

ISSN Online 2148-015X

ACADEMIC FOOD JOURNAL

AKADEMİK

GIDA



Gıda Bilimi ve Teknolojisi Dergisi

<https://dergipark.org.tr/tr/pub/akademik-gida> Cilt/Volume:18 Sayı/Number:3 Temmuz - Eylül 2020

ACADEMIC FOOD JOURNAL
A JOURNAL ON FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY

SİDAS MEDYA

AKADEMİK GIDA®
ACADEMIC FOOD JOURNAL

Akademik Gıda® dergisi Gıda Bilimi ve Teknolojisi alanında hazırlanmış özgün araştırma ve derleme makalelerin yayınlandığı hakemli bir dergidir. Araştırma Notu ve Editöre Mektup gibi yazılar da yayın için değerlendirilmektedir. Dergi 3 ayda bir basılmakta olup 4 sayıda bir cilt tamamlanmaktadır. Dergide Türkçe veya İngilizce olarak hazırlanmış makaleler yayınlanmaktadır.

Baş Editör / Editor-in-Chief

Oğuz Gürsoy
(Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi)

Editörler / Editors

Özer Kınık (Ege Üniversitesi)
Ramazan Gökçe (Pamukkale Üniversitesi)
Yusuf Yılmaz (Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi)

Teknik Editörler / Technical Editors

Hande Özge Güler (Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi)

International Editorial Board / Uluslararası Yayın Kurulu

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

AKADEMİK GIDA**ABSTRACTED / INDEXED / LISTED IN**

1. Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases
2. Academic Index
3. Academic Keys
4. Academic Search Ultimate
5. Advanced Science Index (ASI)
6. AgBiotech News and Information
7. AgBiotechNet
8. Agricultural Economics Database
9. Agricultural Engineering Abstracts
10. Agroforestry Abstracts
11. Animal Breeding Abstracts
12. Animal Production Database
13. Animal Science Database
14. Asos İndeks
15. Biocontrol News and Information
16. Biofuels Abstracts
17. Botanical Pesticides
18. CAB Abstracts
19. CAB Direct
20. Cite Factor
21. Crop Science Database
22. Dairy Science Abstracts
23. Directory of Research Journals Indexing (DRJI)
24. EBSCO
25. Environmental Impact
26. Environmental Science Database
27. Eurasian Scientific Journal Index
28. Field Crop Abstracts
29. Food Science and Technology Abstracts (FSTA)
30. Forest Science Database
31. Global Health
32. Google Scholar
33. Horticultural Science Abstracts
34. Horticultural Science Database
35. Impact Factor Services for International Journals (IFSIJ)
36. International Innovative Journal Impact Factor (IJIF)
37. International Institute of Organized Research (I2OR)
38. İdeal Online
39. Journal Index Net
40. Maize Abstracts
41. MIAR (Information Matrix for the Analysis of Journals)
42. Nutrition Abstracts and Reviews Series A: Human and Experimental
43. Nutrition Abstracts and Reviews Series B: Livestock Feeds and Feeding
44. Nutrition and Food Sciences Database
45. Ornamental Horticulture
46. Parasitology Database
47. Plant Breeding Abstracts
48. Plant Genetic Resources Abstracts
49. Plant Genetics and Breeding Database
50. Plant Protection Database
51. Postharvest Abstracts
52. Potato Abstracts
53. Poultry Abstracts
54. Protozoological Abstracts
55. Review of Agricultural Entomology
56. Review of Aromatic and Medicinal Plants (RAMP)
57. Review of Medical and Veterinary Entomology
58. Review of Medical and Veterinary Mycology
59. Review of Plant Pathology
60. Rice Abstracts
61. Rural Development Abstracts
62. Science Library Index
63. Scientific Indexing Services (SIS)
64. Seed Abstracts
65. Soil Science Database
66. Soils and Fertilizers Abstracts
67. Soybean Abstracts
68. Sugar Industry Abstracts
69. Systematic Impact Factor (SIF)
70. The Belt and Road Initiative Reference Source
71. The Turkish Academic Network and Information Centre Life Sciences Database (TÜBİTAK-ULAKBİM Yaşam Bilimleri Veritabanı, TR-DİZİN)
72. Tropical Diseases Bulletin
73. Veterinary Science Database
74. VetMed Resource
75. Weed Abstracts
76. Wheat, Barley and Triticale Abstracts
77. World Agricultural Economics and Rural Sociology Abstracts (WAERSA)

Akademik Gıda 18 (3) (2020)
İÇİNDEKİLER / CONTENTS

■ Editörden / Editorial

IV-V

■ MAKALELER / PAPERS

■ Araştırma Makaleleri / Research Papers

Exposure Assessment and Risk Characterization of Aflatoxin M1 Intake Through Consumption of Milk by General Population in Bosnia and Herzegovina: Preliminary Study / Bosna-Hersek'te Genel Nüfus Bazında Süt Tüketimi Yoluyla Aflatoxin M1 Alımına Ait Maruziyet Değerlendirmesi ve Risk Karakterizasyonu: Ön Çalışma / Elma Omeragic, Aleksandra Marjanovic, Jasmina Djedjibegovic, Amila Turalic, Aida Lugusic, Miroslav Sober

228-232

Effect of Heat Treatment on Protein Fractions of Edible Poultry Eggs / Isıl İşlemin Yenilebilir Kanatlı Yumurtalarındaki Protein Fraksiyonlarına Etkisi / Özgür Tarhan, Mustafa Gözler, Rahmi Can Yavuz, Melike Şimşek

233-240

Antibacterial and Anticancer Activities of Violacein Extracted Through Ultrasound-Assisted Extraction Method / Ultrason Destekli Ekstraksiyon Yöntemi ile Elde Edilen Violasinin Antibakteriyel ve Antikanser Aktiviteleri / Çağdaş Deniz Periz, Seyhan Ulusoy, Gülgün Tınaz, Turgut Şekerler

241-246

Yaşam Döngüsü Analizi ile Konsantre Şeftali Püresinin Karbon Ayak İzinin Belirlenmesi / Determining Carbon Footprint of Concentrated Peach Puree by Life Cycle Analysis / Neslihan Çolak Güneş

247-255

Kısmi Pişirme Yönteminin Kek Kalitesi Üzerine Etkisi / Impact of Partial Baking Process on Cake Quality / Mehmet Murat Karaoğlu, Yeşim Bedir

256-263

Vitreoscilla Hemoglobini Eksprese Eden E. coli Suşları ile Şeker Pancarı Melasından Biyoetanol Üretiminde Ölçek Büyütmenin Etkisi / Effect of Scaling up on Bioetanol Production from Sugar Beet Molasses by Vitreoscilla Hemoglobin Expressing E.coli Strains / Taner Şar, Meltem Yeşilçimen Akbaş

264-269

İğde (Elaeagnus angustifolia L.) Meyve ve Yapraklarının Antioksidan ve Antidiyabetik Özellikleri / Antioxidant and Antidiabetic Properties of Oleaster (Elaeagnus angustifolia L.) Fruits and Leaves / Serap Berktaş, Mustafa Çam

270-278

Farklı Starter Kültürler ile Yoğurt ve Kremadan Üretilen Tereyağlarının Oksidasyon Stabilitesi ve Bazı Özellikleri / Oxidation Stability and Some Properties of Butter Produced with Yoghurt and Cream by Different Starter Cultures / Engin Gündoğdu, Songül Çakmakçı

279-287

Quality Determination of Traditional Fermented Sausages by Histological and Immunohistochemical Analyses / Geleneksel Fermente Sucukların Kalitesinin Histolojik ve İmmünohistokimyasal Yöntemlerle Belirlenmesi / Semra Gürbüz, Görkem Ekebaş, Latife Çakır Bayram, Yusuf Ziya Kaplan

288-295

Potential Use of Capsicum Pepper Powder and Natural Cheese Aroma in Turkish Delight (Lokum) Production / Çeşnili Lokum Üretiminde Kapsikum Biber Tozu ve Doğal Peynir Aromasının Kullanım Potansiyeli / Hülya Gölcük, Eda Karaalp, Tuğba Yaman, Hande Özge Güler Dal, Yusuf Yılmaz

296-302

■ Derleme Makaleler / Review Papers

Laktik Asit Bakterilerinde CRISPR/Cas Sisteminin Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliğinde Kullanımı / Utilization of CRISPR/Cas System of Lactic Acid Bacteria in Biotechnology and Genetic Engineering / Özge Kahraman Ilıkkan

303-311

Gıda ve Çevreden Alınan Bor Bileşiklerinin Toksikolojik Değerlendirmesi / Toxicological Evaluation of Boron Compounds Taken from Food and Environment / Bahar Demircan, Yakup Sedat Velioğlu

312-322

Fonksiyonel Bir Gıda: Yer Fıstığı ve Sağlığa Yararları / A Functional Food: Peanut and its Health Benefits / Beda Büşra Özalp, Nilgün Seremet Kürklü

323-330

Yağ Rafinasyonu Sırasında İnsan Beslenmesinde Önemli Fonksiyonel Bileşenlerde Değişimler ve Zararlı Rafinasyon Bileşenlerinin Oluşumu / Changes in Important Functional Components for Human Nutrition during Oil Refining and Formation of Harmful Refining Components / Şakir Selçuk Seçilmiş

331-338

■ Akademik Gıda Dergisi Yazım Kuralları / Guidelines to Authors

VI-IX

■ Etik Beyanı / Ethics and Publication Malpractice Statement

X-XV

**Sahibi**

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

Genel Yayın Yönetmeni

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

Baş Editör

Prof. Dr. Oğuz GÜRSOY
ogursoy@yahoo.com

Editörler

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

Reklam Müdürü

Nurcan AKMAN ŞENGÖR

Hukuk Danışmanı

Av. Yrd. Doç. Dr. Murteza AYDEMİR

Abone Sorumlusu

Halil SOLAK

Grafik Tasarım

Sidas Medya Tasarım Grubu

Yönetim Yeri

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

Üç Ayda Bir Yayınlanan Dergimiz
Basın Meslek İlkelerine Uymaktadır.

Yıl / Cilt: 18

Sayı: 89

Temmuz - Ağustos - Eylül 2020

ISSN Print 1304-7582

ISSN Online 2148-015X

Akademik Gıda Dergisi

Bir **SİDAS MEDYA** Yayınıdır.

GRUP

Yayın Türü: Yerel Süreli

Akademik Gıda Dergisi Hakemli Dergidir.

Akademik Gıda dergisinin 18. yayın yılının üçüncü sayısı ile sizlerle birlikteyiz. Bu sayımızda 10 araştırma ve 4 derleme çalışması olmak üzere toplam 14 makale yer almaktadır.

Makale yazarlarından zaman zaman gelen sorular nedeniyle makale kabulü ile ilgili daha önce yaptığımız bilgilendirmeyi tekrar etmek istiyoruz. Dergimiz 2017 yılı birinci sayısından itibaren <http://www.academicfoodjournal.com> adresinin yanı sıra TÜBİTAK ULAKBİM çatısı altında, Türkiye'de yayımlanan akademik dergiler için elektronik ortamda barındırma ve editöryal süreç yönetimi hizmeti sunan DergiPark'ta, <http://dergipark.gov.tr/akademik-gida> adresinde yayımlanmaya başlamıştır. Ancak dergimize yayımlanmak üzere gönderilen makalelerin kabulü halen <http://www.academicfoodjournal.com> adresinden yapılmakta olup, DergiPark üzerindeki makale kabul süreçlerini içeren sistem kullanılmamaktadır. Bu sistem üzerinden makale kabulüne 2020-2021 yılları içerisinde geçilmesi planlanmaktadır. Dergimizin tüm arşivine DergiPark üzerinden erişiminin sağlanması için gerekli çalışmalar TÜBİTAK ULAKBİM tarafından yapılmakta olup, bu çalışmaların kısa bir süre içerisinde tamamlanması beklenmektedir. Söz konusu çalışmalarla birlikte dergimizde yayımlanan makalelerin ulaşılabilirliğinde de önemli düzeyde artış olması beklenmektedir.

Yazarlarımıza hatırlatmak istediğimiz diğer önemli bir husus 2020 yılından itibaren dergimize gönderilecek makalelerde Etik Kurul izni gerektiren çalışmaların ilgili izni aldıkları ile ilgili bilgi ve belgelerini TR-Dizin'e yüklemek üzere dergimize (makalelerini dergimize gönderme aşamasında) sunmaları gerekliliğidir.

Dergimizin etik hususlarla ilgili detaylı etik beyanına web sayfamızdan (<https://dergipark.org.tr/tr/pub/akademik-gida/page/6477>) ulaşılabilir.

Dergimizle ilgili bir diğer yenilik makalelerin sonunda yer alan kaynaklar bölümünde kaynakların gösteriminde kısaca APA (American Psychological Association) olarak bilinen Amerika Psikoloji Derneği yazım stiline kullanılacak olmasıdır. Dergimize makale gönderecek meslektaşlarımızın bu durumu dikkate almasını ve güncellenen yazım kuralları sayfalarımızı takip etmesini rica ediyoruz.

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

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

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

Saygılarımızla.

Oğuz Gürsoy
Baş Editör

Özer Kınık
Ramazan Gökçe
Yusuf Yılmaz
Editörler

BİLİMSEL ETKİNLİKLER

Peynir Çalıştayı

Peynir ve Peynir Teknolojileri ile ilgili çalışanlar veya bu sektörlere hizmet verenler ile bilim insanlarının bir araya getirilmesi, güncel gelişmeler ve sektör sorunların tartışılması hedefleriyle Sidas Medya Ltd. Şti. ve Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü tarafından düzenlenecek Peynir Çalıştayı ile ilgili bilgilere etkinliğin Facebook ve Instagram sosyal medya hesaplarından ulaşılabilir.

5. Uluslararası Anadolu Tarım, Gıda, Çevre ve Biyoloji Kongresi

Tarım, gıda, çevre ve biyoloji alanındaki gelişmeleri gündeme getirmek ve yeni iş birliklerine olanak sağlamak amacıyla, 5.Uluslararası Anadolu Tarım, Gıda, Çevre ve Biyoloji Kongresi Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi ve Türk Tarım - Gıda Bilim ve Teknoloji dergisi (TURJAF) öncülüğünde 1-4 Ekim 2020 tarihlerinde Tokat'ta düzenlenecektir. Kongre ile ilgili <http://www.targid.org/> adresinden ulaşılabilir.

IV. Et Ürünleri Çalıştayı

Ülkemizde Et Bilimi ve Teknolojisi alanında öncü bir organizasyon olma özelliği taşıyan ve teması "Et Ürünleri Üretiminde Yenilikçi Yaklaşımlar" olarak belirlenen IV. Et Ürünleri Çalıştayı 6-8 Ekim 2020 tarihlerinde Seven Seas Sealight Elite Otel'de (Kuşadası, Aydın) düzenlenecektir. Çalıştay ile ilgili ayrıntılı bilgilere <https://etcalistayi2020.ege.edu.tr/> adresinden ulaşılabilir.

IV. International Joint Science Congress of Materials and Polymers

Malzeme Bilimleri alanında son gelişmelerin tartışılacağı IV. International Joint Science Congress of Materials and Polymers kongresi 7-10 Ekim 2020 tarihleri arasında Tetovo, Kuzey Makedonya'da düzenlenecektir. Kongre ile ilgili <http://iscmp.org/> bilgilere adresinden ulaşılabilir.

Türkiye 13. Gıda Kongresi

Türkiye 13. Gıda Kongresi, 21-23 Ekim 2020 tarihlerinde Gıda Teknolojisi Derneği ve Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü işbirliği ile Çanakkale Üniversitesi Troia Kongre Merkezi'nde düzenlenecektir. Kongre ile ilgili <https://gidakongresi2020.org/> adresinden ulaşılabilir.




7. Uluslararası Gıda Güvenliği Kongresi

Gıda Güvenliği Derneği tarafından düzenlenen Uluslararası Gıda Güvenliği Kongrelerinin yedincisi 3-4 Haziran 2021 tarihlerinde İstanbul'da (Grand Cevahir Hotel Convention Center) gerçekleştirilecektir. Kongre ile ilgili bilgilere <https://www.gidaguvenglikongresi.org/> adresinden ulaşılabilir.

10. Ulusal Analitik Kimya Kongresi

2002 yılından bu yana iki yılda bir düzenlenen Analitik Kimya Kongrelerinin onuncusu Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi ev sahipliğinde 2-5 Eylül 2021 tarihlerinde düzenlenecektir. Kongre ile ilgili bilgilere <http://uakk2020.mu.edu.tr/> adresinden ulaşılabilir.

Exposure Assessment and Risk Characterization of Aflatoxin M1 Intake Through Consumption of Milk by General Population in Bosnia and Herzegovina: Preliminary Study

Elma Omeragic  ✉, Aleksandra Marjanovic , Jasmina Djedjibegovic , Amila Turalic ,
Aida Lugusic , Miroslav Sober 

University of Sarajevo, Faculty of Pharmacy, Zmaja od Bosne 8, 71000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

Received (Geliş Tarihi): 05.09.2019, Accepted (Kabul Tarihi): 17.08.2020

✉ Corresponding author (Yazışmalardan Sorumlu Yazar): elma.omeragic@ffsa.unsa.ba (E. Omeragic)

☎ +90 387 61 989 267 📠 +90 387 33 586 178

ABSTRACT

Aflatoxins M1 and M2 are the hydroxylated metabolites of aflatoxins B1 and B2 and can be found in milk or milk products. The aim of this study was to obtain the exposure and health risk assessment of this toxin in raw milk using a selection of existing test results of different periods in a different region of Bosnia and Herzegovina. For AFM1 intake assessment, the data available from the report of Pre-Accession Assistance To Agriculture And Rural Development Sector Analyses in Bosnia and Herzegovina was used. For the concentration of the aflatoxin M1 in raw milk, the data of the previous studies and unpublished data from the Laboratory of Toxicological Chemistry Faculty of the Pharmacy University of Sarajevo were used. Risk characterization was performed by calculating the risk of hepatocellular carcinoma (HCC) incidence per year for four exposure scenario. The results indicated that the average estimated daily intake of aflatoxin M1 was 0.049 ng/kg body weight (bw) per day. The risk of hepatocellular carcinoma (cases/year/100 000 individuals), depending on the HBsAg prevalence, was relatively low (average 0.000064-0.000074 cases/year/100 000). It is concluded that in recent years, the carcinogenic risk of aflatoxin M1 has been low and not critical in Bosnia and Herzegovina.

Keywords: Aflatoxin M1, Milk, Exposure assessment, Risk characterization

Bosna-Hersek'te Genel Nüfus Bazında Süt Tüketimi Yoluyla Aflatoksin M1 Alımına Ait Maruziyet Değerlendirmesi ve Risk Karakterizasyonu: Ön Çalışma

ÖZ

Aflatoksin M1 ve M2, aflatoksin B1 ve B2'nin hidroksile metabolitleri olup, süt ve süt ürünlerinde bulunabilir. Bu çalışmanın amacı, Bosna-Hersek'in farklı bölgelerinden farklı dönemlere ait test sonuçlarını kullanarak çiğ sütteki bu toksine maruz kalma ve sağlık riski değerlendirmesi yapmaktır. AFM1 alım değerlendirme için, Bosna-Hersek'te Tarım ve Kırsal Kalkınmaya Yönelik Katılım Öncesi Yardım Sektör Analizleri raporundaki veriler kullanılmıştır. Aflatoksin M1'in çiğ sütteki konsantrasyonu için, Saraybosna Eczacılık Üniversitesi Toksikolojik Kimya Fakültesi Laboratuvarı'ndan alınan önceki çalışmaların verileri ile yayınlanmamış veriler kullanılmıştır. Dört maruziyet senaryosu için yıllık hepatoselüler karsinom riski (HCC) insidansı hesaplanarak risk karakterizasyonu yapılmıştır. Sonuçlar, ortalama tahmini günlük aflatoksin M1 alımının günde 0.049 ng/kg vücut ağırlığı olduğunu göstermiştir. Hepatoselüler karsinom riski (vaka/yıl/100.000 kişi), HBsAg prevalansına bağlı olarak nispeten düşük bulunmuştur (ortalama 0.000064-0.000074 vaka/yıl/100.000). Son yıllarda, aflatoksin M1'in kanserojen riskinin düşük olduğu ve Bosna Hersek'te kritik olmadığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Aflatoksin M1, Süt, Maruziyet değerlendirme, Risk karakterizasyonu

INTRODUCTION

Milk is a major source of dietary energy, high-quality proteins and fat. It contains the water-soluble vitamins B1, B2, B3, B5, B6, B12, vitamin C, folate and the fat-soluble vitamins A, D, E, and K. Milk is a good source of calcium, magnesium, phosphorus, potassium, selenium, and zinc. Bioavailability of some nutrients in milk, for example, calcium, is high compared with that in other foods in the diet [1].

This important food source can be contaminated with some different unwanted chemicals. Veterinary drugs, heavy metals, radionuclides, mycotoxins (aflatoxins, ochratoxin A, patulin, trichothecenes such as deoxynivalenol, nivalenol and T-2 and HT-2 toxins, as well as zearalenone and fumonisins) and pesticides are chemical contaminants that can enter to animal feed and they have some residues in milk [2].

Aflatoxins are amongst the most poisonous mycotoxins. They can be produced by three species of *Aspergillus* - *A. flavus*, *A. parasiticus*, and *A. nomius*. *Aspergillus flavus* produces only B aflatoxins (B1 and B2), while *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus nominus* produce both B and G aflatoxins (G1 and G2) [3]. Aflatoxin B1 (AFB1) present in feed of lactating animals gets transformed to 4-hydroxylated metabolite in the liver and is excreted in milk as aflatoxin M1 (AFM1) [1]. Milk and milk products including breast milk, are more or less exclusively the source of AFM1 exposure for human. Aflatoxin M1 is classified as B2 category (possible carcinogen for human) by International Agency for Research on Cancer (IARC) and causes liver, kidney and digestive problems. AFM1 has liver carcinogenicity effects and genetic destruction effects in human [3]. The amount of aflatoxin M1 in milk is in relation to the consumed aflatoxin B1. Approximately 1-3% of ingested AFB1 is converted into AFM1 [4]. Aflatoxins contamination of feed fluctuates seasonally. The contamination is generally higher in summer (high temperature) and autumn (high humidity). The concentration of aflatoxins can be measured by gas chromatography (GC), high-performance liquid chromatography (HPLC), thin layer chromatography

(TLC) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [3]. Destruction of AFM1 in milk depends on time and temperature combination of the heat treatment applied. Some investigation was observed that pasteurization caused a decrease in the level of AFM1 at the rate of 7.62% or can partially reduce the amount of AFM1 in milk. However, some reports showing that aflatoxins M1 are stable during heat-treatments such as pasteurization and sterilization and is not destroyed in yoghurt and cheese making [1, 5].

Different studies also show a great synergic effect between aflatoxin M1 and hepatitis B virus in a way that hepatitis B patients (HBsAg⁺) exposed to this toxin are 30 time more prone to liver damages and cancer [3,6]. The maximum allowable concentration of aflatoxin M1 in raw milk, heat-treated milk and milk for the manufacture of milk-based products is 50 ng/L according to the European Commission regulation [7] and to the Ordinance on the maximum allowable concentration of certain contaminants in foods in Bosnia and Herzegovina [8].

Dominant milk production in BiH is based on the small farms, of which only 3.5% are farms with more than 20 dairy cows. The annual milk purchases by registered dairy plants are almost 136 000 tonnes. Marketed milk, (i.e. pasteurized and UHT) accounts for more than half of all milk products in processing [9].

The aim of this study was to do exposure and health risk assessment of this toxin in raw milk using a selection of existing test results of different periods in a different region of Bosnia and Herzegovina.

MATERIALS AND METHODS

Dietary Exposure Assessment

Estimated daily intake (EDI) through milk consumption was an assessment by combining consumption data of milk with contamination data for AFM1 and divided by the individual body weight (Eq. 1).

$$EDI \left[\frac{ng}{kg \text{ b.w. day}} \right] = \frac{\text{Daily consumption} \left[\frac{L}{day} \right] \text{concentration of contaminant} \left[\frac{ng}{L} \right]}{\text{Body weight} [kg]} \quad (1)$$

The total diet study was not being undertaken in Bosnia and Herzegovina, so far. For that reason, for intake assessment, we used the data available from report of IPARD (Pre-Accession Assistance To Agriculture And Rural Development) Sector Analyses in Bosnia and Herzegovina [9] according to which consumption of milk per capita in Bosnia and Herzegovina was approximately 172 litres (471 mL/day) in 2010 year.

The bodyweight of 70 kg was used as the average body weight for the European adult population (aged above 18 years).

Concentration of Aflatoxin M1 in Raw Milk in Bosnia and Herzegovina

This study was performed by analyzing published articles. Reviewing published articles dealing with the concentration of aflatoxin M1 in milk samples origin from Bosnia and Herzegovina, we found a just one published study about this topic. In the study conducted from Bilandžić et al. [10] a total of 285 samples of raw cow's milk were sampled from small and large dairy farms in the period October-November 2014 in the following cantons of Bosnia and Herzegovina: Una Sana, Banja Luka region, Canton 10, Central Bosnia, Zenica Dobo, Tuzla, West Herzegovina, Herzegovina-Neretva, Romanija and Eastern Herzegovina was analyzed.

Additionally, for this study more recent results of 53 milk samples that are analyzed in the Laboratory of toxicological chemistry Faculty of pharmacy University of Sarajevo (Unpublished data) on the AFM1 concentration with enzyme-linked immunosorbent assay (Aflatoxin M1 sensitive ELISA test (5121AFMS), EuroProxima) have been used in a way to cover major regions in milk production of whole county at the period from April to June in 2014. The average concentration of AFM1 used in calculations average exposure were calculated as Pooled Means of reported means as follows (Eq. 2):

$$C_{average} = \frac{N1 \cdot M1 + N2 \cdot M2}{N1 + N2} \quad (2)$$

Where N is reported number of samples and M is reported mean of AFM1 concentration in milk [11].

The result of AFM1 concentrations used for exposure assessment and risk characterisation were presented in Table 1.

Risk Characterization

Five different exposure scenarios were used: (a) "mean exposure in spring sampling period", calculated from milk consumption according to FAO data (2012) and mean AFM1 concentrations during spring sampling period, (b) "mean exposure in autumn sampling period", calculated from milk consumption according to FAO data (2012) and mean AFM1 concentration over the autumn sampling period, (c) "worst-case exposure scenario in spring sampling period" calculated from milk consumption according to FAO data (2012) and maximum concentrations of AFM1 in the spring sampling period, (d) "worst-case exposure scenario in autumn sampling period", calculated from milk consumption according to FAO data [8] and maximum

AFM1 concentrations in autumn sampling period and the "average exposure scenario for both sampling period" calculated from milk consumption according to FAO data (2012) and average AFM1 concentration calculated according Eq. 2.

Risk characterization was performed by calculating the Risk of hepatocellular carcinoma (HCC) incidence per year for each exposure scenario.

Risk of hepatocellular carcinoma (HCC) incidence per year, was calculated from the estimated dietary exposure to AFM1 multiplied by the AFM1 cancer potency (*P_{cancer}*) as follows:

$$HCC = EDI \cdot P_{cancer} \quad (3)$$

Where EDI is estimated dietary exposure to AFM1 and *P_{cancer}* the AFM1 cancer potency.

AFM1 cancer potency was calculated as follows:

$$P_{cancer} = 0.001 \cdot \%HbsAg^- + 0.03\%HbsAg^+ \quad (4)$$

Where, %HbsAg⁻ and HbsAg⁺ are the percentage of Hepatitis B virus surface antigen-negative and Hepatitis B virus surface antigen-positive individuals, respectively. In this calculation percentage of HBsAg⁺ individuals of 1.057% (low estimate) and 1.535% (high estimate) reported by northeast region of Bosnia and Herzegovina were considered [12].

The coefficients 0.001 and 0.03 refer to 0.001 liver cancer cases/year/100 000 individuals per 1ng/kg bw per day of AFM1 in Hepatitis B virus surface antigen-negative (HbsAg⁻) individuals 0.03 liver cancer cases/year/100 000 individuals per 1 ng/kg bw per day of AFM1 in HBsAg⁺ individuals [13].

Table 1. Occurrence of aflatoxin M1 (AFM1) in milk in Bosnia and Herzegovina

Regions	Aflatoxin M1 concentration [ng/L]						Average concentration*** [ng/L]
	April-June 2014*			October-November 2014**			
	Mean±SD	Min	October-November 2014**	Mean±SD	Min	Max	
Canton Sarajevo	6.00±4.00	1.00	15.00	4.85±1.16	3.23	6.65	7.31
Herzegovina-Neretva canton	16.00±4.00	13.00	19.00	6.11±2.18	3.23	13.9	
Canton Tuzla	27.00±18.00	10.00	46.00	9.72±9.95	1.88	24.9	
Romanija region	6.00±2.00	3.00	10.00	4.23±0.42	3.65	4.96	
Central Bosnia canton	14.00±13.00	3.00	36.00	7.81±9.76	2.73	38.9	
Zenica-Doboj canton	10.00±7.00	4.00	22.00	-	-	-	
Total	11.00±10.00	1.00	46.00	6.62±6.36	1.88	38.00	

*unpublished date, ** Bilandžić et al. [10], ***Calculated by Eq. 2

RESULTS AND DISCUSSION

Estimated dietary intake of AFM1 for the general population of Bosnia and Herzegovina was in a range of 0.076-0.310 and 0.045-0.256 ng/kg bw per day in spring and autumn sampling period, respectively. Average EDI calculated using average concentration was 0.049 ng/kg bw per day. The highest EDI (0.184-0.310 and 0.065-0.168 ng/kg bw per day in spring and autumn sampling

period, respectively) was determined in Tuzla canton (northeast Bosnia and Herzegovina) in both sampling periods, and the smallest one in Sarajevo canton (0.039-0.101 ng/kg bw per day) in spring and the Romanija region (0.028-0.033 ng/kg bw per day) in autumn sampling period, both regions are located in central east Bosnia and Herzegovina (Tables 2 and 3). The results of AFM1 concentration in milk in Bosnia and Herzegovina in two sampling periods are in an

agreement to the previously reported fact about seasonal effect influences the concentration of aflatoxin M1. Climate conditions in Bosnia and Herzegovina region are characterized with cold winter, humid spring and relatively warm autumn. Some authors reported the higher concentration of AFM1 in cold seasons as compared to hot seasons. In cold months milking animals are mostly fed with compound feeds and thus the concentration of aflatoxin B1 increases which in turn enhances AFM1 concentration in milk. Moreover, high temperature and moisture contents also affect the presence of aflatoxin B1 in feeds. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* can easily grow in feeds having moisture between 13% and 18% and environmental moisture between 50% and 60% and produce the toxin [1].

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) was calculated the estimated of AFM1 intake to be approximately 0.11 ng/kg bw day for the European type diet. This estimation was calculated based on the European regional consumption of milk and milk products of 340 g per person per day (the Global Environment Monitoring System (GEMS)/Food regional diets data) and the weighted mean concentration of AFM1 in the milk of 23 ng/kg [13]. Considering the deterministic approach of this estimation and considerably higher reported consumption of milk obtained from FAO report, and lower values of mean

AFM1 concentration in milk, exposure to AFM1 just in one region of Bosnia and Herzegovina was slightly higher (Tuzla canton 0.184 ng/kg b.w. per day) and in the other regions even lower (average EDI 0.049 ng/kg bw per day) than this reported for the European type diet [13]. Other studies also confirmed a relatively low exposure to the AFM1 general adult population. Cano-Sancho et al. [14] estimated the exposure of the adult Catalanian population to be 0.039 ng/kg bw per day, Shundo et al. [15] reported intake of AFM1 by the Brazilian adult population of 0.08 ng/kg bw per day and Kos et al. [16] estimated exposure to AFM1 in Serbia through milk intake in 2013 to be 0.21 ng/kg bw per day. Taking into consideration represented exposure assessment, results from Bosnia and Herzegovina are comparable to the ones obtained from regions with climate conditions suitable for aflatoxins production.

We found that the risk of hepatocellular carcinoma (cases/year/100 000 individuals), depending on the HBsAg⁺ prevalence (Tables 2 and 3), was relatively low (average 0.000064-0.000074 cases/year/100,000). In a population of 3,531,159 [17] with an HBV prevalence rate of 1.057% (low estimate) and 1.535% the projected increase in risk would correspond to about 0.002-0.003 additional cases per year at EDI of AFM1 of 0.049 ng/kg bw per day. Highest estimated HCC was in Canton Tuzla region (HCC 0.000240-0.000266).

Table 2. Risk characterization for of aflatoxin M1 in spring sampling periods

Regions	EDI* (ng/kg bw day)	EDI** (ng/kg bw day)	HCC*	HCC**
Canton Sarajevo	0.039	0.101	0.000051-0.000057	0.000132-0.000146
Romanija region	0.042	0.067	0.000055-0.000060	0.000088-0.000097
Zenica-Doboj canton	0.067	0.148	0.000088-0.000097	0.000193-0.000214
Central Bosnia canton	0.095	0.242	0.000124-0.000137	0.000317-0.000350
Herczegovina-Neretva canton	0.108	0.128	0.000141-0.000156	0.000167-0.000185
Canton Tuzla	0.184	0.310	0.000240-0.000266	0.000405-0.000447
Total	0.076	0.310	0.000100-0.000110	0.000405-0.000447

*"mean exposure spring sampling period", calculated from milk consumption according to FAO data (2012) and average AFM1 concentrations during spring sampling period, **"the worst case exposure scenario in spring sampling period" calculated from milk consumption according to FAO data (2012) and maximum concentrations of AFM1 in the spring sampling period.

Table 3. Risk characterization of aflatoxin M1 in sampling periods October-November 2014

Regions	EDI* (ng/kg bw day)	EDI** (ng/kg bw day)	HCC*	HCC**
Zenica-Doboj canton	-	-	-	-
Romanija region	0.028	0.033	0.000037-0.000041	0.000044-0.000048
Canton Sarajevo	0.033	0.045	0.000043-0.000047	0.000058-0.000065
Herczegovina-Neretva canton	0.041	0.094	0.000054-0.000059	0.000122-0.000135
Central Bosnia canton	0.053	0.262	0.000069-0.000076	0.000342-0.000378
Canton Tuzla	0.065	0.168	0.000085-0.000095	0.000219-0.000242
Total	0.045	0.256	0.000058-0.000064	0.000342-0.000378

*"mean exposure in autumn sampling period", calculated from milk consumption according to FAO data (2012) and average AFM1 concentrations during the spring sampling period, **"the worst case exposure scenario in autumn sampling period" calculated from milk consumption according to FAO data (2012) and maximum concentrations of AFM1 in the autumn sampling period.

CONCLUSION

We found a relatively low estimated daily intake of AFM1 by milk consumption in a general population of Bosnia and Herzegovina. The highest EDI was in a

northeast Bosnia and Hercegovina and the lower ones in central east Bosnia and Herzegovina. Slightly higher exposure was in spring sampling period than in autumn that could be explained with climatic condition of this

region and the livestock feeding practice. HCC was relatively low, but not inconsiderable.

LIMITATIONS OF STUDY

There are some limitations of this study. The data of concentrations of AFM1 used for exposure assessment and risk characterization are not representative enough. But, there are any published data on the concentration of AFM1 in milk in Bosnia and Herzegovina, except a study of Bilandžić et al. [10]. Also, we could not find any public report about the state of art of content of AFM1 in milk and milk products from the market in Bosnia and Herzegovina. Further, in this study, all calculations were made for a general adult population and taking into account just results of AFM1 concentration in raw milk samples. AFM1 is present in other dairy products and future analysis should include analysis of AFM1 content in heat-treated milk and milk for the manufacture of milk-based products. Also, more precise analysis of milk and dairy product intake must be done especially for some specific population such as toddlers, adolescents, female etc.

The ELISA test is often considered as a semi-quantitative test and inappropriate for use in risk assessment and it is suggested that all analysis of AFM1 concentration in various type of sample should be done with some of instrumental technics.

The results presented herein are the first results of the risk characterization of AFM1 associated with milk consumption in Bosnia and Herzegovina. The risk to public health seems to be negligible for the general BiH population but still, this first set of data represents a very valuable starting point for future research.

The data of this first investigation indicating that there is a need for more precise research on the consumption frequency of milk, especially among the specific population (e.g. toddlers, child, adolescents), to evaluate a reliable risk assessment per population.

REFERENCES

- [1] Yitbarek, M.B., Tamir, B. (2014). Mycotoxines and/or aflatoxines in milk and milk products: Review. *International Journal of Agricultural Sciences*, 4 (10), 294-311.
- [2] Khaniki, J. (2007). Chemical contaminants in milk and public health concerns: A review. *International Journal of Dairy Science*, 2(2), 104-115.
- [3] Pardakhti, A.R., Maleki, S. (2019). Risk assessment of aflatoxin M1 contamination of milk in Iran. *International Journal of Environmental Research*, 13, 265-271.
- [4] Ali, N., Hashim, N.H., Yoshizawa, T. (1999). Evaluation and application of a simple and rapid method for the analysis of aflatoxins in commercial foods from Malaysia and the Philippines. *Food Additives and Contaminants*, 16, 273-280.
- [5] Govaris, A., Roussi, V., Koidis, A., Botsoglou, N.A. (2001). Distribution and stability of aflatoxin M1 during processing, ripening and storage of Teleme cheese. *Food Additives and Contaminants*, 18, 437-443.
- [6] Peng, K.Y., Chen, C.Y. (2009). Prevalence of aflatoxin M1 in milk and it's potential liver cancer risk in Taiwan. *Journal of Food Protection*, 72, 1025-1029.
- [7] The Commission of the European Communities. (2016). Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19. December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal, L 364/5*, 1-39.
- [8] Ured za Zakonodavstvo. (2018). Pravilnik o izmjenama pravilnika o najvećim dozvoljenim količinama određenih kontaminanata u hrani. *Službeni glasnik BiH*, 84, 15-18 (In Bosnien).
- [9] Regional Office for Europe and Central Asia Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2012). The Meat and Dairy Sector in Bosnia and Herzegovina, Preparation of IPARD Sector Analyses in Bosnia and Herzegovina, GCP/BIH/007/EC, FAO, 2012.
- [10] Bilandžić, N., Tanković, S., Jelušić, V., Varenina, I., Solomun Kolanović, B., Luburić, E.B., Cvetnić E. (2016). Aflatoxin M1 in raw and UHT cow milk collected in Bosnia and Herzegovina and Croatia, *Food Control*, 68, 352-357.
- [11] Udovicki, B., Djekic, I., Kalogianni, E., P., Rajkovic, A. (2019). Exposure assessment and risk characterization of aflatoxin M1 intake through consumption of milk and yoghurt by student population in Serbia and Greece Bozidar *Toxins*, 11, 205.
- [12] Petrovic, J., Salkic, N.N., Ahmetagic, S., Stojic, V., Mott-Divkovic, S. (2011). Prevalence of chronic Hepatitis B and Hepatitis C among first time blood donors in Northeast Bosnia and Herzegovina: An estimate of prevalence in general population. *Hepatitis Monthly*, 11(8), 629-633.
- [13] FAO. (2001). JECFA Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on food additives. In FAO Food Nutric Paper, FAO, Rome, Italy.
- [14] Cano-Sancho, G., Sanchis, V., Marín, S., Ramos, A.J. (2013). Occurrence and exposure assessment of aflatoxins in Catalonia (Spain). *Food and Chemical Toxicology*, 51, 188-193.
- [15] Shundo, L., Navas, S.A., Lamardo, L.C.A., Ruvieri, V., Sabino, M. (2009). Estimate of aflatoxin M 1 exposure in milk and occurrence in Brazil. *Food Control*, 20, 655-657.
- [16] Kos, J., Levic, J., Duragic, O., Kokic, B., Miladinovic, I. (2014). Occurrence and estimation of aflatoxin M1 exposure in milk in Serbia. *Food Control*, 38, 41-46.
- [17] Agency for Statistics of Bosnia and Herzegovina. (2016). *Census Of Population, Households And Dwellings In Bosnia And Herzegovina, Final Results*. Agency for Statistics of Bosnia and Herzegovina, Sarajevo.

Effect of Heat Treatment on Protein Fractions of Edible Poultry Eggs

Özgür Tarhan , Mustafa Gözler , Rahmi Can Yavuz , Melike Şimşek 

Uşak University, Engineering Faculty, Department of Food Engineering, 1 Eylül Campus, 64200, Uşak, Turkey

Received (Geliş Tarihi): 26.08.2020, Accepted (Kabul Tarihi): 16.09.2020

✉ Corresponding author (Yazışmalardan Sorumlu Yazar): ozguratarhan@gmail.com (O. Tarhan)

☎ +90 276 2212121-6727 📠 +90 276 2212183

ABSTRACT

Poultry eggs are highly important in human nutrition due to their content of essential amino acids, vitamins, minerals, and enzymes. Eggs of edible poultries such as hen, turkey, quail, and goose may have some differences in their nutritional composition. Various heat treatments applied before consumption lead to some alterations in their nutrients, especially proteins. The purpose of this study was to investigate compositional and structural changes in the protein fractions of hen, quail, turkey, and goose eggs when exposed to soft- and hard-boiling (11-16 min and 18-19 min), and frying (2-7 min). Electrophoresis and spectroscopy were used to determine the effects of these heat treatments on egg white and yolk proteins separately. It was observed that the heat degradation of proteins in egg white was higher than that in egg yolk. As expected, protein degradation was increased when heat exposure was extended. Hard-boiling treatment completely denatured egg white proteins almost in all poultry species. Ovomuroid was the most resistant fraction against heat denaturation in white proteins, while livetins in yolk. Soft-boiling under the given conditions resulted in mostly retained profiles of proteins in egg yolk of all species. Relevant to protein degradation, remarkable structural changes were detected in the protein secondary structure of hard-boiled and fried egg samples. Significant data obtained in this research revealed the influence of heat treatment on the protein content of edible eggs. Those findings are expected to help in developing the processes and consumption methods of egg products for dietary purposes and improvement of human health.

Keywords: Egg, Protein, Poultry, Electrophoresis, Spectroscopy

Isıl İşlemin Yenilebilir Kanatlı Yumurtalarındaki Protein Fraksiyonlarına Etkisi

ÖZ

İçerisinde barındırdığı esansiyel amino asitler, vitaminler, mineraller ve enzimler ile yumurta insan beslenmesinde oldukça önemli bir yere sahiptir. Tavuk, bıldırcın, hindi ve kaz gibi yenilebilir kanatlı yumurtaları besin bileşiminde bazı farklılıklara sahiptir. Tüketimden önce uygulanan çeşitli ısıl işlemler özellikle proteinler olmak üzere yumurtaların içerisinde barındırdığı besinlerde bazı bileşimsel ve yapısal değişikliklere yol açabilmektedirler. Bu çalışmanın amacı rafadan (11-16 dk.), tam haşlanmış (18-19 dk.) ve sahanda pişirilmiş (2-7 dk.) tavuk, bıldırcın, hindi ve kaz yumurtalarının protein fraksiyonlarındaki bileşim ve yapısal değişikliklerin araştırılmasıdır. Bu ısıl işlemlerin yumurta beyazı ve sarısı proteinleri üzerine etkileri elektroforez ve spektroskopi kullanılarak tespit edilmiştir. Yumurta beyazında sarısına oranla daha fazla ısıl degradasyon gözlenmiştir. Beklendiği gibi ısıl maruziyet süresi uzadıkça protein degradasyonu artmıştır. Tam haşlama hemen hemen bütün kanatlı türlerinin yumurta beyazı proteinlerini denatüre etmiştir. Yumurta sarısında livetin fraksiyonları iken yumurta beyazında ovomukoid ısıl denatürasyona karşı en dayanıklı fraksiyondur. Rafadan haşlamada bütün türlerin yumurta sarılarındaki protein fraksiyonları çoğunlukla denatürasyondan korunmuştur. Protein yıkımı ile bağlantılı olarak tam haşlanmış ve sahanda yumurta örneklerinde protein ikincil yapısında dikkat çekici farklılıklar tespit edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen önemli veriler ısıl işlemin yenilebilir yumurta proteinleri üzerine etkisini ortaya koymuştur. Bu bulguların beslenme ve insan sağlığını iyileştirme

amacına yönelik olarak yumurta içeren ürünlerin üretim ve tüketim yöntemlerini geliştirmede katkı sağlayacağı beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Yumurta, Protein, Kanatlı, Elektroforez, Spektroskopi

INTRODUCTION

Eggs contain high quality of nutrients including proteins, phospholipids, and various micromolecules such as vitamins A, B, D and E, and minerals Ca, P, K, Mg, Fe, and Zn. This rich nutrient content is quite beneficial for every living mammalian. Eggs also contain antioxidants and antimicrobial compounds providing health benefits for the human being. Carotenoids such as lutein, zeaxanthin, and choline as well are found in significant amounts in eggs [1]. Besides these beneficial effects, one adverse effect is associated with allergic reactions in the human body due to egg proteins [2, 3]. In comparison to hen and quail eggs, turkey and goose eggs' proteins can exhibit higher allergic potential since they are big and comprising of the high amount of protein fraction [4]. A whole egg is composed of proteins (~10-14%), carbohydrates (~0.5-2.2 %), water (~88%), fat (~10-13%) , and ash (~1%) [5]. From the outer to the inner layer, it is composed of three main parts including shell, egg white (albumin), and egg yolk. In general, based on average weight, 11 % of an egg corresponds to the shell and the inner membrane, 58% to the egg white, and 31% to egg yolk [6]. Both egg white and yolk are rich in high-quality protein. Ovalbumin (54%) conalbumin (12%), ovomucoid (11%) and lysozyme (3.5%) are the most abundant proteins in the egg white, whereas livetins (38%), phosphitin (8%), and apoproteins (high-density lipoproteins, HDL of 36% and low-density lipoproteins, LDL of 17%) are the protein fractions of egg yolk [6, 7].

Electrophoresis is a common tool used for separation and identification of proteins from various sources. Electrophoretic mobilities of protein fractions greatly differ through their molecular weight and charges. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) is mostly used to elucidate food proteins and facilitate comparison of their profiles after various treatments.

Animal-based proteins are essential for human nutrition. Egg protein has the highest biological value due to its rich essential amino acid content and high digestibility with 95% when compared to milk (85%) and meat (74%) [8]. Leucine, isoleucine, methionine, and lysine are the most important essential amino acids existing in egg white and yolk proteins [9].

Protein denaturation induced by heating can facilitate the action of digestive enzymes, thus providing higher assimilation of cooked egg proteins [10, 11]. Egg proteins are also widely used as ingredients in the food products including bakery, dressings, and meat formulations. Egg white is commonly used in food processing owing to its functional properties such as emulsifying, foaming, and gelling [12]. These functional properties of egg proteins might be changed desirable

or undesirably during processing according to process conditions. For example, controlled heat treatment can induce protein denaturation thus may alter their functionality such as enhanced gelation ability. Both direct consumption and industrial use require the heat processing of eggs through different treatments.

Edible poultry (hen, quail, turkey, goose, etc.) eggs are consumed via different cooking treatments such as boiling and frying. Cooking techniques with varying temperatures and time periods can lead to denaturation of protein fractions at different levels. Some egg proteins are heat resistant such as ovomucoid, whereas some are heat-labile such as lysozyme and ovotransferrin [11]. The length and temperature of heat treatment are critical parameters determining the extend of protein denaturation. The eggs of four different poultry species used in this study are hen, turkey, quail, and goose to follow the effect of different cooking methods on their protein fractions. Eggs of each species differ in size, weight, the proportion of constitutional parts, and their macro- and micro molecular contents [13]. When compared to the other constituents the relative protein amount of the eggs of these species is mostly stable about 13% [11].

Protein denaturation via heat or other factors resulted in destabilization of hierarchical quaternary and tertiary structures unfolded to secondary structure, then followed by conformational alterations in secondary structure elements through breakage of hydrogen bondings and hydrophobic interactions. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) is a widely used versatile technique for the determination of structural changes in protein secondary structure via major vibrational modes known as amide I and amide II stretching bands [14].

It has been well-stated that edible poultry eggs have critical importance in nutrition and the preparation methods are highly effective in their constituents regarding compositional and structural features. Since proteins are the fundamental nutrients in eggs, different cooking styles might significantly alter the structure and conformation of protein fractions, potentially leading to altered bioabsorption. There is still lack of comprehensive and comparative analyses regarding the protein structure and bioavailability of various poultry eggs when exposed to thermal treatments. The present work aimed to investigate compositional and structural changes in protein fractions of soft-boiled, hard-boiled, and fried eggs of different poultry species using gel electrophoresis and infrared spectroscopy.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Four different poultry eggs were used in this study. Hen and quail eggs produced by Kor Agro Organic Gıda AŞ. (Turkey) were purchased from a local market, and goose and turkey eggs were kindly supplied by villagers in Uşak, Turkey. Commercially produced twenty day-old hen eggs with approximately 62 g in weight, and thirty day-old quail egg with 14 g in weight were used. Also, village-grown, twenty to thirty-day old turkey and goose eggs with 75 g and 180 g in average weight, respectively, were used in this study. Electrophoresis chemicals and the standard marker were purchased from Bio-Rad Laboratories Inc (Hercules, CA, USA). Other chemicals were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA).

Methods

Proteins extracted from soft-boiled, hard-boiled, and fried egg white and yolk samples were analyzed by SDS-PAGE for protein profiling and FT-IR for determination of conformational changes in protein structure.

Sample Preparation

Eggs of all species were subjected to heat treatment for different time periods as given in Table 1. Soft- and hard-boiling conditions were set due to preliminary studies. Various trials were conducted to determine cooking time for obtaining the desirable appearance of egg white and yolk. In case of soft-boiling, the white was not fully set (still soft) and the yolk was thick but runny. In case of hard-boiling, both the white and yolk were fully set. For the boiling procedure, one-liter glassware containing 500 ml water and eggs were placed onto a heating plate adjusted to 350 °C (not pre-heated) and exposed to heating via time schedules indicated in Table 1. Hen and quail eggs were boiled two by two, whereas goose and turkey eggs were boiled one by one. Then the eggs were taken out and placed in water at room temperature (~ 24°C) to cool down. The egg white and yolk were separated prior to protein extraction to be explained in the following section. White and yolk parts of the eggs to be fried were separated first, then exposed to frying in a non-stick pan with a diameter of 20 cm, on the heating plate at 350 °C as scheduled in Table 1. The heating plate was not pre-heated when the first sample, the hen's egg white was fried, however, it was already pre-heated for the other samples. The treatment was achieved when the whites and yolks were totally set. No oil was used for the frying treatments in order to eliminate its effects on the changes in protein structure. Two eggs were cooked for each poultry type and the experiments were conducted in duplicate. Uncooked or raw egg samples were also used for comparison in the experiments.

Table 1. Cooking periods applied to the poultry eggs

Type of poultry eggs	Soft-boiling (min)	Hard-boiling (min)	Frying (min)	
			Yolk	White
Hen	15	18	3	7
Quail	11	18	2	5
Turkey	15	18	2	3
Goose	16	19	4	3

Protein Extraction

The extraction of protein fractions in the eggs was achieved according to a previous study with minor modifications [15]. One hundred milligrams of samples from uncooked, boiled and fried eggs were put into Eppendorf® tubes and mixed quite well with 100 µL ultrapure water. It was stored at +4°C overnight. To unfold protein, 1 ml of 90% trichloroacetic acid (TCA), v/v, was added and vortexed until mixed quite well. Then the samples were kept on ice for one and half an hour and centrifuged at 12000 rpm and +4°C for 5 minutes. Non-proteinous parts and other residues within the supernatant were discarded by three sequential washing steps. After the last washing, diethyl ether/ethanol (50/50 %, v/v) solution was added and mixed well. The samples were centrifuged at 12000 rpm and +4°C for 5 minutes. By discarding supernatant two sequential washing steps were carried out. The resultant

pellets were dissolved in 500 µL ultrapure water and stored at +4°C for further analyses.

SDS-PAGE Analysis

Proteins in the fractions were analyzed by SDS-PAGE according to Laemmli [16]. Samples were mixed with sample buffer (1:1) and boiled for 5 minutes to denaturate proteins. Twenty microliters of each sample were loaded to each well. Electrophoresis was carried out on a 4-12 % polyacrylamide gel. It was run at 75 V in the first 15 minutes, then at 150 V for 1 hour. Following protein staining performed using Coomassie Brilliant Blue R250 for 30 min, destaining was carried out for a few hours and protein bands were examined.

FT-IR Spectroscopy

Infrared measurements were carried out using a Perkin-Elmer 100 FTIR Spectrometer (Wesseley, MA, USA) equipped with a horizontal ATR sampling accessory, at room temperature. Nearly, 100 µl samples were placed onto a crystal surface and the measurements were taken in the range of 4000-400 cm⁻¹. The resolution was 4 cm⁻¹ and 32 scans were recorded per each spectrum with a scan speed of 1 cm/sec. A background was recorded before each measurement.

RESULTS AND DISCUSSION

Protein Profiling

Hen, quail, goose, and turkey's eggs were subjected to boiling and frying treatments and resultant varying degree of denaturation in protein structure was investigated. Protein profiles of raw and heat-treated egg samples recorded using SDS-PAGE analysis were given in Figure 1. Egg yolk and white proteins belonging to each poultry species were well-fractionated on the

gels in consistency with the previous studies [4, 7, 15, 17, 18]. Based on their molecular weights, the identification of the protein fractions in egg white and yolk were carried out by the help of marker proteins (M) run in the corresponding lanes of each gel.

Major protein fractions in egg white are ovalbumin (~ 45 kDa) [19], ovotransferrin (~ 70 kDa) [20], ovomucoid (~ 28 kDa) [21], and lysozyme (~ 14 kDa) [22], whereas in egg yolk are LDL (~20-220 kDa) [7], HDL (~30-110 kDa) [23], livetins (~ 25-203 kDa) [17], and phosvitin (~45 kDa) [18]. In raw egg white of all poultries four major protein fractions were detected, however higher band intensities were observed in some fractions such as ovalbumin and ovotransferrin due to their higher amounts and solubilities when compared to the others [7]. The sorted profiles of heat-treated egg white and yolk samples were examined separately by comparing them to the corresponded untreated samples. Qualitative differences were detected in the protein fractions of different poultry eggs investigated in this study.

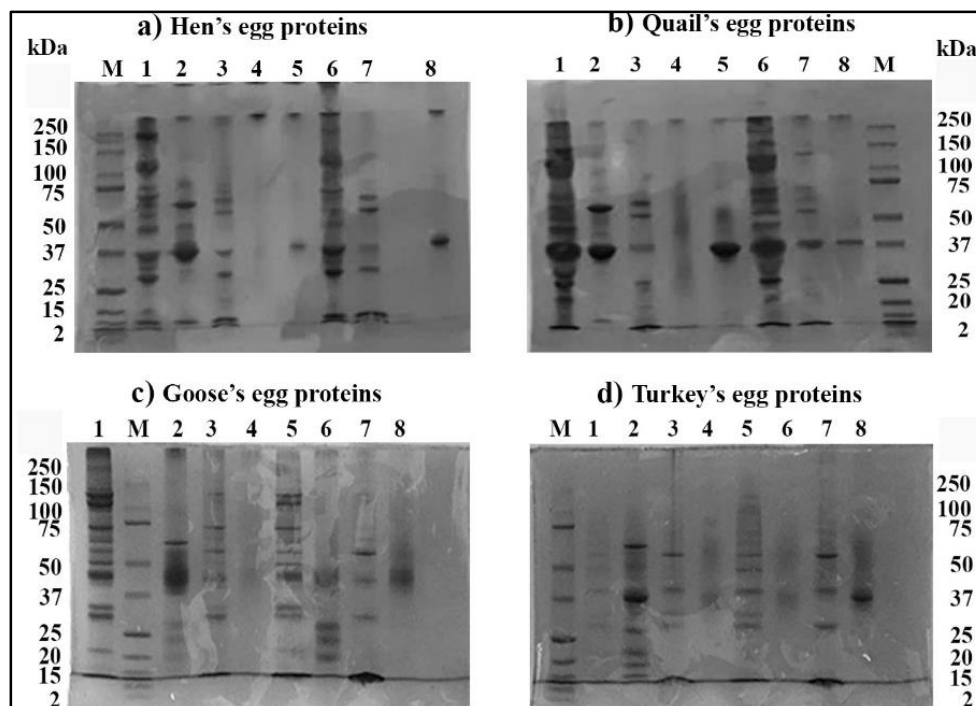


Figure 1. Protein profiles of the different poultry eggs subjected to various cooking treatments. Lane M represents the protein standard. a) Hen's egg proteins, lane a1: raw egg yolk; lane a2: raw egg white; lane a3: hard-boiled egg yolk; lane a4: hard-boiled egg white; lane a5: soft-boiled egg white; lane a6: soft-boiled egg yolk; lane a7: fried egg yolk; lane a8: fried egg white. b) Quail's egg proteins, lane b1: raw egg yolk; lane b2: raw egg white; lane b3: hard-boiled egg yolk; lane b4: hard-boiled egg white; lane b5: soft-boiled egg white; lane b6: soft-boiled egg yolk; lane b7: fried egg yolk; lane b8: fried egg white. c) Goose's egg proteins, lane c1: raw egg yolk; lane c2: raw egg white; lane c3: hard-boiled egg yolk; lane c4: hard-boiled egg white; lane c5: soft-boiled egg yolk; lane c6: soft-boiled egg white; lane c7: fried egg yolk; lane c8: fried egg white. d) Turkey's egg proteins, lane d1: raw egg yolk; lane d2: raw egg white; lane d3: hard-boiled egg yolk; lane d4: hard-boiled egg white; lane d5: soft-boiled egg yolk; lane d6: soft-boiled egg white; lane d7: fried egg yolk; lane d8: fried egg white.

Table 2 represents the detected protein fractions in raw, soft- and hard-boiled, and fried protein white and yolk's of each poultry species based on SDS-PAGE images given in Figure 1. As it is clearly seen in the gel images

and the table protein denaturation induced by heat treatment resulted in lowered band volume intensities and/or disappeared bands. Egg yolk proteins seemed to be more resistant to heat denaturation than egg white

fractions in all species. Protein profiles of soft-boiled yolks were very similar to that of raw yolks with lowered band intensities most probably arisen from partial denaturation. Ovomuroid fraction in egg white showed remarkable resistance to boiling and frying treatments. Similarly, α -, β - livetin, and apovitellenin III exhibited heat resistance among other yolk fractions. In comparison to LDL proteins, HDL proteins in egg yolk were observed as much more heat-labile. A band corresponding to phosvitin fraction remained in goose and turkey egg yolks after heat treatments including hard-boiling and frying.

The protein patterns of hen's and quail's eggs were very similar in both white and yolk after treatments. It is remarkably observed that most of the whole egg white proteins of all species were denatured in case of hard-boiling. In a previous study investigating the thermostability of egg yolk granules when exposed to heat up to 79°C [23]. They reported that LDL and some HDL fractions were heat-sensitive while phosphitin and some other HDL fractions were resistant to heat in prepared egg yolk granules. Our findings were in agreement with those to some extent since here the egg samples were subjected to a higher temperature during boiling and frying treatments, thus strongly inducing protein denaturation.

Table 2. Protein fractions in white and yolk's of eggs cooked with different treatments

Major protein fractions in egg white	Mwt (kDa)	Egg white																
		Hen				Quail				Goose				Turkey				
		R	S	H	F	R	S	H	F	R	S	H	F	R	S	H	F	
Ovalbumin	~ 45	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	
Ovotransferrin (conalbumin)	~ 76	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	
Ovomucoid	~ 28	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	
Lysozyme	~ 14	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	
Major protein fractions in egg yolk	Mwt (kDa)	Egg yolk																
		Hen				Quail				Goose				Turkey				
		R	S	H	F	R	S	H	F	R	S	H	F	R	S	H	F	
Livetins	α - livetin	~ 55, 73	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	β - livetin	~ 33, 36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	γ - livetin	~ 203, 25	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
LDL apoproteins	Phosvitin	~ 45	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Apovitellenin VIa	~ 220	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	Apovitellenin Va	~ 120	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	Apovitellenin IV	~ 68	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	Apovitellenin III	~ 62	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
	Apovitellin 3+4	~ 110	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	Apovitellin 5+6	~ 78	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Apovitellin 8	~ 31	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Apovitellin 8	~ 31	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

R: raw, S: soft-boiled, H: hard-boiled, F: fried, Mwt: molecular weight, kDa: kilo dalton, LDL: low density lipoproteins, HDL: high density lipoproteins

FT-IR Analysis of Protein Fractions in Eggs

Figure 2 shows the FT-IR spectra of protein fractions in yolk and white of hen, quail, and goose eggs. Structural changes in their proteins were tracked in soft- and hard-boiled, and fried eggs of these species. Raw eggs of these poultries were also analyzed for comparison. Qualitative assessment of secondary structure changes revealed denaturation and aggregation in egg proteins leading to alterations in their functional and bioactive properties [24]. The amide I band defined between ~1700 and 1620 cm^{-1} due to the C=O stretching is the well-recognized region to determine the changes in the protein secondary structure. Other vibrational regions involved in the identification of the elements in protein structure are the amide II band between ~1560 and 1520 cm^{-1} due to combination of N-H bending and C-N stretching vibrations and the amide III band between ~1320 and 1220 cm^{-1} due to combination of N-H bending and C-N stretching vibrations [25-27].

The major peaks detected in each infrared spectra were analyzed by considering the given polypeptide vibration band assigned to the secondary structure elements with the reported literature works [27-29]. The stretching bands at 1697 cm^{-1} and 1636/1626 cm^{-1} correspond to β -sheet, and those at ~1687/1670/1669 cm^{-1} correspond to β -turn structures. The peaks belonging to those structural elements were tracked in all egg samples (Figure 2). It was observed that β -sheet structures assigned to the bands at around 1697/1687/1636 cm^{-1} mostly retained during heat treatments with noted partial losses in case of hard boiling and frying. The α -helix structure is mostly attributed to the bands at 1664/1663/1650 cm^{-1} were observed with lowered peak intensities indicating partial degradation due to boiling and frying treatments. The random coil structures were also observed due to the peaks detected at ~1646/1645 cm^{-1} . In the amide II region, the peaks at ~1558 cm^{-1} assigned to α -helical and ~1525 cm^{-1} to β -sheet structures were detected in both yolk and white samples before and after cooking treatments. The peaks

between ~ 1315 and 1280 cm^{-1} in the amide III region attributed to α -helix and some random structures were detected in yolk and white fractions of eggs as well. The detected peaks and corresponding structural elements are comparable to the previous reports [17].

In hen's, quail's, and goose's eggs, the spectra of raw and soft-boiled yolks resembled with the lowered intensities in the latter case (Figure 2A1, 2B1 and, 2C1). In the amide I region, decreases and decreases in the corresponding bands showed lowered α -helix content and increased β - and random structures due to cleavage of protein structure via heat. Hard-boiling and frying resulted in remarkable changes in protein conformation especially in the amide I region. In case of hard-boiling irreversible denaturation seemed to

enhanced protein aggregation and thus buried helical or beta structure patches.

Overall, many shifts, losses, and newborn peaks detected especially in the amide I region exhibited some structural changes in the egg yolk and white fractions of the investigated species. Conformational alterations such as the loss in the helices and increase in the β -, random, and aggregated structures indicated thermal denaturation and reconstitution due to aggregation of cleaved peptide fragments. As the heat exposure prolonged, eg. during hard-boiling, or various reactions taken place, eg. due to water loss during frying, the hydrogen bonds mostly holding the structural elements of egg proteins were broken down and tend to form new bindings leading to an aggregation network.

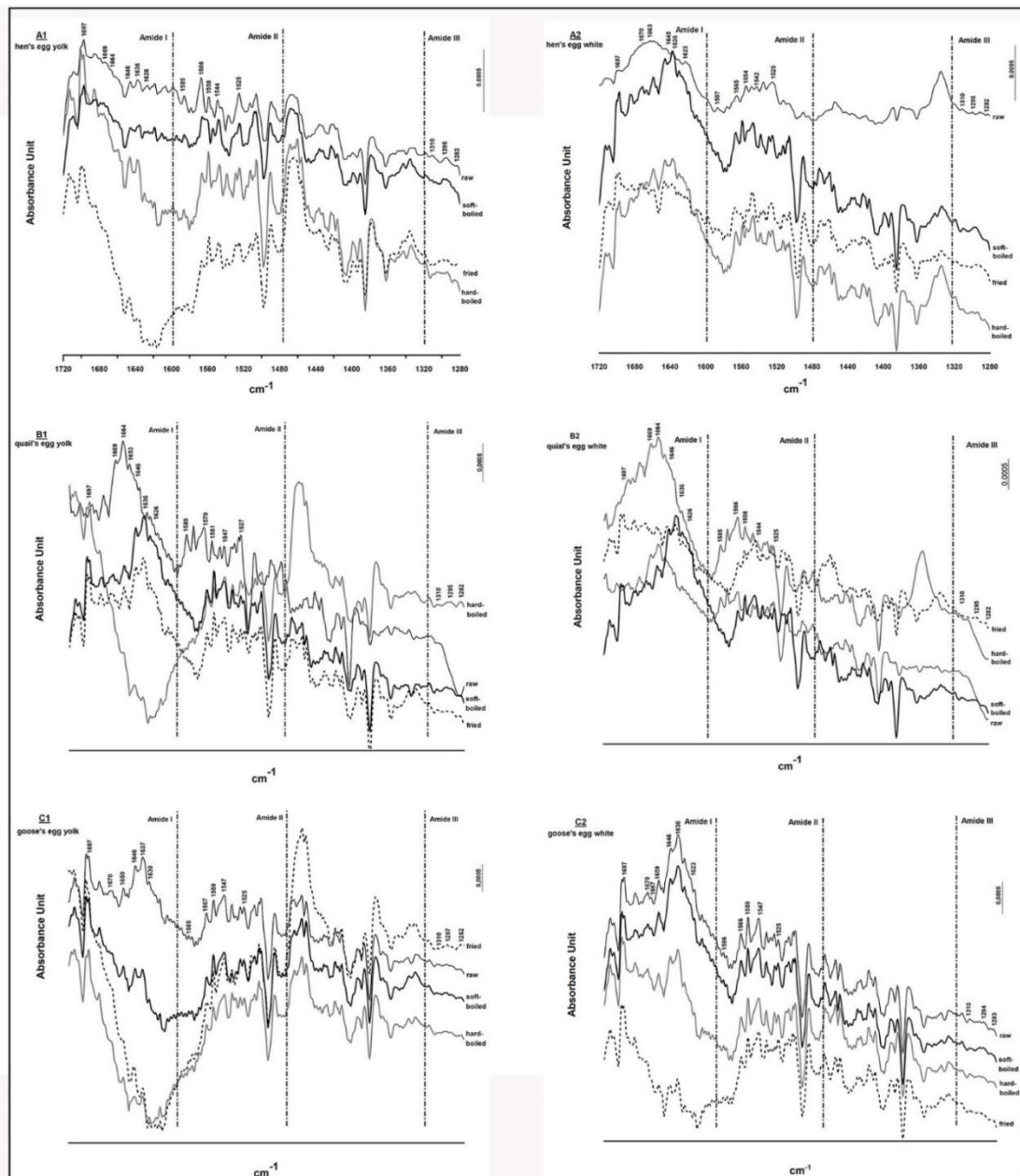


Figure 2. FT-IR spectra of poultry eggs. A1 and A2 represent hen's egg yolk and white; B1 and B2 represent quail's egg yolk and white; C1 and C2 represent goose's egg yolk and white for raw, soft-boiled, hard-boiled, and fried eggs. Peaks of α -helices, β -sheets, turns and random coils were assigned based on literature.

CONCLUSION

Egg proteins are quite valuable for human nutrition. The eggs of different poultry species can be consumed via different cooking styles including boiling and frying. These treatments strongly lead to protein denaturation and thus change its technological properties and nutritive value due to digestibility in the body. Here, protein profiles and structural conformations of the egg white and yolk proteins were studied using electrophoresis and spectroscopy. SDS-PAGE analysis revealed that some protein bands corresponding to well-known fractions in raw egg yolk and white were mostly retained in soft-boiling, but disappeared in hard-boiled and fried yolk samples due to denaturation. According to IR findings, hard boiling and frying treatments resulted in conformational changes in the protein structure, especially in egg yolk. Quail's egg white was mostly retained its conformational structure when exposed to boiling. In each poultry species soft-boiling led to less protein denaturation and thus structural deformation in both egg white and yolk. However, hard-boiling resulted in significant protein denaturation and aggregation.

Overall, the native structure of the existing protein fractions in the egg was degraded in varying degrees based on the cooking technique. Additionally, the protein secondary structure was mostly retained with some conformational changes. To better emphasize the time and temperature dependency of the egg protein denaturation, another research is underway. Moreover, the effect of these treatments on the bioavailability of essential amino acids will also be investigated in the future.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank Dr. Eyüp Yıldırım from Uşak University Chemical Engineering Department for his valuable help in FT-IR studies.

REFERENCES

- [1] Zhu, Y., Vanga, S.K., Wang, J., Raghavan, V. (2018). Impact of food processing on the structural and allergenic properties of egg white. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 188-196.
- [2] Mine, Y., Yang, M. (2008). Recent advances in the understanding of egg allergens: basic, industrial, and clinical perspectives. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(13), 4874-4900.
- [3] Verhoeckx, K.C.M., Vissers, Y.M., Baumert, J.L., Faludi, R., Feys, M., Flanagan, S., Herouet-Guicheney, C., Holzhauser, T., Shimojo, R., van der Bolt, N., Wichers, H., Kimber, I. (2015). Food processing and allergenicity. *Food and Chemical Toxicology*, 80, 223-240.
- [4] Bratu, M.M. Birghila, S., Miresan, H., Pirjol, T.N. (2017). Electrophoretic Method For Edible Eggs Species Identification. *Revista De Chimie*, 68(9), 1983-1987.
- [5] Abeyrathne, E.D.N.S., Lee, H.Y., Ahn, D.U. (2013). Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents-A review. *Poultry Science*, 92(12), 3292-3299.
- [6] Kovacs-Nolan, J., Phillips, M., Mine, Y. (2005). Advances in the value of eggs and egg components for human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22), 8421-8431.
- [7] Guha, S., Majumder, K., Mine, Y. (2018). Egg proteins. In *Encyclopedia of Food Chemistry*, Elsevier, pp. 74-84.
- [8] Çopur, G., Duru, M., Şahin, A., (2004). Düşük kolesterolü yumurta üretimi yönünde yapılan çalışmalar. *4. Ulusal Zootekni Bilim Kongresi*, September 1-3, Isparta, Turkey.
- [9] Çelebi, Ş., Karaca, H. (2006). Yumurthanın besin değeri, kolesterol içeriği ve yumurtayı n-3 yağ asitleri bakımından zenginleştirmeye yönelik çalışmalar. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 37(2), 257-265.
- [10] Evenepoel, P., Claus, D., Geypens, B., Hiele, M., Geboes, K., Rutgeerts, P., Ghoo, Y. (1999). Amount and fate of egg protein escaping assimilation in the small intestine of humans. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 277(5), G935-G943.
- [11] Réhault-Godbert, S., Guyot, N., Nys, Y. (2019). The golden egg: nutritional value, bioactivities, and emerging benefits for human health. *Nutrients*, 11(3), 684.
- [12] Mine, Y., Zhang, J.W. (2002). Comparative studies on antigenicity and allergenicity of native and denatured egg white proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9), 2679-2683.
- [13] Sun, C., Liu, J., Yang, N., Xu, G. (2019). Egg quality and egg albumen property of domestic chicken, duck, goose, turkey, quail, and pigeon. *Poultry Science*, 98(10), 4516-4521.
- [14] Tarhan, Ö., Tarhan, E., Harsa, Ş. (2014). Investigation of the structure of alpha-lactalbumin protein nanotubes using optical spectroscopy. *Journal of Dairy Research*, 81, 98-106.
- [15] Raikos, V., Hansen, R., Campbell, L., Euston, S.R. (2006). Separation and identification of hen egg protein isoforms using SDS-PAGE and 2D gel electrophoresis with MALDI-TOF mass spectrometry. *Food Chemistry*, 99(4), 702-710.
- [16] Laemmli, U.K. (1970). SDS-page Laemmli method. *Nature*, 227, 680-685.
- [17] Chalamaiah, M., Esparza, Y., Temelli, F., Wu, J. (2017). Physicochemical and functional properties of livetins fraction from hen egg yolk. *Food bioscience*, 18, 38-45.
- [18] Uysal, R.S., Acar-Soykut, E., Boyaci, I.H. (2020). Determination of yolk: white ratio of egg using SDS-PAGE. *Food Science and Biotechnology*, 29(2), 179-186.
- [19] McReynolds, L.B.A.J.D.S.M.G., O'malley, B.W., Nisbet, A.D., Fothergill, J.E., Givol, D., Fields, S., Robertson, M., Brownlee, G.G. (1978). Sequence of chicken ovalbumin mRNA. *Nature*, 273(5665), 723-728.
- [20] Li-Chan, E.C. (1995). The chemistry of eggs and egg products. *Egg Science and Technology*, 105-175.

- [21] Kovacs-Nolan, J., Zhang, J.W., Hayakawa, S., Mine, Y. (2000). Immunochemical and structural analysis of pepsin-digested egg white ovomucoid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12), 6261-6266.
- [22] Kato, A. (2005). Engineering hen egg-white lysozyme. In *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease*, CRC Press, 576-595p.
- [23] Anton, M., Denmat, M.L., Gandemer, G. (2000). Thermostability of hen egg yolk granules: Contribution of native structure of granules. *Journal of Food Science*, 65(4), 581-584.
- [24] Ulrichs, T., Drotleff, A.M., Ternes, W. (2015). Determination of heat-induced changes in the protein secondary structure of reconstituted livetins (water-soluble proteins from hen's egg yolk) by FTIR. *Food Chemistry*, 172, 909-920.
- [25] Anderle, G., Mendelsohn, R. (1987). Thermal denaturation of globular proteins. Fourier transform-infrared studies of the amide III spectral region. *Biophysical Journal*, 52(1), 69-74.
- [26] Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1767(9), 1073-1101.
- [27] Jackson, M., Mantsch, H.H. (1995). The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30(2), 95-120.
- [28] Ambrose, E.J., Elliott, A. (1951). Infra-red spectroscopic studies of globular protein structure. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, 208(1092), 75-90.
- [29] Kong, J., Yu, S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(8), 549-559.
-
-

Antibacterial and Anticancer Activities of Violacein Extracted Through Ultrasound-Assisted Extraction Method

Çağdaş Deniz Periz¹ , Seyhan Ulusoy¹  ✉, Gülgün Tınaz² , Turgut Şekerler³ 

¹Suleyman Demirel University, Department of Biology, Isparta, Turkey

²Marmara University, Department of Basic Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Istanbul, Turkey

³Marmara University, Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Istanbul, Turkey

Received (Geliş Tarihi): 31.05.2020, Accepted (Kabul Tarihi): 10.09.2020

✉ Corresponding author (Yazışmalardan Sorumlu Yazar): seyhanulusoy@sdu.edu.tr (S. Ulusoy)

☎ +90 246 211 40 68 📠 +90 246 211 43 99

ABSTRACT

Violacein is a natural violet pigment produced by various bacterial species, especially by the Gram-negative bacteria *Chromobacterium violaceum*. Violacein has antibacterial, antifungal, antioxidant and anticancer activities and has various applications in food, cosmetic, textile and pharmaceutical industries. In this study, violacein was extracted from the *Chromobacterium violaceum* culture through ultrasonic-assisted (UA) and microwave-assisted (MA) extraction methods using methanol, ethanol, acetone, and ethyl acetate as solvent. Violacein was quantified using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Then, antibacterial and anticancer activities of these extracts were investigated. In this study, for the first time, the violacein extract was obtained by using UA and MA extraction methods. The highest violacein concentration could be achieved by UAE method with methanol. It was found out that violacein extracts had an antibacterial effect against *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* (MRSA) and *Bacillus cereus*. The violacein extract had a strong anticancer effect on cervical cancer (HeLa) cells. Finally, the UA and MA extraction methods were successfully applied to bacterial cultures in order to extract the violacein.

Keywords: Violacein, Extraction, Antibacterial, Anticancer

Ultrason Destekli Ekstraksiyon Yöntemi ile Elde Edilen Viyolasinin Antibakteriyel ve Antikanser Aktiviteleri

ÖZ

Viyolasin, özellikle Gram-negatif bakteri *Chromobacterium violaceum* tarafından üretilen ve antibakteriyel, antifungal, antioksidan ve antikanser etkilere sahip çeşitli bakteri türleri tarafından üretilen doğal mor bir pigmenttir. Bu çalışmada, viyolasin, Ultrason destekli (UA) ve mikrodalga destekli (MA) ekstraksiyon prosedürleri ile *C. violaceum* suşundan metanol, etanol, aseton ve etil asetat kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Elde edilen viyolasin miktarı, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak belirlenmiştir. Daha sonra bu ekstraktların antibakteriyel ve antikanser aktiviteleri incelenmiştir. Bu çalışmada, viyolasin ilk kez UA ve MA ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak elde edilmiştir. Viyolasin ekstrelerinin *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* (MRSA) ve *Bacillus cereus*'a karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Viyolasin ekstresi rahim ağzı kanseri hücreleri (HeLa) üzerinde güçlü anti-kanser etkisi göstermiştir. Sonuçta, viyolasini ekstrakte etmek için, UA ve MA ekstraksiyon yöntemleri bakteri kültürlerine başarıyla uygulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Viyolasin, Ekstraksiyon, Antibakteriyel, Antikanser

INTRODUCTION

There is a great interest for using natural pigments in the food, textile, cosmetic and pharmaceutical industries. Numerous molecules (pigments etc.) waiting to be discovered have the potential to be used for new treatment methods and the production of alternative drugs. Violacein which is one of those molecules is the bisindole antibiotic, which is produced by a number of bacterial species [1-4], including strains of *Chromobacterium* [1, 2], *Janthinobacterium* [4] and *Duganella* [4]. Violacein, a violet pigment, has attracted much attention due to its pharmacological properties and bioactivities [5, 6]. Violacein pigment has several biological characteristics (including antifungal, antitumoral, antiparasitic, antiprotozoal, antioxidant, antiviral, and antibacterial activities) and it has gained increasing importance in food, medicine, cosmetics and textiles for various applications [7-14]. A study demonstrated that evaluation of the powdered violacein by spray drying mode and its potential application in food [14]. Violacein is primarily active against Gram-positive strains [1, 8, 15] however, is generally ineffective against Gram-negative strains.

Natural active molecules are important sources for drug development. There are several extraction procedures for extraction of these valuable natural compounds from plants and the other resources. Traditional extraction techniques are time-consuming and require relatively large quantities of solvents [16]. Microwave-assisted and ultrasonic-assisted extraction methods have been used for the extraction of bioactive compounds in order to shorten the extraction time, lower solvent consumption, increase extraction yields and improve the quality of the extracts [17-18].

In this study, violacein was firstly extracted with UA and MA extraction methods from *C. violaceum* ATCC 12472. The extract's antibacterial and cytotoxic activities was evaluated against Gram-positive (*S. aureus*, *Bacillus cereus*, *S. aureus* MRSA), and Gram-negative (*P. aeruginosa*, *E. coli*).

MATERIALS AND METHODS

Chemicals, Bacterial Strains and Media

Methanol, ethanol, ethyl acetate, and acetone were purchased from Merck. Violacein was purchased from Sigma. All other reagents and chemicals used were of analytical reagent grade.

Staphylococcus aureus ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 and *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 which were used in the study were obtained from the bacterial culture collection of the Department of Biology, the Faculty of Arts and Sciences in Süleyman Demirel University. Bacterial strains were maintained Luria Bertani (LB) agar (Difco).

Violacein Extraction

Overnight culture of *C. violaceum* ATCC 12472 was inoculated into fresh LB and grown at 120 rpm and 35°C for 24 hours. The culture was centrifuged and the violacein in the pellet was extracted using Ultrasound assisted extraction (UAE) method for 20 minutes method (Bandelin, Sonorex, RK-100) or Microwave assisted extraction (MAE) method (2450 MHz, 30°C for 20 minutes) with solvent (ethanol/ methanol/ acetone/ ethyl acetate). The extraction was repeated five times and the supernatant was combined. The resulting solvent was evaporated at 45°C under vacuum by a rotary evaporator. The residue was carefully dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and filtered through a 0.45µm PVDF syringe filter and stored at 4°C prior to analysis.

HPLC Analysis of the Violacein and Deoxyviolacein

Violacein was quantified through Shimadzu's (a Japanese brand) HPLC system [19]. The HPLC system is comprised of a system control unit (SCL 10AVP), pump (LC-10ADVP), diode array detector (SPD-M10AVP), manual injector, column oven (CTO-10ACVP) and degasser (DGU-14A). The chromatographic method was performed by using isocratic system composed of methanol-water (70:30 v/v) with a flow rate of 1 mL/min. A reversed-phase column Agilent zorbax XDB-C18, (5µ, 4.6 mm ID× 250 mm) was used and the column temperature was maintained at 30°C and mobile phase consists of methanol-water (70:30 v/v). Violacein and deoxyviolacein were detected at its absorbance maximum (585 nm).

Antibacterial Effects of Violacein Extracts

The antibacterial activities of the violacein extracts were evaluated by Agar well diffusion method [20], against *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* ATCC 11778, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 43300. In this method, 100 µL of standardized inoculum of each test bacterium was mixed with soft agar (0.5%) and the mixture was transferred to plates prepped with 1.5% agar. 8 mm diameter well was cut from the agar using a sterile cork-borer; subsequently each well was filled with 50 µL of the violacein extracts and incubated at 35°C for 24 h. Clear inhibition zones around wells indicated the presence of antibacterial activity. Each assay was repeated three times.

Cytotoxicity Assays of Violacein Extract

To evaluate the cytotoxic effects of violacein, on NIH (Mouse embryonic fibroblast cells) and HeLa (human cervical adenocarcinoma) cells were cultured in flasks containing DMEM medium (Gibco, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (100 U/mL of penicillin and 100 µg/mL of streptomycin) (Gibco) in a CO₂ incubator at 37°C. For the cytotoxicity

assays, cells were seeded (3×10^5 cells mL^{-1} /well) in 12-well plates for 24h and exposed to 0.04–4 μM violacein for 24 and 48h. Cell viability was monitored using the Real-Time Cell Analyzer (RTCA) station (Roche Diagnostics) instrument at 15-minute time intervals for up to 72 hours.

Statistical Analysis

Each assay was repeated three times. Microsoft Excel was applied for the data analysis. The values are presented as a mean \pm standard deviation.

RESULTS

The purpose of this study was to evaluate the UA and MA extraction procedures, that were not employed to extract violacein before, including the variations of organic solvents (methanol, ethanol, ethyl acetate and acetone). Violacein and deoxyviolacein were quantified by high performance liquid chromatography–diode array detection (HPLC–DAD) (Table1). Figure 1 presents a HPLC chromatogram of the UA extracted samples. Results for MAE and UAE of the violacein are shown in Table 1. Better results were obtained with UAE (methanol). Using external calibration, the concentration of the violacein and deoxyviolacein in the extract samples were determined as 4.7 ± 0.1 – 82.0 ± 7.7 μg violacein/mg extract, 0.67 ± 0.002 – 20.7 ± 1.2 μg deoxyviolacein/mg extract respectively (Table1).

