

# GIDA

*THE JOURNAL OF FOOD*



E-ISSN 1309 - 6273, ISSN 1300 - 3070

CİLT / VOLUME : 48

SAYI / NUMBER : 1

YIL / YEAR : 2023

**GIDA TEKNOLOJİSİ DERNEĞİ YAYINI**

*PUBLISHED BY THE ASSOCIATION OF  
FOOD TECHNOLOGY IN TURKEY*

**Sahibi / Owner**

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

Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

Yönetim Kurulu Başkanı / President of the Association

**Baş Editör / Editor-in Chief**

ÇAKIR, İbrahim; *Bolu Abant İzzet Baysal University, Turkey*

**Editörler / Editors**

AVCI, Ayşe; *Sakarya University, Turkey*  
ÇOLAKOĞLU, A. Sinan; *Kabramanmaraş Sütcü İmam University, Turkey*  
DEMİRKESEN, Mert; *İlkem, Ministry of Agriculture and Forestry, Turkey*  
DEMİROK SONCU, Eda; *Ankara University, Turkey*  
ERİNÇ, Hakan; *Niğde Ömer Halisdemir University, Turkey*  
EYİLER, Esen; *Akdeniz University, Turkey*  
KULEAŞAN, Şükran; *Mehmet Akif University, Turkey*  
TABAN, Birce; *Ankara University, Turkey*  
TORUN, Mehmet; *Akdeniz University, Turkey*  
ÖZDEN, Özkan; *İstanbul University, Turkey*  
YILMAZ, Merve Sılanır; *Bitlis Eren University, Turkey*

**Yönetim Yeri**

**Adres / Address**

Büyükelçi Sokak No: 18/1 Kavaklıdere/Ankara Turkey

**Tel:** (+90) 0534 968 5994 • **Faks:** (+90) 312 317 8711

**E-posta / E-mail:** dergi@gidadernegi.org

**URL:** http://www.gidadernegi.org

**Yayın Türü:** Yaygın süreli ve hakemli

**Hazırlayan / Prepared**

Sim Ajans  
19. Sokak No: 47/1 Emek / Ankara  
Tel : (+90) 312 925 25 95  
e-mail: simajans@simajans.com

**Yayın Tarihi / Publication Date**

15 02 2023

**Danışma Kurulu / Advisory Board**

Akköse, Ahmet; *Atatürk University, Turkey*  
Ank, Gökşen G.; *Balıkesir University, Turkey*  
Atalar, İlyas; *Bolu Abant İzzet Baysal University, Turkey*  
Baysal, A. Handan; *İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Turkey*  
Bezirtzoglou, Eugenia; *Democritus University of Thrace, Greece*  
Bozkur, Hamza; *Sakarya Uygulamalı Bilimler University, Turkey*  
Çilak, Gizem Ö.; *Hitit University, Turkey*  
Draughon, Ann Tennessee University, USA  
El Soda, Morsi University of Alexandria, Egypt  
Erbay, Zafer; *Adana Bilim ve Teknik University, Turkey*  
Evren, Mustafa; *Ondokuz Mayıs University, Turkey*  
Fogliano, Vincenzo University of Napoli Federico II, Italy  
Gerçekaslan, K. Emre; *Neşehir Hacı Bektaş Veli University, Turkey*  
Ghosh, Bikash C. National Dairy Research Institute, India  
Gollop, Natan The Volcani Center, ARO, Israel  
Griffiths, Mansel University of Guelph, Canada  
Güneşer, Onur; *Uşak University, Turkey*  
Güven, Esra Ç.; *İstanbul Teknik University, Turkey*  
Ho, Chi-Tang The State University of New Jersey, USA  
Hoşoğlu, Müge İ.; *Gebze Teknik University, Turkey*  
Hüner, İrem D.; *Trakya University, Turkey*  
Kahraman, Kevser; *Abdullah Gül University, Turkey*  
Karaca, Hakan; *Pamukkale University, Turkey*  
Koçan, Deniz; *Aksaray University, Turkey*  
Konuşkan, Dilşat B.; *Mustafa Kemal University, Turkey*  
Kuleaşan, Hakan; *Süleyman Demirel University, Turkey*  
Meral, Raciye; *Yüzüncü Yıl University, Turkey*  
Mete, Aylin A.; *Mersin University, Turkey*  
Morales, Francisco J. CSIC Instituto del Fr o, Spain  
Muhtaba, Mustafa G. Florida Gulf Coast University, USA  
Mutlu, Türkan K.; *Çukurova University, Turkey*  
Öztürk, Fatma; *Kâtip Çelebi University, Turkey*  
Paalme, Toomas Tallinn University of Technology, Estonia  
Parlar, Harun Technical University of Munich, Germany  
Raspor, Peter University of Primorska, Slovenia  
Rezessy-Szabo, Judit M. Corvinus University of Budapest, Hungary  
Sarı, Ferda; *Cumhuriyet University, Turkey*  
Şengün, İlkin Y.; *Ege University, Turkey*  
Soyer, Yeşim; *Orta Doğu Teknik University, Turkey*  
Toğay, Sine Ö.; *Bursa Uludağ University, Turkey*  
Toker, Ömer S.; *Yıldız Teknik University, Turkey*  
Velioglu, Murat; *Namık Kemal University, Turkey*  
Yemiş, Gökçe P.; *Sakarya University, Turkey*  
Yolaçaner, Elif; *Hacettepe University, Turkey*  
Yorulmaz, Aslı; *Adnan Menderes University, Turkey*  
Zorba, Murat; *Çanakkale Onsekiz Mart University, Turkey*

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

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

# İçindekiler / Content

## Araştırmalar (İngilizce) / Researches (English)

- Öztürk, S., Bağder Elmacı, S., Özçelik, F. *Effect of fermentation processes on phenolic content and antioxidant activity during production of black carrot vinegar / Kara havuç sirkesi üretimi sırasında fermantasyon işlemlerinin fenolik içeriği ve antioksidan aktivitesi üzerine etkisi* ..... **25-37**
- Yıldız, S., Karakuş, E., Öztürk-Muti, S. *D-optimal mixture design approach in the production of cookies enriched with dietary fiber sources such as lentil flour, banana fruit and banana peel powder / Mercimek unu, muz meyve ve muz kabuk tozu gibi diyet lifi kaynakları ile zenginleştirilen bisküvi üretiminde D-optimal karışım tasarımı yaklaşımı* ..... **94-106**
- Geçer, E.N., Anlı, R.E. *The effect of different storage conditions on anthocyanin profile of merlot red wines / Farklı depolama koşullarının merlot şaraplarında antosiyanin profili üzerine etkisi* ..... **160-170**
- Yonar, D., Haman Bayarı, S. *Investigation of regular and hypoallergenic infant milk formulas by ATR-FTIR spectroscopy combined with multivariate analysis methods / Standart ve hipoalerjenik bebek sütü formüllerinin ATR-FTIR spektroskopisi ve çok değişkenli analiz yöntemleriyle incelenmesi* ..... **171-184**
- Çelik, S.K., Turan, E., Şimşek, A. *Some physicochemical and sensory properties of hazelnut beverages enriched with VIT-C source fruits and shelf life / VIT-C kaynaklı meyvelerle zenginleştirilmiş fındık içeceklerinin bazı fizikokimyasal ve duyuşal özellikleri ve raf ömrü* ..... **185-198**

## Araştırmalar (Türkçe) / Researches (Turkish)

- Urgu-Öztürk, M. *Paslanmaz çelik yüzeylerde süt protein konsantresi birikiminin ve su ile çalkalama, alkali ve enzimatik temizleme yöntemlerinin etkinliğinin FTIR-ATR ile değerlendirilmesi / Evaluation of fouling with milk protein concentrate on the stainless steel surfaces and the efficiencies of rinsing, alkaline and enzymatic cleaning methods by using FTIR-ATR as a tool* ..... **1-15**
- Ersoy, G., Arslan-Tontul, S., Erbaş, M. *Probiyotik A. clausii sporu içeren kek üretimi / Cake production with probiotic A. clausii spores* ..... **16-24**
- Kanca, N., Altınay, C., Albayrak-Delialioğlu, R. *Farklı oranlarda peyniraltı suyu ve süt bazlı fermente içeceklerin bazı özellikleri / Some properties of ubey and milk-based fermented beverages in different proportions* ..... **38-49**
- Yılmaz, H., Şahin, A.R. *Kafein molekülünün müsün proteini ile olan etkileşiminin floresan spektroskopisi tekniği ile araştırılması / Investigation of the interaction between caffeine molecule and musin protein by fluorescence spectroscopy technique* ... **50-60**
- Dündar-Kırt, B., Sağol, S., Ağçam, E., Akyıldız, A. *Farklı kurutma yöntemlerinin böğürtlen kalite özellikleri üzerine etkileri ve kuruma kinetiği / Effects of different drying methods on quality attributes of blackberry and drying kinetic* ..... **61-72**
- Akçay-Salık, R., Bitim, E., Köprüalan-Aydın, Ö., Selçuk, E., Altay, Ö., Kaymak-Ertekin, F. *Ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen zeytin yaprağı ekstraktının iyonik jelasyon yöntemi ile enkapsülasyonu ve kefir içeceğinde kullanılması / Encapsulation of olive leaf extract obtained by ultrasonic-assisted extraction method and use in kefir beverage* ..... **73-93**
- Akdeniz, V. *Ultrason uygulamasının yoğurt benzeri fermente süt ürününde farklı probiyotik Lactobacillus türlerinin canlılığı üzerine etkisi / Effect of ultrasound application on viability of different probiotic Lactobacillus species in yogurt-like fermented dairy product* ..... **107-117**
- Bayram, M., Topuz, S. *Madımaktan (Polygonum cognatum Meissn.) yanıt yüzey yöntemi kullanılarak fenolik bileşik ekstraksiyonunun optimizasyonu / Optimization of phenolic compound extraction using response surface method from madimak (Polygonum cognatum Meissn.)* ..... **118-129**
- Şişli, B., Çelebi-Uzkuç, N.M., Bayhan, A., Kırca-Toklucu, A. *Karalahna şaraplarının fenolik bileşenleri üzerine fermantasyon tekniği ve şişede depolamanın etkisi / Effect of fermentation technique and bottle storage on the phenolic components of Karalahna wines* ..... **130-143**
- Kutlu Kantar, N. *Derin ötektik çözücünün Rheum ribes köklerinden fenolik bileşik ekstraksiyonu üzerine etkisi / Impact of deep eutectic solvent on phenolic compound extraction from Rheum ribes roots* ..... **199-208**
- Örü, F., Hendek Ertop, M. *Siyez kepeği ekşi hamur optimizasyonunun ekmeğin kalite ve biyoaktif nitelikleri üzerindeki etkileri / Effect of the optimization of einkorn bran sourdough on the quality and bioactive properties of the bread* ..... **209-226**
- Çomak Göçer, E. M., Koptagel, E. *Farklı yağlı tohumlardan elde edilen bitkisel sütlerden üretilen kefirlerin bazı fiziksel ve duyuşal özellikleri / Some physical and sensory properties of kefir made from vegetable milk from different nuts* ..... **227-241**

## Derlemeler (Türkçe) / Reviews (Turkish)

- Nurko, E., Nakilcioğlu, E. *Gıda endüstrisinde simbiyotikler, postbiyotikler ve paraprobiyotikler / Symbiotics, postbiotics, and paraprobiotics in the food industry* ..... **144-159**



**PASLANMAZ ÇELİK YÜZEYLERDE SÜT PROTEİN KONSANTRESİ  
BİRİKİMİNİN VE SU İLE ÇALKALAMA, ALKALİ VE ENZİMATİK  
TEMİZLEME YÖNTEMLERİNİN ETKİNLİĞİNİN FTIR-ATR İLE  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Müge Urgu Öztürk\***

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

Geliş / *Received*: 04.10.2022; Kabul / *Accepted*: 13.12.2022; Online baskı / *Published online*: 16.12.2022

Urgu-Öztürk, M. (2023). Paslanmaz çelik yüzeylerde süt protein konsantresi birikiminin ve su ile çalkalama, alkali ve enzimatik temizleme yöntemlerinin etkinliğinin FTIR-ATR ile değerlendirilmesi. *GIDA* (2023) 48 (1) 1-15 doi: 10.15237/gida.GD22093

Urgu-Öztürk, M. (2023). *Evaluation of fouling with milk protein concentrate on the stainless steel surfaces and the efficiencies of rinsing, alkaline and enzymatic cleaning methods by using FTIR-ATR as a tool. GIDA (2023) 48 (1) 1-15 doi: 10.15237/gida.GD22093*

**ÖZ**

Birikim, gıda güvenliği ve ürün kalitesi açısından ısıtma işleminin gerekli olduğu süt endüstrisinde önemli bir sorundur. Özellikle paslanmaz çelik yüzeylerde uygulanan ısıtma işlemleri, hızla birikimler oluşturarak hem ürünlerin kalitesini değiştirebilmekte hem de gıda güvenliği açısından büyük riskler oluşturabilmektedir. Bu çalışmada, farklı sıcaklık uygulamalarının ve kalsiyum ilavesinin süt protein konsantresinin paslanmaz çelik yüzeylerdeki birikimine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, laboratuvar tipi birikim modeli 3 farklı birikim sıcaklığında (65, 90 ve 110 °C) uygulanmıştır. Ayrıca, meydana gelen kalıntının uzaklaştırılabilmesi amacıyla uygulanabilecek su ile çalkalama, alkali ve enzimatik temizleme yöntemlerinin etkinlikleri değerlendirilmiştir. Kalsiyum ilavesi ve uygulanan sıcaklığın artmasıyla yüzeyde meydana gelen birikim miktarının arttığı ve temizleme etkinliklerinin azaldığı belirlenmiştir. Temizleme etkinliği en düşük su ile çalkalama yönteminde, en yüksek ise enzimatik temizleme yönteminde belirlenmiştir. Çok değişkenli analiz teknikleri ile kombine edilerek kullanılan FTIR-ATR tekniğinin, süt protein konsantresi birikiminin veya kalıntısının olduğu paslanmaz çelik yüzeylere ait sınıflar arası ayrımlarında kullanım potansiyelinin olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** süt protein konsantresi, FTIR, paslanmaz çelik yüzey, temizleme etkinliği

**EVALUATION OF FOULING WITH MILK PROTEIN CONCENTRATE ON  
THE STAINLESS STEEL SURFACES AND THE EFFICIENCIES OF RINSING,  
ALKALINE AND ENZYMATIC CLEANING METHODS BY USING FTIR-ATR  
AS A TOOL**

**ABSTRACT**

Fouling is an important problem in the dairy industry where heat treatment is necessary for food safety and quality. The fouling may affect product quality and food safety. This study aimed to investigate the effects of different fouling temperatures and calcium addition on the fouling amount of milk protein concentrate on stainless steel surfaces. For these purposes, laboratory-scale fouling

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉: muge.urgu@ege.edu.tr

☎: (+90) 232 311 3009

☎: (+90) 232 311 3048

Müge Urgu Öztürk; ORCID no: 0000-0002-6345-9252

model was applied at three different temperatures (~65, 90, 110°C) on the surfaces. Then, the efficiencies of rinsing with water, alkaline and enzymatic cleaning methods were evaluated. The addition of calcium and an increase in the applied temperature increased the fouling amount while decreasing cleaning efficiency. The lowest cleaning efficiency was determined in the rinsing method, whereas the highest was observed using enzymatic cleaning method. The study showed the potential of applying FTIR-ATR combined with multivariate analysis to discriminate the classes of fouled with milk protein concentrate or cleaned surfaces.

**Keywords:** milk protein concentrate, FTIR, stainless steel surface, cleaning efficiency

## GİRİŞ

Gıdaların işlenmesi sırasında, gıdayla temas eden yüzeylerde (özellikle ısıtma yüzeylerinde) bileşenlerin zaman içerisinde istenmeyen birikim ve kalıntılar oluşturması, sektör için önemli bir sorundur (Barish ve Goddard, 2013; Fryer vd., 2013; Wilson, 2018). Gıda güvenliği ve ürün kalitesi açısından ısıtma işleminin gerekli olduğu süt endüstrisi ise bu birikimlerden en çok etkilenen alandır (Blanpain-Avet vd., 2012; Wallhäußer vd., 2012; Zouaghi vd., 2019). Süt endüstrisinde, birikimden kaynaklanan problemler, süt ile temas eden çeşitli yüzeylerde (başta ısı değiştiriciler olmak üzere borular, makinalar, membran porları, konveyörler vb.) oluşmaktadır (Chang vd., 2002; Wilson, 2018). Özellikle paslanmaz çelik yüzeylerde uygulanan ısıtma işlemleri ile birlikte oluşan süt kaynaklı birikimler, zaman içerisinde uzaklaştırılması güç kalıntılara neden olarak ısı transfer etkinliğinin azalması, enerji tüketiminin artması, basınç dalgalanmaları, hatta bazı durumlarda ısı değiştiricilerde tıkanmalar gibi proses etkinliğini olumsuz yönde etkileyen birçok soruna yol açmaktadır (Bansal ve Chen, 2006, Hagsten vd., 2016, Zouaghi vd., 2018). Ayrıca, ısıtma işleminin gerçekleştiği yüzeylerdeki bu birikimler, gereksiz ısıtma işlemi uygulamasına sebep olarak ürün kalitesinde azalmalara veya tam tersi şekilde yetersiz ısıtma işlemi uygulamasına yol açarak mikrobiyal gelişime, kontaminasyonlara ve ileri düzeylerde biyofilm oluşumlarına neden olabilmektedir (Blanpain-Avet vd., 2012; Barish ve Goddard, 2013; Boxler vd., 2013; Hagsten vd., 2016; Zouaghi vd., 2019). Birikimin yanı sıra bu birikimlerin uzaklaştırılması ve temizlenmesi de önemli bir noktadır. Özellikle süt sektöründe, süt kaynaklı bileşenlerin yüzeylerde kuvvetli ve hızlı bir şekilde tutunan birikimler oluşturması, temizleme işleminin sıklığının artmasına (günde birden fazla) neden olmaktadır (Bansal ve Chen, 2006; Blanpain-Avet vd., 2012). Bu sık temizleme

işlemi ise üretimlerin durmasına, fazla miktarlarda su, kimyasal dezenfektan ve enerji kullanımına ve tabii ki bunların sonucunda zaman kaybı, işletme maliyetleri ve çevresel kayıpların artması gibi çeşitli sorunların oluşmasına sebep olmaktadır (Barish ve Goddard, 2013; Boxler vd., 2013; Jimenez vd., 2013; Petit vd., 2013; Boxler vd., 2014; Yang vd., 2018).

Süt kaynaklı birikimlerin oluşumunda, özellikle süt proteinleri (başta peynir altı suyu proteinleri, özellikle  $\beta$ -laktoglobulin, olmak üzere) ve minerallerin (özellikle kalsiyum) başrol oynadığı bilinmektedir (Visser ve Jeurink, 1997; Jimenez vd., 2013; Khaldi vd., 2015; Khaldi vd., 2018). Bu bileşenler ısıtmanın etkisi ile stabilizasyonlarını kaybetmektedir. Özellikle peynir altı suyu proteinlerinde ısı uygulaması ile sekonder ve tersiyer yapılarında çözülme ve globuler yapıda açılmalar meydana gelmektedir. Açılan proteinler, reaktif sülfidril gruplarını (-SH) açığa çıkartarak aktif ara ürün oluşturmakta ve diğer proteinlerle (kazein misellerindeki k-kazein, diğer  $\beta$ -laktoglobulin molekülleri ve peynir altı suyu proteinleri ile) disülfid ara değişim reaksiyonu ile agregatları oluşturarak veya ısı transfer yüzeyi ile interaksiyona girerek birikimlere neden olabilmektedir (Lalande ve Tissier, 1985; Lalande vd., 1989; Bansal ve Chen, 2006; Petit vd., 2011; Truong vd., 2017; Khaldi vd., 2018). Mineraller (özellikle kalsiyum) ise sıcaklıkla birlikte çözünürlüklerinin azalmasıyla protein molekülleri arasındaki interaksiyonları etkileyerek birikimi tetiklemektedir. Dolayısıyla, süt kaynaklı bileşenlerin yüzeylerde meydana getirdiği birikimler kompleks bir mekanizmadır ve bu mekanizmanın kontrolü birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir. Bu faktörler, bileşen özellikleri (protein içeriği ve konsantrasyonu, kalsiyum içeriği, pH, iyonik kuvvet, gaz dağılımı vb.), ısıtma koşulları (ön ısıtma, sıcaklık profili,

sıcak-soğuk akışkan arasındaki sıcaklık farklılıkları), ısı değiştirici yüzey özellikleri (serbest enerji, polarite, materyalin tipi ve dizaynı) olarak sınıflandırılabilir (Santos vd., 2006; Petit vd., 2011; Jimenez vd., 2013). Süt kaynaklı birikimler için ise en temel iki faktörün ürün bileşimi (başta protein ve kalsiyum içeriği) ve uygulanan sıcaklıklar olduğu vurgulanmıştır (Blanpain-Avet vd., 2012; Hagsten vd., 2016; Khaldi vd., 2018). Bu nedenle, birikimin, bileşen ve uygulanacak olan ısı işlemlerle direkt olarak bağlantılı bir şekilde oluştuğu söylenebilmektedir (Lalande vd., 1989; Visser ve Jeurnink, 1997; Bansal ve Chen, 2006). Ancak, şu ana kadar yapılan çalışmalarda daha çok peynir altı suyu proteinlerinin birikim mekanizmaları üzerine yoğunlaşmış ve bu birikimin karakterizasyonunda mikroskopik teknikler, yüzey pürüzlülüğü, yüzey serbest enerjisi, basınç düşüşü ve ısıl iletkenliğin ölçümleri gibi teknikler kullanılmıştır (Boxler vd., 2014; Zouaghi vd., 2018; Khaldi vd., 2018; Magens vd., 2019). Bu çalışmada, süt protein konsantrisi birikim modeli olarak kullanılması ve farklı sıcaklık ve kalsiyum ilavesinin birikim üzerine etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, oluşan birikimlerin uzaklaştırılması için su ile çalkalama, alkali ve enzimatik temizleme ajanlarının etkinlikleri incelenmiştir. Bu amaçlarla, hızlı, basit ve güvenilir yöntemlerden olan titreşimsel spektrofotometrelerden biri olan ATR-FTIR'ın, süt sistemlerinde üretimler aksamadan, hızlı bir şekilde birikim ve temizliğin karakterizasyonunun sağlanması üzerine kullanım olanakları değerlendirilmiştir.

### MATERYAL VE YÖNTEM

#### Materyal

Çalışmada birikimlerin oluşturulması amacıyla süt protein konsantrisi (Enka Süt A.Ş., Türkiye) kullanılmıştır. Süt protein konsantrisinin kurumadde, protein ve yağ değerleri sırasıyla %95.75±0.27, %71.35±0.34 ve %0.50±0.01'dir. Kurumadde, protein ve yağ değerleri sırasıyla gravimetrik (IDF, 1982), Kjeldahl (AOAC, 2012) ve Gerber (IDF, 1981) yöntemlerine göre belirlenmiştir. Ayrıca, kalsiyumun birikimdeki rolünü değerlendirebilmek adına CaCl<sub>2</sub> (Sigma Aldrich, İspanya) kullanılmıştır. Birikimin oluşturulabilmesi için gıdayla temas eden

yüzeylerde (özellikle ısı değiştiricilerde) yaygın olarak kullanılan materyallerden biri olan paslanmaz çelik 316 (SS316) kullanılmıştır. Birikimin temizlenmesi için ticari olarak formüle edilmiş alkali (Brio Complex; iTram Higiene, İspanya) ve enzimatik (Savinase, Novozymes, Danimarka) temizleyici ajanlar kullanılmıştır. Alkali temizleyici sodyum hidroksit (~%5 v/v NaOH), enzimatik temizleyici ise proteaz enzimini içermektedir. Denemeler öncesinde, paslanmaz çelik 4 cm x 4 cm boyutlarında, 0.1 cm kalınlığında kesilerek kare kuponlar halinde hazırlanmıştır.

#### Birikim çözeltisinin hazırlanması

Birikim çözeltisi kurumadde %5 yağsız süt protein konsantrisi olacak şekilde destile su ile hazırlanmıştır. Bu amaçla, süt protein konsantrisi manyetik karıştırıcı ile tamamen çözününceye kadar (35 °C, 600 rpm, 30 dk) karıştırılmıştır. Kalsiyumun birikim miktarına etkilerini değerlendirmek amacıyla, hazırlanan karışıma 100 ppm oranında kalsiyum ilave edilmiştir. Çalışmada kullanılan bu oranlar, yağsız sütün bileşimi (özellikle protein oranı) referans alınarak seçilmiş ve tüm denemelerde sabit tutulmuştur.

#### Paslanmaz çelik yüzeylerde birikimlerin oluşturulması

##### Birikim yöntemi

Birikimin yüzeylerde oluşturulması için, Guerrero-Navarro vd. (2019) tarafından tasarlanan laboratuvar tipi birikim modeli kullanılmıştır. Araştırmacılar, açık kurutma koşullarında oluşturulan birikim modelinin daha kısa bir süre içerisinde yüksek miktarlarda birikime yol açtığını belirtmiştir (Guerrero-Navarro vd., 2019). Bu nedenle, çalışma kapsamında bu açık kurutma koşullarında laboratuvar tipi birikim modelinin uygulanmasına karar verilmiştir. Ancak, yapılan ön denemeler sonucunda uygulanan koşullarda bazı modifikasyonlar yapılmıştır.

##### Birikim sıcaklıkları

Çalışmada oluşturulacak birikimler, üç farklı yüzey sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. İlk sıcaklık olarak, peynir altı suyu proteinlerinin denaturasyonunun henüz gerçekleşmediği, diğer bileşenlerde de

önemsiz düzeyde değişimlerin olacağı düşünülen bir sıcaklık (65 °C) seçilmiştir. Diğer iki sıcaklıkta ise hedef, hem A tipi - 100 °C altında ve peynir altı suyu proteini denatürasyonunun yüksek olduğu birikim modelinin hem B tipi - 100 °C üzerinde ve daha çok kalsiyumun etkin olabileceği birikim modelinin oluşturulmasıdır (Lalande vd., 1985; Foster vd., 1989; Visser ve Jeurink, 1997). Bu amaçla, A tipi birikimi sağlayabilmek için paslanmaz çelik kupon yüzeyi 90 °C'ye, B tipi birikim için ise 110 °C'ye getirilerek birikimler oluşturulmuştur.

### Birikimin oluşturulması

Birikim oluşumu öncesinde, paslanmaz çelik kuponlar temizlenmiş ve dezenfekte edilmiştir (Anonymus, 2015). Bu amaçla, kuponlar alkali deterjanla en az 60 dk yıkanarak saf su ve etanolden geçilmiş, ardından otoklavda (15 dk, 121 °C) sterilize edilmiştir.

Birikim işlemi öncesinde hazırlanan kuponlar ilk olarak etüvde hedeflenen sıcaklığa (65, 90 veya 110°C) gelebilmesi için yaklaşık 20 dk bekletilmiştir. Ardından hazırlanan birikim çözeltisi 0.4 ml eklenerek 45 dk boyunca kupon yüzeyinde kuruması beklenmiştir. Belirtilen birikim miktarı ve süresine yapılan ön denemeler sonucunda karar verilmiştir. Bu kuruma sürecinin ardından, tekrar 0.4 ml çözelti eklenerek 45 dk daha yüzeyde tutunması sağlanmıştır. Bu kuruma süreci, aynı koşullarda 5 döngü halinde gerçekleştirilmiştir. Ardından, kuponlar yüzeyde tutunmayan bileşenlerin uzaklaştırılabilmesi için 50 °C'de, 30 ml deionize su içeren kaptan 1 dk boyunca vorteks ile çalkalanmıştır. Daha sonra, tekrar beş birikim döngüsü uygulanarak birikim süreci tamamlanmıştır. Birikim işlemi sonunda, yüzeydeki fazla suyun uzaklaştırılması için kuponlar 50 °C'de 2 saat boyunca etüvde bekletilmiştir.

### Birikimin temizlenmesi

Temizleme etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla, birikim işlemi sonrasında yüzeyler su ile çalkalama, alkali temizleme veya enzimatik temizleme işlemlerine tabii tutulmuştur. Su ile çalkalama işlemi, sadece su ile yüzeyin çalkalanması, böylelikle kalıntıların su ile nederecede uzaklaştırılabildiğini görebilmek için

gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada, kuponlar birikim sonrasında 30 ml, 20-25 °C'de deionize su ile 10 dk boyunca çalkalanmıştır. Çalışmada kullanılan temizleme prosedürleri alkali ve enzimatik temizleyicilerin ürün kataloglarında yer alan bilgilere göre uygulanmıştır. Alkali temizleme işlemi için kuponlar birikim sonrasında ilk olarak 20-25 °C'de deionize su ile 10 dk, ardından 70 °C'de 45 dk boyunca ticari alkali temizleme ajanı ile, en son tekrar deionize su ile 10 dk çalkalanarak temizlenmiştir. Enzimatik temizleme işlemi için ise 50 °C'de 30 dk boyunca ticari enzimatik temizleme ajanı uygulanmıştır.

Temizleme işlemi sonrası kuponlar 50 °C'de 2 saat boyunca etüvde bekletilmiştir. Temizleme etkinliği aşağıda verilen eşitlik ile hesaplanmıştır.

$$\text{Temizleme etkinliği} = \frac{\text{Birikim sonrası kupon ağırlığı veya bant alanı}}{\text{Temizleme sonrası kupon ağırlığı veya bant alanı}} \times 100$$

Kuponlara uygulanan tüm analizler 24 saat içerisinde tamamlanmıştır. Birikim ve temizleme işlemleri 3 tekrerrül olacak şekilde yürütülmüştür.

### Yöntem

#### Birikim ağırlığı

Kuponların birikim öncesi ve sonrasında ağırlıkları tartılarak birikim miktarları mg/cm<sup>2</sup> cinsinden hesaplanmıştır. Ayrıca, su ile çalkalama, alkali veya enzimatik temizleme işlemleri sonrasında da kalıntı miktarları belirlenerek temizleme işleminin etkinliği değerlendirilmiştir.

#### FTIR analizi

Paslanmaz çelik kuponların spektralleri oda sıcaklığında (25±1 °C) FTIR cihazı (Perkin-Elmer Inc., Norwalk, CT, ABD) kullanılarak elde edilmiştir. Bu amaçla, yeni (birikim uygulanmamış), farklı koşullarda birikimlerin gerçekleştirildiği, birikim sonrası su ile çalkalanan, alkali veya enzimatik temizleyici ile temizlenen kuponların yüzeyleri cihazın kristali üzerine konularak incelenmiştir. Her bir örnek grubu için 4 tekrarlı okuma ile 4000-650 cm<sup>-1</sup> dalga boyunda, 4 cm<sup>-1</sup> çözünürlükte, ortama 32 tarama alınarak spektrum elde edilmiştir. Örnek ölçümlerinden önce boş yüzeyden de ölçüm alınmıştır.

### İstatistiksel ve çok değişkenli veri analizleri

Birikim miktarları ve temizleme etkinliğinin istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS paket programı (versiyon 28.0, IBM, ABD) kullanılmıştır. Örneklere ait ham spektraller Piroutte© çok değişkenli analiz programı (versiyon 3.11, InfoMetrix, Inc., Woodville, WA) kullanılarak değerlendirilmiştir. Toplanan spektra verileri Yumuşak Bağımsız Sınıf Analizleri Modellemesi (SIMCA) ile analiz edilerek örnekler arasındaki sınıflandırmalar ortaya koyulmuştur. Bu amaçla, sınıflandırma öncesinde veriler normleştirme ve 2. türev Savitzky-Golay 15-nokta polinom filtre kullanılarak işlenmiştir. Temizleme işlemi etkinliğinin değerlendirilmesi için belirlenen spektral bandların alanı ise Grams/AI programı (versiyon 8, ThermoFisher Scientific Inc., Smiths Detection) ile tespit edilmiştir.

### SONUÇ VE TARTIŞMA

#### Kalsiyum ilavesinin ve birikim sıcaklıklarının süt protein konsantrisi birikimine etkisi

Çalışmada ilk aşama olarak, kalsiyum ilavesinin ve farklı birikim sıcaklıklarının paslanmaz çelik yüzeylerde süt protein konsantrisinin birikimine etkilerinin değerlendirilmesi sağlanmıştır. Bu

amaçla, başlangıçta (birikim işlemi öncesi) ve birikim işlemi sonrası kuponların ağırlıkları belirlenmiş, aradaki fark bulunarak birikim miktarları hesaplanmıştır. Bu hesaplama yöntemi, literatürde birçok araştırmacı tarafından paslanmaz çelik yüzeylerde birikimin ve temizleme işlemlerinin etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla önerilmiştir (Barish ve Goddard, 2014; Liu vd., 2017). Süt protein konsantrisinin birikim sonrası (SPK-1) sonrası yüzeylerde tutanan kalıntı miktarları Çizelge 1'de verilmiştir. Çizelge 1 incelendiğinde, süt protein konsantrisinin belirtilen birikim yöntemine göre (10 kurutma döngüsü sonucunda) paslanmaz çelik yüzeylerde ortalama  $12.55 \pm 0.02$  mg/cm<sup>2</sup> ile  $13.39 \pm 0.03$  mg/cm<sup>2</sup> aralığında birikim oluşturduğu görülmüştür. Bu birikim miktarları literatür ile uyumludur. Literatürde, kullanılan birikim çözeltilerine bağlı olarak yüzeyde meydana gelen birikimin miktarının değiştiği görülmektedir. Pastörize süt birikimlerinin incelendiği bir çalışmada, 19.21 mg/cm<sup>2</sup> birikim elde edilirken (Liu vd., 2017), peynir altı suyu proteini ile hazırlanan çözeltilerden elde edilen birikimlerin yaklaşık 30.8 mg/cm<sup>2</sup> olduğu tespit edilmiştir (Zouaghi vd., 2018).

Çizelge 1. Birikim işlemi sonrası, su ile çalkalama, alkali ve enzimatik temizleme işlemleri sonrası paslanmaz çelik yüzeye tutunan kalıntı miktarları (mg/cm<sup>2</sup>)

Table 1. Fouling amounts attached to the stainless steel surface after fouling, rinsing with water, alkaline and enzymatic cleaning processes

	65 °C		90 °C		110 °C	
	Kalsiyum ilavesi olmadan <i>Without calcium</i>	Kalsiyum ilavesi ile <i>With calcium</i>	Kalsiyum ilavesi olmadan <i>Without calcium</i>	Kalsiyum ilavesi ile <i>With calcium</i>	Kalsiyum ilavesi olmadan <i>Without calcium</i>	Kalsiyum ilavesi ile <i>With calcium</i>
SPK-1 MPC-1	12.55±0.02 <sup>a,X</sup>	12.99±0.01 <sup>b,X</sup>	13.02±0.01 <sup>a,Y</sup>	13.36±0.01 <sup>b,Y</sup>	13.05±0.02 <sup>a,Z</sup>	13.39±0.03 <sup>b,Z</sup>
SPK-2 MPC-2	9.82±0.03 <sup>a,X</sup>	10.19±0.02 <sup>b,X</sup>	10.06±0.02 <sup>a,Y</sup>	10.47±0.03 <sup>b,Y</sup>	10.09±0.01 <sup>a,Z</sup>	10.60±0.02 <sup>b,Z</sup>
SPK-3 MPC-3	4.12±0.01 <sup>a,X</sup>	4.33±0.01 <sup>b,X</sup>	4.28±0.02 <sup>a,Y</sup>	4.46±0.01 <sup>b,Y</sup>	4.40±0.02 <sup>a,Z</sup>	4.64±0.03 <sup>b,Z</sup>
SPK-4 MPC-4	2.56±0.01 <sup>a,X</sup>	2.88±0.01 <sup>b,X</sup>	2.90±0.01 <sup>a,Y</sup>	3.00±0.02 <sup>b,Y</sup>	3.78±0.01 <sup>a,Z</sup>	3.99±0.02 <sup>b,Z</sup>

SPK-1: Süt protein konsantrisi ile birikim sonrası paslanmaz çelik kupon, SPK-2: Su ile çalkalama sonrası paslanmaz çelik kupon, SPK-3: Alkali temizleme uygulanmış paslanmaz çelik kupon, SPK-4: Enzimatik temizleme uygulanmış paslanmaz çelik kupon. <sup>a-b</sup> Farklı harfler aynı birikim sıcaklığı için kalsiyum ilavesi olmadan ve kalsiyum ilavesi ile hazırlanan kuponlar arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir ( $P < 0.05$ ). <sup>X-Y</sup> Farklı harfler kalsiyum ilaveli veya ilave edilmeden farklı birikim sıcaklıklarında hazırlanan kuponlar arasındaki istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir ( $P < 0.05$ ).

MPC-1: *Stainless steel coupon after fouling with milk protein concentrate*, MPC-2: *Stainless steel coupon after rinsing with water*, MPC-3: *Stainless steel coupon after alkaline cleaning*, MPC-4: *Stainless steel coupon after enzymatic cleaning*. <sup>a-b</sup> Different letters indicated a statistically significant difference between coupons fouled with and without calcium addition for the same fouling temperature ( $P < 0.05$ ). <sup>X-Y</sup> Different letters indicated a statistically significant difference between coupons prepared at different fouling temperatures for the same solution with or without calcium addition ( $P < 0.05$ ).



Çizelge 1 incelendiğinde, süt protein konsantrisine ilave edilen kalsiyumun birikim miktarlarını önemli ölçüde arttırdığı tespit edilmiştir ( $P < 0.05$ ). Benzer şekilde, Khaldi vd. (2015), peynir altı suyu protein çözeltisine farklı konsantrasyonlarda (70 to 87.5 mg L<sup>-1</sup>) kalsiyum ilavesinin plakalı ısı değiştirici yüzeylerindeki birikimlerine etkisini değerlendirmiş ve ilave edilen kalsiyum oranının artmasıyla birikim miktarının büyük ölçüde arttığını vurgulamıştır. Jimenez vd. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada da, peynir altı suyu protein konsantratına kalsiyum ilavesinin paslanmaz çelik yüzeylerde oluşturduğu birikim miktarını arttırdığını tespit etmiştir. Araştırmacılar, kalsiyum ilave edilmeden oluşan birikimlerin ince, pürüzsüz ve homojen olduğunu, tersi durumda ise yüzeyde kalın ve sıkı bir kalıntı meydana geldiğini vurgulamıştır.

Birikimin bileşimi ve görünüşünü etkileyen bir diğer etken ise uygulanan ısıl işlem sıcaklığıdır. Literatürde, süt kaynaklı birikimler uygulanan sıcaklığa göre A ve B tipi olmak üzere iki ana kategoriye ayrılmıştır (Lalande vd., 1985; Foster vd., 1989; Visser ve Jeurink, 1997). A tipi birikimin, pastörizasyon koşullarında (100 °C altında, genellikle 75 °C'de başlar), daha çok peynir altı suyu proteinlerinden oluştuğu, beyaz, ince, yumuşak ve süngerimsi yapıda olduğu belirtilmiştir (Burton, 1968; Nielsen vd., 1995; Petit vd., 2013). B tipi birikim ise, sterilizasyon koşullarında (110 °C üzerinde), çoğunlukla minerallerden (kalsiyum fosfat ve sitrat gibi) ve düşük oranlarda proteinden (%15-20) oluşan gri ve sert yapıdadır (Changani vd., 1997; Visser ve Jeurink, 1997; Hagsten vd., 2016). Bu nedenle, çalışma kapsamında, süt protein konsantrisi ile hazırlanan birikimlerin 65, 90 ve 110 °C olmak üzere farklı yüzey sıcaklıkları (hem A tipi hem B tipine örnek sıcaklık) ile oluşturulması sağlanmıştır. Süt protein konsantrisinin (SPK-1) hem kalsiyum ilave edildiği hem de ilave edilmediği durumlarda uygulama sıcaklığındaki artış ile paslanmaz çelik yüzeylerdeki birikiminin arttığı tespit edilmiştir (Çizelge 1).

Süt protein konsantrisi ile farklı sıcaklıklarda birikim sağlanmış paslanmaz çelik yüzeylerin

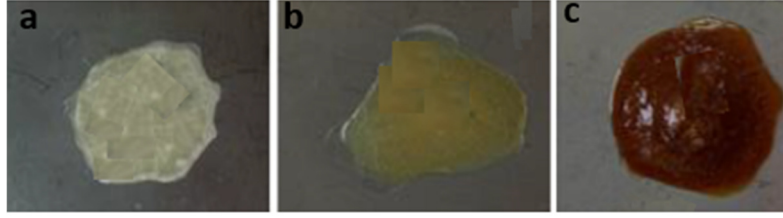
(SPK-1'e ait görüntüler) bazı temsili görüntüleri Şekil 1'de verilmiştir. Genel olarak, süt protein konsantrisinin güçlü bir şekilde paslanmaz çelik yüzeye tutunduğu, uygulanan birikim sıcaklığına bağlı olarak yüzeyde açık kahverengi ile koyu kahverengi arasında değişen bir birikim meydana getirdiği belirlenmiştir. Çalışmada özellikle, birikim işlemi süresince uygulanan sıcaklık arttığında daha kahverengi bir birikimin oluştuğu dikkati çekmektedir (Şekil 1). Birikimdeki bu kahverengiliğin artışı, özellikle 110 °C sıcaklık uygulamasında daha bariz görülmektedir. Bu sonuç, daha önce gözlemlenen endüstriyel koşullarda tespit edilmiş süt birikimleri ile benzerlik göstermektedir (Barish ve Goddard, 2013). Paslanmaz çelik yüzeyde meydana gelen bu rengin özellikle süt proteinleri ve şekerleri (laktoz) arasında gerçekleşen Maillard reaksiyonuyla ilgili olması muhtemeldir (Guerrero-Navarro vd., 2019). Bu durumda, uygulanan sıcaklığın artmasıyla hız kazanabilecek Maillard reaksiyonu, birikim çözeltisindeki bileşenlerin yüzeydeki tutunumunu teşvik edebilecektir. Yani, yüzeylerdeki yüksek termal yükün birikimi ve Maillard reaksiyonu hızının artması ile bileşenler yüzeye daha kuvvetli tutunma eğilimi oluşturarak, birikim kaynaklı meydana gelebilecek problemlerin artmasını tetikleyebilecektir (Barish ve Goddard, 2013; Guerrero-Navarro vd., 2019).

#### **Temizleme etkinliğinin kalıntı miktarı ve FTIR analizi ile değerlendirilmesi**

Paslanmaz çelik yüzeylerdeki birikim sonrası kalıntıların uzaklaştırılması için su ile çalkalama (SPK-2), alkali temizleme (SPK-3) ve enzimatik temizleme (SPK-4) işlemleri uygulanmıştır. Bu amaçla, birikim işlemi öncesi ve temizleme işlemi sonrasında kuponların ağırlıkları tespit edilmiş ve temizleme etkinliği hesaplanarak belirlenmiştir (Çizelge 1, Şekil 2). Farklı sıcaklık uygulaması ve kalsiyum ilavesi ile hazırlanan birikim çözeltilerinin temizleme işlemleri sonrasında tespit edilen kalıntı miktarlarının, SPK-2, SPK-3 ve SPK-4 için sırasıyla ortalama 9.82-10.60 mg/cm<sup>2</sup>, 4.12-4.64 mg/cm<sup>2</sup> ve 2.56-3.99 mg/cm<sup>2</sup> aralığında değişim gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durumda, en yüksek kalıntı miktarlarının su ile çalkalama işlemi sonrası, en düşük kalıntı miktarlarının ise enzimatik temizleme işlemi ile

elde edildiği tespit edilmiştir. Her bir temizleme işlemi ayrı ayrı incelendiğinde, birikim işlemi süresince uygulanan sıcaklığın artışının yüzeylerde temizleme sonrası kalan kalıntı miktarlarının artmasına yol açtığı belirlenmiştir. Diğer bir deyişle, uygulanan birikim sıcaklığının azalmasıyla yüzeylerdeki birikimlerin daha çok uzaklaştırılabileceği tespit edilmiştir. Birikim çözeltisine ilave edilen kalsiyumun da temizleme sonrası meydana gelen kalıntı miktarına etki ettiği belirlenmiştir. Her bir birikim sıcaklığında, birikim çözeltisine ilave edilen kalsiyumun yüzeyde tutunan kalıntı miktarının artmasına yol açtığı saptanmıştır. Bu sonuçlar, birikim sonrası elde

edilen birikim miktarları ile benzerlik göstermektedir. Dolayısıyla, birikimin artmasını teşvik eden uygulama sıcaklığının artması ve kalsiyum ilavesi, temizleme işlemleri sonrası yüzeyde kalan kalıntı miktarının artmasını da teşvik edebilmektedir. Benzer şekilde, Khaldi vd. (2015) tarafından birikim işlem parametrelerinin ve birikim çözeltisindeki kalsiyum miktarının peynir altı suyu proteinlerinin paslanmaz çelik yüzeylerde proteinlerin adhezyon kuvvetlerini ve kalıntının yapısal özelliklerini önemli ölçüde etkilediği, özellikle kalsiyum miktarındaki artış ile meydana gelen birikimlerin temizlenmesinin daha güç olduğu bildirilmiştir.

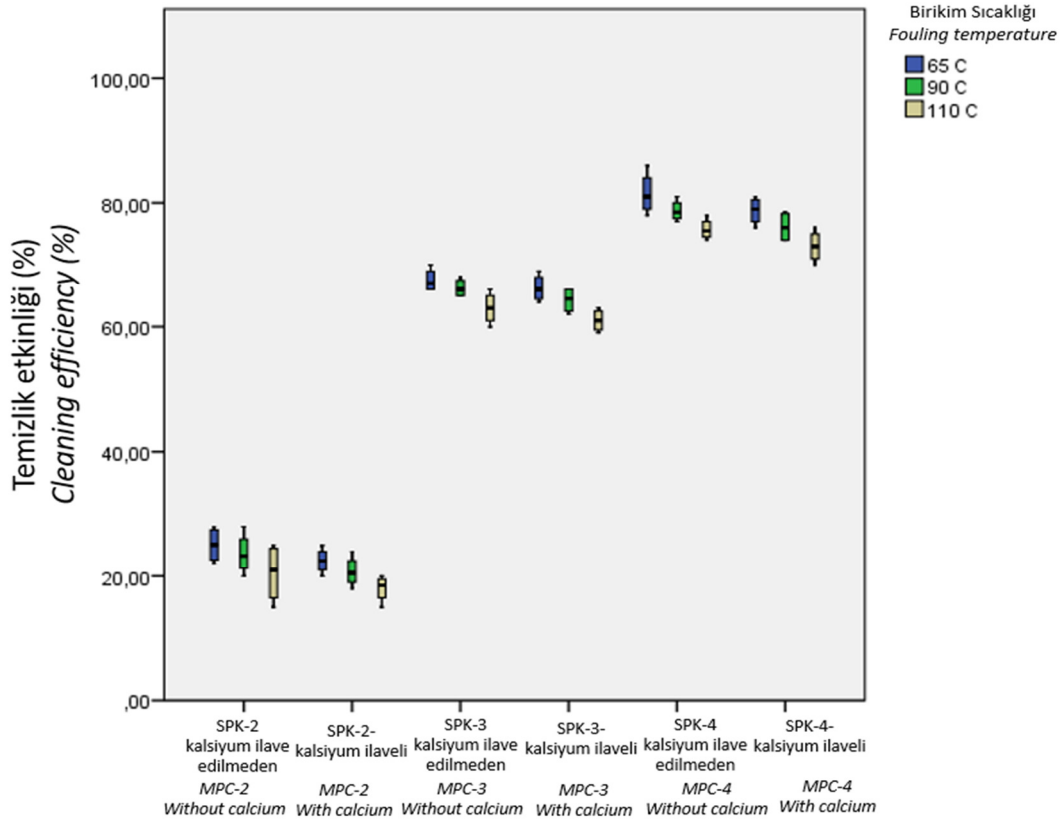


Şekil 1. Farklı birikim sıcaklıklarında süt protein konsantrisi birikimi sağlanan paslanmaz çelik yüzeylerden temsili görüntüler. a: 65 °C, b: 90 °C, c: 110 °C

*Figure 1. Representative images of stainless steel coupons fouled with milk protein concentrate at different temperatures. a: 65 °C, b: 90 °C, c: 110 °C*

Süt protein konsantrisi ile birikim sağlanan paslanmaz çelik kuponların su ile çalkalama, alkali ve enzimatik temizleyiciler ile temizleme işlemlerinin etkinliği Şekil 2'de gösterilmiştir. Şekil 2'deki sonuçlar, süt protein konsantrisi birikimini temizlemek için uygulanan su ile çalkalama işleminin etkinliğinin %18.00-25.08 aralığında değiştiğini göstermektedir. Alkali ve enzimatik temizleme işlemlerinin etkinliklerinin ise sırasıyla %61.00-66.25 ve %73.00-81.50 aralığında olduğu belirlenmiştir (Şekil 2). Bu durumda, süt protein konsantrisine kalsiyum ilave edildiği ve 110 °C sıcaklığın uygulandığı, ardından sadece su ile çalkalama işleminin uygulandığı yüzeylerde en yüksek kalıntıyla karşılaşıldığı belirlenmiştir. En yüksek temizleme işlemi etkinliği ise, birikimin kalsiyum ilave edilmeden ve 65 °C'de sağlandığı, ardından enzimatik temizleme işleminin uygulandığı yüzeyde tespit edilmiştir. Özellikle uygulanan birikim işlemi sıcaklıklarının ve temizleme işlemi yönteminin yüzeyde meydana gelen süt protein konsantrisi kalıntılarının uzaklaştırılmasında önemli etkiler meydana

getirdiği belirlenmiştir ( $P < 0.05$ ). Paslanmaz yüzey kuponlarda farklı temizleme ajanlarının süt birikimine etkisinin incelendiği bir çalışmada da, temizleme etkinliğinin benzer aralıklarda (%73.31–80.43) olduğu belirlenmiştir (Guerrero-Navarro vd., 2019). Bu verilerin sonucunda, süt protein konsantrisi birikimlerine uygulanan enzimatik temizleme işleminin işlem koşullara bağlı olarak %80'nin üzerinde temizleme etkinliğini sağlayabileceği belirlenmiştir. Enzimatik temizleme ile alkali temizleme yöntemine kıyasla daha yüksek temizleme etkinliğinin sağlanabilmesi kimyasal kullanımının azalması, temizleme için kullanılacak su miktarının, sürenin ve enerjinin azalması gibi avantajlar sağlayabileceği düşünülmektedir. Ancak, enzimatik temizleyicilerin ürün maliyetinin çok daha yüksek olması (Guerrero-Navarro vd., 2022), endüstriyel kullanımlarında maliyet kıyaslamalarının yapılması gerekliliğini de göstermektedir.



Şekil 2. Süt protein konsantresi birikimine su ile çalkalama, alkali ve enzimatik temizleme işlemlerinin etkinliği

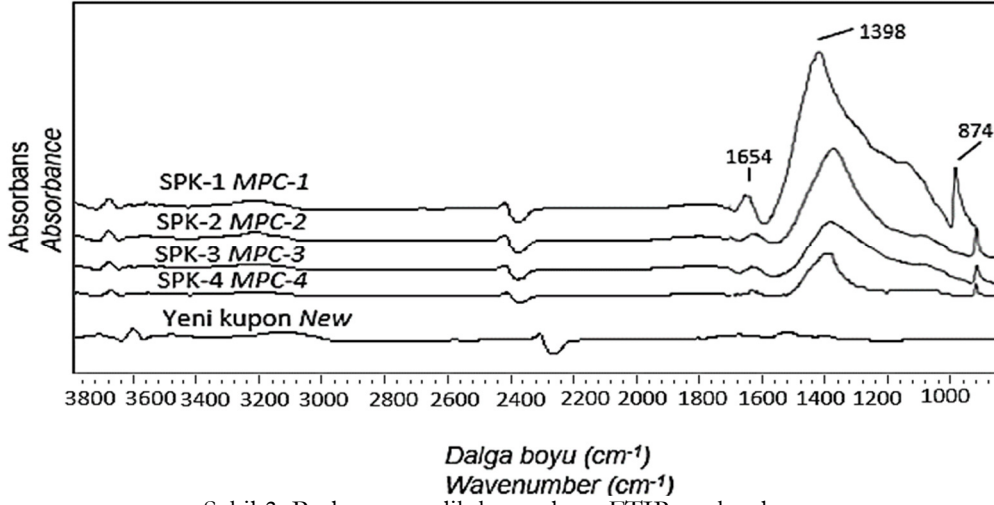
Figure 2. The effectiveness of rinsing with water, alkaline and enzymatic cleaning processes on milk protein concentrate accumulation

Temizleme etkinliği,  $(A-B/A)*100$  formülü ile hesaplanmıştır. Formüle A, birikmiş kuponun birikim miktarını (SPK-1), B, temizleme işlemi yapılmış kuponun kalıntı miktarını (SPK-2, SPK-3 veya SPK-4) ifade etmektedir. SPK-1: Süt protein konsantresi ile birikim sonrası paslanmaz çelik kupon, SPK-2: Su ile çalkalama sonrası paslanmaz çelik kupon, SPK-3: Alkali temizleme uygulanmış paslanmaz çelik kupon, SPK-4: Enzimatik temizleme uygulanmış paslanmaz çelik kupon. Her kutu grafiğinin içinde yer alan çizgi medyanı temsil etmektedir.

Cleaning efficiency calculated according to the formulation:  $(A-B/A)*100$ . A indicated the area of fouled coupon (MPC-1), B: indicated the are of cleaned coupon (MPC-2, MPC3,MPC-4). MPC-1: Stainless steel coupon after fouling with milk protein concentrate, MPC-2: Stainless steel coupon after rinsing with water, MPC -3: Stainless steel coupon after alkaline cleaning, MPC -4: Stainless steel coupon after enzymatic cleaning. The line inside each boxplot represents the median.

Paslanmaz çelik yüzeylerde, birikim ve temizleme etkinliğinin değerlendirilebilmesi için birikim miktarının yanı sıra konfokal taramalı lazer mikroskobu, taramalı elektron mikroskobu, elektron-prob mikro analizleri, atomik kuvvet mikroskopisi ve X-Ray foto-elektron spektroskopisi gibi çeşitli yöntemler kullanılabilir (Jimenez vd., 2013; Hagsten vd., 2016; Khaldi vd., 2018; Yang vd., 2018; Guerrero-Navarro vd., 2020; Guerrero-Navarro

vd., 2022). Çalışmada süt protein konsantresi ile birikim sağlanmış yüzeyler hızlı bir yöntem olan FTIR spektroskopisi ile incelenmiştir. Şekil 3'de, birikim sonrası ve farklı temizleme işlemleri (su ile çalkalama, alkali ve enzimatik temizleme) uygulanan yüzeylerden FTIR spektrometresi ile ölçülen  $4.000-650 \text{ cm}^{-1}$  dalga boyunda toplanan FTIR spektraları verilmiştir. Ayrıca, kıyas amacıyla yeni (birikim sağlanmamış) yüzeylerden de spektra alınmıştır.



Şekil 3. Paslanmaz çelik kuponların FTIR spektraları

Figure 3. FTIR spectra of stainless steel coupon

SPK-1: Süt protein konsantrisi ile birikim sonrası paslanmaz çelik kupon, SPK-2: Su ile çalkalama sonrası paslanmaz çelik kupon, SPK-3: Alkali temizleme uygulanmış paslanmaz çelik kupon, SPK-4: Enzimatik temizleme uygulanmış paslanmaz çelik kupon, Yeni: Birikim uygulanmamış boş paslanmaz çelik kupon.

MPC-1: Stainless steel coupon after fouling with milk protein concentrate, MPC-2: Stainless steel coupon after rinsing with water, MPC-3: Stainless steel coupon after alkaline cleaning, MPC-4: Stainless steel coupon after enzymatic cleaning. New: Unfouled stainless steel coupon.

Şekil 3 incelendiğinde, yeni (birikim uygulanmamış) yüzeylerden spesifik bir fonksiyonel grup titreşimlerinden kaynaklanan herhangi bir spektral bant elde edilmemiştir. Birikim sağlanan yüzeylerden alınan spektra incelendiğinde ise birtakım ayırıcı bölgeleri oluşturan fonksiyonel gruplar olduğu görülmektedir. Bu birikim sağlanan yüzeyde özellikle  $\sim 1656 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1398 \text{ cm}^{-1}$  ve  $875 \text{ cm}^{-1}$ 'de yoğun ve geniş bantlar dikkati çekmektedir. Dolayısıyla, bu bantların yeni ve birikim sağlanan yüzeyler arasındaki farklılıkların tespit edilebilmesi için kullanılabileceğini gösterebilir. Genel olarak, orta infrared bölgesinde proteinlerin oluşturduğu absorban bantların amit I, amit II ve amit III bölgeleri olmak üzere sırasıyla  $\sim 1650$ ,  $1398$  ve  $1240 \text{ cm}^{-1}$ 'de görüldüğü bilinmektedir (Stuart, 2004). Dolayısıyla, birikim sağlanan kuponlardan  $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ 'de elde edilen spektral bant, proteinlerin amit I bölgesi ile ilişkilendirilebilir. Literatürde, bu bandın genel olarak proteinlerin C=O gerilmesi, N-H bükülmesi veya C-N gerilmesinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Stuart, 2004, Deniz vd., 2018). Şekil 3 incelendiğinde, birikim uygulanan yüzeylerden alınan spektradaki en güçlü ve geniş bandın  $\sim 1398$

$\text{cm}^{-1}$ 'de elde edildiği görülmüştür. Bu bant ise proteinlerin amit III bölgesinden kaynaklanmaktadır.  $1241\text{--}1472 \text{ cm}^{-1}$  aralığındaki bölgede yer alan absorpsiyon bantları C-N gerilmesi ve N-H bükülmesi (amit III) titreşimleriyle ilişkili olduğu bilinmektedir (Su vd., 2010). Birikim sağlanan yüzeyden elde edilen spektrada yer alan bir diğer güçlü bandın ise  $\sim 875 \text{ cm}^{-1}$ 'de olduğu belirlenmiştir. Bu bant daha çok karbonhidrat titreşimleri ile ilişkilendirilebilir. Wu vd. (2007) tarafından süttozlarının IR spektralarındaki  $1250\text{--}800 \text{ cm}^{-1}$  arasındaki bölgenin karbonhidratların (özellikle laktoz içeriğinden kaynaklı) C-O titreşimleriyle ilişkilendirilmiştir. Benzer şekilde, Zhou vd. (2006) ise farklı süt tozlarında  $1250\text{--}800 \text{ cm}^{-1}$  arasındaki bölgenin, laktoz içeriğinden kaynaklanan karbonhidrat grubuna ait C-O titreşimlerini temsil ettiğini belirtmişlerdir. Bu spektralar değerlendirildiğinde, süt protein konsantrisi ile birikim sağlanan kupondan elde edilen bu spesifik titreşimlerin, daha çok protein ve karbonhidrat ile ilişkili olduğu söylenebilir. Ayrıca, yağ absorpsiyonuna karşılık gelen bölgelerde (örneğin  $\sim 2874$ ,  $1745$ ,  $1477\text{--}1400$ ,  $1240$  ve  $1175 \text{ cm}^{-1}$ ) belirgin bir titreşim meydana

gelmediği, dolayısıyla yağın herhangi bir titreşim oluşturmadığı belirlenmiştir. Benzer şekilde literatürde, yağlı süt ile oluşan birikimlerde bile yağın önemli miktarlarda bulunmadığı, yani birikimde önemsiz düzeyde etkisinin olduğu belirtilmiştir (Burton, 1968).

Su ile çalkalama, alkali ve enzimatik temizleme işlemleri sonrası hazırlanan kuponların yüzeylerinden elde edilen spektralar Şekil 3'de verilmiştir. Su ile çalkalama işlemi sonrası elde edilen spektra ile birikim sağlanan yüzeyden elde edilen spektranın birbirine daha çok benzerlik gösterdiği, belirgin titreşimlerin aynı bölgelerde meydana geldiği tespit edilmiştir. Alkali ve enzimatik temizleme işlemleri sonrasında kuponlardan alınan spektralarda ise, belirtilen bölgelerde titreşimlerin olduğu, ancak birikim sağlanan yüzey spektrasına kıyasla daha az yoğun olduğu görülmektedir. Dolayısıyla, spektralar arasında gözle görülür farklılığın olmaması temizleme etkinliğinin değerlendirilebilmesi için belirlenen bu spektral bantların alanlarının hesaplanması ile sağlanabileceği öngörülmüştür. Ayrıca, kıyas amacıyla çok değişkenli analiz tekniklerinin uygulanması da uygun bulunmuştur.

Wemsey Diagne vd. (2013) tarafından, ATR-IR tekniğinde elde edilen spektrallardan hedef bölgeler seçilerek yükseklik oranlarına dayalı kantitatif kıyaslamaların yapılabileceği bildirilmiştir. Dolayısıyla, bu çalışmada birikim

sağlanan, birikim sonrası su ile çalkalama, alkali temizleme ve enzimatik temizleme işlemleri uygulanan yüzeylerin spektralarından elde edilen belirgin titreşimlerin alanlarının kıyaslanması üzerine yoğunlaşmıştır. Bu amaçla, bu yüzeylerden alınan 3 belirgin bölgenin (~ 1654, 1398 ve 874  $\text{cm}^{-1}$ ) alanlarının belirlenmesi ve temizleme etkinliğinin bu alanların kıyaslanmasıyla değerlendirilebileceği düşünülmüştür. Çizelge 2'de bu bölgelerde meydana gelen spektral bantların alanları verilmiş ve bu alanlardan yola çıkılarak su ile çalkalama, alkali ve enzimatik temizleme işlemlerinin etkinliği her bir spektral bant için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Bu durumda, amit I (1654  $\text{cm}^{-1}$ ), amit III (1398  $\text{cm}^{-1}$ ), ve karbonhidrat (874  $\text{cm}^{-1}$ ) bölgeleri için sırasıyla su ile çalkalama işleminin etkinliğinin % 62, 15 ve 26, alkali temizleme işleminin etkinliğinin %94, 64 ve 79, enzimatik temizleme işleminin etkinliğinin ise %96, 70 ve 87 aralıklarında olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlardan yola çıkarak, her bir bölge için en az etkin temizlemenin su ile çalkalama, en etkin temizlemenin ise enzimatik temizleme olacağı belirlenmiştir. Dolayısıyla FTIR ile elde edilen bu sonuçların, Çizelge 1'de verilen temizleme sonrası belirlenen kalıntı miktarları ile de uyumlu olduğunu göstermektedir. Ayrıca, birikim sağlanan yüzeyde saptanan en yüksek alana sahip bölgenin amit III (1398  $\text{cm}^{-1}$ ) bölgesi olduğu ve bu fonksiyonel grup kaynaklı kalıntının uzaklaştırılmasının daha güç olduğu söylenebilir.

Çizelge 2. Paslanmaz çelik kuponlara ait spesifik bölgelerde meydana gelen spektral bantların alanları  
Table 2. The area of spectral band taken from specific sections of stainless steel coupons

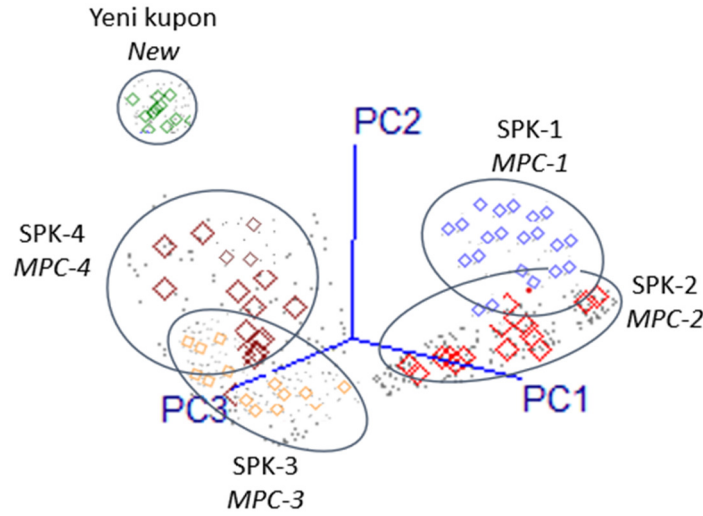
Dalga boyu ( $\text{cm}^{-1}$ ) Wavenumber ( $\text{cm}^{-1}$ )	Bantların ortalama alanları Average area of each band				Temizleme etkinliği* Cleaning efficiency*		
	SPK-1 MPC-1	SPK-2 MPC-2	SPK-3 MPC-3	SPK-4 MPC-4	Su ile çalkalama etkinliği (%) Efficiency of rinsing with water	Alkali temizleme etkinliği (%) Efficiency of alkaline cleaning	Enzimatik temizleme etkinliği (%) Efficiency of enzymatic cleaning
874	3.92±0.10	2.93±0.08	0.81±0.01	0.48±0.01	26±0.02	79±0.02	87±0.08
1398	72.33±0.20	61.02±0.10	25.87±0.09	22.76±0.08	15±0.01	64±0.03	70±0.09
1654	2.08±0.05	0.78±0.01	0.12±0.01	0.08±0.02	62±0.05	94±0.07	96±0.011

\*Temizleme etkinliği,  $(A-B/A)*100$  formülü ile hesaplanmıştır. Formülde A, birikmiş kuponun bant alanını (SPK-1), B, temizleme işlemi yapılmış kuponun bant alanını (SPK-2, SPK-3 veya SPK-4) ifade etmektedir.

\*Cleaning efficiency calculated according to the formulation:  $(A-B/A)*100$ . A indicated the area of fouled coupon (MPC-1), B: indicated the are of cleaned coupon (MPC-2, MPC3,MPC-4).

Paslanmaz çelik yüzeylerin spektrumunda bazı benzer titreşimler gözlemlenmesi sebebiyle, çok değişkenli analiz tekniği kullanılarak örnekler arasındaki farklılıkların ortaya koyulması sağlanmıştır. Bu amaçla, ilk olarak SIMCA analizi için, spektrumlar, normalleştirme, yumuşatma ve 2. türev (Savitzky-Golay ikinci dereceden bir 35-nokta polinom filtre) kullanılarak işlenmiştir. SIMCA üç boyutlu sınıf projeksiyonu Şekil 4'de gösterilmiştir. Şekil 4'de farklı renkteki her bir sınıf farklı bir kuponu temsil etmektedir. SIMCA

üç boyutlu sınıf projeksiyonunda, birbirine benzer özelliğe sahip sınıflar daha yakın ve aynı grupta, farklı olan sınıflar ise birbirinden uzak görülmektedir. Bu durumda, birikim sağlanmış kupon ile su ile çalkalama yapılmış kupon birbirine yakın sınıflarda iken, alkali ve enzimatik temizleme işlemleri uygulanmış sınıflar birbirine daha yakın bulunmuştur. Yeni kupon sınıfına ise en yakın sınıf enzimatik temizleme uygulanmış sınıf olduğu belirlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Paslanmaz çelik kuponların SIMCA üç boyutlu sınıf projeksiyonu

Figure 4. SIMCA 3-d class projection of stainless steel coupon

SPK-1 (mavi): Süt protein konsantrisi ile birikim sonrası paslanmaz çelik kupon, SPK-2 (kırmızı): Su ile çalkalama sonrası paslanmaz çelik kupon, SPK-3 (turuncu): Alkali temizleme uygulanmış paslanmaz çelik kupon, SPK-4 (bordo): Enzimatik temizleme uygulanmış paslanmaz çelik kupon, Yeni (yeşil): Birikim uygulanmamış boş paslanmaz çelik kupon.

MPC-1 (blue): Stainless steel coupon after fouling with milk protein concentrate, MPC-2 (red): Stainless steel coupon after rinsing with water, MPC-3 (orange): Stainless steel coupon after alkaline cleaning, MPC-4 (claret red): Stainless steel coupon after enzymatic cleaning, New (green): Unfouled stainless steel coupon.

Ayrıca, sınıflar arası mesafeler (ICD) göre de bir ayırım yapılmıştır (Çizelge 3). Sınıflar arası mesafe (ICD), her bir sınıfın merkezinden Öklid mesafesi olarak bilinen birimsiz bir parametredir ve sınıflar arasındaki kimyasal kompozisyon farkıyla doğrusal olarak ilişkilidir. İki sınıf arasındaki bu değer 3 veya 3'ten yüksek olması, bu iki sınıfın birbirinden önemli ölçüde farklı olduğunu göstermektedir (Vladisavljević vd., 2006). Bu durumda, birikim uygulanmış sınıf ile su ile çalkalanmış sınıf birbirine benzer sayılabilmektedir. Yeni kupona en yakın sınıfın ise 4.5 değeri ile enzimatik temizleme uygulanan

yüzey olduğu görülmektedir. Şekil 5'te ise örneklerin dalga sayılarına karşılık alınan ayırma güçleri gösterilmiştir. Bu şekilde yer alan en yüksek bantlarda sınıflar arası ayırma daha çok etkili bulunmuştur. Dolayısıyla, en yüksek ayırma güçleri 1654, 1398 ve 874  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayılarında görülmektedir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak, SIMCA analizi ile kombine kullanılacak FTIR spektroskopisinin paslanmaz çelik yüzeylerin sınıflandırılmasında ve temizleme etkinliğinin değerlendirilebilmesinde kullanılacağı belirlenmiştir.

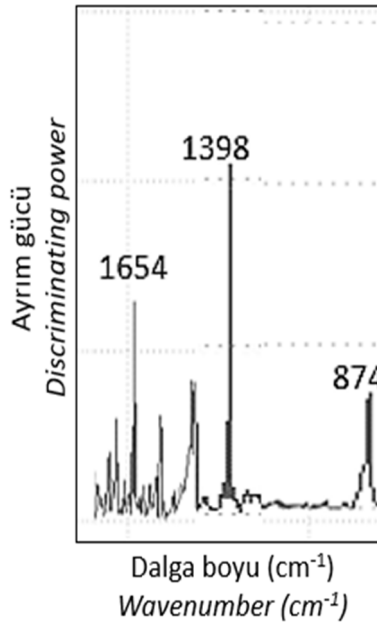
Çizelge 3. Paslanmaz çelik kuponların SIMCA sınıflar arası mesafe değerleri

Table 3. SIMCA Interclass distances of stainless steel coupons

	Yeni (boş) kupon <i>New</i>	SPK-1 <i>MPC-1</i>	SPK-2 <i>MPC-2</i>	SPK-3 <i>MPC-3</i>	SPK-4 <i>MPC-4</i>
Yeni (boş) kupon <i>New</i>	0.0	11.3	9.7	5.2	4.5
SPK-1 <i>MPC-1</i>	11.3	0.0	2.3	4.1	4.8
SPK-2 <i>MPC-2</i>	9.7	2.3	0.0	3.8	3.5
SPK-3 <i>MPC-3</i>	5.2	4.1	3.8	0.0	2.6
SPK-4 <i>MPC-4</i>	4.5	4.8	3.5	2.6	0.0

SPK-1: Süt protein konsantresi ile birikim sonrası paslanmaz çelik kupon, SPK-2: Su ile çalkalama sonrası paslanmaz çelik kupon, SPK-3: Alkali temizleme uygulanmış paslanmaz çelik kupon, SPK-4: Enzimatik temizleme uygulanmış paslanmaz çelik kupon, Yeni: Birikim uygulanmamış boş paslanmaz çelik kupon.

*MPC-1: Stainless steel coupon after fouling with milk protein concentrate, MPC-2: Stainless steel coupon after rinsing with water, MPC-3: Stainless steel coupon after alkaline cleaning, MPC-4: Stainless steel coupon after enzymatic cleaning, New: Unfouled stainless steel coupon.*



Şekil 5. Paslanmaz çelik kuponların gruplandırılmasında dalga sayılarına karşılık alınan ayırım gücü grafiği

Figure 5. Discriminating power versus wavenumbers of stainless steel coupons

## SONUÇ

Bu çalışmada, süt protein konsantresi birikimlerine farklı sıcaklık uygulamaları ve kalsiyum ilavesinin etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, oluşan birikimlerin uzaklaştırılması için su ile çalkalama, alkali ve enzimatik temizleme solüsyonlarının etkinliklerinin değerlendirilmesi sağlanmıştır. Bu amaçlarla, hızlı, basit ve güvenilir yöntemlerden biri FTIR spektroskopisinin çok değişkenli veri analizi ile kombinasyonuna dayanarak farklı özelliklerdeki paslanmaz çelik yüzeylerin ayırt edilmesi üzerine çalışılmıştır. Mevcut çalışmada, süt protein konsantresine ilave edilen kalsiyumun ve uygulanan sıcaklığın artmasının birikim miktarını arttırdığı ve bu birikimin temizlenmesini zorlaştırdığı belirlenmiştir. Hem birikim miktarı hem de FTIR ile analizi ile değerlendirme yapıldığında, diğer işlemlere kıyasla enzimatik temizleme işleminin temizleme etkinliğinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. FTIR spektroskopisinin çok değişkenli analiz teknikleri ile kullanımının süt protein konsantresi birikiminin olduğu ve/veya temizlenmiş paslanmaz çelik yüzeylerin ayırılmasında kullanım

potansiyeli olabilecek bir teknik olduğu belirlenmiştir. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda, paslanmaz çelik yüzeylerde farklı süt kaynaklı birikimlerin oluşturulması ile FTIR-ATR tekniği ile farklı spektroskopik ve mikroskopik tekniklerin kıyaslamaları üzerine çalışmaların gerçekleştirilmesi önerilmektedir.

#### ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarın makale ile ilgili herhangi bir kişi veya kurum ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

#### YAZARLARIN KATKISI

Makalede, çalışma planının hazırlanması ve yürütülmesi, denemeler ve analizlerin gerçekleştirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı Müge Urgan Öztürk tarafından sağlanmıştır.

