlerde de belirlenmiştir (Saricaoglu, vd., 2018b).

Filmlerin yan kesitlerinin görüntüsü Şekil 3'te verilmiştir. Görüldüğü gibi, kontrol ve 25 MPa basınç ile muamele edilmiş süspansiyonlardan elde edilen filmlerin kesitlerinde bazı çatlak ve delikler tespit edilmiş ve bu durum filmlerin daha yüksek SBG ve daha düşük mekanik özellik sergilemesine neden olmuştur. Homojenizasyon basıncının artması ile filmlerin kesitlerindeki çatlak ve delikler kaybolmuş, özellikle 75 ve 100 MPa basınç uygulanmış filmlerde homojen bir kesit görüntüsü elde edilmiştir. Ayrıca, basıncın 150 MPa seviyesine çıkması, protein partiküllerinin aglomere olmasına neden olmuş ve kesit yüzeyindeki parçacıklar bu durumu doğrulamıştır. YBH işlemi uygulanmış fındık proteini süspansiyonlarından üretilen yenilebilir filmlerin mikro yapısal görüntüleri, 75 ve 100 MPa düzeyindeki homojenizasyon işleminin filmlerin SBG ve mekanik özelliklerini iyileştirebileceğini ortaya koymaktadır.



Şekil 2. YBH işlemi uygulanmış protein süspansiyonlarından üretilen filmlerin yüzeylerine ait mikroyapısal görüntüler

Figure 2. Microstructural images of the surfaces of films produced from protein suspensions treated with HPH



Şekil 3. YBH işlemi uygulanmış protein süspansiyonlarından üretilen filmlerin kenar kesitlerine ait mikroyapısal görüntüler

Figure 2. Microstructural images of film edges produced from protein suspensions treated with HPH

SONUÇ

Bu çalışmada YBH işlemi uygulanmış fındık proteini süspansiyonlarından üretilen yenilebilir filmlerin optik, mekanik, bariyer ve mikro-yapısal özellikleri üzerine YBH işleminin etkisi incelenmiştir. Homejenizasyon basıncının artması, fındık proteini süspansiyonlarının partikül boyut dağılımlarını azaltmış, ve artan basınçla birlikte süspansiyonlar homojen olmayan (bi-modal) bir partikül boyut dağılımı sergilemişlerdir. YBH işlemi, filmlerin kalınlığında kısmi bir artışa neden olmuş ve bu durum muhtemelen protein çözünürlüğünün artmasından kaynaklanmıştır. Kontrol örneğine kıyasla L^* değerinde önemli bir azalma gözlemlenmiş, ancak basıncın artması L^* değerini önemli etkilememiştir. Filmlerin a^* değerleri homejenizasyon basıncından etkilenmezken, b^* değerlerinde önemli bir değişim belirlenmiş ve filmler sarımsı bir renge sahip olmuştur. Basıncın 50-100 MPa arasında değişmesi, filmlerin opaklık değerlerini önemli etkilemezken, kontrol örneklerine kıyasla filmlerin opaklığı önemli azalma sergilemiş ve filmlerin ışık geçirgenliği artmıştır. Fındık proteini süspansiyonlarına uygulanan YBH işlemi, filmlerin SBG değerlerini önemli ölçüde azaltmış ve bu durum mikro-yapı görüntüleri ile paralellik göstermiştir. YBH işlemi ile partikül boyutu azalan süspansiyonlarda protein-protein etkileşimi artmış ve bu durum filmlerin daha yüksek G değerlerine sahip olmasına yol açmıştır, ancak KU değerleri kontrol grubuna kıyasla önemli azalma sergilemiştir. Fındık proteininden üretilen yenilebilir filmler, genelde düzgün, homojen ve gözenekli yapı içermeyen bir görüntüye sahip olmuştur. Mikroyapı görüntüleri filmlerin mekanik, optik ve bariyer özelliklerine ait sonuçları doğrular niteliktedir. Mevcut araştırma bulgularına göre, fındık proteini süspansiyonlarına 75 ve 100 MPa basınçta homejenizasyon işlemi uygulaması, fındık proteinlerinden üretilen filmlerin optik, mekanik ve bariyer özelliklerini iyileştirmekte ve bu filmlerin gıda ambalajlamada kullanılabilme potansiyelini arttırmaktadır.

KAYNAKLAR

Alasalvar, C., Shahidi, F., Liyanapathirana, C. M., ve Ohshima, T. (2003). Turkish Tombul Hazelnut

(Corylus avellana L.). 1. Compositional Characteristics. *J Agric Food Chem*, 51(13), 3790-3796.

AOAC. (1990). *Official Methods of Analysis* (15th ed. ed.). Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemist.

ASTM. (2001). Standart test method for tensile properties of thin plastic sheeting. In (Vol. D882-12). Philedelphia, PA: American Society for Testing and Materials (ASTM).

ASTM. (2003). Standart test method for water vapor transmission of materials. In (Vol. E96/E96M-10). West Conshohocken, PA: American Society for Testing and Materials (ASTM).

Aydemir, L. Y., Gökbulut, A. A., Baran, Y., ve Yemenicioğlu, A. (2014). Bioactive, functional and edible film-forming properties of isolated hazelnut (Corylus avellana L.) meal proteins. *Food Hydrocoll*, 36, 130-142.

Fabra, M. J., Pérez-Masiá, R., Talens, P., ve Chiralt, A. (2011). Influence of the homogenization conditions and lipid self-association on properties of sodium caseinate based films containing oleic and stearic acids. *Food Hydrocoll*, 25(5), 1112-1121.

Floury, J., Bellettre, J., Legrand, J., ve Desrumaux, A. (2004). Analysis of a new type of high pressure homogeniser. A study of the flow pattern. *Chemical Engineering Science*, 59(4), 843-853.

Fu, Z.-q., Wang, L.-j., Li, D., Wei, Q., ve Adhikari, B. (2011). Effects of high-pressure homogenization on the properties of starch-plasticizer dispersions and their films. *Carbohydr Polym*, 86(1), 202-207.

Gul, O., Saricaoglu, F. T., Besir, A., Atalar, I., ve Yazici, F. (2018). Effect of ultrasound treatment on the properties of nano-emulsion films obtained from hazelnut meal protein and clove essential oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, 41(Supplement C), 466-474.

Jiang, Y., ve Tang, C. (2013). Effects of transglutaminase on sorption, mechanical and moisture-related properties of gelatin films. *Food Sci Technol Int*, 19(2), 99-108.

- Kang, H. J., Won, M. Y., Lee, S. J., ve Min, S. C. (2015). Plasticization and moisture sensitivity of potato peel-based biopolymer films. *Food Science and Biotechnology*, 24(5), 1703-1710.
- Keerati-u-rai, M., ve Corredig, M. (2009). Effect of Dynamic High Pressure Homogenization on the Aggregation State of Soy Protein. *J Agric Food Chem*, 57(9), 3556-3562.
- Ma, W., Tang, C.-H., Yin, S.-W., Yang, X.-Q., Wang, Q., Liu, F., ve Wei, Z.-H. (2012). Characterization of gelatin-based edible films incorporated with olive oil. *Food Res Int*, 49(1), 572-579.
- Nagarajan, M., Benjakul, S., Prodpran, T., ve Songtipya, P. (2014). Properties of Bio-nanocomposite Films from Tilapia Skin Gelatin as Affected by Different Nanoclays and Homogenising Conditions. *Food and Bioprocess Technology*, 7(11), 3269-3281.
- Nuthong, P., Benjakul, S., ve Prodpran, T. (2009). Effect of some factors and pretreatment on the properties of porcine plasma protein-based films. *LWT - Food Science and Technology*, 42(9), 1545-1552.
- Pavlath, A. E., ve Orts, W. (2009). Edible Films and Coatings: Why, What, and How? In K. C. Huber ve M. E. Embuscado (Eds.), *Edible Films and Coatings for Food Applications* (1st ed., pp. 1-23). New York, NY: Springer New York.
- Rocha, M. d., Loiko, M. R., Tondo, E. C., ve Prentice, C. (2014). Physical, mechanical and antimicrobial properties of Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) protein films incorporated with organic acids. *Food Hydrocoll*, 37, 213-220.
- Sablani, S. S., Dasse, F., Bastarrachea, L., Dhawan, S., Hendrix, K. M., ve Min, S. C. (2009). Apple Peel-Based Edible Film Development Using a High-Pressure Homogenization. *J Food Sci*, 74(7), E372-E381.
- Salgado, P. R., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Mauri, A. N., ve Montero, M. P. (2013). Sunflower protein films incorporated with clove essential oil have potential application for the preservation of fish patties. *Food Hydrocoll*, 33(1), 74-84.
- Sarıcaoğlu, F. T., Gul, O., Besir, A., ve Atalar, I. (2018a). Effect of high pressure homogenization (HPH) on functional and rheological properties of hazelnut meal proteins obtained from hazelnut oil industry by-products. *J Food Eng*, 233, 98-108.
- Sarıcaoğlu, F. T., Tural, S., Gul, O., ve Turhan, S. (2018b). High pressure homogenization of mechanically deboned chicken meat protein suspensions to improve mechanical and barrier properties of edible films. *Food Hydrocoll*, 84, 135-145.
- Sarıcaoğlu, F. T., ve Turhan, S. (2019). Performance of mechanically deboned chicken meat protein coatings containing thyme or clove essential oil for storage quality improvement of beef sucuks. *Meat Sci*, 158, 107912.
- Sothornvit, R., ve Krochta, J. M. (2000). Oxygen Permeability and Mechanical Properties of Films from Hydrolyzed Whey Protein. *J Agric Food Chem*, 48, 3913-3916.
- Tural, S., ve Turhan, S. (2017). Effect of anchovy by-product protein coating incorporated with thyme essential oil on the shelf life of anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) fillets. *Food Science and Biotechnology*, 26(5), 1291-1299.
- Turan, D., Altay, F., ve Çapanoğlu Güven, E. (2015). The influence of thermal processing on emulsion properties of defatted hazelnut flour. *Food Chem*, 167, 100-106.
- Vargas, M., Albors, A., ve Chiralt, A. (2011). Application of chitosan-sunflower oil edible films to pork meat hamburgers. *Procedia Food Science*, 1(0), 39-43.
- Yaylı, D., Turhan, S., ve Sarıcaoğlu, F. T. (2017). Edible Packaging Film Derived from Mechanically Deboned Chicken Meat Proteins: Effect of Transglutaminase on Physicochemical Properties. *Korean J Food Sci Anim Resour*, 37(5), 635-645.



FARKLI ORANLARDA PEYNİR ALTI SUYU KULLANIMININ BEYAZ VE TAM BUĞDAY UNLARINDAN ÜRETİLEN EKMEKLERİN BAZI ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Zeynep Cansız¹, Cihadiye Candal Uslu^{2,3,*}, Ceren Mutlu^{2,4},
Sultan Arslan Tontul⁵, Recai Ercan¹, Mustafa Erbaş²

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

² Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya, Türkiye

³ Artvin Çoruh Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Artvin, Türkiye

⁴ Balıkesir Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Balıkesir, Türkiye

⁵ Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Konya, Türkiye

Geliş / *Received*: 26.03.2019; Kabul / *Accepted*: 09.12.2019; Online baskı / *Published online*: 29.01.2020

Cansız, Z., Candal Uslu, C., Mutlu, C., Arslan Tontul, S., Ercan, R., Erbaş, M. (2020). Farklı oranlarda peynir altı suyu kullanımının beyaz ve tam buğday unlarından üretilen ekmeklerin bazı özellikleri üzerine etkisi. *GIDA* (2020) 45(1) 125-138 doi: 10.15237/gida.GD19066

Cansız, Z., Candal Uslu, C., Mutlu, C., Arslan Tontul, S., Ercan, R., Erbaş, M. (2020). The effects of whey addition at different ratios on the properties of breads produced from white and whole wheat flour. GIDA (2020) 45(1) 125-138 doi: 10.15237/gida.GD19066

ÖZ

Dünya genelinde sağlık sorunlarının artışı, yaşam kalitesini bozan beslenme ve çevre sorunlarıyla ilişkilendirilmektedir. Bunun sonucu olarak, insanların sağlıklı bir çevreye ve zengin besin içeriğine sahip gıdalara talebi artmaktadır. Bu çalışmada, beyaz un ve tam buğday unu ile üretilen ve üretim aşamasında su yerine beş farklı oranda (%0-kontrol, %25, %50, %75 ve %100) peynir altı suyu (PAS) ilave edilerek besinsel içeriği zenginleştirilen ekmeklerin fiziksel, kimyasal ve duyuşal özelliklerinde meydana gelen değişimlerin ve PAS'ın hamur oluşturma suyu olarak kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Araştırma sonucunda PAS oranının artmasıyla; ekmeklerin kabuk renklerinin koyulaştığı, HMF içeriğinin arttığı ve sertlik değerinin azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca PAS kullanılarak üretilen tüm ekmekler panelistler tarafından 5 puanlık hedonik skalada orta değer olan 3 ve üzerinde puanlanmıştır. Sonuç olarak; PAS'ın ekmek üretiminde %50'ye kadar hamur suyu ikamesi olarak kullanılabilirliği ve böylelikle besin içeriğince zengin olan bu ürünün çevreye atık olarak salınması yerine hamura katılarak ekmeğin besleyici özelliklerini ilave masraf olmadan geliştirebileceği değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Peynir altı suyu, çevre, ekmek, HMF

THE EFFECTS OF WHEY ADDITION AT DIFFERENT RATIOS ON THE PROPERTIES OF BREADS PRODUCED FROM WHITE AND WHOLE WHEAT FLOUR

ABSTRACT

Increasing health problems in worldwide relate to the nutritional and environmental problems affected life quality negatively. Therefore, people's demands to the healthy environment and nutritional foods increased. In this study, bread production was performed by using white and whole wheat flour with the whey addition (0%-control, 25%, 50%, 75% and 100%). This study aimed examining the changes in some properties of these breads, and investigation of whey usage as dough water. As a result; as the whey ratio increased, the breads' crust colour became darker, HMF content increased and hardness decreased. Also, all breads were scored 3 or more points on the hedonic scale. Consequently; it was evaluated that whey can be used up to 50% as dough water in bread production. Thus, this product can be added to the dough instead of releasing to the environment as waste and it can improve the bread's nutritional properties without additional costs.

Keywords: Whey, environment, bread, HMF

* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ cihadiyecandal@artvin.edu.tr

☎ (+90) 242 310 6575

☎ (+90) 242 310 6306

Zeynep Cansız; ORCID no: 0000-0001-8615-4737

Cihadiye Candal Uslu; ORCID no: 0000-0002-5945-6649

Ceren Mutlu; ORCID no: 0000-0003-4943-2798

Sultan Arslan Tontul; ORCID no: 0000-0003-1557-7948

Recai Ercan; ORCID no: 0000-0001-8151-6786

Mustafa Erbaş; ORCID no: 0000-0002-9485-2356

GİRİŞ

Dünya genelinde sağlık sorunlarının artması ve Dünya Sağlık Örgütü'nün protein ve enerji yetersizliğini yaşam kalitesini bozan beslenme sorunlarından birisi olarak kabul etmesi ile birlikte bilinçli gıda tüketim konusu büyük önem kazanmıştır (Pekcan, 2009). Bu nedenle, tüketicilerin beslenme alışkanlıklarında değişiklikler meydana gelmiş ve sağlık üzerine olumlu etkileri bulunan fonksiyonel gıdalara normal diyet düzeni içerisinde daha çok yer vermeye başlanmıştır (Gonçalves Cibely vd., 2017; Salazar vd., 2017). Bu kapsamda peynir altı suyu (PAS) gibi sağlığı koruyucu ve geliştirici nitelikteki sanayi yan ürünlerinin değerlendirilmesi, hayvansal protein ihtiyacının karşılanabilmesi ve çevre sağlığı bakımından büyük öneme sahiptir (Kurt ve Gülümser, 1987; Metin, 1998).

PAS; organik asit ya da peynir mayası kullanılarak pıhtılaştırılan süttten elde edilen pıhtının, peynir üretiminde kullanılmak üzere ayrılmasından sonra geriye kalan yeşilimsi sarı renkteki sıvıya verilen isimdir (Yerlikaya vd., 2010). Peynir üretiminde yaklaşık olarak 6 kg süttten 1 kg peynir elde edilirken 5 kg PAS açığa çıkmaktadır. Her ne kadar 2017 yılı TÜİK verilerine göre Türkiye'de yaklaşık 517 bin ton PAS elde edildiği rapor edilmiş olsa da, yine TÜİK verilerine göre Türkiye'nin yaklaşık peynir üretim miktarı olan 690 bin ton dikkate alındığında ülkemizde yaklaşık 3.5 milyon ton PAS açığa çıktığı hesap edilebilmektedir (Anonim, 2017).

PAS, insan gıdası olarak doğrudan kullanılmamaktadır (Metin, 1998). Bu nedenle, patojenik mikroorganizmaların tamamını yok edecek sıcaklık ve sürede ısı işlem uygulanarak pastörize edilen PAS (Harding, 1999); peynir altı suyu konsantresi, peynir altı suyu tozu, yoğurt, tereyağı, lor peyniri, içecek, tarhana, yenilebilir film ya da organik asit gibi çeşitli ürünlere işlenerek değerlendirilebilmektedir. Ancak Türkiye'de maliyetinin yüksek, kullanılan miktarların ise çok az olması gibi nedenlerle PAS'ın çok az bir bölümü bu şekilde değerlendirilirken geri kalan önemli bir kısmı ise atık olarak doğrudan doğaya salınmaktadır

(Bodnár vd., 2007; Koca ve Tarakçı, 1997; Kurt ve Gülümser, 1987).

PAS; içeriğindeki laktoz (%5), serum proteinleri (%0.7), mineraller (%0.2) ve vitaminler (B grubu) gibi besin bileşenleri nedeni ile mikroorganizmalar için iyi bir besin kaynağıdır. PAS'ın akarsulara ve denizlere boşaltılması sonucu suyun organik madde içeriği artmakta ve mikroorganizmalar bu ortamda aşırı çoğalarak sudaki çözülmüş oksijeni kullanmaktadırlar. Bu durum sudaki oksijen seviyesinin düşmesine sebep olurken su ekosisteminde bulunan doğal popülasyona da zarar vermektedir (Kurt ve Gülümser, 1987; Üçüncü, 2004). Bu nedenlerle peynir sanayinin yan ürünü olan PAS, önemli bir çevre kirleticisi konumuna gelmektedir (Gonçalves Cibely vd., 2017; Gamba vd., 2016; Paul vd., 2016). Önemli besin bileşenlerini yapısında bulunduran PAS'ın atık olarak doğaya salınması yerine (Yerlikaya vd., 2010; Paul vd., 2016), tahıla dayalı beslenme alışkanlığı olan ülkelerde fazlaca tüketilen, ucuz, doyurucu, fakat esansiyel aminoasitler açısından fakir olan ekmek ve diğer hububat mamullerinin zenginleştirilmesi amacıyla kullanılması bu ürüne alternatif bir kullanım imkanı sunmaktadır.

Ekmek temel olarak; un, tuz, maya ve suyun belli oranlarda karıştırılması ile oluşturulan hamurun şekillendirilmesi, fermantasyona bırakılması ve pişirilmesiyle elde edilen temel bir gıda maddesidir (Salazar vd., 2017; Paul vd., 2016; Demir vd., 2009). Yaklaşık 100 kg undan 60 L kadar su kullanılarak 140 kg kadar ekmek üretilmektedir. Türkiye'de günde kişi başı ortalama ekmek tüketimi 400 g kadardır (Demir vd., 2009). Dolayısıyla, Türkiye'de günde yaklaşık 32 bin ton, yılda ise 12 milyon ton kadar ekmek tüketilmektedir. Yıllık bu kadar ekmeğin üretiminde ise bileşen olarak yaklaşık 5 milyon ton su kullanımı gerekmektedir. Yıllık ekmek üretimi için gerekli olan su miktarının yaklaşık yarısı PAS ile karşılanabilir. Böylelikle çevreye salındığı için atığa dönüşen PAS ortadan kaldırılırken, ekmeğin besin içeriğinin zenginleştirilmesi de mümkün olmaktadır (Salazar vd., 2017).

PAS proteinleri kullanılarak mayalı ve mayasız hamurdan ekmek üretiminin gerçekleştirildiği bir

çalışmada, pişirme işlemi sonucunda PAS proteinlerinin antioksidan potansiyelleri ve elde edilen ekmeğin tekstürel özellikleri araştırılmış ve sertlik ve çignenebilirlik değerlerinin PAS proteini ile artış gösterdiği belirlenmiştir (Gonçalves Cibely vd., 2017). Kopeć vd. (2014) ise ekşi maya ve PAS proteinleri ilavesiyle üretilen tam buğday ekmeğinin bazı kimyasal özelliklerini (protein, yağ, karbonhidrat ve lif miktarları) ve bu ekmeğin içeriğindeki proteinlerin ve minerallerin deney hayvanları üzerindeki biyolojik değerini incelemiş ve eklenen PAS proteinleri ile ekmekteki düşük kaliteli proteinin kalitesinin arttığını belirlemiştir. Konsantre PAS ilavesiyle besinsel olarak zenginleştirilmiş ekmek üretiminin gerçekleştirildiği bir çalışmada, çok tahıllı hamur ve bu hamurdan kabul edilebilir kalitede bir ekmek üretilmesi için su yerine %15 oranında konsantre PAS kullanılabileceği belirtilmiştir (Paul vd., 2016). Divya ve Rao (2010) da Hindistan'a özgü bir peynirin PAS'ını %15 ve %26 kuru madde içeriklerine konsantre ettikten sonra su ikamesi olarak ekmek üretiminde kullanımını araştırmışlardır. Kinoa unu ve PAS ilavesinin ekmek özellikleri üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, ekmek üretiminde kullanılan suyun tamamı yerine PAS kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Ancak bu çalışmada PAS ve kinoa unununun ekmek üzerindeki ortak etkileri incelenmiş ve sadece PAS kullanımıyla meydana gelen değişimler tespit edilmemiştir (Salazar vd., 2017). Bilgin vd. (2006) ise, pastörize PAS ve yayık altı suyunu ekmek üretiminde su ikamesi olarak kullanmış ve %0, %50 ve %100 oranında PAS ve yayık altı suyu kullanımının hamur ve ekmek kalitesi üzerindeki etkisini inceleyerek PAS kullanımıyla ekmek içinde zamanla meydana gelen sertleşmenin geciktüğünü ve mineral madde miktarında artış olduğunu belirlemiştir.

Literatürde PAS ile yapılan çalışmalar incelendiğinde genel olarak fırın ürünleri içerisine PAS tozu, PAS proteinleri ve PAS konsantrelerinin ilave edildiği, pastörize PAS kullanımının ise fırın ürünlerinde, özellikle de tam buğday unuyla üretilen ürünlerde, sınırlı olduğu görülmektedir. Ayrıca bu ürünlerin ilave edilmesiyle elde edilen nihai ürünlerin HMF içerikleri üzerinde herhangi bir çalışma da

yapılmamıştır. Bu çalışmada; peynir üretimi sırasında çok yüksek miktarlarda ortaya çıktığı için, zengin besin içeriğine rağmen ekonomik olarak değerlendirilemeyip önemli bir çevre kirleticisine dönüşen PAS'ın; pastörizasyon ile dayanımının artırılması, beyaz ekmek ve tam buğday unu ekmeklerinin üretiminde su ikamesi olarak kullanılma imkânlarının ve bu ekmeklerin HMF içerikleri üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Araştırma kapsamında gerçekleştirilen ekmek üretiminde; beyaz (ekmeklik) un ve katkısız tam buğday unu, rafine tuz, ticari pres yaş maya ve içilebilir nitelikte su kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan PAS; %0.88 protein, %0.08 yağ ve %6.05 yağsız kuru madde içeriğinde, pastörize süttten üretilen beyaz peynir altı suyu olarak bir peynir fabrikasından (Ekici Peynir, Antalya) temin edilmiştir. Analizler için gerekli olan kimyasal maddeler analizin niteliğine göre analitik, kromatografik ve mikrobiyolojik saflıklarda kullanılmıştır.

Araştırma planı ve istatistiksel analiz

Araştırmada iki farklı un (beyaz un ve tam buğday unu) kullanılarak hazırlanan ekmek formülasyonlarına 5 farklı oranda pastörize PAS (eklenmesi gereken toplam suyun %0, %25, %50, %75 ve %100'ü) ilave edilerek 2x5 deneme desenine göre 10 farklı ekmek üretimi gerçekleştirilmiştir. Araştırma 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş, analizler ise paralelli olarak yapılmıştır. Laboratuvar analizlerine dayalı parametrelerin istatistiksel hesaplamaları SAS istatistik programı (SAS Institute Inc., Cary, NC, ABD) kullanılarak, verilere varyans analizi (ANOVA) ve önemli bulunan parametrelere Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ($P < 0.05$) uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Duyusal analiz sonuçlarının istatistiksel hesaplamaları ise SPSS istatistik programı (IBM SPSS Statistics, ABD) kullanılarak Kruskal Wallis testi ile gerçekleştirilmiştir. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.

Peynir altı suyunun pastörizasyonu

Araştırma kapsamında temin edilen PAS'ta var olan patojen mikroorganizmaların tamamen yok edilmesini sağlayabilmek için, bu PAS'a 5 farklı sıcaklıkta (55, 60, 65, 70 ve 75°C) 4 farklı süre (5, 10, 15 ve 20 dakika) boyunca ısıtma işlemi uygulanarak denemeler yapılmıştır. Denemelerde; farklı tüplere alınan PAS, belirtilen sıcaklık ve süre koşullarında ısıtma işlemi tabii tutulmuş ve bu tüpler 8 gün süreyle +4°C'de depolanarak, depolamanın her gününde mikrobiyolojik analizler yapılmıştır. Araştırmada PAS'ın pastörize olmasını sağlayan en düşük sıcaklık ve süre kombinasyonunun 75°C'de 15 dakika ısıtma uygulaması olduğu tespit edilmiş ve bu şartlarda pastörize edilen PAS ekmek üretiminde kullanılmıştır.

Mikrobiyolojik analizler

Isıtma işlemi uygulanan ve uygulanmayan PAS'ın toplam maya/küf sayısı APHA (1976)'ya, toplam mezofilik aerobik bakteri sayısı ISO (2001)'ya, toplam koliform sayısı TSE (1992)'ye, toplam *Escherichia coli* sayısı Anonim (1999)'e ve toplam *Enterobacteriaceae* sayısı ise Halkman (2005)'a göre belirlenmiştir.

Un analizleri

Un örneklerinin kuru madde miktarı ICC (1976) Metot No: 110/1'e, toplam kül miktarı ICC (1990) Metot No: 104/1'e ve protein miktarı ise ICC (1994) Metot No: 105/2'ye göre belirlenmiştir. Örneklerin yaş gluten miktarı ICC (1994) Metot No: 137/1'e göre ve kuru gluten miktarı ise yaş glutenin Glutork 2020 (Perten Instruments Co., Ltd., İsveç) cihazında 5 dakika kurutulup desikatörde soğutulmuş tartılması ile belirlenmiştir (Özkaya ve Özkaya, 2005). Sedimentasyon değerleri ICC (1994) Metot No: 116/1'e ve düşme sayısı değerleri ise ICC (1995) Metot No: 107/1'e göre belirlenmiştir. Unların farinograf analizi ICC (1992) Metot No: 115/1'e göre, ekstensograf analizi ise ICC (1992) Metot No: 114/1'e göre farklı oranlarda PAS kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Farinograf analizi ile unun su absorpsiyonu (%), ekstensograf analizi ile ise 45., 90. ve 135. dakikalardaki enerji değeri (A, cm²), hamurun uzama kabiliyeti (mm) ve hamurun uzamaya karşı gösterdiği max direnç (R_m, BU) belirlenmiştir. Ekstensograf analizine ait

sonuçlar için 45., 90. ve 135. dakikalardaki değerlerin ortalamaları üzerinden değerlendirmeler yapılmıştır.

Ekmek üretimi

Un (2000 g), maya (40 g), tuz (40 g) ve ICC (1992) Metot No: 115/1'e göre farinograf analizi ile belirlenen miktarda su ve/veya PAS (%0, %25, %50, %75 ve %100'ü), tekniğine uygun olarak hamur yoğurma makinesinde (Ayhandemir, Konya, Türkiye) karıştırılıp, 20 dakika yoğurularak hamur oluşturulmuştur (Elgün ve Ertugay, 2002). Yoğurulan hamur 30 dakika kitle fermantasyonuna bırakılmış ve yaklaşık 100 g yuvarlak ekmek (roll ekmek) üretmek üzere bu hamurdan 115 g kesilmiştir. Elle küresel şekil verilen hamurlar daha sonra 10 dakika dinlendirilmiştir. Süre sonunda hamurlar elle yuvarlanıp tekrar küresel şekil verilerek ekmek tavasına yerleştirilmiştir. Tavaya alınan hamurlar %85 nisbi nem içeriğine sahip 32°C sıcaklıktaki fermantasyon kabiniinde 60 dakika daha fermantasyona bırakılmıştır. Fermantasyon sonunda pişirme sıcaklığındaki (250°C) elektrikli fırına (Fimak EKF60, Konya) alınan hamurlar, ön denemelerle 40 dakika olarak belirlenen sürede (ekmek nem içeriğinin <%40 olmasını sağlayan süre) pişirilmiştir.

Üretilen ekmeklerin fiziksel analizleri üretimden 2 saat sonra, duyu analizi ise 3 saat sonra gerçekleştirilmiştir. Kimyasal analizler ise; 2 saatlik dinlenme periyodu sonunda kabuk ve iç olarak ayrılan ve analiz edilinceye kadar -18°C'de kilitli plastik ambalajlar içerisinde muhafaza edilen örnekler kullanılarak yapılmıştır.

Ekmeklerde yapılan fiziksel analizler

Spesifik hacim, ekmeklerin hacim değerinin ekmek ağırlığına bölünmesi ile cm³/g olarak belirlenmiştir. Ekmek ağırlıkları ekmeklerin fırından alındıktan 2 saat sonra tartılması ile; ekmek hacimleri ise kolza tohumuyla dolu ölçme kabından taşan kolza miktarının cm³ cinsinden belirlenmesi ile tespit edilmiştir (Elgün vd., 2002).

Ekmeklerin renk değerleri, renk ölçer (Minolta, Kyoto, Japonya) kullanılarak L* (siyahlık - beyazlık), a* (kırmızılık - yeşillik) ve b* (sarılık -

mavilik) değerlerinin tespit edilmesiyle belirlenmiştir (Clerici vd., 2009). Ekmeklerin kabuk rengi üst ve alt kabuklarının, i  rengi ise ekme k dilimlerinin  zer farklı noktasından yapılan ölümlerin ortalamaları alınarak belirlenmiştir.

Ekmeklerin sertlik, kırılganlık, elastikiyet, çiğnenebilirlik ve esneklik özellikleri tekstür profil analiz (TPA) cihazı (TA, Stable Microsystems, Surrey, İngiltere) kullanılarak, 3 cm kalınlığında kesilen ekme k dilimleri üzerinden belirlenmiştir. Analiz 100 mm'lik silindirik prop ve 5 kg'lık y k hücresi ile gerçekleştirilmiştir. Test  ncesi hız 2 mm/s, test hızı 3 mm/s, test sonrası hız 3 mm/s, bekleme süresi 5 s, tetik kuvveti 10 g ve uzaklık ise %70 deformasyon sağlayan mesafe olacak şekilde ayarlanmıştır (G mbaro vd., 2002).

Ekmeklerde yapılan kimyasal analizler

Örneklerin kuru madde içerikleri; sabit ağırlığa getirilmiş ve darası alınmış petri kaplarına yaklaşık 10 g örnek tartılıp, bu örneklerin 105 C'de sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulmasıyla, ağırlıkta meydana gelen değişim üzerinden belirlenmiştir (Elgün vd., 2002).

Ekmek  rneklerinin hidroksimetil furfural (HMF) içeriği, Fallico vd. (2004)'nin metodu modifiye edilerek kromatografik olarak belirlenmiştir. Bu amaçla, 0.5 g örnek üzerine 5 mL deiyonize su eklenmiş ve t p içeriği 1 dakika süreyle karıştırıldıktan sonra örnek  zeltisi üzerine 0.25 mL Carrez I ve Carrez II  zelteleri ilave edilmiştir. Elde edilen karışım santrifüj edilerek berrak olan süpernatant kısmı başka bir tüpe aktarılmış ve hacmi deiyonize su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Kromatografi işlemi; C₁₈ (250 x 4 mm, 5  m) kolon ve DAD dedektör kullanılarak 280 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Bunun için 0.45  m filtreden geçirilen örnekten 20  L alınarak HPLC sistemine enjekte edilmiş, hareketli faz olarak 1 mL/dak akış hızına sahip asetronitril:su (5:1) kullanılmış ve kolon fırını sıcaklığı 32 C'ye ayarlanmıştır. Örneklerdeki HMF miktarı harici standart metodu kullanılarak hesaplanmıştır.

Ekmeklerin duyuusal analizi

Ekmeklerin duyuusal değerlendirmesi, duyuusal değerlendirme hakkında bilgi sahibi 10 panelist

tarafından dış (hacim, kabuk rengi, şekil simetrisi, kabuk ve kenar özelliği) ve i  (gözenek yapısı, tat, çiğneme ve tekstür)  zellikler dikkate alınarak 5 puanlık hedonik skalaya göre (1: hiç beğenmedim; 5: Çok beğendim) yapılmıştır (Elgün ve Ertugay, 2002).

BULGULAR VE TARTIşMA

Pastörizasyon  ncesi ve sonrasında PAS'ın toplam mikroorganizma yükü

Çalışma kapsamında; pastörizasyon için 75 C'de 15 dakika ısıl işleme tabi tutulan PAS'ın mikrobiyolojik yükü 8 gün boyunca takip edilmiştir. PAS içerisinde pastörizasyon öncesinde 1 kob/mL koliform, 6 kob/mL *Enterobacteriaceae* ve >10⁷ kob/mL toplam canlı bulunduğu, pastörizasyon sonrasında ise koliform grubu bakteriler ve *Enterobacteriaceae* familyasına ait bakterilerin tamamı yok edilirken, toplam canlı miktarının 8.1x10² kob/mL'ye düştüğü tespit edilmiştir. Takip edilen 8 gün boyunca toplam canlı sayısında dalgalanmalar meydana gelse de ortamda ortalama 6.6x10² kob/mL canlı bulunduğu belirlenmiştir. Isıl işlem, temel amacı patojenik ve bozulmaya neden olan mikroorganizmaları etkisiz hale getirmek olan ve gıda güvenliğini sağlamak için uygulanması gereken bir işlemdir (Ma vd., 2019; Wang vd., 2018). Yaygın olarak uygulanan ısıl işlemler ultra yüksek sıcaklık (UHT) ve past rizasyondur. Koliform grubu bakteriler çevresel kaynaklardan gıda ürünlerine bulaşmaktadır ve pastörizasyon sonrası kontaminasyonu gösteren indikatör mikroorganizmalar arasında yer almaktadır. Kang vd. (2018) yaptıkları çalışmada, pastörizasyon sonrası sütteki koliform grubu bakterilerin ve *Enterobacteriaceae*  yesi bir bakteri olan *Escherichia coli*'nin tamamen yok edildiğini, toplam mezofilik aerobik bakterilerin ise neredeyse yarısının öldüğünü tespit etmişlerdir.

Ekmek  retiminde kullanılan unların kimyasal ve teknolojik  zellikleri

Ekmek  retiminde kullanılan unların kimyasal özelliklerinden nem, kül ve protein miktarları beyaz un için sırasıyla %13.00, 0.92 ve 11.30 olarak; tam buğday unu için ise sırasıyla %11.20, 1.65 ve 13.55 olarak tespit edilmiştir. Bu unların teknolojik özelliklerinden yaş gluten ile kuru gluten miktarları beyaz un ve tam buğday unu için

sırasıyla %28.55-9.31 ve %22.45-7.53 olarak belirlenmiştir. Sedimentasyon ve düşme sayısı değerleri ise beyaz un için sırasıyla 20.65 mL ve 255.43 s olarak tespit edilirken, tam buğday unu için sırasıyla 16.95 mL ve 255.31 s olarak tespit edilmiştir.

Araştırmada kullanılan beyaz ve tam buğday unlarının genel kimyasal özelliklerinin Türk Gıda Kodeksi Buğday Unu (2013/9) Tebliği'ne (Anonim, 2013) ve teknolojik özelliklerinin ilgili ekmeği üretmeye genel olarak uygun olduğu belirlenmiştir (Elgün vd., 2002). Türk Gıda Kodeksi Buğday Unu Tebliği (Anonim, 2013)'ne göre beyaz buğday ununun nem içeriği en çok %14.5, kül içeriği en çok %0.8, protein miktarı en az %10.5, sedimentasyon değeri en az 26 mL ve düşme sayısı en az 250 s olmalıdır. Tam buğday unu için ise sedimentasyon ve düşme sayısı değerleri aranmazken, nem içeriği en çok %14.5, kül içeriği en az %1.2 ve protein miktarı en az %11 olmalıdır. Ekmeklik beyaz un için yaş gluten miktarının en az %27 olması istenmektedir. Tam

buğday ununun sedimentasyon ve gluten değerlerinin ekmeçlik beyaz undan düşük olmasının, kepek içeriğinin yüksek olmasından kaynaklandığı değerlendirilmiştir.