Table 1. The violacein and deoxyviolacein concentration quantified with HPLC related to methanol, ethanol, ethyl acetate and acetone extracts by ultrasonic and microwave-assisted extraction (μg violacein/mg extract)*

Samples	Violacein	Deoxyviolacein
	μg Violacein/mg extract	μg Violacein/mg extract
Methanol UAE	82.0 ± 7.70	20.7 ± 1.20
Ethanol UAE	48.5 ± 1.50	15.8 ± 3.70
Acetone UAE	60.8 ± 2.10	15.9 ± 1.50
Ethyl Acetate UAE	4.70 ± 0.12	0.67 ± 0.02
Methanol MAE	68.8 ± 4.40	17.2 ± 2.30
Ethanol MAE	44.5 ± 1.00	11.9 ± 1.10
Acetone MAE	49.8 ± 3.80	15.7 ± 1.20
Etil Acetate MAE	5.90 ± 0.10	3.40 ± 0.10

*: UAE: Ultrasound assisted extraction method, MAE: Microwave assisted extraction method

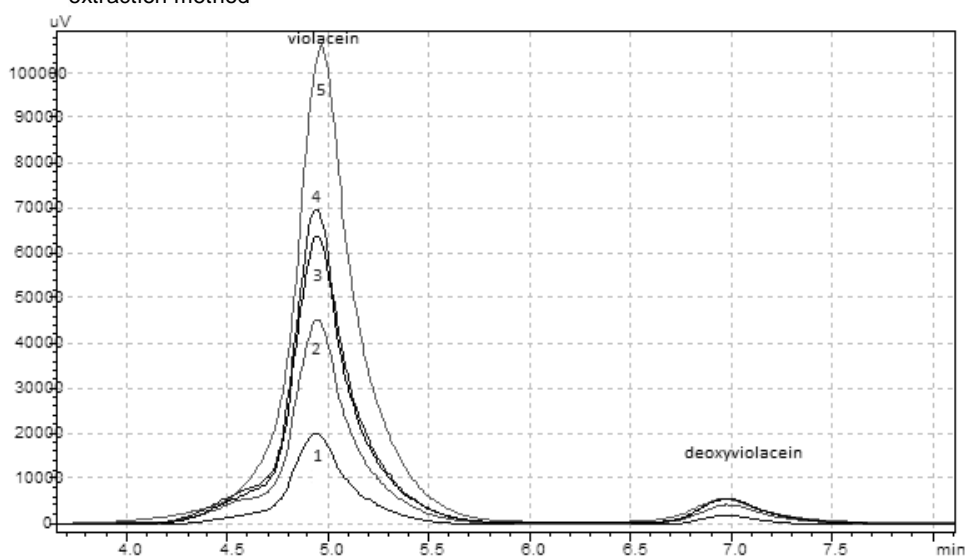


Figure 1. HPLC chromatogram of violacein and deoxyviolacein extracted with ultrasound assisted extraction method 1: Ethyl acetate extract, 2: Violacein standard, 3: Ethanol extract, 4: Acetone extract, 4: Methanol extract.

The UA and MA extracted violacein have been tested for in vitro antibacterial activity and demonstrated to have potential antibacterial effect (Table 2). The results of this study showed that, the zone of inhibition (mm) for

the UA and MA extracted violacein varied from (8.5 ± 0.6 mm) to (15.5 ± 1.1 mm) as compared to Tobramycin.

Table 2. The inhibition zone diameters of the UA and MA extracted violacein samples obtained by agar well diffusion (UA: ultrasound assisted, MA: microwave assisted, E: ethanol, M: methanol, EA: Ethyl acetate, A: acetone), *: No inhibitory effect.

Strains	Inhibition zone diameters (mm)								Tobramycin (10µg)
	UA-E	MW-E	UA-M	MW-M	UA-EA	MW-EA	UA-A	MW-A	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	15.5±1.1	9.5±0.7	13±1.0	9±0.8	*	*	*	11±0.9	13.0±0.0
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	11±0.9	11.5±1.0	13±1.0	12.5±1.0	*	*	*	10.5±0.8	12.7±0.57
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	8.5±0.6	*	*	9±0.8	9±0.7	*	11±0.9	*	11.3±0.57
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	*	*	*	*	*	*	*	*	15.0±1.00
<i>E. coli</i> ATCC 25922	*	*	*	*	*	*	*	*	12.3±0.57

Among all the tested strains, the UA extracted violacein had highest antibacterial activity against the *S. aureus* ATCC 25923 followed by *S. aureus* ATCC 43300. *B. cereus* ATCC 11778 showed poor sensitivity to the UA and MA extracted violacein as compare to the other Gram-positive bacteria. But UA and MA extracted violacein did not show any antibacterial activity against *P. aeruginosa*, *E. coli*.

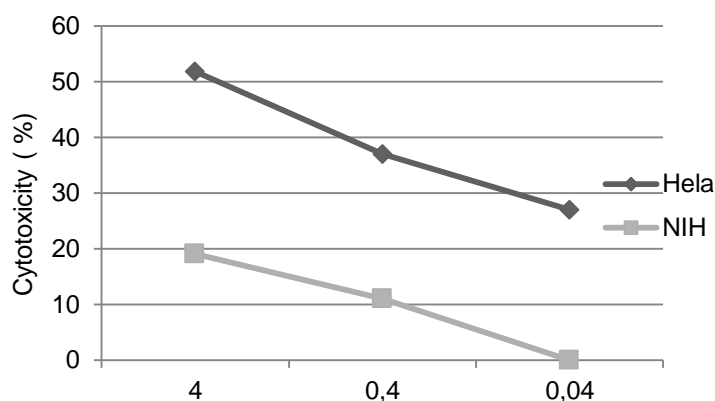


Figure 2. *In vitro* cytotoxicity of UA extracted violacein extracts (4, 0.4 and 0.04 µm) against HeLa and NIH cells.

The cytotoxic efficacy of the UA extracted violacein was evaluated by cell viability in HeLa and NIH cell lines by using real time cell analyzer xCELLigence method. The cells were tested with a range of violacein concentrations (0–10 µM) based on previous reports [5]. The UAE violacein reduced cell growth in a dose-dependent manner from 0.04 to 4 µM, respectively. Significant cytotoxic effect was observed for 4µM the UAE violacein, which inhibited cell viability by 51.8% where NIH cell growth was inhibited by 19% (Figure 2). These results suggest that the UAE violacein potentiates the antiproliferative activity at very low concentrations.

DISCUSSION

Violacein is described as a natural antibiotic that has crucial biologic activities and pharmacological properties. We extracted the highest violacein concentration by using UAE method with methanol (Table1). The antibacterial activity of violacein against different bacteria has been studied by several research groups [1,12, 21, 22]. It was found out in a variety of antimicrobial tests conducted before that while the violacein had the ability to inhibit the growth of Gram-positive bacteria, it had quite a little effect on Gram-

negative bacteria [10, 12, 23, 24]. The result of this study was in conformity with the previous studies. In this study the UA extracted violacein had highest antibacterial activity against Gram-positive strains (Table 2). This result can be explained by that the outer membrane of Gram-negative strains protects cell while Gram-positive bacteria, with no outer membrane, have no protection and are susceptible to effects of violacein [25].

In general, the cytotoxicity of violacein for tumor cells is observed in the range of 1–5µM [5, 26, 27], findings that are in agreement with the data obtained in our work. In this study significant cytotoxic effect was observed for 4µM the UA extracted violacein, which inhibited cell viability by 51.8%.

If compared to conventional extraction methods, the UAE and MAE techniques are both requires short in time and the smaller solvent consumption. On the basis of the results of this study, the UAE provided better efficient violacein extraction than the MAE method.

CONCLUSION

Due to the pharmacological potential of violacein, the UAE method can be considered as an easy and economic tool for the extraction of violacein from bacterial culture.

ACKNOWLEDGEMENT

We would like to thank the Scientific Research Projects Unit of Süleyman Demirel University for supporting this study with the project number 4365-YL1-15.

Conflict of Interest


The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

REFERENCES

- [1] Choi, S.Y., Kim, S., Lyuck, S., Kim, S.B., Mitchell, R.J. (2015). High-level production of violacein by the newly isolated *Duganella violaceinigra* str. NI28 and its impact on *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*, 5, 15598.
- [2] Moss, M.O., Ryall, C. (1981). Distribution of chromobacteria in a lowland river. *Microbial Ecology*, 7(2), 139-149.
- [3] Lichstein, H.C., Van De Sand, V.F. (1945). Violacein, an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *The Journal of Infectious Diseases*, 76(1), 47-51.
- [4] Jude, B.A., Tanner, J., Koko, T., McLaughlin, E.C. (2012). Analysis, characterization, and synthesis of violacein from *Janthinobacterium* isolate extracts. In *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* (Vol. 244). 1155 16TH ST, NW, Washington, DC 20036 USA: Amer. Chemical Soc.
- [5] De Carvalho, D.D., Costa, F.T., Duran, N., Haun, M. (2006). Cytotoxic activity of violacein in human colon cancer cells. *Toxicology in Vitro*, 20(8), 1514-1521.
- [6] Durán, N., Justo, G.Z., Durán, M., Brocchi, M., Cordi, L., Tasic, G.R., Castro, L., Nakazato, G. (2016). Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-Its main secondary metabolite: A review. *Biotechnology Advances*, 34(5), 1030-1045.
- [7] Durán, N., Menck, C.F. (2001). *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. *Critical Reviews in Microbiology*, 27(3), 201-222.
- [8] Nakamura, Y., Asada, C., Sawada, T. (2003). Production of antibacterial violet pigment by psychrotropic bacterium RT102 strain. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8(1), 37-40.
- [9] Bromberg, N., Durán, N. (2001). Violacein transformation by peroxidases and oxidases: implications on its biological properties. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11(4-6), 463-467.
- [10] Subramaniam, S., Ravi, V., Sivasubramanian, A. (2014). Synergistic antimicrobial profiling of violacein with commercial antibiotics against pathogenic micro-organisms. *Pharmaceutical Biology*, 52(1), 86-90.
- [11] Mendes, A.S., de Carvalho, J.E., Duarte, M.C., Durán, N., Bruns, R.E. (2001). Factorial design and response surface optimization of crude violacein for *Chromobacterium violaceum* production. *Biotechnology Letters*, 23(23), 1963-1969.
- [12] Durán, N., Justo, G.Z., Ferreira, C.V., Melo, P.S., Cordi, L., Martins, D. (2007). Violacein: properties and biological activities. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 48(3), 127-133.
- [13] Durán, M., Ponezi, A.N., Faljoni-Alario, A., Teixeira, M.F., Justo, G.Z., Durán, N. (2012). Potential applications of violacein: a microbial pigment. *Medicinal Chemistry Research*, 21(7): 1524-1532.
- [14] Venil, C.K., Aruldass, C.A., Abd Halim, M.H., Khasim, A.R., Zakaria, Z.A., Ahmad, W.A. (2015). Spray drying of violet pigment from *Chromobacterium violaceum* UTM 5 and its application in food model systems. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 102, 324-329.
- [15] Nakamura, Y., Sawada, T., Morita, Y., Tamiya, E. (2002). Isolation of a psychrotrophic bacterium from the organic residue of a water tank keeping rainbow trout and antibacterial effect of violet pigment produced from the strain. *Biochemical Engineering Journal*, 12(1), 79-86.
- [16] Zhang, Q.W., Lin, L.G., Ye, W.C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13(1), 20.
- [17] Kaufmann, B., Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 13(2), 105-113.
- [18] Wang, L., Weller, C.L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300-312.
- [19] Blosser, R.S., Gray, K.M. (2000). Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducers. *Journal of Microbiological Methods*, 40(1), 47-55.
- [20] Holder, I.A., Boyce, S.T. (1994). Agar well diffusion assay testing of bacterial susceptibility to various antimicrobials in concentrations non-toxic for human cells in culture. *Burns*, 20(5), 426-429.
- [21] Batista, A.H., Moreira, A.C., De Carvalho, R.M., Sales, G.W., Nogueira, P.C., Grangeiro, T.B., Medeiros S.C., Silveira E.V., Nogueira, N.A. (2017). Antimicrobial effects of violacein against planktonic cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 22(10), 1534.
- [22] Cazoto, L.L., Martins, D., Ribeiro, M.G., Durán, N., Nakazato, G. (2011). Antibacterial activity of violacein against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *The Journal of Antibiotics*, 64(5), 395-397.
- [23] Aranda, S., Montes-Borrego, M., Landa, B.B. (2011). Purple-pigmented violacein-producing *Duganella* spp. inhabit the rhizosphere of wild and

- cultivated olives in southern Spain. *Microbial Ecology*, 62(2), 446-459.
- [24] Im, H., Choi, S.Y., Son, S., Mitchell, R.J. (2017). Combined application of bacterial predation and violacein to kill polymicrobial pathogenic communities. *Scientific Reports*, 7(1), 1-10.
- [25] Choi, S.Y., Lim, S., Cho, G., Kwon, J., Mun, W., Im, H., Mitchell, R.J. (2020). *Chromobacterium violaceum* delivers violacein, a hydrophobic antibiotic, to other microbes in membrane vesicles. *Environmental Microbiology*, 22(2), 705-713.
- [26] Saraiva, V.S., Marshall, J.C., Cools-Lartigue, J., Burnier Jr, M.N. (2004). Cytotoxic effects of violacein in human uveal melanoma cell lines. *Melanoma Research*, 14(5), 421-424.
- [27] Bromberg, N., Dreyfuss, J.L., Regatieri, C.V., Palladino, M.V., Duran, N., Nader, H.B., Justo, G.Z. (2010). Growth inhibition and pro-apoptotic activity of violacein in Ehrlich ascites tumor. *Chemico-biological Interactions*, 186(1), 43-52.
-
-

Yaşam Döngüsü Analizi ile Konsantre Şeftali Püresinin Karbon Ayak İzinin Belirlenmesi

Neslihan Çolak Güneş  

Ege Üniversitesi, Güneş Enerjisi Enstitüsü, 35100, Bornova, İzmir

Geliş Tarihi (Received): 10.07.2020, Kabul Tarihi (Accepted): 08.10.2020

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): neslihan.colak@ege.edu.tr (N. Çolak Güneş)

☎ 0 232 311 12 27 📠 0 232 388 60 27

ÖZ

Bu çalışmada, mevcut bir meyve suyu konsantresi fabrikasının konsantre şeftali püresi üretim hattı örnek olarak incelenmiş ve gerçek üretim verileri kullanılarak, ISO 14040 ve 14044'te belirtilen adımlar izlenerek, yaşam döngüsü analizi gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, sistem sınırları belirlenmiş ve tüm girdi çıktıları içeren, detaylı bir işlem akışı şeması çizilmiştir. Sonrasında, birim konsantre şeftali püresi üretimi için tüketilen hammadde, su, enerji (ısı ve elektrik), ambalaj malzemesi vb. girdilerle, bu süreçte oluşan atık su, meyve atıkları, ambalaj atıkları vb. çıktıların miktarları belirlenmiştir. Böylece, envanter analizi yapılmış ve elde edilen veriler karbon ayak izi için temel teşkil edecek şekilde bir tablo olarak sunulmuştur. Sonuç olarak, birim ürün için karbon ayak izi 0.82 kg CO_{2eşd}/kg konsantre ürün, enerji ayak izi 4443 kJ/kg konsantre ürün ve su ayak izi 2.59 m³_{su}/kg konsantre ürün olarak hesaplanmıştır. Belirlenen sistem sınırları içinde, ürün yaşam döngüsü aşamalarından tarımsal üretimin hem karbon ayak izine, hem de su ayak izine en büyük etkiyi yaptığı, enerji tüketiminin CO_{2eşd} emisyonları için ikinci önemli etken olduğu ve enerji ayak izinin başlıca sorumlusunun ısı enerjisi olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, literatürdeki benzer ürünlerin yaşam döngüsü analizleri ile bir karşılaştırma yapılmış ve sonuçlar sürdürülebilir üretim kapsamında tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Konsantre şeftali püresi, Meyve suyu, Yaşam Döngüsü Analizi (YDA), Sürdürülebilirlik, Küresel ısınma potansiyeli

Determining Carbon Footprint of Concentrated Peach Puree by Life Cycle Analysis

ABSTRACT

In this study, a peach puree concentrate production line in an industrial juice factory was examined as a case study, and life cycle assessment was carried out by following the steps specified in ISO 14040 and 14044 using real production data. In this context, system boundaries were determined and a detailed process flow chart with all inputs and outputs was drawn. Subsequently, inputs, which were consumed for the production of the unit peach puree concentrate such as the raw material, water, energy (heat and electrical) and packaging materials and outputs, which were composed from processes such as wastewater, fruit residue and packaging wastes, were determined. Thus, an inventory analysis was performed and inventory data was presented as a table that could be the basis for carbon footprint. Consequently, carbon, energy and water footprint values for a unit product were calculated as 0.82 kg CO_{2eq}/kg concentrated product, 4443 kJ/kg concentrated product and 2.59 m³_{water}/kg concentrated product, respectively. Within the specified system boundaries, it was determined that agricultural production had the greatest impact on both carbon and water footprints, energy consumption was the second important factor that constituted the CO_{2eq} emissions, and heat energy was the main responsible of the energy footprint. Also, a comparison was made with the life cycle analysis of similar products in the literature, and the results were discussed within the scope of sustainable production.

Keywords: Concentrated peach puree, Fruit juice, Life Cycle Assessment (LCA), Sustainability, Global warming potential

GİRİŞ

Endüstri devriminden bu yana, fosil yakıtlar, ormansızlaşma, tarım arazilerinin yanlış kullanımı vb. nedenlerle insanlığın sorumlu olduğu doğal kaynakların tahribatı, günümüzde görmezden gelinemez bir seviyeye ulaşmıştır. Bilim insanları, atmosferin dünyadan uzaya yansıyan güneş ışınlarını hapsetmesi sonucu oluşan sera etkisinin nedenini çok hızlı nüfus artışına ve endüstrileşmeye bağlamaktadır [1]. CO₂ ve diğer gazların ısıyı tutma özellikleri 19. yüzyılın ortalarında keşfedilmiştir. Günümüzde ise, artan sera gazı seviyelerinin dünyanın sıcaklığında artışa neden olduğu artık bilinen bir gerçektir [2].

Sera gazlarındaki artış nedeniyle yaşanan küresel ısınma ve iklim değişiklikleri, son yıllarda "sürdürülebilirlik" kavramına olan ilginin tüm dünyada artmasına neden olmuştur. Sürdürülebilirlik yaklaşımı ile, daha az enerji kullanarak, doğal kaynaklara zarar vermeden ve çevreyi kirletmeden üretim yapmak ve kullanım süresi sonunda ürünlerin yeniden kullanılması veya geri dönüşümünün sağlanması mümkün olabilmektedir.

Gıda sanayi, tarımsal/hayvansal kökenli hammaddeleri farklı yöntemlerle işleyerek katma değeri yüksek ürünlere dönüştürür. Bunu yaparken de, yoğun miktarda iş gücü, enerji ve su kullanır. Kullanılan enerji çoğunlukla fosil kaynaklıdır ve bu kaynakların çok uzak olmayan bir gelecekte tükenecek olması, sera gazı emisyonlarının yol açtığı çevresel etkilerinin yüksek olması ve birim enerji fiyatlarındaki artış nedeniyle, üretimde enerji verimliliğinin ve yenilenebilir enerji kaynakları kullanım oranının artırılması, tüm üretim sektörlerinde olduğu gibi gıda üretiminde de önemli hedeflerden biri haline gelmiştir.

Tarım ve gıda endüstrisi pek çok önemli çevresel etkiden sorumludur. Güvenli, besleyici ve çevre dostu gıdalar elde etmek için, gıda sistemlerinde sürdürülebilir üretim yaklaşımı hayati bir öneme sahiptir. Gıda sürdürülebilirliği, su ve enerji ile birlikte tüm dünyanın karşı karşıya olduğu en önemli konulardan biridir.

Gıda üretiminde kaliteli bir son ürün elde etme isteğinin yanı sıra, son yıllarda, ürünün çevresel etkilerinin düşük olması da sektörün amaçları arasına girmeye başlamıştır. Bu kapsamda, gıda maddelerinin üretiminde kullanılan enerji, su, hammadde, ambalaj miktarları ve oluşan atıklar, çevresel etkileri de göz önünde bulundurularak daha detaylı incelenmelidir.

Gıda üretiminde sürdürülebilirlik için aşağıda yer alan üç bakış açısı öncelikle gereklidir:

- daha fazla gıda güvenliği,
- daha verimli ve yenilenebilir enerji,
- sıfır atık yaklaşımı.

Meyve suyu endüstrisi dünyanın en önemli tarım kökenli üretim kollarından biridir. Meyvenin uygun yöntemlerle sıkılarak kabuk, çekirdek ve bir miktar posadan arındırılmış hali genellikle taze meyve suyu olarak

adlandırılır ve kısa sürede tüketilmelidir. Gerek ülkemizde, gerek dünyada meyve suyu endüstrisinin ana hammaddesi ise konsantre meyve suları/püreleridir. Taşıma, paketlenme, depolama maliyetlerini düşürmek ve zararlı mikroorganizma gelişimini engellemek gibi amaçlarla meyve suyu, içindeki suyun bir bölümünün uzaklaştırılması ile konsantre hale getirilir. Bu amaçla yapılan buharlaştırma (evaporasyon) işlemi, gıda endüstrisinde yer alan enerji yoğun işlemlerden biridir.

Şeftali, dünya genelinde ağaçta yetişen en önemli meyvelerden biridir ve hasat edilen şeftalilerin bir kısmı taze tüketilirken, önemli bir kısmı da işlenmektedir [3]. FAO [4] verilerine göre Türkiye, dünyanın 6. büyük şeftali üreticisidir.

Şeftali püresi, çeşitli meyve suları, reçel, marmelat ve pastacılık ürünlerinin hammaddesini oluştururken, aynı zamanda, bebek mamaları, süt ürünleri, meyveli içecekler, tatlılar ve atıştırmalık gıdaların üretiminde kullanılan önemli bir bileşendir [5].

Yaşam döngüsü analizi (YDA), bir ürünün sürdürülebilirliğinin ölçümü için en yaygın kullanılan yaklaşımdır [6]. Günümüzde çevresel sürdürülebilirlik denince akla ilk gelen terimlerden biri karbon ayak izidir. Bir ürünün tüm yaşam döngüsü boyunca neden olduğu toplam sera gazı emisyonlarının CO₂ cinsinden ifadesi olan bu terim, çeşitli ürünlerin yanı sıra insanlar, hayvanlar, toplumlar, belediyeler, işletmeler, vb.'nin çevresel etkilerini tanımlamak için de kullanılmaktadır.

Literatürde, çeşitli gıda maddelerinin yaşam döngüsü boyunca çevresel etkilerinin incelendiği pek çok çalışma yer almaktadır. Meyve bazlı gıdaların çevresel etkilerinin araştırıldığı çalışmalar ise nispeten sınırlıdır. Bunlar da, meyvelerin tarımsal üretimi ve meyvelerden elde edilen ürünlerin endüstriyel üretimi olmak üzere başlıca iki gruba ayrılabilir.

Meyvelerin tarımsal üretim sürecinin çevresel etkilerini inceleyen çeşitli araştırmalar mevcuttur. Cerutti ve ark. [7], meyve yetiştiriciliği alanında yapılmış olan YDA çalışmalarını 2014 yılında derlemiştir. Bu çalışmada yazarlar, meyve yetiştirme sistemlerinin yaşam döngüsü değerlendirmesinde en uygun parametrelerin seçimi için bir yöntem önermeyi amaçlamışlardır. Pergola ve ark. [8], portakal ve limonun, geleneksel yöntemle ve organik olarak yetiştirilmesini, YDA yaklaşımı ile karşılaştırarak, enerji, ekonomi ve çevresel etki analizlerini tüm üretim döngüsü için gerçekleştirmişlerdir. Kayısının tarımsal üretim sürecinin yaşam döngüsü değerlendirmesi, Pergola ve ark. [9] ve Lardo ve ark. [10] tarafından yapılmıştır. İspanya'da şeftali yetiştirilmesini 15 yıllık bir periyotta inceleyen Vinyes ve ark. [11], farklı yıllık verim ve hava şartları koşullarını dikkate alarak, fonksiyonel birim olarak aldıkları 1 kg şeftali üretiminin çevresel etkilerini YDA yöntemiyle belirlemişlerdir. Ingraio ve ark. [12], İtalya'da şeftalinin tarımsal üretiminin çevresel etkilerini 1 hektarlık alan (31.5 ton şeftali) için incelemişlerdir. Nikkhah ve ark. [13] ise, İran'da yetiştirilen şeftalilerin çevresel etkilerini belirlemek için beşikten kapıya yöntemiyle bir YDA çalışması yapmışlardır. Basset-Mens ve ark. [14] tarafından

yürütülen Agribalyse® adlı projenin bir parçası olan çalışmada, Fransa'da marketlerde satılan yerli ürünlerden elma ve şeftali ile, Fas'tan ithal edilen mandalina ve Brezilya'dan gelen mango meyvelerinin üretimi, nakliyesi ve tarımında kullanılan tüm girdiler dikkate alınarak, YDA yöntemi ile beşikten-çiftlik kapısına kadar olan süreç için değerlendirilmiştir. Vinyes ve ark. [15], İspanya'da meyve üretiminin yaşam döngüsü aşamalarını, elma ve şeftali için on yıllık gerçek üretim verilerini kullanarak, tarım, perakende, tüketim ve bertaraf aşamalarını göz önünde bulundurarak, çok yıllık bir yaklaşım ile çevresel olarak analiz etmişlerdir.

Meyvelerden elde edilen ürünlerin yaşam döngüsü değerlendirmesi, endüstriyel üretim sürecini mutlaka kapsamaktadır. Beccali ve ark., [16] İtalya'daki narenciye ürünlerinin çevresel etkilerini belirlemek ve çevresel performanslarını iyileştirmek için uygulanabilir stratejiler ve eylemler önermek amacıyla, uçucu yağ, doğal meyve suyu ve portakal ve limondan elde edilen konsantre meyve sularının çevresel etkilerini belirledikleri bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. De Menna ve ark. [17] tarafından yapılan bir çalışmada, örnek bir gıda olarak seçilen şeftali nektarı üretimi için kullanılan enerji kaynağının fosil yakıt ve biyoenerji olmasına göre iki farklı senaryoya dayalı YDA yapılmıştır. Portakal kabuğu atıkları için YDA, 10 farklı atık yönetimi senaryosu ile, Negro ve ark. [18] tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada, portakal kabuğu atıklarının piroliz, yakma, anaerobik fermentasyon gibi farklı yöntemlerle enerji kaynağı olarak değerlendirilmesi, bertaraf etme, kompost yapma ve hayvan yemi olarak kullanma gibi geleneksel yöntemlerle karşılaştırılmıştır. De Marco ve ark. [19], YDA'yı kullanarak, kayısı için farklı muhafaza yöntemlerini, küresel ısınma potansiyeli açısından değerlendirmişlerdir.

Gıda, enerji ve su, yoksulluğun azalması, toplumların refah düzeyinin artması ve sürdürülebilir kalkınma için çok önemlidir. Günümüzde, bu üç sektörün güvenliğinin ayrılmaz bir şekilde bağlantılı olduğu ve birlikte ele alınması gerektiği, Gıda-Enerji-Su bağı yaklaşımı ile ifade edilmektedir [20]. Güvenli gıda üretimini sağlarken, enerji ve su kaynaklarının korunmasını da hedefleyen sürdürülebilir üretim yaklaşımı, doğal olarak gıda, enerji ve su bağına dikkate almaktadır.

Son yıllarda, gıdaların hem zirai hem de endüstriyel üretim süreçlerinin çevresel etkilerinin araştırıldığı çalışmaların sayısında önemli oranda artış olduğu görülmektedir. Ancak, Türkiye'de yetiştirilen ve üretilen gıdaların yaşam döngüsü değerlendirmesi konusundaki çalışmalar oldukça sınırlıdır. Yapılan detaylı literatür incelemesinde, dünyanın önemli şeftali üreticilerinden biri olan ülkemizde, bu meyveden elde edilen ürünler için YDA konusunda yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, mevcut bir meyve suyu konsantresi üretimi yapan fabrikanın konsantre şeftali püresi üretim hattı incelenmiş ve bu ürünün çevresel etkilerini belirlemek için YDA yöntemi uygulanarak karbon ayak izi, su ayak izi ve enerji ayak izi hesaplanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Sistem Tanıtımı

Bu çalışmada yaşam döngüsü değerlendirmesi yapılan konsantre şeftali püresi, Aydın ili, Sultanhisar ilçesinde kurulu bulunan bir meyve suyu fabrikasında üretilmektedir. Şeftaliler işletmeye çoğunlukla İzmir, Bursa, Manisa ve Aydın bölgelerinden, plastik kasalar içinde, kamyonlarla getirilmektedir. Mayıs ayı ortalarında başlayıp, Eylül ayının sonuna kadar günde ortalama 100 ton şeftali işlenen bu fabrikada, yılın yaklaşık 4 ayı şeftali püre konsantresi üretilmektedir. Şeftali püre konsantresi üretiminin detaylı işlem akış şeması Şekil 1'de verilmiştir. Su, ısı/elektrik enerjisi ve ambalaj malzemesi gibi girdilerle; atık su, meyve atıkları ve kondenssten oluşan proses çıktıları şema üzerinde gösterilmiştir.

Meyve suyu konsantresi üretim sürecinde gerekli olan ısı enerjisi, işletmede bulunan 10 bar kapasiteli doğal gaz kazanında elde edilen buharla sağlanmakta ve proses öncesi buhar basıncı ihtiyaç duyulan değere düşürülmektedir. Yakıt olarak sıvılaştırılmış doğal gaz (LNG) kullanılmakta, elektrik ise şebekeden alınmaktadır.

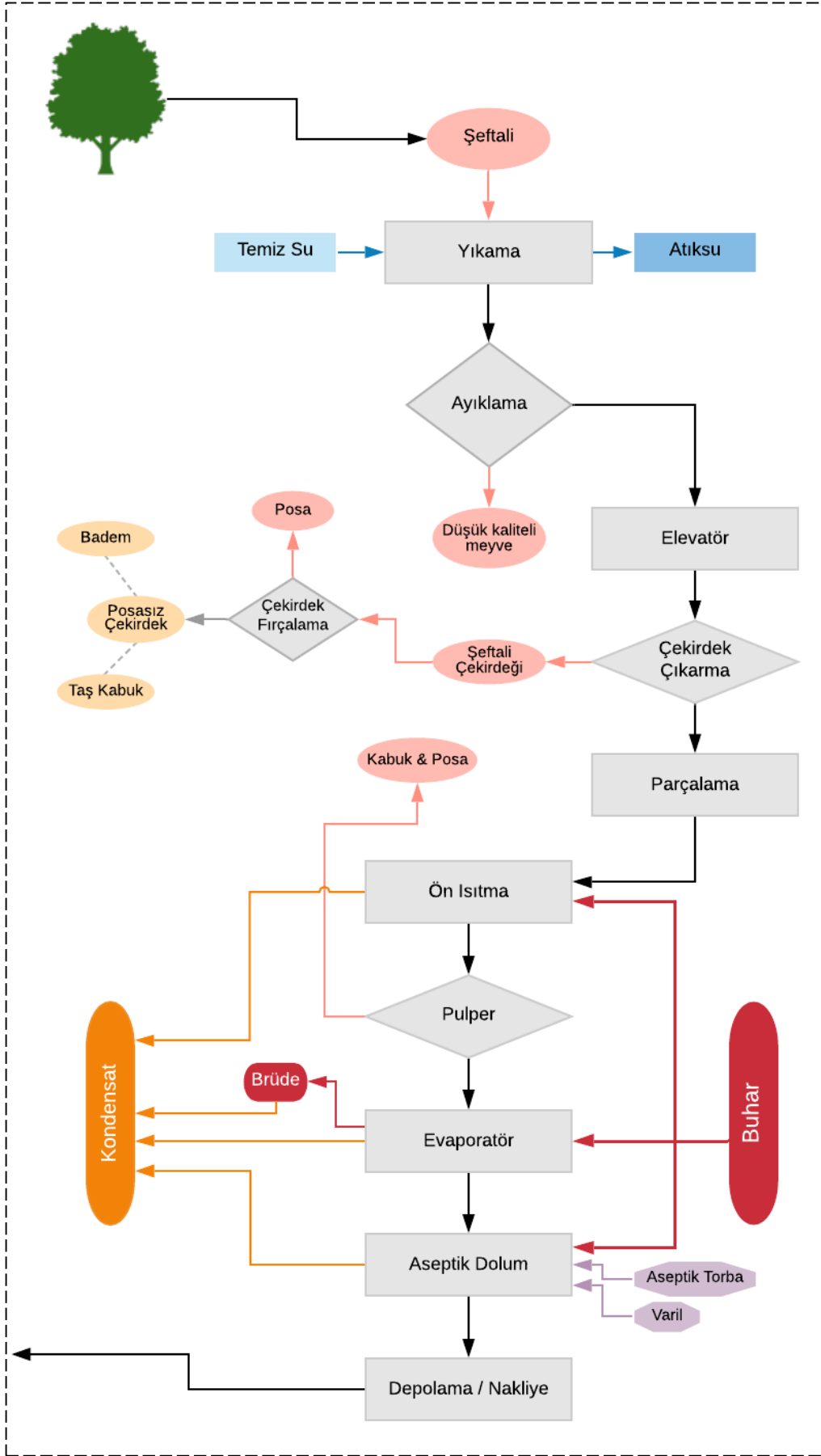
Üretimde, meyvelerin yıkanması, buhar elde edilmesi ve makine ve ekipmanların temizliği için su kullanılmaktadır. Buhar üretimi için kullanılan su, kondens kazanına geri beslemek suretiyle kapalı döngü olarak yeniden değerlendirilmektedir. Meyvelerin yıkanması ve temizlik için kullanılan su ise işletmede bulunan atık su arıtma tesisine gönderilmektedir.

Meyve suyu konsantresi üretiminin çeşitli basamaklarında ortaya çıkan şeftali atıklarından çekirdek kısmı köylüler tarafından yakacak olarak kullanılmak üzere alınırken; posa kısmı İzmir'de bulunan bir biyogaz üretim tesisi tarafından biyokütle olarak değerlendirilmektedir.

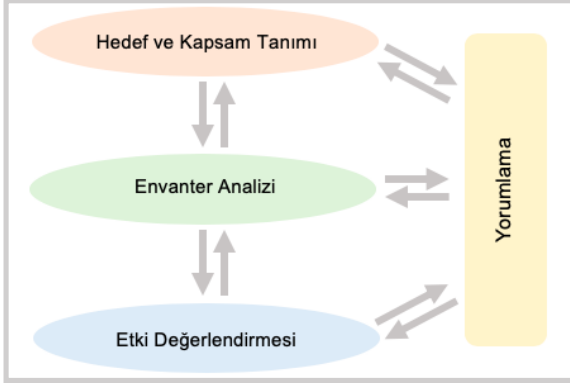
Yöntem

Bir ürünün, sürecin veya sistemin sürdürülebilirliğini kantitatif olarak belirlemek için en çok tercih edilen yöntem olan YDA, bu çalışmada da konsantre şeftali püresi üretiminin çevresel etkilerini belirlemek için kullanılmıştır.

Şekil 2'de görüldüğü gibi, dört ana bileşen YDA'nın çerçevesini oluşturmaktadır. Bunlardan ilki, YDA'nın amacını net bir şekilde belirlemek, sistem sınırlarını ve fonksiyonel birimi seçmek, kısıtları ve kabulleri belirlemek için önemli bir basamak olan hedef ve kapsam tanıımıdır [6, 21]. YDA için en kritik ilk adım, sistem sınırlarını doğru bir şekilde seçmektir. Bunun nedeni, envanter analizi ile ortaya çıkacak olan envanter tablosundaki tüm girdi-çıktılar dikkate alınarak yapılacak olan etki değerlendirmesi için önemli bir temel oluşturmasıdır [6].



Şekil 1. Şeftali püre konsantresi işlem akış şeması



Şekil 2. Yaşam döngüsü analizinin aşamaları

Sürdürülebilirliğin ölçülebilir ve kıyaslanabilir olmasını sağlayan en önemli yöntemlerden biri olan YDA ile belirlenen karbon ayak izi, su ayak izi ve enerji ayak izinin, en yaygın kullanılan çevresel etki parametrelerinden olduğu söylenebilir. Bunların yanı sıra, asit yağmurlarına sebep olabilen emisyonları ifade eden asitleşme potansiyeli, azot ve fosfor içeren atıkların yol açtığı ötrofikasyon potansiyeli, uçucu organik bileşikler ve azot oksitlerin ısı ve güneş ışığı varlığında reaksiyona girerek fotokimyasal ozon oluşturma potansiyeli, çevreye salınan bir kimyasal maddenin insanlar üzerine toksik etkisini ifade eden insan toksisite potansiyeli gibi pek çok etki parametresi vardır. Bu çalışmada, şeftali püre konsantresinin karbon ayak izi, su ayak izi ve enerji ayak izi hesaplanmıştır.

Kyoto protokolü ve yaşam döngüsü değerlendirme ilkelerine göre karbon ayak izi, üretim esnasında oluşan ve küresel ısınmanın başlıca sorumlusu olarak görülen sera gazı emisyonlarının standart göstergesi olarak kabul edilmektedir [21]. YDA çalışmalarında en çok hesaplanan çevresel etki kategorisi küresel ısınma potansiyeli; diğer adıyla karbon ayak izidir ve CO₂ eşdeğeri cinsinden tüm sera gazı emisyonlarını ifade etmektedir. Sera gazları, atmosferde doğal olarak yer alan, CO₂, su buharı, metan vb. gazlardır ve farklı düzeylerde küresel ısınma potansiyeline sahiptirler. Küresel ısınma potansiyelleri, atmosferdeki yoğunlukları ve kalış süreleri dikkate alındığında bu gazların içinde CO₂ öne çıkmaktadır. Bu nedenle, tüm sera gazı salınımları CO₂ eşdeğeri olarak verilmektedir.

YDA hesaplamaları için temel oluşturan envanter tablosu, envanter analizi ile tüm verilerin toplanması ve düzenlenmesi sonucu ortaya çıkar. ISO 14044'te [22] envanter analizi için sistematik bir yaklaşım önerilmiştir. Etki değerlendirme, oluşturulan envanter tablosunda yer alan veriler kullanılarak hesaplamaların yapıldığı ve seçilen etki kategorileri için sayısal sonuçların elde edildiği basamaktır. Yorumlama aşaması ise tüm YDA sürecinin ve elde edilen sonuçların değerlendirildiği ve çevresel etkilerin azaltılması için önerilerin sunulduğu bölümdür [6].

Bir ürünün yaşam döngüsünün hangi aşamalarının dikkate alındığını belirtmek için, beşikten mezara, beşikten kapıya, kapıdan kapıya gibi ifadeler kullanılmaktadır. Buradaki beşik terimi, YDA

çalışmasında hammaddenin elde edilme sürecinin dikkate alındığını, mezar son ürünün tüketimi ve atıkların bertarafı aşamalarının da dahil olduğunu göstermektedir. Kapı ise genel olarak fabrikanın kapısı anlamına gelmektedir.

Bu çalışmada sistem sınırları, Şekil 1'de görüldüğü gibi, şeftalilerin yetiştirildikleri bahçelerden kamyonlarla kasalar içinde fabrikaya taşınmasını, işletmedeki üretim sürecini ve elde edilen şeftali püre konsantresinin depolanmak veya farklı ürünlere işlenmek üzere nakliyesini de içine alacak şekilde belirlenmiştir. Yaşam döngüsü analizi için fonksiyonel birim, 1 kg konsantre ürün olarak seçilmiş ve seçilen sistem sınırları içindeki tüm girdi çıktıları dikkate alınarak, belirlenen fonksiyonel birim için envanter analizi yapılmıştır. Dünyada en yaygın kullanılan etki kategorisi olan, küresel ısınma potansiyeli olarak da ifade edilen karbon ayak izi (CO₂esd), envanter tablosunda yer alan veriler kullanılarak ve tüm girdi/çıkıtlar için emisyon faktörleri literatürden alınarak, beşikten kapıya YDA yöntemi ile, seçilen fonksiyonel birim için hesaplanmıştır.

Gerçek bir meyve suyu işletmesindeki şeftali püre konsantresi üretim hattı dikkate alınarak, ürünün yaşam döngüsü analizini gerçekleştirebilmek için, bazı kısıtlar nedeniyle çeşitli kabuller yapılması gerekmektedir. Fabrikada, şeftali işlenen dönemde başka meyveler de işlendiği için, elektrik, yakıt ve su tüketimi gibi veriler, sadece şeftali işlenen günlere ait değerlerin ortalaması alınarak belirlenmiştir. Ayrıca, ekipmanların bir üretim periyodunda kaç saat çalıştığı da yapılan enerji hesaplamalarında dikkate alınmıştır. Doğal gaz kazanında buhar üretimi için kullanılan su, kondens tekrar kazana beslenme sureti ile geri kazanıldığı ve yeniden kullanıldığı için hesaplamalara dahil edilmemiştir. Ürün için ambalaj materyali olarak kullanılan aseptik torba, kullanım ömrü sonunda üretici firma tarafından alınarak geri dönüşüm sağlandığı için, plastik variller ise tekrar tekrar kullanıldığı için, üretim sürecinde ambalaj atığı oluşmadığı kabul edilmiştir. Üretim sonrası ekipmanlarda yapılan temizlik için kullanılan su miktarı, ortalama 0.03 litre/litre_{meyve suyu} olarak literatürden alınmıştır [23]. Konsantre meyve sularının üretimi sırasında oluşan atık suyun pH değerlerinin 5.8 ile 9.4 arasında ve Kimyasal Oksijen İhtiyacının (KOİ) 1030 ve 5630 mgO₂/dm³ değerleri arasında olduğu belirtilmektedir [24]. Atık suyun, ürünün karbon ayak izine etkisi hesaplanırken, arıtma tesisi dikkate alınmış ve KOİ değeri ortalama 3500 mgO₂/dm³ [24] olarak kabul edilmiştir. Üretim sürecinde ortaya çıkan şeftali atıkları değerlendirildiği için çevresel etki hesaplamasında dikkate alınmamıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, Aydın ili Sultanhisar ilçesinde kurulu bulunan bir meyve suyu fabrikasındaki konsantre şeftali püresi üretim hattı sürdürülebilirlik açısından incelenmiş ve seçilen sistem sınırları için YDA yapılmıştır. Bunun için, öncelikle sistem sınırları belirlenerek detaylı bir işlem akış şeması oluşturulmuştur (Şekil 1). Ardından, üretim hattında gerçekleştirilen çeşitli ölçümler sonucu elde edilen ve işletme tarafından paylaşılan verilerle, m

kütle (kg), E enerji (kW) ifadesi olmak üzere, aşağıda yer alan genel kütle ve enerji denklileri kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır:

$$\sum m_{giren} = \sum m_{çıkan} \quad (1)$$

$$\sum E_{giren} = \sum E_{çıkan} \quad (2)$$

Şeftali püre konsantresi üretiminde kullanılan ısı enerjisi, kazanda yakılan yakıt miktarından yola çıkılarak 3 numaralı denklemlerle hesaplanmıştır:

$$Q_{yakıt} = m_{yakıt} \times q_{yakıt (alt)} \times \eta_{kazan} \quad (3)$$

Burada, Q ısı enerjisini (kJ), q yakıtın alt ısı enerjisi değerini (kJ/kg) ve η kazan verimini ifade etmektedir. Seçilen fonksiyonel birim olan kg konsantre şeftali püresi üretimi için elde edilen envanter verileri, Tablo 1'de sunulmuştur.

Ürünün karbon ayak izini belirlemek için aşağıda yer alan genel formül kullanılmıştır [21, 22]:

$$Toplam CO_2 \text{ emisyonu} = \sum \text{Envanter verisi} \times \text{Emisyon faktörü} \quad (4)$$

Tablo 1. Konsantre şeftali püresinden 1 kg üretim için envanter verileri

Hammadde Girdileri	Birim	Miktar
Şeftali	kg	2.84
Su	litre	0.02
Enerji Girdileri		
Elektrik	kWh	0.14
LNG (Sıvılaştırılmış doğal gaz)	kg	0.09
Ambalaj Girdileri		
Aseptik torba	adet	0.004
Plastik varil	adet	0.004
Nakliye		
Şeftali nakliye	km	0.00006
Motorin	litre	0.0087
Konsantre meyve suyu nakliye	km	0.00003
Motorin	litre	0.0017
Atıklar		
Atık su	litre	0.02

Tablo 1'de yer alan ve CO₂ emisyonunu hesaplamak için temel oluşturan girdi/çıkışlar için emisyon faktörü değerleri Tablo 2'de verilmiş; (4) numaralı denklem kullanılarak çıkarılan şeftali püre konsantresinin ekolojik profili ise Şekil 3'te gösterilmiştir.

Atık suyun emisyon faktörü, literatürde yer alan ve endüstriyel atık su arıtmanın karbon ayak izini hesaplamak için kullanılan 1 kg CO_{2eşd} / 1 kg KOİ [25] yaklaşımı dikkate alınarak, şeftali püre konsantresi üretiminde ortaya çıkan atık suyun KOİ değeri ise 3500 mgO₂/dm³ [24] kabul edilerek belirlenmiştir.

Tablo 2. Envanter için emisyon faktörü değerleri

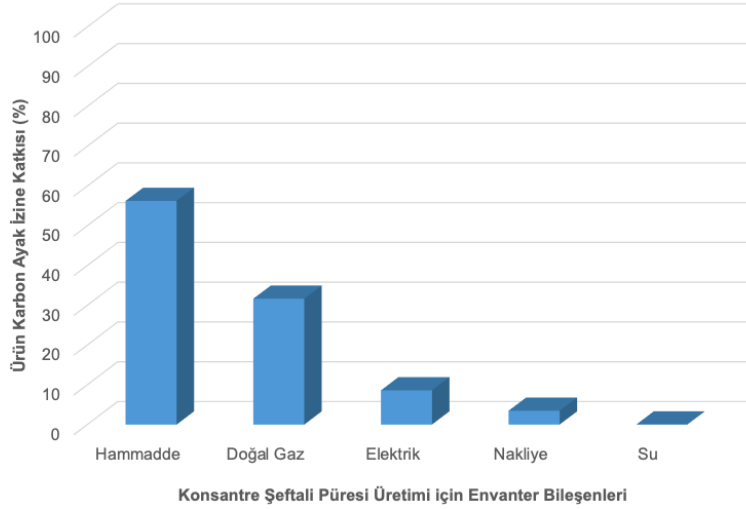
Girdi ve Çıkışlar	Emisyon Faktörü	Birim	Kaynak
Şeftali	0.160	kg CO _{2eşd} /kg	[11]
Nakliye (Dizel)	2.700	kg CO _{2eşd} /litre	[26]
Su	0.132	kg CO _{2eşd} /m ³	[27]
Elektrik	0.497	kg CO _{2eşd} /kWh	[28]
LNG	2.840	kg CO _{2eşd} /kg	[29]
Atık su	3.5	kg CO _{2eşd} /m ³	[24, 25]

Konsantre püre üretiminde hammadde olarak yer alan şeftalinin tarımsal üretiminden kaynaklı çevresel etkileri vardır. Yapılan detaylı literatür araştırmasında, Türkiye'de şeftalinin tarımsal üretim süreci için YDA konusunda bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, Tablo 2'de yer alan CO_{2eşd} emisyon faktörü, şeftalinin İspanya'da geleneksel yöntemlerle çok yıllık olarak yetiştirilmesinin çevresel etkilerini inceleyen Vinyes ve ark. [11] tarafından yapılmış olan çalışmadan alınmıştır.

Tablo 1'de yer alan envanter verileri ve Tablo 2'de bulunan emisyon faktörleri kullanılarak, konsantre şeftali

püresinin karbon ayak izi 0.82 kg CO_{2eşd}/kg konsantre ürün olarak hesaplanmıştır.

Şekil 3'te yer alan grafikte görüldüğü gibi, ürünün karbon ayak izine en büyük etki hammadde üretiminden gelmektedir. Bu da, tarımsal üretim basamağının çevresel etki açısından ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Sonrasında ise üretimde kullanılan enerjinin (doğal gaz ve elektrik) karbon ayak izinin diğer önemli sorumlusu olduğu söylenebilir. Konsantre şeftali püresi üretimi için işletmede kullanılan toplam enerji (ısı ve elektrik) miktarı dikkate alınarak, enerji ayak izi 4443 kJ/kg_{konsantre ürün} olarak bulunmuştur.



Şekil 3. Konsantre şeftali püresi üretiminde envanter bileşenlerinin karbon ayak izine etkisi

Şeftali püre konsantresi üretiminde önemli bir çevresel etki parametresi de su ayak izidir. Birim ürünün üretimi için tüketilen temiz su kaynaklarının dikkate alınarak hesaplandığı bu parametre, akademik çalışmaların yanı sıra, su kaynaklarının dikkatli kullanılması ve su israfının önlenmesini amaçlayan çeşitli kuruluşlar tarafından da farklı ürünler için yayınlanmaktadır [30]. Şeftalinin tarımsal üretimi için kullanılan su miktarını belirlemek için, farklı ülkelerin verileri kullanılarak ortalama bir değer elde edilmiştir. Bu çalışmada, hammaddenin tarımsal üretiminden gelen su ayak izi için, $0.91 \text{ m}^3/\text{kg}_{\text{şeftali}}$ olarak bu değer kullanılmıştır [31]. Şeftali püre konsantresinin fabrikadaki üretimi boyunca, yıkama, temizlik ve buhar üretiminde kullanılan temiz su miktarları dikkate alınarak, endüstriyel üretim basamağından gelen su ayak izi $0.001 \text{ m}^3_{\text{su}}/\text{kg}_{\text{konsantre ürün}}$ olarak hesaplanmıştır. Tarımsal üretim kaynaklı su tüketimi de dikkate alınarak, ürünün beşikten kapıya su ayak izi $2.59 \text{ m}^3_{\text{su}}/\text{kg}_{\text{konsantre ürün}}$ olarak belirlenmiştir. Karbon ayak izinde olduğu gibi, su ayak izinde de tarımsal üretimin etkisi oldukça yüksektir. Literatürde birim gıda üretimi için tüketilen temiz su miktarı ile ilgili farklı değerlere rastlamak mümkündür. Üretim yöntemine, su kullanılan işlemlerin çokluğuna ve çeşidine göre su tüketim miktarlarının farklı olması doğaldır. Örneğin, Alkaya ve Demirel [32] tarafından bir meyve suyu fabrikası incelenerek yapılan bir çalışmada, su tüketimi değeri $23.6 \text{ m}^3/\text{m}^3$ ürün olarak bildirilmiştir. Meyvelerin yıkanması ile başlayan ve perakende şişelere dolun işlemini de içeren bu süreçte, suyun verimli kullanılması ile ilgili çeşitli önlemler alınarak, literatürde yer alan ortalama $2.3\text{--}6.5 \text{ m}^3/\text{m}^3$ ürün su tüketim değerlerine ulaşabileceği belirtilmiştir. Şeftali püre konsantresi üretiminde bu değer yaklaşık $10 \text{ m}^3_{\text{su}}/\text{m}^3_{\text{ürün}}$ olduğu ve kullanılan buharın kazana geri beslenmesi de dikkate alınır normal sınırlar içinde yer aldığı görülmektedir.

Bu çalışmada birim ürün için hesaplanan karbon ayak izi ve enerji ayak izi değerleri, literatürde yer alan çeşitli meyve sularının YDA çalışmaları ile kıyaslandığında, elde edilen sonuçların anlamlı olduğu görülmektedir. Rahim ve Raman [23], konsantre meyve püreleri

kullanılarak üretilen ve 1 litrelik ambalajlara dolun yapılan karışık meyve suyu için yaşam döngüsü analizi yapmışlar ve hammaddenin dahil etmedikleri bu hesaplamada, ürünün karbon ayak izini $0.07 \text{ kg CO}_{2\text{eşd}}/\text{litre}_{\text{meyve suyu}}$ olarak bulmuşlardır. Hammaddenin etkisinin dahil edilmediği ve buharlaştırma gibi enerji yoğun bir işlemin olmadığı düşünüldüğünde, karbon ayak izleri arasındaki fark normal kabul edilebilir. Beccali ve ark. [16] tarafından yapılmış olan çalışmada, portakal suyu konsantresinin karbon ayak izi $5.7 \text{ kg CO}_{2\text{eşd}}/\text{kg}_{\text{konsantre ürün}}$ olarak bulunmuştur. Ele alınan meyve suyu konsantresinin karbon ayak izinin şeftali püre konsantresine göre yüksek olması; üretiminde yoğun elektrik tüketimi olan, soğutma, dondurma ve donmuş muhafaza işlemlerinin bulunması ile açıklanabilir. Karakaya ve Ozilgen [33], domatesin farklı ürünlere işlenmesini, enerji tüketimi ve $\text{CO}_{2\text{eşd}}$ emisyonları açısından ele almıştır. Domates suyu üretimi için karbon ayak izini $0.57 \text{ kg CO}_2/\text{kg}$ taze domates olarak bulmuşlardır. Bu da şeftali püre konsantresi için bulunan değere yakındır. Aynı çalışmada, 1 kg taze domatesin işlenmesi için 12242.6 MJ enerji tüketimi olduğu belirtilmiştir. Bu değer birim konsantre şeftali püresi üretimi için harcanan enerji miktarına göre yüksek olması, tarımsal üretim ve perakende ambalajlama süreçlerini de kapsamıyla açıklanabilir. De Menna ve ark. [17] şeftali nektarı üretimi için kullanılan enerji kaynağına göre iki farklı senaryoya dayalı YDA yapmışlardır. Aynı fonksiyonel birimin kullanıldığı bu iki senaryonun ilkinde şeftali nektarının üretimi, dağıtımı, tüketimi boyunca fosil enerji kaynağı kullanılıp, ortaya çıkan şeftali atıkları bertaraf edilirken; ikinci senaryoda, nektarın yaşam döngüsü boyunca ortaya çıkan yan ürünler yakma veya anaerobik fermantasyon yöntemi ile biyoenerji elde etmek için kullanılmaktadır. 1 litre şeftali nektarı üretimi için tüketilen enerji miktarı 15.27 MJ ve küresel ısınma potansiyeli

$0.91 \text{ kg CO}_{2\text{eşd}}$ olarak verilmiştir. Ortaya çıkan atıkların biyoenerji olarak değerlendirildiği senaryolarda ise fosil yakıt kaynaklı enerji tüketiminde minimum %30, karbon ayak izinde ise en az %27 azalma olduğu bildirilmiştir.

SONUÇ

Bu çalışmada, Türkiye için önemli meyvelerden biri olan şeftaliden elde edilen püre konsantresinin üretimi incelenmiş ve dünyada en yaygın kullanılan çevresel etki parametresi olan küresel ısınma potansiyeli (karbon ayak izi) birim ürün için hesaplanmıştır. Ayrıca, temiz su tüketimini ifade eden su ayak izi ve işletmede üretim için kullanılan ısı ve elektrik enerjisi miktarları dikkate alınarak enerji ayak izi de belirlenmiştir. Tüm bu çevresel etki parametreleri, örnek bir işletmedeki şeftali püre konsantresi üretim hattı dikkate alınarak, beşikten kapıya YDA yöntemi ile, belirlenen sistem sınırları çerçevesinde ve yapılan kabullere göre hesaplanmıştır.

Bir kilogram konsantre şeftali püresinin karbon ayak izi ve su ayak izi incelendiğinde, en büyük etkinin tarımsal üretim basamağından geldiği görülmektedir. Bu nedenle, şeftalinin sürdürülebilir tarım yöntemleri ile yetiştirilmesi, hammaddenin karbon ayak izini ve su ayak izini düşürecek, bu da şeftali kullanılarak üretilen tüm ara ve son ürünlerin çevresel etkilerinin azalmasına katkı sağlayacaktır.

Birim ürünün karbon ayak izine en büyük ikinci etki ise enerji tüketiminden gelmektedir. Fosil kaynaklı yakıtlar kullanılarak elde edilen enerji tüm dünyada küresel ısınmanın en önemli sorumlusu olarak görülmektedir. Gıda endüstrisi, yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanımı için en uygun sanayi kollarından biridir. Şeftali püre konsantresi üretiminin fabrika adımı en büyük çevresel etki enerji kaynaklıdır. Bu nedenle, başta güneş enerjisinden ısı ve elektrik enerjisi üretimi olmak üzere, yenilenebilir enerji kaynakları kullanımının teşvik edilmesi, ürünün karbon ayak izini dikkate değer biçimde düşürecektir.

Sürdürülebilir bir üretim için doğal kaynakların verimli kullanılmasının yanı sıra, atık oluşumunun önlenmesi veya asgari düzeye indirilmesi de oldukça önemlidir. Bu çalışmada örnek olarak ele alınan işletmede, şeftali atıklarının biyogaz üretiminde kullanılmak üzere biyokütle olarak değerlendirilmesini sağladığı görülmektedir. Şeftali püre konsantresi ara bir ürün olduğu için, kullanılan ambalaj malzemelerinin yeniden kullanımı ve geri dönüşümünün, perakende ambalajlara kıyasla daha kolay olduğu söylenebilir. Marketlerde yer alan gıdalar için sürdürülebilir ambalajlama materyalleri ve yöntemleri konusunda hem akademik, hem de ticari pek çok çalışma yapılmaktadır.

Gıda endüstrisinde sürdürülebilir yöntemlere olan ilgi ve talep her geçen gün artmaktadır. Aynı şekilde, gıda-enerji-su bağlamı ile, tüm dünyada insanlık için son derece önemli olan bu üç kaynağın birlikte ele alınması gerekliliği tartışılmaktadır. Ülkemizde gıda ürünlerinin çevresel etkilerinin araştırıldığı çalışmalar oldukça sınırlıdır ve bu alanda yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada, işletmede üretim hattındaki çalışmalar için destek veren ve üretim verilerini paylaşan, Aydın ili,

Sultanhisar ilçesinde bulunan DİMES A.Ş. Meyve Suyu Konsantresi Fabrikası'ndaki tüm çalışanlara içtenlikle teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

- [1] Oreskes, N. (2005). E SSAY on climate change. *Science*, 306, 2004-2005.
- [2] NASA, (2019). Climate change evidence: How do we know? <https://climate.nasa.gov/evidence> (Erişim Tarihi : 07/2020).
- [3] Wu, H., Shi, J., Xue, S., Kakuda, Y., Wang, D., Jiang, Y., Ye, X., Li, Y., Subramanian, J. (2011). Essential oil extracted from peach (*Prunus persica*) kernel and its physicochemical and antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 2032-2039.
- [4] FAO, (2017). Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO). <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Erişim Tarihi : 07/2020)
- [5] Siddiq, M. (2006). Peaches and Nectarines. In *Handbook of Fruits and Fruit Processing*, Edited by Y.H. Hui, Blackwell Publishing, 519-531p.
- [6] Singh, R.P., Heldman, D.R. (2014). Resource Sustainability. In *Introduction to Food Engineering: Fifth edition*, Elsevier Inc., 211-264p.
- [7] Cerutti, A.K., Beccaro, G.L., Bruun, S., Bosco, S., Donno, D., Notarnicola, B., Bounous, G. (2014). Life cycle assessment application in the fruit sector: State of the art and recommendations for environmental declarations of fruit products. *Journal of Cleaner Production*, 73, 125-135.
- [8] Pergola, M., D'Amico, M., Celano, G., Palese, A.M., Scuderi, A., Di Vita, G., Pappalardo, G., Inglese, P. (2013). Sustainability evaluation of Sicily's lemon and orange production: An energy, economic and environmental analysis. *Journal of Environmental Management*, 128, 674-682.
- [9] Pergola, M., Persiani, A., Pastore, V., Palese, A.M., Arous, A., Celano, G., 2017. A comprehensive Life Cycle Assessment (LCA) of three apricot orchard systems located in Metapontino area (Southern Italy). *Journal of Cleaner Production*, 142, 4059-4071.
- [10] Lardo, E., Montanaro, G., Dichio, B., Xiloyannis, C. (2018). Integrated life-cycle assessment in sustainable and conventional apricot orchards in southern Italy. *Acta Horticulturae*, 1214, 77-82.
- [11] Vinyes, E., Gasol, C.M., Asin, L., Alegre, S., Muñoz, P. (2015). Life Cycle Assessment of multiyear peach production. *Journal of Cleaner Production*, 104, 68-79.
- [12] Ingraio, C., Matarazzo, A., Tricase, C., Clasadonte, M.T., Huisingsh, D. (2015). Life Cycle Assessment for highlighting environmental hotspots in Sicilian peach production systems. *Journal of Cleaner Production*, 92, 109-120.
- [13] Nikkhhah, A., Royan, M., Khojastehpour, M., Bacenetti, J. (2017). Environmental impacts modeling of Iranian peach production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 75, 677-682.
- [14] Basset-Mens, C., Vannièrè, H., Grasselly, D., Heitz, H., Braun, A., Payen, S., Koch, P., Biard, Y.

- (2016). Environmental impacts of imported and locally grown fruits for the French market: a cradle-to-farm-gate LCA study. *Fruits*, 71(2), 93-104.
- [15] Vinyes, E., Asin, L., Alegre, S., Muñoz, P., Boschmonart, J., Gasol, C.M. (2017). Life Cycle Assessment of apple and peach production, distribution and consumption in Mediterranean fruit sector. *Journal of Cleaner Production*, 149, 313-320.
- [16] Beccali, M., Cellura, M., Iudicello, M., Mistretta, M. (2010). Life cycle assessment of Italian citrus-based products. Sensitivity analysis and improvement scenarios. *Journal of Environmental Management*, 91(7), 1415-1428.
- [17] de Menna, F., Vittuari, M., Molari, G. (2015). Impact evaluation of integrated food-bioenergy systems: A comparative LCA of peach nectar. *Biomass and Bioenergy*, 73, 48-61.
- [18] Negro, V., Ruggeri, B., Fino, D., Tonini, D. (2017). Life cycle assessment of orange peel waste management. *Resources, Conservation and Recycling*, 127(August), 148-158.
- [19] De Marco, I., Miranda, S., Riemma, S., Iannone, R. (2016). The impact of alternative apricot conservation techniques on global warming potential. *Chemical Engineering Transactions*, 49, 325-330.
- [20] FAO. (2020). *Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO)*. <http://www.fao.org/land-water/water/watergovernance/waterfoodenergynews/en/> (Erişim Tarihi: 01.07.2020)
- [21] ISO-14040. (2006). *International Organization for Standardization. Environmental management - Life Cycle Assessment - Principles and Framework*.
- [22] ISO-14044. (2006). *International Organization for Standardization. Environmental management - Life cycle assesment - Requirements and guidelines, ISO 14044, International Organization for Standardization*.
- [23] Rahim, R., Raman, A.A.A. (2015). Cleaner production implementation in a fruit juice production plant. *Journal of Cleaner Production*, 101, 215-221.
- [24] Puchlik, M., Struk-Sokołowska, J. (2017). Comparison of the composition of wastewater from fruit and vegetables as well as dairy industry. *E3S Web of Conferences*, 17, 00077.
- [25] Keller, J., Hartley, K. (2003). Greenhouse gas production in wastewater treatment: Process selection is the major factor. *Water Science and Technology*, 47(12), 43-48.
- [26] Rubinfeld, A.S. (2016). *The World Bank Group greenhouse gas emissions : inventory management plan for internal business operations 2016 (English)*. Washington, D.C., World Bank Group.
- [27] Jurić, Ž., Ljubas, D., Đurđević, D., Luttenberger, L. (2019). Implementation of the harmonised model for carbon footprint calculation on example of the energy institute in Croatia. *Journal of Sustainable Development of Energy, Water and Environment Systems*, 7(2), 368-384.
- [28] Climate Transparency. (2017). *Brown to Green: The G20 Transition to a Low-Carbon Economy 2017*. <http://www.climate-transparency.org/g20-climate-performance/g20report2017> (Erişim Tarihi: 01.07.2020).
- [29] IPCC. (2007). *Climate Change 2007: Synthesis Report*. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, Pachauri, R.K and Reisinger, A. (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 104 p.
- [30] Mekonnen, M.M., Hoekstra, A.Y. (2011). The green, blue and grey water footprint of crops and derived crop products. *Hydrology and Earth System Sciences*, 15(5), 1577-1600.
- [31] Water Footprint. (2020). <https://waterfootprint.org/en/resources/interactive-tools/product-gallery/> (Erişim Tarihi: 01.07.2020).
- [32] Alkaya, E., Demirer, G.N., (2015). Water recycling and reuse in soft drink/beverage industry: A case study for sustainable industrial water management in Turkey. *Resources, Conservation and Recycling*, 104, 172-180.
- [33] Karakaya, A., Özilgen, M., (2011). Energy utilization and carbon dioxide emission in the fresh, paste, whole-peeled, diced, and juiced tomato production processes. *Energy*, 36(8), 5101-5110.

Kısmi Pişirme Yönteminin Kek Kalitesi Üzerine Etkisi

Mehmet Murat Karaoğlu¹  , Yeşim Bedir¹ 

Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 25240, Erzurum

Geliş Tarihi (Received): 21.10.2019, Kabul Tarihi (Accepted): 02.07.2020

✉ *Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): mmurat@atauni.edu.tr (M.M. Karaoğlu)*

☎ 0 442 231 24 92 📠 0 442 231 58 78

ÖZ

Çalışmada kısmi pişirme yönteminin kek üretiminde kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda, farklı sürelerde (15, 20, 25 dakika) kısmi pişirilen kek örnekleri, oda sıcaklığında 7, 14 ve 21 gün depolandıktan sonra ikinci pişirme işlemi ile tüketime hazır son ürün elde edilerek fiziksel ve mikrobiyolojik analizlere tabi tutulmuştur. Mikrobiyal kalite bakımından, kısmi pişirme süresi analiz sonuçları üzerine önemli bir etkiye sahip olmazken ara depolama süresinin artması 21. günden sonra toplam mezofilik aerobik bakteri ve maya-küf sayılarını artırıcı yönde etkili olmuştur. Kısmi pişirme yöntemi keklerde pişirme kaybını artırmıştır. Ara depolama süresindeki artış spesifik hacim değerlerini önemli derecede etkilemezken, genel olarak kısmi pişirme süresinin artması spesifik hacim değerlerini artırıcı yönde etkili olmuştur. Kek örneklerinin sertlik değerleri ara depolama süresi ile artarken, sertlik bakımından kontrol grubu örneklerle en yakın değerlere 20 ve 25 dakika kısmi pişirildikten sonra oda sıcaklığında 7 gün depolanmış ve yeniden pişirilmiş kek örnekleri sahip olmuştur. Genel olarak, kısmi pişirme yöntemi, keklerde çignenebilirlik ve elastikiyet değerlerini artırıcı, kohesiflik değerini ise düşürücü yönde etkili olmuştur. İstenildiği zaman taze ürün tüketimi bakımından, kısmi pişirme yönteminin, özellikle 20 dakika kısmi pişirme ve 14 güne kadar ara depolama süresinin, kek üretiminde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kısmi pişirme yöntemi, Kek kalitesi, Mikrobiyolojik özellik, Fiziksel özellik, Tekstürel özellik

Impact of Partial Baking Process on Cake Quality

ABSTRACT

In this study, the potential use of partial baking process was investigated in cake production. For this purpose, cake samples partially baked at different times (15, 20, 25 minutes) were stored at room temperature for 7, 14 and 21 days. After the second baking process, a ready-to-use final product was obtained and subjected to physical and microbiological analyses. In terms of microbial quality, partial baking time did not have a significant effect on analysis results, but an increase in intermediate storage time was effective in increasing TMAB and yeast-mold counts after 21 days. Partial baking method increased baking loss in cakes. While an increase in intermediate storage time did not significantly influence the specific volume values, an increase in partial cooking time was generally effective in increasing the specific volume values of cakes. While the hardness values of cake samples increased with intermediate storage time, in terms of hardness the closest values to control group were obtained in cake samples rebaked after part-baking for 20 and 25 minutes and storage for 7 days at room temperature. In general, partial baking method increased the chewiness and elasticity values of cakes while decreasing their cohesiveness value. It was concluded that partial baking method, particularly 20 minutes partial baking and intermediate storage time up to 14 days, can be used in the production of cakes in terms of fresh product consumption at any time.

Keywords: Partial baking method, Cake quality, Microbiological properties, Physical properties, Textural properties

GİRİŞ

Kek bütün dünyada, her yaş gurubunun severek tükettiği iyi bir tat ve aromaya sahip oldukça popüler bir fırın ürünüdür. Buğday unu, şortening, yumurta, şeker, kabartma tozu ve su veya süt gibi bileşenler kullanılarak üretilen kekte yüksek hacim, düşük sertlik, tekdüze iç yapı, geç bayatlama ve uzun raf ömrü arzu edilen kalite karakteristikleridir [1-4].

Genel bir ifade ile zayıf buğday unu, şeker, yağ, yumurta, kabartma tozu ve gerekiyorsa bazı katkı maddelerinin kullanılmasıyla hazırlanan karışımın ısı işleme tabi tutulmasıyla elde edilen kek kimyasal ve mekanik olarak kabartılan bir ürün olarak tanımlanabilir [5, 6] Kek karışımı, su içinde yağ emülsiyonunu kapsamaktadır [7]. Fırında pişirme esnasında, sıcaklık yükseldikçe su buhar basıncı ve kimyasal mayalanma sonucu oluşan karbondioksit miktarı artarak kek karışımındaki hava kabarcıkları genişlemektedir. Eş zamanlı meydana gelen nişasta jelatinizasyonu ve protein denatürasyonu gibi dönüşüm olayları kek mikisini sıvı halden katı hale dönüştürerek keklerde sabit yapısal dokuyu oluşturmaktadır [8, 9].

Özellikle formülasyona giren yağ, şeker ve yumurtanın da etkisi ile kek, ekmek gibi yavan formülasyonlu fırın ürünlerine kıyasla daha geç bayatlayan bir yapıya sahiptir [10]. Bununla birlikte, depolama süresi uzadıkça, özellikle, sistemin en temel bileşeni olan nişastada meydana gelen yapısal değişimlerin etkisi ile kek tazeliğini giderek kaybetmekte ve tüketim kalitesi önemli derecede düşmektedir. Genel olarak keklerde raf ömrü bir ile dört hafta arasında değişmektedir [11, 12]. Depolama süresi uzadıkça, özellikle bayatlama ve mikrobiyal bozulmanın etkisi ile kalite kayıpları meydana gelmektedir. Ürünün fiziksel ve kimyasal özelliklerinde meydana gelen değişiklikler, sertlikteki artış, nem transferi, aroma ve lezzet kayıpları keklerde bayatlama kaynaklı en önemli değişiklikler arasındadır [13].

Formülasyon, ambalajlama, su aktivitesi ve depolama şartları keklerde bayatlama ve raf ömrünü etkileyen en önemli faktörlerdir [14]. Formülasyon [15, 16] ve ambalajlama koşullarının değiştirilmesi [17, 18], dondurarak depolama [19], kek karışımına uygulanan çeşitli işlemler [20], bayatlamayı ve bozulmayı geciktirici katkı maddelerinin kullanılması [13, 21] gibi girişimler ile keklerde raf ömrünün uzatılmasına yönelik çok sayıda çalışma yapılmış olup başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Keklerde bayatlamının geciktirilmesi ve raf ömrünün uzatılmasına yönelik en yeni yaklaşımlardan birisi de kısmi pişirme yöntemidir.

Kısmi pişirme yöntemi ürünün iki aşamalı olarak pişirilmesi işlemi içermektedir. Bu yöntemde, ilk aşamada ürün yapısı oluşana kadar bir ilk pişirme uygulanmakta, depolama sürecinden sonra ikinci aşama da ise basit bir son pişirme ile tüketiciye taze bir ürün tüketme imkânı sunulmaktadır [22]. Evde veya çeşitli tüketim ortamlarında basit bir pişirme işlemi ile tüketiciye taze bir fırın ürünü tüketme imkânı sunduğu için kısmi pişirme yöntemi büyük bir pazar potansiyeline sahiptir [12]. Ayrıca, pişirme işlemi keklerde tekstürel ve diğer

fiziksel özellikler üzerinde çok önemli rol oynamaktadır [23]. Bu nedenle, bu araştırmada kısmi pişirme yöntemi ve kısmi pişirilmiş keklerin oda sıcaklığında farklı sürelerde muhafazasının keklerde mikrobiyolojik, teknolojik ve tekstürel özellikler üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Kek üretiminde piyasadan temin edilen buğday unu (Birlik Un, Erzurum), granül toz şeker, yumurta, taze süt, hamur kabartma tozu (Dr. Oetker, İzmir), sıvı margarin (Becel) ve sofralık rafine tuz kullanılmıştır.

Metot

Kek Üretimi

Kek üretiminde kullanılacak kek hamuru [12] tarafından belirtilen metoda göre hazırlanmıştır. Elde edilen kek hamuru, yağlanmış teflon kek kalıplara 60'ar gram dökülmüş ve 175°C'de 15, 20, 25 ve 35 (kontrol grubu) dakika süre ile pişirilmiştir. 15, 20 ve 25 dakika kısmi pişirilen kekler oda sıcaklığında 7, 14 ve 21 gün depolamaya tabi tutulmuştur. Daha sonra, depolanan kekler 175°C'de toplam pişirme süreleri 35 dakikaya tamamlanacak şekilde yeniden pişirmeye tabi tutulmuştur. Yeniden pişirilen kekler oda sıcaklığında 1 saat soğutulduktan sonra çift katlı polietilen poşetle ambalajlanarak analizler süresince laboratuvar şartlarında bekletilmiştir.

Kekte Yapılan Analizler

Mikrobiyolojik Analizler

Kısmi pişmiş kekler hem oda sıcaklığında depoladıktan hem de ikinci pişirmeden sonra mikrobiyolojik analizlere tabi tutulmuştur. Kek örneklerinin toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) sayımı için, Plate Count Agar (PCA, Merck) besiyeri kullanılmıştır. Uygun dilüsyonlardan çift petri plağına yüzeye ekim yöntemi ile 0.1 mL ekim yapıldıktan sonra 30°C'de 72 saat inkübe edilmiş ve koloni içeren petriyer sayılmıştır. Kek örneklerinde koliform grubu bakteri sayımı için Violet Red Bile Agar (VRBA) (Merck) kullanılmıştır. VRB agar yüzeyine 0.1'er mL aktarılarak yayma yöntemine göre ekim yapılan petriyer ters çevrilerek 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan koloniler sayılmıştır. Maya ve küf sayımı için, Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck) kullanılmıştır. Petri plaklarına yüzeye yayma yöntemine göre uygun dilüsyonlardan 0.1'er mL aktarılarak 20°C'de 5 gün inkübasyona bırakılmış ve sayım yapılmıştır [24].

Fiziksel ve Kimyasal Analizler

Keklerin nem içeriği analizinde, ürün fırından çıktıktan 6 saat sonra, keklerin merkezinden yaklaşık 3 g örnek alınarak 105°C'ye ayarlı kurutma kabiniinde sabit tartım ağırlığına ulaşıncaya kadar kurutulmuş ve % olarak nem

değerleri hesaplanmıştır [25]. Keklerin hacmi, kolza tohumuyla yer değiştirme esasına göre ölçülerek sonuçlar, kek hacmi/kek ağırlığı (cm³/g) (spesifik hacim) olarak verilmiştir [26]. Pişme kaybı değeri, kek karışımının pişmeden önce ve kekin piştikten sonraki elde edilen kütleleri kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar % olarak ifade edilmiştir [27]. Kek örneklerinin üniformite indeksi değerleri AACC 10-91'e göre belirlenmiştir [28]. Keklerde kabuk rengi kolorimetre (CR-200, Minolta, Osaka, Japan) cihazı ile belirlenmiş olup okunan L*, a* ve b* renk değerleri kullanılarak aşağıdaki eşitlik ile kontrol kek örneğine göre toplam renk değişimi (ΔE^*) hesaplanmıştır.

$$\Delta E = [(L_0 - L_1)^2 + (a_0 - a_1)^2 + (b_0 - b_1)^2]^{1/2}$$

Verilen eşitlikte; L₀, a₀, ve b₀ kontrol kek örneğine ait renk değerlerini; L₁, a₁, ve b₁ ise kısmi pişirme ve ara depolamadan sonra yeniden pişirilen kek örneklerine ait renk değerlerini ifade etmektedir.

Tekstür Profil Analizi (TPA)

Kısmi pişirilmiş kekler oda sıcaklığında belirtilen sürelerde depolandıktan sonra ikinci (son) pişirme işlemine tabi tutularak son ürün kekler elde edilmiş ve 24 saat sonra bu keklerde iç kısımdan alınan (40x40x20 boyutlarındaki) örneklerde Tekstür Analiz cihazı (TA.XT.plus Texture Analyser, Stable Microsystems) kullanılarak Tekstür Profil Analizi yapılmıştır. Ölçümler her örnek için 4 paralel 2 tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. TPA testinde çapı 50 mm olan (P50) prob, 5 kg'lık yük hücresi, 2 mms⁻¹ test hızı, %40 deformasyon oranı ve 20 g tetikleme gücü kullanılmıştır. Elde edilen TPA grafiğinden keklerin sertlik, kohesiflik, elastikiyet ve çignenebilirlik değerleri hesaplanmıştır.

İstatistiksel Analiz

Araştırma sonucunda elde edilen veriler SPSS Statistics paket programı kullanılarak varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Farklı sürelerde (15, 20, 25 dakika) kısmi pişirilen ve oda sıcaklığında farklı sürelerde (7, 14, 21 gün) depolanan kek örneklerinin mikrobiyolojik, fiziksel, kimyasal ve dokusal özellikleri açısından istatistiksel farklılıkları kıyaslamak amacıyla Duncan çoklu karşılaştırma yöntemi kullanılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmada, kek hamuru 15, 20 ve 25 dakika pişirilerek kısmi pişmiş kek örnekleri elde edilmiştir. Kısmi pişirilmiş kek örnekleri daha sonra oda sıcaklığında 7, 14 ve 21 gün depolandıktan sonra ikinci pişirme işlemine tabi tutulmuş ve tüketime hazır son ürün elde edilmiştir. Pişirildikten sonra oda sıcaklığında depolanmış kısmi pişmiş kek örnekleri ve depolama sonrası ikinci pişirme işlemine tabi tutulmuş tüketime hazır tam pişmiş kek örneklerinin toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB), koliform grubu bakteri ve maya-küf sayıları Tablo 1'de verilmiştir. Tablodaki veriler incelendiğinde kısmi pişirme

süresinin mikrobiyolojik analiz sonuçları üzerine belirgin bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Depolama süresinin artması ise (14.günden sonra) TMAB ve maya-küf sayılarını artırıcı yönde etkili olmuştur. Kontrol grubu ve oda sıcaklığında 7 ve 14 gün depolanmış kısmi pişmiş kek örneklerinde depolama ve ikinci pişirme sonrası TMAB ve maya-küf sayıları saptanabilir sayının (<2.00 log kob/g) altında çıkmıştır. Alınan sonuçlara göre depolamanın 21. gününde 15, 20, 25 dakikalık kısmi pişirmeye tabi tutulan keklerde depolama sonrası TAMB ve maya-küf üremesinin hemen hemen aynı seviyede olduğu ve bu seviyenin 3.32 ile 3.93 log kob/g arasında değiştiği görülmüştür. İkinci pişirme sonrası yapılan analizler de ise TAMB ve maya-küf sayılarında çok az bir düşüş olmakla birlikte bu değerlerin 3.02 ile 3.83 log kob/g arasında değiştiği görülmüştür. [29] tarafından yapılan çalışmada, kısmi pişirme yöntemi ile üretilen beyaz tava, çavdar ve kepekli ekmeklerde depolama ve ikinci pişirme sonrası mikrobiyolojik özellikler incelenmiş, depolama sonunda uygulanan ikinci pişirme işleminin, ekmekte kaybolan tazeligi tekrar sağlamakla birlikte kısmi pişmiş ve depolanmış ekmekte belli bir seviyenin üzerine çıkan mikroorganizma sayısının da önemli derecede düşmesine sebep olduğu bildirilmiştir. Ayrıca koliform grubu bakteri sayısı hem kısmi pişmiş kekin depolama sonrası hem de ikinci pişirme sonrası aşamasında saptanabilir sayının altında çıkmıştır.

Tablo 2 ve Şekil 1'deki sonuçlara göre kısmi pişirme ve ara depolama süresinin, kek örneklerinin pişme kaybı, üniformite indeksi, spesifik hacim ve renk değişimi değerlerini önemli derecede etkilediği görülmektedir. Bütün kısmi pişirme sürelerinde, ara depolama süresinin artması keklerin pişme kaybını artırıcı yönde etkili olmuştur. Kısmi pişirme ve ara depolamadan sonra yeniden pişirilen kek örneklerinde, kontrol örneğine kıyasla daha fazla pişme kaybı görülmüştür. Dolayısıyla iki aşamalı pişirme işleminden oluşan kısmi pişirme metodunun, kontrol örneğinde uygulanan, tek aşamalı pişirme metoduna göre örneklerde daha fazla nem kaybına neden olduğu ve pişme kaybını artırdığı sonucuna varılmaktadır. Yapılan çalışmalarda benzer sonuçlar bulunmuş ve kısmi pişirme, depolama ve yeniden pişirme işlemleri süresince daha fazla nem kaybı meydana gelmesinin, pişme kaybını da artırdığı belirtilmiştir [30]. Kontrol kek örneği ile kısmi pişirilip ara depolamadan sonra yeniden pişirilen kek örneklerinin renk parlaklığı (L), kırmızı renk tonu (a) ve sarı renk tonu (b) değerleri kullanılarak hesaplanmış toplam renk değişimi (ΔE) 15 dakika kısmi pişirme ve 14 ile 24 gün ara depolama süresine sahip örneklerde en yüksek çıkarken, 20 dakika kısmi pişirmeye ve 7 günlük ara depolama süresine sahip kek örneğinde en düşük çıkmıştır. Bu nedenle, Tablo 2 ve 3'teki veriler dikkate alındığında, kontrol kek örneğine renk benzerliği bakımından genel olarak bütün kısmi pişirme sürelerinde 7 günlük ara depolama süresi ve özellikle 20 dakikalık kısmi pişirme ve 7 günlük ara depolama süresinin en iyi sonucu verdiği söylenebilir.