#### KAYNAKLAR

Anonymous (2015). Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas - Test method and requirements without mechanical action (Phase 2, Step 2). European Standard JNE-EN 13697:2015, 26 p.

AOAC (2012). Official Methods of Analysis the Association of Analytical Chemists. 19th Edition, Gaithersburg, MD, the USA.

Bansal, B., Chen, X.D. (2006). A critical review of milk fouling in heat exchangers. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5: 27–33. doi: 10.1111/j.1541-4337.2006.tb00080.x

Barish, J.A., Goddard, J.M. (2013). Anti-fouling surface modified stainless steel for food processing. *Food and Bioproducts Processing*, 91(4): 352–361. doi: 10.1016/j.fbp.2013.01.003

Barish, J.A., Goddard, J.M. (2014). Stability of nonfouling stainless steel heat exchanger plates against commercial cleaning agents. *Journal of Food Engineering*, 124: 143–151. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.10.009

Blanpain-Avet, P., Hédoux, A., Guinet, Y., Paccou, L., Petit, J., Six, T., Delaplace, G. (2012). Analysis by Raman spectroscopy of the

conformational structure of whey proteins constituting fouling deposits during the processing in a heat exchanger. *Journal of Food Engineering*, 110(1): 86–94. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2011.12.005

Boxler, C., Augustin, W., Scholl, S. (2013). Fouling of milk components on DLC coated surfaces at pasteurization and UHT temperatures. *Food and Bioproducts Processing*, 91(4): 336–347. doi: 10.1016/j.fbp.2012.11.012

Boxler, C., Augustin, W., Scholl, S. (2014). Composition of milk fouling deposits in a plate heat exchanger under pulsed flow conditions. *Journal of Food Engineering*, 121: 1–8. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.08.003

Burton, H. (1968). Deposits from whole milk in heat treatment plant – A review and discussion. *Journal of Dairy Research*, 35: 317–330.

Chang, I., Le Clech, P., Jefferson, B., Judd, S. (2002). Membrane fouling in membrane bioreactors for wastewater treatment. *Journal of Environmental Engineering*, 128 (11): 1018–1029. doi: 10.1061/(ASCE)0733-9372(2002)128:11(1018)

Changani, S.D., Belmar-Beiny, M.T., Fryer, P.J. (1997). Engineering and chemical factors associated with fouling and cleaning in milk processing. *Experimental Thermal and Fluid Science*, 14(4): 392–406. doi: 10.1016/S0894-1777(96)00141-0

Deniz, E., Altuntaş, E.G., Ayhan, B., İğci, N., Özel Demiralp, D., Candoğan, K. (2018). Differentiation of beef mixtures adulterated with chicken or turkey meat using FTIR spectroscopy. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42: 13767. doi: 10.1111/jfpp.13767

Foster, C.L., Britten, M., Green, M. (1989). A model heat-exchange apparatus for the investigation of fouling of stainless steel surfaces by milk. I. Deposit formation at 100 C. *Journal of Dairy Research*, 56: 201–209. doi: doi.org/10.1017/S002202990002642X

Fryer, P.J., Robbins, P.T., Asteriadou, I.K. (2013). Current knowledge in hygienic design: Can we minimise fouling and speed cleaning?. *Food*



- Engineering Series*, 1: 209–227. doi: 10.1016/j.profoo.2011.09.258
- Guerrero-Navarro, A.E., Ríos-castillo, A.G., Avila, C.R., Hascoët, A.S., Felipe, X., Jerez, J.J.R. (2019). Development of a dairy fouling model to assess the efficacy of cleaning procedures using alkaline and enzymatic products. *LWT - Food Science and Technology*, 106: 44–49. doi: 10.1016/j.lwt.2019.02.057
- Guerrero-Navarro, A.E., Ríos-Castillo, A.G., Ripolles-Avila, C., Felipe, X., Rodrigues-Jerez, J.J. (2020). Microscopic analysis and microstructural characterization of the organic and inorganic components of dairy fouling during the cleaning process. *Journal of Dairy Science*, 103: 2117–2127. doi: 10.3168/jds.2019-16957
- Guerrero-Navarro, A.E., Ríos-Castillo, A.G., Ripolles-Avila, C., Zamora, A., Hascoet, A.S., Felipe, X., Castillo, M., Rodrigues-Jerez, J.J. (2022). Effectiveness of enzymatic treatment for reducing dairy fouling at pilot-plant scale under real cleaning conditions. *LWT- Food Science and Technology*, 154: 112634. doi: 10.1016/j.lwt.2021.112634
- Hagsten, C., Altskär, A., Gustafsson, S., Lorén, N., Hamberg, L., Innings, F., Paulsson, M., Nylander, T. (2016). Composition and structure of high temperature dairy fouling. *Food Structure*, 7: 13–20. doi: 10.1016/j.foostr.2015.12.002
- IDF (1981). Milk—Determination of fat content—Gerber butyrometers. IDF Standard 4A, International Dairy Federation (IDF), Brussels, Belgium.
- IDF (1982). Determination of the total solid content (Cheese and processed cheese). IDF Standard 105, IDF International Dairy Federation (IDF), Brussels, Belgium.
- Jimenez, M., Delaplace, G., Nuns, N., Bellayer, S., Deresmes, D., Ronse, G., Alogaili, G. (2013). Toward the understanding of the interfacial dairy fouling deposition and growth mechanisms at a stainless steel surface: A multiscale approach. *Journal of Colloid and Interface Science*, 404: 192–200. doi: 10.1016/j.jcis.2013.04.021
- Khaldi, M., Blanpain-Avet, P., Guérin, R., Ronse, G., Bouvier, L., André, C., Bornaz, S. (2015). Effect of calcium content and flow regime on whey protein fouling and cleaning in a plate heat exchanger. *Journal of Food Engineering*, 147: 68–78. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2014.09.020
- Khaldi, M., Croguennec, T., Andre, C., Ronse, G., Jimenez, M., Bellayer, S., Blanpain-Avet, P., Bouvier, L., Six, T., Bornaz, S., Jeantet, R., Delaplace, G. (2018). Effect of the calcium / protein molar ratio on  $\beta$ -lactoglobulin denaturation kinetics and fouling phenomena. *International Dairy Journal*, 78: 1–10. doi: 10.1016/j.idairyj.2017.10.002
- Lalande, M., René, F., Tissier, J.P. (1989). Fouling and its control in heat exchangers in the dairy industry, *Biofouling*, 1: 233–250. doi: 10.1080/08927018909378111
- Liu, D. Z., Jindal, S., Amamcharla, J., Anand, S., Metzger, L. (2017). Evaluation of a sol-gel-based stainless steel surface modification to reduce fouling and biofilm formation during pasteurization of milk. *Journal of Dairy Science*, 100(4): 2577–2581. doi: 10.3168/jds.2016-12141
- Magens, O.M., Hofmans, J.F.A., Adriaenssens, Y., Wilson, D.I. (2019). Comparison of fouling of raw milk and whey protein solution on stainless steel and fluorocarbon coated surfaces: Effects on fouling performance, deposit structure and composition. *Chemical Engineering Science*, 195: 423–432. doi: 10.1016/j.ces.2018.09.039
- Nielsen, B.T., Singh, H., Latham, J.M. (1995). Aggregation of bovine  $\beta$ -lactoglobulin A and B on heating at 75 °C. *International Dairy Journal*, 6: 519–527. doi: 10.1016/0958-6946(95)00022-4
- Petit, J., Herbig, A., Moreau, A., Delaplace, G. (2011). Influence of calcium on  $\beta$ -lactoglobulin denaturation kinetics: Implications in unfolding and aggregation mechanisms. *Journal of Dairy Science*, 94(12): 5794–5810. doi: 10.3168/jds.2011-4470
- Petit, J., Six, T., Moreau, A., Ronse, G., Delaplace, G. (2013).  $\beta$ -lactoglobulin denaturation, aggregation, and fouling in a plate heat exchanger: Pilot-scale experiments and dimensional analysis.

- Chemical Engineering Science*, 101: 432–450. doi: 10.1016/j.ces.2013.06.045
- Santos, P.M., Pereira-Filho, E.R., Rodriguez-Saona, L.E. (2013). Rapid detection and quantification of milk adulteration using infrared microspectroscopy and chemometrics analysis. *Food Chemistry*, 138(1): 19–24. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.10.024
- Stuart, B. (2004). *Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications*. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, the UK, 248 p.
- Su, J.F., Huang, Z., Yuan, X.Y., Wang, X.Y., Li, M. (2010). Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions. *Carbohydrate Polymers*, 79(1): 145–153. doi: 10.1016/j.carbpol.2009.07.035
- Visser, J., Jeurink, T.J.M. (1997). Fouling of heat exchangers in the dairy industry. *Experimental Thermal and Fluid Science*, 14(4): 407–424. doi: 10.1016/S0894-1777(96)00142-2
- Vladisavljević, G.T., Surh, J., McClements, J.D. (2006). Effect of emulsifier type on droplet disruption in repeated Shirasu porous glass membrane homogenization. *Langmuir*, 22 (10), 4526–4533. doi: 10.1021/la053410f
- Wallhäußer, E., Hussein, M.A., Becker, T. (2012). Detection methods of fouling in heat exchangers in the food industry. *Food Control*, 27(1): 1–10. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.02.033
- Wemsy Diagne, N., Rabiller-Baudry, M., Paugam, L. (2013). On the actual clean-ability of polyethersulfone membrane fouled by proteins at critical or limiting flux. *Journal of Membran Science*, 425–426: 40–47. doi: 10.1016/j.memsci.2012.09.001
- Wilson, D.I. (2018). Fouling during food processing – progress in tackling this inconvenient truth. *Current Opinion in Food Science*, 23: 105–112. doi: 10.1016/j.cofs.2018.10.002
- Wu, D., He, Y., Feng, S. and Sun, D.W. (2007). Study on infrared spectroscopy technique for fast measurement of protein content in milk powder based on LS-SVM. *Journal of Food Engineering*, 84(1): 124–131. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2007.04.031
- Yang, W., Li, D., Dong, X., Mercadé-Prieto, R. (2018). Effect of calcium on the fouling of whey protein isolate on stainless steel using QCM-D. *Chemical Engineering Science*, 177: 501–508. doi: 10.1016/j.ces.2017.12.004
- Zhou, Q., Sun, S.Q., Yu, L., Xu, C.H., Noda, I. and Zhang, X.R. (2006). Sequential changes of main components in different kinds of milk powders using two-dimensional infrared correlation analysis. *Journal of Molecular Structure*, 799: 77–84. doi: 10.1016/j.molstruc.2006.03.025
- Zouaghi, S., Bellayer, S., Thomy, V., Daargent, T., Coffinier, Y., Andre, C., Delaplace, G., Jimenez, M. (2019). Biomimetic surface modifications of stainless steel targeting dairy fouling mitigation and bacterial adhesion. *Food and Bioprocess Processing*, 113: 32–38. doi: 10.1016/j.fbp.2018.10.012
- Zouaghi, S., Six, T., Nuns, N., Simon, P., Delaplace, G. (2018). Influence of stainless steel surface properties on whey protein fouling under industrial processing conditions. *Journal of Food Engineering*, 228: 38–49. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2018.02.009



## PROBİYOTİK *Alkalihalobacillus clausii* SPORU İÇEREN KEK ÜRETİMİ

Gökçe Ersoy<sup>1</sup>, Sultan Arslan Tontul<sup>1\*</sup>, Mustafa Erbaş<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Konya, Türkiye

<sup>2</sup>Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya, Türkiye

Geliş / Received: 27.10.2022; Kabul / Accepted: 13.12.2022; Online baskı / Published online: 16.12.2022

Ersoy, G., Arslan-Tontul, S., Erbaş, M. (2023). Probiyotik *A.clausii* sporu içeren kek üretimi. GIDA (2023) 48 (1) 16-24 doi: 10.15237/gida.GD22105

Ersoy, G., Arslan-Tontul, S., Erbaş, M. (2023). Cake production with probiotic *A.clausii* spores. GIDA (2023) 48 (1) 16-24 doi: 10.15237/gida.GD22105

### ÖZ

Son yıllarda *Bacillus* bakterisi sporlarına olan ilgi, probiyotik özellikleri nedeniyle hızla artmıştır. Bu çalışmada *A. clausii* sporları kullanılarak probiyotik özellikte kek üretimi amaçlanmıştır. Fırınlama işlemi normal şartlarda, mikrodalga ve buhar destekli olarak uygulanmıştır. Üretilen keklerin probiyotik spor canlılığı pişirme sonunda, in vitro sindirim şartlarında ve depolama sırasında takip edilmiştir. Kek örneklerinin pişirme sonrasında probiyotik spor içeriğinin 5.74-5.88 log kob/g aralığında olduğu ve canlılığın yaklaşık %79 oranında korunduğu tespit edilmiştir. Mide ve bağırsak sindirimi sonucunda kek örneklerinin *A. clausii* sayısının sırasıyla 5.89-6.06 log kob/g ve 6.06-6.27 log kob/g seviyesinde olduğu tespit edilmiş ve probiyotik sporların gastrointestinal şartlara karşı oldukça direnç gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan depolama testleri sonucunda ise bakteriyel sporların depolama sırasında da oldukça stabil halde kaldıkları ve başlangıç seviyelerini korudukları belirlenmiştir. Buzdolabı sıcaklığında depolanan örneklerde daha yüksek bakteriyel spor canlılığı tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Bacillus*, spor, probiyotik, kek

## CAKE PRODUCTION WITH PROBIOTIC *Alkalihalobacillus clausii* SPORES

### ABSTRACT

In recent years, interest in *Bacillus* spores has increased due to their probiotic properties. This study, it was aimed to produce probiotic cakes by using *A. clausii* spores. In the baking process; under normal conditions, microwave and steam-assisted baking were applied. The probiotic spore viability was researched after baking, in vitro digestion test, and storage. It was determined that the probiotic spore content of the cake samples after baking was in the range of 5.74-5.88 log cfu/g and the spores preserved their viability at a rate of 79%. As a result of the gastric and intestinal digestion, the number of *A. clausii* in the cake samples was determined to be 5.89-6.06 log cfu/g and 6.06-6.27 log cfu/g, respectively. As can be seen from these results, the probiotic spores showed high resistance to gastrointestinal conditions and almost preserved viability before the test. Additionally, it was determined that the bacterial spores remained quite stable during storage and kept the initial level. The viability of bacterial spores stored at room temperature was higher than that stored at room temperature.

**Keywords:** *Bacillus*, spore, probiotic, cake

\* Yazışmalardan sorumlu yazar/ Corresponding Author

✉: sultan.arslan@selcuk.edu.tr

☎: (+90) 332 223 2937

☎: (+90) 332 241 0108

Gökçe Ersoy; ORCID no: 0000-0003-3771-427X

Sultan Arslan Tontul; ORCID no: 0000-0003-1557-7948

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

## GİRİŞ

Probiyotik mikroorganizmalar sağlığa faydalı etkileri nedeniyle uzun süredir fonksiyonel ürün geliştirme çalışmalarının ilgi odağı haline gelmiştir. Probiyotik mikroorganizmalar, Gıda ve Tarım Örgütü'ne (FAO) göre yeterli miktarda canlı olarak vücuda alındığında sağlığı koruyucu ve geliştirici bazı etkiler gösteren mikroorganizmalar olarak adlandırılmaktadır. Bilinçli gıda tüketicileri, antibiyotik kullanımını sınırlandıran, daha az işlem görmüş, güvenli ve ucuz alternatif gıda arayışı içerisinde. Bu anlamda probiyotik mikroorganizmalar, bu amaçla uzun yıllardır kullanılan güvenli bir yöntem olması nedeniyle öne çıkmaktadır. Probiyotik ürün pazarı, tüketicilerin sağlıklı yaşam bilincinin artması, sindirim bozuklukları ve metabolik bozuklukların beslenme şartlarının düzenlenmesi ile kontrol altına alınabileceğinin anlaşılması gibi nedenlerle hızla büyümektedir. Bu pazarın 2023 yılına kadar %7 oranında genişleyeceği ve pazar payının yaklaşık 39.2 milyar dolara ulaşacağı öngörülmektedir. Ürün geliştirme çalışmalarında kullanılan probiyotikler; *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, maya, spor oluşturan bakteriler ve diğerleri olmak üzere beş sınıfa ayrılmaktadır. Ancak bu sınıfların arasında spor oluşturan *Bacillus* türleri, global nutrasötik pazarında önemli yer tutmaktadır. Bunun en büyük nedeni ise spor oluşturma yeteneğinin sağladığı üstün dayanıklılıktan ileri gelmektedir. Proses sırasında stabilizasyonun yüksek olması *Bacillus* sporlarını yeni fonksiyonel gıda formülasyonlarının geliştirilmesi için iyi bir aday haline getirmiştir (Elshaghabe vd., 2017).

*B. clausii*, gram pozitif, spor oluşturabilen ve fakültatif alkalifilik, çubuk şekilli bir bakteridir. Bu bakterinin karakteristik özellikleri içerisinde; katalaz ve oksidaz üretebilme, jelatin ve nişasta polimerini hidrolize edebilme, nitrat indirgeme, 30-50°C arasındaki sıcaklıklarda gelişebilme ve %10 seviyesine kadar NaCl konsantrasyonunu tolere edebilme sayılabilmektedir. Spor oluşturma yeteneği, bu bakterilere eşsiz bir dayanım kazandırmaktadır. Oluşan bu spor formlar, gastrik sistemin zorlu ve yüksek asitli ortamında korunarak intestinal sisteme kadar ulaşabilmekte ve probiyotik etkilerini gösterebilmektedir

(Sanders vd., 2003; Mingmongkolchai ve Panbangred, 2017).

*A. clausii* probiyotik bakterisinin üstün fonksiyonel özellikleri, spor oluşturma yeteneğinden kaynaklanmaktadır. Probiyotik etki özellikle vejetatif hücrelerde görülmekle birlikte bazı kaynaklarda sporların da bu tür fonksiyonel etkiler gösterebildiği bildirilmektedir (Spinosa vd., 2000). Ancak spor formlar midenin düşük asitliğinden ve sindirim enzimlerinden etkilenmediğinden kolayca asıl etki bölgesi olan kolona ulaşmakta ve burada vejetatif forma dönüşerek probiyotik etki göstermektedirler. Sindirim sisteminin ekstrem şartlarına karşı vejetatif hücrelerin dayanıksız, spor formların ise oldukça dayanıklı olduğu bildirilmektedir. Yapılan bir çalışmada *Bacillus* sporlarının pH 2.5 ortamında 6 saat kalabildiği ve %0.3'e kadar safra tuzunu tolere edebildiği belirtilmiştir. Birçok çalışma, *Bacillus* sporlarının intestinal sistemde vejetatif forma dönüşerek faydalı etkiler (antimikrobiyel, patojenlere karşı besin rekabeti, bağışıklık düzenleyici, kısa zincirli yağ asidi, K ve B grubu vitamin üretimi) gösterdiğini rapor etmektedir (Hong vd., 2005; Elshaghabe vd., 2017; Mingmongkolchai ve Panbangred, 2017). Ayrıca spor formlar yüksek sıcaklıklara dayanabildiklerinden ısl işlem prosesi ile üretilen gıda formülasyonlarında da etkilenmeden canlılıklarını koruyabilecekleri düşünülmektedir.

Güvenli olmaları ve uzun süredir kullanımları *Bacillus* sporlarını fonksiyonel gıda geliştirme çalışmalarında iyi bir probiyotik mikroorganizma adayı haline getirmiştir. Probiyotik etkileri çeşitli çalışmalarla tespit edilmiş olan, insan ve hayvanların tüketiminde kullanılan *Bacillus* türleri *B. cereus*, *B. clausii*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. licheniformis* ve *B. pumilus* olup *A. clausii* türü, diyarenin tedavisinde halihazırda kullanılan bir preparat olarak etkili bir yöntem olması ile ön plana çıkmaktadır (Sanders vd., 2003; Patrone vd., 2016; Mingmongkolchai ve Panbangred, 2017). Yapılan bir çalışmada *A. clausii* hücrelerinin kolayca Caco-2 hücrelerine tutunarak, *Clostridium difficile* toksinlerini inaktive ettiği bildirilmiştir (Elshaghabe vd., 2017). Yayımlanan bir *in vivo* çalışmada ise *B. clausii*'nin sindirim mikrobiyotasını

iyileştirdiği ve bağışıklık sistemini düzenleyen CD4+T hücrelerinin sentezini arttırdığı rapor edilmiştir (Hong vd., 2005). Tüm bunlara ilaveten, *A. clausii* hücrelerinin kloramfenikol ve tetrasiklin antibiyotiklerine dirençli olması nedeniyle antibiyotik tedavisi ile birlikte kullanılması da çok büyük bir avantaj sağlamaktadır (Elshaghabe vd., 2017). Diğer yürütülen in vivo ve in vitro çalışmalar da *A. clausii* hücrelerinin probiyotik özelliklerini desteklemektedir (Muscettola vd., 1991, 1992; Kosak vd., 1998; Di Caro vd., 2005).

Her ne kadar probiyotik etkileri ile *Bacillus* türleri ilgi odağı olsa da bazı türlerinin (*B. cereus*, *B. weihenstephanensis*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*) patojen şüphesi, negatif bir algı ortaya çıkarmaktadır. Halbuki in vivo çalışmalarda patojen bu türler dışındaki *Bacillus* türlerinin herhangi bir toksik etkisi tespit edilmemiştir (Sanders vd., 2003). Patojen olmayan *Bacillus* türleri, çok uzun yıllardır gıda üretiminde GRAS nitelikteki birçok ekstraselüler enzim (amilaz, glukoamilaz, proteaz, pektinaz) üretiminde kullanılmaktadır. Enzim üretimi dışında *Bacillus* türleri; vitamin, karotenoid, antibiyotik ve antimikrobiyal (subtilin ve koagulin) maddeler gibi iyi bilinen ikincil metabolitleri de üretmektedirler. Günümüzde antibakteriyel maddelerin neredeyse yarısı *Bacillus* türleri tarafından üretilmektedir (Sanders vd., 2003; Bernardeau vd., 2017; Elshaghabe vd., 2017). Tüm bunlara ilaveten *Bacillus* türleri soya, keçiyoynuzu, mısır ve pirinç gibi hammaddelerin kullanıldığı geleneksel fermantasyonda sıkça rol alırlar. *Bacillus* fermentasyonu ile üretilen geleneksel gıdalardan en bilineni ise Japonya'da yaygın olarak tüketilen Natto isimli fermente bir gıdadır (Sanders vd., 2003; Elshaghabe vd., 2017).

Bu çalışmada *A. clausii* probiyotik sporlarının kek üretiminde kullanılması, farklı pişirme tekniklerinin spor canlılığı üzerine etkilerinin araştırılması ve üretilen keklerin in vitro sindirim şartlarında ve depolama sırasında probiyotik özelliklerindeki değişimlerin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve YÖNTEM

### Materyal

Çalışmada kullanılan iyi kalitede kek hammaddeleri (un, kristal şeker, sıvı yağ, yumurta, kabartma tozu ve vanilya) yerel marketlerden temin edilmiştir. Araştırmada probiyotik olarak Enterogermina® ticari preparatının içerdiği *Alkalibacillus clausii* sporları kullanılmıştır (10<sup>8</sup> kob/mL). In vitro sindirim çalışmalarında kullanılan sindirim enzimleri Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Mikrobiyolojik analizlerde kullanılan kimyasal malzemeler ise Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

### Kek Üretimi

Kek miksinin hazırlanmasında Arslan-Tontul, vd. (2019) tarafından tarif edilen formülasyon kullanılmıştır. Bu amaçla 150 g un, 150 g kristal toz şeker, 150 g bütün yumurta, 150 g sıvı yağ, 1.5 g kabartma tozu ve 1.5 g vanilya tartılmış ve köpük hamur kıvamına gelene kadar mikser yardımı ile çırpılmıştır. Kek miksinden 150 g tartılarak içerisine 10<sup>7</sup> kob/g olacak şekilde hazır süspansiyon halindeki *A. clausii* sporu ilave edilerek kısa süreli karıştırma uygulanmıştır. Spor ilave edilen kek miksleri, kalıplara 30 g ağırlığında tartılmış ve normal sıcak hava, mikrodalga destekli sıcak hava ve buhar destekli sıcak hava şartlarında pişirilmiştir. Pişirme şartları; normal üretim için 180°C'de 17 dk, kombine mikrodalga uygulaması için 180°C, 90 W ve 13 dk ve buhar uygulaması için ise 180°C, düşük düzeyde buhar ve 19 dk süre boyunca uygulanmıştır. Pişirme sonrasında ölçülen kek iç sıcaklıkları normal, mikrodalga ve buhar uygulaması için sırasıyla 87.8°C, 81.1°C ve 80.6°C olarak belirlenmiştir. Pişirme sonrasında kek örnekleri soğutulmuş, bütün halde bireysel kilitli polietilen poşetlere koyulmuş ve depolanmıştır. Depolama işlemi oda sıcaklığında 5 gün ve buzdolabı sıcaklığında ise 15 gün olarak yürütülmüştür.

### *A. clausii* sayımı

Kek örnekleri öğütüldükten sonra 10 g tartılarak 90 mL steril ringer çözeltisi içerisinde homojenize edilmiştir. Bu süspansiyon ilk dilüsyon olarak kabul edilerek ileri dilüsyonların hazırlanmasında kullanılmıştır. Uygun dilüsyonlardan örnek alınarak yayma plak yöntemine göre Mueller

Hinton Agar besiyerine ekimi yapılmıştır. Petriler 45°C'de 72 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra sayılmıştır (Patrone vd., 2016; Urdacı vd., 2004). *A. clausii* canlılık değeri ise pişirme öncesi hamurda tespit edilen vejetatif-spor hücre sayısının pişirme sonrasında tespit edilen sayıya oranlanması sonrasında % olarak hesaplanmıştır.

#### **In vitro sindirim testi**

*A. clausii* sporlarının in vitro sindirim sisteminde uğradığı değişimler Brodtkorb vd., (2019) tarafından tarif edilen INFOGEST protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. In vitro oral faz çözeltisi, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub> ve 75 U/mL amilaz kullanılarak hazırlanmış ve çözeltinin son pH değeri 7'ye ayarlanmıştır. 2 g kek örneği ve 2 mL oral faz çözeltisi bir şişe içerisinde karıştırılmış ve 37 °C'de 2 dk süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 1 mL örnekleme yapılmıştır. In vitro mide çözeltisinin hazırlanmasında 0.15 mM CaCl<sub>2</sub>, 2000 U/mL pepsin ve 60 U/mL lipaz kullanılmış ve çözelti pH değeri 0.1 N HCl ile 3'e ayarlanmıştır. 3 g kek-oral faz karışımı üzerine 3 mL gastrik çözelti ilave edilmiş ve 37°C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 1 mL örnekleme yapılmıştır. In vitro bağırsak çözeltisinin hazırlanmasında ise, 10 mM safra tuzu, 0.6 mM CaCl<sub>2</sub> ve 100 U/mL pankreatin kullanılmış ve çözelti pH değeri 0.1 N NaOH ile 7'ye ayarlanmıştır. 5 g kek-gastrik faz karışımı üzerine 5 mL bağırsak çözeltisi ilave edilmiş ve 37 °C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 1 mL örnekleme yapılmıştır. Simüle sindirim testi sırasında alınan örneklerde *A. clausii* sayımı yapılmıştır.

#### **pH ve Titrasyon Asitliği**

Pişirme sonrasında öğütülen kek örneklerinin pH değeri, örneğin 20 kat saf su ile homojenize edilmesinden sonra pH metre kullanılarak tespit edilmiştir. Titrasyon asitliği değeri ise pH ölçümü için homojenize edilen örneklerin fenolfitalein indikatöründe, 0.1 N NaOH çözeltisi ile titrasyonu sonucunda laktik asitin eşdeğerliği kullanılarak % olarak belirlenmiştir (AACC, 1999).

#### **İstatistiksel Analizler**

Kek üretimi iki tekerrürlü, analizler ise paralelli olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilere

varyans analizi ve önemli bulunan faktörlere Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi uygulanmıştır. Tüm istatistik hesaplamalar SAS istatistik programı ile gerçekleştirilmiş olup değerler ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde düzenlenmiştir.

#### **BULGULAR VE TARTIŞMA**

##### **Kek Örneklerinin *A. clausii* Sayısı ve Pişirme Sonrası Canlılık Değerleri**

Fırıncılık ürünlerinin probiyotik özellikte üretilmemelerinin önündeki en büyük engel, pişirme sırasında uygulanan yüksek sıcaklıktır. Çoğu probiyotik mikroorganizma (*Lactobacillus* ve *Bifidobacterium*) pişirme sıcaklıklarında inaktive olmaktadır. Bu tür ürünler ancak probiyotiklerin özel teknikler ile hazırlanan süspansiyonlarının pişirme sonrası ürünün yüzeyine püskürtülmesi veya farklı teknikler ile mikrokapsül haline getirildikten sonra formülasyona ilave edilmeleri ile üretilebilmektedir. Bu gereklilik ekstra bir maliyet getirmekle birlikte endüstriyel ölçekte uygulamaya uygun olmamaktadır. Ancak bakteriyel sporlar ısıtma, kurutma, dondurma, toksik kimyasallar ve ışınlamaya karşı oldukça dayanıklıdır. Sporların bu stabil özellikleri onları ısı işlem uygulanan prosesler için ilgi çekici hale getirmektedir. Bakteriyel sporların fırıncılık ürünlerinde kullanımlarının en önemli avantajı herhangi ekstra bir teknik gerektirmeden üstün stabilizasyon özelliklerine sahip olmaları ve daha düşük maliyette doğal bir koruma imkânı sağlamalarıdır.

Gerçekleştirilen bu çalışmada *A. clausii* probiyotik sporlarının kek üretiminde kullanım imkanları araştırılmıştır. Çizelge 1'de sunulduğu üzere pişirme sonrasında gerçekleştirilen sayımlara göre pişirme yönteminin kek örneklerinin *A. clausii* sayısında ve canlılığında istatistiksel olarak önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir ( $p>0.05$ ). Kek örneklerinin pişirme sonrasında probiyotik spor içeriği 5.74-5.88 log kob/g aralığında tespit edilmiştir. Her ne kadar üretilen keklerde probiyotik spor sayısı, limit olarak kabul edilen 10<sup>6</sup> kob/g değerinin altında kalsa da canlılık oranları göz önünde bulundurulduğunda %79'dan fazla sporun pişirme sırasında canlılığını koruduğu tespit edilmiştir. Kek miksi içerisine ilave edilen

başlangıç spor sayısının yüksek tutulması ile limit probiyotik mikroorganizma değerinin sağlanabileceği değerlendirilmiştir. Tüm bunlara ilaveten *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi probiyotik suşların fırın sıcaklığında canlılıklarını

tamamen kaybettiği bilinmektedir (Arslan-Tontul vd., 2019). Bu nedenle *A. clausii* sporlarının probiyotik özellikte kek üretimi için iyi bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 1. Kek örneklerinin pişirme sonrası *A. clausii* sayısı ve canlılığı  
Table 1. *A. clausii* count and viability after baking of cake samples

Pişirme <i>Baking type</i>	<i>A. clausii</i> kob/g <i>A. clausii</i> cfu/g	Canlılık (%) <i>Viability (%)</i>
Normal <i>Control</i>	5.77 ± 0.13 <sup>a</sup>	80.26 ± 1.75 <sup>a</sup>
Mikrodalga <i>Microwave assisted</i>	5.88 ± 0.02 <sup>a</sup>	81.77 ± 0.33 <sup>a</sup>
Buhar <i>Steam assisted</i>	5.74 ± 0.04 <sup>a</sup>	79.81 ± 0.60 <sup>a</sup>

*Bacillus* sporlarının fonksiyonel gıda geliştirme çalışmalarında kullanımı ile ilgili her geçen gün yeni araştırmalar ortaya konulmaktadır. Ancak kek gibi fırıncılık ürünlerinde kullanımı ile ilgili oldukça kısıtlı çalışma tespit edilebilmiştir. Yapılan bir çalışmada farklı fırıncılık ürünlerinin üretimi sırasında pişirme şartlarının *Bacillus coagulans* sporlarının canlılığı üzerine etkileri araştırılmıştır. Probiyotik sporlar %5 oranında formülasyona ilave edilerek 8 farklı ürün üretimi (kurabiye, kek, ekme ve tost) gerçekleştirilmiştir. *B. coagulans* sayıları incelendiğinde ise canlılığın pişirme işleminden olumsuz etkilendiği tespit edilmiştir. Kasımpatı kurabiyeleri, yumurtalı pasta kekleri, pandispanya, sodalı kurabiyeler ve tostların *B. coagulans* sayısı ve canlılığı depolama süresi boyunca hem buzdolabı sıcaklığında hem de oda sıcaklığında azalmıştır (Jao vd., 2011). Almada-Erix vd. (2022) beyaz ekme ve tam buğday ekmeği üretiminde *B. coagulans* kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Çalışmada hamur yoğurma ve fermentasyon proseslerinin probiyotik spor canlılığını etkilemediği, ancak pişirme işleminin yaklaşık 2 logaritmik birimlik azalışa neden olduğu bildirilmiştir. Çalışmada pişirme sonrası ekmeklerin *B. coagulans* sayısının 5 log kob/g seviyesinde olduğu belirlenmiştir. Soares vd. (2019) iki farklı *B. coagulans* suşunun farklı gıda ürünlerinin üretim prosesinde kullanımı ve canlılık takibini yaptıkları çalışmalarında ekmeğin pişirilmesi sonrasında farklı suşlar için

spor canlılığını 7.4 ve 6.0 log kob/g olarak rapor etmişlerdir.

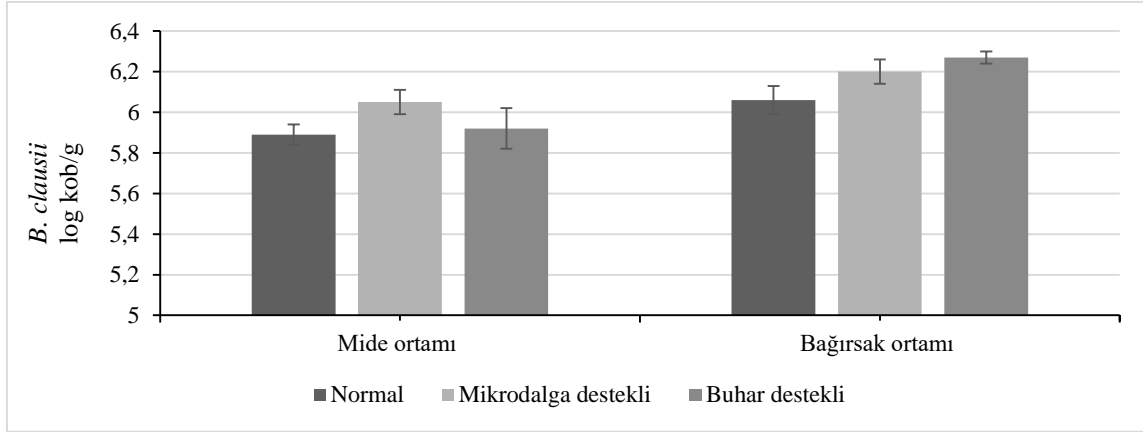
#### Kek örneklerinin içerdiği *A. clausii* Sporlarının In Vitro Sindirim Direnci

Kek örneklerinin *A. clausii* sayısı üzerinde pişirme tekniğinin bir etkisinin olmadığı tespit edilmiş olmakla birlikte temel farklılık in vitro sindirim testi sırasında görülmüştür (Şekil 1). Mide sindirimi sonucunda kek örneklerinin *A. clausii* sayısının 5.89-6.06 log kob/g seviyesinde olduğu tespit edilmiştir. 2 saatlik mide testi sonunda mikrodalga destekli pişirme ortamının bakteriyel sporların direncini kısmen arttırdığı belirlenmiştir. Tüm bunlara ilaveten üretim sonrasında elde edilen spor canlılığının in vitro mide ortamında büyük oranda korunduğu ve *A. clausii* sporlarının kek formülasyonu içerisinde mide şartlarına oldukça dirençli olduğu tespit edilmiştir.

In vitro bağırsak testi sonuçlarına göre 2 saatlik test sonucunda *A. clausii* sayısının 6.06-6.27 log kob/g aralığında olduğu tespit edilmiştir. Test sonucunda pişirme yöntem farklılığının bakteriyel sporların canlılığını etkilediği ve normal pişirmeye kıyasla mikrodalga ve buhar destekli pişirme yönteminin *A. clausii* sporlarının direncini arttırdığı tespit edilmiştir. Tüm bunlara ilaveten kek örneklerinin *A. clausii* spor sayısının bağırsak simülasyonunda artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum temel nedeninin ise spor formların vejetatif hale geçmesinden kaynaklandığı

düşünülmüştür. Çalışmada gerçekleştirilen in vitro testler, kek formülasyonunun probiyotik sporların taşınması için iyi bir araç olduğu ve kek içerisinde bulunan *A. clausii* sporlarının gastrointestinal

sistemde canlılıklarını kaybetmeyip aksine vejetatif forma geçerek çoğalabildiklerini göstermesi açısından önemlidir.



Şekil 1. Kek içerisine ilave edilmiş *A. clausii* sporlarının in vitro sindirim testi sırasında canlılıkları  
 Figure 1. The viability of *A. clausii* spor added to the cake samples during in vitro digestion test

*Bacillus* sporlarının sindirim şartlarına karşı dayanıklı olduğu çeşitli çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Ancak farklı gıda formülasyonları içerisine ilave edilmiş sporların gastrointestinal sistemdeki davranışlarını inceleyen sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Pabon vd. (2022) probiyotik ekstrüde çerez üretimini amaçladıkları çalışmalarında *B. coagulans* probiyotik sporlarını kullanmışlar ve çerezlerde 6.74 log kob/g canlılık sayısı rapor etmişlerdir. Çerez formülasyonlarının in vitro sindirim şartlarında *B. coagulans* sporlarının canlılıkları üzerine etkileri araştırılmış ve 6 saatlik test süresi sonunda %70 oranında canlılık seviyesi bildirmişlerdir. Soares vd. (2019) peynir, meyve suyu ve ekmeğin sindirim şartlarında *B. coagulans* için taşıyıcılık potansiyellerini araştırmıştır. Çalışmada in vitro sindirim şartlarında bu gıda formülasyonlarının probiyotik sporların canlılıkları üzerine etkileri araştırılmış, peynir ve ekmeğin sindirim şartlarında %91'in üzerinde canlılığı korudukları belirlenmiştir. Marcial-Coba vd. (2019) meyve ve kuruyemiş barlarının üretiminde *B. coagulans* probiyotik sporlarını kullanmış ve bu gıdaları in vitro sindirim testlerine tabi tutarak canlılıklarını takip etmiştir. Araştırmada bar örnekleri içerisindeki probiyotik sporların test sırasında yalnızca 0.02

logaritmik birimlik azalış gösterdiği ve büyük oranda korunduğu tespit edilmiştir.

#### Kek örneklerinin içerdiği *A. clausii* Sporlarının Depolama Direnci

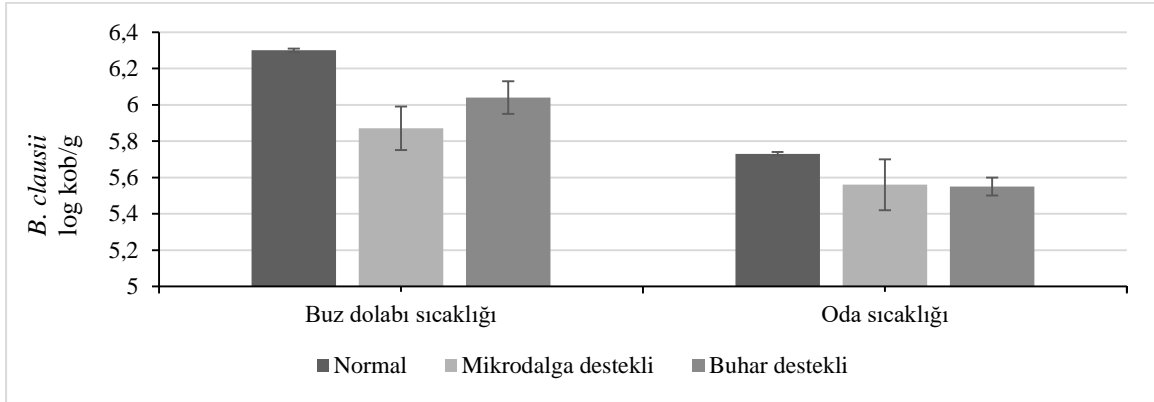
Farklı sıcaklıklarda yürütülen depolama sırasında kek örneklerinin içerdiği *A. clausii* sporlarının canlılık değerlerinin oldukça önemli oranda korunduğu tespit edilmiştir (Şekil 2). Buzdolabı ve oda sıcaklığında depolama sırasında tespit edilen *A. clausii* sayısı sırası ile 5.87-6.30 log kob/g ve 5.55-5.73 log kob/g aralığında olup pişirme tekniğinin depolama stabilitesi üzerinde istatistiki olarak önemli bir etkisinin olmadığı ( $p>0.05$ ) belirlenmiştir. Deskriptif olarak ise normal şartlarda fırınlanan kek örneklerinin spor canlılığının diğer teknikler ile üretilen kek örneklerinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca buzdolabı ortamında gerçekleştirilen depolamanın kısmen daha etkin olduğu belirlenmiştir.

Probiyotik sporların farklı depolama koşullarında oldukça stabil kalabildikleri daha önce yürütülen çalışmalarda da ortaya konulmuştur. Yapılan bir çalışmada farklı formülasyona sahip gıdaların üretiminde *B. coagulans* MTCC 5856 kullanılarak bu ürünlere fonksiyonellik kazandırılması



amaçlanmıştır. Bu amaçla kahve, şekerleme, fıstık ezmesi, çilek reçeli, bitkisel yağ, elma suyu ve şeker şurubu içerisine üretim sonrasında probiyotik sporlar karıştırılarak canlılıkları takip edilmiştir. Sonuç olarak çikolatalı şekerleme, sıcak şekerleme sosları, fıstık ezmesi, çilek reçeli ve bitkisel yağ örneklerinde spor canlılığının 12 ay sonunda %95 seviyesinde olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca buzdolabında 6 aya kadar depolanan elma suyunda ve oda sıcaklığında 24 aya kadar depolanan konsantre glikoz şurubunda da *B. coagulans* sporlarının stabil kalabildiği belirlenmiştir (Majeed vd., 2016). Almada-Erix vd. (2022) ekmek üretiminde *B. coagulans* sporlarını kullanmış

ve 10 günlük depolama süresi sonunda bakteriyel sporların vejetatif forma geçmediğini ve stabil kaldığını rapor etmişlerdir. Marcial-Coba vd. (2019) *B. coagulans* BC4 içeren meyve ve kuruyemiş barlarını 25°C'de 45 gün süresince depolamış ve süre sonunda probiyotik sporların %86 canlılık gösterdiğini tespit etmişlerdir. Soares vd. (2019) iki farklı *B. coagulans* suşunu ekmek üretiminde kullanmış ve ekmek örneklerini oda sıcaklığında 7 gün süre ile depolamışlardır. Suşlardan birisinde depolama sonucunda 0.1 log birimlik azalış (*B. coagulans* MTCC 5856) tespit edilirken diğerinde ise 0.7 log birimlik artış (*B. coagulans* GBI-306086) gözlenmiştir.



Şekil 2. Kek içerisine ilave edilmiş *A. clausii* sporlarının depolama sırasında canlılıkları  
Figure 2. The viability of *A. clausii* spores added to the cake samples during storage

### Kek örneklerinin pH ve titrasyon asitliği değerleri

Pişirme yönteminin probiyotik kek örneklerinin pH ve titrasyon asitliği değerleri üzerine istatistiksel olarak önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir ( $p>0.05$ ). Örneklerin pH değeri 7.19-7.30 ve titrasyon asitliği değeri ise %0.49-0.60 aralığında değişim göstermiştir. Pişirme öncesinde kek miksi pH ve titrasyon asitliği değeri ise 7.3 ve %0.63 olarak tespit edilmiştir. Spor ilave edilmemiş kek miksinin pH ve asitlik değerlerinin pişirme sonrası kek örneklerinde tespit edilen değerler ile aynı olması, *A. clausii* hücrelerinin kek üretimi sırasında fermentatif aktivite göstermediğini ifade etmektedir. *Bacillus coagulans* içeren farklı fırıncılık ürünlerinin geliştirilmesinin amaçlandığı bir çalışmada probiyotik sporlar %5 oranında formülasyona ilave edilerek 8 farklı ürün üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretim sonrası ürünler

iki farklı sıcaklıkta depolanmış ve örneklerin pH, titrasyon asitliği ve *B. coagulans* içeriği takip edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre pişirme işleminden sonra örneklerin pH değerinde bir miktar artış, titrasyon asitliği değerinde ise bir miktar azalış tespit edilmiştir. Bu değerlerin depolama süresince de sabit kaldığı gözlenmiştir. Bu durum fırın ürünlerindeki besinlerin *B. coagulans* tarafından kullanılmadığı ve ortamda organik asit üretiminin gerçekleşmediğini ortaya koymaktadır (Jao vd., 2011).

### SONUÇ

Bu araştırma ile *A. clausii* sporları kullanılarak probiyotik özellikle kek üretiminin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Yürütülen analizler sonucunda kekin pişirilmesi sırasında *A. clausii* sporlarının canlılığının yaklaşık %79'dan fazlasının korunduğu belirlenmiştir. Pişirme

yöntemlerindeki farklılığın ise bakteriyel sporların canlılığı üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Yine yapılan in vitro sindirim testlerinde kekin bakteriyel sporların gastrointestinal sistemde taşınması için iyi bir araç olduğu ve intestinal ortamda bir miktar sporun vejetatif forma geçebildiği belirlenmiştir. Kek örneklerinin depolanması sırasında *A. clausii* sporlarının büyük oranda stabil kaldığı ve kekin depolanması için oda sıcaklığı şartlarının da uygulanabileceği sonucuna varılmıştır. Yapılan araştırmalar sonucunda probiyotik özellikte fırıncılık ürünlerinin üretiminde *A. clausii* sporlarının kullanılabilirliği ve endüstriyel üretim hattında ekstra bir altyapı gerektirmeyerek mevcut şartlara adapte edilebileceği kanaatine varılmıştır.

### TEŞEKKÜR

Bu araştırmaya verdikleri destek nedeniyle Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (Proje no: 20401135) teşekkür ederiz.

### ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Bu makalede yazarların, diğer kişilerin ve kurumların arasında herhangi bir çıkar çatışmasının olmadığını beyan ederiz.

### YAZAR KATKILARI

Tüm yazarlar makalenin yapılmasında, yazılmasında ve yayınlanmasında eşit katkı sağlamışlardır.

### KAYNAKLAR

AACC, (1999). AACC International Method 02-52.01, 02-31.01 and 44-15.02. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, Minnesota, USA.

Almada-Erix, C. N., Almada, C. N., Pedrosa, G. T. S., Biachi, J. P., Bonatto, M. S., Schiele, M., Sant'Ana, A. S. (2022). Bread as probiotic carriers: Resistance of *Bacillus coagulans* GBI-30 6086 spores through processing steps. *Food Res Int*, 155, 111040.

Arslan-Tontul, S., Erbas, M, Gorgulu A. (2019). The use of probiotic-loaded single- and double-layered microcapsules in cake production. *Probiotics Antimicro*, 11: 840-849.

Bernardeau, M., Lehtinen, M. J., Forssten, S. D., Nurminen, P. (2017). Importance of the gastrointestinal life cycle of *Bacillus* for probiotic functionality. *J Food Sci Tech*, 54:2570–2584

Brodkorb A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carriere, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B, Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A.R., Martins, C., Marze, S., McClements, D.J., M'enard, O., Minekus, M., Portmann, R., Santos, C.N., Souchon, I., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W., Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat Protoc*, 14: 991-1014.

Di Caro, S., Tao, H., Grillo, A., Franceschi, F., Elia, C., Zocco, M. A. (2005). *Bacillus clausii* effect on gene expression pattern in small bowel mucosa using DNA microarray analysis. *Eur J Gastroen Hepat*, 17: 951–960.

Elshaghabee, F.M.F., Rokana, N., Gulhane, R.D., Sharma, C., Panwar, H. (2017). *Bacillus* As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. *Front Microbiol*, 8:1-15.

FAO 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture Organisation of the United Nations and World Health Organisation Working Group Report. Roma. FAO.

Hong, H. A., Duc, L. H., Cutting, S. M. (2005). The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol Rev*, 29:813–835.

Jao, C. J., Huangb, S. L., Wu, S. C., Chiang, H. K. (2011). The study on SFLAB GanedenBC30 viability on baking products during storage. 11th International Congress on Engineering and Food (ICEF11), 1601–1609s.

Kosak, T., Maeda, T., Nakada, Y., Yukawa, M., and Tanaka, S. (1998). Effect of *Bacillus subtilis* spore administration on activation of macrophages and natural killer cells in mice. *Vet Microbiol*, 60: 215–225.

- Majeed, M., Majeed, S., Nagabhushanam, K., Natarajan, S., Sivakumar, A., Ali, F. (2016). Evaluation of the stability of *Bacillus coagulans* MTCC 5856 during processing and storage of functional foods. *Int J Food Sci Technol*, 51:894–901.
- Marcial-Coba, M. S., Pjaca, A. S., Andersen, C. J., Knochel, S., Nielsen, D. S. (2019). Dried date paste as carrier of the proposed probiotic *Bacillus coagulans* BC4 and viability assessment during storage and simulated gastric passage. *LWT Food Sci Technol*, 99: 197-201.
- Mingmongkolchai, S., Panbangred, W. (2017). *Bacillus* probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production. *J Appl Microbiol*, 24:1334-1346.
- Muscettola, M., Grasso, G., Blach-Olszewska, Z., Migliaccio, P., Borghesi Nicoletti, C., Giarratan, M. (1992). Effects of *Bacillus subtilis* spores on interferon production. *Pharmacol Res*, 26: 176–177.
- Muscettola, M., Grasso, G., Migliaccio, P., Gallo, V. C. (1991). Plasma interferon-like activity in rabbits after oral administration of *Bacillus subtilis* spores. *J Chemotherapy*, 3: 130–132
- Pabon, K. S. M., Concha, J. L. H., Duque, J. F. S. (2022). Quinoa extruded snacks with probiotics: Physicochemical and sensory properties. *Front Sus Food Syst*, 6, 935425.
- Patrone, V., Molinari, P., Morelli, L. (2016). Microbiological and molecular characterization of commercially available probiotics containing *Bacillus clausii* from India and Pakistan. *Int J Food Microbiol*, 237: 92-97.
- Sanders, M. E., Morelli, L., Tompkins, T. A. (2003). Sporeformers as Human Probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus*. *Compr Rev Food Sci F*, 2:101-110.
- Soares, M. B., Martinez, R. C., Pereira, E. P., Balthazar, C. F., Cruz, A. G., Ranadheera, C. S., Sant'Ana, A. S. (2019). The resistance of *Bacillus*, *Bifidobacterium*, and *Lactobacillus* strains with claimed probiotic properties in different food matrices exposed to simulated gastrointestinal tract conditions. *Food Res Int*, 125: 108542.
- Spinosa, M. R., Braccini, T., Ricca, E., De Felice, M., Morelli, L., Pozzi, G., Oggioni, M. R. (2000). On the fate of ingested *Bacillus* spores. *Res Microbiol*, 151: 361-368.
- Urdaci, N. C., Bressollier, P., Pinchuk, I. (2004). *Bacillus clausii* probiotic strains antimicrobial and immunomodulatory activities. *J Clin Gastroenterol*, 38: 86-90.



**EFFECT OF FERMENTATION PROCESSES ON PHENOLIC CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY DURING PRODUCTION OF BLACK CARROT VINEGAR**

**Süeda ÖZTÜRK, Simel BAĞDER ELMACI, Filiz ÖZÇELİK\***

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

Received / Geliş: 12.10.2022; Accepted / Kabul: 29.12.2022; Published online / Online baskı: 03.01.2023

Öztürk, S., Bağder Elmacı, S., Özçelik, F. 2023. Effect of fermentation processes on phenolic content and antioxidant activity during production of black carrot vinegar. GIDA (2023) 48 (1) 25-37 doi: 10.15237/gida.GD22099

Öztürk, S., Bağder Elmacı, S., Özçelik, F. 2023. Kara havuç sirkesi üretimi sırasında fermantasyon işlemlerinin fenolik içeriği ve antioksidan aktivitesi üzerine etkisi. GIDA (2023) 48 (1) 25-37 doi: 10.15237/gida.GD22099

**ABSTRACT**

Black carrots and black carrot-derived products have gained great popularity in recent years due to their significant content of health-promoting bioactive compounds. Therefore, this study focuses on the production of vinegar from black carrot juice (BCJ) derived from black carrot juice concentrate (BCJC), to attain a food product with nutritional added value. In this study, the effect of alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and acetic acid fermentation by four different vinegar starters (grape, apple, alcohol vinegar, and the mixture of grape and apple vinegar) on some physicochemical properties (pH, total acidity, total dry matter, reducing sugar, total phenolics, and antioxidant activity) of BCJ was investigated. The results obtained indicated that processing the BCJ into black carrot wine (BCW) led to an overall reduction of only 4% in total phenolic contents, and a further decrease of 21-32% in total phenolic content was observed in black carrot vinegars (BCVs) due to the acetification process, on a weight-to-volume basis (mg/L). A similar decreasing trend was also determined for the antioxidant activity throughout the vinegar production process. Total phenolic content was not affected by inoculation with any of the seed vinegars since the difference between the total phenolic contents with respect to the four different vinegar starters was statistically insignificant ( $P > 0.05$ ). In general, the BCW and BCVs (regardless of the type of inoculum) produced in this study exhibited better bioactive properties compared to their commercial counterparts (C-BCW and C-BCV). In conclusion, vinegar was successfully produced from black carrot by retaining a considerable amount of its nutraceutical components.

**Keywords:** Black carrot, vinegar, total phenolic content, antioxidant activity

\* Corresponding author/ Yazışmalardan sorumlu yazar

✉:fozcelik@ankara.edu.tr

☎: (+90) 312 203 3300 / 3608

☎: (+90) 312 317 8711

Süeda Öztürk; ORCID no: 0000-0002-3533-8111

Simel Bağder Elmacı; ORCID no: 0000-0002-0506-8931

Filiz Özçelik; ORCID no: 0000-0002-8991-4057

## KARA HAVUÇ SİRKEŞİ ÜRETİMİ SIRASINDA FERMANTASYON İŞLEMLERİNİN FENOLİK İÇERİĞİ VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

### ÖZ

Kara havuç ve kara havuç türevi ürünler, sağlık üzerine olumlu etkili biyoaktif bileşenleri içermeleri nedeniyle, son yıllarda büyük popülerlik kazanmıştır. Bu nedenle, bu çalışmada, besin değeri yüksek bir gıda ürünü elde etmek amacıyla kara havuç suyu konsantresinden (BCJC) elde edilen kara havuç suyunun (BCJ) sirke üretiminde kullanılması üzerinde durulmuştur. Bu çalışmada, *Saccharomyces cerevisiae* ile gerçekleştirilen alkol fermantasyonunun ve dört farklı sirke starteri (üzüm, elma, alkol sirkesi ve üzüm ve elma sirkesi karışımı) ile başlatılan asetik asit fermantasyonunun, kara havuç suyunun pH, toplam asitlik, kuru madde, indirgen şeker, toplam fenolik madde, antioksidan aktivite değeri gibi bazı fizikokimyasal özellikleri üzerine etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar (ağırlık/hacim bazında (mg/L)), kara havuç suyunun (BCJ) kara havuç şarabına (BCW) işlenmesinin toplam fenolik içeriklerinde yalnızca %4'lük bir azalmaya yol açtığını göstermiştir. Ayrıca, kara havuç sirkesinde (BCV), asetikasyon işlemine bağlı olarak, toplam fenolik içeriğinde %21-32'lik bir azalmanın daha olduğu belirlenmiştir. Sirke üretim süreci boyunca antioksidan aktivite için de benzer bir azalma eğilimi belirlenmiştir. Dört farklı sirke starteri ile üretilen sirke örneklerinin toplam fenolik içerikleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz olduğundan ( $P > 0.05$ ), farklı sirke starterleri ile inokülasyonun toplam fenolik madde miktarını etkilemediği sonucuna varılmıştır. Genel olarak, bu çalışmada üretilen kara havuç şarabı (BCW) ve kara havuç sirkesi (BCV), inokulum türünden bağımsız olarak, ticari muadillerine (C-BCW ve C-BCV) kıyasla daha iyi biyoaktif özellikler göstermiştir. Sonuç olarak, nutrasötik bileşenlerinin önemli bir miktarı korunarak kara havuçtan başarılı bir şekilde sirke üretimi gerçekleştirilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Kara havuç, sirke, toplam fenolik madde, antioksidan aktivite

### INTRODUCTION

The increasing awareness of consumers towards the consumption of healthier products has led to an increasing interest in developing novel products with improved functional characteristics in comparison to traditional products (Kandyliş, 2020). The same trend also applies to vinegar production (industry and research), and a number of studies have been conducted with the goal of diversifying vinegar products (Tang et al., 2020). In this sense, various types of alternative vinegars have been produced by using novel raw materials such as fruit and agri-food wastes. Apart from the conventional raw materials like grape, raisin, apple, cereals, different fruit and vegetable sources, such as watermelon, tomato, orange, pomegranate, star fruit berry, mango, onion, have been used as alternative raw materials to produce novel types of vinegars with enhanced nutritional and organoleptic quality (Kandyliş, 2020).

The starting material used in the vinegar production is one of the most important factors that determine the quality of the finished vinegar

since many of the flavor, aroma and other organoleptic properties of the finished vinegar are derived from the starting material (Hutkins, 2019). Theoretically, any sugar, starch or ethanol-containing material can serve as a substrate for the vinegar fermentation. Accordingly, vinegar can be obtained from almost any fermentable carbohydrate source through a two-step fermentation process. In the first step, fermentable sugars are converted into ethanol by the metabolic activity of yeasts (mainly by strains of *Saccharomyces cerevisiae*) under anaerobic conditions. In the second step, ethanol is oxidized to acetic acid aerobically by bacteria of the genera *Acetobacter* and *Gluconobacter* (Adams and Moss, 2008; Hutkins, 2019; Kandyliş, 2020). The final quality of vinegars, as determined by the chemical, nutritional and organoleptic properties, mainly depend on the factors including the selection of the suitable starter cultures, the quality of the starting material, the production method, and the aging process, if applicable (Mas et al., 2014). As a result, this research was carried out in order to use black carrot juice as a raw material for the

production of vinegar, thereby providing the functional benefits of both the substrate and the fermentation process. This raw material was selected mainly in order to increase the content of phenolic compounds and the antioxidant activity of the produced vinegar.

Black carrot (*Daucus carota* L. ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef) has received considerable attention in recent years since it constitutes a variety of bioactive phytochemicals such as vitamin C, E and phenolic compounds which are known for their antioxidant activities. The prominent feature of black carrots is their intense purple color, which is caused by the presence of anthocyanins (Algarra et al., 2014). Black carrots are often not consumed as fresh (Kamiloglu et al., 2018) but are rather processed into other products such as juice, concentrate and shalgam (Türkyılmaz et al., 2012). In terms of fermented black carrot juice, shalgam is a highly popular traditional lactic acid fermented beverage in which black carrot, bulgur flour, sourdough, salt, turnip, and water are used for production (Erten et al., 2008). Therefore, most of the studies with regard to fermented beverages in which the main ingredient is black carrot, is based on shalgam produced by lactic acid fermentation. (Turker et al., 2004; Ekinçi et al., 2016; Agirman and Erten, 2018). The black carrot vinegar, although not common as traditional types of vinegars, is available on the market. However, there are no published scientific research on this novel type of vinegar. Since black carrots are generally consumed after being processed into various products, it is important to investigate how processing influences the health-associated phytochemicals, such as phenolics, especially anthocyanins (Suzme et al., 2014). In this regard, although several studies have been conducted to examine the effects of food processing, including enzyme-assisted processing (Khandare et al., 2011), juice processing involving clarification and pasteurisation (Türkyılmaz et al., 2012), concentrate processing (Suzme et al., 2014) on black carrot phenolics, there is lack of studies addressing the fermentation-induced changes in bioactive compounds potentially contributing to the health-promoting properties of black carrots.

Only in a study conducted by Kocher et al. (2016), the change of total phenolic content and anthocyanins by the alcoholic fermentation process of black carrots was investigated. With regard to the effect of lactic acid fermentation on the beneficial compounds of black carrots, Toktaş et al. (2018) reported increase in total phenolic content, total flavonoid content, anthocyanins content and total antioxidant capacity of shalgam beverages during the progress of fermentation, albeit lower than in the black carrots. Similarly, Alagöz Kabakçı et al. (2022) indicated that fermentation of black carrot juice using kefir culture resulted in increase in the total anthocyanin content, probably due to the pectinolytic activity of lactic acid bacteria. In a similar manner to our study, many studies have been carried out to investigate the effects of alcoholic and acetic acid fermentation on antioxidant activities and phenolic substances of different raw materials for vinegar production, such as grape, apple (Bakir et al., 2016), strawberry (Ubeda et al., 2013; Hornedo-Ortega et al., 2017), cherry (Budak, 2017), pomegranate (Ordoudi et al., 2014; Kharchoufi et al., 2018), orange (Davies et al., 2017), blueberry (Su and Chien, 2007), papaya (Kong et al., 2018) and tomato (Koyama et al., 2017). In terms of the changes in functional compounds during vinegar production, a high diversity of patterns was observed in these studies, because of the differences in the raw material used, the starter strains and the fermentation conditions. For example, during the conversion of papaya juice into vinegar, the total phenolic contents and antioxidant activities increased throughout the process (Kong et al., 2018), while in another case, the process from grape and apple wine to grape and apple vinegar resulted in loss of antioxidant phenolic compounds (Bakir et al., 2016). However, studies addressing alterations in functional compounds of black carrots during acetification process are still lacking.

Vinegar fermentations are traditionally induced by the use of the so-called “seed vinegar” or “mother of vinegar” that is composed of an undefined culture withdrawn from previous fermentations through back-slopping methods. To the best of

our knowledge, there is no single study in the literature that has examined the effect of vinegar starters on the quality of vinegars.

Taking all above into account, the aim of this study was to analyze changes in total phenolics and antioxidant activity during a laboratory-scale production of black carrot vinegar. Furthermore, this study was conducted with the aim of determining the possible effect of different seed vinegars (grape, apple, alcohol vinegar, and the mixture of grape and apple vinegar) on some physicochemical properties of the finished vinegars.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Black carrot juice concentrate (BCJC) was kindly obtained from a commercial company located in Konya (ERKON Concentrate Industry and Trade Inc.). A wine yeast strain, *Saccharomyces cerevisiae* Narince 3, which was maintained in the Culture Collection of Ankara University Department of Food Engineering, was used to carry out the alcoholic fermentation of the black carrot juice (BCJ). High acidity grape, apple and alcohol vinegar were used as inoculums in order to initiate acetic acid fermentation of black carrot wines (BCW). These inoculum vinegars as well as commercial black carrot juice, black carrot wine and black carrot vinegar samples were kindly provided from a commercial company located in Ankara (Yeni Kavaklıdere).

### Alcoholic Fermentation of Black Carrot Juice

For the alcoholic fermentation of the BCJ, the indigenous wine yeast strain, *S. cerevisiae* Narince 3 (Bağder Elmacı et al., 2014) was initially activated in 10 mL of YPG Broth (10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, 20 g/L glucose; pH 4.5) at 28 °C. Subsequently, the activated yeast cultures were transferred to 50 mL of YPG Broth. After the culture activation, a two-stage adaptation was applied in order to adapt the yeast to the black carrot juice environment. For this purpose, the BCJC at about 65° Brix was diluted to 27-28° Brix. For the first adaptation stage, 50 mL of diluted BCJ was mixed with 50 mL of yeast

cultures in YPG Broth and incubated at 28 °C. The yeast growth was observed after the first adaptation step. Then, the second stage of adaptation was performed by adding 250 mL of yeast cultures in YPG Broth to 750 mL of black carrot juice. In order to start alcoholic fermentation, 9 L of BCJ (approximately 22° Brix) was inoculated with 1 L of adapted yeast culture. The fermentation was carried out at 28 °C for 3 days.

### Acetic Acid Fermentation of Black Carrot Wine

After the alcoholic fermentation of the reconstituted BCJC, the obtained BCW was inoculated with four different vinegar starters at 25% (v/v) inoculum size to conduct acetic acid fermentation by surface culture acetification. The four inoculums included grape, apple, alcohol vinegar, and the mixture of grape and apple vinegar. The black carrot vinegar samples inoculated with grape, apple, alcohol vinegar, and the mixture of grape and apple vinegar were coded as G-BCV, AP-BCV, AL-BCV and M-BCV, respectively. The BCW samples inoculated with different types of vinegars were then incubated at 30 °C in an incubator aerated continuously with an aquarium pump. Acetic acid fermentation was monitored by measuring pH value and total titratable acidity. Acetic acid fermentation was lasted for 35 days. The obtained vinegars were filtered through a roughing filter and then stored at 4 °C for subsequent analysis. Prior to analysis, the samples were filtered through a 0.45 µm PVDF (polyvinylidene fluoride) filter (Millipore, Bedford, MA, USA).

### Analytical Measurements

The pH values of the samples were measured potentiometrically at 20 °C by using a pH meter (Mettler Toledo, S-20K, Switzerland). Total titratable acidity was determined by titrating an aliquot of the sample with standard NaOH solution to the end point of pH 8.5 using phenolphthalein as an indicator. Total titratable acidity (g/100 mL) was expressed as citric or acetic acid equivalent (Aktan and Yıldırım, 2011). Total solid contents of the samples were determined gravimetrically in g/L (Aktan and

Yıldırım, 2011). The reducing and total sugar contents were determined according to a modified Miller method using DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) (Forouchi and Gunn, 1983). Ethanol content was analyzed using gas chromatography (Shimadzu GC-2010 Plus, Kyoto, Japan) equipped with flame ionization detector (FID). One microliter of filtered samples was automatically injected into the GC system via autosampler (Shimadzu AOC-20S, Kyoto, Japan). TRB-WAX capillary column with length of 30 m and internal diameter of 0.25 mm was used. The column oven, injection and detector temperatures were set at 220, 250 and 230 °C, respectively. Nitrogen, and a mixture of hydrogen and air were used as the carrier and fuel gas, respectively.

The antioxidant activity assay was performed by using DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical scavenging method as described by Molyneux (2004). This method was based on the measurement of the decrease in colour spectrophotometrically at 517 nm as a result of reduction of violet stable radical DPPH after the reaction with test compound. The DPPH free radical lost its intense violet colour and turned to yellow due to the reduction reaction, when mixed with the sample having antioxidant activity. For the DPPH assay, appropriately diluted test sample was mixed with 1 mM DPPH solution. The absorbance was measured at 517 nm after 30 min of reaction at room temperature in the dark. The parameter EC50 (“efficient concentration” value) was used for the interpretation of the results from the DPPH method. The EC50 is defined as the concentration of substrate that causes 50% loss of the DPPH activity (colour). Therefore, the lower EC50 value shows the higher antioxidant activity.

The total phenolic contents of the samples were determined in accordance with the Folin-Ciocalteu method of Singleton and Rossi (1965). Briefly, 75 mL of distilled water was put into 100 mL volumetric flask and 1 mL of appropriately diluted sample was added. Subsequently, 5 mL of Folin-Ciocalteu reagent was added to the sample solution and the mixture was allowed to react for 3 min. Then, 10 mL of saturated Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solvent was added and made up to the flask line with distilled water. The thoroughly mixed sample was

allowed to incubate for 60 min and then the absorbance was determined against a blank at 720 nm using a spectrophotometer (Shimadzu UV-1208). The concentration of total phenolics was determined by using the standard curve of gallic acid and expressed as “mg gallic acid equivalent/L (mg GAE/L)”.

The colour measurements were performed by using a light reflectance spectrophotometer (Minolta CM-3600d, Osaka, Japan). Measurements were recorded in L\* (lightness), a\* (redness), b\* (yellowness) colour coordinates as defined by CIE (Commission Internationale de l'Éclairage). The spectrophotometer was calibrated with a white ceramic plate using an illuminant C source. 1 cm path length quartz cuvettes with a total volume of 10 ml were used for colour measurements. C\* (chroma) and h° (hue) values were calculated on the basis of the following equations:

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

$$h^{\circ} = \arctan (b^* / a^*)$$

#### Statistical analysis

All vinegar experiments were performed in three independent replicates. The experimental data were expressed as mean ± standard deviation (SD) and statistically analyzed by one-way ANOVA using the Minitab Software Version 17 (Minitab Inc., State College, PA, USA) followed by the Duncan's multiple comparison test at the 5% level.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Physicochemical Properties of Black Carrot Juice

Table 1 shows the pH, total titratable acidity, total solid content and reducing sugar concentration of BCJ (raw material), BCW (interim product) and BCV (final product) samples. pH values of BCJ and BCW samples were found as 3.72 and 3.85, respectively. pH values of vinegar samples inoculated with different seed vinegars ranged from 3.70 to 3.75 with an average of 3.72, in accordance with the commercial vinegar sample (C-BCV) with pH of 3.77. In accordance with our results, Baysal et al. (2013) reported that the pH



value of the black carrot juice with Brix of 9.10 was 3.85. In other previous studies, depending on the Brix value, different pH values were reported for black carrot juice. Kırca et al. (2007) found the pH of black carrot juice with a Brix of 10.8 to be 6.0; Dereli et al. (2010) found the pH of black carrot juice to be 4.35, with a °Brix of 11.02. As can be seen from Table 1, the acidity of BCJ was found to be 2.4 g/100 mL, which was also same for C-BCJ.

The total solid content (g/L) of the samples were determined to calculate the results on a dry weight basis. Since one of the aims of this study was to

evaluate the effects of vinegar processing on total phenolic content, it was important to give the total phenolic content results on a dry weight basis in order to make comparisons more reliable.

Alasalvar et al. (2001) reported that the main soluble fermentable sugars of black carrot are sucrose (1.96-4.11 g/100 g), followed by glucose (0.69-1.77 g/100 g) and fructose (0.58-1.47 g/100 g). The total sugar concentration in BCJ samples was considerably higher ( $49.73 \pm 0.06$  g/L) since BCJ diluted from concentrate (BCJC) was used in this study.

Table 1. Physicochemical analysis of black carrot juice, wine and vinegar samples

Samples	pH	Total titratable acidity (g/100 mL) <sup>a</sup>	Total solid content (g/L)	Reducing sugar (g/L)	L*	a*	b*	C*	h°
BCJ	3.72	2.40	$217.57 \pm 1.82$	$49.73 \pm 0.06$	0.47	1.51	0.82	1.71	28.45
BCW	3.85	2.43	$106.22 \pm 1.71$	$13.66 \pm 0.18$	0.40	2.23	0.42	2.32	18.99
G-BCV	3.70	6.78	$59.43 \pm 0.71$	$17.27 \pm 0.45$	0.11	0.47	0.12	0.59	85.62
AP-BCV	3.75	6.28	$65.09 \pm 3.84$	$21.74 \pm 1.03$	0.16	0.83	0.17	0.90	64.70
AL-BCV	3.70	6.91	$67.31 \pm 2.33$	$17.78 \pm 0.43$	0.25	1.37	0.26	1.43	79.13
M-BCV	3.72	6.53	$65.11 \pm 1.39$	$19.34 \pm 0.63$	0.13	0.57	0.13	0.69	84.37
C-BCJ	3.60	2.40	$132.00 \pm 2.26$	$54.85 \pm 0.49$	0.14	0.62	0.17	0.74	76.56
C-BCW	3.65	2.40	$73.95 \pm 0.07$	$6.69 \pm 0.18$	0.19	1.02	0.24	1.14	74.67
C-BCV	3.77	4.00	$35.13 \pm 0.53$	$6.27 \pm 0.13$	0.24	1.27	0.33	1.40	71.52

<sup>a</sup>The total titratable acidity (g/100 mL) of BCJ and BCW samples is expressed as citric acid equivalent, while that of BCV samples is expressed as acetic acid equivalent.

In the study, L\*, a\*, b\*, C\* and h° values of black carrot juices were measured (Table 1). In the CIE L\* a\* b\* system, the L\* value is defined as the degree of lightness and this value varies between 0 (black) and 100 (white). The measured L\* value is quite close to zero, which indicates that the color is black. Although positive a\* values indicate red color, Özkan (2009) reported that the measurement method was not suitable for determining the reflectance color values (L\*, a\*, b\*, C\*, and h°) of black carrot juice at different production stages. Consequently, he stated that it would be more precise to measure the reflectance color values after adjusting the pH of black carrot juice to between 1.5 and 2, where anthocyanins exhibit the most redness.

#### Change in total phenolic content and antioxidant activity during the alcoholic and acetic acid fermentation processes

The total phenolic contents of the BCJ, BCW and BCV samples were determined by Folin-Ciocalteu method and the corresponding results are given in Table 2. The total phenolic contents of BCJ (9820 mg/L) and the black carrot juice obtained from the commercial company (C-BCJ) (5625 mg/L) in this study were higher than those reported by previous studies. In other studies, the total phenolic content was 3000 mg GAE/L (Khandare et al., 2011); 1785 mg GAE/L (Ekinci et al., 2016) in different black carrot juice samples. The reported total phenolic content of BCJ samples varied amongst different studies,

probably due to the differences in total solid content. Considering that the BCJ used in this study had a higher solid content (217.57 g/L) compared to that of other studies (generally around 10-12°Brix), it was an expected result that the total phenolic concentrations would be higher. For instance, the total phenolic content of BCJ with a °Brix of 11.02 was reported to be 3037 mg GAE/L (Dereli et al., 2015). In addition, the magnitude of total phenolic content in BCJ was higher than those reported for other phenolic-rich raw materials (e.g. pomegranate juice, cherry juice,

blueberry juice) that have been used for vinegar production. The total phenolic content values reported for pomegranate, cherry and blueberry juices were 1387 mg GAE/L (Ordoudi et al., 2014), 854.79 mg GAE/L (Budak, 2017) and 867 mg GAE/L (Su and Chien, 2007), respectively. It was also found that the BCW as well as BCVs (regardless of the type of inoculum) produced in this study exhibited significantly higher total phenolic content as compared to their commercial counterparts (C-BCW and C-BCV).