Un çeşidi ve farklı oranlardaki PAS kullanımına ait temel farinograf ve ekstensograf özellikleri ise Çizelge 1'de verilmiştir. Un çeşidi ve farklı oranlarda PAS kullanımının; su absorpsiyonu ve R_m değeri üzerine önemli ($P > 0.05$) bir etkide bulunmadığı, ancak uzama kabiliyeti ve enerji değerleri üzerine önemli ($P < 0.05$; $P < 0.01$) bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Ekstensograf test süresine bağlı olarak kurve taban uzunluğunu gösteren hamurun uzama kabiliyetinin ve kurve altında kalan alandan hesaplanarak hamurun ekmeğe dönüşme kabiliyeti hakkında bilgi veren enerji değerinin beyaz unda ve PAS ilavesinde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durumun beyaz unda gluten içeriğinin yüksek olmasından ve PAS ilavesinin ise ilave protein ile gluten içeriğini desteklemesinden kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir.

Çizelge 1. Unların farklı PAS oranlarındaki temel farinograf ve ekstensograf özellikleri
Table 1. Base farinograph and extensograph characteristics of flour in different PAS ratios

Un çeşidi Flour type	Farinograf Farinograph		Ekstensograf Extensograph	
	Su absorpsiyonu Water absorption (%)	Enerji Energy (cm ²)	Uzama kabiliyeti Extensibility (mm)	Max direnç Max resistance (R_m , BU)
BU WF	61.06 ^a ±0.46	62.73 ^a ±2.06	103.07 ^a ±4.37	486.47 ^a ±26.16
TBU WWF	61.70 ^a ±0.55	52.73 ^b ±2.07	76.20 ^b ±2.38	529.20 ^a ±19.46
Önem Significance	-	**	**	-
PAS oranı Whey ratio				
%0	60.40 ^a ±0.91	47.67 ^b ±2.33	76.33 ^b ±5.94	495.17 ^a ±34.20
%25	60.55 ^a ±0.79	62.50 ^a ±3.28	92.50 ^a ±9.23	540.00 ^a ±36.20
%50	62.10 ^a ±0.70	56.83 ^a ±3.11	92.67 ^a ±7.93	481.50 ^a ±37.79
%75	61.35 ^a ±0.70	60.67 ^a ±5.17	93.00 ^a ±8.86	508.50 ^a ±41.24
%100	62.50 ^a ±0.70	61.00 ^a ±1.83	93.67 ^a ±6.89	514.00 ^a ±43.64
Önem Significance	-	**	*	-

BU: Beyaz un, TBU: Tam buğday unu

Önem: ** $P \leq 0.01$, * $0.01 < P \leq 0.05$, - $P > 0.05$ (önemsiz)

WF: White flour, WWF: Whole wheat flour

Significance: ** $P \leq 0.01$, * $0.01 < P \leq 0.05$, - $P > 0.05$ (insignificant)

Üretilen ekmeklerin bazı fiziksel özellikleri

Farklı çeşit un ve farklı oranlarda PAS kullanılarak üretilen ekmeklerin renk özellikleri Çizelge 2’de, TPA özellikleri Çizelge 3’te ve spesifik hacim değerleri Çizelge 4’te verilmiştir. Ekmeklerin spesifik hacim değeri üzerine un çeşidinin ($P < 0.01$) ve PAS oranının ($P < 0.05$) istatistiksel olarak önemli bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Beyaz un ve tam buğday unu ile üretilen ekmeklerin spesifik hacim ortalamaları sırasıyla 2.07 ve 2.48 cm^3/g olarak belirlenmiş ve PAS ilavesi ekmeklerin spesifik hacim değerini kontrol örneğine (%0 PAS) göre arttırmıştır. Bilgin vd. (2006) çalışmalarında, ekmeklerin spesifik hacim değerlerinin pastörize PAS kullanımından önemli şekilde etkilenmediğini belirlemişlerdir. Isıl işlem görmemiş PAS proteinleri buğday unundaki glutene etki ederek ekmek üzerinde olumsuz etkiler meydana getirmektedir. Ancak PAS ısı işlem gördüğünde proteinlerin doğal, sıkı şekilde katlanmış ve kararlı yapısı, denatürasyon sonucu çözünürlüğü azalmış ve katlanmamış bir yapıya dönüşmektedir (Guemes-Vera vd., 2014). Bu dönüşümle birlikte ekmek özelliklerinin geliştiği ve spesifik hacim değerinin arttığı değerlendirilmiştir.

Un çeşidinin ekmeklerin kabuk ve iç rengini önemli düzeyde ($P < 0.05$; $P < 0.01$) etkilediği, PAS kullanımının ise yalnızca ekmeklerin kabuk rengi üzerinde önemli ($P < 0.05$; $P < 0.01$) bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Tam buğday unuyla üretilen ekmeklerin kabuk ve iç renkleri, buğday kepeğinin kendine has renginden dolayı daha koyu olarak belirlenmiştir. Üretimde kullanılan PAS oranının artmasıyla ekmeklerin kabuklarına ait L^* ve b^* renk değerleri azalmıştır. Artan PAS oranıyla birlikte indirgen şeker olan laktozun ve azotlu madde içeriğinin de artmasıyla ekmek kabuğunda gerçekleşen Maillard reaksiyonuna bağlı olarak rengin koyulaştığı değerlendirilmiştir (Paul vd., 2016; Elgün, 1986). Yapılan bir çalışmada, ekmek formülasyonundaki şeker içeriğinin artırılmasıyla ekmek rengine ait L^* değeri azalırken, a^* değerinin artış gösterdiği rapor edilmiştir (Doğan ve Yıldız, 2009). Süt sanayisi yan ürünlerinin ekmek formülasyonuna artan oranlarda ilave edilmesiyle benzer şekilde ekmek rengine ait L^* değerinde azalma meydana geldiği

bildirilmiştir (Demir vd., 2009; Guemes-Vera vd., 2014).

Un çeşidinin ekmeklerin tüm TPA özelliklerini önemli bir düzeyde ($P < 0.05$; $P < 0.01$) etkilediği, kullanılan PAS oranının ise yalnızca ekmeklerin sertlik ve elastikiyet parametreleri üzerinde önemli ($P < 0.05$) bir etki gösterdiği belirlenmiştir. Tam buğday unu kullanılarak üretilen ekmeklerin sertlik, kohezif yapışkanlık (iç yapışkanlık), çignenebilirlik ve esneklik değerlerinin oldukça yüksek, elastikiyet değerinin ise beyaz un ile üretilen ekmeklere göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun ekmek üretiminde kullanılan tam buğday ununun kepek içeriğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. PAS oranının artmasıyla birlikte sertlik değerinin azalması, PAS ilavesinin ekmeği daha yumuşak bir hale getirdiği ve yutulmasını kolaylaştırdığı şeklinde değerlendirilmiştir. PAS proteinlerinin ekmek hamuruna dâhil edilmesi su emilimini arttırmakta ve sonuç olarak ekmek dokusunu iyileştirmektedir. Ayrıca PAS proteinlerinin denatürasyon derecesinin artması da ekmek üretim sürecinin işlevselliğini artırıcı etki yapmaktadır (Guemes-Vera vd., 2014).

Üretilen ekmeklerin bazı kimyasal özellikleri

Farklı çeşit un ve farklı oranda PAS kullanılarak üretilen ekmeklerin bazı kimyasal özellikleri Çizelge 4’te verilmiştir. Ekmeklerin kuru madde içerikleri üzerine un çeşidi ($P < 0.01$) ve PAS oranının ($P < 0.05$) önemli bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Ekmeklere ilave edilen PAS oranı arttıkça (%25-100) ekmeklerin kuru madde içeriklerinde de artış meydana gelmiştir. Bu durumun PAS’ın kuru madde içeriğinin yüksek olmasından kaynaklandığı değerlendirilmiştir. Salazar vd. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada da benzer şekilde ekmeklere ilave edilen PAS oranının artmasıyla ekmeklerin kuru madde içerikleri artmıştır. Rafine edilmiş beyaz buğday unu ile karşılaştırıldığında tam buğday unu; vitamin, mineral, diyet lif ve diğer önemli gıda bileşenlerince daha zengindir (Tebben vd., 2018). Bu nedenle, tam buğday unundan elde edilen ekmeklerin kuru madde içeriklerinin daha yüksek olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 2. Üretilen ekmeklerin renk özellikleri
 Table 2. Colour properties of produced bread

Un çeşidi <i>Flour type</i>	Kabuk rengi <i>Colour of crust</i>		
	L^*	a^*	b^*
BU <i>WF</i>	55.91 ^a ±1.51	8.37 ^b ±0.40	33.06 ^a ±0.70
TBU <i>WWF</i>	45.32 ^b ±0.79	9.57 ^a ±0.18	28.04 ^b ±0.54
Önem <i>Significance</i>	**	*	**
PAS oranı <i>Wbey ratio</i>			
%0	54.81 ^a ±3.83	8.12 ^a ±1.01	32.69 ^a ±1.38
%25	52.77 ^{ab} ±4.28	8.77 ^a ±0.57	31.94 ^{ab} ±1.99
%50	49.42 ^{bc} ±3.53	9.50 ^a ±0.47	30.31 ^{bc} ±1.31
%75	48.31 ^{bc} ±3.07	9.31 ^a ±0.15	29.54 ^{cd} ±1.91
%100	47.75 ^c ±1.08	9.15 ^a ±0.19	28.26 ^d ±0.91
Önem <i>Significance</i>	*	-	**
Un çeşidi <i>Flour type</i>	İç rengi <i>Colour of crumb</i>		
	L^*	a^*	b^*
BU <i>WF</i>	77.62 ^a ±0.50	-6.04 ^b ±0.06	23.84 ^b ±0.20
TBU <i>WWF</i>	57.79 ^b ±0.63	3.06 ^a ±0.07	24.70 ^a ±0.17
Önem <i>Significance</i>	**	**	**
PAS oranı <i>Wbey ratio</i>			
%0	66.61 ^a ±5.66	-1.42 ^a ±2.56	23.96 ^a ±0.24
%25	67.89 ^a ±5.07	-1.41 ^a ±2.61	23.92 ^a ±0.43
%50	67.50 ^a ±6.57	-1.52 ^a ±2.71	24.08 ^a ±0.35
%75	68.38 ^a ±5.45	-1.46 ^a ±2.63	24.75 ^a ±0.39
%100	68.16 ^a ±6.12	-1.65 ^a ±2.65	24.63 ^a ±0.34
Önem <i>Significance</i>	-	-	-

BU: Beyaz un, TBU: Tam buğday unu

Önem: ** $P \leq 0.01$, * $0.01 < P \leq 0.05$, - $P > 0.05$ (önemsiz)

WF: *White flour*, *WWF*: *Whole wheat flour*

Significance: ** $P \leq 0.01$, * $0.01 < P \leq 0.05$, - $P > 0.05$ (insignificant)

Çizelge 3. Üretilen ekmeklerin TPA özellikleri
 Table 3. TPA properties of produced bread

Un çeşidi <i>Flour type</i>	Sertlik <i>Hardness</i> (g)	Elastikiyet <i>Springiness</i>	Kohezif yapışkanlık <i>Cohesiveness</i>
BU <i>WF</i>	3417.40 ^b ±100.58	0.94 ^a ±0.00	0.80 ^b ±0.03
TBU <i>WWF</i>	12633.90 ^a ±510.69	0.66 ^b ±0.01	0.91 ^a ±0.01
Önem <i>Significance</i>	**	**	**
PAS oranı <i>Whey ratio</i>			
%0	8316.47 ^{ab} ±3018.39	0.80 ^{ab} ±0.08	0.83 ^a ±0.05
%25	8779.64 ^a ±3239.30	0.80 ^{ab} ±0.08	0.87 ^a ±0.02
%50	8501.50 ^{ab} ±2762.59	0.78 ^b ±0.09	0.89 ^a ±0.02
%75	7664.32 ^{ab} ±2308.34	0.79 ^{ab} ±0.08	0.80 ^a ±0.08
%100	6866.53 ^b ±2019.03	0.82 ^a ±0.08	0.90 ^a ±0.01
Önem <i>Significance</i>	*	*	-
Un çeşidi <i>Flour type</i>	Çiğnenabilirlik <i>Chewiness</i> (g)	Esneklik <i>Resilience</i>	
BU <i>WF</i>	2559.80 ^b ±113.49	0.38 ^b ±0.02	
TBU <i>WWF</i>	7455.12 ^a ±310.90	0.43 ^a ±0.00	
Önem <i>Significance</i>	**	*	
PAS oranı <i>Whey ratio</i>			
%0	5066.46 ^a ±1683.96	0.39 ^a ±0.02	
%25	5569.23 ^a ±1802.57	0.42 ^a ±0.01	
%50	5227.53 ^a ±1329.76	0.43 ^a ±0.01	
%75	4551.23 ^a ±1297.35	0.38 ^a ±0.04	
%100	4622.85 ^a ±1014.42	0.44 ^a ±0.01	
Önem <i>Significance</i>	-	-	

BU: Beyaz un, TBU: Tam buğday unu

Önem: ** $P \leq 0.01$, * $0.01 < P \leq 0.05$, - $P > 0.05$ (önemsiz)

WF: White flour, *WWF*: Whole wheat flour

Significance: ** $P \leq 0.01$, * $0.01 < P \leq 0.05$, - $P > 0.05$ (insignificant)

Çizelge 4. Üretilen ekmeklerin spesifik hacim değerleri ve bazı kimyasal özellikleri
 Table 4. Specific volume values and some chemical properties of produced bread

Un çeşidi <i>Flour type</i>	Spesifik hacim <i>Specific volume</i> (cm ³ /g)	Kuru madde <i>Dry matter</i> (%)	HMF <i>HMF</i> (mg/kg)
BU <i>WF</i>	2.07 ^b ±0.07	64.32 ^b ±0.30	15.48 ^a ±3.33
TBU <i>WWF</i>	2.48 ^a ±0.04	66.55 ^a ±0.13	11.19 ^a ±1.18
Önem <i>Significance</i>	**	**	-
PAS oranı <i>Whey ratio</i>			
%0	2.07 ^b ±0.16	65.35 ^{ab} ±1.04	7.81 ^b ±1.81
%25	2.29 ^{ab} ±0.12	64.90 ^b ±0.72	7.36 ^b ±0.78
%50	2.26 ^{ab} ±0.18	65.01 ^b ±0.74	11.01 ^b ±1.47
%75	2.44 ^a ±0.12	65.75 ^{ab} ±0.52	19.82 ^a ±3.84
%100	2.32 ^a ±0.09	66.18 ^a ±0.25	20.69 ^a ±4.97
Önem <i>Significance</i>	*	*	**

BU: Beyaz un, TBU: Tam buğday unu

Önem: ** $P \leq 0.01$, * $0.01 < P \leq 0.05$, - $P > 0.05$ (önemsiz)

WF: *White flour*, WWF: *Whole wheat flour*

Significance: ** $P \leq 0.01$, * $0.01 < P \leq 0.05$, - $P > 0.05$ (insignificant)

Ekmeklerin HMF içeriği üzerine PAS oranının istatistiksel olarak önemli ($P < 0.01$) bir etkisinin olduğu, ancak un çeşidinin önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. PAS oranının artmasıyla ekmeklerin HMF içeriklerinde tespit edilen artışın PAS bileşiminde bulunan indirgen şeker ve serbest aminoasitlerin Maillard reaksiyonunu arttırmaktan kaynaklandığı değerlendirilmiştir. Fırın ürünlerinde meydana gelen temel kimyasal reaksiyonlar, enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonları olarak da bilinen Maillard reaksiyonu ve karamelizasyondur. Bu reaksiyonlar sırasında hem renk ve aroma bileşenleri gibi faydalı, hem de HMF ve akrilamid gibi potansiyel olarak zararlı bileşikler meydana gelmektedir (Capuano vd., 2009; Liu ve Zhong, 2015). Un çeşidi için ise; ortalamalar üzerinden tasvir olarak bir deskriptif değerlendirme yapıldığında, tam buğday unu ile üretilen ekmeklerin HMF içeriklerinin, beyaz un ile üretilen ekmeklerin HMF içeriklerinden daha düşük olduğu belirlenmiştir. Tam buğday ununda

bulunan kepek materyalinin Maillard reaksiyonunda rol alan reaktantları seyreltmesi nedeniyle bu sonucun elde edildiği değerlendirilmiştir. Capuano vd. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada da tam buğday unuyla üretilen ekmeklerin HMF içeriğinin normal unla ve çavdar unuyla üretilen ekmeklerin HMF içeriğinden daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Üretilen ekmeklerin duyuşsal özellikleri

Farklı çeşit un ve farklı oranda PAS kullanılarak üretilen ekmeklerin bazı duyuşsal dış (hacim, kabuk rengi, şekil simetrisi, kabuk ve kenar özelliği) ve iç (gözenek yapısı, tat, çiğneme ve tekstür) özelliklerine ait sonuçlar Çizelge 5'te verilmiştir. Ekmeklerin duyuşsal özelliklerini belirten parametreler panelistlerin beğeni düzeyine göre ifade edilmiş olup bu parametrelerden hiçbirinin üzerine un çeşidi ve PAS ilave oranının istatistiksel olarak etkili olmadığı ($P > 0.05$) tespit edilmiştir. PAS ilavesi ile üretilen tüm ekmeklerin panelistler

tarafından 5 puanlık duysal hedonik skalada orta değer olan 3 ve üzerinde puanlandığı ve bu

nedenle de ekmeklerin duysal olarak kabul edilebilir olduğu değerlendirilmiştir.

Çizelge 5. Üretilen ekmeklerin bazı duysal özellikleri

Table 5. Some sensory properties of produced bread

Un çeşidi <i>Flour type</i>	Hacim <i>Volume</i>	Kabuk rengi <i>Colour of crust</i>	Şekil simetrisi <i>Symmetry of form</i>	Kabuk ve kenar özelliği <i>Crust and corner properties</i>
BU <i>WF</i>	4.38 ^a ±0.24	4.24 ^a ±0.10	4.38 ^a ±0.13	4.27 ^a ±0.04
TBU <i>WWF</i>	3.16 ^a ±0.33	3.20 ^a ±0.27	3.28 ^a ±0.37	3.81 ^a ±0.31
Önem <i>Significance</i>	-	-	-	-
PAS oranı <i>Whey ratio</i>				
%0	3.35 ^a ±0.95	3.35 ^a ±0.61	3.20 ^a ±0.94	3.45 ^a ±0.61
%25	3.65 ^a ±0.54	3.45 ^a ±0.61	3.30 ^a ±0.42	3.65 ^a ±0.36
%50	4.00 ^a ±0.44	3.85 ^a ±0.32	3.95 ^a ±0.28	4.30 ^a ±0.12
%75	3.30 ^a ±0.19	3.80 ^a ±0.16	4.10 ^a ±0.25	4.26 ^a ±0.09
%100	4.55 ^a ±0.26	4.15 ^a ±0.25	4.60 ^a ±0.16	4.51 ^a ±0.19
Önem <i>Significance</i>	-	-	-	-
Un çeşidi <i>Flour type</i>	Gözenek yapısı <i>Pore structure</i>	Tat <i>Flavour</i>	Çiğneme <i>Chewing</i>	Tekstür <i>Texture</i>
BU <i>WF</i>	3.96 ^a ±0.27	4.30 ^a ±0.13	4.36 ^a ±0.14	4.34 ^a ±0.12
TBU <i>WWF</i>	3.70 ^a ±0.19	3.58 ^a ±0.19	3.74 ^a ±0.19	3.34 ^a ±0.23
Önem <i>Significance</i>	-	-	-	-
PAS oranı <i>Whey ratio</i>				
%0	3.65 ^a ±0.50	3.75 ^a ±0.41	3.75 ^a ±0.30	3.40 ^a ±0.47
%25	4.40 ^a ±0.22	3.65 ^a ±0.24	3.90 ^a ±0.30	3.60 ^a ±0.50
%50	4.35 ^a ±0.13	3.85 ^a ±0.31	4.10 ^a ±0.37	4.00 ^a ±0.39
%75	3.45 ^a ±0.38	3.95 ^a ±0.24	3.95 ^a ±0.17	3.85 ^a ±0.10
%100	3.30 ^a ±0.17	4.50 ^a ±0.31	4.55 ^a ±0.33	4.35 ^a ±0.33
Önem <i>Significance</i>	-	-	-	-

BU: Beyaz un, TBU: Tam buğday unu

Önem: ** $P \leq 0.01$, * $0.01 < P \leq 0.05$, - $P > 0.05$ (önemsiz)

WF: *White flour*, WWF: *Whole wheat flour*

Significance: ** $P \leq 0.01$, * $0.01 < P \leq 0.05$, - $P > 0.05$ (insignificant)

SONUÇ

Ekmek üretiminde hamur oluşturuucu olarak PAS'ın su ikamesi olarak kullanımının hamur oluşumu üzerine olumsuz bir etki yaratmadığı ve ekmeğin fiziksel ve duyuusal kalitesini kontrol örneğine göre önemli bir düzeyde azaltmadığı tespit edilmiştir. Ekmek kabuğunda oluşan ve bir işlem kontaminantı olarak kabul edilen HMF içeriğinde ise %50 PAS ilavesine kadar kontrol örneğine göre önemli bir artış olmadığı, ancak daha yüksek oranlarda PAS ilavesinin HMF düzeyini önemli ölçüde arttırdığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak; peynir üretiminin besin içeriği ve ekonomik olarak değerli bir yan ürünü olan, ancak doğrudan çevreye salındığı için önemli bir çevre kirleticisine dönüşen PAS'ın ekmek üretiminde %50'ye kadar hamur suyu ikamesi olarak kullanımının uygun olduğu tespit edilmiştir. Böylelikle ekonomik olarak değerli olan bu yan ürünün değerlendirilerek büyük bir ekonomik kaybın engellenebileceği ve bu şekilde hem çevresel bir tehdidin azaltılabileceği hem de ekmeğin besleyici özelliklerinin geliştirilebileceği değerlendirilmiştir.

KAYNAKLAR

Anonim. (1999). *Mikrobiyolojik analiz yöntemlerinde yeni yaklaşımlar*. Hemakim A. Ş., İstanbul, Türkiye, 88 s.

Anonim. (2013). Türk Gıda Kodeksi Buğday Unu Tebliği (Tebliğ No: 2013/9). 28606 Sayılı Resmi Gazete, Ankara, Türkiye.

Anonim. (2017). Süt ve Süt Ürünleri Üretim Miktarı. Web Sitesi: <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=85&locale=tr>. Erişim Tarihi: 23.01.2019

APHA. (1976). Compendium of methods for the microbiological examinations of foods. *The American Public Health Association*, Washington, America, 702 s.

Bilgin, B., Daglioglu, O., Konyali, M. (2006). Functionality of bread made with pasteurized whey and/or buttermilk. *Ital J Food Sci*, 18(3): 277-286.

Bodnár, I., Alting, A.C., Verschuere, M. (2007). Structural effects on the permeability of whey

protein films in an aqueous environment. *Food Hydrocoll*, 21(5): 889-895.

Capuano, E., Ferrigno, A., Acampa, I., Serpen, A., Açar, Ö.Ç., Gökmen, V., Fogliano, V. (2009). Effect of flour type on Maillard reaction and acrylamide formation during toasting of bread crisp model systems and mitigation strategies. *Food Res Int*, 42(9): 1295-1302.

Clerici, M.T.P.S., Airoldi, C., El-Dash, A.A. (2009). Production of acidic extruded rice flour and its influence on the qualities of gluten-free bread. *LWT-Food Sci Technol*, 42(2): 618-623.

Demir, M.K., Elgün, A., Argun, M.Ş. (2009). Sütçülük yan ürünlerinden peynir altı, yayık altı ve süzme yoğurt suları katkılarının bazı ekmek özelliklerine etkileri üzerine bir araştırma. *Gıda*, 34(2): 99-106.

Divya, N., Rao, K.J. (2010). Studies on utilization of Indian cottage cheese whey in wheat bread manufacture. *J Food Process Preserv*, 34(6): 975-992.

Doğan, İ.S., Yıldız, Ö. (2009). Ekmek makinelerinde kullanılan farklı bileşen seviyelerinin ekmek kalitesi üzerine etkisi. *Gıda*, 34(5): 295-301.

Elgün, A. (1986). Fırın ürünlerinin zenginleştirilmesi açısından peynir altı suyuna bakış. *Gıda*, 11(3): 145-152.

Elgün, A., Ertugay, Z. (2002). *Tabul işleme teknolojisi*. Atatürk Üniversitesi Yayınları No: 718, Erzurum, Türkiye, 411 s.

Elgün, A., Ertugay, Z., Certel, M., Kotancılar, H.G. (2002). *Tabul ve ürünlerinde analitik kalite kontrolü ve laboratuvar uygulama kılavuzu*. Atatürk Üniversitesi Yayınları No: 867, Erzurum, Türkiye, 245 s.

Fallico, B., Zappala, M., Arena, E., Verzera, A. (2004). Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. *Food Chem*, 85(2): 305-313.

Gamba, R.R., Moure, C., Diosma, G., Giannuzzi, L., De Antoni, G.L., Pelaez, A.M.L. (2016). Application of whey permeate fermented with kefir grains for the shelf-life improvement of food and feed. *Adv Microbiol*, 6(9): 650-661.

- Gâmbaro, A., Varela, P., Gimenez, A., Aldrovandi, A., Fiszman, S., Hough, G. (2002). Textural quality of white pan bread by sensory and instrumental measurements. *J Texture Stud*, 33(5): 401-413.
- Gonçalves Cibely, M., de Souza Cínthia Hoch, B., Suguimoto Hélio, H., Ishii Priscila, L., dos Santos Leandro, F. (2017). Addition of whey protein in bread-making: Textural parameters and antioxidant potential of leavened and unleavened bread. *Int J Food Eng*, 13(4): 1-8.
- Guemes-Vera, N., Gonzalez-Victoriano, L., Soto-Simental, S., Hernandez-Chavez, J.F., Reyes-Santamaria, M.I. (2014). Mechanical properties of cottage cheese-fortified wheat dough and loaf bread. *J Food Sci Technol*, 51(10): 2797-2802.
- Halkman, A.K. (2005). *Merck gıda mikrobiyolojisi uygulamaları*. Başak Matbaacılık ve Tanıtım Hizmetleri Ltd. Şti., Ankara, Türkiye, 358 s.
- Harding, F. (1999). *Milk quality*. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Maryland, UK, 163 s.
- ICC. (1976). Method No: 110/1. Determination of the moisture content of cereals and cereal products (Practical method). Approved 1960. *ICC Standards*, Vienna, Austria.
- ICC. (1990). Method No:104/1. Determination of ash in cereals and cereal products. Approved 1960. *ICC Standards*, Vienna, Austria.
- ICC. (1992). Method No:114/1. Method for using the Brabender Extensograph. Approved 1972. *ICC Standards*, Vienna, Austria.
- ICC. (1992). Method No:115/1. Method for using the Brabender Farinograph. Approved 1972. *ICC Standards*, Vienna, Austria.
- ICC. (1994). Method No:105/2. Determination of crude protein in cereals and cereal products for food and for feed. Approved 1980. *ICC Standards*, Vienna, Austria.
- ICC. (1994). Method No:116/1. Determination of the sedimentation value (according to zeleny) as an approximate measure of baking quality. Approved 1972. *ICC Standards*, Vienna, Austria.
- ICC. (1994). Method No:137/1. Mechanical determination of the wet gluten content of wheat flour (Perten Glutomatic). Approved 1982. *ICC Standards*, Vienna, Austria.
- ICC. (1995). Method No:107/1. Determination of the "falling number" according to hagberg - as a measure of the degree of alpha-amylase activity in grain and flour. Approved 1968. *ICC Standards*, Vienna, Austria.
- ISO. (2001). Standard No: ISO 8261:2001 (IDF Standard 122: 2001). Milk and milk products, Preparation of sample and dilutions for microbiological examination. *International Organization for Standardization*, Geneva, Switzerland.
- Kang, I.B., Kim, D.H., Chon, J.W., Seo, K.H. (2018). Effect of microbial control measures on farmstead cheesemaking and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus spp.* isolates. *J Food Saf*, 38(2): e12432.
- Koca, A.F., Tarakçı, Z. (1997). Tarhana üretiminde mısır unu ve peyniraltı suyu kullanımı. *Gıda*, 22(4): 287-292.
- Kopec, A., Borczak, B., Pysz, M., Sikora, E., Sikora, M., Curic, D., Novotni, D. (2014). An addition of sourdough and whey proteins affects the nutritional quality of wholemeal wheat bread. *Acta scientiarum polonorum. Technologia Alimentaria*, 13(1): 43-54.
- Kurt, A., Gülümser, S. (1987). Peynir suyu ve kullanım imkânları. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18(1-4): 133-141.
- Liu, G., Zhong, Q. (2015). High temperature-short time glycation to improve heat stability of whey protein and reduce color formation. *Food Hydrocoll*, 44: 453-460.
- Ma, Y., Zhang, L., Wu, Y., Zhou, P. (2019). Changes in milk fat globule membrane proteome after pasteurization in human, bovine and caprine species. *Food Chem*, 279: 209-215.
- Metin, M. (1998). *Süt teknolojisi, Sütün bileşimi ve işlenmesi*. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları, Bornova, İzmir, Türkiye, 793 s.
- Özkaya, H., Özkaya, B. (2005). *Tabıl ve ürünleri analiz yöntemleri*. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları Yayın No: 31, Ankara, Türkiye, 157 s.

- Paul, S., Kulkarni, S., Rao, K.J. (2016). Effect of Indian cottage cheese (paneer)-whey on rheological and proofing characteristics of multigrain bread dough. *J Texture Stud*, 47(2): 142-151.
- Pekcan, G. (2009). Türkiye’de beslenme ve sağlık durumu. *Hacettepe Beslenme ve Diyetetik Günleri, II. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu*, 13-22.
- Salazar, D.M., Naranjo, M., Perez, L.V., Valencia, A.F., Acurio, L.P., Gallegos, L.M., Alvarez, F.C., Amancha, P.I., Valencia, M.P., Rodriguez, C.A., Arancibia, M.Y. (2017). Development of newly enriched bread with quinoa flour and whey. 3rd International Conference on Agricultural and Biological Sciences, (baş ed.), IOP Publishing, 1-7 s.
- Tebben, L., Shen, Y., Li, Y. (2018). Improvers and functional ingredients in whole wheat bread: A review of their effects on dough properties and bread quality. *Trends Food Sci Technol*, 81: 10-24.
- TSE. (1992). Standart No: TSE 4265. Dondurma-Süt esası. *Türk Standartları Enstitüsü*, Ankara, Türkiye.
- Üçüncü, M. (2004). *A’dan Z’ye peynir teknolojisi*, Cilt: II. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, Bornova, İzmir, Türkiye, 1236 s.
- Wang, J.G., Tang, J.M., Liu, F., Bohnet, S. (2018). A new chemical marker-model food system for heating pattern determination of microwave-assisted pasteurization processes. *Food Bioprocess Technol*, 11(7): 1274-1285.
- 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.



ÇÖKELEK PEYNİRİ ÜRETİMİNDE ALTERNATİF KAYNAK OLARAK KEFİR KULLANIMI

Tuba Şanlı^{1*} Elif Ayşe Anlı¹

¹Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü, Ankara, Türkiye

Geliş / Received: 18.12.2019; Kabul / Accepted: 21.01.2020; Online baskı / Published online: 30.01.2020

Şanlı, T., Anlı, E. A. (2020). Çökelek peyniri üretiminde alternatif kaynak olarak kefir kullanımı. *GIDA* (2020) 45(1) 139-149 doi: 10.15237/gida.GD19162

Şanlı, T., Anlı, E. A. (2020). Use of kefir in çökelek cheese production. *GIDA* (2020) 45(1) 139-149 doi: 10.15237/gida.GD19162

ÖZ

Çökelek peyniri, yoğurttan üretilen ve daha çok semt pazarlarında satışı yapılan geleneksel bir peynir çeşididir. Çalışmada çökelek peyniri üretiminde kefir kullanımının uygunluğu araştırılmıştır. Yoğurt ve kefirden elde edilen çökelek peynirleri (YÇ, KÇ) fizikokimyasal, mikrobiyolojik ve duyuşal nitelikleri yönünden 1., 14. ve 28. günlerde karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Yoğurt ve kefir kullanılarak üretilen çökelek peynirlerinde toplam kurumadde, kül, tuz ve protein değerleri bakımından önemli bir fark belirlenmemiştir. Bununla birlikte kefirden üretilen çökelek peynirinin tat ve koku özellikleri yönünden yoğurttan üretilen çökelek peynirinden farklı olduğu ve panelistler tarafından daha fazla beğenildiği tespit edilmiştir. Mikrobiyolojik özellik bakımından değerlendirildiğinde, kefirden üretilen çökelek peynirinde toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sayılarının (2.71-2.96 log kob/g) yoğurttan üretilen çökelek peynirlerinde belirlenen değerlerden (3.31-3.58 log kob/g) daha düşük olduğu görülmüştür. Sonuçlar, Çökelek üretiminde kefir kullanımının ürünün duyuşal özelliklerini ve raf ömrünü olumlu yönde etkilediğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Kefir, Çökelek peyniri, fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özellikler, duyuşal değerlendirme.

USE OF KEFIR IN COKELEK CHEESE PRODUCTION

ABSTRACT

Çökelek, is a traditional type of cheese produced by using yogurt and mainly sold in local bazaars. In the study, the opportunities of using kefir in Çökelek cheese production were investigated. The Çökelek cheese samples (YÇ, KÇ) obtained from yogurt and kefir were examined comparatively in the 1st, 14th and 28th days in terms of their physicochemical, microbiological and sensory properties. Distinct difference was not observed in samples' total dry matter, ash, salt and protein content. Moreover, panelists remarked that Çökelek cheese produced from kefir was different from the cheese produced from yogurt in terms of taste and smell characteristics and more liked. Total aerobic mesophilic bacteria (TAMB) counts in Çökelek cheese produced from kefir (2.71-2.96 log kob/g) were lower than cheese produced from yogurt (3.31-3.58 log kob/g). Results indicated that use of kefir in Çökelek cheese production was favorable for sensory and also shelf life characteristics.

Keywords: Kefir, Çökelek cheese, physicochemical and microbiological properties, sensory evaluation.

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: tcetin@agri.ankara.edu.tr

☎: (+90) 312 596 1527

☎: (+90) 312 318 2219

Tuba Şanlı; ORCID no: 0000-0001-6747-2617

Elif Ayşe Anlı; ORCID no: 0000-0002-0524-4851

GİRİŞ

Çökelek peyniri, ülkemizde özellikle kırsal bölgelerde Beyaz peynir ve Tulum peynirinden sonra en çok tüketilen peynir çeşitlerinden birisidir. Geleneksel olarak yayık tereyağı üretiminde, yoğurdun sulandırılarak yayıklanması işlemi sonrasında kalan yayıkaltına ısıl işlem uygulanarak üretilmektedir (Karabalut vd., 2007; Şanlıdere Aloğlu vd., 2012). Çökelek peyniri ucuz olmasının yanı sıra, kazein ve serum proteinlerini bir arada içermesi ve az yağlı ya da yağsız olması ile sağlıklı beslenmede tercih edilmesi gereken bir peynir çeşididir (Kavaz vd., 2012; Celem vd., 2018; Ergene ve Arslan 2019).

Kefir orijini Kafkasya olan ve geleneksel olarak sütün kefir danesi ile fermantasyonu sonucu üretilen bir süt ürünüdür (Kakisu vd., 2011; Ürkek vd., 2011; Dertli ve Çon, 2017; Yıldız-Akgül vd., 2018). Endüstriyel düzeyde ise; kefir ve kefir danelerinden izole edilmiş saf mikroorganizmalardan oluşan hazır ticari starter kültür ile üretim sağlanır. Diğer süt ürünlerinden farklı olarak kefir, tek bir türe ait mikrofloranın metabolik aktivitesi sonucu değil karışık bir mikrofloranın fermantasyonu sonucu açığa çıkan bir üründür. Kefir mikroflorası başlıca laktobasiller olmak üzere, streptokoklar, laktokoklar, asetik asit bakterileri ve mayalardan oluşmaktadır (Simova vd., 2002; Güzel Seydim vd., 2011; Nielsen vd., 2014). Çok sayıda mikroorganizmayı içeren kefirin, sahip olduğu mikrofloranın fermantasyon sürecinde ürettikleri metabolitlere bağlı olarak antibakteriyel, antihipertansif, bağışıklık sistemini destekleyici, bağırsak florasını dengeleyici özellikleri ile sağlık üzerine olumlu birçok etkisinin bulunduğu bilinmektedir (Ürkek vd., 2011; Esmek ve Güzeler, 2015; Bengoa vd., 2018; Weschenfelder vd., 2018). Konuyla ilişkili olarak da literatürde kefir ile ilgili yapılan çalışmaların yanı sıra, kefir starter kültürü kullanılarak üretilen, özellikle bazı peynir çeşitleri ile yapılan çalışmalar dikkat çekmektedir (Dimitrellou vd., 2015; Ribeiro Melo vd., 2018; Weschenfelder vd., 2018). Bu çalışmada, yirmi birinci yüzyılın yoğurdu olarak bilinen kefirin besleyici özelliği ile tanınan, geleneksel olarak üretilen ve lokal olarak tüketilen bir peynir çeşidi olan çökelek üretiminde

kullanılabilirliği araştırılmıştır. Yoğurt ve kefir kaynaklı olarak üretilen çökelek peynirlerinin kimyasal, mikrobiyolojik ve duyuşsal özellikleri incelenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Araştırmada hammadde olarak kullanılan çiğ inek sütü Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Hayvancılık İşletmesi'nden temin edilmiştir. Çökelek peyniri üretiminde kullanılan yoğurt ve kefir için starter kültür olarak sırasıyla YO-MIX R06 LYO (500 DCU, Danisco, Germany) ve CHOOZIT® Kefir DC (LYO 1000 I, Danisco, Germany) kullanılmıştır. Liyofilize kültürlere kullanmadan önce % 12 (w/w) kurumaddeli rekonstitüe sütte ön aktifleştirme işlemi uygulanmıştır.