Tablo 1. Kısmi pişmiş keklerin oda sıcaklığında depolama sonrası ve ikinci pişirmeden sonraki mikrobiyolojik analiz sonuçları

Kısmi Pişirme Süresi (dakika)	Depolama Süresi (gün)	Depolamadan Sonra (log kob/g)			İkinci pişirmeden sonra (log kob/g)		
		TMAB	Koliform Bakteri	Maya-Küf	TMAB	Koliform Bakteri	Maya-Küf
	0 (K)	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
15	7	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
	14	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
	21	3.93	<2.00	3.91	3.75	<2.00	3.83
20	7	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
	14	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
	21	3.93	<2.00	3.47	3.60	<2.00	3.38
25	7	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
	14	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
	21	3.38	<2.00	3.32	3.17	<2.00	3.02

Kob: Koloni oluşturan birim, K: Kontrol grubu

Tablo 2. Kısmi pişirilerek oda sıcaklığında depolandıktan sonra yeniden pişirilen kek örneklerinin (n=2) pişme kaybı, nem, üniformite indeksi ve renk değişimi (ΔE) değerleri^a

Kısmi Pişirme Süresi (dakika)	Ara Depolama Süresi (gün)	Pişme Kaybı (%)	Üniformite İndeksi	Renk Değişimi (ΔE)
	0 (K)	16.74±0.10e	1.0±0.0c	--
15	7	17.54±0.64e	1.0±0.0c	6,65±0.05d
	14	18.72±0.26cd	1.0±0.0c	13,04±0.43a
	21	19.16±0.01bc	1.0±0.0c	13,53±0.77a
20	7	17.87±0.34de	4.5±0.5a	1,67±1.48e
	14	19.76±0.21bc	1.0±0.0c	9,79±0.52bc
	21	20.23±0.18ab	1.0±0.0c	7,41±0.06d
25	7	17.84±0.46de	1.0±0.0c	7,58±0.25d
	14	19.02±0.56cd	1.0±0.0c	8,11±0.13cd
	21	21.02±0.09a	2.5±0.5b	10,50±0.06b

P

**

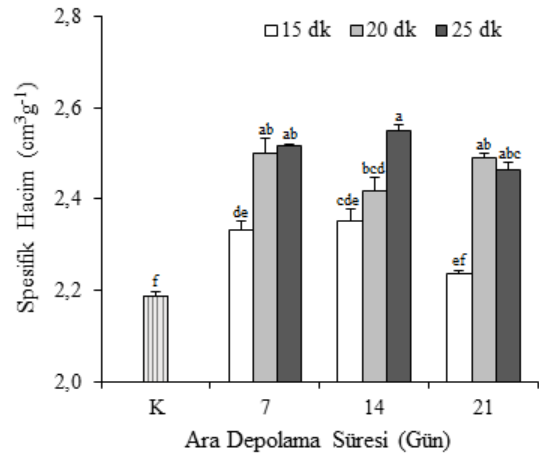
**

**

^a Aynı harfle gösterilen ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklı değildir (p<0.05), K: Kontrol grubu

Kısmi pişirildikten sonra oda sıcaklığında depolanmış ve daha sonra yeniden pişirilmiş kek örneklerinin spesifik hacmi kontrol grubu keklerle göre önemli derecede yüksek çıkmıştır. Ayrıca bütün depolama sürelerinde, genel olarak kısmi pişirme süresinin artması spesifik hacim değerlerini artırıcı yönde etkili olmuştur (Şekil 1). Ayrıca Tablo 3'ten de görüldüğü gibi kısmi pişmiş keklerin depolama süresi, spesifik hacim üzerine önemli derecede etkili olmazken, kısmi pişirme süresinin artması artırıcı yönde etkilemiştir. Kek gibi fırın ürünlerinde, fırında pişirme sırasında pişirmenin başlangıcında fırın sıçraması denilen [31] hacim artışı görülür, bu değişim belli bir süreye kadar yavaşlayarak devam eder ve belli bir süreden sonra durur. Kontrol kek örneğinin pişme süresinin 35 dakika olduğu düşünülür ise araştırmada 25 dakikalık pişme süresinden sonra hacim artışının durduğu ve bir miktar büzüşmenin olduğu söylenebilir. Keklerde hacim artışından da izlendiği gibi, nişasta jelatinizasyonu ve eş zamanlı proteinlerde meydana gelen denatürasyon [32] ile belli bir sabit kek yapısı oluştuktan sonra depolama süresi ile bu yapının çok fazla değişmediği görülmektedir. Bu

durum kısmi pişirme yönteminin kek gibi fırın ürünlerine başarılı bir şekilde uygulanabileceğini göstermektedir.



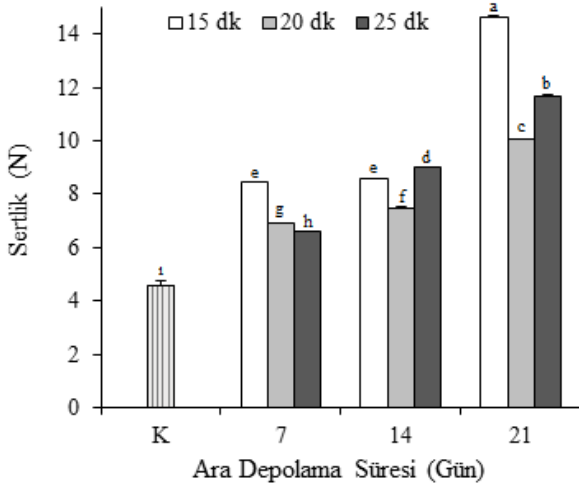
Şekil 1. Kek örneklerinin spesifik hacmi üzerine kısmi pişirme (15, 20 ve 25 dakika) ve ara depolama süresinin etkisi (K: Kontrol grubu)

Tablo 3. Kısmi pişirme ve ara depolama süresinin kek örneklerinin pişme kaybı, spesifik hacim, üniformite indeksi ve renk değişimi (ΔE) değerleri üzerine genel etkisi^a

	n	Pişme Kaybı (%)	Spesifik Hacim (cm ³ g ⁻¹)	Üniformite İndeksi	Renk Değişimi (ΔE)
Kısmi Pişirme Süresi (dakika)					
15	8	18.04±0.38b	2.28±0.03b	1.00±0.00c	11.07±1.40a
20	8	18.65±0.54a	2.39±0.05a	1.87±0.58a	6.29±1.57c
25	8	18.66±0.61a	2.43±0.05a	1.37±0.26b	8.73±0.57b
P		*	**	**	**
Ara Depolama Süresi (gün)					
0 (K)	6	16.74±0.04d	2.19±0.00b	1.00±0.00c	--
7	6	17.75±0.46c	2.45±0.04a	2.17±0.75a	5.30±1.12b
14	6	19.16±0.37b	2.44±0.04a	1.00±0.00c	10.31±0.93a
21	6	20.12±0.35a	2.39±0.05a	1.50±0.34b	10.48±1.13a
P		**	**	**	**

^a Aynı harfle gösterilen ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklı değildir (p<0.05), K: Kontrol grubu

Genellikle, bütün kısmi pişirme süreleri için, ara depolama süresinin artması, kısmi pişirilip depolandıktan sonra yeniden pişirilen kek örneklerinin sertlik değerlerini artırıcı yönde etkili olmuştur (Şekil 2). Yani, kısmi pişmiş olarak depolanan keklerin depolama süresinin artması kek içi dokusal yapısını olumsuz yönde etkilemiştir. Kek gibi yumuşak tekstüre sahip fırın ürünleri pişirildikten sonra depolama süresi arttıkça iç yapının sertliğindeki artışa paralel olarak tazelik giderek kaybolur ve bu değişiklik bayatlama olarak adlandırılır [33]. Fırın ürünlerinde, nişasta miktar olarak sistemin büyük bir kısmını oluşturduğu için depolama süresince nişastada meydana gelen değişimler ve özellikle nişasta retrogradasyonunun bayatlamadan birinci derecede sorumlu olduğu belirtilmektedir [34, 35, 36]. Keklerde, tüketim kalitesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olan, sertlik bakımından kontrol grubu örnekler en yakın değerlere 20 ve 25 dakika kısmi pişirildikten sonra oda sıcaklığında 7 gün depolanmış ve yeniden pişirilmiş kek örnekleri sahip olmuştur.



Şekil 2. Kek örneklerinin sertlik değerleri üzerine kısmi pişirme (15, 20 ve 25 dakika) ve ara depolama süresinin etkisi (K: Kontrol grubu)

Tekstür profil analizi sonucunda elde edilen ve ürünün iç bağlarının gücünün bir göstergesi olan kohesiflik [37]

değeri en yüksek kontrol grubu kek örneklerinde görülürken, en düşük değerler 15 dakika kısmi pişirme, 14 ve 21 gün ara depolama süresine sahip kek örnekleri ile 25 dakika kısmi pişirme ve 7 gün ara depolama süresine sahip keklerde tespit edilmiştir (Tablo 4). Kohesiflik, ikinci sıkıştırma için gereken enerji ile ilgili yumuşak fırın ürünlerinde önemli bir kalite özelliğidir. Bu parametre duyuşal ufalanma ve ürünü çiğnemek için gereken yoğunluk ve enerji ile ilgili algılar hakkında bilgi vermektedir [38]. Dolayısıyla iki aşamalı pişirme yöntemi olarak da adlandırılabilen kısmi pişirme yönteminin keklerde kohesiflik değerini düşürücü yönde etkili olduğu söylenebilmektedir.

Elastikiyet, birinci ve ikinci sıkıştırma arasındaki toparlanmanın bir göstergesi olan esnekliğin ölçümüdür ve karıştırma işlemi sırasında keklerde oluşturulan hava kabarcıklarının sayısı ile ilişkilidir [39]. En yüksek elastikiyet değerleri 15 dakika kısmi pişirmede 14 gün, 20 dakika kısmi pişirmede 14 ile 21 gün ve 25 dakika kısmi pişirmede 21 gün ara depolama süresine sahip keklerde görülmüştür (Tablo 4). Düşük elastik yapı keklerde daha hamurumsu bir yapıya neden olduğu için [40] elastikiyet değerlerinin yüksek olması arzu edilir. Genel olarak kısmi pişirme yönteminin keklerde elastikiyet değerleri üzerinde olumlu yönde etkili olduğu söylenebilir.

Bütün kısmi pişirme sürelerinde ara depolama süresinin artması kek örneklerinin çignenebilirlik değerlerini artırıcı yönde etkili olmuştur (Tablo 4). Direkt yöntemle pişirilmiş kontrol grubu kek örneklerinde çignenebilirlik değeri en düşük çıkarken kısmi pişmiş keklerin özellikle daha uzun ara depolama sürelerinde önemli artışlar görülmüştür. Çignenebilirlik katı bir gıdanın yutmaya hazır hale gelmesi için gerekli olan çigneme enerjisinin bir göstergesidir [30]. Sertlik, kohesiflik ve elastikiyet değerlerinden üretilen ikincil bir parametre olan çignenebilirlikteki değişim, yapılan benzer çalışmalarda da [27] olduğu gibi, genellikle hesaplandığı parametrelerdeki değişimlere ve özellikle de sertlikteki değişimlere benzer olmuştur (Tablo 5).

Tablo 4. Kısmi pişirilerek oda sıcaklığında depolandıktan sonra yeniden pişirilen kek örneklerinin (n=2) kohesiflik, elastikiyet ve çiğnenebilirlik değerleri^a

Kısmi Pişirme Süresi (dk.)	Ara Depolama Süresi (gün)	Kohesiflik (0 - 1) (0 - %100)	Elastikiyet (0 - 1) (0 - %100)	Çiğnenebilirlik
	(0) K	0.648±0.012a	0.808±0.008c	2.401±0.770i
15	7	0.565±0.005c	0.802±0.000c	3.834±0.024e
	14	0.525±0.005d	0.846±0.001a	3.809±0.038e
	21	0.526±0.003d	0.801±0.000c	6.174±0.012a
20	7	0.572±0.002c	0.825±0.000b	3.254±0.003g
	14	0.567±0.007c	0.842±0.000a	3.564±0.020f
	21	0.602±0.002b	0.841±0.000a	5.106±0.031c
25	7	0.534±0.004d	0.807±0.000c	2.848±0.011h
	14	0.593±0.003b	0.827±0.000b	4.423±0.008d
	21	0.609±0.000b	0.842±0.000a	6.003±0.031b
<i>P</i>		**	**	**

^a Aynı harfle gösterilen ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklı değildir (p<0.05), K: Kontrol grubu

Tablo 5. Kısmi pişirme ve ara depolama süresinin kek örneklerinin sertlik, kohesiflik, elastikiyet ve çiğnenebilirlik değerleri üzerine genel etkisi^a

	n	Sertlik (N)	Kohesiflik	Elastikiyet	Çiğnenebilirlik
Kısmi Pişirme Süresi (dakika)					
15	8	9.062±1.206a	0.566±0.023b	0.814±0.007c	4.055±0.5129a
20	8	7.251±0.790c	0.597±0.014a	0.829±0.005a	3.581±0.370c
25	8	7.972±1.054b	0.596±0.017a	0.821±0.005b	3.919±0.536b
<i>P</i>		**	**	**	**
Ara Depolama Süresi (gün)					
0 (K)	6	4.585±0.065d	0.648±0.006a	0.808±0.003c	2.401±0.034d
7	6	7.314±0.365c	0.557±0.007c	0.812±0.004c	3.312±0.181c
14	6	8.349±0.293b	0.561±0.012c	0.838±0.003a	3.932±0.162b
21	6	12.132±0.844a	0.579±0.016b	0.828±0.008b	5.761±0.209a
<i>P</i>		**	**	**	**

^a Aynı harfle gösterilen ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklı değildir (p<0.05), K: Kontrol grubu

SONUÇ

Bu çalışmada, farklı sürelerde kısmi pişirilen kek örnekleri oda sıcaklığında farklı sürelerde depolandıktan sonra yeniden pişirme işlemi ile son ürün elde edilmiş ve son ürün mikrobiyolojik, fiziksel ve tekstürel analizlere tabi tutularak kısmi pişirme yönteminin kek üretiminde kullanılabilirliği araştırılmıştır. Kısmi pişmiş keklerin oda sıcaklığında 14.gün depolamaya kadar mikrobiyolojik açıdan kontrol grubu örneklerle aynı özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir. Depolama süresinin artması spesifik hacim üzerine önemli derecede etkili olmazken, genel olarak kısmi pişirme süresinin artması spesifik hacim değerlerini artırıcı yönde etkili olmuştur. Ara depolama süresinin artması, kek örneklerinin sertlik değerlerini artırıcı yönde etkili olurken sertlik bakımından kontrol grubu örneklerle en yakın değerlere 20 ve 25 dakika kısmi pişirildikten sonra oda sıcaklığında 7 gün depolanmış ve yeniden pişirilmiş kek örnekleri sahip olmuştur. Genel olarak, kısmi pişirme yönteminin, keklerde elastikiyet değerini olumlu yönde etkilerken, kohesiflik değerini düşürücü ve çiğnenebilirlik değerini artırıcı yönde etkili olduğu tespit edilmiştir. Bütün bu

veriler neticesinde kısmi pişirme yönteminin, özellikle 20 dakika kısmi pişirme ve 14 güne kadar ara depolama süresinin, kek üretiminde kullanılabileceği sonucuna varılmaktadır.



KAYNAKLAR

- [1] Jongsutjarittam, N., Charoenrein, S. (2013). Influence of waxy rice flour substitution for wheat flour on characteristics of batter and freeze-thawed cake. *Carbohydrate Polymers*, 97(2), 306-314.
- [2] Conforti, F.D. (2014). Bakery products science and technology. *Cake Manufacture*, Edited by Zhou, W., Hui, Y. H., vol. 32, 563-564p.
- [3] Jaganathan, D.A. (2016). Production of rice flour and peanut paste in yellow cake. *International Journal of Scientific Research*, 5(9), 597-600.
- [4] Işık, F., Urgancı, Ü., Turan, F. (2017). Yaban mersini ilaveli muffin keklerin bazı kimyasal, fiziksel ve duyuşsal özellikleri. *Akademik Gıda*, 15(2), 130-138.
- [5] Köklü, G., Özer, M.S. (2008). Pandispanya yapımında bazı yüzey aktif maddelerin kek

- nitelikleri üzerindeki etkileri. *Ç.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 19(2), 78-86.
- [6] Koçak, Ş. (2018). Bazı emülgatörlerin glutensiz kek üretiminde kalite üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi. İğdir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İğdir.
- [7] Karaoğlu, M.M. (1998). Farklı yöntemler uygulanarak elde edilmiş modifiye nişastaların kek kalitesi üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- [8] Kıranlı, D. (2006). Yüksek şeker içerikli sade bar tipi kek üretiminde asesulfampotasyum, polidekstroz, laktitol ve ksantangam kullanımının ürünün kimi kalite özellikleri üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ege Üniversitesi, İzmir.
- [9] Boz, H. (2018). Buğday veya mısır nişastası kullanılarak üretilen keklerin fiziksel, duyuşsal ve tekstürel özellikleri üzerine çirşlendirmenin etkisi. *Akademik Gıda*, 16(2), 176-182.
- [10] Gelinas, P., Roy, G., Guillet, M. (1999). Relative effects of ingredients on cake staling based on an accelerated shelf- life test. *Journal of Food Science*, 64(5), 937-940.
- [11] Seow, C.C., Teo, C.H. (1996). Staling of starch-based products: a comparative study by firmness and pulsed NMR measurements. *Starch- Stärke*, 48(3), 90-93.
- [12] Karaoğlu, M.M., Kotancılar, H.G., Gerçekaslan, K.E. (2008). The effect of par- baking and frozen storage time on the quality of cupcake. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(10), 1778-1785.
- [13] Jongsutjarittam, N., Charoenrein, S. (2013). Influence of waxy rice flour substitution for wheat flour on characteristics of batter and freeze-thawed cake. *Carbohydrate Polymers*, 97(2), 306-314.
- [14] Botosoa, E.P., Chèné, C., Karoui, R. (2013). Use of front face fluorescence for monitoring lipid oxidation during ageing of cakes. *Food Chemistry*, 141(2), 1130-1139.
- [15] Seyhun, N., Sumnu, G., Sahin, S. (2005). Effects of different starch types on retardation of staling of microwave-baked cakes. *Food and Bioprocess Technology*, 83(1), 1-5.
- [16] Gomez, M., Ronda, F., Caballero, P.A., Blanco, C.A., Rosell, C.M. (2007). Functionality of different hydrocolloids on the quality and shelf-life of yellow layer cakes. *Food Hydrocolloids*, 21(2), 167-173.
- [17] Baeva, M., Panchev, I. (2005). Investigation of the retaining effect of a pectin-containing edible film upon the crumb ageing of dietetic sucrose-free sponge cake. *Food Chemistry*, 92(2), 343-348.
- [18] Janjarasskul, T., Tananuwong, K., Kongpensook, V., Tantratian, S., Kokpol, S. (2016). Shelf life extension of sponge cake by active packaging as an alternative to direct addition of chemical preservatives. *LWT-Food Science and Technology*, 72, 166-174.
- [19] Byun, J.I., Koh, B.K. (2017). Textural properties of frozen stored garaetteok supplemented with agar and casein. *International Journal of Food Properties*, 20(3), 2960-2968.
- [20] Gómez, M., Ruiz, E., Oliete, B. (2011). Effect of batter freezing conditions and resting time on cake quality. *LWT-Food Science and Technology*, 44(4), 911-916.
- [21] Samapundo, S., Devlieghere, F., Vroman, A., Eeckhout, M. (2016). Antifungal properties of fermentates and their potential to replace sorbate and propionate in pound cake. *International Journal of Food Microbiology*, 237, 157-163.
- [22] Karaoğlu, M.M., Serçe, İ. (2011). Kısmi pişirme yönteminin fırın ürünlerinde kullanımı. 7. *Gıda Mühendisliği Kongresi*. 24-26 Kasım 2011, Bildiriler Kitabı, Sayfa: 237, Ankara.
- [23] Hesso, N., Loisel, C., Chevallier, S., Le-Bail, A., Queveau, D., Pontoire, B., Le-Bail, P. (2015). Monitoring cake baking by studying different ingredient interactions: From a model system to a real system. *Food Hydrocolloids*, 51, 7-15.
- [24] Karaoğlu, M.M., Kotancılar, H.G., Gürses, M. (2005). Microbiological characteristics of part-baked white pan bread during storage. *International Journal of Food Properties*, 8(2), 355-365.
- [25] Rodríguez-García, J., Sahi, S.S., Hernando, I. (2014). Functionality of lipase and emulsifiers in low-fat cakes with inulin. *LWT-Food Science and Technology*, 58(1), 173-182.
- [26] Lee, C.C., Hosney, R.C., Varriano-Marston, E. (1982). Development of a laboratory-scale single-stage cake mix. *Cereal Chemistry*, 59, 389-392.
- [27] Ateş, G., Elmacı, Y. (2018). Kahve çekirdeği zarının diyet lifi kaynağı olarak kek formülasyonunda kullanılması. *Akademik Gıda*, 16(2), 156-167.
- [28] Anonim. (1967). Standard Methods of the International Association for Cereal Chemists. St Paul, MN: International Association for Cereal Chemistry.
- [29] Karaoğlu, M.M. (2002). Farklı sıcaklık ve sürelerde muhafaza edilen kısmi pişmiş ekmeklerin teknolojik ve mikrobiyolojik özellikleri. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- [30] Karaoğlu, M.M., Kotancılar, H.G. (2009). Quality and textural behaviour of par- baked and rebaked cake during prolonged storage. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(1), 93-99.
- [31] He, H.A.N.D., Hosney, R.C. (1991). Gas retention of different cereal flours. *Cereal Chemistry*, 68(4), 334-336.
- [32] Mizukoshi, M., Kawada, T., Matsui, N. (1979). Model studies of cake baking. i. continuous observations of starch gelatinization and protein coagulation during baking. *Cereal Chemistry*, 56(4), 305-309.
- [33] Ji, Y., Zhu, K., Qian, H., Zhou, H. (2007). Staling of cake prepared from rice flour and sticky rice flour. *Food Chemistry*, 104(1), 53-58.
- [34] Zeleznak, K.J., Hosney, R.C. (1986). The role of water in the retrogradation of wheat starch gels and bread crumb. *Cereal Chemistry*, 63(5), 407-411.
- [35] Gujral, H.S., Haros, M., Rosell, C.M. (2003). Starch hydrolyzing enzymes for retarding the staling of rice bread. *Cereal Chemistry*, 80(6), 750-754.

- [36] Kwaśniewska-Karolak, I., Mostowski, R. (2019). The influence of storage conditions on the staling rate and starch retrogradation in wheat rolls packaged in a modified atmosphere. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 8(5), 1188.
- [37] Szczesniak, A.S. (1963). Classification of textural characteristics a. *Journal of Food Science*, 28(4), 385-389.
- [38] Sanz, T., Salvador, A., Baixauli, R., Fiszman, S.M. (2009). Evaluation of four types of resistant starch in muffins. II. Effects in texture, colour and consumer response. *European Food Research and Technology*, 229(2), 197-204.
- [39] Rahman, R., Hiregoudar, S., Ramachandra, C.T., Mouneswari, K., Udaykumar, N., Roopa, R.S. (2015). Physico-chemical, textural and sensory properties of muffins fortified with wheat grass powder. *Karnataka Journal Agricultural Science*, 28(1), 79-82.
- [40] Singh, A., Geveke, D.J., Jones, D.R., Tilman, E.D. (2019). Can acceptable quality angel food cakes be made using pasteurized shell eggs? The effects of mixing factors on functional properties of angel food cakes. *Food Science & Nutrition*, 7(3), 987-996.
-

***Vitreoscilla* Hemoglobini Eksprese Eden *Escherichia coli* Suşları ile Şeker Pancarı Melasından Biyoetanol Üretiminde Ölçek Büyütmenin Etkisi**

Taner Şar , Meltem Yeşilçimen Akbaş  ✉

Gebze Teknik Üniversitesi, Temel Bilimler Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 41400, Kocaeli

Geliş Tarihi (Received): 22.04.2019, Kabul Tarihi (Accepted): 14.07.2020

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): akbas@gtu.edu.tr (M. Yeşilçimen Akbaş)

☎ 0 262 605 25 30 📠 0 262 653 84 90

ÖZ

Bu çalışmada, *Vitreoscilla* hemoglobini eksprese eden *Escherichia coli* TS3 ve TS4 suşlarının şeker pancarı melası hidrolizatı ile hazırlanan besiyerleri (MB2-MB5) kullanılarak biyoetanol üretimleri incelenmiştir. Kullanılan farklı şeker konsantrasyonlu besiyerleri içerisinde en fazla etanol üretimi MB2 besiyeri ortamında (yaklaşık %4 şeker içeren) gerçekleştirilmiştir. MB2 besiyerinde, küçük ölçekten büyük ölçeğe doğru biyoetanol üretiminin %10-17 oranında arttığı saptanmıştır. En fazla biyoetanol üretim miktarları en büyük hacimdeki fermentasyon ortamında TS3 ve TS4 suşları ile sırasıyla %2.49 ve %2.62 (v/v) olarak belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada ölçek büyütmenin VHB ekspresyonu yapan bakterilerle şeker pancarı melasından etanol üretimini olumlu etkilediği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Melas hidrolizatı, Etanol, Bakteriyel hemoglobin, *E. coli*, Sukroz, Ölçek büyütme

Effect of Scaling up on Bioethanol Production from Sugar Beet Molasses by *Vitreoscilla* Hemoglobin Expressing *Escherichia coli* Strains

ABSTRACT

In the present work, bioethanol production through VHB expressing *Escherichia coli* TS3 and TS4 strains from sugar-beet molasses hydrolysate containing media was investigated. The highest growth and ethanol production were obtained in MB2 (contains about 4% sugar) medium. In MB2 medium, bioethanol production was enhanced by *E. coli* TS3 and TS4 strains from small scale to big scale fermentation. The highest ethanol productions by TS3 and TS4 strains were determined as 2.49% and 2.62% (v/v) respectively, with the largest volume of fermentation medium. It was shown that scaling up process had positive effect on bioethanol production from sugar beet molasses through VHB expressing strains.

Keywords: Molasses hydrolysate, Ethanol, Bacterial hemoglobin, *E. coli*, Sucrose, Scale up process

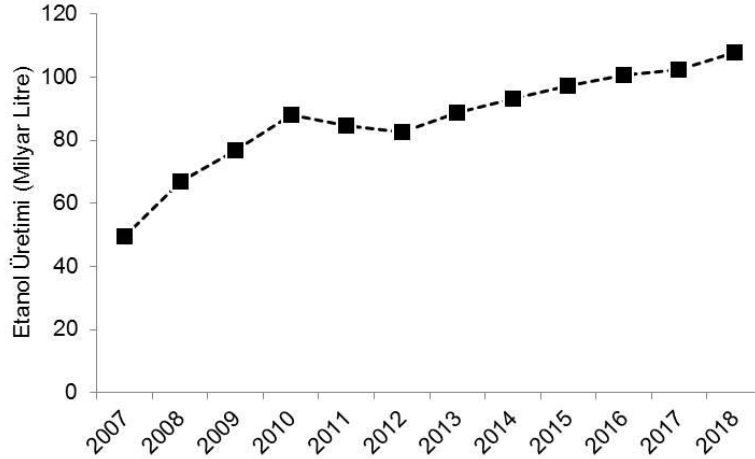
GİRİŞ

Biyoetanol küresel yakıt ihtiyacını karşılamak ve sera gaz emisyonunu azaltmak amacıyla kullanılan alternatif bir yakıttır [1]. Dünya çapında biyoetanol üretimi 2007 yılında 50 milyar litre, 2008 yılında ise 60 milyar litre civarındadır. Küresel biyoetanol üretim miktarı 2013 yılında yıllık 87.2 milyar litreye, 2015 yılında ise 97.2 milyar litreye ulaşmıştır. 2018 yılında 108 milyar litreye

ulaşan biyoetanol üretiminin 2020 yılında ise yıllık 120 milyar litre olması planlanmaktadır (Şekil 1) [2, 3]. Biyoetanolün çoğu Amerika Bileşik Devletleri'nde mısır ve Brezilya'da şeker kamışı gibi birincil nesil gıda kaynaklarından üretilmektedir. Tarımsal ve endüstriyel atıklar ile lignoselülozik maddeler gibi ikincil üretim süreçleri ile etanol üretiminin maliyeti ise yüksektir [4]. Birincil nesil üretim süreçlerinde kullanılan hammadde kaynaklarının gıda kaynağı olarak kullanılması ve ikincil

nesil üretim süreçlerinin de maliyetli olması nedeniyle biyoetanol üretiminde şeker pancarı melası gibi

potansiyel karbon kaynaklarının araştırılması gerekmektedir.



Şekil 1. Dünyada yıllık biyoetanol üretimi [2, 3].

Melas genel olarak şeker kamışı veya şeker pancarından şeker üretim sürecinde açığa çıkan koyu kahverengi bir gıda işleme atığıdır [5]. Genel olarak şeker pancarı ağırlığının %20'si kadar şeker içermektedir. Kristalize olmayan ve şeker üretimi esnasında yan ürün olarak açığa çıkan şeker pancarı melası ise yaklaşık %50 oranında sukroz içermektedir ve nitrojen bakımından zengindir [6]. Şeker pancarı melası zengin karbon kaynağı içermesinin yanı sıra ferulik asit (%0.5), asetik asit (%1.6) ve metanol (%0.4) de içerebilmektedir [7].

Biyoetanol üretiminde şeker pancarı melasının kullanımı oldukça yaygındır. Avrupa'nın bir bölümü ile Akdeniz ülkeleri biyoetanol üretimini şeker pancarı ve şeker pancarı melasından sağlamaktadır [8]. Türkiye'de üretilen etanolün çoğu Çumra Şeker Fabrikası'nda şeker pancarı ve şeker pancarı melasından sağlanmaktadır [9]. Benzer olarak Tayland'da da melasın ucuz ve bol miktarda olması nedeniyle etanol üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır [10]. Şeker pancarı melasının zengin içeriği ile etanol üretiminin yanı sıra enzim, maya, lipid, hidrojen gibi pek çok metabolit üretiminde de alternatif karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır [11-18].

Biyoetanol üretimi için fermentasyon ortamlarında genellikle *Saccharomyces cerevisiae* kullanılmasına rağmen bu organizma sadece altı karbonlu şekerleri fermente edebilir. Etanol üreticisi *Escherichia coli* FBR5 ise birçok farklı şekeri fermente edebilmesinden dolayı biyoetanol üretiminde alternatif mikroorganizma olarak ilgi çekmektedir [19-21]. *Vitreoscilla* Hemoglobini (VHb) en iyi karakterize edilmiş bakteriyel hemoglobindir. VHb eksprese eden hücrelerin daha yüksek hücre yoğunluğuna ulaştığı ve metabolit üretiminde artışa neden olduğu bildirilmiştir [22, 23]. *E. coli* FBR5 suşundan geliştirilen ve VHb ekspresyonu yapan suşların (TS3 ve TS4) [24] farklı ucuz karbon kaynaklarından biyoetanol üretimini arttırdığı görülmüştür [13, 25-30].

Yapılan bu çalışmada, *Vitreoscilla* Hemoglobini eksprese eden *E.coli* TS3 ve TS4 suşları ile karbon

kaynağı olarak şeker pancarı melasından biyoetanol üretiminde ölçek büyütmenin etkisi araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bakteri Suşları

Bu çalışmada kullanılan etanol üretebilen ve *Vitreoscilla* (bakteriyel) Hemoglobin geni (*vgb*) içeren *E.coli* TS3 ve TS4 suşları Prof. Dr. Benjamin C. Stark (Illinois Teknoloji Enstitüsü, Şikago, IL, ABD) tarafından hediye edilmiştir [24].

Şeker Pancarı Melası Hidrolizi

Çalışmada kullanılan şeker pancarı melası Kocaeli Pakmaya Fabrikası'ndan (Kocaeli, Türkiye) temin edilmiştir. Şeker pancarı melası ağırlığının beş katı olacak şekilde distile su ile sulandırılarak pH değeri 3.0 olacak şekilde 2M H₂SO₄ (%96 saflıkta, Merck, Darmstadt, Almanya) ile ayarlanmıştır. Sulandırılan melas bir gece oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve daha sonra 121°C'de 20 dakika süre ile bir otoklavda (Hirayama Hiclave™, HVE-50, Saitama, Japonya) ısıtılarak hidroliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen hidrolizatın steril koşullar altında pH değeri 7.0 olacak şekilde 10N NaOH ile ayarlanmıştır. Melas hidrolizatı +4°C sıcaklıkta 6000 g hızda 15 dakika süre ile santrifüj edilerek safsızlıklardan arındırılarak besiyeri bileşeni olarak kullanılmıştır [13].

Besi Ortamlarının Hazırlanması

Şeker pancarı melas hidrolizatı farklı oranlarda steril distile su ile sulandırılarak farklı şeker yoğunluğu içerecek şekilde besi ortamları hazırlanmıştır. Bu besi ortamlarından MB2 melas hidrolizatının 2 kat sulandırılması ile (%4.10 şeker içerecek şekilde), MB3 melas hidrolizatının 3 kat sulandırılması ile (%2.69 şeker içerecek şekilde), MB4 melas hidrolizatının 4 kat sulandırılması ile (%2.10 şeker içerecek şekilde) ve MB5 melas hidrolizatının ise 5 kat sulandırılması ile (%1.61 şeker içerecek şekilde) hazırlanmıştır. Her bir

besi ortamına 5g/L olacak şekilde maya özütü ilave edilmiştir [28-31]. Farklı besi ortamlarının şeker içerikleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Biyotanol üretimi

Ön kültürler için, 5 mL farklı besi ortamları içeren 50 mL Erlenler içerisinde *E.coli* TS3 ve TS4 suşları ayrı ayrı olacak şekilde inoküle edilmiş ve çalkalamalı bir inkübatörde (Edmund Bühler GmbH, TH15, Hechingen, Almanya) bir gece boyunca (18 saat) 37°C sıcaklıkta ve 180 devir/dakika hızında inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

Fermentasyon denemelerinde biyotanol üretimi için 50 mL, 250 mL, 500 mL ve 1000 mL Erlenler kullanılarak Erlen hacminin %80'i besiyeri içerecek şekilde (40-800 mL) farklı fermentasyon ortamları hazırlanmıştır. Fermentasyon ortamları başlangıç OD_{600nm} değeri 0.06 olacak şekilde, bir gecelik bakteri kültürleri ile ayrı ayrı inoküle edilmiş [32] ve çalkalamalı bir inkübatörde (Edmund Bühler GmbH, TH15, Hechingen, Almanya) 48 saat süre ile 37°C sıcaklıkta ve 180 devir/dakika hızında inkübe edilmiştir.

Analiz Yöntemleri

Fermentasyon sonrasında, kültürlerin üremeleri, OD_{600nm}'deki optik yoğunlukları 0.6 değerini

$$\begin{aligned} \text{Etanol Miktarı (\% w/v)} &= \text{Etanol miktarı (\% v/v)} \times 0.78924 & (1) \\ \text{Etanol Verimi} &= \frac{\text{Üretilen etanol miktarı (\% w/v)}}{\text{Tüketilen şeker miktarı (\% w/v)}} & (2) \\ \text{Teorik Etanol Verimi (\%)} &= (\text{Etanol verimi} / 0.512) \times 100 & (3) \end{aligned}$$

İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler, Microsoft Office, Excel 2007 programı ile yapılmıştır. *P* değerleri, tek kuyruklu t-testi ile VHB eksprese eden *E. coli* suşları ile melas hidrolizatından etanol üretiminin ölçek büyütme ile arttırılabileceği hipotezine dayanılarak belirlenmiştir. *P*<0.05 seviyesinde bulunan denemelerin sonuçları istatistiksel açıdan "önemli" olarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Farklı oranlarda sulandırılan melas hidrolizatı besiyerlerinin toplam şeker içerikleri Tablo 1'de gösterilmiştir. En fazla şeker içeriği melas hidrolizatının 2 kat sulandırılması ile elde edilen MB2 besiyerinde olmuştur. Ayrıca 50 mL'lik Erlenlerde, *E. coli* TS4 suşu ile gerçekleşen ön denemelerde, dört farklı besiyeri içerisinde en fazla üremenin MB2 besiyerinde olduğu

aşmayacak şekilde steril özgün besi ortamı ile seyreltilerek bir spektrofotometre cihazı (Shimadzu, UV-1800 UV-VIS, Kyoto, Japonya) kullanılarak belirlenmiştir. Optik yoğunluğun belirlenmesinde kör olarak kültüre özgün steril besi ortamı kullanılmıştır.

Melas hidrolizatlarının fermantasyonlar öncesi var olan ve sonrası kalan şeker miktarları (% w/v) ile üretilen biyotanol miktarları (% v/v) HPLC analiz cihazı vasıtasıyla belirlenmiştir [28]. HPLC analizi için, örnekler +4°C'de 10000 rpm hızda ve 10 dakika süre ile santrifüj edilerek safsızlıklardan arındırılmıştır. Elde edilen üst sıvı, 0.22 µm por çaplı selüloz filtreden geçirilerek HPLC viallerine aktarılmıştır. Yürütücü faz olarak Asetoritril (%60 v/v) solüsyonu kullanılmış ve akış hızı 1 mL/dakika olacak şekilde ayarlanmıştır. 20 µL örnek enjeksiyonu ile toplamda 10 dakika süre boyunca, 25°C kolon sıcaklığında ve NH₂ kolonu (Interstil, 5 µm, 4.6 x 250 mm, GL Sciences Inc., Shinjuku, Tokyo, Japonya) kullanılarak HPLC analizi gerçekleştirilmiştir.

Fermentasyon sonrası şeker tüketimi ve etanol üretim miktarlarına göre etanol verimi ve teorik etanol verimi aşağıda belirtilen formüllere göre belirlenmiştir [33].

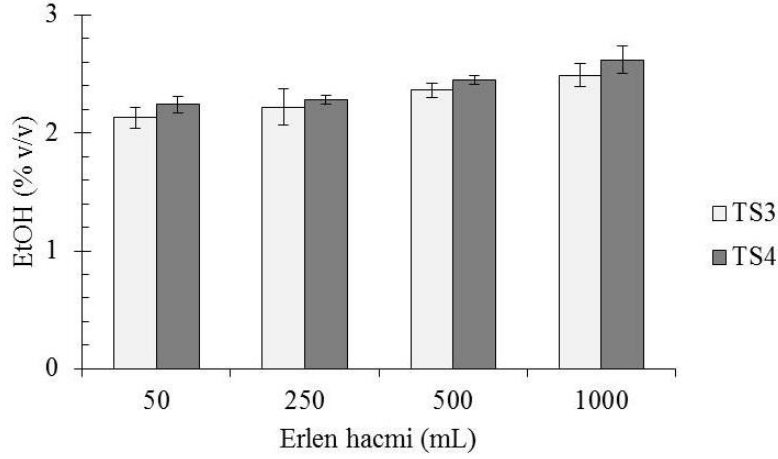
belirlenmiştir (*p*<0.05). Biyotanol üretiminin ise yine 4 farklı besiyeri içerisinde en fazla yine MB2 besiyerinde %2.24 (v/v) olduğu belirlenmiştir (Tablo 1). Aynı koşullarda, TS3 suşu ile etanol üretiminin %2.13 (v/v) olduğu belirlenmiştir (Şekil 2). Diğer besiyerlerinde melas hidrolizatının sulandırılma oranları arttığından üremenin ve etanol üretiminin azaldığı görülmüştür.

MB2 besi ortamında, *E. coli* TS3 ve TS4 suşları ile ölçek büyütme (40 mL'den 800 mL'ye) ile biyotanol üretiminin kademeli olarak arttığı (%10-17 arasında) saptanmıştır (Şekil 2). Biyotanol üretim miktarlarının TS3 suşu ile 400 mL besiyeri içeren 500 mL'lik Erlenlerde %2.36 (v/v), 800 mL besiyeri içeren 1000 mL'lik Erlenlerde ise %2.49 (v/v) olduğu belirlenmiştir. TS4 suşu ile ise etanol üretiminin ise 500 ve 1000 mL'lik erlenlerde sırasıyla %2.45 ve %2.62 (v/v) olduğu belirlenmiştir (Şekil 2).

Tablo 1. 50 mL hacimli erlenlerde *E.coli* TS4 suşunun farklı besi ortamlarında (40 mL, MB2-MB5) üreme (OD_{600nm}) ve biyotanol üretim (EtOH) değerleri (% v/v) ile besiyerlerinin toplam şeker içerikleri (%w/v)*

Besiyeri	Suş	Toplam Şeker (%w/v)	OD _{600nm}	EtOH (%v/v)
MB2	TS4	4.04±0.23	4.87±0.18	2.24±0.07
MB3	TS4	2.69±0.15	4.20±0.09	1.78±0.06
MB4	TS4	2.02±0.13	3.50±0.17	1.30±0.02
MB5	TS4	1.61±0.07	3.08±0.13	0.97±0.11

*Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Standart sapmalar (±) simgesi ile gösterilmiştir.



Şekil 2. Farklı hacimlerdeki Erlenlerde (50-1000 mL) farklı miktarlarda MB2 besi ortamlarında (40-800 mL) *E.coli* TS3 ve TS4 suşlarının etanol üretim değerleri (% v/v). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ifade etmektedir.

Ölçek büyütme ile (40 mL'den 800 mL'ye), hem *E. coli* TS3 suşu ile hem de *E. coli* TS4 suşu ile biyoetanol üretiminin %17 oranında arttığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Ölçek büyütmenin etanol üretimini olumlu yönde

etkilemesinin yanı sıra şeker tüketimini, etanol verimini ve teorik etanol verimini de arttırdığı ($p < 0.05$) belirlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. *E. coli* TS3 ve TS4 suşlarının farklı hacimlerdeki erlenlerde (50-1000 mL) farklı miktarlarda MB2 besi ortamında (40-800 mL) kalan toplam şeker (%w/v), üreme (OD_{600nm}), etanol verimi ($g_{EtOH}/g_{tükenen\ şeker}$) ve teorik etanol verimi (%) değerleri*

Erlen (mL)	Suş	Kalan Toplam Şeker (%w/v)	OD_{600nm}	Etanol Verimi ($g_{EtOH}/g_{tükenen\ şeker}$)	Teorik Etanol Verimi (%)
50	TS3	0.43±0.02	4.56±0.14	0.47±0.02	91.8±0.52
	TS4	0.37±0.08	4.87±0.18	0.48±0.02	93.8±0.46
250	TS3	0.24±0.09	4.95±0.10	0.46±0.07	89.8±1.02
	TS4	0.31±0.11	4.72±0.21	0.48±0.03	93.8±1.39
500	TS3	0.15±0.01	4.26±0.10	0.48±0.01	93.8±2.14
	TS4	0.13±0.01	4.64±0.15	0.49±0.01	95.7±1.33
1000	TS3	0.12±0.03	4.34±0.02	0.50±0.02	97.7±1.16
	TS4	0.08±0.01	4.21±0.18	0.52±0.01	101.6±1.24

*Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Standart sapmalar (\pm) simgesi ile gösterilmiştir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan bu çalışmada biyoetanol üretiminde karbon kaynağı olarak şeker pancarı melas hidrolizatı (glukoz ve fruktoz) kullanılarak etanol üretiminin artırılmasında *Vitreoscilla* hemoglobini ekspresyonu ve hacim artışının etkisi incelenmiştir. Bunun için farklı şeker konsantrasyonlarında (%1.61-4.04) ve farklı hacimlerde üretim ortamları (50-1000mL'lik Erlenlerde 40-800 mL besiyerleri içeren) kullanılmış ve suşların etanol üretimleri incelenmiştir.

Bu çalışmada besiyeri maliyetinin azaltılması için şeker pancarı melası ile hazırlanan fermentasyon ortamlarına sadece maya özütü ilavesi yapılmıştır [28-31]. Toplam %2.4 (w/v) oranında şeker içerecek şekilde şeker pancarı melas hidrolizatı ve zengin besiyeri (pepton, sodyum asetat, fosfat tamponu gibi) bileşenleri içeren 800 mL besi ortamı içeren 1000 mL erlenler kullanılarak etanol üretiminin gerçekleştirildiği bir çalışmada, *E. coli* TS4 suşu ile etanol üretiminin %2.09 (v/v) olduğu belirlenmiştir [13]. Bu çalışmada da, farklı olarak, zengin besiyeri yerine şeker pancarı melas hidrolizatı içeren

aynı şeker oranına sahip 800 mL minimal besiyerinde TS4 suşu ile 48 saat sonunda %2.62 oranında etanol üretilmesi besiyerinin maya özütü hariç zenginleştirilmesine ihtiyaç duyulmadan şeker pancarı melası ile minimal ortamda benzer oranda etanol üretiminin gerçekleşebildiği gösterilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada VHB eksprese eden *E. coli* TS4 suşunun, VHB eksprese etmeyen FBR5 suşuna göre %118 daha fazla etanol ürettiği belirlenerek VHB'nin etkinliği gösterilmiştir. Silva ve arkadaşlarının [34] yapmış oldukları bir diğer çalışmada ise, %4 sukroz (w/v) içeren 200 mL minimal besiyerinde 96 saatlik inkübasyon sonunda *E. coli* KO11 ve *Klebsiella oxytoca* P2 suşlarının, etanol üretimlerinin sırasıyla 15.8 g/L ve 11.3 g/L, %4 sukroz (w/v) ile zenginleştirilmiş 200 mL LB besiyerinde ise her iki suşun etanol üretiminin 20.3 g/L olduğu bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmada ise toplam yaklaşık %4 (w/v) oranında şeker içerecek şekilde melas hidrolizatı ile hazırlanan 200 mL ve 800 mL minimal besi ortamları ile etanol üretimlerinin sırasıyla %2.28 (v/v) (17.99 g/L) ve %2.62 (v/v) (20.67 g/L) olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, yapılan bu çalışma ile kullanılan TS4 suşu ile biyoetanol üretiminde düşük maliyetli olabilecek melas hidrolizatını

içeren MB2 besiyerinin etkin olarak kullanılabilirliği görülmüştür.

Bu çalışmada, ölçek büyütme ile teorik etanol veriminin %100 seviyesine ulaştığı belirlenmiştir. Melas hidrolizatı ile yapılan bu çalışmada, biyoetanol üretimi için en etkin şeker miktarının belirlenmesinin yanı sıra fermentasyonda ölçek büyütmenin de önemli bir faktör olabileceği belirlenmiştir. Benzer şekilde VHB ekspresyonu yapan rekombinant *E. coli* suşları ile yapılan önceki çalışmalarda da, ölçek büyütmenin farklı karbon kaynakları ile de biyoetanol üretimini arttırdığı raporlanmıştır [13, 25, 27]. Abanoz ve arkadaşlarının [25] yapmış oldukları çalışmada, patates işleme atıkları kullanılarak *E. coli* TS4 suşu ile etanol üretiminde fermentasyon besiyeri miktarının 100 mL'den 800 mL'ye artırılması ile etanol üretiminin %43 oranda arttırdığı belirlenmiştir. Patates ile mısır işleme atık suları ve peynir altı suyu kullanılarak yapılan diğer etanol üretim çalışmalarında da ölçek büyütme ile (80 mL'den 800 mL'ye) etanol üretiminin %100'ün üzerinde arttığı belirlenmiştir [13, 27]. Yapılan bu çalışmada şeker pancarı melası ile ölçek büyütmenin VHB ekspresyonu yapan bakterilerle etanol üretimini %17 arttırdığı belirlenmiştir. Bunun nedeni ölçek büyümesine bağlı olarak meydana gelen oksijen transferi kısıtlamaları, pH değişimleri, oksijen oranının azalması gibi faktörlerin artmasına karşın VHB'nin hücre canlılığını korumasından ve etanol üretimini arttırmasındandır [35,36].

Elde edilen sonuçlar, biyoetanol üretiminde şeker pancarı melasının alternatif bir karbon kaynağı olabileceğini göstermektedir. Biyoetanol üretiminde, melas hidrolizatı içeriğindeki glukozun yanı sıra fruktoz şekerinin de etkili olabileceği düşünülmektedir. Bundan dolayı etanol üretimi çalışmalarında fruktoz içeren meyve suyu işleme atıkları da değerlendirilebilir. VHB ekspresyonu ile şeker pancarı melası kullanılarak pH, sıcaklık, çözülmüş oksijen miktarı gibi faktörlerin kontrollü olduğu bir fermentör ortamında yapılacak denemelerle daha yüksek etanol konsantrasyonları elde edilebilecektir. Ayrıca elde edilen sonuçlar ile, biyoetanol üretiminde vgb/VHB sisteminin sanayide çok daha büyük ölçekli fermentasyon uygulamalarında potansiyel olarak kullanılabilirliğini ve avantajlı olabileceğini göstermektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Gebze Teknik Üniversitesi (2013-A02, 2016-A-13 ve 2017-A102-19) tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Demirbas, A. (2007). Progress and recent trends in biofuels. *Progress in Energy and Combustion Science*, 33(1), 1-18.
- [2] U.S Department of Energy (US DOE). (2016). Global Ethanol Production by Country/Region, Renewable Fuels Association, Washington, USA.
- [3] RFA. (2019). Renewable Fuels Association, Washington, USA.

- [4] Regassa, T.H., Wortmann, C.S. (2014). Sweet sorghum as a bioenergy crop: literature review. *Biomass and Bioenergy*, 64, 348-355.
- [5] Arimi, M.M., Zhang, Y., Götz, G., Kiriamiti, K., Geißen, S.U. (2014). Antimicrobial colorants in molasses distillery wastewater and their removal technologies. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 87, 34-43.
- [6] Broughton, N.W., Dalton, C.C., Jones, G.C., Williams, E.L. (1995). Adding value to sugar beet pulp. *International Sugar Journal* (United Kingdom).
- [7] Kühnel, S., Schols, H.A., Gruppen, H. (2011). Aiming for the complete utilization of sugar-beet pulp: examination of the effects of mild acid and hydrothermal pretreatment followed by enzymatic digestion. *Biotechnology for Biofuels*, 4(1), 1-14.
- [8] Fukuda, H., Kondo, A., Tamalampudi, S. (2009). Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 2-12.
- [9] Ozdingis, A.G.B., Kocar, G. (2018). Current and future aspects of bioethanol production and utilization in Turkey. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 81, 2196-2203.
- [10] Pattanakittivorakul, S., Lertwattanasakul, N., Yamada, M., Limtong, S. (2019). Selection of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* for high temperature ethanol production from molasses and increasing ethanol production by strain improvement. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1-16.
- [11] Veana, F., Martínez-Hernández, J.L., Aguilar, C.N., Rodríguez-Herrera, R., Michelena, G. (2014). Utilization of molasses and sugar cane bagasse for production of fungal invertase in solid state fermentation using *Aspergillus niger* GH1. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(2), 373-377.
- [12] Suksawang, S., Cheirsilp, B., Yeesang, J. (2016). Production of kefiran from molasses and spent yeast cells by *Lactobacillus kefiranofaciens* JCM 6985. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, 21(2), 59-67.
- [13] Akbas, M.Y., Sar, T., Ozcelik, B. (2014). Improved ethanol production from cheese whey, whey powder, and sugar beet molasses by "Vitreoscilla hemoglobin expressing" *Escherichia coli*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 78(4), 687-694.
- [14] Taskin, M., Ortucu, S., Aydogan, M.N., Arslan, N.P. (2016). Lipid production from sugar beet molasses under non-aseptic culture conditions using the oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* TR29. *Renewable energy*, 99, 198-204.
- [15] Urbaniec, K., Grabarczyk, R. (2014). Hydrogen production from sugar beet molasses—a techno-economic study. *Journal of Cleaner Production*, 65, 324-329.
- [16] Oehmen, A., Pinto, F.V., Silva, V., Albuquerque, M.G., Reis, M.A. (2014). The impact of pH control on the volumetric productivity of mixed culture PHA production from fermented molasses. *Engineering in Life Sciences*, 14(2), 143-152.
- [17] Jung, M.Y., Jung, H.M., Lee, J., Oh, M.K. (2015). Alleviation of carbon catabolite repression in *Enterobacter aerogenes* for efficient utilization of

- sugarcane molasses for 2, 3-butanediol production. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 106.
- [18] Xu, K., Xu, P. (2014). Efficient production of L-lactic acid using co-feeding strategy based on cane molasses/glucose carbon sources. *Bioresource Technology*, 153, 23-29.
- [19] Ingram, L.O., Conway, T., Clark, D.P., Sewell, G.W., Preston, J.F. (1987). Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(10), 2420-2425.
- [20] Ingram, L.O., Conway, T. (1988). Expression of different levels of ethanologenic enzymes from *Zymomonas mobilis* in recombinant strains of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 397-404.
- [21] Dien, B.S., Nichols, N.N., O'bryan, P.J., Bothast, R.J. (2000). Development of new ethanologenic *Escherichia coli* strains for fermentation of lignocellulosic biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84-86, 181-196.
- [22] Khosla, C., Bailey, J.E. (1988). Heterologous expression of a bacterial haemoglobin improves the growth properties of recombinant *Escherichia coli*. *Nature*, 331(6157), 633.
- [23] Frey, A.D., Kallio, P.T. (2003). Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins: versatile proteins and their impact on microbiology and biotechnology. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(4), 525-545.
- [24] Sanny, T., Arnaldos, M., Kunkel, S.A., Pagilla, K.R., Stark, B.C. (2010). Engineering of ethanolic *E. coli* with the *Vitreoscilla* hemoglobin gene enhances ethanol production from both glucose and xylose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(5), 1103-1112.
- [25] Abanoz, K., Stark, B.C., Akbas, M.Y. (2012). Enhancement of ethanol production from potato-processing wastewater by engineering *Escherichia coli* using *Vitreoscilla* haemoglobin. *Letters Applied Microbiology*, 55(6), 436-443.
- [26] Arnaldos, M., Kunkel, S.A., Wang, J., Pagilla, K.R., Stark, B.C. (2012). *Vitreoscilla* hemoglobin enhances ethanol production by *Escherichia coli* in a variety of growth media. *Biomass Bioenergy*, 37, 1-8.
- [27] Sumer, F., Stark, B.C., Akbas, M.Y. (2015). Efficient ethanol production from potato and corn processing industry waste using *E. coli* engineered to express *Vitreoscilla* haemoglobin. *Environmental Technology*, 36(18), 2319-2327.
- [28] Sar, T., Stark, B.C., Akbas, M.Y. (2017). Effective ethanol production from whey powder through immobilized *E. coli* expressing *Vitreoscilla* hemoglobin. *Bioengineered*, 8(2), 171-181.
- [29] Sar, T., Seker, G., Erman, A.G., Stark, B.C., Akbas, M.Y. (2017). Repeated batch fermentation of immobilized *E. coli* expressing *Vitreoscilla* hemoglobin for long-term use. *Bioengineered*, 8(5), 651-660.
- [30] Sar, T., Stark, B.C., Akbas, M.Y. (2019). Bioethanol production from whey powder by immobilized *E. coli* expressing *Vitreoscilla* hemoglobin: optimization of sugar concentration and inoculum size. *Biofuels*, 1-6.
- [31] Sar, T., Akbas, M.Y. (2019). Investigation of effective immobilization method for ethanol producing *E. coli* strain. *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 15(2), 217-220.
- [32] Şar, T., Akbaş, M.Y. (2016). Biyoetanol üretimi için gıda işleme atıklarının asit hidrolizi. *Akademik Gıda*, 14(1), 15-20.
- [33] Jayus, Nurhayati, Mayzuhroh, A., Arindhani, S., Caroenchai, C. (2016). Studies on bioethanol production of commercial baker's and alcohol yeast under aerated culture using sugarcane molasses as the media. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 9, 493-499.
- [34] Silva, G.P.D, Araújo, E.F.D, Silva, D.O., Guimarães, W.V. (2005). Ethanolic fermentation of sucrose, sugarcane juice and molasses by *Escherichia coli* strain KO11 and *Klebsiella oxytoca* strain P2. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36(4), 395-404.
- [35] Anand, A., Duk, B.T., Singh, S., Akbas, M.Y., Webster, D.A., Stark B.C., Dikshit, K.L. (2010). Redox-mediated interactions of VHb (*Vitreoscilla* haemoglobin) with OxyR: novel regulation of VHb biosynthesis under oxidative stress. *Biochemical Journal*, 426(3), 271-280.
- [36] Akbas, M.Y., Doruk, T., Ozdemir, S., Stark, B.C. (2011). Further investigation of the mechanism of *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) protection from oxidative stress in *Escherichia coli*. *Biologia*, 66(5), 735-740.

İğde (*Elaeagnus angustifolia* L.) Meyve ve Yapraklarının Antioksidan ve Antidiyabetik Özellikleri

Serap Berктаş  ✉, Mustafa Çam 

Erciyes Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Kayseri

Geliş Tarihi (Received): 16.05.2020, Kabul Tarihi (Accepted): 10.10.2020

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): berktaserap@gmail.com.tr (S. Berктаş)

☎ 0 352 207 66 66-32757 📠 0 352 437 57 84

ÖZ

Bu çalışma *Elaeagnus angustifolia* L. (iğde) meyve ve yapraklarının antioksidan ve antidiyabetik etkilerini belirlemek ve karşılaştırmak için gerçekleştirilmiştir. Metanol:su (1:1, v/v) ile yapılan iğde meyve ve yaprak ekstraktlarının toplam fenolik, toplam flavonoid ve tanen içerikleri, antioksidan aktiviteleri (DPPH ve ABTS metotları) ve α -glukozidaz ve α -amilaz enzimlerini inhibe edici etkileri araştırılmıştır. Ayrıca ekstraktlarda lipaz inhibisyonu aktivitesi tayini de gerçekleştirilmiştir. İğde meyve ve yapraklarının α -glukozidaz enzimini %50 oranında inhibe ettikleri değerler (IC50) sırasıyla 17.11 μ g/mL ve 124.7 μ g/mL olarak tespit edilirken, α -amilaz enzimini sadece meyvenin inhibe ettiği (21.95 mg/mL) ve hem meyve hem de yaprakların lipaz inhibisyon aktivitesi göstermediği belirlenmiştir. Meyve ve yaprakların ekstraktlarının toplam fenolik, flavonoid ve tanen içerikleri ile antioksidan aktivite değerleri incelendiğinde meyvenin biyoaktif içeriğinin yaprağına göre anlamlı şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$). İğdenin meyve ve yapraklarının içerdiği biyoaktif bileşikler sayesinde göstermiş olduğu antidiyabetik aktivitenin *in vitro* çalışmalar sonrası elde edildiği göz önüne alındığında, iğdenin özellikle de meyve kısmının tip 2 diyabet rahatsızlıklarının doğal yoldan tedavisinde destekleyici yönünün olabileceği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Elaeagnus angustifolia* L., İğde, Biyoaktivite, Antidiyabet, Tanen

Antioxidant and Antidiabetic Properties of Oleaster (*Elaeagnus angustifolia* L.) Fruits and Leaves

ABSTRACT

This study was carried out to determine the antioxidant and antidiabetic activities of *Elaeagnus angustifolia* L. (oleaster) fruits and leaves. The total phenolic, total flavonoid and tannin contents, antioxidant activities (DPPH and ABTS methods), and inhibitory effects against α -glucosidase and α -amylase enzyme were investigated in the oleaster fruit and leaf extracts obtained with methanol:water (1:1, v/v). In addition, lipase inhibition activity was determined in these extracts. The values in which the fruit and leaves of oleaster inhibit the α -glucosidase enzyme by 50% (IC50) were determined as 17.11 μ g/mL and 124.71 μ g/L, respectively. Neither fruits nor leaves displayed a lipase inhibition activity. In terms of the phenolic, flavonoid and tannin contents and antioxidant activity values of the extracts of fruits and leaves, the bioactive content of fruits was significantly higher than that of leaves ($p < 0.05$). Considering *in vitro* antidiabetic activities of the fruits and leaves of oleaster, the consumption of these natural extracts may have a potential for the treatment of type 2 diabetes.

Keywords: *Elaeagnus angustifolia* L., Oleaster, Bioactivity, Antidiabetics, Tannin

GİRİŞ

Tıbbi ve aromatik bitkilerin bazı terapötik özelliklere sahip olmaları onların geleneksel kullanımlarını yaygınlaştırarak bu bitkileri alternatif bir ilaç olarak öne çıkarmaktadır. Bitkilerin çiçek, yaprak ve kök gibi kısımlarından infüzyon veya kaynatma yoluyla hazırlanan çaylar gastrointestinal hastalıklar ve tip 2 diyabet gibi kronik hastalıkların tedavisinde geleneksel olarak kullanılmaktadır [1]. Bitkilerde bulunan antioksidanların diyabeti önleme ve kontrol etmede kayda değer etkilerinin olacağı ve dünya çapında yaklaşık 800 bitkinin antidiyabetik özellikler sergilediği belirlenmiştir [2]. Birçok çalışmada, bitkilerin biyoaktif bileşikleri ve pankreatik α -amilaz inhibitör etkileri neticesinde Diabetes mellitus'un tedavisinde umut vaat ettiğini bildirilmiştir. Ayrıca, bitkilerin karbonhidrat sindirim enzimi inhibitörleri olarak diyabeti kontrol ettiği ve ilaçlardan daha az olumsuz etki (örneğin karaciğer problemleri, yüksek dozlarda hipoglisemi, vb.) göstereceği ifade edilmiştir [3]. Bireysel fenoliklerin veya fenolik sınıflarının antioksidan aktivitelerinden bağımsız olarak anahtar enzimlerin aktivitelerini doğrudan etkileyerek, diğer yararlı etkilere neden olabileceğine dair kanıtlar artmaktadır [4]. Yabanmersini ve frenk üzümü [4], mürver ve boysenberry [5] gibi bazı meyvelerdeki fenoliklerin antidiyabetik özellikler sergilediği gösterilmiştir.

İğde (*Elaeagnus angustifolia* L.) genellikle küçük kırmızımsı-kahverengi, 1.5-2 cm uzunluğunda elips şeklinde meyvelere ve keskin uçlu kısa saplı uzun eliptik yapraklara sahiptir [6, 7]. Zeytin ağacına benzediğinden dolayı Rus zeytini, yabani zeytin ya da en yaygın kullanımı olan ve İngiliz dilinde oleaster olan iğde adı ile de bilinmektedir. Elaeagnaceae (Araliaceae) familyasına üye olan *Elaeagnus* cinsine ait yaprak dökken, dalları gümüş yeşili olan ve genellikle 2-7 m yüksekliğinde büyük çalı türü bir bitkidir [6, 8]. Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika'nın bazı kısımlarının yarı tropik bölgelerinde geniş bir coğrafi yayılım gösteren *Elaeagnus*' un 90'dan fazla türü bulunmaktadır. Bu tür birçok Avrupa kentinde süs ağacı olarak kullanılmasına rağmen, Orta ve Doğu Anadolu'da yenilebilir meyveleri için yaygın olarak yetiştirilmektedir [9]. Bununla birlikte, kök, ağaç kabuğu, çiçek, yaprak ve meyve gibi bitkinin tüm kısımları tıbbi özelliklere sahiptir ve gıda, ilaç, parfümeri endüstrileri gibi farklı kullanım alanları bulunmaktadır [8].

Rusya'da, *E. angustifolia* (Rus zeytini) çok şifalı bir bitki olarak bilinmekle birlikte değerli terapötik özellikleri sayesinde birçok Asya ve Trans-Kafkasya ülkesinin geleneksel tıbbında kullanılmıştır [10]. Yerel türlerin meyve, çiçek, yaprak ve kabuklarının deoksijenasyonu ve infüzyonları çeşitli hastalıkların ve semptomların geleneksel tedavisinde kullanılmaktadır. Bitkinin çiğ ya da pişmiş meyvesinin ve çiçeklerinin infüzyonlarının mide bulantısı, tetanoz, öksürük, soğuk algınlığı, ateş, bulantı, kusma, sarılık, astım, diyare ve diğer semptomların tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir [11]. İranlılar geleneksel olarak iğde meyvelerini eklem iltihabından muzdarip hastalar için ağrı kesici olarak kullanırken, çiçeklerini tetanoz tedavisinde kullanmışlardır. Türkiye'de kullanılan tıbbi

bitkilerden birisi olan iğdenin çiçekli dallarından deoksijenasyon ile elde edilen çayın Balıkesir ili Gönen ilçesinde diyabetin tedavisinde geleneksel olarak kullanıldığı bilinmektedir [2]. Bununla birlikte, yine geleneksel olarak bitkinin meyvesi diüretik, tonik, antipiretik, antidiarreal ve böbrek rahatsızlıklarında kullanılmaktadır [12, 13].

İğde bitkisi flavonoid bileşikler, polisakkaritler, sitosteroller, karotenoidler, kardiyak glikozitler, terpenoidler, kumarinler, fenol karboksilik asitler, aminoasitler, saponinler, karotenoidler, vitaminler ve tanenleri içermektedir. İğde meyveleri proteinler, şekerler, vitaminler (tokoferol, C vitamini, karoten, thiamine B1) ve mineraller (kalsiyum, magnezyum, potasyum (8504 mg/kg), sodyum (1731 mg/kg), fosfor (635 mg/kg), demir ve manganez) ve linoleik asit, palmitoleik asit, palmitik asit, fosfolipitler, glikolipitler ve beta-sitosterol gibi bileşiklerce zengindir [6, 14, 15, 16]. Kök, kök kabuğu, dalları, gövde kabuğu ve yaprakları ise demir, kurşun, bakır, kadmiyum, çinko, krom, nikel ve kobalt içermektedir [6, 7]. Yapılan bir çalışmada iğde meyve yağının sabunlaşmayan kısmında 9.8 mg/100 g karotenoid ve 36.5 mg/100 g tokoferol içerdiğini tespit etmişlerdir [17]. GC-MS ile yapılan analizlerde C16-C34 alkanlar, steroidler ve tokoferollerine içine alan yaklaşık 50 sabunlaşmayan bileşik teşhis edilmiştir [17]. Genotip, iklim şartları ve toprak kompozisyonu farklılıkları bileşimde farklılıklara sebep olmakla birlikte *E. angustifolia* meyvelerinde laurik, tridekanoik, miristik, pentadekanoik, palmitik (%34.31), palmitoleik, heptadekanoik, linoleik, linolenik, oleik (%26.23), lignoserik (%17.47), stearik, eikosanoik ve dokosanoik asitlerin varlığı tespit edilmiştir. Meyve kabuğunda ise palmitoleik asidin bolluğu ve tohumlardaki linoleik ve palmitik asidin yüksek miktarı da rapor edilmiştir [16, 18]. Yapılan bir çalışmada iğde meyvelerinin önemli elementleri, polifenolik içerikleri ve antioksidan kapasiteleri araştırılmıştır [9]. Başka bir çalışmada ise kurutulmuş iğde meyvesi ununun zengin besinsel içeriği sebebiyle fonksiyonel bir bileşik olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür [19]. İğdenin çeşitli kısımlarının yüksek biyoaktif içeriği ile birlikte önemli biyolojik aktivitelere sahip oldukları belirtilmiştir [20]. Bununla birlikte, bitkinin meyvesinin çeşitli ürünlere katılarak ürünlerin farklı yönlerden desteklenmesi çalışmaları da gerçekleştirilmiştir [19, 21]. Yapılan bir çalışmada iğdenin çiçek ve yapraklarının yüksek miktarda fenolik ve flavonoid bileşikleri içerdiğini belirlemişlerdir [7]. Bir diğer çalışma ise iğde meyvesinin ve tohumunun yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuştur [22]. Son çalışmalar iğdenin antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antikanser özelliklerine işaret etmektedir [6]. Ayrıca, iğdenin meyve polifenollerinin konsantrasyonuyla üretilen pshatin adı verilen bir ilaç, uzun yıllar Ermenistan'da kolit ve diğer GI sistem hastalıklarının tedavisi için kullanılmıştır [10].

İğdenin farklı kısımlarının kompozisyonlarının araştırıldığı çalışmalara literatürde sıkça rastlanmaktadır [6, 7, 9, 20]. Ancak iğdenin özellikle sindirim enzimlerinin inhibisyonu yoluyla antidiyabetik aktivite sergilediğine dair veriler birkaç çalışma ile sınırlı bulunmaktadır [23]. Türkiye'nin birçok yerinde doğal olarak yetişen ve

iğdenin meyve, yaprak veya diğer kısımlarının kullanım alanlarının tarım ve gıda endüstrisinde sınırlı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bu değerli bitkinin değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir. Dolayısıyla bu çalışmada, önemli biyoaktif içeriğe sahip iğde meyve ve yapraklarının in vitro tekniklerle antioksidan aktivite ve antidiyabetik aktivitelerinin belirlenmesi ve karşılaştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bitki Materyali

E. angustifolia'nın yaprak ve meyveleri 2019 yılında meyve hasat döneminde (Eylül ayı) Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi bahçesinde yer alan tek bir iğde ağacından toplanmıştır. Toplanan meyve ve yapraklara herhangi bir kurutma işlemi uygulanmadan ve meyvenin kabuk kısmı geri kalanından çıkarılmayarak çekirdeksiz taze halde analiz edilmiştir. Örnekler analizler gerçekleştirilene kadar kilitli poşetlerde -18°C'de muhafaza edilmiştir.

Kimyasallar

Kimyasallar analitik standartta olup temin edildikleri yer ve kodları şöyledir: Folin (1.09001.0500 Merck, Almanya), gallik asit (G7384 Sigma-Aldrich, Almanya), DPPH (D9132 Sigma-Aldrich), Trolox (238813 Sigma-Aldrich, Danimarka), ABTS (A1888 Sigma-Aldrich, Çin), quercetin (Q4951 Sigma-Aldrich, Almanya), L-glutatione (G4251 Sigma-Aldrich, Japonya), 4-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside (N1377 Sigma-Aldrich, İsviçre), α -glukozidaz from *S.cerevisiae* (G0660 Sigma-Aldrich, Almanya), tannik asit (T0125 Sigma, Almanya), epikateşin (E1753 Sigma-Aldrich, ABD), α -amilaz (A3176-1MU Sigma, ABD), 3,5-dinitrosalisilik asit (D0550-25G Sigma, Hindistan), tris (hydroxymethyl)aminomenhane (1.08387.0500 Merck, Germany), triton (93427-6X10mL, Merck, İsviçre), lipaz (L3126 Sigma-Aldrich, ABD).

Ekstraktların Hazırlanması

10' ar gram taze iğde meyve ve yaprağı bir havan yardımıyla tamamen homojen bir hale geldiğinden emin oluncaya kadar ayrı ayrı homojenize edilerek, 100 mL metanol-su (%50-50) ile 40°C'de çalkalamalı su banyosunda (NÜVE ST30, Türkiye) 30 dakika boyunca ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Hidroalkolik ekstraktlar filtre kağıdından (Whatman no:1) süzülerek analizleri gerçekleştirinceye kadar -18°C'de muhafaza edilmiştir [24].

Toplam Fenolik İçeriği

Ekstraktların toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak belirlenmiştir [25, 26]. Folin-Ciocalteu reaktifi distile su ile 10 kat seyreltilerek 2 mL reaksiyon tüplerine alınmıştır. Üzerine uygun oranlarda seyreltilen ekstraktlardan 0.1 mL eklenmiştir. Daha sonra 1.6 mL %7.5' lik Na₂CO₃ çözeltisi eklenerek analiz tüpleri karıştırılmış ve reaksiyonun gerçekleşmesi için 1 saat karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

Kör çözelti için örnekle aynı miktarda distile su kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda 765 nm de spektrofotometrede (SHIMADZU UV 1800, Japonya) örneklerin absorbans okumaları gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar mg gallik asit eşdeğeri/g yaş ağırlık olarak verilmiştir.

Toplam Flavonoid İçeriği

Toplam flavonoid miktarı spektrofotometrik yöntem kullanılarak belirlenmiştir [27]. 4 mL distile su reaksiyon tüplerine alınmış ve üzerlerine seyreltilmiş örneklerden 1 mL eklenmiştir. 0.3 mL %5' luk NaNO₂ çözeltisinin eklenmesinin ardından 5 dakika inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Ardından tüplere 0.3 mL %10' luk AlCl₃ çözeltisi eklenmiş ve 1 dakika sonra 1 mL 1M NaOH çözeltisi eklenerek son hacim 10 mL ye distile su ile tamamlanmıştır. Kör çözelti için 1 mL distile su kullanılmıştır. Reaksiyon tüplerindeki örneklerinin absorbans okumaları 510 nm'de spektrofotometrede gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar hazırlanan kateşin standartları ile çizilen kalibrasyon eğrisinden faydalanılarak mg kateşin eşdeğeri/g yaş ağırlık olarak belirtilmiştir.

Antioksidan Aktivite Tayinleri

DPPH serbest radikali kullanılarak antiradikal aktivite tayini gerçekleştirilmiştir [28]. 6.25 mg DPPH tartılarak 250 mL metanolde çözündürülmüştür. Hazırlanan radikal çözeltiden 3.9 mL tüplere alınmış ve üzerine seyreltilen ekstraktlardan 0.1 mL eklenmiştir. Tüpler karıştırılarak reaksiyonun gerçekleşmesi için 30 dakika karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Kontrol örnekleri için ekstrakt yerine 0.1 mL distile su, kör çözelti için ise metanol kullanılmıştır. Süre sonunda 515 nm de spektrofotometrede örneklerin okumaları gerçekleştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Trolox standardına karşılık inhibisyon eğrisi çizilerek elde edilen lineer denklemden faydalanılarak sonuçlar mg Trolox eşdeğeri/g yaş ağırlık olarak belirtilmiştir.

ABTS radikali kullanılarak gerçekleştirilen antioksidan aktivite tayininde de spektrofotometrik metot kullanılmıştır [29]. 12.25 mM K₂S₂O₈ ile 12-16 saat karanlıkta inkübe edilerek hazırlanan ABTS radikal çözeltisi, tuzlu fosfat tamponu (PBS) ile 734 nm de 0.68-0.72 abs verecek şekilde seyreltilmiştir. Seyreltilmiş radikalden 2 mL alınarak mikroküvete aktarılmış ve üzerine yine PBS ile seyreltilmiş ekstraktlardan 20 μ L eklenmiştir. Kontrol örnekleri için 20 μ L PBS kullanılmıştır. 6 dakika karanlıkta inkübasyonun ardından spektrofotometrede 734 nm de örneklerin absorbans okumaları gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Trolox standardına karşılık çizilen inhibisyon eğrisinden faydalanılarak mg Trolox eşdeğeri/g yaş ağırlık olarak ifade edilmiştir.

Kondense Tanen ve Toplam Hidroliz Olabilen Tanen İçeriği

iğde taze meyve ve yapraklarının metanol-su karışımı ile alınan ekstraktlarında kondense tanen analizi gerçekleştirilerek epikateşin eşdeğeri cinsinden

hesaplanmıştır [30]. Bunun için 5 mL seyreltilmiş ekstrakt alınarak azot akımı altında çözücü uzaklaştırılmış ve 5 mL metanol eklenmiştir. Hazırlanan bu ekstraktan 1 mL alınarak üzerine %1' lik vanillin çözeltisinden 2.5 mL eklenmiştir. Daha sonra metanolde hazırlanan %25'lik H₂SO₄ çözeltisinden 2.5 mL eklenerek reaksiyon tüpleri 30°C'de 15 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda örneklerin absorbansları spektrofotometrede 500 nm'de okunmuştur. Kör çözelti için ekstrakt yerine aynı miktarda metanol kullanılmıştır.

Toplam hidroliz olabilen tanen miktarının belirlenmesi için seyreltilmiş ekstraktlardan 1 mL alınarak üzerine 5 mL %2.5'lik KIO₃ çözeltisi eklenmiştir. 25°C'de 2 dk inkübasyonun ardından spektrofotometrede 550 nm de absorbans okuması yapılmıştır. Kör çözeltilerin hazırlanması için ekstrakt yerine aynı miktarda saf su kullanılmış ve sonuçlar tannik asit eşdeğeri cinsinden verilmiştir [31].

Alfa Glukozidaz İnhibisyon Aktivitesi

Ekstraktların α-glukozidaz inhibisyon aktiviteleri spektrofotometrik bir yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar IC50 olarak ifade edilmiştir [4].

37°C'de ve 6.8 pH'da gerçekleştirilen inhibisyon aktivite tayini için belirli konsantrasyonlarda seyreltilen ekstraktlardan 50 µL alınarak üzerine 67 mM potasyum fosfat tamponundan (pH 6.8) 1250 µL eklenmiştir. Ardından 50 µL 0.4 ünite/mL konsantrasyonlu soğuk tamponda hazırlanan α-glukozidaz enzim çözeltisi eklenmiştir. Üzerine 125 µL 10 mM p-nitrofenil α-D-glukozit eklendikten sonra reaksiyon tüpleri 37°C'de 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 100 mM sodyum karbonat çözeltisinden 2 mL eklenerek reaksiyon durdurulmuş ve 400 nm de spektrofotometrede örneklerin absorbans değerleri okunmuştur. Kontrol örneği için 50 µL, kör için ise 100 µL deiyonize su kullanılmıştır. Ayrıca kör örneği için enzim kullanılmamıştır. Enzimin %50'sini inhibe eden meyve ve yaprak konsantrasyonu IC50 olarak ifade edilmiştir.

Alfa Amilaz İnhibisyon Aktivitesi

Alfa-amilaz inhibisyon aktivitesi denemesi sonrası enzimin %50'sini inhibe eden miktar IC50 olarak ifade edilmiştir [4].

Seyreltilmiş iğde meyve ve yaprak ekstratlarından 0.25 mL reaksiyon ortamına alınarak üzerine %1 lik nişasta solüsyonundan 0.25 mL eklenmiştir. 1 ünite/mL konsantrasyonlu α-amilaz solüsyonundan 0.25 mL eklenerek 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından renk solüsyonundan (sodyum potasyum tartarat ve 3.5-dinitrosalisilik asit solüsyonları ile hazırlanan) 0.25 mL eklendikten ve 15 dakika kaynayan su banyosunda bekletildikten sonra örnek tüpleri oda sıcaklığına soğutulmuştur. 3 mL distile suyun eklenmesinin ardından 540 nm'de spektrofotometrede absorbans okumaları gerçekleştirilmiştir.

Lipaz İnhibisyonu Aktivitesi

Örneklerin lipaz inhibisyon aktivite değerlendirmeleri spektrofotometrik yöntem kullanılarak test edilmiştir [4]. 100 mM tris tampon çözeltisinden (pH=8.2) 800 µL reaksiyon tüplerine alınarak üzerine 300 µL tampon çözeltide hazırlanan enzim çözeltisi (10 mg/mL) eklenmiştir. Daha sonra seyreltilmiş ekstraktan 100 µL, substrattan (%0.03'lük p-nitrofenil-laurat) 800 µL eklenerek reaksiyon tüpleri 37°C'deki su banyosuna yerleştirilerek 2 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda 400 nm'de spektrofotometrede örneklerin absorbans okumaları gerçekleştirilmiştir. Kontrol örneği için ekstrakt yerine aynı miktarda saf su, pozitif kontrol için orlistat kullanılmıştır. Kör örnekleri için ise enzim çözeltisi kullanılmamıştır.

İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi SPSS 22 paket programı (SPSS Inc., Şikago, IL, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerin tüm verileri Student t testine tabi tutularak ortalamalar arasındaki fark p<0.05 anlamlılık düzeyinde belirlenmiştir.

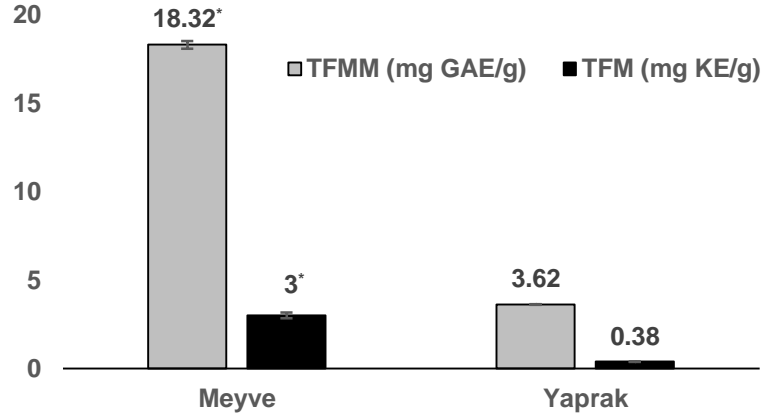
BULGULAR VE TARTIŞMA

Toplam Fenolik (TFMM) ve Toplam Flavonoid (TFM) Madde Miktarları

Metanol:su (1:1) ile ekstrakte edilen iğde meyve ve yapraklarının toplam fenolik ve toplam flavonoid sonuçları incelendiğinde iğde meyvelerinin TFMM (18.32 mg GAE/g) ve TFM (3.00 mg KE/g) değerlerinin yaprak değerlerine göre anlamlı (p<0.05) şekilde daha yüksek olduğu (Şekil 1) belirlenmiştir. Birçok fenolik ve flavonoid maddeler bitkilerin yaprak, meyve, çiçek ve tohumları gibi çeşitli kısımlarında bulunarak biyoaktif özelliklerine katkıda bulunurlar. İkincil metabolitler olarak bilinen bu biyoaktif özellikli bileşikler alkaloidler, flavonoidler, tanenler ve saponinleri de içine alan ve bitkinin savunma mekanizması sonucu üretilen metabolitlerdir [32]. İklim, toprak ve yükselti gibi ekolojik şartlar bitkilerin ikincil metaboliti olan fenolik maddelerin içeriğini etkilemektedir. Ayrıca, bitkilerin tür içi farklılıkları hatta varyeteleri incelendiğinde de farklı seviyelerde biyoaktif içerik ve miktara sahip oldukları bilinmektedir. İki farklı türdeki (Mashhad ve Fariman) iğde yapraklarının fizikokimyasal özelliklerinin belirlendiği bir çalışmada etanolik ve metanolik ekstraktlarının TFMM ve TFM değerleri sırasıyla 10.91 (Fariman)-7.78 (Mashhad) mg GAE/100 g ve 5.80 (Fariman) -3.34 (Mashhad) mg QE/100 g olarak tespit edilmiştir [7]. Benzer şekilde kurutulmuş formdaki iğde yapraklarının metanol (%70) ile ekstraktlarının hazırlandığı bir çalışmada ise TFMM ve TFM değerleri sırasıyla 82.64 mg GAE/g ve 33.24 mg RUE/g olarak belirlenmiştir [33]. Bir diğer çalışmada iğde meyvesinin pulp ve kabuk kısımlarının su, aseton ve metanol ile ayrı ayrı ekstraktlarının alınması sonucu 558.52 mg GAE/100 g TFMM değeri ile sulu ekstraksiyonun test edilen numuneler için metanol ve aseton ekstraksiyon prosedürlerine kıyasla antioksidan kapasiteyi ve toplam fenolikleri belirleme konusunda çok daha efektif olduğu tespit edilmiştir [9]. Bununla birlikte,

önceki çalışmalar incelendiğinde fenolik içeriğinin bitkinin farklı bölümleri arasında bile anlamlı şekilde değişebileceği belirtilmiştir [34, 35]. Yapılan çalışmalar elde edilen veriler ile karşılaştırıldığında sonuçlar arasında önemli varyasyonlar görülmektedir. Bitkinin kuru veya yaş formda olması, kullanılan solventin türü, sonuçların verildiği eşdeğer fenolik bileşik ve ekstraksiyon koşulları gibi parametrelere bağlı olarak sonuçlarda varyasyonlar oluşabilmektedir. Bununla

birlikte, bu bileşiklerin kimyasal yapıları ve ekstraksiyona olan hassasiyetleri değişken olduğundan farklı solvent ekstraksiyonları farklı tipte bileşiklerin ekstrakte edilmesini sağlayacaktır. Yapılan çalışmalarda, böylesi alkolle elde edilen ekstraksiyonların bu tür bileşiklerin ekstrakte edilmesini sağlayarak daha fazla antioksidan özelliğın ortaya çıkmasına katkı sağlayacağı belirtilmektedir [36].