Table 2. Changes in total phenolic content during acetification

Samples	Total phenolic content (mg GAE/L)	Total phenolic content (mg GAE/g; on dry weight basis)	Antioxidant activity (EC <sub>50</sub> DPPH; µL sample)
BCJ	9820±254.56 <sup>a</sup>	45.13±1.17 <sup>g</sup>	2.90±0.07 <sup>e</sup>
BCW	9460±28.28 <sup>b</sup>	89.06±0.27 <sup>e</sup>	3.14±0.08 <sup>de</sup>
G-BCV	7720±135.06 <sup>c</sup>	129.90±2.48 <sup>a</sup>	3.38±0.13 <sup>d</sup>
AP-BCV	6640±245.60 <sup>d</sup>	102.01±3.92 <sup>d</sup>	3.86±0.18 <sup>c</sup>
AL-BCV	7620±140.29 <sup>c</sup>	113.21±1.67 <sup>b</sup>	3.21±0.05 <sup>de</sup>
M-BCV	7583±109.85 <sup>c</sup>	116.47±1.70 <sup>b</sup>	3.42±0.22 <sup>d</sup>
C-BCJ	5625±35.36 <sup>e</sup>	42.61±0.27 <sup>g</sup>	4.37±0.14 <sup>b</sup>
C-BCW	5313±17.68 <sup>e</sup>	71.84±0.24 <sup>f</sup>	4.39±0.18 <sup>b</sup>
C-BCV	3800±28.28 <sup>f</sup>	108.17±0.81 <sup>c</sup>	6.81±0.03 <sup>a</sup>

Data are expressed in mean ± standard deviation.

Means with a different lower case letter in the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ).

The total phenolic content of BCJ (9820 mg/L) was found to be higher than that of BCW (9460 mg/L) and BCV (ranging from 6640 to 7720 mg/L) samples in this study ( $P < 0.05$ ), indicating an overall reduction by only 4% and 21-32% due to alcoholic and acetic acid fermentation processes, respectively. A similar decreasing tendency was also reported for red and white cherry juices during vinegar production (Budak, 2017). In case of commercial black carrot products used in this study, there was a non-significant, but slight difference between C-BCJ and C-BCW samples, whereas the total phenolic content of C-BCV was significantly lower than those of C-BCJ and C-BCW. The results of this study were in agreement with Kharchoufi et al. (2018) who showed slight decrease (only around 10%) in total polyphenol content in pomegranate juice after both alcoholic and acetic acid fermentation. Similarly, Ordoudi et al. (2014)

reported that the initial total phenolic content of pomegranate juice was completely retained after alcoholic fermentation and was only reduced by 10% as a result of acetification process. Hornedo-Ortega et al. (2017) showed a decrease in total phenolics due to acetification process (91%) to a larger extent than alcoholic fermentation (19%) during strawberry vinegar production. In case of lactic acid fermentation, Ekinici et al. (2016) reported a significant reduction by 71% in total phenolic content of fresh black carrot juice (1785 µg GAE/mL) after processing into fermented black carrot juice, shalgam (517 µg GAE/mL).

Significant changes in total solid content occur in the vinegar production process due to the consumption of sugars by fermentative yeast and acetic acid bacteria. Therefore, in order to make comparisons more reliable, the total phenolic content results were also given on a dry weight

basis. When total phenolic content results are expressed on a dry weight basis, it is clear that an increase in total phenolic content was observed during the transition from BCJ to BCW as well as from BCW to BCV (Table 2).

The changes in antioxidant activity as measured by the DPPH method during BCV manufacturing are shown in Table 2. In accordance with total phenolic content data (on weight-to-volume basis (mg/L)), vinegar processing resulted in decreases in total antioxidant capacity, determined using DPPH. Also, a strong correlation was found between total phenolic content (mg GAE/L) and antioxidant activity ( $EC_{50}$ ) ( $r = -0.89$ ). In the case of pomegranate vinegar production, Kharchoufi et al. (2018) also reported that the antioxidant activity as measured by the DPPH assay decreased by 17.6% after alcoholic fermentation and by a further 9.1% after acetic acid fermentation. It was observed that the  $EC_{50}$  value, which shows antioxidant activity, increased by alcoholic fermentation of BCJ into BCW and acetic acid fermentation of BCW to BCV. There is an inverse relationship between  $EC_{50}$  value and antioxidant activity. A decrease occurred in the antioxidant activity of vinegars, as high  $EC_{50}$  value indicates low antioxidant activity. In consistent with the total phenolic results, it was also found that the BCW as well as BCVs (regardless of the type of inoculum) produced in this study showed significantly higher antioxidant capacity as compared to their commercial counterparts (C-BCW and C-BCV).

#### Monitoring of Acetic Acid Fermentation

The interim product with 3.72 g/100 mL (v/v) alcohol (BCW) that was obtained by the alcoholic fermentation of BCJ was divided into four batches (data not shown). Then, each batch was inoculated with four different vinegar starters at a 25% (v/v) inoculum size to conduct acetic acid fermentation by surface culture acetification. In order to monitor the progress of acetic acid fermentation, pH and titratable acidity were measured at 5-day intervals. Figure 1 represents the pH values and total titratable acidity (as g/100 mL acetic acid) during the course of acetic acid fermentation of BCW. In the present study, surface film formation (mother of vinegar) was

observed after 5 days in samples incubated at 30 °C, and acetic acid fermentation was terminated when the alcohol concentration dropped below 0.5% (v/v) after 35 days. In his study on the production of vinegar from Dimrit grapes, Ünal (2007) reported that on the eighth day of acetic acid fermentation, a film formed on the surface of all samples and that the fermentation lasted 37 days in two of the trials and 47 days in one.

As seen in Figure 1A, during the course of acetification, there was not a considerable increase or decrease in the pH values of the vinegar groups produced by using four different inoculums. No significant difference was found between the pH values of day 0 and day 35.

As shown in Figure 1B, an increase was observed in the total acidity values of G-BCV, AP-BCV, AL-BCV and M-BCV samples until the 35th day when fermentation is terminated. Since the acidity of black carrot juice was high, it could be said that the high initial acidity values were due to the raw material. During the course of acetic acid fermentation, the highest increase in acidity was observed between the 5th and 10th days of fermentation.

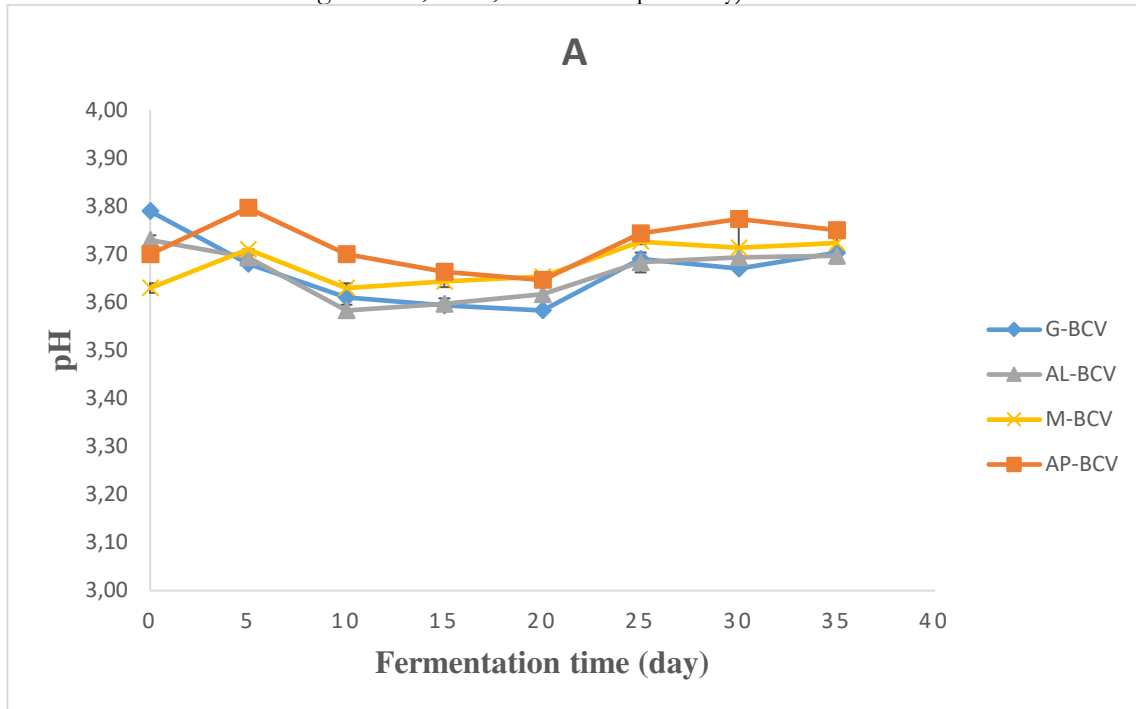
#### Properties of Marketable BCVs

The pH, total dry matter, reducing sugar content and total phenolic contents of marketable BCVs which were reconstituted to 4 g/100 mL acidity, were varied between 3.70 and 3.75, 35.11 and 41.46 g/L, 9.37 and 13.86 g/L and 4232 and 4655 mg GAE/L, respectively (Table 3). According to the Turkish Standards Institution TS 1880 EN 13188 vinegar standard, the total acid content (as free acetic acid in water) of the vinegar produced in our country should not be less than 40 g per liter. Therefore, in the final product, water was added to adjust the acid concentration to 4%.

The pH values of four different groups of BCV obtained by applying the slow method vary between 3.70 and 3.75. The pH of C-BCV obtained from the factory was found to be 3.77, which would be close to these values (Table 3 and 1). Ünal (2007) reported that the pH of wine vinegars produced from grapes varied between 2.68 and 2.85. Akbaş (2008) stated in his study

that the pH of grape vinegars varied between 2.63 and 3.27. Gerbi et al. (1998) reported that the average pH value in apple cider vinegar was 3.00. The reason why the pH values of BCVs were significantly higher than the pH values of other vinegars could be explained by the high dry matter ratios of black carrot vinegars and, thus, the

presence of components with more buffering properties in this high dry matter composition. The dry matter contents of the vinegars produced in this study were found to be higher than those found in other studies by Ünal (2007) and Akbaş (2008) (10.85-12.60 g/L and 8.75-17.5 g/L, respectively).



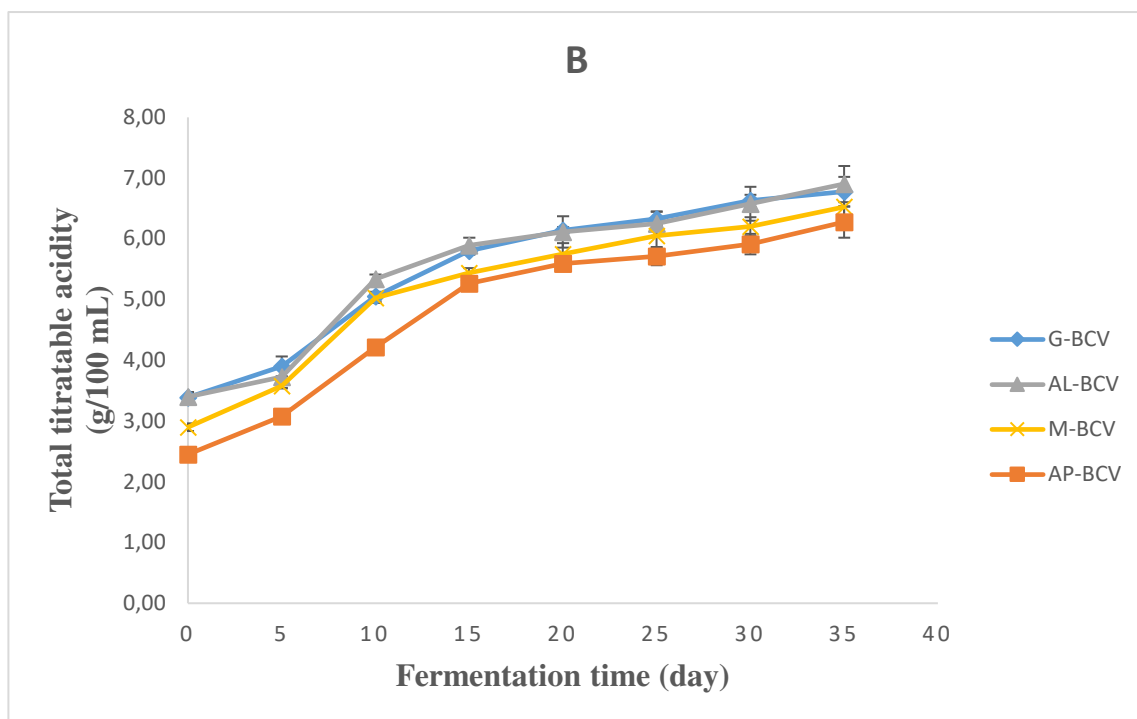


Figure 1. A) pH values and B) total titratable acidity (as g/100 mL acetic acid) during the course of acetic acid fermentation of BCW

Table 3. Values for black carrot vinegars available for sale

Samples	pH	Total solid content (g/L)	Reducing sugar (g/L)	Total phenolic content (mg GAE/L)
G-BCV	3.70±0.02 <sup>b</sup>	35.11±0.89 <sup>b</sup>	10.11±0.55 <sup>bc</sup>	4563±251.73
AP-BCV	3.75±0.01 <sup>a</sup>	41.46±1.05 <sup>a</sup>	13.86±0.70 <sup>a</sup>	4232±28.49
AL-BCV	3.70±0.02 <sup>b</sup>	39.08±3.14 <sup>a</sup>	9.37±2.17 <sup>c</sup>	4421±257.03
M-BCV	3.72±0.01 <sup>b</sup>	39.93±0.84 <sup>a</sup>	11.87±0.83 <sup>ab</sup>	4655±270.84

The pH, total dry matter, reducing sugar content, and total phenolic contents of BCVs were determined after adjusting the acid concentration to 4 g/100 mL, in accordance with the Turkish Standards Institution TS 1880 EN 13188 vinegar standard.

Data are expressed in mean ± standard deviation.

Means with a different lower case letter in the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ).

Total phenolic content was not affected by inoculation with any of the seed vinegars since the difference between the total phenolic contents with respect to the four different vinegar starters (grape, apple, alcohol vinegar, and the mixture of grape and apple vinegar) was statistically insignificant ( $P > 0.05$ ). Although not statistically significant, in comparison with other final vinegars, AP-BCV had lower phenolic content,

which might be related to the differences in their pH and total solid content.

## CONCLUSION

The primary aim of this study was to determine the effects of fermentation processes involved in vinegar production on the content of total phenolics and antioxidant activity of BCJ. In addition, the effect of different vinegar starters on

the quality of vinegars was also evaluated. BCVs were successfully produced from industrially processed BCJCs in order to take advantage of their nutraceutical components. The results obtained indicated that processing the BCJ into black carrot wine (BCW) led to an overall reduction of only 4% in total phenolic contents, and a further decrease of 21-32% in total phenolic content was observed in black carrot vinegars (BCVs) due to the acetification process, on a weight-to-volume basis (mg/L). Moreover, when the total phenolic calculations were made on a dry-weight basis to compensate for changes in dry matter content due to fermentation processes, an increase in total phenolic content was observed throughout the vinegar processing. With regard to the effect of different seed vinegars, the difference in total phenolic contents was statistically insignificant. In conclusion, the results of this study pointed out the potential of BCV to obtain an added-value product that will increase the variety of functional products on the market.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared no conflict of interest.

#### AUTHORS' CONTRIBUTIONS

This study was a part of master thesis of Süeda Öztürk, approved in Ankara University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Food Engineering, Ankara, Turkey. Süeda Öztürk performed the experiments and interpreted the results. The manuscript was written by Simel Bağder Elmacı. Simel Bağder Elmacı also participated in laboratory analyses. Filiz Özçelik made the experimental design and contributed to the writing and revision of this manuscript.

#### REFERENCES

Adams, M.R., Moss, M.O. (2008). *Food Microbiology*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 310-369.

Agirman, B., Erten, H. (2018). The influence of various chloride salts to reduce sodium content on the quality parameters of şalgam (shalgam): a traditional Turkish beverage based on black carrot. *Journal of Food Quality*, Volume 2018, Article ID 3292185, 11 pages.

Akbaş, M. (2008). Ülkemizde üretilen üzüm sirkelerinin bileşimleri ve gıda mevzuatına uygunlukları üzerine bir araştırma. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Adana, 58 s. [in Turkish].

Aktan, N., Kalkan Yıldırım, H. (2011). Sirke Teknolojisi. Sidas Medya, İzmir, 83 s. [in Turkish].

Alagöz Kabakçı, S., Türkyılmaz, M., Özkan, M. (2022). Effects of fermentation time and pH on quality of black carrot juice fermented by kefir culture during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102: 2563-2574.

Alasalvar, C., Grigor, J.M., Zhang, D., Quantrick, P. C. and Shadidi, F. (2001). Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 1410-1416.

Algarra, M., Fernandes, A., Mateus, N., de Freitas, V.B., Joaquim C.G. Esteves da Silva, J.C.G.E., Casado, J. (2014). Anthocyanin profile and antioxidant capacity of black carrots (*Daucus carota* L. ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) from Cuevas Bajas, Spain. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33: 71-76.

Bağder Elmacı, S., Özçelik, F., Tokatlı, M., Çakır, İ. (2014). Technological properties of indigenous wine yeast strains isolated from wine production regions of Turkey. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105: 835-847.

Bakir, S., Toydemir, G., Boyacıoğlu, D., Beekwilder, J., Capanoğlu, E. (2016). Fruit antioxidants during vinegar processing: changes in content and in vitro bio-accessibility. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1658, pages 1-12.

Baysal, T., Demirdöven, A., Ergün, A.R. (2013). Kara havuç suyu üretiminde elektroplazmoliz ve mikrodalga uygulamalarının verim ve kalite özellikleri üzerine etkileri. *GIDA*, 38(5): 291-298. [in Turkish].

Budak, N.H. (2017). Bioactive components of *Prunus avium* L. black gold (red cherry) and *Prunus avium* L. stark gold (white cherry) juices, wines and

- vinegars. *Journal of Food Science and Technology*, 54(1):62-70.
- Davies, C.V., Gerard, L.M., Ferreyra, M.M., Schvab, M.C., Solda, C.A. (2017). Bioactive compounds and antioxidant activity analysis during orange vinegar production. *Food Science and Technology, Campinas*, 37(3): 449-455.
- Dereli, U. (2010). Siyah havuç suyu konsantresi üretimi ve depolanması sürecinde fenolik maddelerdeki değişimler ve bu değişimlerin antioksidan aktivite ile ilişkisi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 69 s. [in Turkish].
- Dereli, U., Türkyılmaz, M., Yemiş, O., Özkan, M. (2015). Effects of clarification and pasteurization on the phenolics, antioxidant capacity, color density and polymeric color of black carrot (*Daucus Carota* L.) juice. *Journal of Food Biochemistry*, 39: 528-537.
- Ekinci, F.Y., Baser, G.M., Özcan, E., Güçlü Üstündağ, Ö., Korachi, M., Sofu, A., Blumberg, J.B., Oliver Chen, C.Y. (2016). Characterization of chemical, biological, and antiproliferative properties of fermented black carrot juice, shalgam. *European Food Research and Technology*, 242:1355-1368.
- Erten, H., Tanguler, H., Canbaş, A. (2008). A traditional Turkish lactic acid fermented beverage: shalgam (salgam). *Food Reviews International*, 24: 352-359.
- Forouchi, E., Gunn, D.J. (1983). Some effects of metal ions on the estimation of reducing sugars in biological media. *Biotechnology and Bioengineering*, 25: 1905-1911.
- Gerbi, V., Zeppa, G., Beltramo, R., Carnacini, A. and Antonelli, A. (1998). Characterisation of White vinegars of different sources with artificial neural networks. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 78(3): 417-422.
- Hornedo-Ortega, R., Álvarez-Fernández, M.A., Cerezo, A.B., Garcia-Garcia, I., Troncoso, A.M., Garcia-Parrilla, M.C. (2017). *Journal of Food Science*, 82(2): 364-372.
- Hutkins, R.W. (2019). *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. 2nd Edition, Blackwell Publishing, IFT Press, Iowa, pp. 460-484.
- Kamiloglu, S., Camp, J.V., Capanoglu, E. (2018). Black carrot polyphenols: effect of processing, storage and digestion-an overview. *Phytochemistry Reviews*, 17: 379-395.
- Kandyli, P. (2020). Innovative vinegar products. In: *Advances in Vinegar Production*, Bekatorou, A. (chief ed.), CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 265-298.
- Khandare, V., Walia, S., Singh, M., Kaur, C. (2011). Black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus*) juice: Processing effects on antioxidant composition and color. *Food and Bioprocess Technology*, 89:482-486.
- Kharchoufi, S., Gomez, J., Lasanta, C., Castro, R., Sainz, F., Hamdia, M. (2018). Benchmarking laboratory-scale pomegranate vinegar against commercial wine vinegars: antioxidant activity and chemical composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98: 4749-4758.
- Kırca, A., Özkan, M., Cemeroglu, B. (2007). Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins. *Food Chemistry*, 101, 212-218.
- Kocher, G.S., Pooja, Brar, A., Dhillon, T.S. (2016). Fermentative production of alcoholic beverage from black carrot. *Agricultural Research Journal*, 53 (1): 138-140.
- Kong, C.T., Ho, C.W., Ling, J.W.A., Lazim, A., Fazry, S., Lim, S.J. (2018). Chemical changes and optimisation of acetous fermentation time and mother of vinegar concentration in the production of vinegar-like fermented papaya beverage. *Sains Malaysiana*, 47(9): 2017-2026.
- Koyama, M., Ogasawara, Y., Endou, K., Akano, H., Nakajima, T., Aoyama, T., Nakamura, K. (2017). Fermentation-induced changes in the concentrations of organic acids, amino acids, sugars, and minerals and superoxide dismutase-like activity in tomato vinegar. *International Journal of Food Properties*, 20(4): 888-898.
- Mas, A., Torija, M.J., García-Parrilla, M.C., Troncoso, A.M. (2014). Acetic acid bacteria and

- the production and quality of wine vinegar. *The Scientific World Journal*, Volume 2014, Article ID 394671, 6 pages.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Sonklanakarın Journal of Science and Technology*, 26(2): 211-219.
- Ordoudi, S.A., Mantzouridou, F., Daftsiou, E., Malo, C., Hatzidimitriou, E., Nenadis, N., Tsimidou, M.Z. (2014). Pomegranate juice functional constituents after alcoholic and acetic acid fermentation. *Journal of Functional Foods*, 8: 161-168.
- Özkan, M. (2009). Siyah havuç suyu konsantresi üretimi ve depolanması sürecinde fenolik maddeler ve antosiyaninlerdeki değişimler ve bu değişimlerin antioksidan aktivite ile ilişkisi. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, Ankara, 107s. [in Turkish].
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-153.
- Su, M.S., Chien, P.J. (2007). Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) fluid products as affected by fermentation. *Food Chemistry*, 104: 182-187.
- Suzme, S., Boyacioglu, D., Toydemir, G., Capanoglu, E. (2014). Effect of industrial juice concentrate processing on phenolic profile and antioxidant capacity of black carrots. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 819-829.
- Tang, H., Song, J., Luo, L. (2020). Vinegar Production in China. In: *Advances in Vinegar Production*, Bekatorou, A. (chief ed.), CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 171-208.
- Toktaş, B., Bildik, F., Özçelik, B. (2018). Effect of fermentation on anthocyanin stability and in vitro bioaccessibility during shalgam (şalgam) beverage production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98: 3066-3075.
- Turker, N. Aksay, S., Ekiz, H.I. (2004). Effect of storage temperature on the stability of anthocyanins of a fermented black carrot (*Daucus carota* var. L.) beverage: shalgam. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (12): 3807-3813.
- Türkyılmaz, M., Yemiş, O., Özkan, M. (2012). Clarification and pasteurisation effects on monomeric anthocyanins and percent polymeric colour of black carrot (*Daucus carota* L.) juice. *Food Chemistry*, 134: 1052-1058.
- Ubeda, C., Callejón, R.M., Hidalgo, C., Torija, M.J., Troncoso, A.M., Morales, M.L. (2013). Employment of different processes for the production of strawberry vinegars: Effects on antioxidant activity, total phenols and monomeric anthocyanins. *LWT - Food Science and Technology*, 52: 139-145.
- Ünal, E. (2007). Dimrit üzümünden değişik yöntemlerle sirke üretimi üzerinde bir araştırma. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Adana, 60 s.



## FARKLI ORANLARDA PEYNİRALTI SUYU VE SÜT BAZLI FERMENTE İÇECEKLERİN BAZI ÖZELLİKLERİ

Nazlı Kanca<sup>1\*</sup>, Canan Altınay<sup>1</sup>, Rabia Albayrak Delialioğlu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Süt Teknolojisi Bölümü, Dışkapı, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup>Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Biyometri ve Genetik Anabilim Dalı, Dışkapı, Ankara, Türkiye

Geliş / Received: 26.10.2022; Kabul / Accepted: 30.12.2022; Online baskı / Published online: 14.01.2023

Kanca, N., Altınay, C., Albayrak-Delialioğlu, R. (2023). Farklı oranlarda peyniraltı suyu ve süt bazlı fermente içeceklerin bazı özellikleri. *GIDA* (2023) 48 (1) 38-49 doi: 10.15237/ gida.GD22103

Kanca, N., Altınay, C., Albayrak-Delialioğlu R. (2023). *Some properties of whey and milk-based fermented beverages in different proportions. GIDA* (2023) 48 (1) 38-49 doi: 10.15237/ gida.GD22103

### ÖZ

Çalışmada, farklı oranlarda (%0, %25, %50, %75, %100) peyniraltı suyu (PAS) içeren inek sütünden fermente içecek üretimi gerçekleştirilmiştir. PAS miktarının artması ile, örneklerin temel bileşen içerikleri ile parlaklık değerleri azalmış, sarılık-yeşillik artmıştır ( $P<0.05$ ). Örneklerin pH/titrasyon asitliği değerleri PAS ilavesinden etkilenmiş, ayrıca 14 günlük depolama süresi boyunca pH değerleri düşmüş, titrasyon asitliği değerleri artmıştır ( $P<0.05$ ). Yüksek PAS içeriği, serum ayrılmasının artmasına, kıvam indeksinin düşmesine neden olmuştur ( $P<0.05$ ). *Streptococcus* spp. içerikleri PAS miktarından etkilenirken ( $P<0.05$ ), *Lactobacillus* spp.-*Bifidobacterium* spp. ve toplam aerobik mezofilik bakteri içeriklerinde farklılık gözlenmemiştir ( $P>0.05$ ). Duyusal analiz sonuçlarına göre, görünüş, yapı, lezzet ve toplam kabul edilebilirlik özellikleri bakımından en düşük puanları, en yüksek PAS içeriğine sahip örnekler (%75 ve %100) almıştır ( $P<0.05$ ).

**Anahtar kelimeler:** Duyusal değerlendirme, fermente içecek, laktik asit bakterileri, peyniraltı suyu, renk, reoloji, serum ayrılması

## SOME PROPERTIES OF WHEY AND MILK-BASED FERMENTED BEVERAGES IN DIFFERENT PROPORTIONS

### ABSTRACT

In the study, fermented beverages were produced from cow's milk including whey at different rates (0%, 25%, 50%, 75%, 100%). As the whey increase, the gross composition and the brightness of the samples decreased, the yellowness-greenness increased ( $P<0.05$ ). The pH/titratable acidity values were affected by the addition of whey, furthermore the pH values decreased and the titratable acidity values increased ( $P<0.05$ ) during the 14-day storage. High whey content caused an increase in phase separation and a decrease in the consistency index ( $P<0.05$ ). While the counts of *Streptococcus* spp. were affected by the whey amount ( $P<0.05$ ), no difference was observed in *Lactobacillus* spp.-*Bifidobacterium* spp. and total aerobic mesophilic bacteria counts ( $P>0.05$ ). Sensory analysis revealed that the samples with the highest whey content (75% and 100%) got the lowest scores in terms of appearance, texture, flavor and total acceptability ( $P<0.05$ ).

**Keywords:** Sensory evaluation, fermented beverage, lactic acid bacteria, whey, color, rheology, phase separation

\*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: nazli.turkmen@ankara.edu.tr

☎: (+90) 312 596 1346

☎: (+90) 312 318 2219

Nazlı Kanca; ORCID no: 0000-0002-4219-8903

Canan Altınay; ORCID no: 0000-0001-6369-7448

Rabia Albayrak Delialioğlu; ORCID no: 0000-0002-1969-4319

## GİRİŞ

Peyniraltı suyu (PAS), peynir üretimi sırasında elde edilen pıhtının ayrılmasından sonra geriye kalan yeşilimsi-sarı renkte bir süt yan ürünüdür. 2022 Temmuz ayı verilerine göre Türkiye’de üretilen çiğ inek sütünün aylık 57 bin tondan fazlası peynir üretiminde kullanılmaktadır (TUIK, 2022). Peynire işlenen sütün yaklaşık %90 kadarının PAS olarak ayrıldığı düşünüldüğünde (Prazeres vd., 2012), son verilere göre Türkiye’de 1 ayda en az 51 bin ton PAS elde edilmektedir. Dünya genelinde ise ~200 milyon ton PAS elde edilmekte olup, günümüzde halen bunun yaklaşık yarısının değerlendirilmediği ve atık olarak görüldüğü bildirilmektedir (Barba, 2021).

Peynir üretiminde kullanılan çiğ sütün niteliği, üretilen peynirin çeşidi ve uygulanan üretim yöntemine bağlı olarak değişmekle birlikte, çiğ sütte bulunan kazein ve süt yağının tamamına yakını pıhtıda tutulmakta, diğer kurumadde bileşenlerinin ise önemli kısmı PAS’a geçmektedir (Carvalho vd., 2013; Chegini ve Taheri, 2013). PAS, %93-94 su, %4.5-6 laktoz, %0.6-1.1 protein, %0.8-1.0 mineral maddeler, %0.05-0.9 laktik asit ve %0.06-0.5 yağ içeriğine sahiptir (Prazeres vd., 2012). PAS, biyolojik değeri yüksek serum proteinleri bakımından zengin bir kaynaktır (Agarkova vd., 2020). Özellikle bu proteinlerin sağlık üzerine etkileri ile ilgili yapılmış pek çok çalışma bulunmaktadır. PAS proteinlerinin hidrolizasyonu sonucu açığa çıkan biyoaktif peptitlerin antioksidan, antihipertansif ve antimikrobiyel özellik gösterdiği (Brandelli vd., 2015; Revilla vd. 2016; Kareb ve Aider, 2019) ve gıdaların oksidatif bozulmalarını önleyerek raf ömürlerini uzattığı (De Gobba vd., 2014) çeşitli çalışmalar ile ortaya konulmuştur.

PAS, muhafaza ve taşınabilirlik açısından genellikle toz haline getirildikten sonra çeşitli ürünlerde kullanılmaktadır (Chegini ve Taheri, 2013). Toz haldeki PAS’ın süt ürünleri, fırıncılık ürünleri ve et ürünleri gibi çeşitli gıda ürünlerinde kullanımı ile ilgili çok sayıda çalışma (Barbut, 2006; Madenci ve Bilgiçli, 2014; Guler-Akin vd., 2016; Pereira vd., 2019) olmasına karşın, sıvı halde kullanımı oldukça sınırlıdır.

Bu çalışmanın amaçlarından biri, toz haline getirilmeden kullanımı kısıtlı olan PAS’a, sıvı formda kullanım alanı yaratabilmektir. Çalışmanın bir diğer amacı ise, besleyici değeri yüksek, yeni bir fermente süt ürünü geliştirebilmektir. Bu amaçla, fermente içecek üretiminde, Beyaz peynir üretiminden elde edilen PAS ile çiğ inek sütünün farklı oranlarda karışımı kullanılmış ve 14 günlük depolama süresince ürünün çeşitli fiziksel, kimyasal, mikrobiyolojik ve duyuşsal özellikleri incelenmiştir.

## MATERYAL ve YÖNTEM

### Fermente İçecek Üretimi

Fermente içeceklerin üretiminde, çiğ inek sütü ve beyaz peynir üretiminden elde edilen peyniraltı suyu (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Haymana Araştırma ve Uygulama Çiftliği, Ankara, Türkiye) ile YO-MIX 205 LYO kodlu *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium lactis* bakterilerini içeren probiyotik starter kültür (Danisco, Fransa) kullanılmıştır.

Üretim için çiğ süt ile peyniraltı suyu 5 farklı örnek elde edilecek şekilde belirli oranlarda karıştırılmıştır (Çizelge 1). Karışımlar su banyosunda (Heto, SBD 50, Allerød, Danimarka) 65°C/30 dakika ısıtılma tabi tutulmuş ve hemen ardından ~37°C’ye soğutulmuştur. Üretimden 1 gün önce steril süt içerisinde 37°C’de 24 saat boyunca aktifleştirilmiş olan probiyotik starter kültür ile %3 oranında inoküle edilen örnekler 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu pH 4.7-4.8 aralığında sonlandırılan örnekler, 200 ml’lik kaplara doldurularak paketlenmiş ve analiz günlerinde açılmaları yapılmak üzere +4°C’de depolanmıştır.

### Örneklerin Analizleri

Fermente içeceklerin toplam kurumadde ve kül içerikleri gravimetrik yöntem (Hooi vd., 2004), yağ içerikleri Gerber yöntemi (Hooi vd., 2004) ile belirlenmiştir. Toplam protein miktarları, Kjeldahl metodu kullanılarak belirlenen toplam azot içeriklerinin 6.38 faktörü ile çarpılmasıyla hesaplanmıştır.

Çizelge 1. Örneklerin süt ve peyniraltı suyu içerikleri

Table 1. Milk and whey contents of the samples

Örnekler Samples	Açıklama Description
A (kontrol) A (control)	%100 süt 100% milk
B	%75 süt + %25 peyniraltı suyu 75% milk + 25% whey
C	%50 süt + %50 peyniraltı suyu 50% milk + 50% whey
D	%25 süt + %75 peyniraltı suyu 25% milk + 75% whey
E	%100 peyniraltı suyu 100% whey

Örneklerin pH değerleri Ohaus marka pH-metre (Parsippany, ABD) ile, titrasyon asitliği değerleri ise titrasyon yöntemi ile belirlenmiş ve sonuçlar % laktik asit cinsinden verilmiştir.

Fermente içeceklerin reolojik özelliklerinin belirlenmesi için Malvern Kinexus Pro+ (Worcestershire, Birleşik Krallık) marka reometre kullanılmıştır. Dinamik reometrik yöntemle 2 mm boşlukta, 0.1-300 s<sup>-1</sup> kayma hızı aralığında ve +4°C sıcaklıkta örneklerin kıvam indeksi (K) ile akış davranış indeksi (n) değerleri belirlenmiş ve elde edilen veriler Power law modeli ile yorumlanmıştır (korelasyon değeri - R<sup>2</sup>>0.99).

Serum ayrılması değerleri için Atamer ve Sezgin (1986) tarafından belirtilen yöntem kullanılmıştır. 100 ml'lik mezürlere aktarılan örnekler, +4°C'de 24 saat bekletilmiş ve ayrılan serum miktarı tespit edilerek %Serum ayrılması olarak ifade edilmiştir.

Örneklerin renk özellikleri (L\*, a\*, b\*), renk ölçüm cihazı (Konica Minolta CR-400, Tokyo, Japonya) ve yazılımı (SpectraMagic NX) kullanılarak belirlenmiştir.

Mikrobiyolojik analiz için, içerisinde 9 ml Ringer solüsyonu (Merck, Darmstadt, Almanya) bulunan tüplerde dilüsyon serisi hazırlanmıştır. Hazırlanan

dilüsyonlardan toplam mezofilik aerobik bakteri sayımı için PCA (Plate Count Agar, Merck, Darmstadt, Almanya), *Lactobacillus* spp. ve *Bifidobacterium* spp. sayımı için MRS agar (de Man Rogosa Sharpe Agar, HiMedia, Bombay, Hindistan), *Streptococcus* spp. sayımı için M17 agar (HiMedia, Bombay, Hindistan) ve maya-küf sayımı için PDA (Potato Dextrose Agar, Merck, Darmstadt, Almanya) besiyerlerine iki paralel olacak şekilde yüzeye yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriyeler, PCA ve M17 için aerobik şartlarda 37°C'de 24-48 saat, MRS için anaerobik şartlarda 37°C'de 24-48 saat ve PDA için aerobik şartlarda 25°C'de 3-5 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda besiyeri üzerinde gelişen kolonilerin sayımı yapılmış ve paralel ekimlerin ortalamaları alınarak bütün sonuçlar log kob/ml olarak verilmiştir.

Fermente içeceklerin duyu analizi, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü akademik personelinden oluşan 7 kişilik deneyimli panelist tarafından gerçekleştirilmiştir. 3 rakamlı kodlar verilen örnekler, +4°C'de panelistlere sunulmuş ve duyu analizi değerlendirilmesinin tek bir oturumda gerçekleştirilmesi istenmiştir. Panelistler, örnekleri görünüş, yapı, lezzet ve toplam kabul edilebilirlik özelliklerine göre 5 puan üzerinden değerlendirmiştir.

Örneklerin temel bileşim analizleri (toplam kurumadde, yağ, toplam protein, kül) ve renk değerleri (L\*, a\*, b\*) depolamanın 1. gününde, diğer analizler 1., 7. ve 14. günlerde gerçekleştirilmiştir.

#### İstatistiksel Analiz

Fermente içeceklerin toplam kurumadde, yağ, protein, kül içerikleri ile renk özellikleri (L\*, a\*, b\*) bakımından PAS oranlarının (0, 25, 50, 75, 100) ortalamaları arasındaki farkların istatistik olarak önemli olup olmadığının belirlenmesinde varyans analizi tekniği (One-way-ANOVA) kullanılmıştır. Diğer özellikler için, PAS oranlarının 0, 25, 50, 75 ve 100 olmak üzere beş seviyesi ile depolama faktörünün 1, 7 ve 14 olmak üzere üç seviyesinin, üzerinde çalışılan özelliklere

birlikte etkileri faktöriyel düzende varyans analizi tekniği (factorial ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Farklı grupların belirlenmesinde Duncan testinden yararlanılmıştır. İstatistik analizler MINITAB 16 paket programında yapılmıştır.

### BULGULAR ve TARTIŞMA

Üretimde kullanılan hammadde özellikleri ile fermente içeceklerin toplam kurumadde, yağ, protein ve kül içerikleri sırasıyla Çizelge 2 ve

Çizelge 3'te gösterilmiştir. Belirtilen özelliklerin tamamı bakımından örnekler arasında istatistik farklılık olduğu belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). Örneklerdeki PAS içeriği arttıkça, toplam kurumadde, yağ, protein ve kül içeriklerinin beklendiği gibi giderek düştüğü tespit edilmiştir. Bu durum, PAS'ın bahsedilen bileşenleri çiğ süte kıyasla daha düşük miktarda içermesinden (Çizelge 2) kaynaklanmaktadır.

Çizelge 2. Hammadde özellikleri (n=2)  
Table 2. The properties of raw materials (n=2)

Hammadde <i>Raw material</i>	Kurumadde (%) <i>Total solid (%)</i>	Yağ (%) <i>Fat (%)</i>	Protein (%) <i>Protein (%)</i>	Kül (%) <i>Ash (%)</i>	pH	Laktik Asit (%) <i>Lactic acid (%)</i>
Çiğ süt <i>Raw milk</i>	11.70±0.005	3.1±0.15	2.85±0.015	0.75±0.047	6.81±0.025	0.15±0.004
Peyniraltı suyu <i>Whey</i>	6.25±0.424	0.4±0.100	0.75±0.045	0.48±0.002	6.58±0.015	0.17±0.001

Çizelge 3. Örneklerin toplam kurumadde, yağ, protein ve kül içerikleri (n=2)

Table 3. Total solid, fat, protein and ash contents of the samples (n=2)

Örnekler <i>Samples</i>	Kurumadde (%) <i>Total solid (%)</i>	Yağ (%) <i>Fat (%)</i>	Protein (%) <i>Protein (%)</i>	Kül (%) <i>Ash (%)</i>
A	11.71±0.003 <sup>A</sup>	3.1±0.15 <sup>A</sup>	2.82±0.035 <sup>A</sup>	0.74±0.045 <sup>A</sup>
B	10.29±0.145 <sup>B</sup>	2.6±0.00 <sup>AB</sup>	2.37±0.005 <sup>B</sup>	0.71±0.011 <sup>AB</sup>
C	9.12±0.038 <sup>C</sup>	1.9±0.10 <sup>B</sup>	1.95±0.005 <sup>C</sup>	0.59±0.002 <sup>BC</sup>
D	7.72±0.018 <sup>D</sup>	1.1±0.20 <sup>C</sup>	1.51±0.115 <sup>D</sup>	0.58±0.011 <sup>C</sup>
E	6.34±0.007 <sup>E</sup>	0.4±0.10 <sup>C</sup>	0.80±0.050 <sup>E</sup>	0.51±0.007 <sup>C</sup>

A (kontrol): %100 süt, B: %75 süt + %25 peyniraltı suyu, C: %50 süt + %50 peyniraltı suyu, D: %25 süt + %75 peyniraltı suyu, E: %100 peyniraltı suyu

Aynı sütündeki farklı büyük harfler istatistik olarak farklılığı ifade etmektedir ( $P<0.05$ ).

A (control): 100% milk, B: 75% milk + 25% whey, C: 50% milk + 50% whey, D: 25% milk + 75% whey, E: 100% whey  
Values with the different upper case letters within the same column indicate the statistically significant difference ( $P<0.05$ ).

Fermente içeceklerin renk değerleri ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) arasında istatistik açıdan farklılık olduğu tespit edilmiştir ( $P<0.05$ ) (Çizelge 4).  $L^*$  değerleri incelendiğinde, en düşük değeri sadece PAS kullanılarak üretilen E örneğinin aldığı görülmektedir. Dolayısıyla E örneği, en az parlaklığa sahip olan örnektir. Tespit edilen  $a^*$  değerlerine (kırmızılık +, yeşillik -) göre, sadece süttten üretilen A örneği hariç örneklerin tamamının yeşilimsi renge sahip olduğu ve içerdikleri PAS miktarının artmasıyla yeşilimsi görünümün de giderek arttığı belirlenmiştir. Örneklerin  $b^*$  değerleri (sarılık +, mavilik -)

incelendiğinde, benzer şekilde PAS miktarının artmasıyla sarımsı rengin giderek arttığı tespit edilmiştir. Renk değerlerinde tespit edilen bu farklılık, hammadde olarak kullanılan PAS'ın yeşilimsi-sarı renginden kaynaklanmaktadır.

Örneklerin 14 günlük depolama süresindeki pH ve titrasyon asitliği değerlerindeki değişim Çizelge 5'te belirtilmiştir ( $P<0.05$ ). pH değeri bakımından depolamanın bütün günlerinde en yüksek değeri PAS içermeyen A örneğinin aldığı tespit edilmiştir. Bu durumu, hammadde çiğ süttün pH değerinin PAS'ın pH değerinden daha yüksek

olması ile (Çizelge 2) ilişkilendirmek mümkündür. Laktik asit değerleri bakımından ise en düşük değeri, sadece PAS kullanılarak üretilen E örneğinin aldığı görülmektedir. Skryplonek vd. (2019) tarafından PAS konsantratu kullanılarak üretilen fermente süt ürünlerinde, süttozu ilavesi ile laktik asit bakterilerinin gelişiminin teşvik edildiği ve buna bağlı olarak bu örneklerin laktik asit içeriğinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Benzer şekilde bu çalışmada da süt içeriği daha yüksek olan örneklerde laktik asit bakterilerinin canlılığının daha fazla olduğu tespit edilmiştir

(Çizelge 7). Örneklerin tamamı en az %0.3 laktik asit içeriğine sahip oldukları için, Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği'ne (Anonim, 2009) uygunluk göstermiştir. Depolama boyunca örneklerin tamamının pH değerlerinde düşüş, laktik asit içeriklerinde ise artış gözlenmiştir. Bu durum, fermente süt ürünlerinde soğuk depolama sırasında laktik asit bakterilerinin laktik asit üretimine devam etmesi ile oluşan post-asidifikasyondan (Pescuma vd., 2010) kaynaklanmaktadır.

Çizelge 4. Örneklerin renk (L\*, a\*, b\*) değerleri (n=2)  
Figure 1. Color (L\*, a\*, b\*) values of the samples (n=2)

Örnekler Samples	L*	a*	b*
A	82.81±0.295 <sup>A</sup>	-0.47±0.115 <sup>B</sup>	1.55±0.230 <sup>B</sup>
B	79.79±0.585 <sup>A</sup>	-2.53±0.030 <sup>A</sup>	2.73±0.400 <sup>B</sup>
C	74.68±1.350 <sup>A</sup>	-2.77±0.065 <sup>A</sup>	4.19±0.185 <sup>A</sup>
D	68.06±2.020 <sup>A</sup>	-2.84±0.015 <sup>A</sup>	4.54±0.115 <sup>A</sup>
E	44.36±5.900 <sup>B</sup>	-2.87±0.050 <sup>A</sup>	4.90±0.155 <sup>A</sup>

A (kontrol): %100 süt, B: %75 süt + %25 peyniraltı suyu, C: %50 süt + %50 peyniraltı suyu, D: %25 süt + %75 peyniraltı suyu, E: %100 peyniraltı suyu

Aynı sütündeki farklı büyük harfler istatistik olarak farklılığı ifade etmektedir ( $P<0.05$ ).

A (control): 100% milk, B: 75% milk + 25% whey, C: 50% milk + 50% whey, D: 25% milk + 75% whey, E: 100% whey  
Values with the different upper case letters within the same column indicate the statistically significant difference ( $P<0.05$ ).

Fermente içeceklerin 14 günlük depolama süresi boyunca tespit edilen serum ayrılması, Power law davranış modeline göre kıvam indeksi ve akış davranış indeksi değerleri Çizelge 6'da gösterilmiştir. Örneklerin serum ayrılması ve kıvam indeksi değerlerinin ortalamaları arasında farklılık olduğu ( $P<0.05$ ) ve içerdikleri PAS miktarının artması ile serum ayrılması değerinin giderek arttığı, kıvam indeksi değerinin ise giderek düştüğü belirlenmiştir. Benzer şekilde, rekonstitüe PAS ve inek sütü kullanılarak üretilen probiyotik fermente süt içeceklerinin özelliklerinin incelendiği bir çalışmada (Akpınar vd., 2015), en yüksek serum ayrılması ve en düşük viskozite değerlerinin, sadece rekonstitüe PAS kullanılarak üretilen örneklerde olduğu bildirilmiştir. Bu durumun sebeplerinden biri, PAS miktarının artması ile birlikte, örneklerin toplam kurumadde içeriklerinin düşmesidir (Çizelge 3). Toplam

kurumadde içeriği düştükçe, proteinler arası mesafenin artmasına bağlı olarak koloidal formdaki madde miktarı azalmakta, dolayısıyla serum ayrılmasında artış, viskozitede ise düşüş görülmektedir (Özer, 2006). Bir diğer sebep ise, fermente süt ürünlerinde istenen yapıyı oluşturan ve viskoziteyi artıran başlıca bileşen olan kazeinin; PAS'ta, süte kıyasla oldukça düşük miktarda bulunmasıdır (Skryplonek vd., 2019). Depolama boyunca örneklerin serum ayrılması değerlerinde artış, kıvam indeksi değerlerinde ise düşüş görülmüştür ( $P<0.05$ ). Benzer sonuçların elde edildiği bir çalışmada (Akpınar vd., 2015), yazarlar bu durumun depolama süresi boyunca örneklerde görülen pH düşüşünden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Nitekim bu çalışmada da depolama süresi boyunca pH değerlerinin giderek düştüğü belirlenmiştir (Çizelge 5).

Çizelge 5. Örneklerin depolama süresindeki pH ve titrasyon asitliği değerleri (n=2)  
Table 5. pH and titratable acidity values of the samples during the storage period (n=2)

Özellik Property	Depolama (Gün) Storage (Day)	Örnekler Samples					Ortalama Mean
		A	B	C	D	E	
pH	1	4.53±0.005	4.48±0.010	4.46±0.025	4.44±0.005	4.45±0.010	4.47±0.011 <sup>A</sup>
	7	4.39±0.025	4.31±0.030	4.31±0.015	4.30±0.005	4.32±0.010	4.32±0.013 <sup>B</sup>
	14	4.26±0.030	4.19±0.005	4.18±0.010	4.21±0.015	4.23±0.015	4.21±0.011 <sup>C</sup>
	Ortalama Mean	4.39±0.050 <sup>a</sup>	4.33±0.055 <sup>b</sup>	4.31±0.051 <sup>b</sup>	4.31±0.043 <sup>b</sup>	4.33±0.042 <sup>b</sup>	
Laktik asit (%) Lactic acid (%)	1	0.68±0.005 <sup>Ca</sup>	0.60±0.005 <sup>Cb</sup>	0.56±0.025 <sup>Bb</sup>	0.42±0.000 <sup>Bc</sup>	0.30±0.005 <sup>Bd</sup>	0.51±0.045
	7	0.76±0.025 <sup>Ba</sup>	0.65±0.020 <sup>Bb</sup>	0.55±0.010 <sup>Bc</sup>	0.47±0.005 <sup>Ad</sup>	0.34±0.005 <sup>ABe</sup>	0.55±0.049
	14	0.83±0.020 <sup>Aa</sup>	0.74±0.000 <sup>Ab</sup>	0.61±0.020 <sup>Ac</sup>	0.49±0.000 <sup>Ad</sup>	0.37±0.015 <sup>Ac</sup>	0.61±0.056
	Ortalama Mean	0.75±0.030	0.66±0.027	0.57±0.015	0.46±0.013	0.33±0.014	

A (kontrol): %100 süt, B: %75 süt + %25 peyniraltı suyu, C: %50 süt + %50 peyniraltı suyu, D: %25 süt + %75 peyniraltı suyu, E: %100 peyniraltı suyu

Aynı satırdaki farklı küçük harfler ve aynı sütündeki farklı büyük harfler istatistik olarak farklılığı ifade etmektedir (P<0.05).

A (control): 100% milk, B: 75% milk + 25% whey, C: 50% milk + 50% whey, D: 25% milk + 75% whey, E: 100% whey  
Values with the different lower case letters within the same row and upper case letters within the same column indicate the statistically significant difference (P<0.05).

Fermente içeceklerin akış davranış indeksi değerleri 0.32 ile 0.41 arasında bulunmuş olup, PAS ilavesinin ve depolama süresinin bu değer üzerine istatistik olarak etkisinin bulunmadığı tespit edilmiştir (P>0.05). Akış davranış indeksi, örneğin akış tipinin Newtonian akış tipinden ne kadar uzaklaştığının göstergesi olup (Berkay Karaca vd., 2009), bu çalışmada bu değer 1'in altında bulunmuş olması, örneklerin tamamının Newtonian olmayan akış tipine sahip olduklarını belirtmektedir. Fermente süt içeceklerinin Newtonian olmayan akış özelliği gösterdiği, farklı çalışmalarda da belirtilmiştir (Penna vd., 2001; Patocka vd., 2006).

Örneklerin depolama süresince belirlenen mikrobiyel içerikleri Çizelge 7'de gösterilmiştir. Fermente içeceklerdeki PAS miktarının artması ile örneklerin *Streptococcus* spp. içeriklerinde düşüş olduğu gözlenirken (P<0.05), *Lactobacillus* spp. - *Bifidobacterium* spp. ve toplam aerobik mezofilik bakteri içerikleri bakımından örnekler arasında istatistik olarak bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir (P>0.05). Bu durumu Laktobasillerin düşük pH'ya karşı daha dayanıklı olması (Yerlikaya, 2014) ile ilişkilendirmek mümkündür. Nitekim çalışmada, PAS oranının artmasıyla örneklerin pH değerlerinde düşüş olduğu tespit

edilmiştir (Çizelge 5). İncelenen bütün bakterilerin sayısı, depolama süresi boyunca azalma eğiliminde olmuştur (P<0.05). Bu durum muhtemelen, depolama süresince ortamda biriken laktik asidin, bakterilerin gelişimini olumsuz etkilemesinden (Tamuçay-Özünü ve Koçak, 2010) kaynaklanmaktadır. Çalışmada belirlenen laktik asit içeriklerinin, bütün örnekler için depolama süresi boyunca artmış olması bu durumu desteklemektedir (Çizelge 5). Örneklerin hiçbirinde depolama süresi boyunca maya-küf tespit edilmemiştir.

Örneklerin duyu analizi sonuçları Çizelge 8'de verilmiştir. İncelenen bütün özellikler (görünüş, yapı, lezzet, toplam kabul edilebilirlik) bakımından örneklerin ortalamaları arasındaki farklılık önemli bulunmuştur (P<0.05). Depolama süresi boyunca, sadece lezzet özelliği açısından farklılık olduğu tespit edilmiş ve örneklerin bu özellik bakımından panelistlerden aldıkları değerlerin zamanla giderek arttığı görülmüştür (P<0.05).

İncelenen özelliklerin tamamı için en düşük puanları alan örnekler, en yüksek PAS içeriğine sahip D ve E örnekleri olmuşlardır. Panelistler bu iki örneğin renginin arzu edilmeyecek düzeyde sarıya yakın, kıvamının oldukça düşük ve tadının

da daha yavan olduğunu belirtmişlerdir. A, B ve C örnekleri ise belirtilen bütün özellikler bakımından depolamanın her gününde 4'ün üzerinde puanlar almıştır. Toplam kabul edilebilirlik puanları incelendiğinde, bu üç örneğin arasında istatistik açıdan farklılık olmadığı tespit

edilmiştir ( $P>0.05$ ). Dolayısıyla duyu özellikler göz önünde bulundurulduğunda, kontrol örneğinin yanı sıra %25 ve %50 oranında PAS içeren örneklerin de fermente süt içeceği olarak tüketilebilirliğinin olduğunu söylemek mümkündür.

Çizelge 6. Örneklerin depolama süresindeki serum ayrılması, kıvam indeksi (K) ve akış davranış indeksi (n) değerleri (n=2)

Table 6. Phase separation, consistency index (K) and flow behaviour index (n) values of the samples during the storage period (n=2)

Özellik Property	Depolama (Gün) Storage (Day)	Örnekler Samples					Ortalama Mean
		A	B	C	D	E	
Serum ayrılması (%) Phase separation (%)	1	2.0±0.00	5.0±1.00	8.0±2.00	44.0±0.00	97.0±0.00	31.2±12.10 <sup>B</sup>
	7	3.0±0.00	6.0±1.00	10.5±1.50	48.5±1.50	97.5±0.50	33.1±12.10 <sup>B</sup>
	14	4.0±0.00	9.0±2.00	34.0±19.00	56.5±1.50	97.5±0.50	40.2±11.80 <sup>A</sup>
	Ortalama Mean	3.0±0.37 <sup>d</sup>	6.7±0.99 <sup>cd</sup>	17.5±7.21 <sup>c</sup>	49.7±2.38 <sup>b</sup>	97.3±0.21 <sup>a</sup>	
Kıvam indeksi (Pa·s) Consistency index (Pa·s)	1	1.25±0.045	0.87±0.015	0.73±0.025	0.51±0.005	0.34±0.010	0.74±0.104 <sup>A</sup>
	7	1.16±0.055	0.84±0.055	0.69±0.010	0.53±0.035	0.32±0.015	0.70±0.096 <sup>A</sup>
	14	1.05±0.025	0.79±0.040	0.65±0.015	0.38±0.005	0.33±0.010	0.64±0.089 <sup>B</sup>
	Ortalama Mean	1.15±0.041 <sup>a</sup>	0.83±0.023 <sup>b</sup>	0.69±0.017 <sup>c</sup>	0.47±0.031 <sup>d</sup>	0.33±0.007 <sup>c</sup>	
Akış davranış indeksi Flow behaviour index	1	0.41±0.000	0.39±0.035	0.34±0.005	0.33±0.015	0.38±0.000	0.37±0.012
	7	0.40±0.015	0.38±0.035	0.33±0.000	0.32±0.005	0.39±0.045	0.36±0.014
	14	0.36±0.025	0.38±0.065	0.32±0.050	0.41±0.035	0.34±0.060	0.36±0.019
	Ortalama Mean	0.39±0.013	0.38±0.021	0.33±0.013	0.35±0.021	0.37±0.021	

A (kontrol): %100 süt, B: %75 süt + %25 peyniraltı suyu, C: %50 süt + %50 peyniraltı suyu, D: %25 süt + %75 peyniraltı suyu, E: %100 peyniraltı suyu

Aynı satırdaki farklı küçük harfler ve aynı sütündeki farklı büyük harfler istatistik olarak farklılığı ifade etmektedir ( $P<0.05$ ).

A (control): 100% milk, B: 75% milk + 25% whey, C: 50% milk + 50% whey, D: 25% milk + 75% whey, E: 100% whey  
Values with the different lower case letters within the same row and upper case letters within the same column indicate the statistically significant difference ( $P<0.05$ ).

Peyniraltı suyu-süt bazlı fermente içeceklerin özellikleri

Çizelge 7. Örneklerin depolama süresindeki mikrobiyel içerikleri (n=2)  
Table 7. Microbial counts of the samples during the storage period (n=2)

Microorganizma (log kob/ml) Microorganism (log cfu/ml)	Depolama (Gün) Storage (Day)	Örnekler Samples					Ortalama Mean
		A	B	C	D	E	
<i>Lactobacillus</i> spp. - <i>Bifidobacterium</i> spp.	1	7.24±0.025	7.16±0.080	7.11±0.100	7.03±0.085	7.09±0.055	7.12±0.034 <sup>A</sup>
	7	7.19±0.015	7.07±0.015	7.15±0.150	7.07±0.050	7.00±0.020	7.09±0.033 <sup>AB</sup>
	14	7.08±0.075	6.98±0.045	6.99±0.065	7.01±0.065	6.97±0.030	7.00±0.023 <sup>B</sup>
	Ortalama Mean	7.17±0.036	7.07±0.041	7.08±0.059	7.03±0.033	7.02±0.028	
<i>Streptococcus</i> spp.	1	9.14±0.065	9.11±0.050	9.01±0.005	8.91±0.010	8.71±0.045	8.97±0.054 <sup>A</sup>
	7	9.03±0.010	9.05±0.050	8.94±0.005	8.86±0.040	8.71±0.035	8.92±0.043 <sup>AB</sup>
	14	9.13±0.005	8.98±0.075	8.83±0.030	8.77±0.025	8.64±0.040	8.87±0.058 <sup>B</sup>
	Ortalama Mean	9.10±0.027 <sup>a</sup>	9.05±0.036 <sup>a</sup>	8.92±0.033 <sup>b</sup>	8.85±0.030 <sup>b</sup>	8.68±0.023 <sup>c</sup>	
Toplam aerobik mezofilik bakteri Total aerobic mesophilic bacteria	1	7.40±0.010	7.29±0.050	7.13±0.130	7.20±0.050	7.20±0.015	7.24±0.038 <sup>A</sup>
	7	7.14±0.070	7.13±0.030	7.11±0.060	7.15±0.050	7.10±0.015	7.13±0.018 <sup>A</sup>
	14	7.00±0.100	6.96±0.125	6.97±0.040	6.94±0.110	6.92±0.095	6.96±0.034 <sup>B</sup>
	Ortalama Mean	7.18±0.081	7.13±0.071	7.07±0.050	7.10±0.061	7.07±0.058	
Maya-küf Yeast-mold	1	nd	nd	nd	nd	nd	
	7	nd	nd	nd	nd	nd	
	14	nd	nd	nd	nd	nd	

A (kontrol): %100 süt, B: %75 süt + %25 peyniraltı suyu, C: %50 süt + %50 peyniraltı suyu, D: %25 süt + %75 peyniraltı suyu, E: %100 peyniraltı suyu

Aynı satırdaki farklı küçük harfler ve aynı sütündeki farklı büyük harfler istatistik olarak farklılığı ifade etmektedir (P<0.05).

nd: Tespit edilmedi.

A (control): 100% milk, B: 75% milk + 25% whey, C: 50% milk + 50% whey, D: 25% milk + 75% whey, E: 100% whey  
Values with the different lower case letters within the same row and upper case letters within the same column indicate the statistically significant difference (P<0.05).

nd: Not detected.



Çizelge 8. Örneklerin depolama süresindeki görünüş, yapı, lezzet ve toplam kabul edilebilirlik özellikleri (n=2)

Table 8. Appearance, texture, flavor and total acceptability properties of the samples during the storage period (n=2)

Özellik Property	Depolama Storage	Örnekler Samples					Ortalama Mean
		A	B	C	D	E	
Görünüş Appearance	1	5.00±0.000	4.72±0.285	4.29±0.145	3.61±0.395	3.08±0.215	4.14±0.250
	7	4.79±0.075	4.90±0.105	4.00±0.290	3.61±0.395	2.79±0.215	4.01±0.273
	14	5.00±0.000	4.86±0.145	4.29±0.000	3.58±0.285	2.93±0.215	4.13±0.267
	Ortalama Mean	4.93±0.049 <sup>a</sup>	4.82±0.094 <sup>a</sup>	4.19±0.010 <sup>b</sup>	3.60±0.162 <sup>c</sup>	2.93±0.110 <sup>d</sup>	
Yapı Texture	1	4.50±0.070	4.22±0.215	4.11±0.105	3.40±0.395	2.64±0.070	3.77±0.235
	7	4.36±0.355	4.75±0.250	4.25±0.250	3.75±0.400	3.00±0.290	4.02±0.218
	14	4.71±0.000	4.93±0.070	4.32±0.180	3.36±0.355	3.07±0.070	4.08±0.253
	Ortalama Mean	4.52±0.114 <sup>a</sup>	4.63±0.161 <sup>a</sup>	4.23±0.093 <sup>a</sup>	3.50±0.159 <sup>b</sup>	2.90±0.116 <sup>c</sup>	
Lezzet Flavor	1	4.43±0.000	4.50±0.070	4.11±0.105	3.15±0.145	2.72±0.145	3.78±0.242 <sup>B</sup>
	7	4.50±0.210	4.75±0.040	4.15±0.145	3.57±0.140	2.93±0.215	3.99±0.226 <sup>AB</sup>
	14	4.86±0.145	4.93±0.070	4.43±0.285	3.50±0.210	2.79±0.075	4.10±0.283 <sup>A</sup>
	Ortalama Mean	4.60±0.106 <sup>a</sup>	4.73±0.084 <sup>a</sup>	4.23±0.108 <sup>b</sup>	3.41±0.112 <sup>c</sup>	2.81 ± 0.080 <sup>d</sup>	
Toplam kabul edilebilirlik Total acceptability	1	4.79±0.075	4.54±0.035	4.22±0.215	3.40±0.395	2.79±0.215	3.94±0.259
	7	4.43±0.140	4.75±0.040	4.00±0.000	3.71±0.000	2.93±0.360	3.96±0.217
	14	4.86±0.145	4.93±0.070	4.50±0.210	3.36±0.355	2.86±0.145	4.10±0.288
	Ortalama Mean	4.69±0.100 <sup>a</sup>	4.74±0.076 <sup>a</sup>	4.24±0.120 <sup>a</sup>	3.49±0.154 <sup>b</sup>	2.86±0.118 <sup>c</sup>	

A (kontrol): %100 süt, B: %75 süt + %25 peyniraltı suyu, C: %50 süt + %50 peyniraltı suyu, D: %25 süt + %75 peyniraltı suyu, E: %100 peyniraltı suyu

Aynı satırdaki farklı küçük harfler ve aynı sütündeki farklı büyük harfler istatistik olarak farklılığı ifade etmektedir (P<0.05).

A (control): 100% milk, B: 75% milk + 25% whey, C: 50% milk + 50% whey, D: 25% milk + 75% whey, E: 100% whey  
Values with the different lower case letters within the same row and upper case letters within the same column indicate the statistically significant difference (P<0.05).

## SONUÇ

Fermente içeceklerdeki PAS oranının artması ile, örneklerin toplam kurumadde, yağ, protein ve kül içeriklerinin, PAS'ın söz konusu bileşenleri süte kıyasla daha düşük miktarda içermesine bağlı olarak düştüğü tespit edilmiştir. Renk analizi sonucu elde edilen sonuçlara göre, örneklerdeki sarılık ve yeşillik, PAS miktarının artması ile beklendiği gibi artmıştır. PAS ilavesi örneklerin pH ve titrasyon asitliği değerlerini etkilemiş ve depolama süresi boyunca pH değerlerinde düşüş, %laktik asit içeriklerinde ise artış olduğu belirlenmiştir. Fermente içeceklerdeki PAS oranının değişmesi ile birlikte, örneklerin serum ayrılması ve kıvam indeksi değerlerinde de değişim olduğu gözlenmiştir. En yüksek PAS içeriğine sahip D ve E örneklerinin serum ayrılması değerleri depolama süresi boyunca oldukça yüksek, kıvam indeksi değerleri ise diğer örneklerle kıyasla daha düşük bulunmuştur. Akış davranış indeksi değeri bakımından örnekler arasında farklılık olmadığı tespit edilmiştir. PAS miktarı, örneklerin *Streptococcus* spp. içeriklerini etkilerken, *Lactobacillus* spp. - *Bifidobacterium* spp. ve toplam aerobik mezofilik bakteri içeriklerine herhangi bir etkisi olmamıştır. İncelenen bakterilerin sayılarında depolama boyunca düşüş olduğu belirlenmiş, örneklerin hiçbirinde depolama süresince maya-küf tespit edilmemiştir. İncelenen duyuşal özellikler (görünüş, yapı, lezzet, toplam kabul edilebilirlik) bakımından panelistlerden en düşük puanları D ve E örnekleri almış, toplam kabul edilebilirlik özelliği bakımından diğer 3 örnek (A, B ve C) arasında farklılık olmadığı tespit edilmiştir. Çalışmada incelenen özelliklerin tamamı dikkate alındığında, %25 ve %50 oranında PAS içeren örneklerin (B ve C) peyniraltı suyu-bazlı fermente içecek olarak kabul edilir özelliklere sahip olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Stabilizatör ilavesi yaparak, serum ayrılmasının azaltılması, viskozitenin artırılması ve yapının iyileştirilmesi sonucunda örneklerin kabul edilebilirliğinin artırılabilirliği; ayrıca, lezzetin iyileştirilebilmesi için, tuz veya çeşitli meyvelerden/ aroma maddelerinden yararlanmanın faydalı olabileceği düşünülmektedir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarların makale ile ilgili herhangi bir kişi veya kurum ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

## YAZARLARIN KATKISI

Nazlı Kanca, çalışmanın planlanması ve yürütülmesi süreci ile, gerçekleştirilen üretim ve analizlerin tamamı ile sonuçların yorumlanması ve makalenin yazımında görev almıştır. Canan Altınay, çalışmanın planlanması, üretim ve analizlerin tamamı ile sonuçların değerlendirilmesi ve makalenin yazımında görev almıştır. Rabia Albayrak Delialioğlu, elde edilen sonuçların analizi ve yorumlanmasına katkıda bulunmuştur.

## KAYNAKLAR

Agarkova, E.Y., Kruchinin, A.G., Zolotaryov, N.A., Pryanichnikova, N.S., Belyakova, Z.Y., Fedorova, T.V. (2020). Processing cottage cheese whey components for functional food production. *Foods and Raw Materials* 8(1): 52-59, doi: 10.21603/2308-4057-2020-1-52-59.

Akpınar, A., Torunoglu, F.A., Yerlikaya, O., Kinik, O., Akbulut, N., Uysal, H.R. (2015). Fermented probiotic beverages produced with reconstituted whey and cow milk. *Agro FOOD Industry Hi-Tech* 26(4): 24-27.

Atamer, M., Sezgin, E. (1986). Yoğurtta kurumadde artırımının pıhtının fiziksel özellikleri üzerine etkisi. *GIDA* 11(6): 327-331.

Anonim. (2009). *Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği*. 16 Şubat 2022 tarih ve 27143 sayılı Resmî Gazete, Ankara. <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2009/02/20090216-8.htm>

Barba, F.J. (2021). An integrated approach for the valorization of cheese whey. *Foods* 10(3): 564, doi: 10.3390/foods10030564.

Barbut, S. (2006). Effects of caseinate, whey and milk powders on the texture and microstructure of emulsified chicken meat batters. *LWT-Food Science and Technology* 39(6): 660-664, doi: 10.1016/j.lwt.2005.03.017.

Berkay Karaca, O., Güven, M., Yaşar, K., Kaya, S., Kahyaoğlu, T. (2009). The functional, rheological and sensory characteristics of ice

- creams with various fat replacers. *International Journal of Dairy Technology*, 62(1): 93-99, doi: 10.1111/j.1471-0307.2008.00456.x.
- Brandelli, A., Daroit, D.J., Corrêa, A.P.F. (2015). Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *Food Research International* 73: 149-161, doi: 10.1016/j.foodres.2015.01.016.
- Carvalho, F., Prazeres, A. R., Rivas, J. (2013). Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Science of the Total Environment* 445-446: 385-396, doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.12.038.
- Chegini, G., Taheri, M. (2013). Whey powder: Process technology and physical properties: a review. *Middle-East Journal of Scientific Research* 13(10): 1377-1387, doi: 10.5829/idosi.mejsr.2013.13.10.1239.
- De Gobba, C., Espejo-Carpio, F.J., Skibsted, L.H., Otte, J. (2014). Antioxidant peptides from goat milk protein fractions hydrolysed by two commercial proteases. *International Dairy Journal* 39(1): 28-40, doi: 10.1016/j.idairyj.2014.03.015.
- Guler-Akin, M.B., Goncu, B., Akin, M.S. (2016). Some properties of probiotic yoghurt ice cream supplemented with carob extract and whey powder. *Advances in Microbiology* 6(14): 1010-1020, doi: 10.4236/aim.2016.614095.
- Hooi, R., Barbano, D.M, Bradley, R.L, Budde, D., Bulthaus, M., Chettiar, M. (2004). Chemical and physical methods. In: *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, Wehr, H.M., Frank, J.F. (chief ed.), American Public Health Association, the USA, pp. 363-532.
- Kareb, A., Aider, M. (2019). Whey and its derivatives for probiotics, prebiotics, synbiotics, and functional foods: A critical review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 11(2): 348-369, doi: 10.1007/s12602-018-9427-6.
- Madenci, A.B., Bilgiçli, N. (2014). Effect of whey protein concentrate and buttermilk powders on rheological properties of dough and bread quality. *Journal of Food Quality* 37(2): 117-124, doi: 10.1111/jfq.12077.
- Özer, B. (2006). *Yoğurt bilimi ve teknolojisi*. Sidas Medya Ltd. Şti., İzmir, Türkiye.
- Patocka, G., Cervenková, R., Narine, S., Jelen, P. (2006). Rheological behaviour of dairy products as affected by soluble whey protein isolate. *International Dairy Journal* 16(5): 399-405, doi: 10.1016/j.idairyj.2005.05.010.
- Penna, A.L.B., Sivieri, K., Oliveira, M.N.D. (2001). Relation between quality and rheological properties of lactic beverages. *Journal of Food Engineering* 49(1): 7-13, doi: 10.1016/S0260-8774(00)00179-5.
- Pereira, Á.M.d.S., de Farias, D.R.B., de Queiroz, B.B., Nobre, M.S.d.C., Cavalcanti, M.T., Salles, H.O., dos Santos, K.M.O., de Medeiros, A.C.D., Florentino, E.R., Buriti, F.C.A. (2019). Influence of a Co-culture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus casei* on the proteolysis and ACE-inhibitory activity of a beverage based on reconstituted goat whey powder. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 11: 273-282, doi: 10.1007/s12602-017-9362-y.
- Pescuma, M., Hébert, E.M., Mozzi, F., De Valdez, G.F. (2010). Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 141(1-2), 73-81, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.011.
- Prazeres, A. R., Carvalho, F., Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management* 110: 48-68. doi: 10.1016/j.jenvman.2012.05.018.
- Revilla, I., Gonzalez-Martin, M.I., Vivar-Quintana, A.M., Blanco-Lopez, M.A., Lobos-Ortega, I.A., Hernandez-Hierro, J.M. (2016). Antioxidant capacity of different cheeses: Affecting factors and prediction by near infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science* 99(7): 5074-5082, doi: 10.3168/jds.2015-10564.
- Skryplonek, K., Dmytrów, I., Mituniewicz-Malek, A. (2019). Probiotic fermented beverages based on acid whey. *Journal of Dairy Science* 102(9): 7773-7780. doi: 10.3168/jds.2019-16385.
- Tamuçay-Özünü, B., Koçak, C. (2010). Farklı inkübasyon sonu asitliğinin ayran kalitesine etkisi. *GIDA* 35(2): 113-119.
- TUIK (2022). <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Sut->

ve-Sut-Urunleri-Uretimi-Temmuz-2022-45755  
(Erişim tarihi: 19 Ekim 2022).

Yerlikaya, O. (2014). Effect of bee pollen supplement on antimicrobial, chemical, rheological, sensorial properties and probiotic

viability of fermented milk beverages. *Mljekarstvo*  
64(4): 268-279, doi: 10.15567/  
mljekarstvo.2014.0406.