Yöntem

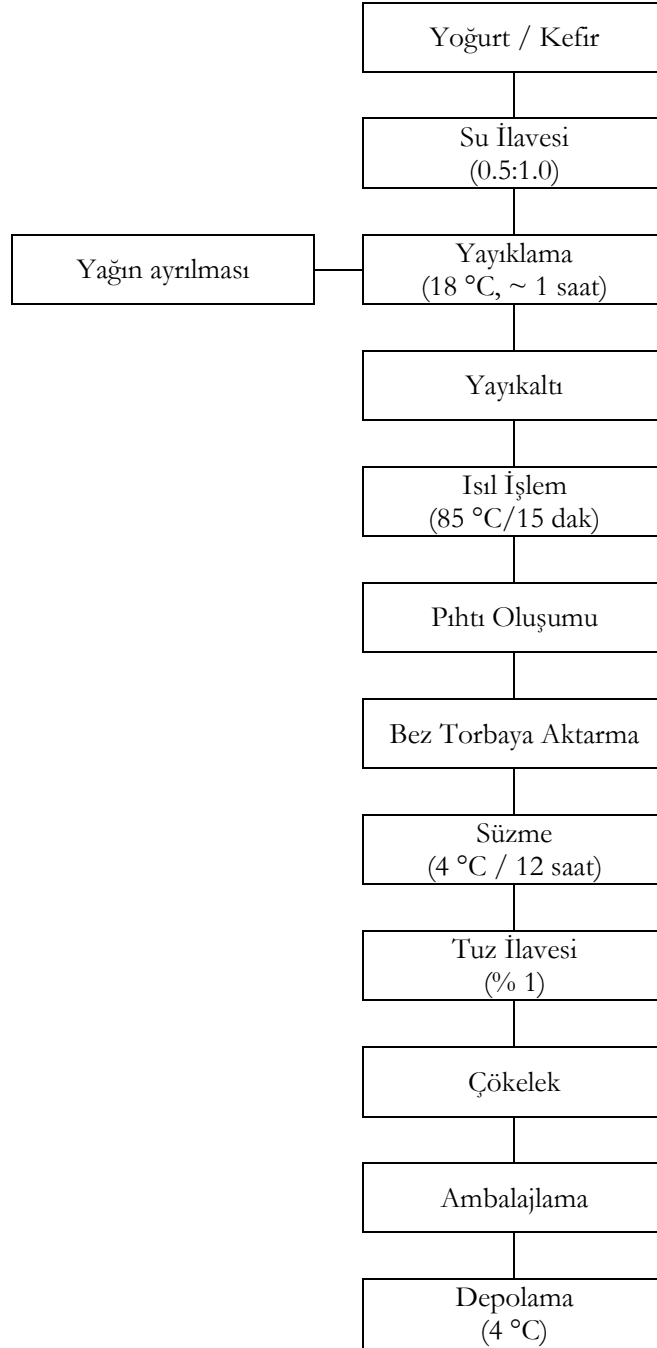
Deneme örneklerinin üretimi Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Eğitim Araştırma ve Uygulama İşletmesinde mevcut donanımlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çiğ süte 85°C'de 15 dakika ısıl işlem uygulanmış ve daha sonra kefir ve yoğurt üretimi için iki kısma ayrılmıştır. Kefir üretiminde kullanılacak ilk kısım süt, 22°C'ye soğutulduktan sonra % 5 kefir starter kültürü ilave edilerek 22°C'de pH 4.5-4.6'ya ulaşmaya kadar (yaklaşık 18 saat) inkübasyona bırakılmıştır. Yoğurt üretiminde kullanılan ikinci kısım süte ise, 45°C'ye soğutulduktan sonra % 2 yoğurt starter kültürü ilave edilerek 43-44°C'de pH 4.6'ya ulaşmaya kadar inkübasyon işlemi uygulanmıştır. Çökelek peyniri üretim yöntemi Şekil 1'de verilmiştir. Çökelek peynir örnekleri, 4°C'de depolanarak 1., 14. ve 28. günlerde fizikokimyasal, mikrobiyolojik ve duyuşsal özellikleri yönünden incelenmiştir.

Kimyasal analizler

Peynir örneklerinde toplam kurumadde ve kül içerikleri gravimetrik yöntemle, yağ içeriği Gerber metodu ile, tuz içeriği ise Mohr titrasyon yöntemiyle belirlenmiştir (Hooi vd., 2004). Peynir örneklerinin titrasyon asitliği Hooi vd. (2004) tarafından bildirilen yöntemle göre belirlenmiş ve sonuçlar % laktik asit cinsinden ifade edilmiştir. Örneklerin pH değeri dijital pH-metre (MP 225,

Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Germany) kullanılarak saptanmıştır. Toplam azot (TN) içerikleri Kjeldahl yöntemine göre tayin edilmiştir (IDF, 1993). Bulunan değer 6.38 ile çarpılarak %

toplam protein miktarı belirlenmiştir. Örneklerin % nem içerikleri OHAUS marka nem tayin cihazı (MB 45; Parsippany, NJ, USA) ile tespit edilmiştir.



Şekil 1. Çökelek peyniri üretim akış şeması
Figure 1. Flow chart Çökelek cheese production

Renk analizi

Çökelek peyniri örneklerinin renk özelliklerini ifade eden L^* , a^* ve b^* değerleri, depolamanın 1., 14. ve 28. günlerinde kromametre cihazı (Konica Minolta CR 410, Sensing Inc., Osaka, Japan) kullanılarak ölçülmüştür. Örnekler arası renk farklılığını ortaya koymak üzere örneklerde depolama günlerinde aşağıdaki eşitlikten yararlanılarak ΔE değeri hesaplanmıştır (Chudy vd., 2019). Eşitlikte verilen ΔL , Δa ve Δb değerleri söz konusu günlerde deneme örnekleri için ölçülen L^* , a^* ve b^* değerleri dikkate alınarak ve yoğurt çökeleği kontrol örneği olarak kabul edilerek hesaplanmıştır.

$$\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{\frac{1}{2}}$$

Mikrobiyolojik analizler

Örneklerin mikrobiyolojik analizinde 10'ar gram çökelek peyniri örneği 90 mL steril ringer (1/4 strength, Merck, Darmstadt, Germany) çözeltisinde magnetik karıştırıcı (Heidolph MR Hei-Tec, Schwabach, Germany) ile homojen hale getirilmiştir. Hazırlanan seri dilüsyonlardan dökme plak yöntemi ile ekim yapılmıştır. Toplam mezofilik aerobik bakteri (TAMB) sayımında Plate Count Agar (PCA, Merck) besiyeri kullanılmıştır. Ekimi yapılan örnekler 37°C'de 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Sayım sonuçları koloni oluşturan birim sayısının logaritması alınarak (log kob/g) verilmiştir (Halkman, 2005).

Duyusal değerlendirme

Peynir örneklerinin duyuşal değerlendirmesi Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü öğretim elemanlarından oluşan, süt ve süt ürünlerinin duyuşal değerlendirmesi konusunda deneyimli 8 panelist tarafından gerçekleştirilmiştir. Örneklerin duyuşal özellikleri depolamanın 1., 14. ve 28. günlerinde yapılmıştır. İki aşamalı olarak yapılan duyuşal değerlendirmede ilk olarak koku, lezzet, görünüş ve yapı özellikleri yönünden sunulan 2 örnek arasında fark olup olmadığı değerlendirilmiş, ikinci aşamada ise puanlama testi ile yine aynı özellikler yönünden farklılığın derecesi belirlenmeye çalışılmıştır (Altuğ- Onoğur ve

Elmacı, 2015). Duyusal değerlendirme için örnekler 3 haneli sayılar ile rastgele kodlanmış, plastik kapaklı kaplar içerisine yerleştirilmiş ve ağız tadını iyileştirmek üzere 1 bardak su eşliğinde panelistlere sunulmuştur.

İstatistiksel analiz

Araştırma sonucu elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS (SPSS Version 20.0, IBM Corp. Armonk, NY, USA, 2011) programı kullanılmıştır. Örnekler arası farklılığın belirlenmesinde bağımsız gruplar arası t-testi uygulanmıştır. İki tekerrürlü olarak gerçekleştirilen çalışmada elde edilen veriler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. Verilerin depolama günlerindeki karşılaştırılmasında ise tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmış ve istatistiksel olarak önemli olan farklılıklar ($P < 0.05$) Tukey testi ile belirlenmiştir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Kimyasal özellikler

Çökelek peyniri örneklerinin üretiminde kullanılan yoğurt ve kefir yayıkaltlarına ilişkin genel bileşim özellikleri ortalama olarak % 2.5 protein, % 0.1 yağ ve % 6 kurumadde olarak tespit edilmiştir.

Çökelek peyniri örneklerinin kimyasal özellikleri Çizelge 1'de verilmiştir. Yoğurt ve kefir kullanılarak üretilen çökelek peynirlerinin toplam kurumadde, kül, tuz ve protein değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel açıdan önemli olmadığı bulunmuştur ($P > 0.05$). Her örnek kendi içerisinde değerlendirildiğinde, depolama sürecinde de söz konusu kimyasal özelliklerde belirlenen değişimlerin istatistiksel açıdan önemli olmadığı ($P > 0.05$) görülmüştür.

Çökelek peynirlerinin toplam kurumadde (%21.47 - 24.54) ve yağ içerikleri (%1.5 - 2) bakımından Celem vd. (2018) tarafından 20 çökelek peynirinde belirlenen toplam kurumadde (ortalama %23.9 \pm 2.4) ve yağ içerikleri (ortalama %1.6 \pm 0.8) ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, Çardak (2012) ve Kavaz vd. (2012) tarafından yapılan çalışmalarda çökelek peynirlerinin toplam kurumadde ve yağ içeriklerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Nem değerleri %70-82 aralığında olan yağsız peynirler yumuşak ve taze peynir olarak sınıflandırılmaktadır (Fox, 1993). Bu sınıflandırmaya göre deneme örnekleri çökelek peynirlerinin %71.35 – 73.36 aralığında değişen

nem değerleri ile taze peynir grubunda yer aldığı tespit edilmiştir. Çökelek peyniri olgunlaştırma olmadığı sürece taze olarak tüketilen bir peynir çeşidi olarak bilinmektedir.

Çizelge 1. Çökelek peynirlerinin kimyasal özellikleri
Table 1. Chemical properties of Çökelek cheeses

Özellikler Properties	Depolama (Gün) Storage (Day)	YÇ	KÇ
Kurumadde (%) Dry matter (%)	1	22.86±2.19	24.54±1.17
	14	22.98±1.62	24.22±0.75
	28	21.47±1.07	23.97±1.12
Nem (%) Moisture (%)	1	73.36±0.01	71.35±0.01
	14	73.26±1.05	71.76±0.16
	28	73.35±0.66	71.72±0.09
Titrasyon asitliği (% LA) Titratable acidity (% LA)	1	1.59±0.04	1.68±0.02
	14	1.66±0.02	1.72±0.04
	28	1.70±0.08	1.72±0.09
pH	1	4.35±0.04	4.42±0.01
	14	4.27±0.07	4.38±0.01
	28	4.29±0.06	4.40±0.01
Kül (%) Ash (%)	1	1.44±0.21	1.47±0.06
	14	1.41±0.49	1.51±0.53
	28	1.55±0.01	1.59±0.09
Protein (%) Protein (%)	1	19.71±2.14	20.79±0.62
	14	19.55±1.25	20.15±1.53
	28	21.21±0.02	20.34±0.03
Tuz (%) Salt (%)	1	1.59±0.01	1.61±0.01
	14	1.55±0.07	1.52±0.07
	28	1.38±0.09	1.34±0.06

YÇ: Yoğurt kullanılarak üretilen Çökelek peyniri (kontrol), KÇ: Kefir kullanılarak üretilen Çökelek peyniri
YC: Çökelek cheese produced from yogurt (control), KC: Çökelek cheese produced from kefir.

Çökelek peynirlerinin kül değerlerinin %1.41-1.59 aralığında değiştiği belirlenmiştir (Çizelge 1). Elde edilen sonuçların Şanlıdere Aloğlu vd. (2012) tarafından Karadeniz bölgesine has bir çökelek peyniri olan Minci peynirlerinde tespit edilen ortalama kül değerleri (%1.68) ile benzerlik gösterdiği, ancak; Karabulut vd. (2007) ve Kavaz vd. (2012) tarafından bulunan değerlerden (sırasıyla %4.1 ve %4.78) düşük olduğu belirlenmiştir. Örneklerin kül değerlerindeki farklılıkların kullanılan hammaddenin bileşim

özellikleri ve çökelek peynirlerinin tuz içeriklerine bağlı olduğu düşünülmüştür.

Protein düzeyleri bakımından yoğurt ve kefirde üretilen çökeleklerdeki değişimin %19.55-21.22 arasında olduğu Çizelge 1'den görülmektedir. Bu değerlerin Minci peynir örneklerinde belirlenen ortalama değerlerden (%9.56) daha yüksek olduğu (Şanlıdere Aloğlu vd., 2012), ve Karabulut vd. (2007) tarafından yapılan başka bir çalışmada elde edilen değerler ile (%20) benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Çökelek peyniri örneklerinin

protein içerikleri bakımından istatistiki olarak önemli bir farkın olmaması ($P > 0.05$) üretimde aynı hammaddenin kullanımından ileri gelmektedir. Çökelek peyniri konusunda yapılan çalışmalar ile mevcut çalışma örneklerinin bileşim özellikleri yönünden farklı sonuçların elde edilmesinin kullanılan hammadde ve üretim yöntemine bağlı olduğu söylenebilir.

Çökelek peyniri örneklerinin asitlik düzeyini gösteren pH ve titrasyon asitliği değerleri Çizelge 1'de verilmiştir. Örneklerin pH değerlerinin 4.27 - 4.42 ve titrasyon asitliği değerlerinin ise laktik asit cinsinden %1.59 - 1.72 aralığında değiştiği belirlenmiştir. Kefirden elde edilen çökelek peynirinde asitlik düzeyinin, yoğurttan üretilen çökelek peynirinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ancak, çökelek peynirlerinin asitlik değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel açıdan önemli olmadığı ($P > 0.05$) tespit edilmiştir. Depolama sürecinde örneklerin asitlik düzeylerinde artış olduğu belirlenmiş, ancak; pH ve titrasyon asitliği düzeylerinde görülen bu değişimin istatistiksel açıdan önemli olmadığı bulunmuştur ($P > 0.05$). Depolama sürecinde örneklerin asitlik düzeyindeki artış laktozdan laktik asitin oluşumu ile açıklanmaktadır (Temiz vd., 2009; İrkin, 2011). Peynirlerde asitlik düzeyi

hammadde bileşimi, kullanılan starter kültür, üretim yöntemi, depolama koşulları gibi pek çok faktöre bağlı olarak değişebilmektedir (Fox vd., 1993). Çardak (2012) çalışmasında çökelek peynirlerinde pH ve titrasyon asitliği değerlerini sırasıyla, 2.96-5.35 ve %0.25-0.79 (% Laktik asit) aralığında değişim gösterdiğini ve Karabulut vd. (2007) ise örneklerde pH değerini 3.95 ve titrasyon asitliğini laktik asit cinsinden %0.97 olarak tespit etmişlerdir. Şanlıdere Aloğlu vd. (2012), Minci peynirlerinde pH değerinin 4.25-7.25 aralığında olduğunu ve titrasyon asitliğinin ise laktik asit cinsinden %0.30-1.24 olduğunu tespit etmişlerdir.

Renk özellikleri

Çökelek peyniri örneklerinin depolamanın 1., 14. ve 28. günlerinde ölçülen L^* , a^* ve b^* değerleri Çizelge 2'de verilmiştir. Gıdalarda renk, tüketici beğenisini, ürünün kabul edilebilirliğini ve tüketicinin tat algısını etkileyen önemli kalite kriterlerinden bir tanesidir (Wadhvani ve McMahan, 2012). Peynirin renk özelliği üzerinde, başta hammadde çiğ sütün rengi olmak üzere, üretim yöntemi, peynirin olgunlaşma durumu, ambalajlama tekniği gibi birçok faktörün etkili olduğu bilinmektedir (Juric vd, 2003).

Çizelge 2. Çökelek peynirlerinin renk değerleri.

Table 2. Color values of çökelek cheeses

Özellikler Properties	Depolama (Gün) Storage (Day)	YÇ	KÇ
L^*	1	70.69±0.02	70.47±0.02
	14	69.87±0.18	70.02±0.35
	28	70.36±0.36	69.70±0.54
a^*	1	-0.52±0.13	-0.55±0.00
	14	-0.66±0.28	-0.52±0.11
	28	-0.62±0.04	-0.47±0.09
b^*	1	6.88±0.01	7.08±0.16
	14	7.26±0.25	7.12±0.14
	28	6.98±0.16	6.91±0.23

YÇ: Yoğurt kullanılarak üretilen Çökelek peyniri (kontrol), KÇ: Kefir kullanılarak üretilen Çökelek

YC: Çökelek cheese produced from yogurt (control), KC: Çökelek cheese produced from kefir

Çökelek peyniri taze olarak tüketildiğinde beyazlık özelliği ile bilinen bir peynir çeşididir (Kalender ve Güzeler, 2013). Bu durum geleneksel olarak üretiminde hammadde yoğurdun yayıklama işlemiyle yağının ayrılmasıyla elde edilen yayık ayranının kullanımına bağlıdır. Çökelek peyniri örnekleri renk özellikleri açısından karşılaştırıldıklarında elde edilen değerlerin benzer olduğu saptanmıştır ($P > 0.05$). Ayrıca, depolamanın çökelek peynirlerinin renk özelliklerini istatistiksel açıdan önemli düzeyde etkilemediği ($P > 0.05$) belirlenmiştir. L^* değeri parlaklığı simgeleyen bir renk parametresi olarak; 0 = karanlık, 100 = parlaklık olmak üzere bir değişim aralığına sahiptir. a^* değerinin (-) olması yeşil rengin, (+) olması ise kırmızı rengin göstergesi iken, b^* değerinin (-) olması mavi rengin, (+) olması ise sarı rengin göstergesi olarak kabul edilmektedir (Pathare vd., 2013). Yoğurt ve kefirden üretilen çökelek peynirlerinin L^* değerlerinin 69.70-70.69 arasında değiştiği Çizelge 2'den görülmektedir. Şanlıdere Aloğlu vd. (2012) çalışmalarında farklı üreticilerden toplanan 21 adet Minci peynirinde L^* , a^* ve b^* değerlerini sırasıyla, 83.99-97.40, -1.84-0.73 ve 8.02-18.81 olarak belirlemişlerdir. Minci peyniri örneklerinin, hammadde ve üretim yöntemi yönünden olası farklılıklar taşınması nedeniyle renk değerleri bakımından geniş bir değişim gösterdiği belirtilmiştir. Mevcut çalışma örneklerinde ise L^* , a^* ve b^* değerlerinin değişim aralığı daha dardır. Yoğurt ve kefir çökelek peynirlerinin a^* değeri bakımından yeşil ve b^* değeri bakımından ise sarı renk bölgesinde yer aldığı söylenebilir. Benzer sonuçları, Şanlıdere Aloğlu vd. (2012) çökelek örneklerinde tespit etmiş olmasına rağmen Celem vd., (2018), çökelek örneklerinde a^* değerleri bakımından farklı sonuçlar elde etmiştir.

Aynı hammadde kullanılarak üretilen yoğurt ve kefirden üretilen çökelek peynirlerinde kullanılan starter kültürler ve inkübasyon koşulları dışında aynı prosedürün takip edilmiş olması genel bileşim özellikleri ve renk değerleri bakımından benzer sonuçların elde edilmesinin nedenidir. Bu durumu ortaya koymak üzere örneklerin renk değerleri bakımından farkını ortaya koyan bir renk indisi olan ΔE değeri depolama günlerinde hesaplanmıştır. Hesaplama yapılırken, çökelek

peyniri üretiminde kefir kullanımının etkisini gözlemlemek amacıyla yoğurttan üretilen çökelek peyniri kontrol örneği olarak kabul edilmiştir. ΔE değerinin yüksekliği örneklerin kontrol örneğinden farklılığının derecesini göstermektedir (Chudy vd., 2019). $\Delta E < 1.5$ iken renk açısından küçük farklılığın olduğu ifade edilmektedir (Pathare vd., 2013). Kefir çökeleği örneği için depolamanın 1., 14. ve 28. günlerinde hesaplanan ΔE değerleri sırasıyla, 0.24, 0.25 ve 0.40'dır. Bu değerler $\Delta E < 1.5$ olduğu için kefirden üretilen çökelek peynirinin renk özelliği açısından yoğurttan üretilen çökelek peyniri ile kıyaslandığında çok küçük bir farklılığın olduğu söylenebilir.

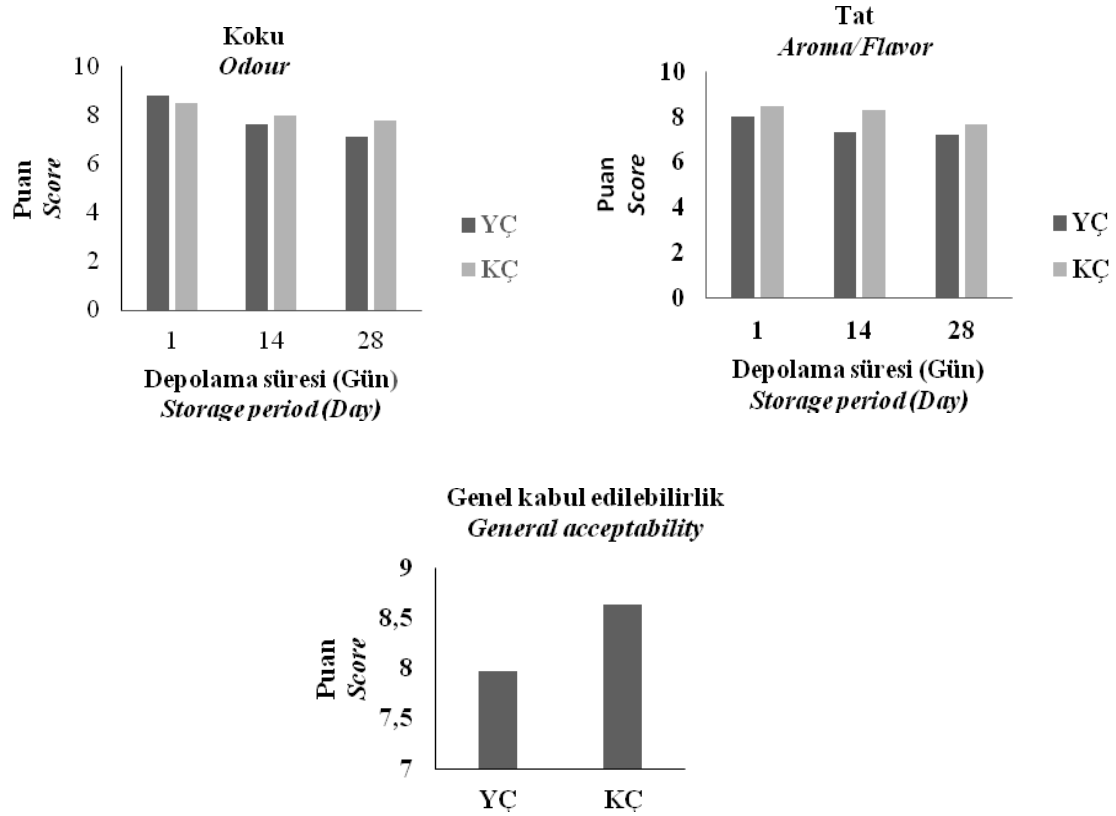
Duyusal değerlendirme

Çökelek peynirlerinin koku, görünüş, tat, yapı ve genel kabuledilebilirlik gibi duyu özellikleri panelistler tarafından 10 tam puan üzerinden değerlendirilmiştir. Depolama günlerinde elde edilen sonuçların ortalama değerleri Şekil 2'de verilmiştir. Değerlendirmenin ilk aşamasında panelistler tarafından örneklerin tat ve koku özellikleri bakımından farklı olduğu ifade edilmiştir. Ancak görünüş ve yapı özellikleri yönünden ise örnekler arasında fark olmadığı belirtilmiştir. Bu durum aynı hammadde çiğ süt kullanılarak üretilen yoğurt ve kefirin benzer bileşime sahip olmaları ve aynı prosedür ile üretilen çökelek peynirlerinin benzer nem içerikleri ile ilişkilendirilmiştir.

Duyusal değerlendirmenin 2. aşamasında tat ve koku yönünden farklılığın derecesi puanlama testi ile değerlendirilmiştir. Koku yönünden değerlendirildiğinde depolamanın 1. günde örnekler arasında fark çok büyük olmamakla beraber yoğurttan elde edilen çökeleğin daha yüksek puan aldığı, 14. ve 28. günlerde ise kefirden üretilen çökeleğin daha yüksek puan aldığı belirlenmiştir (Şekil 2). Tat yönünden ise yine örnekler arasında önemli bir fark olmamakla birlikte tüm depolama günlerinde kefirden üretilen çökeleğin daha yüksek puan aldığı görülmektedir. Bu duruma kefir ürününe has tat/aromadan sorumlu olan maya popülasyonunun etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Kefir ürününün tat/arasından mayaların

ürettiği alkol ve karbondioksitin sorumlu olduğu ve kefir kültürünün peynirde tat/aroma yönünden katkı sağladığı bildirilmiştir (Nielsen vd., 2014; Bengoa vd., 2018). Genel kabul edilebilirlik özelliği yönünden depolama günleri ortalaması

dikkate alındığında, kefirde üretilen çökelek peynirinin daha fazla beğenildiği belirlenmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. Çökelek peynirlerinin duyu değerlendirmeye sonuçları
Figure 2. Sensory evaluation results of Çökelek cheeses

Mikrobiyolojik sayım sonuçları

Yoğurt ve kefir kullanılarak üretilen çökelek peynirlerinin TAMB sonuçları Çizelge 3'de verilmiştir. Çökelek peyniri örneklerinin depolamanın 1., 14. ve 28. günlerinde belirlenen TAMB düzeyleri arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Bununla birlikte, örneklerin TAMB sayıları üzerinde depolama günlerinin etkisi değerlendirildiğinde meydana gelen değişimin istatistiksel açıdan önemli olmadığı belirlenmiştir ($P > 0.05$). TAMB

sayısı, ürünlerde hijyenik yetersizliğin bir göstergesi olarak kabul edilir. Çökelek peyniri gibi ısı işlem etkisiyle pıhtı elde edilen peynir türlerinde TAMB sayısındaki muhtemel yükseklik, çiğ sütün mikrobiyel kalitesi, ısıya dayanıklı mikroorganizmaların varlığı ve ısı işlem sonrası uygulamalara (torbadan süzme, baskı uygulaması, paketlenme vb.) bağlı olabilmektedir (Temiz vd., 2009). Yoğurttan ve kefirde üretilen çökelek peynirlerinde TAMB düzeylerinin depolama süresince sırasıyla, 3.31-3.58 log kob/g ve 2.71-

2.96 log kob/g aralığında değiştiği belirlenmiştir. Dimitrellou vd., (2015), tarafından Feta tipi peynirlerde kefir kültürü kullanımının bozulma etmeni olan ve patojen mikroorganizma faaliyetini baskılayıcı etki yarattığı bildirilmiştir. Bengoa vd., (2018) çalışmalarında kefir mikroflorasında bulunan laktik asit bakterilerinin ürettikleri laktik asit, asetik asit ve antimikrobiyel bileşenlerin ürünlerde koruyucu etki yarattığını belirlemişlerdir. Nielsen vd., (2014) tarafından, peynir üretiminde kefir kültürü kullanımının tat/aroma yönünden ümit vadeci olduğu ve mikrofloranın antimikrobiyel etkisi nedeniyle peynirin raf ömrünü uzatıcı etki yarattığı bildirilmiştir. Benzer şekilde, çalışmada kefirde

üretilen çökelek peyniri örneklerinde daha düşük TAMB değerleri elde edilmiştir (Çizelge 3). Depolamanın 1. gününde TAMB değerlerinin 14. gün değerlerine göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Fox vd. (1993) tarafından TAMB sayısının depolamanın 7. gününe kadar artış gösterip, 7. günde maksimuma ulaştığı ve ilerleyen günlerde azaldığı belirtilmiştir. Bu durum her iki deneme örneğinde de depolamanın 14. gününe kadar gözlenmiştir. Ancak depolamanın 28. gününde her 2 örnekte de TAMB değerlerinde artış gözlenmiş, değerler 1. gün değerlerine ulaşmıştır (Çizelge 3).

Çizelge 3. Çökelek peynirlerinin mikrobiyolojik sayım sonuçları (log kob/g)

Table 3. Microbiological counts of çökelek cheeses (log cfu/g)

	Depolama (Gün) Storage (Day)	YÇ	KÇ
Toplam aerobik mezofilik bakteri <i>Total aerobic mesophilic bacteria</i>	1	3.58±0.06 ^a	2.96±0.06 ^b
	14	3.31±0.22 ^a	2.71±0.01 ^b
	28	3.51±0.08 ^a	2.95±0.07 ^b

YÇ: Yoğurt kullanılarak üretilen Çökelek peyniri (kontrol), KÇ: Kefir kullanılarak üretilen Çökelek peyniri Aynı satırda farklı harflerle gösterilen örnek ortalamaları arasındaki farklılık önemli bulunmuştur ($P < 0.05$)

YC: Çökelek cheese produced from yogurt (control), KC: Çökelek cheese produced from kefir

Difference between sample averages indicated by different letters in the same line was found significant ($P < 0.05$)

Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre; tüketicinin son dönemde sağlığı iyileştirmeye katkı sağlayan gıdalara eğilimi nedeniyle, kefirde üretilen çökelek peynirinin endüstriyel üretim potansiyeline sahip bir peynir çeşidi olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Altug-Onogur, T., & Elmaci, Y. (2015). Farklılık Testleri. İçinde: Gıdalarda Duyusal Değerlendirme, Sidas Medya Ltd. Şti, İzmir, Türkiye, s. 39-61.

Bengoa, A.A., Iraporda, C., Garrote, G.L., Abraham, A.G. (2018). Kefir micro-organism: Their role of grain assembly and health properties of fermented milk. *J Appl Microbiol*, 126, 686-700, doi: 10.1111/jam.14107.

Celem, E., Çelik, Ö.F., Tarakçı, Z. (2018). The effects of ripening on some physicochemical and microbiological characteristics of Çökelek cheeses: A market survey of fresh and skin-ripened Çökelek. *J Cent Euro Agric*, 19(2), 335-348, doi:10.5513/JCEA01/19.2.2155.

Chudy, S., Makowska, A., Tek, M.P., Bartkowiak, M.K.N. (2019). Application of microwave vacuum drying for snack production: Characteristics of pure cheese puffs. *Int J Dairy Technol*, 72, 82-88, doi: 10.1111/1471-0307.12562.

Çardak, A.D. (2012). Mikrobial and chemical quality of Çökelek cheese, Lor cheese and Torba (strained) yoghurt. *Afr J Micro Res*, 6(45), 7278-7284, doi: 10.5897/AJMR12.1676.

- Dertli, E., Çon, A.H. (2017). Microbial diversity of traditional kefir grains and their role on kefir aroma. *LWT – Food Sci Technol*, 85: 151-157, doi: 10.1016/j.lwt.2017.07.017.
- Dimitrellou, D., Kandyliş, P., Kourkoutas, Y., Koutinas, A.A., Kanellaki, M. (2015). Cheese production using kefir culture entrapped in milk proteins. *Appl Biochem Biotechnol*, 176, 213-230, doi: 10.1007/s12010-015-1568-4.
- Ergene, G., Arslan, S. (2019). Chemical and sensory characteristics dried Çökelek cheeses at different temperatures. *J Food Process Preserv*, 43(6), 1-8, doi: 10.1111/jfpp.13985.
- Esmek, E.M., Güzeler, N. (2015). Kefir ve Kefir Kullanılarak Yapılan Bazı Ürünler. *Harran tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 19, 250-258.
- Fox, P.F. (1993). Cheese: An Overview. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Fox, P.F. (chief ed.), Chapman and Hall, London UK, pp. 1-36.
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Wallace, J. (1993). Biochemistry of cheese ripening. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Fox, P.F. (chief ed.), Chapman and Hall, London UK, pp. 389-438.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H. (2017). Fundamentals of cheese science (2nd ed.). New York, NY, USA: Springer. Chapt. 11.
- Güzel Seydim, Z., Kök Taş, T., Greene, K., Seydim, A.C. (2011). Review: Functional properties of Kefir. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 51, 261-268, doi: 10.1080/10408390903579029.
- Halkman, A. K. (2005). Mikroorganizma analizi. *Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları*, Halkman, A.K. (Ed.), Başak Matbaacılık ve Tanıtım Hizmetleri Ltd. Şti., Ankara, Türkiye, s. 135-136.
- Hooi, R., Barbano D.M., Bradley R.L., Budde D., Bulthaus M., Chettiar M. (2004). *Chemical and physical methods*. In: *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, Wehr, H.M., Frank, J.F. Washington (chief ed.), DC: American Public Health Association, pp. 363-532.
- IDF (1993). “Milk determination of nitrogen content”, Standard No: 20B, International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- Irkin, R. (2011). Shelf life of unsalted and light “Lor” whey cheese stored under various packaging conditions: Microbiological and sensory attributes. *J Food Process Preserv*, 35, 163-178, doi: 10.1111/j.1745-4549.2009.00469.x.
- Juric, M., Bertelsen, G., Mortensen, G., & Petersen, M.A. (2003). Light-induced colour and aroma changes in sliced, modified atmosphere packaged semi-hard cheeses. *Int Dairy J*, 13, 239-249, doi: 10.1016/S0958-6946(02)00156-5.
- Kakisu, E., Irigoyen, A., Torre, P., De Antoni, G.I., G. Abraham, A. (2011). Physicochemical, microbiological and sensory profiles of fermented milk containing probiotic strains isolated from kefir. *J Dairy Res*, 78: 456-463, doi: 10.1017/S0022029911000653.
- Kalender, M., Güzeler, N. (2013). Anamur Yöresi Keş Çeşitleri ve Bazı Kimyasal Özellikleri. *Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 28 (2), 1-10.
- Karabulut, I., Hayaloğlu, A.A., Yıldırım, H. (2007). Thin-layer drying characteristics of kurut, a Turkish dried dairy by-product. *Int J Food Sci Technol*, 42, 1080-1086, do: 10.1111/j.1365-2621.2006.01351.x.
- Kavaz, A., Arslaner, A., Bakırcı, İ. (2012). Comparison of quality characteristics of Çökelek and Lor cheeses. *Afr J Biotechnol*, 11(26):6871-6877, doi: 10.5897/AJB11.4230.
- Nielsen, B., Candan Gürkan, G., Ünlü, G. (2014). Kefir: A Multifaceted fermented dairy product. *Probiotics Antimicro Prot*, 6, 123-135, doi: 10.1007/s12602-014-9168-0.
- Pathare, P.B., Opara, U.L., & Al-Julanda Al-Said, F. (2013). Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: A review. *Food Bioprocess Technology*, 6, 36–60, doi: 10.1007/s11947-012-0867-9.
- Ribeiro Melo, D.R., Silva, P.H.T. da, Rigoto, R.P., Sottoriva, H.M., Cintra, F.F., Trento, J.P., Castro, A.L. de, Alves, G. (2018). Quark cheese produced with kefir and agave inulin. *Arquivos de Ciências*

Veterinária e Zoologia UNIPAR, Umuarama, 21(3), 87-92, doi: 10.25110/arqvet.v21i3.2018.7337.

Simova, E., Bershkova, D., Angelov, A., Hrisyova, T., Frengova, G., Spasov, Z. (2002). Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 28, 1-6, doi: 10.1038/sj/jim/7000186.

Şanlıdere Aloğlu, H., Turhan, İ, Öner, Z. (2012). Minci (Minzi) peynirinin özelliklerinin belirlenmesi. *Gıda* 37(6): 349-354.

Temiz, H., Aykut, U., & Hursit, A. (2009). Shelf life of Turkish whey cheese (Lor) under modified atmosphere packaging. *Int J Dairy Technol*, 62, 378e386, doi: 10.1111/j.1471-0307.2009.00511.x.

Ürkek, B., Erkaya, T., Şengül, M. (2011). Kefir: Bileşimi, üretimi, probiyotik ve terapötik özellikleri. *Akademik Gıda*, 9(5), 60-66.