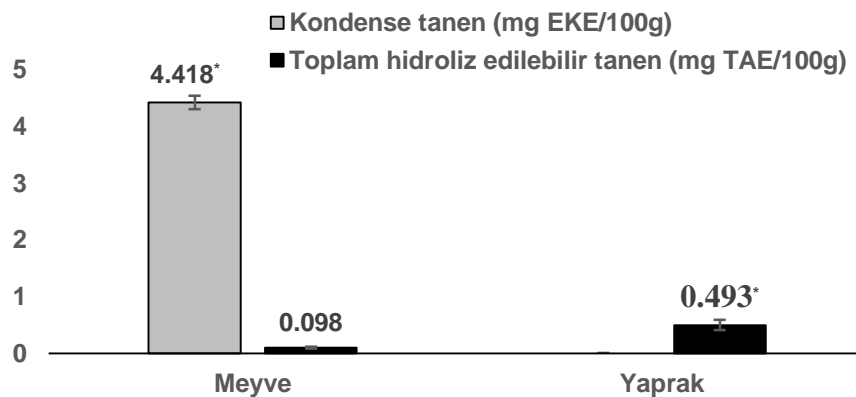


Şekil 1. İğde meyve ve yapraklarının toplam fenolik ve toplam flavonoid içerikleri (¹GAE: gallik asit eşdeğeri, KE: kateşin eşdeğeri, ²Şekil üzerinde gösterilen veriler analiz sonuçlarını, hata barları ise standart sapmayı ifade etmektedir. Meyve ve yaprak verileri arasındaki anlamlı fark Student t testi ile değerlendirilmiş ve şekil üzerinde "*" işareti ile belirtilmiştir.)

Kondense ve Hidroliz Olabilen Tanen Miktarları

İğdenin biyolojik özelliklerine katkı sağlayan aktif bileşiklerden bir diğeri de tanenlerdir. Tanenler hidroliz olabilen ve kondense tanen olarak iki grupta incelenmektedir. Hidroliz olabilen tanenler gallik asitin ve heksahidroksi difenik asitin esterlerinden meydana gelirken, kondense tanenler polihidroksi flavan-3-ol türevleridir [31]. İğde meyve ve yapraklarının tanen

sonuçları incelendiğinde meyvedeki kondense tanen içeriğinin yaprağa göre yüksek olduğu hatta yaprakta tespit edilemediği, hidroliz olabilen tanen içeriğinin ise yaprakta daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 2). Elde edilen toplam fenolik, flavonoid ve tanen içeriği sonuçları da göz önüne alındığında iğde meyve ve yapraklarının daha çok fenolik asitlerce zengin olduğu sonucuna varılabilir.

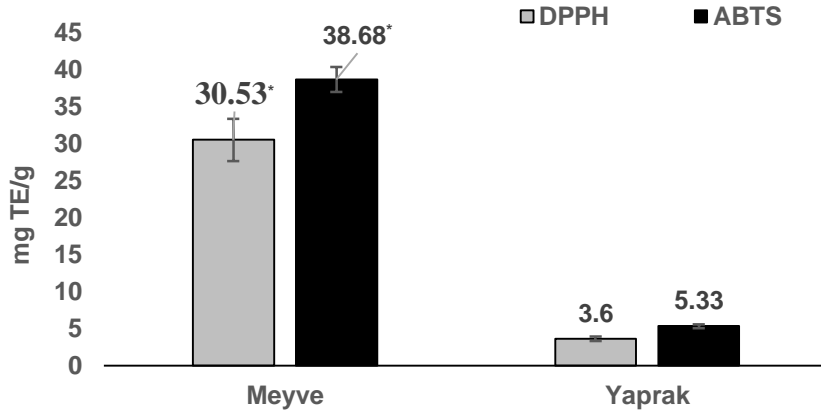


Şekil 2. İğde meyve ve yapraklarının kondense tanen ve toplam hidroliz edilebilir tanen içerikleri (¹EKE: (-) epikateşin eşdeğeri, TAE: tannik asit eşdeğeri, ²Şekil üzerinde verilen değerler ortalama \pm standart sapmayı ifade etmektedir. Meyve ve yaprak verileri arasındaki anlamlı fark Student t testi ile değerlendirilmiş ve fark şekil üzerinde "*" işareti ile belirtilmiştir.)

Antioksidan Aktivite Değerleri

Bitkiler içerdikleri aktif bileşikler sayesinde birçok biyoaktif özellikler sergilemektedir. Bu bileşiklerden olan fenolik bileşikler sahip oldukları hidroksil grupları sebebiyle elektron ve serbest radikal süpürücü aktivite veya hidrojen atomu verme özelliğine sahiptir. Dolayısıyla, fenolik bileşikler antioksidan aktiviteye doğrudan katkı sağlayabilir [37]. Bu çalışmada bitkilerin antioksidan aktivitelerini belirlemede yaygın olarak kullanılan yöntemlerden ikisi olan DPPH ve ABTS metotları örneklerin antioksidan aktivitelerini tayin etmek amacıyla kullanılmıştır. DPPH metodu radikal süpürücü aktivitenin belirlenmesinde basit, hızlı ve stabil bir yöntem iken [28], ABTS metodu hem lipofilik hem de hidrofilik antioksidan bileşiklerin aktivitesini belirlemede etkin bir yöntemdir [29]. Hem ABTS hem de DPPH metotlarından elde edilen antioksidan aktivite sonuçları değerlendirildiğinde aynı bitkinin farklı kısımlarının ekstraktları için önemli ölçüde farklı antioksidan etkiler gözlemlenmiştir ($p < 0.05$). Buna göre meyve ekstraktlarının yaprak ekstraktlarından daha yüksek aktivite sergilediği görülmektedir (Şekil 3). Fenolik maddelerin iğdenin yaprağından çok meyvesinde yoğunlaşması sebebiyle daha güçlü antioksidan aktivite sergilemesine katkı sağlamıştır. Ancak her zaman antioksidan aktivite ve toplam fenolik içeriği arasında pozitif bir korelasyon tespit edilmeyebilir. Bitkinin antioksidan aktivitesine katkı sağlayan sadece fenolik bileşikler değildir. Bununla birlikte, tokoferoller, pigmentler, C vitamini, karotenoidler ve flavonoidler de

antioksidan aktiviteden sorumludur [38, 39]. İğdenin farklı bölümlerinin antioksidan aktivite değerlerinin incelendiği bir çalışmada, bitkinin yaprak kısmının ekstraktlarının antioksidan aktivite değerleri 0.385-1.955 $\mu\text{g TE/g}$ (ABTS) ve 0.713-1.620 $\mu\text{g TE/g}$ (DPPH) olarak tespit edilirken, meyve kısmının aktivitesi 0.031-4.642 $\mu\text{g TE/g}$ (ABTS) ve 1.109-4.450 $\mu\text{g TE/g}$ (DPPH) olarak belirlenmiştir [20]. Çalışmamızdaki antioksidan aktivite sonuçları yaprak değerlerinin meyve değerlerinden düşük bulunması açısından bu çalışmanın bulguları ile uyumludur. Ancak, tespit ettiği değerler bizim sonuçlarımızdan oldukça düşük görünmektedir. Bu farklılık ekstraksiyon koşulları ve bitki materyalinin fiziki durumundan kaynaklanmaktadır. Ayrıca iğde meyvesinin dış kabuğunun ayrılmadan ekstraksiyon işlemine dahil edilmesi ile de antioksidan aktiviteye ayrıca katkı sağlayacağı öngörülmektedir. Sonuç olarak meyvenin antioksidan kapasitesi kullanılan antioksidan aktivite yöntemine bakılmaksızın her durumda yaprağından daha üstün bulunmuştur. Diğer yandan, antioksidan aktiviteden sorumlu fonksiyonel gruplar bitkinin farklı kısımlarında çeşitli oranlarda bulunabilmektedir. Bu durum için türlerdeki popülasyon varyasyonları ve bitkinin farklı kısımlarının ışığa erişilebilirlik derecelerinin farklı olmaları gibi çeşitli faktörler vardır. Ek olarak, fonksiyonel grupların aynı yönenin farklı bölgelerinde yetişen aynı bitki kısımlarındaki dağılımı bile farklı olabilir. Dolayısıyla, fenolik bileşiklerin miktarı ve aktivitesi olgunluk derecesine ve ışık alma durumuna da bağlıdır [40].



Şekil 3. İğde meyve ve yapraklarının antioksidan aktivite değerleri (¹TE: Trolox eşdeğeri, ²Şekil üzerinde gösterilen veriler analiz sonuçlarını, hata barları ise standart sapmayı ifade etmektedir. Meyve ve yaprak verileri arasındaki anlamlı fark Student t testi ile değerlendirilmiş ve şekil üzerinde “*” işareti ile belirtilmiştir.)

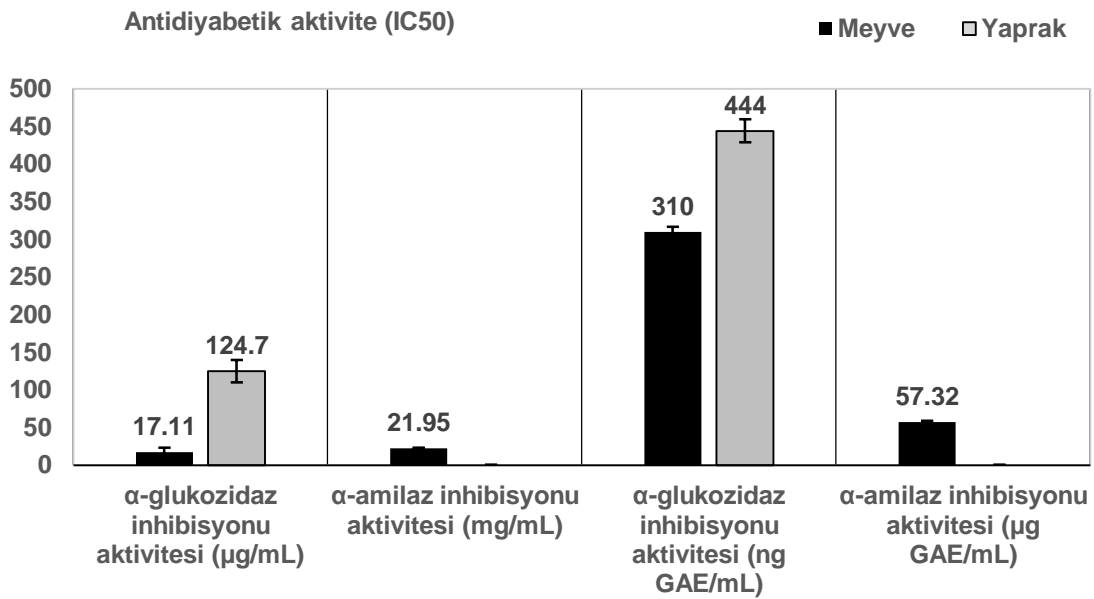
Antidiyabetik Aktivite Değerleri

Bitkiler ve ürünleri dünya çapında yaygın hastalıkların önlenmesi veya tedavisi için yeni bir çağ açmaktadır. Bu nedenle *E. angustifolia* L.'nin tip 2 diyabet rahatsızlığında önemli olan α -glukozidaz ve α -amilaz enzimleri üzerine inhibe edici etkileri bu çalışmada değerlendirilmiştir. Bu amaçla iğdenin taze meyve ve yapraklarından metanol:su ekstraktları hazırlanarak α -glukozidaz ve α -amilaz enzimleri üzerindeki inhibe edici

etkileri belirlenmiştir. Test edilen ekstraktların enzim inhibisyon potansiyelleri, IC50 değeri olarak ifade edilmiştir. IC50 deneyde kullanılan ekstraktların enzim aktivitesini %50 oranında inhibe ettiği standart veya numune ekstraktlarının konsantrasyonunu belirtmektedir. Bir test örneğinin düşük IC50 değeri daha yüksek inhibisyon aktivitesine sahip olduğunu işaret etmektedir [4]. Ekstraktların α -glukozidaz ve α -amilaz enzimlerini inhibe ettikleri değerler Şekil 4'te verilmiştir. Ekstraktların IC50 değerleri hem meyve ve yaprak

miktarı hem de içerdiği fenolik miktarına eşdeğer olarak verilmiştir. Alfa-glukozidaz enzimini üzerinde meyve ekstratlarının kayda değer inhibe etme potansiyelinin olduğu ve bunun aksine yaprakların α -amilaz enzimine karşı inhibitör aktivite sergilemediği görülmektedir. İğdenin sergilediği bu antidiyabetik özellik sahip olduğu fenolik bileşiklerin hidroksil gruplarına atfedilebilir. İki farklı ekstraksiyon yönteminin (Soxhlet ve ASE) kullanıldığı bir çalışmada metanol ile ekstrakte edilen iğde yaprağının α -glukozidaz inhibisyon aktivitesi doza bağlı olarak (10-50 μ L) %35-65 aralığında bulunurken, α -amilaz inhibisyon aktivitesi %26-40 olarak belirlenmiştir [23]. Bu sonuç çalışmamızla karşılaştırıldığında, yapraklarda α -amilaz inhibisyon etkisinin bulunmaması yönünden farklılaşmaktadır. Bunun nedeni olarak ekstraksiyon metotlarının farklılığı ve kullanılan solvent ve materyalin fiziki durumu

(kurutulmamış olması) gibi çeşitli faktörler gösterilebilir. Ancak, bulgularımız bitki fenolik asitlerinin hafif α -amilaz inhibitörleri ve güçlü α -glukozidaz inhibitörleri olduğu iddiaları ile uyumludur. İğdenin α -glukozidaz ve α -amilaz inhibe edici etkilerinin yanı sıra lipaz inhibisyon aktivitesi de test edilmiştir. Ancak, iğdenin hem meyve hem de yapraklarının belirtilen ekstraksiyon koşulları altında lipaz inhibisyon aktivitesi göstermediği belirlenmiştir. Bunun nedeni olarak ise, meyve ve yaprağın zaten lipaz inhibe edici özelliğinin olmaması veya bizim kullandığımız ekstraksiyon yönteminin eğer mevcutsa lipaz inhibe edici bileşikleri ekstrakte edememiş olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Literatürde *E. angustifolia*'nın in vitro yöntemlerle antidiyabetik ve antiobezite aktivitesi ile ilgili başka bir bulguya rastlanılmamıştır.



Şekil 4. İğde meyve ve yapraklarının α -glukozidaz ve α -amilaz inhibisyon aktivite değerleri (¹IC50: enzimin aktivitesini %50 oranında inhibe eden miktar (Şeklin ilk iki sütunundaki değerler iğde yaş ağırlığı, son iki sütunundaki değerler ise iğdenin fenolik miktarına eşdeğer cinsinden verilmiştir). ²Şekil üzerinde verilen değerler ortalama±standart sapmayı ifade etmektedir. Meyve ve yaprak verileri arasındaki anlamlı fark Student t testi ile değerlendirilmiştir ve fark şekil üzerinde “*” işareti ile belirtilmiştir.)

SONUÇ

E. angustifolia L.'nin farklı kısımlarının (meyve ve yaprak) fenolik içerikleri, antioksidan aktivite ve antidiyabetik özelliklerinin incelendiği bu çalışmada iğde meyvesinin yaprağına göre fenolik bileşenlerce zengin olduğu ve bu özelliğinin antioksidan ve antidiyabetik aktivitesine de yansıdığı görülmüştür. Literatür verileri incelendiğinde de görülmüştür ki aslında güçlü fenolik içerik güçlü antioksidan aktiviteye işaret etmektedir. Ayrıca bitkinin farklı kısımlarında baskın olan fenolik profilinin değişmesi de bu aktiviteler üzerinde önemli etkiye sahip olacaktır. İğde meyvesinin, zengin ve faydalı besin kompozisyonlarına dayanan değerli bir bahçe ürünü olduğu oldukça fazla yapılan bileşim analizleri neticesinde önceki çalışmalarda ortaya konulmuştur. Ancak iğde meyve ve yaprağının özellikle tanen içeriğinin ve antidiyabetik potansiyelinin

karşılaştırıldığı bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Türk Halk Tıbbında *Elaeagnus angustifolia* yapraklarının diyabet üzerine olumlu etkiler gösterebileceğini iddia eden bilgiler mevcuttur. Ancak bu geleneksel kullanımın doğruluğu *in vitro* ve *in vivo* denemeler ile test edilerek ispatlanmalıdır. Bununla birlikte iğdenin antidiyabetik özelliklerinin test edildiği *in vitro* çalışma sayısı oldukça sınırlı olup, bu çalışmaların farklı koşullar altında gerçekleştirilerek literatüre kazandırılması önem az etmektedir. Sağlıklı gıdalara olan tüketici talebinin artmasına paralel olarak geliştirilen fonksiyonel ürünlere yenilerinin eklenmesiyle kullanımı sınırlı fakat değerli içeriğe sahip materyallerden elde edilecek olan bu bileşenler gıda sektöründe giderek daha da fazla kullanılacaktır.

Antioksidan ve enzim inhibitör aktivitelerin bitkinin farklı bölümlerine göre değiştiği ve bitkinin ürettiği olduğu

fenolik ve uçucu bileşikler gibi metabolitlerinin bitkinin bölümlerine göre farklılaşması sonucu tanımlanan bileşiklerin biyolojik rollerini değiştirdiği bilinmektedir. Bu çalışma, iğde meyvesinin α -amilaz ve α -glukozidaz, yaprağının ise α -glukozidaz enzimini inhibe edici özellikleri olduğunu göstermiştir. Bundan sonraki çalışmalar, bu bileşiklerin bireysel olarak α -amilaz ve α -glukozidaz enzimleri üzerine etkisini belirleyecek şekilde dizayn edilebilir.

KAYNAKLAR

- [1] McCune, L.M., Johns, T. (2002). Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the indigenous peoples of the North American boreal forest. *Journal Ethnopharmacology*, 82(2-3), 197-205.
- [2] Sarıkaya, S., Öner, H., Harput, U.Ş. (2010). Türkiye florasında diyabet tedavisinde kullanılan tıbbi bitkiler. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 39, 317-342.
- [3] Büyükbacı, A., El, S.N. (2008). Determination of in vitro antidiabetic effects, antioxidant activities and phenol contents of some herbal teas. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63, 27-33.
- [4] McDougall, G.J., Shpiro, F., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., Stewart, D. (2005). Different polyphenolic components of soft fruits inhibit α -amylase and α -glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2760-2766.
- [5] Matsui, T., Ueda, T., Oki, T., Sugita, K., Terahara, N., Matsumoto, K. (2001). Alpha-glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins 1: Survey of natural pigments with potent inhibitory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1948-51.
- [6] Hamidpour, R., Hamidpour, S., Hamidpour, M., Shahlari, M., Sohraby, M., Shahlari, N., Hamidpour, R. (2016). Russian olive (*Elaeagnus angustifolia* L.): From a variety of traditional medicinal applications to its novel roles as active antioxidant, anti-inflammatory, anti-mutagenic and analgesic agent. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7(1), 24-29.
- [7] Saboonchian, F., Jamei, R., Hosseini, S.S. (2014). Phenolic and flavonoid content of *Elaeagnus angustifolia* L. (leaf and flower). *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 4, 231-8.
- [8] Hassanzadeh, Z., Hassanpour, H. (2018). Evaluation of physicochemical characteristics and antioxidant properties of *Elaeagnus angustifolia* L. *Scientia Horticulturae*, 238, 83-90.
- [9] Cansev, A., Sahan, Y., Celik, G., Taskesen, S., Ozbey, H. (2011). Chemical properties and antioxidant capacity of *Elaeagnus angustifolia* L. fruits. *Asian Journal of Chemistry*, 23, 2661-2665.
- [10] Abizov, E.A., Tolkachev, O.N., Mal'tsev, S.D., Abizova, E.V. (2008). Composition of biologically active substances isolated from the fruits of Russian olive (*Elaeagnus angustifolia*) introduced in the European part of Russia. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 42, 696-698.
- [11] Ahmadiani, A., Hosseiny, J., Semnianian, S., Javan, M., Saeedi, F., Kamalinejad, M., Saremi, S. (2000). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Elaeagnus angustifolia* fruit extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 72, 287-292.
- [12] Ayaz, F.A., Bertoft, E. (2001). Sugar and phenolic acid composition of stored commercial oleaster fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14(5), 505-511.
- [13] Gürbüz, I., Üstün, O., Yesilada, E., Sezik, E., Kutsal, O. (2003). Anti-ulcerogenic activity of some plants used as folk remedy in Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 88(1), 93-97.
- [14] Goncharova, N.P., Plugar', V.N., Rashkes, Y.V., Isamukhamedov, A.S., Glushenkova, A.I. (1995). Oxygenated fatty acids of the seeds of *Elaeagnus angustifolia*. *Chemistry of Natural Compounds*, 30(6), 661-665.
- [15] Okmen, G., Turkcan, O. (2014). A study on antimicrobial, antioxidant and antimutagenic activities of *Elaeagnus angustifolia* L. leaves. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 11, 116-120.
- [16] Sahan, Y., Gocmen, D., Cansev, A., Celik, G., Aydin, E., Dundar, A.N., Dulger, D., Kaplan, H.B., Kilci, A., Gucer, S. (2015). Chemical and techno-functional properties of flours from peeled and unpeeled oleaster (*Elaeagnus angustifolia* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 88, 34-41.
- [17] Bekker, N.P., Glushenkova, A.I. (2001). Components of certain species of the Elaeagnaceae family. *Chemistry of Natural Compounds*, 37, 97-116.
- [18] Yıldırım, I., Gökçe, Z., Yılmaz, Ö. (2015). The investigation of biochemical content of *Elaeagnus angustifolia*. *Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry*, 2(1), 34-41.
- [19] Sahan, Y., Dundar, A.N., Aydin, E., Kilci, A., Dulger, D., Kaplan, F.B., Gocmen, D., Celik, G. (2013). Characteristics of cookies supplemented with oleaster (*Elaeagnus angustifolia* L.) flour. I Physicochemical, sensorial and textural properties. *Journal of Agricultural Science*, 5, 160-168.
- [20] Incilay, G. (2014). Volatile composition, antimicrobial and antioxidant properties of different parts from *Elaeagnus angustifolia* L. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 17, 1187-1202.
- [21] Çakmakçı, S., Topdaş, E.F., Kalin, P., Han, H., Şekerci, P., Köse, L., Gülçin, I. (2015). Antioxidant capacity and functionality of oleaster (*Elaeagnus angustifolia* L.) flour and crust in a new kind of fruity ice cream. *International Journal of Food Science and Technology*, 50, 472-481.
- [22] Wang, Y., Guo, T., Li, J., Zhou, S., Zhao, P. (2012). Four flavonoid glycosides from the pulps of *Elaeagnus angustifolia* and their antioxidant activities, in: *Proceedings of the 2012 2nd International Conference on Computer and Information Applications (ICCIA 2012)*. Atlantis Press, Paris, France.
- [23] Saltan, F.Z., Okutucu, B., Canbay, H.S., Ozel, D. (2017). In vitro α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory effects in *Elaeagnus angustifolia* leaves extracts. *Eurasian Journal of Analytical*

- Chemistry*, 12, 117-126.
- [24] Yalcin, G., Sogut, O. (2014). Antioxidant capacity of *Elaeagnus angustifolia* L. and investigation of eosin y as the fluorescent probe in ORAC method. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 12(2), 51-54.
- [25] Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96, 254-260.
- [26] Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- [27] Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555-559.
- [28] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 28, 25-30.
- [29] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(98), 1231-1237.
- [30] Sun, B., Ricardo-da-Silva, J.M., Spranger, I. (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4267-4274.
- [31] Willis, R.B., Allen, P.R. (1998). Improved method for measuring hydrolyzable tannins using potassium iodate. *Analyst*, 123, 435-439.
- [32] Kliebenstein, D.J. (2004). Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinged glasses. *Plant, Cell and Environment*, 27, 675-684.
- [33] Amini, M.H., Ahmady, A., Zhakfar, A.M. (2019). Preliminary phytochemical profile, in vitro antioxidant and sun protective activities of *Alhagi pseudalhagi* and *Elaeagnus angustifolia* L. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 31(4), 1-13.
- [34] Zengin, G., Aktumsek, A. (2014). Investigation of antioxidant potentials of solvent extracts from different anatomical parts of *Asphodeline anatolica* E. Tuzlaci: an endemic plant to Turkey. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 11(2), 481-488.
- [35] Zengin, G., Uysal, S., Ceylan, R., Aktumsek, A. (2015). Phenolic constituent, antioxidative and tyrosinase inhibitory activity of *Ornithogalum narbonense* L. from Turkey: A phytochemical study. *Industrial Crops and Products*, 70, 1-6.
- [36] Harborne, J.B. (1973). *Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis*, Edited by Chapman and Hall, Springer Netherlands, 278p.
- [37] Gupta, D. (2013). Comparative analysis of spices for their phenolic content, flavonoid content and antioxidant capacity. *American International Journal of Research in Formal, Applied and Natural Sciences*, 4(1), 38-42.
- [38] Bajpai, M., Pande, A., Tewari, S.K., Prakash, D. (2005). Phenolic contents and antioxidant activity of some food and medicinal plants. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56, 287-291.
- [39] Demirci, F., Guven, K., Demirci, B., Dadandi, M.Y., Baser, K.H.C. (2008). Antibacterial activity of two *Phlomis* essential oils against food pathogens. *Food Control*, 19(12), 1159-1164.
- [40] Aherne, S.A., O'Brien, N.M. (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism chemistry and structure of the flavonoids. *Nutrition*, 18(1), 75-81.

Farklı Starter Kültürler ile Yoğurt ve Kremadan Üretilen Tereyağlarının Oksidasyon Stabilitesi ve Bazı Özellikleri

Engin Gündoğdu¹  , Songül Çakmakçı² ¹Gümüşhane Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Gümüşhane²Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Erzurum

Geliş Tarihi (Received): 12.05.2020, Kabul Tarihi (Accepted): 02.10.2020

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): engingundogdu@gumushane.edu.tr (E. Gündoğdu)

📞 0 456 233 10 00/18 55 📠 0 456 233 10 75

ÖZ

Bu araştırma, kültür ilave edilmeksizin (A: kontrol) ve farklı kültürlerle [B: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (%2)], [C: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (%2)] ve bu iki kültürün kombinasyonu [D: B (%1)+C (%1)] ile üretilen yoğurt ve krema tereyağlarında bazı fizikokimyasal ve oksidasyon stabilitesi özelliklerini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Tereyağı örnekleri 4±1°C'de muhafaza edilmiş ve analizler [(kurumadde, yağ, pH, asitlik, serbest yağ asitliği (SYA), peroksit değeri (PD) ve tiyobarbüirik asit değeri (TBA)] depolamanın 1, 15, 30, 45 ve 60. günlerinde yapılmıştır. Kurumadde, yağ ve pH değerleri krema tereyağlarında daha yüksek, asitlik daha düşük bulunmuştur. SYA değerleri ise yoğurt tereyağlarında daha yüksek olup her iki çeşit tereyağında da depolama süresince artmıştır. En düşük PD yoğurt tereyağlarında D kültürü ile üretilen örnekte, krema tereyağlarında ise kontrol (A) ve C kültürü ile üretilen örneklerde belirlenmiştir. TBA değerleri her iki çeşit tereyağında da depolama süresince artmış, en düşük TBA değeri karışık kültürle üretilen yoğurt tereyağında (D) belirlenmiştir. Karışık kültür (D) ile üretilen iki tereyağı çeşidinde de depolama sonunda genel kabul edilebilirlik puanları diğer örneklerden daha yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak, tereyağında önemli bir kalite kriteri olan oksidasyonun önlenmesinde starter kültürün önemli olduğu ve bu bağlamda yoğurt tereyağı üretiminde kullanılabileceği ancak uygun suş seçimi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Yoğurt tereyağı, Krema tereyağı, Starter kültür, Oksidasyon stabilitesi, Analiz

Oxidation Stability and Some Properties of Butter Produced with Yoghurt and Cream by Different Starter Cultures

ABSTRACT

This research was carried out to determine some physicochemical and oxidative stability properties in yoghurt and cream butters produced without inoculation of starter culture (control sample), [B: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (2%)], [C: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (2%)] and the combination of these cultures [D: B (1%) + C (1%)]. Butter samples were stored at 4±1°C and analyzed [(dry matter, fat, pH, acidity, free fatty acidity (SYA), peroxide value (PV) and thiobarbutyric acid value (TBA)] on the storage days of 1, 15, 30, 45, and 60. Butter samples had higher values in terms of pH, dry matter and fat contents than others while their acidity was found lower. On the other hand, SYA values were higher in yoghurt butters and they increased in both types of butter during storage. The lowest PV value was found in yoghurt butter sample produced with D starter culture, and control (A) and C culture in cream butter samples. TBA values increased during storage in both types of butter, and the lowest TBA value was determined in yoghurt butter produced with mixed culture (D). In the two butter varieties produced with mixed culture (D), general acceptability scores were found higher at the end of storage. In conclusion, it can be said that starter culture is important in preventing oxidation, which is an important quality criterion in butter,

and in this context, it can be used in the production of yoghurt butter, but more studies are needed for the selection of an appropriate strain.

Keywords: Yoghurt butter, Cream butter, Starter culture, Oxidation stability, Analysis

GİRİŞ

Süt ve ürünleri temel gıda maddeleri olarak insan beslenmesinde çok önemli bir yere sahip olup birçoğu hem geleneksel hem de modern yöntemlerle işlenerek üretilmektedir [1]. Bu ürünlerden biri olan tereyağı, çeşitli ülkelerde farklı geleneksel yollarla üretilmektedir. Örneğin Tunus'ta sütün kendiliğinden/kültür ilave edilmeksizin fermentasyonunun ardından yayıklanması ile elde edilen ve yöresel olarak "Zebda beldi" olarak adlandırılan geleneksel Tunus Tereyağı, bir diğeri Cezayir'in pek çok bölgesinde deve sütünün keçi derisinden yapılan kaplarda 24-48 saat süreyle fermentasyonunun ardından kabın yarısının ekşi sütle doldurulup yayıklanması ile elde edilen ve "Shmen" adı verilen tereyağı [2], yine Mısır'da mekanik olarak ayrılan kremanın "Kerba" adı verilen keçi derisinden yapılan kaplarda derinin dış kısmının bolca tuzlanarak oda sıcaklığında 2-3 gün bekletildikten sonra Kerba'nın sallanarak oluşan yağ globüllerinin ayrılması ile elde edilen tereyağı [3] olduğu bilinmektedir. Ülkemizde ise eskiden "yayık" adı verilen tahta fıçılarda yoğurdun belli oranda su ilave edilerek yayıklanması ile elde edilen, aslında literatüre "Yoğurt tereyağı" olarak girmesi gerekirken "Yayık tereyağı" olarak geçen geleneksel tereyağı da üretilmektedir. Günümüzde teknolojinin gelişimine bağlı olarak tereyağı üretiminde elektrikli makineler de kullanıldığı için, hammaddesi dikkate alınarak bu çalışmada yoğurttan yapılan tereyağı yoğurt tereyağı olarak adlandırılmıştır. Hammaddesinin yoğurt olması nedeniyle hem üretim hem de bazı özellikleri nedeniyle krema tereyağından ayrılmaktadır. Her ne kadar kendine özgü tat ve aromaya sahip olması, raf ömrünün daha uzun olması ve yoğurt üretiminde yüksek ısı işlem uygulanması nedeniyle daha güvenilir olsa da, tereyağlarında depolama süresince biyokimyasal reaksiyonlara bağlı olarak tat ve aromada değişimler olabilmektedir. Tüketiciler geleneksel ürünleri tercih ederken temizlik ve hijyen beklentisinin yanı sıra daha sağlıklı ve satış yerlerinde her zaman bulunmasını arzu etmektedirler [4]. Avrupa'da geleneksel ürünler için büyük bir pazar olduğu ancak bu pazarın devamlılığı için geleneksel ürünlerde bir takım yeniliklerin gerekli olduğu, özellikle ürünün herhangi bir olumsuz yönünün düzeltilmesinin tüketiciler tarafından kabul edilebilirliğinde artışa neden olduğu ifade edilmiştir [5].

Kültür ile üretilen tereyağı, diasetil ve uçucu organik asitler gibi aromatik bileşikler ve laktik asit nedeniyle zengin aromaya sahip ürün olarak tanımlanmaktadır. Tereyağında bulunan bu maddeler hem ürünün raf ömrünün uzaması hem de fonksiyonel özellik kazanması açısından gereklidir. Ayrıca kültürlü tereyağında laktik asit bakterileri tarafından oluşturulan diasetil ve laktik asit antibakteriyel etki göstererek bozulma yapan mikroorganizmaların gelişmesini önlemektedir [6]. Kültürlü tereyağı üretiminde çoğunlukla mezofilik laktik asit bakterilerinden *L. lactis*, *L. cremoris*,

L. diacetylactis ve *Leuconostoc* cinsi bakteriler kullanılmakta ve bunların temel görevi önemli miktarda aroma maddesi veya aromatik bileşikler yanında orta derecede asit üretmektir [6]. Kültür ilaveli tereyağının starter kültür aşılınmamış olana kıyasla daha yüksek verim, daha iyi aroma ve ısı işlem sonrası daha az kontaminasyon riski gibi üstünlüklere sahiptir [7]. Ancak, önemli geleneksel bir süt ürünümüz olan Yoğurt tereyağı ile yapılan çalışmalar sınırlı sayıda olup çalışmalar daha çok üretim parametrelerinin araştırılması üzerine yoğunlaşmıştır [8-10]. Bu nedenle, bu çalışmada farklı starter kültür kullanılarak üretilen yoğurt ve krema tereyağlarının kimyasal özellikleri ve oksidasyon stabiliteleri araştırılarak farklılıkları ortaya konulmuştur. Böylece geleneksel tereyağında da çeşitliliği sağlayarak üretimi ve tüketimini teşvik etmek amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Yoğurt tereyağlarının üretimi için kullanılan yoğurtların üretiminde kullanılan çiğ inek sütü Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Pilot Süt Fabrikası'ndan, Krema tereyağlarının üretiminde kullanılan krema ise Leben Süt ve Süt Ürünleri A.Ş.'den (Erzurum) temin edilmiştir. Yoğurt yapımında kullanılan ticari yoğurt kültürü (DVS YC350) Peyma Hansen (İstanbul) ve tereyağı üretiminde kullanılan saf *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* 4366 ve *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* 20200 kültürleri DSMZ'den (Almanya Mikroorganizma ve Hücre Kültür Koleksiyonu) temin edilmiştir.

Metot

Starter Kültürlerin Hazırlanışı

Bu amaçla 121°C'de 15 dk. sterilize edilmiş M17 ve MRS brothlar (Merck) kullanılmıştır. Steril öze ile *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* M17 brotha *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* ise MRS brotha aktarılmış, M17 broth aerobik, MRS broth ise anaerobik şartlarda 30°C'de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Gelişme görülen brothlardan M17 ve MRS agarlara üçlü çizim yöntemi ile ekim yapılmış ve aynı şartlarda inkübe edilmiştir [11]. Petrilerde oluşan koloniler steril fizyolojik tuzlu su içeren tüplere aktarılarak MacFarland skalası (McFarland Standard, Ref. 70 900, BioMérieux®) ile 10⁷ kob/mL mikroorganizma yoğunluğuna ayarlanmıştır. Tereyağı üretiminde kullanılan kültürün hazırlanması için; %10 kurumaddeli 110°C'de 5 dk. sterilize edilmiş yağsız süttozu içerisine 10⁷ seviyesinde mikroorganizma içeren tüplerden 1 mL alınarak ilave edilmiş ve 30°C'de inkübe edilerek asitlik %0.36-0.39 olduğunda inkübasyon

sonlandırılmıştır. Kültür aktivite testi için Horrall-Elliker testi kullanılmıştır.

Hammaddede Yapılan Analiz Yöntemleri

Süt, yoğurt ve kremada; kurumadde (gravimetrik yöntem), yağ (Gerber yöntemi), laktik asit cinsinden asitlik derecesi ve pH analizleri Kurt ark.'nın belirttiği yöntemlerle belirlenmiştir [12].

Yoğurt ve Yoğurt Tereyağlarının Üretimi

Bu amaçla önce yoğurtlar üretilmiş sonra tereyağı üretilmiştir. Yoğurt üretimi için çiğ inek sütü, randımanı artırmak amacıyla taze krema (%60 yağlı) ile yağ içeriği %5 olarak ayarlandıktan sonra 90°C'de 20 dk. ısıtılmasının ardından 43±1°C'ye soğutulmuş %2 oranında *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ilave edilerek pH 4.7±1'ye düşüncüye kadar inkübe edilmiş ve 21±1°C'ye soğutulmuş dört kısma ayrılmıştır. Birinci kısım Kontrol (YA) olarak ayrılmıştır. İkinci kısım 10⁷ seviyesinde *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (YB), üçüncü kısım *Leu.mesenteroides* subsp. *cremoris* (YC), dördüncü kısım her iki kültürün karışımı *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* + *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* (YD) ilave edilmiş ve 1 gece olgunlaştırılmıştır.

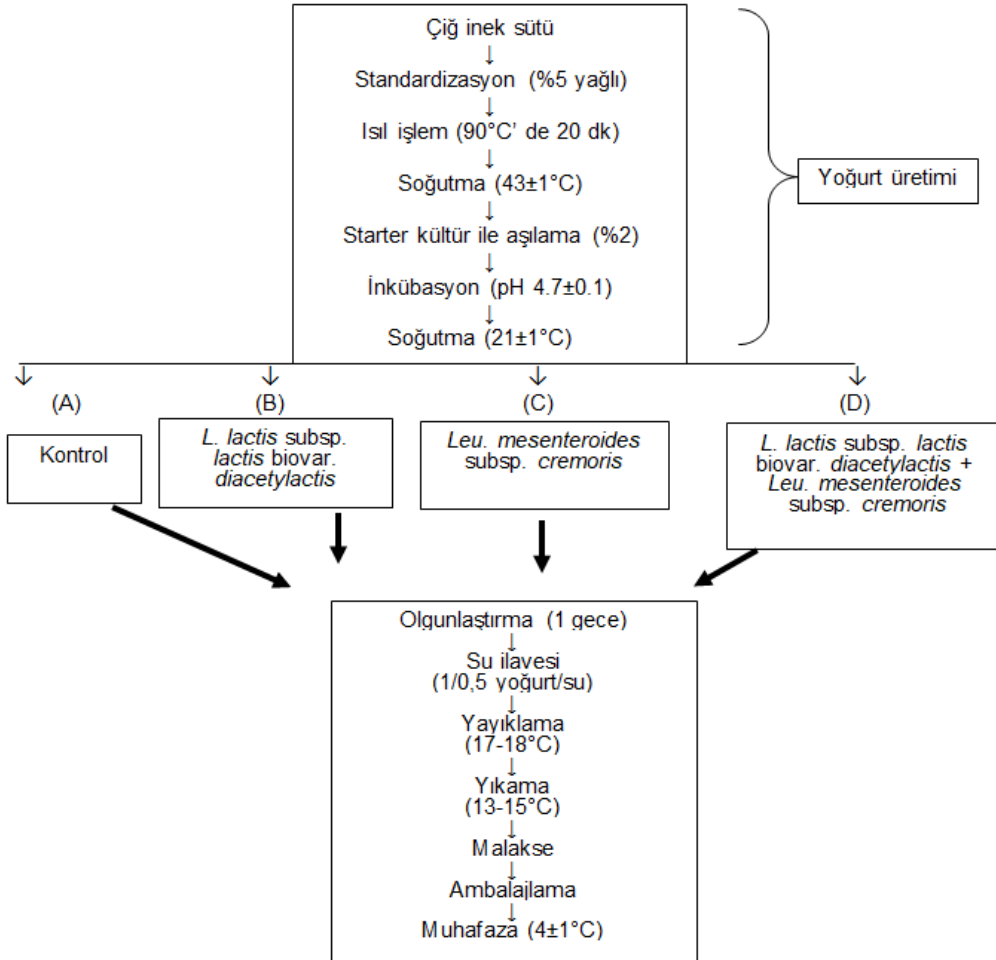
Ardından yoğurtlara 1/0.5 (1 yoğurt/ 0.5 su) oranında su ilave edilerek 17-18°C'de yayıklanmıştır. Elde edilen yağ granülleri 13-15°C içme suyu ile yıkanarak malakse edilmiştir. Ardından alüminyum folyo ile sarılarak 4±1°C'de 2 ay muhafaza edilmiştir. Üretim akış şeması Şekil 1'de verilmiştir.

Krema Tereyağlarının Üretimi

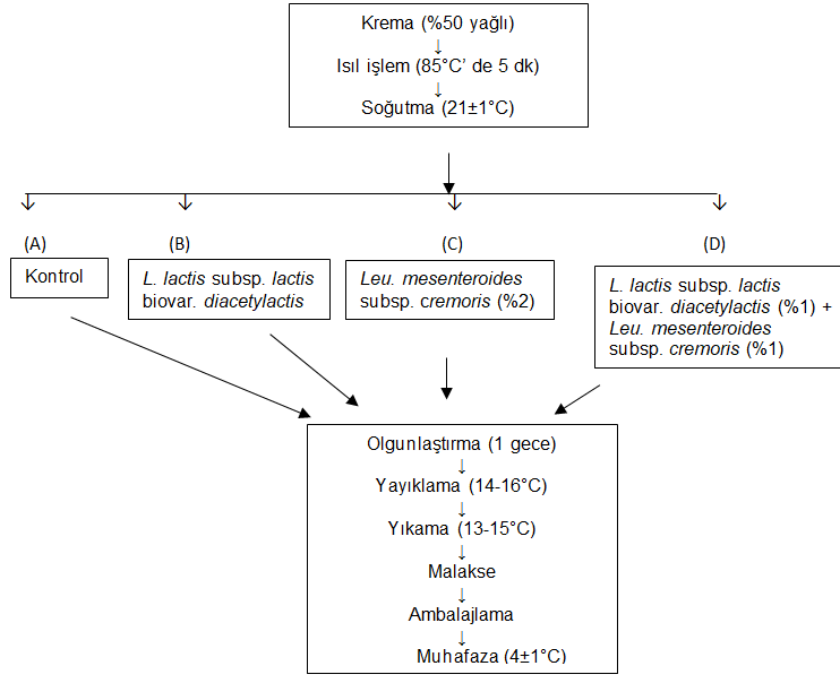
Bu amaçla, yağ içeriği su ile %50'ye ayarlanan krema 85°C'de 5 dk. pastörize edildikten sonra dört kısma ayrılmış ve yoğurt tereyağı üretiminde olduğu gibi aynı starter kültürlerin aynı oranda ilave edilmesiyle aynı şartlarda üretilmiş ve örnekler KA, KB, KC ve KD olarak kodlanmıştır. Üretim akış şeması Şekil 2'de gösterilmiştir.

Tereyağı Örneklerinde Yapılan Analizler

Depolamanın 1., 15., 30., 45. ve 60. günlerinde kurumadde (gravimetrik yöntem), yağ (Gerber yöntemi), asitlik derecesi (titrasyon), pH ve serbest yağ asitleri analizleri Atamer [13]'e göre yapılmıştır. Depolama süresince oksidasyon stabilitesi testlerinden olan peroksit değeri ve tiyobarbutirik asit değerleri Atamer [13] ve Ozturk ve ark. [14] tarafından belirtilen yöntemlerle tespit edilmiştir.



Şekil 1. Yoğurt ve yoğurt tereyağlarının üretim akış şeması



Şekil 2. Krema tereyağları üretim akış şeması

İstatistiksel Analizler

Çalışma 2 hammadde (yoğurt ve krema × 4 starter kültür aşılantısı) [Kontrol (kültür ilave edilmeyen), *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* + *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris*] × 5 muhafaza süresi (1, 15, 30, 45 ve 60. gün) × 2 tekrür olmak üzere Tam Şansa Bağlı Deneme Planı'na göre yürütülmüştür. Elde edilen veriler SPSS for Windows Release ver 13.0 (1999) paket programında varyans analizi ile değerlendirilmiş, önemli

bulunan ortalamalar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile karşılaştırılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Hammadde Analiz sonuçları

Yoğurt üretiminde kullanılan süt, tereyağlarının üretiminde kullanılan yoğurt ve kremanın kimyasal özellikleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Tereyağı örneklerinin üretiminde kullanılan hammaddelerin özellikleri

İçerik	Isıl işlem görmüş süt	Yoğurt	Isıl işlem görmüş krema
Kurumadde (%)	10.96	13.24	55.25
Yağ (%)	5.00	5.00	50.00
Asitlik (% laktik asit)	0.17	1.07	0.18
pH	6.30	4.70	6.60

Fiziksel ve Kimyasal Analiz Sonuçları

Tereyağının kalitesini belirleyen karakteristik kalite özellikleri yağ ve su içeriğidir [15]. Bu çalışmada, tereyağı örneklerinin 60 günlük depolama süresince belirlenen fiziksel ve kimyasal özelliklerindeki değişim Tablo 2'de verilmiştir. Tablodan görüldüğü gibi yoğurttan elde edilen tereyağlarının (yoğurttan elde edilen tereyağları, Y) kurumadde ve yağ açısından kremadan elde edilenlere kıyasla daha düşük olduğu, bu sonuç üzerine, starter kültürlerin hammaddelerdeki (krema ve yoğurt) etkilerinin farklılığının neden olabileceği düşünülmektedir. Yoğurttan elde edilen tereyağlarında kurumadde miktarları %80.43±0.51-% 83.38±0.23 arasında değişim göstermiş bu değerler depolama süresince küçük artış ve azalışlar görülmüştür. Depolama süresince YA örneğinde artış, YB örneğinde azalma görülmüş ve istatistiksel olarak önemli

bulunmuştur ($p<0.05$). Diğer iki örnekte ise değişim önemli değildir ($p>0.05$). Yapılan bir çalışmada, 3 ay depolanan tereyağlarında depolamaya bağlı olarak kurumadde miktarında artış olduğu belirlenmiş ve bu artışın su kaybindan kaynaklandığı ifade edilmiştir [16]. Benzer durumun çalışmamız için de geçerli olduğu, ayrıca tereyağı üretiminde kullanılan starter kültür ve asitlik değerlerinin de bu duruma neden olabileceği düşünülmektedir. Depolama sonunda en fazla YA (yoğurttan Kontrol) örneğinde (%83.38±0.23) tespit edilmiş ve diğer örneklerden istatistiksel olarak farklı bulunmuştur. Diğer örneklerde kontrol örnekten düşük çıkması, kullanılan starter kültür aktivitesine bağlı olarak ya da yıkama sırasında bünyede su kalması nedeniyle olabilir. Benzer durum krema tereyağlarında da görülmüştür. KA (kremadan Kontrol) örneğinde depolama süresince artış, KB örneğinde azalma görülmüş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur

($p < 0.05$). Depolama sonunda en düşük kurumadde oranı karışık kültür ile üretilen KD örneğinde (83.98 ± 0.41), en yüksek Kontrol örneğinde (86.08 ± 0.08) belirlenmiş olup KA ve KC ile KB ve KD örnekleri kendi aralarında istatistiksel olarak benzer olmuştur. Erkaya ve ark. [17] kurumadde oranlarını 84.63 ± 0.33 - 86.33 ± 0.23 arasında bulmuşlardır. Birghila ve ark. [18], 5 hafta 4°C 'de depolanan tereyağlarında depolama sonunda nemin arttığını, bu durumun depolama şartlarındaki nispi nemin etkisiyle olabileceğini ifade etmişlerdir.

Yağ miktarları açısından yoğurt tereyağlarında; depolama süresince YA örneğinde artma YD örneğinde azalma belirlenmiş ve başlangıç ile kıyaslandığında depolama sonunda istatistiksel olarak önemli bulunmuş, diğer iki örnekteki değişim anlamlı bulunmamıştır. Depolama sonunda en düşük yağ miktarı YC örneğinde (79.00 ± 0.22) belirlenmiş ancak YD örneği ile aralarında anlamlı fark bulunmazken, en yüksek yağ

oranı (81.63 ± 0.25) YA örneğinde tespit edilmiş olup diğer örneklerden farklı bulunmuştur ($p < 0.05$).

pH değerleri yoğurt tereyağı örneklerinde krema tereyağı örneklerinden daha düşük bulunmuştur. Bu durum yoğurdun pH değerinin (4.70) kremadan (6.60) düşük olmasından kaynaklanmıştır. Yoğurt tereyağlarının pH değeri 4.02 ± 0.0 - 4.15 ± 0.07 arasında değişmiştir. Genel olarak, depolama süresince pH değerlerinde artma ve azalmalar olmuş ancak bu dalgalanmalar YC ve YD örneklerinde depolama sonunda önemli bulunmazken, YA ve YB örneklerinde önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Depolama sonunda en düşük pH değeri (4.04 ± 0.02) YD örneğinde, en yüksek pH değeri (4.27 ± 0.13) YB örneğinde bulunmuş ve diğer örneklerde istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($p < 0.05$). Deve sütünün fermente edilip yayıklaştırılmasıyla elde edilen geleneksel bir tereyağı olan Shmen örneklerinde pH değerlerinin 3.10 ± 0.26 - 4.97 ± 0.32 arasında değiştiği belirlenmiştir [2].

Tablo 2. Tereyağı örneklerinin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri

Özellik	Günler	Tereyağı örnekleri							
		YA	YB	YC	YD	KA	KB	KC	KD
Kurumadde (%)	1	81.80±0.33Ba	82.76±0.81Aa	81.04±0.75ABa	81.07±0.74ABa	85.82±0.08Db	83.67±0.12Ca	85.33±0.95Da	83.82±0.33Ca
	15	83.05±0.20Cb	80.55±0.45Ab	81.25±0.97ABa	81.65±0.44Ba	85.57±0.08Ea	83.97±0.18Dab	85.70±0.96Ea	84.31±0.29Cab
	30	82.77±0.08Bb	80.60±0.88Ab	80.80±0.84Aa	81.51±0.66Aa	86.16±0.19Dc	83.86±0.30Cab	85.90±0.87Da	84.05±0.28Cab
	45	82.79±0.15Cb	80.77±0.46Ab	81.16±0.80ABa	81.35±0.55Ba	85.87±0.10Eb	83.89±0.37Dab	86.09±0.82Ea	84.50±0.51Db
Yağ (%)	1	80.63±0.19Ba	79.56±0.43Aab	79.56±0.66Aa	80.19±0.47ABb	82.13±0.25Ca	80.69±0.69Bab	82.25±0.29Ca	80.50±0.41Ba
	15	81.06±0.12BCab	79.19±0.94Aa	80.25±0.51Ba	80.69±0.55Cb	82.50±0.20Db	81.88±0.75DCd	82.75±0.29Db	81.13±0.25BCa
	30	80.81±0.69Ca	79.25±0.29Aa	79.38±0.85Aa	80.25±0.29BCb	83.19±0.24Ed	79.88±0.25ABa	82.75±0.35DEb	82.25±0.65Db
	45	81.63±0.60Cb	79.44±0.23Aab	79.61±0.87ABa	80.00±0.74ABab	82.75±0.35Dbc	80.44±0.43Bab	82.94±0.12Db	82.63±0.88Db
pH	1	4.02±0.00Aa	4.07±0.09ABa	4.10±0.05Ba	4.07±0.03ABa	5.65±0.01Eb	4.67±0.01Ca	5.56±0.05Dc	4.67±0.01Cb
	15	4.04±0.02Aab	4.09±0.04ABa	4.11±0.05Ba	4.08±0.02ABa	5.56±0.09Db	4.65±0.01Ca	5.51±0.04Db	4.64±0.02Ca
	30	4.04±0.04Aab	4.05±0.03Aa	4.05±0.06Aa	4.03±0.02Aa	5.19±0.47Ca	4.71±0.03Bb	5.46±0.01Da	4.68±0.02Bb
	45	4.10±0.03ABc	4.13±0.08ABa	4.08±0.04Aa	4.15±0.07Bb	5.32±0.03Dab	4.80±0.04Cc	5.44±0.01Ea	4.77±0.01Cc
Asitlik (%)	1	0.41±0.03ABCb	0.53±0.03Cb	0.46±0.01BCb	0.42±0.01BCa	0.38±0.50ABCa	0.23±0.01ABa	0.13±0.00Aa	0.23±0.01ABa
	15	0.32±0.01Dab	0.32±0.02Da	0.33±0.03Da	0.32±0.03Dab	0.19±0.01Ba	0.24±0.01Ca	0.14±0.01Aab	0.25±0.01Cab
	30	0.25±0.08ABa	0.28±0.12Ba	0.27±0.08ABa	0.26±0.11ABa	0.24±0.01ABa	0.26±0.02ABa	0.15±0.01Ab	0.24±0.01ABa
	45	0.25±0.07Aa	0.29±0.12Aa	0.27±0.11Aa	0.26±0.10Aa	0.26±0.01Aa	0.28±0.03Aab	0.19±0.02Ac	0.26±0.00Ab
Serbest Yağ Asitliği (mg KOH/g yağ)	1	1.69±0.11Ba	1.82±0.07Ca	1.66±0.08Ba	1.72±0.05Ba	0.87±0.02Aa	0.88±0.03Aa	0.84±0.00Aa	0.88±0.03Aa
	15	1.87±0.02Cb	1.81±0.07Ca	1.79±0.11Cab	1.86±0.07Cb	1.36±0.03Bb	1.02±0.07Aa	0.98±0.03Ab	1.02±0.03Aab
	30	1.79±0.09Cab	1.84±0.07Ca	1.89±0.07Cb	1.88±0.12Cb	1.84±0.14Cc	1.12±0.00Ba	0.96±0.05Ab	1.19±0.12Bbc
	45	1.88±0.05Bb	1.85±0.07Ba	1.88±0.15Bb	1.92±0.09Bc	2.01±0.01Bd	1.99±0.83Bb	1.29±0.14Ac	1.34±0.12Bc
60	1.80±0.11Aab	1.84±0.06Aa	1.83±0.09Ab	1.83±0.05Aab	2.42±0.06Be	4.06±0.13Cc	1.77±0.06Ad	1.91±0.24Ad	

YA: Yoğurt tereyağı, Kontrol; YB: *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (%2) ile üretilen yoğurt tereyağı; YC: *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* (%2) ile üretilen yoğurt tereyağı; YD: *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* (%1) + *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (%1) ile üretilen yoğurt tereyağı; KA: Krema tereyağı, Kontrol; KB: *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (%2) ile üretilen krema tereyağı; KC: *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* (%2) ile üretilen krema tereyağı; KD: *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* (%1) + *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (%1) ile üretilen krema tereyağı. a–e Aynı sütündeki farklı harfler istatistiksel olarak farklıdır ($p < 0.05$). A–E Aynı sıradaki farklı harfler istatistiksel olarak farklıdır ($p < 0.05$).

Yayık tereyağı üzerine yapılan bir çalışmada pH değerleri 3.73 ± 0.03 - 3.81 ± 0.09 arasında değişim göstermiştir [19]. Diğer bir çalışmada, yayık tereyağının depolama başında 5.25 ± 0.03 olan pH değeri 60 günlük depolama sonunda 4.62 ± 0.12 değerine ulaşmış, buna karşılık titrasyon asitliği değerleri değişmemiştir [20]. Krema tereyağlarından KB ve KD örneklerinde depolama süresince pH değerleri genel olarak bir artış göstermiş, başlangıç pH değeriyle depolama sonundaki pH değerleri istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($p < 0.05$). KA ve KC örneklerinde ise depolama süresince azalma olmuştur. Bu durum KA örneğinde anlamlı bulunmazken KC örneğinde önemli olmuştur ($p < 0.05$). Depolama sonunda en düşük pH değeri (4.76 ± 0.01) KD örneğinde belirlenmiş. KB örneği ile benzer bulunurken, en yüksek pH değeri ise (5.45 ± 0.02) KC örneğinde belirlenmiş olup KA örneği ile benzer çıkmıştır. Bu sonuç, KC örneğinin üretiminde kullanılan

Leu. mesenteroides subsp. *cremoris* suşunun asit üretim gücünün düşük olmasından kaynaklanmıştır olabilir. *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* laktozu fermente etme gücü diğer *Leu.* türlerinden daha düşük olup starter kültür olarak kullanıldığında asit üreten *Lactococcus* suşları ile birlikte kullanılmaktadır [21]. Çalışmamızda aroma üretimi için kullanılmıştır. Ayrıca *Leuconostoc* spp. heterofermantatif mezofilik özellikte oluşu ile diğer laktik asit bakterilerinden ayrılmaktadır [22].

Asitlik açısından değerlendirildiğinde yoğurt tereyağlarının krema tereyağlarından daha yüksek asitliğe sahip olduğu görülmüştür. Bu sonuç, tereyağı üretiminde kullanılan yoğurdun kremadan daha yüksek asitliğe sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Benzer bulgular Şenel ve ark. [8] tarafından da saptanmıştır. Yoğurt tereyağları içerisinde en yüksek asitlik *L. lactis*

subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ile üretilen YB örneğinde tespit edilmesine rağmen tüm örnekler istatistiksel olarak benzer bulunmuştur. Cachon ve ark. [23] *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*'in tereyağı, krema ve taze fermente peynir gibi pek çok süt ürünüde asit ve aroma üreten ajan olarak kullanıldığını bildirmiştir. Çalışmamızda örnekler arasında fark olmaması yoğurt tereyağı üretiminde kullanılan starter kültürlerin simbiyotik etkileşimi sonucu olduğu düşünülmektedir. Depolama süresince tüm örneklerin asitlikleri belirgin olarak düşerken bu düşüşün 15. günden sonra istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiş ve depolama sonunda asitlik değerleri 0.26 ± 0.09 - 0.29 ± 0.09 arasında değişim göstermiştir. Ancak, Şenel ve ark. [8] tarafından yapılan çalışmada, yayık tereyağlarında depolama süresince asitlikte artış görülmüştür. Başka bir çalışmada da, koyun ve keçi sütlerinden yapılan yayık tereyağlarında depolama süresince artış görülürken inek yoğurdundan yapılan tereyağlarında artış görülmemiştir [9]. pH 4'de yayıklanan yayık tereyağlarının pH 4.6'da yayıklanan yağlara göre daha yüksek titrasyon asitliği gösterdiği 60 günlük depolama süresince sürekli artış gösterdiği, buna karşılık laktik asit miktarlarının azaldığı belirlenmiştir [8]. Yine %7 yağlı yoğurttan elde edilen yayık tereyağının %14 yağlı yoğurttan üretilen tereyağına göre daha yüksek titrasyon asitliğine sahip olduğu, ancak depolama sonunda istatistiksel olarak fark olmadığı belirlenmiştir [8]. Bizim araştırmada, krema tereyağlarında ise Kontrol örneği (KA) hariç, diğer tüm örneklerde depolama süresince asitlikte artış olduğu, başlangıçla karşılaştırınca istatistiksel olarak önemli olduğu görülmektedir. Benzer bulgular Şenel ve ark. [8] tarafından da tespit edilmiştir. Dagdemir ve ark. [24] 90 gün depolanan krema tereyağlarında asitlikte artış tespit etmişlerdir. Kesler [25], 60 gün depoladığı tereyağında kontrol tereyağında asitliğin arttığını, ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bildirmiştir. Araştırmamızda, en yüksek asitlik KA örneğinde (0.38 ± 0.50) en düşük asitlik 0.13 ± 0.00 ile YC örneğinde belirlenmiştir. Bu durum C örneğinin üretiminde kullanılan *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* kültürünün asitten ziyade aroma üreten bakteri olmasından kaynaklanmaktadır. Nitekim kültürlü tereyağı üretiminde *L. lactis*, *L. cremoris*, *L. diacetylactis*, *Leuconostoc* cinsi mezofilik starter kültürler kullanılmakta, bunlar önemli oranda aroma maddesi oluştururken orta derecede asit üretme kapasitesine sahiptirler [6]. Konuyla ilgili olarak, yayıklama sırasında yağsız kurumadde unsurlarının yayık altına geçmesi yani doğal asitlik unsurlarının azalması nedeniyle asitliğin azaldığı ve kurumadde miktarındaki değişimlerin sütün titrasyon asitliğinde değişime neden olduğu belirtilmektedir [8].

Tereyağı uzun süre depolanabilmesine rağmen depolama sırasında ransidite büyük sorun teşkil etmektedir. Bu probleme lipoliz sonucu oluşan serbest yağ asitleri (SYA) ve SYA'nın oksidasyonu ile birlikte tat ve aromayı bozması dışında tereyağının besin değerini düşürerek süt ve gıda endüstrisinde ekonomik kayıplara neden olduğu belirtilmektedir [16]. Ayrıca, lipaz enzimiyle yağların parçalanması sonucu SYA oluşumu başlamakta ve oluşan SYA ise bütirik, acı, sabunumsu

ya da ekşimsi denilen istenmeyen tatlara neden olmaktadır [26].

Asit değeri, yağların hidrolitik ransidite derecesinin bir ölçüsüdür. Hidrolitik ransidite tereyağının su ve enzim interaksyonu sonucu olmakta ve düşük asit değeri daha az SYA oluştuğunu ve dolayısıyla daha kaliteli ürün olduğunu göstermektedir [27]. Serbest yağ asitliği açısından değerlendirildiğinde; yoğurt tereyağlarının SYA değerlerinin krema tereyağlarından daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Tablo 2). Yoğurt tereyağları içerisinde en yüksek SYA değeri YB (1.82 ± 0.07 mg KOH/g yağ) örneğinde belirlenmiş olup istatistiksel olarak diğer örneklerden farklı bulunmuştur. En düşük SYA değeri YC örneğinde (1.66 ± 0.08 mg KOH/g yağ) tespit edilmiş. YA ve YD örneklerinde benzer değerler bulunmuştur. Depolama süresince tereyağı örneklerinin SYA değerlerinde dalgalanmalar olmuş, bu değişimler YC örneğinde başlangıç SYA değerine göre istatistiksel olarak önemli bulunurken ($p<0.05$) diğer örneklerde benzer çıkmıştır (Tablo 2). Ancak, depolama sonunda örneklerin SYA değerleri arasında farklılık bulunmamıştır. Krema tereyağlarında ise depolama boyunca SYA artmış, en çok artış YA ve YB örneklerinde tespit edilmiş ve istatistiksel olarak diğer örneklerden farklı bulunmuştur. Serbest yağ asitliği değerlerinin PD ve TBA değerlerinden yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 2). Bu durum tereyağındaki asil bozulmanın oksidatif bozulmadan ziyade hidrolitik (lipolitik) bozulmadan kaynaklandığı belirtilmiştir [28]. Başka bir araştırmada, krema tereyağlarında 4 aylık depolama süresince SYA değerlerinin arttığı belirlenmiştir [15]. Bakirci ve ark. [29] 120 gün depoladıkları tereyağlarında SYA değerinin depolama süresince artışını istatistiksel olarak anlamlı bulmuşlardır. Bizim araştırmada, Yoğurt tereyağlarının SYA değerlerinin krema tereyağlarından daha yüksek olmasına rağmen duysal açıdan krema tereyağları kadar çok beğenildiği görülmüştür [30]. Bu durumun ransit tada neden olan kısa zincirli (C4-C8) yağ asitlerinin sulu fazda biriktiği ve bu nedenle de SYA ile belirlenemediği belirtilmiştir [31]. Sağıdç ve ark. [10] tarafından yapılan bir araştırmada, Yayık tereyağı örneklerinin asit değerlerinin 0.67-0.70 mg KOH/g arasında değiştiği tespit edilmiş olup, bu değerler bu araştırmada taze Kontrol Yoğurt tereyağı örneklerine benzer, ilerleyen periyotlardaki değerlerden ise düşüktür. Ayrıca Birghila ve ark. [18], depolama süresince tereyağında SYA değerlerinin arttığını ancak bu artışın istatistiksel olarak önemli olmadığını belirtmişlerdir. Bu durum da tereyağı örneklerinin bozulmasında hidrolitik parçalanmanın önemli olmadığını ve depolama süresinin SYA üzerinde etkili olmadığını ifade etmişlerdir.

Oksidasyon Stabilitesi

Tereyağı örneklerinin PD ve TBA değerlerine ait sonuçlar Tablo 3'de verilmiştir. Yoğurt tereyağlarında krema tereyağlarına göre daha yüksek PD tespit edilmiştir (Tablo 3). Ancak, ilk günde Yoğurt tereyağlarında peroksit değeri tespit edilebilir sınırın altında bulunmuştur. 15. günde ise Yoğurt tereyağları içerisinde en düşük PD (0.43 ± 0.13 meq O₂/kg yağ) YD

örneğinde, en yüksek PD ise Kontrol örnekte (0.66 ± 0.05 meq O_2/kg yağ) belirlenmiştir. Depolama sonunda ise, en düşük PD yine YD örneğinde (0.58 ± 0.019 meq O_2/kg yağ) belirlenmiş ve diğer örneklerden istatistiksel olarak farklıdır ($p < 0.05$). En yüksek PD (0.78 ± 0.06 meq O_2/kg yağ) ise YB örneğinde depolamanın son gününde belirlenmiş, ancak diğer örneklerde belirlenen değerler ile benzer bulunmuştur (Tablo 3). Depolama süresince yoğurt tereyağlarında PD genel olarak artış olsa da bu durum istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p > 0.05$). Ancak Öztekin-Öztürk [19] tarafından yapılan bir çalışmada, Yayık tereyağlarında PD 60 günlük depolama süresince azalmıştır. Yapılan başka bir çalışmada, inek ve koyun yoğurtlarından üretilen Yayık tereyağlarında PD depolama sırasında azalma göstermiş, keçi tereyağında artış görülmüştür [9]. Diğer bir çalışmada, 9 ay depolanan krema tereyağlarında PD artış göstermiştir [16]. Bizim çalışmada ise, Krema tereyağlarından KB ve KC örneklerinde 45. güne kadar artma 60. günde ise azalma olmuştur. KD örneğinde tüm periyotlarda artış, Kontrol örneği olan KA'da ise 30. günde azalmanın ardından yeniden artış göstererek dalgalı bir seyir göstermiştir. Tüm örneklerde başlangıç ve depolama sonunda PD değişimi önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Depolama sonunda en yüksek peroksit değeri karışık kültür ile üretilen KD örneğinde (0.80 ± 0.04 meq O_2/kg yağ) belirlenmiş ve diğer örneklerden istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($p < 0.05$). En düşük PD ise KC örneğinde (0.30 ± 0.06 meq O_2/kg yağ) belirlenmiş ancak diğer örneklerin değerleriyle istatistiksel olarak farksız bulunmuştur ($p > 0.05$). Çakmakçı ve ark. [32] [90 gün depolanan krema tereyağlarında PD'de artış tespit etmişlerdir. Bir başka çalışmada ise, 18 gün depolanan krema tereyağlarında 15. güne kadar peroksit değerlerinde çok yavaş bir artış olduğu belirlenmiş, bu durum çok az otooksidasyon olduğunun göstergesi olarak yorumlanmış, 18. gündeki hızlı artışın ise otooksidasyonun başladığının göstergesi olduğu ifade edilmiştir [28].

TBA değerleri de yoğurt tereyağlarında daha yüksek bulunmuştur (Tablo 3). Yoğurt tereyağlarında 15. güne kadar azalma görülmüş bugünden sonra dalgalanmalar olmuş, ancak depolama sonunda TBA değerleri başlangıç periyoduyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). Depolama sonunda ise en yüksek TBA değeri YA (0.18 ± 0.00 mg malonaldehit/kg yağ) ile YC (0.18 ± 0.01 mg malonaldehit/kg yağ) örneklerinde, en düşük TBA değerleri ise YB (0.15 ± 0.02 mg malonaldehit/kg yağ) ve YD (0.14 ± 0.01 mg malonaldehit/kg yağ) örneklerinde belirlenmiş ve bu örnekler kendi aralarında istatistiksel olarak benzer bulunmuştur (Tablo 3). Yapılan bir çalışmada, 60 gün depolanan Yayık tereyağlarında TBA değerleri sürekli azalmıştır [19]. Başka bir çalışmada ise 60 günlük depolama süresince Yayık tereyağlarında TBA değerlerinin arttığı belirlenmiştir [20]. Bu çalışmada, krema tereyağlarında depolama süresince YC örneğinde 30. güne kadar artış, sonra azalma ve tekrar artış görülürken, diğer tüm örneklerde depolama süresince artmış ve başlangıç periyodundan istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (Tablo 3). Depolama sonunda KA ve KC örnekleri istatistiksel olarak birbirine benzer bulunmuş. KB ve KD örnekleri ise farklı bulunmuştur. Depolama sonunda en düşük TBA değerleri KA (0.15 ± 0.01 mg malonaldehit/kg yağ) ve KC (0.16 ± 0.03 mg malonaldehit/kg yağ) örneklerinde, en yüksek TBA değerleri YB (0.25 ± 0.02 mg malonaldehit/kg yağ) ve YD (0.27 ± 0.02 mg malonaldehit/kg yağ) örneklerinde belirlenmiştir. Tahmas-Kahyaoğlu ve ark. [33] krema tereyağlarında depolama süresince TBA değerinde artış olduğunu saptamışlardır. Başka bir çalışmada ise kremadan üretilen probiyotik tereyağlarının TBA değerlerinin 30. güne kadar arttığı sonra azaldığı belirlenmiştir [17]. Krema tereyağlarında TBA değerlerinde çok az bir değişimin olmasının aldehit ve keton gibi ikincil oksidasyon ürünlerinin oluşmadığının göstergesi olduğu ifade edilmiştir [28].

Tablo 3. Tereyağı örneklerinin oksidasyon stabilite özellikleri

Özellik	Günler	Tereyağı örnekleri								
		YA	YB	YC	YD	KA	KB	KC	KD	
Peroksit değeri (meq O_2/kg yağ)	1	TE*	TE	TE	TE	TE	0.14 ± 0.00Aa	0.14 ± 0.03Aa	0.16 ± 0.03Aa	0.12 ± 0.02Aa
	15	0.66 ± 0.05Da	0.63 ± 0.21CDa	0.50 ± 0.07BCa	0.43 ± 0.13Ba	0.21 ± 0.01Ac	0.22 ± 0.04Aa	0.22 ± 0.02Aab	0.24 ± 0.02Ab	
	30	0.94 ± 0.51Da	0.62 ± 0.15Ca	0.60 ± 0.11Ca	0.50 ± 0.00BCa	0.16 ± 0.00Ab	0.25 ± 0.01ABa	0.25 ± 0.06ABbc	0.26 ± 0.02ABb	
	45	0.65 ± 0.06BCa	0.72 ± 0.09Ca	0.60 ± 0.14BCa	0.55 ± 0.19Ba	0.36 ± 0.02Ad	0.51 ± 0.10ABb	0.39 ± 0.04Ac	0.64 ± 0.03BCc	
	60	0.70 ± 0.06BCa	0.78 ± 0.06Ca	0.65 ± 0.15BCa	0.58 ± 0.19Ba	0.35 ± 0.00Ad	0.41 ± 0.17Ab	0.30 ± 0.06Ad	0.80 ± 0.04Cd	
TBA (mg malonaldehit/kg yağ)	1	0.17 ± 0.08ABb	0.17 ± 0.08ABa	0.27 ± 0.29Ba	0.17 ± 0.18ABa	0.05 ± 0.00Aa	0.09 ± 0.05ABa	0.02 ± 0.01Aa	0.08 ± 0.02ABa	
	15	0.07 ± 0.02Aa	0.13 ± 0.04Ba	0.15 ± 0.06Ba	0.11 ± 0.05ABa	0.06 ± 0.00Ab	0.14 ± 0.04Bb	0.07 ± 0.01Aab	0.14 ± 0.01Bb	
	30	0.13 ± 0.00ABb	0.14 ± 0.01ABa	0.21 ± 0.07BCa	0.25 ± 0.11Ca	0.07 ± 0.00Ac	0.14 ± 0.01ABb	0.12 ± 0.05Abc	0.14 ± 0.02ABb	
	45	0.17 ± 0.01CDb	0.15 ± 0.01BCDa	0.10 ± 0.01ABa	0.12 ± 0.00ABCa	0.07 ± 0.00Ad	0.15 ± 0.03BCDb	0.08 ± 0.05Aab	0.18 ± 0.07Db	
	60	0.18 ± 0.00BCb	0.15 ± 0.02ABa	0.18 ± 0.01Ca	0.14 ± 0.01Aa	0.15 ± 0.01Ae	0.25 ± 0.02Dc	0.16 ± 0.03ABc	0.27 ± 0.02Ec	

YA: Yoğurt tereyağı. Kontrol; YB: *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (%2) ile üretilen yoğurt tereyağı; YC: *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* (%2) ile üretilen yoğurt tereyağı; YD: *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* (%1) + *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (%1) ile üretilen yoğurt tereyağı; KA: Krema tereyağı. Kontrol; KB: *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (%2) ile üretilen krema tereyağı; KC: *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* (%2) ile üretilen krema tereyağı; KD: *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* (%1) + *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (%1) ile üretilen krema tereyağı. a–e Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak farklıdır ($p < 0.05$); A–E Aynı sıradaki farklı harfler istatistiksel olarak farklıdır ($p < 0.05$)

*TE: Tespit edilemedi

SONUÇ VE ÖNERİLER

Araştırma sonucunda, geleneksel olarak üretilen Yoğurt tereyağlarının starter kültür aşılansıyla üretimi durumunda tereyağının oksidasyon stabilitesi üzerinde olumlu etkisinin olduğu görülmüştür. Nitekim oksidasyon açısından önemli bir kriter olan PD'nin yoğurt tereyağları

içerisinde karışık kültürle üretilen örnekte en düşük bulunması ve depolama süresince çok az değişim göstererek depolama sonunda taze tereyağında belirlenen değere yakın olması, geleneksel olarak starter kültür ilave edilmeden üretilen yoğurt tereyağı üretiminde starter kültür kullanımının daha kaliteli tereyağı üretimine imkân vereceğini ortaya koymuştur.

Ayrıca, krema tereyağlarında yoğurt tereyağının aksine en yüksek PD ve TBA değerlerinin KD örneklerinde belirlenmesi en uygun starter kültür çeşidinin belirlenmesinde farklı suşların birlikte ya da tek olarak etkilerinin denenecek daha fazla araştırılması gerektiği sonucunu düşündürmektedir. Ancak depolama sonunda hem en az oksit tadın YD örneğinde algılanması hem de genel kabul edilebilirlik açısından en fazla beğenilen örnek olması [30], oksidatif bozulmanın duyu analizde hissedilecek düzeyde olmadığını göstermiştir.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmayı maddi olarak destekleyen (Proje No: 2009/201) Atatürk Üniversitesi BAP birimine teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- [1] Abid, Y., Azabou, S., Jridi, M., Khemakhem, I., Bouaziz, M., Attia, H. (2017). Storage stability of traditional Tunisian butter enriched with antioxidant extract from tomato processing by-products. *Food Chemistry*, 233, 476-482.
- [2] Mourad, K., Nour-Eddine, K. (2006). Physicochemical and microbiological study of "shmen", a traditional butter made from camel milk in the Sahara (Algeria): isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts. *Grasas y Aceites*, 57(2), 198-204.
- [3] Meshref, A. (2010). Microbiological quality and safety of cooking butter in Beni-Suef governorate-Egypt. *African Health Sciences*, 10(2), 193-198.
- [4] Jordana, J. (2000). Traditional foods: challenges facing the European food industry. *Food Research International*, 33(3), 147-152.
- [5] Vanhonacker, F., Kühne, B., Gellynck, X., Guerrero, L., Hersleth, M., Verbeke, W. (2013). Innovations in traditional foods: Impact on perceived traditional character and consumer acceptance. *Food Research International*, 54(2), 1828-1835.
- [6] Musiy, L., Tsisaryk, O., Slyvka, I., Mykhaylytska, O., Gutyj, B. (2017). Research into probiotic properties of cultured butter during storing. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*, 3(11), 31-36.
- [7] Rodríguez, A., Bunge, A., Castro, E., Sousa, I., Empis, J. (2003). Development and optimization of cultured goat cream butter. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(10), 987-992.
- [8] Şenel, E., Atamer, M., Öztekin, Ş. (2010). Yayıklama parametrelerinin yayık ayranı ve yayık tereyağının bazı nitelikleri üzerine etkisi. *Gıda*, 35(4), 267-274.
- [9] Şenel, E., Atamer, M., Öztekin, F.Ş. (2011). The oxidative and lipolytic stability of Yayık butter produced from different species of mammals milk (cow, sheep, goat) yoghurt. *Food Chemistry*, 127(1), 333-339.
- [10] Sağdic, A., Arici, M., Simsek, O. (2002). Selection of starters cultures for a traditional Turkish yayık butter made from yoghurt. *Food Microbiology*, 19, 303-312.
- [11] Speck, M.L. (1984). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, American Public Health Association, Washington, USA.
- [12] Kurt, A., Çakmakçı, S., Çağlar A. (2007). Süt ve Mamülleri Muayene ve Analiz Metotları Rehberi. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No. 18, 238 s, Erzurum.
- [13] Atamer, M. (1993). Tereyağı Teknolojisi Uygulama Klavuzu, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara.
- [14] Ozturk, S., Cakmakci, S. (2006). The effect of antioxidants on butter in relation to storage temperature and duration. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(11), 951-959.
- [15] Dvořák, L., Lužová, T., Šustová, K. (2016). Comparison of butter quality parameters available on the Czech market with the use of FT NIR technology. *Mljekarstvo*, 66(1), 73-80.
- [16] Méndez-Cid, F.J., Centeno, J.A., Martínez, S., Carballo, J. (2017). Changes in the chemical and physical characteristics of cow's milk butter during storage: Effects of temperature and addition of salt. *Journal of Food Composition and Analysis*, 63, 121-132.
- [17] Erkaya, T., Ürkek, B., Doğru, Ü., Çetin, B., Şengül, M. (2015). Probiotic butter: Stability, free fatty acid composition and some quality parameters during refrigerated storage. *International Dairy Journal*, 49, 102-110.
- [18] Birghila, S., Dobrinas, S. (2010). The influence of the storage time on the stability of butter. *Environmental Engineering and Management Journal*, 9(11), 1579-1582.
- [19] Öztekin, F.Ş. (2010). Yoğurdun sulandırma oranı ve granüllerin yıkama sayısının yayık tereyağının nitelikleri üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Süt Teknolojisi Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye.
- [20] Simsek, B. (2011). Studies on the storage stability of yayık butter. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 6(2), 175-181.
- [21] Thunell, R. (1995). Taxonomy of the Leuconostocs. *Journal of Dairy Science*, 78(11), 2514-2522.
- [22] Hassan, A.N., Frank, J.F. 2001. Starter Cultures and Their Use. In: Applied Dairy Microbiology, Edited by E.H. Marth, J.L. Steele, Marcel Dekker, Inc., USA, 736p.
- [23] Cachon, R., Diviès, C. (1993). Modeling of growth and lactate fermentation by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* in batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40(1), 28-33.
- [24] Dagdemir, E., Cakmakci, S., Gundogdu, E. (2009). Effect of *Thymus haussknechtii* and *Origanum acutidens* essential oils on the stability of cow milk butter. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(11), 1118-1123.
- [25] Kesler, Y. (2008). The Production of Functional Butter with Addition of Food Fiber and Probiotic Bacteria. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, Türkiye.

- [26] Ray, P., Chatterjee, K., Chakraborty, C., Ghatak, P. (2013). Lipolysis of milk: A review. *International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine*, 1(1), 58-74.
- [27] Afolabi, S., Okache, T., Eke, M., Alakali, J. (2018). Storage stability of butter produced from peanut, crayfish and ginger. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology* 12(1), 27-37.
- [28] Farag, R.S., Ali, M.N., Taha, S.H. (1990). Use of some essential oils as natural preservatives for butter. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68(3), 188-191.
- [29] Bakirci, I., Çelik, S., Özdemir, C. (2002). The effects of commercial starter culture and storage temperature on the oxidative stability and diacetyl production in butter. *International Journal of Dairy Technology*, 55(4), 177-181.
- [30] Gundogdu, E., Cakmakci, S., Hayaloglu, A.A. (2020). Effects of starter culture and storage on volatile profiles and sensory characteristics of yogurt or cream butter. *Mljekarstvo*, 70 (3), 184-200.
- [31] Duncan, S., Christen, G., Penfield, M. (1991). Rancid flavor of milk: relationship of acid degree value, free fatty acids, and sensory perception. *Journal of Food Science*, 56(2), 394-397.
- [32] Çakmakçı, S., Gündoğdu, E., Dağdemir, E., Erdoğan, Ü. (2014). Investigation of the possible use of black cumin (*Nigella sativa* L.) essential oil on butter stability. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(4), 533-539.
- [33] Tahmas-Kahyaoğlu, D., Çakmakçı, S. (2018). A Comparative study on some properties and oxidation stability during storage of butter produced from different animals'milk. *Gıda*, 43(2), 283-293.
-
-

Quality Determination of Traditional Fermented Sausages by Histological and Immunohistochemical Analyses

Semra Gürbüz¹  ✉, Görkem Ekebaş² , Latife Çakır Bayram² , Yusuf Ziya Kaplan³ 

¹Mardin Artuklu University, Tourism Faculty, Department of Gastronomy and Culinary Art, 47080 Mardin, Turkey

²Erciyes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, 38280 Kayseri, Turkey

³Veterinary Control Central Research Institute, Food Control Laboratory, 06010 Ankara, Turkey

Received (Geliş Tarihi): 18.09.2020, Accepted (Kabul Tarihi): 28.10.2020

✉ Corresponding author (Yazışmalardan Sorumlu Yazar): semragurbuz@gmail.com (S. Gürbüz)

☎ +90 482 591 13 15 📠 +90 482 591 13 16

ABSTRACT

In this study, it was aimed to determine the presence of animal tissues and plant materials in traditionally produced fermented sausages by using histological and immunohistochemical methods, and to determine the animal tissues that are not legally permitted. In the study, fermented sausage samples (n=18) produced by a traditional method in Mardin (Turkey) and sold in butcher shops between January and March in 2019 were used as a test material. Samples were taken from 5 different locations of each sausage for histological examinations, and routine histological tissue follow-up was performed. Paraffinized sections were stained with Hematoxylin eosin, Crossmon's trichrome and Immunohistochemical techniques. Striated muscle, collagen fibers, connective, adipose, nerve, glandular, cartilage, bone, lung, heart, spleen tissues, blood vessels, glandular epithelium and various plant materials were detected in the examined sections. Animal tissues that are not permitted but included in fermented sausages were determined in all samples. It was concluded that the identification of these tissues in fermented sausage contents individually is important and to examine fermented sausages by histological methods in terms of preventing fraud in addition to the analyses performed for the evaluation of microbiological and chemical quality parameters, and that foods produced locally and presented to consumption without being subjected for inspection may pose a health risk.