## KAFEİN MOLEKÜLÜNÜN MÜSİN PROTEİNİ İLE OLAN ETKİLEŞİMİNİN FLORESAN SPEKTROSKOPİ TEKNİĞİ İLE ARAŞTIRILMASI

**Hilal Yılmaz\* , Arslan Recep Şahin**

Bartın Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü, Bartın, Türkiye

Geliş / Received: 27.11.2022; Kabul / Accepted: 30.12.2022; Online baskı / Published online: 17.01.2023

Yılmaz, H., Şahin, A.R. (2023). Kafein molekülünün müsün proteini ile olan etkileşiminin floresan spektroskopisi ile araştırılması. *GIDA* (2023) 48 (1) 50-60 doi: 10.15237/gida.GD22120

Yılmaz, H., Şahin, A.R. (2023). Investigation of the interaction between caffeine molecule and musin protein by fluorescence spectroscopy technique. *GIDA* (2023) 48 (1) 50-60 doi: 10.15237/gida.GD22120

### ÖZ

Uyanık kalmaya ve yorgunluğun başlamasını önlemeye yardımcı olduğundan, kafein içerikli gıdalar dünya çapında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu sebeple hem gıda hem de farmasötik amaçlı kafein kullanımına yönelik araştırmalar son yıllarda artmıştır, fakat yaygın olarak oral yolla alınan kafeinin gastrointestinal sistem boyunca ona eşlik eden salyadaki müsün proteini ile olan etkileşimi hakkında bir araştırma bulunmamaktadır. Bu çalışmamızda kafein ve müsün molekülleri arasındaki etkileşim floresan spektroskopisi tekniği kullanılarak araştırılmıştır. Deneysel sonuçlar kafein moleküllerinin müsün proteininin floroforları üzerine söndürme etkisi olduğunu göstermiştir. Bu etki hem ağız/bağırsak ortamına yakın pH 7 hem de mide ortamına yakın pH 3 değerlerinde, her kafein molekülü bir protein molekülü ile etkileşime girmesi ve bu etkileşimin statik floresan söndürme mekanizmasının çalışmasına sebep olmasıyla gerçekleşmektedir. Kafein ve müsün etkileşiminin kafein konsantrasyonu arttıkça, özellikle de mide ortamında, hızla arttığını gösteren bu çalışmamız, kafeinin sindirim ve biyoyararlılık çalışmalarına temel oluşturabilecektir.

**Anahtar kelimeler:** kafein, müsün, floresan söndürme, pH, Stern-Volmer

## INVESTIGATION OF THE INTERACTION BETWEEN CAFFEINE MOLECULE AND MUSIN PROTEIN BY FLUORESCENCE SPECTROSCOPY TECHNIQUE

### ABSTRACT

Caffeine-containing foods are frequently used around the world, as it helps to stay awake and prevent the onset of fatigue. Therefore, research on the use of caffeine as a food or pharmaceutical purposes has increased in recent years. However, there is no research for the interaction of caffeine with the mucin protein in saliva that accompanies the orally ingested molecules throughout the gastrointestinal tract. In this study, the interaction between caffeine and mucin was investigated using fluorescence spectroscopy technique. Experimental results showed that caffeine molecules have a quenching effect on the fluorophores of mucin protein. This effect occurs when each caffeine molecule interacts with one protein molecule via the static fluorescence quenching mechanism. Moreover, the interaction of caffeine and mucin was enhanced as the caffeine concentration increases, especially in the stomach environment. After all, this study may provide a good basis for the digestion and bioavailability studies of caffeine.

**Keywords:** caffeine, mucin, fluorescence quenching, pH, Stern-Volmer

\*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: hiclebioglu@bartin.edu.tr

☎: (+90) 544 849 0058

Hilal YILMAZ; ORCID no: 0000-0002-0399-355X

Arslan Recep ŞAHİN; ORCID no: 0000-0001-5593-6795

## GİRİŞ

Dünyada tüketimi yaygın olan bazı içeceklerin içerisinde kafein bulunmaktadır. Yetişkin nüfusun yaklaşık %80'i her gün kahve veya çay içmektedir. Kahve ve çayda ortalama 2-3 mM kafein bulunmaktadır (Lisko vd., 2017). Doğal uyarıcı bir madde olan kafein az miktarda kakao içinde de bulunmakta ve yoğun karakteristik acımsı tadı sebebiyle kola gibi bazı asitli içeceklere de eklenmektedir.

Bir alkaloid türü olan kafein molekülünün, beyni ve merkezi sinir sistemini uyararak çalıştığı, böylece uyanık kalmaya ve yorgunluğun başlamasını önlemeye yardımcı olduğu bilinmektedir. Bu sebeple, kafein molekülünün hem gıdalarda hem de ilaç türü ürünlerde katkı maddesi olarak kullanılması gün geçtikçe artmaktadır. Örnek olarak kafein, soğuk algınlığı ilaçları, analjezikler, anorektanlar ve amfetamin benzeri olarak bilinen uyarıcı veya uyarıcı karışımların bileşenlerinde de tüketilir (Grosso vd., 2017).

Kafeinin ayrıca farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri olduğu belirtilmektedir (Alsabri vd., 2018). Kafeinin bağırsak mikrobiotasını değiştirebildiğinden dolayı anti-enflamatuvar etkilerinin olduğu belirtilmiştir. Hücre, hayvan ve insan çalışmalarından elde edilen kanıtlara göre kafein bağırsak mikrobiyotasının yapısında ve fonksiyonunda değişiklikler meydana getirir. Bu değişiklikler majör filumlar (*Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* ve *Firmicutes*) arasındaki oran değişiklikleridir (Pan vd., 2016). Bağırsak mikrobiotasındaki bu değişiklikler polifenol biyotransformasyonunda önemli role sahiptir ve obezite karşıtı etki yaptığı belirtilmiştir. Bu sebeple, kafeinin bağırsak ve bağırsak mikrobiotasında olumlu yönde etkileri olduğu söylenmektedir (Moco vd., 2012). Diğer yandan, kafein fazla tüketildiğinde mide kanserine sebep olabileceği yönünde bulgular vardır (Grosso vd., 2017). Bunun da sebeplerinden birisi olarak kafeinin, insan mide müsin salgılayan hücrelerinde müsin salgılanmasını inhibe etmesi olduğu düşünülmektedir. Mukus sekresyonunun azalması, kafein nedeniyle gastrik mukozal hasarın

önemli faktörlerinden biri olabilir (Hamada vd., 1997).

Genel olarak baktığımızda kafein ister gıdalarla ister farmakolojik ürünlerle alınsın, bulgular oral yolun kafeinin en yaygın uygulama yolu olduğunu göstermektedir ve kafeinin tam emilimi ince bağırsakta gerçekleşir. Kafein oral yolla alınıp bağırsakta emilene kadar salya ona eşlik etmektedir. Salyanın büyük kısmını müsin isimli proteinler oluşturmaktadır. Müsin, salya ve midesel sıvıların temel proteindir (Bansil ve Turner, 2006). Müsin, yüksek derecede glikozilasyona sahip, yüksek moleküler ağırlıklı (0,5-40 MDa), ampifilik karakterli ve pH 2-3 aralığında seyreden düşük izoelektrik noktasına sahip olan bir proteindir (Svensson ve Arnebrant, 2010). Farklı organlardaki müsin proteinleri, kompozisyon, yapı ve biyofiziksel açılardan önemli farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıkların hem hidrofobik uç bölgelerinden hem de farklı tip, miktar ve pozisyonda negatif yük içeren merkez bölgesinden kaynaklandığı rapor edilmiştir (Bansil ve Turner, 2006; Madsen vd., 2016).

Kafeinin oral proresteki tat salınımı, midede gastrik asit sekresyonunu uarması (Hamada vd., 1997), emilimi ve bağırsak mikrobiyotasını etkilemesi (Moco vd., 2012) gibi durumlar, tüm bu süreçte ona eşlik eden müsin proteini ile olan etkileşimi sonucu olabileceği hipotezini kurmamızı sağlamıştır. Yaptığımız araştırmalarda müsin proteini ile kafein molekülünün etkileşimini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu etkileşimin moleküler düzeyde aydınlatılması kafeinin ağız, mide ve bağırsaktaki etkilerine ışık tutabilir. Protein-ligand etkileşimleri, küçük ilaç moleküllerinin canlı sistemlerde taşınması ve dağılımında önemlidir (Islam vd., 2016).

Bu çalışmamızda, kafein ve müsin arasındaki etkileşimi anlamada floresans spektroskopisi tekniği uygulanmıştır. Floresans spektroskopisi intirinsik floroforların varlığına dayalı bir tekniktir. Proteinlerin içerisindeki triptofan, tirozin ve fenilalanin amino asitleri floresans emisyonu verir ve bu emisyon spektrumlarının hem yoğunluğundaki hem de maksimum tepe

noktasındaki değişimler, bu amino asitlerin ve dolayısıyla proteinin konformasyonel değişimleri veya bulunduğu ortamdaki farklılaşmaları hakkında bilgiler sağlar (Lakowicz, 2006). Bu sebeple müsin proteinindeki kafein varlığında oluşan muhtemel değişimleri ve bu iki molekül arasındaki etkileşimi göstermede floresans spektroskopisi tekniği optimum tekniklerden biridir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Örnek hazırlama

Araştırmada kullanılacak çözeltiler; domuz (porcine) gastrik müsin (PGM) (Tip III) ve kafein yüksek saflıkta (> %98.5) Sigma-Aldrich'den (St. Louis, Missouri, USA) satın alınmıştır ve ekstra bir purifikasyon yapılmadan kullanılmıştır. Protein ve kafein çözeltilerinin gerekli konsantrasyonları 10 mM fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile hazırlanmıştır.

### Floresan spektroskopisi ölçümleri

Tüm intrinsik floresans ölçümlerinde FS5 Spectrofluorometer (Edinburgh Instruments, Livingston, UK) kullanılmıştır (150 W Xenon lambası ve PMT (single photon counting photomultiplier) dedektörü). Ekzitasyon dalga boyu ( $\lambda_{ex}$ ) 280 nm ve emisyon dalga boyu 290-420 nm aralığında ayarlanarak her 2 nm'de ölçüm alınmıştır. Ölçümler oda sıcaklığında 10 mm quartz küvet kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Kafein moleküllerinin müsin proteininin floroforları üzerine söndürme etkisini gözlemleyebilmek için kafein çözeltilerinden 0 – 10  $\mu$ M arasında bir seyreltme serisi hazırlanmıştır. Her ölçüm işleminde seçili konsantrasyondan 1 mL kafein çözeltisi ile 1 mL'lik 1 mg/mL konsantrasyonundaki müsin çözeltisine eklenmiştir. Protein çözeltisine (müsin) sabit hacimdeki söndürücü (kafein) eklenmesi seyreltme etkisi sonucu oluşan komplikasyonlardan kaçınmamızı sağlamaktadır. Ölçümlerin alınacağı emisyon dalga boyu aralığında kafein molekülleri, protein floresans emisyonu etkileyecek bir enerji absorpsiyonuna sahip değildir fakat kafein moleküllerinin olası ufak absorpsiyon etkilerini de ortadan kaldırmak için her kafein konsantrasyonu için bir blank (kör)

hazırlanmış (yani kafein çözeltilerinin tek başına floresans emisyon şiddetleri ölçülür) ve bu blank (kör) ilgili karışımın emisyon spektrumundan çıkarılarak müsin proteininin floresans şiddetindeki değişim net olarak gözlemlenmiştir (Papadopoulou vd., 2005; Brandão vd., 2017).

Ölçümler sonunda Stern-Volmer grafiği çizilip söndürme katsayısı hesaplanmıştır. Söndürme katsayısı değerine göre söndürmenin dinamik veya statik olduğu saptanabilmektedir. Floresans söndürme analizi aşağıda verilen Stern-Volmer formülüne göre yapılmıştır (Lakowicz, 2006):

$$F_0/F = 1 + K_{sv} [Q] = 1 + K_q \tau_0 [Q]$$

$F_0$ : müsin olmadığı durumdaki floresans şiddeti

$F$ : müsin varlığında elde edilen floresans şiddeti

$K_{sv}$ : Stern-Volmer söndürme sabiti

$K_q$ : Bimoleküler söndürme sabiti

$[Q]$ : müsin konsantrasyonu

Stern-Volmer grafiği  $F_0/F$  değerine karşılık  $[Q]$  değeri olarak çizildiğinde elde edilen regresyon eğrisinin eğimi  $K_{sv}$  değerini verir.  $K_{sv}$  değeri söndürme verimini ve/veya söndürücü molekülün florofora erişilebilirliğini yansıtır. Böylelikle kafein ve müsinler arası etkileşim gücünün bir göstergesi olmaktadır (Mensi vd., 2013).  $K_q$ , bimoleküler söndürme sabitidir ve  $K_{sv}/\tau_0$ 'a eşittir ( $M^{-1} s^{-1}$ ). Bununla birlikte  $\tau_0$  söndürücünün yokluğunda floroforun ömrüdür ( $10^{-8}$  s).

Floresan söndürme hem statik hem de dinamik söndürmeyi içerir ve maksimum dinamik sabit, sulu bir çözeltide  $2.0 \times 10^{10} M^{-1} S^{-1}$ 'dir (Lakowicz, 2006).  $K_q$ 'nin maksimum dinamik sabitten büyük olduğu durumda, statik söndürme baskındır. Statik söndürme sabitleri aşağıdaki çift-logaritmik denkleme göre hesaplanabilmektedir.

$$\log \left[ \frac{F_0 - F}{F} \right] = \log K_A + n \log [Q]$$

Bu denklemde  $K_A$ , grafiğin ordinat ile kesişimidir ve bağlanma sabitini verir. Grafiğin eğiminden ise  $n$  değeri hesaplanır ve bağlama noktalarının sayısını verir.

Floresans emisyon şiddetindeki azalma iki molekül arasındaki bağlanma derecesi hakkında bilgi verirken,  $\lambda_{em}$  değerindeki kaymalar ise Trp

çevresindeki değişimleri dolayısıyla protein konformasyonundaki değişimleri göstermektedir.

### İstatistiksel analiz

Tüm deneyler üç kez tekrarlanarak, veriler “ortalama  $\pm$  standart sapma” olarak temsil edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar için veriler, varyans analizi (ANOVA) için SPSS yazılımı (Windows için sürüm 16.0, SPSS Inc.) kullanılarak istatistiksel analize tabi tutulmuştur.

## SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### Floresan söndürme çalışmaları

Kafein moleküllerinin müsin protein ile etkileşimini ve kafeinin müsin moleküllerinin floresan şiddeti üzerine söndürme etkisini gözlemek için artan konsantrasyonlarda kafein çözeltisinin müsin protein çözeltisine eklenmesiyle floresan emisyon spektrumları elde edilmiştir. Şekil 1’de gösterildiği üzere hem pH 7 hem de pH 3 ortamında artan kafein konsantrasyonu, müsin proteininin floresan yoğunluğunda kademeli düşüşe neden olmuştur. Diğer bir deyişle, kafein molekülleri müsin molekülleri üzerinde floresan söndürücü olarak etki etmiştir. Floresan söndürme, söndürücü moleküller ile çeşitli moleküler etkileşimler sebebiyle bir floroforun floresan kuantum veriminin azalmasıdır (Papadopoulou vd., 2005). Floresan söndürme için florofor ile söndürücü arasında moleküler temas gereklidir. Moleküler etkileşim veya çözücü bileşimindeki değişiklik nedeniyle, floroforun uyarılma ve emisyon davranışı değiştirilebilir. Örneğin, Tyr solvent polaritesine karşı nispeten duyarlıdır, Trp ise polariteye ve/veya yerel ortama büyük ölçüde bağımlıdır (Lakowicz, 2006). Bunun nedeni, yakın iki izoenerjik geçişe sahip Trp'nin benzersiz şekilde karmaşık floroforudur; bununla birlikte, Tyr emisyonunun tek bir elektronik durumdan meydana geldiği görülmektedir.

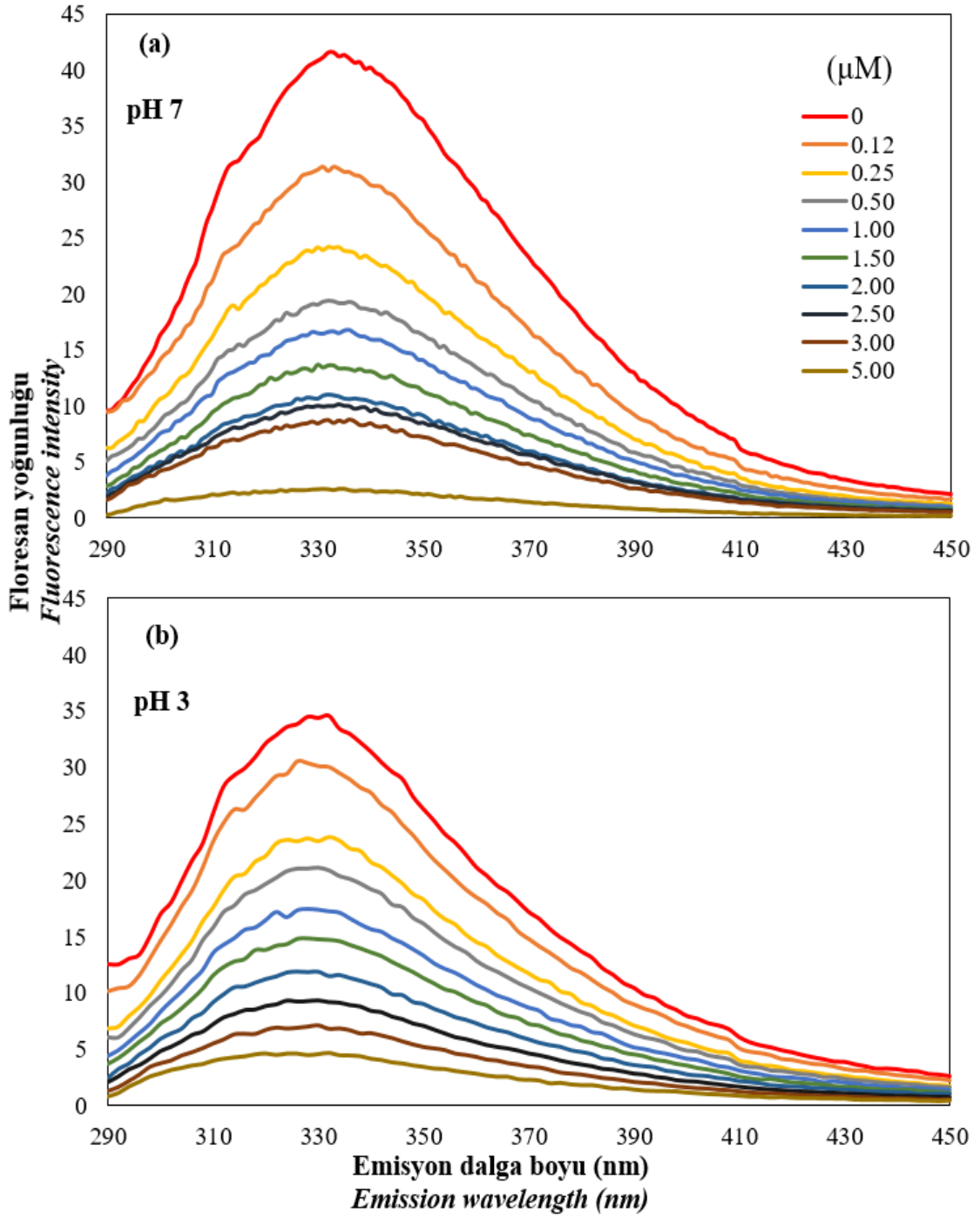
Şekil 1’de müsin proteininin kendisinin (kafein varlığından bağımsız olarak) bir adet geniş floresan emisyon piki verdiği görülmektedir. Bu tip pikler, proteinin floresan emisyon yoğunluğuna Trp’a ek olarak Tyr rezidülerinin de katkıda bulunduğunu göstermektedir. Proteinlerin floresan emisyonuna, en uzun dalga

boyunda absorblayan Trp hakimdir. Trp varlığında proteinde fenilalanin (Phen) ve Tyr amino asitleri bulunmasına rağmen absorbladıkları enerji esas olarak Trp'a aktarılır. Protein floresansı genellikle 280 nm’de uyarılır, ancak Phen, maksimum 282 nm’ye yakın yapılandırılmış bir emisyon sergiler. Bu nedenle çok küçük bir kuantum verimine sahip olan Phen, bu çalışmada olduğu gibi uyarılmamıştır. Tyr ve Trp’ın sudaki maksimum emisyonları sırasıyla 303 nm ve 350 nm’de gerçekleşir (Lakowicz, 2006). Böylece, Şekil 1’de gözlemlenen emisyon tepe noktaları, 280 nm’de hem Tyr hem de Trp’ın absorpsiyonundan kaynaklanmaktadır. Öte yandan, Tyr’den Trp’a rezonans enerji transferleri art arda gerçekleşir, bu nedenle Tyr’in çoğu proteinin emisyonuna yalnızca küçük bir katkısı gözlemlenebilir, geri kalan enerji bu çalışmada da olduğu gibi Trp rezidülerinin geniş bir pik vermesine sebep olur.

Kafein konsantrasyonunun müsin proteinlerinin floresan yoğunluğu üzerine etkisini daha net görebilmek için her bir konsantrasyonun söndürme yüzdesi hesaplanarak Şekil 2’de gösterilmiştir. Ortam pH’ı 7 olduğunda 0.12  $\mu$ M kafein konsantrasyonunda % 25.5 $\pm$ 0.5 oranında bir söndürme olurken, kafein miktarı 5  $\mu$ M olduğunda söndürme oranı % 93.9 $\pm$ 0.3’e çıkmaktadır. Söndürme yüzdeleri pH 3 ortamında genel olarak pH 7’ye göre daha düşük olmakla beraber, benzer şekilde 0.12  $\mu$ M’den 0.12  $\mu$ M’a artan kafein konsantrasyonu daha fazla söndürmeye sebep olmuştur (sırasıyla % 11.9 $\pm$ 0.5 ve % 86.4 $\pm$ 0.4).

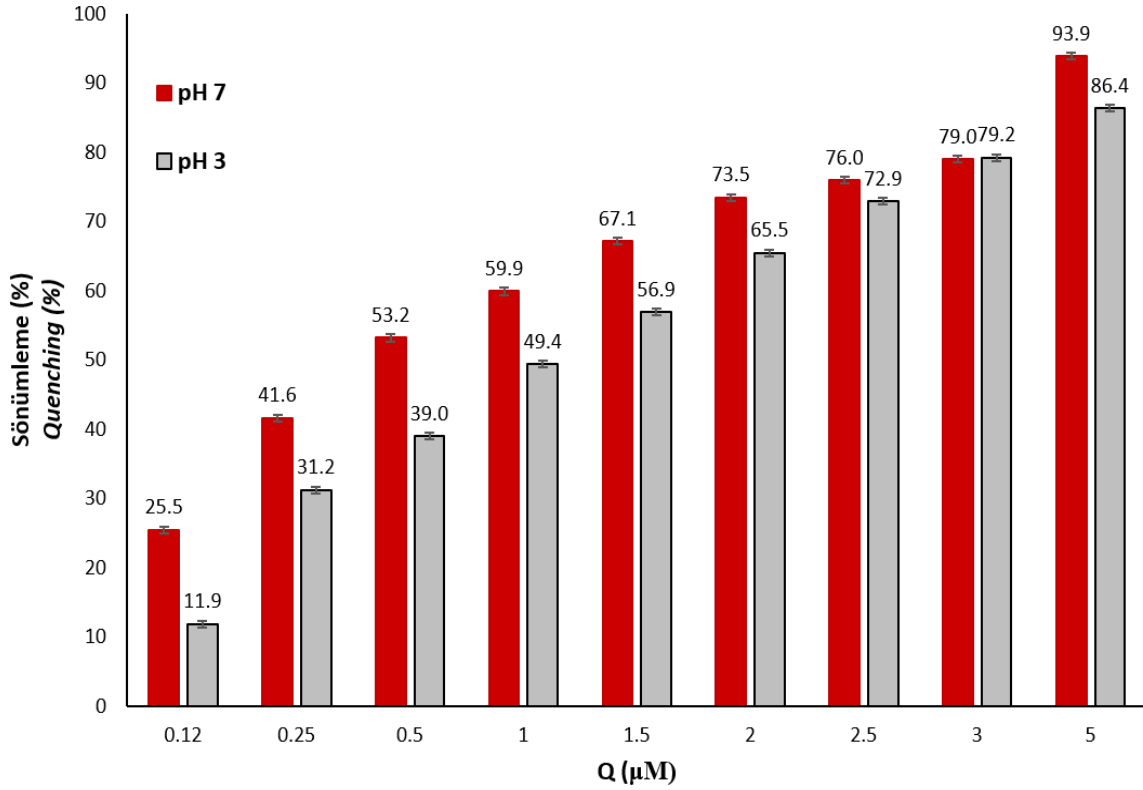
Müsin proteininin kafein içermediği durumdaki floresan yoğunlukları karşılaştırıldıklarında pH 7’de pH 3’e göre daha yüksek değere sahip olduğu görülmektedir. Bununla birlikte pH 7’de kafeinin daha fazla söndürme etkisi olmuştur. Bu durum şaşırtıcı değildir, çünkü müsinin izoelektrik noktasının 2 ile 3 arasında yer aldığı bilinmektedir (Bansil ve Turner, 2006) ve dolayısıyla pH 3’de net yükü neredeyse sıfırdır. Bu veriler, müsin protein yapısında pH’ın önemine ve sonuç olarak, müsinin kafein ile etkileşime girme yeteneğine floresan rezidülerinin yan zincirlerindeki yük miktarlarının katkısına işaret etmektedir.





Şekil 1. Artan kafein konsantrasyonu ve farklı pH ortamlarında mûsin proteininin floresan emisyon spektrumları ( $\lambda_{ex}$ : 280 nm)

Figure 1. Fluorescence emission spectra of mucin protein at different caffeine concentration and Ph



Şekil 2. Artan kafein konsantrasyonu ve farklı pH ortamlarında müsin proteininin floresan yoğunluğundaki sönümlenme yüzdeleri

Figure 2. Fluorescence quenching percentage of mucin protein at different caffeine concentration and pH

Floresan yoğunluğunun yanı sıra maksimum emisyon dalga boyu ( $\lambda_{max}$ ) değerindeki değişimler de çözücü ortamının ve moleküler etkileşimin etkileri hakkında önemli ipuçları verebilmektedir. Farklı pH değerlerindeki tampon çözeltilerinde müsin için gözlenen tüm  $\lambda_{max}$  değerleri, tek başına Trp indol grubu için  $\lambda_{max}$  değerinden biraz daha kısadır ( $\lambda_{em} = 340$  nm) (Lakowicz, 2006). Bu durum müsinin ana floresan rezidülerinin proteinin çözücü ile temas halindeki yüzey bölgesinde değil de, sulu çözücünden daha etkili bir şekilde korunduğu hidrofobik bölgelerde bulunduğunu gösterir. Fakat müsin proteininin maksimum floresan yoğunluğu verdiği dalga boyu pH 7'de 332 nm iken pH 3'te 328 nm olmuştur (Şekil 1 ve Çizelge 1). Yani ortam pH 7'den pH 3'e değiştirildiğinde 4 nm'lik daha düşük dalga boyuna kayma (maviye kayma) gözlemlenmiştir. Emisyonun daha uzun dalga boyuna kayması (kırmızıya kayma – red shift), genellikle proteinler

açıldığında meydana gelir ve bu, proteinlerin kompakt yapısında önemli bir kayıp olduğunu düşündürür. Diğer yandan floroforlar doğal proteinin içine gömülü haldeyse daha kısa dalga boyunda emisyon verir (maviye kayma- blue shift) (Lakowicz, 2006). Gastrik müsinin, pH  $\geq 4$ 'te rastgele halka konformasyonundan, müsin moleküllerinin pH  $< 4$ 'te bir araya toplandığı anizotropik ve daha kompakt bir konformasyona doğru bir konformasyonel değişime uğradığı bilinmektedir (Çelebioğlu vd., 2015). pH 3'te müsin molekülleri protonlanır ve negatif yük değeri düşer (Çelebioğlu vd., 2020). Bu, daha önce yaptığımız zeta potansiyel çalışmaları sonucunda gösterilmiştir (Yılmaz vd., 2021). Bu çalışma sonuçları da daha düşük  $\lambda_{max}$  vererek pH 3 değerinde müsin molekülünde katlanmalar meydana geldiğini kanıtlamıştır.

Çizelge 1. Kafein müsin etkileşiminin pH 7 ve pH 3 ortamlarında Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ), bimoleküler söndürme ( $K_q$ ) ve bağlanma sabitleri ( $K_A$  ve  $n$ ) ile maksimum floresan dalga boyu ( $\lambda_{max}$ ) ve ulaşılabilir florofor değerleri ( $f_a$ )

Table 1. Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ), bimolecular quenching ( $K_q$ ), and binding constants ( $K_A$  ve  $n$ ) of the caffeine-mucin interaction in addition to the maximum fluorescence wavelength ( $\lambda_{max}$ ) and accessible fluorophore ( $f_a$ )

pH	Stern-Volmer sabitleri Stern-Volmer constants			Çift-logaritmik regresyon değerleri Double-logarithmic regression values			$f_a$	$\lambda_{max}$ (nm)
	$K_{sv}$ ( $10^{14}$ L mol <sup>-1</sup> )	$K_q$ ( $10^6$ L mol <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	$K_A$ ( $10^5$ L mol <sup>-1</sup> )	$n$	R <sup>2</sup>		
7	1.18	1.18	0.985	1.67	0.70	0.988	0.84	332
3	1.13	1.13	0.960	1.10	0.94	0.980	1.03	328

### Stern-Volmer ve bağlanma katsayıları

Kafein konsantrasyonunu artırarak müsin floresan söndürmeyi açıklamak için Şekil 3'te sunulan Stern-Volmer grafikleri, deneysel olarak ölçülen F ve F<sub>0</sub> değerleri kullanılarak elde edilmiştir. Her iki pH değerinde de lineer Stern-Volmer eğrileri bulunmuştur. Bu genellikle, proteinin tüm ana floresan rezidülerinin çözücü tarafından eşit olarak erişilebilir olduğu anlamına gelir. İki florofor popülasyonu mevcutsa ve bir sınıf söndürücü tarafından erişilebilir değilse, Stern-Volmer çizimleri doğrusallıktan x eksenine doğru sapar (Giraddi vd., 1996). Müsin proteininin floresan rezidülerinin eşit olarak erişilebilir olup olmadığından emin olmak için ulaşılabilir floresan kesri ( $f_a$ ) aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f_a K_A [Q]} + \frac{1}{f_a}$$

$1/[Q]$  değerine karşılık  $F_0/\Delta F$  grafiği lineer olarak bulunmuş ve bu lineer eğrinin eğimi  $1/(f_a K_A)$  değerini ve ordinat ile kesişimi ise  $1/f_a$  değerini vermiştir. Hesaplanan ve Çizelge 1'de verilen  $f_a$  değerleri her iki pH ortamında da yaklaşık 1'dir. Bu da tüm floresanın söndürülebilir Trp'den kaynaklandığı anlamına gelmektedir. Dolayısıyla bu veriler, Stern-Volmer eğrilerinden elde edilen, tüm ana floresan rezidülerinin söndürülebilir olduğu ve protein içinde gömülü veya söndürücü tarafından kullanılmayan kısımların olmadığı verilerini desteklemektedir.

Stern-Volmer grafiklerinin doğrusallığı aynı zamanda sadece bir tip söndürme mekanizması olduğunu ve bunun dinamik veya statik olabileceğini işaret etmektedir. Müsin-kafein

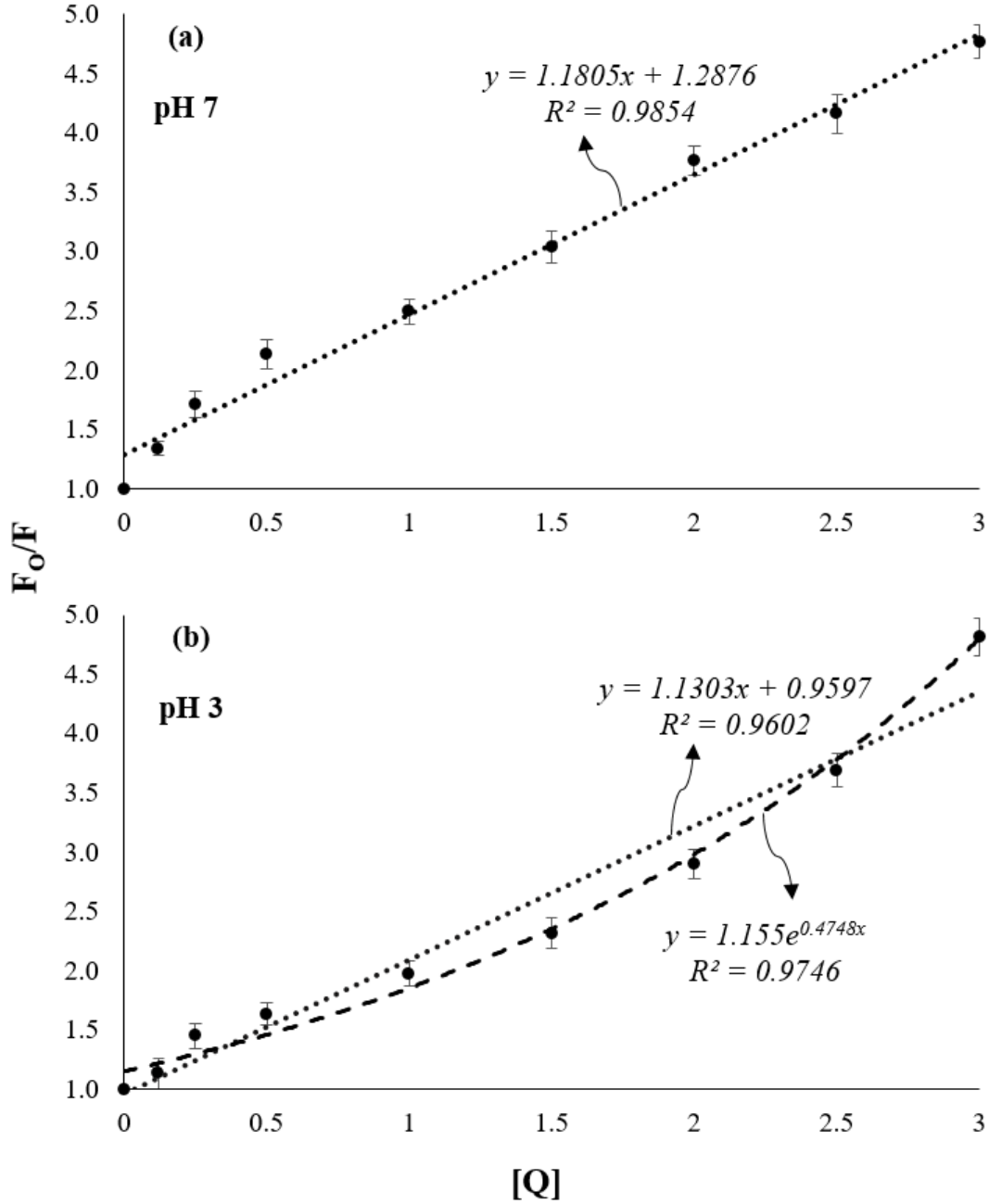
sistemi için Stern-Volmer söndürme sabiti olan  $K_{SV}$  değerleri  $[Q]$ 'ya karşılık  $F_0/F$  grafiğinin eğiminden hesaplanmaktadır (Şekil 3) ve söndürme verimliliğini ve söndürücü kafeinin müsin floroforuna erişilebilirliğini yansıtır (Papadopoulou vd., 2005). Bimoleküler söndürme sabiti  $k_q$  ise  $K_{sv}/\tau_0$  oranından hesaplanmaktadır. Hesaplanan  $K_{SV}$  ve  $k_q$  değerleri Çizelge 1'de verilmiştir. Her iki pH için de  $k_q$  sabitleri maksimum dinamik söndürme sabiti olan  $2.0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$  değerinden büyük olduğu için müsin-kafein sisteminde statik söndürme baskındır.

Şekil 3b'de gösterilen diğer bir durum ise pH 3 ortamında artan kafein konsantrasyonunda Stern-Volmer eğrisi doğrusallıktan kayabilmekte ve y eksenine doğru yukarı doğru eğrilik gösterebilmektedir. Stern-Volmer denkleminin (yukarı doğru eğimli grafikler) pozitif sapmalar genellikle söndürme miktarı büyük olduğunda tespit edilir (Brandão vd., 2017). Stern-Volmer grafiğinden bu tür bir sapma, statik söndürme işlemine atfedilir ve genellikle "eylem alanı" modeliyle açıklanır (Giraddi vd., 1996; Lakowicz, 1999). Bu modele göre yine statik söndürme gerçekleşir ve florofor tam uyarılma anında söndürücü molekül ile bitişik halde bulunur. Müsin-kafein sisteminde de, kafein molekülleri tam uyarılma anında müsin molekülleriyle etkileşim sonucu floresan-olmayan-kompleks oluşturarak statik söndürmeye sebep olduğu düşünülmektedir. Bu durum pH 3'de ve artan kafein konsantrasyonlarında daha etkilidir.

Müsin ve kafein moleküllerinin etkileşiminde rol alan bağlanma bölgelerinin sayısı ( $n$ ) çift-logaritmik regresyon eğrisinden hesaplanmıştır

(Şekil 4). Her iki pH noktasında da  $n$  değerleri 1'e yakındır. Bu da demek oluyor ki bir kafein molekülü, bir müsin molekülü ile moleküller arası çapraz bağlanma yoluyla bağımsız olarak

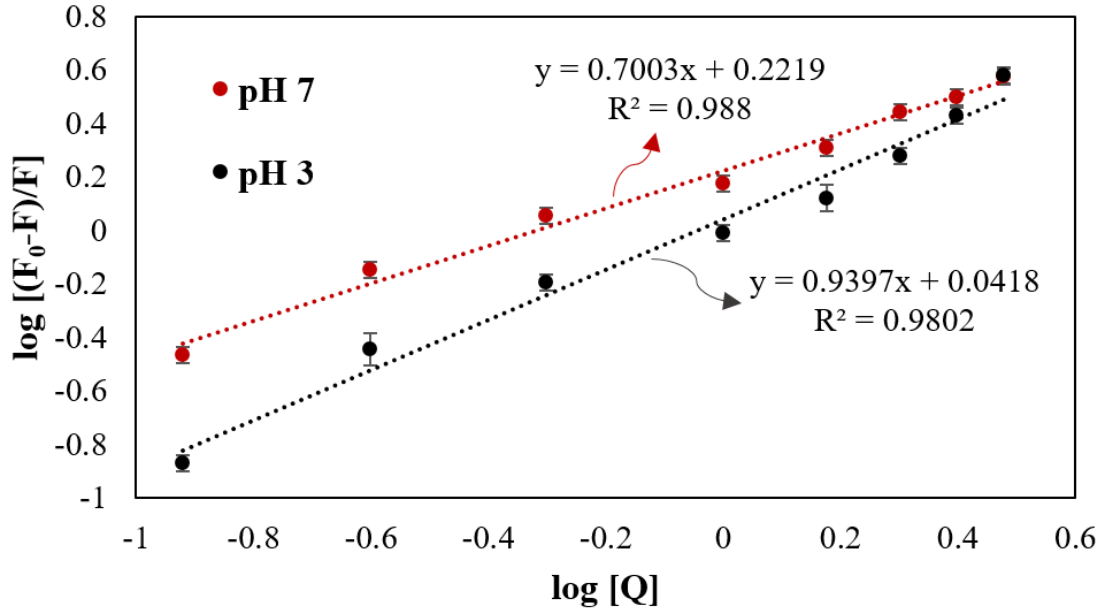
etkileşime girebilmektedir. Yine çift-logaritmik regresyon eğrisinden hesaplanan bağlanma sabitleri ( $K_A$ ) ise pH 3'te 1.10 iken pH 7'de 1.67'dir.



Şekil 3. Kafein ve müsin etkileşiminin pH 7 (a) ve pH 3 (b) ortamlarındaki Stern-Volmer eğrileri  
Figure 3. Stern-Volmer plots for the caffeine-mucin interaction at pH 7 (a) and pH 3 (b)

Bağlanma sabitinin pH 7 noktasında biraz daha büyük olması aynı kafein konsantrasyonlarında olmasına rağmen pH 7 ortamında kafein moleküllerinin müsin proteini ile etkileşime girme

eğiliminin daha yüksek ve güçlü olduğunu ima etmektedir. Kafein varlığında müsin floresan yoğunluğundaki düşüşün pH 7'de daha fazla oluşu da bu sonuçları desteklemektedir (Şekil 2).



Şekil 4. Kafein ve müsin etkileşiminin pH 7 ve pH 3 ortamlarındaki Çift Logaritmik Regresyon eğrileri  
Figure 4. Double-logarithmic regression plots for the caffeine-mucin interaction at pH 7 and pH 3

Kafein moleküllerinin proteinlerle bağ yapabildiği ve bunun sonucu proteinlerin floresanlarını statik söndürme mekanizması ile söndürdüğü literatürde bulunan bazı çalışmalarda da gösterilmiştir. Kafein moleküllerinin bovin serum albümin proteini ile sadece tek bir bağlanma bölgesinden ( $n=1$ ), bovin hemogloblin ile ise 5 bölgeden ( $n=5$ ), etkileşime girerek statik floresan söndürmeye sebep olduğu gözlemlenmiştir (Bian vd., 2006; Wang vd., 2009). Bovin serum albümin tek zincirli bir proteinken, bovin hemogloblin ise tetramerdir. Bu durum protein yapısının kafein molekülleri ile bağlanma derecesini etkilediğini göstermektedir. Müsin proteini ve kafein arasındaki etkileşimi inceleyen bu çalışmada da pH'a bağlı protein yapısındaki değişimlerin benzer şekilde kafein molekülleri ile olan etkileşimini etkilediği gözlemlendi.

Sonuç olarak hem pH 7 hem pH 3 ortamında her kafein molekülü bir protein molekülü ile

etkileşime girmektedir ve bu etkileşim statik floresan söndürme mekanizmasının çalışmasına sebep olmaktadır. Özellikle düşük kafein konsantrasyonlarında kafeinin müsin ile etkileşimi pH 7'de daha fazla ve etkileşim sonucu oluşan bağlar nispeten daha güçlüdür. Fakat pH 3 ortamında kafein konsantrasyonu 2  $\mu$ M üzerine çıktığında kafein molekülleri, zaten katlanmış yapıda bulunan müsin proteinlerinin etrafında bulunarak tam uyarılma anında söndürülmesine sebep olmaktadır. Biyolojik ortamlarda moleküler etkileşimleri etkileyecek birden fazla parametre olmasına karşın bu çalışmanın sonuçları, kafein moleküllerinin gastrointestinal sistemde en yoğun bulunan müsin proteini ile hem ağız/bağırsak ortamı olan pH 7 hem de mide ortamına yakın değer olan pH 3'te etkileşime girebildiğini ve bu etkileşimin kafein konsantrasyonu arttıkça, özellikle de mide ortamında, hızla arttığını göstererek kafeinin sindirim ve biyoyararlılık çalışmalarına temel oluşturabilecektir.

**ÇIKAR ÇATIŞMASI**

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması beyan etmemektedir. Finansörlerin çalışmanın tasarımında, verilerin toplanmasında, analiz edilmesinde, yazımında veya sonuçların yayınlanması kararında hiçbir rolü olmamıştır.

**YAZARLARIN KATKISI**

Tasarım, Hilal Yılmaz; metodoloji, Hilal Yılmaz deneyler, Hilal Yılmaz ve Arslan Recep Şahin; sonuçlar rapor hazırlama, Hilal Yılmaz ve Arslan Recep Şahin; yazma, Hilal Yılmaz; gözetim, Hilal Yılmaz; fon edinimi, Hilal Yılmaz ve Arslan Recep Şahin. Tüm yazarlar makaleyi okumuştur ve yayınlanan versiyonunu kabul etmiştir.

**TEŞEKKÜR**

Bu araştırmayı finanse ettiklerinden dolayı TÜBİTAK 2209/A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destek Programı'na teşekkür ederiz.

**KAYNAKLAR**

Alsabri, S. G., Mari, W. O., Younes, S., Elsadawi, M. A., Oroszi, T. L. (2018). Kinetic and dynamic description of caffeine. *Journal of Caffeine and Adenosine Research*, 8(1), 3-9.

Bansil, R., Turner, B. S. (2006). Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current opinion in colloid & interface science*, 11(2-3), 164-170.

Bian, W., Wei, Y. L., Wang, Y. P., Dong, C. (2006). Study on interaction of caffeine and theophylline with bovine serum albumins. *Guang pu xue yu Guang pu fen xi= Guang pu*, 26(3), 505-508.

Brandão, E., Silva, M. S., García-Estévez, I., Mateus, N., de Freitas, V., Soares, S. (2017). Molecular study of mucin-procyanidin interaction by fluorescence quenching and Saturation Transfer Difference (STD)-NMR. *Food chemistry*, 228, 427-434.

Çelebioğlu, H. Y., Gudjónsdóttir, M., Meier, S., Duus, J. Ø., Lee, S., Chronakis, I. S. (2015). Spectroscopic studies of the interactions between  $\beta$ -lactoglobulin and bovine submaxillary mucin. *Food Hydrocolloids*, 50, 203-210.

Çelebioğlu, H. Y., Lee, S., Chronakis, I. S. (2020). Interactions of salivary mucins and saliva with food proteins: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(1), 64-83.

Giraddi, T. P., Kadavevarmath, J. S., Malimath, G. H., Chikkur, G. C. (1996). Effect of solvent on the fluorescence quenching of organic liquid scintillators by aniline and carbon tetrachloride. *Applied radiation and isotopes*, 47(4), 461-466.

Grosso, G., Godos, J., Galvano, F., Giovannucci, E. L. (2017). Coffee, caffeine, and health outcomes: An umbrella. *Annual Review of Nutrition*, 37, 131-156.

Hamada, E., Nakajima, T., Hata, Y., Hazama, H., Iwasawa, K., Takahashi, M., ... Omata, M. (1997). Effect of caffeine on mucus secretion and agonist-dependent Ca<sup>2+</sup> mobilization in human gastric mucus secreting cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1356(2), 198-206.

Islam, M. M., Sonu, V. K., Gashnga, P. M., Moyon, N. S., Mitra, S. (2016). Caffeine and sulfadiazine interact differently with human serum albumin: A combined fluorescence and molecular docking study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 152, 23-33.

Lakowicz, J. R. (1999). Instrumentation for fluorescence spectroscopy. In *Principles of fluorescence spectroscopy* (pp. 25-61). Springer, Boston, MA.

Lakowicz, J.R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; 3rd ed.; Springer: Baltimore, Maryland; ISBN 978-0-387-46312-4.

Lisko, J. G., Lee, G. E., Kimbrell, J. B., Rybak, M. E., Valentin-Blasini, L., Watson, C. H. (2017). Caffeine concentrations in coffee, tea, chocolate, and energy drink flavored e-liquids. *Nicotine & Tobacco Research*, 19(4), 484-492.

Madsen, J. B., Sotres, J., Pakkanen, K. I., Efler, P., Svensson, B., Abou Hachem, M., ... Lee, S. (2016). Structural and mechanical properties of thin films of bovine submaxillary mucin versus porcine

- gastric mucin on a hydrophobic surface in aqueous solutions. *Langmuir*, 32(38), 9687-9696.
- Mensi, A., Choiset, Y., Rabesona, H., Haertlé, T., Borel, P., Chobert, J. M. (2013). Interactions of  $\beta$ -lactoglobulin variants A and B with vitamin A. Competitive binding of retinoids and carotenoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(17), 4114-4119.
- Moco, S., Martin, F. P. J., Rezzi, S. (2012). Metabolomics view on gut microbiome modulation by polyphenol-rich foods. *Journal of proteome research*, 11(10), 4781-4790.
- Pan, M. H., Tung, Y. C., Yang, G., Li, S., Ho, C. T. (2016). Molecular mechanisms of the anti-obesity effect of bioactive compounds in tea and coffee. *Food & function*, 7(11), 4481-4491.
- Papadopoulou, A., Green, R. J., Frazier, R. A. (2005). Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(1), 158-163.
- Svensson, O., Arnebrant, T. (2010). Mucin layers and multilayers—Physicochemical properties and applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(6), 395-405.
- Wang, Y. Q., Zhang, H. M., Zhou, Q. H. (2009). Studies on the interaction of caffeine with bovine hemoglobin. *European journal of medicinal chemistry*, 44(5), 2100-2105.
- Yılmaz, H., Lee, S., Chronakis, I. S. (2021). Interactions of  $\beta$ -Lactoglobulin with Bovine Submaxillary Mucin vs. Porcine Gastric Mucin: The Role of Hydrophobic and Hydrophilic Residues as Studied by Fluorescence Spectroscopy. *Molecules*, 26(22), 6799.

## FARKLI KURUTMA YÖNTEMLERİNİN BÖĞÜRTLEN KALİTE ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ VE KURUMA KİNETİĞİ

**Burcu Dünder Kırt\*, Sevdanur Sağol, Erdal Ağçam, Asiye Akyıldız**  
Çukurova Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Adana, Türkiye

Geliş / Received: 07.07.2022; Kabul / Accepted: 30.12.2022; Online baskı / Published online: 18.01.2023

Dünder-Kırt, B., Sağol, S., Ağçam, E., Akyıldız, A. (2023). Farklı kurutma yöntemlerinin böğürtlen kalite özellikleri üzerine etkileri ve kuruma kinetiği. *GIDA* (2023) 48 (1) 61-72 doi: 10.15237/gida.GD22068

*Dünder-Kırt, B., Sağol, S., Ağçam, E., Akyıldız, A. (2023). Effects of different drying methods on quality attributes of blackberry and drying kinetic. GIDA (2023) 48 (1) 61-72 doi: 10.15237/gida.GD22068*

### ÖZ

Bu çalışmada, böğürtlenler mikrodalga (100 W) ve sıcak hava (70°C) kurutmaya tabi tutularak kuruma kinetiği parametreleri ve kurutulmuş ürününün bazı kalite özellikleri belirlenmiştir. Kurutma yönteminden bağımsız olarak araştırılan kurutma modelleri arasından *Logaritmik* modelin en yüksek belirlilik katsayılarına ( $R^2=0.9813-0.9827$ ) sahip olduğu tespit edilmiştir. Kurutulmuş böğürtlen örneklerinde, su aktivitesi, renk, hidroksimetilfurfural-(HMF), toplam monomerik antosiyanin-(TMA) ve siyanidin-3-glukozit analizleri gerçekleştirilmiştir. Sıcak hava ile kurutulan örneklerin renk parametrelerindeki ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  ve  $\Delta E^*$ ) değişim mikrodalga ile kurutulanlara kıyasla daha yüksek orandadır. HMF (0.50-1.54 mg/ kg KM) oluşumunun ise mikrodalga ile kurutulan böğürtlenlerde daha düşük düzeyde olduğu gözlemlenmiştir. TMA içeriğinde (54.03-576.82 mg/100 g KM) mikrodalga kurutma ile meydana gelen azalmanın diğer yöntemle kıyasla daha düşük olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, siyanidin-3-glikozid (23.92 – 320.4 mg/100 g KM) sıcak hava kurutmada daha yüksek oranda parçalanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, kalite özellikleri ve kuruma hızı bakımından mikrodalga kurutmanın böğürtlen kurutmada önemli avantajlar sağladığı belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Böğürtlen (*Rubusfruticosus*), kurutma, modelleme, fenolik madde, hidroksimetilfurfural

## EFFECTS OF DIFFERENT DRYING METHODS ON QUALITY ATTRIBUTES OF BLACKBERRY AND DRYING KINETIC

### ABSTRACT

In this study, the compatibility of drying kinetics and some quality attributes of dried product were determined by subjecting blackberries to microwave (100 W) and hot air (70°C) drying methods. The experimental results showed that the *Logarithmic* model was the best fitted model among the investigated drying models regardless of the method of drying ( $R^2=0.9813-0.9827$ ). Water activity, color, hydroxymethylfurfural-(HMF), total monomeric anthocyanin-(TMA) and cyanidin-3-glucoside analyzes were performed on dried blackberry samples. The change in color parameters ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  and  $\Delta E^*$ ) of samples dried with hot air is higher than those dried with microwave. HMF (0.50-1.54 mg/kg DM) formation was observed to be lower in microwave dried blackberries. It was determined that the decrease in the TMA content (54.03-576.82 mg/100 g DM) after microwave drying was

\*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: bdunder@cu.edu.tr

☎: (+90)506 460 8692

☎: (+90) 322 338 6945

Burcu Dünder Kırt; ORCID no: 0000-0002-9919-5711

Sevdanur Sağol; ORCID no: 0000-0003-2737-2595

Erdal Ağçam; ORCID no: 0000-0002-2677-2020

Asiye Akyıldız ORCID no: 0000-0001-5584-0849



lower. Similarly, cyanidin-3-glycoside (23.92-320.4 mg/100 g DM) was degraded in higher level in hot air drying. According to the results obtained, it has been determined that microwave drying provides significant advantages in terms of quality characteristics and drying rate.

**Keywords:** Blackberry (*Rubus fruticosus*), drying, modelling, phenolic compounds, hydroxymethylfurfural

## GİRİŞ

Batı, Güney ve Orta Avrupa orijinli *Rosaceae* familyasına ait böğürtlen (*Rubus fruticosus*) meyvesi üzüksü meyveler grubuna dâhildir. Böğürtlen çeşitleri büyük oranda Kuzey Amerika kökenli olmakla birlikte anavatanı Güney, Batı ve Orta Avrupa'dır (Ağaoğlu, 1986). Yabani formları Dünya üzerinde oldukça geniş bir alanda yayılma göstermiştir. Böğürtlen üzerine yapılmış ilk çalışmalar, 18. yy. ortalarında başlamış, dikensiz çeşitlerin bulunmasıyla hızla tek türle dikim normlarına uygun olarak tesis edilmiş bahçeler kurulmuştur (Crandall 1995; Demirsoy, 2006). Böğürtlenlerin yabanileri ülkemizde de çok eskiden beri tanınmakta ve toplanarak tüketilmektedir (Hartman, 2009). Türkiye'de yaklaşık 2400 ton böğürtlen üretimi yapılmakta olup, üretimin %82'si Doğu Marmara Bölgesi'nde ve %80'i Bursa'da yapılmaktadır (Fidan, 2013). Böğürtlen, A, B1, B2, B3, B6, B9, E, C ve K vitaminleri, potasyum, kalsiyum, sodyum, fosfor, magnezyum, demir, çinko, bakır, mangan ve selenyum mineralleri, lif ve organik asit içermekte olan antioksidan bakımından zengin bir meyvedir. Kalorisi düşük olan böğürtlenin 100 g'ı, 43 kalori'dir. Kanseri, kalp hastalıkları, alerjik reaksiyonlardan korunmada etkili olduğu bildirilmiştir (Anonim, 2015). Böğürtlen, çeşit ve olgunluk seviyesine bağlı olarak 114-1056 mg/100g arasında değişen polifenol içeriğine ve kırmızıdan mora değişen renkten sorumlu olan zengin antosiyanin içeriğine sahiptir. Böğürtlen antosiyaninlerini, glikoz, rutinoz, ksiloz ve arabinoz şekerleri ile bağ yapan siyanidin türevleri oluşturmaktadır. Böğürtlende en baskın olarak bulunan antosiyanin ise siyanidin-3-glikozid olarak bildirilmiştir (Howard ve Hager, 2007). Ayrıca,  $\beta$ -karoten, kriptoksantin ve lutein pigmentleri ve kompleks olarak mirisetin, kuersetin ve kamferol bulunmaktadır (Anonim, 2019).

Kurutma, bilinen en eski gıda muhafaza yöntemlerinden biridir. Kurutma ile materyalin su

aktivitesi azaltılmakta olup bu sayede mikrobiyal gelişim ile enzimlerin çalışması engellenmekte ve böylece ürünün bozulmasının önüne geçilebilmektedir. Kurutma ile gıdada bulunan serbest su uzaklaştırıldığından, kurutulan meyve ve sebzelerde hacimsel olarak küçülme ve önemli ölçüde ağırlık kaybı da meydana gelmektedir. Bu hacim azalması ve ağırlık kaybı, taşımacılık ve depolamada avantaj oluşturmaktadır (Yamashita, 2017). Sıcak havayla kurutma, meyve ve sebzelerin kurutulmasında yaygın olarak kullanılan bir muhafaza yöntemidir. Ancak bu yöntemde kurutma süresinin ve enerji tüketiminin yüksek olması, ürün içerisinde çözünenlerin homojen dağılmaması, kuru ürünün bünyesinde yüksek sıcaklığa bağlı olarak çeşitli kalite kayıplarının oluşması, rehidrasyon kabiliyetinin azalması gibi olumsuz yönleri bulunmaktadır (Akpınar, 2006; Figiel, 2010). Mikrodalga kurutma sistemlerinde ise çoğu zaman mikrodalga ve sıcak hava ısıtma kombine olarak kullanılmaktadır. Mikrodalga kurutma sistemleri ürünün kalitesini etkilemeksizin kuruma süresini önemli düzeyde azaltmaktadır (Cemeroğlu, 2004; Sham vd., 2001). Mikrodalga kurutmada, materyallerin hızlı kurutulması için uygun basınç ve sıcaklıktaki nemli materyallerde, mikrodalga enerjisi ısı enerjisine çevrilir. Mikrodalga yöntemi, hacimsel ısıtma ile sağlanan dielektrik ısıtma tekniklerindedir. Hacimsel ısıtma ile böylece ısının materyalin içinde oluşması ve su molekülleri tarafından absorbe edilmesinden dolayı, ürünler sıcak hava ile kurutma yönteminden daha kısa sürede istenilen sıcaklık seviyelerine getirilebilmektedir (Ramesh vd., 2002). Mikrodalga kurutma, kurutma süresinin kısa olması, enerji tasarrufu sağlaması, materyalde tekdüze bir kuruma oluşturulması ve kalite kayıplarını en aza indirmesi gibi sebeplerden dolayı tercih edilmektedir. Gerek mikrodalga gerekse sıcak hava kurutma ile gerçekleştirilen kurutma işlemlerinde materyaller, optimum kurutma sağlamak ve yanık oluşumuna yol

açmamak için tek tabaka halinde kurutulmaktadırlar (Özdemir ve Devres, 1999).

Bu çalışmada, sıcak hava ve mikrodalga kurutma yöntemlerinin böğürtlenin kuruma kinetiği üzerine etkisinin incelenmesi ve kurutma sürecinde nem oranında meydana gelen değişimin matematiksel olarak modellenmesi, elde edilen kurutulmuş böğürtlenlerin bazı fiziksel ve kimyasal kalite özelliklerinin (su aktivitesi, renk, HMF, TMA ve siyanidin-3-glikozid) karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

Çalışmada yeni hasat edilen, standart olgunluktaki böğürtlenler (Prime® ark-45), Çukurova Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümünden temin edilmiştir. Örnekler öncelikle yıkama, ayıklama ve sap ayırma işlemleri uygulanmıştır.

### Metot

#### *Kurutma uygulamaları ve kinetiği*

Böğürtlenlerin mikrodalga ile kurutulmasında fan destekli mikrodalga fırın (MW71E, Samsung, Güney Kore, 100 W) kullanılmıştır. Kurutma işlemi boyunca eşit aralıklarla (30 dk) tartım yapılmıştır. Sıcak hava ile kurutma ise laboratuvar ölçekli yapay bir kurutma sistemi olan ve kesikli rejimle çalışan kabin tipi kurutucuda (Nüve-KD 400D Türkiye) 70°C'de sabit hava akımında gerçekleştirilmiştir. Uygulanan sıcaklık ve mikrodalga gücü değerlerine ön denemeler sonucunda karar verilmiştir. Kurutucu, oda koşullarındaki taze havayı kullanmıştır. Taze hava, kurutucunun rezistans odacığında istenilen kurutma sıcaklığına (70°C) getirildikten sonra kurutma bölümünde dolaşımı sağlanmıştır. Kurutulacak örnekler öncelikle iki ayrı kerevete tek katman şeklinde yerleştirilmiş ve kurutma tek seferde gerçekleştirilmiştir. Kurutma işlemi nem oranı %10 olduğunda sonlandırılmıştır. Kurutma işleminde ağırlık ölçümleri nem kaybının hızlı olduğu ilk anlarda 30 dakikada bir gerçekleştirilmişken daha sonrasında 60 dakikada bir yapılmıştır. Mikrodalga kurutma ile kurutmanın sonlandırılması için hedeflenen nem oranına 300. dakikada, sıcak hava ile kurutmada ise 420. dakikada ulaşılmıştır. Ancak, hedeflenen

nem oranına ulaşıldıktan 60 dk sonra kurutma işlemleri sonlandırılmıştır. Kalite analizleri mikrodalga ile kurutulan örnekler için 0, 60, 120 ve 360. dakikalarda, sıcak hava ile kurutulan örnekler için ise 0, 60, 120, 360, 420 ve 480. dakikalarda gerçekleştirilmiştir. Kurutulmuş böğürtlen örnekleri analiz süresine kadar -65°C'lik dondurucuda depolanmıştır.

Örneklerin kurutulması sırasında sabit kurutma koşullarında denge sağlanıncaya kadar toplanan ağırlık azalış verileri kullanılarak örneklerin kuru maddedeki su içeriği "kg H<sub>2</sub>O/kg KM" cinsinden hesaplanmıştır. Zamana bağlı nem içeriği değerleri kullanılarak nem oranı  $((M_t - M_d) / (M_0 - M_d))$  değerleri hesaplanıp nem oranı-zaman grafiği oluşturulmuştur. Kurutulan böğürtlen örneklerinin boyutsuz nem oranları (MR) Eşitlik (1) kullanılarak belirlenmiştir.

$$MR = \frac{M_t - M_d}{M_0 - M_d} \quad (1)$$

$M_t$  herhangi bir t anında böğürtlenin nem içeriği (g nem/g kuru madde),  $M_0$  başlangıçta böğürtlenin nem içeriği (g nem/g kuru madde) ve  $M_d$  böğürtlenin dengedeki nem içeriğini (g nem/g kuru madde) ifade etmektedir. Nem oranına çevrilen deneysel kurutma verilerinin matematiksel modellenmesi amacıyla Çizelge 1'de verilmiş olan üç farklı kuruma modeli kullanılmıştır.

Her ne kadar teorik modeller tüm proses koşulları için kullanılabilir olsa da pratik olmayışları sebebiyle gıdalarda yapılan kurutma çalışmalarında genellikle yarı teorik ve ampirik modeller tercih edilmektedir (Özdemir ve Devres, 1999). Böğürtlenlerin kuruma davranışlarının modellenmesinde kullanılan kuruma modelleri Çizelge 1'de verilmiştir.

Kullanılan model eşitliklerindeki model sabitleri Microsoft Excel 2016 (Microsoft, USA) programı kullanılarak belirlenmiştir. Matematiksel modeller ile deneysel veriler arasındaki uygunluğu belirlemek üzere belirlenim katsayısı ( $R^2$ ), deneysel ve tahmin verileri ortalamalarının karesi ki-kare ( $X^2$ ), hataların karelerinin toplamı (RSS) ve hataların karelerinin ortalamasının karekökü (RMSE) parametrelerinden faydalanılmıştır. Bu

parametreler (2), (3) ve (4) eşitlikleri ile hesaplanmıştır.

$$X^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (MR_{den,i} - MR_{hes,i})^2}{N-n} \quad (2)$$

$$RSS = \sum_{i=1}^n (MR_{den,i} - MR_{hes,i})^2 \quad (3)$$

$$RMSE = \left[ \frac{1}{N} \sum_{i=1}^n (MR_{den,i} - MR_{hes,i})^2 \right]^{1/2} \quad (4)$$

Bu eşitliklerde  $MR_{den,i}$ , deneysel olarak belirlenen nem oranını;  $MR_{hes,i}$ , matematiksel model kullanılarak hesaplanan nem oranını;  $N$ , deneysel olarak belirlenen veri sayısını;  $n$  ise matematiksel modeldeki sabitlerin sayısını ifade etmektedir.

Çizelge 1. Böğürtlen kurutmada uygulanan kuruma modelleri

Table 1. Drying models applied in blackberry drying

Model adı <i>Model name</i>	Model denklemleri <i>Model equation</i>	Kaynak <i>Reference</i>
<i>Page</i>	$MR = \exp(-k t^n)$	(Hassan vd., 2009, Sobukola ve Dairo, 2007)
<i>Henderson &amp; Pabis</i>	$MR = a \exp(-k t)$	(Ghodake vd., 2006)
<i>Logaritmik</i>	$MR = a \exp(-k t) + c$	(Wang vd. 2007, Xanthopoulos vd. 2007)

*a* ve *c*: Model katsayıları, *k*: Kinetik sabit (1/dk), *n*: Page model sabiti, *t*: Kuruma süresi (dk), *MR*: Nem oranı  
*a* and *c*: Model parameter, *k*: Kinetic constant (1/min), *n*: Page model parameter, *t*: Drying time (min), *MR*: Moisture

#### Uygulanan analizler

Böğürtlenler, Çukurova Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Meyve Sebze Analiz Laboratuvarı'nda analiz edilmiştir. Kurutulmuş böğürtlen örnekleri, saf su ile 40 kat seyreltilerek karıştırıcı (Waring Commercial Blender, USA) yardımıyla homojen bir karışım elde edilmiştir. Çalışmada, mikrodalga ve sıcak hava kurutma yöntemleriyle kurutulan örneklerin renk değerleri kurutma boyunca bir saatlik aralıklarla ölçülerek ısı işlemlerin renk değişimleri üzerine etkisi ve yöntemlerin kurutma başarısı incelenmiştir. Kuru örneklerin su aktivitesi 25°C'de su aktivitesi ölçüm cihazı (Novasina, LabMaster, USA) ile ölçülmüştür. Kuru madde analizi ise örneklerden 1-5 g kadar alınarak etüvde sabit ağırlığa kadar kurutulmuş ve sonuçlar yüzde kuru madde olarak hesaplanmıştır (g/100mL).

#### Renk analizi

Böğürtlen örneklerinin renk parametreleri, renk ölçüm cihazı (Minolta, model CR-400, Tokyo, Japonya) kullanılarak belirlenmiştir.  $L^*, a^*, b^*$  değerleri 3 boyutlu koordinat sistemi ile verilmekte ve bu koordinat sisteminde  $L^*$  değeri dikey eksenle parlaklıktan koyuluğa doğru değişimi belirtirken  $+a^*$  kırmızılığa,  $-a^*$  yeşillığe,  $+b^*$  sarılığa,  $-b^*$  ise maviliği göstermektedir (Lee and Castle, 2001). Kuru örneklerin su aktivitesi değerleri ise su aktivitesi cihazı (Novasina, LabMaster, USA) ile 25°C'de belirlenmiştir.

#### HMF analizi

Farklı kurutma metotları uygulanan böğürtlen örnekleri (1-5 g) kurutucuda sabit ağırlığa kadar kurutulmuş ve sonuçlar yüzde kuru madde cinsinden hesaplanmıştır (g/100 g) (Cemeroğlu, 2007). HMF, meyve ve sebzelerde doğal olarak bulunmayan ancak ısı ve asit etkisiyle monosakkaritlerden oluşan bir bileşiktir. Kurutulmuş böğürtlen örneklerinin HMF analizi yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC, Shimadzu, LC-20AT, Kyoto, Japonya, 2006) kullanılarak örneklerin ekstraksiyonu ise Gökmen ve Acar (1998) tarafından önerilen yöntemle uygulanan bazı modifikasyonlarla gerçekleştirilmiştir. Analizin prensibi örneklerin etilasetat ile ekstraksiyonu ve sonra sulu sodyum karbonat çözeltisi ile ekstraktın muamele edilmesi esasına dayanmaktadır. Analiz için Akyıldız vd. (2021) tarafından bildirilen HPLC koşulları ve mobil faz akışı uygulanmıştır.

#### TMA analizi

TMA tayininde ise Fuleki ve Francis (1968) tarafından önerilen ve Giusti ve Wrolstad (2001) tarafından geliştirilen pH diferansiyel yönteminden faydalanılarak mg siyanidin-3-glikozid/100 g KM cinsinden sonuçlar belirlenmiştir. Tüm absorbans okumaları, UV/VIS spektrofotometrede (Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS) gerçekleştirilmiştir.

## Siyanidin-3-glikozid analizi

Örneklerin siyanidin-3-glikozid içeriği, Dündar vd. (2019) tarafından önerilen analiz yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla, örneklere metanol çözeltisi (%80) ilave edilerek 6000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmesinden (Heraeus Bofuge Primo R, Germany) sonra, süpernatant (20 µL) filtre (0.45 µm PTFE) edilerek 30°C sıcaklıktaki HPLC kolonuna (Xterra RP C18, 5 µm, 4.6x250 mm (Waters, Milford, ABD)) enjekte edilmiştir.

## İstatistiksel analiz

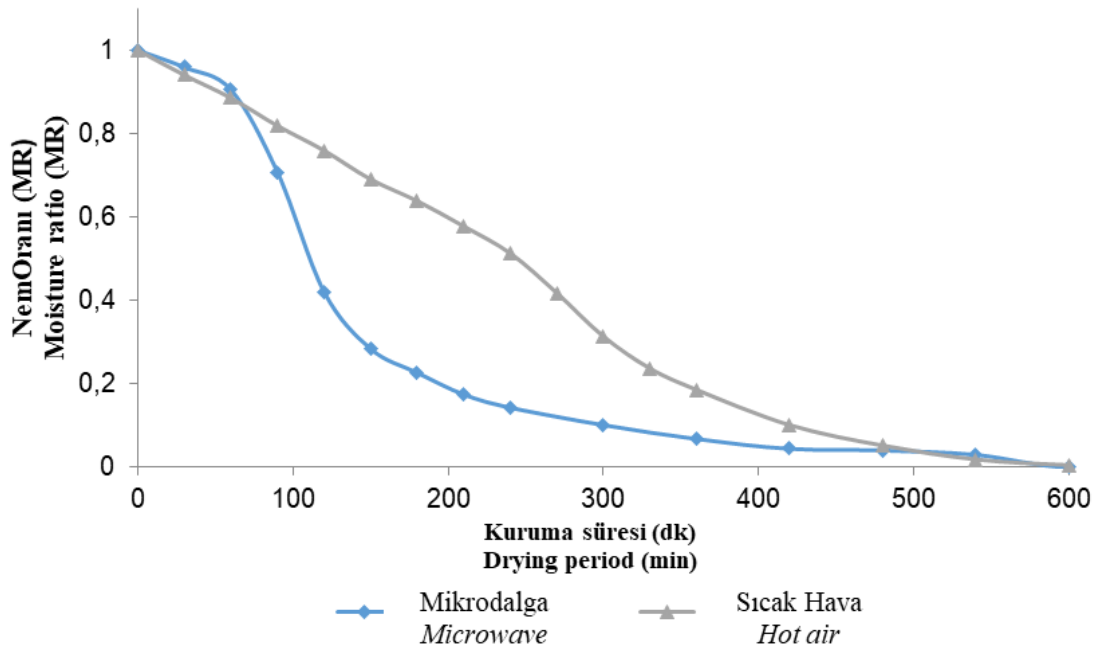
Elde edilen sonuçlar, SPSS (PASW Statistic 18) paket programı ile varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur. Varyans analiz sonuçlarına göre önemli bulunan uygulamaların ortalamaları Duncan çoklu karşılaştırma testi ile karşılaştırılmıştır ( $P < 0.05$ ).