Wadhvani, R., McMahon, D.J. (2012). Color of low-fat cheese influences flavor perception and consumer liking. *J Dairy Sci*, 95: 2336-2346, doi: 10.3168/jds.2011-5142.

Weschenfelder, S., Pinto Paim, M., Gerhardt, C., Chaves Carvalho, H.H., Maria, Wiest, M. (2018). Antibacterial activity of different formulations of cheese and whey produced with kefir grains. *Rev Ciênc Agron*, 49(3), 443-449, doi: 10.5935/1806-6690.20180050.

Yıldız-Akgül, F., Yetişemiyen, A., Şenel, E., Yıldırım, Z. (2018). Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir produced by secondary fermentation. *Mljekarstvo*, 68(3), 201-213, doi: 10.15567/mljekarstvo.2018.0305.



CHARACTERIZATION OF THE FOAM-MAT DRIED EGG WHITE POWDER

Gülşah Çalışkan Koç*, Burcu Çabuk

Alanya Hamdullah Emin Paşa University, Arts and Design Faculty, Department of Gastronomy and Culinary Arts, Alanya, Antalya, Turkey

Received / Geliş: 17.08.2019; Accepted / Kabul: 09.12.2019; Published online / Online baskı: 01.02.2020

Çalışkan Koç, G., Çabuk, B. (2020). Characterization of the foam-mat dried egg white powder. *GIDA (2020) 45 (1): 150-160* doi: 10.15237/gida.GD19120

Çalışkan Koç, G., Çabuk, B. (2020). Köpük kurutma yöntemi ile kurutulmuş yumurta beyazı tozlarının karakterizasyonu. *GIDA (2020) 45 (1): 150-160* doi: 10.15237/gida.GD19120

ABSTRACT

The scope of this study is to determine the effect of different drying air temperatures on the drying behavior, effective moisture diffusivity, physical, powder, and functional properties of foam mat dried egg white powder. For this purpose, the egg white foam was obtained by using kitchen blender (1000W, 30s) and dried at convective hot air oven at three different drying air temperatures (60, 70, and 80°C, %20 ventilation rate). Drying took place in a falling rate period for all drying temperatures. The effective moisture diffusivity values increased depending on the drying air temperature and the activation energy was calculated as 13.81kJ/mol. The moisture content has a proportional relationship with ash content, b*, Chroma, yellowness and browning indexes, flowability, cohesiveness, emulsification stability, water holding capacity, and foam holding capacity values, whereas it has an inverse proportional relationship with L*, a*, hygroscopicity, emulsification activity, oil holding capacity, and foam holding stability values.

Keywords: Egg white, foam mat drying, powder properties, functional properties, foaming.

KÖPÜK KURUTMA YÖNTEMİ İLE KURUTULMUŞ YUMURTA BEYAZI TOZLARININ KARAKTERİZASYONU

ÖZ

Bu çalışmanın amacı, farklı hava sıcaklıklarının köpük kurutma yöntemi ile kurutulmuş yumurta beyazı köpüğünün kuruma davranışı, etkin nem difüzyon katsayısı, fiziksel, toz ürün ve fonksiyonel özellikleri üzerine etkisinin belirlenmesidir. Bu amaç doğrultusunda, yumurta beyazı köpüğü blender kullanılarak (1000W, 30s) elde edilmiş ve konvektif fırında üç farklı sıcaklıkta (60, 70, ve 80°C, %20 fan hızı) kurutulmuştur. Tüm hava sıcaklıklarında, kuruma düşen hız periyodunda gerçekleşmiştir. Etkin nem difüzyon katsayısı hava sıcaklığına bağlı olarak artmış ve aktivasyon enerjisi 13.81kJ/mol olarak hesaplanmıştır. Nem içeriği; kül içeriği, b*, kroma, sarılık ve esmerleşme indeksleri, akabilirlik, yapışkanlık, emülsiyon stabilitesi, su tutma kapasitesi ve köpük tutma kapasitesi değerleri ile doğru, L*, a*, higroskopisite, emülsiyon aktivitesi, yağ tutma kapasitesi ve köpük tutma stabilitesi ile ters oranlı bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Yumurta beyazı, köpük kurutma, toz özellikler, fonksiyonel özellikler, köpüklenme

* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar;

✉ gulsah_caliskan86@hotmail.com,

☎ (+90) 242 513 69 69/ 1404,

☎ (+90) 242 513 69 66

Gülşah Çalışkan Koç; ORCID no: 0000-0002-6542-3093

Burcu Çabuk; ORCID no: 0000-0001-8836-6047

INTRODUCTION

Whole egg and egg-derived proteins are generally used in dressings, baking, and confectionery products due to their functional properties such as foaming, emulsifying, gelling agents, etc. (Ayadi et al., 2008). An egg can be divided into two parts including the egg white (approximately 67% of an egg's liquid weight) and egg yolk. Egg white (egg albumen) consists of about 87.8% water, 9.7 to 10.6% protein, and 0.5 to 0.6 % carbohydrate. In addition, egg white contains 56% of its total proteins along with the majority of the vitamin A and minerals (chlorine, magnesium, potassium, sodium, and sulfur) in the egg (AEB, 1999). Egg white is qualified as a multi-purpose food ingredient and commercialized under various forms such as liquid solutions, pasteurized form, etc. But the more frequently encountered form is powder form obtained by several drying techniques such as spray, freeze, foam mat drying, etc. due to its short self-life (Talansier et al., 2009). Egg white powder was used as foaming agent and foaming stabilizer at several studies such as foam mat convective drying of Cantaloupe (Salahi et al., 2015), foam mat freeze-drying of apple juice (Raharitsifa and Ratti, 2010), etc. In addition, the egg white powder can be used as a drying agent in the food industry (Solval, 2011).

Foam mat drying is an alternative technique to drum, spray, and freeze-drying techniques to obtain food powders due to its suitability for all types of liquids and rapid drying at a lower drying temperature, high retention of nutrition, easy reconstitution, and being cost-effective (Sangamithra et al., 2014; Kudra and Ratti, 2006). In this technique, liquids or semi-liquid/solid foods are transformed into stable foams followed by drying under thin layer conditions (Abbasi and Azizpour, 2016; Sangamithra et al., 2014; Rajkumar et al., 2007). In order to reduce the surface tension between liquid-liquid or liquid-solid interphase and increase the stability of foams, various foaming agents (proteins) and stabilizers (polysaccharides) are generally used (Sangamithra et al., 2014). Foam mat drying rate is very high compared to other convective drying techniques due to the higher surface area (Sharada, 2013). A high-quality food powder can

be obtained by the proper selection of the foaming method, agent, stabilizers, and time and also selected drying method and temperature (Sangamithra et al., 2014). There are several studies on the drying of egg white by using different drying techniques such as spray drying (Ayadi et al., 2008; Ma et al., 2013), foam mat freeze-drying (Mathukumaran et al., 2008a and b) and microwave-assisted foam mat drying (Çalışkan Koç and Çabuk, 2019). However, from the authors' knowledge, there is a paucity of literature investigating the effect of drying air temperatures on the quality characteristics of foam mat dried egg white powder. Kudra and Mujumdar (2002) and Araya-Farias and Ratti (2009) reported that the conventional drying methods are still widely preferred industrially as compared to novel technologies due to the simplicity of dryer construction, ease of operation, and status of familiarity. For this reason, the aim of this study is to determine the effect of different drying air temperatures on the drying behavior, effective moisture diffusivity, physical, powder, and functional properties of hot air assisted foam-mat dried egg white powder.

MATERIAL AND METHODS

Material

The commercial pasteurized liquid egg whites were obtained from Anako Egg and Products Food Industry Import, Export and Trade Co. Ankara, Turkey. Egg whites were kept under refrigeration ($5\pm 2^{\circ}\text{C}$) until the next step of the experiment.

Experimental Procedure

Foam Preparation

The egg foam was obtained by the method described by Mathukumaran et al. (2008a and 2008b). In order to obtain egg foam, fifty milliliters of egg white ($+24\pm 2^{\circ}\text{C}$) was added to the glass beaker (500ml) and a kitchen blender (1000W power, 30s, SHB 3107, Sinbo, Turkey) was used for making foam.

Convective Hot Air Drying

The egg white foam samples were dried in a convective hot air oven (Memmert, UF 110, Germany) at 60, 70, and 80°C temperature and at

20% ventilation rate. The total amount of egg white foam was 40.00 ± 0.20 g for each drying experiment. Samples were placed as a slab 35x50 cm (width x length, 2mm thickness, drying took place from one side) and located at the center of the convective hot air oven. The weight loss was measured every 10 min until the constant weight was reached. Then, the obtained pellets were ground in order to obtain egg white powder.

Drying Behavior and Drying Rate

The moisture ratio (MR) of egg white foam during convective hot air drying was calculated using the Eq. (1);

$$MR = \frac{M_t - M_e}{M_0 - M_e} \quad (1)$$

Where M_t , M_0 , and M_e are the moisture content at any time, initial, and equilibrium (kg water (H₂O)/kg dry matter (DM)), respectively.

Drying rate was defined as:

$$\text{Drying Rate (DR)} = \frac{\Delta X}{\Delta t * S} \quad (2)$$

where X is the moisture content (kg H₂O/kg DM), t is the time (min), S is the total surface area of all egg white foam in one container (m²) and DR is the drying rate (kg H₂O/kg DM.min.m²) (Tekin and Başlar, 2018).

Calculation of Effective Moisture Diffusivity and Activation Energy

In order to calculate D_{eff} values, it is assumed that the moisture diffusion coefficient is the same in all directions (isotropic material) and shrinkage of the sample is negligible. The effective moisture diffusivity (D_{eff}) values of egg white foams were calculated by Fick's diffusion model as given in (Eq. 3).

$$MR = \frac{M_t - M_e}{M_0 - M_e} = \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{(2n-1)^2} \exp \left[-(2n-1)^2 \pi^2 \frac{D_{eff}}{4L^2} t \right] \quad (3)$$

Where t is the time (s), D_{eff} is the effective moisture diffusivity (m²/s), and L (m) is the thickness of samples. A limiting case of Eq. (2) was assumed and expressed in the logarithmic form as in Eq. (4);

$$\ln MR = \ln \left(\frac{8}{\pi^2} \right) - \left(\frac{\pi^2 D_{eff}}{4L^2} \right) t \quad (4)$$

D_{eff} is typically calculated by plotting experimental MR in logarithmic form versus drying time. From the Eq. (4), a plot of $\ln MR$ versus drying time gives a straight line with a slope of (Eq. 5):

$$\text{Slope} = - \frac{\pi^2 D_{eff}}{4L^2} \quad (5)$$

The relation between the effective moisture diffusivity and drying temperature was assumed to be an Arrhenius function (Eq. 6).

$$D_{eff} = D_0 \exp \left(- \frac{E_a}{RT} \right) \quad (6)$$

where D_0 is the pre-exponential factor of the Arrhenius equation in m²/s, E_a is the activation energy in kJ/mol, R is the universal gas constant (R = 8.31451 J/mol.K), and T is the hot air temperature expressed in K.

Determination of Physicochemical Properties

The moisture and ash contents of the egg white powders were determined according to AOAC (2000) and AOAC (2005). The water activity and color values of the egg white powders were measured using a Testo-AG 400, Germany water activity measurement device and Konica Minolta CR-400, Japan colorimeter, respectively. Chroma, total color change (ΔE), browning (BI), and yellowness (YI) index values were calculated according to Pathare et al. (2013).

Determination of Powder Properties

Bulk and tapped densities, flowability (Carr Index (CI)) and cohesiveness (Hausner Ratio (HR)) values, wettability time, and hygroscopicity (%) analysis were performed according to the procedure described by Jinapong et al. (2008), Gong et al. (2008), and Cai and Corke (2000), respectively.

Determination of Functional Properties

Emulsification (Emulsification Activity (EA) and Stability (ES)) and foaming properties (Foam Holding Capacity (FC) and Stability (FS)), as well as water and oil holding capacities of foam mat dried egg white powders were determined

according to Yasumatsu et al. (1972), Stone et al. (2015), and Liu et al. (2010), respectively.

Statistical Analysis

All experiments were performed in duplicate and measurements were performed in triplicate. Statistically significant differences between the samples were determined using ANOVA (analysis of variance, F-test for multiple samples or two samples with $\alpha = 0.05$, SPSS 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A.). Significant differences were indicated by different letters when the p-value was below 0.05.

RESULTS AND DISCUSSION

Drying Kinetics

The changes in moisture ratio values of egg white foam depending on drying time (min) is shown in Figure 1. The egg white foam showed a similar trend for all drying temperatures. The drying time of the egg white foam ranged between 30 min and 50 min and an increase in the drying air temperature resulted in a significant decrease in drying time ($P < 0.05$). When the drying temperature increased, the moisture removal rate

accelerated and thus, drying time reduced. It can also be stated that the drying air temperature is an important variable in the foam mat drying process. Similar findings were also observed by several researchers (Rajkumar et al., 2007; Kadam and Balasubramanian, 2011). Kadam and Balasubramanian (2011) reported that drying time of foam-mat dried of tomato juice powder ranged between 450 min to 510 min and decreased according to drying air temperature (60, 65, and 70°C). According to Figure 1, it can also be stated that the moisture reduction rate of egg white foam was high until 30 min for 60°C drying air temperature and 20 min for 70°C and 80°C drying air temperatures. After these periods, the moisture removal rate stayed almost stable and reached the final moisture content. The freeze-drying time of egg white foam (25g sample, -40°C condenser temperature, +20°C heating plate temperature) was found to be as 20-24h by Mathukumaran et al. (2008b). By using convective hot air drying technique, the drying time of egg white foam could be significantly decreased compared to the freeze-drying technique.

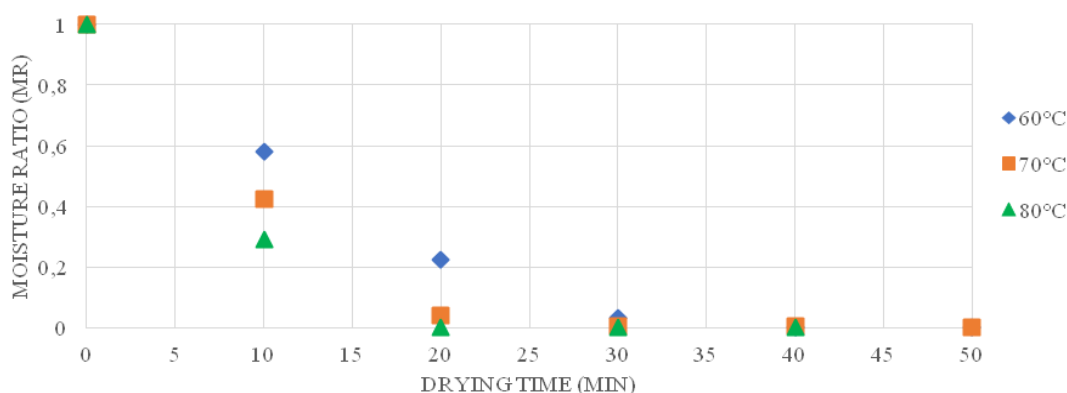


Figure 1. The changes in MR values of the egg white foam depending on drying time

The drying rates of egg white foam were calculated ($\text{kg H}_2\text{O}/\text{kg DM}\cdot\text{min}\cdot\text{m}^2$) and plotted against the free moisture content ($\text{kg H}_2\text{O}/\text{kg DM}$) as shown in Figure 2. It can be seen that drying took place in the falling rate period at all drying temperatures which indicates that the internal moisture diffusion phenomenon controlled the drying process except for the initial temperature-rise period. It may be due to the

rapid removal of moisture from the thin surfaces of foams. Similarly, Rajkumar et al. (2007) reported that drying (batch-type thin layer cabinet dryer, at 60, 65, 70, and 75°C) of foamed mango pulps with egg albumen occurred during the falling rate period with the rapid removal of moisture from the thin surfaces of foams. In addition, Çalışkan Koç and Çabuk (2019) reported that the overall drying process of the egg

white foam (6.00 ± 0.20 g, 10.8 cm diameter, 2mm side thickness) took place in the falling rate periods for all microwave drying experiments (350W, 460W, 600W, and 720W) except for 120W. The drying rate values of egg white foam ranged between 0.1614-0.001, 0.1938-0.002, and 0.2245-0.002 kg H₂O /kg DM.min.m² for 60, 70, and 80°C drying air temperatures, respectively. The higher drying rate values were observed for

the drying experiment which was performed at 80°C. The higher temperature difference between the drying medium and sample increases the heat transfer coefficient which is related to higher heat and mass transfer rate. In addition, the higher drying rate values were observed at the initial phase of the drying for all drying temperatures due to the higher moisture diffusion rate.

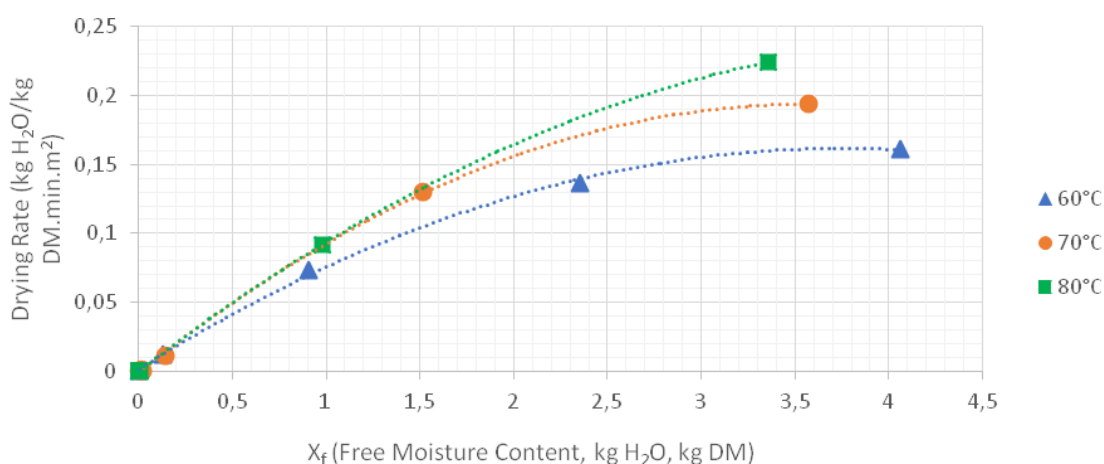


Figure 2. The drying rate (kg H₂O/kg DM*min*m²) of egg white foam

The effective moisture diffusivity, pre-exponential factor, and activation energy values of foam mat dried egg white powders values are given in Table 1. According to the results, it can be stated that an increase in the hot air drying temperature resulted in an increase in the effective moisture diffusivity values, however, this increase was not found to be statistically significant ($P > 0.05$). The reasons for high effective moisture diffusion values of egg white foam may be due to a larger exposed surface area of egg white foam. Mathukumaran et al. (2008b) reported that the freeze-dried egg white foam with 0.125% xanthan gum had three effective moisture diffusivity values (2.677×10^{-8} , 5.962×10^{-8} , and 1.247×10^{-7} m²/s (Average= 7.036×10^{-8} m²/s) where the egg white foam without xanthan gum had only two effective moisture diffusivity values (2.413×10^{-8} and 3.781×10^{-8} m²/s (Average= 3.097×10^{-8} m²/s)). In this study, the D_{eff} values of convective hot air assisted foam mat dried egg white powders were found to be higher than the results of

Mathukumaran et al. (2008b). It may be due to a higher drying rate of convective hot air drying technique compared to the freeze-drying technique. In addition, the egg white foam had one effective moisture diffusivity value for all drying temperatures.

The activation energy (E_a) is related to the required energy to facilitate moisture diffusion. Lower E_a values indicate that the lower energy is necessary for moisture diffusion (Tekin and Başlar, 2018). The pre-exponential factor and activation energy values for hot air assisted foam mat dried egg white foam values were calculated to be as 2.8960×10^{-4} m²/s and 13.81kJ/mol, respectively.

Physicochemical Properties

Physicochemical properties of convective hot air assisted foam mat dried egg white powders are shown in Table 2. The moisture content values of the powders were found to be lower than 10%.

The moisture content values decreased when drying air temperature increased from 60°C to 70°C ($P > 0.05$), however, the opposite effect was observed for the further increase ($P < 0.05$). It may be due to crust formation which did not let to remove the moisture from the egg white foam. The moisture content values of foam mat freeze-dried egg white powder with xanthan gum and without xanthan gum were found to be as 7.74% and 8.47% (wet basis), respectively (Mathukumaran et al., 2008b). The different drying techniques may be the reason for different moisture content values. The ash contents of the samples were ranged between 4.38%-4.43% and

were not significantly changed depending on the drying air temperature ($P > 0.05$). Ayadi et al. (2008) reported that the ash content of spray-dried whole egg powder and egg white powder were 6.13 ± 0.11 and 5.69 ± 0.09 g/100g dry basis, respectively. The results (4.70-4.76 g/100g dry basis) obtained in this study were found to be slightly lower compared to the findings of Ayadi et al. (2008). The water activity values of egg white foam were found to be lower than 0.6 which can be acceptable as microbiologically safe. The water activity values decreased depending on an increase in the drying air temperature ($P < 0.05$).

Table 1. Effective moisture diffusivity, pre-exponential factor, and activation energy values of foam mat dried egg white powders (n=3).

Drying Air Temperature (°C)	Effective Moisture Diffusivity (D_{eff} , m ² /s)	R ²	Pre-Exponential Factor (D_0 , m ² /s)	Activation Energy (E_a , kJ/mol)
60	$1.9879 \times 10^{-6} \pm 5.1637 \times 10^{-7}$ ^a	0.9208 ± 0.0531		
70	$2.2719 \times 10^{-6} \pm 3.4424 \times 10^{-7}$ ^a	0.9373 ± 0.0182	2.8960×10^{-4}	13.81
80	$2.6370 \times 10^{-6} \pm 1.7212 \times 10^{-7}$ ^a	0.9158 ± 0.0214		

^{a-c} Different letters in the same column indicate a significant difference between the samples at $P < 0.05$.

Table 2. Physical properties of foam mat dried egg white powders (n=3).

Drying Air Temperature (°C)	Moisture Content (% Wet Basis)	Ash Content (%)	Water Activity	Chroma	Yellowness Index (YI)	Browning Index (BI)
60	6.44 ± 0.80 ^{ab}	4.40 ± 0.14 ^a	0.458 ± 0.01 ^b	20.30 ± 0.02 ^c	31.24 ± 0.03 ^c	20.57 ± 0.02 ^c
70	6.30 ± 0.21 ^a	4.38 ± 0.64 ^a	0.455 ± 0.02 ^b	17.94 ± 0.05 ^a	27.10 ± 0.08 ^a	17.48 ± 0.06 ^a
80	6.97 ± 0.26 ^b	4.43 ± 0.74 ^a	0.438 ± 0.01 ^a	18.99 ± 0.07 ^b	28.67 ± 0.08 ^b	18.33 ± 0.05 ^b

^{a-c} Different letters in the same column indicate a significant difference between the samples at $P < 0.05$.

The color values of egg white foam are given in Figure 3. The effect of drying air temperature on the color values was found to be significant ($P < 0.05$). The L* and a* values of egg white powders significantly increased when the drying air temperature increased from 60°C to 70°C, however, further increase resulted in a significant decrease ($P < 0.05$). But, the opposite effect was observed for b* values of powders. The a* values of egg white powder was found to be on the negative scale which indicates the green color. The chroma, YI, and BI values were calculated and results are given in Table 2. Similar to b* values, the chroma, YI, and BI values decreased

when drying air temperature was increased from 60°C to 70°C, however, the opposite effect was observed for further increase ($P < 0.05$).

Powder Properties

The powder properties of egg white powder are illustrated in Table 3. The wettability times of egg white powders changed between 453.50s and 706.25s and significantly decreased depending on the increasing drying air temperature ($P < 0.05$). The higher water holding capacity of the samples which were dried at 80°C may also be the reason for fast wetting behavior (Table 4). Çalışkan Koç and Çabuk (2019) reported that the wettability

times of microwave-assisted foam mat dried egg white powder ranged between 1034.00s and 1721.50s. According to this finding, it can be stated that the convective hot air drying technique resulted in faster wettable egg white powder compared to the microwave drying technique. The different drying techniques, moisture content values, and surface properties may be the reason for different wetting behavior. Higher bulk density values are desired because of low packaging and transportation costs. For this reason, the egg white powder dried at 60°C has the advantages of low packaging and transportation costs due to significantly higher bulk density values compared to other drying temperatures ($P < 0.05$). The bulk and tapped density values of egg white powders significantly decreased depending on an increase in the drying air temperature ($P < 0.05$). The bulk and tapped density values of egg white powders were in line with Çalışkan Koç and Çabuk (2019) who reported that the bulk and tapped density values of egg white powder ranged between 282.33 and 331.35 kg/m³ and 416.68 and 514.58 kg/m³, respectively. The egg white powder showed fair

flow characteristic and high cohesiveness which may be due to an intermediate moisture content values of the powders. Similar findings were also obtained by Çalışkan Koç and Çabuk (2019) for microwave-assisted foam mat dried egg white powder. The higher CI and HR values were observed for the powders which were dried at 80°C. It may be due to the stickiness effect of moisture. Iqbal and Fitzpatrick (2008) and Fitzpatrick et al. (2007) reported that high moisture content increases the cohesion between powder particles and resulting in lower flowability. In order to improve the flow properties of egg white powder, different types of food-grade additives such as maltodextrin, gum Arabic, whey powder, etc. which improve the flow properties can be added or agglomeration process can be applied to the obtained powders. According to Tables 2 and 3, it can also be stated that the moisture content and hygroscopicity have an inverse proportional relationship. It may be due to the high-moisture concentration gradient between the egg white powders and the surrounding atmosphere.

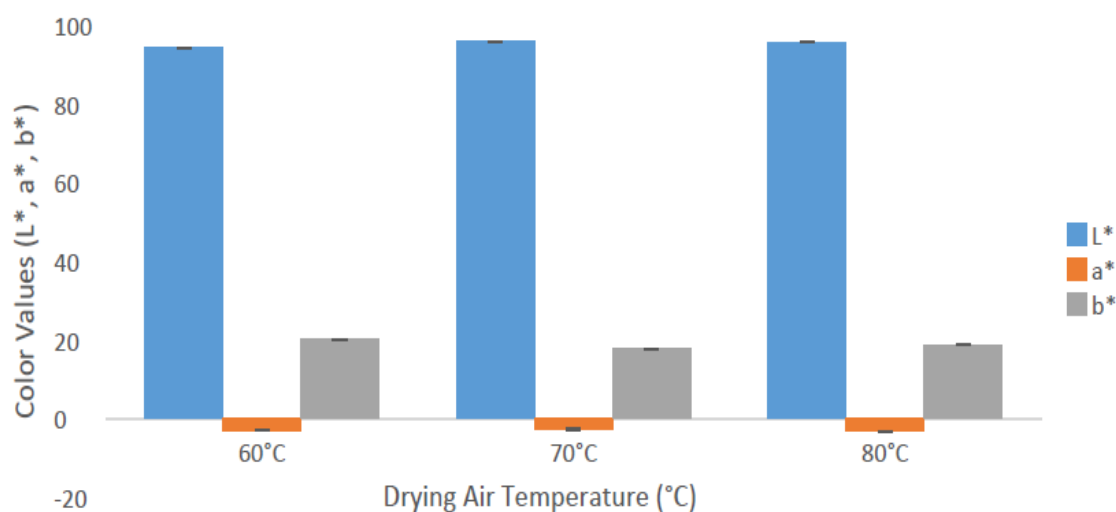


Figure 3. Color values of foam mat dried egg white powders.

Table 3. Powder properties of foam mat dried egg white powder (n=3).

Drying Air Temperature (°C)	Wettability Time (s)	Bulk Density (kg/m ³)	Tapped Density (kg/m ³)	Flowability (Carr Index)	Cohesiveness (Hausner Ratio)	Hygroscopicity (%)
60	706.25±91.31 ^c	323.12±22.92 ^b	471.89±14.43 ^b	31.53±4.24 (Fair) ^a	1.47±0.09 (High) ^a	12.24±0.32 ^a
70	596.33±76.89 ^b	259.76±32.63 ^a	385.60±52.07 ^a	30.56±1.68 (Fair) ^a	1.46±0.04 (High) ^a	13.44±0.52 ^c
80	453.50±75.90 ^a	230.70±10.92 ^a	356.08±36.53 ^a	34.92±3.92 (Fair) ^a	1.54±0.09 (High) ^a	12.90±0.14 ^b

^{a-c} Different letters in the same column indicate a significant difference between the samples at $P < 0.05$.

Functional Properties

The functional properties of egg white foam are given in Table 4. The water holding capacity (WHC) of proteins is important due to its effect on physical (elasticity, swelling, etc.), chemical (emulsification, etc.) and sensory (juiciness, etc.) properties of foods (Wong and Kitts, 2003). Similar to moisture content values, the WHC of egg white powders significantly decreased when the drying air temperature increased from 60°C to 70°C, however, further increase (70°C to 80°C) resulted in a significant increase ($P < 0.05$). It may be due to higher protein denaturation at the higher drying temperatures. Wagner and Anon (1990) reported that the denatured protein entraps a significant amount of water. Ndife et al. (2010) reported that the water holding capacity of oven-dried whole egg powder, egg yolk, and white powders were 1.60g, 0.50g, and 1.80g, respectively. The WHC of commercial spray-dried egg white powder was also found to be 1.68 ± 0.06 g H₂O/ g protein (Wong and Kitts, 2003). The differences between the results may be due to the different drying techniques, analysis methods, material, etc. Opposite to WHC results the OHC values of egg white powders firstly increased when the drying air temperature increased from 60°C to 70°C, however, further increase resulted in a decrease ($P < 0.05$). It was previously reported that WHC and OHC can be changed due to denaturation and partial unfolding of the protein structure (Ayadi et al. 2008). Han et al. (2019), Van Der Plancken et al. (2006), and Folawiyo and Apenten (1997) also found that the content of total dissociated sulphhydryl groups increased, ovalbumin and lysozyme unfolded by

heat treatment contributing to the exposition of hydrophobic groups buried in the core of proteins and increasing surface hydrophobicity thus influencing the binding ability of water and oil molecules.

Significant differences in emulsifying and foaming properties were detected among treated samples ($P < 0.05$). Egg white powder dried at 70°C had the lowest ES, while this sample obtained the highest FS. Egg white powder treated at 70°C had the highest emulsion activity, which means that it had the best ability to produce a cohesive protein layer at the oil-water interface. On the other hand, it was observed that ES followed an opposite trend and the lowest ES was calculated at 70°C showing that at that temperature protein molecules were unable to form a well-ordered network structure to form stable emulsions. This might be related to the rearrangement of protein structure during the heating procedure involved in ES measurement assay. Moreover, dry heating might also induce partial hydrolysis of egg white proteins. It is known that protein hydrolysates can migrate to the oil-water interface more efficiently due to lower molecular size whereas protein hydrolysates could form less stable network structure due to fewer hydrophobic binding sites (Pokora et al., 2013), resulting in a relative worse ES of protein hydrolysates. In the current study, it was clearly observed that functional properties change significantly ($P < 0.05$) by during drying and are influenced by processing conditions. From Table 4, it can be observed stated that when the heating temperature was 70°C foam holding capacity

decreased followed by a further increase to $139.00 \pm 18.42\%$ when temperature increased. The increased temperature might cause a reduction in the viscosity of the continuous phase in stabilizing foam structure (Kinsella, 1981). In contrast to our research, Ibanoglu and Ercelebi (2007) obtained

the foamability 80°C when effects of temperature ($65, 70, 75,$ and 80°C) and protein concentration on egg white foam was investigated. In terms of FS, no significant ($P > 0.05$) differences could be found between the different treatments applied.

Table 4. The functional properties of foam mat dried egg white powders (n=3).

Drying Air Temperature ($^\circ\text{C}$)	Water Holding Capacity (%)	Oil Holding Capacity (%)	Emulsification Activity (%)	Emulsification Stability (%)	Foam Holding Capacity (%)	Foam Holding Stability (%)
60°C	299.5 ± 13.50^a	145.67 ± 10.25^a	256.94 ± 2.55^{ab}	136.00 ± 2.87^a	140.00 ± 0.00^a	88.57 ± 0.00^a
70°C	252.50 ± 13.00^a	202.50 ± 9.19^b	265.31 ± 1.80^a	106.69 ± 3.45^b	124.00 ± 4.00^b	90.42 ± 2.92^a
80°C	300.00 ± 15.00^a	196.00 ± 1.41^b	256.97 ± 1.10^b	137.84 ± 2.67^a	139.00 ± 18.42^a	84.11 ± 7.67^a

^{a-c} Different letters in the same column indicate a significant difference between the samples at $P < 0.05$.

CONCLUSION

In this study, it was observed that hot air assisted foam mat drying is a suitable process to obtain egg white powder which can be used as a food ingredient especially in the bakery industry for its foaming, gelling, and encapsulating properties. The moisture contents of foam-mat dried egg white powders are below 10% which is sufficient to make foods microbiologically safe. The ash content of the samples was not significantly changed depending on the drying air temperature ($P > 0.05$). Results indicated that the bulk and tapped density values and average wettability times of foam-mat egg white powders significantly decreased depending on the increase of drying air temperature ($P < 0.05$). Water holding capacity values were first decreased down when the temperature increased to 70°C and then increased with an increase in the temperature of treatment. However, the opposite effect was observed for oil holding capacity values. Heat treatment showed to have an influence on egg white protein conformation, which impairs their sensitivity to water and oil binding. The emulsification activity was also significantly influenced by the change in drying temperature and followed a similar trend as oil holding capacity ($P < 0.05$). The strongest effects are rather observed at 70°C . The effect of the different drying processes on the chemical

composition and the effect of storage conditions on the physical, chemical, and powder properties of foam-mat dried egg white powder could be studied in further studies.

ACKNOWLEDGMENTS

This study has been supported by the Anako Egg and Products Food Industry Import, Export and Trade Co. Ankara, Turkey.

REFERENCES

- Abbasi, E., Azizpour, M. (2016). Evaluation of physicochemical properties of foam mat dried sour cherry powder. *LWT-Food Sci Technol*, 68: 105-110.
- AEB - American Egg Board. (1999): Eggyclopedia – The incredible edible egg. Park Ridge, IL.
- AOAC. (2000): Official methods of analysis. 17th edn. Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists.
- AOAC. (2005): Official Method 923.03. Ash of flour. Gaithersburg, MD, USA.
- Araya-Farias, M., Ratti, C. (2009). Dehydration of foods: general concepts. In: Ratti C, editor. Advances in food dehydration. Boca Raton, FL: CRC Press. p 1–36. ch1.

- Ayadi, M.A., Khemakhem, M., Belgith, H., Attia, H. (2008). Effect of Moderate Spray Drying Conditions on Functionality of Dried Egg White and Whole Egg. *J Food Sci*, 73(6):281-287.
- Cai, Y.Z., Corke, H. (2000). Production and properties of spray-dried amaranthus β -cyanin pigments. *J Food Sci*, 65, 1248–1252.
- Çalışkan Koç, G., Çabuk, B. (2019). The Effect of Different Microwave Powers on the Drying Kinetics and Powder Properties of Foam-Mat Dried Egg White Powder. *GIDA*, 44 (2): 328-33.
- Fitzpatrick, J.J., Barry, K., Cerqueira, P.S.M., Iqbal, T., O'Neill, J., Roos, Y.H. (2007). Effect of composition and storage conditions on the flowability of dairy powders. *Int Dairy J*, 17, 383–392.
- Folawiyo, Y. L., Apenten, R. O. (1997). The effect of heat-and acid-treatment on the structure of rapeseed albumin (*napin*). *Food Chem*, 58(3), 237-243.
- Gong, Z., Zhang, M., Mujumdar, A.S., Sun, J. (2008). Spray drying and agglomeration of instant bayberry powder. *Drying Technol*, 26, 1116–1121.
- Hand, Z., Cai, M. J., Cheng, J. H., Sun, D. W. (2019). Effects of microwave and water bath heating on the interactions between myofibrillar protein from beef and ketone flavour compounds. *Int J Food Sci Technol*, 54 (5): 1787-1793.
- Ibanoğlu, E., Ercelebi, E. (2007). Thermal denaturation and functional properties of egg proteins in the presence of hydrocolloid gums. *Food Chem*, 101(2), 626-633.
- Iqbal, T., Fitzpatrick, J.J. (2008). Effect of storage conditions on the wall friction characteristics of three food powders. *J Food Eng*, 72, 273–280.
- Jinapong, N., Suphantharika, M., Jamnong, P. (2008). Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. *J Food Eng*, 84, 194–205.
- Kadam, D.M., Balasubramanian, S. (2011). Foam mat drying of tomato juice. *J Food Process Pres*, 35: 484-495.
- Kinsella, J.E. (1981). Functional properties of proteins: Possible relationships between structure and function in foams. *Food Chem*, 7 (4); 273-288.
- Kudra, T., Ratti, C. (2006). Foam-Mat Drying: Energy and Cost Analyses. *Can Biosyst Eng*, 48:27–32.
- Kudra, T., Mujumdar, A S. (2002). Part I. General discussion: conventional and novel drying concepts. In: Kudra T, Mujumdar AS, editors. Advanced drying technologies. New York: Marcel Dekker Inc. p 1–26.
- Liu, S., Elmer, C., Low, N.H., Nickerson, M.T. (2010). Effect of pH on the functional behaviour of pea protein isolate–gum Arabic complexes. *Food Res Int*, 43(2):489–495.
- Ma, S., Zhao, S., Zhang, Y. Yu, Y., Liu, J., Xu, M. (2013). Quality characteristic of spray-drying egg white powders *Mol Biol Rep*, 40: 5677.
- Muthukumar, A., Ratti, C., Raghavan, V.G.S. (2008a). Foam-Mat Freeze Drying of Egg White-Mathematical Modeling Part II: Freeze Drying and Modeling. *Drying Technol*, 26(4):513–18.
- Muthukumar, A., Ratti, C., Raghavan, V.G.S. (2008b). Foam-Mat Freeze Drying of Egg White and Mathematical Modeling Part I Optimization of Egg White Foam Stability. *Drying Technol*, 26(4):508–12.
- Ndife, J., Udobi Ejikeme, C., Amaechi, N. (2010). Effect of oven drying on the functional and nutritional properties of whole egg and its components, *Afr J Food Sci*, 4(5):254- 257.
- Pathare, P.B., Opara, L.U., Al-Said F.A. (2013). Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food Bioprocess Technol*, 6(1),36-60.
- Pokora, M., Eckert, E., Zambrowicz, A., Bobak, Ł., Szoltysik, M., Dąbrowska, A., Chrzanowska, J., Polanowski, A., Trziszka, T. (2013). Biological and functional properties of proteolytic enzyme-modified egg protein by-products. *Food sci nutr*, 1(2), 184-195.
- Raharitsifa N., Ratti, C. (2010). Foam-mat freeze-drying of apple juice part 1: experimental data and ann simulations. *J Food Process Eng*, 33: 268-283.