Keywords: Food adulteration, Histological examination, Traditional fermented sausage, Animal tissue, Plant material

Geleneksel Fermente Sucukların Kalitesinin Histolojik ve İmmünohistokimyasal Yöntemlerle Belirlenmesi

ÖZ

Bu çalışmada, geleneksel yöntemle üretilerek satışa sunulan fermente sucukların içeriğindeki hayvansal doku ve bitki materyallerinin histolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerle belirlenerek, yasal olarak izin verilmeyen hayvansal dokuların varlığının araştırılması amaçlandı. Çalışmada 2019 yılı Ocak-Mart aylarında Mardin'de geleneksel yöntemle üretilerek kasap dükkânlarında satışa sunulan 18 fermente sucuk örneği test materyali olarak kullanıldı. Histolojik incelemeler için; sucukların her birinin 5 farklı bölgesinden örnekler alınarak rutin histolojik doku takibi uygulandı. Parafinlenmiş kesitler Hematoksilen eosine, Crossmon's trichrome ve Immunohistochemical teknikler ile boyandı. İncelenen kesitlerde çizgili kas, kollajen lifleri, bağ doku, yağ, sinir, bez, kırıkdamak, kemik, akciğer, kalp, dalak dokuları, kan damarları, bez epiteli ve çeşitli bitki materyalleri tespit edildi. Sucuk örneklerinin tamamında sucuk içeriğine katılmasına izin verilmeyen hayvansal dokuların bulunduğu belirlendi. Sucukların mikrobiyolojik ve kimyasal kalite parametrelerinin değerlendirmeleri için yapılan analizler yanında, içeriğindeki dokuların bireysel olarak tanımlanarak hilelerin önlenmesi açısından, histolojik yöntemle de incelenmesinin önemli olduğu ve yerel olarak üretilerek denetime tabi olmadan tüketime sunulan gıdaların sağlık açısından risk oluşturabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Gıda hileleri, Histolojik inceleme, Geleneksel fermente sucuk, Hayvansal doku, Bitki materyali

INTRODUCTION

Alongside socio-economic factors and religious beliefs, traditions also play a role in the consumption of meat and meat products [1]. Fermented sausage is a traditional meat product that is widely consumed in many countries of the world, especially in Mediterranean, Middle East and Southeast European countries [2, 3]. In Turkey, fermented sausage productions with traditional methods at homes and in small establishments are still continuing as well as industrially produced fermented sausages [4, 5].

According to the Turkish Food Codex Communiqué on Meat, Prepared Meat Mixtures and Meat Products, fermented sausages can be produced with minced bovine and / or ovine carcass meat and fat by mixing flavorings (salt, mustard, spice, spice extracts, aromatic herbs and aromatic plant extracts suitable for human consumption) and addition of offal is not permitted, and it should be labelled in accordance with the Turkish Food Codex Regulation on Food Labelling and Consumer Information. In the Turkish Food Codex Communiqué, it is also stated that sausage and similar products cannot be produced in retail establishments [6]. However, in the Turkish Fermented Sausage Standard (TS 1070) prepared by the Turkish Standards Institute, body cover fat, internal fat, tail fat, kidney fat and fat around kidney and bovine and ovine meat, which are separated from fat, bone, tendon, fascia, cartilage, lymph nodules, large nerves and blood vessels, can be used in the producing of fermented sausage [7].

Adulteration in meat products is frequently encountered as in other food products with high economic value [8]. Such applications in processed meats are not easily determined visually as in fresh meat. From past to present, in order to make more profit in the production of meat products, adulteration practices by using low-value and not allowed tissues instead of tissues with high-economic value have been encountered [9-11]. Animal tissues that are not allowed in the content of fermented sausage have been reported in several previous studies [11-16]. In studies conducted in our country and in other countries, animal tissues such as cartilage, glandular, lymph and bone tissues, tendon and fascia, spleen, tongue, rumen, salivary gland, lung and intestine were detected in the fermented sausages [12, 13, 17-19]. In addition to deceiving the consumer and unfair competition, adulteration in product also has the potential to cause health problems due to addition of tissues such as central nervous system, which may be a vector of infective agents or plant-based substances that may cause allergic effects [8, 11, 20]. Although herbal ingredients often used in most meat products, use of plant-derived ingredients in food without specifying at the label is not legally permitted because of their possible allergic effects in Turkey and the European Union countries [21, 22]. Solely chemical methods are not sufficient to evaluate all the properties of meat products [20]. Histological examination based on the determination and differentiation of ingredients in processed meat products by light or electron microscopy is a method that has been used since the early 1900s to

detect tissue pieces and herbal contents in meat products and to determine the quality of meat products, and several researchers have stated that it is a reliable method that enables to determine even small amounts [11, 15-17, 20, 23-25].

In Mardin (Turkey), fermented sausage is produced with a traditional method in small butcher's shops and sold as Mardin Fermented Sausage during the winter season as in many other provinces in Turkey. These sausages are offered for sale without label. There are no previous studies on the determination of the individual tissues and ingredients in the Mardin Fermented Sausage, which is preferred by consumers because they thought it is natural and nutritious. In this study, it was aimed to determine the animal tissue and plant materials in the content of fermented sausages produced by traditional method and offered for sale by histological and immunohistochemical methods and to investigate the presence of tissues that are not legally allowed.

MATERIALS AND METHODS

Fermented sausage samples

In this study, 18 fermented sausage samples produced in different butcher's shops in Mardin (Turkey) and offered for sale in the same enterprise without labels were used as test materials. Samples were collected between January and March in 2019. Sausage samples weighing between 300 and 400 g were delivered to the laboratory in a container with ice batteries and examined.

Histological and immunohistochemical analysis

Standard morphologically based techniques were used to examine the histology of fermented sausage samples [15]. Pieces with a cut surface of 2-3 mm and a thickness of 5 mm were cut from 5 different areas of each fermented sausage sample for histological examinations. Specimens were placed in tissue follow-up cassettes and fixed in 10% formalin solution for 12-24 hours. Fixed tissue samples were dehydrated in graded ethanol (70, 80, 90%, and absolute) series, cleared in xylene. The tissues were then embedded in paraffin wax and 4-5 μ m sections were taken with a rotary microtome (Thermo Scientific™HM 340E Electronic Rotary Microtome). For histological and immunohistochemical staining, 4 cuts from each sample thus a total of 72 serial sections were taken from paraffin blocks prepared from each of the 18 fermented sausage samples. Different special dyes were used to distinguish different tissue types in the sections. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used for general histological examinations [26]. Crossman's trichrome is a connective tissue dye and has been used to distinguish between connective tissue fiber and muscle tissue in different organs [14, 20]. Each paraffin section was stained with Hematoxylin-Eosin (HE) stain (18 paraffin sections) and Crossman's trichrome (18 paraffin sections). In addition, streptavidin-biotin peroxidase (SABP) complex method was performed (Invitrogen, USA) using two different antibodies including pan-

Cytokeratin Antibody (AE1/AE3) (18 paraffin sections) and Vimentin (18 paraffin sections).

Avidin Biotin Peroxidase Complex (ABC) technique was performed according to the standard procedure

prescribed in the commercial kit (Zymed, Histostain Plus Kit, California, USA) to demonstrate vimentin and cytokine activity in tissues. Primary antibodies used in the current study are provided in Table 1.

Table 1. Characteristics of the antibodies used in this study.

Monoclonal/ polyclonal	Company	Catalog number	Target antigen	Target Species	Dilution and Incubation
Monoclonal	Santa-Cruz (Dallas, Texas, USA)	sc-81714	pan-Cytokeratin Antibody (AE1/AE3)	-	1/50- 1 hour
Monoclonal	LSBio (Seattle, Washington, ABD)	LS-C40181	Vimentin	Pig, Human, Monkey, Mouse, Rat, Bovine, Cat, Dog, Hamster, Horse, Rabbit, Chicken	1/100- 1 hour

Phosphate buffer solution (PBS) (pH 7.4) was applied to the tissues as negative control, and primary antibodies were applied the control tissues recommended by the manufacturers of primary antibodies as positive control. The 5 µm thick sections were taken on adhesive slides with the help of a microtome from the prepared paraffin blocks. Sections were kept in 3% H₂O₂ solution for 10 minutes to block non-specific antigenic sites and washed for 3-5 minutes in PBS. The periphery of the tissue was wiped, the tissues were placed horizontally in a humid environment, and primary antibody was dropped on it, and incubated for one hour then washed for 3-5 minutes in PBS. After wiping the periphery of the cross section, the secondary antibody (with biotin) was dropped and incubated for 30 minutes at room temperature. Again, it was washed for 3-5 minutes in PBS and the periphery of cross section was wiped. Then Peroxidase-streptavidin was dropped and incubated for 30 minutes at room temperature. The slides were washed for 3-5 minutes in PBS and wiped. While positive cells were fixed with DAB chromogen, ground staining was done with Gill Hematoxylin for 1-3 minutes. It was later closed with entellan.

All slides were photographed with a digital camera (Olympus DP71) and digital programmers (DP Controller and the DP Manager) fitted to a microscope (BX-51, Olympus) (using x10, x20, x40).

RESULTS

The histological analysis results of the examined sections are presented in Table 2. Legally restricted animal tissues were detected in all sausages examined (18, 100%) along with meat and fats, which are the allowed main contents. Skeletal muscle, connective tissue, gland tissue, adipose tissue, bone and cartilage tissue were remarkable in all sections (Figures 1A-O and 2A-O).

In histological examination, herbal materials were observed in all of the examined sections from each of the sausage sample. Cortex of ranunculus root parenchyma, poppy seed and root of plants were present along with the frequently used spices such as paprika and allspice (Figure 3).

In the triple staining method (Crossman trichrome), one of the applied staining methods, elastic fibers were stained in pinkish red, nerve fibers sheaths in blue, connective tissue and cartilage intermediate substrates in tones of blue, and muscle and epithelial tissues were stained in reddish tones whereas cell nuclei were stained purplish black (Figure 1A, C, D-I, L-O). In Hematoxylin-Eosin staining, cell cytoplasm of different tissue types was stained in pink and red tones; cell nuclei were stained in purple (Figure 1B, J, K).

It was shown whether the tissue types were of epithelial or mesenchymal origin with the antibodies used in immunohistochemical staining and cytokeratin vimentin. As a result of staining, the positive reaction was stained with a dark brown color (Figure 2).

DISCUSSION

In this study, skeletal muscle, adipose and connective tissue allowed to be present in sausage samples and animal tissues that are not legally allowed to be added to the sausage dough were detected in all of the fermented sausage samples. Although skeletal muscle and connective tissue are the main components found in sausages, the quality of sausage is closely related to the amount of these components [9]. Although a histometric measurement was not performed in this study, in the microscopic examination of the preparations, the level of the presence of connective tissue in 9 (50%) of the samples was the same or more than the muscle tissue. The level of connective tissue determined in this study is quite compatible with the results of Ince and Özfilliz [19].

Although the skeletal muscle contains certain amounts of connective tissue [17], the nutritional value of fermented sausages containing large amounts of connective tissue is decreased due to the fact that the lower bioavailability of the connective tissue protein than the muscle protein [27, 28]. In the Turkish Food Codex, the collagen connective tissue protein is allowed to be maximum 20% of the total meat protein in the fermented sausage [6].

Table 2. Histological examination results of fermented sausage samples

Sample No	Skeletal Muscle*	Connective Tissue	Adipose Tissue	Collogen Fibres	Nerve Tissue	Glandular Tissue	Cartilage and Bone Tissue	Lung Tissue	Heart Tissue	Spleen Tissue	Blood Vessels	Glandular Epitelium	Plant Materials
1	+	+	+	+		+	+				+		+
2	+	+	+	+	+	+	+	+				+	+
3	+	+	+	+		+	+		+		+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+			+	+		+
5	+	+	+	+		+	+						+
6	+	+	+	+	+	+	+	+				+	+
7	+	+	+	+		+	+				+		+
8	+	+	+	+		+	+		+	+		+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+					+	+
11	+	+	+	+		+	+						+
12	+	+	+	+		+	+				+		+
13	+	+	+	+	+	+	+					+	+
14	+	+	+	+		+	+				+		+
15	+	+	+	+	+	+	+					+	+
16	+	+	+	+		+	+						+
17	+	+	+	+	+	+	+				+	+	+
18	+	+	+	+		+	+			+	+	+	+
Total n (%)	18 (100)	18 (100)	18 (100)	18 (100)	8 (44.4)	18 (100)	18 (100)	3 (16.7)	2 (11.1)	3 (16.7)	9 (50)	9 (50)	18 (100)

*(+) indicates the presence

In the present study, nerve, glandular, cartilage, bone, lung, heart, spleen tissues, blood vessels and glandular epithelium were found in the investigated samples (Table 2, Figures 1 and 2). Similarly, in studies conducted with histological examination, it has been reported that disallowed tissues are detected in meat products. In several previous studies in Turkey, tendon and ligament, nerves, cartilage and salivary gland were found by Atasever et al. [17] in the samples of fermented sausages offered for consumption in Konya province; skin and digestive system epithelial tissues, cellular structures of internal organs, cartilage and bone were reported by Ayaz et al. [12] in the fermented sausages sent to the Food Control Laboratory in Ankara; Sezer et al. [4] observed epithelial tissue, sero-mucous glandular epithelium, smooth muscle tissue, cartilage and bone tissue in fermented sausages produced by traditional methods in butcher's shops and heat-treated sausages purchased from markets in Kars. Kılıç Altun et al. [18] found cartilage tissue, lymph tissue, and connective tissue in the fermented sausage samples offered for sale in Erzurum. İnce and Özfiliz [19] also have reported that they detected nervous tissue, smooth muscle, tendon, ligament, bone and cartilage tissues in fermented and heat-treated sausages obtained from different companies.

In studies conducted in other countries; it has been reported by Ghisleni et al. [9] that nervous tissue, blood vessels, adipose tissue, upper digestive system mucosa, cartilage and glandular tissues are present besides skeletal muscle in the meat filling of tortelline, which is a popular pasta unique to Italy. Marcincak et al. [29] have reported bone tissue in a traditional meat product purchased from markets in Slovakia and the Czech Republic, and Latorre et al. [11] have reported presence of cartilage and lymph nodes in sausages in Iran. Glandular and nervous tissues were also detected in cured sausage samples in a study conducted by Malakauskiene et al. [13] in Lithuania. In a study of Mokhtar et al. [14] conducted in Egypt, adulteration was

determined in 88% of minced meat and 100% of sausages, similar to this study bone, cartilage, smooth muscle fibers, nerve cells, tendon were present in sausages.

Similar to the results that we obtained from this study, previous studies have shown the presence of not allowed tissues in meat products. In this study, the presence of bone tissue may suggest that remaining part of meat trimmings and meat scraps are added to the fermented sausage dough. Similarly, use of the offal such as heart, lung and spleen with low commercial value as well as glandular tissue with no commercial value suggests the possible tendency gaining unfair profit by reducing the production cost of fermented sausage. It is thought that the diversity between the findings of the studies may be due to the differences in production practices, the staining methods of the histological sections and the number of examined samples.

Ingredients of plant origin as flavoring agents have been used in the production of fermented sausage as well as animal tissues [6]. In this study, plant materials such as cortex of ranunculus root parenchyma, paprika, poppy seed, allspice, root of plants were detected in the examined sections. Although soya was detected in all processed meat products examined by Latorre et al. [11], it was not detected in this study. In many countries including Turkey, soya is in the list of substances that cause allergies, and it is a legal requirement to be indicated on the product's label [21, 22]. Poppy seed was determined similar to the study conducted by Mokhtar et al. [14] in addition to paprika and allspice, which are frequently used by fermented sausage producers in Mardin (Turkey). Addition of tissues such as central nervous system, a possible vector of infective agents, [8, 11, 20] may cause health problems and use of plant-derived ingredients in sausages without specifying at the label is not legally permitted because of their possible allergic effects [21, 22].

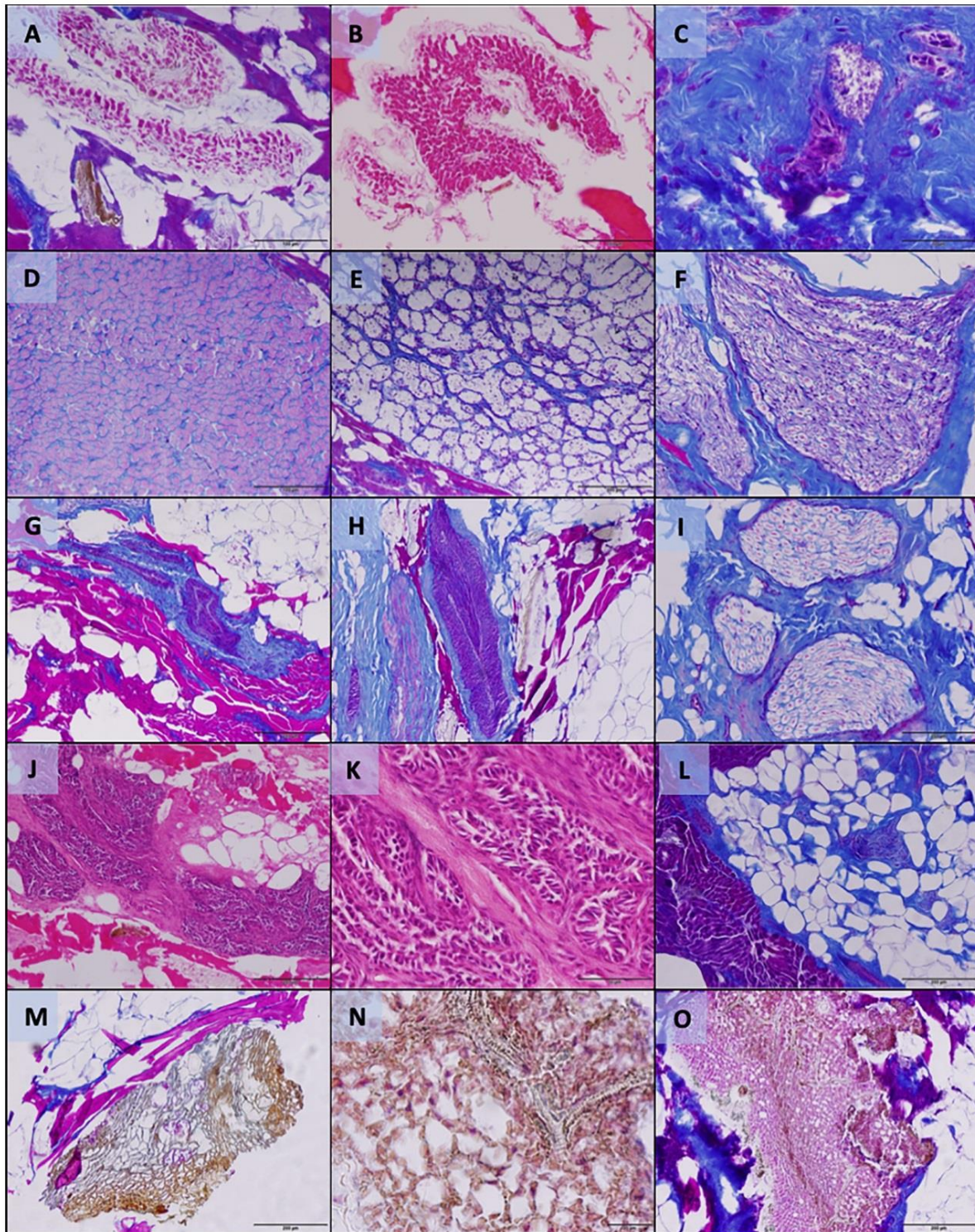


Figure 1. Representative examples of different types of tissues identified by microscopic analysis in fermented sausage food preparations. A, B) Histological section shows heart tissue (C) Spleen tissue in cross section with connective tissue. (D) Cross section of a connective tissue and skeletal muscle (E) Glandular tissue and blood vessels in examined fermented sausage (F) Cross section of a peripheral nerve fascicle (G, H) Spleen trabecule with skeletal muscle and adipose tissue in examined fermented sausage. J-L) Histological section shows glandular tissue with adipose tissue in fermented sausage. M-O) Histological section shows lung tissue with bronches. Stain of plate: Hematoxylin and Eosin (B, J, K). Crossman trichrome stain (A, C, D-I, L-O). Bars of plate: 20 μ m (N), 50 μ m (C, K), 100 μ m (A, B, D, F), 200 (E, G, H, I, J, L, M, O)

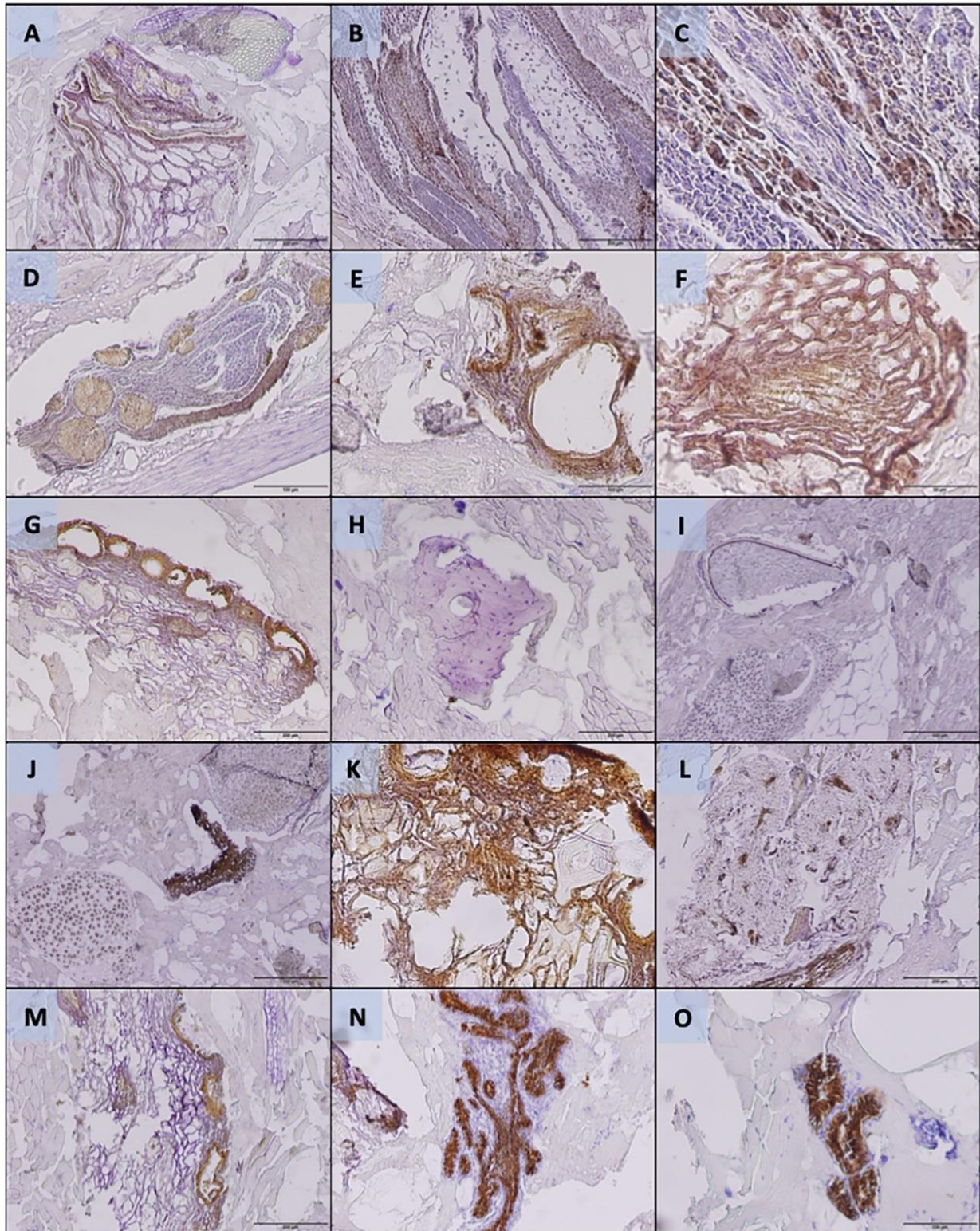


Figure 2. Immunohistochemistry positivity of different animal tissue. Cytokeratin AE1/AE3 positive immunoexpression in all glandular luminal and glandular epithelial cells of (C-G, K, M-O) with blood vessels endotel. Vimentin positive immunoexpression in cartilage and bone tissue (B, H-J). Spleen spleen immunostained for vimentin. sinusoid wall shows strongly immunoreactive rod-like structures running parallel to the long axis and sinusoidal endothelium is immunoreactive (L). Stain of plate: Immunoperoxidase-3,39-diaminobenzidine (DAB chromogen and counterstained with hematoxylin). Bars of plate: 20 μ m (C), 50 μ m (F, K), 100 μ m (D, O), 200 (A, B, G, H, L, M), 500 μ m (E, I, J, N).

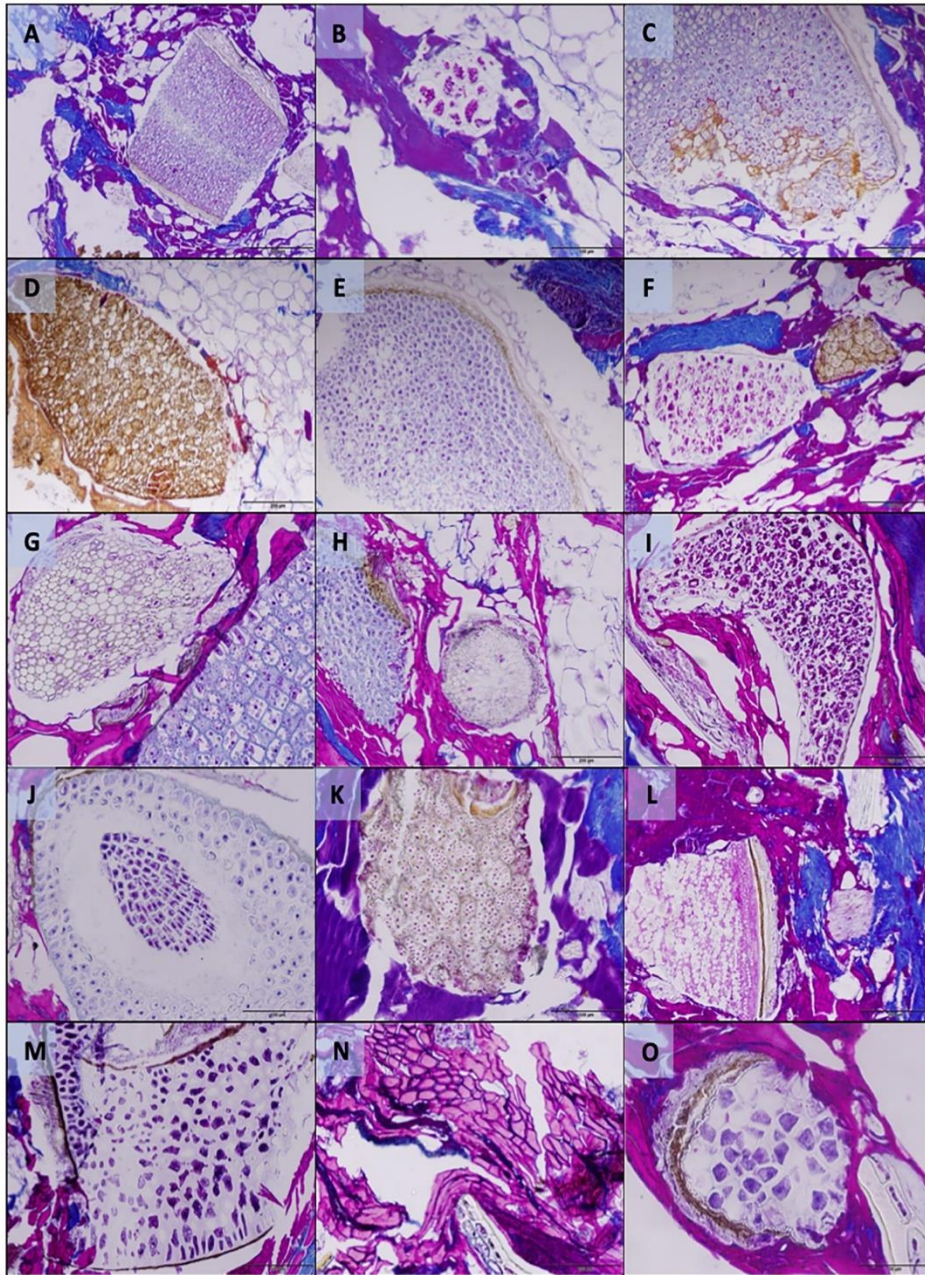


Figure 3. A-O) Histological presentation of plant tissues in fermented sausages. C, D, F) Cortex of ranunculus root parenchyma with starch grains. Note the yellow color additives. B, F, I) Chromoplasts inside plant cells in paraffin block section taken from a sausage sample prepared by adding red chili pepper to the product mortar. A, C, E, G, H, J) Cross section of poppy seed. K) Leucoplasts in a paraffin block section taken from a sausage sample prepared by adding allspice to the product mortar. L, M, N, O) Root of plants. Stain of plate: Crossman's trichrome. Bars of plate: 50 μm (A, E, O), 100 μm (B, J, K), 200 (C, D, F, G, H, I, L, M, N)

CONCLUSION

In this study, animal tissues that are legally not allowed to be added to the sausage dough were detected in all of analyzed fermented sausage samples. Such fraud practices may pose a risk for consumer health, as well as may result in reduction in nutritional value and overall quality of the product, economic deceit of the consumer and unfair competition among producers. Therefore, determination of the individual animal tissue types and plant materials in meat products with histological examination together with other quality control analyses such as microbiologic and chemical methods in order to

detect fraudulent productions is considered important for ensuring food safety and quality.

REFERENCES

- [1] Font-i-Furnols, M., Guerrero, L. (2014). Consumer preference, behaviour and perception about meat and meat products: An overview. *Meat Science*, 98(3), 361-371.
- [2] Stajic, S., Perunovic, M., Stanisic, N., Zujovic, M., Zivkovic, D. (2013). Sucuk (Turkish-style dry-fermented sausage) quality as an influence of starter formulation and inoculation of starter

- cultures. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37, 870-880.
- [3] Paulos, K., Rodrigues, S., Oliveira, A.F., Leite, A., Pereira, E., Teixeira, A. (2015). Sensory characterization and consumer preference mapping of fresh sausages manufactured with goat and sheep Meat. *Journal of Food Science*, 80(7), 1568-73.
- [4] Sezer, Ç., Aksoy, A., Çelebi, Ö., Deprem, T., Ögün, M., Oral, N.B., Vatansver, L., Güven, A.i. (2013). Evaluation of the quality characteristics of fermented sausages and sausage-like products sold in Kars. *Eurasian Journal of Veterinary Science*, 29(3), 143-149.
- [5] Gürbüz, S. Çelikel Güngör, A. (2018). Mardin'de satışa sunulan geleneksel fermente sucukların bazı mikrobiyolojik ve kimyasal özellikleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, UGAP2018: 28-32.
- [6] TGK (Türk Gıda Kodeksi). (2019). Türk Gıda Kodeksi Et, Hazırlanmış Et Karışımları ve Et Ürünleri Tebliği, Tebliğ No: 2018/52. 29 Ocak 2019 tarih ve 30670 sayılı Resmi Gazete, Ankara.
- [7] TSE (Türk Standartları Enstitüsü). (2012). TS 1070 Türk Sucuğu. Mart 2012. Ankara.
- [8] Everstine, K., Spink, J., Kennedy, S. (2013). Economically motivated adulteration (EMA) of food: Common characteristics of EMA incidents. *Journal of Food Protection*, 76(4), 723-735.
- [9] Ghisleni, G., Stella, S., Radaelli, E., Mattiello, S., Scanziani, E. (2010). Qualitative evaluation of tortellini meat filling by histology and image analysis. *International Journal of Food Science*, 45, 265-270.
- [10] Sentandreu, M.A., Sentandreu, E. (2014). Authenticity of meat products: Tools against fraud. *Food Research International*, 60, 19-29.
- [11] Latorre, R., Sadeghinezhad, J., Hajimohammadi, B., Izadi, F., Sheibani, M.T. (2015). Application of morphological method for detection of unauthorized tissues in processed meat products. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 2, 71-74.
- [12] Ayaz, Y., Kaplan, Y.Z., Ayaz, N.D., Aksoy, M.H. (2012). Et ürünlerinin histolojik muayenesi. *Etilik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 23(2), 49-56.
- [13] Malakauskiene, S., Alioniene, I., Dziugiene, D., Babrauskiene, V., Riedel, C., Thomas Alter, T., Malakauskas, M. (2016). Histological analysis for quality evaluation of cured meat sausages. *Veterinarija Ir Zootechnika*, 74 (96), 23-26.
- [14] Mokhtar, D.M., Abd-Elaziz, D.M., Youssef, H., Taha, A. (2018). Applied histological and chemical analysis for detection of minced meat and sausage. *Journal of Advanced Microscopy Research*, 13, 3.
- [15] Migaldi, M., Rossi, G., Sgambato, A., Farinetti, A. Mattioli A.V. (2016). Histological and immunohistochemical analysis of meat-based food preparations. *Progress in Nutrition*, 18(3), 276-282.
- [16] Sadeghinezhad, J., Hajimohammadi, B., Izadi, F., Yarmahmoudi, F., Latorre, R. (2015). Evaluation of the morphologic method for the detection of animal and herbal content in minced meat. *Czech Journal of Food Science*, 33, 564-569.
- [17] Atasever, M., Çelik, İ., Keleş, A., Boydak, M. (1999). Fermente sucuklardaki doku tiplerinin histolojik yöntemlerle belirlenmesi. *Veteriner Bilimleri Dergisi*, 15(1), 147-154.
- [18] Kılıç Altun, S., Temur, A., Harem, İ.Ş. (2015). Erzurum ilinde satışa sunulan fermente sucuk ve sosislerin histolojik muayenesi. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 4(2), 73-79.
- [19] İnce, E., Özfiliz, N. (2016). Türkiye'de süpermarketlerde satışa sunulan fermente ve ısıtılmış işlem görmüş sucukların histolojik muayene ile kalitelerinin belirlenmesi. *Uludağ University Journal of Faculty Veterinary Medicine*, 35,17-23.
- [20] Abdel-Maguid, D.S., Zaki, R.S., Soliman, S.A., Abd-Elhafeez, H.H., Mohamed, S.A. (2019). Fraudulence risk strategic assessment of processed meat products. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 9(3), 81-90.
- [21] Pospiech, M., Tremlová, B., Renčová, E., Randulová, Z. (2009). Immunohistochemical detection of soya protein – optimisation and verification of the method. *Czech Journal of Food Science*, 27, 11-19.
- [22] TGK (Türk Gıda Kodeksi). (2017). Gıda Etiketleme ve Tüketicileri Bilgilendirme Yönetmeliği. 26 Ocak 2017 tarih ve 29960 Mükerrer sayılı Resmi Gazete, Ankara.
- [23] Tremlova, B., Starha, P. 2003. Histometric evaluation of meat products – Determination of area and comparison of results obtained by histology and chemistry. *Food Science*, 21(3), 101-106.
- [24] Güçer, L., Gövercin, İ. (2010). Taklit veya tağşiş edilmiş et ve et ürünlerinin histolojik muayenesi. *Analiz 35 Dergisi*, 5, 24-28.
- [25] Guelmamene, R., Bennoune, O., Elgroud, R. (2018). Histological techniques for quality control of meat and meat products – A mini-review. *Journal of Nutrition and Human Health*, 2(2), 24-29.
- [26] Botka-Petrak, K., Hraste, A., Lucić, H., Gottstein, Ž., Đuras Gomerčić, M., Jakšić, S., Petrak, T. (2011). Histological and chemical characteristics of mechanically deboned meat of broiler chickens. *Veterinarski Arhiv*, 81, 273-283.
- [27] Ertaş, H., Kolsarıcı, N. (1983). Salam, sosis ve sucuklarda hidroksiprolin miktarı üzerine araştırma. *Gıda*, 8(5), 209-215.
- [28] Gezgin, T., Karakuş, Ş., Bülbül, H. (2020). Et ürünlerinde hidroksiprolin miktarının belirlenmesinde mikrodalga ile protein hidrolizi yönteminin araştırılması. *Gıda ve Yem Bilimi & Teknolojisi Dergisi*, 23, 25-29.
- [29] Marcincak, S., Pospiech, M., Macanga, J., Tremlova, B., Turek, P. (2014). Quality of sausages "Spišské párky" on Slovak and Czech markets. *Folia Veterinaria*, 58, 22-24.

Potential Use of Capsicum Pepper Powder and Natural Cheese Aroma in Turkish Delight (Lokum) Production

Hülya Gölcük¹ , Eda Karaalp¹ , Tuğba Yaman² , Hande Özge Güler Dal¹ , Yusuf Yılmaz¹  

¹Department of Food Engineering, Faculty of Engineering and Architecture, Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Istiklal Campus, 15030 Burdur, Turkey

²Department of Food Engineering, Institute of Natural and Applied Sciences, Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Istiklal Campus, 15030 Burdur, Turkey

Received (Geliş Tarihi): 19.06.2020, Accepted (Kabul Tarihi): 10.09.2020

✉ Corresponding author (Yazışmalardan Sorumlu Yazar): yilmaz4yusuf@yahoo.com (Y. Yılmaz)

☎ +90 248 213 27 22 📠 +90 248 213 27 04

ABSTRACT

Turkish delight, which is produced from sugar, starch and water as raw materials and can be enriched with different flavors and aromas, is a traditional dessert widely consumed around the world. Although there are many types of Turkish delight, capsicum pepper powder (CPP) and natural cheese aroma (NCA) added Turkish delights are not consumed in Turkey. In this study, the potential use of CPP and NCA in the production of flavored Turkish delights was studied to obtain a unique taste, flavor and color, and also the physical, chemical and sensorial properties of Turkish delights containing three different ratios of CPP and NCA were determined. For this purpose, capsicum pepper was dried and powdered, and commercial natural Cheddar cheese flavor was used to provide cheesy characteristic to Turkish delights. In capsicum pepper and cheese flavored Turkish delights, the ratios of CPP were 0.1, 0.3 and 0.5% (w/w) while the ratios of NCA were 6.5, 10.0 and 12.5% (w/w). The physicochemical properties such as color, dry matter and ash contents, total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC) and antioxidant activities and the sensory properties of Turkish delight samples were determined. The highest L* values were found in Turkish delights with 6.5% and 10.0% NCA concentrations ($p < 0.05$), and L* values generally decreased with an increase in NCA concentration. As the ratio of CCP and NCA increased, the TPC values of samples increased. The highest TPC and antioxidant activity values were found as 27.59 mg GAE/100g dm and 6.11 $\mu\text{mol TE}/100\text{g dm}$ for Turkish delights containing 0.5% CPP, respectively. There were statistically insignificant differences among TFC values ($p > 0.05$). Sensory analysis results indicated that Turkish delights containing 12.5% NCA had a high acceptability score, and CPP added Turkish delights were equally liked by panelists. In conclusion, CPP and NCA flavorings could be used in the production of Turkish delights for the development of a novel dessert product with a high consumer acceptability, and might provide health beneficial functional components.

Keywords: Lokum, Capsicum pepper, Antioxidant, Sensory, Phenolic

Çeşnili Lokum Üretiminde Kapsikum Biber Tozu ve Doğal Peynir Aromasının Kullanım Potansiyeli

ÖZ

Lokum, hammaddeleri olan şeker, nişasta ve suyun kullanımıyla üretilen, farklı tat ve aroma maddeleriyle zenginleştirilebilen, Türklere özgü bir tatlıdır. Lokumun birçok çeşidi olmasına rağmen ülkemizde kapsikum biber tozu (CPP) ve doğal peynir aroması (NCA) içeren lokum çeşitlerinin üretimi ve tüketimi mevcut değildir. Bu çalışmada, çeşnili lokum üretiminde CPP ve NCA'nın lokuma farklı bir tat, lezzet ve renk verilmesi amacıyla kullanım potansiyeli belirlenmiş; üç farklı oranda CPP ve NCA içeren lokumların fiziksel, kimyasal ve duyuşsal özellikleri araştırılmıştır. Bu

amaçla, kapsicum cinsi acı kırmızıbiberler kurutularak toz hale getirilmiş ve peynir aromalı lokum üretimi için ise doğal Çedar peynir aroması temin edilmiştir. Kapsicum biber tozlu lokuma ağırlıkça %0.1, 0.3 ve 0.5 oranlarında CPP, peynir aromalı lokuma ise %6.5, 10.0 ve 12.5 oranlarında NCA ilave edilmiştir. Ardından, elde edilen lokumların renk (CIELAB), kuru madde, toplam fenolik madde içeriği (TPC) ve toplam flavonid içeriği (TFC) ile antioksidan aktivite gibi fizikokimyasal özellikleri ile duyuşal özellikleri belirlenmiştir. En yüksek açıklık-koyuluk (L^*) değerleri %6.5 ve 10.0 oranında NCA içeren çeşnili lokum örneklerinde saptanmış ($p<0.05$), NCA çeşnili lokumlarda konsantrasyon artışı ile L^* değerleri genel olarak azalmıştır. Peynir aromalı ve biber tozlu lokumlarda CPP ve NCA konsantrasyonu arttıkça TPC değerlerinin arttığı belirlenmiştir. En yüksek TPC ve antioksidan aktivite değerleri %0.5 CPP içeren lokum için sırasıyla 27.59 mg GAE/100g km ve 6.11 μ mol TE/100g km olarak bulunmuştur ($p<0.05$). TFC değerleri arasında istatistiksel olarak farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). Duyusal analiz sonuçlarına göre, %12.5 NCA içeren lokumların kabul edilebilirlik skoru yüksek bulunmuş ve CPP çeşnili lokumlar ise panelistler tarafından eşit derecede beğenilmiştir. Sonuç olarak, CPP ve NCA çeşnilerinin, yüksek tüketici kabulüne sahip yeni bir tatlı ürününün geliştirilmesi için lokum üretiminde kullanılabileceği ve sağlığa yararlı fonksiyonel bileşenler sağlayabileceği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Lokum, Kırmızıbiber, Antioksidan, Duyusal, Fenolik

INTRODUCTION

Turkish delight, a traditional dessert, has existed in Anatolia and Ottoman lands since the 15th century when its name was announced to the world as "lokum", and has been widely consumed by many people with a great pleasure. Various types of lokum products have been developed since then. Originally, flour and honey were used to flavor Turkish delight products; however, starch, sugar and various flavorings are widely used in their production. Depending on the type of Turkish delight, dried and chopped fruits or nuts such as peanuts, hazelnuts, almonds, flower petals or food grade pine resin can be added to these main ingredients. Sometimes, natural colorants or essences specific to foodstuffs may be included in lokum formulations. Besides being attracted by the consumers and being the leading gift on special days or occasions, lokum may be good for health especially in curing or relieving various diseases like sore throat [1-3].

Capsicum pepper (*Capsicum annuum* L.) is a produce native to the tropical and subtropical countries of America, and in addition to its widespread use as a spice, it has a wide range of physiological and pharmacological effects on human health [4, 5]. Nadeem et al. [6] reported that the polyphenols of capsicum pepper may protect the body from oxidation caused by free radicals and reactive oxygen while its consumption stimulates the formation of bile and increases the secretion of bile acids that are important for the elimination of cholesterol from the body. They stated that besides being an excellent source of vitamin C and vitamin A, it is a good source of vitamin B6, folic acid, beta-carotene and fiber, and it contains an anticoagulant that prevents blood coagulation and reduces the risk of heart attack. Its lycopene content is important in reducing the risk of some types of cancer [6]. The red color of capsicum pepper comes from a mixture of carotenoid group color substances especially from the capsanthin and others carotene, capsorubin, zeaxanthin, cryptoxanthin and lutein, and the amount of color substances in the fruit is between 0.3 and 3.8% [7]. Many varieties of capsicum pepper exist, and it is an important vegetable in global cuisines, with plenty of vitamin C [5]. Capsaicin, which is known as an appetizer

enhancer and diuretic, has many pharmacological effects including analgesic, antitumorigenic, antioxidant, antimutagenic and anticarcinogenic, and it may reduce the plasma lipid concentration while stimulating digestive secretions and facilitating digestion [8].

Gelling agents (e.g. starch), sugar, acidity regulators and water are used in the production of Turkish delight. Starch is one of the most important components used in lokum production due to its high water holding capacity and by giving Turkish delight products their desired consistency. In order to eliminate the risk of syneresis (water release), some gelling agents can be added to starch [1, 9]. Also, sugar is one of the most important raw materials used in Turkish delight production. Sugar contributes to the formation of gel structure as well as adding sweet taste and structure to lokum products [10, 11]. Acidity regulators in Turkish delight production are used to hydrolyze sucrose and provide the appropriate pH for gel formation. Citric acid is widely used and preferred as an acidity regulator in lokum production. Incorporation of ground hazelnuts, peanuts, walnuts and dried fruit pieces into Turkish delight products for the development of unique consistency and natural flavor are called seasoning or flavoring. Seasonings are generally added to the Turkish delight at the last stage. Seasonings such as ground hazelnuts, coconuts, pistachios and walnuts can also be used as coating materials in Turkish delight [3, 10, 12].

To the best of our knowledge, there is no study in the literature on the physical, chemical and sensory properties of Turkish delight flavored with CPP or NCA. In this study, it was aimed to develop innovative Turkish delights that are naturally colored and healthy with high bioactive properties by using CPP or NCA as flavorings and to determine the physicochemical and sensorial properties of lokum products developed.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Fresh capsicum peppers (strongly hot) used in the production of CPP flavored Turkish delights were obtained from a local producer in Şanlıurfa (Turkey),

and natural cheddar cheese aroma (Boğaziçi Kimya ve Gıda San. Tic. Ltd. Şti., Tekirdağ, Turkey) was used for the NCA added Turkish delights. Also corn starch (İnci, Emin Gıda Pazarlama San. ve Tic. Ltd. Şti., İstanbul, Turkey), sugar and powdered sugar (Petek, Nar Gıda Maddeler San. ve Tic. Ltd. Şti., Konya, Turkey) and drinking water (Nazli, Aydın, Turkey) were used in the production of Turkish delights. Lemon juice is obtained by squeezing the juice of fresh lemons obtained from a national market in Burdur (Turkey).

Chemicals used in analyses were Trolox®, diammonium salt of ABTS, sodium acetate.3H₂O, Folin-Ciocalteu reagent, gallic acid, catechin, AlCl₃.6H₂O, NaOH from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany) and sodium carbonate from Riedel-de Haen (Germany). NaNO₂ and ethanol (HPLC grade) were supplied from Merck (Darmstadt, Germany).

Methods

Turkish Delight Production

For capsicum pepper powder production, peppers were washed, separated from foreign materials and unwanted parts prior to drying. Then, capsicum peppers were cut into four equal pieces longitudinally and placed on an aluminum foil. Pieces of capsicum peppers were dried by natural convection in a preheated oven (FN 500, Nüve, Ankara, Turkey) for 5 hours at 85°C. Dried capsicum peppers were powdered by a coffee grinder and were sieved with a 0.250 mm mesh opening sieve.

For the production of Turkish delights, table sugar (400 g) and drinking water (400 mL) were mixed by mixer (Arzum AR1069 Cust Mix Stand Mixer, İstanbul, Turkey). After corn starch (60 g) was dissolved in drinking water (50 mL), fresh lemon juice (10 mL) was added. Preliminary studies indicated that for the CPP flavored Turkish delight production, 0.1, 0.3 and 0.5% concentration of CPP were required for the development of desired hot character in lokum products, and it needed to be included into the mixture at the last 3 min until it reached a homogeneous consistency. Initially, the mixture of sugar, water and lemon juice was transferred to a fryer (Tefal Actify Express, France) and subjected to heat treatment at 180°C for 50 min to produce the final Turkish delight dough. Cooking time and aroma ratios were decided according to the pre-sensory determinations by a laboratory group to get acceptable levels of taste and consistency. After each Turkish delight dough sample was ready in the fryer, it was poured into a glass square bowl, previously covered with a mixture of corn starch and powdered sugar (1:1, w/w). Then, the surface of lokum products was smoothed and covered with this mixture, cooled and molded.

The same production procedure was used for the cheese flavored Turkish delights. In the preliminary tests for cheese flavored Turkish delight production, freeze-dried fresh white cheese powder was used but cheese flavor was unable to be detected sensorily in a final product because of the evaporation of aromatic

substances at a high temperature during production. As the ratio of freeze-dried cheese powder was increased, undesired cheese flavor (similar to spoiled cheese) was detected. Unfortunately, any desired lokum product could not be obtained because of high temperatures used during lokum production. Since trials with freeze-dried cheese powder were unsuccessful, fat-free fresh cheese was included into lokum formulation at the first stage of production, but lokum sample had a taste and consistency similar to "hosmerim" dessert, which is widely consumed in the Balıkesir region of Turkey. It was concluded that the production of Turkish delight with natural cheese aroma would be more appropriate. Natural Cheddar cheese aroma was used in the following trials, and cheese aroma was added at the last 3 min of the process since the cheese aroma was significantly lost during production. The ratio of cheese aroma was adjusted to be felt in mouth at an acceptable level in the final product during preliminary trials. In NCA flavored Turkish delight experiments, with the addition of 6.5, 10.0 and 12.5% cheese aroma, the desired cheese flavor was achieved and these concentrations were considered as acceptable.

Determination of Dry Matter and Ash Contents

Since Turkish delight contains sugar, and water molecules are formed during drying at temperatures higher than 100°C, drying was carried out at 70°C for the determination of dry matter content. Drying continued until a constant weight was obtained [13]. For the ash content determination, Turkish delights were divided into small pieces and approximately 10 g were weighed into each porcelain mortars. In order to prevent samples from foaming, pre-drying process was applied in an oven at 150°C. Then, temperature was increased gradually at an hour interval, and the samples were burned at 550°C. Ash contents of samples were determined gravimetrically [13].

Color Analysis

Color analysis was performed by a colorimeter device (Konica Minolta Chroma Meter, CR-400, Japan) in CIELAB system (L*, a*, b*). Color measurements were achieved for each sample before it was covered by corn starch and powdered sugar in a glass square bowl. In the color measurements of products, L*, a* and b* color parameters were determined by taking the average of at least three measurements from the top and middle parts of the samples.

Preparation of the Extracts

In order to prepare the extracts, Turkish delight samples (10 g) were weighed, cut in small pieces by a sharp knife. Samples were put into a volumetric flask and 70% (v/v) aqueous ethanol solution (50mL) was added (1:5, w/v). Then, the top of each flask was sealed with parafilm and aluminum foil. In order to obtain a homogeneous mixture, it was mixed in the orbital shaker (Widhshake, Daihan Scientific Co. Ltd., Korea) for 90 min at 250 ppm, followed by ultrasonication in an ultrasonic water bath (WUCD06H, Daihan Scientific Co.

Ltd., Korea) for 30 min. Homogeneous mixture was then transferred into Eppendorf® tubes, and micro-centrifuged (WiseSpin, CF-10, Daihan Scientific Co. Ltd., Korea) at 13,500 rpm for 2 min. Supernatants were used in following analyses.

Total Phenolic Content (TPC)

“Micro-adapted Folin-Ciocalteu” method was used in the determination of total phenolic content [13]. For this purpose, supernatants (0.5 mL) were put into test tubes and Folin Ciocalteu agent (2.5 mL) was added into each tube. 3 min after the reaction started, 2 mL of 20% Na₂CO₃ solution was added and the mixture was kept in the dark for 2 h. At the end of this period, the absorbance values of samples were obtained at 760 nm wavelength by a spectrophotometer (Optizen Pop, Mecasys Co., Ltd., Daejeon, Korea), and results were expressed as mg gallic acid equivalent (GAE) per 100 g Turkish delight samples.

Total Flavonoid Content (TFC)

Total flavonoid content was determined according to the method of Zhishen et al. [14]. In this assay, catechin solution was prepared at 20, 40, 60, 80 and 100 mg/L concentrations and used to obtain a calibration curve. The extract or standard (1 mL) was mixed with distilled water (4 mL) and 5% NaNO₂ (0.3 mL) was added. After 5 min, 0.3 mL of 10% AlCl₃ was added to the mixture and waited for a min. Then, 2 mL of 1M NaOH added. Immediately after, 2.4 mL of distilled water was added to the mixture and it was shaken vigorously. The resulting pink color was read at 510 nm wavelength by a spectrophotometer, and results were expressed as mg catechin equivalent (CE) per 100 g Turkish delight sample [13].

Antioxidant Activity (ABTS)

Antioxidant activity was determined with the ABTS (2,2'-azinobis- (ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) method of Miller et al. [15]. This method is based on the principle of determining the color of the ABTS^{•+} radical formed as a result of the oxidation of ABTS^{•+} at a certain wavelength, and the result is expressed as the “TEAC value” (Trolox® equivalent antioxidant capacity) [15]. Specifically, 7 mM ABTS diammonium salt was solved in water and treated with 2.45 mM potassium persulfate, and the mixture was left at room temperature for about 12-16 hours until it became a dark blue color (stock solution). Stock solution was added with ethanol until the absorbance value of 1.10±0.05 was obtained. 150 µL of supernatant was added with 2850 µL of working solution and left in the dark for 30 min. Absorbance values were read in a spectrophotometer at a wavelength of 734 nm. The linear calibration curve was obtained with Trolox® solution, and results were expressed as µmol Trolox® equivalents (TE) per 100 g Turkish delight samples.

Sensory Analysis

In sensory analysis, Turkish delight samples containing three different concentrations of CPP and NCA were subjected to the ranking test [16]. Students (n=12) at the Department of Food Engineering in Burdur Mehmet Akif Ersoy University (Burdur, Turkey) were used as panelists. During the analysis, samples were presented to panelists in white plastic plates coded each by a random three-digit number. The panelists were asked to rank the samples according to their liking as stated by Altuğ Onoğur and Elmacı [16].

Statistical Analysis

Each experiment was run in triplicates while chemical and physical analyses in this study were performed in duplicates for each sample. For statistical evaluation, analysis of variance (ANOVA) was applied to the data by SAS package program (The SAS System for Windows 9.0, Chicago, USA) and statistical differences were determined. The statistical difference of means was obtained by the Duncan multiple comparison test at the level of $\alpha=0.05$. Results were expressed as mean±standard deviation.

RESULTS AND DISCUSSION

In this study, CPP and NCA flavored Turkish delights were produced (Figure 1) and dry matter, ash, color, total phenolic, total flavonoid contents and antioxidant activities of the Turkish delights were determined. The results of the analyses are presented below.

Color Analysis

The color parameters (L*, a* and b*) of Turkish delights produced with CPP and NCA are presented in Table 1. According to Table 1, the color L* values of CPP flavored Turkish delights changed insignificantly by CPP concentration ($p>0.05$). Inverse relationship between the L* values and the NCA concentration in Turkish delights were observed. Among the NCA added Turkish delights, the lowest L* value was determined for the samples added with 12.5% NCA (31.02) ($p<0.05$). The highest L* value of the Turkish delight was determined for the samples containing 6.5% of cheese aroma (40.41); however, its difference from the L* value of 10% NCA added sample was found statistically insignificant ($p>0.05$).

The highest a* value was found in Turkish delights containing 0.3% of CPP (9.12) ($p<0.05$) while it reduced slightly in samples containing 0.5% of CPP (8.21). Higher a* values are indicator for an increase in red colored pigments of Turkish delight samples. The a* values of NCA added Turkish delights were generally low than those of CPP added Turkish delights ($p<0.05$). The highest b* value (4.90) was determined for the Turkish delights containing 0.3% of CPP. Like the a* values, the b* values of NCA added Turkish delights were generally lower than those of CPP added samples ($p<0.05$). By an increase in NCA concentration, the color

of samples turned from yellow to blue based on decreased b* values.

Hayoğlu et al. [17] demonstrated that the addition of 17-19% pomegranate arils was ideal for the production of Sultan-type Turkish delights. They reported the L* value of pomegranate aril added Sultan Turkish delights as 79.55, while the color a* and b* values were 0.11 and 7.61, respectively. Adding cornelian cherry as a natural coloring agent to Turkish delights during storage, Akpunar [18] found the L* values of samples as between 30.70-62.3. Also, the color a* values ranged from -1.7 to 14.10 and b* values from 5.0 to 13.5. Adding black grape and sour cherry fruit syrups into Turkish delights, Batu and Arslan [19] reported that the L* values of samples varied from 24.43 to 41.10, a* values from -4.08 to 4.37, and b* values from 1.63 to 3.20 while the a

* value decreased as the concentration of sour cherry syrups increased from 2.5 to 7.5%.

In a study by Ozen et al. [20], traditional Turkish delights were colored by the concentrate of black carrot juice, and L* values from 26.02 to 27.13, a* values from 4.8 to 6.4 and b* values from -1.20 to -0.28 were reported during storage (0-15 day) at different temperatures (12-30°C). Kaya et al. [21] produced Turkish delights with pomegranate juice, and reported that the L* values of samples varied from 27.43 to 43.94, the a* values from -0.66 to 14.45 and b* values from -1.67 to 4.08. According to literature studies, it can be said that the color values of Turkish delights with different flavorings vary in a wide scale, and color values generally have a good agreement with the results of the current study.

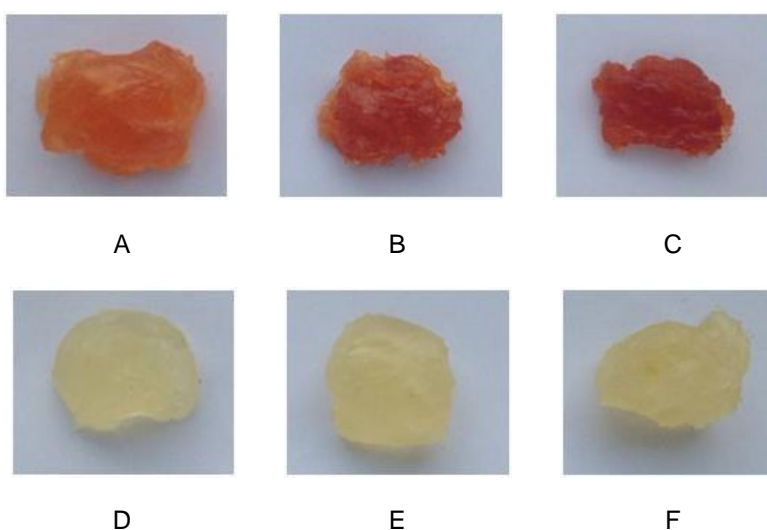


Figure 1. Turkish delight samples produced with capsicum pepper powder (A, 0.1%; B, 0.3% and C, 0.5%) and natural cheese aroma (D, 6.5%; E, 10.0% and F, 12.5%)

Table 1. Color properties of Turkish delights flavored with CPP and NCA

Flavor	Flavor concentration (%)	L*	a*	b*
CPP	0.1	32.84±1.43 ^B	2.99±0.72 ^C	0.78±0.49 ^C
	0.3	33.08±0.85 ^B	9.12±0.70 ^A	4.90±0.24 ^A
	0.5	33.66±0.57 ^B	8.21±0.33 ^B	2.53±0.30 ^B
NCA	6.5	40.41±0.44 ^A	0.54±0.04 ^D	-0.08±0.71 ^D
	10.0	38.18±2.37 ^A	0.57±0.12 ^D	-0.25±0.25 ^D
	12.5	31.02±1.83 ^B	-0.15±0.10 ^D	-0.85±0.37 ^D

^{A-D}: Different letters in a column show statistical differences among means (p<0.05).

Dry Matter and Ash Contents

Results for the dry matter and ash contents of Turkish delights produced with CPP and NCA flavorings are given in Table 2. According to Table 2, the dry matter content of Turkish delights containing 10% NCA was 94.00% and the sample containing 0.5% of CPP had a dry matter content of 91.92%. Differences in dry matter contents among Turkish delights were found statistically insignificant (p>0.05).

In a study [22] on the properties of four unpackaged Turkish delight samples obtained from two different locations in Çanakkale (Turkey), the dry matter contents

of samples were reported to vary between 78.4 and 93.0%.

Table 2. Dry matter and ash contents of Turkish delights with CPP and NCA flavorings

Flavor	Concentration (% w/w)	Dry matter content (%)
CPP	0.1	93.58±0.04 ^A
	0.3	92.31±0.08 ^A
	0.5	91.92±0.21 ^A
NCA	6.5	93.87±4.49 ^A
	10.0	94.00±0.03 ^A
	12.5	93.08±0.49 ^A

^A: Different letters in a column show statistical differences among means (p<0.05).

In another study [17], the dry matter and ash contents of Sultan-type Turkish delights with pomegranate arils were determined as 86.39% and 0.29%, respectively. Akpunar [18] added cornelian cherry as a natural coloring agent to Turkish delights, and reported that the dry matter of samples ranged from 90.33 to 98.8 and ash contents from 0.07 to 2.16 during storage. Kaya et al. [21] produced pomegranate juice added Turkish

delights and reported dry matter values ranging from 80.55 to 84.82%.

TPC, TFC and Antioxidant Activity Values

The TPC, TFC and antioxidant activity values of Turkish delights produced with CPP and NCA flavorings are demonstrated in Table 3.

Table 3. Total phenolic (TPC) and flavonoid contents (TFC) and antioxidant activities of Turkish delights produced with CPP and NCA flavorings

Flavor	Concentration (% w/w)	TPC (mg GAE/100g dm)	TFC (mg CE/100g dm)	Antioxidant activity ($\mu\text{mol TE}/100\text{g dm}$)
CPP	0.1	15.23 \pm 1.32 ^D	6.03 \pm 3.99 ^A	3.18 \pm 0.05 ^C
	0.3	24.60 \pm 1.05 ^B	8.25 \pm 2.37 ^A	5.46 \pm 0.55 ^B
	0.5	27.59 \pm 1.23 ^A	10.18 \pm 2.15 ^A	6.11 \pm 0.18 ^A
NCA	6.5	14.83 \pm 2.76 ^D	15.31 \pm 4.78 ^A	2.19 \pm 0.20 ^D
	10.0	15.45 \pm 1.66 ^D	12.09 \pm 5.98 ^A	2.12 \pm 0.21 ^D
	12.5	18.05 \pm 1.19 ^C	13.84 \pm 5.60 ^A	2.36 \pm 0.11 ^D

^{A-D}: Different letters in a column show statistical differences among means ($p < 0.05$).

According to Table 3, the highest TPC was found as 27.59 mg GAE/100 g dm for the Turkish delights containing 0.5% CPP ($p < 0.05$). Among the CPP added samples, the difference was found statistically significant ($p < 0.05$), and the lowest TPC value was found for 0.1% of CPP added Turkish delights as 15.23 mg GAE/100 g dm. The highest TPC among the NCA added Turkish delights was found for 12.5% of NCA added samples as 18.05 mg GAE/100g dm ($p < 0.05$). TPC values were generally increased by an increase in the concentration of flavorings.

The TFC value of Turkish delights containing 0.5% CPP was 10.18 mg CE/100g dm, and it was 6.03 mg CE/100g dm for the samples containing 0.1% CPP ($p > 0.05$). While the TFC value of 6.25% NCA flavored Turkish delights was determined as 15.31 mg CE/100g dm, it was found as 12.09 mg CE/100g dm for 10% NCA ($p > 0.05$). Generally, the TFC values of samples increased with an increase in CPP concentration, and they decreased with an increase in the concentration of NCA. On the other hand, differences in TFC values among Turkish delights were found statistically insignificant ($p > 0.05$).

The highest antioxidant activity was determined as 6.11 $\mu\text{mol TE}/100\text{g dm}$ in Turkish delights containing 0.5% CPP ($p < 0.05$). The lowest antioxidant activity among CPP added samples was found as 3.18 $\mu\text{mol TE}/100\text{g dm}$ for Turkish delights with 0.1% CPP addition ($p < 0.05$). The difference in the antioxidant activities among NCA added Turkish delights was found statistically insignificant ($p > 0.05$).

Batu and Arslan [19] added black grape and sour cherry fruit syrups into Turkish delights and found that the TPC and antioxidant activity values of samples increased with an increase in flavoring concentration from 2.5 to 7.5%. Kaya et al. [21] reported the TPC values of Turkish delights with pomegranate juice between 201.33 and 760.33 mg GAE/kg. In the presents study, as the CPP concentration increased in Turkish delights, their TPC and antioxidant activity values also increased,

which indicated that these results were in good agreement with the literature.

Sensory Analysis

Results of the sensory analysis for Turkish delights produced with CPP and NCA flavorings are given in Table 4.

Table 4. Sensory analysis results of Turkish delight samples with CPP and NCA flavorings

Flavor	Concentration (% w/w)	Ranking score
CPP	0.1	2.08 \pm 0.90 ^{BA}
	0.3	2.00 \pm 0.85 ^{BA}
	0.5	1.92 \pm 0.79 ^{BA}
NCA	6.5	1.92 \pm 0.79 ^{BA}
	10.0	1.58 \pm 0.67 ^B
	12.5	2.50 \pm 0.80 ^A

^{A-B}: Different letters in a column show statistical differences among means ($p < 0.05$).

Ranking score for 0.1% CPP flavored Turkish delights was determined as 2.08, while it was 1.92 for the 0.5% CPP added Turkish delights ($p > 0.05$). It was found that liking scores decreased with an increase in CPP concentration; however, the difference in ranking scores among CPP flavored Turkish delights was found statistically insignificant ($p > 0.05$), which indicated that panelists liked samples equally.

While the ranking score for the 12.5% NCA flavored Turkish delights was 2.50, it was 1.58 for the samples containing 10% NCA. The difference between the ranking scores of these samples was found statistically significant ($p < 0.05$). In a study on Turkish delights produced by the addition of cornelian cherry as a natural coloring agent, Akpunar [18] reported that the highest desirability in sensory analysis was found for the samples which contained 12.2% cornelian cherry pulp. Batu and Arslan [19] found that Turkish delights produced with 2.5% fruit juice concentrates had the highest acceptability score on appearance, color, aroma, and overall acceptability.

CONCLUSION

Although there are many types of Turkish delights, CPP and NCA flavored Turkish delights are neither produced nor consumed in Turkey. In this study, potential use of CPP and NCA in the production of Turkish delights as flavorings were determined. Dry matter and ash contents, color analyses, total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant activity and sensory analyses were carried out to determine the characteristics of these potentially novel types of Turkish delights. When the lightness values were considered, the highest value was determined for the Turkish delights with 6.5 and 10.0% NCA addition, and it decreased with an increase in the concentration of NCA. The lightness values of the NCA added samples were generally higher than those of the CPP added samples. In terms of TPC values, as the ratio of CPP and NCA increased in formulation, TPC values increased, and the highest value was found as 27.59 mg GAE/100 g dm for Turkish delights containing 0.5% CPP. According to the results of TFC, it was 15.31 mg CE/100 g dm for Turkish delights containing 6.5% NCA flavoring. In terms of the total antioxidant activities of Turkish delights, the highest value was found as 6.11µmol TE/100g dm for Turkish delights containing 0.5% CPP. According to sensory analyses, Turkish delights containing 12.5% of cheese had a ranking score of 2.50. CPP flavored Turkish delights, which might have a different taste (hot and sweet) for general consumers, equally liked by panelists, and its ranking score decreased slightly as its concentration increased. In the current study, healthy, naturally colored and sweet Turkish delight samples were produced, and these novel products could be potentially produced by the lokum industry and attract consumers' appreciation. With high bioactive properties, Turkish delights with CPP flavorings may be more beneficial as a traditional food and providing added value to the food industry and economy.

ACKNOWLEDGEMENT


This study was financially supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) under the 2209-A Program.

REFERENCES

- [1] Minifie, B.W. (1989). Chocolate, Cocoa, and Confectionery: Science and Technology. AVI Book, New York, USA.
- [2] Batu, A., Kırmacı, B. (2006) Lokum üretimi ve sorunları. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 37-49.
- [3] Akbulut, M., Özen, G. (2008). Kayısı lokumu üretimi ve beslenmedeki önemi. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 1, 7-11.
- [4] Şalk, A., Arın, L., Deveci, M., Polat, S. (2008). Özel Sebzeçilik. Sevil Cilt Evi ve Matbaası, Tekirdağ.
- [5] Yaşar, H., Melek, S. (2003). Besinler ve Beslenme. Nobel Yayınları, Ankara.
- [6] Nadeem, M., Anjum, F.M., Khan, M.R., Saeed, M., Riaz, A. (2011). Antioxidant potential of bell pepper

- (*Capsicum annum* L.)-A review. *Pakistan Journal of Food Science*, 21(1-4), 45-51.
- [7] Bilişli, A. (2013). Şeker ve Şekerli Ürünler, Özel Gıdalar, Sidas Medya, Çankaya, İzmir.
- [8] Çiçek, H., Yılmaz, N., Çelik, A., Ceylan, N.Ö., Meram, İ. (2005). Kapsaisin (kırmızı biber) insan sağlığı üzerine etkileri, *Anadolu Tıp Dergisi*, 31.
- [9] Batu, A. (2006). Türk lokumu üretim tekniği ve kalitesi. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 1, 35-46
- [10] Gönül, M. (1985). Türk Lokumu Yapım Tekniği Üzerine Araştırmalar. Ege Mühendislik Fakültesi, Bornova, İzmir.
- [11] Baysal, T., Ersus, S. (1999). Karotenoidler ve insan sağlığı. *Gıda*, 24(3), 177-185.
- [12] Ağarcık, H. (1989). Cezerye Üretim Teknolojisi Üzerine Araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- [13] Cemeroğlu, B. (2013). Gıda Analizlerinde Genel Yöntemler, Gıda Analizleri, Bizim Grup Basımevi, Ankara.
- [14] Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559.
- [15] Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A., (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84(4), 407-412.
- [16] Altuğ Onoğur, T., Elmacı, Y. (2015). Gıdalarda Duyusal Değerlendirme. Sidas Medya, Çankaya, İzmir.
- [17] Hayoğlu, İ., Başyigit, B. Dirik, A. (2017). Tane nar ilaveli lokum üretimi ve vakum ambalajlamanın raf ömrü üzerine etkisi. *Gıda*, 42(5), 553-560.
- [18] Akpunar, E. (2015). Türk lokumu üretiminde kızılıcık (ergen) meyvesinin doğal renklendirici olarak kullanılması ve depolama stabilitesinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyon.
- [19] Batu, A., Arslan, A. (2014). Biochemical and sensory evaluations of Turkish delight (lokum) enriched with black grape and sour cherry syrups. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 38(4), 561-569.
- [20] Ozen, G., Akbulut, M., Artık, N. (2011). Stability of black carrot anthocyanins in the Turkish delight (Lokum) during storage. *Journal of Food Process Engineering*, 34(4), 1282-1297.
- [21] Kaya, C., Güldane, M., Topuz, S., Bayram, M. (2018). Determination of some properties of Turkish delight produced by the addition of pomegranate juice. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 6(12), 1814-1819.
- [22] Doyuran, S.D., Gültekin, M., Güven, S. (2004). Geleneksel gıdalardan lokumun üretimi ve özellikleri. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, Van, 334-342.

Laktik Asit Bakterilerinde CRISPR/Cas Sisteminin Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliğinde Kullanımı

Özge Kahraman Ilıkkan  

Başkent Üniversitesi, Kahramankazan Meslek Yüksek Okulu, Gıda İşleme Bölümü, Gıda Kalite Kontrol ve Analizi Programı, Ankara

Geliş Tarihi (Received): 30.01.2020, Kabul Tarihi (Accepted): 10.08.2020

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): mikro_ozge@yahoo.com (Ö. Kahraman Ilıkkan)

☎ 0 312 8141919/149 📠 0 312 814 37 37

ÖZ

Laktik asit bakterileri (LAB) düşük GC içeriğine sahip, Gram pozitif, spor oluşturmeyen, hareketsiz, fakültatif anaerob, asidik ortama dayanıklı ve çeşitli besinleri fermente etme yeteneğindeki bakterilerden oluşan bir gruptur. Bu grup genellikle probiyotik ve starter kültür olarak kullanılan bakterileri içerir. “Düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar (CRISPR)” ve “CRISPR ilişkili Cas proteinleri”den oluşan CRISPR/Cas sisteminin keşfi ile bu konuda yapılan çalışmalar hız kazanmış ve genom düzenlemeleri kolayca yapılmaya başlanmıştır. Söz konusu sistem yardımıyla yapılan genom düzenlemeleri ve sistemin diğer genetik mühendisliği yöntemleriyle birleştirilmesi, LAB’ın ve probiyotiklerin endüstri ve klinikte kullanımına yönelik yeni bir çığır açacaktır. Bu derleme, CRISPR/Cas sisteminin genel işleyişi, LAB’ta hangi sistemlerden oluştuğu, biyoteknoloji ve genetik mühendisliğindeki mevcut uygulamaları ile gelecekteki potansiyel uygulamaları konusunda geniş bir bakış açısı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Laktik asit bakterileri, CRISPR/Cas sistemi, Biyoteknoloji, Genetik mühendisliği

Utilization of CRISPR/Cas System of Lactic Acid Bacteria in Biotechnology and Genetic Engineering

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) are a group of low-GC content, Gram-positive, facultative anaerob, non-motile, non-spore-forming, acid tolerant bacteria that can ferment various nutrients. This group of bacteria mostly contains starter cultures and probiotics. Discovery of “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)” and “CRISPR-related Cas” proteins accelerated studies pertaining to the subject and provided a simplified genom editing mechanism. Genom editing via CRISPR/Cas system and combination of this system with other genetic tools will break new ground on industrial and clinical applications of lactic acid bacteria and probiotics. This review aims to provide an insight on how CRISPR/Cas system works, which types of CRISPR/Cas system lactic acid bacteria and probiotics contain, how it is applied to biotechnology and genetic engineering as well as the future potential applications.

Keywords: Lactic acid bacteria, CRISPR/Cas system, Biotechnology, Genetic engineering

GİRİŞ

Bakteriler ve arkealar, virüs ve plazmid istilalarına karşı pek çok direnç mekanizması geliştirmişlerdir. Bunlardan

biri olan, düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrarlar (CRISPR) ve CRISPR ile ilişkili sistem (Cas) proteinleri (kısaca CRISPR/Cas Sistemi) DNA ya da RNA’yı keserek fajlara ve diğer hareketli genetik

elementlere (MGEs) karşı koruma sağlarlar. Bu sistem, insanda yaşayan kommensal ve patojen bakterilerden, toprak ve gıdalarda bulunan bakterilere kadar farklı ekolojik çevrelerde bulunan mikroorganizmalarda mevcuttur [1]. Bu teknoloji ilk kez 1987'de *E. coli*'de tespit edilmiş, ancak *Streptococcus thermophilus* bakterisinde fajlara karşı oluşturulan adaptif bağışıklık sisteminin temel bileşeni olduğu gösterilerek biraz daha aydınlatılmıştır [2,3]. Bakterilerin kendilerini korumak için geliştirdikleri CRISPR/Cas mekanizması çeşitli araştırmalarda gen ekleme-çıkarma, epigenetik yaklaşımlar, hastalık modelleri gibi genomda kolayca düzenleme yapmayı sağlayacak bir yaklaşım olarak biyoteknoloji çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır [4].

Laktik asit bakterileri (LAB), *Firmicutes* ve *Actinobacteria* filumları içerisinde yer almaktadır [5]. *Firmicutes* filumundaki LAB, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Symbiobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* genuslarını içerirken, *Actinobacteria* filumu ise LAB'tan *Atopobium* ve *Bifidobacterium* genuslarını içermektedir [5-7]. LAB düşük GC içeriğine sahip, Gram-pozitif, spor oluşturmayan, hareketsiz, fakültatif anaerob ve asite dayanıklı, basil ve kok morfolojisindeki bakterilerden oluşan bir gruptur [5,8,9]. Bu bakteriler solunum yolları, gastrointestinal sistem, ağız boşluğu, vajinal boşluk gibi çeşitli habitatlarda, ayrıca süt ürünleri, et ve sebze gibi ortamlarda bulunabilirler [5]. LAB'ın bazı türleri endüstride starter kültür olarak kullanılmakta, bazıları ise probiyotik özellik göstermektedir. Dolayısıyla, bu mikroorganizma grupları süt ürünleri, fermente gıdalar ve gastrointestinal sistem gibi ortamlarda fajlara veya yabancı DNA'ya maruz kalmaları nedeniyle doğal olarak CRISPR/Cas sistemine sahiptirler. *Lactobacillus* cinsinin %62.9'u, *Bifidobacterium* cinsinin %77'si ve *Streptococcus thermophilus* türü %100 oranında CRISPR/Cas sistemini içermektedir [2,10]

Genetik olarak modifiye edilmiş probiyotik ve LAB'ı oluşturmak, probiyotik besinler yoluyla aşı uygulamasına yönelik potansiyellerini arttırmak, endüstride starter kültür özelliklerinin iyileştirilmesi, konağın bağışıklık cevabının düzenlenmesi gibi amaçlarla genetik mühendisliği yöntemleri CRISPR/Cas sistemi ile birleştirilerek çalışmalar yapılmaktadır. CRISPR/Cas sistemi bunların yanı sıra, LAB'ın gastrointestinal sistemden geçişte yaşam şansını arttırmak, konakçıda kolonizasyon, asit ve safra dayanıklılığı ve sindirilemeyen oligosakkaritlerin katabolizması gibi probiyotik özelliklerin güçlendirilmesine yardımcı olabilir [10]. Bu derleme CRISPR/Cas sisteminin genel işleyişi, LAB'ta ve probiyotik bakterilerde şimdiye kadar aydınlatılmış mekanizmaları ayrıca biyoteknoloji, genetik mühendisliği ve endüstrideki potansiyel uygulamaları üzerine bir bakış açısı sunacaktır.

CRISPR/Cas SİSTEMİ

CRISPR/Cas sistemi bakterilerin %45'inde bulunurken, LAB'ın %63'ünde bulunmaktadır. LAB' larda bu sistemin

çok olmasının sebebi, muhtemelen fajlara ve mobil genetik elementlere çok fazla maruz kalmalarıdır [11,12]. Bu sistem sayesinde yabancı DNA'ya ait ufak DNA parçacıkları CRISPR lokusundaki CRISPR tekrarları arasına katılır. CRISPR lokusları genetik pozisyonu, tekrar sekansları ve Cas genlerine göre CRISPR1, CRISPR2, CRISPR3 ve CRISPR4 olarak sınıflandırılırlar [13]. CRISPR/Cas sistemi neredeyse her bakteride değişiklik gösterebilir ancak bir CRISPR lokusu temel olarak şu kısımlardan oluşur (Şekil 1):

Tekrar Dizileri (DR): Bu diziler türler arasında değişiklik gösterebilen ve RNA saç tokası (hairpin loop) yapısının oluşumuna katkıda bulunan dizilerdir. Bu dizilerin arasına aralık (spacer) dizileri girer. 20-38 nt.'lik genellikle palindromik dizilerden oluşurlar ve bir genomda ~600 tekrara kadar bulunabilirler [9, 14, 15] .

Aralık (spacer) DNA Bölgeleri: Bakterileri enfekte eden faj ya da plazmit tarzı istilacıardan kazanılmış bağışıklık oluşturulması amacıyla alınan dizilerdir. Bu diziler PAM sekanslarına bitişik olarak bulunurlar [14, 16].

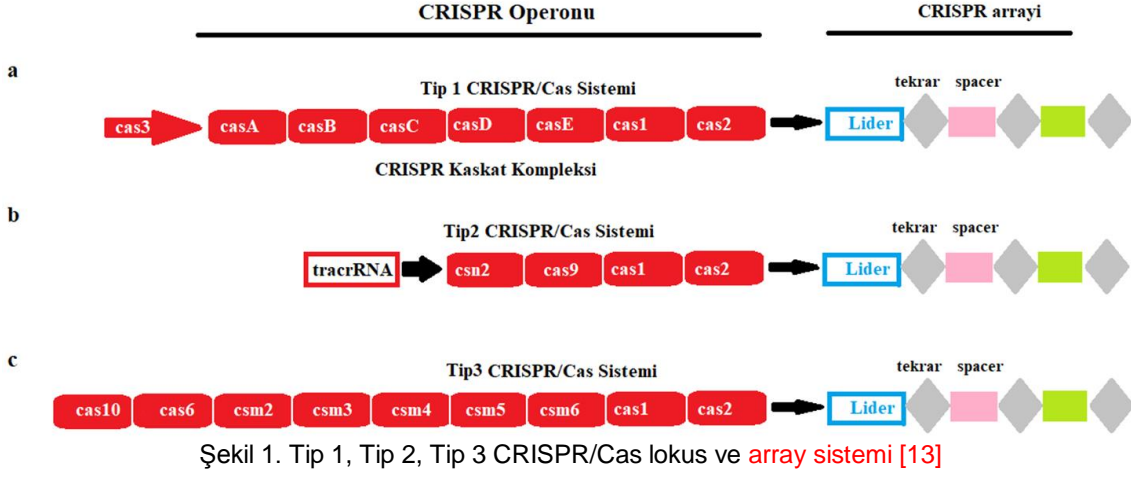
Lider dizisi: Lider dizisi transkripsiyonun başlama noktasıdır. Açık okuma çerçevesi içermez ve korunmamıştır [14, 16].

Cas Genleri: CRISPR dizisine yakın yerde bulunurlar ve Cas proteinlerini kodlarlar. Bu proteinlerin özelliği endonukleaz, ekzonukleaz, helikaz aktivitesi göstermeleridir. Cas proteinleri dört fonksiyonel gruba ayrılmaktadır [17];

- a) Yeni immün markerlarının alımını ve kromozoma entegrasyonu için rekombinaz ve nükleaz aktivitesi gösteren proteinler. Örn; Cas1 ve Cas2
- b) CRISPR RNA'ları işlemek için ribonükleazlar
- c) Kaskat, Cas9, Cmr ve Csm içeren crRNP kompleksine katılan proteinler
- d) Yabancı hareketli mobil genetik elementlerin parçalanması için Cas3, Cas9 gibi nükleazlar

Son sınıflandırmaya göre CRISPR/Cas sistemi, 2 sınıf (Class 1 ve Class 2), 6 Tip (I-VI) ve 33 alt tipten oluşmaktadır [18]. Bu sınıf ayırımı Cas genleri kompozisyonu, gen sinteni ve tekrar dizileri, DNA/RNA parçalanmasından sorumlu crRNA-efektör kompleksine göre yapılmaktadır (Kaskat, Csm veya Cmr) [2, 16, 19]. Sınıf 1 CRISPR-Cas sistemi, çoklu protein efektör kompleksi içerir ve 6-10 arası Cas proteini, büyük bir kaskat ya da Cmr kompleksi ile beraber hareket eder. Sınıf 2 CRISPR-Cas sistemi ise tekil protein efektör kompleksinden oluşur ve Cas9, Cas12 veya Cas 13 gibi proteinleri içerir [16, 20]. Tip 1, 3 ve 4, Sınıf 1 CRISPR-Cas sisteminde yer alırken, Tip 2, 5 ve 6 Sınıf 2 CRISPR-Cas sisteminde yer almaktadır.