## BULGULAR VE TARTIŞMA

## Kuruma kinetiği

İki kurutma yöntemi için de kurutulan böğürtlenlerin kuruma boyunca nem oranlarındaki değişim zamana bağlı olarak Şekil

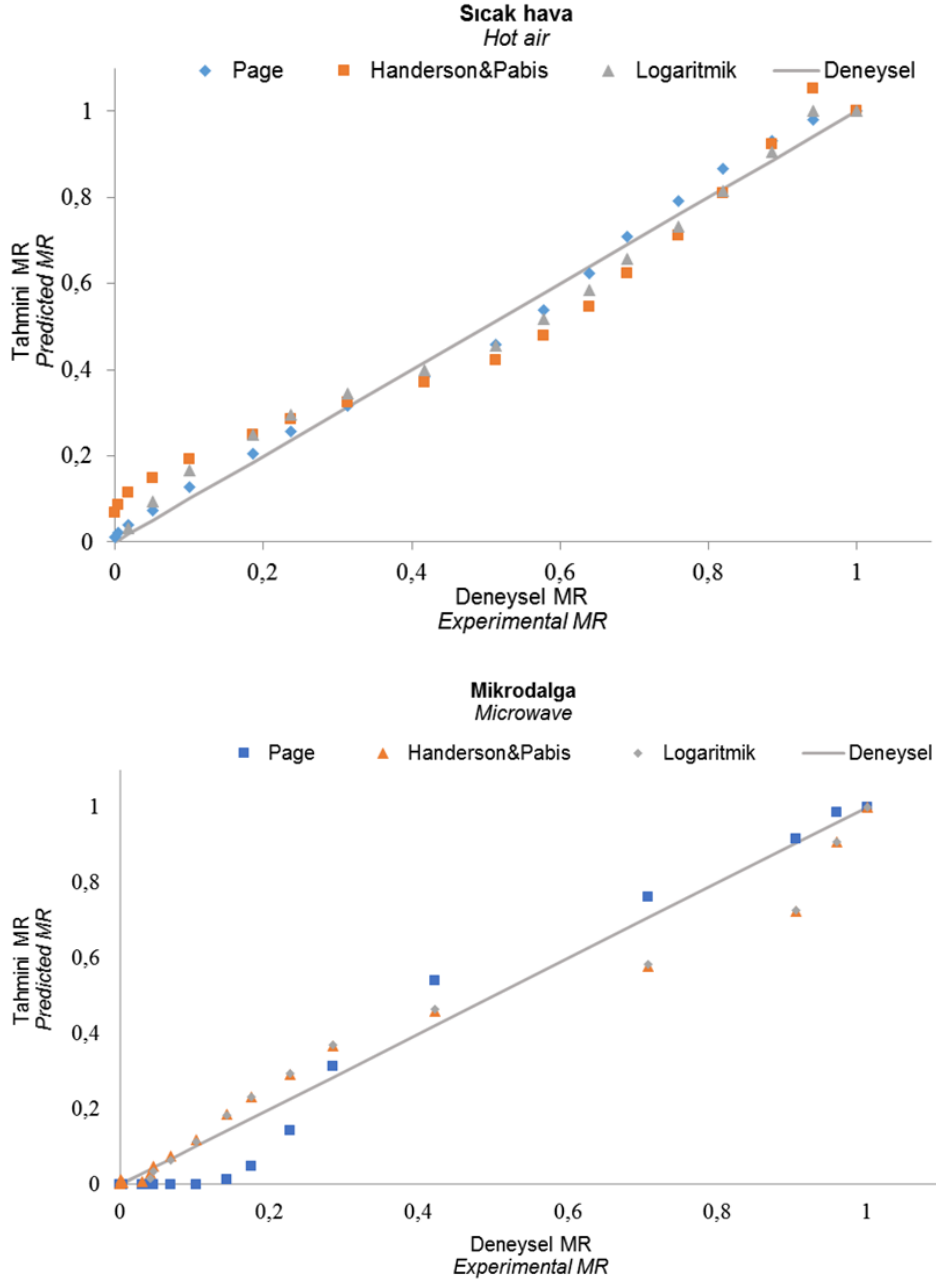
1.'de verilmiştir. Mikrodalga kurutma ile nem oranı ~300 dk içerisinde 0.1 değerine düşüş gösterirken sıcak hava kurutmada ile ~420 dk sonunda ulaşılmıştır. Her iki metotla kurutulan böğürtlenlerde bu sürelerden bir saat sonrasına kadar örnek alınarak kalite analizleri gerçekleştirilmiştir. Kuruma kinetiklerinin modellenmesi amacıyla ise 600 dk boyunca ağırlık değişimleri kaydedilerek nem oranları hesaplanmıştır. Kurutma uygulamalarının nem oranı üzerindeki etkisi, kurutmanın 60. dakikasından sonra, özellikle 60–150 dk aralığında, belirginleşmeye başlamıştır. Mikrodalga kurutma tekniğine kıyasla, sıcak hava kurutma ile daha yavaş bir kuruma gerçekleşmiştir. Bunun sebebi mikrodalga kurutma tekniğinin direkt böğürtlenin merkezine ve serbest suya etki etmesi sonucu daha hızlı bir kurutma sağlanması olabilir. İki farklı yöntemle kurutulan böğürtlenlerin aynı nem oranına ulaşması için geçen süreler arasında karşılaştırıldığında, mikrodalga ile kurutmanın %29 oranında kurutma süresini azalttığı görülmektedir.



Şekil 1. Farklı kurutma yöntemleri ile kurutulan böğürtlenlerin nem oranlarının zamanla değişimi  
Figure 1. Variation of moisture content of blackberries dried with different drying methods over time

Mikrodalga ve sıcak hava ile kurutma için elde edilen deneysel veriler ile kuruma modellerinden yararlanılarak tahminlenen değerlerin uygunluğunu Şekil 2’de verilmiştir. Mikrodalga ile kurutma yönteminde incelenen modellerde *Logaritmik* ve *Handerson&Pabis* modelleri benzer özellik göstererek deneysel kuruma davranışını Şekil 2.

temsil etmektedir. En az uyum gösteren model mikrodalga ile kurutma yönteminde *Page* modeli olurken sıcak hava ile kurutma yönteminde *Handerson&Pabis* modeli olduğu belirlenmiştir.



Şekil 2. Mikrodalga ve sıcak hava ile kurutulan böğürtlen örneklerine ait kuruma kinetiği verileri  
*Figure 2. Drying kinetic data of blackberry samples dried with microwave and hot air*

Mikrodalga ve sıcak hava kurutma yöntemi ile kurutulan böğürtlen örneklerinin kuruma davranışına uygun modelin saptanması için analiz edilen kuruma modellerine ilişkin katsayılar ve parametreler Çizelge 2’de verilmiştir. Çizelge 2 incelendiğinde en yüksek  $R^2$  ve en düşük  $RSS$  ve  $RMSE$  değerleri uygulanan model için en

uygunluğun bir ölçüsüdür. Değerlendirmeler sonucunda iki kurutma yöntemi içinde en uygun modelin *Logaritmik* model olduğu görülmektedir. Mikrodalga ve sıcak hava kurutma yöntemlerine ait *Logaritmik* modellerin  $R^2$  değerlerinin sırasıyla 0.9813 ve 0.9827 olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 2. Böğürtlen kurutma verilerine uygulanan kuruma modellerine ait sabitler ve modellerin istatistiksel uygunluk parametreleri

Table 2. The constants of the drying models applied to the blackberry drying data and the statistical fitness parameters of the models

Kurutma Yöntemi Type of dryer	Modeller Models	Model Sabitleri Model constants		İstatistiksel Parametreler Statistical parameters		
				$R^2$	$RSS$	$RMSE$
Mikrodalga Microwave	Page	$k$	$7.92669 \times 10^{-7}$	0.8673	0.0792	0.0664
		$n$	2.83332			
	Henderson & Pabis	$k$	0.00911	0.9812	0.0405	0.0475
		$a$	1.37654			
	Logaritmik	$k$	0.00929	0.9813	0.0402	0.0473
		$c$	0.00721			
	$a$	1.37750				
Sıcak hava Hot air	Page	$k$	$5.73 \times 10^{-5}$	0.8032	0.0166	0.0304
		$n$	1.73712			
	Henderson & Pabis	$k$	0.00436	0.9547	0.0944	0.0724
		$a$	1.19867			
	Logaritmik	$k$	0.00240	0.9827	0.0360	0.0484
		$c$	-0.37247			
	$a$	1.47454				

$a$  ve  $c$ : Model katsayıları/Model parameters

$k$ : Kinetik sabit (1/dk)/ Kinetic constant (1/min)

$n$ : Page model sabiti/Page model parameter

Modelleme çalışmaları incelendiğinde, zeytin küspesinin farklı sıcaklıklarda kurutularak kuruma eğrisinin modellendiği çalışmada, altı farklı model (Page, Geliştirilmiş Page, Henderson&Pabis, Geliştirilmiş Henderson&Pabis, İki terimli, Logaritmik) test edilmiş ve en yüksek uyum gösteren modelin Geliştirilmiş Henderson&Pabis ( $R^2=0.999$ ,  $X^2=9.303 \times 10^{-5}$ ) olduğu görülmüştür (Vega-Galvez vd., 2010). Başka bir çalışmada ise dağ çileğinin kurutulmasıyla elde edilen deneysel verilerden yola çıkarak en düşük indirgenmiş kare ( $X^2=0.00044$ ) ve  $RMSE$  (0.02058) değerlerinin Page modelinde elde edilmesiyle, dağ çileği örneklerinin deneysel kuruma davranışını en iyi bu model ile açıklandığı belirlenmiştir (Çakmak vd., 2016). Kuşburnunun kurutulduğu bir başka

çalışmada ise Newton, Page, Henderson & Pabis, Logaritmik, İki terimli ve Wang & Singh modelleri arasından deneysel verilere, bu çalışmaya benzer şekilde, Logaritmik modelin ( $R^2=0.994$ ) diğerlerine kıyasla daha yüksek uyum gösterdiği bildirilmiştir (Erenturk vd., 2004).

### Kalite özelliklerindeki değişimler

#### Renk değişimi

Çalışmada, mikrodalga ve sıcak hava kurutma yöntemleriyle kurutulan örneklerin renk değerleri kurutma süresi boyunca belirli zamanlarda ölçülmüş ve renk değerleri ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  ve  $\Delta E^*$ ) üzerine kurutma yöntemlerinin etkisini belirlemek için varyans analizi yapılmıştır. Yapılan renk analizinde farklı kurutma yöntemleri ve zamanına

bağlı olarak böğürtlenlerin renklerine ilişkin parlaklık ( $L^*$ ), yeşillik-kırmızılık ( $a^*$ ), sarılık-mavilik ( $b^*$ ), parametrelerinin kurutma süresi boyunca değişimleri ve taze böğürtlen renk değerleri Çizelge 3'de verilmiştir. Kurutma yönteminden bağımsız olarak,  $L^*$  değerinde kurutma süresi boyunca belirgin bir azalma söz konusudur. İki farklı kurutma yöntemi uygulanan böğürtlen örneklerinde en büyük değişim, sıcak hava ile kurutulanlarda gözlemlenmiştir. Sıcak hava kurutulan örneklerin  $a^*$  değerinde zamana bağlı olarak belirgin bir azalma görülmektedir ( $P < 0.05$ ). Bu durum böğürtlenlerin kırmızı-mor renginin kurutma süresince zamana bağlı olarak

giderek koyulaştığının göstergesidir. Tazeye en yakın  $a^*$  değerlerine mikrodalga kurutma ile ulaşılmıştır. İki farklı kurutma uygulaması  $b^*$  değeri açısından kıyaslandığında, mikrodalga kurutmada önemli bir değişim olmazken, sıcak hava ile kurutmada 360. dakikaya kadar azalma gözlemlenmiştir. Farklı kurutma uygulamaları sonucunda elde edilen kurutulmuş ürünlerin renk değerleri karşılaştırıldığında, sıcak hava ile kurutmanın rengi daha yüksek düzeyde etkilediği belirlenmiştir. Ancak, kurutma yöntemlerinin renk değişimleri üzerindeki etkileri arasında 360. dakikaya kadar önemli düzeyde bir fark görülmemiştir.

Çizelge 3. Kurutma yöntemlerinin renk özellikleri üzerine etkileri  
Table 3. Effects of drying methods on color attributes

Kuruma süresi (dk) Drying period (min)	$L^*$		$a^*$		$b^*$		$\Delta E^*$	
	Mikrodalga Microwave	Sıcak hava Hot air	Mikrodalga Microwave	Sıcak hava Hot air	Mikrodalga Microwave	Sıcak hava Hot air	Mikrodalga Microwave	Sıcak hava Hot air
0	41.0±0.1		0.84±0.1		-0.73±0.06		-	
60	32.57±1.69 <sup>bc</sup>	33.24±2.95 <sup>b</sup>	6.69±0.59 <sup>de</sup>	7.97±1.84 <sup>c</sup>	1.41±0.15 <sup>c</sup>	1.56±0.65 <sup>bc</sup>	10.48±1.64 <sup>c</sup>	10.78±3.34 <sup>c</sup>
120	31.51±1.76 <sup>d</sup>	32.65±2.37 <sup>bc</sup>	5.96±1.16 <sup>e</sup>	7.76±0.63 <sup>c</sup>	1.21±0.09 <sup>c</sup>	1.59±0.13 <sup>bc</sup>	10.95±0.71 <sup>c</sup>	11.09±1.83 <sup>c</sup>
360	30.57±4.26 <sup>e</sup>	31.75±1.64 <sup>cd</sup>	4.56±2.30 <sup>f</sup>	7.19±0.62 <sup>cd</sup>	0.68±0.25 <sup>c</sup>	1.03±0.10 <sup>c</sup>	11.17±3.71 <sup>c</sup>	11.35±1.12 <sup>c</sup>
420	-	32.37±0.93 <sup>bed</sup>	-	10.13±1.60 <sup>b</sup>	-	2.4±0.70 <sup>b</sup>	-	13.06±1.92 <sup>b</sup>
480	-	35.45±1.20 <sup>a</sup>	-	22.09±1.08 <sup>a</sup>	-	8.13±0.65 <sup>a</sup>	-	23.7±1.11 <sup>a</sup>

<sup>a-f</sup> Her bir özellik için farklı harflerle gösterilen ortalama değerler önemli düzeyde farklıdır ( $P < 0.05$ ).

<sup>a-f</sup> The mean values of each parameter with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

Sonuçlar ortalama ±standart sapma olarak verilmiştir.

Results are given as mean ±standard deviation.

Farklı kurutma yöntemleri uygulanan böğürtlenlerde, kurutma sonucunda ham maddede bulunan kuru madde içeriği önemli miktarda artmıştır. Nitekim en büyük değişim mikrodalga ile kurutulan böğürtlen örneklerinde gözlemlenmiştir. Kuru madde değeri ham örnekte %12.80, mikrodalga ile kurutmada %90.23, sıcak hava ile kurutmada %87.22 olarak bulunmuştur. Su aktivitesi ( $a_w$ ) değerleri ise sıcak hava ve mikrodalga kurutmada sırasıyla  $0.362 \pm 0.02$  ve  $0.369 \pm 0.02$  olarak ölçülmüştür ( $P > 0.05$ ). Su aktivitesi, gıdalarda mikrobiyal çoğalmanın gerçekleşmesi için gerekli olan, kullanılabilir sudur. Kurutulmuş meyveler için  $a_w$  değeri 0.7 olduğunda bu değerlerin güven aralığının altında ve mikrobiyolojik açıdan güvenli olduğu

belirlenmiştir. Genellikle yaşamsal faaliyetler için bakteriler 0.9; maya ve küfler ise 0.7 su aktivitesine ihtiyaç duymaktadır; 0.7 değeri altındaki su aktivitesi değerine sahip olan gıdalarda ise mikrobiyolojik faaliyetler gerçekleşmemektedir (Ayan, 2010).

#### HMF içeriğindeki değişim

İki farklı kurutma yönteminin kurutma süresince belirlenen HMF, TMA ve siyanidin-3-glikozit değerleri Çizelge 4'te verilmiştir. Böğürtlen örneklerine ait HMF değerleri kurutma süreleri boyunca önemli düzeyde artış göstermiştir. Bunun sebebi, ısıya maruz kalma süresinin uzaması ve gıdada bulunan nem miktarının azalması sonucu sıcaklık artışının HMF

oluşumunu arttırması olarak görülmektedir. Sıcak hava kurutmada da  $0.58 \pm 0.01$  mg/kg KM olan kurutma başlangıcındaki HMF içeriği, kurumanın ilerlemesiyle  $1.54$  mg/kg KM düzeyine ulaşmıştır.

Kurutma işlemleri sonlandırıldığında, sıcak hava ile kurutulan örneklerin mikrodalga ile kurutulanlara kıyasla daha yüksek HMF içeriğine sahip olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4. Kurutma yöntemlerinin farklı kurutma sürelerinde hidroksimetilfurfural (HMF), toplam monomerik antosiyanin (TMA) ve siyanidin-3- glikozit bileşen değerleri

Table 4. Hydroxymethylfurfural (HMF), total monomeric anthocyanin (TMA) and cyanidin-3- glucoside values of drying methods at different drying times

Kurutma süresi (dk) Drying period (min)	HMF (mg/kg KM) HMF (mg/kg DM)		TMA (mg/100 g KM) TMA (mg/100 g DM)		Siyanidin-3- glikozit (mg/100 g KM) Cyanidin-3- glucoside (mg/100 g DM)	
	Mikrodalga Microwave	Sıcak hava Hot air	Mikrodalga Microwave	Sıcak hava Hot air	Mikrodalga Microwave	Sıcak hava Hot air
60	$0.94 \pm 0.01^c$	$0.58 \pm 0.01^g$	$576.82 \pm 1.05^a$	$353.11 \pm 1.72^c$	$320.39 \pm 5.1^a$	$196.79 \pm 5.25^b$
120	$0.50 \pm 0.02^h$	$1.08 \pm 0.02^d$	$427.33 \pm 0.84^b$	$280.29 \pm 1.52^d$	$112.40 \pm 1.35^d$	$157.93 \pm 0.9^c$
360	$0.75 \pm 0.01^f$	$1.36 \pm 0.01^c$	$128.73 \pm 0.93^e$	$89.03 \pm 0.91^f$	$48.41 \pm 1.8^e$	$55.60 \pm 1.8^c$
420	-	$1.49 \pm 0.02^b$	-	$76.08 \pm 2.78^g$	-	$35.59 \pm 2.88^f$
480	-	$1.54 \pm 0.02^a$	-	$54.03 \pm 2.09^h$	-	$23.92 \pm 3.45^g$

<sup>a-f</sup> Farklı harflerle gösterilen ortalama değerler önemli düzeyde farklıdır ( $P < 0.05$ ).

<sup>a-f</sup> The mean values with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

Results are given as mean  $\pm$  standard deviation.

### TMA içeriğindeki değişim

Her iki kurutma yönteminde de başlangıçtaki TMA miktarları zamana bağlı olarak önemli düzeyde azalma göstermiştir (Çizelge 4). İki yöntem karşılaştırıldığında ise mikrodalga kurutmanın sıcak hava ile kurutmaya kıyasla antosiyanin parçalanması bakımından daha olumlu sonuç verdiği ifade edilebilir. Isıl işlem uygulamalarında, meyve ve sebzelerde bulunan bazı biyoaktif bileşenlerin miktarı üzerine sıcaklık kadar bu sıcaklığın uygulama süresi de etkili olmaktadır (Cemeroğlu, 2004). Benzer şekilde, sıcak hava ve vakum altında mikrodalga ile kurutulan yaban mersinlerinde TMA içeriğinin %70-95 oranında azalma gösterdiği bildirilmiştir (Zielinska ve Michalska, 2016).

### Siyanidin-3-glikozit içeriğindeki değişim

Çalışma kapsamında uygulanan her iki kurutma yönteminde de başlangıçtaki siyanidin-3-glikozit içeriği zamanla belirgin miktarlarda azalma göstermiştir. Çağındı (2016) yaptığı çalışmasında, kırmızı üzüm suyu örneklerine mikrodalga uygulamasının fenolik madde içeriğinde azalmalara neden olduğunu gözlemlemiştir. Hem

mikrodalga hem de sıcak hava kurutmada, ısı ve oksidasyon etkisiyle siyanidin-3-glikozit bileşiklerin parçalanması yüksektir. Farklı çalışmalarda sıcaklık artışı ve maruz kaldığı süreye bağlı olarak siyanidin-3-glikozit parçalanmasının *Logaritmik* modele uyum gösterdiği bildirilmiştir (Rhim, 2002).

### SONUÇ

Bu çalışmada, böğürtlenler mikrodalga ve sıcak hava yöntemleri ile kurutulmuş, kurutma boyunca nem oranı değişimlerinin bazı kuruma modellerine uygunluğu incelenmiş ve bazı önemli kalite parametrelerinin kurutma işlemleri ile değişimleri değerlendirilmiştir. Böğürtlen örneklerinin kuruma süreleri incelendiğinde, mikrodalga ile kurutma yönteminde nem oranlarındaki zamana bağlı değişimlerin eğimleri dikkate alındığında daha hızlı kuruma gerçekleştiği belirlenmiştir. Kuruma kinetiği belirlenirken kullanılan modellerine ait istatistiksel veriler dikkate alınarak böğürtlenlerin kurutulması sırasında nem oranında meydana gelen değişimin *Logaritmik* modele uygun olduğu belirlenmiştir. Mikrodalga (fan destekli mikrodalga fırında 100



W) ve sıcak hava (70°C) ile gerçekleştirilen kurutma uygulamalarında, sıcak hava ile kurutulan örneklerin renk parametrelerindeki ( $L^*$ ,  $a^*$  ve  $b^*$ ) değişimin mikrodalga ile kurutulanlara kıyasla daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Mikrodalga ile kurutulmuş böğürtlenlerin HMF içeriği diğer yöntemle kıyasla %51 daha düşüktür. TMA içeriğinde ise her iki kurutma yöntemi için de önemli düzeyde azalma söz konusu olmasına rağmen sıcak hava ile kurutulan böğürtlenlerde antosiyanin parçalanmasının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde, siyanidin-3-glikozidin en fazla parçalandığı kurutma yöntemi sıcak hava ile kurutmadır. Her iki kurutma yönteminde de araştırılan kalite parametrelerindeki değişim, kurutma süresine bağlı olarak önemli düzeyde değişim göstermektedir.

Sonuç olarak, çalışma kapsamında ortaya konan matematiksel modeller böğürtlenlerin mikrodalga ve sıcak hava kurutma yöntemleri ile kurtulması sırasında, daha iyi kalite özelliklerine sahip kurutulmuş böğürtlen üretiminde ve proses koşullarının optimize edilmesinde yol gösterici olacaktır. Ayrıca, mikrodalga kurutma yönteminin, özellikle kurutma süresi bakımından, sıcak hava kurutmaya kıyasla önemli avantajlar sağladığı tespit edilmiştir. Böylece kurutma sırasındaki enerji maliyetlerinin azaltılarak sürdürülebilir üretime önemli katkılar sağlanmış olacaktır.

### ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar, bu makalenin araştırılması, yazarlığı ve/veya yayınlanması ile ilgili potansiyel çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

### YAZAR KATKILARI

Çalışma tüm yazarlar tarafından tasarlanmıştır. Burcu Dündar Kırıt ve Sevdanur Sağol, analizlerin yürütülmesi, sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi, makale taslağının yazımı ve düzeltilmesine katkı sağlamışlardır. Erdal Ağçam, elde edilen analiz sonuçlarının değerlendirilmesi ve taslak makalenin düzeltilmesine katkıda bulunmuştur. Asiye Akyıldız ise örneklerin temin edilmesi, analiz sonuçlarının değerlendirilmesi,

taslak makalenin düzeltilmesi aşamalarında katkı ve danışmanlık sağlamıştır.

### TEŞEKKÜR

Yazarlar, çalışmanın kimyasal analiz sürecindeki yardımlarından dolayı, Enes Erenmemişoğlu, Yaşar Burak Bulut, Pınar Altıntaş ve Aylin Doğruer'e teşekkür eder.

### KAYNAKLAR

Akyıldız, A., Mertoglu, T.S., Agcam E. (2021). Kinetic study for ascorbic acid degradation, hydroxymethylfurfural and furfural formations in orange juice, J. Food Compos. Anal. 103996,

Ağaoğlu, Y.S. (1986). Üzümsü Meyveler. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara.

Akpınar, E.K. (2006). Determination of suitable thin layer drying curve model for some vegetables and fruits. Journal of Food Engineering, 73: 75-84.

Anonim, (2014). Bitkisel Üretim İstatistikleri (<http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>) (Erişim: 26.12.2014) 17. Strik, B., Finn, C., Clark, J. R., Banados, M. P. 2006. Worldwide Production of Blackberries.

Anonim, (2019). Ulusal Gıda Kompozisyon Veritabanı. <http://www.turkomp.gov.tr/> adresinden 24 Mayıs 2019 tarihinde alınmıştır.

Ayan, H. (2010). Güneşte ve Yapay Kurutucuda Kurutulmuş Domates (*Lycopersicon esculentum*) Üretimi ve Proses Sırasındaki Değişimlerin Belirlenmesi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 119s, Ankara.

Cemeroğlu, B. (2004). Meyve Sebze İşleme Teknolojisi, 2. cilt. ISBN 975-98578- 2-0

Cemeroğlu, B. (2007). Gıda Analizleri. (Bölüm yazarları: Cemeroğlu, Mehmet Özkan, Ahmet Yemenicioğlu, Ayşegül Kırca, Oktay Yemiş). Bizim Büro Basımevi, Ankara, 535 s.

Crandall, PC. (1995). Bramble Production: The Management Marketing of Raspberries and Blackberries. 147– 167, New York.

Çağındı, Ö. (2016). Mikrodalga Uygulamasının Kırmızı Üzüm Suyunun Antosiyanin İçeriği ile

- Bazı Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Etkisi, Akademik Gıda 14(4) (2016) 356-361
- Çakmak, H., Bozdoğan, N., Turkut, G.M., Kumcuoğlu, S., Tavman, Ş. (2016). Dağ Çileğinin (*Arbutus Unedo L.*) Kuruma Kinetiğinin İncelenmesi ve Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi. *Gıda*, 41(4): 227-234.
- Demirsoy, L., Demirsoy, H., Bilgener, Ş., Öztürk, A., Ersoy, B., Çelikel, G., Balcı, G. (2006). Samsunda Yapılan Böğürtlen Çeşit adaptasyon Çalışmaları. II. Ulusal Üzümü Meyveler Sempozyumu, 14-16 Eylül 2006, Tokat, 237– 243.
- Dündar, B., Ağçam, E., Akyıldız, A. (2019). Optimization of thermosonication conditions for cloudy strawberry nectar with using of critical quality parameters. *Food Chemistry*, 276, 494–502.
- Erenturk, S., Gulaboglu, M.S., Gultekin, S. (2004). The thin-layer drying characteristics of rosehip. *Biosystems Engineering*, 89(2), 159e166.
- Fidan, M.S., Öz, A., Adanur, H., Turan, B. (2013). Gümüşhane Yöresinde Yetişen Bazı Önemli Odun Dışı Orman Ürünleri ve Kullanım Miktarları. *Gümüşhane Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 3(2).
- Figiel, A. (2010). Drying Kinetics and Quality of Beet roots Dehydrated by Combination of Convective and Vakuum-Microwave Methods. *Journal of Food Engineering*, 98: 461-470.
- Fuleki, T., Francis, F.J. (1968). Quantitative Methods for Anthocyanins. II. Determination of Total Anthocyanin and Degradation Index for Cranberry Juice. *Journal of Food Science*, 33, 78-83.
- Giusti, M.M., Wrolstad, R.E. (2001). Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. R. E. Wrolstad, S. J. Schwartz (Eds), John Wiley and Sons, New York, pp 1-13.
- Ghodake, H.M., Goswami, T.K., and Chakraverty, A. (2006). “Mathematical Modeling of Withering Characteristics of Tea Leaves”, *Drying Technology*, 24:159-164.
- Gökmen, V., Acar J. (1998). An Investigation on the Relationship Between Patulin and Fumaric Acid in Apple Juice Concentrates. *Lebensm- Wiss Technol*, 31:480-483.
- Hassan-Beygi, S.R., Aghbashlo, M., Kianmehr, M.H., Massah, J. (2009). “Drying Characteristics of Walnut (*Juglans regia L.*) During Convection Drying”, *International Agrophysics*, 23:129-135.
- Hartman, J.R. (2009). PoorFruit Set in Brambles, *PlantPathologyFactSheet*, Univ. of Kentucky Extension Service. UK.
- Howard, L.R., Hager, T.J. (2007). Berryfruit phytochemicals. In *BerryFruit Value-Added Products for Health Promotion*, 1st ed.; Zhao, Y., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, Vol. 1, pp 73-104.
- Lee, H.S., Castle, W.S. (2001). Seasonal changes of carotenoid pigments and color in Hamlin, Earlygold, Budd Blood orange juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 877– 882.
- Özdemir M., Devres, Y.O., (1999). The thin layer drying characteristics of hazelnuts during roasting. *J Food Eng*, 42, 225-233.
- Ramesh, M.N., Wolf, W., Tevini, D., Bognar, A., (2002). Microwave Blanching of Vegetables. *Journal of Food Science*, 67(1): 390-398.
- Rhim J.W., (2002). Kinetics of thermal degradation of anthocyanin pigment solutions driven from red flower cabbage. *J Food Sci Biotechnol*, 11: 361-364.
- Sham, P.W.Y., Scaman, C.H., Durance, T.D. (2001). Texture of Vacuum Microwave Dehydrated Apple Chips as Affected by Calcium Pretreatment, Vacuum Level, and Apple Variety. *Journal of Food Science*, 66 (9):1341- 1347.
- Sobukola, O.P., Dairo, O.U. (2007). “Modeling Drying Kinetics of Fever Leaves (*Ocimum viride*) in a Convective Hot Air Dryer”, *Nigerian Food Journal*, 25:146-154.
- Wang, Z., Sun, J., Liao, X., Chen, F., Zhao, G., Wu, J., Hu, X. (2007). “Mathematical Modeling on Hot Air Drying of Thin Layer Apple Pomace”, *Food Research International*, 40:39-46.

Xanthopoulos, G., Lambrinos, GR., Manolopoulou, H. (2007). "Evaluation of Thin-Layer Models for Mushroom (*Agaricus bisporus*) Drying", *Drying Technology*, 25:1471-1481.

Vega-Galvez, A., Miranda M., Diaz, LP., Lopez, L., Rodriguez, K., Di-Scala K. (2010). Effective moisture diffusivity determination and mathematical modelling of the drying curves of the olive-waste cake. *Bioresour Technol*, 101, 7265-7270.

Yamashita, C., Chung, M.M.S., dos Santos, C., Mayer, C.R.M., Moraes, I.C.F., Branco, I.G.

(2017). Microencapsulation of an anthocyanin-rich blackberry (*Rubus* spp.) by-product extract by freeze-drying. *LWT-Food Science and Technology*, 84, 256-262.

Zielinska, M., Michalska, A. (2016). Microwave-assisted drying of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruits: Drying kinetics, polyphenols, anthocyanins, antioxidant capacity, colour and texture. *Food Chemistry*, 212, 671-680.

## ULTRASONİK DESTEKLİ EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ İLE ELDE EDİLEN ZEYTİN YAPRAĞI EKSTRAKTININ İYONİK JELASYON YÖNTEMİ İLE ENKAPSÜLASYONU VE KEFİR İÇECEĞİNDE KULLANILMASI

**Rabia Akçay-Salık, Ezgi Bitim, Özgün Köprüalan-Aydın,  
Esin Selçuk, Özgül Altay, Figen Kaymak-Ertekin\***  
Ege Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İzmir, Türkiye

Geliş / *Received*: 22.09.2022; Kabul / *Accepted*: 30.12.2022; Online baskı / *Published online*: 18.01.2023

Akçay-Salık, R., Bitim, E., Köprüalan-Aydın, Ö., Selçuk, E., Altay, Ö., Kaymak-Ertekin, F. (2023). Ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen zeytin yaprağı ekstraktının iyonik jelasyon yöntemi ile enkapsülasyonu ve kefir içeceğinde kullanılması. *GIDA* (2023) 48 (1) 73-93 doi: 10.15237/gida.GD22092

*Akçay-Salık, R., Bitim, E., Köprüalan-Aydın, Ö., Selçuk, E., Altay, Ö., Kaymak-Ertekin, F. (2023). Encapsulation of olive leaf extract obtained by ultrasonic-assisted extraction method and use in kefir beverage. GIDA (2023) 48 (1) 73-93 doi: 10.15237/gida.GD22092*

### ÖZ

Bu çalışmada zeytin yaprağından fenolik bileşenler ultrasonik destekli yöntem ile ekstrakte edilerek çözgen tipi (etanol ve etil asetat); katı/çözgen oranı (1:10, 1:15 ve 1:20 (a/h)); çözgen:su konsantrasyonu (90:10 (h/h), 80:20 (h/h), 70:30 (h/h)) belirlenmiştir. En yüksek ekstraksiyon verimi, toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite değerleri; 1:20 (a/h) katı/çözgen oranı ve %90:10 (h/h) etanol-su karışımı koşullarında belirlenmiştir. Ultrasonik destekli ekstraksiyon yönteminde; sıcaklık, süre ve ultrasonik genliğinin ekstraksiyon verimi, Box Behnken deney tasarımı kullanılarak, toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite üzerine etkisi incelenerek, optimum süre 5.31 dak, sıcaklık 39.27°C ve genlik %40.51 olarak belirlenmiştir. Daha sonra ekstraktlar iyonik jelasyon yöntemiyle enkapsüle edilmiş, ekstrakt konsantrasyonu, kitosan konsantrasyonu ve bekleme süresi CCRD deney tasarımı kullanılarak enkapsülasyon etkinliği ve toplam fenolik madde üzerine etkisi optimize edilmiştir. Enkapsülasyon işleminde optimum ekstrakt konsantrasyonu %1.04, kitosan konsantrasyonu %0.5 ve bekleme süresi ise 11.24 dak olarak saptanmıştır. Enkapsülasyon işleminin ekstraktın acı tat ve aromasını baskıladığı ve fonksiyonel gıda amacıyla üretilen kefir içerisine eklenen kapsüllerin laktik asit bakterilerini (LAB) inhibe edici etkisinin olmadığı saptanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Zeytin yaprağı, fenolik bileşenler, ultrasonik destekli ekstraksiyon, iyonik jelasyon, kefir

## ENCAPSULATION OF OLIVE LEAF EXTRACT OBTAINED BY ULTRASONIC-ASSISTED EXTRACTION METHOD AND USE IN KEFIR BEVERAGE

### ABSTRACT

In this study, the extraction of phenolic compounds from olive leaves by ultrasonic assisted method and the solvent type (ethanol and ethyl acetate); solvent: water concentration (90:10 (v/v), 80:20

\*Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*:

✉: figen.ertekin@ege.edu.tr

☎: (+90) 232 311 3006

☎: (+90) 232 342 7592

Rabia Akçay Salık; ORCID no: 0000-0002-9031-3160

Ezgi Bitim; ORCID no: 0000-0001-6454-6545

Özgün Köprüalan Aydın; ORCID no: 0000-0001-8800-7714

Esin Selçuk; ORCID no: 0000-0002-3745-1791

Özgül Altay; ORCID no: 0000-0003-0067-9319

Figen Kaymak Ertekin; ORCID no: 0000-0001-5042-3659

(v/v), 70:30 (v/v)) and solid/solvent ratio (1:10, 1:15 and 1:20 (w/v)) were determined. The highest extraction yield (%), total phenolic content and antioxidant capacity values were determined for 1:20 (w/v) solids/solvent ratio and 90:10% (v/v) ethanol-water mixture. In the ultrasonic assisted extraction method; The effects of temperature, time and ultrasonic amplitude on extraction efficiency, total phenolic substance and antioxidant capacity were investigated using Box Behnken experimental design, and optimum time was determined as 5.31 min, temperature 39.27°C and amplitude 40.51%. Then, the oleuropein-rich extract was encapsulated using the ionic gelation method, and the effects of extract concentration, chitosan concentration and waiting time on the encapsulation efficiency and total phenolic content were optimized using CCRD experimental design. In the encapsulation process, the optimum conditions were determined as 1.04%, the extract concentration; 0.5%, the chitosan concentration and 11.24 min, the waiting time. In addition, it was determined that microcapsules added to kefir produced for functional food did not show an inhibitory effect on LAB bacteria and suppressed the bitter taste and aroma of the extract.

**Keywords:** Olive leaf, phenolic compounds, ultrasonic assisted extraction, ionic gelation, kefir

## GİRİŞ

Akdeniz bölgesinin en önemli bitkilerinden birisi olan zeytin, içerdiği biyoaktif bileşenler sayesinde sağlığın korunmasında ve kronik hastalıkların önlenmesinde büyük rol oynamaktadır (Vural vd., 2021). Zeytin ağırlığının %10'unu oluşturan zeytin yaprağı, zeytinin toplanması, budanması ve zeytinyağına işlenmesi sırasında yan ürün/atık ürün olarak oluşmakta, hayvan yemi olarak kullanılmasının yanı sıra son yıllarda, içerdiği yüksek miktarda biyoaktif bileşenler sebebiyle dikkat çekmektedir (Kılıç, 2020; Arslan vd., 2021). Zeytin yaprağı, fenolik bileşikler, flavonoidler ve sekoiridoitler açısından zengin olup, katma değeri yüksek, ucuz biyoaktif hammadde kaynağı olarak kabul edilmekte (Şahin vd., 2018; Tarchoune vd., 2019; Gür vd., 2020), bu özelliği ile gıda ve ilaç endüstrisinde büyük ilgi görmektedir. Ayrıca, zeytin yaprağı ekstraktları, doğal antioksidan olarak gıdaların muhafazası ve biyoaktif gıdaların üretimi için büyük bir potansiyel sunmaktadır (Lama-Muñoz vd., 2019; Borjan vd., 2020). Zengin bir polifenol kaynağı olarak dikkat çeken zeytin yaprağı, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antiviral, antikanser ve ayrıca kardiyovasküler, nöroprotektif ve hepatoprotektif etkiler ile sağlık üzerine önemli faydalar göstermektedir (Temur ve Temiz, 2018; Danahaliloğlu vd., 2018; Gürbüz ve Ögüt, 2018; Medina vd., 2019; Yin vd., 2019; Bayram vd., 2020; Kaya ve Demir 2020, Salık ve Çakmakçı 2021). Zeytin yaprağında en yüksek oranda bulunan fenolik bileşik olan oleuropein sekoiridoit adı verilen gruba ait olup, bu biyoaktif özelliklerden sorumlu ana bileşiktir (Lama-Muñoz vd., 2019; Markhali vd., 2020). Oleuropein zeytin

ve zeytinyağının acılığında sorumlu bileşik olup, olgunlaşmamış zeytinde meyve ağırlığının yaklaşık %2'si oranında bulunmakta ve olgunlaşmayla birlikte azalmaktadır (Acar-Tek ve Ağagündüz, 2020; Kaya ve Demir, 2020). Aynı zamanda zeytinyağında %0.005-0.12 ve zeytin yapraklarında ise %1-14 oranında bulunmaktadır (Irakli vd., 2018; Arı, 2022).

Son yıllarda, zeytin yaprağında bulunan biyoaktif moleküllerin özellikle ana bileşen olan oleuropein ekstraksiyonu üzerine çalışmalar artmıştır. Bitkilerden biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonu genellikle geleneksel çözügen ekstraksiyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Ancak bu yöntem, bazı değerli bileşiklerin kaybına, düşük ekstraksiyon verimlerine, uzun ekstraksiyon sürelerine ve yüksek enerji tüketimine neden olabilmektedir (Cifá vd., 2018; Albero vd., 2019). Son yıllarda, ekstraksiyon süresini kısaltmak, verimi artırmak ve daha az çözügen kullanmak amacıyla yeni ve yeşil ekstraksiyon tekniklerinin geliştirilmesine ilgi artmıştır (Chemat vd., 2019). Mikrodalga destekli ekstraksiyon, basınçlı sıvı ekstraksiyonu ve süperkritik sıvı ekstraksiyon teknikleri zeytin yaprağından oleuropein ekstraksiyonu için kullanılan gelişmiş yeşil yöntemlerdir. Ancak bu yöntemlerin çoğu yüksek basınç altında çalışılan ve yüksek enerji maliyeti gerektiren yöntemlerdir. Bu nedenle etkin ve düşük maliyetli bir ekstraksiyon yöntemi olarak ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi, ekstraksiyon süresini ve çözügen miktarını azaltma ve ayrıca biyoaktif bileşiklerin geri kazanımlarını artırma potansiyeline sahip bir teknik olarak

karşımıza çıkmaktadır (Irakli vd., 2018). Ultrasonik destekli ekstraksiyon sistemlerinde, örneğe uygulanan frekanslarla akustik titreşimler oluşmakta ve bu titreşimler içinden geçtiği sıvıda kavitasyon meydana getirerek sıvı ortamda çok sayıda küçük kabarcıklar üretilmesine ve bu sayede örneğin mekanik olarak sarsılmasına neden olarak partiküllerin kopmasını sağlamaktadır (Kumar vd., 2021). Oluşan bu kavitasyonlar sayesinde kütle transferi ve hücre içi maddelerin ekstraksiyon ortamına salınımı artmaktadır. Zeytin yaprağından oleuropein ekstraksiyonunun gerçekleştirildiği bir çalışmada ultrasonik destekli ekstraksiyonun geleneksel çözügen ekstraksiyonuna göre daha hızlı, basit ve verimli olduğu bulgulanmıştır (Cifá vd., 2018). Bununla birlikte, ekstraksiyon maliyetlerini azaltarak ve fonksiyonel aktivitelerini koruyarak biyoaktif bileşiklerin verimini artırmak için ekstraksiyon koşullarının optimize edilmesi önem arz etmektedir.

Gıda, ilaç ve kozmetik sektörlerinde bitkilerden elde edilen doğal ekstraktlara olan ilgi son yıllarda artmış olup, bu ekstraktlar fonksiyonel gıda üretiminde kullanılabilir (Cifá vd., 2018). Oleuropeinin yanı sıra biyofenollerce zengin zeytin yaprağı ekstraktları, besinsel özellikleri artırılmış, antimikrobiyal ve antioksidan özellikleriyle raf ömrü uzatılmış fonksiyonel gıda formülasyonlarında dikkat çekmektedir. Bununla birlikte çözünürlüklerinin düşük olması, ısı, ışık ve pH gibi çevresel koşullara duyarlı olması, aynı zamanda kötü tat ve aromaya sahip olmaları kullanımlarını kısıtlamaktadır (Güngör vd., 2022). Bu maddelerin çözünürlüklerini ve biyoerişilebilirliklerini arttırmak amacıyla farklı enkapsülasyon yöntemleri kullanılmaktadır (Tavakoli vd., 2018; González-Ortega vd., 2021). Püskürtmeli kurutma/soğutma, dondurarak kurutma, koaservasyon ve iyonik jelasyon gıda bileşenlerinin kaplanması için yaygın kullanılan yöntemlerdir (Aydın ve Ünlüel, 2021). Nanokapsülleme-mikrokapsülleme tekniklerinden biri olan iyonik jelasyon yöntemi, polimer çözeltisi ile aktif madde homojenize edilerek şırınga yardımıyla küresel jel partikülleri elde etmek amacıyla dağıtıcı faza (CaCl<sub>2</sub> gibi) damlatılarak gerçekleştirilmektedir. Damlatma

metodu kalsiyum-aljinat taneciklerinin elde edilmesinde kullanılan bir metot olup, çapraz bağlanma CaCl<sub>2</sub> molekülündeki kalsiyum ile sodyum aljinat molekülündeki sodyumun bağlanması prensibine dayanmaktadır. Bu yöntem uygulanabilirliği kolay, maliyeti düşük ve yumuşak formülasyon koşullarına sahip olması nedeniyle popüler bir yöntemdir (Doderó vd., 2019; de Moura vd., 2019). Literatür incelendiğinde iyonik jelasyon yönteminin aronia üzümü ekstraktlarının (Tzatsi vd., 2021), hibiskus ekstraktlarının (de Moura vd., 2019) ve keten tohumu yağı ekstraktlarının (Wissam and Samer, 2019) enkapsülasyonunda kullanıldığı görülmektedir.

Bu çalışmada, yan/atık ürün olan zeytin yaprağından oleuropeince zengin ekstraktların ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilerek ekstraksiyon işleminin optimize edilmesi, optimum koşullarda üretilen ekstraktın acı tat ve keskin aromasının baskılanması ve stabilitesinin artırılması amacıyla iyonik jelasyon yöntemi ile enkapsüle edilerek işlemin optimize edilmesi hedeflenmiştir. Ayrıca sağlık üzerinde olumlu etkileri olduğu bilinen oleuropeince zengin enkapsüle ekstraktın kefir içine eklenerek fonksiyonel özelliğinin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

Çalışmada hammadde olarak kullanılan zeytin yaprakları (*Olea europaea* L.), Aydın Memecik tipi zeytinlerin toplanması sırasında atık olarak oluşan yapraklardan toplanmış, yapraklar oda sıcaklığında (25°C) kurutulmuş ve öğütüldükten (Fakir, HAUSGERATE aromatic) sonra -18°C'de muhafaza edilmiştir.

### Ekstraksiyon yöntemi

*Katı/çözgen oranının, çözgen tipinin ve konsantrasyonunun belirlenmesi, ultrasonik destekli ekstraksiyon işlem koşullarının optimizasyonu*

Yaklaşık 1 gram kurutulmuş ve öğütülmüş zeytin yaprağı kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemi sonucu elde edilen ekstraktlar, filtre kağıdından süzülerek analiz işlemine kadar -18°C'de muhafaza edilmiştir. Ekstraksiyon işlemleri ultrasonik su banyosu (37 kHz frekans,

Isolab, 621.06.006) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon işlemlerinde öncelikle en uygun katı/çözgen oranı belirlenmiştir. Bu amaçla en uygun katı/çözgen oranının belirlenmesinde, 3 farklı katı/çözgen oranı (1:10, 1:15 ve 1:20 (a/h)) denenmiş ve sabit koşullarda (10 dak, 40°C, %70 genlik), çözgen olarak %80-20 (h/h) etanol-su çözeltisi kullanılarak ultrasonik destekli ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. En yüksek toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/gKM), antioksidan kapasite (mg TE/gKM) ve ekstraksiyon verimini veren katı/çözgen oranı belirlenmiştir. Katı/çözgen oranı belirlendikten sonra, çalışma kapsamında kullanılacak çözgen tipi ve çözgen konsantrasyonunun belirlenmesi işlemi gerçekleştirilmiştir. Ultrasonik destekli ekstraksiyon işleminde en uygun çözgen tipi ve konsantrasyonunun belirlenmesi için, iki farklı çözgen (etanol ve etil asetat) ve üç farklı çözgen/su konsantrasyonu (90:10 (h/h), 80:20 (h/h), 70:30 (h/h)) denemeleri diğer ekstraksiyon koşulları (10 dak, 40°C, 70% genlik) ve katı/çözgen oranı sabit tutularak gerçekleştirilmiştir. En yüksek toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/gKM), antioksidan kapasite (mg TE/gKM) ve ekstraksiyon veriminin elde edildiği çözgen tipi ve çözgen/su konsantrasyonu belirlenmiştir. Ekstraksiyon denemeleri aynı anda iki tekrar olarak gerçekleştirilmiştir.

Ultrasonik destekli ekstraksiyon işleminin optimizasyonu aşamasında, yöntemle özgü bağımsız işlem değişkenleri olarak süre (dak), sıcaklık (°C) ve genlik (%) optimize edilmiş ve Box Behnken deney tasarımına göre oluşturulan deneme deseni Çizelge 1'de verilmiştir. Ultrasonik destekli ekstraksiyon denemeleri, birinci aşamada belirlenen sabit katı-çözgen oranı, çözgen tipi ve çözgen/su konsantrasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Deneme deseninin de belirtilen (Çizelge 1) farklı işlem koşullarında gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemleri sonrasında elde edilen oleuropeince zengin ekstraktlara, toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/gKM), antioksidan kapasite (mg TE/gKM) ve ekstraksiyon verimi analizleri gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon maksimum toplam fenolik madde miktarı, maksimum antioksidan kapasite ve maksimum ekstraksiyon

verimi hedef alınarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon denemeleri aynı anda iki tekrar olarak gerçekleştirilmiştir.

Optimum ultrasonik destekli ekstraksiyon koşullarında elde edilen ekstraktlardaki çözgen, enkapsülasyon işlemi öncesinde rotary evaporatörde (50°C) vakum altında uzaklaştırılmıştır.

#### *İyonik jelyasyon ile enkapsülasyon ve işlem koşullarının optimizasyonu*

Enkapsülasyon işlemi, kaplama materyali olarak kitosan ve pektin kullanılarak gerçekleştirilmiştir. En yüksek enkapsülasyon etkinliğini sağlayan kaplama materyali belirlenerek işleme devam edilmiştir.

Optimum ekstraksiyon koşulunda elde edilen oleuropeince zengin ekstrakt, sabit konsantrasyondaki sodyum aljinat çözeltisi içerisine damla damla olacak şekilde ilave edilerek damlatma çözeltisi hazırlanmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki kitosan veya pektin çözeltisi ise kalsiyum klorür (CaCl<sub>2</sub>) çözeltisi (%2 a/h) içerisine eklenmiş ve oda sıcaklığında homojenize edilerek jelleşme ortamı hazırlanmıştır. Daha sonra damlatma çözeltisi jelleşme ortamı içerisine şırınga ile 1:9 (h/h) oranında damlatılmıştır. Elde edilen kapsüller jelleşme ortamından süzülerek ayrılmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Enkapsülasyon işlemleri iki tekrar olarak gerçekleştirilmiştir.

Enkapsülasyon işleminde, sodyum aljinat çözeltisi içindeki oleuropeince zengin ekstrakt konsantrasyonu, kitosan veya pektin çözeltisi konsantrasyonu ve bekleme süresi bağımsız işlem değişkenleri olarak seçilmiş ve Merkezi Kompozit Dizayn (CCRD) kullanılarak optimizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İyonik jelyasyon yöntemine özgü olarak seçilen bağımsız işlem değişkenleri ve CCRD 'ye göre belirlenen deneme deseni Çizelge 4'de verilmiştir. İyonik jelyasyon ile enkapsülasyon işleminde optimum nokta; maksimum EE ve maksimum toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/gKM) hedef alınarak belirlenmiştir. Optimum enkapsüle örneklerde ise toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/gKM),

antioksidan kapasite (mg TE/gKM), nem içeriği, su aktivitesi, çözünübilirlik (%) ve enkapsülasyon verimi (%) analizleri gerçekleştirilmiştir.

#### Optimizasyon

Optimizasyon çalışmalarında; ultrasonik destekli ekstraksiyon işlemi değişkenleri olarak süre (dak), sıcaklık (°C) ve genlik (%), mikroenkapsülasyon işlemi ise, sodyum aljinat çözeltisi içindeki oleuropeince zengin ekstrakt konsantrasyonu, kitosan veya pektin çözeltisi konsantrasyonu ve bekleme süresi bağımsız işlem değişkenleri olarak seçilmiş ve optimize edilmiştir. Regresyon analizi, izohips ve yanıt yüzey grafikleri ve optimizasyon Design Expert Version 7.0 (StateaseInc.) paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ultrasonik destekli ekstraksiyon ve iyonik jelyasyon ile mikroenkapsülasyon işlemleri sonrasında elde edilen ürünlerin işleme özgülü belirlenen yanıtla ilişkin verilerinin regresyon analizi sonucu, yanıt için ikinci dereceden polinomiyal denklem (Eş. 1) elde edilmiştir.

$$\text{Yanıt} = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} x_{ij} \quad (k = 1,2,3) \quad (1)$$

#### Model Gıda Denemesi

Kefir üretimi için %3 yağ içeren pastörize süt (Tire Süt Kooperatifi, İzmir) kullanılmıştır. Süt 40°C'ye ısıtılmış ve içerisine kefir mayası (VIVO Gıda San. Ltd. Şti., İstanbul) eklenerek 16 saat oda sıcaklığında fermantasyon işlemine bırakılmıştır. Fermantasyon sonunda elde edilen kefir 4°C'de soğumaya bırakılmıştır. Elde edilen kefir içerisine ham ekstrakt (%0.5, g/g) ve mikroenkapsül (%1, g/g) eklenmiş, kontrol grubu olarak ise ekstrakt ve mikrokapsül eklenmemiş kefir kullanılmıştır. Elde edilen kefir örnekleri analiz işlemlerine kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir. Kefir örneklerinde LAB sayımı ve duyu analizi gerçekleştirilmiştir.

#### Analiz Yöntemleri

##### Nem ve su aktivitesi

Nem tayini, termogravimetrik prensibe göre çalışan etüv yöntemine göre gerçekleştirilmiştir (AOAC, 1990). Su aktivitesi, ±0.001 hassasiyete sahip dijital göstergeli su aktivitesi ölçüm probu (Testo-AG 400) kullanılarak belirlenmiştir.

##### Toplam fenolik madde miktarı (TFM)

Ultrasonik destekli ekstraksiyon ve enkapsülasyon işlemi sonrası örneklerin toplam fenolik madde miktarı, Jasicka-Misiak vd. (2018) belirttiği spektrofotometrik (Shimadzu, UV-1800) yöntem ile Folin-Ciocalteu metoduna göre 90 dak bekletilerek 725 nm dalga boyunda ölçülmüş ve sonuçlar mg gallik asit eşdeğeri GAE/gKM olarak ifade edilmiştir.

Mikrokapsül örneklerinin yüzey fenolik madde miktarı, sodyum sitrat eklenerek 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek, toplam fenolik madde miktarı bölümünde verilen aynı yöntem ile hesaplanmıştır.

##### Antioksidan kapasite

Ultrasonik destekli ekstraksiyon ve enkapsülasyon işlemi sonrası örneklerin antioksidan kapasitesi, Şahin'in (2019) belirttiği DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil radikal süpürme kapasitesi yöntemi) yöntemine göre 30 dak bekleme işleminin ardından 515 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak belirlenmiş ve sonuçlar mg troloks eşdeğeri mg TE/gKM olarak verilmiştir.

##### C vitamini miktarı

Taze zeytin yaprağı ve optimum koşullarda elde edilen zeytin yaprağı ekstraktında C vitamini miktarı spektrofotometrik yöntem kullanılarak, 518 nm'de ölçülmüş ve sonuçlar mg askorbik asit eşdeğeri mg AA/gKM cinsinden verilmiştir (Hışıl, 2007).

##### Ekstraksiyon verimi

Ekstraksiyon verimi, ekstraksiyon işleminden sonra elde edilen ekstraktların kurutulduktan sonraki miktar (g), başlangıçta işleme alınan örnek miktarına (g) oranlanması ile yüzde (%) olarak hesaplanmıştır.

##### Enkapsülasyon etkinliği (EE)

Enkapsülasyon etkinliği, mikrokapsül örneklerinin yüzey fenolik madde miktarı ve toplam fenolik madde miktarı belirlenerek Eşitlik 2'de verilen denkleme göre hesaplanmıştır (Çilek vd., 2012).

$$EE(\%) = \frac{P_{\text{toplam}} - P_{\text{yüzey}}}{P_{\text{toplam}}} * 100 \quad (2)$$



### Enkapsülasyon verimi

Enkapsülasyon verimi, enkapsülasyon sonrası elde edilen mikrokapsüllerin kütlesinin, oleuropeince zengin ekstrakt ve kaplama materyalinin başlangıç toplam kütlesine oranlanması (%) şeklinde Eşitlik 3'te verilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$EV (\%) = \frac{\text{enkapsülasyon sonrası mikrokapsüllerin kütlesi}}{\text{ekstrakt ve kaplama materyalinin başlangıçtaki toplam kütlesi}} * 100 \quad (3)$$

### Çözünübilirlik

Kapsüllerin suda çözünübilirlik analizi için Türker vd. (2018)'nin belirttiği yöntem kullanılmıştır.

### Duyusal Değerlendirme

Model gıda olan kefirin duyu analizi; enkapsüle edilmiş ve edilmemiş fenolik maddece zengin ekstraktın, kefir içerisine katılarak hedonik test ile 5 puan üzerinden, 10 yarı eğitilmiş panelist tarafından değerlendirilmesine dayanmaktadır. Değerlendirme kriterleri olarak görünüş, renk, kıvam ve lezzet (tat ve koku) ve tüm izlenim özellikleri dikkate alınmıştır (Bennion ve Bamford, 1973; Chauhan ve Sharma, 2003; Altuğ ve Elmacı, 2005).

### Laktik asit bakterisi (LAB) sayımı

Kefir örneklerinde LAB sayısını belirlemek üzere MRS agar, pH 6.2 'de dökme plak yöntemine göre

çift katlı ekim yapılmış 30°C'de 3-5 gün inkübasyona bırakılmıştır (ISO 15214, 1998).

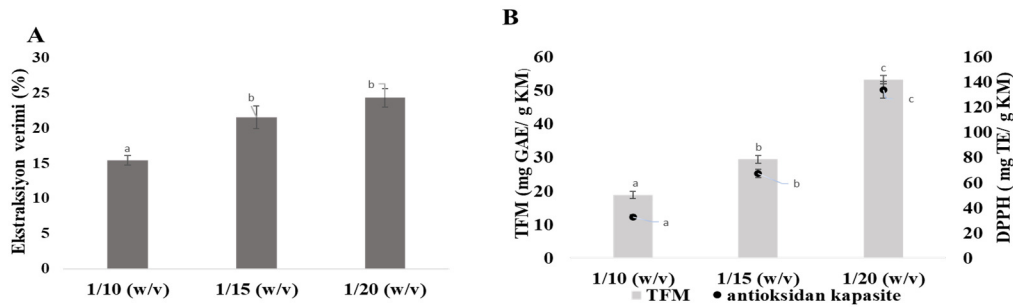
### İstatistiksel analizler

Zeytin yaprağının ultrasonik destekli ekstraksiyon işlem koşullarının ve iyonik jelasyon yöntemi ile enkapsülasyon işlem koşullarının optimizasyonunda istatistiksel analizler Design Expert Version 7.0 (StateaseInc.) paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Optimum işlem koşullarının doğrulama denemeleri için gerçekleştirilen t-testi ve model gıda denemelerinde gerçekleştirilen varyans analizi (ANOVA) Post-Hoc (Duncan) için SPSS paket programı (Versiyon 22) kullanılmıştır. Ortalama değerler  $\pm$  standart sapma olarak ifade edilmiştir.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### Ekstraksiyon katı/çözgen oranı, çözgen tipi ve konsantrasyonunun belirlenmesi

Ekstraksiyona alınan kurutulmuş zeytin yapraklarının nem içeriği %4.98 (yaş temelinde), su aktivitesi ( $a_w$ ) değeri 0.33 ve toplam C vitamini miktarı 16.53 mg AA/gKM olarak bulunmuştur. Örneklerin farklı katı/çözgen oranı, çözgen tipi ve konsantrasyonu kullanılarak gerçekleştirilen denemeler sonucunda elde edilen % ekstraksiyon verimi, TFM ve antioksidan kapasitesi sonuçları Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. Ultrason destekli ekstraksiyonda etanol ile farklı katı/çözgen oranlarında elde edilen ekstraksiyon verimi, TFM ve antioksidan kapasitesi değerleri.

Figure 1. Extraction yield, total phenolic content and antioxidant capacity values obtained with ethanol at different solid/ solvent ratios in ultrasound assisted extraction.

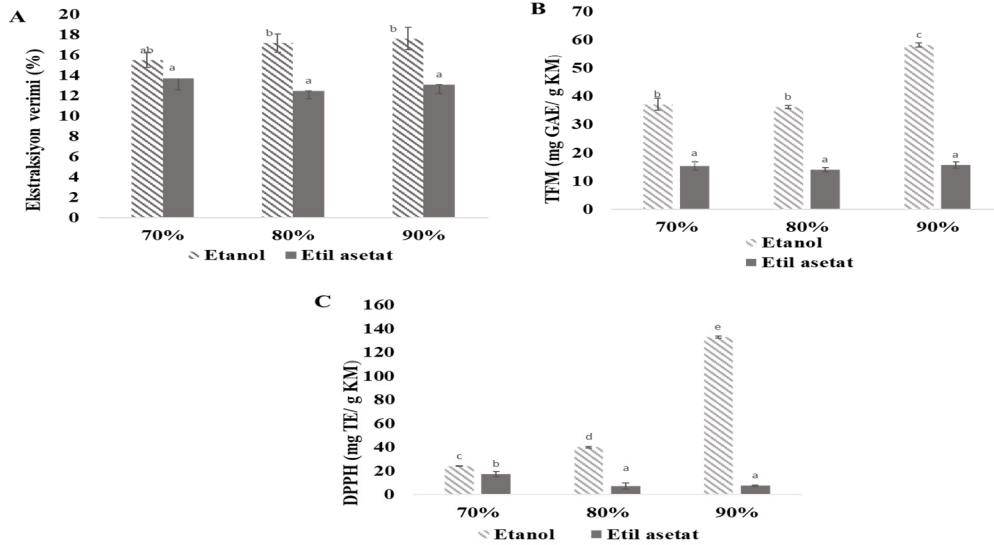
\* A Katı/ çözgen oranlarında ekstraksiyon verimi, B Katı/ çözgen oranlarında fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasite, TFM Toplam fenolik madde, GAE Gallik asit eşdeğeri, TE Trolox eşdeğeri. Veriler kuru baz olarak ve ortalama değer  $\pm$  SD (n=2) olarak ifade edildi. Farklı üst simge küçük harf,  $P < 0.05$  'te önemli farklılıklar göstermektedir.

\*A Extraction efficiency at solid/ solvent ratios, B Phenolic content and antioxidant capacity at solid/ solvent ratios, TFM Total phenolic substance, GAE Gallic acid equivalent, TE Trolox equivalent. Data were expressed as dry basis and mean value  $\pm$  SD (n=2). Different superscript lower cases indicated significant differences at  $P < 0.05$ .

Sabit ultrasonik destekli ekstraksiyon koşullarında (40°C, 10 dak, %70 genlik), %80:20 (h/h) etanol-su kullanılarak farklı katı/çözgen (1:10, 1:15 ve 1:20 a/h) oranlarında gerçekleştirilen denemelerde, en yüksek ekstraksiyon verimi (%24.33), TFM (53.31 mg GAE/gKM) ve antioksidan kapasitesi (134.025 mg TE/gKM; 1:20 a/h) katı/çözgen oranı için belirlenmiştir (Şekil 1). Katı/çözgen oranının artmasıyla birlikte polifenollerin daha yüksek miktarda elde edildiği görülmektedir (Şekil 1). Xie vd. (2015), katı/çözgen oranının 1:30'a (a/h) kadar artmasıyla ekstraksiyon veriminin hızla arttığını daha sonrasında ise önemli ölçüde değişmediğini belirtmişlerdir. Ekstraksiyon verimini artırmasını ise çözgen/katı oranındaki artışın, hücrelere çözücü difüzyonunun artmasını sağlamasına bağlamışlardır.

Çözgen tipinin seçilmesi, zeytin yaprağından oleuropein elde edilmesinde büyük önem

taşımaktadır (Şahin vd., 2011). Çalışma kapsamında kullanılacak çözgen tipi ve konsantrasyonu, ekstraksiyon koşulları ve katı/çözgen oranı sabit tutularak belirlenmiştir. En yüksek ekstraksiyon verimi (%17.60), TFM (58.16 mg GAE/gKM) ve antioksidan kapasitesi (132.78 mg TE/gKM) %90:10 (h:h) etanol-su ile gerçekleştirilen denemede elde edilmiştir (Şekil 2). Çözgen olarak etil asetat ile etanol kıyaslandığında etanolün ekstraksiyon verimi, TFM ve antioksidan kapasitesi değerlerinin daha yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 2). Zeytin yaprağının polar bir fenolik bileşiği olan oleuropeini ekstrakte edebilmek için polar bir çözücü gerekmektedir. Çözgen tipi olarak etanol ile etil asetatın kullanıldığı bir çalışmada etanol ile gerçekleştirilen ekstraksiyonun daha yüksek verim (%6.38) sağladığı, ayrıca karışımda etanol konsantrasyonunun artışıyla birlikte de verimin belli bir dereceye kadar arttığı bildirilmiştir (Xie vd., 2015).



Şekil 2. Ultrason destekli ekstraksiyonda farklı çözgen tipi ve konsantrasyonunda elde edilen ekstraksiyon verimi, TFM ve antioksidan kapasitesi değerleri.

Figure 2. Extraction efficiency, total phenolic content and antioxidant capacity values obtained in ultrasound assisted extraction at different solvent types and concentrations.

\* A Çözgen tipi ve farklı konsantrasyonlarda ekstraksiyon verimi, B Çözgen tipi ve farklı konsantrasyonlarda TFM toplam fenolik madde miktarı, C Çözgen tipi ve farklı konsantrasyonlarda antioksidan kapasite, TFM Toplam fenolik madde, GAE Gallik asit eşdeğeri, TE Trolox eşdeğeri. Veriler kuru baz olarak ve ortalama değer  $\pm$  SD (n=2) olarak ifade edildi. Farklı üst simge küçük harf,  $P < 0.05$ 'te önemli farklılıklar göstermektedir.

\* A Extraction efficiency at different solvent types and concentrations, B amount of total phenolic substance at different solvent types and concentrations, C Antioxidant capacity at different solvent types and concentrations, TFM Total phenolic substance, GAE Gallic acid equivalent, TE Trolox equivalent. Data were expressed as dry basis and mean value  $\pm$  SD (n=2). Different superscript lower cases indicated significant differences at  $P < 0.05$ .

En yüksek ekstraksiyon verimi, TFM ve antioksidan kapasite değerleri; 1:20 (a/h) katı/çözgen oranı ve %90:10 (h/h) etanol-su karışımı koşulları için belirlenmiş ve ekstraksiyon işlem koşullarının optimizasyonu bu koşullar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### Ultrasonik destekli ekstraksiyon ve işlem koşullarının etkisi

Bu çalışmanın ikinci basamağında yeşil teknik olarak bilinen ultrasonik destekli ekstraksiyon işlem koşullarının (süre (dak), sıcaklık (°C) ve genlik (%)) ekstraksiyon verimi, TFM ve antioksidan kapasite üzerine etkileri incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi ile Box Behnken deneme desenine göre elde edilen sonuçlar.

Table 1. Experimental results obtained by ultrasound assisted extraction method according to Box-Behnken experimental design.

Deneme No (Experimental No)	Süre (Time) (dak) (min) (A)	Sıcaklık (Temperature) (°C) (B)	Genlik (Amplitude) (%) (C)	Ekstraksiyon Verim (Extraction Yield) (%)	TFM (mg GAE/gKM)	Antioksidan Kapasite (Antioxidant Capacity) (mg TE/gKM)
1	5	30	70	16.59±0.60	52.70±0.31	174.59±4.99
2	15	30	70	15.27±0.80	65.36±0.45	155.33±1.07
3	5	40	70	17.80±0.55	68.98±0.80	162.35±4.62
4	15	40	70	16.95±0.43	58.98±3.18	149.29±0.64
5	5	35	40	16.38±0.24	67.07±0.18	172.01±1.49
6	15	35	40	15.63±0.97	66.53±3.46	153.16±0.41
7	5	35	100	15.89±1.10	62.61±2.89	155.84±1.19
8	15	35	100	16.94±0.64	60.95±2.62	153.57±0.55
9	10	30	40	15.40±0.59	61.85±1.94	175.69±2.18
10	10	40	40	16.75±0.89	67.10±0.82	155.62±0.50
11	10	30	100	16.64±1.75	60.27±1.31	170.29±0.66
12	10	40	100	18.48±0.22	58.95±0.85	143.33±16.47
13	10	35	70	16.86±1.45	62.24±0.20	131.81±11.49
14	10	35	70	16.11±1.33	62.02±1.27	132.63±1.28
15	10	35	70	16.12±1.12	65.10±3.74	126.23±5.15
16	10	35	70	17.02±0.86	59.83±6.40	124.32±3.48
17	10	35	70	17.37±0.34	65.17±3.44	130.73±7.13

GAE Gallik asit eşdeğeri, TE Trolox eşdeğeri. Veriler kuru baz olarak ve ortalama değer  $\pm$  SD (n=2) olarak ifade edildi. GAE Gallic acid equivalent, TE Trolox equivalent. Data were expressed as dry basis and mean value  $\pm$  SD (n=2).

Optimizasyon çalışmasında yer alan işlem değişkenleri ile her bir yanıt arasında ilişkiyi ifade eden kuadratik matematiksel model, regresyon analizi yapılarak oluşturulmuştur. Bunun için modelin uygunsuzluğu testi (lack of fit) değerleri analiz edilmiş ve kuadratik matematiksel modelin uygun olduğu belirlenmiştir. Bu modellerin ANOVA sonuçları ve regresyon katsayıları Çizelge 2'de verilmiştir.

### Ekstraksiyon verimi

İşlem değişkenlerinin ekstraksiyon verimi üzerindeki etkilerini veren yanıt yüzey grafiği ve izohips eğrileri Şekil 3'de gösterilmiştir.

Ekstraksiyon verimi üzerine ekstraksiyon işlem koşullarının (sıcaklık, süre ve genlik) tümünün etkisinin önemli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2)( $P < 0.05$ ). Ekstraksiyon veriminin  $15.27 \pm 0.80$  ile  $18.48 \pm 0.22$  arasında değiştiği ve en yüksek ekstraksiyon veriminin 10 dakika süre,  $35^\circ\text{C}$  sıcaklık ve %70 genlik koşullarında elde edildiği görülmektedir (Çizelge 1). Ekstraksiyon sıcaklığının artmasına bağlı olarak ekstraksiyon veriminin arttığı görülmektedir. Ekstraksiyon işleminde yüksek sıcaklık değerleri, bitki matriksinden bileşiklerin desorpsiyonunun artmasını sağlayarak kütle transferini ve ekstraksiyon performansını artırmaktadır (Şahin

vd., 2015). Ekstraksiyon süresinin azalmasıyla birlikte ekstraksiyon veriminde artış olduğu gözlenmiş (Şekil 3) ve ekstraksiyon süresindeki kısalmanın ise ekonomik açıdan avantaj sağlayarak enerji maliyetlerinin en aza indirilmesinde etkili olduğu bildirilmiştir (Şahin ve Şamlı, 2013; Chemat vd., 2017). Aynı zamanda ekstraksiyon süresi çözücünün ürüne nüfuz etme ve çözme işleminde etkili bir parametre olup ekstraksiyon verimini etkilemektedir (Guler vd., 2020). Flórez-Fernández vd. (2019), ultrasonik destekli

ekstraksiyon ile uyguladıkları kısa sonikasyon sürelerinin aljinat veriminde artış sağladığını belirtmişlerdir. Gilaburu (*Viburnum opulus* L.) meyvesi ile yapılan bir çalışmada, ultrasonik destekli ekstraksiyon ile işlem süresinde yaklaşık %90 oranında tasarruf sağlandığı belirlenmiştir. Ayrıca geleneksel yöntemle göre daha yüksek antioksidan aktivite belirlenmiş ve ultrasonik destekli ekstraksiyon ile fenolik bileşiklerde daha az bozulma olduğu bildirilmiştir (Alifakı vd., 2018).

Çizelge 2. Ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ekstraktların ve iyonik jelasyon ile elde edilen kapsüllenen ANOVA sonuçları

Table 2. ANOVA results of the extracts obtained by ultrasonic assisted extraction method and encapsulated obtained by ionic gelation

Ultrasonik destekli ekstraksiyon ( <i>Ultrasonic assisted extraction</i> )							
Varyasyon Kaynağı ( <i>Variation Source</i> )	SD	Ekstraksiyon Verimi ( <i>Extraction Yield</i> ) (%)		TFM (mg GAE/gKM)		Antioksidan Kapasitesi ( <i>Antioxidant Capacity</i> ) (mg TE/gKM)	
		HKT	P-değeri ( <i>P-value</i> )	HKT	P-değeri ( <i>P-value</i> )	HKT	P-değeri ( <i>P-value</i> )
Model	9	11.9106	<b>0.0090</b>	233.218	<b>0.0100</b>	4514.03	<b>0.0003</b>
A	1	1.4328	<b>0.0286</b>	0.025	0.9373	357.425	<b>0.0067</b>
B	1	4.9320	<b>0.0014</b>	26.937	<b>0.0332</b>	533.99	<b>0.0023</b>
C	1	3.8191	<b>0.0028</b>	44.741	<b>0.0113</b>	139.88	0.0489
AB	1	0.0170	0.7732	128.474	<b>0.0007</b>	9.494	0.5549
AC	1	0.8055	0.0783	0.306	0.7862	68.799	0.1390
BC	1	0.0581	0.5972	13.788	0.1004	11.870	0.5105
A <sup>2</sup>	1	0.5224	0.1409	1.267	0.5842	863.684	<b>0.0006</b>
B <sup>2</sup>	1	0.2795	0.2641	15.424	0.0855	1204.08	<b>0.0002</b>
C <sup>2</sup>	1	0.0758	0.5475	3.189	0.3931	969.874	<b>0.0004</b>
Kalıntı ( <i>Residue</i> )	7	1.3275		26.967		172.876	
Model Uygunsuzluğu Testi ( <i>Lack of Fit</i> )	3	0.0593	0.9770	6.380	0.7531	119.347	0.1600
Saf Hata ( <i>Pure Error</i> )	4	1.2683		20.586		53.529	
Toplam ( <i>Cor Total</i> )	16	13.238		260.185		4686.9	
R <sup>2</sup>		0.8997		0.8963		0.9631	
R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>		0.7707		0.7630		0.9156	
C.V. *%		2.6245		3.1332		3.2913	
PRESS		2.9300		134.2584		1993.195	
Yeterli Tahminleme ( <i>Adeq Precision</i> )		11.2855		9.9673		12.4958	

Çizelge 2. devam

İyonik jelyasyon ( <i>Ionic gelation</i> )					
			EE (%)	TFM (mg GAE/gKM)	
Varyasyon Kaynağı ( <i>Variation Source</i> )	SD	HKT	P-değeri ( <i>P-value</i> )	HKT	P-değeri ( <i>P-value</i> )
Model	9	2925.403	<b>0.0013</b>	431.594	<b>0.0003</b>
X <sub>1</sub>	1	115.032	0.1010	222.545	<b>&lt; 0.0001</b>
X <sub>2</sub>	1	1135.109	<b>0.0003</b>	99.948	0.0005
X <sub>3</sub>	1	1.613	0.8336	1.607	0.5168
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1	417.800	<b>0.0069</b>	4.563	0.2849
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	1	259.038	0.0228	49.853	<b>0.0045</b>
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	1	433.711	<b>0.0062</b>	24.136	<b>0.0281</b>
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	223.821	0.0313	16.807	0.0570
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1	123.178	0.0913	2.564	0.4162
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	1	346.424	0.0114	6.392	0.2113
Kalıntı ( <i>Residue</i> )	7	310.185		31.773	
Model Uygunsuzluğu Testi (Lack of Fit)	3	212.741	0.3045	10.146	0.8443
Saf Hata (Pure Error)	4	97.444		21.627	
Toplam (Cor Total)	16	3235.587		463.366	
R <sup>2</sup>		0.9041		0.9314	
R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>		0.8082		0.8629	
C.V. *%		17.0250		18.8348	
PRESS		2231.966		126.87	
Yeterli Tahminleme (Adeq Precision)		11.8542		12.674	

A: Süre (dak), B: Sıcaklık (°C), C: Genlik (%), X<sub>1</sub>: Ekstrakt Konsantrasyonu (%), X<sub>2</sub>: Kitosan Konsantrasyonu (%), X<sub>3</sub>: Bekleme Süresi (dak)

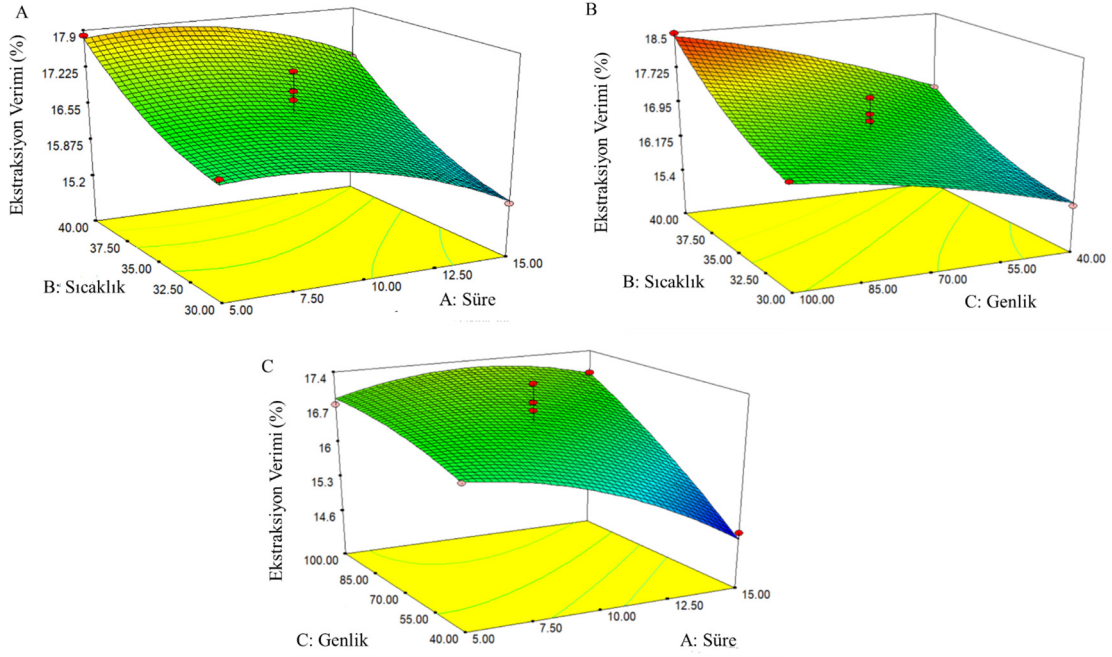
A: Time (min), B: Temperature (°C), C: Amplitude (%), X<sub>1</sub>: Extract Concentration (%), X<sub>2</sub>: Chitosan Concentration (%), X<sub>3</sub>: Waiting Time (min)

### Toplam fenolik madde (TFM)

İşlem değişkenlerinin TFM üzerindeki etkileri, yanıt yüzey grafiği ve izohips eğrileri ile Şekil 4'te gösterilmiştir.