- Rajkumar, P., Kailappan, R., Viswanathan, R., Raghavan, G.S.V., Ratti, C. (2007). Foam mat drying of alphonso mango pulp. *Drying Technol*, 25(2):357- 365.
- Salahi, M.R., Mohebbi1, M., Taghizadeh, M. (2015). Foam-mat drying of cantaloupe (*cucumis melo*): Optimization of foaming parameters and investigating drying characteristics. *J Food Process Pres*, 39: 1798-1808.
- Sangamithra, A., Venkatachalam, S., John S.G., Kuppuswamy, K. (2014). Foam mat drying of food materials: a review. *J Food Process Pres*, 39: 3165-3174.
- Sharada, S. (2013). Studies on Effect of Various Operating Parameters & Foaming Agents- Drying of Fruits and Vegetables. *International Journal of Modern Engineering Research (IJMER)*, 3(3):1512–19.
- Solval, K.E.M. (2011). Spray drying technology for the production and processing of microencapsulated omega-3 fish oil with egg powder, Master Thesis, 1390. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, USA.
- Stone, A.K., Karalash, A., Tyler, R.T., Warkentin, T.D., Nickerson, M.T. (2015). Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. *Food Res Int*, 76(1):31–38.
- Talansier, E., Loisel, C., Dellavalle, D., Desrumaux, A., Lechevalier, V., Legrand, J. (2009). Optimization of dry heat treatment of egg white in relation to foam and interfacial properties, *LWT - Food Sci Technol*, 42, 496–503.
- Tekin, Z.H., Baslar, M. (2018). The effect of ultrasound-assisted vacuum drying on the drying rate and quality of red peppers. *J Therm Anal Calorim*, 132(2), 1131–1143.
- Van Der Plancken, I., Van Loey, A., Hendrickx, M. E. (2006). Effect of heat-treatment on the physico-chemical properties of egg white proteins: A kinetic study. *J Food Eng*, 75(3), 316-326.
- Wagner, J. R., Anon. M.C. (1990). Influence of denaturation, hydrophobicity and sulfhydryl content on solubility and water absorbing capacity of soy protein isolates. *J Food Sci*, 55:765–770.
- Wong, P. Y. Y., Kitts, D. D. (2003). A Comparison of the Buttermilk Solids Functional Properties to Nonfat Dried Milk, Soy Protein Isolate, Dried Egg White, and Egg Yolk Powders. *J Dairy Sci*, 86:746–754.
- Yasumatsu, K., Sawada, K., Moritaka, S., Misaki, M., Toda, J., Wada, T., and Ishii, K. (1972). Whipping and emulsifying properties of soybean products. *Agric Biol Chem*, 36(5):719–27.

SOĞUK SIKMA VE SOĞUK MASERASYON YÖNTEMİYLE ELDE EDİLEN BİTKİ EKSTRAKTLARININ YAYGIN PATOJENLER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Aylin Korkut Altıntaş*, Hakan Kuleaşan

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

Geliş / Received: 02.07.2019; Kabul / Accepted: 15.01.2020; Online baskı / Published online: 02.02.2020

Korkut Altıntaş, A., Kuleaşan, H. (2020). Soğuk sıkma ve soğuk maserasyon yöntemiyle elde edilen bitki ekstraktlarının yaygın patojenler üzerindeki etkileri. *GIDA* (2020) 45(1) 161-170 doi: 10.15237/gida.GD19118

Korkut Altıntaş, A., Kuleaşan, H. (2020). Soğuk sıkma ve soğuk maserasyon yöntemiyle elde edilen bitki ekstraktlarının yaygın patojenler üzerindeki etkileri. GIDA (2020) 45(1) 161-170 doi: 10.15237/gida.GD19118

ÖZ

Çalışmada, farklı bitkilerin yapılarına göre soğuk sıkma yöntemi veya soğuk maserasyon yoluyla elde edilen ekstraktlarının antimikrobiyel etkileri, kuyu difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Sarımsak soğuk sıkma ekstraktı, 22.00 ±1.73 ile 41.00 ±1.00 mm aralığında zon çapı ile antimikrobiyel etki gösterirken, defne ekstraktı ise *S. aureus*'a karşı 12.67±0.58 mm zon çapı ile en düşük antimikrobiyel etki göstermiştir. En düşük Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIK), değerlerini sarımsak soğuk sıkma ekstraktı göstermiştir. Soğuk maserasyon ekstraktlarının farklı seviyelerde antimikrobiyel etki gösterdiği ve çözgen çeşidinin önemli etkileri olduğu sonucuna varılmıştır. HPLC analiz sonuçları incelendiğinde antimikrobiyel etkiden büyük ölçüde fenolik bileşenlerin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Sarımsak, biberiye, defne ve günlük ağacı ekstraktlarının birlikte kullanıldıklarında sinerjist etki göstererek antimikrobiyel etkiyi arttırabildiği, ancak bazı durumlarda ise azaltılabileceği tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyel etki, bitki ekstraktı, ekstraksiyon, soğuk sıkma, maserasyon, bitki ekstrakt karışımı

ANTIMICROBIAL EFFECTS OF PLANT EXTRACTS OBTAINED BY COLD PRESS AND COLD MACERATION METHODS ON SOME PATHOGENS

ABSTRACT

In this study, antimicrobial effects of plant extracts obtained by cold press or cold maceration regarding their structures on microorganisms were determined by well diffusion method. While cold pressed garlic extract showed strong antimicrobial effect with a zone diameters between 22.00 ±1.73 to 41.00 ±1.00 mm, bay extract was the lowest against *S. aureus* with 12.67±0.58 mm zone diameter. Besides cold pressed garlic extract showed the lowest Minimum Inhibition Concentration (MIC) levels. It can be concluded that the cold maceration extracts showed various levels of antimicrobial effect and the type of solvent employed were important factors. When HPLC analysis results were examined, it was determined that phenolics compounds are mainly responsible for the antimicrobial effect. Garlic, rosemary, bay and styrax tree extracts was found to be able to increase the antimicrobial effect by showing synergistic effects when used together, but the effect can be reduced in some cases.

Keywords: Antimicrobial effect, plant extract, extraction, cold press, maceration, plant extract mixture

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉korkutaylin1@gmail.com

☎ (+90) 542 208 68 88

☎ (+90) 246 211 1542

Aylin Korkut Altıntaş; ORCID no: 0000-0001-7805-8745

Hakan Kuleaşan; ORCID no: 0000-0002-0893-0689

GİRİŞ

Bitkiler, çeşitli kullanım alanlarının yanı sıra sahip oldukları antimikrobiyel etki nedeniyle gıdaların korunmasında da kullanılabilir (Toroğlu ve Çenet, 2006; Bayramoğlu vd., 2009; Aksoy, 2010). Antimikrobiyel etkiye sahip bitkilerde, bu etkiyi sağlayan maddeler denen geniş gruba oluşturanların başında fenolik bileşenler gelmektedir (Erdoğan ve Everest, 2013). Bitkilerin sahip oldukları bu antimikrobiyel etkinin, bileşimlerinde bulunan esansiyel yağlarının içerikleri, aldehytlar, organik asitler ve fenolik bileşiklere bağlı olarak değişmekte olduğu ve çoğunluğunun patojen bakteriler başta olmak üzere mikotoksin oluşturan küfler ve mayaların gelişimini olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir (Valero ve Salmeron, 2003; Şahin, 2006). Çalışmamızda soğuk sıkma ve soğuk maserasyon

yöntemleri ile elde edilen ekstraktların, yaygın olarak rastlanan bazı patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel etkileri ve minimum inhibisyon konsantrasyonları belirlenmiştir. Çalışmada yer verilen bitki ekstraktlarının fenolik madde içerikleri ve bu ekstraktlardan bazılarının karışımlarının, patojenlere karşı antimikrobiyel etkileri belirlenmiştir.

MATERYAL-YÖNTEM

Çalışmada kullanılan tüm bitkilere öncelikle soğuk sıkma yöntemi uygulanmış, ancak bu yöntemle ekstrakt elde edilemeyen bitkilerden soğuk maserasyon yöntemiyle ekstraktlar elde edilmiştir. Çizelge 1’de çalışmada kullanılan bitkiler ve temin edildikleri bölgeler verilmiştir.

Çizelge 1. Bitkiler ve temin edildiği bölgeler

Table 1. Plants and geographic locations

Bitki /Kullanılan Kısımlar <i>Plant/ parts used</i>	Botanik Adı <i>Botanical name</i>	Familya <i>Family</i>	Temin Edildiği Yer <i>Geographic location</i>
Günlük/Yaprak	<i>Liquidambar orientalis</i>	<i>Hamamelidaceae</i>	Muğla
Biberiye/Yaprak	<i>Rosmarinus officinalis L.</i>	<i>Labiatae</i>	Muğla
Zeytin/Yaprak	<i>Olea europaeae</i>	<i>Oleaceae</i>	Muğla
Muskat cevizi	<i>Myristica</i>	<i>Myristicaceae</i>	Yerel aktardan satın alınmıştır.
Sarımsak	<i>Allium sativum</i>	<i>Alliaceae</i>	Muğla
Defne/Yaprak ve çiçek	<i>Laurus nobilis L.</i>	<i>Lauraceae</i>	Muğla
Çörek otu	<i>Nigella sativa</i>	<i>Ranunculaceae</i>	Muğla
Stevia/Yaprak	<i>Stevia rebandiana</i>	<i>Asteraceae</i>	Mersin
Turunç/Kabuk	<i>Citrus aurantium</i>	<i>Rutaceae</i>	Muğla

Soğuk Sıkma Yöntemi ile Bitki Ekstraktlarının Elde Edilmesi

Bitkiler, öğütülme özelliklerine göre mekanik öğütücü, havan ya da laboratuvar tipi elektrikli değirmen (IKA, Almanya) yardımıyla parçalanmış ve ince gözenekli bir bezin arasına sarılarak hazırlanan pres sisteminde 8-10 kg/cm² basınç etkisiyle ekstraktların elde edilmesi sağlanmıştır. Turunç meyvesinde farklı olarak kabukları meyve etinden soyularak ayrılmış, deneylerde sadece kabuk kısımları kullanılmıştır. Pres sistemiyle elde edilen süzöntü, içerisinde bulunan bazı partiküllerin ayrılması amacıyla 20 dakika 4000 rpm’de santrifüjlenmiş ve berrak turunç ekstraktı

elde edilmiştir. Diğer ekstraktlar ise santrifüj işlemi olmaksızın sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -18 °C’de muhafaza edilmiştir. Çalışmada elde edilen tüm ekstraktlar, antimikrobiyel aktivite denemesi için 0.45 µm çaplı steril filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

Soğuk Maserasyon Yöntemi ile Bitki Ekstraktlarının Elde Edilmesi

Presleme yöntemiyle ekstrakt elde edilemeyen bitkilerin ekstraktları, Çopuroğlu(2013) çalışmasında kullanılan maserasyon yönteminde bazı değişiklikler yapılarak elde edilmiştir. Bitkiler, öğütücü veya değirmen yardımıyla parçalandıktan

sonra, bitkilere bitki/çözgen oranı, 1:3 (w/v) olacak şekilde çeşitli çözgenler ilave edilerek oda sıcaklığında ışık almayan bir ortamda 5-7 gün bekletilmişlerdir. Maserasyon süresinin ardından karışım kaba filtre kağıdından süzöldükten sonra, çözgenler uygun sıcaklıkta, döner evaporatör (Heidolph Laborota 4000, Almanya) cihazı yardımıyla uçurularak elde edilen saf ekstraktlar, antimikrobiyel etki denemesi için 0.45 µm çaplı steril filtreden geçirilerek steril edildikten sonra -18 °C'de muhafaza edilmiştir.

Antimikrobiyel Etkinin Belirlenmesi

Antimikrobiyel etkinin belirlenmesinde, temel bir yöntem olan kuyu difüzyon yöntemi kullanılmıştır (Tagg ve McGiven, 1971). Denemede kullanılan mikroorganizmalar (*Staphylococcus aureus* (SA), *Bacillus subtilis* (BS), *Enterococcus faecalis* (EF), klinik mikrobiyolojide nadir endokarditis etmeni bir mikroorganizma olan *Micrococcus luteus* (ML), *Listeria monocytogenes* (LM), *Salmonella* Enteritidis (SE), *Salmonella* Typhi (ST), *Klebsiella pneumoniae* (KP), *Yersinia enterocolitica* (YE), *Campylobacter jejuni* (CJ), *Escherichia coli* Tip 1 (EC1), *Escherichia coli* O157:H7 (EC2), Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Kullanılan bakteriler, Mueller Hinton Broth (Merck) besiyerine aşılansak uygun sıcaklıklarda 18 saat süresince geliştirilmişlerdir. İnkübasyon sonunda aktif kültürlerin yoğunluğu, 0.5 McFarland değerine ayarlanmıştır. Bu kültürler %1 oranında 45 °C sıcaklıkta tutulan 40 ml besiyeri içerisine inoküle edilmiş ve 15 cm çaplı petri kutularına dökülerek oda sıcaklığında katılaşmaları sağlanmıştır. Katılaştıran besiyerlerine metal delgeç ile 10 mm çaplı kuyular açılmış ve bu kuyulara 80 µL bitki ekstraktı konulmuştur. Petri kutuları, içerdikleri bakteriye uygun sıcaklıkta 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan zon çapları, kumpas yardımıyla mm olarak ölçülmüştür.

Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarının (MIK) Belirlenmesi

Minimum inhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla Celikel ve Kavas (2008) çalışmalarında kullandığı yöntemde bazı değişiklikler yapılarak ekstraktların minimum

inhibisyon konsantrasyonları belirlenmiştir. Önceki bölümde anlatıldığı şekilde hazırlanan kuyulara konulan saf ekstrakt, %100 konsantrasyon olarak kabul edilmiş ve farklı konsantrasyonların (%75, %50, %25, %18,75 ve %12,5) antimikrobiyel etkisi kuyu difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir.

Farklı Ekstraktların Birleşik Antimikrobiyel Etkisinin Belirlenmesi

Mikroorganizmalara karşı her bir bitki ekstraktının bireysel olarak sağladıkları antimikrobiyel etkilerin değerlendirilmesi sonrasında, yüksek antimikrobiyel etkinin belirlendiği (Zon çapı >20 mm) sarımsak (soğuk sıkma), günlük yaprağı ve biberiye maserasyon (hegzan), defne yaprağı maserasyon (metanol) ekstraktları kombinasyonlar şeklinde kullanılmıştır. Seçilen bitkisel ekstraktlar, eşit oranlarda (v/v) karıştırılarak, indikatör mikroorganizmalara karşı tekrar antimikrobiyel etkileri belirlenmiştir.

Bitki Ekstraktlarındaki Fenolik Maddelerin Belirlenmesi

En yüksek oranda antimikrobiyel etki gösteren bitki ekstraktlarının fenolik madde içerikleri, Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma ve Uygulama Merkezi tarafından HPLC cihazı (Shimadzu, Japan) ile belirlenmiştir. Analizde, C18 (Agilent XDB-C18) kolonda 30 °C sıcaklık uygulanmış ve mobil faz olarak %3 asetik asit ve metanol karışımı kullanılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Bitki Ekstraktlarının Mikroorganizmalar Üzerindeki Antimikrobiyel Etkisi

Çalışmada, ekstraktların çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel aktivitesi belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 2'de verilmiştir. Elde edilen zon çaplarından 11-15 mm zon çapı zayıf antimikrobiyel etkiyi, 16-20 mm arası zon çapı orta düzey antimikrobiyel etkiyi, 20 mm üzeri zon çapı ise güçlü antimikrobiyel etkiyi belirtmektedir. Sonuçlar, CLSI antimikrobiyel test standardı (Anonymous, 2019)'na göre değerlendirilmiştir. Elde edilen zon çapları değerlendirildiğinde ekstraktların, ağırlıklı olarak

Gram pozitif bakterilere karşı daha etkili olduğu görülmüş, bu durumun Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı yapısından kaynaklandığı düşünülmüştür. Benzer sonuçlar, Salar vd., (2015)

çalışmasında da elde edilmiş olup, Gram pozitif bakterilerin antimikrobiyel etkiye karşı daha hassas oldukları sonucuna varmışlardır.

Çizelge 2. Bitki ekstraktlarının mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel etkileri
Table 2. Antimicrobial effects of plant extracts against microorganisms

Mikroorganizma Microorganism	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>S. aureus</i>	28.67 ±0.58	0	12.67 ±0.58	31.33 ±1.15	25.67 ±1.53	25.00 ±2.00	12.33 ±1.15	20.67 ±0.58	21.33 ±1.53	0	30.33 ±2.08	25.00 ±1.00	23.33 ±1.53
<i>S. Enteritidis</i>	32.67 ±2.08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Typhi</i>	28.00 ±2.00	0	0	13.33 ±1.15	0	0	11.67 ±0.58	0	0	0	0	15.00 ±1.00	0
<i>B. subtilis</i>	32.33 ±0.58	15.33 ±1.15	0	22.67 ±0.58	11.67 ±0.58	25.33 ±1.53	0	11.67 ±0.58	0	23.33 ±1.15	23.00 ±1.00	0	12.00 ±0
<i>E. faecalis</i>	25.33 ±1.15	0	0	0	0	17.00 ±0	14.33 ±0.58	11.33 ±1.15	0	0	0	0	0
<i>M. luteus</i>	41.00 ±1.00	0	17.00 ±1.53	28.00 ±0.58	24.00 ±2.00	26.00 ±2.00	0	18.00 ±1.15	0	24.00 ±0.58	18.00 ±1.00	25.00 ±2.00	0
<i>K. pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Y. enterocolitica</i>	22.00 ±1.73	0	16.67 ±0.58	22.00 ±1.73	20.67 ±0.58	0	0	18.00 ±1.00	0	22.00 ±1.73	42.00 ±2.00	22.33 ±1.53	15.33 ±1.15
<i>C. jejuni</i>	25.67 ±0.58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12.67 ±1.15	0
<i>L. monocytogenes</i>	31.67 ±1.53	0	0	14.00 ±0	13.33 ±0.58	0	0	0	0	0	0	0	12.67 ±0.58
<i>E. coli</i> Tip 1	31.33 ±1.15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> O157:H7	33.67 ±2.08	0	0	14.67 ±1.53	14.00 ±2.00	26.33 ±0.58	0	17.33 ±1.15	0	0	0	18.67 ±0.58	0

Ekstraktlar, 1: Sarımsak (soğuk sıkma), 2: Turunç kabuğu (soğuk sıkma), 3: Defne yaprağı (soğuk sıkma), 4: Defne yaprağı (metanol), 5: Defne çiçeği (metanol), 6: Biberiye yaprağı (hegzan), 7: Muskat cevizi (aseton), 8: Muskat cevizi (metanol), 9: Stevia yaprağı (hegzan), 10: Stevia yaprağı (metanol), 11: Çörek otu (hegzan), 12: Günlük yaprağı (hegzan), 13: Zeytin yaprağı (metanol)

Çalışmada kullanılan bitkilerin hepsine soğuk sıkma yöntemi uygulanmış, sadece sarımsak, defne, biberiye, turunç kabuğu ve zeytin yaprağından soğuk sıkma yöntemi ile ekstrakt elde edilebilmiştir. Presleme yöntemi ile elde edilen sarımsak ekstraktı, patojenlere karşı yüksek oranda ($22,00 \pm 1,73 - 41,00 \pm 1,00$ mm) antimikrobiyel etki gösterirken, en yüksek antimikrobiyel etkiyi ($41,00 \pm 1,00$ mm) ise klinik mikrobiyolojide nadir endokarditis etmeni olan *M. luteus*'a karşı göstermiştir. Aynı ekstrakt, *K. pneumoniae*'e karşı herhangi bir antimikrobiyel etki göstermemiştir. Sarımsak ekstraktının farklı yöntemler kullanılarak elde edildiği çalışmalarda (Abdou vd., 1972; Kıvanç ve Kunduhoğlu, 1997; Ahmad ve Beg, 2001; Nazir ve Latif, 2012), *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* ve *S. typhi* üzerinde çalışmamıza göre daha düşük antimikrobiyel etki tespit edilmiştir. Bu farklılığın, soğuk sıkma yönteminde etken

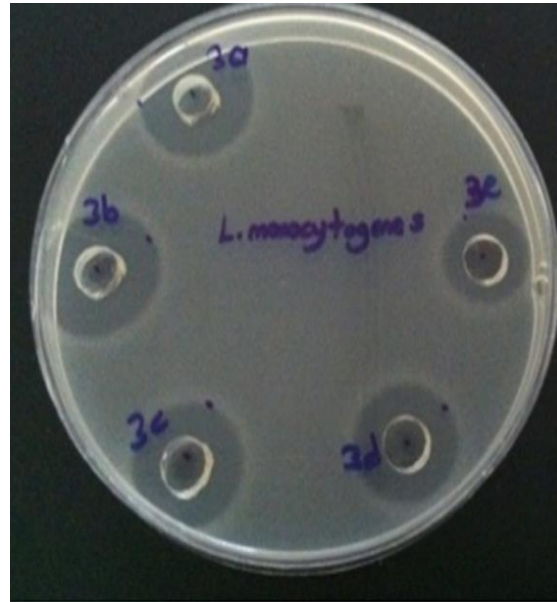
maddelere daha az zarar verilmesinden ve/veya presleme öncesi uygulanan yoğun parçalama işleminden kaynaklandığı düşünülmüştür. Benzer şekilde soğuk sıkma yöntemi ile elde edilen turunç kabuğu ve defne ekstraktları ise sarımsak ekstraktına kıyasla daha düşük antimikrobiyel etki göstermişlerdir. Çalışmamızda metanol ile elde edilen zeytin yaprağı ekstraktı, en yüksek antimikrobiyel etkiyi, *S. aureus*'a karşı ($23,33 \pm 1,53$ mm) gösterirken, biberiye (hegzan) ekstraktı ise *M. luteus* ($26,00 \pm 2,00$ mm) ve *E. coli* O157:H7'ye ($26,00 \pm 0,58$ mm) karşı daha yüksek bir etki göstermiştir. Zeytin yapraklarında bulunan fenolik bileşiklerin, antimikrobiyel etkiden sorumlu oldukları ve kullanılan çözügene bağlı olarak mikroorganizmalar üzerinde farklı düzeylerde antimikrobiyel etki gösterdikleri çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur (Markin vd., 2003; Pereira vd., 2007; Gülcü ve Demirci, 2008;

Sudjana vd., 2009; Yıldız ve Uylaşer, 2011; Salar, 2015). Biberiye yaprağından soğuk sıkma dışındaki yöntemler kullanılarak elde edilen ekstraktların, antimikrobiyel etkisinin incelendiği çalışmalarda (Erdogru, 2002; Sağdıç ve Özcan, 2003; Abu-Shanab vd., 2004 ; Dülger ve Gonuz, 2004; Oskay ve Sarı, 2007; Aydın, 2008; Uçar vd., 2015), *E. faecalis*, *S. aureus*, *M. luteus*, ve *B. subtilis*'e karşı mevcut çalışmamıza kıyasla daha düşük antimikrobiyel etki tespit edilmiştir. Günlük yaprağının antimikrobiyel etkisinin incelendiği çalışmalara (Oskay ve Sarı, 2007; Aydın, 2008; Okmen vd., 2014) kıyasla günlük yaprağı (hegzan) ekstraktı, *S. aureus*, *Y. enterocolitica*, *M. luteus*'a karşı daha güçlü bir antimikrobiyel etki göstermiştir. Çalışmamızda maserasyon yöntemi ile elde edilen ekstraktlar arasında, *C. jejuni*'ye karşı tek antimikrobiyel etkiye sahip olan ekstrakt bu olmuştur. Çözgen olarak metanolün kullanıldığı defne yaprağı ekstraktının, soğuk sıkma yöntemi ile elde edilen ekstraktlara kıyasla antimikrobiyel etki açısından daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Defne bitkisinde metanol ile elde edilen ekstraktlardan yaprak ekstraktı, çiçek ekstraktına göre daha yüksek antimikrobiyel etki göstermiştir. Çalışmamıza kıyasla bazı mikroorganizmalar üzerinde daha düşük bir antimikrobiyel etkinin elde edildiği çalışmalarda (Sağdıç vd., 2002; Sağdıç vd., 2003; Celikel ve Kavas, 2008; Al-Hussaini ve Mahasneh, 2009), kullanılan çözgenin tek başına etkili olmadığı, uygulanan yöntemin de farklılık sağladığı sonucuna varılmıştır. Gupta vd. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, muskat cevizi (metanol) ekstraktı, *S. aureus*'a karşı antimikrobiyel aktivite göstermezken, yaptığımız çalışmada tersi şekilde muskat cevizinden metanol ile elde edilen ekstraktı, orta düzeyde ($20,67 \pm 0,58$ mm) etki göstermiş olup aynı bitkinin aseton ekstraktı ise metanol ekstraktına kıyasla daha zayıf bir etki göstermiştir. Çörek otu-hegzan ekstraktı, en yüksek antimikrobiyel etkiyi *Y. enterocolitica*'ya karşı ($42,00 \pm 2,00$ mm) göstermiştir. Çörek otundan farklı yöntemler ile elde edilen ekstraktların incelendiği çeşitli çalışmalarda ise *Y. enterocolitica*'ya karşı daha düşük bir antimikrobiyel etki tespit edilmiştir (Hanafy ve Hatem., 1991; Ahmad ve Beg, 2001; Dulger ve Gonuz., 2004; Arici vd., 2005). Stevia bitkisi ekstraktları incelendiğinde, metanolün hegzana göre daha etkili olduğu

belirlenmiştir. Benzer çalışmalar ile karşılaştırıldığında (Tadhani ve Subash, 2006; Debnath, 2008; Ghosh vd., 2008; Muanda vd., 2010; Uçar vd., 2015), *B. subtilis*, *S. aureus* ve *E. faecalis*, *M. luteus*'a karşı daha düşük veya daha yüksek antimikrobiyel etkiler tespit edilmiştir.

Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları

Bitki ekstraktlarının antimikrobiyel etki denemesi sonucunda, 20 mm ve üzeri zon veren bitki ekstraktları için seyreltilmiş dozlardaki inhibisyon etkileri belirlenmiştir. Seyreltilmiş ekstraktlara ait sonuçlar incelendiğinde, en düşük konsantrasyonlarda etki gösteren ekstraktın soğuk sıkma ile elde edilen sarımsak ekstraktı olduğu (%12.5-%25) ve konsantrasyonunun azalmasıyla birlikte zon çaplarının belirgin şekilde azaldığı gözlenmiştir. Çizelge 3'te ekstraktların azaltılmış konsantrasyonlardaki inhibisyon etkileri gösterilmektedir. Şekil 1'de örnek olarak seçilen farklı konsantrasyonlardaki sarımsak ekstraktının, *L. monocytogenes*'e karşı antimikrobiyel etkisi verilmiştir.



Şekil 1. Farklı konsantrasyonlardaki soğuk sıkma sarımsak ekstraktının *L. monocytogenes*'e karşı antimikrobiyel etkisi

Figure 1. Antimicrobial effect of cold pressed garlic extract at different concentrations against *L. monocytogenes*

Minimum inhibisyon konsantrasyonları (MIK) incelendiğinde, en düşük inhibisyon konsantrasyonlarının sarımsak ekstraktında olduğu belirlenmiştir. En yüksek MIK değerini ise (%50), *S. aureus*'a karşı muskat cevizi maserasyon (metanol) ekstraktının verdiği dikkati çekmektedir. Farklı bitkiler kıyaslandığında sarımsak ekstraktının % 12.5 minimum inhibisyon konsantrasyonunda etkili olabildiği gözlenirken, defne ekstraktlarının ancak %25 seyreltilmiş konsantrasyonlarda inhibisyon etkisi

gösterebildiği belirlenmiştir. MIK değerleri açısından en zayıf etkiye, muskat cevizi metanol ekstraktının sahip olduğu gözlenmiştir. Esansiyel yağların ve ekstraktların minimum inhibisyon konsantrasyonlarının incelendiği çalışmalar (Pereira vd., 2007; Celikel ve Kavas, 2008; Sudjana vd., 2009; Ekren vd., 2013) değerlendirildiğinde, mikroorganizmaya ve ekstraksiyonda kullanılan yöntemle bağlı olarak MIK değerlerinin farklılık gösterebildiği belirlenmiştir.

Çizelge 3. Bitki ekstraktlarının minimum inhibisyon konsantrasyonları (%) ve zon çapları (mm) (delgeç çapı dâhil)

Table 3. Minimum inhibition concentrations of plant extracts (%) and zone diameters (mm) (with puncher diameter)

Mikroorganizma <i>Microorganism</i>	Bitki Ekstraktı/ Yöntem <i>Plant extract/ Method</i>	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu(%) /zon çapları (mm) <i>Minimum inhibition concentration(%) / zone diameters (mm)</i>
<i>B. subtilis</i>	Sarımsak / Soğuk sıkma	12.5 / 14
	Biberiye / Maserasyon (Hegzan)	25 / 18
	Defne çiçek / Maserasyon (Metanol)	25 / 16
	Stevia / Maserasyon (Hegzan)	25 / 16
	Çörek otu / Maserasyon (Hegzan)	18.75 / 20
<i>S. Enteritidis</i>	Sarımsak / Soğuk sıkma	12.5 / 20
<i>S. Typhi</i>	Sarımsak / Soğuk sıkma	12.5 / 18
<i>L. monocytogenes</i>	Sarımsak / Soğuk sıkma	12.5 / 14
	<i>E. faecalis</i>	Sarımsak / Soğuk sıkma
<i>Y. enterocolitica</i>	Biberiye / Maserasyon (Hegzan)	25 / 14
	Sarımsak / Soğuk sıkma	12.5 / 12
	Defne çiçek / Maserasyon (Metanol)	25 / 14
	Çörek otu / Maserasyon (Hegzan)	25 / 18
	Günlük / Maserasyon (Hegzan)	25 / 14
<i>S. aureus</i>	Defne / Maserasyon (Metanol)	25 / 14
	Sarımsak / Soğuk sıkma	12.5 / 20
	Biberiye / Maserasyon (Hegzan)	25 / 18
	Stevia / Maserasyon (Hegzan)	25 / 12
	Çörek otu / Maserasyon (Hegzan)	18.75 / 24
	Günlük / Maserasyon (Hegzan)	25 / 18
	Defne / Maserasyon (Metanol)	18.75 / 22
	Muskat cevizi / Maserasyon (Metanol)	50 / 16
	Defne çiçek / Maserasyon (Metanol)	25 / 20
<i>E. coli</i>	Sarımsak / Soğuk sıkma	18.75 / 16
O 157:H7	Biberiye / Maserasyon (Hegzan)	18.75 / 20
<i>C. jejuni</i>	Sarımsak / Soğuk sıkma	25 / 12
<i>M. luteus</i>	Sarımsak / Soğuk sıkma	25 / 26
	Defne / Maserasyon (Metanol)	25 / 18
	Stevia / Maserasyon (Metanol)	25 / 12
	Defne çiçek / Maserasyon (Metanol)	25 / 18
	Biberiye / Maserasyon (Hegzan)	25 / 18
	Günlük / Maserasyon (Hegzan)	25 / 14

Ekstrakt Karışımlarının Antimikrobiyel Etkisi

Çalışmada elde edilen çeşitli ekstraktlardan, bireysel olarak en yüksek etki gösteren ekstraktların farklı kombinasyonları oluşturulmuş ve antimikrobiyel etkileri belirlenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, mikroorganizmaya bağlı olarak, karışımların sinerjik etki gösterdiği, bazı durumlarda ise antimikrobiyel etki gösteren bitki

ekstraktlarının birlikte kullanımının antimikrobiyel etkiyi ortadan kaldırdığı görülmüştür. Uçucu yağ bileşenlerinin karışım halinde kullanımının antimikrobiyel etkiyi arttırdığı yapılan çalışmalarda (Cerit, 2008; Lee ve Lee, 2010) belirtilmiştir. Çizelge 4'te bitki ekstrakt kombinasyonlarının mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel etki denemesi sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4. Bitki ekstrakt karışımlarının antimikrobiyel etkisi

Table 4. Antimicrobial effect of plant extract combinations

Karışımlar/ Combinations	SE	ST	CJ	SA	ML	BS	LM	EF	YE	EC2	EC1
S+B	24	24	18	30	30	22	24	22	34	22	24
S+D	24	22	12	32	30	22	26	16	20	22	24
S+B+D	22	18	24	24	28	20	20	22	24	20	20
B+D	0	0	24	30	24	20	0	0	24	18	0
G+B	0	0	20	24	20	18	0	14	18	22	0
G+D	0	0	18	24	24	18	11	16	20	12	0
G+B+D	0	0	20	28	22	20	0	12	16	16	0

S: Sarımsak soğuk sıkma, D: Defne ekstraktı, B: Biberiye ekstraktı, G: Günlük ekstraktı

Bitki Ekstraktlarındaki Fenolik Maddeler

Bitki ekstraktlarındaki fenolik madde analiz sonuçlarına göre, sarımsak ekstraktında gallik asit, defne soğuk maserasyon (metanol) ekstraktında başta rutin olmak üzere fenolik maddeler tespit edilmiş olup, bu maddelerin antimikrobiyel

etkiden sorumlu oldukları yapılan çalışmalarda da (Pereira vd., 2007; Sudjana vd., 2009., Muanda vd., 2011) belirtilmiştir. Çizelge 5'te bazı bitki ekstraktlarındaki fenolik maddeler verilmiştir.

Çizelge 5. Bitki ekstraktlarındaki fenolik maddeler ve konsantrasyonları (mg/kg)

Table 5. Phenolic substances and their concentrations in plant extracts (mg/kg)

Bitki Ekstraktı Plant extract	Fenolik Maddeler ve Konsantrasyonları (ppm) Phenolic compounds and concentrations (ppm)
Sarımsak (soğuk sıkma)	Gallik asit (144.7 ppm)
Muskat cevizi (metanol)	Siringik asit (25.7 ppm), Vanilin (21.3 ppm), p-kumarik asit (3.0 ppm), Ferulik asit (14.1 ppm), Sınnamik asit (10.6 ppm)
Çörek otu (hegzan)	Gallik asit, Luteolin (13.8 ppm), Apigenin (3.0 ppm), Karvakrol (195.3 ppm)
Stevia (metanol)	Gallik asit (23.8 ppm), Protokateşik asit (352.6 ppm), Rosmarinik asit (623.4 ppm), Karvakrol (94.9 ppm)
Günlük yaprağı (hegzan)	Gallik asit (222.2 ppm), Protokateşik asit (27.3 ppm), Vanilin (3.3 ppm)
Biberiye yaprağı (hegzan)	Siringik asit (0.2 ppm), Karvakrol (44.3 ppm)
Defne yaprağı (metanol)	Rutin (455.8 ppm), Ferulik asit (210.7 ppm), Kafeik asit (239.1 ppm), Luteolin (44.1 ppm)
Defne çiçek (metanol)	Rutin (2447.0 ppm), Ferulik asit (85.5 ppm), Kafeik asit (294.9 ppm), Karvakrol (104.3 ppm)
Turunç kabuğu (soğuk sıkma)	Rutin (35.9 ppm), Eriodiktiol (1.8 ppm)
Zeytin yaprağı (metanol)	Oleuropein (2426.3 ppm), Hidroksitirozol (524.1 ppm), Apigenin (218.4 ppm), Kuarsetin (145.7 ppm), Luteolin (92.4 ppm)

SONUÇ

Bitkilerde bulunan pek çok aktif bileşenin elde edilmesinde yaygın olarak kullanılan ve ekstraksiyon ortamına ısı verilmesini gerektiren geleneksel damıtma ve ekstraksiyon yöntemleri, sıcaklık artışlarında kararsız yapıdaki bileşiklerin kaybına sebep olabilmektedir (Büyüktuncel, 2012; Yaman ve Kuleaşan, 2016). Benzer bulgular yapılan farklı araştırmalarda bildirilmiştir (Dülger ve Gönüz, 2004; Sağdıç ve Özcan, 2003; Benkeblia vd., 2014; Belguith vd., 2010). Söz konusu araştırmalarda, hidrodistilasyon ve sokslet gibi ısı işlem uygulanarak elde edilen ekstraktların antimikrobiyel etki yeteneklerinin, ısı işlem uygulanmadan elde edilen ekstraktlara kıyasla daha düşük sonuçlar verdiği görülmüştür. Isı işlemin bitkilerdeki etken maddelere zarar verebildiği (Kaya ve Ergönül, 2015; Siger vd., 2008), ayrıca uçucu bileşenlerin uzaklaşabileceği, bu nedenle sıcaklık ve kimyasal uygulama içermeyen ve uçucu olan bileşenlerin kaybolmamasını sağlayan soğuk sıkma yönteminin, ekstrakt elde edilebilen bitkiler için daha avantajlı olabileceği düşünülmüştür.