CRISPR/Cas sisteminde Tip 1, Tip 2 ve Tip 5' de DNA hedeflenirken, Tip 6' da RNA, Tip 3' de ise hem RNA hem de DNA hedeflenmektedir. Tip 4 ise henüz deneysel olarak aydınlatılmamıştır [21]. Bu kadar çok çeşitli tipte CRISPR/Cas sistemi olmasına rağmen, söz konusu sistem temel olarak şu süreçlerden oluşur [2, 15, 16, 18, 22]:



Şekil 1. Tip 1, Tip 2, Tip 3 CRISPR/Cas lokus ve array sistemi [13]

Adaptasyon:

CRISPR/Cas sisteminde ilk basamak adaptasyondur.

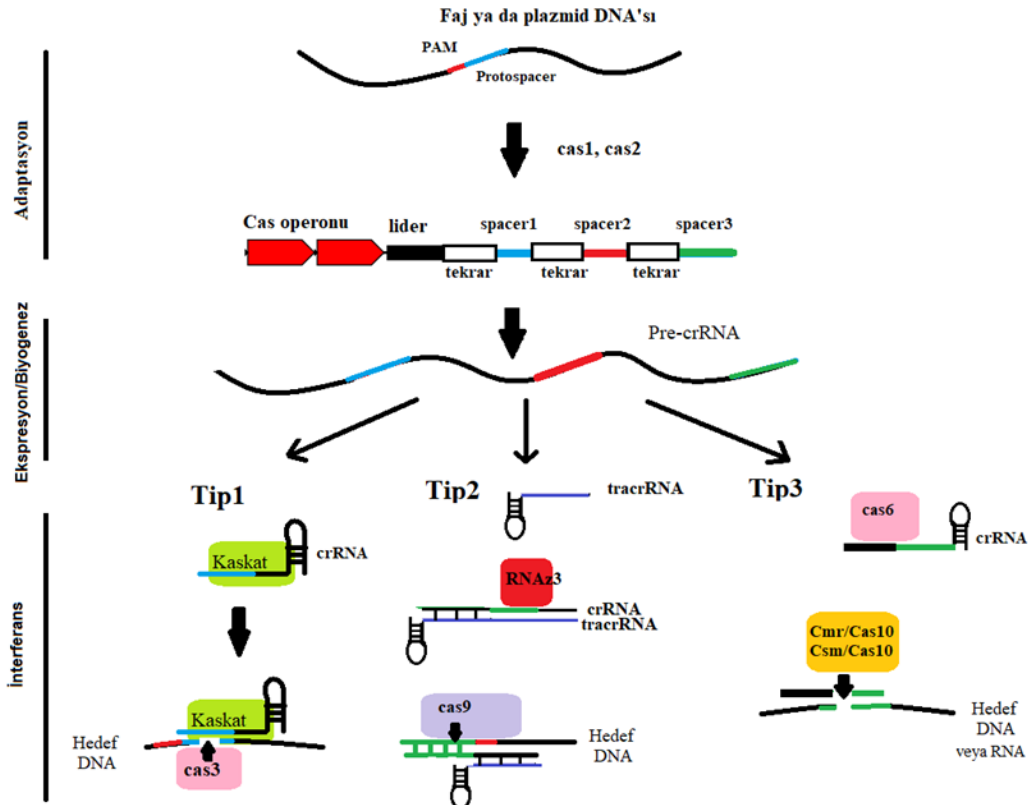
Adaptasyon süreci kabaca iki adımdan oluşur:

- İstilacı DNA'sından protospacer (protoaralık) sekansının seçimi
- Protospacer sekansının CRISPR dizisine katılımı.

Protospacer ifadesi, yabancı DNA'da bulunan ve spacer-repeat-spacer (aralık-tekrar-aralık) dizisine henüz katılmamış hedef DNA'yı ifade eder. Bu dizi spacer-repeat-spacer dizisine katıldığında artık spacer olarak ifade edilir [1, 2]. Yeni spacer sekans alımının sebebi organizmanın otoimmüniteyi engellemek için kendinden olan ve kendinden olmayan DNA'yı ayırt

etmek istemesidir. Adaptasyon sürecine Cas1 ve Cas2 kompleksi aracılık eder [2] (Şekil 2).

Tip 1 ve Tip 2 sisteminde spacer alımı, PAM dizisi ile gerçekleşir. PAM dizisi protospacer'a bitişik 2-4 nükleotidlik bir settir ve hedef DNA'nın tanınmasını sağlar. PAM sekansı türden türe değişiklik gösterebilir ama bazı *Lactobacillus* türlerinde şu şekilde olduğu tahmin edilmektedir; *L. casei*; 5'-tGAAA-3', *L. rhamnosus*; 5'-aGAAA-3', *L. gasseri*; 5'-cTAACc-3', *L. jensenii*; 5'-tGGc-3', *L. pentosus*; 5'-gTTAAT-3' [16]. Tip 3 ise PAM içermeyen bir mekanizma kullanmaktadır. Spacer dizilerinin tekrarlar arasına katılmasında DNA tamir mekanizması rol oynamaktadır [2].



Şekil 2. Tip 1, Tip 2, Tip 3 CRISPR/Cas Sistemi [2]

Ekspresyon/Biyogenez Basamağı:

Ekspresyon basamağı 3 kısımdan oluşur:

- Cas geni ve CRISPR ekspresyonunun düzenlenmesi
- Cas kompleksi oluşumu
- pre-crRNA (öncül/olgunlaşmamış-crRNA) olgunlaşması

Ekspresyon basamağının ilk aşamasında spacer-repeat-spacer dizisinin crRNA'lara (pre-crRNA) transkripsiyonu gerçekleşir. Pre-crRNA transkripsiyonu lider sekansı içerisinde bulunan Pcrispr promotörü ile yönlendirilir. Daha sonra işlenerek olgunlaştırılan crRNA'lar crRNA-efektör kompleksine katılır. Kaskat kompleksi proteinlerini kodlayan genlerin (CasABCDE) transkripsiyonu ise, cas genleri upstream bölgesinde yer alan ve polisistronik transkript (Kaskat: Cse1, Cse2, Cas7, Cas5 ve Cas6e) oluşturan Pcas promotörü tarafından yönlendirilir. Ayrıca, CRISPR/Cas promotörlerinin susturulmasında H-NS DNA bağlama proteininin yer aldığı gösterilmiştir [2]. Tip 2 CRISPR/Cas sisteminde pre-crRNA, tracrRNA yardımıyla işlenir ve içerdiği sekans pre-crRNA'ya komplementerdir. Cas9, tanıma (REC) lobu sayesinde crRNA: tracrRNA kompleksini tanıyarak bağlanır. Bu aşamada RNaz III bu kompleksi tekrar-antitekrar bölgesinden keserek bireysel crRNA-tracrRNA birimlerine dönüştürür [3]. Cas9, crRNA: tracrRNA kompleksine bağlı kalarak Tip 2 crRNA efektör kompleksi oluşturur (Şekil 2).

CRISPR İnterferansı:

CRISPR interferansı çok basamaklı bir işlemdir. crRNA'nın Cas proteinleri ile bir denetleme kompleksi oluşturup onu istilacı nükleik asitlerdeki PAM ve protospacer çekirdek sekansına yönlendirmesiyle başlar. Protospacer genelde bir dsDNA iken, Tip 3-B sisteminde ssRNA'dır. Tip 2 ve Tip 3-B sisteminde hedef sekansın kesilmesi Cas/crRNA ribonükleoprotein kompleksi aracılığıdır, buna karşın Tip 1 ve Tip 3-A sistemi Cas nükleaza ihtiyaç vardır. Tip 1 sisteminde denetleme kompleksi dsDNA'ya bağlanır ve kesim gerçekleşir. Tip 2 sisteminde, Cas9/crRNA/tracr RNA kompleksi hedefe bağlanır ve kesim gerçekleşir. Tip 3-A sisteminde, Csm/crRNA kompleksi ve Csm6 proteinini dsDNA'ya bağlanır ve kesim gerçekleşir. Tip 3-B sisteminde ise, Cmr/crRNA kompleksi komplementer RNA'yı keser (Şekil 2).

Tip 1 CRISPR/Cas sistemi

Tip 1 CRISPR/Cas sistemi, I-A ile I-G arasında 7 alt tipi içerir [9]. Tip 1 moleküler mekanizmasına Kaskat (CRISPR associated complex for antiviral defense cascade) kompleksi ve Histidin/Aspartat (HD) domaini içeren bir Cas3 nükleaz eşlik eder [2, 15] Cas3, Tip 1'in imza proteini ve alt tip proteini Tip1-A'da Cas8a, Tip1-B'de Cas8b, Tip 1-E'de Cas8e şeklindedir (Şekil 1a). Ancak, Tip1-D Cas10d alt tip proteinini içerir [23]. CRISPR dizisinin transkripsiyonu ile oluşan öncül crRNA'lar (pre-CRISPR RNA) tekrar-spesifik endoribonükleaz Cas3 ile kesilir ve bu reaksiyon kısa crRNA'lar oluşturur (Şekil 2). Bunlar Kaskat kompleksi

ile birleşerek hedef DNA'da (virüs ya da plazmit) yer alan komplementer protospacer'ı bulmak için kullanılır. Cas8, crRNA tarafından tanınan hedef dizinin upstream kısmında yer alan kısa dizi motifini tanıyarak (PAM). PAM sekansı olmadan komplementer crRNA'lar hedef DNA'yı bulamaz. Tip 1-C'de pre-crRNA Cas5 ile kesilir [2].

Son aşamada, Kaskat kompleksi/hedef DNA oluşumu Cas3 nükleaz aktivitesini tetikler böylece plazmit ya da bakteriyofajın hedef DNA'sında ssDNA kırığı oluşturulur ve parçalanma başlar. Hedef DNA içerisinde bir "çekirdek dizi (seed sekans)" tanımlanmıştır ve crRNA/DNA dubleksinin 5' ucundaki ilk 8 bazın bağımsızlık için kritik olduğu gösterilmiştir. Bu sekansta meydana gelen mutasyonların bakteriyofajları, *E. coli*'nin CRISPR immünitesinden koruduğu gösterilmiştir. Bununla beraber, çekirdek sekansının 6. nükleotidinde meydana gelecek herhangi bir mutasyonun bu immüniteyi etkilemediği gösterilmiştir [15].

Tip 2 CRISPR /Cas sistemi

İmmünite fonksiyonlarını gerçekleştirmek için Cas9 imza proteini, Csn2 (Tip 2-A'da) (Şekil 1b) veya Cas4 (Tip 2-B'de) alt tip proteinleri, spacer dizisi, PAM dizisi, hedef DNA'ya komplementer 17-20 nükleotidlik crRNA ve tracrRNA (trans-aktive edici crRNA)'dan oluşan sgRNA'ya (tek-rehber RNA) ihtiyaç duyar [23]. PAM dizisi, Cas9'un PAM-bağlama domaini tarafından tanınır ve hedef dizinin downstream bölgesinde bulunur. TracrRNA'nın iki bölgesi mevcuttur; i) Cas9 ile birleşmesine aracılık eden sekonder yapı oluşturan bölge, ii) CRISPR dizisinin tekrar dizisine komplementer olan bölge. TracrRNA ve öncül-crRNA dsRNA oluşturur ve bu kompleks RNaz III ile kesilir. Kesim ürünleri, küçük crRNA rehberleridir (guide crRNA). Cas9'da iki nükleaz domaini mevcuttur; RuvC/RNazH ve McrA/HNH. Bu domainler, istilacı DNA'sında crRNA spesifik dsDNA kırıkları oluşturur. McrA/HNH, baz eşleşmesi olan ipliği keserken, RuvC/RNazH ayrılmış olan ipliği keser ki, burada bir küt uç oluşturulur. DNA hedefinin tanınması Cas9'un PAM dizisine bağlanmasıyla başlar, sonrasında DNA ipliği PAM dizisinin hemen upstream bölgesinden açılır, r-loop oluşumu ve spacer sekansının 6-8. bazları arasına denk gelen DNA hedefi kesimi gerçekleşir [2,15].

Tip 3 CRISPR /Cas sistemi

Tip 3 CRISPR sisteminde 3-A ile 3-F arasında 6 alt tip mevcuttur [9]. Cas10 imza proteini, Csm6, Cmr, Csx10 alt tip proteinlerinden oluşur [23]. Tekrar spesifik endoribonükleaz olan Cas6, pre-crRNA'yı, pre-crRNA tekrarındaki stem loop yapısında bulunan bazdan keser. Tip 3 alt tipine göre (Tip 3-A, Tip 3-B), Cas6 kesimiyle elde edilen küçük crRNA'lar, Cas 10/Csm veya Cas 10/Cmr kompleksine transfer edilir. Daha sonra, crRNA bu kompleks içerisinde bir olgunlaşma işlemine tabi tutulur. Bu işlemde 3' ucu 6 nükleotid aralıkla kesilir. Genel olarak, Tip 3-A sistemi, 9 farklı Cas/csm geni içermektedir (Şekil 1c). Tip 3-B ise 6 farklı Cas proteininden (Cmr 1, Cas10, Cmr3, Cmr4, Cmr5 ve Cmr6) oluşmaktadır. Tip 3 sisteminde, Cas10 kompleksi endoribonükleaz ve endodeoksiribonükleaz aktivitesi

gösterir ve Cas10 palm domaini kalıp olmayan DNA kesiminden sorumludur. Şimdiye kadar hiçbir çalışmada Tip 3 sisteminin PAM dizisi ihtiyacına rastlanmamıştır [2, 15].

LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ VE PROBİYOTİK BAKTERİLERDE CRISPR/Cas SİSTEMİ

LAB'ta CRISPR/Cas sisteminin bulunma oranı türden türe değişiklik göstermektedir. Örneğin; *L. reuteri* %17, *L. crispatus* %96 ve *L. delbrueckii* %93 oranında bu

sisteme sahiptir [9]. LAB'ta en çok rastlanan CRISPR/Cas tipi Tip 2'dir, daha sonra Tip 1 ve çok az da Tip 3'e rastlanmaktadır [9, 18]. Genel olarak rastlanan alt tipler ise 2-A, 2-C, 1-F ve 1-E' dir (Tablo 1) [24]. 1-E ve 1-F alt tiplerinde genler kümelmiş ve Tip 1-E' de CRISPR1 ve CRISPR2, Tip 1-F'de CRISPR3 ve CRISPR4 olacak şekilde iki tekrar dizisi ile sıkıca çevrelenmiştir. İki sistemde benzerdir ancak Tip 1-E 8 gen (*cas3*, *cse1*, *cse2*, *cas7*, *cas5*, *cas6e*, *cas1*, *cas2*), Tip 1-F 7 gen (*cas1*, *cas2*–*cas3*, *csy1*, *csy2*, *csy3*, *cas6f*) içermektedir [21, 25].

Tablo 1: Bazı laktik asit bakterilerinin CRISPR/Cas sistemi tipleri, alt tipleri, spacer sayıları ve tekrar dizileri [24]

Tür	CRISPR/Cas Sistemi Tipi- Alt tipi	Spacer Sayısı	Tekrar Dizileri (DR)	GenBank/RefSeq	Kaynak
<i>Lactobacillus sakei</i> DS4	II-A, II-C	26	GCTATTGTTTCCTCAACATTCGGTTAAGATGAAAT	CP025839.1	NCBI/ CRISPRFinder
<i>Lactobacillus buchneri</i>	II-A, I-F, I-E	25	GTATTCCTCCACGTACGTAGGGGTGATCC	NC_018610.1	NCBI/ CRISPRFinder
<i>Lactobacillus gasserii</i>	II-A	9	GTTTTAGATGGTTGTTAGATCAATAAGGCTTAGATC	CP021427.1	NCBI/ CRISPRFinder
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	I-E	40	GTATTCCTCCACGCAAGTGGGGGTGATCC	NC_008054.1	NCBI/ CRISPRFinder
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	I-E	32	GGATCACCTCCACATACGTGGAGAAAAT	NC_006814.3	NCBI/ CRISPRFinder
<i>Lactobacillus casei</i>	I-C, II-A	20	GTTTTCTCCCGCACATGCGGGGTGATCC	NC_008526.1	NCBI/ CRISPRFinder
<i>Streptococcus thermophilus</i>	III-A, II-C, II-A, I-E	32	GTTTTGGAACATTCCGAAACAACACAGCTCTAAAAC	CP006819.1	NCBI/ CRISPRFinder
<i>Pediococcus acidilactici</i>	II-A	33	GTTTCAGAAGGATGTTAAATCAATAAGGTTAAGATC	CP015206	NCBI/ CRISPRFinder
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	II-A	1	TGACTTCTGAATCTAACTGTTGAACGCCAC	NC_008525.1	NCBI/ CRISPRFinder

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK MÜHENDİSLİĞİNDEKİ UYGULAMALARI

Genetik rekombinasyonda kullanılan CRISPR/Cas9 sistemi iki komponentten oluşur, gRNA (rehber RNA) ve *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpyCas9). gRNA' lar, komplementer hedef DNA'ya bağlanacak özellikte dizayn edilmiştir ve kesim için 3' NGG PAM sekansı SpyCas9'a rehberlik ederek, PAM sekansının 3 baz yukarısından kesim yapmasına yardımcı olur [26]. Ancak, Cas9'un bazı bakteriler türlerine toksik olduğu görülmüştür bu nedenle alternatif olarak Cas12a (Tip 5-A), Cas9 varyantı ThermoCas9 ve ya C2c1/2/3 de kullanılmaktadır [6, 26, 27].

CRISPR interferans (CRISPRi) ve CRISPR aktivasyon (CRISPRa) ifadeleri, CRISPR ile yapılan gen susturma ve gen aktivasyonu için kullanılmaktadır [28, 29]. Çift iplik kesim aktivitesi engellenmiş dCas9 (aktif olmayan Cas9), tek-rehber RNA (single-guide RNA) sayesinde hedeflenen genomik bölgelere bağlanır, ancak kesim yapmaz. Böylece transkripsiyon susturulur ya da aktive edilir. dCas9, Cas9'u kodlayan genin katalitik rezidülerinde (D10A ve ya H840A) meydana gelen mutasyonla sağlanmaktadır [10, 12, 13].

CRISPR-Cas9 genom modifikasyon yöntemi ökaryotlar ve bazı model bakterilerde geniş oranda kullanılmasına rağmen, LAB'ta henüz çalışmalar başlangıç aşamasındadır [9,30]. Gen ekleme ve çıkarmayı etkin şekilde gerçekleştirebilecek genetik araçların azlığı, LAB'ın biyoteknolojik uygulamalarına sınırlama getirmiştir. Bu nedenle, diğer genom düzenleme araçları CRISPR/Cas sistemine entegre edilerek genom düzenlemede yeni bir tasarım oluşturulması sağlanmaktadır [6,31]. Genom düzenleme için bir bakteride endojenik CRISPR/Cas sistemi olması şart değildir. Eğer endojenik CRISPR/Cas sistemi yoksa, genetik mühendisliği ile oluşturulan ekzojenik formu (sgRNA: Cas9), genom düzenleme için gerekli olan

hedeflenen rehber RNA içeren bir plazmide eklenebilir [10] (Tablo 2). Şimdiye kadar, LAB'ta sadece tip 1 ve tip 2 sistemi endojenik CRISPR temelli gen düzenleme için kullanılmıştır. Ancak, *L. salivarius* ve *L. ruminis* tip 3 sistemine sahiptir ve LAB'ta ilk tip 3 sistemi endojenik CRISPR temelli gen düzenleme aracı oluşturulabilir.

Cas9 temelli genom düzenleme, *L. reuteri*'de ssDNA rekombinasyonu ile, *L. plantarum*'da dsDNA rekombinasyonu ve plazmid-temelli homolog rekombinasyon ile, *L. lactis*'de plazmid-temelli homolog rekombinasyon ile beraber oluşturulmuştur [6, 32]. *L. reuteri*'de, hedefe yönelik mutasyon oluşturma uygulaması yüksek etkinlik oranıyla başarılıdır (99-100%) [6, 33]. CRISPR-Cas sistemi, ssDNA rekombinasyonu uygulamasını ileriye taşıyarak, wild-type (mutasyon içermeyen) hücrelerin ölümünün gerçekleşmesini, dolayısıyla mutantların etkinliğinin artmasını sağlamıştır. Çünkü Cas9 tarafından meydana getirilen DNA kırıkları tamir edilememekte, bu da wild-type hücrelerin elemine edilmesini kolaylaştırmaktadır. Bu sayede, 1 kb'a yakın delesyon ya da bir kodon mutagenesi gerçekleştirilebilir [6]. Cas9, aynı zamanda *Streptococcus thermophilus* ve *L. lactis*'te büyük hareketli genetik elementlerin çıkarılması için de kullanılmıştır [13,33]. *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpyCas9) ise, Mn²⁺ iyonları varlığında DNA'yı rehber RNA (sgRNA) olmadan kesebilir [34].

Cas9'da bulunan RuvC ve HNH domainlerinden birisinin katalitik aktivitesi inhibe edilerek tek iplik DNA kırıklarına neden olan nikaz mutantları oluşturulabilir (nikaz Cas9n-D10ACas9) [4, 12]. *L. casei*' de bir nikaz varyantı olan CRISPR-Cas9^{D10A} ile nikaz-temelli Cas9 (nCas9) düzenlemesi oluşturulmuştur. Bu genetik araç, tek bir adımda transformasyonu sağlayarak tek-gen çıkarılması ya da eklenmesine olanak sağlayan etkin bir araç olmuştur. Geniş bir konakçı oranına sahip plazmid pLCNICK genom düzenleme için diğer *Lactobacillus* türlerine adapte edilme potansiyeline sahiptir [31].

Çalışmalarda, çoklu rehber RNAlar (gRNA) nCas9 ile rastgele olacak şekilde genoma yollanıp, hedeften hiç sapmaya neden olmadan çift iplik kesimi sağlanmıştır [9].

Prokaryotlarda, CRISPR/Cas sistemi tarafından meydana gelen çift iplik kırıklarına yönelik sağlam bir tamir sisteminin olmayışı, bu sistemin antimikrobiyal ajan olarak kullanılmasına da olanak sağlamaktadır. Diziye özgü spesifik yönlendirme sayesinde bazı bakterilere karşı ölümcül hasarlar verilebilir. Yapılan bir çalışmada, CRISPR antimikrobialerinin %99 dizi benzerliği olan iki *E. coli* türünü bile ayırabildiği görülmüştür [2]. Bazı *Lactobacillus* türlerinde de homoloji yönlendirmeli tamir sisteminin (HDR) yokluğundan dolayı, bakteriler CRISPR/Cas ile oluşturulan çift iplik kırıklarına duyarlıdır. Bu nedenle, faj temelli RecE/T, CRISPR-Cas9 sistemi ile birleştirilmiş ve *L. plantarum* WCFS1 ve *L. brevis* ATCC367'de etkili bir genom düzenleme aracı oluşturulmuştur. Bu yöntemle, tek gen delesyonu %50-100 arasında başarılmıştır [35].

Lactococcus lactis' de endojenik CRISPR/Cas sistemi bulunmamaktadır, ancak ekzojenik Cas9 mühendisliği başarılı bir şekilde çalışmaktadır. Bir çalışmada oluşturulan ve pLABTarget adı verilen Cas9-sgRNA ekspresyon vektörü ile, *L. lactis*'de cas9 hedef çalışmalarının gerçekleştirilmesine olanak sağlanmıştır [36]. *L. lactis* ile yapılan diğer bir çalışmada, CRISPR/Cas9 yöntemi, upp ve galK gen lokuslarında nokta mutasyonu oluşturmak için kullanılmış ve % 75'in üzerinde başarı elde edilmiştir [37].

CRISPR-Cas SİSTEMİ İLE FİLOGENİ ÇALIŞMALARI

CRISPR/Cas sistemi, son zamanlarda LAB'ta suşlar arasındaki filogeni ve karakterizasyon çalışmalarında kullanılmaktadır [38, 39]. Tekrar-aralık-tekrar dizleri ve Cas genleri kullanılarak CRISPR-temelli tiplendirme artık tiplendirme yöntemleri arasında potansiyel olarak görülmektedir. Özellikle endüstriyel starter kültürlerin, probiyotik bakterilerin, hayvan kommensali türlerin ve problematik patojenlerin tiplendirilmesinde kullanılması için çalışmalar mevcuttur [2, 14].

CRISPR-Cas SİSTEMİ İLE PROBİYOTİK VE ENDÜSTRİYEL ÖZELLİKLERİN GELİŞTİRİLMESİ

LAB'ın genetik mühendisliğindeki uygulamalarının yanı sıra, probiyotik özelliklerinin geliştirilmesi, endüstride ve klinikte değişik uygulamalarının oluşturulması için de yine CRISPR/Cas teknolojisi kullanılmaktadır [33]. Ekzopolisakarit (EPS) üzerine yapılan bir çalışmada, tek nükleotid mutasyonu gerçekleştirmek için, endojenik CRISPR/Cas yöntemi, hedefe yönelik rehber RNA ve mutasyonu taşıyan donör kalıp sekansı içeren bir plazmid ile birleştirilmiş ve farklı bir EPS oluşturulmuştur. EPS üzerine bu tarz değişiklikler, fermente ürünün reolojik ve organoleptik karakterini değiştirmektedir [10]. *L. gasseri*'de bshA promotör sekansının düzenlenmesiyle bshA transkripsiyonu artmış, böylece

bakterinin safra tuzlarını parçalama yeteneği artırılmıştır [10]. *Bifidobacterium longum subsp. longum* bakterisine bir karbohidrat hidrolaz eklenmesiyle bakterinin galaktoligosakarit katabolizmasına olanak sağlanmıştır [40]. *Clostridium tyrobutyricum*' da bulunan Tip 1-B sistemi, çoklu genom düzenleme amacıyla bir platform görevi görerek, cat1 geninin alkol dehidrogenaz genleriyle yer değiştirmesi neticesinde (adhE1 ve adhE2) kesikli fermantasyonda n-bütanol üretimi başarılı bir şekilde artırılmıştır [12].

L. rhamnosus suşlarının mukozaya bağlanma yeteneklerinin karşılaştırdığı genomik analiz çalışmalarına göre, spaCBA gen kümesi adezyon faktörü olarak tanımlanmıştır. spaCBA'nın adezyonda görev almadığını doğrulamak amacıyla, CRISPR-Cas yöntemi spaC'yi çıkaracak şekilde dizayn edilebilir ve adezyon fenotipi azaltılabilir [12].

LAB'ta son zamanlarda tanımlanmış olan ve konak-mikrop etkileşiminde, bağırsak enflamasyonunun düzenlenmesinde önemli yeri olan yüzey tabaka proteinleri de gelecekte CRISPR/Cas genom mühendisliği için bir hedef olacaktır. Dolayısıyla, gelecekte "CRISPRbiyotik" olarak tanımlanan ve probiyotik özellikleri geliştirilmiş yeni nesil bakterilerin oluşturulması söz konusudur [9].

CRISPR-Cas SİSTEMİ İLE AŞI ÇALIŞMALARI

Gelecek yıllarda, Cas 9 nükleaz, sgRNA ve donör DNA içeren Cas9 plazmidi (pCas9) yardımıyla, mukozal aşı uygulamalarının geliştirilmesi ve ağızdan aşı uygulamasında probiyotiklerin kullanılması düşünülmektedir. Yöntem, laktik asit bakterinde biyoterapötiklerin taşınması ve probiyotik bakterilerde aşı amaçlı antijen ekspresyonu için başarılı bir şekilde denenmiştir [10,20]. Yine benzer bir çalışmada, ağız yoluyla aşı uygulaması için probiyotik ve ökaryotik bir maya olan *Saccharomyces boulardii*'nin rekombinant formu oluşturulmuştur. Mayada ovalbumin üretecek şekilde bir gen değişimi yapılmıştır. Bu proteinin bağırsak bariyerinden kolay geçebilmesi için C-terminal ucuna *Clostridium perfringens* enterotoksininden claudin-hedefleme dizisi eklenerek (CPE), OVA-CPE (Ovalbumin- C-CPE) füzyon proteini oluşturulmuştur. Yine *ura3* oksotrof mutanti maya oluşturmak için CRISPR/Cas9 sistemi ile gen delesyonu yapılmış ve oluşturulan füzyon protein geni bu rekombinant mayaya aktarılmıştır. Fare denemeleri sonucunda, serumda IgG ve IgA seviyesinin kontrol grubuna göre arttığı gözlenmiştir [41].

CRISPR-Cas SİSTEMİ İLE FAJLARA DİRENÇLİ STARTER KÜLTÜR SUŞ GELİŞTİRİLMESİ

Firmicutes filumu içindeki LAB'ların bazıları starter kültür ya da probiyotik olarak kullanılmaktadır [5]. Dolayısıyla, bu mikroorganizma grupları fermente gıdalar ve gastrointestinal sistem gibi ortamlarda fajlara veya yabancı DNA'ya maruz kalmaktadırlar [42]. Özellikle, peynir yapım süreçlerinde bakteriyofajların laktik asit bakterilerine saldırarak verimi düşürdüğü bilinmektedir

[43]. Bu nedenle, genetik mühendisliği yöntemleri kullanılarak faj-dirençli starter kültürler oluşturulmaktadır [42, 43]. Ancak, gelecekte biyoinformatik araçlar ile spacer (aralık) dizileri analiz edilebilir, suşlara özgü fajlar taranabilir endüstride veya klinikte fajlara daha dayanıklı starter kültürlerin ya da probiyotik bakterilerin elde edilmesinde genetik mühendisliği yöntemleriyle beraber kullanılabilir [9]. Genetik modifiye LAB, aynı zamanda gıda ürünlerinin tekstür ve tat profillerini geliştirmek amacıyla da kullanılabilir [9].

GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ LAB'LARIN GÜVENLİĞİ

Gıdalara katılan herhangi bir madde sağlık açısından sorun teşkil etmiyorsa "generally recognised as safe" (GRAS, genellikle güvenli olarak kabul edilen) olarak

tanımlanır ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) bu onaydan sorumludur [27]. Genetiği değiştirilmiş LAB suşları, daha stabil, daha verimli ve yüksek canlılık oranına sahip olabilmese rağmen, şüna kadar sadece genetiği değiştirilmemiş LAB'lar FDA onayına sahiptir [27]. LAB'ların töröpötik protein üretmesi ve aşu olarak kullanılabilmesi bu bakterilerin potansiyellerini güçlendirmektedir. Ancak, ne kadar efektif olurlarsa olsunlar, insanların genetik modifiye mikroorganizmaları kabul etme oranı düşüktür [27]. CRISPR-Cas9 genetik müdahale metodu USA'da belli bir seviyede kabul görmesine rağmen, Avrupa'da henüz diğer genetik modifikasyon metotlarından ayırımı yapılmamıştır. Avrupa Birliği'nde şuan kabul gören genom modifikasyon yöntemleri doğal metotlar (konjugasyon, faj transdüksiyonu veya doğal kompetans) ve rastgele mutageniz çalışmalarıdır [27].

Tablo 2. LAB' ta CRISPR/Cas yöntemi ile yapılan uygulama örnekleri

Mikroorganizma	Uygulama	CRISPR-Cas yöntemi	Referans
<i>Bifidobacterium longum subsp. longum</i>	Filogeni çalışmaları	CRISPR/Cas lokus ve arrayi	[33, 38]
<i>Bifidobacterium longum subsp. longum</i>	Karbohidrat metabolizmasının artırılması	Endojenik CRISPR/Cas (I-E)	[10]
<i>Lactobacillus gasseri</i>	bshA transkripsiyonu artırma ve safra tuzlarının parçalanması	Endojenik CRISPR/Cas9 (II-C)	[10]
<i>Streptococcus thermophilus</i>	EPS üretiminin artırılması	Endojenik CRISPR/Cas9 (II-A)	[10]
<i>Lactobacillus casei</i>	Delesyonlar ve gen insersiyonları oluşturmak	Ekzojenik- SpyCas9 ^{D10A}	[31]
<i>Lactobacillus crispatus</i>	Plazmid temelli yeniden programlanmış tip 1-E sistemi ile insersiyon, delesyon ve tek baz değişimlerinin sağlanması	Endojenik Cascade-Cas3	[20]
<i>Lactobacillus plantarum, Lactobacillus brevis</i>	RecE/T yardımcı CRISPR-Cas9 ile tek gen delesyonları ya da kromozomal gen değişimleri	Ekzojenik- spyCas9	[35]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Cas9 yardımcı dsDNA ve ssDNA rekombinasyonu ile gen susturma, insersiyon ve nokta mutasyonları. Bu yöntemle N-asetilglukozamin üretimi (GlcNAc)	Ekzojenik- spyCas9	[44]
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Cas9 düzenleme aracı ile birleştirilmiş ssDNA rekombinasyonu ile yüksek etkinlikte rekombinant seçimine olanak sağlanır	Ekzojenik- spyCas9	[9, 32]
<i>Streptococcus thermophilus</i>	8 kb-102 kb arasındaki genomik ada delesyonları için tip2-A sistemi yeniden düzenlenmiştir	Endojenik sth3Cas9	[45]
<i>Lactococcus lactis</i> MG1363	pLABTarget	Ekzojenik- spyCas9	[35]
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	n-bütanol üretimi	Endojenik tip 1-B sistemi	[12]
<i>Lactobacillus rhamonosus</i>	spaCBA adezyon özelliğinin araştırılması	CRISPR/Cas9	[12]
<i>Lactococcus lactis</i>	Nokta mutasyonu, upp ve galK genleri	CRISPR/Cas9	[37]
Probiyotik bakteriler	Mukoza ya da ağızdan aşu	sgRNA ve donör DNA içeren Cas9 plazmidi	[10, 20]

SONUÇ

CRISPR/Cas sisteminin geliştirilmesi her alanda yeni denemelere ve uygulamalara olanak sağlamaktadır. Bu sistemlerin, LAB ile oluşturulacak biyoteknoloji ve genetik mühendisliği alanındaki uygulamalarda yerini alabilmesi için pek çok çalışma yapılmaktadır. LAB'ta CRISPR/Cas sisteminin kullanımı, endüstride ürün özelliğinin artırılmasının yanı sıra "farklı bir kullanım için yeniden tasarlama" şeklinde de olmaktadır. Ancak, CRISPR/Cas sistemi ile yeni nesil ve yeni özelliklere sahip endüstriyel suşlar geliştirilirken, hala Cas9 özgülüğündeki eksiklik nedeniyle hedeflenen genomik bölgenin haricinde, istenmeyen hedef dışı DNA bölgelerinin kesime uğraması ve etik problemler, her alanda olduğu gibi bu alanda da sistemin kısıtlayıcılığını oluşturabilmektedir. Yine de çalışmalar artıkça bu problemler de çözüme ulaşacaktır.

KAYNAKLAR



[1] Nethery, M.A., Henriksen, E.D., Daughtry, K.V., Johanningsmeier, S.D., Barrangou, R. (2019).

- Comparative genomics of eight *Lactobacillus buchneri* strains isolated from food spoilage. *BMC Genomics*, 20, 1–12.
- [2] Stout, E., Klaenhammer, T., Barrangou, R. (2017). CRISPR-Cas technologies and applications in food bacteria. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8, 413–437.
- [3] Sanozky-Dawes, R., Selle, K., O'Flaherty, S., Klaenhammer, T., Barrangou, R. (2015). Occurrence and activity of a type II CRISPR-Cas system in *Lactobacillus gasseri*. *Microbiology (United Kingdom)*, 161, 1752–1761.
- [4] Gümüş, N., Tezcanlı Kaymaz, B. (2018). CRISPR/Cas9 Age in Genome Editing and Leukemia Applications. *Kafkas Journal of Medical Sciences*, 8, 232–248.
- [5] Horvath, P., Coüté-Monvoisin, A.C., Romero, D.A., Boyaval, P., Fremaux, C., Barrangou, R. (2009). Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. *International Journal of Food Microbiology*, 131, 62–70.
- [6] Börner, R.A., Kandasamy, V., Axelsen, A.M., Nielsen, A.T., Bosma, E.F. (2019). Genome editing

- of lactic acid bacteria: Opportunities for food, feed, pharma and biotech. *FEMS Microbiology Letters*, 366, 1–12.
- [7] Yörük, G.N., Güner, A. (2010). Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması ve *Weissella* türlerinin gıda mikrobiyolojisinde önemi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 6, 163–176.
- [8] Yao, R., Liu, D., Jia, X., Zheng, Y., Liu, W., Xiao, Y. (2018). CRISPR-Cas9/Cas12a biotechnology and application in bacteria. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 3, 135–149.
- [9] Roberts, A., Barrangou, R. (2020). Applications of CRISPR-Cas systems in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 1–15.
- [10] Hidalgo-Cantabrana, C., O'Flaherty, S., Barrangou, R. (2017). CRISPR-Based engineering of next-generation lactic acid bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 37, 79–87.
- [11] Pijkeren, J.P., Van, Barrangou, R. (2018). Genome editing of food-grade lactobacilli to develop therapeutic probiotics. *Bugs as Drugs*, 5, 389–408.
- [12] Pan, M., Barrangou, R. (2020). Combining omics technologies with CRISPR-based genome editing to study food microbes. *Current Opinion in Biotechnology*, 61, 198–208.
- [13] Hao, M., Cui, Y., Qu, X. (2018). Analysis of CRISPR-cas system in *Streptococcus thermophilus* and its application. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–7.
- [14] Barrangou, R., Dudley, E.G. (2016). CRISPR-Based typing and next-generation tracking technologies. *Annual Review of Food Science and Technology*, 7, 395–411.
- [15] Golubov, A. (2016). Chapter6: CRISPR: Bacteria Immune System. In *Genome Stability: From Virus to Human Application*. Elsevier Inc. 87-96
- [16] Alkhnbashi, O.S., Meier, T., Mitrofanov, A., Backofen, R., Voß, B. (2020). CRISPR-Cas bioinformatics. In *Methods*, 172, 3-11.
- [17] Barrangou, R., Marraffini, L.A. (2014). CRISPR-cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. In *Molecular Cell*, 54, 234-244.
- [18] Crawley, A.B., Henriksen, E.D., Stout, E., Brandt, K., Barrangou, R. (2018). Characterizing the activity of abundant, diverse and active CRISPR-Cas systems in lactobacilli. *Scientific Reports*, 8, 1-12.
- [19] Common, J., Morley, D., Westra, E.R., Van Houte, S. (2019). CRISPR-Cas immunity leads to a coevolutionary arms race between *Streptococcus thermophilus* and lytic phage. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374, 1-11.
- [20] Hidalgo-Cantabrana, C., Goh, Y.J., Pan, M., Sanozky-Dawes, R., Barrangou, R. (2019). Genome editing using the endogenous type I CRISPR-Cas system in *Lactobacillus crispatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116, 15774–15783.
- [21] McGinn, J., Marraffini, L.A. (2019). Molecular mechanisms of CRISPR–Cas spacer acquisition. *Nature Reviews Microbiology*, 17, 7–12.
- [22] Makarova, K.S., Haft, D.H., Barrangou, R., Brouns, S.J.J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F.J.M., Wolf, Y.I., Yakunin, A.F., Van Der Oost, J., Koonin, E.V. (2011). Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 9, 467–477.
- [23] Nethery, M.A., Barrangou, R. (2019). Predicting and visualizing features of CRISPR–Cas systems. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 616). Elsevier Inc.
- [24] Grissa, I., Vergnaud, G., Pourcel, C. (2007). CRISPRFinder: A web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Research*, 35, 52–57.
- [25] Aydin, S., Personne, Y., Newire, E., Laverick, R., Russell, O., Roberts, A.P., Enne, V.I. (2017). Presence of Type I-F CRISPR/Cas systems is associated with antimicrobial susceptibility in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72, 2213–2218.
- [26] Leenay, R.T., Vento, J.M., Shah, M., Martino, M.E., Leulier, F., Beisel, C.L. (2019). Genome editing with CRISPR-Cas9 in *Lactobacillus plantarum* revealed that editing outcomes can vary across strains and between methods. *Biotechnology Journal*, 14, 1–11.
- [27] Plavec, T.V., Berlec, A. (2020). Safety Aspects of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria. *Microorganisms*, 8, 297.
- [28] Peters, J.M., Koo, B.M., Patino, R., Heussler, G.E., Hearne, C.C., Qu, J., Inclan, Y.F., Hawkins, J.S., Lu, C.H.S., Silvis, M.R., Harden, M.M., Osadnik, H., Peters, J.E., Engel, J.N., Dutton, R.J., Grossman, A.D., Gross, C.A., Rosenberg, O.S. (2019). Enabling genetic analysis of diverse bacteria with Mobile-CRISPRi. *Nature Microbiology*, 4, 244–250.
- [29] Xiong, Z.Q., Wei, Y.Y., Kong, L.H., Song, X., Yi, H.X., Ai, L.Z. (2020). Short communication: An inducible CRISPR/dCas9 gene repression system in *Lactococcus lactis*. *Journal of Dairy Science*, 103, 161–165.
- [30] Muysson, J., Miller, L., Allie, R., Inglis, D.L. (2019). *The Use of CRISPR-Cas9 Genome Editing to Determine the Importance of Glycerol Uptake in Wine Yeast During Icewine Fermentation*. *Fermentation*, 5, 1-15.
- [31] Song, X., Huang, H., Xiong, Z., Ai, L., Yang, S. (2017). *CRISPR-Cas9D10A Nickase-Assisted Genome Editing in Lactobacillus casei*. 83, 1–14.
- [32] Oh, J.H., Van Pijkeren, J.P. (2014). CRISPR-Cas9-assisted recombineering in *Lactobacillus reuteri*. *Nucleic Acids Research*, 42, 1–11.
- [33] Stout, E.A., Sanozky-Dawes, R., Goh, Y.J., Crawley, A.B., Klaenhammer, T.R., Barrangou, R. (2018). Deletion-based escape of CRISPR-CAS9 targeting in *Lactobacillus gasseri*. *Microbiology (United Kingdom)*, 164, 1098–1111.
- [34] Sundaresan, R., Keilbarth, M.W., Rajan, R., Sundaresan, R., Parameshwaran, H.P., Yogesha, S.D., Keilbarth, M.W., Rajan, R. (2017). RNA-Independent DNA cleavage activities of Cas9 and Cas12a. *CellReports*, 21, 3728–3739.
- [35] Huang, H., Song, X., Yang, S. (2019). Development of a RecE/T-Assisted CRISPR–Cas9

- Toolbox for *Lactobacillus*. *Biotechnology Journal*, 14, 1–12.
- [36] Els, S. Van Der, James, J.K., Kleerebezem, M., Bron, P.A. (2018). *Versatile Cas9-Driven Subpopulation Selection Toolbox for Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(8):e02752-17 84.
- [37] Guo, T., Xin, Y., Zhang, Y., Gu, X., Kong, J. (2019). A rapid and versatile tool for genomic engineering in *Lactococcus lactis*. *Microbial Cell Factories*, 18, 1–12.
- [38] Briner, A.E., Lugli, G.A., Milani, C., Duranti, S., Turrone, F., Gueimonde, M., Margolles, A., Van Sinderen, D., Ventura, M., Barrangou, R. (2015). Occurrence and diversity of CRISPR-Cas systems in the genus *bifidobacterium*. *PLoS ONE*, 10, 1–16.
- [39] Pan, M., Nethery, M.A., Hidalgo-Cantabrana, C., Barrangou, R. (2020). Comprehensive Mining and Characterization of CRISPR-Cas Systems in *Bifidobacterium*. *Microorganisms*, 8, 720.
- [40] Hidalgo-Cantabrana, C., Crawley, A. B., Sanchez, B., Barrangou, R. (2017). Characterization and exploitation of CRISPR loci in *Bifidobacterium longum*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–16.
- [41] Bagherpour, G., Ghasemi, H., Zand, B., Zarei, N., Roohvand, F., Ardakani, E.M., Azizi, M., Khalaj, V. (2018). Oral administration of recombinant *Saccharomyces boulardii* expressing ovalbumin-CPE fusion protein induces antibody response in mice. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–9.
- [42] Klaenhammer, T.R. (1991). Development of bacteriophage-resistant strains of lactic acid bacteria. *Biochemical Society Transactions*, 19, 675–681.
- [43] Spus, M., Li, M., Alexeeva, S., Wolkers-Rooijackers, J.C.M., Zwietering, M.H., Abee, T., Smid, E.J. (2015). Strain diversity and phage resistance in complex dairy starter cultures. *Journal of Dairy Science*, 98, 5173–5182.
- [44] Zhou, D., Jiang, Z., Pang, Q., Zhu, Y., Wang, Q., Qi, Q. (2019). CRISPR/Cas9-assisted seamless genome editing in *Lactobacillus plantarum* and its application in N-acetylglucosamine production. *Applied and Environmental Microbiology*, 85, 1–11.
- [45] Selle, K., Klaenhammer, T.R., Barrangou, R. (2015). *CRISPR-based screening of genomic island excision events in bacteria*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 112, 1–6.
-
-

Gıda ve Çevreden Alınan Bor Bileşiklerinin Toksikolojik Değerlendirmesi

Bahar Demircan¹ , Yakup Sedat Veliöğlu²  ✉

Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 06830 Gölbaşı, Ankara

Geliş Tarihi (Received): 25.06.2020, Kabul Tarihi (Accepted): 01.09.2020

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): velioglu@ankara.edu.tr (Y.S. Veliöğlu)

🕒 0 312 203 33 00/36 19 📄 0 312 317 87 11

ÖZ

Bor, endüstri ve tarımda yaygın olarak kullanılan ve çevrede doğal olarak bulunan bir bileşik olduğundan birçok araştırmacı tarafından ilgi odağı olmuştur. Bu makalede, içme suyu, gıdalar ve farklı kaynaklardan kaynaklanan bor maruziyetinin insan ve hayvanlar üzerindeki etkileri ve çeşitli gıdaların bor miktarları verilmiştir. Bor bileşenlerine insanlar ve hayvanlar oral, solunum ve temas yoluyla maruz kalmaktadır. Maruziyet sınırları bu bileşenlerin etkileri üzerinde oldukça önemlidir. Önerilen miktarlarda vücuda alınan borun çeşitli metabolik, beslenme, hormonal ve fizyolojik süreçlere etkisi değerlendirildiğinde, insanlarda temel bir besin ögesi olmasa da diyet açısından önemli olduğu ve hücre fonksiyonlarında olumlu etkileri olduğu kanıtlanmıştır. Hem hayvan hem de insanlar için bor alımı <1.0 mg/gün düzeyinde olduğunda olumlu etkilere sahipken fazla alınmasının sakıncalı olabileceği bilinmektedir. Önemli bor kaynakları olarak günlük diyetinde meyve, sebze, kabuklu yemiş ve bakliyalara yeterli miktarlarda yer verilmelidir. Ayrıca içme suyu da yetişkin bireyler için birincil bor kaynağıdır. Hayvanlar üzerinde borun gelişimsel ve üreme toksisitesine ilişkin veriler doğrultusunda kanserojenliğine dair net bir kanıt yoktur. Bor vücuttan kolayca atılabilen bir element olup kanserojen veya mutajen olduğunu gösteren bir veri bulunmamaktadır. Bor bileşenlerinin diyet gereksinimleri, metabolik fonksiyonları, terapötik uygulamaları ve önemli düzenleyici etkileri üzerinde daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Bor, Borat, Borik asit, Bor toksisitesi, Borun etkileri

Toxicological Evaluation of Boron Compounds Taken from Food and Environment

ABSTRACT

Since boron is widely used in industry and agriculture and naturally found in environment, it has been the focus of attention by many researchers, recently. In this review, in addition to the effects of boron exposure from different sources on humans and animals, the amounts of boron in various foods and recommended boron intake levels are also summarized. Humans and animals are exposed to boron components through oral consumption, inhalation and skin contact. Exposure limits are very important on the effects of these ingredients. Even though boron is not essential for humans, it is important for diet and cellular functions. In case of taking recommended amounts to body, it was shown that it had positive effects on metabolic, nutritional, hormonal and physiological functions. It is known that boron intake of >1.0 mg/day may be beneficial for both animals and humans, but it may be inconvenient to take it in excess. As important boron sources, sufficient amounts of fruits, vegetables, nuts and legumes should be included in the daily diet. In addition, drinking water is the primary source of boron for adults. There is no clear evidence of the carcinogenicity of boron in animals based on data on developmental and reproductive toxicity. Boron is easily excreted from body and there is lack of data indicating it as carcinogen or mutagen. More studies are needed on the dietary requirements, metabolic functions, therapeutic applications, and important regulatory expressions of boron components.

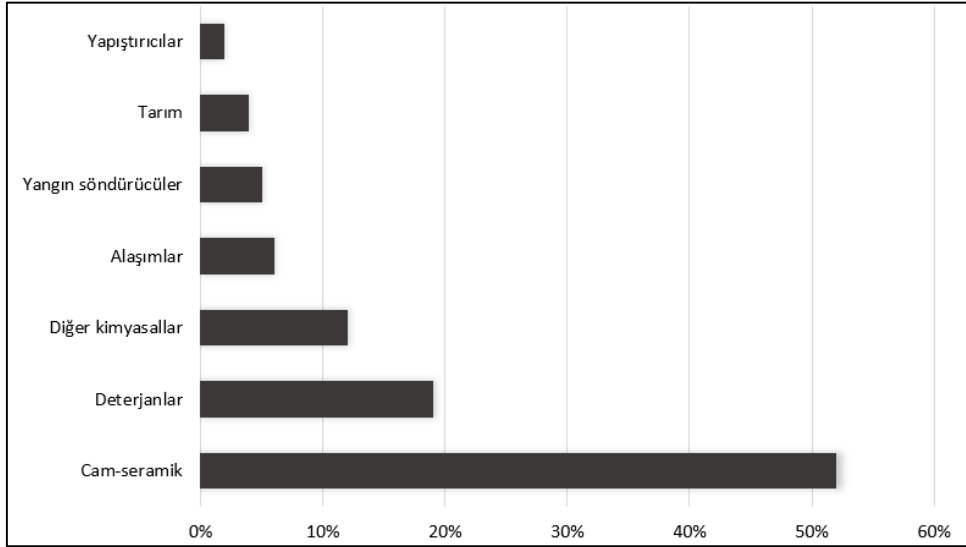
Keywords: Boron, Borate, Boric acid, Boron toxicity, Boron effects

GİRİŞ

Bor ilk olarak 1808'de izole edilmiş ve sonrasında tamamen saf olarak elde edilebilmiştir. Mendeleev Periyodik Tablosu'nda 3A grubunda, metal ile ametal arasındaki özelliklere sahip yarı iletken bir elementtir. Bileşiklerinin uçuculuğundan dolayı bor, özellikle volkanik aktivitelerde öne çıkan bir elementtir [1]. Bor bileşikleri çok eski zamanlardan beri değişik amaçlarla kullanılmaktadır. Tarihsel süreçte bu bileşenlerin kullanımı altın işçiliğinde, mumyalama, tıbbi ve metalurjik uygulamalarda bildirilmiştir. Günümüzde ise bor bileşikleri endüstri ve tarımda yaygın olarak kullanılmaktadır. Cam ve deterjan sanayi borun ana kullanıcılarıdır (Şekil 1) [2].

Bor doğal bir üründür ve genellikle çevrede boratlar (borun oksijen ile bağlanmasından oluşan bileşikler) şeklinde bulunur [3]. İnsanlarda veya hayvanlarda boratın %90'ından fazlası borik asit olarak atılmaktadır [4]. Borun çeşitli metabolik, beslenme, hormonal ve

fizyolojik süreçlere önemi üzerine yapılan çalışmalar, borun bitkiler için gerekli olduğunu veya olmadığını gösterirken, insanlar için gerekli olduğunu göstermiştir [5-8]. 1870'lerde boraks ve borik asidin gıdaları korumak için kullanılabileceği keşfedilmiş ve borat ilavesi, balık, et ve süt ürünlerinin korunmasında en iyi yöntemlerden biri olarak kabul edilmiştir [5]. Gıda Katkı Maddeleri ve Besin Kaynakları Paneli, AB'de gıda katkı maddeleri olarak borik asit (E284) ve sodyum tetraboratın (boraks) (E285) güvenliğini değerlendiren bilimsel bir görüş sunmuştur. Bu katkı maddelerinin, AB'nde 4 g borik asit/kg konsantrasyona kadar mersin balığı yumurtalarında (havyar) koruyucu olarak kullanılmasına izin verilmiştir. Panel, borik asit ve sodyum tetraboratın genotoksisite için endişe yaratmadığı sonucuna varmıştır. Panel ayrıca sıçanlarda gelişimsel bir toksisite çalışmasından türetilen 9.6 mg bor/kg vücut ağırlığı/gün NOAEL (hiçbir yan etki göstermeyen doz) değerine dayanarak 0.16 mg bor/kg vücut ağırlığı/gün düzeyinde ADI (günlük alınmasına izin verilen miktar) olabileceği sonucuna varmıştır [9].



Şekil 1. Günümüzde sektörlere göre bor kullanımının dağılımı [2]

Çoğu analiz yöntemi doğrudan elementi ölçerken, bor bu formda canlı dokularda mevcut değildir. Borun fizyolojik önemi, zayıf bir asit olan borik asitten kaynaklanmaktadır. Hem borik asit hem de bor oral yoldan alındığında gastrointestinal sistemde kolayca alınır ve emilir [10]. Çok yüksek alımlarda bile, genellikle 24 saat içinde, tamamına yakını idrar ile hızlı bir şekilde atılmaktadır. Uygulama yöntemine bakılmaksızın, maruziyetten sonra vücutta bor kalmadığı bildirilmiştir [11]. Yapılan çalışmalarda, borun yaklaşık 20 saatlik kısa bir yarılanma ömrüne sahip olduğu anlaşılmıştır [12, 13]. İnsanlar bora içme suyu ve gıda tüketimi (içecekler ve diyet takviyeleri dahil), madencilik, imalat ve diğer endüstriyel prosesler sırasında bor bileşiklerinin solunması, ağız bakım ürünleri, kozmetik ürünleri, sabunlar ve deterjanlar gibi bazı tüketici ürünlerinin kullanılması gibi çeşitli yollardan maruz kalmaktadır. Genel olarak bireylerin bora en büyük doğal maruziyeti, yiyeceklerle bor alımından gelir. Bitkisel gıdalar, özellikle meyveler, yapraklı sebzeler, fındık ve baklagiller gibi

yiyecekler ile şarap, bira ve damıtık içecekler bor bakımından zengindir. Hayvansal gıdalar, bal hariç, nispeten daha düşük miktarda bor içerirler [10].

Bu derlemede farklı kaynaklardan bor bileşenlerine maruziyetin insan ve hayvanlar üzerindeki toksisiteyi ve farklı gıdaların bor miktarları, önerilen bor alım seviyeleri çerçevesinde ele alınarak insan ve hayvanlar üzerindeki etkileri ortaya konulmuştur.

BOR KAYNAKLARI ve ETKİLERİ

Yetişkinler için günlük ortalama bor alımları erkeklerde, kadınlarda, vejetaryen erkek ve kadınlarda sırasıyla 1.17, 0.96, 1.47 ve 1.29 mg/gün olarak belirtilmiştir [14]. Samman ve ark. [15], Amerikan diyetinden günlük bor alımının yaklaşık 1 mg/gün olduğunu hesaplamıştır. Bu çalışmada kahve ve süt en iyi iki bor kaynağı olarak görülmüştür; bu ürünlerde borun düşük olduğu ancak tüketilen miktarları nedeniyle toplam bor alımının

%12'sini oluşturdukları belirtilmektedir. Bor alımı için kabul edilebilir güvenli aralık 1 ile 13 mg/gün arasındadır ve fındık, kuru meyveler ve şarap içeren bir diyetle günlük 20 mg/gün bor alımına ulaşılabilir [16]. Tüketici ürünlerinden bor maruziyeti tahminen 0.1 mg/gün olarak bildirilmiştir [17]. Borun en büyük rolü membrana bağlı süreçlerde, doku farklılaşmasının erken evrelerinde veya büyük miktarda membran materyalinin gerekli olduğu yerlerde [18]. İnsanlarda, yetersiz bor alımının birkaç hormonun aktivitesinde azalmaya neden olabileceği ve borun yaşamın erken evrelerinde gerekli olduğu da bildirilmiştir. Sıçan ve farelerle yapılan çalışmalar, düşük borun memelilerde üremeyi etkileyebileceğini düşündürmektedir [19].

Literatürde bor yoksunluğuna bağlı sendromlar ve hastalıklar ile ilgili farklı çalışmalar yer almaktadır. Kurbağalar üzerine yapılan bir çalışmada <3.5 mg/kg bor uygulamasının, organogenez (embriyodaki organ sistemlerinin gelişim evresi) sırasında anormal gelişimlere ve kas-iskelet bozukluklarına neden olduğu belirtilirken [20], başka bir çalışmada diyetle bor eksikliği ile nekrotik (istenmeyen, doku ölümü durumu) yumurta sayısının arttığı belirtilmiştir [21]. Piliçler üzerinde yapılan çalışmalarda bor eksikliği, D vitamini eksikliği ile birlikte değerlendirildiğinde büyüme gecikmesi görülmüştür [22, 23]. Bu kombine değerlendirmenin sıçanlar üzerinde çalışılması ile kalsiyum, magnezyum ve fosfor dengesinin bozulduğu gözlenmiştir [24]. Ek olarak sıçanlar üzerinde bor eksikliğinin bağışıklık fonksiyonunun zayıflamasına ve beyin aktivitelerinin azalmasına neden olduğu bildirilmiştir [25, 26]. İnsanlar üzerindeki çalışmalarda ise bu eksikliğin kalsiyum metabolizmasında bozulma, beyin elektriksel aktivitesinde azalma, dikkat eksikliği ve düşük performansa neden olduğu bildirilmiştir [27]. Bazı araştırmacılara göre, bor antiosteoporotik (osteoporoz önleyici), antiinflamatuvar (iltihap önleyici), antikoagülan (kanda pıhtılaşmayı önleyici), antineoplastik (kansere önleyici) ve hipolipidemik (lipit düşürücü) etkilere sahiptir [8, 19].

Bor, mineral ve hormonal metabolizmalar, hücre zarı fonksiyonları ve enzim reaksiyonlarında önemli rol oynayan bir elementtir. Bor ayrıca osteoporoz, kalp rahatsızlığı, felç, diyabet ve yaşlılığı da etkiler [28]. Bor kalsiyum ve kemik metabolizmasında rol oynar. Bor takviyesi veya yoksunluğu ile yapılan çalışmalar, magnezyum eksikliği olduğunda borun etkilerinin daha belirgin olduğunu göstermiştir. Bor, hücre dışı matrisin sentezinde rol oynar ve yara iyileşmesine yardımcı olur. Bor bileşiklerinin, hayvanlarda hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalar kapsamında güçlü anti-osteoporotik, anti-enflamatuvar, anti-pıhtılaştırıcı ve anti-neoplastik ajanlar olduğu gösterilmiştir [29]. Deneysel çalışmalar, borun prostat kanserine karşı koruyucu özelliklere sahip olduğunu da göstermektedir [30]. Borun akciğer kanseri üzerindeki etkisi net değildir, ancak antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklerine işaret eden kanıtlar bulunmaktadır [31]. Bor bakımından zengin bölgelerde yaşayan kadınlarda serviks kanseri (rahim ağrı kanseri) gözlenmezken, bor bakımından fakir bölgelerdeki 15 kadında serviks kanseri gözlenmiştir [32]. Ayrıca borun beyin fonksiyonları ve insanların bilişsel performansı

üzerinde etkili olabileceği de bildirilmiştir [33]. Bazı hayvanların yaşam döngülerini tamamlamak için bora ihtiyaç duydukları ve çok düşük miktarda bor alımının kemik sağlığının bozulmasına, beyin fonksiyonlarının ve bağışıklığın zayıflamasına neden olabileceği yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır [34, 35]. Literatürdeki çalışma sonuçları incelendiğinde, hiçbir toksik maruziyet düzeyi söz konusu değilse, borun insan sağlığına olumlu katkılar yapabileceği söylenebilir.

BOR TOKSİSİTESİ

Hayvanlar üzerinde yapılmış çalışmalardan elde edilen veriler, borun insanda kansere neden olma potansiyelini belirlemek için yetersizdir [36]. EPA (ABD Çevre Koruma Ajansı) ve NTP (ABD Ulusal Toksikoloji Programı), borun potansiyel kanserojen olarak değerlendirilmesi için mevcut bilgileri yetersiz görmüştür, ayrıca IARC (Uluslararası Kansere Araştırmaları Ajansı) tarafından da bor kanserojen olarak değerlendirilmemiştir [16]. Bor bileşiklerinin sınır değerleri üzerine birçok ülkede çalışmalar yapılmaktadır ve esas odak toksikolojisi üzerindedir [37]. Doğurganlık ve gelişimsel toksisite için, borik asit, Avrupa Birliği tarafından, R60-61 risk ifadeleriyle ilişkili, "1B kategorisi (doğurganlığı azaltabilir; doğmamış yavruya zarar verebilir)" bileşiği olarak sınıflandırılmıştır. Ayrıca, borik asit deneysel çalışmalara dayanarak "çok yüksek endişe verici madde" olarak değerlendirilmiştir. Fakat birçok çalışma borun üreme fonksiyonları üzerinde faydalı etkileri olduğunu göstermektedir [38].

Mikrobesin elementler doz, maruz kalma süresi ve uygulama yöntemine bağlı olarak toksik olabilir [39]. Literatürde bu tür testlerde hayvanlara en yaygın olarak uygulanan bor formları olan borik asit ve boraks bileşiklerinin toksisitesi kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Borik asit ve boraks, uygulandıkları türlerde toksikolojik olarak benzer sonuçlar ile değerlendirilmiştir [16]. Bor maruziyet çalışmalarında, veri karşılaştırmalarını sağlamak için veriler bor eşdeğeri olarak ifade edilmektedir. Fizyolojik bir pH'da, borat tuzları tamamen borik aside dönüştürülür; buradan yola çıkarak borik asit ve borat tuzlarının benzer toksikolojik özelliklere sahip olduğu ifade edilmiştir [40].

Çoğu bor bileşiğinin endüstriyel olarak sorun oluşturmayacak düzeyde düşük toksisiteye sahip olduğu bilinmektedir. Bor, tıp alanında sodyum borat, borik asit veya boraks olarak temizleme amaçlı olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Weir ve Fisher [26], boraks ve borik asidin düşük toksisiteye sahip olduğunu belirtmişlerdir, ancak farklı araştırmacılar tarafından borik asit ve boratlara bağlı zehirlenme vakaları da bildirilmiştir. Bazı araştırmacılar tarafından borik asit zehirlenmesinin yanıklara veya açık yaralara uygulanan kremlerden toksik bor miktarlarının deri yoluyla emilmesinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir [27, 41]. Zehirlenmelerden elde edilen raporlarda belirtilen veriler, ölümcül borik asit dozunun bebekler için 3-6 g ve yetişkinler için 15-20 g olduğunu göstermektedir. Raporlardaki klinik etkiler sinirlilik, nöbet geçirme, gastrointestinal rahatsızlıklar, iltihaplanma, mukozanın ve derinin dökülmesi, şişlik ve ödem bulgularını

İçermektedir [16]. Çeşitli araştırmacılar tarafından insanlarda aşırı bor alımı ile akut toksisite semptomları bulantı, kusma, ishal ve uyuşukluk hissi olarak belirtilirken, kronik toksisite semptomları iştahsızlık, bulantı, kilo kaybı ve azalmış cinsel aktivite, sperm sayısı ve motilite (hareket kabiliyeti) olarak belirtilmektedir [5, 40, 42]. Restuccio ve ark. [43] tarafından bir insanda akut oral bor dozunun toksik etki ve ölüme neden olduğu bildirilmiştir. Bu bağlamda, 45 yaşında bir erkek bireyin intihar etmek amacıyla suda çözülmüş iki fincan borik asit kristali içtiği ve sonraki üçüncü günde öldüğü rapor edilmiştir. Bu doz tüketildikten kısa bir süre sonra oluşan belirtiler mide bulantısı, kusma, ishal ve dehidratasyon olarak ifade edilmiştir.

Literatürde bor bileşiklerinin toksisitesi soluma, oral ve deri ile temas olmak üzere farklı maruz kalma şekilleri bazında değerlendirilmiştir.

Hayvanlar Üzerindeki Çalışmalar

Hayvansal deneyler, toksisitenin yaklaşık 100 µg/g'ı aşan diyet bor alımından kaynaklandığını ortaya koymuştur. Akut toksisite açısından inorganik boratların sıçanlar üzerinde denenmesi ile farklı çalışmalarda farklı LD₅₀ (lethal doz; test hayvanlarının belirli bir süre sonunda yarısını öldürmek için gerekli doz) düzeyleri belirlenmiştir ve bu değerler Tablo 1'de listelenmiştir [44]. Boratlar üzerinde yapılan toksikolojik çalışmaların çoğunda ya borik asit ya da boraks olarak bilinen

disodyum tetraborat dekahidrat kullanılmıştır. Farelerde diyetdeki bor seviyeleri 4.000 mg borik asit/kg değerini aştığında hücre hasarı ve atrofi (normal olan bir organ veya dokunun körelmesi) görülmüştür. Oral uygulamadan sonra sıçanlar için de benzer etkiler rapor edilmiştir [5]. Sıçanlarda günde 17.5 mg bor/kg düzeyinin doğurganlığı ve 9.6 mg bor/kg maruz kalmanın ise normal gelişimi etkilediği bildirilmiştir [45, 46].

Culver ve ark. [47], bor bileşiklerine soluma yoluyla maruz kalındığında bu bileşiklerin mukoza zarlarından doğrudan ne kadar emildiği ve bu süreçte ne kadarının temizlendiği veya yutulduğu konusunda netlik olmadığını belirtse de bu bileşiklerin inhalasyondan (soluma) sonra emildiğini öne sürmüşlerdir. Araştırmacılar tarafından test edilen boratlarda düşük akut inhalasyon toksisitesi gözlenmiştir. Sıçanların 4 saat boyunca soluma yoluyla 2.12 mg (0.37 mg bor)/L konsantrasyonlarında borik aside maruz bırakıldığı bu çalışmada ölüm gözlenmemiştir. Laboratuvar hayvanlarında oral maruziyetle yürütülen bir çalışmada bor toksisitesinin esas hedefinin gelişmekte olan fetüs ve testisler olduğu belirtilmiştir. Bora maruz kalan fareler ve sıçanlar üzerinde doğum öncesi ölümlerin yanısıra gözlerde, merkezi sinir sisteminde, kardiyovasküler sistemde ve iskelette anormallikler gözlenmiştir. Farelerde LD₅₀ için akut oral toksisite 3450 mg/kg vücut ağırlığı, sıçanlarda 2660 mg/kg vücut ağırlığı olarak belirtilirken; insan için belirlenmiş akut veriler 1.4 ile 70 mg/kg vücut ağırlığı arasında değişmektedir [48].

Tablo 1. Başlıca inorganik bor bileşikleri ve oral LD₅₀ değerleri [44]

Bor bileşikleri	Kimyasal formülü	LD ₅₀ (mg/kg)
Borik asit	H ₃ BO ₃	2660-4100
Borik oksit	B ₂ O ₃	>2000
Disodyum tetraborat dekahidrat (boraks)	Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	4500-6000
Disodyum tetraborat pehtahidrat	Na ₂ B ₄ O ₇ .5H ₂ O	3200-3400
Susuz disodyum tetraborat	Na ₂ B ₄ O ₇	>2000
Disodyum oktaborat tetrahidrat	Na ₂ B ₈ O ₁₃ .4H ₂ O	2550
Sodyum metaborat dihidrat	NaBO ₂ .2H ₂ O	>2000
Sodyum metaborat tetrahidrat	NaBO ₂ .4H ₂ O	2300
Disodyum perborat tetrahidrat	NaBO ₃ .4H ₂ O	2100, 2243
Disodyum perborat monohidrat	NaBO ₃ .H ₂ O	1120-2100
Potasyum tetraborat tetrahidrat	K ₂ B ₄ O ₇ .4H ₂ O	3700
Çinko borat	4ZnO.B ₂ O ₃ .H ₂ O	>5000

Boratların hayvanlar üzerinde cilt ile temas yoluyla test edilmesinde, akut dermal toksisitenin düşük olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular doğrultusunda borun yaralanmamış, hasar almamış bir cilt dokusundan emilemeyeceği, ancak hasarlı ciltten kolayca emileceği sonucuna varılmıştır [49]. Deneysel olarak, farelerde, sıçanlarda ve tavşanlarda bor maruziyeti sonucunda fetal toksisite gözlenmiştir. Ortalama fetal vücut ağırlığı, tüm maruz kalan gruplarda doza bağlı bir şekilde önemli ölçüde azalmıştır. Bor maruziyetinden sonra bildirilen gelişimsel etkiler arasında; yüksek perinatal mortalite (fetüsün veya yenidoğanın ölümünü), azalmış fetal vücut ağırlığı, kardiyovasküler sistem, merkezi sinir sistemi, göz ve iskelette malformasyonlar (kusurluluk, sakatlık) bulunur [48, 50, 51]. Bununla birlikte, hayvan

çalışmalarından elde edilen veriler, gelişimsel toksisitenin bor maruziyetindeki insanlarda bir endişe konusu olabileceğini düşündürmektedir.

Hayvanlarda, bor ile ilişkili ana toksik etki üreme sistemi üzerindedir. Bor, sıçanlarda, farelerde ve köpeklerde erkek üreme sisteminde dejenerasyon ve atrofiyi inhibe etmiştir. Bor ayrıca dişi sıçanlarda yumurtlamada ve dişi farelerde böbrek lezyonlarında azalmaya neden olmuştur [52]. Yapılan bir çalışmada bor maruziyetinin sıçanlarda sperm üretiminin 3000 ve 4500 ppm dozlarında inhibe edildiğini, 6000 ve 9000 ppm dozlarında atrofiye neden olduğu bulunmuştur. Testis dokusundaki 5.6 µg/g bor konsantrasyonunun sperm üretimini inhibe ettiği, 11.9 µg/g seviyesinin atrofiye

neden olduğu bildirilmiştir. Bu çalışma için NOAEL 26 mg bor/kg/gün olarak bildirilmiştir [53]. Bu çalışmanın ardından aynı araştırmacılar *in vitro* olarak testis hücrelerini 11.9 µg/g bor ile tedavi etmişler ve borik asidin hücrelerin üretimini ve olgunlaşmasını erken evrelerde olumsuz etkilediğini rapor etmişlerdir [54]. Krishnan ve ark. [55] tarafından erkek keçilerde yürütülen bir çalışmada diyet bor takviyesinin (40 ppm) sperm hareketliliğini ve bağışıklık ve antioksidan savunma kapasitesini arttırdığı gözlenmiştir. Oral yolla uygulanan boraks, sıçanlarda 4.50 g/kg LD₅₀ ve soluma yoluyla uygulanan borik asit 3.45 g/kg LD₅₀ değerleri ile sonuçlanmıştır [26]. Sabuncuoğlu ve ark. [56] sıçanlara oral yoldan uygulanan 400 mg/kg/gün düzeyinde bir subakut (akut ve kronik arası) dozun böbrek dokusunda histopatolojik değişiklikler ürettiğini bildirmişlerdir. Sander ve ark. [57], civcivleri borik asit ile muamele edilen zemin bölmelerine yerleştirdiklerinde beyin, böbrek, karaciğer veya beyaz kaslarda bor kalıntı seviyesinde artış olmadığını rapor etmişlerdir. Çalışma sonucunda akut oral öldürücü borik asit dozu 2.95 g/kg olarak belirtilmiştir. Dani ve ark. [58] tarafından 1-3 hafta boyunca sıçanlara 1 g/kg boraks ve borik asidin subkronik oral uygulamasında, 3 hafta sonra vücut ağırlığında, DNA sentez inhibisyonunda ve klinik toksisite belirtilerinde azalma olduğu gözlenmiştir. Weir ve Fisher [26] tarafından sıçanlarda boraks ve borik asit ile yapılan kronik bir oral çalışmada, düşük alım seviyelerinde (117-550 ppm) hiçbir zararlı etkinin olmadığı ancak yüksek doz seviyesinde (1170 ppm) klinik toksisite belirtileri ortaya çıktığı belirtilmiştir. Ek olarak hiçbir tedavi grubunda karsinojenez bulgusu gözlenmemiştir. Aynı çalışmada 2 yıl boyunca 1170-2000 ppm bor ile beslenen köpeklerde bodur büyüme ve deri döküntüleri gözlenmiştir. Başka bir çalışmada, sıçanlarda 14 gün boyunca günde 4 saat 2.0 mg/L boraks (sodyum tetraborat dekahidrat) solunması mortaliteye neden olmuştur [59]. Bazı araştırmacılar, boraksın bir panzehir olarak kullanılıp kullanılmayacağını araştırmış ve alüminyum toksisitesi için yararlı bir antagonist olduğu sonucuna varmışlardır. Çalışmada kullanılan boraks (3.25 ve 13 mg/kg vücut ağırlığı) dozlarının sıçanları alüminyuma bağlı toksisiteye karşı açıkça koruduğu belirtilmiştir [60].

İnsanlar Üzerindeki Çalışmalar

İnsanların borlara maruz kalmasında birincil maruziyetin çoğu durumda diyet alımı yoluyla olduğu kabul edilmektedir. Bununla birlikte, dünyadaki içme suyu kaynaklarındaki bor varlığı nedeniyle bu maruz kalma yolu da önemlidir. Su kaynaklarında borun önemi, AB'de güvenli içme suyu standartları oluşturulduğundan beri birçok araştırmacının dikkatini çekmiştir [61]. 2004 yılında ABD'nde bor üzerine yeni ve daha güvenilir araştırmalar sonucunda su kaynaklı izin verilen günlük bor dozu 14 mg bor/gün olarak revize edilmiştir. Bu değişiklik, esas olarak, güvenlik faktörünün hesaplanmasındaki bir değişiklikten kaynaklanmaktadır; buradaki belirsizlik faktörü, varsayılan faktör olan 100'den 60'a düşürülmüştür. EPA'nın belirsizlik faktörleri kullanımı genellikle eksik verilerden, yani hesaba katılması gereken verilerden (bireyler arası veya türler arası) değişkenlik, türler arasındaki ekstrapolasyonlar,

yaşam süresi veya kronik maruziyet sağlamak için zaman içindeki ekstrapolasyonlar, olumsuz etki düzeyleri vb.) kaynaklanmaktadır. Bor bileşenlerinin sanayi alanlarından içme suyu kaynaklarına akışıyla ilgili endişeler daha fazla politika revizyonu getirmiştir [62, 63].

Bor ile ilgili EFSA (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi) kararları, öncelikle besin kaynağı olarak borik asit ve sodyum boratın bor kaynağı olarak kullanılmasına izin veren ve ikinci sırada sağlık risklerini önlemek için doğal mineralli sularda maksimum bor konsantrasyonu belirleyen bir bildirim kabul edilmesiyle sonuçlanmıştır. Panellerde yetişkinler için 10 mg bor/gün değeri güvenli bor alım seviyesi olarak belirlenmişken bebeklerde en küçük yaş grubu 1-3 olan kategori için ise 3 mg bor/gün olarak belirtilmiştir. Su tüketimi ile çocukların günlük bor maruziyette üst sınırı aşmasını önlemek için şişelenmiş sularda maksimum 1.5 mg bor/L limiti belirlenmiştir [64, 65]. Yetişkin bireyler için akut kantitatif doz yanıt verileri 1.4 ile 70 mg/kg vücut ağırlığı arasında değişmektedir. Nielsen [19] tarafından, yutulan borun asgari ölümcül dozu (borik asit olarak) bebekler için 2-3 g, çocuklar için 5-6 g ve yetişkinler için 1-30 g olarak belirtilmiştir. Borik asit ve sodyum boratlar, yüksek dozlarda kullanıldığında (hayvan çalışmaları sonucunu takiben) üreme ve gelişmeye toksik olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte, epidemiyolojik çalışmalarda bor maruziyetinin üreme ve gelişme üzerindeki olumsuz etkileri üzerine nadir çalışmalar bulunmaktadır. Bu bağlamda borik asit üretim tesisinde istihdam edilen ve bor bileşenlerine aşırı derecede maruz kalan işçilerin üreme toksisite göstergelerini araştırmak amacıyla Başaran ve ark. [66] tarafından Bandırma, Türkiye'de bir çalışma yürütülmüştür. Çalışma 204 çalışan katılımı ile gerçekleştirilmiş ve yüksek maruziyetteki işçi grubunun ortalama kan bor konsantrasyonu 223.89 ng/g olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak bor maruziyetinin üreme toksisitesi göstergeleri üzerine olumsuz etkilerinin gözlenmediği rapor edilmiştir. Bu sonuçlar, Çin'de iş yaşamında bor bileşenlerine maruz kalan işçilerle ilgili daha önce yayınlanmış çalışmaların sonuçları ile de uyumludur [65, 67]. Kelly [68] tarafından erkeklere diyetle 4500 ppm üzerinde borik asit verildiğinde testislerde körelme olduğu ve düzey 1000 ppm'e düşürüldüğünde ise sperm hareketlerinde azalma görüldüğü bildirilmiştir. Ancak Şaylı [69] tarafından Balıkesir/Bandırma'da yapılan bir çalışmada bor ile kısırlığın hiçbir ilişkisi olmadığı ortaya konulmuştur.

Bordaki mesleki maruziyet, insan nüfusunun küçük bir yüzdesini etkilemektedir. Literatürdeki çalışmalar genellikle bor madeninde ve ilgili işleme tesislerinde yapılmıştır (Tablo 2). Çalışmalarda genelde bor maruziyetinin kadın ve erkek bireylerde üreme sistemi üzerindeki etkilerine odaklanılmıştır.

Ağır metaller bilindiği üzere çevrede birikebilir ve ekosistemlere ve insan sağlığına ciddi zararlar verebilir. Bor, çeşitli biyolojik fonksiyonları ile temel mikro besin olarak kabul edilse de borik asidin antioksidan etkilerinin de araştırılması gerektiği bildirilmiştir. Hücresel aktivitelerdeki önemli bor bileşiklerinin potansiyelini araştırmak amacıyla insan kanında yapılan bir

çalışmada bazı bor bileşiklerinin (borik asit, boraks, kolemanit ve uleksit) genotoksiste üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmada, test edilen bor bileşikleri (5-20 ppm), düşük dozda ağır metallerin neden olduğu genotoksik etkileri önemli ölçüde azaltmıştır. Sonuç

olarak, bor bileşiklerinin koruyucu etkisinin antioksidan kapasitelerinden kaynaklandığı belirtilmiştir. Böylece, bu bileşiklerin fonksiyonel gıda ve ilaç hammaddelerinin geliştirilmesinde yararlı olabileceği söylenebilir [87].

Tablo 2 Mesleki veya çevresel olarak bor bileşiklerine maruz kalan kişiler üzerinde yapılan çalışmalar

Çalışmadaki mevcut bor maruziyeti	Çalışmanın yapıldığı yer, grup	Değerlendirilen parametre	Bulgular	Kaynak
Düşük, orta ve yüksek toz maruziyetleri	Boraksın paketlenme ve nakliyesini yapan işçiler	Kandaki bor konsantrasyonu	Kandaki maksimum bor düzeyi, hayvanlarda güvenli dozlardan 10 kat azdır.	70
Boraks tozu maruziyeti (1.1 mg-14.6 mg bor/m ³)	Boraks çalışanları	Solunum semptomları	Solunum yolu tahrişi ≥ 4.0 mg bor/m ³ maruziyette gözlenmiştir.	71, 72
Sodyum borat tozu maruziyeti	Boraks madenciligi ve arıtma tesisinde çalışan sanayi işçileri	Akut tahriş edici etki	Sigara içenler, havadaki sodyum borat tozuna içmeyenlere göre daha az duyarlıdır.	73
Hava yolu ile maruziyet	Bora çevresel, mesleki veya her iki yolla maruz kalan kişiler	Doğurganlık ve üreme	Borun insan doğurganlığını ve üremesini etkilediğine dair kanıt yoktur.	74
İçme suyu kaynaklı maruziyet (29 mg bor/L'ye kadar)	Türkiye'de bu duruma fazla maruz kalan bir popülasyon	Doğurganlık	Doğurganlık üzerinde herhangi bir olumsuz etki yoktur.	75-77
Sodyum borat tozu maruziyeti	Madencilik ve üretimde çalışan erkekler	Üreme	Yüksek borat dozlarının olumsuz üreme etkileri yoktur.	78, 79
Borik asit veya sodyum borat maruziyeti	Bor endüstrisi erkek çalışanları	Kanda bor miktarı, üreme sistemi, sperm yoğunluğu	Üreme sistemi ve sperm yoğunluğuna önemli etki yoktur.	80, 81
47.17 mg bor/gün bor maruziyeti	Bor madeninde çalışan erkek işçiler	Semen özellikleri	Semen parametreleri üzerine olumsuz bir etki yoktur.	82
46 mg bor/gün bor maruziyeti	Bandırma ve Bigadiç'te yaşayan kadınlar	Üreme ve doğurganlık	Düşük, ölü-erken doğum-anomali, yenidoğan ölümüne olumsuz etkiler yoktur.	83
Ortalama 44.9 mg bor/gün bor maruziyeti	Mesleki ve çevresel olarak bor bileşiklerine maruz kalan erkek işçiler	Doğumda cinsiyet oranları	Semen örneklerindeki toplam Y:X sperm oranları ile bor maruziyeti arasında bir ilişki yoktur.	84
6.5 mg/gün bor maruziyeti	Bor madeni çalışanları	Semen özellikleri	Denenen düzeyin olumsuz etkisi yoktur.	85
Bor maruziyeti	Bor maden işçileri ve çevreden seçilen erkek işçiler	Kandaki bor konsantrasyonu ve üreme etkileri	Bor konsantrasyonu ile semen parametreleri arasında anlamlı ilişki gözlenmemiştir.	86

DIYET İLE ALINAN BORUN DEĞERLENDİRİLMESİ

Literatürdeki mevcut bilgiler, günde <1 mg bor alan kişilerin bu maruziyetten sağlığa faydalı etki göreceği ve üst alım düzeyinin (Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada'da 20 mg/gün) üzerindeki alımların sakıncalı olabileceği yönündedir. İnsan diyetinin günde 1 ile 20 mg arasında bor içerip içermediğini belirlemek amacıyla yapılan birkaç çalışmada, yaygın olarak tüketilen yiyeceklerin bor içeriği ve günlük tahmini diyet alımı üzerinde odaklanılmıştır [88]. Bu çalışmalarda bor düzeylerini belirlemek için Hunt ve ark. [89], Anderson ve Cunningham [90] ve Hunt ve Meacham [91] tarafından farklı analiz ve sindirim teknikleri kullanılmıştır. Rainey ve Nyquist [92], bitki kökenli gıdaların, özellikle meyveler ve yapraklı sebzeler, kabuklu yemişler, baklagiller, şarap ve biranın bor bakımından zengin olduğunu belirtmişlerdir. En yüksek bor konsantrasyonları ($\mu\text{g/g}$ taze ağırlık) avokado (14.3 ± 0.4), fıstık ezmesi (5.9 ± 0.2), kuru erik suyu

(5.6 ± 0.0), çikolata tozu (4.3 ± 0.4), şarap (3.6 ± 0.0), üzüm suyu (3.4 ± 0.0) ve cevizde (2.6 ± 0.1) belirtilmiştir [91].