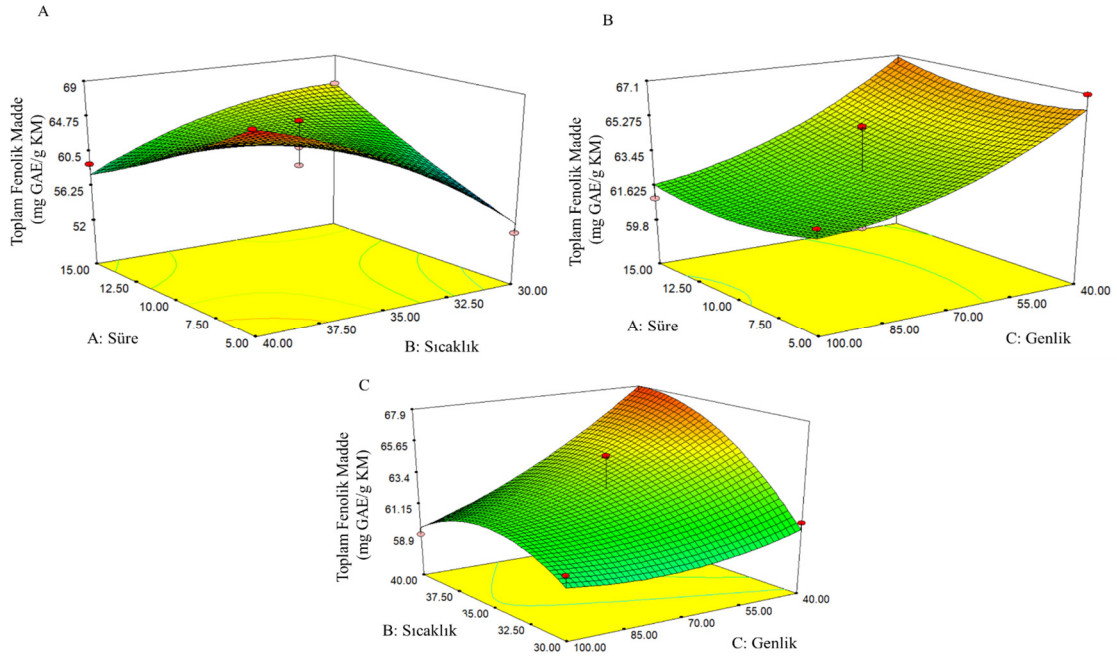
Zeytin yaprağı ekstraktlarının TFM'si  $52.70 \pm 0.31$  ile  $68.98 \pm 0.80$  mg GAE/g ürün arasında bulunmuştur (Çizelge 1). TFM yanıtı için regresyon analizi sonucunda elde edilen ikinci dereceden polinomiyal modelde sıcaklığın, genliğin, süre ve genliğin etkileşimlerinden anlamlı seviyede etkilendiği bulunmuştur ( $P < 0.05$ ). İşlem değişkenlerinden sıcaklığın artmasıyla TFM önemli düzeyde arttığı, ancak ekstraksiyon sıcaklığında artışın devam etmesi ile TFM azalmanın gözlemlendiği belirlenmiştir (Şekil 4). TFM'deki bu artış, sıcaklığın yükselmesiyle birlikte çözücü viskozitesinin ve yüzey geriliminin azalarak fenolik bileşiklerin çözünürlüğünü

arttırmasına, dolayısıyla bu bileşiklerin difüzyon ve ekstraksiyon hızını artırma kabiliyetine bağlanabilmektedir. Aynı zamanda sıcaklık artışına bağlı olarak meydana gelen kimyasal ve enzimatik bozulmalar TFM etkilemektedir (Ünver ve Çelik, 2022). Bu çalışmada işlem süresinin TFM üzerinde çok fazla bir değişime neden olmadığı görülmüştür (Şekil 4). Uzun ekstraksiyon süreleri, daha fazla kimyasal reaksiyona ve fenolik bileşiklerin oksidasyonuna neden olabilmektedir (Şahin vd., 2015). Şekil 4 incelendiğinde genliğin azalmasıyla ise TFM'de artış olduğu görülmektedir. Yüksek genlik uygulanması güç sarfiyatını artıracak ve örneğin ısınmasına neden olacaktır. Ultrasonik genliğinin artırılması, ultrasonik gücünün artmasına neden olarak kavitasyon gerçekleşmekte ve kavitasyon lokal ısınmaya neden olarak bitki hücre duvarının yıkımını sağlamaktadır (Poyraz vd., 2021).



Şekil 3. Ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ekstraktların ekstraksiyon verimi için yanıt yüzey grafiği ve izohips eğrisi.

Figure 3. The response surface plots and isohips curves for the extraction efficiency of the extracts obtained by the ultrasound assisted extraction method.



Şekil 4. Ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ekstraktların TFM için yanıt yüzey grafiği ve izohips eğrisi.

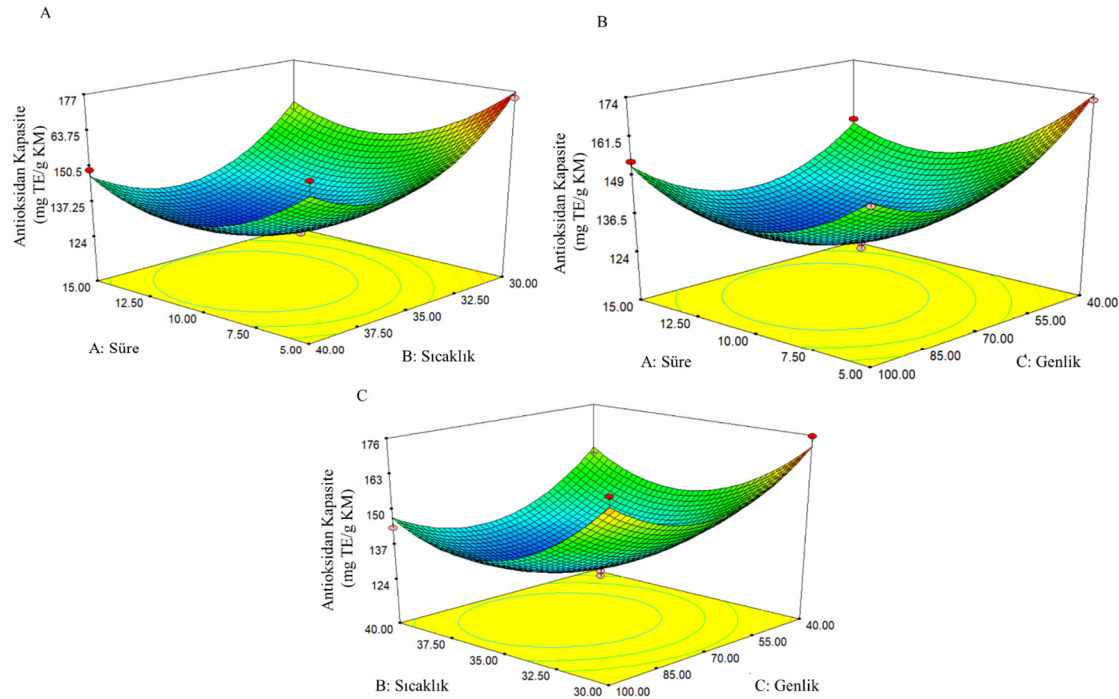
Figure 4. Response surface plots and isohips curves for the total amount of phenolic substances in the extracts obtained by ultrasonic assisted extraction method.

### Antioksidan kapasite

İşlem değişkenlerinin antioksidan kapasite üzerindeki etkileri yanıt yüzey grafiği ve izohips eğrileri olarak Şekil 5'te gösterilmiştir.

Zeytin yaprağı ekstraktlarının antioksidan kapasitesi üzerine ekstraksiyon sıcaklık, süre ve genlik değişkenlerinin etkili olduğu saptanmıştır (Çizelge 2) ( $P < 0.05$ ). Maksimum antioksidan kapasite değeri 5 dakika süre, 30°C sıcaklık ve %70 genlik koşullarında elde edilmiştir. Şekil 5'te görüldüğü üzere sürenin 5 dak'dan 10 dak'a, sıcaklığın 30°C'den 35°C'e ve ultrasonik genliğin %40'tan %70'e artmasıyla antioksidan kapasite

önce azalmış sonrasında ise parametrelerdeki artışla birlikte artış göstermiştir. Ekstraksiyon süresi ve sıcaklığının, birlikte olan etkisi de antioksidan kapasitesi üzerine anlamlı bulunmuştur (Çizelge 2) ( $P < 0.05$ ). Ünver ve Çelik (2022), zeytin yaprağı üzerine yaptıkları çalışmada benzer sonuçları elde etmişlerdir. Ekstraksiyon süresinin artmasıyla antioksidan kapasitede düşüşün gözlenmesi, daha uzun ekstraksiyon sürelerinin ultrasonik işleme aşırı maruz kalma nedeniyle sıcaklıktaki artışa ve ısıl bozunmaya bağlanmıştır (Prommuak vd., 2008; Şahin ve Şamlı, 2013).



Şekil 5. Ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ekstraktların antioksidan kapasitesi için yanıt yüzey grafiği ve izohips eğrisi.

Figure 5. Response surface plots and isohips curves for antioxidant capacity of extracts obtained by ultrasonic assisted extraction method.

### Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Yöntemi İşlem Koşullarının Optimizasyonu

Optimum ekstraksiyon koşulları (ekstraksiyon süresi (dak), sıcaklık (°C) ve genlik (%)); maksimum TFM, maksimum ekstraksiyon verimi ve maksimum antioksidan kapasite hedef alınarak belirlenmiştir. Deneysel veriler üzerinde regresyon analizi yapılmış ve modelin katsayıları,

ANOVA analizi kullanılarak istatistiksel anlamlılık açısından değerlendirilmiştir. Tahmin edilen ikinci dereceden polinomiyal modellerinin regresyon katsayıları Çizelge 2'de özetlenmiştir.  $R^2$  ve  $R^2_{adj}$  değerlerinin birbirlerine yakın olması modellerin istatistiksel olarak önemsiz terimleri içermediğini göstermektedir. Varyasyon katsayısı deneysel verilerdeki kalıntı varyasyonun ortalamaya bağlı

bir ölçüsüdür. Büyük varyasyon katsayısı değerleri, verilerin ortalamadan çok fazla saptıklarını, küçük varyasyon katsayısı değerleri ise verilerin hemen hemen ortalamayla aynı değere sahip olduğunu göstermektedir

Desirability (arzu edilebilirlik) fonksiyonu yaklaşımı uygulandığında, desirability değeri 1 olarak bulunmuş ve optimum ekstraksiyon koşulları; 5.31 dak süre, 39.27°C sıcaklık ve %40.51 genlik olarak belirlenmiştir. Optimum

noktada, ekstraksiyon verimi, TFM ve antioksidan kapasite sırasıyla %17.097, 72.479 mg GAE/gKM ve 176.15 mg TE/gKM olarak tahmin edilmiştir. Optimum ekstraksiyon işlem koşullarında üç doğrulama denemesi yapılmış ve modelden tahminlenen nokta deneysel olarak doğrulanmıştır. Örneklerin deneysel ekstraksiyon verimi, TFM ve antioksidan kapasiteleri ortalama olarak modelden elde edilen değerlerden farklı bulunmamıştır ( $P > 0.05$ ) (Çizelge 3).

Çizelge 3. Ultrasonik destekli ekstraksiyon ve iyonik jelasyon için optimum nokta doğrulama ve t-testi sonuçları

Table 3. Verification and t-test results for ultrasound assisted extraction and ionic gelation at optimum condition

	Ultrasonik destekli ekstraksiyon (Ultrasonic assisted extraction)			İyonik jelasyon (Ionic gelation)	
	Ekstraksiyon Verimi (Extraction Yield) (%)	TFM (mg GAE/gKM)	Antioksidan Kapasitesi (Antioxidant Capacity) (mg TE/gKM)	EE (%)	TFM (mg GAE/gKM)
1	14.499	72.996	171.235	61.18	12.36
2	19.440	72.471	176.950	60.91	12.74
3	14.760	72.395	173.900	62.94	12.44
Ortalama (Average)	17.100	72.621	174.028	61.68	12.51
Modelden Tahminlenen (Estimated from the Model)	17.097	72.479	176.146	63.8	12.34
P- değeri (P- value)	0.645	0.530	0.328	0.079	0.273

### İyonik jelasyon yöntemi ile mikroenkapsülasyon ve işlem koşullarının etkisi

Optimum koşullarda elde edilen zeytin yaprağı ekstraktlarının iyonik jelasyon ile enkapsülasyonu işleminde iki farklı kaplama materyali kombinasyonu ile ön denemeler gerçekleştirilmiştir. Sodyum aljinat-kitosan ve sodyum aljinat-pektin kombinasyonları kullanılan ön denemelerde, ekstrakt konsantrasyonu %1, pektin veya kitosan konsantrasyonu %0.1 ve bekleme süresi 15 dakika olarak belirlenmiş olup damlatma çözeltisinin jelleşme çözeltisine oranı 1:9 olarak seçilmiştir.

Sodyum aljinat ile beraber pektin ve kitosan kullanımında EE sırasıyla %15.2 ve %17.5 olarak

belirlenmiştir. Ayrıca pektin kullanılarak oluşturulmuş kapsüllerin kitosan kullanılarak oluşturulanlara göre daha yumuşak, küçük ve heterojen bir yapıda olduğu görülmüştür. Bu nedenle mikroenkapsülasyon işlemi için uygun kombinasyon olarak sodyum aljinat-kitosan seçilmiştir.

Sodyum aljinat-kitosan ile yapılan enkapsülasyon işleminin optimizasyonunda Çizelge 4'de görülen CCRD deneme deseni kullanılmıştır. Bağımsız işlem değişkenleri olarak ekstrakt konsantrasyonu (%1-5), kitosan konsantrasyonu (%0.1-0.5) ve bekleme süresi (5-15 dak.) seçilirken, TFM ve EE ise yanıt değişkenleri olarak belirlenmiştir (Çizelge 4).



Çizelge 4. CCRD deneme desenine göre iyonik jelasyon enkapsülasyon yöntemi ile elde edilen sonuçlar  
 Table 4. Experimental results obtained by ionic gelation encapsulation method according to CCRD experimental design

Deneme No (Experimental No)	Ekstrakt Konsantrasyonu (Extract Concentration) (%) (X <sub>1</sub> )	Kitosan Konsantrasyonu (Chitosan Concentration) (%) (X <sub>2</sub> )	Bekleme Süresi (Waiting Time) (dak) (min) (X <sub>3</sub> )	EE (%)	TFM (mg GAE/gKM)
1	1	0.1	5	18.61±0.55	2.28±0.50
2	5	0.1	5	51.88±0.67	18.64±0.80
3	1	0.5	5	40.47±0.96	6.83±1.12
4	5	0.5	5	37.34±1.10	18.47±1.15
5	1	0.1	15	17.87±1.15	3.48±1.16
6	5	0.1	15	20.88±1.54	8.15±1.28
7	1	0.5	15	61.68±1.13	13.27±1.75
8	5	0.5	15	43.28±1.67	16.63±1.52
9	1	0.3	10	32.02±1.32	5.53±1.34
10	5	0.3	10	51.18±1.78	16.67±1.16
11	3	0.1	10	22.75±1.74	5.11±1.42
12	3	0.5	10	55.77±1.23	14.08±1.32
13	3	0.3	5	21.00±1.62	6.75±1.45
14	3	0.3	15	21.58±1.55	7.43±2.10
15	3	0.3	10	25.67±1.89	6.71±1.88
16	3	0.3	10	31.82±1.66	9.45±2.05
17	3	0.3	10	29.65±0.88	7.26±2.13
18	3	0.3	10	32.41±0.78	10.39±1.90
19	3	0.3	10	39.21±1.18	12.39±1.34

GAE Gallik asit eşdeğeri, EE Enkapsülasyon etkinliği. Veriler kuru baz olarak ve ortalama değer ± SD (n=2) olarak ifade edilmiştir. GAE Gallic acid equivalent, EE Encapsulation efficiency. Data were expressed as dry basis and mean value ± SD (n=2).

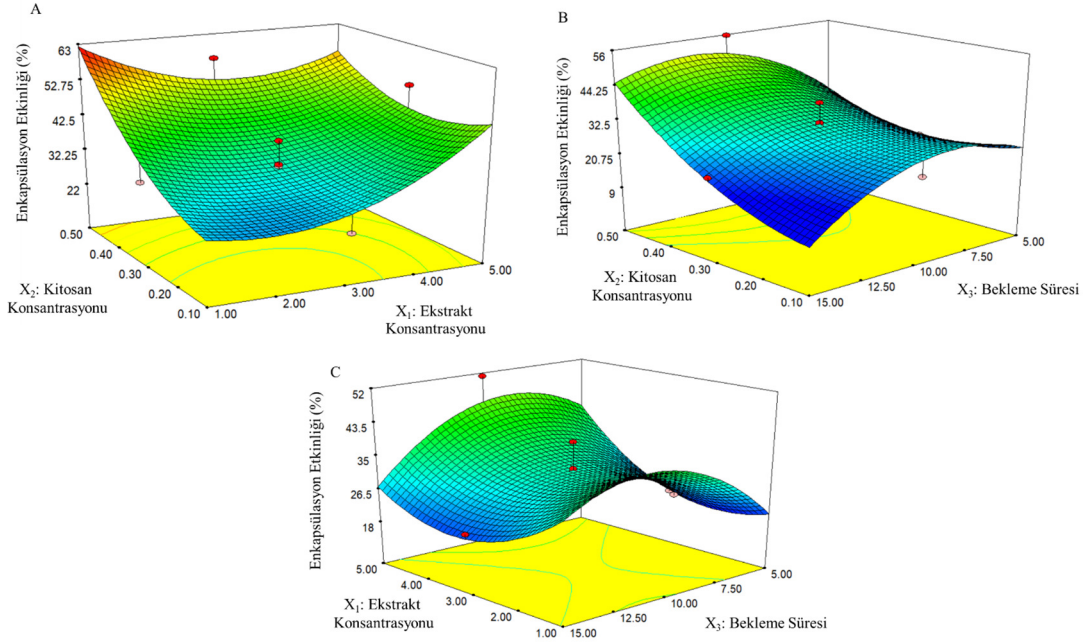
Elde edilen veriler ile kuadratik matematiksel modelin uygun olduğu belirlenmiş ve bağımsız değişkenlerin model üzerine etkisi ANOVA ile incelenmiştir (Çizelge 2). Buna göre iki yanıt değişkeni için de model istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ( $P < 0.05$ ), model uygunsuzluğu testi istatistiksel olarak önemsizdir ( $P > 0.05$ ). Ayrıca her iki yanıt değişkeni için R<sup>2</sup> değeri 0.9'dan büyük olarak bulunmuştur. Yanıtlar için varyasyon katsayısı değeri TFM için 18.83 EE için 17.02 olarak bulunmuştur.

#### Enkapsülasyon etkinliği (EE)

EE üzerine kitosan konsantrasyonunun doğrudan anlamlı bir etkisi bulunurken, diğer bağımsız işlem değişkenlerinin birbiri ile interaksiyon halinde bulunması durumunda anlamlı bir etkiye sahip olduğu ( $P < 0.05$ ) Çizelge 2'de görülmektedir.

Kitosan ve ekstrakt konsantrasyonundaki azalma sonucunda EE azalmıştır. Bekleme süresindeki artış ise EE 'yi bir noktaya kadar arttırmış, ardından artan bekleme süresine göre EE 'de azalma başlamıştır (Şekil 6).

İyonik jelasyon işleminde kalsiyum iyonları, sodyum aljinat ile birlikte çapraz bağ oluşturmada ve yumurta kutusu şekli almaktadır. Aynı zamanda düşük molekül ağırlığına sahip kitosan aynı şekilde sodyum aljinat ile elektrostatik interaksiyonlar ile bağ oluşturmaktadır. Düşük molekül ağırlıklı aljinat ve kitosandan oluşan boncuklar daha gözenekli bir yapı oluşturmaktadır (Bajpai ve Tankhiwale, 2006). Bu da EE'deki düşüşü açıklamaktadır. Zira kitosan-kalsiyum klorür çözeltisi içerisinde oluşan boncuklardan aktif bileşen dışarıya doğru difüze olmaktadır (Najafi-Soulari vd., 2016).



Şekil 6. İyonik jelasyon yöntemi ile elde edilen kapsüllerin EE için yanıt yüzey grafiği ve izohips eğrisi  
 Figure 6. Response surface plots and isohips curves for encapsulation efficiency of capsules obtained by ionic gelation method

### Toplam fenolik madde (TFM)

Mikroenkapsülasyon işleminde yanıt değişkeni olarak TFM incelendiğinde, Çizelge 2'den de anlaşılacağı üzere ekstrakt ve kitosan konsantrasyonunun model üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olduğu görülmektedir ( $P < 0.05$ ). Bununla beraber, bekleme süresi ekstrakt konsantrasyonu ve ayrıca kitosan konsantrasyonu ile birlikte etki göstermiştir ( $P < 0.05$ ).

Şekil 7 incelendiğinde kitosan ve ekstrakt konsantrasyonu azaldığında TFM'nin azaldığı görülmektedir. Bekleme süresindeki artışın bir noktaya kadar toplam TFM'yi arttırdığı, sonrasında ise azalmaya neden olduğu bulgulanmıştır.

Ekstrakt içerisindeki TFM'de ki azalmanın, fenolik bileşenlerin kalsiyum klorür çözeltisi içinde önemli ölçüde migrasyonu sonucu meydana geldiği ve oluşan boncukların alındığı jelleşme ortamında enkapsüle olmadan kaldığı belirtilmektedir (Arriola vd., 2019). Bunun yanı sıra aktif bileşen kaybının çoğunlukla kitosan

çözeltisinin içerisinde gerçekleştiği bulgulanmıştır (Deladino vd., 2008).

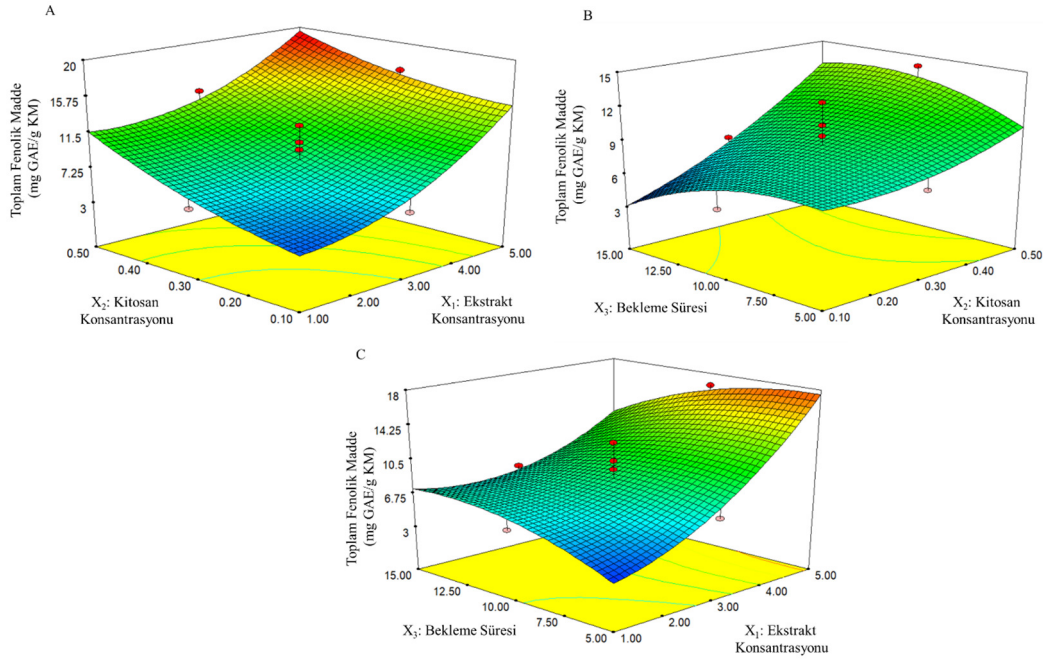
### İyonik Jelasyon ile Enkapsülasyon İşlem Koşullarının Optimizasyonu

Zeytin yaprağı ekstraktının sodyum aljinat-kitosan kombinasyonu ile iyonik jelasyon yöntemi ile enkapsülasyonunda bağımsız işlem değişkenleri olan %1-5 ekstrakt konsantrasyonu, %0.1-0.5 kitosan konsantrasyonu ve 5-15 dak bekleme süresi aralıklarında, desirability (arzu edilebilirlik) fonksiyonu yaklaşımıyla ve maksimum TFM ve maksimum EE hedeflenerek gerçekleştirilen optimizasyonda, desirability değeri 1 olarak bulunurken, ekstrakt konsantrasyonu %1.04, kitosan konsantrasyonu %0.5 ve bekleme süresi 11.24 dak olarak belirlenmiştir. Optimum noktada EE %63.8, TFM ise 12.34 mg GAE/gKM olarak tahminlenmiştir.

Çizelge 3'de belirtildiği üzere, doğrulama denemelerinde enkapsülasyon etkinliği TFM deneysel olarak sırasıyla ortalama %61.68 ve 12.51 mg GAE/gKM olarak bulunmuştur. Tek örnek t-testi sonucuna göre deneysel ve tahminlenen

değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ( $P > 0.05$ ) (Çizelge 3). Optimum koşullarda elde edilen ekstraktta TFM 72.621 mg GAE/gKM olarak bulunmuşken,

enkapsüle örneklerde ise bu miktar oldukça düşük ve 12.51 mg GAE/gKM ürün olarak hesaplanmıştır.



Şekil 7. İyonik jelasyon yöntemi ile elde edilen kapsüllerin TFM için yanıt yüzey grafiği ve izohips eğrisi  
Figure 7. The response surface plots and isohips curves for the total amount of phenolic substance in the capsules obtained by the ionic gelation method

Najafi-Soulari vd. (2016) tarafından limon otu ekstraktının iyonik jelasyon yöntemi ile enkapsülasyonu üzerine yapılan bir çalışmada, optimum noktada elde edilen EE %39.5 olarak bulunmuştur. Arriola vd. (2019) tarafından stevia ekstraktlarının farklı özellikte sodyum aljinat kullanılarak iyonik jelasyon ile enkapsüle edildiği çalışmada ise EE'nin %60'ın üzerinde olduğu belirtilmiştir. Buna göre bu çalışmada elde edilen sonuç yapılan bu çalışmalar ile uyum göstermektedir.

Çizelge 5'de ise optimum noktada elde edilen mikrokapsüllerde gerçekleştirilen analizlerin sonuçları verilmiştir.

Santagapita vd. (2011) tarafından invertaz enziminin iyonik jelasyon ile enkapsüle edildiği çalışmada kurutulmuş haldeki mikrokapsüllerin nem içeriği kuru bazda %4.5-11.4 arasında

değişim gösterirken, su aktivitesi değerleri 0.181 ile 0.330 olarak bulunmuştur. *Bougainvillea glabra* bitki ekstraktlarının iyonik jelasyon ile enkapsüle edildiği bir diğer çalışmada ise ekstraktta ve enkapsüle örneklerde TFM sırasıyla 22.97 ve 18.24 mg GAE/gKM olarak tespit edilmiştir (Silva de Azevedo ve Zapata Noreña, 2021). Elde edilen sonuçlar literatür ile uyum göstermektedir.

### Model gıda denemesi

Zeytin yaprağı ekstraktı ve optimum koşullarda enkapsüle edilmiş ekstrakt model gıda olarak üretilen kefir içine ilave edilmiştir.

Oda sıcaklığında 2 gün boyunca inkübasyona bırakılan kefir, mikrobiyolojik olarak incelenmiş olup laktik asit bakteri sayım sonuçları log kob/g cinsinden Çizelge 6'de verilmiştir. Kefirin tanımlayıcı istatistikleri göz önüne alındığında, laktik asit bakteri sayısı 8.4-8.5 log kob/g

aralığında değişim göstermiştir. Örnekler arasında laktik asit bakteri sayımı açısından istatistiksel fark gözlenmemiştir ( $P < 0.05$ ). Buna göre, kefir içinde kullanılan zeytin yaprağı ekstraktı ve

mikrokapsüllerin laktik asit bakterilerine karşı herhangi inhibe edici etkisinin olmadığı saptanmıştır.

Çizelge 5. Optimum noktada elde edilen mikrokapsüllerin analiz sonuçları

Table 5. Analysis results of microcapsules obtained at the optimum point

Nem İçeriği ( <i>Moisture Content</i> ) (%)	12.41±1.76
TFM (mg GAE/gKM)	12.51±0.20
Antioksidan Kapasite ( <i>Antioxidant Capacity</i> ) (mg TE/gKM)	41.76±0.45
C Vitamini ( <i>C vitamin</i> ) (mg AA /gKM)	7.44±0.22
Enkapsülasyon Verimi ( <i>Encapsulation Efficiency</i> ) (%)	82.71±0.90
Su Aktivitesi ( <i>Water Activity</i> ) ( $a_w$ )	0.45±0.06
Çözünürlük ( <i>Solubility</i> ) (%)	70.88±3.74

GAE Gallik asit eşdeğeri, TE Troloks eşdeğeri, AA askorbik asit. Veriler kuru baz olarak ve ortalama değer ± SD ( $n=2$ ) olarak ifade edildi. *GAE Gallic acid equivalent, TE Trolox equivalent, AA ascorbic acid. Data were expressed as dry basis and mean value ± SD (n=2).*

Çizelge 6. Kefir için LAB (laktik asit bakteri) sayım sonuçları

Table 6. LAB (*lactic acid bacteria*) counts for kefir

Örnek Grubu ( <i>Sample Group</i> )	Laktik Asit Bakterileri ( <i>Lactic Acid Bacteria</i> ) (log kob/g)
Kontrol ( <i>Control</i> )	8.51±0.13 <sup>a</sup>
Mikrokapsül eklenmiş ( <i>Microcapsule added</i> )	8.50±0.13 <sup>a</sup>
Ekstrakt eklenmiş ( <i>Extract added</i> )	8.50±0.12 <sup>a</sup>

Veriler ortalama değer ± SD ( $n=2$ ) olarak ifade edildi. Aynı sütundaki farklı üst simge küçük harf,  $P < 0.05$ 'te önemli farklılıklar göstermektedir. *Data were expressed as mean value ± SD (n=2). Different superscript lowercase in the same column indicated significant differences at  $P < 0.05$ .*

Mikroenkapsülasyon işleminin amaçlarından biri acı/kötü tat ve aromanın ürünleri olumsuz etkilemesinin önüne geçmek/engellemektir. Çizelge 7'de kefire uygulanan duyuşal değerlendirme sonuçları verilmiştir. Renk, görünüş ve kıvam açısından enkapsüle edilmiş ve edilmemiş ekstrakt içeren kefir örneklerinin farklı olmadığı ( $P < 0.05$ ), ancak kontrol örneğinden daha düşük puan aldığı gözlemlenmiştir. Lezzet puanı açısından ham ekstrakt eklenmiş örnek en

düşük puanı alırken, kontrol grubu ile mikrokapsül eklenmiş örneğin daha yüksek puan aldığı gözlenmiştir. Tüm izlenim olarak değerlendirildiğinde en yüksek puan kontrol grubunda ve en düşük puan ham ekstrakt içeren örnekte saptanmıştır. Duyusal değerlendirme sonucunda zeytin yaprağı ekstraktının enkapsüle edilmesi ile acı tadının bastırıldığı, kontrol grubu kefir örneği ile lezzet farkının olmadığı sonucuna varılmıştır.

Çizelge 7. Model gıda kefir için duyuşal analiz sonuçları

Table 7. Sensory analysis results for kefir as model food

Örnek Grubu ( <i>Sample Group</i> )	Renk ( <i>Colour</i> )	Görünüş ( <i>Appearance</i> )	Kıvam ( <i>Consistency</i> )	Lezzet ( <i>Flavor</i> )	Tüm İzlenim ( <i>All Impression</i> )
Kontrol ( <i>Control</i> )	4.8±0.4 <sup>a</sup>	4.5±0.5 <sup>a</sup>	4.4±0.7 <sup>a</sup>	4.0±0.9 <sup>b</sup>	4.5±0.7 <sup>b</sup>
Mikrokapsül eklenmiş ( <i>Microcapsule added</i> )	3.7±0.6 <sup>a</sup>	4.1±0.8 <sup>a</sup>	4.0±0.8 <sup>a</sup>	3.4±0.7 <sup>b</sup>	3.6±0.7 <sup>ab</sup>
Ekstrakt eklenmiş ( <i>Extract added</i> )	4.1±0.7 <sup>a</sup>	4.2±0.7 <sup>a</sup>	4.0±0.6 <sup>a</sup>	1.5±0.5 <sup>a</sup>	2.4±0.7 <sup>a</sup>

Veriler ortalama değer ± SD ( $n=2$ ) olarak ifade edildi. Aynı sütundaki farklı üst simge küçük harf,  $P < 0.05$ 'te önemli farklılıklar göstermektedir. *Data were expressed as mean value ± SD (n=2). Different superscript lowercase in the same column indicated significant differences at  $P < 0.05$ .*

## SONUÇ

Bu çalışmada, yan ürün/atık zeytin yaprağından maksimum fenolik madde ve antioksidan madde içeren zeytin yaprağı ekstraktı, ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilmiş ve iyonik jelasyon yöntemi ile enkapsüle edilmiştir. Ultrasonik destekli ekstraksiyon işleminde optimum işlem koşulları, 5.31 dak süre, 39.27°C sıcaklık ve %40.51 genlik olarak bulgulanmıştır. İyonik jelasyon ile enkapsülasyon işleminde ise optimum enkapsülasyon koşulları; %1.04 ekstrakt konsantrasyonu, %0.5 kitosan konsantrasyonu ve 11.24 dak bekleme süresi olarak belirlenmiştir. Elde edilen enkapsüller fonksiyonel gıda üretiminde model gıda olarak seçilen kefire ilave edilmiş ve kefirin laktik asit bakteri sayısı ve duyuşal özellikleri üzerine etkisi incelenmiştir. Zeytin yaprağı ekstraktının acı tadının mikroenkapsülasyon işlemi ile giderildiği ve enkapsüle veya ham ekstrakt ilavesinin laktik asit bakterileri üzerine herhangi bir inhibe edici etkisi olmadığı bulgulanmıştır. Sonuç olarak yeşil ekstraksiyon yöntemi olan ultrasonik destekli ekstraksiyon ile antioksidan ve TFM açısından zengin ekstrakt elde edilmiş olup, iyonik jelasyon yöntemi ile ekstrakt biyoaktif bileşenlerini en iyi şekilde koruyabilecek şekilde enkapsüle edilmesi bu çalışmanın önemini arz etmektedir. Zeytin yaprağı ekstraktının ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemini de içerecek şekilde hibrit bir ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilmesi, enkapsülasyon aşamasında ekstraktın emülsiyon yapısı oluşturularak jelleşme çözeltisine damlatılması ve elde edilen kapsüllerin kefir üretiminde fermentasyon aşamasında eklenerek mikroorganizmanın çoğalması üzerine sinerjistik bir etkisi olup olmadığının incelenmesi bir sonraki çalışmamızın hedefi olarak planlanmaktadır.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarların makale ile ilgili herhangi bir kişi veya kurum ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

## YAZARLARIN KATKISI

Ezgi BİTİM, çalışmada gerçekleştirilen üretim ve analizlerde görev almıştır. Rabia AKÇAY-SALIK, Özgün KÖPRÜALAN-AYDIN, Özgül ALTAY ve Esin SELÇUK üretim, analizler, sonuçların yorumlanması ile makalenin yazımına katkı

sağlamıştır. Figen KAYMAK-ERTEKİN, çalışmanın planlanması ve yürütülmesi süreci ile sonuçların değerlendirilmesi ve makalenin yazımına katkıda bulunmuştur.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir (proje numarası FLP-2021-22560). Çalışmanın gerçekleştirilmesinde katkı sağlayan Melike ATALAY'a teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

Acar-Tek, N., Ağagündüz, D. (2020). Olive leaf (*Olea europaea* L. folium): potential effects on Glycemia and Lipidemia. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 76(1), 10-15.

Albero, B., Tadeo, J. L., Pérez, R. A. (2019). Ultrasound-assisted extraction of organic contaminants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 118, 739-750.

Alifakı, Y. Ö., Şakıyan, Ö., İşçi, A. (2018). Gilaburu (*Viburnum opulus* L.) meyvesinden fenolik bileşiklerin ultrason destekli ekstraksiyonu. *GIDA/The Journal of FOOD*, 43(5).

Altuğ, T., Elmacı, Y. (2005). Gıdalarda duyuşal değerlendirme, İzmir: Meta Basım.

AOAC (1990). Official Methods of Analysis AOAC INTERNATIONAL. 15th Edition, Washington DC, the USA.

Arı, M. (2022). Oleuropein ve Farmakolojik Etkileri. *Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 6(2), 369-382.

Arriola, N. D. A., Chater, P. I., Wilcox, M., Lucini, L., Rocchetti, G., Dalmina, M., Pearson, P. J., Amboni, R. D. D. M. C. (2019). Encapsulation of stevia rebaudiana Bertoni aqueous crude extracts by ionic gelation—Effects of alginate blends and gelling solutions on the polyphenolic profile. *Food chemistry*, 275, 123-134.

Arslan, E. E., Karademir, G., Berктаş, S., Çam, M. (2021). Zeytin yaprağı ekstraktı içeren soğuk çay üretimi. *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*, 9(3), 843-849.

- Aydın, Ö., Ünlüel, İ., (2021). Enkapsülasyon teknikleri ve kontrollü salım. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (32), 640-648.
- Bajpai, S. K., Tankhiwale, R. (2006). Investigation of dynamic release of vitamin B2 from calcium alginate/chitosan multilayered beads: Part II. *Reactive and Functional Polymers*, 66(12), 1565-1574.
- Bayram, M., Topuz, S., Kaya, C. (2020). Antioxidant, Antimicrobial Activity of Olive Leaf Extract and Oleuropein, Their Possibilities Usage in Foods. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 8(2), 337-347.
- Borjan, D., Leitgeb, M., Knez, Ž., Hrnčič, M. K. (2020). Microbiological and antioxidant activity of phenolic compounds in olive leaf extract. *Molecules*, 25(24), 5946.
- Chemat, F., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Strube, J., Uhlenbrock, L., Gunjevic, V., Cravotto, G. (2019). Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 118, 248-263.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics sonochemistry*, 34, 540-560.
- Cifá, D., Skrt, M., Pittia, P., Di Mattia, C., Poklar Ulrih, N. (2018). Enhanced yield of oleuropein from olive leaves using ultrasound-assisted extraction. *Food science & nutrition*, 6(4), 1128-1137.
- Çilek, B., Luca, A., Hasirci, V., Sahin, S., Sumnu, G. (2012). Microencapsulation of phenolic compounds extracted from sour cherry pomace: effect of formulation, ultrasonication time and core to coating ratio. *European Food Research and Technology*, 235(4), 587-596.
- Danahaliloğlu, H., Tekeli, Y., Göycüncik, S., Yıldırım, F. (2018). Hatay'da farklı bölgelerde yetiştirilen zeytin yapraklarının antioksidan özelliklerinin belirlenmesi. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 8(1), 77-86.
- de Moura, S. C., Schettini, G. N., Garcia, A. O., Gallina, D. A., Alvim, I. D., Hubinger, M. D. (2019). Stability of hibiscus extract encapsulated by ionic gelation incorporated in yogurt. *Food and Bioprocess Technology*, 12(9), 1500-1515.
- Deladino, L., Anbinder, P. S., Navarro, A. S., Martino, M. N. (2008). Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate polymers*, 71(1), 126-134.
- Dodero, A., Pianella, L., Vicini, S., Alloisio, M., Ottonelli, M., Castellano, M. (2019). İyonik jelasyon yoluyla hazırlanan aljinat bazlı hidrojeller: Çapraz bağlanma derecesini tahmin etmek için deneysel bir tasarım yaklaşımı. *Avrupa Polimer Dergisi*, 118, 586-594.
- Flórez-Fernández, N., Domínguez, H., Torres, M. D. (2019). A green approach for alginate extraction from *Sargassum muticum* brown seaweed using ultrasound-assisted technique. *International journal of biological macromolecules*, 124, 451-459.
- González-Ortega, R., Šturm, L., Skrt, M., Di Mattia, C. D., Pittia, P., Ulrih, N. P. (2021). Liposomal encapsulation of oleuropein and an olive leaf extract: Molecular interactions, antioxidant effects and applications in model food systems. *Food Biophysics*, 16(1), 84-97.
- Guler, B. A., Deniz, I., Demirel, Z., Yesil-Celiktas, O., Imamoglu, E. (2020). A novel subcritical fucoxanthin extraction with a biorefinery approach. *Biochemical Engineering Journal*, 153, 107403.
- Güngör, KK, Coşgun, G., Özdemir, M., Torun, M. (2022). Zerdeçalın su ile ekstraksiyonunda ultrases işleminin etkisi ve elde edilen ekstraktın püskürterek kurutma yöntemiyle enkapsülasyon koşullarının optimizasyonu. *Gıda*, 47 (1), 107-120.
- Gür, F, Ağgül, A. G., Gülaboğlu, M. (2020). Su ile hazırlanan zeytin yaprağı özütünün ratlarda streptozotosin kaynaklı oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu üzerine etkileri. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 10(4), 2406-2415.
- Gürbüz, M., Ögüt, S. (2018). Zeytin yaprağının potansiyel sağlık yararları. *Türkiye Klinikleri Sağlık Bilimleri Dergisi*, 3(3), 242-253.

- Hışıl, Y. (2007). Enstrümental gıda analizleri laboratuvar deneyleri, Ege Üniversitesi, Yayın No: 45, İzmir.
- Irakli, M., Chatzopoulou, P., Ekateriniadou, L. (2018). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds: Oleuropein, phenolic acids, phenolic alcohols and flavonoids from olive leaves and evaluation of its antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, 124, 382-388.
- ISO (1998), ISO 15214:1998 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria.--Colony-count technique at 30 degrees C, <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:15214:ed-1:v1:en> (Erişim Tarihi: 4 Aralık 2020).
- Jasicka-Misiak, I., Poliwoda, A., Petecka, M., Buslovych, O., Shlyapnikov, V. A., Wiczorek, P. P. (2018). Antioxidant phenolic compounds in *Salvia officinalis* L. and *Salvia sclarea* L. *Ecological Chemistry and Engineering*, 25(1), 133.
- Kaya, S., Demir, N. (2020). Zeytin (*Olea europaea*) yaprağı ekstraktının model organizma *Galleria mellonella* hemosit aracılı bağışıklık tepkileri üzerine etkileri. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 7(3), 646-653.
- Kılıç, S. (2020). Kazdağları bölgesine ait zeytin, zeytin yaprağı ve zeytinyağlarının element tayini ve metot validasyonu. *Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences*, 3(1), 48-54.
- Kumar, K., Srivastav, S., Sharanagat, V. S. (2021). Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105325.
- Lama-Muñoz, A., del Mar Contreras, M., Espínola, F., Moya, M., de Torres, A., Romero, I., Castro, E. (2019). Extraction of oleuropein and luteolin-7-O-glucoside from olive leaves: Optimization of technique and operating conditions. *Food chemistry*, 293, 161-168.
- Markhali, F.S., Teixeira, J.A., Rocha, C.M.R. (2020). Olive tree leaves-a source of valuable active compounds. *Processes*, 8: 1177, 1-18. doi:10.3390/pr8091177.
- Medina, E., Romero, C., García, P., Brenes, M. (2019). Characterization of bioactive compounds in commercial olive leaf extracts, and olive leaves and their infusions. *Food & function*, 10(8), 4716-4724.
- Najafi-Soulari, S., Shekarchizadeh, H., Kadivar, M. (2016). Encapsulation optimization of lemon balm antioxidants in calcium alginate hydrogels. *Journal of Biomaterials science, Polymer edition*, 27(16), 1631-1644.
- Poyraz, Ç., Küçükıldız, G., Kırbaşlar, Ş. İ., Çigeroğlu, Z., Şahin, S. (2021). Valorization of Citrus unshiu biowastes to value-added products: an optimization of ultrasound-assisted extraction method using response surface methodology and particle swarm optimization. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-11.
- Prommuak, C., De-Eknamkul, W., Shotipruk, A. (2008). Extraction of flavonoids and carotenoids from Thai silk waste and antioxidant activity of extracts. *Separation and Purification Technology*, 62(2), 444-448.
- Salık, M. A., Çakmakçı, S. (2021). Zeytin (*Olea Europaea* L.) yaprağının fonksiyonel özellikleri ve gıdalarda kullanım potansiyeli. *Gıda*, 46(6), 1481-1493.
- Santagapita, P. R., Mazzobre, M. F., Buera, M. P. (2011). Formulation and drying of alginate beads for controlled release and stabilization of invertase. *Biomacromolecules*, 12(9), 3147-3155.
- Silva de Azevedo, E., Zapata Noreña, CP. (2021). External ionic gelation as a tool for the encapsulation and stability of betacyanins from *Bougainvillea glabra* bracts extract in a food model. *J Food Process Preserv.*, 45:e15637.
- Şahin, S. (2019). Farklı İllerden Temin Edilen Fındık Zarının Bileşimi ve Antioksidan Etkinliğinin Araştırılması. *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 9(1), 27-35.
- Şahin, S., Şamlı, R. (2013). Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 595-602.

- Şahin, S., Elhussein, E., Bilgin, M., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Roohinejad, S. (2018). Effect of drying method on oleuropein, total phenolic content, flavonoid content, and antioxidant activity of olive (*Olea europaea*) leaf. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(5), e13604.
- Şahin, S., İlbay, Z., Kırbaşlar, Ş. İ. (2015). Study on optimum extraction conditions for olive leaf extracts rich in polyphenol and flavonoid. *Separation Science and Technology*, 50(8), 1181-1189.
- Tarchoune, I., Sgherri, C., Eddouzi, J., Zinnai, A., Quartacci, M. F., Zarrouk, M. (2019). Olive leaf addition increases olive oil nutraceutical properties. *Molecules*, 24(3), 545.
- Tavakoli, H., Hosseini, O., Jafari, S. M., Katouzian, I. (2018). Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of yogurt enriched by olive leaf phenolics within nanoliposomes. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 66(35), 9231-9240.
- Temur, A., Temiz, M. A. (2018). Zeytin yaprağının (*Olea europaea* L.) diyabetik sıçanlarda bazı biyokimyasal ve hematolojik parametreler üzerine etkisi. *Alinteri Journal Of Agriculture Science*, 33(1), 13-19.
- Türker, İ., Koç, B., İşleroglu, H. (2018). Püskürtmeli-dondurarak kurutma işleminin maltodekstrinin fiziksel özellikleri üzerine etkisi. *GIDA/The Journal of FOOD*, 43(2).
- Tzatsi, P., Goula, A. M. (2021). Encapsulation of extract from unused chokeberries by spray drying, co-crystallization, and ionic gelation. *Waste and Biomass Valorization*, 12(8), 4567-4585.
- Ünver, N., Çelik, Ş. (2022). Optimization of ultrasound-assisted extraction of olive leaf (var. halhah) extracts. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 50(2), 173-184.
- Vural, N., Cavuldak, Ö. A., Akay, M. A. (2021). D-Optimal design and multi-objective optimization for green extraction conditions developed with ultrasonic probe for oleuropein. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 20, 100279.
- Xie, P. J., Huang, L. X., Zhang, C. H., You, F., Zhang, Y. L. (2015). Reduced pressure extraction of oleuropein from olive leaves (*Olea europaea* L.) with ultrasound assistance. *Food and Bioproducts processing*, 93, 29-38.
- Yin, M., Jiang, N., Guo, L., Ni, Z., Al-Brakati, A. Y., Othman, M. S., Kassab, R. B. (2019). Oleuropein suppresses oxidative, inflammatory, and apoptotic responses following glycerol induced acute kidney injury in rats. *Life sciences*, 232, 116634.
- Wissam, Z., Samer, H. (2019). Encapsulation of flaxseed oil extract in alginate-salep system by ionic gelation. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55.



## **D-OPTIMAL MIXTURE DESIGN APPROACH IN THE PRODUCTION OF COOKIES ENRICHED WITH DIETARY FIBER SOURCES SUCH AS LENTIL FLOUR, BANANA FRUIT AND BANANA PEEL POWDER**

**Semanur Yıldız\*, Eylem Karakuş, Serpil Öztürk Muti**

Sakarya University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Sakarya, Türkiye

Received /Geliş: 09.10.2022; Accepted /Kabul 30.12.2022; Published online/Online baskı 18.01.2023

*Yıldız, S., Karakuş, E., Öztürk-Muti, S. (2023). D-optimal mixture design approach in the production of cookies enriched with dietary fiber sources such as lentil flour, banana fruit and banana peel powder. GIDA (2023) 48 (1) 94-106 doi: 10.15237/gida.GD22096*

Yıldız, S., Karakuş, E., Öztürk-Muti, S. (2023). Mercimek unu, muz meyve ve muz kabuk tozu gibi diyet lifi kaynakları ile zenginleştirilen bisküvi üretiminde D-optimal karışım tasarımı yaklaşımı. GIDA (2023) 48 (1) 94-106 doi: 10.15237/gida.GD22096

### **ABSTRACT**

This study aimed to develop fiber-enriched cookies by partially replacing wheat flour (WF) with alternative fiber sources including yellow lentil flour (YLF), green lentil flour (GLF), banana powder (BP), and banana peel powder (BPP). The ratios of YLF, GLF, and WF were identified as 24.5, 10.7, and 64.8 % (flour basis), respectively, considering the mixture experimental design for an optimal breaking strength of cookies. Four types of cookies were studied: (i) wheat-based cookies (WC), (ii) lentil flour, BP and BPP-incorporated cookies (LBC), (iii) BP and BPP-incorporated cookies (BC), (iv) lentil flour-incorporated cookie (LC). LC showed a higher spread ratio and lightness than LBC and BC. Although alternative ingredients enhanced dietary fiber content compared to wheat-only cookies, the liking degree of sensory attributes was lower in LBC and BC. Overall, LC was superior to LBC and BC samples, indicating possible use of lentil flours for partial replacement of wheat flour for desired physical, chemical, and sensory attributes.

**Keywords:** D-optimal mixture design, cookie, lentil flour, dietary fiber, optimization, banana, texture

## **MERCİMEK UNU, MUZ MEYVE VE MUZ KABUK TOZU GİBİ DİYET LİFİ KAYNAKLARI İLE ZENGİNLEŞTİRİLEN BİSKÜVİ ÜRETİMİNDE D-OPTİMAL KARIŞIM TASARIMI YAKLAŞIMI**

### **ÖZ**

Bu çalışma, sarı mercimek unu (YLF), yeşil mercimek unu (GLF), muz tozu (BP) ve muz kabuğu tozu (BPP) gibi alternatif lif kaynakları kullanarak buğday unu (WF) miktarı kısmen azaltılmış ve diyet lif içeriği açısından zenginleştirilmiş bisküvi geliştirmeyi hedeflemektedir. YLF, GLF ve WF'nin un bazındaki oranları karışım deney tasarımı çerçevesinde sırasıyla %24,5, %10,7, 64,8 olarak belirlenmiştir. Dört çeşit bisküvinin kalite özellikleri üzerinde çalışılmıştır: (i) buğday unu bazlı bisküvi (WC), (ii) mercimek unu, muz meyve ve kabuk tozu katkılı bisküvi (LBC), (iii) muz meyve ve kabuk tozu katkılı bisküvi (BC), (iv) mercimek unu katkılı bisküvi (LC). LC numuneleri, LBC ve

\*Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar

✉: semanury@sakarya.edu.tr

☎: (+90) 264 295 5853

☎: (+90) 264 295 5601

Semanur Yıldız; ORCID no: 0000-0002-1845-7813

Eylem Karakuş; ORCID no: 0000-0002-6441-3483

Serpil Öztürk Muti; ORCID no: 0000-0002-3493-1212

BC'den daha yüksek yayılma oranı ve açık renk özellikleri göstermiştir. Alternatif lif kaynakları, yalnızca buğday unu içeren ürüne kıyasla diyet lifi içeriğini arttırsa da LBC ve BC numunelerinin duyuşal özelliklerinin beğeni derecesi daha düşük kalmıştır. Genel olarak, mercimek unu katkılı bisküvi (LC), LBC ve BC örneklerinden daha üstün nitelikler göstermiş olup istenen fiziksel, kimyasal ve duyuşal özelliklerdeki bisküvi üretimini sağlamak için baklagil unu kullanımıyla buğday ununun kısmi olarak azaltılmasının mümkün olabileceğine işaret etmektedir.

**Anahtar kelimeler:** D-optimal deneysel tasarım, bisküvi, mercimek unu, diyet lifi, optimizasyon, muz, tekstür

### INTRODUCTION

The food industry needs to make advancements in ingredients and formulations due to the growing consumer demand for functional foods that provide advantages in addition to basic nutrition (Falguera et al., 2012). Cookie-type biscuits are suitable products for designing alternative formulations for diversified nutrition due to their consumption worldwide, extended shelf life, and appealing characteristics.

Legume flours have been gaining attention to enrich cakes and cookies because of their nutritional composition and positive health effects (Bravo-Núñez and Gómez, 2021). Lentils are considered one of the alternative ingredients to enhance cookie formulations or substitute wheat flour since they are good sources of protein, fiber, iron, vitamin B, and phenolic compounds (Sen Gupta et al., 2013; Hall et al., 2017). Valorization of agricultural and industrial wastes and by-products is also a critical approach for developing value-added food products considering sustainable processing and production strategies. Currently, wastes and by-products of fruit and vegetables are highly recognized as a source of bioactive compounds, dietary fiber, polysaccharides, and proteins (Narayanan et al., 2017). Fruit peels can be utilized as an ingredient in cookie formulations since they can provide dietary fiber and bioactive compounds for the final product. Consumption of dietary fiber is associated with several health benefits, including lowering the risk of diabetes, cancer, and intestinal diseases and promoting healthy gut microflora (Weickert and Pfeiffer, 2008; He et al., 2022).

Banana is one of the most popular fruits worldwide. Banana peel contributes about 40% of the total weight of fruit (Anhwange et al., 2009).

Banana fruit and banana peel are well known for their content of nutrients and dietary fiber (Sidhu and Zafar, 2018); therefore, they could be a good source to produce fiber-enriched cookies. Different dietary fiber sources have been included in the cookie formulation including cereals (Sudha et al., 2007), mango peel (Ajila et al., 2008), pumpkin and carrot pomace (Turksoy and Özkaya, 2011), pomegranate peel (Colantuono et al., 2016), raspberry and blueberry pomace (Šarić et al., 2019). Lentil flours are also suggested as a promising ingredient for the enhancement of nutritional and sensory quality of bakery products including gluten-free cookies (Hajas et al., 2022).

The incorporation of dietary fiber sources into biscuit-type cookie production system to replace wheat flour leads to changes in the rheological properties of dough as well as the physicochemical, textural, and sensory characteristics of the product (Sudha et al., 2007). Since development of new foods is directly associated with consumer approval, proper optimization actions should be considered for desired color, texture, sensory, and nutritional properties. Experimental design is important in food science because it provides crucial knowledge on the effect of ingredients and processing parameters on the quality of final products that satisfy consumers' demands. Use of the experimental design is a systematic approach to optimizing new food formulations with minimum effort, time, and resources (Montgomery, 2001). Mixture design is one of the effective data collection methods to identify optimal formulation of a specific mixture (Ellouze-Ghorbel et al., 2010).

This study aims to evaluate the possibility of using different dietary fiber sources in developing a cookie-type biscuit formulation to partially

replace wheat flour with lentil flour (green and yellow), banana fruit powder, and banana peel powder. Fiber-enriched cookie formulation was developed considering mixture design methodology. The optimized cookies were compared with the standard wheat-based cookie in terms of physicochemical, textural, and sensory properties. This study contributes to product development strategies using alternative dietary fiber sources including agricultural and industrial food by-products and waste.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Commercial yellow lentil flour (YLF) and green lentil flour (GLF) were purchased from Tito (İzmir, Turkey). All-purpose shortening (Marsa, Adana, Turkey), high fructose corn syrup (42% HFCS), fine-granulated sucrose, brown-granulated sugar, skimmed milk powder, salt (NaCl), and wheat flour (13% moisture basis) were used in this study. Bananas were purchased from a local market in Sakarya at their commercial maturity. Banana fruit and banana peel were separated, sliced into pieces, and freeze-dried by using a lyophilizer (Labconco freezezone 6.0., U.K.) at 0.045 mbar for 48 hours. Dried banana fruit and banana peel pieces were ground using a Waring blender, and the banana fruit powder (BP) and banana peel powder (BPP) were then used in the cookie formulation.

### Preparation of cookies

Cookies were prepared according to the approved method 10-54.01 (AACC, 2000) with slight modifications. Formulation of a standard cookie using 100 % wheat flour (WF) is given in Table 1. BP and BPP were tested at 5 and 10 % levels (on flour basis) by examining the taste and odor of the cookies (data not shown). The proportions of the BP and BPP were then set at 5 % considering the sensory characteristics of the final product. Wheat flour was partially replaced with yellow and green lentil flours based on an experimental mixture design.

Fine-granulated sucrose, brown-granulated sugar, skimmed milk powder, salt, and all-purpose shortening were mixed using a dough mixer

(KitchenAid, USA) to get a uniform creamed mixture, followed by the addition of 42% HFCS and water. After the addition of flours and powders, the mixture was kneaded to obtain a uniform dough. Then the dough was rolled to 7 mm thick and shaped with a circular cookie cutter with a 6.5 cm diameter. Baking was performed at 205°C for 11 min in a rotary oven (Simsek Labor teknik, Ankara Turkey).

Table 1. Standard cookie formulation

Ingredients	Weight (g)
All-purpose shortening	32
Fine-granulated sucrose	25.6
Brown-granulated sugar	8
Salt	0.5
Nonfat dry milk powder	0.8
High fructose corn syrup (42% HFCS)	1.2
Water	17.5
Sodium bicarbonate	1
Wheat flour*	40

\*13% moisture basis.

### Experimental mixture design

D-optimal experimental design was used to formulate the 3-component mixture system on flour basis. A mixture design was constructed using the Design Expert (version 7.0.0, Stat-Ease, USA) software to analyze the effect of varying proportions of YLF ( $x_1$ ), GLF ( $x_2$ ), and WF ( $x_3$ ) on the breaking strength of cookies. The relationship between the component composition and cookie textural properties (i.e., breaking strength) was evaluated by performing 18 experiments. Linear, quadratic, and special cubic mathematical equations were developed in which  $x_i$  represents the fractional constrained proportion of  $i^{\text{th}}$  ingredient,  $0 \leq x_i \leq 1$ ,  $i=1, 2, \dots, q$ .

$$\text{Linear } Y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3$$

$$\text{Quadratic } Y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3$$

$$\text{Special cubic } Y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{123} x_1 x_2 x_3$$

where  $Y$  represents the dependent variable (i.e., breaking strength).  $\beta_i$  refers to the linear and cross constituent coefficients in the models. The sum of components ( $\sum_{i=1}^3 x_i = x_1 + x_2 + x_3$ ) is equal to 1 or equivalent to 100% in the mixture design. The upper limit for YLF and GLF was set at 44 % while the proportion of wheat flour varied between 56% and 100 %. Triangular contour plots and 3-D surface graphs were constructed based on the selected regression model.

### Physicochemical properties

#### *Weight, diameter, thickness, and spread ratio*

Weight, diameter, and thickness were measured after cooling the cookies for 24 h. Six measurements were conducted using three different cookies. The spread ratio of each cookie was calculated by dividing the average diameter by the average thickness.

#### *Color*

Instrumental color measurement was conducted using a portable colorimeter PCE-CSM 7 (Alicante, Spain). The surface color of each cookie was expressed in the CIELab coordinate system. Nine measurements were performed to estimate lightness ( $L^*$ ), redness-greenness ( $a^*$ ), and yellowness-blueness ( $b^*$ ) of cookies. The instrument was standardized by black and white calibration before analysis.

#### *Moisture, ash, and total dietary fiber content*

The moisture content (%) of flours, powders and cookies was measured using a moisture analyzer with infrared heating (AND MX-50) at 105 °C. Ash content was determined based on AOAC Official Method 923.03 (AOAC, 2000). The total dietary fiber contents of flours, powders and cookies were determined using the enzymatic-gravimetric method according to the approved method 32-07 (AACC, 2000).

#### *Texture*

Textural properties of cookies were identified according to the procedure of Tyagi et al. (2007) with some modifications. Stable Micro Systems TA.TX2 texture analyzer (Surrey, UK) was used to determine the breaking strength and hardness of the cookies. The breaking strength values of

cookies were measured in triplicate by using HDP/BS blade set probe at a pre-test speed of 2 mm/s, test speed of 3 mm/s, post-test speed of 10 mm/s, and a distance of 5 mm. The maximum force (N) required to break the cookie samples was recorded as breaking strength. Regarding hardness, HDP/90 blade set and P/2 probe were used at pre-test speed of 2 mm/s, test speed of 0.5 mm/s, post-test speed of 10 mm/s, and a distance of 5 mm. The first peak force was recorded as hardness and all measurements were repeated four times for each cookie type.

### Sensory analysis

The sensorial properties of cookies were examined by 25 semi-trained panelists who were familiar with the quality aspects of baked products and randomly selected from students and staff of the Food Engineering Department (Sakarya University, Turkey). The cookie samples were assigned three-digit codes and served to panelists on white plates. The samples were evaluated in terms of appearance, color, odor, hardness, fracturability, taste, mouth feel, after-taste, and overall acceptability on a 9-point hedonic scale (1= disliked extremely, 9= extremely liked).

### Statistical analysis

Data analysis was conducted using Microsoft Excel (2016) and Minitab 16 (Minitab Inc. State College, PA). The significance of the differences was determined based on an analysis of variance using the Tukey test at a 95% confidence interval ( $p < 0.05$ ).

## RESULTS and DISCUSSION

### Optimization of the flour mixture components

The addition of YLF and GLF to partially replace the WF in the cookie formulation was evaluated using contour and 3-D response surface graphs obtained from the mixture experimental design (Figure 1). Based on the preliminary experiments, lower and upper limits on the proportions (w/w) of the mixture components were selected as follows:

$$0.00 \leq x_1, x_2 \leq 0.44$$

$$0.56 \leq x_3 \leq 1$$

where  $x_1$ ,  $x_2$ , and  $x_3$  correspond to YLF, GLF, and WF, respectively.

The 18-run mixture experiment design generated by Design Expert (7.0) is shown in Table 2, representing the change in the breaking strength

of cookies as affected by the proportions of YLF, GLF, and WF. Breaking strength of cookie decreased as the proportion of lentil flours was increased (Figure 1).

Table 2. D-optimal experimental design to optimize flour proportions based on breaking strength of cookies

Run	Proportion of flour (%)			Breaking strength (N)
	Yellow lentil	Green lentil	Wheat	
R1	26.3	17.7	56	17.03
R2	22	0	78	20.57
R3	0	35	65	25.25
R4	44	0	56	24.04
R5	7.2	7.4	85.4	25.59
R6	14.7	14.7	70.7	26.66
R7	10.2	27.8	62	19.04
R8	0	44	56	22.34
R9	0	22	78	24.85
R10	14.7	14.7	70.7	19.94
R11	0	44	56	21.18
R12	22	0	78	25.97
R13	44	0	56	23.84
R14	14.7	14.7	70.7	25.61
R15	16.6	13.9	69.5	26.91
R16	8	21.4	70.6	26.29
R17	0	0	100	29.38
R18	0	0	100	32.36

Linear, quadratic, and special cubic models were developed in terms of actual components as follows:

$$\text{Linear } Y = 11.16x_1 + 10.50x_2 + 29.76x_3$$

$$\begin{aligned} \text{Quadratic } Y = & 43.27x_1 - 11.53x_2 + 30.28x_3 \\ & - 74.76x_1x_2 - 50.33x_1x_3 \\ & + 39.10x_2x_3 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Special cubic } Y = & 63.93x_1 + 17.63x_2 + 30.52x_3 \\ & - 908.38x_1x_2 - 85.79x_1x_3 \\ & - 11.46x_2x_3 + 1365.46x_1x_2x_3 \end{aligned}$$

The coefficients of determination were 0.4887, 0.6077, and 0.7145 for linear, quadratic, and special cubic models, respectively. Variance analysis of the experimental design is given in Table 3 based on the special cubic model that is selected due to its higher  $R^2$  value. The model was found significant ( $p < 0.05$ ) with an insignificant lack of fit ( $p = 0.7012$ ). Linear terms and the

interaction of YLF ( $x_1$ ) and GLF ( $x_2$ ) were significant ( $p < 0.05$ ) in the model. The mixture that allowed reduction of wheat flour proportion and resulted in optimal breaking strength was identified for the final formulation on the flour basis. In this respect, 24.5 %, 10.7 %, and 64.8 % were selected for the addition of YLF, GLF, and WF to obtain lentil-based cookies (LC), respectively.

The optimized levels of flours were used with banana fruit and banana peel powders to obtain lentil- banana-based cookies. The proportions of wheat and lentil flours were selected based on the D-optimal mixture design, while banana fruit and banana peel powder were limited to 5% each on flour basis considering preliminary tests and sensorial evaluation (data not shown). Selected proportions of flours and powders are given in Table 4. WC refers to the control cookie

developed using 100 % wheat flour as described in the standard cookie formulation. Lentil and banana-based cookies (LBC) comprised of the optimized lentil flour proportions (24.5 % YLF, 10.7 % GLF), 54.8 % wheat flour, 5 % banana fruit powder (BP), and 5% banana peel powder (BPP) to evaluate the incorporation of both lentil

flours and banana powders. In order to differentiate the effects of BP and BPP, banana fruit and banana peel powder incorporated cookies (BC) were developed using 90 % WF, 5% BP, and 5% BPP.

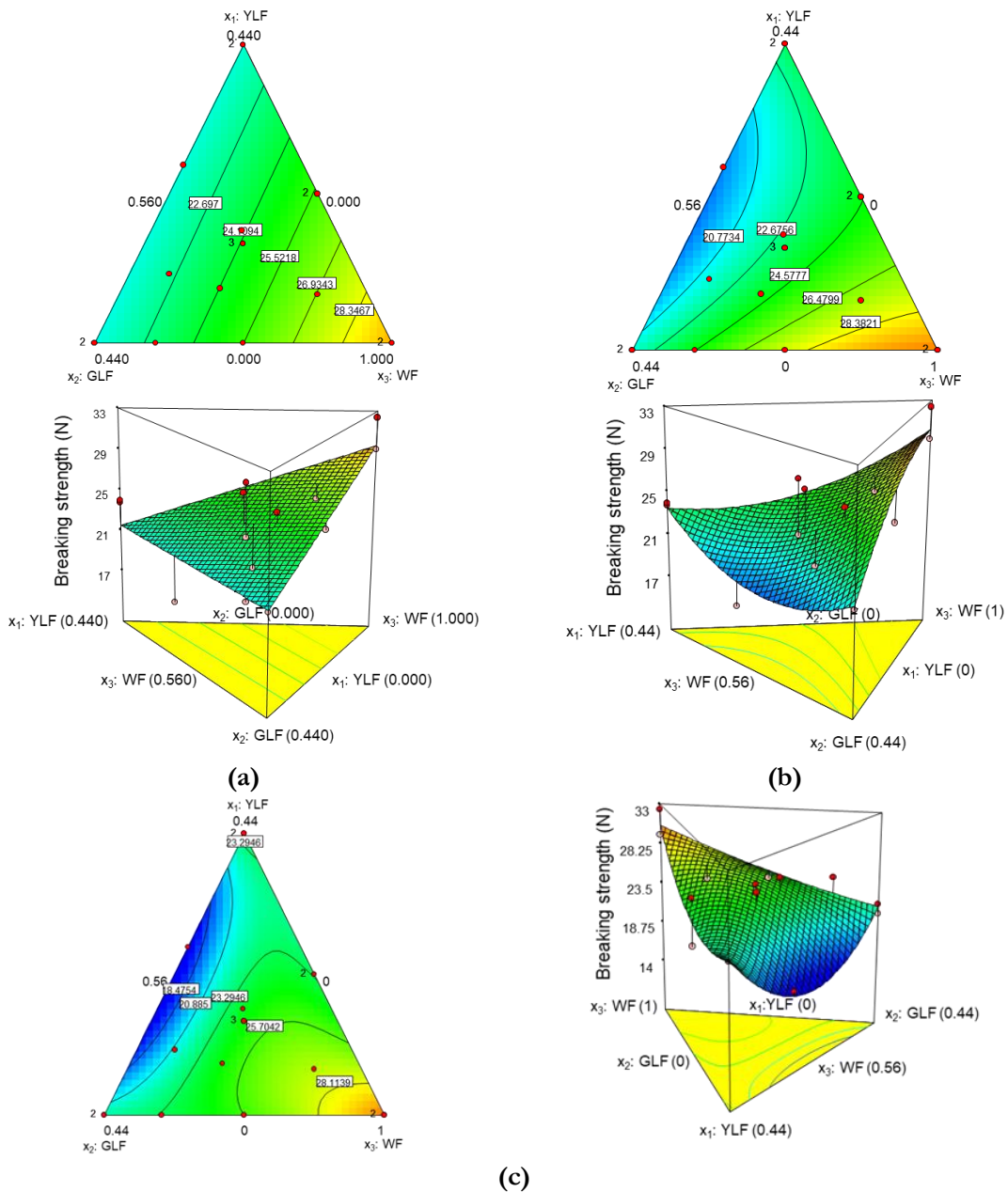


Figure 1. Contour and 3-D response surface graphs for linear (a), quadratic (b), and special cubic (c) models of breaking strength of cookies as affected by the proportion of lentil and wheat flours. YLF, GLF, and WF refer to yellow lentil flour, green lentil flour, and wheat flour, respectively.

Table 3. Variance analysis of D-optimal experimental design considering a special cubic model

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	172.87	6	28.81	4.59	0.0142	significant
Linear Mixture	118.23	2	59.11	9.42	0.0041	
x <sub>1</sub> x <sub>2</sub>	38.93	1	38.93	6.20	0.0300	
x <sub>1</sub> x <sub>3</sub>	23.14	1	23.14	3.69	0.0812	
x <sub>2</sub> x <sub>3</sub>	0.31	1	0.31	0.049	0.8284	
x <sub>1</sub> x <sub>2</sub> x <sub>3</sub>	25.84	1	25.84	4.12	0.0674	
Residual	69.06	11	6.28			
Lack of Fit	23.15	5	4.63	0.60	0.7012	not significant
Pure Error	45.9158	6	7.65			
Cor Total	241.925	17				

Table 4. Selected proportions of lentil flour, banana fruit, and banana peel powder

Sample	Proportion of flour and powders (%)				
	YLF	GLF	WF	BP	BPP
WC (control)	0	0	100	0	0
LBC	24.5	10.7	54.8	5	5
BC	0	0	90	5	5
LC	24.5	10.7	64.8	0	0

YLF: yellow lentil flour, GLF: green lentil flour, WF: wheat flour, BP: banana powder, BPP: banana peel powder. Control refers to wheat-only cookies (WC). LBC: lentil flour, banana fruit and banana peel powder incorporated cookies, BC: banana fruit and peel powder incorporated cookies, LC: lentil flour incorporated cookies.