Biberiye, defne gibi bitki ekstraktlarının karışım halinde uygulanmasının antimikrobiyel etkiyi arttırabileceği belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre, bazı bitki ekstraktlarının karışım halinde kullanılması durumunda antimikrobiyel etkinin azalmasının sebebi olarak, karışım halinde uygulandıklarında bireysel kullanım durumlarındaki MIK değerlerinin altındaki değerlere düşmüş olması ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca bitki ekstrakt karışımlarındaki etken bileşenlerin, birbirleriyle biyokimyasal etkileşime girerek yapılarının değişmesi ve ekstraktların birbirlerinin pH'sını değiştirebilecekleri, dolayısıyla mikroorganizmalar üzerinde bireysel kullanımına göre bazı durumlarda antimikrobiyel etkilerinin azalabileceği düşünülmektedir.

Soğuk ekstraksiyon uygulamaları incelendiğinde, kullanılan çözgenin çeşitinin de antimikrobiyel etki üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Bitkilerdeki hedef etken maddelerin polarite (polar, apolar) özelliklerine göre, yöntemlerde kullanılan çözgenlerin polaritelerinin uygun

olmasının, ekstraksiyonda bu maddelerin eldesi ve dolayısıyla antimikrobiyel etkinin eldesinde önemli bir kriter olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje No: 4441-YLI-15) tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

Abdou, I. A., Abou-Zeid, A. A., El-Sherbeeney, M. R., Abou-El-Gheat, Z. H. (1972). Antimicrobial activities of *Allium sativum*, *Allium cepa*, *Raphanus sativus*, *Capsicum frutescens*, *Eruca sativa*, *Allium kurrat* on bacteria. *Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles*, 22(1), 29-35.

Abu-Shanab, B., Adwan, G. M., Abu-Safiya, D., Jarrar, N., Adwan, K. (2004). Antibacterial Activities of Some Plant Extracts Utilized in Popular Medicine in Palestine. *Turk J Biol*, 28(2-4), 99-102.

Ahmad, I., Beg, A. Z. (2001). Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *J ethnopharmacol*, 74(2), 113-123.

Aksoy, A. (2010). Bazı bitki ekstraktlarının kanatlı etlerinin raf ömrü üzerine etkisinin araştırılması. Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Ana bilim Dalı Doktora tezi, Kars, Türkiye, 161 s.

Al-Hussaini, R., Mahasneh, A. (2009). Microbial growth and quorum sensing antagonist activities of herbal plants extracts. *Molecules*, 14(9), 3425-3435, doi:10.3390/molecules14093425

Anonymous, (2019). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute M100. Wayne, USA.

Arici, M., Sagdic, O., Gecgel, U. (2005). Antibacterial effect of Turkish black cumin (*Nigella sativa* L.) oils. *Grasas Aceites*, 56(4), 259-262.

Aydın, B. D. (2008). Bazı tıbbi bitki ve baharatların gıda patojenleri üzerine antibakteriyel etkisinin araştırılması. Kafkas Üniversitesi

- Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 14(1), 83-87, doi:10.9775/kvfd.2008.11-A
- Bayramoğlu, M. M., Toksoy, D., Şen, G. (2009). Türkiye’de Tıbbi Bitki Ticareti.2.Ormancılıkta Sosyo-ekonomik Sorunlar Kongresi,19-21 Şubat 2009, Isparta, Türkiye, 89-98.
- Belguith, H., Kthiri, F., Chati, A., Sofah, A. A., Hamida, J. B., Ladoulsi, A. (2010). Inhibitory effect of aqueous garlic extract (*Allium sativum*) on some isolated *Salmonella* serovars. *Afr J Microbiol Res*, 4(5), 328-338.
- Benkeblia, N. (2004). Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *LWT-Food Sci Techno*, 37(2), 263-268.
- Büyüktuncel, E. (2012). Gelişmiş ekstraksiyon teknikleri I. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 32(2), 209-242.
- Celikel, N., Kavas, G. (2008). Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech J Food Sci-UZPI (Czech Republic)*, 26 (3), 174-181.
- Cerit, L. S. (2008). Bazı baharat uçucu yağlarının antimikrobiyel özellikleri, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Denizli, Türkiye, 45 s.
- Çopuroğlu, Ö. (2013). Niğde yöresindeki bazı endemik bitki türlerinin antimikrobiyel aktiviteleri. Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Niğde, Türkiye, 67 s.
- Debnath, M. (2008). Clonal propagation and antimicrobial activity of an endemic medicinal plant *Stevia rebaudiana*. *J Med Plants Res*, 2(2), 45-51.
- Dulger, B.,Gonuz, A. (2004). Antimicrobial activity of certain plants used in Turkish traditional medicine. *Asian J Plant Sci*, 3(1), 104-107.
- Ekren, S., Yerlikaya, O., Tokul, H. E., Akpınar, A., Accedil, M. (2013). Chemical composition, antimicrobial activity and antioxidant capacity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Afr J Microbiol Res*, 7(5), 383-388, doi:10.5897/AJMR12.1765.
- Erdoğan, A. E., Everest, A. (2013). Antimikrobiyel ajan olarak bitki bileşenleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, (2), 27-32.
- Erdogrul, Ö. T. (2002). Antibacterial activities of some plant extracts used in folk medicine. *Pharm Biol*, 40(4), 269-273.
- Ghosh, S., Subudhi, E., Nayak, S. (2008). Antimicrobial assay of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf extracts against 10 pathogens. *Int J Integr Biol*, 2(1), 1-5.
- Gupta, A. D., Bansal, V. K., Babu, V., Maithil, N. (2013). Chemistry, antioxidant and antimicrobial potential of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.). *J Genet Eng and Biotechnol*, 11(1), 25-31.
- Gülcü, M., Demirci, A. Ş. (2008). Zeytin ve Yaprağındaki Biyoaktif Bileşenler ve Sağlık Üzerine Etkileri. 1.Ulusal Zeytin Öğrenci Kongresi, 17-18 Mayıs 2008 / Edremit-Balıkesir, Türkiye, 198 s.
- Hanafy, M. S. M., Hatem, M. E. (1991). Studies on the antimicrobial activity of *Nigella sativa* seed (black cumin). *J ethnopharmacol*, 34(2-3), 275-278.
- Kaya, D., Ergönül, P. G. (2015). Uçucu Yağları Elde Etme Yöntemleri. *Gıda/The J Food*, 40(5), 1-8, doi: 10.15237/gida.GD15014
- Kıvanç, M., Kunduhoglu, B. (1997). Antimicrobial Activity of Fresh Plant Juice on The Growth of Bacteria and Yeasts. *J Qafqaz University*, 1(1), 27-35.
- Lee, O. H., Lee, B. Y. (2010). Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresour Technol*, 101(10), 3751-3754.
- Markin, D., Duek, L., Berdicevsky, I. (2003). In Vitro Antimicrobial Activity of Olive Leaves. *Mycoses*, 46:132-136.
- Muanda, F. N., Soulimani, R., Diop, B., Dicko, A. (2011). Study on Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oil and Extracts From *Stevia rebaudiana Bertoni* Leaves. *LWT-Food Sci Technol*, 44(9), 1865-1872.

- Nazir, S., Latif, Z. (2012). Screening of Natural Extracts for Their Antibacterial Activity Against Different Enteric Pathogens Isolated From Soil, Water and Rotten Fruit Samples. *Afr J Biotechnol*, 11(73), 13814-13820, doi: 10.5897/AJMR12.2249
- Oskay, M., Sarı, D. (2007). Antimicrobial Screening of Some Turkish Medicinal Plants. *Pharm Biol*, 45(3), 176-181.
- Okmen, G., Turkcan, O., Ceylan, O., Gork, G. (2014). The Antimicrobial Activity of *Aliquidambar orientalis* mill. Against Food Pathogens and Antioxidant Capacity of Leaf Extracts. *Afr J Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 11(5), 28-32.
- Pereira, A., Ferreira, I., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., Pereira, J. (2007). Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Mol*, 12(5), 1153-1162.
- Sağdıç, O., Kuşçu, A., Özcan, M., Özçelik, S. (2002). Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* O157: H7. *Food Microbiol*, 19(5), 473-480, doi:10.1006/yfmic.494.
- Sağdıç, O., Karahan, A. G., Ozcan, M., Ozkan, G. (2003). Note: effect of some spice extracts on bacterial inhibition. *Food Sci Technol Int*, 9(5), 353-358.
- Sağdıç, O., Özcan, M. (2003). Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. *Food Control*, 14(3), 141-143.
- Salar, M. O., Yardımcı, H., Diker, K. S. (2015). Bazı endüstriyel bitkilerin *Salmonella* Serotipleri üzerindeki antimikrobiyel etkileri. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 86(2), 9-18.
- Siger, A., Nogala-Kalucka, M., Lampart-Szczapa, E. (2008). The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *J Food Lipids*, 15(2), 137-149.
- Sudjana, A. N., D'Orazio, C., Ryan, V., Rasool, N., Ng, J., Islam, N., Riley, T.V., Hammer, K. A. (2009). Antimicrobial Activity of Commercial *Olea europaea* (olive) Leaf Extract. *Int J Antimicrob Agents*, 33(5), 461-463.
- Şahin, E. (2006). Bitkisel Kaynaklı Antimikrobiyellerin Gıda Kaynaklı Bazı Patojen Mikroorganizmalar Üzerinde Etkileri. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 57s, İstanbul.
- Tadhani, M. B., Subhash, R. (2006). In Vitro Antimicrobial Activity of *Stevia rebaudiana* Bertoni Leaves. *Trop J Pharm Res*, 5(1), 557-560.
- Tagg, J., McGiven, A. R. (1971). Assay System for Bacteriocins. *Appl Microbiol*, 21(5), 943.
- Toroğlu, S., Çenet, M. (2006). Tedavi Amaçlı Kullanılan Bazı Bitkilerin Kullanım Alanları ve Antimikrobiyel Aktivitelerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Metodlar. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen ve Mühendislik Dergisi, 9(2), 12-19.
- Uçar, E., Odabaş Köse, E., Özyiğit, Y., Turgut, K. (2015). Bazı Tıbbi ve Aromatik Bitkilerde Esansiyel Yağların Antimikrobiyel Aktivitelerinin Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi. Ziraat Fakültesi Dergisi, 10(2), 118-124.
- Valero, M. and Salmeron, M.C. (2003). Antibacterial Activity of 11 Essential Oils Against *Bacillus cereus* in Tyndallized Carrot Broth. *Int J Food Microbiol*, 85, 73-81.
- Yaman, T., Kuleaşan, Ş. (2016). Uçucu Yağ Elde Etmede Gelişmiş Ekstraksiyon Yöntemleri. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, (1), 78-83.
- Yıldız, G., Uylaşer, V. (2011). Doğal Bir Antimikrobiyel: Oleuropein. Uludağ Üniversitesi. Ziraat Fakültesi Dergisi, 25(1).

**GELENEKSEL ANJELİKA REÇELİNİN TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE,
TOPLAM FENOLİK MADDE VE *IN VITRO* SİNDİRİM MODELİ İLE
BİYOERİŞİLEBİLİRLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

Elif Koç, Perihan Yolcu Ömeroğlu*

Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Bursa, Türkiye

Geliş / Received: 29.11.2019; Kabul / Accepted: 10.02.2020; Online baskı / Published online: 16.02.2020

Koç, E., Ömeroğlu, P. Y. (2020). Geleneksel anjelika reçelinin toplam antioksidan kapasite, toplam fenolik madde ve *in vitro* sindirim modeli ile biyoerişilebilirliğinin belirlenmesi. *GIDA* (2020) 45(1) 171-181 doi: 10.15237/gida.GD19154

Koç, E., Ömeroğlu, P. Y. (2020). Determination of total phenolic compound, antioxidant capacity of the traditional angelica jam and their bioaccessibility with *in vitro* digestive model. *GIDA* (2020) 45(1) 171-181 doi: 10.15237/gida.GD19154

ÖZ

Bu çalışmanın amacı, Bursa'ya ait unutulmaya yüz tutmuş geleneksel bir gıda olan Anjelika reçelinin biyoaktif bileşenlerini ortaya koyarak fonksiyonel özelliklerini değerlendirmektir. Bu bağlamda, farklı özütleme yöntemlerinin toplam antioksidan kapasite, toplam fenolik madde ve toplam flavonoid madde miktarlarına olan etkisi ve *in vitro* sindirim modeli ile bu biyoaktif bileşenlerin biyoerişilebilirliği de incelenmiştir. Geleneksel yöntemine göre üretilen Anjelika reçeli %0.1 formik asit içeren %75 metanol, %0.5 asetik asit içeren %70 aseton ve %70 etanol ile özütlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre biyoaktif bileşen miktarları özütleme yöntemlerine göre farklılık göstermiştir. Reçelin toplam antioksidan kapasitesi en fazla metanolik bazlı özütünden, DPPH, CUPRAC ve ABTS yöntemleriyle sırasıyla 21.77 ± 3.38 mg troloks eşdeğeri (TE)/100 g kuru madde (KM), 69.97 ± 10.85 mg TE/100g KM ve 111.97 ± 9.17 mg TE/100g KM olarak elde edilmiştir. Sonuçlara göre, fenolik ve flavonoid madde miktarı en fazla aseton bazlı özütten sırasıyla 12.10 ± 0.55 mg gallik asit eşdeğeri/100 g KM ve 10.48 ± 0.63 mg rutin eşdeğeri/100 g KM olarak elde edilmiştir. Ayrıca, reçellerin bağırsakta sindirimi neticesinde elde edilen toplam fenol miktarı ve toplam antioksidan miktarlarında (DPPH metoduyla) artış gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Anjelika, reçel, biyoaktif bileşen, geleneksel gıdalar, antioksidan kapasite

**DETERMINATION OF TOTAL PHENOLIC COMPOUND, ANTIOXIDANT CAPACITY
OF THE TRADITIONAL ANGELICA JAM AND THEIR BIOACCESSIBILITY WITH *IN
VITRO* DIGESTIVE MODEL**

ABSTRACT

The aim of this study is to evaluate the functional properties of Angelica jam, a traditional food produced in Bursa, by revealing its bioactive components. In this context, the effect of different extraction methods on total antioxidant capacity, total phenolic and total flavonoid contents and bioavailability of those bioactive components with the *in vitro* digestion model were also investigated. For this purposes, Angelica jam produced according to its traditional method was extracted with three different solvents including 75% methanol containing 0.1% formic acid, 70% acetone containing 0.5% acetic acid, and 70% ethanol. According to the analytical results, the antioxidant capacity of the jams changed with extraction methods and the samples extracted by methanolic solvent showed more antioxidant capacity using DPPH, CUPRAC and ABTS methods, as 21.77 ± 3.38 mg TE/100 g DM, 69.97 ± 10.85 mg trolox equivalent (TE)/100 g dry matter (DM), and 111.97 ± 9.17 mg TE/100 g DM, respectively. Moreover, the highest amount of phenolic and flavonoid contents were obtained from acetone-based extracts as 12.10 ± 0.55 mg gallic acid equivalent/100 g DM and 10.48 ± 0.63 mg rutin equivalent/100 g DM, respectively. Increased total phenol content and total antioxidant levels (by DPPH method) were observed as a result of intestinal digestion of the jam.

Keywords: Angelica, jam, bioactive compounds, traditional foods, antioxidant capacity

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ pyomeroglu@uludag.edu.tr

Tel: (+90) 224 294 1401

Fax: (+90) 224 294 1402

Elif Koç; ORCID no: 0000-0001-8315-6411

Perihan Yolcu Ömeroğlu; ORCID no: 0000-0001-8254-3401

GİRİŞ

Kültürel mirasın bir parçası olan geleneksel gıdalar, bir yörenin iklimi, coğrafyası, geleneksel gıda işleme yöntemleri ve beslenme biçimleri hakkında bilgi veren önemli değerleridir. Nesilden nesile aktarılacak kültürel bir miras haline gelen geleneksel gıdalar sağlıklı ve lezzetli olmalarının yanında, buldukları bölgenin ihracat potansiyelini artırarak bölge ekonomisine katkı sağlamaktadır (Trichopoulou vd., 2006). Türkiye'nin zengin meyve ve sebze çeşitliliğinin bir sonucu olarak, geleneksel gıdaları arasında reçeller de bulunmaktadır. Anjelika (melek otu) reçeli, Bursa'ya ait unutulmaya yüz tutmuş geleneksel ürünler arasında sıralanmıştır (Koç ve Yolcu Ömeroğlu, 2019).

Türk Gıda Kodeksi (TGK) Reçel, Jöle, Marmelat ve Tatlandırılmış Kestane Püresi Tebliği'nde reçeller; reçel, ekstra reçel, geleneksel reçel ve ekstra geleneksel reçel olmak üzere dört farklı grupta sınıflandırmaya tabi tutulmuştur (Anonim, 2006). TGK'ne göre ekstra geleneksel reçel, en az %68 oranında çözünür kuru madde ve %45 oranında meyve içermektedir. Koç ve Yolcu Ömeroğlu (2019), geleneksel Anjelika reçelinin fizikokimyasal ve duyuşsal özelliklerini ortaya koymuş ve mevzuatta belirtilen kriterlere uygunluk gösterdiğinden dolayı "ekstra geleneksel" sınıfında yer aldığını kanıtlamıştır.

Anjelika reçeli, Uludağ'ın eşsiz bitki örtüsünde nadir bulunan bir bitki olan *Angelica sylvestris* gövdesi (melek otu) ile üretilmektedir (Akkor, 2009). Maydanozgiller familyasının bir üyesi olan *Angelica sylvestris*, uzunluğu 2 m'ye yaklaşan çok yıllık bir bitkidir. *Angelica sylvestris* genellikle sulak alanlarda, nemli ve gölgeli yerlerde yetişmekte olup Avrupa ve Asya'nın ılıman ülkelerinde görülmektedir. Çiçekleri açık formda ve çok katmanlı şemsiye şeklinde olan bu bitkinin yaprakları, yeşilimsi veya beyaza yakın toz pembe renktedir (Stpiczynska vd., 2015). Bu familyanın Türkiye'de yetişen iki çeşidinden biri olan *Angelica sylvestris* endemik bir tür olarak bilinmektedir ve Bursa Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herberiyumu'nda 26232 sayı ile kayıt altına alınmıştır (Daşkın ve Kaynak, 2012).

Uzak Doğu başta olmak üzere pek çok ülkede geleneksel tıpta kullanılan *Angelica sylvestris*; bronşit, astım, grip ve solunum, vasküler ve sindirim sistemlerinde görülen hastalıkların tedavisinde antibakteriyel ajan görevi görmektedir (Stankovic vd., 2016). Gıda ve ilaç olarak kullanımının yanı sıra Avrupa'da kadınlar için bir besin takviyesi olarak da kullanıldığı bilinmektedir (Wei vd., 2016). Antioksidanlar, serbest radikalleri nötralize ederek oksidasyonu engelleyen ve bu sayede bağışıklık ve sinir sistemi ile kalp damar hastalıklarında koruyucu etkileri olan biyoaktif maddelerdir. Stankovic vd. (2016) yaptığı çalışmada *Angelica sylvestris*'in antioksidan bileşikler içerdiğini ortaya koymuştur. *Angelica* cinsinin çeşitli türlerinde ve aynı zamanda *Apiaceae* (maydanozgiller) familyasında görülmekte olan kumarinler, steroller ve fenolik asitler hakkında kapsamlı çalışmalar mevcuttur (Wei vd., 2016). Antioksidan bileşiklerin analizleri için etkin bir şekilde spektrofotometrik ve kromatografik yöntemler kullanılmaktadır (Rice-Evans vd., 1997; Apak vd., 2004; Kumaran ve Karunakaran, 2006; Kamiloğlu, 2019a). Bu yöntemlerin ilk aşamasında, bu bileşenlerin numuneden etkin bir şekilde özütlenmesi gerekmektedir. Özütleme çözücüsü, sıcaklık, katı-sıvı oranı ve partikül büyüklüğü, özütleme işlemini etkileyen önemli parametrelerdir (Qu vd., 2010).

Gıdayla alınan biyoaktif bileşenlerin sağlık üzerindeki etkilerini gösterebilmeleri için; yeme sonrasında gıda matriksinden serbest bırakılması, mide-bağırsak sisteminde biyoerişilebilir olması (gıda matriksinden salınım ile daha sonraki alım ve emilim için elverişli olan form) ve etki göstereceği hedef bölgeye ulaşması, yani bir başka deyişle, biyoyararlı olması gerekmektedir (Manach vd., 2005). Gıda ve beslenme arasındaki ilişkinin anlaşılabilmesi için sağlık ile ilgili gıda bileşenlerinin biyoyararlılıklarının ve biyoerişilebilirliklerinin değerlendirilmesi önemlidir (Fernandez-Garcia vd., 2009). Bu bağlamda, insan sindirim sistemini simüle eden *in vitro* yöntemler; hızlı ve güvenilir olmaları, uygulama koşullarının standardize edilebilir olması ve (*in vivo* yöntemler için bir dezavantaj olan) etik kurallar nedeni ile kısıtlamaların olmaması gibi avantajlı yönleri sayesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (You vd.,

2010). Reçel yapımında meyvelere uygulanan kesme, ezme (parçalama) ve kaynatma (ısı işlem uygulaması) prosesleri, farklı antioksidan grubu bileşenler açısından zengin bileşenlerin (meyve, baharat, limon suyu, vb.) birlikte kullanımı, şeker ilavesi gibi, biyoerişilebilirlik ve biyoyararlılık üzerine etkili olabilecek, çok sayıda faktör bir arada bulunmaktadır (Kamiloğlu vd., 2015; Tomas vd., 2017).

Osmanlı döneminde macun yapımında kullanılan bu bitki ve reçeli günümüzde pek fazla bilinmemektedir. Bu bağlamda, literatüre bakıldığında *Angelica sylvestris*'in antimikrobiyal (Canlı vd., 2016), fizikokimyasal ve duyuşal özellikleri (Koç ve Yolcu Ömeroğlu, 2019) ile ilgili çalışmaların olduğu; fakat bu bitkinin gövde kısmından üretilen geleneksel reçelin biyoaktif bileşen miktarının ve bunların biyoerişilebilirliğinin tanımlanmadığı görülmüştür. Bu çalışmadaki amacımız; Bursa'da geleneksel olarak üretilen ancak unutulmaya yüz tutmuş Anjelika reçelinin içerdiği biyoaktif bileşenlerini tanımlamak (toplam antioksidan, toplam fenol ve toplam flavonoit olarak), farklı özütleme yöntemlerinin biyoaktif bileşenlerine olan etkisini ve standartlaştırılmış *in vitro* gastrointestinal sindirim modeli kullanarak bu bileşenlerin biyoerişilebilirliğini incelemektir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Reçel Üretimi ve Numune Hazırlama

Anjelika reçeli, Bursa'da bulunan tek yerel üreticisinin (Ulus Pastanesi) yıllardır süregelen geleneksel formülüne uygun olarak üretilmiştir. Reçelin hammaddesi olan *Angelica sylvestris*, üretimin yapıldığı 2017 yılın Mayıs-Haziran aylarında Uludağ'ın eteklerindeki dağ köylerinde yaşayan çiftçiler tarafından el ile hasat edilerek, reçel üretiminde kullanılan gövdeleri, kök ve çiçeklerinden ayrılmış bir şekilde poliüretan torbalarda 1-2 gün içerisinde ulaştırılmıştır. Gövde kısımlarındaki ince kabuklar ayrılıp, yüzük şeklinde (yaklaşık 30 mm çapında ve 10 mm kalınlığında) kesilip reçel üretimine hazır hale getirilmiştir. Şeker ve su 2:1 (w/w) oranında, şurup elde etme amacıyla açık kazanda kaynamaya (koyulaştırma) bırakılmıştır. Bu sırada şeker ile ağırlıkça aynı miktardaki bitki de eklenerek reçel

kıvamı elde edilinceye kadar kaynatma devam ettirilmiştir. Kaynatma (koyulaştırma) işlemi sonlandırılmadan önce reçele asit ilavesi olarak sitrik asit (1 kg reçele 1 g olacak şekilde) eklenmiştir. Son aşamada cam kavanozlara sıcak dolum yapıp, kapağı kapatıldıktan sonra ters çevirilerek soğumaya bırakılmıştır (Akkor, 2009). Şekil 1'de Anjelika reçelinin geleneksel üretim akış şeması yer almaktadır.

Bu çalışmada kullanılan Anjelika reçelinin fizikokimyasal ve duyuşal özelliklerini Koç ve Yolcu Ömeroğlu (2019) yaptıkları çalışma sonucunda ortaya koymuştur. Yapılan çalışmada, Anjelika reçelinin meyve ağırlığı oranının %45.83, pH'nın 3.72 ve refraktrometre ile tayin edilen suda çözünür kuru madde miktarının %72.24 olduğu belirtilmiştir. Üretilen reçeller analizler gerçekleştirilene kadar 4 °C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Analizlerden önce, reçel numuneleri değirmen (IKA, Almanya) yardımıyla sıvı azot içerisinde ince bir toz halinde öğütülmüş ve analizlere kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Kimyasallar

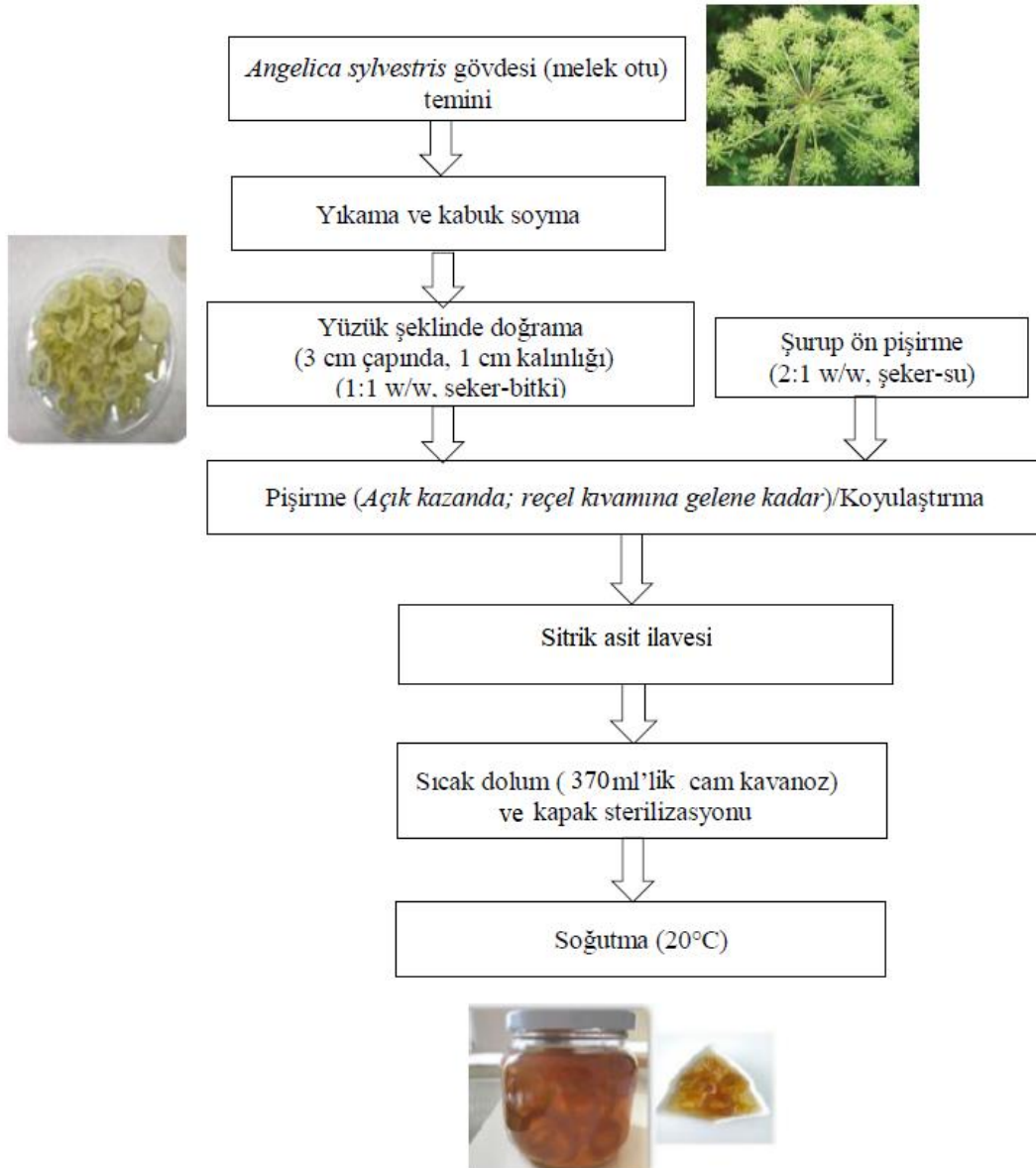
Analizlerde kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya) ve Merck (Darmstadt, Almanya) firmalarından temin edilmiştir. Tüm analizlerde damıtık su cihazından elde edilen damıtık su kullanılmıştır (IKA GenPure).

Sindirilmemiş Numunelerin Özütlenmesi

Geleneksel olarak üretilen Anjelika reçelinden antioksidan bileşiklerin doğru bir şekilde özütlenmesi için A-metanol:formik asit:su (75/0.1/24.9, v/v) (Çapanoğlu vd., 2008), B-etanol:su(70:30, v/v) (Perk vd., 2016), C-aseton:asetik asit:su (70:0.5:29, 5, v/v) (Kamiloğlu vd., 2015; Kamiloğlu, 2019a), C-etanol:su (70:30, v/v), olmak üzere 3 farklı yöntem kullanılmıştır. 1.00±0.01 g toz halinde öğütülmüş numune uygun bir behere alınarak üzerine 5 mL özütleme çözeltileri eklenmiş, 1 dakika vortekslenildikten (IKA VorteksGenius 3, IKA®-WerkeGmbH&CO.KG, Almanya) sonra 15 dakika su banyosunda (Memmert/WNB 22, Almanya) bekletilmiştir. Daha sonra 5000 rpm, 4°C'de 10 dakika santrifüj (Sigma 2-16PK,

Almanya) edildikten sonra üst faz temiz bir falkon tüpüne aktarılarak, dibe çöken kalıntıya tekrar 5 mL özütleme çözeltisi ilave edilmiş ve ilk aşamada yapılan işlemler tekrarlanmıştır. Birleştirilen özütler analize kadar falkon tüpü içerisinde

-20°C'de saklanmıştır. Her bir özütleme yönteminden elde edilen özütlerin toplam antioksidan kapasite, toplam fenolik ve toplam flavonoit madde miktarları spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.



Şekil 1. Anjelika reçeli (Başer, 2014; Koç ve Yolcu Ömeroğlu, 2019).
Figure 1. Angelica jam (Başer, 2014; Koç and Yolcu Ömeroğlu, 2019).

***In vitro* Gastrointestinal Sindirim Modeli**

In vitro gastrointestinal sindirim için, Minekus vd. (2014) tarafından ilgili fizyolojik koşullara uygun olarak geliştirilerek standart hale getirilmiş *in vitro* sindirim modeli uygulanmıştır. Bu model, ağız, mide ve ince bağırsaktaki sindirimi simüle eden üç aşamadan oluşmaktadır. Tüm bu aşamaların detayları Kamiloğlu (2019b) tarafından detaylı olarak ele alınmıştır. Birinci basamakta, ağızdaki sindirimi simüle etmek için, 5.00 ± 0.01 g öğütülmüş numune, tükürük sıvısı (değişik derişim ve hacimlerde karıştırılan potasyum klorür, monopotasyum fosfat, sodyum bikarbonat, magnezyum klorür hegzahidrat, amonyum karbonat ve hidroklorik asitten oluşmaktadır; pH 7.0), α -amilaz enzimi, kalsiyum klorür ve damıtık su ile karıştırılarak 37°C'deki çalkamalı su banyosunda 2 dakika süre ile inkübe edilmiştir. İkinci basamakta, midedeki sindirimin simülasyonu için, ağız sindirimi simülasyonundan alınan numune, mide sıvısı (değişik derişim ve hacimlerde karıştırılan potasyum klorür, monopotasyum fosfat, sodyum bikarbonat, sodyum klorür, magnezyum klorür hegzahidrat, amonyum karbonat ve hidroklorik asitten oluşmaktadır; pH 3.0), pepsin enzimi ve kalsiyum klorür ile karıştırılmış ve pH değeri hidroklorik asit ile 3.0 değerine ayarlanmıştır. Sonrasında 37°C'deki çalkamalı su banyosunda 2 saat süre ile inkübe edilmiştir. Üçüncü basamakta, bağırsak sindirimini simülasyonu için, mideden gelen numune, bağırsak sıvısı (değişik derişim ve hacimlerde karıştırılan potasyum klorür, monopotasyum fosfat, sodyum bikarbonat, sodyum klorür, magnezyum klorür hegzahidrat ve hidroklorik asitten oluşmaktadır; pH 7.0), pankreatin enzimi, safra ve kalsiyum klorür ile karıştırılmış ve pH değeri sodyum hidroksit ile 7.0 değerine ayarlanmıştır. Bağırsaktan emilen ve atılan kısımların ayrı ayrı gözlemlenebilmesi için bağırsak sıvıları eklendikten sonra diyaliz poşetlerinin içerisine 20 mL NaHCO₃ çözeltisi konularak diyaliz poşetleri bağırsak sıvısının bulunduğu behere konmuştur (beherden diyaliz poşetlerine geçen kısım bağırsaktan emilen kısmı-IN, beherde kalan kısım ise bağırsaktan atılan-OUT kısmı temsil etmektedir). Bağırsak sıvılarının ve diyaliz poşetlerinin içinde bulunduğu beher 37°C'deki çalkamalı su banyosunda yine 2 saat

süre ile inkübe edilmiştir. Ağız, mide ve bağırsak sindirimi (emilen ve atılan ayrı ayrı) aşamalarından sonra 2 mL numuneler alınarak pH'ları 2'ye ayarlanmış ve +4°C sıcaklıkta 23000 g hızında 5 dk santrifüjlenmiş ve üstte kalan sıvı kısım analiz edilmek üzere toplanmıştır. Bu numunelerde toplam antioksidan kapasite, toplam fenol ve flavonoit analizleri spektrofotometrik yöntemlere dayanarak gerçekleştirilmiş ve sindirim sonrası numuneler için elde edilen değerler, başlangıç reçel numuneleri (sindirime uğramamış) için elde edilen değerler ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmalar ile sindirimin ağız, mide ve bağırsak aşamalarından sonra, orijinal reçel numunelerindeki biyoaktif bileşenlerin etkinliğinin ne oranda korunduğu, yani ne kadarının potansiyel olarak biyoerişilebilir (%) olduğu değerlendirilmiştir.

Spektrofotometrik Analizler

Numunelerin toplam antioksidan kapasitesinin tayini için 3 farklı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemler, DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), CUPRAC (Bakır indirgeyici Antioksidan Kapasitesi) ve ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) olarak belirlenmiştir.

CUPRAC yöntemi için (Apak vd., 2004), 100 μ L'lik özütlenmiş numuneler tüpe konulmuş, daha sonra sırasıyla, 1 mL 10 mM CuCl₂.2H₂O çözeltisi, 1 mL 7.5 mM Neocuproine çözeltisi, 1 mL 1 M amonyum asetat (pH=7) çözeltisi ve 1 mL su ilave edilmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra spektrofotometre (Shimadzu UV-1700, Tokyo, Japonya) ile 450 nm'de köre karşı ölçülmüştür. Farklı derişimlerde hazırlanan trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) (10-800 ppm) varlığında Cuprac çözeltisinin absorbansındaki değişimin ölçülmesiyle bir trolox kalibrasyon eğrisi elde edilmiş olup ($R^2 > 0.996$) sonuçlar mg TE/100g KM olarak ifade edilmiştir.