Bor analizi pahalı ve zaman alıcı olduğu için, gıda ve takviyelerdeki miktarlarının analize fazlaca yapılmamaktadır. Günümüzde, idrarla atılım genellikle diyetle bor alımının bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Diyet takviyeleri, diyetle alınan bor miktarını değerlendirmede başka bir karmaşık faktördür. Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Tıp Kütüphanesi Diyet Takviyeleri Etiketleri Veritabanı, bir bileşen olarak bor içeren giderek artan sayıda gıda takviyeleri olduğunu belirtmektedir. 2009 yılında bor miktarı 203 üründe 0.07 ile 3 mg/birim arasında değişirken; sadece 3'ü 3 mg/birim içermekte idi. Sıvı mineral takviyesi için düzeltilmiş değer olarak 750 $\mu\text{g}/15$ mL birim belirtilmiştir [88]. Takviyelere ek olarak, deniz tuzları ve chia tohumları gibi diğer bor kaynakları da besinlerle alınan bor miktarını etkileyebilmektedir. Günümüzde, bor için değerlendirme yöntemlerinin gelişmesine rağmen, gıda kayıtları kullanılarak diyet alımına ilişkin tahminlerin

dikkatle incelenmesi gerekmektedir. Belirli bir süre boyunca tüm öğelerin (gıda, su ve takviyeler) analitik belirlenmesi bor alımını değerlendirmek için en doğru yöntem olacaktır. Belirlenen bor alımının doğruluğunu desteklemek için idrar bor atılımı da kullanılabilir.

Yapılan bir çalışmada [93], menopoz sonrası kadınları içeren bir araştırma grubunda borun ortalama idrarla atılımının 2 kadın için <0.5 mg/gün ve 14 kadın için 0.5 ile 1.0 mg/gün arasında olduğu belirtilmiştir. Diyet ile bor alımı üzerine yapılan denemelerde [20, 94-96], katılımcılar 63 gün boyunca yalnızca 0.2 ile 0.4 mg/gün bor sağlayan bir diyet tükettikten sonra 3 mg/gün bor takviyesi koşullarında olumlu sonuçlar vermişlerdir. Bu bulgular, günde 1.0 mg/gün üzerindeki bor alımının insan sağlığına yararlı etkileri olacağını göstermektedir.

Veliöglü ve ark. [97] tarafından yapılan bir çalışmada bor madeni havzalarındaki yerleşim birimlerinde (1. bölge olarak Balıkesir'in ilçelerinden Bigadiç'e bağlı İskele kasabası, Osmanca köyü ve Yeniköy; 2. bölge olarak Kütahya'nın Hisarcık ve Emet ilçelerinin Dereköy, Hamamköy ve Yukarıyoncağa köyleri; 3. bölge olarak ise Eskişehir'in Seyitgazi ilçesine bağlı Kırka beldesi) üretilen bazı bitkisel ürünlerin ve su örneklerinin bor miktarı saptanmıştır. Su örneklerinde bor miktarları İskele'de 6.74, Osmanca'da 2.45, Yeniköy'de 0.23, Bademli'de 0.10, Seyitgazi'de 1.49, Kırka'da 0.44, Kunduzlar Barajı'nda 1.19 ve Çatören Barajı'nda 1.45 mg/litre olarak belirlenmiştir. İçme suları için 0.1 mg/kg düzeyini aşmayan bor miktarının ideal olduğu göz önüne alındığında bazı bölgelerde saptanan değerlerin üst limiti oldukça aştığı görülmektedir. Yalnızca Bademli köyündeki suyun bor açısından ideal düzeyde olduğu saptanmıştır. Çalışma sonucunda diğer bölgelerdeki suyun içme suyu olarak kullanımının sakıncalı olacağı belirtilmiştir. Fakat bu suların sulama amaçlı olarak ekili alanlarda kullanılması bu bölgelerdeki çeşitli tahıl, meyve ve sebzelerin de bor içeriğinin doğal düzeyinin üzerinde çıkmasına neden olmuştur.

Şimşek ve ark. [98], Türkiye'de (Balıkesir, Bursa, Eskişehir, Kütahya) borat minerallerine maruz kalmanın sağlık üzerindeki etkilerini araştırma amaçlı sebzeler, meyveler ve diğer bazı gıdalardaki bor miktarlarını belirlemişlerdir. Çalışmada borat üretilen bölgelerden örnek alınan gıdalarda en yüksek bor düzeyleri (mg/kg), antep fıstığı (67.0), üzüm yaprağı (60.48), vişne (57.03), ayva (38.78), şeftali (34.49), üzüm (20.7), yeşil fasulye (19.49), olgunlaşmamış şeftali (18.92) ve maydanozda (10.24) belirlenmiştir. Türk topraklarının yüksek bor içeriğinden dolayı gıdalarda belirlenen bor miktarlarının genelde yüksek olduğu ifade edilmiştir. Çoğu gıda için burada sunulan ortalama değerlere ve borun insan üremesini olumsuz etkilemediği gerçeğine dayanarak, borat yatakları üzerinde/yakınındaki topluluklar üzerinde yapılan çalışmalarda ortaya çıktığı gibi 10-20 mg/gün bor alımının güvenli olduğu sonucuna varılmıştır. İnsanlar tarafından gıdalar yoluyla bor alımının, özellikle tartışılan alanlarda, tahmin edilen 0.70-0.91 mg/gün miktarının çok üzerinde olabileceği öne sürülmüştür [91]. Rainey ve ark. [92], Amerika Birleşik Devletleri'ndeki ortalama diyet yoluyla bor alımları tahminlerini erkekler için 1.17-2.42 mg/gün ve kadınlar için 0.96-1.94 mg/gün

olarak bildirmişlerdir. Fakat diyetteki çeşitli gıda gruplarının oranlarına ve topraktaki bor konsantrasyonlarına bağlı olarak bu miktarlar büyük ölçüde değişiklik gösterebilir. Ortalama genel bor alımı için bildirilen değerler Birleşik Devletler'de 1.7-7.0; Meksika'da 1.75-2.12; Avrupa Birliği'nde 0.8-1.9; Avustralya'da 2.16-2.28; ve Kore'de 0.93 mg/gün olarak belirlenmiştir [92, 99]. Farklılıklar, topraktaki bölgesel farklılıklar ve lif ve protein açısından zengin bitki besinlerinin tüketimi ile ilişkilidir.

Kore'de yürütülen bir çalışmada [100], kadınlarda bor alımının kemik mineral yoğunluğu ile ilişkisi 134 yetişkin bireyin diyeti incelenerek ortaya konulmuştur. Kişilerin günlük ortalama enerji ve bor alımları sırasıyla 6.538,53 kJ ve 926.94 µg olarak bildirilmiştir. Çalışmada sebzeler, meyveler ve tahıllardan bor alımı, toplam bor alımının %61.72'sini karşılamış ve günlük bor alımına en çok katkıda bulunan gıda maddesi olarak pirinç belirlenmiştir. Araştırmanın bulguları değerlendirildiğinde bor alımı, kemik mineral yoğunluğu ile anlamlı bir ilişki göstermemiştir. Başka bir çalışmada Boyacıoğlu ve ark. [101], Balıkesir'in bazı bölgelerinde içme suyu kaynaklı yüksek (≥1 mg/litre) veya düşük (<1mg/litre) bor konsantrasyonuna maruz kalan 55-60 yaş arası 53 postmenopozal kadın üzerinde günlük bor alımı ile osteoporoz arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Bulgular doğrultusunda günlük 1 mg/litre bor alımının postmenopozal kadınlarda kemik metabolizmasını olumlu etkileyebileceği sonucuna varılmıştır.

Boratlar arasında diyetle en çok maruz kalınan ve en yaygın olarak incelenen nutrasötik, osteoartrit ve osteoporoz tedavisinde destekleyici olarak da kullanılan kalsiyum fruktoborattır. Kalsiyum fruktoborat temelde bir şeker-borat esteri (SBE) olup bitki kökenlidir, canlıların hücreleri tarafından kolayca emilir ve çoğunlukla sebze ve meyvelerde bulunur. SBE'nin en büyük avantajı, diğer boratlara göre daha az toksisiteye sahip olmasıdır [102]. Anti-inflamatuvar özelliklere sahip olması nedeniyle kalsiyum fruktoborat içeren diyet takviyelerinin yaşam kalitesini arttırabileceği belirtilmiştir [103-105].

SONUÇ

Borun hayvanlar, insanlar ve bitkiler için gerekli bir mineral olduğu kabul edilmektedir. Diyet borun birçok metabolik enzimin aktivitesini ve ayrıca steroid hormonlarının metabolizmasını ve kalsiyum, magnezyum ve D vitamini de dahil olmak üzere çeşitli mikro besinleri etkilediği belirtilmiştir. Borun hayvanlar üzerindeki etkilerini belirlemek için fazla sayıda çalışma yapılmasına ve insanlar üzerindeki etkileri konusunda da veriler bulunmasına rağmen borun ne kadar güvenli olabileceğine dair genel tablonun hala yetersiz olduğu söylenebilir.

Bor bileşiklerine maruz kalmayla ilişkili sağlık etkilerini değerlendirmek için sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır. Mevcut veriler maruziyetin solunum yolu, nazofarenks (üst yutak, geniz) ve göz üzerindeki kısa süreli tahriş edici etkilerle ilişkili olduğunu göstermektedir. Ancak bu etkiler kısa vadeli ve geri dönüşümlü görünmektedir. İnsan verilerinin eksikliğine dayanarak, bor insan

kanserojenliği açısından sınıflandırılmaz. Gelişimsel ve üreme toksisitesine ilişkin veriler, sıçanlarda daha düşük fetal vücut ağırlığının kritik faktör olduğunu göstermektedir. Doz arttıkça farklı hayvan türlerinde gözlenen etkiler de değişmektedir. Fare ve sıçanlar üzerinde yapılan hayvan çalışmaları, borik asidin kanserojenliğine dair net bir kanıt göstermemiştir.

İnsan sağlığına borun etkilerinin daha net anlaşılması ve detaylandırılması için borun insan metabolizmasındaki gerekliliği ve insan sağlığı üzerindeki etkilerinin bor tüketim miktarları ile ilişkisi bu alandaki çalışmalar için öncelikli araştırma konuları olmalıdır. Aslında çevremizdeki ve insan vücudundaki borun genel bir değerlendirmesi, insan sağlığı ile ilgili bor hakkındaki araştırmalardan önce olmalı ve insan sağlığı ile ilgili bilgilerin bu temeller ile açıklanması gerekmektedir.

Bulgular, borun hayvanların yaşam döngüsünü tamamlamak için gerekli olduğunu göstermiştir. Ayrıca önerilen miktarlarda tüketildiğinde kemik sağlığının, beyin fonksiyonlarının ve bağışıklık sisteminin güçlenmesine yardımcı olur; artrit riskini azaltır, birkaç hormonun etkisini artırır ve bazı kanser türlerinde riski azaltır. Bu, 1 mg/gün üzerindeki bor alımının insanların "daha uzun ve daha iyi yaşamalarına" yardımcı olabileceğini göstermektedir. Meyveler, sebzeler, kabuklu meyşer ve bakliyat gibi bor bakımından zengin gıdaların tüketilmesi, makul bir diyet önerisi olarak kabul edilmelidir.

KAYNAKLAR

- [1] Kılıç, A.M., Kılıç, Ö., Andaç, İ., Çelik, A.G. (2009). Boron mining in Turkey, the marketing situation and the economical importance of Boron in the World IV. *In International Boron Symposium*, Eskişehir, Turkey.
- [2] Parks, J.L., Edwards, M. (2005). Boron in the environment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 35(2), 81-114.
- [3] Howe, P.D. (1998). A review of boron effects in the environment. *Biological Trace Element Research*, 66(1-3), 153-166.
- [4] Bolaños, L., Lukaszewski, K., Bonilla, I., Blevins, D. (2004). Why boron? *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(11), 907-912.
- [5] Nielsen, F.H. (1997). Boron in human and animal nutrition. *Plant and Soil*, 193(1-2), 199-208.
- [6] Başoğlu, A., Sevinc, M., Guzelbektas, H., Civelek, T. (2000). Effect of borax on serum lipid profile in dogs. *Online Journal of Veterinary Research*, 4, 153-156.
- [7] Kabu, M., Civelek, T. (2012). Effects of propylene glycol, methionine and sodium borate on metabolic profile in dairy cattle during periparturient period. *Revue De Medecine Veterinaire*, 163(8), 419-430.
- [8] Hunt, C.D. (2012). Dietary boron: progress in establishing essential roles in human physiology. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 26(2-3), 157-160.
- [9] EFSA (Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS)). (2013). Scientific Opinion on the re-evaluation of boric acid (E 284) and sodium tetraborate (borax) (E 285) as food additives. *EFSA Journal*, 11(10), 3407.
- [10] UKEVM (U.K. Expert Group on Vitamins and Minerals). 2002. Preliminary Risk Assessment—Boron, London, UK: Food Standards Agency.
- [11] Moore, J.A., Expert Scientific Committee. (1997). An assessment of boric acid and borax using the IEHR evaluative process for assessing human developmental and reproductive toxicity of agents. *Reproductive Toxicology*, 11(1), 123-160.
- [12] Culver, B.D., Shen, P.T., Taylor, T.H., Feldstein, A.L., Anton-Culver, H., Strong, P.L. (1993). Absorption of boron by sodium borate and boric acid production workers. *Report to US Borax*, August, 11.
- [13] Culver, B.D., Hubbard, S.A. (1996). Inorganic boron health effects in humans: An aid to risk assessment and clinical judgment. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine: The Official Publication of the International Society for Trace Element Research in Humans*, 9(4), 175-184.
- [14] Rainey, C.J., Nyquist, L.A., Christensen, R.E., Strong, P.L., Culver, B.D., Coughlin, J.R. (1999). Daily boron intake from the American diet. *Journal of the American Dietetic Association*, 99(3), 335-340.
- [15] Samman, S., Foster, M., Hunter, D. (2011). The role of boron in human nutrition and metabolism. *Boron Science: New Technologies and Applications*, 73, 73-82.
- [16] WHO (World Health Organization). (1998). International Programme on Chemical Safety. *Environmental Health Criteria 204*. Boron. 1-10.
- [17] EU. (1995). Technical guidance document. European Commission: Risk Assessment of New and Existing Substances.
- [18] Goldbach, H.E., Wimmer, M.A. (2007). Boron in plants and animals: is there a role beyond cell-wall structure? *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 170(1), 39-48.
- [19] Nielsen, F.H. (2000). The emergence of boron as nutritionally important throughout the life cycle. *Nutrition*, 16(7-8), 512-514.
- [20] Penland, J.G. (1998). The importance of boron nutrition for brain and psychological function. *Biological Trace Element Research*, 66(1-3), 299-317.
- [21] Bai, Y., Hunt, C.D. (1996). Dietary boron enhances efficacy of cholecalciferol in broiler chicks. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 9(3), 117-132.
- [22] Fort, D.J., Stover, E.L., Strong, P.L., Murray, F.J., Keen, C.L. (1999). Chronic feeding of a low boron diet adversely affects reproduction and development in *Xenopus laevis*. *The Journal of Nutrition*, 129(11), 2055-2060.
- [23] Hegsted, M., Keenan, M.J., Siver, F., Wozniak, P. (1991). Effect of boron on vitamin D deficient rats. *Biological Trace Element Research*, 28(3), 243-255.
- [24] Young, E.G., Smith, R.P., MacIntosh, O.C. (1949). Boric acid as a poison: Report of six accidental

- deaths in infants. *Canadian Medical Association Journal*, 61(5), 447-450.
- [25] Kent, N.L., McCance, R.A. (1941). The absorption and excretion of minor elements by man: Silver, gold, lithium, boron and vanadium. *Biochemical Journal*, 35(7), 837-844.
- [26] Weir Jr, R.J., Fisher, R.S. (1972). Toxicologic studies on borax and boric acid. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 23(3), 351-364.
- [27] Goldbloom, R.B., Goldbloom, A. (1953). Boric acid poisoning: report of four cases and a review of 109 cases from the world literature. *The Journal of Pediatrics*, 43(6), 631-643.
- [28] Nielsen, F.H. (2008). Is boron nutritionally relevant? *Nutrition Reviews*, 66(4), 183-191.
- [29] Benderdour, M., Bui-Van, T., Dicko, A., Belleville, F. (1998). In vivo and in vitro effects of boron and boronated compounds. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 12(1), 2-7.
- [30] Cui, Y., Winton, M.I., Zhang, Z.F., Rainey, C., Marshall, J., De Kernion, J.B., Eckhert, C.D. (2004). Dietary boron intake and prostate cancer risk. *Oncology Reports*, 11(4), 887-892.
- [31] Mahabir, S., Spitz, M.R., Barrera, S.L., Dong, Y.Q., Eastham, C., Forman, M.R. (2008). Dietary boron and hormone replacement therapy as risk factors for lung cancer in women. *American Journal of Epidemiology*, 167(9), 1070-1080.
- [32] Korkmaz, M., Uzgören, E., Bakırdere, S., Aydın, F., Ataman, O.Y. (2007). Effects of dietary boron on cervical cytopathology and on micronucleus frequency in exfoliated buccal cells. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 22(1), 17-25.
- [33] Penland, J.G. (1994). Dietary boron, brain function, and cognitive performance. *Environmental Health Perspectives*, 102(suppl 7), 65-72.
- [34] Devirian, T.A., Volpe, S.L. (2003). The physiological effects of dietary boron. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(2), 219-231.
- [35] Nielsen, F.H. (2009). Micronutrients in parenteral nutrition: boron, silicon, and fluoride. *Gastroenterology*, 137(5), S55-S60.
- [36] Eckhert, C., Barranco, W., Kim, D. (2007). Boron and prostate cancer a model for understanding boron biology. *Advances in Plant and Animal Boron Nutrition*, 291-297.
- [37] Duydu, Y., Aydın, S., Undeger, U., Yavuz Ataman, O., Aydos, K., Düker, Y., Maximilian Bolt, H. (2016). Is boric acid toxic to reproduction in humans? Assessment of the animal reproductive toxicity data and epidemiological study results. *Current Drug Delivery*, 13(3), 324-329.
- [38] Bolt, H.M., Başaran, N., Duydu, Y. (2020). Effects of boron compounds on human reproduction. *Archives of Toxicology*, 94, 714-724.
- [39] Blevins, D.G., Lukaszewski, K.M. (1994). Proposed physiologic functions of boron in plants pertinent to animal and human metabolism. *Environmental Health Perspectives*, 102(suppl 7), 31-33.
- [40] Appel, P.W., Na-Oy, L. (2012). The borax method of gold extraction for small-scale miners. *Journal of Health and Pollution*, 2(3), 5-10.
- [41] MacGillivray, P.C., Fraser, M.S. (1953). Boric acid poisoning in infancy arising from the treatment of napkin rash. *Archives of Disease in Childhood*, 28(142), 484.
- [42] Linden, C.H., Hall, A.H., Kulig, K.W., Rumack, B.H. (1986). Acute ingestions of boric acid. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 24(4), 269-279.
- [43] Restuccio, A., Mortensen, M.E., Kelley, M.T. (1992). Fatal ingestion of boric acid in an adult. *The American Journal of Emergency Medicine*, 10(6), 545-547.
- [44] Hubbard, S.A. (1998). Comparative toxicology of borates. *Biological Trace Element Research*, 66(1-3), 343-357.
- [45] Price, C.J., Strong, P.L., Murray, F.J., Goldberg, M.M. (1997). Blood boron concentrations in pregnant rats fed boric acid throughout gestation. *Reproductive Toxicology*, 11(6), 833-842.
- [46] Scialli, A.R., Bonde, J.P., Brüske-Hohlfeld, I., Culver, B.D., Li, Y., Sullivan, F.M. (2010). An overview of male reproductive studies of boron with an emphasis on studies of highly exposed Chinese workers. *Reproductive Toxicology*, 29(1), 10-24.
- [47] Culver, B.D., Shen, P.T., Taylor, T.H., Lee-Feldstein, A., Anton-Culver, H., Strong, P.L. (1994). The relationship of blood-and urine-boron to boron exposure in borax-workers and usefulness of urine-boron as an exposure marker. *Environmental Health Perspectives*, 102(suppl 7), 133-137.
- [48] Price, C.J., Strong, P.L., Marr, M.C., Myers, C.B., Murray, F.J. (1996). Developmental toxicity NOAEL and postnatal recovery in rats fed boric acid during gestation. *Fundamental and Applied Toxicology*, 32(2), 179-193.
- [49] Draize, J.H., Kelley, E.A. (1959). The urinary excretion of boric acid preparations following oral administration and topical applications to intact and damaged skin of rabbits. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1(3), 267-276.
- [50] Heindel, J.J., Price, C.J., Field, E.A., Marr, M.C., Myers, C.B., Morrissey, R.E., Schwetz, B.A. (1992). Developmental toxicity of boric acid in mice and rats. *Fundamental and Applied Toxicology*, 18(2), 266-277.
- [51] Price, C.J., Marr, M.C., Myers, C.B., Seely, J.C., Heindel, J.J., Schwetz, B.A. (1996). The developmental toxicity of boric acid in rabbits. *Fundamental and Applied Toxicology*, 34(2), 176-187.
- [52] Murray, F.J., Schlekot, C.E. (2004). Comparison of risk assessments of boron: alternate approaches to chemical-specific adjustment factors. *Human and Ecological Risk Assessment*, 10(1), 57-68.
- [53] Ku, W.W., Chapin, R.E., Wine, R.N., Gladen, B.C. (1993). Testicular toxicity of boric acid (BA): relationship of dose to lesion development and recovery in the F344 rat. *Reproductive Toxicology*, 7(4), 305-319.
- [54] Ku, W.W., Shih, L.M., Chapin, R.E. (1993). The effects of boric acid (BA) on testicular cells in culture. *Reproductive Toxicology*, 7(4), 321-331.
- [55] Krishnan, B.B., Selvaraju, S., Gowda, N.K.S., Subramanya, K.B., Pal, D., Archana, S., Bhatta, R. (2019). Dietary boron supplementation enhances

- sperm quality and immunity through influencing the associated biochemical parameters and modulating the genes expression at testicular tissue. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 55, 6-14.
- [56] Sabuncuoğlu, B., Kocatürk, P., Yaman, O., Kavaş, G., Tekelioğlu, M. (2006). Effects of subacute boric acid administration on rat kidney tissue. *Clinical Toxicology*, 44(3), 249-253.
- [57] Sander, J.E., Dufour, L., Wyatt, R.D., Bush, P.B., Page, R.K. (1991). Acute toxicity of boric acid and boron tissue residues after chronic exposure in broiler chickens. *Avian Diseases*, 745-749.
- [58] Dani, H.M., Saini, H.S., Allag, I.S, Sareen, K. (1971). Effect of boron toxicity on protein and nucleic acid contents of rat tissues. *Research Bulletin of the Panjab University*, 22(1-2), 229-235.
- [59] Ball, R.W., Harrass, M.C., Culver, B.D. (2001). Boron. *Patty's Toxicology*, 885-934.
- [60] Turkez, H., Geyikoglu, F., Tatar, A., Keles, M.S., Kaplan, İ. (2012). The effects of some boron compounds against heavy metal toxicity in human blood. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64(1-2), 93-101.
- [61] Weinthal, E., Parag, Y., Vengosh, A., Muti, A., Kloppmann, W. (2005). The EU drinking water directive: the boron standard and scientific uncertainty. *European Environment*, 15(1), 1-12.
- [62] EPA, U. (2008). Drinking water health advisory for boron. Health and Ecological Criteria Division. US Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- [63] EPA, U. (2008). Health effects support document for boron. Health and Ecological Criteria Division. US Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- [64] EFSA (European Food Safety Authority). (2004). Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA) on the tolerable upper intake level for boron (sodium borate and boric acid). *EFSA Journal*, 80, 1-22.
- [65] EFSA (European Food Safety Authority). (2005). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request of the Commission related to concentration limits for boron and fluoride in natural mineral waters. *EFSA Journal*, 237, 1-8.
- [66] Başaran, N., Duydu, Y., Bolt, H.M. (2012). Reproductive toxicity in boron exposed workers in Bandırma, Turkey. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 26(2-3), 165-167.
- [67] Xing, X., Wu, G., Wei, F., Liu, P., Wei, H., Wang, C. Elashoff, D. (2008). Biomarkers of environmental and workplace boron exposure. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 5(3), 141-147.
- [68] Kelly, G.S. (1997). Boron: a review of its nutritional interactions and therapeutic uses. *Alternative Medicine Review*, 2(1), 48-56.
- [69] Şaylı, B.S. (2003). Low frequency of infertility among workers in a borate processing facility. *Biological Trace Element Research*, 93(1-3), 19-29.
- [70] Imbus, H.R., Cholak, J., Miller, L.H., Sterling, T. (1963). Boron, cadmium, chromium, and nickel in blood and urine: A survey of American working men. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 6(2), 286-295.
- [71] Garabrant, D.H., Bernstein, L., Peters, J.M., Smith, T.J., Wright, W.E. (1985). Respiratory effects of borax dust. *Occupational and Environmental Medicine*, 42(12), 831-837.
- [72] Wegman, D. H., Eisen, E.A., Hu, X., Woskie, S.R., Smith, R.G., Garabrant, D.H. (1994). Acute and chronic respiratory effects of sodium borate particulate exposures. *Environmental Health Perspectives*, 102(suppl 7), 119-128.
- [73] Hu, X., Wegman, D. H., Eisen, E.A., Woskie, S.R., Smith, R.G. (1992). Dose related acute irritant symptom responses to occupational exposure to sodium borate dusts. *Occupational and Environmental Medicine*, 49(10), 706-713.
- [74] Block, C. (2003). Human and Environmental Risk Assessment on ingredients of household cleaning products. *Jornadas-Comite Espanol De La Detergencia*, 33, 39-44.
- [75] Şaylı, B.S. (2001). Assessment of fertility and infertility in boron exposed Turkish subpopulations. *Biological Trace Element Research*, 81, 255-267.
- [76] Şaylı, B.S. (1998). An assessment of fertility in boron-exposed Turkish subpopulations: 2. Evidence that boron has no effect on human reproduction. *Biological Trace Element Research*, 66(1-3), 409-422.
- [77] Şaylı, B.S. (1998). The sex ratio of offspring of people exposed to boron. *Reproductive Toxicology*, 12(6), 673-674.
- [78] Whorton, D., Haas, J., Trent, L. (1994). Reproductive effects of inorganic borates on male employees: birth rate assessment. *Environmental Health Perspectives*, 102(suppl 7), 129-132.
- [79] Whorton, M.D., Haas, J.L., Trent, L., Wong, O. (1994). Reproductive effects of sodium borates on male employees: birth rate assessment. *Occupational and Environmental Medicine*, 51(11), 761-767.
- [80] Liu, P., Wei, H., Guoping, W., Fusheng, W. (2006). Effects of occupational exposure to boron on the sperm quality of males. *Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases*, 24(3), 167-169.
- [81] Duydu, Y., Başaran, N., Bolt, H.M. (2012). Exposure assessment of boron in Bandırma boric acid production plant. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 26(2-3), 161-164.
- [82] Duydu, Y., Başaran, N., Aydın, S., Üstündağ, A., Yalçın, C.Ö., Anlar, H.G. Ickstadt, K. (2018a). Evaluation of FSH, LH, testosterone levels and semen parameters in male boron workers under extreme exposure conditions. *Archives of Toxicology*, 92(10), 3051-3059.
- [83] Duydu, Y., Başaran, N., Üstündağ, A., Aydın, S., Yalçın, C. Ö., Anlar, H.G., Ickstadt, K. (2018b). Birth weights of newborns and pregnancy outcomes of environmentally boron-exposed females in Turkey. *Archives of Toxicology*, 92(8), 2475-2485.
- [84] Duydu, Y., Başaran, N., Yalçın, C.Ö., Üstündağ, A., Aydın, S., Anlar, H.G., Ickstadt, K. (2019). Boron-exposed male workers in Turkey: no change in

- sperm Y: X chromosome ratio and in offspring's sex ratio. *Archives of Toxicology*, 93(3), 743-751.
- [85] Korkmaz, M., Yenigün, M., Bakırdere, S., Ataman, O.Y., Keskin, S., Müezzinođlu, T., Lekili, M. (2011). Effects of chronic boron exposure on semen profile. *Biological Trace Element Research*, 143(2), 738-750.
- [86] Robbins, W.A., Xun, L., Jia, J., Kennedy, N., Elashoff, D. A., Ping, L. (2010). Chronic boron exposure and human semen parameters. *Reproductive Toxicology*, 29(2), 184-190.
- [87] Turkez, H., Geyikođlu, F., Tatar, A. (2013). Borax counteracts genotoxicity of aluminum in rat liver. *Toxicology and Industrial Health*, 29(9), 775-779.
- [88] Nielsen, F.H., Meacham, S.L. (2011). Growing evidence for human health benefits of boron. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 16(3), 169-180.
- [89] Hunt, C.D., Shuler, T.R., Mullen, L.M. (1991). Concentration of boron and other elements in human foods and personal-care products. *Journal of The American Dietetic Association*, 91(5), 558-568.
- [90] Anderson, D.L., Cunningham, W.C., Lindstrom, T.R. (1994). Concentrations and intakes of H, B, S, K, Na, Cl, and NaCl in foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 7(1-2), 59-82.
- [91] Hunt, C.D., Meacham, S.L. (2001). Aluminum, boron, calcium, copper, iron, magnesium, manganese, molybdenum, phosphorus, potassium, sodium, and zinc: concentrations in common western foods and estimated daily intakes by infants; toddlers; and male and female adolescents, adults, and seniors in the United States. *Journal of The American Dietetic Association*, 101(9), 1058-1060.
- [92] Rainey, C., Nyquist, L. (1998). Multicountry estimation of dietary boron intake. *Biological Trace Element Research*, 66(1-3), 79-86.
- [93] Nielsen, F.H., Penland, J.G. (1999). Boron supplementation of peri-menopausal women affects boron metabolism and indices associated with macromineral metabolism, hormonal status and immune function. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine: The Official Publication of the International Society for Trace Element Research in Humans*, 12(3), 251-261.
- [94] Penland, J.G. (1995). Quantitative analysis of EEG effects following experimental marginal magnesium and boron deprivation. *Magnesium Research*, 8(4), 341-358.
- [95] Nielsen, F.H. (1996). Evidence for the nutritional essentiality of boron. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 9, 215-229.
- [96] Nielsen, F.H., Gallagher, S.K., Johnson, L.K., Nielsen, E.J. (1992). Boron enhances and mimics some effects of estrogen therapy in postmenopausal women. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 5, 237-246.
- [97] Veliöğlu, S., Saylı, B.S., Altunsoy, S. (1999). Bor madeni havzalarında üretilen bazı gıdalarda bor miktarlarının belirlenmesi üzerine bir araştırma. *Gıda*, 24(1), 13-19.
- [98] Şimşek, A., Veliöğlu, Y.S., Coşkun, A.L., Saylı, bor.S. (2003). Boron concentrations in selected foods from borate-producing regions in Turkey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(6), 586-592.
- [99] Pizzorno, L. (2015). Nothing boring about boron. *Integrative Medicine: A Clinician's Journal*, 14(4), 35-48.
- [100] Kim, M.H., Bae, Y.J., Lee, Y.S., Choi, M.K. (2008). Estimation of boron intake and its relation with bone mineral density in free-living Korean female subjects. *Biological Trace Element Research*, 125(3), 213-222.
- [101] Boyacıoğlu, O., Orenay-Boyacıoğlu, S., Yıldırım, H., Korkmaz, M. (2018). Boron intake, osteocalcin polymorphism and serum level in postmenopausal osteoporosis. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 48, 52-56.
- [102] Khaliq, H., Juming, Z., Ke-Mei, P. (2018). The physiological role of boron on health. *Biological Trace Element Research*, 186(1), 31-51.
- [103] Militaru, C., Donoiu, I., Craciun, A., Scorei, I.D., Bulearca, A.M., Scorei, R.I. (2013). Oral resveratrol and calcium fructoborate supplementation in subjects with stable angina pectoris: effects on lipid profiles, inflammation markers, and quality of life. *Nutrition*, 29(1), 178-183.
- [104] Reyes-Izquierdo, T., Nemzer, B., Gonzalez, A.E., Zhou, Q., Argumedo, R., Shu, C., Pietrkowski, Z. B. (2012). Short-term intake of calcium fructoborate improves WOMAC and McGill scores and beneficially modulates biomarkers associated with knee osteoarthritis: a pilot clinical double-blinded placebo-controlled study. *American Journal of Biomedical Sciences*, 4(2), 111-122.
- [105] Scorei, R., Mitrut, P., Petrisor, I., Scorei, I. (2011). A double-blind, placebo-controlled pilot study to evaluate the effect of calcium fructoborate on systemic inflammation and dyslipidemia markers for middle-aged people with primary osteoarthritis. *Biological Trace Element Research*, 144(1-3), 253-263.

Fonksiyonel Bir Gıda: Yer Fıstığı ve Sağlığa Yararları

Beda Büşra Özalp¹ , Nilgün Seremet Kürklü²  

¹Yüksek İhtisas Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Çankaya, Ankara

²Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Konyaaltı, Antalya

Geliş Tarihi (Received): 17.02.2020, Kabul Tarihi (Accepted): 30.06.2020

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): nseremetkurklu@akdeniz.edu.tr (N. Seremet Kürklü)

☎ 0 242 310 61 03 📄 0 246 211 38 01

ÖZ

Yağlı tohumlu bitkilerin arasında yer alan yer fıstığı (*Arachis hypogaea* L.) içerdiği yararlı besin öğeleri ve insan sağlığı üzerine olumlu etkileri olan fonksiyonel bileşiklerinden dolayı dikkat çeken bir meyve türüdür. Yer fıstığı, 20 amino asidin tümünü farklı oranlarda içermekle birlikte önemli bir aminoasit olan arjinin için de en iyi kaynaklardan biridir. Yer fıstığının sağlık üzerine etkilerini incelemek amacıyla son yıllarda yapılan bilimsel araştırmalar yer fıstığının içerdiği doymamış yağ asitlerinin obezite dahil birçok hastalığın önlenmesinde önemli rol oynadığını ispatlamıştır. Ayrıca yer fıstığının yüksek arjinin, E vitamini, flavonoid ve fitosterol içermesinden dolayı diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar üzerine olumlu etkilerini gösteren çalışmalar da mevcuttur. Yer fıstığı zarı da son dönemlerde popülerlik kazanmış olup içerdiği yüksek kateşin ve prosiyanidin miktarından dolayı antiinflamatuvar etki göstererek inflamasyon ile ilişkili hastalıkları önleyebileceği belirtilmektedir. Bu derlemede yer fıstığının besin ögesi içeriği ve hastalıklar ile ilişkisi incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Yer fıstığı, *Arachis hypogaea*, Arjinin, Doymamış yağ asitleri, Fonksiyonel gıda

A Functional Food: Peanut and its Health Benefits

ABSTRACT

Peanut (*Arachis hypogaea* L.), which is one of the oilseed plants, is a fruit type that draws attention due to its nutritional content and positive effects on human health. Peanut contain all 20 amino acids in different proportions and is one of the best sources of arginine, an important amino acid. Scientific research in recent years on the effects of peanuts on human health has proven that unsaturated fatty acids in peanuts play an important role in preventing many diseases, including obesity. There are also studies showing the beneficial effect of peanuts on diabetes and cardiovascular diseases because they contain high arginine, vitamin E, flavonoids and phytosterols levels. Recently, peanut membrane has also gained popularity, and it is stated that it may exhibit anti-inflammatory effects and prevent inflammation related diseases because of its high content of catechin and procyanidin. In this review, nutritional content of peanuts and their relationship with some diseases were investigated.

Keywords: Peanut, *Arachis hypogaea*, Arginin, Unsaturated fatty acid, Functional food

GİRİŞ

Yer fıstığı baklagiller familyasından olup içerdiği yağ, protein, karbonhidrat ve çeşitli vitamin/minareller nedeniyle insan sağlığı açısından önemli bir yağlı

tohumdur [1]. Dünyada ekonomik anlamda yer fıstığının Virjinya, Runner, Spanish ve Valensiya türüne ait çeşitleri yetiştirilmektedir. Türkiye'de ise genel olarak Virginia ve Spanish gibi çeşitleri ekilmektedir [2]. Dünyada yer fıstığı üretiminin %37.8'ini Çin, %15.6'sını

Hindistan, %6.9'unu Nijerya karşılamaktadır. Türkiye de ise yer fıstığının üretim payı %0.37'dir [3]. Ülkemizde toplam yağlı tohum ekim alanlarının %10.9'unu yer fıstığı oluşturmakla birlikte yer fıstığının iklim koşulları açısından üretimine en uygun olan Akdeniz Bölge'sinde sıklıkla yetiştirildiği görülmektedir. Yer fıstığı kullanım alanlarına göre değerlendirildiğinde dünyada yağ sanayisinde için önemli bir hammadedir. Fakat ülkemizde yağ sanayisinde kullanımı tercih edilmemektedir. Ayrıca son yıllarda yer fıstığının yer fıstığı ezmesi ve unlu mamüllerde yer fıstığı unu olarak kullanımı yaygınlaşsa da genellikle çerez olarak tüketildiği görülmektedir [4]. Yer fıstığı tüm dünyada ciddi sağlık sorunlarına yol açan aflatoksin kontaminasyonu açısından en riskli gıda olarak değerlendirilmektedir. Çevre ve iklim koşulları (ortamın nemi, sıcaklığı vb.) yer fıstığının aflatoksin ile kirlenmesinde önemli rol aldığı için yer fıstığının hasat zamanı, soldurma, kurutma ve depolama koşullarına dikkat edilmesi gerekmektedir [5].

Yer fıstığı tohumunda yüksek miktarda riboflavin, tiamin, nikotik asit ve E vitamini bulunmakla birlikte A, C ve D vitaminlerinin miktarı yok denecek kadar azdır. Yer fıstığının kavrulması işlemi sırasında tiamindeki azalmaya karşılık niasin ve riboflavin vitaminleri miktarlarında önemli bir değişim olmadığı rapor edilmiştir [6]. Yapılan araştırmalar sonucunda yer fıstığının, resveratrol (3, 4', 5-trihidroksi-stilben), fenolik asitler, flavonoidler ve fitosteroller gibi biyoaktif bileşikler bakımından zengin olduğu, ayrıca koenzim Q10 ve arjininin içeriğinin de yüksek olduğu saptanmıştır [7]. Yer fıstığının içerdiği çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA) miktarının fazla, doymuş yağ asitleri (DYA) miktarının ise düşük olduğu, ayrıca birçok vitamin, mineral ve fenolik bileşiklerden zengin olması nedeniyle kardiyovasküler hastalıklardan, Alzheimer, Parkinson gibi sinir hücreleri kaybına neden olan nörodejeneratif hastalıklara ve çeşitli kanser türlerine kadar birçok hastalığın önlenmesinde ve tedavisinde etkili bir gıda olduğu belirtilmektedir [8, 9]. Bu derlemede de dünyada ve ülkemizde sıklıkla tüketilen yer fıstığı çeşitlerinin bileşimi ve insan sağlığı üzerindeki etkisi güncel bilgiler ışığında incelenmiştir.

YER FISTIĞININ BİLEŞİMİ

Yer fıstığı kolesterol içermemesi ve kompleks karbonhidrat olan posa içeriği bakımından zengin olması nedeniyle iyi bir besin kaynağıdır. Bunlara ek olarak yer fıstığı tohumlarının ham protein değerinin %22-30 civarında olması vejetaryenler ve veganlar için sağlıklı bir diyetel protein kaynağı olarak değerlendirilmektedir [10]. Daha önceki yıllarda yer fıstığı yağ miktarının yüksek (%50) olmasından dolayı sağlıklı bir gıda olarak nitelendirilmesine rağmen son yıllarda yapılan çalışmalarda bunun tam tersinin doğru olduğu anlaşılmıştır [11, 12]. Yer fıstığının enerji ve besin ögesi bileşimi Tablo 1'de verilmiştir [13].

Tablo 1. Çiğ yer fıstığının enerji ve besin ögesi bileşimi (100g)

Enerji ve Besin ögeleri	Miktar
Enerji (kcal)	567
Protein (g)	25.8
Yağ (g)	49.24
Kolesterol (mg)	-
Doymuş yağ asidi (g)	6.279
Tekli doymamış yağ asidi (g)	24.426
Çoklu doymamış yağ asidi (g)	15.558
Karbonhidrat (g)	16.13
Posa (g)	8.5
Kalsiyum (mg)	92
Demir (mg)	4.58
Magnezyum (mg)	168
Fosfor (mg)	376
Potasyum (mg)	705
Sodyum (mg)	18
Çinko (mg)	3.27
Bakır (mg)	1.144
Selenyum (µg)	7.2
Tiamin (mg)	0.64
Riboflavin (mg)	0.135
Niasin (mg)	12.066
B6 vitamini (mg)	0.348
Folat (µg)	240
E vitamini (alfa-tokoferol)	8.33

Makro Besin Ögeleri

Karbonhidratlar

Yer fıstığının karbonhidrat miktarı ve türü yetiştirildiği bölge, yetiştirilme tarzı, fıstığın olgunlaşma süresi ve çeşidine göre farklılık göstermektedir. Yer fıstığının bileşimindeki karbonhidratlar genel olarak değerlendirildiğinde yüksek miktarda sukroz, fruktoz, glikoz, inositol, rafinoz, stakioz içerdiği saptanmıştır [10]. Yağsız fıstık ununun yaklaşık %38 karbonhidrat içerdiği ve bu karbonhidratların %18'inin oligosakkaritler, %12.5'inin nişasta, %12.5'inin selüloz ve %4.0'ünün ise hemiselüloz olduğu tespit edilmiştir [14]. Yer fıstığının içerdiği karbonhidrat türünün büyük bir kısmının kompleks karbonhidrat olmasından dolayı glisemik indeks (GI=14) ve glisemik yükünün (GY=1) düşük olduğu bu nedenle de diyabet hastalarının tüketebileceği bir gıda olduğu düşünülmektedir [15]. Ek olarak, yer fıstığı veya yer fıstığı ezmesinin, bir simit ve bir bardak meyve suyu gibi yüksek glisemik yüklü bir öğüne eklendiğinde kan şekeri çok hızlı yükselmemesi nedeniyle kan glikoz düzeyini dengeleyici bir görev gördüğü de belirtilmektedir [16].

Amerika Diyabet Derneği (American Diabetes Association [ADA]); yer fıstığının kompleks karbonhidratları içermesinin yanı sıra magnezyum, arjinin ve E vitamini gibi kalp-damar sağlığı açısından olumlu etkileri olan besin ögelerini içermesi ve normoglisemik kan glikoz cevabı sağlamasından dolayı diyabetli bireylerin günlük diyetlerine eklenmesinin faydalı olabileceğini belirtmekte ve tavsiye etmektedir [17].

Protein

Yer fıstığı teknik olarak baklagiller familyasına girmekte; badem, ceviz veya diğer yağlı tohumlara göre nohut ve soya fasulyesine yapısal olarak daha fazla benzemekte ve fındığa nazaran protein bakımından daha zengin ve besleyici olarak tanımlanmaktadır [18]. Dünyada farklı türlerdeki fıstıklar protein içeriği bakımından değerlendirildiğinde; içerdikleri protein türlerinin benzer protein miktarlarının ise farklı olduğu ve yer fıstığının 32 farklı protein içerdiği tespit edilmiştir [19].

Yer fıstığı alerjisi en sık görülen gıda alerjilerinden biridir ve populasyonun yaklaşık %1'inde bulunmaktadır [20]. Türkiye'de yürütülen bir çalışmada gıda alerjilerinin %11.7'sini yer fıstığının oluşturduğu bulunmuştur [21]. Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization [WHO]) ve Uluslararası İmmünoloji Dernekleri Birliği (International Union of Immunological Societies [IUIS]) tarafından bugüne kadar 17 fıstık proteininin (Ara h 1 ile Ara h 17) yer fıstığı alerjisinden sorumlu fıstık alerjeni olduğu belirtilmiştir [22].

Yer fıstığı, 20 amino asidin tümünü farklı oranlarda içermekle birlikte önemli bir aminoasit olan arjininin en önemli kaynağı olma özelliğini taşımaktadır [13]. Protein sindirilebilirliğine göre düzeltilmiş amino asit skoru (Protein digestibility corrected amino acid score [PDCAAS])'na göre yer fıstığı ve soya gibi diğer baklagillerin büyüme, gelişme ve sağlıklı bir yaşam sürdürülmesi için et ve yumurtadan sonra gelen protein kalitesi yüksek bir gıda olduğu belirtilmektedir [23]. Bitkisel kaynaklı protein bakımından zengin olan yer fıstığının, içerdiği posa ve çeşitli biyoaktif bileşenlerden dolayı da sağlık üzerine olumlu etkileri bulunmaktadır [24].

Yağ

Yer fıstığı yağının ciddi bir enerji kaynağı olmasının yanı sıra hormon metabolizması, nörotransmitter sentezi gibi birçok önemli işlevi de bulunmaktadır. Yer fıstığı ve yer fıstığı ürünlerinin lezzet ve kalitesi büyük ölçüde içerdiği yağ asidi türlerine bağlı olmakla birlikte, yağ asidi türü yer fıstığının çeşidine, tohum olgunluğuna, çevresel koşullara ve coğrafi bölgelere göre değişkenlik göstermektedir [25, 26]. Yer fıstığı tohumu ortalama %50 (%44-56) oranında yağ içermektedir [27]. Amerikan Fıstık Konseyi (American Peanut Council [APC])'ne göre, yer fıstığı yağının yaklaşık %50'sini tekli doymamış yağ asitleri (TDYA), %33'ünü ÇDYA ve %14'ünü ise DYA oluşturmaktadır [28]. Tat ve dayanıklılık açısından birçok bitkisel yağdan üstün olan yer fıstığı yağında doymamış yağ asitlerinden oleik asit (n-9) %45 ve linoleik asit (n-6) %35 oranında bulunmaktadır. Bu bileşimden dolayı yer fıstığı yağının oleik-linoleik grubu yağlar arasında oksidatif stabilitesi yüksek bir yağ olduğu da belirtilmektedir [29].

Mikro Besin Öğeleri

Vitaminler

Yer fıstığı suda çözünebilir bir vitamin olan B vitamini ile yağda çözünebilir bir vitamin olan E vitamini (alfatokoferol) iyi bir kaynağıdır [30]. Bu vitaminleri yüksek miktarda içermesi nedeniyle antioksidan ve antiinflamatuvar özellik göstererek Alzheimer, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyucu görev almaktadır [31].

Yüz gram yer fıstığı tüketimi yetişkin bir bireyin günlük niasin ihtiyacının %75'ini, folat ihtiyacının %60'ını, tiamin ihtiyacının %53'ünü, riboflavin ihtiyacının %10'unu, pantotenik asit ihtiyacının %35'ini, piridoksin ihtiyacının %27'sini ve E vitamini ihtiyacının %55'ini karşılayabildiği saptanmıştır [13]. Yer fıstığının günlük niasin ihtiyacının büyük bir kısmını karşılaması nedeniyle sindirim ve sinir sistemi hastalıklarının önlenmesinde yardımcı rolü bulunmaktadır [32]. Bunlara ek olarak hamilelerde günlük gereksinimin %50 oranında arttığı ve nöral tüp defektinin engellenmesi için elzem olan folat içeriğinin de yer fıstığında yüksek olduğu görülmektedir [33].

Mineraller

Yer fıstığı, mineraller açısından zengin gıdalar grubuna girmektedir. Yüz gram yer fıstığı tüketimi ile yetişkin bir bireyin günlük bakır gereksiniminin %127'si, manganez gereksiniminin %84'ü, fosfor gereksiniminin %54'ü ve magnezyum gereksiniminin %42'si karşılanmaktadır. Yer fıstığı ayrıca sodyum, potasyum, kalsiyum, selenyum ve çinko da içermektedir [13]. Yapılan bir çalışmada günlük bir kaşık (28.3 g) yer fıstığı ezmesi tüketiminin kalsiyum ihtiyacının %1.7'sine denk geldiği; yer fıstığının kırmızı et, sebze ve tahıl gevreklerine göre günlük kalsiyum gereksinimini daha iyi karşıladığı saptanmıştır. Ayrıca kalsiyuma ek olarak birçok mineralden zengin bir gıda olan yer fıstığının dengeli beslenme açısından önemli bir yere sahip olduğu da vurgulanmıştır [34].

YER FISTIĞI FONKSİYONEL BİR GIDA MIDIR?

Fonksiyonel gıda; insan sağlığı için yararlı bir veya birden çok bileşen içeren gıda olarak tanımlanmaktadır [35]. Yer fıstığı, hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde etkin rol oynayan birçok besin ögesi ve fitokimyasal bileşikler içermesi nedeniyle fonksiyonel gıda olarak kabul görmektedir [36].

Fonksiyonel bir gıda olan yer fıstığı iyi bir diyet posası kaynağı olmasının yanı sıra çeşitli B grubu vitaminleri, E vitamini, demir, çinko, potasyum ile antioksidan olan bazı mineralleri de (magnezyum, selenyum ve bakır) yüksek oranda içermektedir [37]. Yer fıstığı önemli bir aminoasit olan arjininin en iyi kaynaklarından biridir. Ayrıca yer fıstığında, flavonoid ve fenolik asitler gibi çeşitli biyoaktif bileşikler de yüksek oranda bulunmaktadır. Yer fıstığının bu bileşimi nedeniyle kronik hastalıkların etiyolojisinde rol alan serbest radikallerin yol açtığı oksidatif strese karşı koruyucu özellik göstermekte, inflamasyonu engelleyerek kanser,

diyabet, kardiyovasküler hastalık, artrit gibi birçok hastalığı önleyici etkileri olduğu belirtilmektedir [7].

Arjinin

Arjinin elzem bir aminoasit olmamasına rağmen büyüme, travma veya kanser gibi durumlarda vücudun arjinine olan gereksinmesinin artmasından dolayı yarı esansiyel bir aminoasit olarak kabul edilmektedir. Nitrik oksidin öncüsü olan arjinin, kan akışını düzenlemeye ve vücuttaki hasarlı dokulardaki iyileşme süresini azaltmaya yardımcı olmaktadır [38]. Ayrıca T lenfositleri etkileyerek bağışıklık sistemini uyarmakta, amonyağın ve diğer toksik maddelerin vücuttaki etkilerini nötralize ederek karaciğerin detoksifiye etme görevine de yardımcı olmaktadır. Arjininin gastrointestinal sistem için de koruyucu olduğu belirtilmektedir [39].

Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı (TÜRKOMP) verilerine göre yer fıstığının, yağlı tohumlar arasında çam fıstığından sonra arjinin miktarı en yüksek (1182 mg/100 g) gıda olduğu belirtilmektedir [40]. Yapılan bir çalışmada günlük 3-6 gram arasında arjinin tüketilmesinin kardiyovasküler sistemi iyileştirdiği, sindirim sistemine yardımcı olduğu ve immün sistemi güçlendirdiği gösterilmiştir [41].

Resveratrol

Stilbenler adı verilen bir polifenolik bileşik sınıfına ait olan resveratrol yer fıstığında yüksek miktarda bulunmaktadır. Taze yer fıstığı 0.01 µg/g, kavrulmuş yer fıstığı 0.055 µg/g, yer fıstığı yağı 0.324 µg/g ve haşlanmış yer fıstığı 5.138 µg/g, şam fıstığı 0.09-1.67 µg/g resveratrol içermektedir [42]. Resveratrol; kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik hastalıklar gibi birçok kronik hastalığın temelinde bulunan inflamasyona karşı koruyucudur [7].

Fitosteroller

Fitosteroller (bitki sterolu) bitki hücre zarlarında doğal olarak bulunan bileşiklerdir. Bu bileşiklerin bağırsaklarda kolesterolün emilimini engelleyerek serum kolesterol seviyelerini düşürücü etki gösterdikleri bilinmektedir. Bu nedenle yer fıstığı, yer fıstığı yağı ve yer fıstığı ununun kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde önemli bir rolü olabileceği belirtilmektedir [43].

Fenolik Asit ve Flavonoidler

Yer fıstığı kardiyovasküler hastalıklara ve kansere karşı koruyucu olan flavonoid açısından da zengin bir gıdadır. [44]. Yapılan bir çalışmada yer fıstığında polifenolik antioksidanlardan p-kumarik asitin yüksek oranda bulunduğu ve bu bileşiğin yer fıstığının antioksidan seviyesini %22 arttırdığı saptanmıştır [39]. Ayrıca yer fıstığı zarının, yer fıstığına göre daha çok fenolik asit içerdiği tespit edilmiştir [45].

YER FISTIĞININ HASTALIKLAR İLE İLİŞKİSİ

Yer Fıstığı ve Obezite

Yer fıstığının doymamış yağ asitleri, diyet posası, bitkisel protein, arjinin, antioksidan vitamin ve mineral besin öğeleri ile flavonoidler, fitosteroller gibi biyoaktif bileşenleri içermesi nedeniyle son yıllarda obezite üzerine olumlu etkilerinin olabileceği düşünülmektedir. Belirtilen bu besin öğeleri ve biyoaktif bileşenler oksidatif stresi önleyerek ve inflamasyonu azaltarak obezite ve obezite kaynaklı birçok kronik hastalığın oluşum riskini azaltmaktadır [46]. Fakat, çiğ yer fıstığının (100 g) ortalama enerji değeri 567 kilokaloridir [13]. Bu nedenle tüketilirken günlük tüketim miktarına (yarım avuç veya 15 g veya 15 adet yer fıstığı/gün) dikkat edilmesi gerekmektedir [47]. Bes-Rastrollo ve ark [48] yer fıstığının obezite mekanizması üzerindeki olumlu etkisini yer fıstığının içerdiği yüksek miktarda protein, sağlıklı yağ asitleri (TDYA) ve diyet lifinin termogenezi uyarak bazal metabolizma hızının artması şeklinde açıklamaktadırlar. Yapılan bir çalışmada yer fıstığı tüketiminin bazal metabolizma hızını %11 arttırdığı belirlenmiştir [49]. Ayrıca yer fıstığı yüksek protein ve posa içeriği nedeniyle gastrik boşalmayı yavaşlatarak doyunluk sağlamaktadır [50]. Çoklu doymamış yağ asitleri, doymuş yağ asitlerine göre daha az okside olmak ve lipogenezisi azaltmaktadır. Yer fıstığı yüksek miktarda ÇDYA içerdiği için lipogenezisi azaltarak vücutta yağ oluşumunu engellediği belirtilmektedir [51]. Bunlara ek olarak yer fıstığı, yağ atılımını sağlayarak enerji alımında azalmaya neden olmakta, bu özelliğinden dolayı da ağırlık kaybında etkin rol oynayabileceğini düşünülmektedir [52]. Yer fıstığı içerdiği flavonoidler, diyet posası ve polisakkaritler ile bağırsak mikrobiyotasının gelişmesine yardımcı olarak da ağırlık kaybını sağlayabilmektedir [53].

Yer fıstığı ile obezite ve diyet kalitesi arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla yapılan gözlemsel bir çalışmada; 4751 erkek, 4572 kadın ve 4939 çocuğun 2 günlük gıda tüketim kaydı verilerinden sağlıklı yeme indeksleri hesaplanmıştır. Yer fıstığı tüketen (%24) bireylerin yer fıstığı tüketmeyenlere göre günlük protein, total yağ, ÇDYA, TDYA, posa, A vitamini, E vitamini, folat, kalsiyum, magnezyum, çinko ve demir alımının anlamlı derecede daha yüksek olduğu belirlenmiştir (p<0.05). Yer fıstığı tüketenlerin günlük kolesterol alımının tüketmeyenlere göre daha az olduğu, enerji alımının yer fıstığı tüketenlerde daha fazla olması rağmen özellikle yer fıstığı tüketen kadın ve çocuklarda beden kütle indeksinin (BKİ) anlamlı düzeyde düşük olduğu saptanmıştır [54]. Vücut ağırlıkları 85. persentil ve üzeri olan 10-14 yaş arası adölesan birey ile yürütülen bir başka çalışmada ise diyetlerine yer fıstığı eklenen adölesanların vücut ağırlığında anlamlı bir düşüş, kontrol grubunda ise artış olduğu tespit edilmiştir [15].

Yer fıstığı ve türevlerinin (yer fıstığı yağı, ezmesi ve unu) tüketiminin yağ emilimi üzerine olan etkisini incelemek amacıyla gerçekleştirilen randomize kontrollü bir çalışmada; yetişkin bireylere günlük enerji gereksinimleri göz önünde bulundurularak sağlıklı ve dengeli diyetler (%55 karbonhidrat, %15 protein, %30

yağ) verilmiş, kontrol grubu hariç diğer grupların diyetlerine 70 g/gün yer fıstığı veya türevi eklenmiş olup bireylerin dışıklarının yağ oranları incelenmiştir. Çalışmanın uygulandığı 7-9 günden sonra yer fıstığı tüketen grubun diğer gruplara göre yağ emiliminin daha az olduğu belirtilmiştir ($p<0.05$) [55]. Yapılan benzer bir çalışmada ise yer fıstığının ve türevlerinin 56 g/gün tüketilmesinin vücut ağırlığında herhangi bir değişikliğe neden olmadığı belirtilmiştir [56].

Yüksek oleik asit içeren yer fıstığı ile kardiyometabolik risk faktörleri ve vücut kompozisyonu arasındaki ilişkiyi inceleyen (>50 yaş ve $BKİ>25$ kg/m^2) bir çalışmada, bireylerin enerji alımının %15-20'sini (erkeklerde 84 g, kadınlarda 52 g) yüksek oleik asit içeren yer fıstığından karşılaması istenmiştir. Yer fıstığı tüketen grupta kontrol grubuna göre toplam yağ alımının %30, enerji alımının %10 arttığı saptanmıştır. Her iki grup arasında plazma düşük dansiteli lipoprotein (LDL), toplam kolesterol, C-reaktif protein, glikoz ve insülin düzeylerinde fark görülmezken; yer fıstığı tüketimi ile enerji alımında artış olmasına rağmen vücut kompozisyonunda anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir. Bu sonucun yer fıstığı alımı ile termogenezin ve enerji harcamasının artmasından dolayı olduğu savunulmuştur [57].

Yapılan bir başka çalışmada ise 71 hafif şişman ve obez olan birey; standart yer fıstığı tüketen (56 g/gün), yüksek oleik asit içeren yer fıstığı tüketen (56 g/gün) ve bisküvi tüketen (kontrol grubu) olmak üzere üç gruba ayrılmış olup yüksek oleik asit içeren yer fıstığı tüketen gruptaki bireylerde diğer gruplara göre, termogenezin arttığı ve bireylerin tokluk hislerinin daha fazla olduğu saptanmıştır ($p<0.05$) [58].

Diyabet ve Yer Fıstığı

Glikoz metabolizmasının bozukluğu sonucu ortaya çıkan diyabet hem toplum hem de bireyler için tehdit oluşturmaktadır. Tedavisinde medikal tedaviye ek olarak tıbbi beslenme tedavisinin de önemli bir yerinin olduğu bilinmektedir. Amerika Diyabet Derneği yer fıstığının normoglisemik etkilerinden dolayı diyabetin tıbbi beslenme tedavisinde kullanılmasını önermektedir [16]. Ayrıca yer fıstığının besin ögesi profili (yağ asitleri, arjinin, fitosteroller, E ve B vitaminleri) göz önünde bulundurulduğunda postprandiyal (tokluk) glikoz cevabını iyileştirebileceği ve endotel disfonksiyonu önleyebileceği de belirtilmektedir [59, 60].

Yaşları 34-59 arasında değişen 83818 kadın bireyin katıldığı prospektif kohort bir çalışmada; haftada 5 veya daha fazla yer fıstığı tüketen bireylerin (140 g/gün) yer fıstığı tüketmeyen bireylere göre tip 2 diyabet riskinin azaldığı ve yer fıstığı tüketimi ile diyabet riski arasında negatif doğrusal bir ilişkinin olduğu belirtilmiştir [61]. Yapılan başka bir çalışmada tip 2 diyabet tanılı bir gruba ADA kriterlerine uygun olarak tıbbi beslenme tedavisi uygulanırken, diğer grubun yağ ihtiyacının %20'sini yer fıstığından karşılaması istenmiştir. On altı haftanın sonunda her iki grupta da bel çevresi, BKİ ve vücut ağırlığında anlamlı bir azalma görülürken, yer fıstığı tüketen grubun kontrol grubuna göre günlük gıdalarla alınan ÇDYA/DYA, ÇDYA, TDYA miktarları ile A

vitamini, niasin ve magnezyum düzeylerinin anlamlı olarak yüksek olduğu belirlenmiştir [62]. Yer fıstığı ile tahıllı bar tüketiminin karşılaştırıldığı bir çalışmada ise 1 avuç (28 g) yer fıstığı tüketimin, tahıllı bar tüketen gruba göre plazma glikoz düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark oluşturmadığı saptanmıştır [63].

Kardiyovasküler Hastalıklar ve Yer Fıstığı

Yer fıstığının kolesterol ve trans yağ içermemesine ek olarak doymuş yağ asiti oranının düşük olması sebebiyle dünyada en çok mortalite nedeni olan kardiyovasküler hastalıklarda (KVH) tüketiminin güvenilir olduğu düşünülmektedir [64]. Amba ve ark [65] günlük diyetlerinde fındık, fıstık gibi yağlı tohumları tüketen bireyleri hiç tüketmeyen bireyler ile karşılaştırdığında ($n=566398$), yağlı tohum tüketmeyen bireylerin diyabet ve Alzheimer hariç diğer hastalıklar kaynaklı mortalite riskinin daha yüksek olduğu, fakat tek başına yer fıstığı tüketimiyle mortalite riski arasında herhangi bir ilişki görülmediğini belirtmişlerdir. İran'da 44 hiperkolesterolemik erkek birey üzerinde yürütülen başka bir çalışmada bir grubun rutin beslenmelerine devam etmeleri (kontrol grubu), diğer grubun ise rutin beslenmelerine ek olarak günlük 76 g yer fıstığı tüketmeleri istenmiştir. Dört haftalık süre sonunda yer fıstığı tüketen grubun plazma LDL ve toplam kolesterol/yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) düzeylerinin kontrol grubuna göre daha düşük, HDL düzeylerinin ise daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$) [66]. Yapılan başka bir çalışmada ise bireyler üç gruba ayrılmış, birinci grubun herhangi bir diyet kısıtlaması yapmadan diyetlerine ilave 500 kilokalori yer fıstığı tüketmesi, ikinci grubun diyet tedavisine ek olarak 500 kilokalori yer fıstığı tüketmesi, üçüncü grubun ise günlük toplam yağ alımını yer fıstığından karşılaması istenmiştir. Çalışmanın sonunda sadece birinci grupta plazma trigliserit (TG) ve toplam kolesterol düzeylerinde bir azalma görülürken diğer lipid düzeylerinde bir fark olmadığı saptanmıştır [67]. Benzer şekilde yapılan başka bir çalışmada, 86 g/gün yer fıstığı tüketiminin hafif şişman ve obez bireylerde plazma TG düzeylerini azalttığı ve endotel fonksiyonu iyileştirdiği belirtilmiştir [60]. Son olarak yer fıstığı ile KVH risk faktörleri arasındaki ilişkiyi inceleyen bir meta analizde ise yer fıstığı tüketimi ile plazma LDL, TG, insülin düzeyleri ile bel çevresi, BKİ, kan basıncı düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki olmamasına rağmen, serum HDL düzeyi ile pozitif ilişkili olduğu belirtilmiştir [68].

Diğer Hastalıklar ve Yer Fıstığı

Yağlı tohumlarda yüksek miktarda bulunan E vitamini ve diğer antioksidan bileşikler, başta hafıza olmak üzere beyin birçok işlevini olumlu etkilemektedir [69]. Bu etkilerini genel olarak oksidatif stresi azaltarak ve inflamasyonu önleyerek gösterdiği düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada; orta yaşlı bireylerde on iki hafta boyunca normal beslenmelerine ek olarak tüketilen yüksek oleik asit içeren yer fıstığının arter elastisitesinde artışa, hafıza ve bilişsel fonksiyonda iyileşmeye neden olduğu saptanmıştır [70]. Çin'de 55 yaş ve üzeri bireylerde yapılan bir çalışmada ise günlük ≥ 10 g/gün

yağlı tohum tüketen bireylerin bilişsel fonksiyonlarının %40 daha yüksek olduğu belirtilmiştir [71].

YER FISTIĞI ZARI VE SAĞLIK İLE İLİŞKİSİ

Son dönemlerde yer fıstığı zarının yüksek miktarda kateşin ve prosiyanidin içerdiği tespit edilmiştir. Yer fıstığı zarının bu biyoaktif bileşikleri içermesinden dolayı antiinflamatuvar etki göstererek hastalıkları önleyebileceği belirtilse de bu konuda yapılmış sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır [72, 73]. Aterojenik diyet ile hiperkolesterolemik olan farelere yer fıstığı zarı polifenolik ekstratı verildiğinde farelerin hepatik glikojen ve serum glikoz düzeylerinin azaldığı gözlenirken, yer fıstığı zarının alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı için de tedavi edici rolü olabileceği savunulmuştur [73]. On beş sağlıklı birey üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise yer fıstığı zarının fenolik ekstratının postprandiyal 45. dakikada antidiyabetik etki gösterdiği de gözlemlenmiştir [74].

SONUÇ VE ÖNERİLER

Yağlı tohumlar arasında yer alan yer fıstığı antioksidan vitamin ve minerallerin yanı sıra resveratrol, fitosterol gibi sağlığa olumlu etkileri olan biyoaktif bileşikleri de içerdiği için fonksiyonel gıda olarak nitelendirilmektedir. Yer fıstığı, önemli bir aminoasit olan arjininin de en iyi kaynaklarından biri olmakla birlikte doymamış yağ asitlerini de yüksek miktarda içermektedir. Bu bileşiminden dolayı yer fıstığının obezite, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar gibi kronik hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde rol oynadığı belirtilmektedir. Sağlıklı beslenme çerçevesinde yer fıstığı tüketimine önem verilmesi, yer fıstığı zarının da sağlığa olası yararları düşünüldüğünde yer fıstığının zarı ile birlikte tüketilmesi, fakat enerji ve toplam yağ alımını arttırmamak için tüketilecek miktara (günlük yarım avuç veya 15 g veya 15 adet yer fıstığı) dikkat edilmesi gerekmektedir. Bunların yanı sıra yer fıstığı tüketiminin hastalıklar ile ilişkisi üzerine daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR



- [1] Arıoğlu, H.H. (2014). Yer fıstığı Yetiştirme ve Islahı. Yağ Bitkileri Ders Kitabı. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, G.Y. No: 220, Y. No: A-70, S.74, Adana.
- [2] Türkiye Tarım ve Orman Bakanlığı. Yer fıstığı Yetiştiriciliği. Erişim Adresi: <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/batem/Belgeler/Kutuphane/Teknik%20Bilgiler/yerfistigi%20yetistiriciligi.pdf>
- [3] FAO, 2018. Erişim Adresi: <http://faostat.fao.org/>.
- [4] Şahin, G. (2014). Türkiye'de yer fıstığı (*Arachis hypogaea* L.) yetiştiriciliği ve bir coğrafi işaret olarak Osmaniye yer fıstığı. *Gaziantep University Journal of Social Sciences*, 13(3), 619-644.
- [5] Lavkor, I., Biçici, M. Osmaniye'de yetiştirilen yer fıstıklarında hasat, hasat sonrası, kurutma ve depo öncesi dönemlerinde aflatoksin oluşumu. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 21(3), 394-405.

- [6] ANONİM. (2006). Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Adana il Müdürlüğü. Adana ili tarımsal istatistik verileri yayın no:2006-2 Adana.
- [7] Arya, S.S., Salve, A.R., Chauhan, S. (2016). Peanuts as functional food: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 53(1), 31-41.
- [8] Chen, J., Zhou, Y., Mueller-Steiner, S., Chen, L.F., Kwon, H., Yi, S., Mucke, L. Gan, L. (2005). SIRT1 projects against microglia-dependent amyloid-b toxicity through inhibiting NF-kB signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 280(48), 40364-40374.
- [9] Delmas, D., Lançon, A., Colin, D., Jannin, B., Latruffe, N. (2006). Resveratrol as a chemopreventive agent: a promising molecule for fighting cancer. *Current Drug Targets*, 7(4), 423-442.
- [10] Mutegi, C.K., Wagacha, J.M., Christie, M.E., Kimani, J., Karanja, L. (2013). Effect of storage conditions on quality and aflatoxin contamination of peanuts (*Arachis hypogaea* L.). *International Journal of Agriscience*, 3(10), 746-758.
- [11] Zhao, X., Chen, J., Du, F. (2012). Potential use of peanut by-products in food processing: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 49(5), 521-529.
- [12] Toomer, O.T. Nutritional chemistry of the peanut (*Arachis hypogaea*). (2018). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(17), 3042-3053.
- [13] United States Department of Agriculture (USDA). (2018). Food Data Central. Erişim Adresi: <https://fdc.nal.usda.gov/>.
- [14] Shiga, T.M., Lajolo, F.M. (2006). Cell wall polysaccharides of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.)-composition and structure. *Carbohydrate Polymer*, 63(1), 1-12.
- [15] Foster-Powell, K., Holt, S.H., Brand-Miller, J.C. (2002) International table of glycemic index and glycemic load values. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76(1), 5-56.
- [16] Johnston, C.A., Tyler, C., McFarlin, B.K., Poston, W.S., Haddock, C.K., Reeves, R., Foreyt, J.P. (2007). Weight loss in overweight Mexican American children: a randomized, controlled trail. *Pediatrics*, 120(6), 1450-1457.
- [17] American Diabetes Association, Bantle, J.P., Wylie-Rosett, J., Albright, A.L., Apovian, C.M., Clark, N.G., Franz, M.J., Hoogwerf, B.J., Lichtenstein, A.H., Mayer-Davis, E., Mooradian, A.D., Wheeler, M.L. (2008). Nutrition recommendations and interventions for diabetes: a position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 31(1), 61-78.
- [18] Iqbal, A., Shah, F., Hamayun, M., Ahmad, A., Hussain, A., Waqas, M., Kang, S.M., Lee, I.J. (2016). Allergens of *Arachis hypogaea* and the effect of processing on their detection by ELISA. *Food & Nutrition Research*, 60, 28945-28951.
- [19] Yusnawan, E., Marquis, C.P., Lee, N.A. (2012). Purification and characterization of Ara h1 and Ara h3 from four peanut market types revealed higher order oligomeric structures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(41), 10352-10358.
- [20] Stiefel, G., Anagnostou, K., Boyle, R. J., Brathwaite, N., Ewan, P., Fox, A. T., Huber, P.,

- Luyt, D., Till, S. J., Venter, C., Clark, A. T. (2017). BSACI guideline for the diagnosis and management of peanut and tree nut allergy. *Clinical and Experimental Allergy : Journal of The British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 47(6), 719–739.
- [21] Yavuz, S.T., Sahiner, U.M., Buyuktiryaki, B., Soyer, O.U., Tuncer, A., Sekerel, B.E., Kalayci, O., Sackesen, C. (2011). Phenotypes of IgE-mediated food allergy in Turkish children. *Allergy and asthma proceedings*, 32(6), 47–55.
- [22] WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee. Allergen Nomenclature Search Database. (2017). *Arachis hypogaea* (Peanut groundnut). Erişim Adresi: <http://www.allergen.org/search.php?allergen=sourceDArachisChypogaea>.
- [23] FAO/WHO/UNU (2002). Protein and amino acid requirements in human nutrition. In: Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation, World Health Org Technical Report Series No:935.
- [24] Wu, H.W., Wang, Q., Ma, T.Z., Ren, J.J. (2009). Comparative studies on the functional properties of various proteins concentrates preparations of peanut protein. *Food Research International*, 42(3), 343-348.
- [25] Akhtar, S., Khalid, N., Ahmed, I., Shahzad, A., Suleria, H.A. (2014). Physicochemical characteristics, functional properties, and nutritional benefits of peanut oil: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(12), 1562-1575.
- [26] Carrín, M.E., Carelli, A.A. (2010). Peanut oil: Compositional data. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(7), 697-707.
- [27] Anyasor, G.N., Ogunwenmo, K.O., Oyelana, O.A., Ajayi, D., Dangana, J. (2009). Chemical analyses of groundnut (*Arachis hypogaea*) oil. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(3), 269-272.
- [28] Isanga, J., Zhang, G.-N. (2007). Biologically active components and nutraceuticals in peanuts and related products: review. *Food Reviews International*, 23(2), 123-140.
- [29] Gunstone, F.D. (2011). Vegetable Oil in Food Technology Composition, Properties and Uses. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- [30] O'Brien, R.D. (2004). Fats and Oils. Formulating and Processing for Applications. CRC Press, Boca Raton, USA.
- [31] Bramley, P.M., Elmadfa, I., Kafatos, A., Kelly, F.J., Manios, Y., Roxboroug, H.E., Schuch, W., Sheehy, P.J.A., Wagner, K.H. (2000). Vitamin E. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 913-938.
- [32] Morris, M.C. Dietary niacin and the risk of incident alzheimer's disease and of cognitive decline. (2004) *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 75(8), 1093-1099.
- [33] Roy, M.P. Folate and neural tube defects. (2007). *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(1), 285-285.
- [34] Galvao, L., Lopez, A., Williams, H. (2006). Essential mineral elements in peanuts and peanut butter. *Journal of Food Science*, 41(6), 1305-1307.
- [35] Position of the American Dietetic Association: phytochemicals and functional foods. (1995). *Journal of the American Dietetic Association*, 95(5), 493-496.
- [36] Lee, A.N., Wright, C.G., Rachaputi, R.C.N. (2016). Peanuts: Bioactives and Allergens. DEStech Publications Inc, Pennsylvania, USA.
- [37] Gülçin, I. (2010). Antioxidant properties of resveratrol: a structure activity insight. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 210-218.
- [38] Coates, A.M., Hill, A.M., Tan, S.Y. (2018). Nuts and cardiovascular disease prevention. *Current Atherosclerosis Reports*, 20(10), 48.
- [39] Duggan, C., Gannon, J., Walker, W.A. (2002). Protective nutrient and functional foods for the gastrointestinal tract. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 75(5), 789-808.
- [40] Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı Verisi. http://www.turkomp.gov.tr/component_result-153
- [41] Field, C.J., Johnson, I., Pratt, V.C. (2000). Glutamine and arginine: Immunonutrients for improved health. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 32(7), 77-88.
- [42] Evren, M., Koca, İ. (2008). Resveratrol ve sağlık üzerine etkisi. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, 21-23 Mayıs, 2008, Erzurum, Türkiye, s1099.
- [43] Lopes, R.M., Agostini-Costa, T.D.S., Gimenes, M.A., Silveira, D. (2011). Chemical composition and biological activities of *Arachis* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 4321-4330.
- [44] Francisco, M.L., Resurreccion, A.V. (2008). Functional components in peanuts. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(8), 715-746.
- [45] Duncan, C.E., Gorbet, D.W., Talcott, S.T. (2006). Phytochemical content and antioxidant capacity of water-soluble isolates from peanuts (*Arachis hypogaea* L). *Food Research International*, 39(8), 898-904.
- [46] Salas-Salvadó, J., Guasch-Ferré, M., Bulló, M., Sabaté, J. (2014). Nuts in the prevention and treatment of metabolic syndrome. *American Journal of Clinical Nutrition*, 100(1), 399-407.
- [47] United States Department of Agriculture (USDA). Scientific Report of the 2015 Dietary Guidelines Advisory Committee. Erişim Adresi: <https://health.gov/sites/default/files/2019-09/Scientific-Report-of-the-2015-Dietary-Guidelines-Advisory-Committee.pdf>
- [48] Bes-Rastrollo, M., Wedick, N.M., Martinez-Gonzalez, M.A., Li, T.Y., Sampson, L., Hu, F.B. (2009). Prospective study of nut consumption, long-term weight change, and obesity risk in women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 89(6), 1913-9.
- [49] Alper, C.M., Mattes, R.D. (2002). Effects of chronic peanut consumption on energy balance and hedonics. *International Journal of Obesity Relation Metabolic Disorder*, 26(8), 1129-1137.
- [50] Jenkins, D.J., Kendall, C.W., Axelsen, M., Augustin, L.S., Vuksan, V. (2000). Viscous and nonviscous fibres, nonabsorbable and low

- glycaemic index carbohydrates, blood lipids and coronary heart disease. (Son erişim: 15.11.2019) *Current Opinion in Lipidology*, 11(1), 49-56.
- [51] Vadivel, V., Kunyanga, C.N., Biesalski, H.K. (2012). Health benefits of nut consumption with special reference to body weight control. *Nutrition*, 28(11-12), 1089-1097.
- [52] Mattes, R.D., Kris-Etherton, P., Foster, G.D. (2008). Impact of peanuts and tree nuts on body weight and healthy weight loss in adults. *Journal of Nutrition*, 138(9), 1741-1745.
- [53] Lamuel-Raventos, R.M., Onge, M.S. (2017). Prebiotic nut compounds and human microbiota. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(14), 3154-3163.
- [54] Griel, A.E., Eissenstat, B., Juturu, V., Hsieh, G., Kris-Etherton, P.M. (2004). Improved diet quality with peanut consumption. *Journal of the American College of Nutrition*, 23(6), 660-668.
- [55] Traoret, C.J., Lokko, P., Cruz, A.C., Oliveira, C.G., Costa, N.M., Bressan, J., Alfenas, R.C., Mattes, R.D. (2008). Peanut digestion and energy balance. *International Journal of Obesity*, 32(2), 322-8.
- [56] McKiernan, F., Lokko, P., Kuevi, A. (2010). Effects of peanut processing on body weight and fasting plasma lipids. *British Journal of Nutrition*, 104(3), 418-426.
- [57] Barbour, J.A., Howe, P.R., Buckley, J.D., Bryan, J., Coates, A.M. (2015). Effect of 12 weeks high oleic peanut consumption on cardio-metabolic risk factors and body composition. *Nutrients*, 7(9), 7381-7398.
- [58] Duarte Moreira Alves, R., Boroni Moreira, A.P., Silva Macedo, V., Brunoro Costa, N.M., Gonçalves Alfenas Rde, C., Bressan, J. (2014). High-oleic peanuts increase diet-induced thermogenesis in overweight and obese men. *Nutricion Hospitalaria*, 29(5), 1024-1032.
- [59] Ros, E. (2010). Health benefits of nut consumption. *Nutrients*, 2(7), 652-682.
- [60] Liu, X., Hill, A., West, S., Gabauer, R., McCrea, C., Fleming, J., Kris-Etherton, P. (2017). Acute peanut consumption alters postprandial lipids and vascular responses in healthy overweight or obese men. *Journal of Nutrition*, 147(5), 835-840.
- [61] Jiang, R., Manson, J.E., Stampfer, M.J., Liu, S., Willett, W.C., Hu, F.B. (2002). Nut and peanut butter consumption and risk of type 2 diabetes in women. *JAMA*, 288(20), 2554-60.
- [62] Wien, M., Oda, K., Sabaté, J. (2014). A randomized controlled trial to evaluate the effect of incorporating peanuts into an American Diabetes Association meal plan on the nutrient profile of the total diet and cardiometabolic parameters of adults with type 2 diabetes. *Nutrition Journal*, 13, 10.
- [63] Johnston, C.S., Trier, C.M., Fleming, K.R. (2013). The effect of peanut and grain bar preloads on postmeal satiety, glycemia, and weight loss in healthy individuals: an acute and a chronic randomized intervention trial. *Nutrition Journal*, 12, 35.
- [64] Kris-Etherton, P.M., Hu, F.B., Ros, E., Sabate, J. (2008). The role of tree nuts and peanuts in the prevention of coronary heart disease: multiple potential mechanisms. *Journal of Nutrition*, 138(9), 1746-1751.
- [65] Amba, V., Murphy, G., Etemadi, A., Wang, S., Abnet, C.C., Hashemian, M. (2019). Nut and peanut butter consumption and mortality in the national institutes of Health-AARP Diet and Health Study. *Nutrients*, 11(7). pii: E1508.
- [66] Ghadimi Nouran, M., Kimiagar, M., Abadi, A., Mirzazadeh, M., Harrison, G. (2010). Peanut consumption and cardiovascular risk. *Public Health Nutrition*, 13(10), 1581-1600.
- [67] Lokko, P., Lartey, A., Armar-Klimesu, M., Mattes, R.D. (2007). Regular peanut consumption improves plasma lipid levels in healthy Ghanaians. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 58(3), 190-200.
- [68] Jafari Azad, B., Daneshzad, E., Azadbakht, L. (2019). Peanut and cardiovascular disease risk factors: A systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 13, 1-18.
- [69] Klimova, B., Kuca, K., Valis, M., Hort, J. (2018). Role of nut consumption in the management of cognitive decline - a mini-review. *Current Alzheimer Research*, 15(9), 877-882.
- [70] Barbour, J.A., Howe, P.R.C., Buckley, J.D., Bryan, J., Coates, A.M. (2017). Cerebrovascular and cognitive benefits of high-oleic peanut consumption in healthy overweight middle-aged adults. *Nutritional Neuroscience*, 20(10), 555-562.
- [71] Li, M., Shi, Z. (2019). A prospective Association of nut consumption with cognitive function in Chinese adults aged 55+ China health and nutrition survey. *The Journal of Nutrition, Health and Aging*, 23(2), 211-216.
- [72] Yu, J., Ahmedna, M., Goktepe, I., Dai, J. (2006). Peanut skin procyanidins: Composition and antioxidant activities as affected by processing. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(4), 364-371.
- [73] Toomer, O.T., Vu, T., Pereira, M., Williams, K. (2019). Dietary supplementation with peanut skin polyphenolic extracts (PSPE) reduces hepatic lipid and glycogen stores in mice fed an atherogenic diet. *Journal of Functional Foods*, 55, 361-370.
- [74] Christman, L.M., Dean, L.L., Allen, J.C., Godinez, S.F., Toomer, O.T. (2019). Peanut skin phenolic extract attenuates hyperglycemic responses in vivo and in vitro. *PLoS One*, 14(3), e0214591.