### Physicochemical properties of cookies

#### *Weight, diameter, thickness, and spread ratio*

The cookies prepared using the selected flour and powder proportions are shown in Figure 2. The cookie quality in terms of weight, diameter, thickness, and spread ratio is presented in Table 5. The weights of the cookies were in the range of 24.32 – 25.90 g. The diameter and thickness of cookies were in the range of 7.12 – 7.96 cm and 0.91 – 0.98 cm, respectively. Therefore, the spread ratio varied between 7.31 – 8.79, representing the ratio of the diameter and thickness of cookies. Yellow and green lentil flour incorporated cookies (LC) resulted in a higher cookie diameter and spread ratio compared to control (WC) and the banana fruit and banana peel powder incorporated cookies (LBC and BC). LBC sample had diameter, thickness and spread ratio values similar to WC sample. Similarly, Portman et al. (2019) demonstrated that cookies prepared with wheat and lentil flour blends showed flatter and wider geometry with significant increases in cookie diameter and surface area compared to the cookies prepared from 100% wheat flour. This

finding was also in accordance with the study of Hajas et al. (2022).

#### *Color attributes*

The color properties of WC, LBC, BC, and LC samples are represented in Table 5 in terms of L\*, a\*, b\* values. Lightness values were in the range of 56.99 – 72.63 which was significantly reduced by the addition of BP and BPP compared to wheat flour (WC) and lentil-incorporated (LC) cookies. This finding is attributed to the enzymatic browning reactions during cookie production in addition to the non-enzymatic browning during baking. Polyphenol oxidase is likely to be present in banana peel as a quality-degrading enzyme that could further cause a certain degree of enzymatic browning (Thipayarat, 2007). Maillard reaction, on the other hand, results in darker products because of the formation of melanoidin in the formulations with high protein and sugar content (Zucco et al., 2011). a\* values varied between 8.65 – 11.92, indicating significant increases in redness of the cookies as the wheat flour was partially replaced

with GLF, YLF, BP, and BPP. Redness was significantly increased with the incorporation of BP and BPP. On the other hand,  $b^*$  values were significantly increased from 25.75 to 31.98 as the

proportion of lentil flours increased due to the green and yellow colors originating from the lentils.

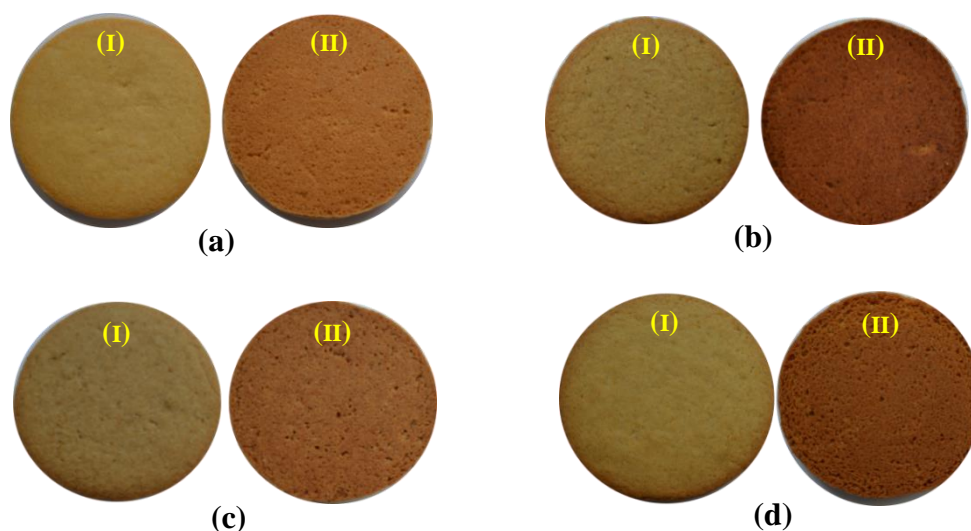


Figure 2. Picture of cookies formulated using lentil flours, banana fruit and peel powder

(I) and (II) represent the front and bottom side of the cookies, respectively. a) Control: standard cookie formulation with 100% wheat flour (WC). b) Lentil flour, banana fruit and banana peel powder incorporated cookie (LBC): 24.5 % of yellow lentil flour, 10.7% of green lentil flour, 54.8 % of wheat flour, 5% of banana fruit powder, 5% of banana peel powder. c) banana fruit and banana peel powder incorporated cookie (BC): 90 % of wheat flour, 5 % of banana fruit powder, 5% of banana peel powder. d) Lentil flour incorporated cookie (LC): 24.5 % of yellow lentil flour, 10.7% of green lentil flour, 64.8 % of wheat flour.

Table 5. Physical characteristics of cookies

Sample	Diameter (cm)	Thickness (cm)	Spread ratio	Weight (g)	Color		
					L*	a*	b*
WC (Control)	7.51±0.09 <sup>b</sup>	0.93±0.04 <sup>b</sup>	8.11±0.34 <sup>b</sup>	25.90±1.54 <sup>a</sup>	72.63±0.40 <sup>a</sup>	8.65±0.17 <sup>c</sup>	25.75±0.24 <sup>c</sup>
LBC	7.50±0.13 <sup>b</sup>	0.94±0.04 <sup>ab</sup>	8.03±0.43 <sup>b</sup>	24.86±0.64 <sup>a</sup>	57.41±0.44 <sup>c</sup>	11.92±0.26 <sup>a</sup>	30.27±0.20 <sup>b</sup>
BC	7.12±0.09 <sup>c</sup>	0.98±0.04 <sup>a</sup>	7.31±0.36 <sup>c</sup>	25.86±0.85 <sup>a</sup>	56.99±1.10 <sup>c</sup>	11.30±0.67 <sup>ab</sup>	25.36±0.261 <sup>c</sup>
LC	7.96±0.09 <sup>a</sup>	0.91±0.04 <sup>b</sup>	8.79±0.51 <sup>a</sup>	24.32±1.01 <sup>a</sup>	68.24±2.04 <sup>b</sup>	9.84±1.77 <sup>bc</sup>	31.98±0.59 <sup>a</sup>

Different letters in the same column indicate significant differences among cookies ( $p < 0.05$ ). Control refers to wheat-only cookies (WC). LBC: lentil flour, banana fruit and peel powder incorporated cookies, BC: banana fruit and peel powder incorporated cookies, LC: lentil flour incorporated cookies

#### Moisture, ash, and total dietary fiber content

Moisture and total dietary fiber contents of flours and powders are given in Table 6. The moisture was in the range of 9.87 – 12.65 % for flours while BP and BPP had 4.31 and 7.66 % moisture,

respectively. BPP had the highest fiber content ( $46.89 \pm 1.58$  %) followed by GLF ( $22.45 \pm 0.21$  %), YLF ( $14.66 \pm 1.33$  %), BP ( $10.77 \pm 0.05$  %), and WF ( $4.56 \pm 2.15$  %).



Table 6. Total dietary fiber and moisture content of flour and powders used in cookie formulation

Ingredient	Moisture content (%)	Fiber content (%)
Wheat flour (WF)	12.65±0.23	4.56±2.15
Green lentil flour (GLF)	9.87±0.11	22.45±0.21
Yellow lentil flour (YLF)	10.06±0.01	14.66±1.33
Banana powder (BP)	4.31±0.12	10.77±0.05
Banana peel powder (BPP)	7.66±0.11	46.89±1.58

Moisture levels and fiber content in ingredients have an influence on the quality properties of the final product. The chemical properties of cookies in terms of moisture, dietary fiber, and ash contents are shown in Table 7. The moisture content of cookies with substituted ingredients varied between 6.42 – 7.40 % which was not significantly different from the wheat-only control cookies. Hajas et al. (2022) recently demonstrated varying moisture levels between 8.2% and 10.0% for gluten-free cookies produced by using different lentil flour varieties. Dietary fiber content was 4.41 % in WC samples, and

significantly increased to 8.83 % in LBC samples by the addition GLF, YLF, BP, and BPP. Ash contents showed a similar trend, resulting in the highest ash in LBC samples (1.56 %) followed by BC (1.27 %), LC (1.19 %), and WC (0.85 %). Thus, the addition of banana fruit powder (5%) and banana peel powder (5%) significantly increased the total dietary fiber and ash content of cookies. Portman et al. (2019) also demonstrated that the cookies containing lentil flour at a ratio of 25% and 50 % showed higher fiber content (approximately 3 – 7 %) than cookies produced with 100% wheat flour.

Table 7. Physicochemical properties of cookies

Sample	Moisture (%)	Ash (%)	Dietary fiber (%)	Hardness (N)
WC (Control)	7.19±0.09 <sup>ab</sup>	0.85±0.01 <sup>b</sup>	4.41±0.13 <sup>b</sup>	8.03±0.53 <sup>a</sup>
LBC	6.57±0.09 <sup>ab</sup>	1.56±0.29 <sup>a</sup>	8.83±0.75 <sup>a</sup>	8.51±0.74 <sup>a</sup>
BC	7.40±0.07 <sup>a</sup>	1.27±0.10 <sup>ab</sup>	6.14 ±0.34 <sup>ab</sup>	6.58±0.49 <sup>b</sup>
LC	6.42±0.41 <sup>b</sup>	1.19±0.10 <sup>ab</sup>	5.93±1.76 <sup>ab</sup>	7.92±1.04 <sup>a</sup>

Different letters in the same column indicate significant differences among cookies ( $p < 0.05$ ). Control refers to wheat-only cookies (WC). LBC: lentil flour, banana fruit and peel powder incorporated cookies, BC: banana fruit and peel powder incorporated cookies, LC: lentil flour incorporated cookies

#### *Textural properties*

The breaking strength and hardness are very important quality parameters that describe the textural characteristics of the final product. The influence of the incorporated components on the breaking strength and hardness of cookies is given in Figure 3 and Table 7, respectively. Breaking strength varied between 13.94 – 19.33 N with insignificant changes among the samples developed using the selected proportions of lentil flours, banana fruit, and banana peel powders ( $p < 0.05$ ). Nonetheless, there is a noticeable decrease in breaking strength as the wheat flour was partially replaced with GLF, YLF, BP, and BPP (Figure 3). Breaking cookies can become

easier as the proportion of wheat flour decreases (Duta and Culetu, 2015). Regarding the hardness measurement, BC sample prepared with only BP (5%) and BPP (5%) incorporation showed the lowest hardness value than other formulations (Table 7). This could be due to the higher moisture content of BC sample. Addition of lentil flours, on the other hand, resulted in hardness values similar to those of wheat flour cookie (WC). Kaur et al. (2019) also reported hardness values of 12.01 – 13.55 N for raw and roasted flaxseed flour incorporated in cookies up to 30%, indicating a decrease in hardness as the amount of flaxseed flour increased in cookie formulation. On the contrary, Ganorkar and Jain (2014)

reported harder cookies with incorporation of flaxseed flour up to 15% due to the water absorbing components such as fiber and proteins. In study of Hajas et al. (2022), the authors demonstrated significant increases in hardness of cookies as the rice flour was replaced with brown,

green, red, and yellow lentil flours. The changes in hardness of cookies are attributed to the differences in protein and starch contents as well as the water binding capacity of flours used in the cookie formulation (Hajas et al., 2022).

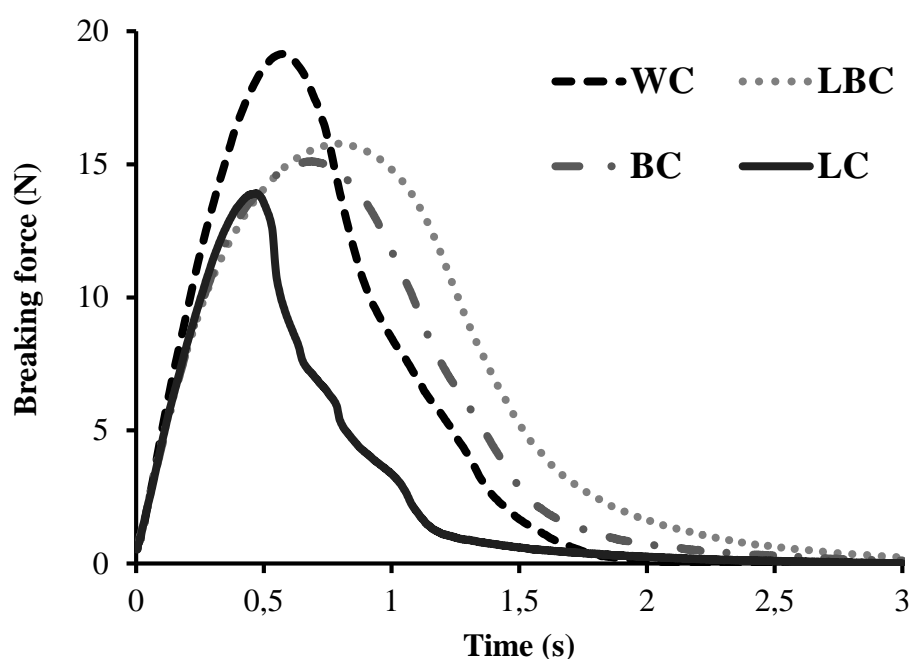


Figure 3. Change in applied force during measurement of breaking strength of cookies WC refers to Wheat only Cookies as control. LBC: Lentil flour, Banana fruit and banana peel powder incorporated Cookies, BC: Banana fruit and banana peel powder incorporated Cookies, LC: Lentil flour incorporated Cookies.

### Sensory attributes

Sensory attributes of cookies are given as a radar plot in Figure 4. Lentil flour-incorporated cookies (LC) without the addition of banana products were superior to WC, BC, and LBC in terms of appearance, color, hardness, fracturability, taste, mouthfeel, after-taste, and overall acceptability. Color is one of the primary quality criteria since consumer attitudes are first influenced by the color of the final product. There were no significant differences in the degree of liking for the surface color and appearance of cookies at the selected proportions of flours and powders. In accordance with the instrumental texture measurements, panelists ranked the hardness and fracturability in favor of lentil flour incorporated cookies (LC). BP and BPP additions resulted in

lower fracturability and hardness rankings for the LBC and BC samples. Similarly, banana-based cookies received significantly lower rankings than wheat-only and lentil-based cookies in terms of odor, taste, mouthfeel, after-taste, and overall acceptability. In fact, the lentil-based cookies were more preferred than other samples, indicating the relevance of using lentil flour in cookie formulations that can make the final product more appealing to consumers. Hajas et al. (2022) also reported higher liking degree in overall acceptance for red and brown lentil cookies than rice-based cookies. Both sensory analysis and instrumental texture analysis reveal that the cookies with less breaking strength are more preferable.

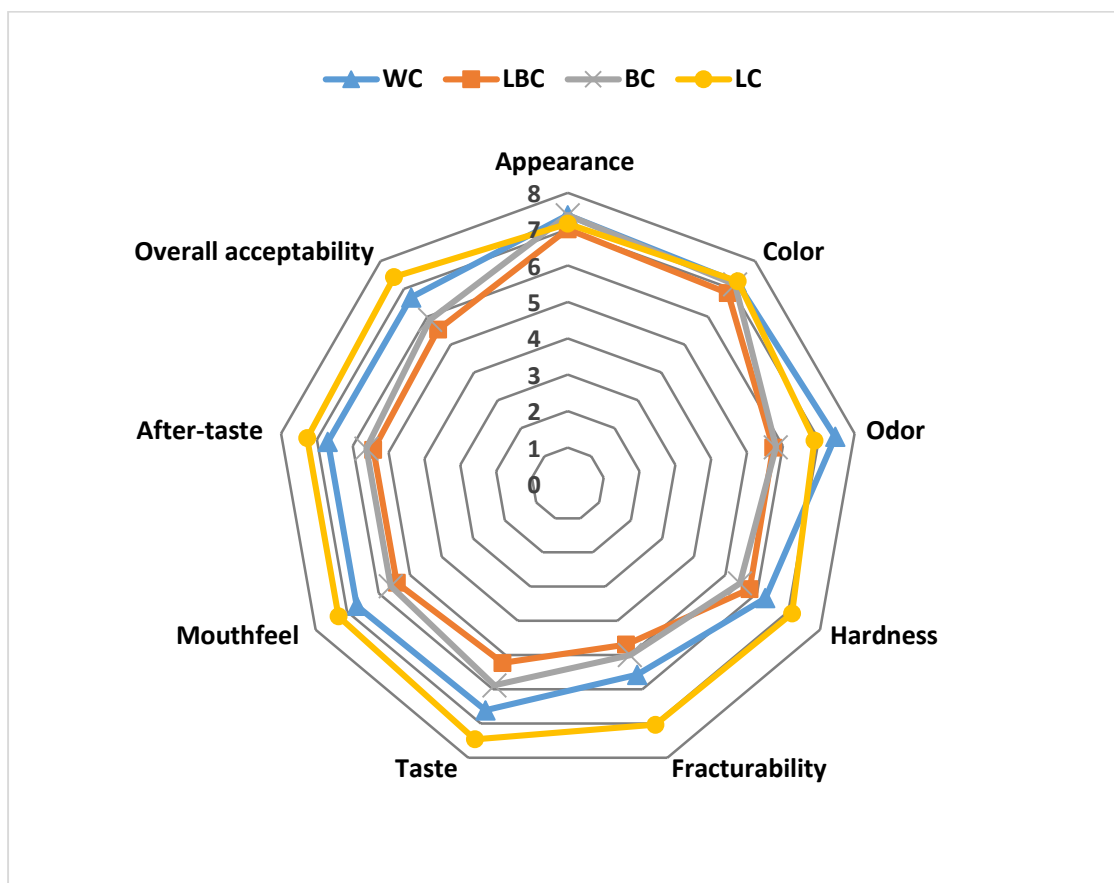


Figure 4. Sensory analysis of cookies supplemented with lentil flour, banana fruit powder, and banana peel powder

## CONCLUSION

In the present study, cookies were enriched with dietary fiber by partially replacing the wheat flour with green and -yellow lentil flours, banana fruit powder, and banana peel powder. The mixture design approach allowed optimization of the proportions of the lentil and wheat flours. Physicochemical, textural, and sensory characteristics were examined while developing fiber-enriched cookies using alternative sources. The use of banana fruit and banana peel powders enhanced the dietary fiber content; however, no more than 5% is suggested for each powder in order to avoid the likely undesired changes in taste and color attributes of banana powder and banana peel powder incorporated cookies. Enzymatic and non-enzymatic browning reactions should be further studied while incorporating agricultural and industrial by-products into cookie formulations. Lentil flours can be suggested as an

alternative ingredient to partially replace wheat flour in new food formulations and to develop new food products with desired physicochemical, textural, and sensory attributes.

## ACKNOWLEDGMENT

We would like to thank Prof. Dr. Zehra Ayhan for providing us the opportunity to use the texture analyser equipment in her laboratory.

## CONFLICT OF INTEREST

No conflict of interest.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Semanur Yıldız: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing original draft, Formal analysis, Supervision, Visualization, Review and editing. Eylem Karakuş: Investigation and Methodology. Serpil Öztürk: Methodology, Investigation, Review and editing.

## REFERENCES

- AACC (2000). American Association of Cereal Chemists Approved methods of the AACC (10<sup>th</sup> ed.). St. Paul, MN, USA.
- Ajila, C.M., Leelavathi, K.U.J.S., Rao, U.P. (2008). Improvement of dietary fiber content and antioxidant properties in soft dough biscuits with the incorporation of mango peel powder. *Journal of Cereal Science*, 48(2), 319-326.
- Anhwange, B.A., Ugye, T.J., Nyiaatagher, T.D. (2009). Chemical composition of *Musa sapientum* (banana) peels. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 8(6), 437-442.
- AOAC (2000). Official Methods of Analysis. 15<sup>th</sup> edn. Association of official analytical chemists, Washington, DC, USA.
- Bravo-Núñez, Á., Gómez, M. (2021). Enrichment of cakes and cookies with pulse flours. A review. *Food Reviews International*, 1-19.
- Colantuono, A., Ferracane, R., Vitaglione, P. (2016). In vitro bioaccessibility and functional properties of polyphenols from pomegranate peels and pomegranate peels-enriched cookies. *Food & Function*, 7(10), 4247-4258.
- Duta, D.E., Culetu, A. (2015). Evaluation of rheological, physicochemical, thermal, mechanical and sensory properties of oat-based gluten free cookies. *Journal of Food Engineering*, 162, 1-8.
- Ellouze-Ghorbel, R., Kamoun, A., Neifar, M., Belguith, S., Ayadi, M. A., Kamoun, A., Ellouze-Chaabouni, S. (2010). Development of fiber-enriched biscuits formula by a mixture design. *Journal of Texture Studies*, 41(4), 472-491.
- Falguera, V., Aliguer, N., Falguera, M. (2012). An integrated approach to current trends in food consumption: moving toward functional and organic products? *Food Control* 26:274–281.
- Ganorkar, P.M., Jain, R.K. (2014). Effect of flaxseed incorporation on physical, sensorial, textural and chemical attributes of cookies. *International Food Research Journal*, 21(4).
- Hajas, L., Sipos, L., Csobod, É. C., Bálint, M. V., Juhász, R., Benedek, C. (2022). Lentil (*Lens culinaris* Medik.) Flour Varieties as Promising New Ingredients for Gluten-Free Cookies. *Foods*, 11(14), 2028.
- Hall, C., Hillen, C., Garden Robinson, J. (2017). Composition, nutritional value, and health benefits of pulses. *Cereal Chemistry*, 94(1), 11-31.
- He, Y., Wang, B., Wen, L., Wang, F., Yu, H., Chen, D., Su, X., Zhang, C. (2022). Effects of dietary fiber on human health. *Food Science and Human Wellness*, 11(1), 1-10.
- Kaur, P., Sharma, P., Kumar, V., Panghal, A., Kaur, J., Gat, Y. (2019). Effect of addition of flaxseed flour on phytochemical, physicochemical, nutritional, and textural properties of cookies. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 18(4), 372-377.
- Montgomery, D.C. (2001). *Design and Analysis of Experiments*, fifth ed. John Wiley & Sons, New York.
- Narayanan, C.M., Das, S., Pandey, A. (2017). Food waste utilization: green technologies for manufacture of valuable products from food wastes and agricultural wastes. In: *Food Bioconversion*, Grumezescu, A.M. and Holban, A.M. (Eds), Volume 2, Academic Press, pp. 1-54.
- Portman, D., Maharjan, P., McDonald, L., Laskovska, S., Walker, C., Irvin, H., Blanchard, C., Naiker, M., Panozzo, J.F. (2019). Nutritional and functional properties of cookies made using down-graded lentil—A candidate for novel food production and crop utilization. *Cereal Chemistry*, 97(1), 95-103.
- Sen Gupta, D., Thavarajah, D., Knutson, P., Thavarajah, P., McGee, R. J., Coyne, C. J., Kumar, S. (2013). Lentils (*Lens culinaris* L.), a rich source of folates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(32), 7794-7799.
- Sidhu, J.S., Zafar, T.A. (2018). Bioactive compounds in banana fruits and their health benefits. *Food Quality and Safety*, 2(4): 183-188.
- Sudha, M.L., Vetrmani, R., Leelavathi, K. (2007). Influence of fibre from different cereals on the rheological characteristics of wheat flour dough and on biscuit quality. *Food Chemistry*, 100(4), 1365-1370.

- Šarić, B., Dapčević-Hadnađev, T., Hadnađev, M., Sakač, M., Mandić, A., Mišan, A., Škrobot, D. (2019). Fiber concentrates from raspberry and blueberry pomace in gluten-free cookie formulation: effect on dough rheology and cookie baking properties. *Journal of Texture Studies*, 50(2), 124-130.
- Thipayarat, A. (2007). Quality and physiochemical properties of banana paste under vacuum dehydration. *International Journal of Food Engineering*, 3(4).
- Turksoy, S., Özkaya, B. (2011). Pumpkin and carrot pomace powders as a source of dietary fiber and their effects on the mixing properties of wheat flour dough and cookie quality. *Food Science and Technology Research*, 17(6), 545-553.
- Tyagi, S. K., Manikantan, M. R., Oberoi, H. S., Kaur, G. (2007). Effect of mustard flour incorporation on nutritional, textural and organoleptic characteristics of biscuits. *Journal of Food Engineering*, 80(4), 1043-1050.
- Weickert, M.O., Pfeiffer, A.F. (2008). Metabolic effects of dietary fiber consumption and prevention of diabetes. *The Journal of Nutrition*, 138(3), 439-442.
- Zucco, F., Borsuk, Y., Arntfield, S.D. (2011). Physical and nutritional evaluation of wheat cookies supplemented with pulse flours of different particle sizes. *LWT-Food Science and Technology*, 44(10), 2070-2076.



## ULTRASON UYGULAMASININ YOĞURT BENZERİ FERMENTE SÜT ÜRÜNÜNDE FARKLI PROBİYOTİK LAKTOBASİL TÜRLERİNİN CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİ

**Vildan AKDENİZ\***

Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Süt Teknolojisi Bölümü, İzmir, Türkiye

Geliş / Received: 20.10.2022 Kabul / Accepted: 12.01.2023 Online baskı / Published online: 18.01.2023

Akdeniz, V. (2023). Ultrason uygulamasının yoğurt benzeri fermente süt ürününde farklı probiyotik laktobasil türlerinin canlılığı üzerine etkisi. GIDA (2023) 48 (1) 107-117 doi: 10.15237/gida.GD22100

*Akdeniz, V. (2023). Effect of ultrasound application on viability of different probiotic Lactobacillus species in yogurt-like fermented dairy product. GIDA (2023) 48 (1) 107-117 doi: 10.15237/gida.GD22100*

### ÖZ

Bu çalışmada ultrason uygulamasının farklı probiyotik laktobasil (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* GG) türlerinin canlılığına etkisini incelenmiştir. Ayrıca, ultrason uygulamasının fermentasyon süresine etkisi de saptanmıştır. Bu amaçla süte önce 15 dk süreyle 400 W ultrason uygulanmış ve kültür ilavesi sonrasında da 5 dk süreyle 100 W ultrason uygulanarak fermentasyon süresi belirlenmiş ve elde edilen yoğurt benzeri probiyotik fermente süt ürününde probiyotik bakteri sayımı gerçekleştirilmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda ultrason uygulamasının *L. acidophilus* ve *L. casei* ile aşılana örneklerde fermentasyon süresini kısalttığı ve *L. acidophilus*, *L. casei* ve *L. rhamnosus* GG probiyotik bakterilerinin canlılığını arttırdığı saptanmıştır. Bu sonuçlar, ultrason uygulamasının süt teknolojisinde gelecek vaat ettiğini ve probiyotik fermente süt ürünleri üretiminde kullanılma potansiyeli olduğunu göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** Ultrason, probiyotik, fermente süt ürünü

### EFFECT OF ULTRASOUND APPLICATION ON VIABILITY OF DIFFERENT PROBIOTIC *LACTOBACILLUS* SPECIES IN YOGURT-LIKE FERMENTED DAIRY PRODUCT

#### ABSTRACT

In this study, the effect of ultrasound on the viability of different probiotic lactobacilli species (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* GG) was investigated. In addition, the effect of ultrasound application on the fermentation time was determined. For this purpose, first 400 W ultrasound was applied to the milk for 15 minutes, and after the culture addition, 100 W ultrasound was applied for 5 minutes, then the fermentation time was determined, and the probiotic bacteria count was performed in the yogurt-like probiotic fermented milk product obtained. As a result of the study, it was determined that the application of ultrasound shortened the fermentation time in the samples inoculated with *L. acidophilus* and *L. casei*, and increased the viability of *L. acidophilus*, *L. casei* and *L. rhamnosus* GG probiotic bacteria. These results show that the ultrasound application is promising in dairy technology and has the potential to be used in the production of probiotic fermented milk products.

**Keywords:** Ultrasound, probiotic, fermented milk product

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

vildan.akdeniz@ege.edu.tr,

☎ (+90) 232 311 2733/4471,

☎ (+90) 232 342 5713

Vildan Akdeniz; ORCID no: 0000-0002-2288-7832

## GİRİŞ

Günümüzde tüm dünyada sağlığın gıda tercihindeki rolü artmaktadır. Yapılan araştırmalar tüketilen gıdaların bireyin sağlığını doğrudan etkilediğini ortaya koymaktadır. Bilinçli tüketicilerin artması ve beslenme ile sağlık arasındaki ilişkinin ortaya çıkması sonucu probiyotik içeren gıdalara doğru bir eğilim söz konusudur (Sarkar, 2010). Probiyotikler, yeterli miktarda alındığında konakçıya sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (Dinkçi vd., 2019). Laktik asit bakterilerinin en önemli gruplarından biri olan laktobasiller, gıda teknolojisinde oldukça önemli bir yere sahiptir. Hastaliksız bir yaşam için sağlıklı bir bağırsak kavramı ilk olarak 19. yüzyılın başlarında ortaya çıkmış ve *Lactobacillus acidophilus* ilk olarak biberonla beslenen bebeklerin dışkılarından izole edilerek "*Bacillus acidophilus*" olarak adlandırılmıştır (Kneifel ve Bonaparte, 2003). Sonrasında bu bakterinin insan sindirim sistemi bozuklukları üzerinde etkili olduğu ortaya çıkmış (Kopeloff ve Cheney, 1922) ve *L. acidophilus* içeren probiyotik ürünler giderek popüler hale gelmiştir (Ryan vd., 2020). 1930 yılında *Lactobacillus casei* şusu keşfedilmiştir. *L. casei* antimikrobiyel, antidiyareik ve antitumörjenik etkisinin kanıtlanması ile probiyotik olarak dikkat çekmiştir (Srinivasan ve Meyer, 2006; Wendakoon vd., 2007). Ayrıca *L. casei*'nin anti-kanser, kolesterol düşürücü, bağışıklık sistemini güçlendirici, kan şekeri seviyesini düzenleyici, patojen mikroorganizmaları inhibe edici etkileri bulunmaktadır (Matsuzaki vd., 2007; Sömer vd., 2012). *L. rhamnosus* GG ise ilk olarak Gorbach ve Goldin tarafından 1985 yılında izole edilmiştir ve gastrointestinal kanalda hayatta kalma ve kolonize olma kabiliyeti sayesinde günümüzde gastrointestinal hastalıklarda sıklıkla kullanılan probiyotik bakterilerden biri haline gelmiştir (Goldin vd. 1992; Jia vd., 2016). Bağırsak florasını düzenleme, ishali önleme, toksinleri ortadan kaldırma ve ayrıca diş çürüklerine karşı bağışıklığı artırma gibi etkileri bulunmaktadır (Jia vd., 2016; Sun vd. 2019).

Probiyotiklerin sağlık üzerinde bağırsak florasını iyileştirme, diyareyi önleme, bağışıklık sistemini aktive etme, kanda kolesterol seviyesini düşürme,

kanseri önleme, mineral absorpsiyonunu güçlendirme gibi olumlu etkileri vardır. Çalışmalar probiyotiklerin sağlık üzerindeki olumlu etkisini gösteren çok sayıda kanıt sunmaktadır (Matsuzaki vd., 2007; Sömer vd., 2012; Foysal vd., 2020). Ancak bu yararların ortaya çıkması için bağırsak sistemine canlı olarak ulaşmaları ve dünya çapındaki birçok gıda organizasyonu tarafından açıklandığı üzere gıda maddesinin en az  $10^6$ - $10^7$  kob/g probiyotik bakteri içermesi gerekmektedir. Bu nedenle, ürünün raf ömrü boyunca bu bakteriler yüksek oranda canlılığını koruyabilmelidir (Shori, 2016). Fakat probiyotik fermente süt ürünlerinde özellikle asitlik ve oksijenin etkisi sebebiyle probiyotik bakteriler stabil değildir. Bu sebeple probiyotik bakterilerin canlılığını teşvik edici uygulamalar günümüzde önem kazanmış ve probiyotik özellikleri geliştirmeyi amaçlayan yeni teknolojik yöntemler ön plana çıkmıştır (Lacroix ve Yıldırım, 2007; Akalın ve Erisir, 2008; Bakr, 2015). Ultrason bu konuda gelecek vaat eden bir teknoloji olarak karşımıza çıkmaktadır (Nguyen vd., 2009; Nguyen vd., 2016; Potoroko vd., 2018; Guimaraes vd., 2019).

Ultrason teknolojisi insan duyma eşliğinin üst sınırı olan 20 kHz'den daha yüksek bir frekansa sahiptir (Higuera-Barraza vd., 2016). Yeşil teknoloji olarak adlandırılan ultrason, güvenli, basit, hızlı ve toksik etkisi bulunmayan ses dalgaları aracılığıyla çevre dostu proseslerin oluşturulmasını sağlayan nispeten ucuz bir teknolojidir (Arzeni vd., 2012). Ses enerjisi sürekli dalga tipi bir hareket oluşturarak ortama girdiğinde, bu hareketin bir sonucu olarak boylamsal dalgalar oluşmakta ve bu durumda ortamdaki partiküller üzerinde bir sıkışma ve gevşeme meydana gelmektedir. Uygulanan ses dalgasının büyüklüğü ve kullanılan frekansa bağlı olarak çok çeşitli uygulamalara olanak sağlayan bir seri fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal etkiler gerçekleşmektedir (Knorr vd., 2004; Akdeniz ve Akalın, 2017). Süt teknolojisinde genellikle 20 ile 40 kHz frekans aralığında yüksek enerjili ultrason uygulamaları kullanılmakta olup bu uygulamalar süt sanayinde geniş bir kullanım potansiyeli bulmuştur (Mohammadi vd., 2014; Ashokkumar, 2015).

Ultrason işleminin probiyotik bakteri canlılığını geliştirilmesi, membran geçirgenliğini artırması ve hücre zarında geçici gözenekler oluşturmasına bağlanmaktadır. Bu sayede atık ürünlerin hücreden uzaklaştırılması ve aynı zamanda hücrenin büyümesi için gerekli oksijen ve besinlerin hücre zarından geçişi kolaylaşmaktadır (Pitt ve Ross, 2003; Wu ve Nyborg, 2008; Lentacker vd., 2014). Bununla birlikte,  $\beta$ -galaktosidaz gibi hücre içi enzimlerin hücre dışına salınması ile transgalaktosilasyon ve laktoz hidrolizi ve ayrıca gelişme faktörü olarak adlandırılan bazı bileşenlerin açığa çıkması ile probiyotik bakterilerin kullanabileceği besin miktarı artmaktadır. Ultrason uygulaması ile meydana gelen tüm bu değişimler sonucunda da mikrobiyal gelişme teşvik edilmektedir (Nguyen vd., 2009; Nguyen vd., 2012; Guimaraes vd., 2019).

Yapılan bu araştırmada, ultrason uygulamasının *L. acidophilus*, *L. casei* ve *L. rhamnosus* GG probiyotik bakterilerinin gelişimine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla aşılama öncesi ve sonrası ultrason işlemi uygulanan süttten üretilen yoğurt benzeri fermente süt ürünlerinde probiyotik bakteri sayıları belirlenmiştir.

### MATERYAL VE YÖNTEM

#### Materyal

Çalışmada kullanılan çiğ inek sütü Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü'nden tedarik edilmiştir. Probiyotik kültürler, *L. acidophilus*, *L. casei* ve *L. rhamnosus* GG, Chr. Hansen (Denmark) firmasından dondurularak kurutulmuş formda sağlanmıştır.

#### Yöntem

##### Süt Analizleri

Sütte yağ oranı Gerber yöntemiyle (AOAC, 2002), asitlik titrasyon yöntemiyle % laktik asit cinsinden (AOAC, 2000), kurumadde miktarı gravimetrik olarak (AOAC, 2000) ve pH değeri Microprocessor pH-meter (Hanna Instruments, USA) ile belirlenmiştir.

##### Ultrason Uygulaması

Çiğ süt 6 kısma ayrılarak 3 kısım süte ultrason uygulanmış, diğer 3 kısım ise kontrol örneklerini

oluşturmuştur. Ultrason işlemi için 13 mm'lik titanyum proba sahip, 20 kHz sabit frekansta çalışan Nanolinker NL650 Ultrasonik Processor (Mormed, İstanbul, Türkiye) kullanılmıştır. Ultrason probu, behere konan 200 mL'lik süt örneklerine 30 mm'lik bir derinliğe kadar daldırılmıştır. İşlem boyunca süt örneklerinin sıcaklığı kontrol edilmiş ve sıcaklık artışı tespit edilmemiştir. Önceki çalışmalara (Nguyen vd., 2009; Potoroko vd., 2018; Akdeniz ve Akalın, 2022) istinaden önce çiğ süte 400 W ultrason 15 dk boyunca uygulanmış, sonrasında ısı işlem ve kültür ile aşılama takiben 100 W ultrason 5 dk boyunca uygulanarak sütler pH 4.75'e kadar fermente edilmiştir.

##### Yoğurt Benzeri Fermente Süt Ürünü Üretimi

Yoğurt benzeri fermente süt ürünü üretimi Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla EÜ Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü'nden 4°C'de alınan % 3.53 yağ, % 11.54 toplam kurumadde, % 0.172 laktik asit ve 6.70 pH değerlerine sahip çiğ inek sütü kullanılmıştır. 60°C'ye ısıtılan süt 6 kısma ayrılmış ve 3 kısma (L1, L2 ve L3 grupları) önceki çalışmalar ışığında (Akdeniz ve Akalın, 2022) 400 W'da 15 dk ultrason işlemi uygulanmıştır. Ultrason işlemi uygulanmayan 3 kısım süt ise K1, K2 ve K3 grupları olarak kontrol örneklerini oluşturmuştur. 85°C 15 dk pastörizasyon işleminden sonra sütler yaklaşık 45°C'ye soğutularak L1 grubu ve ultrason uygulanmayan kontrol K1 grubu probiyotik kültür *L. acidophilus* ile, L2 grubu ve K2 kontrol grubu *L. casei* ile, L3 grubu ve K3 kontrol grubu *L. rhamnosus* GG ile % 2 oranında aşılanmıştır (Abesinghe vd., 2019). Aşılama sonrası L1, L2 ve L3 gruplarına ayrıca 100 W güçte 5 dk ultrason işlemi uygulanmıştır (Nguyen vd. 2009, Potoroko vd. 2018; Niamah 2019; Akdeniz ve Akalın, 2022). Kültür ilave edilmiş sütler 42°C'de pH 4.75'e ulaşmaya dek inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası elde edilen yoğurt benzeri fermente süt ürünleri oda sıcaklığında 15 dk kadar dinlendirildikten sonra 1 gece 4°C'de buzdolabı koşullarında depolanmıştır. Ertesi gün örneklerde % yağ, % kurumadde, % asitlik ve pH değerleri belirlenerek probiyotik bakteri canlılıklarının



belirlenmesi için uygun besiyerlerine ekimler gerçekleştirilmiştir.

### Fermantasyon Süresinin Belirlenmesi

Yoğurt benzeri probiyotik fermente süt örneklerinde inkübasyon başlangıcından itibaren pH 4.75'e düşene kadar geçen süre tespit edilmiştir (Riener vd., 2009).

### Fizikokimyasal Analizler

Yoğurt benzeri fermente süt örneklerinin toplam kurumadde miktarı standart gravimetrik yöntem ile (AOAC, 2000), asitlik değeri % laktik asit cinsinden titrasyon yöntemiyle (AOAC, 2000) ve yağ miktarı Gerber yöntemi ile (AOAC, 2002) belirlenmiştir. Örneklerin pH değeri Hanna Instruments, Microprocessor pH-metre (Hanna Instruments, 584 Park East Drive, Woonsocket, RI 02895, ABD) ile ölçülmüştür.

### Mikrobiyolojik Analizler

#### *Lactobacillus acidophilus* Sayımı

*L. acidophilus* probiyotik bakteri sayımında MRS-sorbitol agar besiyeri kullanılmıştır. MRS agar 121°C'de 15 dk sterilize edildikten sonra 90 mL MRS agar içerisine, *L. acidophilus* dışındaki mikroorganizmaların gelişimini durdurmak amacıyla 10 mL % 10'luk (w/v) D-sorbitol çözeltisi membran filtreden (0.22 µm) geçirilerek ilave edilmiştir. Analiz yayma plak kültürel sayım yöntemi ile yapılmış ve inkübasyon anaerobik ortamda 37°C'de 72 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Anaerobik koşullar anaerobik kavanoz ve kit (Aerocult A) (Merck, Almanya) kullanılarak sağlanmıştır (Dave ve Shah, 1998).

#### *Lactobacillus casei* Sayımı

*L. casei* sayımı için MRS-Vankomisin Agar (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) besiyeri Tharmaraj ve Shah (2003)'e göre hazırlanmıştır. Uygun dilüsyonlardan yayma plak kültürel sayım yöntemi ile paralel ekim yapılan petri kapları 37°C'de 72 saat anaerobik inkübasyona bırakılmış ve ardından sayılmıştır. Anaerobik koşulları sağlamak için anaerobik kavanoz ve kit (Aerocult A) (Merck, Almanya) kullanılmıştır.

#### *Lactobacillus rhamnosus* GG Sayımı

*L. rhamnosus* GG probiyotik bakteri sayımında MRS-Vankomisin agar besiyeri kullanılmıştır.

Analiz yayma plak kültürel sayım yöntemi ile yapılmış ve inkübasyon anaerobik ortamda 37°C'de 72 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Anaerobik koşullar anaerobik kavanoz ve kit (Aerocult A) (Merck, Almanya) kullanılarak sağlanmıştır (Tharmaraj ve Shah, 2003).

### İstatistiksel Analiz

Çalışmamız iki tekerrür şeklinde yürütülmüş ve analizler iki paralelli olarak gerçekleştirilmiştir. Araştırma sonuçlarına varyans analizi (ANOVA) uygulanmış ve önemli bulunan sonuçlar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile  $P < 0.05$  düzeyinde karşılaştırılmıştır. Bu amaçla IBM SPSS versiyon 25 (IBM SPSS, Armonk, NY, ABD) istatistik analiz paket programı kullanılmıştır.

### BULGULAR VE TARTIŞMA

Üretimde kullanılan çiğ sütün ortalama kurumadde, yağ, titrasyon asitliği (% laktik asit) ve pH değerleri sırasıyla % 11.54±0.04, % 3.53±0.06, % 0.17±0.00 ve 6.70±0.00 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçların Türk Gıda Kodeksi Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği'nde belirtilen değerler ile uyumlu olduğu görülmüştür (Anonim, 2006).

Yoğurt benzeri fermente süt örneklerinin kurumadde, yağ, pH ve titrasyon asitliği değerleri Çizelge 1'de verilmiştir. Yapılan varyans analizi ve Duncan testi sonucunda hem ultrason uygulamasının hem de kullanılan kültürün üretilen yoğurt benzeri probiyotik fermente süt ürünlerinin kurumadde miktarlarını ve yağ oranlarını önemli ölçüde etkilemediği saptanmıştır ( $P > 0.05$ ).

Gursoy vd. (2016) 800 mL süte 70°C'de 5 dk ısıtma işlemi ile birlikte farklı güçlerde (100, 125 ve 150W) 15 dk ultrason uygulayarak ürettikleri yoğurt içeceklerini geleneksel yöntemle üretilen kontrol grubu yoğurt içecekleri ile kıyasladıklarında çalışma bulgularımız ile paralel olarak ultrason uygulamasının ürünlerin kurumadde ve yağ miktarları üzerinde önemli bir etkisi olmadığını saptamışlardır ( $P > 0.05$ ). Akdeniz ve Akalın (2022) tarafından yapılan çalışmada da ultrason uygulamasının probiyotik yoğurtların kurumadde ve yağ miktarlarını etkilemediği belirtilmiştir.

Çizelge 1. Yoğurt benzeri probiyotik fermente süt ürünlerinin kurumadde (%), yağ (%), asitlik (%) ve pH değerleri

Table 1. Total solid (%), fat (%), acidity (%) and pH values of yogurt-like probiotic fermented milk products

Ürün Product	Kurumadde Miktarı (%) Total Solid (%)	Yağ Miktarı (%) Fat (%)	Laktik Asit Miktarı (%) Lactic Acid (%)	pH pH
K1	13.66±0.35 <sup>a</sup>	3.25±0.07 <sup>a</sup>	0.98±0.02 <sup>a</sup>	4.31±0.01 <sup>b</sup>
K2	13.22±0.27 <sup>a</sup>	3.30±0.14 <sup>a</sup>	0.87±0.002 <sup>b</sup>	4.43±0.01 <sup>a</sup>
K3	13.59±0.30 <sup>a</sup>	3.25±0.07 <sup>a</sup>	0.97±0.003 <sup>a</sup>	4.27±0.02 <sup>b</sup>
L1	13.32±0.15 <sup>a</sup>	3.28±0.04 <sup>a</sup>	0.99±0.04 <sup>a</sup>	4.28±0.04 <sup>b</sup>
L2	13.58±0.03 <sup>a</sup>	3.23±0.11 <sup>a</sup>	0.87±0.01 <sup>b</sup>	4.43±0.01 <sup>a</sup>
L3	13.59±0.06 <sup>a</sup>	3.30±0.00 <sup>a</sup>	0.99±0.02 <sup>a</sup>	4.31±0.01 <sup>b</sup>

K1: *L. acidophilus* ile aşıl原因an kontrol örneği, K2: *L. casei* ile aşıl原因an kontrol örneği, K3: *L. rhamnosus* GG ile aşıl原因an kontrol örneği, L1: 400W güçte 15 dk ultrason uygulanan ve *L. acidophilus* ilavesi sonrası 100W güçte 5 dk ultrason uygulanarak üretilen probiyotik fermente süt ürünü, L2: 400W güçte 15 dk ultrason uygulanan ve *L. casei* ilavesi sonrası 100W güçte 5 dk ultrason uygulanarak üretilen probiyotik fermente süt ürünü, L3: 400W güçte 15 dk ultrason uygulanan ve *L. rhamnosus* GG ilavesi sonrası 100W güçte 5 dk ultrason uygulanarak üretilen probiyotik fermente süt ürünü

<sup>a-b</sup>: Aynı sütündeki farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark önemlidir ( $P<0.05$ )

K1: Control sample inoculated with *L. acidophilus*, K2: Control sample inoculated with *L. casei*, K3: Control sample inoculated with *L. rhamnosus* GG, L1: Probiotic fermented milk product produced by ultrasonication at 400W for 15 min, and after addition of *L. acidophilus*, ultrasonication at 100W for 5 min, L2: Probiotic fermented milk product produced by ultrasonication at 400W for 15 min, and after addition of *L. casei*, ultrasonication at 100W for 5 min, L3: Probiotic fermented milk product produced by ultrasonication at 400W for 15 min, and after addition of *L. rhamnosus* GG, ultrasonication at 100W for 5 min

<sup>a-b</sup>: The difference between the means indicated by different letters in the same column is significant ( $P<0.05$ )

*L. casei* ile aşıl原因an K2 ve L2 yoğurt benzeri probiyotik fermente süt ürünlerinin diğer ürünlere kıyasla daha yüksek pH ve daha düşük asitlik değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Ultrason uygulamasının ise yoğurtların pH ve asitlik değerlerini kontrol örneklerine kıyasla istatistiksel olarak önemli derecede etkilemediği görülmüştür ( $P>0.05$ ). Çalışma bulgularımıza paralel olarak Gursoy vd. (2016) tarafından yoğurt içeceklerinde yapılan çalışmada ultrason uygulamasının örneklerin pH ve asitlik değerlerini önemli derecede etkilemediği saptanmıştır. Guimaraes vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada da aynı şekilde ultrason uygulamasının peyniraltı suyu içeceklerinin pH'sını önemli derecede etkilemediği bulunmuştur. Erkaya vd. (2015) de 35 kHz frekansta farklı sıcaklık ve sürelerde ultrason uygulamasının ayranların % laktik asit miktarını önemli derecede etkilemediğini belirtmişlerdir. Bu sonucun, ultrason

uygulamasının enzimler üzerindeki etkisinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ultrasonun enzimler üzerindeki etkisi henüz tam olarak çözülememiştir ve bu konuda çalışmalar yapılmaya devam edilmektedir.

### Fermantasyon Süresi

Yoğurt benzeri probiyotik fermente süt ürünlerinin kültür ilave edilip inkübatöre konulma zamanından pH 4.75'e düşene kadar geçen fermantasyon süresi Çizelge 2'de verilmiştir. *L. acidophilus* ile aşıl原因an örneklerin fermantasyon süresi diğer probiyotik kültürlerle aşıl原因an örneklerden daha kısa olmuştur. En uzun fermantasyon süresi *L. rhamnosus* GG ile aşıl原因an örneklerde gözlenmiştir. Sun vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada da *L. rhamnosus* GG tek başına kullanıldığında fermantasyon süresinin uzun olduğu bildirilmiştir.

Çizelge 2. Yoğurt benzeri probiyotik fermente süt ürünlerinin fermentasyon süresi  
Table 2. Fermentation time of yogurt-like probiotic fermented milk products

Probiyotik Bakteri Türü <i>Probiotic Bacteria Species</i>	Ultrason Uygulaması <i>Ultrasound Application</i>	Fermentasyon süresi (dk) <i>Fermentation time (min)</i>
<i>L. acidophilus</i>	K1	63.50±2.12 <sup>d</sup>
	L1	46.00±4.24 <sup>e</sup>
<i>L. casei</i>	K2	677.00±5.66 <sup>b</sup>
	L2	656.50±7.78 <sup>c</sup>
<i>L. rhamnosus</i> GG	K3	1388.50±4.95 <sup>a</sup>
	L3	1394.50±6.36 <sup>a</sup>

K1: *L. acidophilus* ile aşıl原因an kontrol örneği, K2: *L. casei* ile aşıl原因an kontrol örneği, K3: *L. rhamnosus* GG ile aşıl原因an kontrol örneği, L1: 400W güçte 15 dk ultrason uygulanan ve *L. acidophilus* ilavesi sonrası 100W güçte 5 dk ultrason uygulanarak üretilen probiyotik fermente süt ürünü, L2: 400W güçte 15 dk ultrason uygulanan ve *L. casei* ilavesi sonrası 100W güçte 5 dk ultrason uygulanarak üretilen probiyotik fermente süt ürünü, L3: 400W güçte 15 dk ultrason uygulanan ve *L. rhamnosus* GG ilavesi sonrası 100W güçte 5 dk ultrason uygulanarak üretilen probiyotik fermente süt ürünü

<sup>a-e</sup>: Aynı sütündeki farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark önemlidir ( $P<0.05$ )

K1: Control sample inoculated with *L. acidophilus*, K2: Control sample inoculated with *L. casei*, K3: Control sample inoculated with *L. rhamnosus* GG, L1: Probiotic fermented milk product produced by ultrasonication at 400W for 15 min, and after addition of *L. acidophilus*, ultrasonication at 100W for 5 min, L2: Probiotic fermented milk product produced by ultrasonication at 400W for 15 min, and after addition of *L. casei*, ultrasonication at 100W for 5 min, L3: Probiotic fermented milk product produced by ultrasonication at 400W for 15 min, and after addition of *L. rhamnosus* GG, ultrasonication at 100W for 5 min

<sup>a-e</sup>: The difference between the means indicated by different letters in the same column is significant ( $P<0.05$ )

Ultrason uygulaması *L. rhamnosus* GG ile aşıl原因an örneklerde fermentasyon süresinde önemli bir farklılık ( $P>0.05$ ) yaratmazken, *L. acidophilus* ve *L. casei* ile aşıl原因an örneklerde kontrollerine göre fermentasyon süresini istatistiksel olarak önemli derecede kısaltmıştır ( $P<0.05$ ). Bu konuda yapılan diğer çalışmalarda da bulgularımız ile paralel olarak ultrason uygulamasının fermentasyon süresini kısaltmada etkili olduğu belirtilmektedir. Ultrason işleminin kefirin fermentasyon süresini kısalttığını (Shimada vd., 2004), bifidobakterilerin fermentatif aktivitesini suşaya bağlı olarak arttırdığını (Nguyen vd.,2009), *Lactobacillus casei* subsp.*casei* ATTC 39392'nin fermentasyon sürecini geliştirdiğini (Dahroud vd., 2016) bildiren çalışmaları mevcuttur. Wu vd. (2001) tarafından yapılan çalışmada ise kültür ilavesinden önce uygulanan ultrason işleminin fermentasyon süresini kısaltmada etkili olmadığı, bunun yanı sıra kültür ilavesinden sonraki ultrason işleminin ise

fermentasyon süresinde 30 dk'ya kadar azalma sağladığı belirtilmiştir.

Ultrasonun fermentasyon işlemi üzerindeki bu etkisi fermentatif enzimlerin aktivitesini teşvik etmesine bağlanmaktadır (Wu vd., 2001). Ultrason uygulaması ile probiyotik kültürlerin aktivitesi artırılmakta ve sonuç olarak daha yüksek canlılık, daha hızlı asit gelişimi ve fermentasyon süresinde azalma sağlanmaktadır (Guimaraes vd. 2019). Ayrıca ultrason uygulaması ile probiyotik bakterilerin membran geçirgenliği artmakta ve böylece laktoz hidrolizinden sorumlu olan hücre içi enzim β-galaktosidaz hücre dışına salınmaktadır. Bunun sonucunda da laktoz hidrolizi artmakta ve fermentasyon süresi kısaltılmaktadır (Kreft ve Jelen, 2000; Nguyen vd., 2009; Nguyen vd., 2012; Abesinghe vd., 2019).

### Probiyotik Bakteri Canlılığı

Yoğurt benzeri probiyotik fermente süt örneklerinin *L. acidophilus*, *L. casei* ve *L. rhamnosus* GG sayıları Çizelge 3'te verilmiştir. Örnekler arasında *L. rhamnosus* GG ile aşılana fermente süt ürünleri daha yüksek bakteri canlılığına sahip olup,  $9.91 \pm 0.04$  log kob/g bakteri sayısı ile ultrason uygulanan L3 grubu en yüksek değere sahiptir. Yapılan varyans analizi ve Duncan testi

sonucunda ultrason uygulamasının örneklerin probiyotik bakteri sayıları üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ( $P < 0.05$ ). Ultrason uygulanan örneklerin (L1, L2, L3) ultrason uygulanmayan kontrol örneklerine (K1, K2, K3) kıyasla daha yüksek bakteri canlılığına sahip olduğu tespit edilmiştir ( $P < 0.05$ ).

Çizelge 3. Yoğurt benzeri fermente süt ürünlerinde farklı laktobasil türlerinin probiyotik bakteri sayıları (log kob/g)

Probiyotik Bakteri Türü <i>Probiotic Bacteria Species</i>	Ultrason Uygulaması <i>Ultrasound Application</i>	Probiyotik Bakteri Canlılığı (log kob/g) <i>Probiotic Bacteria Viability (log cfu/g)</i>
<i>L. acidophilus</i>	K1	$8.99 \pm 0.02^e$
	L1	$9.36 \pm 0.02^e$
<i>L. casei</i>	K2	$8.97 \pm 0.04^e$
	L2	$9.16 \pm 0.06^d$
<i>L. rhamnosus</i> GG	K3	$9.54 \pm 0.11^b$
	L3	$9.91 \pm 0.04^a$

K1: *L. acidophilus* ile aşılana kontrol örneği, K2: *L. casei* ile aşılana kontrol örneği, K3: *L. rhamnosus* GG ile aşılana kontrol örneği, L1: 400W güçte 15 dk ultrason uygulanan ve *L. acidophilus* ilavesi sonrası 100W güçte 5 dk ultrason uygulanarak üretilen probiyotik fermente süt ürünü, L2: 400W güçte 15 dk ultrason uygulanan ve *L. casei* ilavesi sonrası 100W güçte 5 dk ultrason uygulanarak üretilen probiyotik fermente süt ürünü, L3: 400W güçte 15 dk ultrason uygulanan ve *L. rhamnosus* GG ilavesi sonrası 100W güçte 5 dk ultrason uygulanarak üretilen probiyotik fermente süt ürünü

<sup>a-c</sup>: Aynı sütündeki farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark önemlidir ( $P < 0.05$ )

K1: Control sample inoculated with *L. acidophilus*, K2: Control sample inoculated with *L. casei*, K3: Control sample inoculated with *L. rhamnosus* GG, L1: Probiotic fermented milk product produced by ultrasonication at 400W for 15 min, and after addition of *L. acidophilus*, ultrasonication at 100W for 5 min, L2: Probiotic fermented milk product produced by ultrasonication at 400W for 15 min, and after addition of *L. casei*, ultrasonication at 100W for 5 min, L3: Probiotic fermented milk product produced by ultrasonication at 400W for 15 min, and after addition of *L. rhamnosus* GG, ultrasonication at 100W for 5 min

<sup>a-c</sup>: The difference between the means indicated by different letters in the same column is significant ( $P < 0.05$ )

Ultrason uygulaması ile probiyotik bakterilerin membran geçirgenliği arttığından ultrason uygulaması metabolik süreçler üzerinde önemli etkiye sahiptir. Çalışma bulgularımız ile paralel olarak, yapılan diğer çalışmalar göstermektedir ki ultrason uygulaması bazı laktobasil suşlarının (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactocaseibacillus casei*, *Lactococcus lactis* spp *cremoris*, *Lactococcus lactis* spp *lactis*) ve bazı bifidobakteri suşlarının

(*Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*) gelişimini olumlu etkilemektedir (Mortazavi ve Tabatabaie, 2008; Nguyen vd., 2009; Ewe vd., 2012; Niamah, 2019). Ultrasonun bu etkisi probiyotik bakterilerin membran geçirgenliğini arttırmasına atfedilmektedir. Membran geçirgenliğindeki artışa bağlı olarak bakterilerin gelişmesi için gerekli olan besinlerin hücre içine taşınması ve aynı zamanda hücre içindeki artıkların hücre dışına taşınması kolaylaşmaktadır.

Bununla birlikte  $\beta$ -galaktosidaz gibi hücre içi enzimlerin hücre dışına çıkması sağlanarak hem laktoz hidrolizi hızlanmakta hem de gelişme faktörü olarak nitelendirilen bazı bileşenleri açığa çıkması sağlanmaktadır. Böylece probiyotik bakterilerin kullanabileceği besin miktarı arttığından gelişimleri teşvik edilmektedir (Nguyen vd., 2009; Nguyen vd., 2012; Guimaraes vd., 2019).

### SONUÇ

Bu çalışma, ultrason uygulamasının yoğurt benzeri probiyotik fermente süt ürünleri üretiminde kullanım potansiyelinin yüksek olduğunu ve probiyotik bakteri canlılığını arttırmada umut verici olduğunu göstermiştir. 15 dk boyunca 400 W uygulanan ve probiyotik kültür ilavesi sonrasında 5 dk boyunca 100 W uygulanan ultrason işlemi, probiyotik fermente süt ürünlerinde kontrol örneklerine kıyasla *L. acidophilus*, *L. casei* ve *L. rhamnosus* GG sayılarını arttırmıştır. Ayrıca *L. acidophilus* ve *L. casei* kültürleri ile üretilen ürünlerde fermentasyon süresini kısaltmıştır. Güvenli, basit, hızlı, enerji tasarrufu sağlayan ve toksik etkisi olmayan ultrason uygulamaları aynı zamanda çevre dostu olduğundan tüketici açısından da avantaj sağlamaktadır.

### ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarın bu makale ile ilgili olarak üçüncü şahıslarla bir çıkar çatışması yoktur.

### YAZAR KATKISI

Araştırma, kurgulama, metodoloji, analizlerin gerçekleştirilmesi, verilerin toplanması ve değerlendirilmesi, taslak hazırlama, yazma, gözden geçirme işlemlerinin tamamı Vildan Akdeniz tarafından gerçekleştirilmiştir.

### KAYNAKLAR

Abesinghe, A.M.N.L., Islam, N., Vidanarachchi, J.K., Prakash, S., Silva, K.F.S.T., Karim, M.A. (2019). Effects of ultrasound on the fermentation profile of fermented milk products incorporated with lactic acid bacteria, *International Dairy Journal*, 90: 1-14. doi:10.1016/j.idairyj.2018.10.006.

Akalın, A.S., Erisir, D. (2008). Effects of inulin and oligofructose on the rheological

characteristics and probiotic culture survival in low-fat probiotic ice cream. *Journal of Food Science*, 73(4): 184–188, doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00728.x.

Akdeniz, V., Akalın, A.S. (2017). Ultrason uygulamasının süt ürünlerinde homojenizasyon, jel yapısı, viskozite ve su tutma kapasitesi üzerine etkisi, *GIDA*, 42(6): 743-53, doi:10.15237/gida.GD17062.

Akdeniz, V., Akalın, A.S. (2022). Power ultrasound affect on physicochemical, rheological and sensory characteristics of probiotic yoghurts. *International Dairy Journal*, In press, doi:10.1016/j.idairyj.2022.105530.

Anonim (2006). Türk Gıda Kodeksi Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ, No: 2006/38, Ankara.

AOAC (2000). Official Methods of Analysis AOAC INTERNATIONAL. 17th Edition, Washington DC, USA.

AOAC (2002). Official Methods of Analysis AOAC INTERNATIONAL. Fat content of raw and pasteurized whole milk: method 2000.18, 33.2.27A, Gaithersburg, USA.

Arzeni, C., Martinez, K., Zema, P., Arias, A., Perez, O.E., Pilosof, A.M.R. (2012). Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. *Journal of Food Engineering*, 108: 463–472. doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.08.018.

Ashokkumar, M. (2015). Applications of ultrasound in food and bioprocessing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 25: 17–23. doi:10.1016/j.ultsonch.2014.08.012.

Bakr, S.A. (2015). The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4: 423–431. doi:10.1016/j.bcab.2015.09.010.

Dahroud, B.D., Mokarram, R.R., Khiabani, M.S., Hamishehkar, E., Bialvaei, A.Z., Yousefi, M., Kafil, H.S. (2016). Low intensity ultrasound increases the fermentation efficiency of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATTC 39392,

- International Journal of Biological Macromolecules*, 86: 462-67. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.01.103.
- Dave, R.I., Shah, N.P. (1998). Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt, *Journal of Dairy Science*, 81: 2804-2816.
- Dinkci, N., Akdeniz, V., Akalin, A.S. (2019). Survival of probiotics in functional foods during shelf life. In *Food Quality and Shelf Life*, 1st ed., Galanakis, C.M. (Ed.), Academic Press: Cambridge, MA, USA, pp. 201–226.
- Erkaya, T., Baslar, M., Sengül, M., Ertugay, M.F. (2015). Effect of thermosonication on physicochemical, microbiological and sensorial characteristics of ayran during storage, *Ultrasonics Sonochemistry*, 23: 406-412. doi:10.1016/j.ultsonch.2014.08.009.
- Ewe, J., Abdullah, W.W., Bhat, R., Karim, A., Liong, M., (2012). Enhanced growth of lactobacilli and bioconversion of isoflavones in biotin-supplemented soymilk upon ultrasound-treatment, *Ultrasonics Sonochemistry*, 19: 160-173, doi:10.1016/j.ultsonch.2012.01.003.
- Foysal, M.J., Fotedar, R., Siddik, M.A.B., Tay, A. (2020). *Lactobacillus acidophilus* and *L. plantarum* improve health status, modulate gut microbiota and innate immune response of marron (*Cherax cainii*). *Scientific Reports*, 10:5916, doi:10.1038/s41598-020-62655-y.
- Goldin, B. R., Gorbach, S. L., Saxelin, M., Barakat, S., Gualtieri, L., Salminen, S. (1992). Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Digestive Diseases and Sciences*, 37:121–128.
- Guimaraes, J.T., Silva, E.K., Ranadheera, C.S., Moraes, J., Raices, R.S.L., Silva, M.C., Ferreira, M.S., Freitas, M.Q., Meireles, M.A.A., Cruz, A.G. (2019). Effect of high-intensity ultrasound on the nutritional profile and volatile compounds of a prebiotic soursop whey beverage, *Ultrasonics Sonochemistry*, 55: 157–164. doi:10.1016/j.ultsonch.2019.05.004.
- Gursoy, O., Yilmaz, Y., Gokce, O., Ertan, K. (2016). Effect of ultrasound power on physicochemical and rheological properties of yoghurt drink produced with thermosonicated milk, *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28(4): 235-241. doi:10.9755/ejfa.2015-09-719.
- Higuera-Barraza, O.A., Del Toro-Sanchez, C.L., Ruiz-Cruz, S., Márquez-Ríos, E. (2016). Effects of high-energy ultrasound on the functional properties of proteins. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31: 558–562. doi:10.1016/j.ultsonch.2016.02.007.
- Jia, R., H. Chen, H. Chen, W. Ding. (2016). Effects of fermentation with *Lactobacillus rhamnosus* GG on product quality and fatty acids of goat milk yogurt. *Journal of Dairy Science*, 99:221–227, doi:10.3168/jds.2015-10114.
- Kneifel, W., Bonaparte, C. (2003). Acidophilus milk. In *Encyclopedia of food sciences and nutrition*, Caballero, B. (Ed.), Elsevier Applied Sciences Publ., UK, pp. 3-7.
- Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., Lee, D.U. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing, *Trends in Food Science and Technology*, 15: 261–266, doi:10.1016/j.tifs.2003.12.001.
- Kopeloff, N., Cheney, C. (1922). Studies on the therapeutic effect of Bacillus Acidophilus and lactose. *JAMA*, 79(8): 609–611, doi:10.1001/jama.1922.02640080011004.
- Kreft, M.E., Jelen, P. (2000). Stability and Activity of  $\beta$ -Galactosidase in Sonicated Cultures of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 as Affected by Temperature and Ionic Environments, *Journal of Food Science*, 65(8): 1364–1368.
- Lacroix, C., Yildirim, S. (2007). Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. *Current Opinion in Biotechnology*, 18:176–183, doi:10.1016/j.copbio.2007.02.002.
- Lentacker, I., De Cock, I., Deckers, R., De Smedt, S., Moonen, C. (2014). Understanding ultrasound induced sonoporation: Definitions and underlying mechanisms, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 72: 49-64, doi:10.1016/j.addr.2013.11.008.
- Matsuzaki, T., Takagi, A., Ikemura, H., Matsuguchi, T., Yokokura, T. (2007). Intestinal

- microflora: probiotics and autoimmunity. *The Journal of Nutrition*, 137(3): 798-802, doi:10.1093/jn/137.3.798S.
- Mohammadi, V., Ghasemi-Varnamkhasti, M., Ebrahimi, R., Abbasvali, M. (2014). Ultrasonic techniques for the milk production industry, *Measurement*, 58: 93–102, doi:10.1016/j.measurement.2014.08.022.
- Mortazavi, A., Tabatabaie, F. (2008). Study of ice cream freezing process after treatment with ultrasound, *World Applied Sciences Journal*, 4(2): 188–190.
- Nguyen H.T, Truong, D.H., Kouhoude, S., Ly, S., Razafindralambo, H., Delvigne, F. (2016). Biochemical Engineering Approaches for Increasing Viability and Functionality of Probiotic Bacteria. *International Journal of Moluculer Sciences*, 17:867, doi:10.3390/ijms17060867.
- Nguyen, T.M.P., Lee, Y.K., Zhou, W. (2009). Stimulating fermentative activities of bifidobacteria in milk by high intensity ultrasound, *International Dairy Journal*, 19: 410–416, doi:10.1016/j.idairyj.2009.02.004.
- Nguyen, T.M.P., Lee, Y.K., Zhou, W. (2012). Effect of high intensity ultrasound on carbohydrate metabolism of bifidobacteria in milk fermentation, *Food Chemistry*, 130: 866-74, doi:10.1016/j.foodchem.2011.07.108.
- Niamah, A.K. (2019). Ultrasound treatment (low frequency) effects on probiotic bacteria growth in fermented milk. *Future of Food: Journal on Food, Agriculture and Society* Article Number 103, doi:10.17170/kobra-20190709592.
- Pitt, W.G., Ross, S.A. (2003). Ultrasound Increases the Rate of Bacterial Cell Growth, *Biotechnology Progress*, 19: 1038-1044.
- Potoroko I., Kalinina, I., Botvinnikova, V., Krasulya, O., Fatkullin, R., Bagale, U., Sonawanw, S.H. (2018). Ultrasound effects based on simulation of milk processing properties, *Ultrasonics Sonochemistry*, 48: 463-472. doi:10.1016/j.ultsonch.2018.06.019.
- Riener, J., Noci, F., Cronin, D.A., Morgan, D.J., Lyng, J.G. (2009). The effect of thermosonication of milk on selected physicochemical and microstructural properties of yogurt gels during fermentation. *Food Chemistry*, 114: 905–911, doi:10.1016/j.foodchem.2008.10.037.
- Ryan, J., Hutchings, S.C., Fang, Z., Bandara, N., Gamlath, S., Ajlouni, S., Ranadheera, C.S. (2020). Microbial, physico-chemical and sensory characteristics of mango juice-enriched probiotic dairy drinks. *International Journal of Dairy Technology*, 73(1): 182-190, doi: 10.1111/1471-0307.12630.
- Sarkar, S. (2010). Approaches for enhancing the viability of probiotics: a review. *British Food Journal*, 112: 329–342, doi:10.1108/00070701011034376.
- Shimada, T., Ohdaira, E., Masuzawa, N. (2004). Effect of ultrasonic frequency on lactic acid fermentation promotion by ultrasonic irradiation. *Japanese Journal of Applied Physics*, 43(5S): 2831. doi:10.1143/JJAP.43.2831.
- Shori, A.B. (2016). Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: An overview based on dairy and non-dairy beverages. *Food Bioscience*, 13(1): 1–8. doi: 10.1016/j.fbio.2015.11.001.
- Sömer, V.F., Akpınar, D., Başyigit Kılıç, G. (2012). *Lactobacillus casei*'nin sağlık üzerine etkileri ve gıda endüstrisinde kullanımı. *GIDA*, 37(3): 165-172.
- Srinivasan R., Meyer, R. (2006). Clinical safety of *Lactobacillus casei* strain shirota as a probiotic in critically ill children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 42(2): 171-173, doi:10.1097/01.mpg.0000189335.62397.cf.
- Sun, J., Chen, H., Qiao, Y., Liu, G., Leng, C., Zhang, Y. Lv, X., Feng, Z. (2019). The nutrient requirements of *Lactobacillus rhamnosus* GG and their application to fermented milk. *Journal of Dairy Science*, 102: 5971-5978, doi:10.3168/jds.2018-15834.
- Tharmaraj, N., Shah, N.P. (2003). Selective Enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* and Propionibacteria.

*Journal of Dairy Science*, 86: 2288-2296, doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73821-1.

Wendakoon, C.N., Nakano, T., Remillard, S.C., Ozimek, L. (2007). Antimutagenic activity of *Lactobacillus casei* ADA 03 and its cell wall components. *Milchwissenschaft*, 62(3): 320-323.

Wu, H., Hulbert, G.J., Mount, J.R. (2001). Effects of ultrasound on milk homogenization and

fermentation with yoghurt starter, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1(3): 211–218.

Wu, H., Nyborg, W.L. (2008). Ultrasound, cavitation bubbles and their interaction with cells, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60:1103–1116.



**MADIMAKTAN (*Polygonum cognatum* Meissn.) YANIT YÜZEY YÖNTEMİ  
KULLANILARAK FENOLİK BİLEŞİK EKSTRAKSİYONUNUN  
OPTİMİZASYONU**

**Mustafa BAYRAM, Semra TOPUZ\***

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Tokat,  
Türkiye

Geliş / Received: 27.10.2022; Kabul / Accepted: 30.12.2022; Online baskı / Published online: 18.01.2023

Bayram, M., Topuz, S. (2023). Madımaktan (*Polygonum cognatum* Meissn.) yanıt yüzey yöntemi kullanılarak fenolik bileşik ekstraksiyonunun optimizasyonu. *GIDA* (2023) 48 (1) 118-129 doi: 10.15237/gida.GD22104

Bayram, M., Topuz, S. (2023). Optimization of phenolic compound extraction using response surface method from madimak (*Polygonum cognatum* Meissn.). *GIDA* (2023) 48 (1) 118-129 doi: 10.15237/gida.GD22104

**ÖZ**

Bu çalışmada, gıda olarak tüketiminin yanı sıra geleneksel halk hekimliğinde de kullanım alanı bulunan madımaktan (*Polygonum cognatum* Meissn.) fenolik bileşik ekstraksiyonunun optimizasyonu amaçlanmıştır. Bu amaçla madımaktan elde edilen fenolik ekstraktların toplam fenolik madde (TFM), toplam flavonoid (TFL) miktarı ve serbest radikali giderme aktivitesi (DPPH) üzerine metanol/su karışımı konsantrasyonu (%0-100), ekstraksiyon süresi (5-120 dk.) ve sıcaklığın (30-70 °C) etkisi araştırılmıştır. TFM, TFL ve DPPH değerleri için optimum işlem koşulları “desirability” fonksiyonu yaklaşımı ile Design Expert Programı, Box-Behnken tasarımı kullanılarak belirlenmiştir. *P. cognatum*’dan fenolik bileşik ekstraksiyonu elde etmek amacıyla yapılan çalışmada metanol konsantrasyonu %40.15, ekstraksiyon süresi 5.00 dk. ve ekstraksiyon sıcaklığı 70.00 °C optimum koşullar olarak belirlenmiştir. Optimum noktalarda elde edilen fenolik ekstraktların TFM, TFL ve DPPH değerleri sırasıyla 45.40 mg GAE/g kuru örnek, 30.36 mg KE/g kuru örnek, 53.40 mg TE/g kuru örnek olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *P. cognatum* fenolik bileşik ve antioksidan aktivite açısından zengin bir kaynaktır.