ABTS yöntemi için, 220 mg ABTS'nin 200 mL suda çözülmesiyle elde edilen ABTS çözeltisi, 38 mg potasyum persülfatın 2 mL suda çözülmesiyle elde edilen potasyum persülfat çözeltisi ile muamele edilmiştir (Rice-Evans vd., 1997). Karışım oda

sıcaklığında ve karanlık ortamda bir gece (12 saat) koyu mavi renk oluşana kadar bekletilmiştir. Koyu mavi renkli bu çözelti, 0.05 M fosfat tampon çözelti (pH 8.0 kullanılarak) absorbans 734 nm'de 0.9 ± 0.05 olana kadar seyreltilmiştir. Daha sonra 100 µL özütlenmiş numune ile seyreltilmiş çözülden 1 mL (ABTS çözeltisi) alınarak karıştırılmış ve 1 dk bekletildikten sonra absorbans değeri spektrofotometre ile 734 nm'de ölçülmüştür. Farklı derişimlerde hazırlanan trolox (10-800 ppm) varlığında ABTS çözeltisinin absorbansındaki değişimin ölçülmesiyle bir trolox kalibrasyon eğrisi elde edilmiş olup ($R^2 > 0.996$) sonuçlar mg TE/100g KM olarak ifade edilmiştir.

DPPH yöntemi için, gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra tüplere konulan 100 µL numune özütüne ya da standarda 2 mL 0.1 mM DPPH (1,1-difenil-2- pikrilhidrazil) ilave edilmiştir (Kumaran ve Karunakaran, 2006). Vorteksleme ve 30 dk oda sıcaklığında karanlıkta bekletme sonrasında spektrofotometre ile 517 nm'de saf suya karşı absorbanslar okunmuştur. Farklı derişimlerde hazırlanan trolox (10-800 ppm) varlığında DPPH çözeltisinin absorbansındaki değişimin ölçülmesiyle bir trolox kalibrasyon eğrisi elde edilmiş ($R^2 > 0.996$) olup, sonuçlar mg TE/100g KM olarak ifade edilmiştir.

Toplam fenolik madde analizinde yaygın olarak kullanılan Folin-Ciocalteu yöntemi (Velioglu vd. 1998) kullanılmıştır. Buna göre; 100 µL özütlenmiş numune üzerine %10'luk 0.75 mL Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmiş, 5 dk bekletildikten sonra bu karışıma 0.75 mL (%6'luk) doymuş sodyum karbonat çözeltisi ilave edilerek vortekslenmiştir. Elde edilen karışım oda sıcaklığında 90 dk karanlıkta bekletildikten sonra oluşan rengin absorbansı spektrofotometrede 725 nm'de okunmuştur. Farklı derişimlerde hazırlanan gallik asit (10-800 ppm) varlığında absorbansın ölçülmesiyle bir gallik asit kalibrasyon eğrisi elde edilmiş olup ($R^2 > 0.996$) sonuçlar mg GAE (gallik asit eşdeğeri)/100g KM olarak ifade edilmiştir.

Toplam flavonoid madde içeriği, kolorimetrik olarak Kim vd. (2003)'nin yöntemine göre belirlenmiştir. Bu yöntemine göre; 1 mL özütlenmiş numune gerekli seyreltilmeler yapıldıktan sonra

tüplere konulmuştur. Kronometre ile süre başlatılıp oda sıcaklığında sırasıyla 0.3 mL %5'lik NaNO_2 ($t=0$ dk anında), 0.3 mL %10'luk AlCl_3 ($t=5$ dk anında) ve 2 mL 1M NaOH ($t=6$ dk anında) ilave edilmiştir. En son 2.4 mL su ilave edilerek vortekslenmiş ve spektrofotometre ile 510 nm'de absorbansda okunmuştur. Farklı derişimlerde hazırlanan rutin (10-800 ppm) varlığında absorbansın ölçülmesiyle bir rutin kalibrasyon eğrisi elde edilmiş ($R^2 > 0.996$) olup sonuçlar mg RE (rutin eşdeğeri)/100g KM olarak ifade edilmiştir.

İstatistiksel Analizler

Geleneksel Anjelika reçelinin biyoaktif özelliklerini incelemek için analizler sonrasında elde edilen değerler istatistiksel teknikler kullanılarak yorumlanmıştır. Çalışma kapsamında her deneme (üretim, özütleme, biyoerişilebilirlik modeli, spektrofotometrik analizler) 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler SPSS istatistik programı (versiyon 23.0, SPSS, Chicago, IL, ABD) kullanılarak analiz edilmiştir. Karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey çoklu-karşılaştırma testi yapılarak $P < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. Korelasyon katsayıları (R^2), Microsoft Office Excel 2011 yazılımı (Microsoft Corporation, Redmond, WA, ABD) kullanılarak hesaplanıp veriler ortalama \pm standart sapma olarak rapor edilmiştir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Farklı Özütleme Yöntemlerinin Etkisi

Fizikokimyasal özellikleri Koç ve Yolcu Ömeroğlu (2019) tarafından ortaya konulmuş olan Anjelika reçelinin antioksidan bileşenlerinin sindirilmemiş reçel numunelerinden etkin bir şekilde özütlenmesi için metanol, etanol ve aseton bazlı üç farklı çözgen kullanılmıştır. Her bir özütleme yönteminden elde edilen özütlerle yapılan analizlere ait sonuçlar Çizelge 1'de sunulmuştur.

Toplam antioksidan kapasite analizi için gerçekleştirilen ABTS ve DPPH metanolik ve etanolik bazlı özütlemeler arasında istatistiksel olarak fark olmadığı ($P > 0.05$) fakat aseton özütleme ile elde edilen sonucun bunlardan daha

düşük çıktığı ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu ($P < 0.05$) görülmüştür. CUPRAC metodunda etanol ve aseton bazlı özütleme yöntemleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ($P > 0.05$) ve metanolik bazlı özütlemenin bunlardan farklı olarak en yüksek değeri verdiği görülmüştür. Toplam fenolik madde analizinde ise 3 özütleme metodu da

istatistiksel olarak anlamlı derecede birbirinden farklı olup ($P < 0.05$), en fazla fenolik madde aseton bazlı özütleme yöntemi ile elde edildiği, en az fenolik madde miktarı ise metanol bazlı özütlemekten elde edildiği gözlenmiştir. Benzer gözlemler flavonoid madde miktarında da gözlenmiştir. Ancak en az flavonoid maddenin etanolik özütlemekten elde edildiği gözlenmiştir.

Çizelge 1. Farklı özütleme yöntemlerinin Anjelika reçelinin toplam antioksidan kapasitesi, toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarları üzerine etkisi

Table 1. The effect of different extraction methods on total antioxidant capacity, total phenolic and total flavonoid contents of *Anjelica jam*

	Özütleme yöntemi Extraction method		
	Metanol (A) (metanol:formik asit:su) (75:0.1:24.9 v:v) Methanol (A) (methanol:formic acid:water)	Etanol (B) (etanol:su) (70:30 v:v) Ethanol (B) (ethanol:water)	Aseton (C) (aseton:asetik asit:su) (70:0.5:29.5 v:v) Aseton (C) (aseton:formic acid:water)
Toplam Antioksidan Kapasite (mg TE/ 100 g KM)- Total Antioxidant Capacity (mg TE/ 100 g DM)			
ABTS	111.97±9.17 ^a	110.53±9.88 ^a	96.71±10.13 ^b
CUPRAC	69.97±10.85 ^a	43.43±5.98 ^b	46.43±6.40 ^b
DPPH	21.77±3.38 ^a	19.49±2.11 ^a	7.61±1.03 ^b
Toplam Fenol Madde Miktarı (mg GAE/ 100 g KM)- Total Phenolic Content (mg GAE/ 100 g DM)			
	6.33±1.09 ^c	10.20±1.44 ^b	12.10±0.55 ^a
Toplam Flavonoid Madde Miktarı (mg RE/100 g KM)-Total Flavonoid Content (mg RE/ 100 g DM)=			
	3.87±0.73 ^b	2.59±0.35 ^c	10.48±0.63 ^a

Satır boyunca verilen üst simgeler örnekler arasında anlamlı farklılık olduğunu göstermektedir ($P < 0.05$). Different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

Biyoaktif bileşenleri etkin bir şekilde özütleyebilecek çözümler her gıda için farklıdır (Demir vd., 2019). Bu nedenle gıdaların bileşimine göre en uygun özütleme solventi seçilmesi gerekmektedir. Ayrıca özütlenecek biyoaktif bileşene uygun polaritedeki çözücü seçmek gerekmektedir. Örneğin, sulu aseton çözgeni özellikle yüksek moleküler ağırlıklı polifenollerin özütlenmesinde etkilidir (Türkyılmaz vd., 2017). Özütleme çözümleri, çözümlerin polaritesindeki farklılıklardan dolayı bu çalışmada toplam antioksidan maddelerin, toplam fenolik

maddelerin ve toplam flavonoid maddelerin numunelerden özütlenmesi üzerinde önemli bir etki göstermiştir. Literatüre paralel olarak (Demir vd., 2019) %75 metanol/ %0.1 formik asit/ %24.9 su özütleme yöntemiyle analiz edilen reçel numunelerinin daha fazla antioksidan aktivite gösterdiği görülmüştür. Doğan vd. (2014), yaptıkları çalışmada farklı özütleme çözümleri ile hazırlanan numunelerin fenolik madde miktarının istatistiksel olarak birbirlerinden farklı olduğunu ve en yüksek etkinliğin metanol ile özütleme yönteminde görüldüğünü tespit etmişlerdir.

Ancak yaptığımız çalışmada, toplam fenol ve flavonoit analizlerinde en yüksek sonucu aseton bazlı özütlenme yöntemi vermiştir. Bu durum, numunelerin içerdiği fenoliklerin çeşidine bağlı olması ile açıklanabilir. Ancak aynı özütlenme yöntemiyle tüm biyoaktif madde analizi gerçekleştirilebileceği için bir sonraki çalışmalarda metanolik bazlı özütlenme yönteminin tercih edilmesi önerilebilir.

Toplam antioksidan kapasite, toplam fenolik madde ve toplam flavonoit madde miktarı

Anjelika reçelinin metanolik bazlı özütlenmesi sonucunda sindirilmemiş numunelerin antioksidan kapasitesi ABTS, CUPRAC ve DPPH yöntemiyle sırasıyla 111.97 ± 9.17 mg TE/100 g KM, 69.97 ± 10.85 mg TE/100 g KM ve 21.77 ± 3.38 olarak bulunmuştur (Çizelge 1). En yüksek antioksidan kapasite sonucu ABTS yöntemi ile elde edilmiştir. Antioksidan kapasite analizleri sonucunda ABTS metodunun en yüksek değeri vermesinin ABTS metodunun, hem sulu radikallerin hem de lipit peroksil radikallerinin antioksidan kapasitelerini ölçebilmesinden (Türkyılmaz vd., 2017) ve ABTS radikalının geniş bir pH aralığında kararlılık (Büyüktuncel, 2013) göstermesinden kaynaklı olduğu tahmin edilmektedir. DPPH radikali sadece organik ortamda çözünüp (özellikle alkol ortamında), sulu ortamda çözünemediği için hidrofilik antioksidanların analizinde önemli bir sınırlamadır. Küçük moleküller radikale daha kolay ulaşacağından, daha yüksek antioksidan kapasite değerlerine sahiptirler. Tiyol tipi antioksidanları okside etmek için hızlı bir yöntem olan CUPRAC reaktifinin daha düşük elektrot potansiyeline sahip olması nedeniyle, girişime neden olacak basit şekerler ve sitrik asit bu reaktifle okside olmazlar (Büyüktuncel 2013). Bu da reçel gibi şekerli matrikslerde güvenilir sonuç alınmasını sağlamaktadır.

Bileşiklerin antioksidan kapasitelerini belirlemede kullanılan çeşitli analitik yöntemlerde bir antioksidan, seçilen bir ölçme yöntemi ile yüksek antioksidan kapasite gösterirken, aynı antioksidanın diğer bir yöntemle daha düşük bir aktivite gösterebildiği literatürde yer alan çalışmalarda da görülmüştür (Güldiken vd., 2016,

Tomas vd., 2017). Dolayısıyla literatürde yapılan önceki çalışmalarda göz önüne alındığında, gıdalarda antioksidan kapasite ölçümünde farklı prensiplere sahip birden fazla metodun uygulanması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anjelika reçelinin metanolik bazlı özütlenmesi sonucunda sindirilmemiş numunenin toplam fenolik madde ve flavonoit madde miktarı sırasıyla 6.33 ± 1.09 mg GAE/100 g KM ve 3.87 ± 0.73 mg RE/100g KM olarak tespit edilmiştir. Stankovic vd. (2016) geleneksel şifalı bitkilerin antioksidan ve antibakteriyel özellikleriyle ilgili yaptıkları çalışmada, *Angelica sylvestris*'in polifenol ve flavonoit içeriğinin diğer bitkilere göre daha düşük çıktığını belirtmişlerdir. Bununla birlikte; reçel ve marmelat işlenmesi sırasında hücre yapısının bozulması ve hammaddenin enzimatik olmayan oksidasyona yatkın hale gelmesinden dolayı fenolik bileşenlerin azaldığını belirten çalışmalar da literatürde mevcuttur (Tomas vd., 2017).

***In vitro* gastrointestinal sindirim modeli**

In vitro gastrointestinal sindirimin Anjelika reçelinin biyoaktif bileşen madde içeriği üzerine etkileri Çizelge 2'de verilmiştir.

Anjelika reçelinin toplam fenol ve flavonoit miktarına, ağız sonrası sindirimin etkisi incelendiğinde, toplam fenol miktarının ihmal edilebilir düzeyde değiştiği (%1.5) ve toplam flavonoit miktarlarının %44 arttığı gözlenmiştir. Bu durum; düşük miktarlarda gerçekleştirilen ölçümlerin doğal hatası olarak açıklanabilir. Toplam antioksidan kapasitesine etkisi incelendiğinde ise, ağız sonrası sindiriminden sonra ölçülen antioksidan kapasitesinin sindirilmemiş numunenin antioksidan kapasitesine oranla %100'e varan oranda düşük çıktığı gözlenmiştir. Kamiloğlu (2019a) bu durumu ağız sindirimi için uygulanan inkübasyon süresinin (2 dk) bu bileşenlerin gıda matrisinden salınımı için yeterli olmadığı şeklinde açıklamıştır. Dolayısıyla, 2 saatlik bir inkübasyon gerektiren mide sindirim modeli süresince, ortam pH'sı ve enzimlerin etkisiyle toplam fenol, flavonoit ve DPPH ile ölçülen toplam antioksidan kapasite miktarlarında, sindirilmemiş numunenin

değerlerine göre fazla artış gözlenmiştir. Kamiloğlu (2019b) bu durumu mide sindirimi sırasında gıdadan geçen fenolik özütleme işleminin etkin bir şekilde devam ederken stabilitesini de korumasına bağlamaktadır. Ayrıca literatürde (Doğan vd., 2014), Folin-Ciocalteu metodunun fenolik bileşenler yanında; askorbik asit, sitrik asit, basit şekerler ve bazı amino asitler gibi indirgen bileşenleri de ölçerek, toplam fenolik madde içeriğinin gerçek değerinden fazla ölçülmesine neden olduğu belirtilmiştir. Bu da spektrofotometrik yöntemlerin yanında bu çalışmaların kromatografik analizlerle desteklenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Biyoaktif bileşenler, bağırsakta gerçekleşen sindirim süresinin yeterli olması sonucunda,

ortamda bulunan sıvılar ve enzimler ile parçalanarak açığa çıkmaktadırlar (Tamer, 2018), dolayısıyla bu bileşenlerin toplam antioksidan değerlerinin (ABTS ve CUPRAC) ve toplam fenol miktarlarının, mide sonrası sindirim değerlerine göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Anjelika reçelinin toplam antioksidan kapasitesinin ABTS, CUPRAC ve DPPH metoduyla ölçülmesi sonucu sırasıyla sindirilmemiş numuneye göre %97, %18.89 ve %736 oranında biyoerişilebilirlik oranına sahip olduğu (geri kazanım) gözlenmiştir. Toplam fenol miktarı ise %211 oranında geri kazanılmıştır. Toplam flavonoid miktarı ise bağırsak sonrası sindirimde ihmal edilir düzeyde saptanmıştır.

Çizelge 2. *In vitro* gastrointestinal sindirim sırasında toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde ve toplam antioksidan kapasitede meydana gelen değişimler

Table 2. Changes in total phenolic content, total flavonoid content and total antioxidant capacity during *in vitro* gastrointestinal digestion

Sindirilmemiş (Metanol özüt)-S <i>Undigested</i> (<i>Methanolic</i> <i>extract</i>)-UD	Ağız <i>Mouth</i>	Mide <i>Stomach</i>	Bağırsakta Emilen-IN <i>Dialysable fraction-</i> <i>IN</i>	Bağırsaktan Atılan-OUT <i>Undialysable</i> <i>fraction-IN</i>	Geri Kazanım, % (S/IN) x100 <i>Recovery, %</i> (UD/IN) x100
Toplam Antioksidan Kapasite (mg TE/ 100 g KM)- <i>Total Antioxidant Capacity (mg TE/100 g DM)</i>					
ABTS					
111.97±9.17 ^b	te-nd	43.53±1.07 ^c	110.10±3.73 ^b	233.26±17.56 ^a	97
CUPRAC					
69.97±10.85 ^a	2.30±0.30 ^d	11.06±1.43 ^c	13.22±1.42 ^c	21.44±1.59 ^b	19
DPPH					
21.77±3.38 ^c	10.70±1.70 ^d	252.04±6.92 ^a	160.47±68.95 ^b	131.12±22.25 ^b	736
Toplam Fenol Madde Miktarı (mg GAE/ 100 g KM)- <i>Total Phenolic Content (mg GAE/ 100 g DM)</i>					
6.33±1.09 ^d	6.40±1.60 ^d	11.03±0.85 ^c	13.39±0.93 ^b	17.12±1.34 ^a	211
Toplam Flavonoid Madde Miktarı (mg RE/ 100 g KM)- <i>Total Flavonoid Content (mg RE/100 g DM)</i>					
3.87±0.73 ^c	5.51±0.53 ^b	13.21±2.95 ^a	0.35±0.06 ^d	0.51±0.05 ^d	9

Bu çizelgede gösterilen veriler 3 tekrarlı olarak temin edilen numunelerde yapılan ölçümlerin ortalama ± standart sapma değerleridir. Satırlardaki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları temsil etmektedir ($P < 0.05$). te: tespit edilemedi.

Data presented in this table represents average values ± standard deviation of 3 batches. Different letters in the rows represent statistically significant differences (P < 0.05). nd: not detected

Sonuç olarak, Bursa'ya ait geleneksel bir reçel olan Anjelika reçeli ile yapılan bu çalışmada, antioksidan aktivite analizlerinde %75'lik metanol özütlemenin diğer çözümlere göre en verimli sonuçları verdiği ve antioksidan kapasitelerinin

özütleme yöntemine göre farklılık gösterdiği görülmüştür. Yapılan analiz sonuçlarına göre, tek bir antioksidan kapasite ölçüm metodu kullanmasının tatmin edici bir değerlendirme yapılmasına olanak sağlamayacağı sonucuna

varılmıştır. Bu nedenle ölçümlerinde farklı mekanizmalara sahip birden fazla metodun kullanılması önerilmektedir. Anjelika reçelinin biyoaktif bileşenler içermesinin tüketiciler tarafından talebi arttıracığı ve bu sayede unutulmaya yüz tutmuş Anjelika reçelinin tanınırlığının artarak katma değeri olan geleneksel ürünler içerisinde yer alacağı beklenmektedir. Gıdalarda bulunan biyoaktif bileşenlerin biyoerişilebilirliklerini, gıda işlemede kullanılan kesme-parçalama, kurutma, ısıtma işlem gibi uygulamalar pozitif ve negatif yönde etkilemektedir. Dolayısıyla *Angelica sylvestris* gövdesinin sahip olduğu biyoaktif bileşenlerin ortaya konulması, bu bileşenlere reçele işleme sürecinin etkisinin irdelenmesi, bu bağlamda reçelde üretim ve depolama koşullarının optimize edilmesi, gelecekte yapılacak çalışmalarda detaylı bir şekilde ele alınmalıdır. Ayrıca, Anjelika reçelinin geleneksel özelliklerinin korunmasının yanı sıra ticari boyutta üretilmesi için yöntemlerin araştırılması ve ürün çeşitliliğinin ve fonksiyonelliğinin artırılması için reçetenin düzenlenmesi de bir sonraki çalışmalarda ele alınması gereken konulardır.

TEŞEKKÜR

Çalışma kapsamında hammaddelerin temini sürecindeki katkı ve desteklerinden dolayı Ulus Pastanesi'ne içten teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

Akkor, M.Ö. (2009). Bursa Yemeği. İş Bankası Kültür Yayınları, İstanbul, Türkiye, 357 s. ISBN: 978994-488-59-5-9.

Anonim (2006). Türk gıda kodeksi. Reçel, jöle marmelat ve tatlandırılmış kestane püresi tebliği. (2006/55). Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. 30 Aralık 2006 tarih ve 26392 sayılı Resmi Gazete, Ankara.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agric. Food Chem*, 52(26): 7970–7981.

Başer, K.H.C. (2014). Melekotu (*Angelica archangelica* L.). *BağBahçe*, 56: 28-29.

Büyüktuncel, E. (2013). Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler. *Marmara Pharm J*, 17: 93-103.

Canlı, K., Yetgin, A., Akata, I., Altuner, E.M. (2016). Invitro antimicrobial activity of *Angelica sylvestris* roots. *Int J Biol Sci*, 1: 1-7.

Çapanoğlu, E., Beekwilder, J., Boyacıoğlu, D., Hall, R., De Vos, R. (2008). Changes in antioxidant and metabolite profiles during production of tomato paste. *J Agric Food Chem*, 56: 964-73.

Daşkın, R., Kaynak, G. (2012). *Angelica archangelica* (Apiaceae), a new species to Turkey: a contribution to its taxonomy and distribution. *Phytologia Balc*, 18(1), 5-9

Demir, T., Akpınar, Ö., Kara, H., Güngör, H. (2019). Nar (*Punica granatum* L.) kabuğunun in vitro antidiyabetik, antiinflamatuar, sitotoksik, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi. *Akademik Gıda*, 17(1): 61-71.

Doğan, C., Doğan, N., Çelik, Ş. (2014). Farklı solventlerle ekstrakte edilen ceviz dış kabuklarının bazı biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi. *Harran Tar Gıda Bil Derg*, 18(3): 41-47.

Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., Pérez-Gálvez, A. (2009). *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutr Res*, 29: 751-760.

Güldiken, B., Memis, K.N., Okur, S., Boyacıoğlu, D., Çapanoğlu, E., Toydemir, G. (2016). Home-processed red beetroot (*Beta vulgaris* L.) products: changes in antioxidant properties and bioaccessibility. *Int J Mol Sci*, 17: 858- 871.

Kamiloğlu, S., Pasli, A., Ozcelik, B., Van Camp, J., Capanoğlu, E. (2015). Influence of different processing and storage conditions on *in vitro* bioaccessibility of polyphenols in black carrot jams and marmalades. *Food Chem*, 186: 74-82.

Kamiloğlu, S. (2019a). Bireysel ve hızlı dondurma işlemi basamaklarının Granny Smith elmaların polifenol içeriği ve antioksidan kapasitesine etkileri. *Akademik Gıda*, 17(1): 38-46.

- Kamiloğlu, S. (2019b). Taze ve dondurulmuş elmalarda ve elma posasında polifenol biyoerişilebilirliğinin değerlendirilmesi. *GIDA*, 44(3): 409-418.
- Kim, D.O., Jeong, S.W., Lee, C.Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem*, 81: 321–326.
- Koç, E., Yolcu Ömeroğlu, P. (2019). Geleneksel Anjelika (Melek Otu) Reçelinin Fizikokimyasal ve Duyusal Özellikleri. *Akademik Gıda*, 17(4): 485-496.
- Kumaran, A., Karunakaran, R.J. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chem*, 97(1): 109-114.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Remesy, C. (2005). “Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies”. *Am J Clin Nutr*, 81: 230-242.
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T.O.R.S.T.E.N., Bourlieu, C., Dufour, C. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food—an international consensus. *Food Funct*, 5(6): 1113-1124.
- Qu, W., Pan, Z., Ma, H. (2010). Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. *J Food Eng*, 99: 16–23.
- Perk, A.A., Ceylan, F.D., Yanar, O., Boztaş, K., Çapanoğlu, E. (2016). Investigating the antioxidant properties and rutin content of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves and branches. *Afr J Biotech*, 15(5): 118-124.
- Rice-Evans, C., Miller, N., Papanga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci*, 2(4): 152-159.
- Stanković, N., Mihajilov-Krstev, T., Zlatković, B., Stankov-Jovanović, V., Mitić, V., Jović, J., Čomić, L., Kocić, B., Bernstein, N. (2016). Antibacterial and antioxidant activity of traditional medicinal plants from the Balkan Peninsula. *NJAS - Wageningen J Life Sci*, 78: 21–28.
- Stpiczynska, M., Nepi, M., Zych, M. (2015). Nectaries and male-biased nectar production in protandrous flowers of a perennial umbellifer *Angelica sylvestris* L. (Apiaceae). *Plant Syst Evol*, 301: 1099-1113.
- Tamer, C.E. (2018). A Research on the production of green coffee beverage fortified with apricot pulp. *GIDA*, 43(5): 800-811.
- Tomas, M., Toydemir, G., Boyacioglu, D., Hall, R.D., Beekwilder, J., Çapanoğlu, E. (2017). Processing black mulberry into jam: effects on antioxidant potential and *in vitro* bioaccessibility. *J Sci Food Agric*, 97(10): 3106-3113.
- Trichopoulou, A., Vasilopoulou, E., Georga, K., Soukara, S., Dilis, V. (2006). Traditional foods: why and how to sustain them. *Trends Food Sci Technol*, 17: 498–504.
- Türkyılmaz, M., Tağı, Ş., Özkan, M. (2017). Effects of extraction solvents on polyphenol contents, antioxidant and antibacterial activities of pomegranate parts. *Akademik Gıda*, 15(2): 109-118.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J Agric Food Chem*, 46: 4113-4117.
- Wei, W.L., Zeng, R., Gu, C.M., Qu, Y., Huang, L.F. (2016). *Angelica sinensis* in China-A review of botanical profile, ethnopharmacology, phytochemistry and chemical analysis. *J Ethnopharm*, 190: 116-141.
- You, Y.S. Yoo, H.G., Yoon, J. Park, Lee, Y.H., Oh, K.T., Lee, J., Cho, H.Y., Jun, W. (2010). *In vitro* and *in vivo* hepatoprotective effects of the aqueous extract from *Taraxacum officinale* (dandelion) root against alcohol-induced oxidative stress. *Food Chem Toxicology*, 48: 1632-1637.

DOĞAL MAYALARIN YAYGIN PATOJENLER ÜZERİNDEKİ İNİHİTÖR ETKİLERİ

Tuba Büyüksırt Bedir*, Hakan Kuleaşan²

¹ Hitit Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Çorum, Türkiye

² Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta, Türkiye

Geliş / Received: 05.08.2019; Kabul / Accepted: 19.01.2020; Online baskı / Published online: 16.02.2020

Büyüksırt Bedir, T., Kuleaşan, H. (2020). Doğal mayaların yaygın patojenler üzerindeki inhibitör etkileri. *GIDA* (2020) 45(1) 182-191 doi: 10.15237/gida.GD19115

Büyüksırt Bedir, T., Kuleaşan, H. (2020). Inhibitory effects of natural yeasts on common pathogens. GIDA (2020) 45(1) 182-191 doi: 10.15237/gida.GD19115

ÖZ

Mayalar, bazı bakteri ve maya türleri üzerinde inhibitör etki göstermektedir. Bu mayaların, gıdalarda bozulma etmeni ve patojen mikroorganizmaların biyokontrolünde kullanılma olanakları araştırılmaktadır. Bu amaçla, mayaların elde edilebilmesi için çok sayıda doğal materyal ve fermente gıdadan izolasyon yapılmıştır. Ön taramalar sonucunda farklı 110 maya suşu izole edilerek saflaştırılmıştır. Elde edilen izolatların *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* ve *Candida albicans* üzerindeki inhibitör etkileri test edilmiştir. İzolatlardan 8 tanesi *M. luteus*, 2 tanesi *E. coli* ve 4 tanesi *C. albicans* üzerinde inhibitör etki göstermiştir. Bunlar üzerinde inhibitör etki gösteren suşlara *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* O157 ve O157:H7, *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica* subsp. Typhimurium üzerinde de inhibisyon testleri uygulanmıştır. İnhibitör etkinin farklı patojenler üzerinde farklı derecelerde olduğu gözlenmiştir. Patojenlere karşı en fazla katil özellik gösteren izolatlar tanımlanmış ve bu izolatların *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia reukaufii* ve *Saccharomyces cerevisiae* oldukları belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyel maya, toksin, duyarlı maya, patojen bakteri

INHIBITORY EFFECTS OF NATURAL YEASTS ON COMMON PATHOGENS

ABSTRACT

Yeasts have an inhibitory effects on certain bacterial and yeast species. The possible use of these yeasts on biocontrol of food-spoilage and pathogenic microorganisms was investigated. In order to obtain yeast isolates, various natural materials and fermented foods were used. As a result of preliminary screening, 110 different yeast strains were isolated. The inhibitory effects of the isolates on *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* and *Candida albicans* were tested. Eight of the isolates on *M. luteus*, 2 of them on *E. coli* and 4 of the isolates on *C. albicans* showed inhibitory effect. Strains which exhibit inhibitory effects on these 3 indicator microorganisms were also tested against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* O157 and O157: H7, *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica* subsp. Typhimurium. Isolates which have greatest killer feature and these were determined as *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia reukaufii* and *Saccharomyces cerevisiae*.

Keywords: Antimicrobial yeast, toxin, sensitive yeast, pathogenic bacteria

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ tubabuyuksirit@hitit.edu.tr

☎ (+90) 364 227 4533

☎ (+90) 364 227 4535

Tuba Büyüksırt Bedir; ORCID no: 0000-0001-8615-4075

Hakan Kuleaşan; ORCID no: 0000-0002-0893-0689

GİRİŞ

Mayaların diğer mikroorganizmaların gelişimini engelleyici etkisi ilk olarak 1909 yılında Hayduck (1909) tarafından ortaya konulmuştur. Bevan ve Makower 1963 yılında bazı *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının aynı türün diğer suşlarına karşı inhibitör bir madde salgıladığını belirlemişlerdir (Polonelli vd., 1983). İlerleyen yıllarda, mayaların diğer mayalara karşı inhibitör etkilerinin, ürettikleri sekonder metabolitlerden kaynaklandığı tespit edilmiştir (Suzuki vd., 2001; Marquina vd., 2002). Mayalar tarafından üretilen bu tip antagonist etkiye sahip metabolitler “mikosin” olarak adlandırılmaktadır.

Mikosinler protein veya glikoprotein yapısındaki maddeler olup, duyarlı olan mayaların gelişimini durdurmaktadır. Mikosin aktivitesi ilk olarak *S. cerevisiae*'da saptanmış, daha sonra yapılan çalışmalarla 20 farklı maya cinsinde mikosin aktivitesi belirlenmiştir (Schmitt ve Breinig, 2002). Mikosin üretimi belirlenmiş başlıca maya cinsleri arasında *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Williopsis* ve *Zygosaccharomyces* yer almaktadır (Young ve Yagiu, 1978; Hodgson vd., 1995; Magliani vd., 1997; Chen vd., 2000; Schmitt ve Breinig, 2002; Dabhole ve Joishy, 2005; Golubev, 2006; Altuntaş ve Özçelik, 2007). İnhibitör etki mekanizmaları henüz tam olarak ortaya konulmamış olmakla birlikte *Aureobasidium*, *Rhodotorula*, *Tremella* ve *Trichosporon* gibi bazı maya cinslerinde de mikosin üretiminin varlığı belirlenmiştir (Carreiro vd., 2002).

Bakteriler tarafından sentezlenen bakteriyosinler için yapılan açıklamalara benzer şekilde, doğal ortamlarda mayaların mikosin üretiminin besin rekabetinde duyarlı mikroorganizmalara karşı bir avantaj sağladığı öne sürülmektedir (Baeza vd., 2008). Mayalardaki bakteri ve küf gelişimini önleyen aktif bileşiklerin organik asitler (heksanoat, oktanoat, ve dekanoat) ve proteinler olduğu belirtilmektedir (Roostita vd., 2011). Bazı *Candida* türleri dahil pek çok maya tarafından ekzotoksinler üretilmektedir. Protein ya da glikoprotein yapısında olan bu toksinler, hücre yüzeyindeki özgül reseptörlere bağlanarak küf, bakteri ve protozoaları öldürebilmektedir

(Çerikcioğlu, 2003; Lopes ve Sangorin, 2010; Liu vd, 2013).

Mayalar tarafından üretilen antimikrobiyal maddelerin kendilerine özgü mekanizmaları, dirençli bakterilere karşı yeni bileşiklerin geliştirilmesinde yeni olanaklar sunmaktadır. Antimikrobiyal peptidler (AMP) pek çok mikroorganizmadan izole edilerek karakterize edilmişlerdir. Bu moleküller duyarlı mikroorganizmaların hücre zarı/duvarı, sitoplazmik yapıları, nükleik asit sentezi, veya metabolizma işleyişini hedef alarak inhibe etmektedirler. (Hou vd., 2011).

Yapılan bir çalışmada elma, yabanmersini, frenk üzümü ve Litvanya'ya özgü kırmızı üzüm şarabından inhibitör etkiye sahip mayalar izole edilmiştir. Çalışmada izole edilmiş suşların inhibisyon mekanizmaları 7 farklı gruba ayrılmıştır. İnhibitör etki gösteren ve yaygın olarak bilinen bazı maya türlerinden farklı mikosinler elde edilerek saflaştırılmıştır. Bu suşların bazılarında endüstriyel olarak kullanılabilme potansiyeline sahip inhibitör maddeler üretilmiş ancak elde edilen aktif bileşen miktarları farklılık göstermiştir. Yapılan genetik çalışmalarda inhibitör maddelerden bazılarının genetik materyalde kodlandığı tespit edilmiş, ancak bazılarının genetik determinantları belirlenmemiştir (Gulbinene vd., 2004).

Hindistan'da yapılan bir çalışmada farmösetik bitkilerin çiçeklerinden inhibitör mayalar izole edilmiş ve bunların ürettiği toksinlerin, fungal patojenlerin yanı sıra duyarlı maya hücreleri üzerindeki etkileri belirlenmiştir. *S. cerevisiae* ve *Pichia kluyveri* toksinlerinin, *Dekkera anomala* hücrelerinin gelişimini engellediği belirlenmiştir. Ancak, hem *S. cerevisiae* hem de *P. kluyveri*'nin, *Aspergillus niger*, *C. albicans* ve *Fusarium* spp. üzerinde engelleyici bir etkisi belirlenmemiştir (Dabhole ve Joishy, 2005).

Mayaların inhibitör özelliklerine bağlı olarak dört ayrı fenotip gösterdikleri belirlenmiştir. Bunlar; inhibitör (K), duyarlı (S), nötral (N), inhibitör-duyarlı (K-S) suşlardır. Katil suşlar kendi toksinine bağışıklı olup, nötral suşlar hem toksin

üretmemekte hem de katil toksinine karşı duyarısız kalmaktadır. İnhibitör-duyarlı suşlar öldürücü faktörlere sahip olup, aynı zamanda diğerkatil mayaların toksinlerine karşı da duyarlı davranmaktadır (Altuntaş ve Özçelik, 2007).

Katil mayaların ürettikleri toksinler farklı mekanizmalar yoluyla duyarlı hücreleri inhibe etmektedirler. Katil mayalarda belirlenmiş bu mekanizmalardan en yaygın olanı toksinin hücre duvarına bağlanarak β -glukan sentezini engellemesi ve hücre membranı boyunca kanallar açarak sitoplazma sıvısının dışarı akmasına neden olması şeklindedir. Ayrıca bu toksinlerin bazıları hedef hücredeki DNA ve tRNA sentezini engelleyerek hücre bölünmesini veya işlevlerini kaybetmesini sağlayabilmektedirler. Yapılan çalışmalarda ortaya konulan son mekanizma da hücre içerisine kalsiyum alımının önlenmesi ile olmaktadır (Izgu ve Altınbay, 2004; Suzuki vd., 2001; Klassen ve Meinhardt, 2005).

Bu çalışmada doğal maya izolatları içerisinden katil maya özelliğine sahip suşların tespit edilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla doğal ortamlar ve fermente gıdalar izolasyon kaynağı olarak kullanılmıştır. Toplanan materyaller farklı besiyerlerine ekilerek elde edilen maya suşlarının geniş bir yelpazeyi temsil etmesi hedeflenmiştir. Yapılan ön incelemelerde farklı olduğu düşünölen suşlar seçilerek saflaştırılmıştır. Elde edilen izolatlar önce *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* ve *Candida albicans* olmak üzere 3 indikatör üzerinde test edilmiştir, ardından bunlar üzerinde inhibitör etki gösteren suşlar daha geniş bir patojen mikroorganizma grubu üzerinde denenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Mayaların İzolasyonu, Seçimi ve Saflaştırılması

Araştırmada yer verilen mayalar yılın farklı zamanlarında meyve, sebze, süt ürünleri, toprak, çiçek, ağaç yaprağı ve kabuk gibi doğal ortamlardan izole edilmiştir. Toplanan materyaller 25 mL FTS (% 0.85 w/v tuz) içerisine konularak çalkalanmış ve üzerlerinde bulunan mayaların sıvıya geçmesi sağlanmıştır. Ardından bu sıvıdan alınan örneklerin farklı besiyerlerine yayma plak yöntemi ile ekimleri yapılmıştır. Mayaların izole

edilmesi amacıyla Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RBCA), Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Sabouraud Dextrose Chloramphenicol Agar (SDCA), Potato Dextrose Agar (PDA) gibi seçici besiyerleri kullanılmıştır. Bakteri gelişimini engellemek için PDA besiyeri bileşimine chloramphenicol antibiyotiğı (5 mg/L) eklenmiştir. 30 °C'de 3 gün inkübasyon sürecinin ardından farklı koloniler seçilerek saflaştırılmıştır. Bu amaçla farklı koloni oluşturan suşlar geliştikleri aynı besiyerleri üzerine tek koloni düşürme tekniğıyle ekilerek saf kültürlerin elde edilmesi sağlanmıştır. Elde edilen saf kültürler YEPD (% 1 Maya Ekstraktı, % 2 Pepton, % 2 Dekstroz) besiyerlerinde geliştirildikten sonra % 20 gliserol ortamında -20 °C'de saklanmıştır.