Yağ Rafinasyonu Sırasında İnsan Beslenmesinde Önemli Fonksiyonel Bileşenlerde Değişimler ve Zararlı Rafinasyon Bileşenlerinin Oluşumu

Şakir Selçuk Seçilmiş  

Gaziantep Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksek Okulu, Şehitkâmil, Gaziantep

Geliş Tarihi (Received): 20.02.2020, Kabul Tarihi (Accepted): 29.09.2020

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): selcuksecilmis@gantep.edu.tr (Ş. Selçuk Seçilmiş)

☎ 0 342 317 17 01 📠 0 342 360 11 71

ÖZ

Bitkisel yağlar, içerdikleri ve biyoaktif olarak tanımlanan bileşenler sayesinde sağlık açısından birçok fayda sağlamaktadırlar. Yağlar sadece vücuda enerji sağlamakla kalmayıp, ayrıca vücut ısısının ve dokularının korunmasında, içerisinde çözünen vitaminlerin taşınmasında ve daha birçok önemli fonksiyonların yürütülmesinde rol oynamaktadır. Bitkisel yağlarda bulunan en önemli biyoaktif maddeler arasında bitkisel steroller, karotenler, tokoller, fenolik maddeler ve skualen gibi hidrokarbonlar gelmektedir. Uygulanan rafinasyon şartlarına bağlı olarak, değerli bileşenler kayba uğramakla birlikte, yine rafinasyon şartlarına bağlı olarak yağda meydana gelen reaksiyonlar sonucunda, sağlık açısından risk taşıyan bileşenler de (3-monokloropropan-1-2-diol ve glisidil esterleri) meydana gelebilmektedir. Bu derlemenin ilk kısmında yağ rafinasyon basamakları ve bu süreçler içerisinde fonksiyonel bileşenlerde meydana gelen kayıplar ve nedenleri, ikinci kısmında ise yağ rafinasyonu sırasında meydana gelen zararlı maddelerin oluşumu ve miktarlarının azaltılması konusunda yapılan çalışmalar ele alınmıştır.

Anahtar Kelimeler: Bitkisel yağlar, Fonksiyonel bileşenler, Yağ rafinasyonu, 3-monokloropropan-1-2-diol, Glisidil esterleri

Changes in Important Functional Components for Human Nutrition during Oil Refining and Formation of Harmful Refining Components

ABSTRACT

Vegetable oils provide many health benefits because of their ingredients defined as bioactive. Oils not only provide energy to the body, but also play a role in maintaining body temperature and tissues, carrying vitamins dissolved in their structure, and carrying out many other important functions. Among the most important bioactive substances found in vegetable oils are vegetable sterols, carotenes, tocopherols, phenolic substances and hydrocarbons like squalene. Valuable components are lost depending on refining conditions applied, and health-hazard components (3-monochloropropane-1-2-diol and glycidyl esters) may occur as a result of reactions occurring in oils. In the first part of this review, oil refining steps and losses in functional components during these processes and their causes are presented while, in the second part, studies on the formation and reduction of harmful substances that take place during oil refining are discussed.

Keywords: Vegetable oils, Functional components, Oil refining, 3-monochloropropane-1-2-diol, Glycidyl esters

GİRİŞ

Bitkisel yağlar içeriği bakımından insan beslenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Dolayısıyla dünya geneli incelendiğinde; bitkisel kaynaklı yağ tüketimi 158 milyon ton/yıl olmakla birlikte, bu rakamın gittikçe arttığı gözlenmektedir [1, 2]. Yağların içermiş olduğu biyoaktif bileşenler, sağlık üzerine birçok etki sağlamaktadırlar. Yağlar sadece vücuda enerji sağlamakla kalmayıp, ayrıca vücut ısısının ve dokularının korunmasında, içerisinde çözünen vitaminlerin taşınmasında ve daha birçok önemli fonksiyonların yürütülmesinde rol oynamaktadır [3]. Bitkisel yağlarda bulunan en önemli biyoaktif maddeler arasında steroller, renk maddeleri (klorofil ve karotenoidler), tokoller, fenolik maddeler ve skualen gibi hidrokarbonlar gelmektedir. Uygulanan rafinasyon şartlarına bağlı olarak, biyoaktif bileşenler kayba uğramakla birlikte, yine rafinasyon şartlarına bağlı olarak yağda meydana gelen reaksiyonlar sonucunda, sağlık açısından risk oluşturan bileşenler de meydana gelebilmektedir. Özellikle 3-monokloropropan-1-2-diol (3-MCDP) ve glisidil esterleri (GE) rafinasyon sırasında meydana gelebilen ve kanserojen olarak tanımlanan bileşenlerdir [4, 5]. Özellikle son yıllarda sağlık ve beslenme arasında giderek artan önemli bir etkileşim mevcuttur [6]. Bunun sonucunda; endüstri, işlemleri olduğu ürünlerin içerisindeki değerli bileşenleri, uygulanan işlemler boyunca korumak ve gerekirse meydana gelen kaybı, dışarıdan takviye ile destekleme eğilimi içerisinde. Diğer taraftan; uygulanan işlemler sırasında meydana gelebilecek zararlı bileşenlerin de

tamamen önlenmesi ya da miktarının azaltılması da önem arz etmektedir. Dolayısıyla bitkisel ham yağ rafinasyonunda temel amaç; yağ ve değerli bileşenlerin kaybını en aza indirerek, yağda istenmeyen değişik miktardaki safsızlıkları mümkün olduğunca uzaklaştırmak ve zararlı bileşenlerin de oluşumunun önüne geçmek olmalıdır. Bu nedenle günümüzde, bitkisel yağların besin değerini arttırmak için yeni metotların araştırılması devam etmekle birlikte, meydana gelen zararlı bileşenlerin önlenmesi konusunda çalışmalar yapılması da tavsiye edilmektedir [7, 8].

Bu çalışmanın ilk kısmında, yağ rafinasyon basamakları ve bu süreçlerde yağdaki fonksiyonel bileşenlerde meydana gelen kayıplar ve nedenleri, ikinci kısmında ise; yağ rafinasyonu sırasında meydana gelen zararlı maddelerin oluşumu ve miktarlarının azaltılması konusunda yapılan çalışmalar ele alınmıştır.

YAĞ RAFİNASYONU SIRASINDA FONKSİYONEL BİLEŞENLERDE MEYDANA GELEN DEĞİŞİMLER

Bitkisel yağ rafinasyonu; yapışkan maddelerin ayrılması (degumming), nötralizasyon, ağartma, vinterizasyon ve deodorizasyon gibi uygulamaları içeren işlemler bütünüdür. Her bir işlem farklı amaçlar doğrultusunda gerçekleştirilmektedir. Şekil 1'de rafinasyon basamakları ve fonksiyonları gösterilmiştir.

Rafinasyon aşamaları	Giderilen maddeler
Degumming	-----> Gam, fosfolipid, iz metaller
Nötralizasyon	-----> Serbest yağ asitleri
Ağartma	-----> Renk vericiler, ağır metaller, oksidasyon ürünleri
Vinterizasyon	-----> Wax, stearin ve erime noktası yüksek doymuş gliserdiler
Deodorizasyon	-----> Aldehit ve ketonlar, serbest yağ asitleri, oksidatif ürünler

Şekil 1. Yağ rafinasyon basamakları ve fonksiyonları [9].

Yapışkan maddelerin ayrılması (Degumming)

Bitkisel yağ rafinasyonunun ilk aşaması yapışkan maddelerin ayrıştırılmasıdır. Bu aşamada sağlık açısından fayda sağlayan fosfatidilkolin gibi fosfolipitler yağdan uzaklaştırılmaktadır. Fosfatidilkolinin özellikle kardiyovasküler ve karaciğer sağlığının korunmasında önemli bir rol oynadığı ve aynı zamanda bu sistemlerin yenilenmesinde ve gelişmesinde de etkin oldukları bildirilmektedir [10]. Ancak rafinasyonun diğer aşamalarında, çökme eğilimi göstermeleri ve renk koyulaşmalarına neden oldukları için yağdan uzaklaştırılırlar. Diğer rafinasyon basamaklarındaki kadar şiddetli olmasa da, fonksiyonel bileşenlerde meydana gelen kayıplar yapışkan maddelerin ayrılması aşamasında da yaşanmaktadır. Özellikle, E vitamini olarak bilinen tokoferoller bu kayıpların yaşandığı bileşenlerdir. Tokoferoller gıda ve biyolojik sistemlerde,

önemli bir lipit oksidasyonu inhibitörleridir [11]. Ayrıca bazı hastalıkların ve bozuklukların önlenmesinde veya tedavisinde etkin bir rol alırlar [12]. Farklı bitkisel yağlarda yapılan çalışmalarda, yapışkan maddelerin ayrılması sonrası toplam tokoferol miktarında meydana gelen kayıplar bildirilmiştir [13, 14, 15, 16]. Buna karşın bazı çalışmalarda α - ve γ - izomerlerde bir miktar artış gözlemlenirken δ - ve β - izomerlerinde ise düşüş olduğu ifade edilmektedir [13, 17]. Ancak yapılan çalışmalarda, tokoferol kayıp oranlarının değişkenlik gösterdiği görülmektedir. Kayıp oranlarının %1.4 ile %8.4 gibi geniş bir aralıkta değiştiği gözlemlenmektedir [14, 18, 19, 20]. Bu farklılıklar çalışmalarda kullanılan, değişik bitkisel yağların özelliklerine ve uygulanan yapışkan maddelerin ayrılması şartlarına bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülebilir. Bitkisel steroller kolesterol seviyelerini düşürmeleri nedeniyle; koroner kalp hastalık riskini azaltmakta, antiinflamatuvar etkisi göstermekte

ayrıca kanser hücrelerinin apoptosiz indüksiyonunda etkilidirler [21]. Yapışkan maddelerin ayrılması aşamasının steroller üzerinde de etkilerinin olduğu bildirilmektedir. Ayçiçek yağı üzerinde yapılan bir çalışmada, yapışkan maddelerin ayrılması sonrası toplam sterol kaybının %22.4 olduğu bildirilmektedir [20]. Soya yağında yapılan başka bir çalışmada ise, yapışkan maddelerin ayrılması sonrası sterol kaybının %3.6 olduğu vurgulanmaktadır [14]. Aspir yağı üzerinde yapılan bir çalışmada ise, yapışkan maddelerin ayrılması sonrası esterleşmiş sterol miktarlarında ve kompozisyonlarında herhangi değişimin gerçekleşmediği ancak serbest sterol miktarının arttığı raporlanmaktadır [22]. Başka bir çalışmada ise uygulanan yapışkan maddeleri ayırma metodunun steroller üzerindeki etkisi araştırılmış ve su ile gerçekleştirilen ayırma işleminde fitosterol içeriğinin ve kompozisyonun değişmediği ancak asit ile gerçekleştirilen ayırma işlemi neticesinde serbest sterol miktarının bir miktar arttığı bildirilmektedir [23]. Dolayısıyla farklı ayırma metodlarının biyoaktif bileşen kaybı üzerinde etkili olduğu söylenebilmektedir.

Nötralizasyon

Bitkisel kaynaklı yağların raf ömürlerinin korunması amacı ile ortamda bulunan yağ asitlerinin giderilmesi gerekir. Dolayısıyla bu işlem deasidifikasyon olarak da ifade edilen nötralizasyon aşamasında gerçekleştirilmektedir. Nötralizasyon aşamasında da birtakım fonksiyonel bileşen kayıpları gözlenmektedir. Nötralizasyon sırasında meydana gelen sterol kaybının yüksek alkali koşulları ve sabun stokunun yıkanması neticesinde gerçekleştiği bildirilmektedir [24]. Yağda bulunan fenolik bileşiklerin de bu yıkama neticesinde kayba uğradıkları ifade edilmektedir [25]. Başka bir çalışmada ise, nötralizasyon boyunca oluşan sabunun da fenolik kayba katkı sağladığı bildirilmektedir [26]. Kolza tohumu yağının deasidifikasyonu sonucunda fenolik bileşenlerin %94.5 gibi çok yüksek bir oranda kayba uğradığı belirtilmektedir [27]. Soya yağında yapılan bir çalışmada da nötralizasyon sonucunda sterollerin önemli bir kısmının kayba uğradığı raporlanmaktadır. Aynı çalışmada tokoferol kaybının da %22.2 şeklinde gerçekleştiği görülmektedir [14]. Ayçiçek yağında yapılan başka bir çalışmada ise, nötralizasyon sonrası meydana gelen toplam tokoferol kaybının yaklaşık olarak %14.7 olduğu bildirilmektedir [19]. Kanola yağı üzerinde yapılan diğer bir çalışmada ise toplam tohum miktarının %3 olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada toplam tokoferol kaybının da %6 olduğu ifade edilmektedir [13]. Ayçiçek yağında ise nötralizasyon sonrası toplam tokoferol içeriğinde meydana gelen kayıp yaklaşık olarak %15 olarak bulunmuştur. Nötralizasyon sonucunda meydana gelen tokoferol kayıp oranlarının geniş bir aralıkta olduğu dikkat çekmektedir. Çalışmalarda farklı yağ çeşitlerinin kullanılması ve uygulanan nötralizasyon şartları bu farklılıkların ortaya çıkmasında etkili olduğu söylenebilir. Nitekim nötralizasyon sırasında, farklı alkaliler kullanmak sureti ile gerçekleştirilen bir çalışmada; kalsiyum hidroksit, sodyum hidroksite göre fonksiyonel bileşenlerin korunmasında daha etkin olduğu bildirilmektedir [28]. Bununla birlikte; sodyum karbonatın

alternatif bir alkali olabileceği ve sodyum hidroksitle kıyaslandığında, α -tokoferol korunmasında iki kat daha etkin olduğu ifade edilmektedir [29]. Nötralizasyon sırasında kayba uğradığı tespit edilen bir diğer fonksiyonel bileşen skualendir. Deney hayvanları üzerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalar sonucunda skualenin; kimyasal olarak indüklenen kolon, akciğer ve deri tümörlerinin inhibe edilmesinde etkili olduğu gösterilmiştir [30]. Zeytin, ayçiçek, kolza, mısır ve soya yağlarında yapılan rafinasyon çalışması sonucunda, nötralizasyon aşamasında skualen değerlerinde meydana kayıp oranları sırasıyla yaklaşık olarak; %13, %7.2, %7 ve %14 olarak bulunmuştur [31].

Ağartma

Temel olarak bazı renk pigmentlerinin, çeşitli özelliklerdeki adsorban materyaller kullanmak sureti ile yağdan uzaklaştırıldığı aşama, ağartma işlemi olarak bilinmektedir. Ağartma sırasında fonksiyonel bileşenlerde meydana gelen kayıplar; mineral asitlerle muamele edilerek adsorbsiyon kapasiteleri artırılan, diğer bir deyişle aktive edilen ağartma topraklarının uzun süren ağartma işlemi boyunca, yağla temas etmesinden kaynaklı gerçekleştiği söylenebilir. Dolayısıyla düşük aktiviteli toprakların kullanımı, besin öğelerinin kaybını minimize etmektedir. Ancak diğer taraftan, kullanılan toprak miktarının artmasına bağlı olarak üretim maliyetlerinde yükselme meydana gelmektedir [32]. Ağartma sırasında tokoferollerde meydana gelen kayıpların kullanılan toprak çeşidine ve miktarına bağlı olarak değiştiği ifade edilmektedir [33]. Yapılan bazı çalışmalarda da genel olarak, ağartma işlemi sırasında meydana gelen tokoferol kaybının yaklaşık %8 olduğu ifade edilmektedir [18, 19, 34, 35]. Ancak yapılan bazı diğer çalışmalarda ise, toplam tokoferol miktarındaki kayıp çok daha fazla olduğu belirtilmektedir. Farklı varyetelerdeki kolza yağında yapılan bir çalışmada, toplam tokoferol kaybının ağartma sonucunda %21.2-27.41 arasında bir değişkenlik gösterdiği vurgulanmaktadır [36]. Ağartma işleminin sterol kayıpları üzerinde de etkin olduğu görülmektedir. Nitekim soya ve mısır yağında yapılmış bir çalışmada, toplam esterleşmiş sterol miktarında kayıpların meydana geldiği tespit edilmiştir Ancak aynı çalışmada, özellikle yağın çeşidine ve uygulanan rafinasyon koşullarına bağlı olarak, esterleşmiş sterol içeriğinde belli bir miktar artış olduğu da ifade edilmektedir [23]. Başka bir çalışmada ise serbest sterollerden; beta sitosterol, kampesterol ve stigmasterol gibi bileşenlerde, ağartma parametreleri koşullarına bağlı olarak bir artış meydana geldiği de görülmektedir [37]. Asitle aktive edilmiş ağartma toprağı tarafından katalizlenen bir dehidrasyon neticesinde; sterodial hidrokarbonlar, steradiene dönüşmektedir. Ayrıca uygulanan ağartma sıcaklığının da bu dönüşüm üzerinde etkin olduğu vurgulanmaktadır. Özellikle 3-5-stigmastadien, β -sitosterol hidrolizi ile meydana gelen ve bitkisel yağlarda tespit edilen en baskın steradienler arasındadır [38]. Ağartmanın skualen üzerinde de tahrip edici bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Bu etkinin araştırıldığı ve beş farklı yağ (ayçiçek, zeytin, mısır, kolza ve soya) üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, ortalama skualen kaybı yaklaşık %17 kadardır. En yüksek skualen kaybı soya

yağında iken, en düşük skualen kaybı kolza yağında tespit edilmiştir [31]. Palm yağının antioksidan kapasitesinin, rafinasyon şartlarına bağlı olarak değişimini inceleyen bir çalışmada, ağartma sonrasında antioksidan kapasitesinin yaklaşık %50 azaldığı bulunmuştur. Aynı çalışmada ayrıca toplam fenolik içeriğin %50'ne yakını, toplam karotenoid içeriğinin de %70'in üzerinde bir kayba uğradığı görülmektedir [39]. Fındık yağı üzerinde yapılan başka bir çalışmada da antioksidan kapasitesinin özellikle ağartma ve deodorizasyon aşamalarında azaldığı belirtilmektedir. Ayrıca lutein ve zeaksantin gibi karotenoidlerin, özellikle ağartma aşamasından sonra fındık yağında tespit edilmediği bildirilmektedir [26]. Pirinç kepeği yağında bulunan ve önemli bir bileşen olan γ -orizanolün; kolesterol düşürücü, anti diyabetik, anti kanserojen, antioksidan, trombosit kümeleşmesini azaltıcı, sinirsel dengesizlikleri ve menapoz sıkıntılarını azaltıcı, kas kütesini arttırıcı, fekal safra asidi atımını arttırıcı, tümör büyümesini engelleyici ve UV ışığına karşı koruyucu etkileri bildirilmektedir [40-45]. Yapılan bir çalışma sonucunda, pirinç kepeği yağındaki γ -orizanolün %40 oranında kayba uğradığı bildirilmektedir [46].

Deodorizasyon

Rafinasyon aşaması sırasında oluşan ayrıca yağın kendi bünyesinde de yer alan, yağda istenmeyen tat ve koku bileşenlerinin (özellikle kısa zincirli aldehit ve ketonlar) uzaklaştırıldığı aşama deodorizasyondur. Özellikle 220°C'nin üzerine çıkan sıcaklıklar nedeniyle, rafinasyon basamakları arasında en şiddetli işlem koşullarına sahip bir işlem olarak nitelendirilebilir. Dolayısıyla bu aşamada, fonksiyonel bileşen kayıpları çok daha dramatik bir şekilde gerçekleşmektedir. Nitekim ayçiçek yağının deodorizasyonu sonucunda meydana gelen toplam tokoferol kaybı %36 olarak bulunmuştur [47]. Bu kayba yakın bir şekilde, kolza yağında da toplam tokoferol kaybının %38 olduğu bildirilmektedir [13]. Bir başka çalışmada ise; tokoferol kayıplarının, özellikle deodorize distilatı olarak kayba uğradığını ve gerçekleşen kaybın %28.5 olduğu ifade edilmektedir [48]. Sonuç olarak deodorizasyon sırasında

tokoferol kaybının, diğer aşamalara göre çok daha yüksek bir değerde olduğu görülmektedir. Deodorizasyon aşamasında fitosterollerin de yüksek oranlarda kayba uğradığı söylenebilir. Nitekim soya yağı üzerinde yapılan bir çalışmada meydana gelen kaybın %30 olduğu raporlanmıştır [14]. Uygulanan yüksek sıcaklıklar nedeniyle, fitosteroller başka bileşenlere de dönüşebilmektedirler. Bu konuda yapılan bir çalışmada, işlenmemiş (ham) yağlarda steradiene rastlanmazken, deodorizasyon sunucunda steradien miktarının yükseldiği belirtilmektedir [49]. Yapılan başka bir çalışmada ise; deodorizasyon aşamasında steradien miktarının, artan sıcaklıklara bağlı olarak yükseldiği belirtilmektedir [38]. Diğer aşamalarda olduğu gibi deodorizasyon aşamasında da skualen kaybı yaşanmaktadır. Ancak diğer işlemlerle karşılaştırıldığında deodorizasyon aşamasında çok daha şiddetli bir skualen kaybı olduğu söylenebilir. Yapılan bir çalışmada işlenmemiş mısır ve soya yağında skualen miktarı sırasıyla 24.7 ve 18.1 mg/ 100 g yağ şeklinde iken, deodorizasyon sonunda skualen tespit edilememiştir [31]. Başka bir çalışmada ise, soya yağında deodorizasyon sonunda skualen kaybı yaklaşık olarak %38 olarak belirtilmektedir [14].

YAĞ RAFİNASYONU SIRASINDA MEYDANA GELEN ZARARLI BİLEŞENLER

Bitkisel yağ rafinasyonu pazar beklentilerini karşılamak amacıyla gerçekleştirilen farklı ve karmaşık işlemler bütünüdür. Dolayısıyla uygulanan işlem koşullarına bağlı olmakla birlikte, istenmeyen bileşenlerin oluşumunu da neden olmaktadır. Diğer taraftan; yağa çeşitli sebeplerle bulaşmış, bazı kontaminantların da (polisiklik aromatik hidrokarbonlar vb.) yağdan arındırılmasını sağlayarak, sağlıklı ürün elde edilmesine de katkı sunabilmektedir. Yağ rafinasyonu sırasında meydana gelebilen zararlı bileşiklerin başında, 3-monokloropropan-1-2-diol ile glisidil esterleri gelmektedir (Şekil 2). Bazı rafine edilmiş bitkisel yağlara ait 3-MCPD ve GE içerikleri Tablo 1'de verilmiştir.

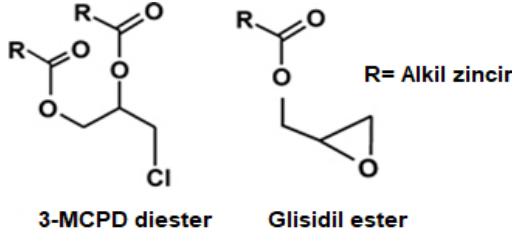
Tablo 1. Bazı rafine edilmiş bitkisel yağların 3-monokloropropan-1-2-diol ve glisidil ester içerikleri [50].

Yağ çeşidi	3-MCPD esterleri	Glisidil esterleri
Palm yağı	1.7 mg/kg	0.5 mg/kg
Hindistan cevizi yağı	0.6 mg/kg	0.5 mg/kg
Zeytinyağı	1.2 mg/kg	0.3 mg/kg
Ayçiçek yağı	1.0 mg/kg	0.4 mg/kg
Kolza tohumu yağı	0.4 mg/kg	< 0.1 mg/kg
Soya yağı	0.9 mg/kg	0.5 mg/kg
Aspir yağı	1.4 mg/kg	0.8 mg/kg
Mısır-özü yağı	1.7 mg/kg	0.6 mg/kg

3-MCPD ve GE ham yağda bulunmazken, özellikle rafinasyon sürecinde uygulanan yüksek sıcaklıklara bağlı olarak meydana geldiği ifade edilmektedir [51, 52]. Bu bileşenler yağ asitleri ile esterleşmek suretiyle yağda bulunmaktadır [53]. Yüksek sıcaklık varlığında;

trigliseritlerin mono ve digliseritlere parçalanarak GE' ye dönüştüğü ve ortamda klor iyonu bulunması halinde de 3-MCPD esterleri meydana geldiği belirtilmektedir [54]. Ancak literatürde, öncül bileşenleri ve reaksiyonun seyir tarzı dahil, 3-MCPD esterlerinin oluşum mekanizması

hakkında farklı kuramlar mevcuttur. Örneğin bazı araştırmacılar muhtemel öncül bileşenleri; triağılglicerol (TAG), diağılglicerol (DAG) ve monoağılglicerol (MAG) olarak öne sürmüştür [55, 56]. Ancak diğer taraftan bazı araştırmacılar da; TAG ve 3-MCPD ester içeriği arasında, lineer bir ilişkinin olmadığını ve MAG'lerin büyük çoğunluğunun rafinasyon sırasında giderildiğini belirtmektedir. DAG içeriğinin diğer yağlarla kıyaslandığında özellikle; 3-MCPD ester kütlesi içeren palm yağında belirgin olduğu, dolayısıyla palm yağı için DAG'ın büyük olasılıkla öncü bileşen olduğu ifade edilmektedir [57].



Şekil 2. 3-MCPD ve glisidil ester yapısı [54].

İşlem koşullarına ve kimyasal rekabetin 3-MCPD esterleri üzerindeki etkisine göre, 4 oluşum mekanizması öne sürülmektedir. Önerilen mekanizmalardan ikisi, gliserol omurga karbon atomlarının ester grubu (yol 1) veya protonlanmış hidroksil grubu (yol 2) üzerindeki klorür iyonu tarafından reaksiyona girdiği şeklindedir. Diğer iki yol ise, açiloksonyum iyonu (yol 3) veya GE (yol 4) gibi reaktif ara maddelerin oluşumunu önermektedir [58, 59]. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından genotoksik olmayan bir kontaminant olarak tanımlanan 3-MCPD için, tolere edilebilir günlük limitin 2 µg/kg olduğu rapor edilmiştir. Yağlarda 3-MCPD varlığı ve bunun rafinasyon ile bağlantısı, ilk olarak Zelinkova ve ark. [60] tarafından raporlanmıştır Söz konusu çalışmada; içinde rafine zeytinyağının da bulunduğu, farklı bitkisel yağlardaki serbest formdaki 3-MCPD'nin <3-24 µg/kg aralığında olduğu, ancak bağlı formdaki 3-MCPD'nin özellikle rafine yağlarda çok daha yüksek olduğu (<300-2462 µg/kg) bildirilmektedir. Özellikle palm yağı gibi meyve yağları bu maddelerin oluşumuna çok daha duyarlı görünmektedir [61]. Ancak zeytin ve avokado yağı da palm yağı gibi meyve yağı olmalarına rağmen, 3-MCPD oluşumu çok daha azdır. Bu durumun palm yağındaki DAG içeriğinin bu yağlara kıyasla daha yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir [57]. Zeytinyağı ve prina yağlarının buhar distilasyonu sırasında 3-MCPD ve glisidil esterlerinin oluşumunun incelendiği bir çalışmada buhar distilasyonu öncesinde zeytinyağında bu bileşenlere rastlanılmamıştır. Ancak yağ ekstraksiyonu öncesinde prina yağına uygulanan kurutma işleminin yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilmesi ve buhar distilasyonu ile birlikte yüksek sıcaklıkların devam ettirilmesi neticesinde prina yağında toplam 3-MCPD değeri 10.9 mg/kg'a kadar çıkmaktadır [62].

3-MCPD ester içeriğini azaltmak için, en uygun reaksiyon yolunu belirlemek ve 3-MCPD esterlerinin öncü bileşenlerini açıklığa kavuşturmak son derece önemlidir [60]. Ayrıca 3-MCPD esterlerinin ve ilgili

maddelerin içeriğini azaltmanın alternatif yolları düşünülmelidir. Yemelik yağların; hammadde hazırlama kadar işleme yoluna bakarak, 3-MCPD esterlerinin ve ilgili bileşiklerin azaltılmasına yol açabilecek 3 strateji vardır. Bunlardan biri, yağ rafinasyonu sırasında ester oluşumunu tetikleyen kritik reaktantların ham yağdan uzaklaştırılmasıdır. Bir diğer strateji ise, rafinasyon boyunca işlem şartlarının değiştirilmesi şeklinde olabilir. Bu aşamada rafine yağın; dayanıklılığı, duyu kalitesi ve diğer kontaminantların varlığı gibi birden fazla parametre olduğu için optimizasyon stratejisi zor bir metottür. Son olarak bir diğer strateji de rafinasyon sonrası oluşan, 3-MCPD esterlerinin rafine yağdan uzaklaştırılması şeklindedir [57].

Yerfıstığı yağının fiziksel rafinasyonunun 3-MCPD oluşumuna etkisinin incelendiği bir çalışmada; yapışkan maddelerin ayrılması ve ağartma sırasında, 3-MCPD oluşuma neden olan bileşenlerin kısmen uzaklaştırıldığını ve ağartılmış yağın, deodorizasyon öncesi yıkamak suretiyle, 3-MCPD esterlerinin oluşumunun azalttığı ifade edilmektedir. Ayrıca deodorizasyon öncesi; toksik olmayan ve ucuz bir madde olan diasetin kullanımının, 3-MCPD oluşumunu azalttığı raporlanmaktadır [63]. Başka bir çalışmada ise, rafine edilmeden önce ham yağın yıkanması ile rafinasyon sırasında 3-MCPD esterlerinin oluşumunun, bir ölçüde azaltıldığı vurgulanmaktadır [57]. Palm yağında yapışkan maddelerin ayrılması ve ağartma parametrelerinin 3-MCPD esterlerinin oluşumu üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada ise, yapışkan maddelerin ayrılması işleminin su ile ağartma işleminin de natürel ağartma toprağıyla çalışılan örneklerde, nihai 3-MCPD içeriğinin diğer örnekler içerisinde en düşük olduğu bildirilmektedir. Çalışmada ayrıca; özellikle sıcaklıkla birlikte, yapışkan maddelerin ayrılması sırasında kullanılan asitlerin ve asitle muamele edilerek aktive edilen ağartma topraklarının, 3-MCPD oluşumunu tetiklediği raporlanmaktadır [64]. Benzer görüş başka bir çalışmada da ifade edilmektedir [65]. Su ile gerçekleştirilen yapışkan maddelerin ayrılması sonucunda 3-MCPD ve GE'de meydana gelen düşüş miktarı sırasıyla %84 ve %26; nötralizasyon işleminin sodyum bikarbonat (NaHCO₃) veya potasyum hidroksitle (KOH) yapılması neticesinde düşüş oranları benzer sıra ile %81 ve %84; ağartma sırasında nötr ağartma toprağı ve magnezyum silikat (Magnesol R 60) kullanımı ile meydana gelen düşüş miktarı yine sıra ile %46 ve %67 şeklinde raporlanmaktadır. Ayrıca çift deodorizasyon ve bazı katkıları kullanmak sureti ile uygulanan deodorizasyon uygulamaları, bu bileşenlerin azaltılmasında umut verici bir yöntem olarak vurgulanmaktadır [4]. Rafine edilmiş palm yağının adsorban madde kullanmak suretiyle 3-MCPD azaltılmasına yönelik gerçekleştirilen bir çalışmada ise, 9 farklı inorganik adsorban madde incelenmiş ve içlerinden kalsine zeolit ve sentetik magnezyum silikat ile %40'lık bir düşüş elde edilmiştir [66]. Özellikle son yıllarda yağ rafinasyonu sırasında meydana gelen zararlı bileşiklerin oluşumunun önlenmesine ya da azaltılmasında minimal rafinasyon kavramı ön plana çıkmaktadır. Bu amaçla rafinasyon kademelerinde daha ılıman koşulların uygulanması, zayıf alkallerin ve

alternatif adsorbantların kullanılması, rafinasyon kademelerinin azaltılması ile istenmeyen reaksiyonların engellenmesi hedeflenmektedir [67].

SONUÇ

İnsan beslenmesinde önemli bileşenler, yağ rafinasyonu sırasında uygulanan işlemler neticesinde farklı miktarlarda kayba uğramaktadır. Özellikle tokoller, fenolik bileşikler, bitkisel steroller, skualen gibi biyoaktif maddeler rafinasyon sırasında ya biyolojik olarak etkisini kaybetmekte ya da miktar olarak azalmaktadır. Diğer taraftan rafinasyon sırasında yine işlem koşullarına bağlı olmakla birlikte, insan sağlığını tehdit eden bir takım zararlı bileşenlerin de meydana geldiği bilinmektedir. Son yıllarda tüketicilerin de bilinçlenmesi ile işlem görmüş gıdalara olan ilgi azalmakta, bunun sonucu olarak da işlem görmemiş ya da az işlem görmüş gıda ürünlerine ilgi duyulmaktadır. Bu nedenle kayıpların önüne geçilmesi ve zararlı bileşen oluşumunun önlenmesi ya da miktarının azaltılması amacıyla; rafinasyon basamaklarının ve uygulanan işlem koşullarının, yeniden gözden geçirilmesi ve bu bileşenlerin korunmasına yönelik yenilikçi metotlar üzerinde yapılan çalışmalar son derece önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Ostfeld, R., Howarth, D., Reiner, D., Krasny, P. (2019). Peeling back the label exploring sustainable palm oil ecolabelling and consumption in the United Kingdom. *Environmental Research Letters*, 14(1), 014001.
- [2] Mahlia, T.M.I., Ismail, N., Hossain, N., Silitonga, A.S., Shamsuddin, A.H. (2019). Palm oil and its wastes as bioenergy sources: a comprehensive review. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 1-18.
- [3] Yang, R., Zhang, L., Li, P., Yu, L., Mao, J., Wang, X., Zhang, Q. (2018). A review of chemical composition and nutritional properties of minor vegetable oils in China. *Trends in Food Science and Technology*, 74, 26-32.
- [4] Oey, S.B., Van der Fels-Klerx, H.J., Fogliano, V., Van Leeuwen, S.P. (2019). Mitigation Strategies for the Reduction of 2-and 3-MCPD Esters and Glycidyl Esters in the Vegetable Oil Processing Industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(2), 349-361.
- [5] *World Health Organization. (2013). Some chemicals present in industrial and consumer products, food and drinking-water. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 101, 349-374.
- [6] Mancini, A., Imperlini, E., Nigro, E., Montagnese, C., Daniele, A., Orrù, S., Buono, P. (2015). Biological and nutritional properties of palm oil and palmitic acid: effects on health. *Molecules*, 20(9), 17339-17361.
- [7] Hidalgo, F.J., Zamora, R. (2006). Peptides and proteins in edible oils: Stability, allergenicity, and new processing trends. *Trends in Food Science and Technology*, 17(2), 56-63.
- [8] Cheng, W.W., Liu, G.Q., Wang, L.Q., Liu, Z.S. (2017). Glycidyl fatty acid esters in refined edible oils: a review on formation, occurrence, analysis, and elimination methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(2), 263-281.
- [9] Demirkol, E. (2015). Rafine yağ tesislerinde deodorize kolonu seviye ölçümü. *Gıda2000 Gıda Teknolojisi ve Tarım Dergisi*. <http://www.gida2000.com/rafine-yag-tesislerinde-deodorize-kolonu-seviye-olcumu.html>. Son erişim tarihi: 23.09.2019.
- [10] Teberikler, L., Koseoglu, S., Akgerman, A. (2001). Selective extraction of phosphatidylcholine from lecithin by supercritical carbon dioxide/ethanol mixture. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(2), 115-120.
- [11] Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L.Å. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31(7), 671-701.
- [12] Niki, E. (2019). Vitamin E: Chemistry and Nutritional Benefits. Vitamin E: Structure, Properties and Functions. Edited by E. Niki, Royal Society of Chemistry, Croydon CR044YY, England, 269p.
- [13] Garcia, R.A., Schulte, E., Esteves, W., Brühl, L., Mukherjee, K.D. (1996). Minor constituents of vegetable oils during industrial processing. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(5), 587-592.
- [14] Guffinger, T., Letan, A. (1974). Quantitative changes in some unsaponifiable components of soya bean oil due to refining. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25(9), 1143-1147.
- [15] Wei, P.C., May, C.Y., Ngan, M.A., Hock, C.C. (2004). Degumming and bleaching: effect on selected constituents of palm oil. *Journal of Oil Palm Research*, 16(2), 57-63.
- [16] Liu, R., Shi, L., Zhang, Z., Zhang, T., Lu, M., Wang, X. (2019). Effect of refining process on physicochemical parameters, chemical compositions and in vitro antioxidant activities of rice bran oil. *LWT- Journal of Science and Technology*, 109, 26-32.
- [17] Jung, M.Y., Yoon, S.H., Min, D.B. (1989). Effects of processing steps on the contents of minor compounds and oxidation of soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 66(1), 118-120.
- [18] Kreps, F., Vrbiková, L., Schmidt, Š. (2014). Influence of industrial physical refining on tocopherol, chlorophyll and beta-carotene content in sunflower and rapeseed oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(11), 1572-1582.
- [19] Tasan, M., Demirci, M. (2005). Total and individual tocopherol contents of sunflower oil at different steps of refining. *European Food Research and Technology*, 220(3-4), 251-254.
- [20] Karaali, A. (1985). The effects of refining on the chemical composition of Turkish sunflower seed oil. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 87(3), 112-117.
- [21] Ogbe, R.J., Ochalefu, D.O., Mafulul, S.G., Olaniru, O.B. (2015). A review on dietary phytosterols: Their

- occurrence, metabolism and health benefits. *Asian Journal of Plant Science Research*, 5(4), 10-21.
- [22] Ortega-García, J., Gámez-Meza, N., Noriega-Rodríguez, J.A., Dennis-Quiñonez, O., García-Galindo, H.S., Angulo-Guerrero, J.O., Medina-Juárez, L.A. (2006). Refining of high oleic safflower oil: effect on the sterols and tocopherols content. *European Food Research and Technology*, 223(6), 775-779.
- [23] Verleyen, T., Sosinska, U., Ioannidou, S., Verhé, R., Dewettinck, K., Huyghebaert, A., De Greyt, W. (2002). Influence of the vegetable oil refining process on free and esterified sterols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(10), 947-953.
- [24] Ghazani, S.M., Marangoni, A.G. (2013). Minor components in canola oil and effects of refining on these constituents: A review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(7), 923-932.
- [25] Pal, U.S., Patra, R.K., Sahoo, N.R., Bakhara, C.K., Panda, M.K. (2015). Effect of refining on quality and composition of sunflower oil. *Journal of Food Science and Technology*, 52(7), 4613-4618.
- [26] Durmaz, G., Gökmen, V. (2019). Effect of refining on bioactive composition and oxidative stability of hazelnut oil. *Food Research International*, 116, 586-591.
- [27] Mirzaee Ghazani, S. (2012). The Influence of Traditional and Minimal Refining on the Minor Constituents of Canola Oil (Doctoral dissertation).
- [28] Essid, K., Trabelsi, M., Frikha, M.H. (2006). Effects of neutralization with lime on the quality of acid olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83(10), 879-884.
- [29] Dunford T.N. (2004). Nutritionally Enhanced Edible Oil and Oilseed Processing. Effects of Processing on Nutritional and Bioactive Components of Oil and Oilseeds. Edited by Dunford T. N., Dunford H. B, AOCS Publishing, USA, 303p.
- [30] Smith, D., Espino-Montoro, A., Perez-Jimenez, F., Pedro-Botet, J., Pereperez, J.J., Ordovas, J.M. (2000). Effect of a high saturated fat and cholesterol diet supplemented with squalene or β -sitosterol on lipoprotein profile in fib hamsters. *Nutrition Research*, 20(9), 1309-1318.
- [31] Nergiz, C., Çelikkale, D. (2011). The effect of consecutive steps of refining on squalene content of vegetable oils. *Journal of Food Science and Technology*, 48(3), 382-385.
- [32] Neuman T.D., Dunford T.N. (2004). Nutritionally Enhanced Edible Oil and Oilseed Processing. Edible Oil Bleaching. Edited by Dunford T.N., Dunford H.B, AOCS Publishing, USA, 303p.
- [33] Fine, F., Brochet, C., Gaud, M., Carre, P., Simon, N., Ramli, F., Joffre, F. (2016). Micronutrients in vegetable oils: the impact of crushing and refining processes on vitamins and antioxidants in sunflower, rapeseed, and soybean oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(5), 680-697.
- [34] Alpaslan, M., Tepe, S., Simsek, O. (2001). Effect of refining processes on the total and individual tocopherol content in sunflower oil. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 737-739.
- [35] Ergönül P.G, Köseoğlu O. (2014). Changes in α -, β -, γ - and δ - tocopherol contents of mostly consumed vegetable oils during refining process. *CyTA-Journal of Food*, 12, 199-202.
- [36] Wu, Y., Zhou, R., Wang, Z., Wang, B., Yang, Y., Ju, X., He, R. (2019). The effect of refining process on the physicochemical properties and micronutrients of rapeseed oils. *Plos One*, 14(3), e0212879.
- [37] Abedi, E., Sahari, M.A., Barzegar, M., Azizi, M.H. (2015). Optimisation of soya bean oil bleaching by ultrasonic processing and investigate the physicochemical properties of bleached soya bean oil. *International Journal of Food Science and Technology*, 50, 857-863.
- [38] Verleyen, T., Cortes, E., Verhe, R., Dewettinck, K., Huyghebaert, A., De Greyt, W. (2002). Factors determining the steradiene formation in bleaching and deodorisation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(6), 331-339.
- [39] Szydłowska-Czerniak, A., Trokowski, K., Karlovits, G., Szyk, E. (2011). Effect of refining processes on antioxidant capacity, total contents of phenolics and carotenoids in palm oils. *Food Chemistry*, 129(3), 1187-1192.
- [40] Rong, N., Ausman, L.M., Nicolosi, R.J. (1997). Oryzanol decreases cholesterol absorption and aortic fatty streaks in hamsters. *Lipids*, 32, 303-309.
- [41] Sugano, M., Tsuji, E. (1997). Rice bran oil and cholesterol metabolism. *Journal of Nutrition*, 127, 521-524.
- [42] Yokoyama, W.H. (2004). Plasma LDL cholesterol lowering by plant phytosterols in a hamster model. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 528-531.
- [43] Seetharamaiah, G.S., Krishnakantha, T.P., Chandrasekhara, N. (1990). Influence of oryzanol on platelet aggregation in rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 36, 291-297.
- [44] Juliano C., Cossu M., Alamanni M.C., Piu L. (2005). Antioxidant activity of gamma-oryzanol: Mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils. *International Journal of Pharmaceutics*, 299, 146-154.
- [45] Jha A.B., Panchal S.S. (2017). Neuroprotection and cognitive enhancement by treatment with γ -oryzanol in sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Applied Biomedicine*, 15(4), 265-281.
- [46] Strieder, M.M., Engelmann, J.I., Pohndorf, R.S., Rodrigues, P.A., Juliano, R.S., Dotto, G.L., Pinto, L.A.A. (2019). The effect of temperature on rice oil bleaching to reduce oxidation and loss in bioactive compounds. *Grasas y Aceites*, 70(1), e287.
- [47] Naz S., Sherazi S.T.H., Talpur F.N. (2011). Changes of Total Tocopherol and Tocopherol Species During Sunflower Oil Processing. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(1), 127-132.
- [48] Garcia, J.O., Gamez-Meza, N., Noriega-Rodríguez, J.A., Dennis-Quinonez O., García-Galindo H.S., Angulo-Guerrero J.O., Medina-Juarez L.A. (2006)

- Refining of High Oleic Safflower Oil: Effect on the Sterols and Tocopherols Content. *European Food Research and Technology*, 223(6), 775-779.
- [49] Ferrari, R.A., Schulte, E., Esteves, W., Brühl, L., Mukherjee, K.D. (1996). Minor constituents of vegetable oils during industrial processing. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(5), 587-592.
- [50] Weißhaar, R., Perz, R. (2010). Fatty acid esters of glycidol in refined fats and oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(2), 158-165.
- [51] Hrnčirik, K., Van Duijn, G. (2011). An initial study on the formation of 3-MCPD esters during oil refining. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 374-379.
- [52] Matthäus, B., Pudel, F., Fehling, P., Vosmann, K., Freudenstein, A. (2011). Strategies for the reduction of 3-MCPD esters and related compounds in vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 380-386.
- [53] Li, C., Zhou, Y., Zhu, J., Wang, S., Nie, S., Xie, M. (2016). Formation of 3-chloropropane-1-2-diol esters in model systems simulating thermal processing of edible oil. *LWT-Food Science and Technology*, 69, 586-592.
- [54] Bakhiya, N., Abraham, K., Gürtler, R., Appel, K.E., Lampen, A. (2011). Toxicological assessment of 3-chloropropane-1-2-diol and glycidol fatty acid esters in food. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55(4), 509-521.
- [55] Collier, P.D., Cromie, D.D.O., Davies, A.P. (1991). Mechanism of formation of chloropropanols present in protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68(10), 785-790.
- [56] Hamlet, C.G., Sadd, P.A., Gray, D.A. (2004). Generation of monochloropropanediols (MCPDs) in model dough systems. 2. Unleavened doughs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7), 2067-2072.
- [57] Matthäus B., Pudel F., Fehling P., Vosmann, K., Freudenstein, A. (2011). Strategies for the reduction of 3-MCPD esters and related compounds in vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 380-386.
- [58] Hrnčirik K., Zelinková Z., Ermacora A. (2011). Critical factors of indirect determination of 3-chloropropane-1-2-diol esters. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 361-367.
- [59] Velišek J., Calta P., Crews C., Hasnip, S., Doležal, M. (2003). 3-Chloropropane-1-2-diol in models simulating processed foods: Precursors and agents causing its decomposition. *Czech Journal of Food Sciences*, 21, 153-161.
- [60] Zelinková, Z., Svejková, B., Velišek, J., Doležal, M. (2006). Fatty acid esters of 3-chloropropane-1-2-diol in edible oils. *Food Additives and Contaminants*, 23(12), 1290-1298.
- [61] Seefelder, W., Varga, N., Studer, N.A., Williamson, G. (2008). Esters of 3-chloro-1-2-propanediol (3-MCPD) in vegetable oils: Significance in the formation of 3-MCPD. *Food Additives and Contaminants*, 25(4), 391-400.
- [62] Özdikicierler, O., Yemişçioğlu, F., Gümüskesen, A. S. (2016). Effects of process parameters on 3-MCPD and glycidyl ester formation during steam distillation of olive oil and olive pomace oil. *European Food Research and Technology*, 242(5), 805-813.
- [63] Li, C., Li, L., Jia, H., Wang, Y., Shen, M., Nie, S., Xie, M. (2016). Formation and reduction of 3-monochloropropane-1-2-diol esters in peanut oil during physical refining. *Food Chemistry*, 199, 605-611.
- [64] Ramli, M.R., Siew, W.L., Ibrahim, N.A., Hussein, R., Kuntom, A., Abd. Razak, R.A., Nesaretnam, K. (2011). Effects of degumming and bleaching on 3-MCPD esters formation during physical refining. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(11), 1839-1844.
- [65] Hew, K.S., Asis, A.J., Tan, T.B., Yusoff, M.M., Lai, O.M., Nehdi, I.A., Tan, C.P. (2020). Revising degumming and bleaching processes of palm oil refining for the mitigation of 3-monochloropropane-1-2-diol esters (3-MCPDE) and glycidyl esters (GE) contents in refined palm oil. *Food Chemistry*, 307, 125545.
- [66] Strijowski, U., Heinz, V., Franke, K. (2011). Removal of 3-MCPD esters and related substances after refining by adsorbent material. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 387-392.
- [67] Yemişçioğlu, F., Özdikicierler, O., Gümüskesen, A.S. (2016). Bitkisel yağ rafinasyonunda yeni bir yaklaşım: minimal rafinasyon. *Akademik Gıda*, 14(2), 172-179.

Akademik Gıda Dergisi Yazım Kuralları

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

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

- Gönderilecek çalışmanın dergide hangi tür makale olarak (Araştırma Makalesi, Derleme Makale, Araştırma Notu, Mini Derleme, Görüş ve Editöre Mektup) yayınlanması istendiği yazar(lar) tarafından mutlaka belirtilmelidir.
- Yazar(lar) tarafından çalışmayı değerlendirebileceği düşünülen ve yazar(lar)la çıkar çatışması/çakışması olmayan en az 3 potansiyel hakem iletişim bilgileri de (yazışma adresi, e-posta ve telefon numarası) verilerek önerilmelidir. Önerilecek hakemler yazarın kendi kurumu dışından olmalıdır.
- Gönderilecek çalışmalar yazım ve imla hataları içermemelidir. İngilizceden Türkçeye tercüme edilen teknik terimler "Gıda Mühendisliği Teknik Terimler Rehberi"nde [Gıda Mühendisleri Odası, Kitaplar Serisi No: 17, Filiz Matbaacılık, Ankara, 232s, ISBN: 978-9944-89-407-4] tavsiye edilen şekliyle kullanılmalıdır.
- Gönderilen çalışmaların daha önce hiç bir yerde yayınlanmadığı yazar(lar) tarafından garanti edilmelidir.
- Yayın Kurulu yayına kabul edilmiş çalışmalarda gerekli değişiklikleri yapmaya yetkilidir.

Makalelerin Değerlendirilmesi

Yayımlanmak üzere Akademik Gıda dergisine gönderilen çalışmalar öncelikle Editörlerin ön incelemesinden geçmektedir. İlk incelemeyi geçen çalışmalar, değerlendirilmek üzere en az iki bağımsız hakeme gönderilmektedir. Çalışmaların değerlendirilmesinde hakemlerin makale yazar(lar)ını, makale yazar(lar)ının hakemleri görmediği çift-kör (double-blind) değerlendirme sistemi kullanılmaktadır. Editörler (i) dergi kapsamı dışında olan, (ii) teknik açıdan yetersiz, (iii) kendi içerisinde bütünlük ve

tutarlılık arz etmeyen sonuçlar içeren veya (iv) kötü yazılmış çalışmaları doğrudan reddetme hakkına sahiptir.

Yayın Ücreti

Akademik Gıda dergisinde makale yayınlanması için herhangi bir ücret talep edilmemektedir.

Etik Beyanı

Dergi yayın politikası, makalelerin değerlendirilmesi ve etik hususlar ile ilgili detaylı bilgilere Etik Beyanı kısmından ulaşılabilir.

Çalışmaların Hazırlanması

1. Çalışmalar A4 boyutunda hazırlanmalı, üstten 2.45 cm, alttan 2.45 cm, sağ ve soldan 1.75 cm boşluk bırakılmalı ve tek kolon olarak hazırlanmalıdır. Metin çift satır aralıklı yazılmalı, paragraflar arasında tek satır boşluk bırakılmalıdır. Metinde bütün satırlar (sürekli) numaralandırılmalıdır.

2. Çalışma başlığı 14 punto Arial, koyu, küçük harflerle ve ortalanmış olarak yazılmalıdır. Başlıktan sonra bir satır boşluk bırakılmalı (11 punto); yazar isimleri (yalnızca ilk harfler büyük) 10 punto Arial ve ortalanmış olarak verilmelidir. Yazarların adresleri, telefon ve faks bilgileri ile yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi hemen alt satırda 9 punto Arial, ilk harfler büyük olacak şekilde ve ortalanmış olarak yazılmalıdır. Yazarların çalıştıkları kuruluşlar (ve/veya adresler) farklı ise her bir yazar isminin sonuna rakamlarla üst indis konulmalıdır.

3. Metin içindeki kısımların başlıkları (ÖZ, ABSTRACT, GİRİŞ vb.) 10 punto Arial ve koyu olarak büyük harflerle yazılmalı, başlıktan sonra bir satır boşluk bırakılarak metine geçilmelidir. Alt başlıklarda ilk harfler büyük, 10 punto Arial ve koyu yazı karakteri kullanılmalıdır. ÖZ'ün altına bir satır boşluk bırakıldıktan sonra en fazla 5 adet Anahtar Kelime konmalıdır. Anahtar Kelimelerden sonra bir satır boşluk bırakılarak İngilizce başlık ve altına ABSTRACT ve Keywords yazılmalıdır. Bir satır boşluk bırakılarak ana metine geçilmelidir.

4. Ana metin 9.5 punto Arial olarak hazırlanmalıdır.

5. Çalışma başlıca şu kısımlardan oluşmalıdır: Başlık, Yazar İsimleri, Adresleri, İletişim Bilgileri, Yazışmalardan Sorumlu Yazarın E-posta adresi, Öz,

Abstract, Ana Metin (Giriş, Materyal ve Metot, Bulgular ve Tartışma, Sonuç), Teşekkür (gerekliyse), Kısaltmalar (gerekliyse), Kaynaklar.

6. Öz ve Abstract 250 kelimeyi geçmemeli, çalışmanın amacını, metodunu ve önemli sonuçlarını içermelidir. Öz tek paragraf olarak yazılmalı ve öz içinde kaynaklara atıf yapılmamalıdır.

7. Çalışma içerisinde geçen mikroorganizma isimleri ile Latince ifade ve isimler italik olarak yazılmalı ve kısaltmalarda uluslararası yazım kuralları göz önünde bulundurulmalıdır.

8. Tablo başlıkları tablonun üstüne, şekil başlıkları ise şeklin altına yazılmalı ve numaralandırılmalıdır. Kullanılan tablo ve şekillere metin içinde mutlaka atıf yapılmalıdır. Metin içinde geçen veriler tablo ve şekillerin tekrarı olmamalıdır. Tablo ve şekillerin başlıkları içerikleriyle uyumlu ve anlaşılabilir olmalıdır. Şekiller ve resimlerin yüksek çözünürlükte olmasına dikkat edilmelidir. Resimler (ve gerekliyse Şekiller) *.jpg formatında metin içerisinde yer almalıdır.

9. Metin içerisinde atıflar köşeli parantez içerisinde rakamlarla yapılmalı [1] ve Kaynaklar bölümünde bu numara sırasıyla detayları yazılmalıdır. Kaynakların numaralandırılması MS Word Numaralandırma Kitaplığı kullanılarak yapılmalıdır.

10. Kullanılan matematiksel denklemler numaralandırılmalı ve metin içerisinde bu denklemlere atıf yapılmalıdır.

11. Kaynaklar kısmı APA yazım stili kullanılarak hazırlanmalıdır. Kaynakların yazımında aşağıdaki örnek yazım biçimleri kullanılmalı ve makalelerin yayımlandığı dergi isimleri kısaltma kullanılmadan ve italik olarak yazılmalıdır. Web adreslerine atıf yapılacağına (mümkün olduğunca Resmi web sayfalarına atıf yapılmalıdır) mutlaka ilgili web adresine erişim tarihi verilmelidir.

Makale

- [1] Bozkurt, H., İçier, F. (2009). İnegöl köfte üretiminde ohmik pişirmenin uygulanabilirliğinin incelenmesi. *Akademik Gıda*, 9(1), 6-12.

Kitap

- [2] Kılıç, S. (2001). Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ege Üniversitesi Matbaası, Bornova, İzmir.

Kitap Bölümü

- [3] Gibson, G.R., Saavedra, J.M., MacFarlane, S., MacFarlane, G.T. (1997). Probiotics and Intestinal Infections. In Probiotics 2: Applications and Practical Aspects, Edited by R. Fuller, Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London SE1 8HN, England, 212p.

Kongre-Sempozyum Bildirisi

- [4] Gürsoy, O., Akdemir, O., Hepbaşı, A., Kınık, Ö. (2004). Recent situation of energy consumption in Turkey dairy industry. *International Dairy Symposium: Recent Developments in Dairy Science and Technology*, May 24-28, 2004, Isparta, Turkey, Book of Proceedings, 10-16p.

12. Hakem görüşleri doğrultusunda düzeltilmek üzere yazar(lar)a gönderilen çalışmaların gerekli düzeltmeleri yapılarak yayın ofisine ulaştırılması gereklidir. Editörler tarafından belirtilen süre zarfında gönderilmeyen çalışmalar "ilk defa gönderilmiş çalışma" olarak değerlendirilecektir.

13. Yukarıdaki kurallara uygun olarak hazırlanmamış çalışmalar değerlendirmeye alınmaz.

Guidelines to Authors

Akademik Gıda® (Academic Food Journal) is a peer reviewed journal where original research and review articles are published in the field of food science and technology. Research notes, mini-reviews, opinions and letters to the editor are also considered for publication. The journal is published trimonthly and each volume is composed of 4 issues per year. Journal articles are published either in Turkish or English. Manuscripts in either good American or British English usage are accepted, but not a mixture of these.

Manuscripts for the Akademik Gıda® (Academic Food Journal) must be sent via the electronic article submission system, which can be located in the official website of the journal, www.academicfoodjournal.com. Manuscripts sent by e-mail are not considered for evaluation. For questions related to the electronic article submission system, contact the editor via e-mail at ogursoy@yahoo.com.

- Authors must specify the type of the manuscript (research articles, review articles, research briefs, mini-review articles, comments and letters to the editor).
- Authors should provide at least 3 potential referees and their contact information (mailing address, e-mail address and phone number).
- Manuscripts to be submitted should be free from any spelling or grammatical error.
- Authors must guarantee that the submitted manuscript is not published anywhere previously and will not be submitted to anywhere before the editorial board makes a final decision on the manuscript.
- The editorial board is authorized to make necessary changes in manuscripts accepted for publication.

Peer review policy

Manuscripts pass through initial screening in the editorial office followed by internal review by Editors. After the first evaluation, manuscripts are double-blind-reviewed by a peer review system involving at least two independent reviewers to ensure high quality of manuscripts accepted for publication. The Editors have the right to decline formal review of a manuscript if it is (i) on a topic outside the scope of the Journal, (ii) lacking technical merit, (iii) fragmentary and providing marginally incremental results or (iv) poorly written.

Publication fee

Akademik Gıda® (Academic Food Journal) welcomes article submissions and does not charge a publication fee.

Ethics Statement

Detailed information about journal publication policy, evaluation of manuscripts and ethical issues can be found in the Ethics Statement section.

Preparation of a manuscript

1. Manuscripts should be prepared in A4 size, and the text must be prepared in a single column format. The text must be double-spaced, and a single space should be left between paragraphs. All lines and pages must be continuously numbered.

2. The title must be 14pt Arial, bold, small letters and centered. A blank line should be left after the title, and the names of authors should be given in 10pt Arial and centered. In addition to each author's contact address, the phone and fax numbers and e-mail address of the corresponding author should be provided. If the institutions of the authors are different, superscript numbers should be used to indicate their addresses.

3. The headings (e.g. Abstract, Introduction, Materials and Methods etc.) must be 10pt Arial, and should be typed in bold capital letters. Each heading should appear on its own separate line. A blank line should be left after each heading. A list of keywords, a maximum of 5, should be provided below the abstract section of the manuscript.

4. The main text should be prepared in 9.5pt Arial.

5. Typical articles mainly consist of the following divisions: Title, Author Names, Addresses, Contact Information, Corresponding author's e-mail address, Abstract, Main text (Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions), Acknowledgements (if necessary), Abbreviations (if necessary) and References.

6. The abstract should not exceed 250 words, and the main purpose and method and the most significant result and conclusion should be presented in the abstract. The abstract should be prepared as a single paragraph, and should not include any citation.

7. Latin names in the text should be in italics, and names and abbreviations should follow international rules. If abbreviations that are not standard are unavoidable, they must be defined at their first mention in the text. Consistency of abbreviations throughout the article must be ensured. Internationally accepted rules and conventions must be followed, and the international

system of units (SI) must be used. If other units are mentioned, their equivalents in SI must be provided.

8. Table headings should be on the top of each table and figure captions below each figure. Each table or figure must be numbered consecutively in accordance with their appearance in the text. All figures and tables should be cited in the text. The data presented in the tables and figures should not be repeated in the text. Table headings and figure captions should be self-explanatory. Figures and pictures must be provided in high resolution, and pictures (and, if necessary figures) should be included in the text as *.jpg format.

9. References in the text should be cited in numbers in square brackets [1] and details of the citations must be provided in the Literature or References section with their respective numbers.

10. Mathematical equations should be numbered and cited in the text.

11. References should be given according to the APA manual of style. The following formats should be used for the details of cited references, and the journal names must be typed in italics. References to the Web addresses (if necessary, the official web pages should be preferred) must include full web address and the date of access.

Article

[1] Güzeler, N., Kaçar, A., Say, D. (2011). Effect of milk powder, maltodextrin and polydextrose use on

physical and sensory properties of low calorie ice cream during storage. *Akademik Gıda*, 9(2), 6-12.

Book

[2] Kilic, S. (2001). Lactic Acid Bacteria in Dairy Industry. Ege University Faculty of Agriculture Publications, Ege University Press, Bornova, Izmir, Turkey.

Book Chapter

[3] Gibson, G.R., Saavedra, J.M., MacFarlane, S., MacFarlane, G.T. (1997). Probiotics and Intestinal Infections. In Probiotics 2: Applications and Practical Aspects, Edited by R. Fuller, Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London, England, 212p.

Proceedings of the Congress-Symposium

[4] Gursoy, O., Akdemir, O., Hepbasli, A., Kinik, O. (2004). Recent situation of energy consumption in dairy industry in Turkey. *International Dairy Symposium: Recent Developments in Dairy Science and Technology*, May 24-28, 2004, Isparta, Turkey, Book of Proceedings, 10-16p.

12. A list of the corrections requested by the referees must be provided by the authors, and it must be sent to the editorial office.

13. Studies that are not prepared in accordance with the rules above will not be considered for evaluation.

Etik Beyanı

Akademik GIDA®, gıda bilimi ve teknolojisi alanında orijinal araştırma ve derleme makalelerinin yayınlandığı hakemli bir dergidir. Dergi üç ayda bir Sidas Medya Ltd. Şti. (Çankaya, İzmir, Türkiye) tarafından yayınlanmaktadır. Derginin genel bilimsel kalitesini iyileştirmek için yayıncı tarafından aşağıdaki yönergeler belirlenmiştir.

Yayın Politikası

Akademik Gıda dergisine gönderilen tüm makaleler Dergi Editörleri için Davranış Kuralları ve En İyi Uygulama Kılavuzları ve Dergi Yayıncıları için Davranış Kurallarında ([Code of Conduct and Best Practice Guidelines for Journal Editors and Code of Conduct for Journal Publishers](#)) belirtilen Genel Kılavuzlara uygun olarak değerlendirilmektedir. Bilimsel yazılar dergiye gönderilmeden önce derginin Yazım Kurallarının okunmasını önemle tavsiye ederiz. Yazarlar aynı zamanda Avrupa Bilim Editörleri Birliği'nin (EASE) ([European Association of Science Editors](#)) İngilizce olarak basılacak makaleler için "Bilimsel Makalelerin Yazarları ve Çevirmenleri İçin Rehber"e uymalıdır. Yazarlar, insan veya hayvan verilerini içeren araştırmaları için Uluslararası Tıp Dergisi Editörleri Komitesinin ([International Committee of Medical Journal Editors](#)) önerilerini takip etmelidir.

Makalelerin Değerlendirilmesi

Dergiye gönderilen tüm makaleler, bilimsel içeriklerinin özgünlüğü ve kalitesi ölçütlerine göre değerlendirilir.

- Dergiye gönderilen tüm yazılar, ilk olarak yayın ofisindeki (teknik ve genel kalite değerlendirilmesi açısından) eleme işleminden geçer ve ardından teknik ve bilimsel editörler tarafından değerlendirilir.
- İlk değerlendirmeden sonra, editörler (i) dergi kapsamı dışında kalan bir konu hakkında hazırlanmış makaleleri (ii) teknik olarak eksik/yetersiz makaleleri, (iii) kısmi ve marjinal artan sonuçları içeren makaleleri veya (iv) kötü yazılmış makaleleri reddetme hakkına sahiptir.
- İlk inceleme sonucunda makalenin ileri değerlendirme için uygun olduğuna karar verilirse, dergide yayımlanmak üzere kaliteli makalelerin seçimini yapmak amacıyla, makaleler çift-körlü (hakemin ve yazar/yazarların birbirlerini görmedikleri) değerlendirme sistemi ile en az iki bağımsız hakemden oluşan bir değerlendirme sürecinde bilimsel incelemeye alınır.
- Hakemler tarafından talep edilirse, makalenin hakem görüşleri doğrultusunda yazarlar tarafından revize edilmiş versiyonu orijinal hakemler tarafından tekrar değerlendirilir. Değerlendirmelerin ardından

editörler hakem önerileri doğrultusunda makale hakkındaki nihai kararlarını verirler. Gerekirse editörler, hakemlerin istedikleri tüm şartların yerine getirilmesi için yazarlardan ilave revizyon isteyebilir.

- Kabul edilen makalelerin son versiyonu, yayın öncesi taslağın (galley proof) hazırlanması için teknik editörlere gönderilir. Yazarlardan, makalelerinin dizgisi hazırlanmış taslaklarını son kontrol için yayın öncesinde incelemeleri istenir.
- Tüm makaleler, nihai formlarında DOI numarası almış ve çevrimiçi olarak pdf dosyaları halinde yayımlanır. İlgili veritabanlarında bu şekilde indekslenir.

Yayın Ücreti

Akademik Gıda dergisinde makalelerin yayınlanması için herhangi bir yayın ücreti talep edilmemektedir.

Gizlilik

Editörler, Akademik Gıda'ya gönderilen tüm makaleleri tam bir gizlilikle ele alır. Editörler, hakemler haricinde, COPE tavsiyelerine uyulmadığı takdirde, üçüncü şahıslara makale ile ilgili hiçbir bilgi vermezler. Yayımlanmak üzere dergiye gönderilen makaleler hakemler için de gizlidir ve bilimsel değerlendirme için aldıkları makalelerin herhangi bir bölümünü üçüncü şahıslarla paylaşmalarına veya dağıtmalarına izin verilmez. Suiistimal şüphesi olduğunda, hakemlerin derhal gizli bir şekilde yayın ofisine başvurmaları önerilir. Hakemler ayrıca, Dergi Editörleri için Davranış Kuralları ve En İyi Uygulama Kuralları ile Dergi Yayıncıları için Davranış Kuralları'nı ([Code of Conduct and Best Practice Guidelines for Journal Editors and Code of Conduct for Journal Publishers](#)) takip ederek editöre gizli yorumlarında belirli bir eylem önerebilirler.

Akademik Gıda, çift-kör bir hakem inceleme süreci yürütür, yani çalışmanın eleştirel değerlendirmesini sağlamak için hakemlerin isimleri gizlidir. Hakemlerden, raporlarında adlarını veya irtibat bilgilerini açıklamamaları istenir. Hakem raporları yazarlara gönderilemeden önce bu açıdan kontrol edilir.

Yazarlık

Bir yazar, bir araştırmanın fikrine veya tasarımına, verilerin elde edilmesine, verilerin analizine veya yorumlanmasına büyük ölçüde katkıda bulunan, makalenin hazırlanmasında, yazılmasında veya gözden geçirilmesinde entelektüel içeriğe eleştirel katkı yapan bireydir. Katkıda bulunanlar diğer kişiler makalenin Teşekkür bölümünde belirtilmelidir ve çalışmanın yazarı olarak kabul edilemez. Tüm yazarların doğru ve tam isimleri ile ORCID kimlikleri dergiye gönderilen

makalenin başlık sayfasında yer almalıdır. Yazarların isimlerinin yanında çalıştıkları kurumlar ve yazışmalardan sorumlu yazarın geçerli bir adresi verilmelidir. Yazışmalardan sorumlu yazarın telefon ve faks numaraları ile e-posta adresi makalenin ilk sayfasında belirtilmelidir. Tüm yazarlar, gönderilen makalenin daha önce herhangi bir yerde yayınlanmadığını ve makale hakkında Akademik Gıda dergisi nihai bir karar vermeden önce makaleyi başka bir dergiye göndermeyeceklerini garanti etmelidir.

Destekleyen/Finans Sağlayan Kuruluşlar

Araştırmanın tüm finans kaynaklarına ilişkin detaylar, Teşekkür bölümünde belirtilmelidir. Yazarlar, resmi finansman kurum/larının tam isimlerini ve proje/hibe numaralarını belirtmelidir.

Yazarlarda Değişiklik

Makalenin Akademik Gıda'ya sunulmasından sonra yazar isimlerinde değişiklik ancak revizyon sırasında gerekli olan ek çalışmalar durumunda olabilir. Makalenin yayına kabul edilmesinden sonra herhangi bir değişikliğe izin verilmez. Yazarlıktaki değişiklik, hakem görüşlerine verilen cevaplar sırasında yazışmalarda belirtilmeli ve tüm yazarlar tarafından kabul edilmelidir. Yazışmalardan sorumlu yazar, yazarların sırası da dahil olmak üzere makalenin revize edilmiş versiyonundaki değişikliklerden sorumludur.

Çalışma Verilerinde Düzeltme

Yayınlanan verilerin doğruluğundan tüm yazarlar sorumlu olmalıdır. Verilerin düzeltilmesi için, yazışmalardan sorumlu yazardan yayın öncesi taslağı (galley proof) incelemesi ve makalenin yayınlanmasından 4 gün önce dikkatlice düzeltilmesi istenir.

Makalenin Geri Çekilmesi

Bir makalenin geri çekilmesi, gönderim veya yayın hatalarını düzeltmek için kullanılır. Yazarlar makaleyi geri çekebilir ve bu durumda Yayın Etiği Komitesi (COPE) Geri Çekme Kurallarına [(COPE) retraction guidelines] uymalıdır. Tekrarlanan veya benzerlik oranı yüksek bir yayın, verilerin hileli kullanımını, intihal veya etik dışı araştırma yapılması durumunda, makale editör tarafından geri çekilecek ve geri çekilen makale linklerine bağlantı korunacak ancak elektronik veri tabanına (makale sayfasına) bir geri çekme bildirimi eklenecektir.

Etik Hususlar

Çıkar çatışması:

- Yazar/lar başvuru sırasında herhangi bir çıkar çatışması varsa beyan etmelidir. Yazar/ların başvuru sırasında bilimsel değerlendirme için en az üç potansiyel hakem önermeleri istenir. Önerilen hakemler çalışma arkadaşları, ortak çalıştıkları kişiler veya çalıştıkları kurumların üyeleri olamazlar.
- Hakemler makaleyi değerlendirmelerini önleyen herhangi bir çıkar çatışması olması durumunda

Editörleri bilgilendirmesi ve bu konuda COPE kurallarına uyması tavsiye edilmektedir.

- Editörler Kurulu üyeleri veya kurul üyelerinin ortak çalıştıkları kişiler tarafından dergiye gönderilen makaleler için, değerlendirme sırasındaki önyargıları en aza indirmek amacıyla, değerlendirme süreci ilgili kurul üyelerini dışarıda tutacak şekilde değiştirilerek uygulanır.
- Düzeltmeler (revizyonlar) sırasında, editörler Dergi Editörleri İçin Davranış Kuralları ile En İyi Uygulama Kılavuzu ve Dergi Yayıncıları İçin Davranış Kurallarını ([Code of Conduct and Best Practice Guidelines for Journal Editors and Code of Conduct for Journal Publishers](#)) takip ederler.

İnsan denekleri, hayvan veya bitki içeren araştırmalar

- Araştırmanın insan denekleri veya hayvanları içermesi durumunda, yazarların Uluslararası Tıp Dergisi Editörleri Komitesinin ([the International Committee of Medical Journal Editors](#)) yönergelerini izlemeleri önerilir.
- İnsan denekleri içeren çalışmalarda, deneklerin çalışmaya katılmak için imzaladıkları onamlar yazarlar tarafından sağlanmalıdır. 18 yaşın altındaki deneklerin çalışmaya katılmaları için ebeveyn veya velileri tarafından izin verilmelidir.
- Test edilen tüm denekler için, makalenin, ilgili kurallara ve/veya uygun izinlere veya lisanslara uyumunu gösteren belgelerin sunulması gerekir.
- Hayvanlar üzerinde yapılacak her türlü araştırma kurumsal, ulusal veya uluslararası kurallara uygun olmalı ve etik kurul tarafından onaylanmalıdır.
- Bitki materyallerinin toplanması dahil, bitkiler üzerinde yapılan deneysel araştırmalar, kurumsal, ulusal veya uluslararası kurallara uygun olmalıdır.
- Saha çalışmaları yerel mevzuata uygun olarak yapılmalı ve uygun izinleri ve/veya lisansları belirten bir açıklama makalede yer almalıdır.

Yayın suistimali

- Akademik Gıda dergisi, Dergi Editörleri İçin Davranış Kuralları ile En İyi Uygulama Kılavuzları ve Dergi Yayıncıları İçin Davranış Kurallarını ([Code of Conduct and Best Practice Guidelines for Journal Editors and Code of Conduct for Journal Publishers](#)) takip eder.
- Makalenin aynı anda birden fazla dergiye gönderilmesi, intihal, yayınlanmış makalenin yeniden yayınlanması, etik kuralların ihlali vb. şüpheli bir suistimal durumunda, araştırmacılar, hakemler veya okuyucular Yayın Ofisi (ogursoy@yahoo.com) ile iletişime geçmeye teşvik edilir.
- Makaledeki benzerlik oranı tek bir kaynaktan %10'dan fazla olmamak üzere en fazla %25 ile sınırlandırılmıştır. Bu koşula uymayan makaleler reddedilir. Bu şartların ihlal edilmesi durumunda, COPE ([COPE recommendations](#)) tavsiyeleri izlenecek ve ilgili tüm taraflara bildirilecektir.

Telif Hakkı

Akademik Gıda, yayınlanan bütün makalelere orijinal eserin uygun şekilde belirtilmesi ve ticari amaçlarla kullanılmaması şartıyla, herhangi bir ortamda kullanılmasına, dağıtılmasına ve çoğaltılmasına izin veren "Creative Commons Attribution 4.0 CC BY-NC" lisansını ([Creative Commons Attribution Non-Commercial 4.0 CC BY-NC](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)) tüm yayınlanmış makalelere uygular. Yayınlanmadan önce, Telif Hakkı Devir Formu yazışmalardan sorumlu yazar tarafından imzalanmalı ve derginin yayın ofisine gönderilmelidir. Yayınlanan yazıların telif hakkı Sidas Medya Limited Şirketi'ne (Çankaya, İzmir) aittir. Yazarlar, yayınladıkları makaleleri serbestçe ve ticari olmayan amaçlarla, bütünlüğü korunduğu ve yazarları, alıntı detaylarını ve yayıncıları açıkça belirtildiği sürece kullanma hakkına

sahiptir. Bireysel kullanıcılar, yazarların fikri ve ahlaki haklarının, saygınlığının ve bütünlüğünün tehlikeye atılmaması şartıyla, Akademik Gıda'da yayınlanan yazılara erişebilir, indirebilir, kopyalayabilir, görüntüleyebilir ve uyarlayabilir. Kullanıcılar herhangi bir yeniden kullanımın, sahiplerin telif hakkı politikalarına uygun olmasını sağlamalıdır. Yayınlanan yazıların içeriği, ticari olmayan araştırma ve eğitim amaçlı kopyalanır, indirilir veya başka bir şekilde yeniden kullanılırsa, uygun şekilde bir atıf yapılmalı ve ilgili makaleye bir link [yazarlar, dergi unvanı, el yazması adı, cilt, yıl ve sayfa numaraları ve yayınlanan link] Derginin web sitesinde sürüm] sağlanmalıdır. Telif hakkı bildirimleri ve feragatnameler silinmemelidir.

Ethics and Publication Malpractice Statement

Akademik GIDA® is a peer-reviewed journal where original research and review articles are published quarterly by Sidas Media Agency Advertisement Consultation Ltd. (Cankaya, Izmir, Turkey) in the field of food science and technology. In order to improve the overall scientific quality of the journal, following guidelines have been established by the publisher.

Editorial Policy

General Guidelines stated in the [Code of Conduct and Best Practice Guidelines for Journal Editors and Code of Conduct for Journal Publishers](#) are followed by all papers submitted to Academic GIDA. Prior to submission, authors are highly recommended to read the [Journal's Instructions to Authors](#). Authors should also follow the [European Association of Science Editors \(EASE\) Guidelines for Authors and Translators of Scientific Articles to be Published in English](#). For any research involving human or animal data, the recommendations of the [International Committee of Medical Journal Editors](#) should be followed by the authors of the manuscripts.

Peer Review

All contributions are evaluated according to the criteria of originality and quality of their scientific content.

- All manuscripts pass through an initial screening process (technical and overall quality evaluation) in the editorial office followed by an internal review by the technical and scientific editors.
- After the first evaluation, editors have the right to decline formal review of a manuscript if it is (i) on a topic outside the scope of the Journal, (ii) lacking technical merit, (iii) fragmentary and providing marginally incremental results or (iv) poorly written.
- If the manuscript is considered suitable for further evaluation, manuscripts are double-blind-reviewed by a peer review system involving at least two independent reviewers to ensure high quality of manuscripts accepted for publication.
- If requested, the revised version is evaluated by the reviewers, and editors make a decision about final acceptance based on their suggestions. If necessary, further revision can be asked for to fulfil all the requirements of the reviewers.
- The final version is then sent to the technical editor in order to produce a galley proof, and the authors receive this proof for final check before publishing.
- All manuscripts are posted online as pdf files in their final form, indexed in databases with the assigned DOI numbers.

Publication Fee

Akademik GIDA welcomes article submissions and does not charge any publication fee.

Confidentiality

Editors handle all papers submitted to Akademik GIDA in strict confidence. With the exception of reviewers, they do not disclose any information regarding submissions to third parties, unless in case of a suspected misconduct, where COPE recommendations are followed. Submissions are also confidential for reviewers and they are not allowed to share or distribute any part of the manuscripts which they receive for evaluation to third parties. For a case of suspected misconduct, reviewers are encouraged to contact the editorial office immediately in a confidential manner. Reviewers can also recommend a particular course of action in their confidential comments to the editor, following [Code of Conduct and Best Practice Guidelines for Journal Editors and Code of Conduct for Journal Publishers](#).

Akademik GIDA conducts a double-blind peer review process, i.e. the names of the reviewers are confidential to ensure the critical evaluation of the work. Reviewers are asked not to disclose their names or contact details in their comments for authors.

Authorship

An author is an individual who substantially contributed to the idea or design of a research, acquisition of data, analysis or interpretation of data, was involved in drafting, writing or revising the manuscript critically for important intellectual content. Other contributors should be mentioned in the Acknowledgements section of the manuscript and cannot be considered as authors of the study. Correct and full names of all authors and their [ORCID](#) IDs should be on the title page of the manuscript. Names of authors must be supplemented with their affiliations and a valid address of the corresponding author. The phone and fax numbers and e-mail address of the corresponding author should be stated in the first page of the manuscript. All authors must guarantee that the submitted manuscript is not published anywhere previously and will not be submitted to anywhere before the editorial board makes a final decision on the manuscript.

Funding Sources

Details for all funding sources of the research should be stated in the Acknowledgements. Authors should provide

the full official funding agency name(s) and grant number(s).

Alteration in Authorship

Alteration in authorship after the submission of the manuscript to Akademik GIDA can be justified only by the additional work required during the revision. Any change is not allowed after the acceptance of the manuscript for publication. Alteration in authorship should be indicated in the responses to reviewers, and should be accepted by all authors. The corresponding author is primarily responsible for any alteration in the revised version of the manuscript, including the order of authors.

Correction of Data

All authors should be responsible for the accuracy of the published data. For the correction of data, the corresponding author receives the galley proof of the paper and is asked to correct it carefully within 4 days before publication.

Retraction of an Article

A retraction of an article is used to correct errors in submission or publication. Authors can retract the paper and should follow the Committee on Publication Ethics (COPE) [retraction guidelines](#). In case of a duplicate or overlapping publication, fraudulent use of data, plagiarism or unethical research, the paper will be retracted by the editor, and a retraction notice will be included into the electronic database while all links to the retracted article will be maintained.

Ethical Considerations

Conflict of interest:

- Authors should declare any conflict of interest in their submission form. Authors are requested to suggest at least three potential reviewers before submission, and these reviewers cannot be their colleagues, collaborators or members of their institutions.
- Reviewers should notify the editors on any conflict of interest which prevents them from reviewing the paper, and they are recommended to follow the [COPE guidelines](#).
- For the manuscripts submitted by the members of the Editorial Board or their collaborators, peer reviewing is modified to exclude them from the entire evaluation process in order to minimize any bias during the evaluation.
- During revision, the editors follow the [Code of Conduct and Best Practice Guidelines for Journal Editors and Code of Conduct for Journal Publishers](#).

Research involving human subjects, animals or plants:

- If the research involves humans or animals, the authors are recommended to follow the guidelines of the [International Committee of Medical Journal Editors](#).

- In studies involving human subjects, their informed consent to participate in the study should be supplied by the authors. For subjects under the age of 18, their parents or guardians should give the permission for their participation in the study. For all tested subjects, the manuscript must accompany with a statement detailing compliance with relevant guidelines and/or appropriate permissions or licenses.
- Any research on animals must comply with institutional, national or international guidelines and, where possible, should be approved by an ethics committee.
- Any experimental research on plants, including collection of plant materials, must comply with institutional, national, or international guidelines.
- Field studies should be conducted in compliance with local legislation, and a statement specifying the appropriate permissions and/or licences should be included in the manuscript.

Publication misconduct:

- The Journal follows the [Code of Conduct and Best Practice Guidelines for Journal Editors and Code of Conduct for Journal Publishers](#).
- In a case of a suspected misconduct such as redundant or duplicate submission, plagiarism, text recycling, violation of ethical norms, etc., researchers, reviewers or readers are encouraged to contact the Editorial Office (ogursoy@yahoo.com).
- The overlapping in the manuscript is highly restricted to the maximum of 25% with no more than 10% from a single source; otherwise, the manuscript will be rejected. If these terms are violated, COPE recommendations will be followed and all parties involved will be notified.

Copyright

Akademik GIDA applies the [Creative Commons Attribution Non-Commercial 4.0 CC BY-NC license](#) to all published papers, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes. Before publication, the [Copyright Transfer Form](#) must be signed by the corresponding author and returned to the editorial office of the journal. Copyright of published papers is retained by the Sidas Media Agency Advertisement Consultation Ltd. (Cankaya, Izmir, Turkey). Authors have the right to use their published article freely and in noncommercial purposes, as long as its integrity is maintained and its original authors, citation details and publisher are clearly stated. Individual users may access, download, copy, display, and adapt the manuscripts published in Akademik GIDA, provided that the authors' intellectual and moral rights, reputation and integrity are not compromised. Users must ensure that any reuse complies with the copyright policies of the owners. If the content of the published manuscripts is copied, downloaded or otherwise reused for noncommercial research and educational purposes, a link to the appropriate bibliographic citation (authors, journal title, manuscript title, volume, year and page

numbers, and the link to the published version on the [Journal's website](#) should be provided. Copyright notices and disclaimers must not be deleted.

Fevzipaşa Blv. Çelik İş Merkezi No:162 K:3 D:302 Çankaya / İZMİR
Tel: +90 232 441 60 01 Fax: +90 232 441 61 06 E-mail: sidasmedya@gmail.com

SIDAS MEDYA