İzolatların İnhibitör Etkilerinin Belirlenmesi

Koloni morfolojileri ve mikroskopik incelemelerine göre maya olan mikroorganizmalar belirlenmiştir. İzolatların yaygın gıda patojenlerinin üzerindeki etkilerinin belirlenmesinden önce indikatör olarak belirlenmiş üç mikroorganizma üzerindeki inhibitör etkileri belirlenmiştir. İnhibisyon etkisinin belirlenmesine yönelik çalışmalarda agar spot difüzyon testi kullanılmıştır. Kullanılan indikatör bakterilerin ilki bu tip çalışmalarda Gram pozitif indikatör bakteri olarak yaygın bir şekilde kullanılan *M. luteus* olarak belirlenmiştir (Kuleaşan ve Çakmakçı, 2003). Kullanılan diğerk bir indikatör ise Gram negatif bir bakteri olan *E. coli* Tip-P'dir. Maya izolatlarının, yakın türler üzerindeki olası etkilerin belirlenmesi amacıyla da patojen bir maya olan *C. albicans* (ATCC 10231) kullanılmıştır. Bu üç mikroorganizmaya karşı inhibitör etki gösteren suşların belirlenmesinden sonra aynı yöntemle *Staph. aureus* (ATCC 25923), *L. monocytogenes*, *S. cerevisiae*, *Psen. aeruginosa*, *E. coli* O157 ve O157:H7, *B. subtilis*, *S. Typhimurium* üzerinde de inhibisyon testleri uygulanmıştır. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliğı Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. A. Kadir Halkman'ın Gıda Mikrobiyolojisi Kültür Koleksiyonundan temin edilmiştir.

Agar spot difüzyon testinde indikatör olarak kullanılan mikroorganizmalardan *M. luteus* ve *E.*

coli TSB (Triptik Soy Broth, Merck, Almanya), *C. albicans* ise YEPD sıvı besiyerinde 18 saat süre ile inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Difüzyon testi öncesi FTS içerisine alınan kültürlerin yoğunlukları hücre McFarland densitometresi (DEN-1B, Letonya) yardımıyla 0.5 McFarland değerine ayarlanmıştır. Bu değer bakterilerde 1.5×10^8 kob/mL (McFarland J., 1907), mayalarda ise $1-5 \times 10^6$ kob/mL (Arendrup vd., 2014) değerlerine karşılık gelmektedir. 45 °C su banyosunda tutulan tüplerde hazırlanmış TSBA besiyeri içerisine aktif bakteri kültüründen veya YEPDA besiyeri içerisine aktif maya kültüründen %1 oranında karıştırılarak petrilere dökülmüş ve katlaşıncaya dek bekletilmiştir. YEPDA besiyerinin hazırlanmasında zon oluşumunun daha kolay ayırt edilebilmesi için % 0.003 oranında metilen mavisi eklenmiştir (Russell vd., 1986).

Buna paralel olarak test edilecek maya izolatu YEPD sıvı besiyerinde 18 saat süre ile inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Bu kültürden 20 µL alınarak agarlı besiyeri üzerine damlatılarak tek nokta ekim yapılmıştır (Polonelli ve Morace, 1986). *M. luteus* petrilere 30 °C'de 48 saat, *E. coli* Tip-I petrilere 37 °C'de 24 saat ve *C. albicans* petrilere 30 °C'de 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında oluşan zonların ölçümleri yapılmıştır.

Mayaların tanımlanması

Elde edilen izolatların tür düzeyinde tanımlamaları Orta Doğu Teknik Üniversitesi Teknokenti bünyesinde faaliyet gösteren REFGEN şirketinde (Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti.) ABI PRISM 3730XL (Perkin Elmer, Amerika Birleşik Devletleri) marka otomatik gen sekans cihazı kullanılarak yapılmıştır. 18S ribozomal DNA gen dizi benzerliği National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLAST programı kullanılarak tespit edilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmanın ilk aşamasında doğal ortamlardan koloni morfolojisine ve mikroskop görüntülerine göre 110 adet maya suşu izole edilerek saflaştırılmış ve 14 adedi antimikrobiyal etki göstermiştir. İlk inhibisyon aşamasında bu suşlardan inhibitör etki gözlenen 1 ve 84 numaralı izolatlar asma bitkisi sürgünü ve yaprağından, 19 numaralı izolat beyaz üzümünden, 17, 26 ve 30 numaralı izolatlar kırmızı üzümünden, 31 numaralı izolat topraktan, 25, 51, 54 ve 94 numaralı izolatlar peynirden, 27 numaralı izolat çiçekten (süs yoncası), 11 ve 95 numaralı izolatlar ise elmadan izole edilmiştir. İzole edilen suşlardan 8 tanesi *M. luteus* üzerinde, 2 tanesi *E. coli* üzerinde ve 4 tanesi *C. albicans* üzerinde inhibe edici etki göstermiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. İzolatların bazı patojen mikroorganizmalar üzerindeki antagonist etkileri ve zon çapları
Table 1. Antagonist effect of isolates on some pathogenic microorganisms and zone diameters

İzolat No / Isolate Number	<i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i> Tip I	<i>Staph. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i> O157	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. Typhimurium</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Pseu. aeruginosa</i>
1	14.33±0.33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	27.00±1.15	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	30.67±1.45	-	-	-
19	20.67±1.20	-	-	-	-	-	-	-	-	32.33±3.48	-
25	-	-	-	-	-	14.00±0.58	-	18.67±1.76	-	-	14.33±0.33
26	12.00±0.58	16.00±1.15	12.33±0.33	14.67±1.76	11.67±0.33	18.67±1.76	13.67±0.88	20.67±0.88	-	-	17.67±1.20
27	-	13.33±0.33	12.00±0.58	13.67±1.20	12.33±1.86	13.67±1.20	12.67±0.88	23.00±3.21	-	-	13.33±1.45
30	-	10.00±0.58	8.33±0.33	10.00±0.58	12.33±0.33	14.33±0.33	11.67±1.20	24.00±0.58	-	-	14.00±0.58
31	14.33±1.20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	16.33±0.67	-	-	-	-	-	-	-	-	26.33±1.86	-
54	16.66±0.33	-	-	-	-	-	-	-	-	26.67±2.85	-
84	-	11.33±0.67	11.67±0.33	13.00±0.58	14.00±0.58	-	15.00±0.58	26.33±1.86	-	-	-
94	17.33±0.33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
95	18.67±0.88	-	-	-	-	-	-	-	-	21.00±2.52	-

*Zon çapları mm olarak verilmiştir.

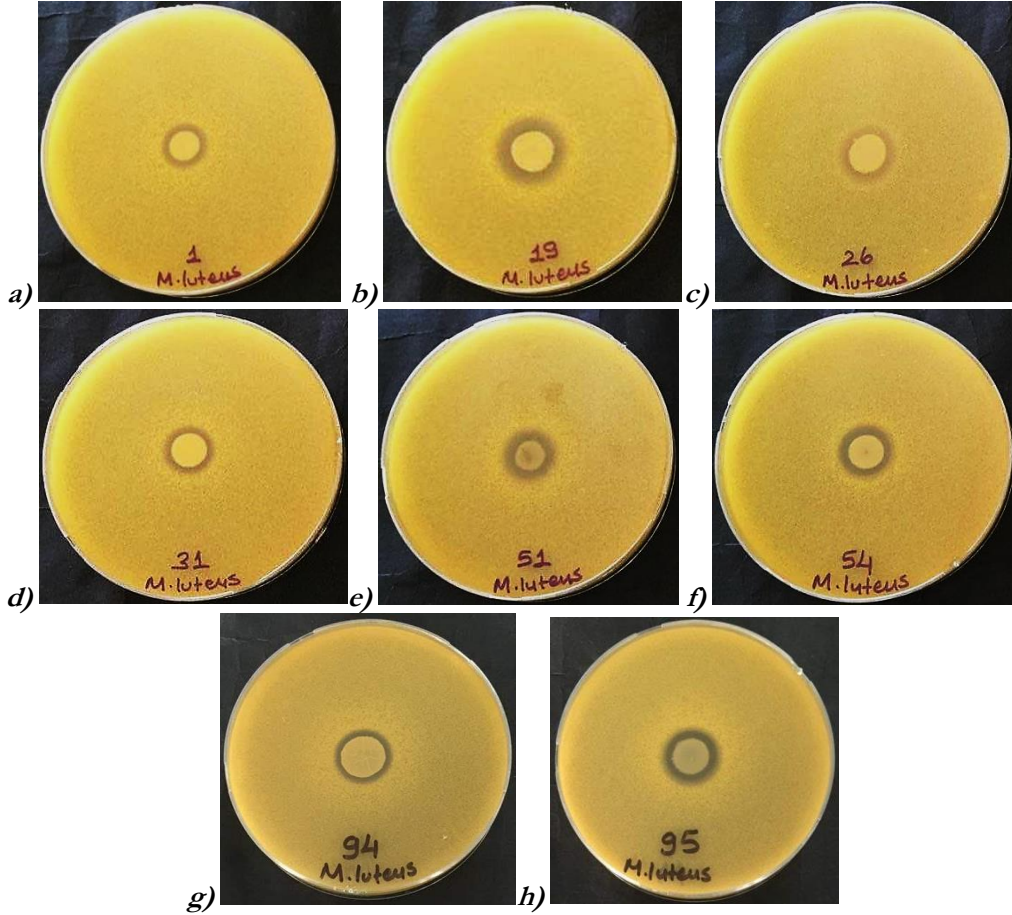
*Zone diameters are given in mm.

** Zon çapları ortalaması ± standart hata 3 tekrerrür ait ortalamaları ifade etmektedir.

** The mean zone diameters ± standard error values represent of triplicates.

İzole edilen mayalardan 8 tanesi *M. luteus* 'a karşı inhibitör etki göstermiştir. Gram pozitif bir bakteri olan *M. luteus* patojen olmamakla birlikte bağışıklık sistemi zayıflamış hastalarda fırsatçı patojen bir mikroorganizmadır (Seifert vd., 1995; Wieser vd., 2002). *M. luteus* 'a karşı zon veren mayalar Şekil 1'de gösterilmiştir. Ochigava vd.

(2011) yaptıkları çalışmada *Hansenula anomala*, *Williopsis mrakii*, *Kluyveromyces drosophylarum*, *Kluyveromyces lactis* ve *Candida tropicalis* türlerinin Gram pozitif patojen veya patojen olmayan bakterilere karşı inhibe edici özellik gösterdiğini tespit etmiştir.



Şekil 1. İzolatların *M. luteus* üzerindeki antagonist etkileri a) 1; b) 19; c) 26; d) 31; e) 51; f) 54; g) 94; h) 95.

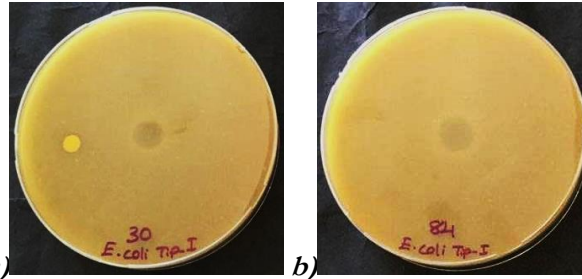
Figure 1. Antagonist effect of isolates on *M. luteus* a) 1; b) 19; c) 26; d) 31; e) 51; f) 54; g) 94; h) 95.

İzole edilen mayalardan 2 tanesi Gram negatif bir bakteri olan *E. coli* Tip-1'e karşı inhibitör etki göstermiştir. *E. coli* Tip 1 patojen olmadığı gibi, vücutta B vitamini sentezine katıldığı için yararlı olarak dahi nitelendirilmektedir. Ancak herhangi bir ortamda *E. coli* Tip 1'in bulunması bağırsak kökenli diğer patojenlerin de olabileceği potansiyelini göstermektedir (Halkman, 2011). *E. coli*'ye karşı zon veren mayalar Şekil 2'de gösterilmiştir. Polonelli ve Morace (1986) yaptıkları çalışmada, 36 *Hansenula*, *Pichia*,

Saccharomyces ve *Candida* cinsinin, bakteri ve mayalara karşı inhibe edici etkisini araştırmıştır. *E. coli*'nin de içinde bulunduğu 11 bakteri suşuna karşı test edilmiştir. Daha önce mayalarla sınırlı olduğu düşünülen katil özelliğinin bakterilere karşı da etkili olduğu ilk defa belirlenmiştir. Chen vd. (2015) yaptıkları çalışmada kısırak sütünün fermentasyonu ile elde edilen Kırmız'dan 3 adet *S. cerevisiae* ve 2 adet *Kluyveromyces marxianus* suşunu izole etmişlerdir. Bu maya suşlarının ürettikleri mikosinin *E. coli*'ye karşı antibakteriyel etkisi

olduğu belirlenmiştir. Yapılan bir başka çalışmada da çiftlik hayvanlarının ürünlerinden mayalar izole edilmiştir. Mayaların antimikrobiyal aktivitesi *Psen. aeruginosa*, *Staph. aureus* ve *E. coli*'ye karşı agar spot difüzyon yöntemi ile test edilmiştir. Meyveli

yoğurt isolatları *Psen. aeruginosa*'ya karşı yüksek oranda (35 mm), *Staph. aureus* ve *E. coli*'ye karşı orta derecede antimikrobiyal etki göstermiştir. Bu izolatin *Candida parapsilosis* olduğu belirlenmiştir (Roostita vd., 2011).

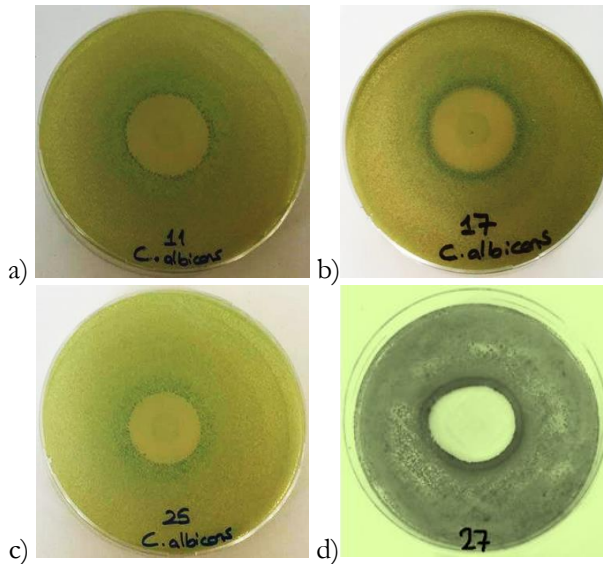


Şekil 2. İzolatların *E.coli* üzerindeki antagonist etkileri a) 30; b) 84.

Figure 2. Antagonist effect of isolates on *E. coli* a) 30; b) 84.

Bu çalışma kapsamında izole edilen mayalardan 4 tanesi *C. albicans*'a karşı inhibitör etki göstermiştir. *C. albicans*'a karşı zon veren mayalar Şekil 3'te gösterilmiştir. *C. albicans*, toprak ve bitkilerde de bulunmakla birlikte esas kaynağı insan vücudu olan fırsatçı bir patojendir (McCullough vd., 1996; Aydın, 2004). Son yıllarda, bağışıklık sistemi zayıf kişilerde *Candida* enfeksiyonlarının görülme sıklığı artmıştır. En patojenik *Candida* türü olan *C. albicans* klinik örneklerinde en sık karşılaşılan türdür (Lim ve Tay, 2011). Yapılan bir diğer çalışmada esasen insan kökenli bir patojen olan *C.*

albicans, *C. krusei*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* türleri ağaç yaprağından, su ve topraktan izole edilmiştir. Çalışmada 10 adet basidiomiset ve 11 adet askomiset türünün *Candida* spp. izolatlarna karşı inhibitör etkileri araştırılmıştır. Basidiomisetler arasında en iyi sonuç *Rhodotorula glutinis* ve *R. mucilaginosa*'da gözlenmiştir (Vadkertiova ve Slavikova, 2007). Katil maya *Williopsis (Hansenula) mrakii*, pH 4.5'te *C. albicans*'a karşı inhibe edici özellik göstermiştir (O'Leary, 1987).



Şekil 3. İzolatların *C. albicans* üzerindeki antagonist etkileri a) 11; b) 17; c) 25; d) 27.

Figure 3. Antagonist effect of isolates on *C. albicans* a) 11; b) 17; c) 25; d) 27.

Çalışmamızda, indikatör mikroorganizmaların en az birine karşı antagonistik etki gösteren maya suşlarının *Staph. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. cerevisiae*, *Pseu. aeruginosa*, *E. coli* O157 ve O157:H7, *B. subtilis*, *S. Typhimurium* üzerinde gösterdikleri inhibitör etkileri test edilmiş, sonuçlar Çizelge 1'de verilmiştir. *S. cerevisiae*'ya karşı izolatların hiç biri zon vermemiştir. Benzer şekilde daha önce yapılan çalışmalarda da *M. pulcherrima*, *S. cerevisiae*'a karşı inhibitör aktivite göstermemiştir (Janisiewicz vd., 2001). Genel olarak patojen mikroorganizmaların çoğunda zon veren 26, 27, 30 ve 84 nolu maya suşları olmuştur. Bu katil mayaların tür düzeyinde tanımlamaları 18S ribozomal DNA gen dizi benzerliği ile tespit edilmiş ve Gen Bankasına kaydedilerek kayıt numarası (Accession Number) alınmıştır. Yapılan tanımlamada 26 numaralı izolatın *M. pulcherrima* (MN622823), 27 numaralı izolatın *M. reukaufii* (MN622824), 30 numaralı izolatın *M. pulcherrima* (MN622825) ve 84 numaralı izolatın *S. cerevisiae* (MN622826) oldukları belirlenmiştir.

Farris vd. (1991) yaptıkları çalışmada üzüm ve sırasından 260 tane *M. pulcherrima* suşu izole etmişler ve 6 suşun katil maya olduğunu belirlemişlerdir. En yüksek öldürme etkisi pH 3.6 ve 5.2 aralığında, 48 saat veya 72 saat geliştirilen kültürlerde elde edilmiştir. Lopes ve Sangorin (2010) yaptıkları çalışmada *M. pulcherrima*, *Wickerhamomyces anomala* ve *Torulopsis delbrueckii* olmak üzere üç türe ait 36 maya izolatının inhibitör etkisi, şarapta bozulmaya neden olan *Pichia guilliermondii* ve *P. membranifaciens*'e karşı biyokontrol ajanları olarak kullanılması açısından test edilmiştir. En geniş etki spektrasi, *W. anomala* ve *M. pulcherrima* izolatlarında tespit edilmiştir. Fernández de Ullivarri vd. (2018) yaptıkları çalışmada *W. anomalus*'un, şarapta bozulmaya neden olan *Pichia guilliermondii*, *P. membranifaciens*, *Brettanomyces bruxellensis* ve *Dekkera anomala* türlerini engelleyen mikosin salgıladığını belirlemişlerdir.

Oro vd. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada yedi adet *M. pulcherrima* suşunun farklı maya cinslerine ait 114 mikroorganizma üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerini incelemişlerdir. *M. pulcherrima*'nın *S. cerevisiae*'nin gelişmesi üzerinde

hiçbir etkisi görülmezken, bozulmalara sebep olan *Brettanomyces/Dekkera*, *Hanseniaspora* ve *Pichia* cinsleri gibi yabancı mayalar üzerinde geniş ve etkili bir antimikrobiyal etki göstermiştir.

Acuña-Fontecilla vd. (2017) yaptıkları çalışmada 103 maya suşunun *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* ve *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal özelliği araştırılmıştır. *Pichia*, *Candida* ve *Saccharomyces* cinslerinden olmak üzere dokuz maya suşunun bu üç patojene karşı antimikrobiyal etki gösterdiğini belirlenmiştir.

Chen vd. (2015) yaptıkları çalışmada 3 adet *S. cerevisiae* suşunu izole etmiş ve bu maya suşlarının ürettikleri mikosinin *E. coli*'ye karşı antibakteriyel etkisi olduğunu belirlenmiştir. Yapılan bir başka çalışmada *S. uvarum*, *S. cerevisiae*, *S. hybrids*, *S. diastaticus* ve *S. capensis* türlerinin inhibitör etkileri araştırılmıştır. Protein yapısında toksin ürettiği belirlenen suşların birbirlerine karşı antagonistik etkileri incelenmiştir. *S. uvarum*, *S. cerevisiae*, *S. hybrids* türleri *S. cerevisiae* ve *S. diastaticus*'a karşı inhibitör etki gösterirken, *S. diastaticus* ve *S. capensis* de *S. cerevisiae* ve *S. hybrids*'e karşı inhibitör etki göstermiştir (Young ve Yagiu, 1978).

SONUÇ

Mevsimsel olarak mayaların doğada yaygın olarak bulunması ve izolasyon kaynaklarının çeşitli olması farklı maya suşlarının izolasyon ihtimalini arttırmaktadır. Koloni yapılarına göre farklılık gösterenler saflaştırılmış ve mikroskopta incelenerek hücre şekillerine göre maya olanlar tespit edilmiştir. İlk inhibisyon aşamasında *E. coli*, *M. luteus* ve *C. albicans* üzerindeki inhibitör etkileri test edilmiştir. Bu üç indikatör mikroorganizmaya karşı inhibitör etki gösteren suşların *Staph. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. cerevisiae*, *Pseu. aeruginosa*, *E. coli* O157 ve O157:H7, *B. subtilis*, *S. Typhimurium* üzerinde de inhibisyon testleri uygulanmıştır. İnhibitör etkinin farklı patojenler üzerinde farklı derecelerde olduğu gözlenmiştir. Patojenlere karşı en etkin katil özellik gösteren izolatların tanımlanması sonucunda *M. pulcherrima*, *M. reukaufii* ve *S. cerevisiae* oldukları belirlenmiştir.

Mikosin üreten yeni katil maya türlerinin belirlenmesi için bu konu üzerinde yapılan

araştırmaların sayısı artmaktadır. Son yıllarda katil toksinlerin besin maddelerinin muhafaza edilmesinde biyolojik koruyucu olarak kullanım olanakları özellikle araştırılmaktadır. Elde edilecek olumlu sonuçlar gıdalarda bozulma etmeni ve patojen mikroorganizmaların inhibe edilmesinde ve/veya baskılanmasında kullanılarak hem gıdaların raf ömrünü uzatmada hem sağlıklı gıda üretiminde yeni olasılıklar sunacaktır. Özellikle fermente gıdaların üretiminde kullanılan starter mikroorganizmalara yardımcı kültür olarak kullanımları ortamda bulunan istenmeyen mikroorganizmaların baskılanması yoluyla ürün kalitesinin artmasını sağlayabilecekleri düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma; Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 4848-D1-17 nolu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

Acuña-Fontecilla, A., Silva-Moreno, E., Ganga, M.A. (2017). Evaluation of antimicrobial activity from native wine yeast against food industry pathogenic microorganisms. *CyTA-J Food*, 15(3), 457-465.

Altuntaş, E.G., Özçelik, F. (2007). Killer özellikli mayaların etki mekanizmaları ve endüstride yol açtıkları sorunlar. *GIDA*, 32 (4), 205-212.

Arendrup, M.C., Cuenca-Estrella, M., Lass-Flörl, C., Hope, W. (2014). The subcommittee on antifungal susceptibility testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

Aydın, M. (2004). *Candida* cinsi mantarlar (*Candida albicans*). Ed. Cengiz, Mısırlıgil, Aydın. Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji. 133:1109-1118. Güneş yayınevi, Ankara.

Baeza, M.E., Sanhueza, M.A., Cifuentes, V.H. (2008). Occurrence of killer yeast strains in industrial and clinical yeast isolates. *Biol Res*, 41: 173-182.

Bevan, E.A., Makower, M. (1963). The physiological basis of the killer character in yeast. Proceedings of the 11th International Congress of

Genetics. September 1963, The Hague, The Netherlands, 1: 202-203.

Carreiro, S.C., Pagnocca, F.C., Bacci, M., Bueno, O.C., Hebling, M.J.A., Middelhoven, W.F. (2002). Occurrence of killer yeasts in leaf-cutting ant nests. *Folia Microbiol*, 47(3): 259-262.

Chen, W.B., Han, Y.F., Jong, S.C., Chang, S.C. (2000). Isolation purification and characterization of a killer protein from *Schwanniomyces occidentalis*. *Appl Environ Microbiol*, 66: 1029-1035.

Chen, Y., Aorigele, C., Wang, C., Simujide, H., Yang, S. (2015). Screening and extracting mycocin secreted by yeast isolated from Koumiss and their antibacterial effect. *J Food Nutr Res*, 3(1): 52-56.

Çerikcioğlu, N. (2003). Maya Öldürücü Toksinin Tıbbi Önemi. *Mikrobiyal Bülten*, 37: 215-221.

Dabhole, M.P., Joishy, K.N. (2005). Production and effect of killer toxin by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kluyveri* on sensitive yeasts and fungal pathogens. *Indian J Biotechnol*, 4: 290-292.

Farris, G.A., Mannazzu, I., Budroni, M. (1991). Identification of killer factor in the yeast genus *Metschnikowia*. *Biotechnol Lett*, 13, 297-298.

Fernández de Ullivarri, M., Mendoza, L.M., Raya, R.R. (2018). Characterization of the killer toxin KTCf20 from *Wickerhamomyces anomalus*, a potential biocontrol agent against wine spoilage yeasts. *Biol Control*, 121: 223-228.

Golubev, W. I. (2006). Antagonistic interactions among yeasts, in bio-diversity and ecophysiology of yeasts, eds. G. Péter and C. Rosa (Berlin: Springer),197-219.

Gulbinienė, G., Kondratienė, L., Jokantaite, T., Serviene, E., Melvydas, V., Petkuniene, G. (2004). Occurrence of killer yeast strains in fruit and berry wine yeast populations. *Food Technol Biotechnol*, 42(3): 159-163.

Halkman, K. (2011). Almanya'daki EHEC salgını ve düşündürdükleri. Köşe Yazısı, 01 Temmuz 2011, Cum. [https://www.labmedya.com/ġggg,yşN\(almanyadaki-ehc-salgını-ve-düşündürdükleri](https://www.labmedya.com/ġggg,yşN(almanyadaki-ehc-salgını-ve-düşündürdükleri), Erişim tarihi: (17.05.2019).

Hayduck, F., (1909).Über einen Hefengiftstoff in Hefe. *Wochenschr Brau* 26: 677-679. (In German)

- Hodgson, V.J., Button, D., Walker, G.M. (1995). Anticandida activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. *Microbiol*, 141: 2003-2012.
- Hou, F., Li, J., Pan, P., Xua, J., Liua, L., Liua, W., Songa, B, Li, N., Wana, J., Gaoa, H. (2011). Isolation and characterisation of a new antimicrobial peptide from the skin of *Xenopus laevis*. *Int J Antimicrob Agents*, 38: 510-515.
- Izgu, F., Altinbay, D. (2004). Isolation and characterization of the K5-type yeast killer protein and its homology with an exo- β -1,3-glucanase. *Biosci Biotechnol Biochem*, 68: 685-693.
- Janisiewicz, W.J., Tworzoski, T.J., Kurtzman, C.P. (2001). Biocontrol potential of *Metchnikovia pulcherrima* strains against blue mold of apple, *Phytopathol*, 91: 1098-1108.
- Klassen, R., Meinhardt, F. (2005). Induction of DNA damage and apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae* by a yeast killer toxin. *Cell Microbiol*. 7: 393-401.
- Kuleaşan, H., Çakmakçı, M.L. (2003). Bakteriyosinlerin özellikleri, Gıda Mikrobiyolojisinde Kullanım Alanları ve İleri Dönemlerdeki Kullanım Potansiyelleri. *GIDA*, 28: 123-129.
- Lim, S.L., Tay, S.T. (2011). Diversity and killer activity of yeasts in malaysian fermented food samples. *Trop Biomed*, 28(2): 438-443.
- Liu, G.L., Chi, Z., Wang, G.Y., Wang, Z.P., Li, Y., Chi, Z.M. (2013). Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications. *Crit Rev Biotechnol*, 35(2): 222-234.
- Lopes, C.A., Sangorin, M.P. (2010). Optimization of killer assays for yeast selection protocols. *Rev Argent Microbiol*, 42: 298-306.
- Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., Polonelli, L. (1997). Yeast killer systems. *Clin Microbiol Rev*, 10: 369-400.
- Marquina, D., Santos, A., Peinado, J.M. (2002). Biology of killer yeast. *Int Microbiol*, 5: 65-71.
- McCullough, M.J., Ross, B.C., Reade, P.C. (1996). *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 25(2): 136-144.
- McFarland J. (1907). Nephelometer: an instrument for media used for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *J Am Med Assoc*, 14: 1176-1178.
- Ochigava, I., Collier, P.J., Walker, G.M., Hakenbeck R. (2011). *Williopsis saturnus* yeast killer toxin does not kill *Streptococcus pneumoniae*. *Antonie Leeuwenhoek*, 99: 559-566.
- O'Leary, E.C. (1987). A study of killer yeast activity against the opportunistic pathogen *Candida albicans*. Thesis Presented for the Degree of Master of Science. School of Biological Sciences National Institute for Higher Education, Dublin, Ireland.
- Oro, L., Ciani, M., Comitini, F. (2014). Antimicrobial activity of *Metchnikovia pulcherrima* on wine yeasts. *J Appl Microbiol*, 116: 1209-1217.
- Polonelli, L., Archibusacci, C., Sestito, M., Morace, G. (1983). Killer system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. *J Clin Microbiol*, 17(5): 774-780.
- Polonelli, L., Morace, G. (1986). Reevaluation of the yeast killer phenomenon. *J Clin Microbiol*, 24(5): 866-869.
- Roostita, L.B., Fleet, G.H., Wendry, S.P., Apon, Z.M., Gemilang, L.U. (2011). Determination of yeasts antimicrobial activity in milk and meat products. *Adv J Food Sci Technol*, 3(6): 442-445.
- Russell, I. (1986). Killer yeast identification. *J Am Soc Brew Chem*, 44(3): 123-125.
- Schmitt, M.J., Breinig, F. (2002). The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiol*, 26: 257-276.
- Seifert, H., Kaltheuner, M., Perdreau-Remington, F. (1995). *Micrococcus luteus* endocarditis: case report and review of the literature. *Zentralbl Bakteriol*, 282: 431-5.
- Suzuki, C., Ando, Y., Machida, S. (2001). Interaction of SMKT, a killer toxin produced by

Pichia farinosa, with the yeast cell membranes. *Yeast*, 18(16): 1471-1478.

Vadkertiova, R., Slavikova, E. (2007). Killer activity of yeasts isolated from natural environments against some medically important *Candida* species. *Pol J Microbiol*, 56 (1): 39-43.

Young, T. W., Yagiu, M. (1978). A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. *Antonie Leeuwenhoek*, 44(1): 59-77.

Wieser, M., Denner, E.B., Kämpfer, P., Schumann, P., Tindall, B., Steiner, U., Vybiral, D., Lubitz, W., Maszenan, A.M., Patel, B.K., Seviour, R.J., Radax, C., Busse, H.J. (2002). Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos et al. 1974). *Int J Syst Evol Mikrobiol*, 52(2): 629-637.

İçindekiler / Content

Araştırmalar (İngilizce) / Researches (English)

- Oz, E. *Effects of smoking with different wood chips and barbecuing on some properties of salmon fish* / Farklı odun talaşları ile tütsüleme ve mangalda pişirmenin somon balığının bazı özellikleri üzerine etkileri 1-8
- Suna, S., Çiftçi, K., Tamer, C. E. *Determination of physicochemical and sensory properties of kombucha beverage prepared with saffron* / Safran kullanılarak hazırlanan kombucha içeceğinin fizikokimyasal ve duyu özelliklerinin belirlenmesi 20-30
- Yazgan, H. *Biogenic amine production in histidine decarboxylase broth by selected lactic acid bacteria strains* / Bazı laktik asit bakteri üyelerinin histidin dekarboksilaz sıvısında biyojen amin üretimleri 31-38
- Ermis, E., Karasu, E. N. *Spray drying of de-oiled sunflower protein extracts: functional properties and characterization of the powder* / Püskürtmeli kurutucu ile yağı alınmış ayçiçeği protein ekstraktı tozu üretimi: fonksiyonel özellikleri ve toz karakterizasyonu 39-49
- Kuşçu, G., Öztürk, B. *Physical, chemical and sensory properties of fresh orange juice fortified with reishi (Ganoderma lucidum) extract* / Reishi (Ganoderma lucidum) ekstraktı katkılı taze portakal suyunun fiziksel, kimyasal ve duyu özellikleri 81-91
- Gülşah Çalışkan Koç, G., Çabuk, B. *Characterization of the foam-mat dried egg white powder* / Köpük kurutma yöntemi ile kurutulmuş yumurta beyazı tozlarının karakterizasyonu 150-160

Araştırmalar (Türkçe) / Researches (Turkish)

- Karakaya, H., Yılmaztekin, M. *Pseudomonas putida ile izoöjenolden doğal vanilin üretiminde bazı ortam koşullarının molar verim üzerine etkisi* / Effect of culture conditions on molar yield of natural vanillin production from isoeugenol by Pseudomonas putida 9-19
- Ketenoğlu, O. *Yer fıstığı (Arachis hypogaea L.) yağının farklı çözücüler kullanılarak değişken güç ve frekanslarda ultrason destekli ekstraksiyonu* / Ultrasound-assisted extraction of peanut (Arachis hypogaea L.) oil under varying power and frequencies using different solvents 61-71
- Erdoğan, S. F. Bostancı, B. *Kefir örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, identifikasyonu ve antimikrobiyal etkilerinin değerlendirilmesi* / Isolation and identification of lactic acid bacteria from kefir samples and evaluation of their antimicrobial effects 72-80
- Yücel Şengün, İ., Kırmızıgül, A., Özyıldırım, İ., Yarımlı, H. *Tüketicilerin probiyotik ve prebiyotik gıdalara yönelik bilgi düzeyleri ve tüketim durumlarının belirlenmesi: İzmir/Bornova örneği* / Determination of knowledge level and consumption status of consumers on probiotic and prebiotic foods: A sample of İzmir/Bornova 103-114
- Sarıcaoğlu, F. T. *Yüksek basınç homojenizasyon işlemi uygulanmış fındık proteinlerinden üretilen yenilebilir filmlerin mekanik ve bariyer özellikleri* / The effect of high pressure homogenization on the mechanical and barrier properties of edible films produced from cold press hazelnut meal proteins 115-124
- Cansız, Z., Candal Uslu, C., Mutlu, C., Arslan Tontul, S., Ercan, R., Erbaş, M. *Farklı oranlarda peynir altı suyu kullanımının beyaz ve tam buğday unlarından üretilen ekmeklerin bazı özellikleri üzerine etkisi* / The effects of whey addition at different ratios on the properties of breads produced from white and whole wheat flour 125-138
- Şanlı, T., Anlı, E. A. *Çökelek peyniri üretiminde alternatif kaynak olarak kefir kullanımı* / Use of kefir in cheese production 139-149
- Korkut Altıntaş, A., Kuleşan, H. *Soğuk sıkma ve soğuk maserasyon yöntemiyle elde edilen bitki ekstraktlarının yaygın patojenler üzerindeki etkileri* / Antimicrobial effects of plant extracts obtained by cold press and cold maceration methods on some pathogens 161-170
- GD19154 Koç, E., Yolcu Ömeroğlu, P. *Geleneksel anjelika reçelinin toplam antioksidan kapasite, toplam fenolik madde ve in vitro sindirim modeli ile biyoerişilebilirliğinin belirlenmesi* / Determination of total phenolic compound, antioxidant capacity of the traditional angelica jam and their bioaccessibility with in vitro digestive model 171-181
- GD19115 Büyüksırtı Bedir, T., Kuleşan, H. *Doğal mayaların yaygın patojenler üzerindeki inhibitör etkileri* / Inhibitory effects of natural yeasts on common pathogens 182-191

Derlemeler (Türkçe) / Reviews (Turkish)

- Eker, T., Cabaroğlu, T. *Yoğurt matrisinin tüketim sırasında in vivo aroma salınımı üzerine etkileri* / The impact factors of yogurt matrix on in vivo aroma release during consumption of yogurt 50-60
- Mutlu, C., Erbaş, M. *D-glikozdan D-sorbitol ve L-askorbik asit üretimi: Bu bileşiklerin özellikleri, kullanım alanları ve sağlık üzerine etkileri* / Production of D-sorbitol and L-ascorbic acid from D-glucose: Their properties, fields of usage and effects on health 92-102