**Anahtar kelimeler:** *Polygonum cognatum* Meissn., fenolik bileşik, optimizasyon, antioksidan aktivite

**OPTIMIZATION OF PHENOLIC COMPOUND EXTRACTION USING  
RESPONSE SURFACE METHOD FROM MADIMAK (*Polygonum cognatum*  
Meissn.)**

**ABSTRACT**

In this study, it was aimed to optimize the extraction of phenolic compounds from the madimak (*Polygonum cognatum* Meissn.), which is used in traditional folk medicine as well as nutrition. For this purpose, the effects of methanol/water mixture concentration (0-100%), extraction time (5-120 min.) and temperature (30-70 °C) on total phenolic compounds (TPC), total flavonoid compounds (TFC) and free radical scavenging activity (DPPH) of phenolic extracts obtained from *P. cognatum* were determined. Optimum conditions for TPC, TFC and DPPH values were determined using the

\*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉:semra.topuz@gop.edu.tr

☎: (+90)356 252 1616

☎: (+90)356 252 1729

Mustafa Bayram; ORCID no: 0000-0002-8232-226X

Semra Topuz; ORCID no: 0000-0002-9122-0839

“desirability” function approach, using the Box-Behnken design in the Design Expert Program. In the study carried out to obtain phenolic compound extraction from *P. cognatum*, methanol concentration (40.15%), extraction time (5.00 min.) and extraction temperature (70.00 °C) were determined as optimum conditions. TPC, TFC and DPPH values of phenolic extracts obtained under optimum conditions were determined as 45.40 mg GAE/g dry sample, 30.36 mg QE/g dry sample, 53.40 mg TE/g dry sample, respectively. As a result of the obtained results, *P. cognatum* is a rich source in terms of phenolic compounds and antioxidant activity.

**Keywords:** *Polygonum cognatum* Meissn., phenolic compound, optimization, antioxidant activity

## GİRİŞ

Bugüne kadar Türkiye’de 12476 bitki taksonu bulunduğu ve bunlardan 4080 türün ise endemik olduğu belirlenmiştir. Benzersiz bir biyolojik çeşitlilik oluşturan bu türlerin birçoğu beslenme açısından da önemli bir yere sahiptir (Sefaoğlu, 2021). Ayrıca endemik bitkiler yöreye özgü yiyecek ve içeceklerin hazırlanmasında kullanıldığı gibi, geçmiş yıllardan beri bazı hastalıkların tedavisinde de “geleneksel” ve “doğal ilaç” olarak kullanılabilir (Saraç vd., 2018). Bu bitkilerden biri olan *P. cognatum* Meissn. Polygonaceae familyasına ait yenilebilir çok yıllık otsu bir bitki türüdür (Pekdemir vd., 2020; Pehlivan vd., 2021). Yörelere göre farklı şekillerde isimlendirilen bu bitkinin en yaygın adı “madımak” olmakla birlikte, bitki madımak pancarı, madımalak, badımak, badımalak, mercimelek, mercimenek ve kuş ekmeği olarak da bilinmektedir.

*P. cognatum* gövdesi toprak üstüne yatık, pembe çiçekli, yeşil yapraklı otsu yabani bir bitkidir. Bitki 15-30 cm uzunluğunda olmakla birlikte gövdesi ince ve odunsudur (Onay, 2019). Yapraklar kısa saplı, elips biçiminde ve çoğunlukla sivri uçludur (Saraç vd., 2018). Bitki deniz seviyesinden 720-3000 m yüksekliklerde, tarla ve yol kenarları, meralar, uçurumlar, yamaçlar ve sanayi alanları gibi tarımsal ve tarım dışı alanlarda doğal olarak yetişmektedir (Pekdemir, 2020). Bitki ilkbahar mevsiminde Nisan ayından başlayarak Haziran ayına kadar hasat edilmektedir. Farklı iklim koşullarına dayanıklı olan bu bitkiye Türkiye’nin Tokat, Sivas ve Erzurum illeri başta olmak üzere Anadolu’nun çeşitli yerlerinde rastlanmaktadır (Demirgöl vd., 2022). Türkiye’nin İç Anadolu Bölgesi’ndeki bazı çiftçiler şehirleşmeye bağlı olarak ticari bir ürüne dönüşmüş bu bitki için artan talebi karşılamak üzere tarımsal çalışmalara da başlamıştır (Önen vd., 2014). *P. cognatum*

bitkisinin yaprakları ve genç sürgünleri kullanılarak yapılan çorba, yahni, salata, börek gibi çok sayıda ürün bu şehirlerin yöresel yemekleri arasında yer almaktadır (Pekdemir, 2020). *P. cognatum* yetiştiği bölgelerde daha çok gıda olarak tüketilmesinin yanı sıra, yöre halkı bitkiyi geleneksel halk hekimliğinde çeşitli amaçlarla da kullanabilmektedir (Koca vd., 2018; Saraç vd., 2018). Şeker hastalığı tedavisinde, böbrek taşlarının düşürülmesinde, bronşit ve guatr hastalığının tedavisinde kullanılabildiği gibi idrar artırıcı ve damarları büzücü özelliğinden dolayı uzun süren kanamaların durdurulmasında da kullanılabilmektedir (Onay, 2019). Bu etkilerinin içeriğinde bulunan biyoaktif bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmekte fakat *P. cognatum*’un biyoaktif bileşiklerini inceleyen sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Demirgöl vd., 2022). *P. cognatum* üzerine yapılan daha önceki çalışmalarda, bu bitkinin fenolik bileşikler, C vitamini ve karotenoidleri içerdiği rapor edilmiştir (Pekdemir vd., 2020; Pehlivan vd., 2021). *P. cognatum* bitkisi kateşol, kateşin, epikateşin, kumarin, gallik asit, *p*-kumarik asit, klorojenik asit, salisilik asit, kafeik asit, gentisik asit, sinapik asit, *t*-sinnamik asit gibi fenolik bileşikler açısından da zengin bir kaynaktır (Yılar, 2007).

Literatürde *P. cognatum* bitkisinden fenolik bileşik ekstraksiyonunun optimizasyonuna yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada Tokat ve çevre illerde geleneksel halk hekimliğinde ve çeşitli yöresel yemeklerin hazırlanmasında kullanılan *P. cognatum* bitkisinden fenolik bileşik ekstraksiyonunun optimizasyonunu gerçekleştirmek amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve YÖNTEM

### Materyal

#### *Bitkisel materyal*

Araştırmada, fenolik bileşik ekstraksiyonu için kurutulmuş *P. cognatum* bitkisi Madımakçı Sebze ve Meyve Dünyası İşletmesi'nden (Merkez, Tokat) temin edilmiştir. Kurutulmuş *P. cognatum* bitkisi (% nem değeri:  $6.51 \pm 0.10$ ) ekstraksiyon işlemlerinden önce bir öğütücü yardımı ile toz forma getirilmiş ve  $0.075 \text{ mm}^2$  gözenek alanına sahip elekten geçirilmiştir. Kullanıma hazır hale getirilen toz örnek ekstraksiyon işlemine kadar cam kavanozlarda, oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda depolanmıştır.

#### *Kimyasal materyal ve kullanılan ekipmanlar*

Araştırmanın ekstraksiyon ve analiz aşamalarında etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) (Tekkim, Bursa), metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) (Tekkim, Bursa), gallik asit ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ ) (Sigma-Aldrich, Almanya), sodyum hidroksit ( $\text{NaOH}$ ) (Merck, Almanya), sodyum nitrit ( $\text{NaNO}_2$ ) (Merck, Almanya), sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Isolab, Almanya), troloks (( $\pm$ )-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilik asit) (Sigma-Aldrich, Almanya), kuersetin (BLDpharm, Çin), alüminyum klorür ( $\text{AlCl}_3$ ) (Merck, Almanya), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (Sigma-Aldrich, Almanya), Folin-Ciocalteu reaktifi (Carlo Erba, Fransa) kimyasalları kullanılmıştır.

Araştırmanın farklı basamaklarında ise UV-VIS spektrofotometre (PG Instrument, T80+, İngiltere), saf su cihazı (Merck, Millipore, Almanya), hassas terazi (Radwag, AS 220 R2, Polonya), santrifüj (Nüve, Türkiye), öğütücü (Sinbo SCM 2934, Türkiye), su banyosu (Memmert, Almanya), vorteks (Velp Scientifica, İtalya), ısıtıcı manyetik karıştırıcı (Biosan, MSH 300, Letonya) kullanılmıştır.

### Yöntem

#### *Fenolik bileşik ekstraksiyonu*

Fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için 500 mg toz haline getirilmiş *P. cognatum* örnekleri hazırlanmıştır. Farklı oranlarda hazırlanan metanol/su karışımlarından (%0-100) 10 mL alınmış ve *P. cognatum* örnekleri üzerine ilave

edilerek çalkalamalı su banyosunda karıştırılmıştır. Hazırlanan karışımlar çeşitli ekstraksiyon sürelerinde (5-120 dk.) ve sıcaklıklarında (30-70 °C) ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Ekstraksiyon işlemlerinden sonra, ekstraktlar 6000 rpm'de 5 dk. santrifüjlenmiş ve kaba filtre kağıdıyla süzülmuştür. Elde edilen filtratlar analizlerde kullanılmıştır. Deneysel tasarım Çizelge 2'de gösterilmiştir.

#### *Toplam fenolik madde tayini*

Analiz için ilk aşamada 100  $\mu\text{L}$  ekstrakt üzerine 2 N Folin-Ciocalteu reaktifi (200  $\mu\text{L}$ ) ve distile su (2 mL) ilave edilmiştir. Elde edilen bu karışım oda sıcaklığında 3 dk. bekletilmiştir. Daha sonra karışıma %20'lik  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1 mL) çözeltisi eklenmiş ve karışım vorteks ile karıştırıldıktan sonra oda koşullarında karanlık bir ortamda 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Karışımların absorbans değerleri 765 nm'de spektrofotometre ile ölçülmüştür. Örneklerin TFM değerleri, gallik asit standardı kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiği ile yapılan seyreltmeler de dikkate alınarak mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g kuru örnek olarak hesaplanmıştır (Putnik vd., 2017).

#### *Toplam flavonoid miktarı tayini*

Ekstraktların toplam flavonoid bileşik miktarı Gaafar ve Salama (2013)'nın uyguladığı metodun modifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir. 500  $\mu\text{L}$  ekstrakt üzerine 2 mL distile su ve 150  $\mu\text{L}$  %5'lik  $\text{NaNO}_2$  eklenmiştir. Oda sıcaklığında 5 dk. bekletildikten sonra karışım üzerine 150  $\mu\text{L}$  %10'luk  $\text{AlCl}_3$  çözeltisi ilave edilmiştir. Karışım 5 dk. bekletilmiş ve üzerine 1 mL 1 M  $\text{NaOH}$  çözeltisi ilave edilerek vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra karışım 1.2 mL distile su ile 5 mL'ye tamamlanmıştır. Karışımın spektrofotometrede 415 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Örneklerin toplam flavonoid miktarları kuersetin standardı kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar mg kuersetin eşdeğeri (KE)/g kuru örnek olarak ifade edilmiştir.

#### *Serbest radikal giderme aktivitesi (DPPH•)*

Analiz için ilk aşamada DPPH çözeltisi (0.06 mM) hazırlanmıştır. Sonrasında ise ekstraktların (100  $\mu\text{L}$ ) üzerine DPPH çözeltisi (3.9 mL) eklenmiş ve

kariştirme işlemi uygulanmıştır. Elde edilen karişım karanlık bir ortamda, oda sıcaklığında 30 dk. bekletilmiş ve daha sonra karişımın spektrofotometrede 517 nm’de absorbanları ölçölmüştür. Örnekerin serbest radikali giderme aktivitesi troloks standardı kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrişi kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar mg troloks eşdeğeri (TE)/g kuru örneker olarak ifade edilmiştir (Blasi vd., 2016).

*Optimizasyon ve istatistiksel analiz*

Fenolik ekstraksiyonu için bağımsız değişkenler için değer aralıklarının seçiminde ön deneme ve literatür taraması sonucu elde edilen verilerden yararlanılmıştır. Fenolik bileşik ekstraksiyonu metanol konsantrasyonu, ekstraksiyon süresi ve sıcaklık parametreleri bakımından optimize edilmiştir. Fenolik bileşik ekstraksiyonu için uygulanan bağımsız değişkenlerin değerleri sırasıyla Çizelge 1’de verilmiştir.

Çizelge 1. Fenolik bileşik ekstraksiyonunda kullanılan bağımsız değişkenler

*Table 1. Independent variables used in phenolic compound extraction*

Bağımsız Değişkenler		Sembol	-1	0	+1
Fenolik ekstraksiyonu	Metanol konsantrasyonu(%)	X <sub>1</sub>	0	50	100
	Ekstraksiyon süresi (dk.)	X <sub>2</sub>	5	62.5	120
	Sıcaklık (°C)	X <sub>3</sub>	30	50	70

En yüksek TFM, TFL ve DPPH değerlerini sağlayacak olan ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu Design Expert Programında bulunan Box-Behnken tasarımı kullanılarak geręekleřtirilmiřtir. TFM, TFL ve DPPH değerleri üzerine, ekstraksiyon işleminde kullanılan parametrelerin etkisi incelenmiş ve en yüksek TFM, TFL ve DPPH değerlerine sahip olan ekstraktı elde etmeyi sağlayacak ekstraksiyon işlemi ise ‘desirability’ fonksiyon yaklaşımı ile optimize edilmiştir. Fenolik bileşik ekstraksiyonu için optimum koşullar için seçilen model Eşitlik 1’de açıklanmıştır:

$$Y (TFM, TFL, DPPH) = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 \quad \text{Eşitlik 1}$$

Eşitlik 1’de Y bağımlı değişkenleri (TFM, TFL ve DPPH) b<sub>0</sub> sabit, b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub> ve b<sub>3</sub> lineer terimleri, b<sub>11</sub>, b<sub>22</sub> ve b<sub>33</sub> kuadratik terimleri ve X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> ve X<sub>3</sub> bağımsız değişkenleri temsil etmektedir. Deneysel olarak elde edilen veriler ile tahminlenen değerler arasında fark olup olmadığı SPSS 22.0 (IBM, ABD) paket programı tek örneker t-testi ile belirlenmiştir. TFM, TFL ve DPPH değerleri üzerine işlem değişkenlerinin etkisini belirlemede uygulanan istatistiksel analizler, regresyon analizi, optimizasyon işlemleri, yanıt yüzey grafikleri ise Design Expert (version 7.0, Stat-Ease Inc., ABD) paket programı yardımıyla geręekleřtirilmiřtir.

**BULGULAR ve TARTIşMA**

Fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda kullanılacak çözücünün türü, çözücünün ekstrakte edilecek katı maddeye oranı, çözücü ile ekstrakte edilecek maddenin teması (şahin, 2011), fenolik bileşiklerin polimerizasyon derecesi, diğer bileşenlerle etkileşimi, ekstraksiyon süresi ve sıcaklığı büyük önem arz etmektedir (Çoklar ve Akbulut, 2016). Yapılan çalışmada *P. cognatum* bitkisinden fenolik bileşik ekstraksiyonu işleminde elde edilen TFM, TFL ve DPPH değerleri üzerine metanol/su karişımı konsantrasyonu (X<sub>1</sub>: %0-100), ekstraksiyon süresi (X<sub>2</sub>: 5-120 dk.), sıcaklığın (X<sub>3</sub>: 30-70 °C) etkisi incelenmiştir. Katı-sıvı oranı yapılan ön denemeler neticesinde belirlenmiş olup, ekstraksiyon işlemi boyunca (katı-sıvı:0.5 g-10 mL) sabit tutulmuştur. *P. cognatum* örnekerinden ekstrakt eldesi farklı metanol konsantrasyonu, süre ve sıcaklıktan oluşan 17 farklı koşulda geręekleřtirilmiřtir. Bu koşullar uygulanarak elde edilen ekstraktların TFM, TFL ve DPPH değerleri ise Çizelge 2’de sunulmuştur. Ekstraktların TFM değerleri 17.58-46.11 mg GAE/g kuru örneker, TFL değerleri 14.72-31.27 mg KE/g kuru örneker, DPPH değerleri 23.47-53.71 mg TE/g kuru örneker aralığında değişkenlik göstermektedir.

TFM (46.11 mg GAE/g kuru örneker), TFL (31.27 mg KE/g kuru örneker) ve DPPH (53.71 mg TE/g kuru örneker) miktarında en yüksek değer deney

5'te (%50 (h/h), 5 dk, 70 °C) tespit edilmiştir. Literatürde, Elazığ yöresinde toplanan *P. cognatum* bitkisinin etanol, metanol, aseton ve hegzan ekstraktlarının TFM değerleri sırasıyla 24.58, 19.26, 10.76, 4.35 mg GAE/g ekstrakt olarak belirlenmiştir (Pekdemir vd., 2020). Aynı çalışmada TFL değerleri sırasıyla 0.48, 0.97, 0.40, 0.23 mg kateşin eşdeğeri (KAE)/g ekstrakt olarak tespit edilmiştir. Bir başka çalışmada %80 etanol ile ekstrakte edilen kurutulmuş *P. cognatum* bitkisinin TFM değeri 1.24 mg GAE/g olarak tespit edilmiştir (Demirgöl vd., 2022). Türkiye'nin Orta Karadeniz ve Orta Anadolu bölgelerinden toplanan *P. cognatum* bitkilerinin TFM değerleri sırasıyla 67.30 GAE mg/g ve 58.59 GAE mg/g olarak, TFL değerleri ise sırasıyla 50.88 KAE mg/g ve 32.86 KAE mg/g olarak belirlenmiştir (Marangoz, 2020). Mayıs ayında Ardahan ilinde toplanan taze *P. cognatum* bitkisinin TFM ve TFL değerleri sırasıyla 2.24 mg GAE/g, 0.26 mg rutin eşdeğeri (RE)/g olarak belirlenmiştir (Murathan, 2018).

Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre, %50 metanol konsantrasyonunda yapılan ekstraksiyon işlemlerinde TFM, TFL ve DPPH değerlerinin saf su ve %100 metanol konsantrasyonlarında gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemlerine kıyasla daha yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca aynı çizelgede saf su ile elde edilen ekstraktların TFM, TFL ve DPPH değerlerinin %100 metanol ile elde edilen ekstraktlardan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 2). Çalışmada 17 farklı koşulda ekstrakte edilen *P. cognatum* bitkisinin TFM, TFL ve DPPH değerlerinin birbirinden farklı oldukları tespit edilmiştir. Bundan dolayı verilerin optimize edilmesi gerekmektedir. Ekstraksiyon işlemleri için oluşturulan ve optimizasyon çalışmasında regresyon analizi ile elde edilen ikinci dereceden polinomial modeller TFM için Eşitlik 2, TFL için Eşitlik 3 ve DPPH için Eşitlik 4 ile verilmiştir.

$$\begin{aligned} \text{TFM (mg GAE/g)} = & 33.74 + 0.31X_1 - 0.04X_2 - \\ & 0.01X_3 + 1.23 \times 10^{-3}X_1X_2 + 2.46 \times \\ & 10^{-3}X_1X_3 - 8.71 \times 10^{-4}X_2X_3 - 5.92 \times 10^{-3}X_1^2 + \\ & 2.86 \times 10^{-4}X_2^2 + 7.58 \times 10^{-4}X_3^2 \end{aligned} \quad \text{Eşitlik 2}$$

$$\begin{aligned} \text{TFL (mg KE/g)} = & 24.30 + 0.11X_1 - 0.04X_2 + \\ & 0.04X_3 + 9.45 \times 10^{-4}X_1X_2 + 1.82 \times \\ & 10^{-3}X_1X_3 - 7.23 \times 10^{-4}X_2X_3 - 2.95 \times 10^{-3}X_1^2 + \\ & 3.72 \times 10^{-4}X_2^2 - 2.19 \times 10^{-5}X_3^2 \end{aligned} \quad \text{Eşitlik 3}$$

$$\begin{aligned} \text{DPPH (mg TE/g)} = & 32.19 + 0.71X_1 - 0.08X_2 + \\ & 0.04X_3 + 1.14 \times 10^{-3}X_1X_2 + 6.00 \times \\ & 10^{-4}X_1X_3 - 5.20 \times 10^{-4}X_2X_3 - 8.53 \times 10^{-3}X_1^2 + \\ & 4.19 \times 10^{-4}X_2^2 + 6.36 \times 10^{-4}X_3^2 \end{aligned} \quad \text{Eşitlik 4}$$

TFM, TFL ve DPPH değerleri üzerine ekstraksiyonda kullanılan işlem değişkenlerinin etkisi varyans analizi (ANOVA) çizelgesinde sunulmuştur (Çizelge 3). TFM, TFL ve DPPH analizleri için oluşturulan kuadratik modeller istatistiksel olarak %99 seviyesinde anlamlıdır ( $P < 0.01$ ). Her üç analiz için model uygunsuzluğu ise %95 seviyesinde istatistiksel olarak anlamsızdır ( $P > 0.05$ ). Model uygunsuzluğu değerlerinin istatistiksel anlamda önemsiz olması, TFM, TFL ve DPPH için oluşturulan ikinci dereceden polinomial denklemlerin başarısını göstermektedir.

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde; TFM, TFL ve DPPH için oluşturulan modellerde metanol konsantrasyonu ( $X_1$ ) ve sıcaklığın ( $X_3$ ) lineer etkisinin %95 seviyesinde anlamlı olduğu ( $P < 0.05$ ) ancak ekstraksiyon süresinin ( $X_2$ ) lineer etkisinin istatistiksel olarak bir öneminin bulunmadığı belirlenmiştir ( $P > 0.05$ ). Ayrıca TFM, TFL ve DPPH için oluşturulan modellerde metanol konsantrasyonu-süre interaksyonunun ( $X_1.X_2$ ) etkisinin %95 seviyesinde anlamlı olduğu ( $P < 0.05$ ), ekstraksiyon süresi-sıcaklık interaksyonunun ( $X_2.X_3$ ) istatistiksel olarak bir öneminin bulunmadığı bulgulanmıştır ( $P > 0.05$ ) (Çizelge 3). Metanol konsantrasyonu-sıcaklık interaksyonunun ( $X_1.X_3$ ) TFM ve TFL üzerinde önemli bir etkisi saptanırken ( $P < 0.05$ ), DPPH üzerine herhangi bir etkisi saptanmamıştır ( $P > 0.05$ ). TFM, TFL ve DPPH için oluşturulan modellerde metanol konsantrasyonunun kuadratik etkisinin ( $X_1^2$ ) önemli olduğu tespit edilirken ( $P < 0.05$ ), ekstraksiyon süresinin kuadratik etkisi ( $X_2^2$ ) ile sıcaklığın kuadratik etkisinin ( $X_3^2$ ) istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir etkisi tespit edilememiştir ( $P > 0.05$ ) (Çizelge 3).

Çizelge 2. Fenolik bileşik ekstraksiyonuna ait deneysel tasarım ve elde edilen TFM, TFL ve DPPH değerleri

Table 2. Experimental design of phenolic compound extraction and obtained TPC, TFC and DPPH values

No	MeOH (%) (X <sub>1</sub> )	Süre (dk.) (X <sub>2</sub> )	Sıcaklık (°C) (X <sub>3</sub> )	TFM (mg GAE/g kuru örnek)	TFL (mg KE/g kuru örnek)	DPPH (mg TE/g kuru örnek)
1	50	62.5	50	41.83 (±1.02)	26.11 (±0.38)	48.64 (±0.79)
2	0	120	50	30.11 (±1.02)	23.07 (±0.23)	30.37 (±0.98)
3	50	62.5	50	40.10 (±2.17)	28.96 (±1.33)	50.86 (±1.61)
4	100	62.5	70	28.43 (±0.47)	22.57 (±1.21)	31.57 (±2.74)
5	50	5	70	46.11 (±0.96)	31.27 (±0.48)	53.71 (±1.01)
6	0	62.5	30	30.88 (±1.07)	22.68 (±0.53)	28.36 (±2.15)
7	100	5	50	18.53 (±0.51)	15.58 (±0.45)	24.07 (±2.20)
8	50	120	30	41.77 (±1.29)	29.18 (±1.07)	51.64 (±0.64)
9	100	62.5	30	17.58 (±0.84)	14.72 (±0.30)	23.47 (±2.48)
10	50	5	30	39.47 (±0.53)	27.33 (±0.24)	51.31 (±1.28)
11	0	5	50	33.86 (±1.46)	24.66 (±0.87)	34.54 (±0.97)
12	100	120	50	28.87 (±0.37)	24.86 (±0.80)	33.01 (±0.61)
13	50	120	70	44.40 (±1.91)	29.79 (±1.43)	51.64 (±0.86)
14	50	62.5	50	42.32 (±0.22)	28.77 (±0.27)	50.92 (±0.65)
15	0	62.5	70	31.91 (±0.41)	23.24 (±0.36)	34.06 (±0.66)
16	50	62.5	50	42.50 (±0.81)	28.99 (±0.37)	51.34 (±0.75)
17	50	62.5	50	41.69 (±0.90)	28.04 (±0.78)	50.41 (±0.42)

Çizelge 3. TFM, TFL ve DPPH değerleri için lineer, kuadratik ve interaksiyon terimlerinin etkisini gösteren ANOVA tablosu

Table 3. ANOVA table showing the effect of linear, quadratic and interaction terms for TPC, TFC and DPPH values

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı			Kareler Ortalaması		
		TFM	TFL	DPPH	TFM	TFL	DPPH
Model	9	1201.49	338.07	2026.54	133.50	37.56	225.17
X <sub>1</sub>	1	139.15	31.70	28.92	139.15	31.70	28.92
X <sub>2</sub>	1	6.46	8.13	1.15	6.46	8.13	1.15
X <sub>3</sub>	1	55.97	21.00	32.80	55.97	21.00	32.80
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1	49.63	29.50	42.97	49.63	29.50	42.97
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	1	24.13	13.28	1.44	24.13	13.28	1.44
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	1	4.01	2.76	1.44	4.01	2.76	1.44
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	921.09	228.20	1914.45	921.09	228.20	1914.45
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1	3.77	6.36	8.10	3.77	6.36	8.10
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	1	0.39	0.00032	0.27	0.39	0.00032	0.27
Kalıntı	7	8.94	14.71	26.03	1.28	2.10	3.72
Model Uygunsuzluğu	3	5.34	8.78	21.57	1.78	2.93	7.19
Saf Hata	4	3.60	5.93	4.46	0.90	1.48	1.11
Toplam	16	1210.42	352.78	2052.57			

Çizelge 3. Devam

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	F Değeri			P-Değeri		
		TFM	TFL	DPPH	TFM	TFL	DPPH
Model	9	104.57	17.88	60.56	< 0.0001	0.0005	< 0.0001
X <sub>1</sub>	1	108.99	15.09	7.78	< 0.0001	0.0060	0.0270
X <sub>2</sub>	1	5.06	3.87	0.31	0.0592	0.0899	0.5958
X <sub>3</sub>	1	43.84	10.00	8.82	0.0003	0.0159	0.0208
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1	38.87	14.04	11.56	0.0004	0.0072	0.0114
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	1	18.90	6.32	0.39	0.0034	0.0402	0.5534
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	1	3.14	1.32	0.39	0.1195	0.2891	0.5534
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	721.48	108.61	514.93	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1	2.95	3.03	2.18	0.1295	0.1255	0.1835
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	1	0.30	0.00015	0.073	0.5990	0.9905	0.7945
Kalıntı	7						
Model Uygunsuzluğu	3	1.98	1.97	6.45	0.2596	0.2601	0.0518
Saf Hata	4						
Toplam	16						

TFM, TFL ve DPPH için oluşturulan modelin, regresyon katsayısı (R<sup>2</sup>), düzeltilmiş regresyon katsayısı (Adj-R<sup>2</sup>) 1 değerine oldukça yakındır. Bu durum tahmin edilen değerler ve gerçek değerler arasında mükemmel bir korelasyon olduğunun göstergesidir. Ayrıca elde edilen düşük varyasyon katsayısı (CV) değerleri, deneysel sonuçların

kesinliğini ve güvenilirliğini göstermektedir. Çizelge 3 ve Çizelge 4'te belirtilen sonuçlar doğrultusunda önerilen modellerin, *P. cognatum* bitkisinden fenolik bileşik ekstraksiyonunun optimizasyonu için uygun olduğu anlaşılmaktadır.

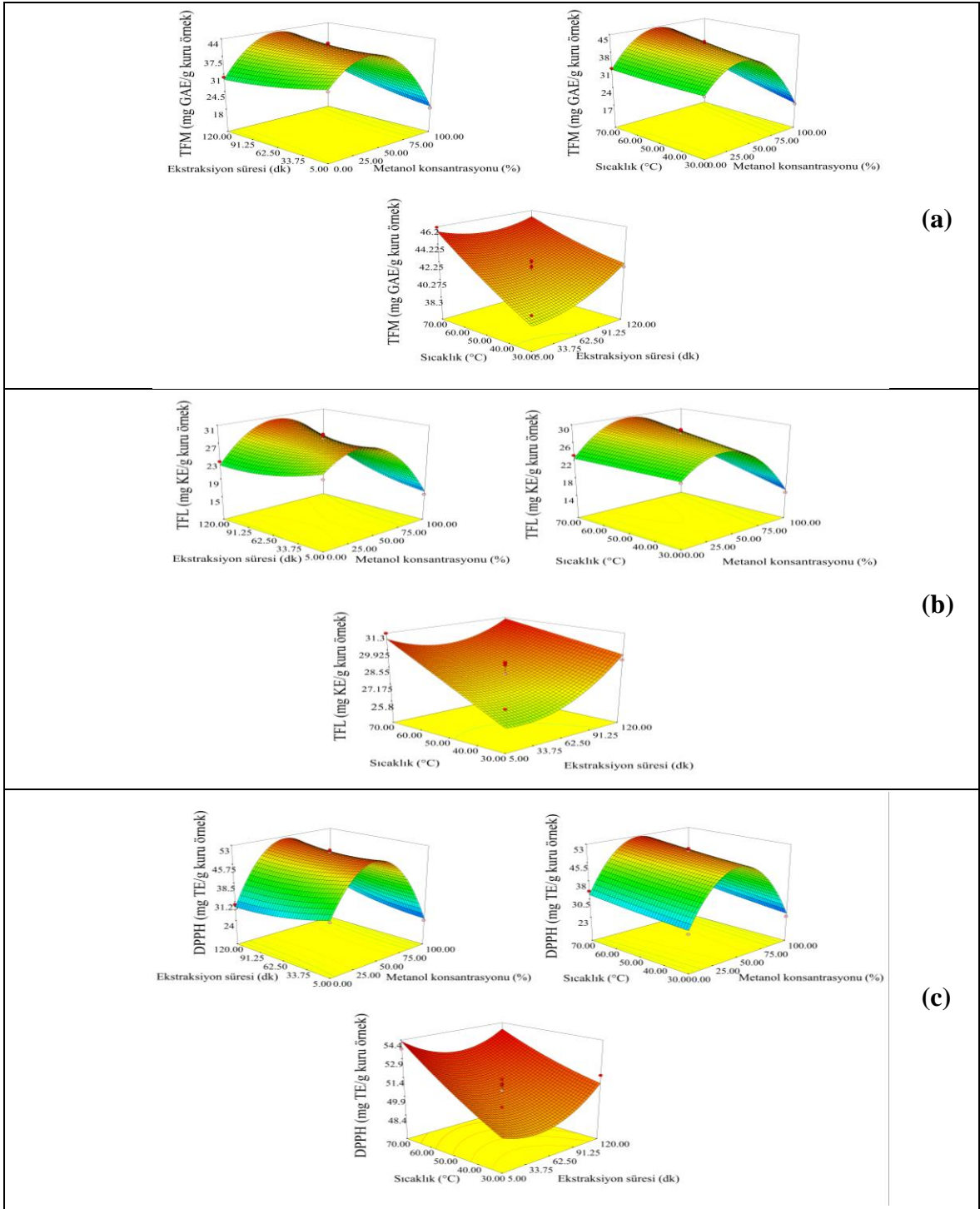
Çizelge 4. TFM, TFL ve DPPH değerleri için elde edilen istatistiksel parametreler  
Table 4. Statistical parameters obtained for TPC, TFC and DPPH values

Parametre	TFM	TFL	DPPH
R <sup>2</sup>	0.9926	0.9583	0.9873
Adj- R <sup>2</sup>	0.9831	0.9047	0.9710
Yeterli Tahminleme	32.030	14.231	19.936
PRESS	91.02	149.69	352.05
C.V (%)	3.20	5.73	4.68

Şekil 1'de *P. cognatum* bitkisinden elde edilen ekstraktların TFM, TFL ve DPPH değerlerine metanol konsantrasyonu, ekstraksiyon süresi ve sıcaklığın etkisini gösteren 3D yanıt-yüzey grafikleri gösterilmiştir.

Sabit sıcaklıkta (ekstraksiyon sıcaklığı için orta nokta: 50 °C sıcaklık) süre ve metanol konsantrasyonu değişiminin TFM, TFL ve DPPH üzerine etkisi incelendiğinde, metanol konsantrasyonunda ki artışın TFM, TFL ve DPPH değerlerini arttırdığı ama belli bir

aşamadan sonra ise azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. Sabit ekstraksiyon süresinde (ekstraksiyon süresi: 62.5 dk.) sıcaklık ve metanol konsantrasyonu değişiminin TFM, TFL ve DPPH üzerine etkisi de sabit sıcaklıkta olan değişime benzer şekildedir. Sabit çözücü konsantrasyonunda (metanol konsantrasyonu için orta nokta: %50 metanol konsantrasyonu) sıcaklık ve ekstraksiyon süresi değişiminin TFM, TFL ve DPPH üzerine etkisi incelendiğinde ise sıcaklık ve metanol konsantrasyonunda ki artışın TFM, TFL ve DPPH değerlerini arttırdığı tespit edilmiştir.



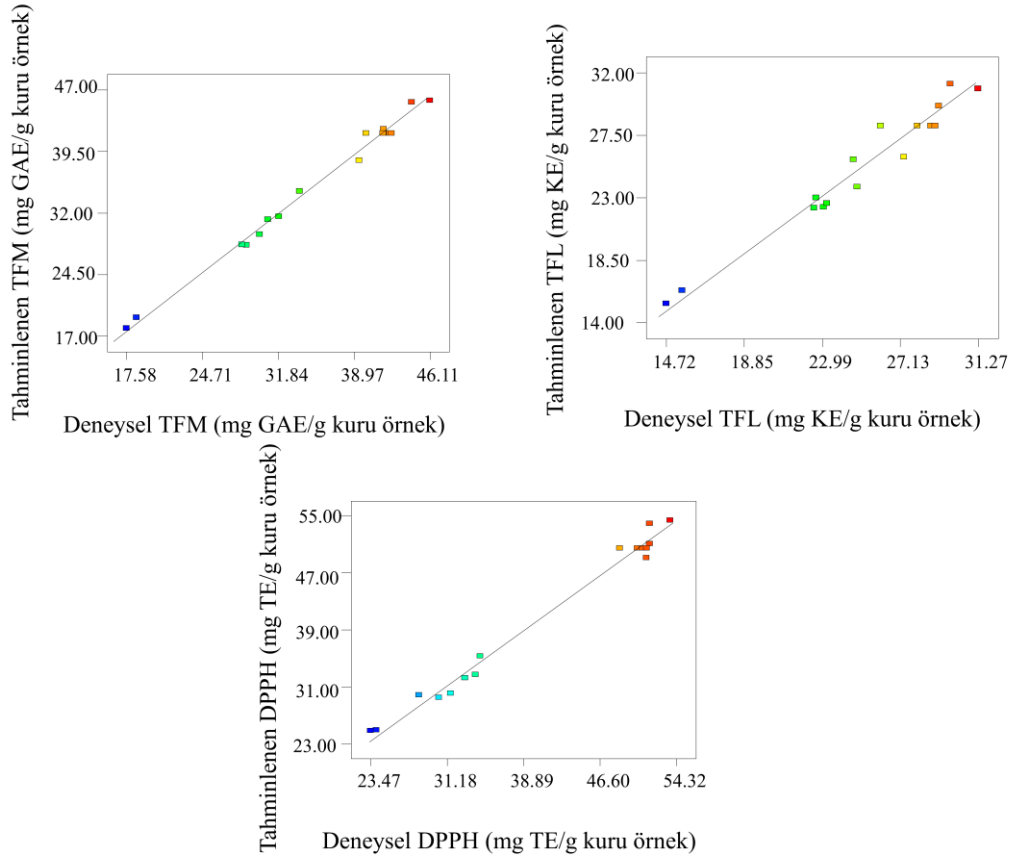
Şekil 1. *P. cognatum* bitkisinden fenolik ekstraksiyonu sonucu elde edilen TFM (a), TFL (b) ve DPPH (c) değerlerine ekstraksiyon parametrelerinin etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri

Figure 1. Response surface graphs showing the effect of extraction parameters on TPC (a), TFC (b) and DPPH (c) values obtained as a result of phenolic extraction from *P. cognatum* plant



Şekil 2’de ise TFM, TFL ve DPPH değerleri için deneysel verilerden elde edilen veriler ile program tarafından oluşturulan polinomial modellerden tahminlenen veriler kıyaslanmıştır. Elde edilen grafikler değerlendirildiğinde tahminlenen veriler

ile deneysel verilerin 45° doğrusu üzerinde toplanma eğiliminde olduğu belirlenmiştir. Bu durum oluşturulan modellerin uygunluğunu desteklemektedir.



Şekil 2. TFM, TFL ve DPPH değerleri açısından deneysel veriler ile tahminlenen veriler arasındaki ilişki  
Figure 2. Relationship between experimental data and predicted data in terms of TPC, TFC and DPPH values

*P. cognatum* bitkisinden ekstraksiyon işlemi ile yüksek miktarda TFM, TFL değeri ve DPPH aktivitesi elde edilmesi için yapılan optimizasyon çalışmasında program tarafından tahmin edilen optimum koşullar tespit edilmiştir. Program tarafından “desirability” fonksiyonu yaklaşımına göre optimum noktayı belirleyen ve birbirine oldukça yakın olan 10 adet çözüm noktası tespit edilmiştir. Önerilen bu çözümlerden programın seçtiği %40.15 metanol konsantrasyonu, 5.00 dk., 70.00 °C sıcaklık ekstraksiyon için optimum işlem koşulları olarak belirlenmiştir (Çizelge 5).

Literatürde, *Salvia officinalis* L. bitkisinden klasik çözücü ekstraksiyon yöntemiyle fenolik bileşik ekstraksiyonu için optimum ekstraksiyon koşulları; %60 etanol konsantrasyonu, 53.93 °C sıcaklık, 84.84 dk. ekstraksiyon süresi olarak tespit edilmiştir (Yağcıoğlu, 2015). Yeşil çay fabrika atıklarından fenolik bileşik ekstraksiyonu için optimum koşullar ise %62.63 etanol konsantrasyonu, 51.51 °C sıcaklık, 39.34 dk. olarak belirlenmiştir (Bostancı, 2016). *Psidium myrtoides* meyvesinden fenolik bileşik ekstraksiyonu için optimum koşullar %40 etanol

konsantrasyonu, 50 °C sıcaklık, 30 dk. olarak (Freitas, 2021), portakal yapraklarından fenolik bileşik ekstraksiyonu için optimum işlem koşulları

ise %90 metanol konsantrasyonu, 60 °C sıcaklık, 180 dk. olarak belirlenmiştir (Uysal vd., 2018).

Çizelge 5. Optimizasyon koşulları ve optimum koşullarda elde edilen ekstraktın TFM, TFL ve DPPH sonuçları

Table 5. Optimization conditions and TPC, TFC and DPPH results of the extract obtained under optimum conditions

Optimum Koşullar		
Metanol konsantrasyonu (%)	Ekstraksiyon süresi (dk.)	Sıcaklık (°C)
40.15	5.00	70.00
Optimum Koşullarda Program Tarafından Tahminlenen Değerler		
TFM (mg GAE/g kuru örnek)	TFL (mg KE/g kuru örnek)	DPPH (mg TE/g kuru örnek)
46.14	31.12	54.39
Optimum Koşullarda Deneysel Verilerden Elde Edilen Değerler		
TFM (mg GAE/g kuru örnek)	TFL (mg KE/g kuru örnek)	DPPH (mg TE/g kuru örnek)
45.40±0.79	30.36±0.81	53.40±0.63

*P. cognatum* bitkisinden fenolik bileşik ekstraksiyonunda (%40.15 metanol konsantrasyonu, 5.00 dk., 70.00 °C sıcaklık) TFM, TFL ve DPPH değerleri sırası ile 46.14 mg GAE/g kuru örnek, 31.12 mg KE/g kuru örnek, 54.39 mg TE/g kuru örnek olarak tahminlenmiştir. TFM, TFL ve DPPH değerleri için üç tekrarlı optimum nokta doğrulama denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu denemeler neticesinde değerler sırası ile 45.40 mg GAE/g kuru örnek, 30.36 mg KE/g kuru örnek, 53.40 mg TE/g kuru örnek olarak tespit edilmiştir. Elde edilen deneysel veriler ile tahminlenen veriler arasında tek örnek t-testi gerçekleştirilmiş ve değerler arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmadığı belirlenmiştir ( $P > 0.05$ ).

## SONUÇ

Bitkisel materyallerden fenolik bileşiklerin ekstrakte edilmesi sürecinde, ekstraksiyon etkinliğini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörlerin belirlenmesinde ve ekstraksiyon işlemi için uygun deneysel tasarımın oluşturulmasında yanıt-yüzey yöntemi etkin bir şekilde kullanılabilir. Bu çalışma ile *P. cognatum* bitkisinden fenolik bileşik ekstraksiyonu üzerine metanol konsantrasyonu, ekstraksiyon süresi ve sıcaklığın etkisi belirlenmiş, bu parametrelerin en yüksek TFM, TFL ve DPPH değerlerinin elde edildiği noktada optimizasyonu sağlanmıştır. Optimizasyon çalışmalarının sonunda *P. cognatum* bitkisinden fenolik bileşik

ekstraksiyonu için %40.15 metanol konsantrasyonu, 5.00 dk., 70.00 °C optimum koşullar olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde *P. cognatum* bitkisinin yüksek miktarda fenolik bileşik ihtiva ettiği ve antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ekstraksiyon işlemleri neticesinde elde edilecek *P. cognatum* ekstraktının sahip olduğu biyoaktiviteden dolayı gıdalarda kullanım potansiyelinin bulunabileceği belirlenmiştir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar, bu araştırma makalesi ile ilgili olarak başka kişiler ve/veya kurumlar arasında çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

## YAZAR KATKILARI

Mustafa BAYRAM çalışma konusunun belirlenmesinde, deney tasarımının oluşturulmasında, verilerin değerlendirilmesinde ve makale taslağının oluşturulmasında, kontrolünde katkı sağlamıştır. Semra TOPUZ deney tasarımının oluşturulmasında, analizlerin planlanması ile gerçekleştirilmesinde ve makale metninin oluşturulmasında görev almıştır.

## KAYNAKLAR

Blasi, F., Urbani, E., Simonetti, M.S., Chiesi, C., Cossignani, L. (2016). Seasonal variations in antioxidant compounds of *Olea europaea* leaves

- collected from different Italian cultivars. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 89: 202-207.
- Bostancı, Ş. (2016). Yeşil çay fabrika atıklarından farklı yöntemlerle antioksidan bileşiklerin ekstraksiyonu. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim, Dalı Doktora Tezi, Samsun, Türkiye, 184 s.
- Çoklar, H., Akbulut, M. (2016). Alıç (*Crataegus orientalis*) meyvesinin antioksidan aktivitesi ve fenolik bileşiklerinin ekstraksiyonu üzerine farklı çözümlerin etkisi. *Derim* 33(2): 237-248.
- Demirgöl, F., Divriklioğlu-Kundak, M., Sağdıç, O. (2022). Bioactive properties, antibacterial activity, and color features of *Polygonum cognatum*: The effects of frozen storage and cooking process. *Food Science and Technology*, 42.
- Freitas, T.S.M., de Rodrigues, G.M., Fakhouri, F.M., da Silva, C., Cardoso, C.A.L., Velasco, J.I., Filgueiras, C.T., dos Santos Garcia, V.A. (2021). Application of the Box-Behnken experimental design for the extraction of phenolic compounds from araçá-roxo (*Psidium myrtilloides*). *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(3): e15260.
- Gaafar, A.A., Salama, Z.A. (2013). Phenolic compounds from artichoke (*Cynara scolymus* L.) by-products and their antimicrobial activities. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 3(12): 1-6.
- Koca, İ., Lüle, F., Koyuncu, T. (2018). Effect of microwave and hot-air drying techniques on the color properties and specific energy requirement of madımak plants (*Polygonum cognatum* Meissn.). *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 12(36): 123-132.
- Marangoz, N. (2020). Türkiye'nin farklı bölgelerinden temin edilen madımak örneklerinin bazı biyoaktif özelliklerinin belirlenmesi. Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Türkiye, 56 s.
- Murathan, Z.T. (2018). Kuzeydoğu Anadolu Bölgesi ekolojik koşullarında yetişen bazı tıbbi bitkilerin biyokimyasal içeriği ve antioksidan özelliklerinin belirlenmesi. *Balikesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20(2): 51-60.
- Onay, E. (2019). Diyabetik ratlarda madımak (*Polygonum cognatum* Meissn.) etanol ekstraktının bazı biyokimyasal parametreler ve histopatolojik değişimler üzerine etkisi. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum, Türkiye, 108 s.
- Önen, H., Altuntaş, E., Özgöz, E., Bayram, M., Özcan, S. (2014). Moisture effect on physical properties of knotweed (*Polygonum cognatum* Meissn.) seeds. *Gaziösmenpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 31(2): 15-24.
- Pehlivan, M., Çöven, H.İ.K., Cerci, B., Eldem, A., Öz, T., Savlak, N., Soyöz, M., Pirim, İ. (2021). The cytotoxic effect of *Polygonum cognatum* and chemotherapeutic effect of doxorubicin on glioblastoma cells. *European Journal of Therapeutics*, 27(1): 50-54.
- Pekdemir, S., Çiftçi, M., Karatepe, M. (2020). Elazığ'da yetişen *Polygonum cognatum* Meissn (madımak) bitki ekstraktlarının in vitro biyolojik aktiviteleri ve bazı fitokimyasal bileşenlerinin belirlenmesi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 18: 368-378.
- Putnik, P., Barba, F. J., Španić, I., Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V., Kovačević, D.B. (2017). Green extraction approach for the recovery of polyphenols from Croatian olive leaves (*Olea europaea*). *Food and Bioproducts and Processing*, 106: 19-28.
- Saraç, H., Daştan, T., Demirbaş, A., Daştan, S.D., Karaköy, T., Durukan, H. (2018). Madımak (*Polygonum cognatum* Meissn.) bitki özütlerinin besin elementleri ve in vitro antikanserijen aktiviteleri yönünden değerlendirilmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 340-347.
- Sefaoğlu, F. (2021). Halk ilacı çiriş (*Asphodelus aestivus*). *Doğanın İnsanlığa Sunduğu Tıbbi Bitkiler*, Gül, V. (Ed.), İksad Yayınevi, Ankara, Türkiye, s. 81-101.
- Şahin, S. (2011). Zeytin ağacı yapraklarından süperkritik-CO<sub>2</sub> ile ekstrakt eldesi ve bileşimindeki oleuropein miktarının incelenmesi.

İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul, Türkiye, 212 s.

Uysal, S., Cvetanović, A., Zengin, G., Đurović, S., Zeković, Z., Aktumsek, A. (2018). Effects of orange leaves extraction conditions on antioxidant and phenolic content: Optimization using response surface methodology. *Analytical Letters*, 51(10): 1505-1519.

Yağcıoğlu, P. (2015). Farklı ekstraksiyon metotları ile adaçayı (*Salvia officinalis* L.) bitkisinden

antioksidan ekstraksiyonunun optimizasyonu. İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, Türkiye, 121 s.

Yılar, M. (2007). *Polygonum cognatum* Meissn. (madımdak)'in allelopatik potansiyelinin belirlenmesi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Tokat, Türkiye, 87 s.

## KARALAHNA ŞARAPLARININ FENOLİK BİLEŞENLERİ ÜZERİNE FERMANTASYON TEKNİĞİ VE ŞİŞEDE DEPOLAMANIN ETKİSİ

Burcu ŞİŞLİ<sup>1</sup>, Nesrin Merve ÇELEBİ UZKUÇ<sup>1</sup>,  
Aslı BAYHAN<sup>2</sup>, Ayşegül KIRCA TOKLUCU<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Çanakkale, Türkiye  
<sup>2</sup>Vinero Bağcılık, Kumköy, Eceabat, Çanakkale, Türkiye

Geliş / Received: 05.10.2022; Kabul / Accepted: 30.12.2022; Online baskı / Published online: 19.01.2023

Şişli, B., Çelebi-Uzkuç, N.M., Bayhan, A., Kırca-Toklucu, A. (2023). Karalahna şaraplarının fenolik bileşenleri üzerine fermantasyon tekniği ve şisede depolamanın etkisi. *GIDA* (2023) 48 (1) 130-143 doi: 10.15237/gida.GD22095

Şişli, B., Çelebi-Uzkuç, N.M., Bayhan, A., Kırca-Toklucu, A. (2023). Effect of fermentation technique and bottle storage on the phenolic components of Karalahna wines. *GIDA* (2023) 48 (1) 130-143 doi: 10.15237/gida.GD22095

### ÖZ

Bu çalışmada, ticari maya ve spontan fermantasyon teknikleri ve 6 ay şisede depolamanın Karalahna şaraplarının fenolik madde profilleri ve renk özellikleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Ticari maya fermantasyonu ile elde edilen şarapların toplam monomerik antosiyanin miktarının, spontan fermantasyonla üretilen şaraplara göre istatistiksel açıdan daha yüksek olduğu saptanmıştır. Malvidin-3-glikozit konsantrasyonunun, alkol fermantasyonu sonunda ticari maya ile üretilen örneklerde yaklaşık %35 daha fazla olduğu belirlenmiştir. Şarapların fenolik bileşik kompozisyonu da uygulanan fermantasyon tekniğine bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Genel olarak, ticari maya ile üretilen şaraplarda fenolik bileşiklerin konsantrasyonlarının spontan fermantasyonla üretilen şaraplara kıyasla daha yüksek olduğu bulunmuştur. Depolama süreci sonunda monomerik antosiyaninlerin her iki fermantasyon tekniğinde de yaklaşık %70 düzeyinde azaldığı belirlenirken, şarapların toplam fenolik madde miktarlarında istatistiksel açıdan bir fark görülmemiştir.

**Anahtar kelimeler:** Karalahna, kırmızı şarap, antosiyanin, fenolik, renk

## EFFECT OF FERMENTATION TECHNIQUE AND BOTTLE STORAGE ON THE PHENOLIC COMPONENTS OF KARALAHNA WINES

### ABSTRACT

In this study, the effects of commercial yeast and spontaneous fermentation techniques and 6 months of storage in bottles on the phenolic profile and color properties of Karalahna wines were investigated. It was determined that the total monomeric anthocyanin content of wines produced by commercial yeast fermentation was statistically higher than the wines produced by spontaneous fermentation. The concentration of malvidin-3-glycoside was found to be approximately 35% higher in samples produced with commercial yeast at the end of alcoholic fermentation. The phenolic composition of wines also changed depending on the fermentation technique. In general,

\*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: aysegulkirca@comu.edu.tr

☎: (+90) 286 218 0018-20061

☎: (+90) 286 218 0541

Burcu Şişli; ORCID no: 0000-0003-4888-2383

Nesrin Merve Çelebi Uzkuç; ORCID no: 0000-0001-8822-7864

Aslı Bayhan; ORCID no: 0000-0002-7867-1950

Ayşegül Kırca Toklucu; ORCID no: 0000-0001-9293-9063

concentrations of phenolic compounds were found to be higher in wines produced with commercial yeast compared to spontaneously fermented wines. At the end of the storage, it was determined that monomeric anthocyanins were reduced by approximately 70% in both fermentation techniques, while there was no statistical difference in the total phenolic content of the wines.

**Keywords:** Karalahna, red wine, anthocyanin, phenolic, color

### GİRİŞ

Fenolik bileşikler, kırmızı şaraplarda renk, burukluk ve acılıktan sorumlu olup, kaliteyi etkileyen en önemli unsurlardan biridir (Ribéreau-Gayon vd., 2006). Kardiyovasküler hastalıklara ve kansere karşı etkileri sebebiyle fenoliklerce zengin şaraplara olan ilgi daha fazladır (Dell'Agli vd., 2004). Kırmızı şarapta renk, fenolik bileşikler olan antosiyaninler ve türevlerinden ileri gelmekte olup, en önemli kalite karakteristiklerinden biridir (Busse-Valverde vd., 2013). Antosiyaninler üzüm kabuklarından, kırmızı şarap üretimi sırasında maserasyon ve mayşe fermantasyonu işlemi ile şaraba geçmektedir. Üzümlerin antosiyanin kompozisyonu çeşide, bağcılık uygulamalarına, iklim gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Caridi vd., 2017). Kırmızı şaraplardaki temel antosiyaninler; malvidin-3-glukozit, siyanidin-3-glukozit, peonidin-3-glukozit, petunidin-3-glukozit ve delfinidin-3-glukozittir. Bunlar arasında malvidin-3-glukozit hâkim antosiyanin olup, konsantrasyonu toplam antosiyaninlerin %90'ına kadar ulaşabilmektedir (Ribéreau-Gayon vd., 2006). Genç şaraplarda kırmızı renk monomerik antosiyaninlerden ileri gelirken, olgunlaşma ile beraber daha stabil polimerik bileşikler oluşmaktadır. Monomerik antosiyaninler stabil olmayıp, oksidasyona karşı oldukça hassastır. Şarap üretimi sırasında ve olgunlaşma süreciyle birlikte, monomerik antosiyaninler kopigmentasyon, flavan-3-oller (kateşin, epikateşin) ve proantosiyanidinlerin polimerizasyonu ve yeni pigmentlerin oluşumu gibi çeşitli reaksiyonlara dahil olurlar. Böylece, genç şaraptaki kırmızı-mor renk tonları, olgun şarapların kırmızı-turuncu rengine evrilmektedir (Caridi vd., 2017).

Şarabın fenolik profili, üzümün çeşidine ve bağcılık uygulamalarına göre değişebilmekle beraber, üretim teknikleri ve kullanılan maya seçimi gibi işlemler ile iyileştirilebilmektedir (Lesko vd., 2014; Ribéreau-Gayon vd., 2006). Mayaların yapısında bulunan mannopteinler,

şarap fenolikleri ile birleşerek renk stabilitesini artırabilmekte ve tanenlerin burukluk hissini azaltabilmektedir (Escot vd., 2001). Bu mekanizma, özellikle antosiyaninler ve maya hücre duvarları arasında fiziksel etkileşimle ve adsorpsiyon yoluyla gerçekleşebilmektedir (Caridi vd., 2017).

Şarap üretimi, teknolojik özellikleri belli olan seçilmiş saf maya suşları kullanılarak yapılabildiği gibi, endojen mikroflora ile spontan olarak da gerçekleştirilebilmektedir. Spontan fermantasyon, yerel florada bulunan *Saccharomyces* ve *Saccharomyces* dışındaki mayaların farklı suşları tarafından gerçekleştirilen karmaşık mikrobiyal bir süreçtir. Fermantasyonda faaliyet gösteren maya tür ve suşları elde edilen şarabın karakteristik aroma profili üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Blazquez Rojas vd., 2012; Carrascosa vd., 2012; Gammacurta vd., 2014; Takush & Osborne, 2012; Varela vd., 2009). Antosiyaninler ve şarabın diğer fenolik bileşikleri de fermantasyonda yer alan maya tür ve suşlarına bağlı olarak değişebilmekte, mayalar daha stabil pigmentlerin oluşumunda etkili olabilmektedir (Carew vd., 2013; Blazquez Rojas vd., 2012). Maya hücre duvarlarına bağlanan antosiyaninler, fermantasyon sonunda tortu ile birlikte uzaklaşarak kaybedilmektedir. Ayrıca, farklı maya suşlarının hücre duvarı yapısına bağlı olarak, antosiyanin adsorpsiyonunda da farklılık gösterdikleri belirlenmiştir (Morata vd., 2016). Daha detaylı araştırmalar, açillenmiş antosiyaninlerin açillenmemiş antosiyaninlere göre daha güçlü bir şekilde adsorbe edildiğini göstermektedir. Öte yandan, daha yüksek metoksilasyon derecesine sahip antosiyaninlerin daha yüksek hidroksillenmiş antosiyaninlere göre daha güçlü adsorbe olduğu saptanmıştır (He vd., 2012). Metoksilasyon derecesi, antosiyanini daha apolar hale getirir ve stabilitesini artırır (Morata vd., 2019). Bu da adsorpsiyon mekanizmasının hidrofobik bir etkileşim olduğunu göstermektedir (He vd., 2012). Fermantasyon sırasında, mayaların etanol üretmesi nedeniyle üzüm şirasının

polaritesi değişmekte ve antosiyaninlerin çözünürlüğünün azalmasıyla renk kayıpları meydana gelebilmektedir. Ayrıca, antosiyaninlerin polimerizasyonu da renk maddelerinin çökmesine yol açabilmektedir (Morata vd., 2016).

Şarap, üretimin son aşamasında şişelenir ve tüketileceği zamanki kalitesi de bu aşamadaki özelliklerine ve depolama koşullarına bağlıdır. Bu nedenle, depolama sırasında genel olarak fenolik bileşikler ve özeldede antosiyaninler, flavonoller, flavanoller ve fenolik asitler kırmızı şarabın renk stabilizasyonunda anahtar rol oynarlar (García-Falcón vd., 2007). Olgunlaşma sürecinde şarap uçucu ve fenolik bileşikleri; hidroliz, esterleşme, polimerizasyon vb. reaksiyonlardan dolayı yavaş yavaş değişikliklere uğrarlar (Echave vd., 2021). Şarabın bileşimi ve kalitesini belirleyen bu reaksiyonlar, şişeleme sırasındaki başlangıç bileşimi, kükürtdioksit (SO<sub>2</sub>) seviyesi, depolama koşulları, depolama sıcaklığı, yıllandırma süresi, ışığa maruz kalma ve kapatma türü gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Bu nedenle, şarabın bileşimi ve kalitesi için maya suşu ve şişede olgunlaştırmanın önemi göz önüne alındığında, bu iki faktörün birlikte incelenmesi gereklidir (Garde-Cerdán vd., 2022).

Karalahna Çanakkale'ye özgü kırmızı şaraplık bir üzüm çeşididir. Bölgede uzun yıllar kanyaklık üzüm olarak değerlendirilmiş ve koyu yakut rengi ile şarapların rengini güçlendirmek amacıyla kullanılmıştır (Anlı, 2006). Literatürde, Karalahna şarabının genel kalite karakteristikleri üzerine sınırlı sayıda çalışma bulunmakla birlikte (Doyuran ve Güven, 2006; Ataol, 2012), fermantasyon tekniği ve depolamanın antosiyanin profili üzerine etkileri hakkında bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yakın zamanda ekibimizin gerçekleştirdiği ve fermantasyon tekniğinin Karalahna şarabının uçucu bileşen kompozisyonu ve duyuşal özelliklerine etkisinin ortaya konulduğu bir çalışmamız literatürde yer almaktadır (Çelebi Uzkuç vd., 2020).

Bu çalışmanın amacı, yerli üzüm çeşidimiz Karalahna'dan spontan ve saf maya fermantasyonu yoluyla üretilen kırmızı şarapların

genel özellikleri, toplam monomerik antosiyanin ve toplam fenolik madde içerikleri ile antosiyanin ve renksiz fenolik madde profillerinin karşılaştırılması ve 6 ay şişede depolama süresince bu bileşiklerde meydana gelen değişimlerin belirlenmesidir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

Bu çalışmada Bozcaada'ya özgü kırmızı bir üzüm çeşidi olan Karalahna (*Vitis vinifera* Linné subsp. *vinifera*) kullanılmıştır. Üzümler, Bozcaada'da bulunan bağlardan uygun hasat zamanında elle hasat edilerek şarap işletmesine (Vinero Şarap; Eceabat) getirilmiş ve burada kırmızı şaraba işlenmiştir. Karalahna şarasının briks değeri 25.2, pH değeri 3.15 ve titrasyon asitliği değeri 6.64 g/L olup, daha detaylı özellikleri Çelebi Uzkuç vd. (2018)'de sunulmuştur. Ticari maya fermantasyonunda *S. cerevisiae* suşu kullanılmıştır (Zymaflore FX10, Laffort, Fransa). Şarapların kükürtlenmesi amacıyla potasyum metabisülfid tuzunun (K<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>) %5'lik çözeltisi kullanılmıştır.

### Şarap Üretimi

Çanakkale Bozcaada'da bulunan "Talay Şarapçılık" bünyesine bağlı bağlardan elle hasat edilerek şarap işletmesine (Vinero Şarap; Eceabat) getirilen Karalahna üzümleri, burada kırmızı şaraba işlenmiştir. Üretimde spontan fermantasyon ve saf maya fermantasyonu olmak üzere iki yöntem kullanılmıştır. Her bir yöntem için üretim 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Üzümler önce saplarından ayrılarak mayşeye işlenmiştir. Ardından mayşe 25 L'lik cam damacanalara doldurulup kükürtleme yapılmış (15 mg/L) ve 7-8°C'de 4 gün süreyle soğuk maserasyona bırakılmıştır. Spontan fermantasyon yöntemi ile üretilen şaraplarda, soğuk maserasyonun sonunda sıcaklık yükseltilerek fermantasyonun başlaması sağlanmıştır. Saf maya fermantasyonunda ise mayşeye 20 g/hL düzeyinde ticari maya (Zymaflore FX10 Laffort) inokulasyonu yapılmıştır. Sonraki aşamalar her iki yöntemde de aynı şekilde devam etmiştir. Mayşe fermantasyonunda oluşan karbondioksitin kabuk ve çekirdekleri kabın yüzeyine taşınmasıyla meydana getirdiği katman, günde iki kez kırılarak homojen hale getirilmiştir. Günlük olarak sıcaklık

ve yoğunluk değerleri takip edilmiştir. Yoğunluk değeri 1000 g/L ve altına düştüğünde mayşe fermantasyonuna son verilmiş ve presleme ile cibre mayşeden ayrılmıştır. Fermantasyonun tamamlanmasına ise indirgen şeker tayini sonuçlarına göre karar verilmiştir. Alkol fermantasyonu bitiminde preslenen şaraplar, malolaktik fermantasyonun gerçekleşmesi için 5 litrelik hava kilitli damacanalara aktararak 18-20°C sıcaklıkta bekletilmiştir. Malolaktik fermantasyonun takibi kâğıt kromatografisi ile gerçekleştirilmiştir (Boido ve ark., 1999). Şaraplar malolaktik fermantasyon aşamasından sonra serbest kükürt düzeyi 25 g/L olacak şekilde kükürtlenerek, 35 cl'lik koyu renkli şarap şişelerine doldurulup, dezenfekte edilen aglomere mantarlar ile kapatılmıştır. Şişelenen örnekler soğutmalı inkübatöre (Sanyo MIR-153, Japonya) alınarak, yaklaşık olarak 6 ay süreyle 13°C'de depolanmıştır.

Çalışmada, mayşe fermantasyonunun bitiminde alınan örnek "ham şarap"; şişede 6 ay olgunlaşma sürecinin ardından alınan örnek ise "genç şarap" olarak değerlendirilmiştir. Şarap örnekleri analize kadar -18 °C'de muhafaza edilmiştir.

### Fiziksel ve Kimyasal Analizler

Şırada pH, toplam asitlik, kurumadde ve indirgen şeker analizleri yapılmıştır. Şaraplarda ise bu analizlerin yanında alkol, serbest ve toplam kükürt dioksit miktarı, toplam fenolik madde, toplam antosiyanin, renk yoğunluğu ve renk tonu değerleri ile HPLC'de fenolik madde kompozisyonu belirlenmiştir.

### Toplam Monomerik Antosiyanin (TMA) Miktarı

Şıraların TMA içeriği, Fuleki ve Francis (1968) tarafından önerilen ve Giusti ve Wrolstad (2001) tarafından geliştirilen pH-diferansiyel yöntemine göre belirlenmiştir. Örneklerin TMA miktarı malvidin-3-glikozit cinsinden "mg/L" olarak hesaplanmıştır.

### Toplam Fenolik Madde (TFM) Miktarı

Şıra örneklerinde TFM miktarı Singleton ve Rossi (1965) tarafından önerilen Folin-Ciocalteu metoduna göre gerçekleştirilmiştir. Yöntem, fenolik bileşiklerin alkali ortamda Folin-Ciocalteu

ayıracını indirgemesi ve oluşan mavi rengin spektrofotometrede ölçümü prensibine dayanmaktadır. TFM miktarını belirleyebilmek için hazırlanan kalibrasyon eğrisinden ( $R^2=0.991$ ) yararlanılmış ve sonuçlar gallik asit cinsinden "mg/L" olarak verilmiştir.

### Renk Yoğunluğu ve Renk Tonu Değerleri

Şarapların renk yoğunluğu ve renk tonu değerleri, örneklerin 420 nm, 520 nm ve 620 nm dalga boyundaki absorbans değerlerinin saf suya karşı ölçümüne dayalı olarak hesaplanmıştır (Ribéreau-Gayon vd., 2006).

$$\text{Renk yoğunluğu} = \text{OD 420} + \text{OD 520} + \text{OD 620} \quad (1)$$

$$\text{Renk tonu} = \text{OD 420} / \text{OD 520} \quad (2)$$

### Antosiyanin ve Renksiz Fenolik Madde Kompozisyonu

Şarap örneklerinin antosiyanin ve renksiz fenolik madde dağılımları Çelebi Uzkuç vd., (2022)'de açıklanan yöntemlere göre HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japonya) ile belirlenmiştir. Analizde ters faz (reverse phase) C18 kolonu (250 x 4.6 mm, 5 µm; Phenomenex Inc. Los Angeles, CA, ABD) ve diyot dizilim dedektör (DAD) kullanılmıştır.

Elde edilen pikler, standart maddelerin geliş süresi ve dedektörde elde edilen UV spektrumlarının karşılaştırılması ile tanımlanmıştır. Bu amaçla 4 adet antosiyanin standardı (Fluka, MO, ABD) kullanılmıştır. Bunlar; malvidin-3-glikozit (Mv-3-Glu,  $R^2=0.966$ ), peonidin-3-glikozit (Peo-3-Glu,  $R^2=0.999$ ), delfinidin-3-glikozit (Dp-3-Glu,  $R^2=0.999$ ), siyanidin-3-glikozittir (Cy-3-Glu,  $R^2=0.999$ ). Ayrıca, gallik asit ( $R^2=0.997$ ), (+) kateşin ( $R^2=0.999$ ), kafeik asit ( $R^2=0.985$ ), p-kumarik asit ( $R^2=0.989$ ) ve ferulik asit ( $R^2=0.999$ ) olmak üzere beş adet fenolik maddenin (Sigma, MO, ABD) dağılımları belirlenmiştir. Her bir fenolik madde standardı için en az 5 veriye dayalı olarak hazırlanan kalibrasyon eğrileri kullanılmıştır.

### İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen sonuçların karşılaştırılmasında IBM SPSS 22 yazılımından yararlanılarak, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır.



Parametrik olmayan veriler için Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır.

## SONUÇ VE TARTIŞMA

### Şarapların Genel Özellikleri

Karalahna üzümlelerinden spontan ve ticari maya fermentasyonu ile üretilen şarapların şişeleme öncesi (ham şarap, HM) ve şişede 6 ay olgunlaştırılması sonrasında (genç şarap, GŞ) saptanan genel fizikokimyasal özellikleri Çizelge 1'de verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi spontan ve ticari maya fermentasyonu ile elde edilen ham

ve genç şarapların alkol içerikleri %14.1-14.9 (v/v) arasında değişiklik göstermektedir. Fermentasyon tekniği şarapların alkol içeriği üzerinde bir farklılığa neden olmazken, 6 aylık depolama şarapların alkol içeriklerinin azalmasına neden olmuştur. Diğer yandan, fermentasyon tekniği ve 6 aylık depolama, şarapların pH ve asitlik değerleri üzerinde önemli bir farklılığa yol açmamıştır. Spontan fermentasyon ile elde edilen şaraplarda kalan indirgen şeker miktarının ise, ticari maya ile üretilen şaraba kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür.

Çizelge 1. Karalahna şaraplarının genel fiziksel ve kimyasal özellikleri

Table 1. Physical and chemical properties of Karalahna wines

Özellikler Parameters	Spontan Fermantasyon <i>Spontaneous fermentation</i>		Ticari Maya Fermantasyonu <i>Commercial yeast fermentation</i>	
	HŞ	GŞ	HŞ	GŞ
Yoğunluk (g/mL) <i>Density (g/mL)</i>	0.999±0.001 <sup>a</sup>	0.999±0.001 <sup>a</sup>	0.998±0.001 <sup>a</sup>	0.999±0.001 <sup>a</sup>
Alkol (%) <i>Alcohol (%)</i>	14.9±0.17 <sup>a</sup>	14.3±0.1 <sup>b</sup>	14.9±0.2 <sup>a</sup>	14.1±0.1 <sup>b</sup>
pH <i>pH</i>	3.13±0.01 <sup>a</sup>	3.12±0.0 <sup>a</sup>	3.12±0.01 <sup>a</sup>	3.13±0.01 <sup>a</sup>
Toplam asitlik* (g/L) <i>Total acidity* (g/L)</i>	10.42±0.29 <sup>a</sup>	10.16±0.09 <sup>a</sup>	8.86±0.64 <sup>b</sup>	10.21±0.28 <sup>a</sup>
Uçar asitlik** (g/L) <i>Volatile acidity** (g/L)</i>	0.60±0.01 <sup>a</sup>	0.61±0.0 <sup>a</sup>	0.60±0.01 <sup>a</sup>	0.62±0.01 <sup>a</sup>
İndirgen şeker (g/L) <i>Reducing sugar (g/L)</i>	4.74±0.06 <sup>a</sup>	4.10±0.07 <sup>b</sup>	3.10±0.06 <sup>c</sup>	2.60±0.31 <sup>d</sup>
Serbest SO <sub>2</sub> (mg/L) <i>Free SO<sub>2</sub> (mg/L)</i>	16.0±0.8 <sup>b</sup>	16.1±0.8 <sup>b</sup>	15.0±0.5 <sup>b</sup>	18.3±0.7 <sup>a</sup>
Toplam SO <sub>2</sub> (mg/L) <i>Total SO<sub>2</sub> (mg/L)</i>	38.0±1.2 <sup>a</sup>	31.2±1.8 <sup>b</sup>	36.0±2.2 <sup>a</sup>	29.8±0.5 <sup>b</sup>

Sonuçlar, ortalama±standart hata olarak verilmiştir. \*Tartarik asit cinsinden, \*\*Asetik asit cinsinden. HŞ: Alkol fermentasyonu bitimi ham şarap, GŞ: 6 ay şişede depolama sonunda genç şarap.

Results were given as mean±standard error. \*Expressed as tartaric acid, \*\*Expressed as acetic acid. HŞ: Wines at the end of the alcoholic fermentation, GŞ: Young wines at the end of 6 months of bottle storage.

*Saccharomyces* dışındaki mayalar ve bazı yabancı *S. cerevisiae* suşları spontan fermentasyon sırasında yüksek düzeyde uçar asit üretebilmektedirler (Zhao vd., 2021). Ancak, çalışmamızda spontan ve ticari maya fermentasyonu ile elde edilen genç Karalahna şaraplarının uçar asit değerleri arasında bir fark görülmemiş olup, saptanan değerler kabul edilebilir seviye olan 0.72 g/L asetik asit değerinin altında bulunmuştur (Ribéreau-Gayon vd., 2006). Ham ve genç şarapların serbest kükürtdioksit

içerikleri 15.0 ile 18.3 mg/L arasında, toplam kükürtdioksit içerikleri ise 29.8 ile 38.0 mg/L arasında değişiklik göstermiştir. Bilindiği gibi, şarap üretiminde hastalık ve kusurların önlenmesinde kükürtdioksitin önemli bir rolü vardır. Kırmızı şaraplarda 10-20 mg/L düzeyinde serbest SO<sub>2</sub> bulunmasının yeterli olduğu belirtilmektedir (Cabaroğlu ve Canbaş, 1993).

## Karalahna şaraplarının fenolik bileşenleri ve renk özellikleri

### Karalahna Şaraplarının Toplam Monomerik Antosiyenin ve Toplam Fenolik Madde Miktarları ile Renk Özellikleri

Spontan fermantasyon ve ticari maya fermantasyonu ile üretilen Karalahna şaraplarının

alkol fermantasyonu bitimi ve 6 ay şişede olgunlaşma süreci sonundaki toplam monomerik antosiyenin ve toplam fenolik madde içerikleri ile renk yoğunluğu ve renk tonu değerleri Çizelge 2’de verilmiştir.

Çizelge 2. Karalahna şaraplarının spektrofotometrik özellikleri

Table 2. Spectrophotometric properties of Karalahna wines

Özellikler Parameters	Şarap örnekleri Wine samples	Spontan Fermantasyon Spontaneous fermentation	Ticari Maya Fermantasyonu Commercial yeast fermentation
Toplam fenolik madde <i>Total phenolic content</i>	HŞ	2588.48±134.59 <sup>aA</sup>	2852.42±81.03 <sup>aA</sup>
(mg/L)	GŞ	2358.48±47.57 <sup>aA</sup>	3052.42±196.28 <sup>bA</sup>
Toplam monomerik antosiyenin <i>Total monomeric anthocyanin content</i>	HŞ	159.04±2.94 <sup>aA</sup>	181.86±6.44 <sup>bA</sup>
(mg/L)	GŞ	48.28±0.69 <sup>aB</sup>	53.18±0.50 <sup>bB</sup>
Renk yoğunluğu <i>Color intensity</i>	HŞ	9.84±0.34 <sup>aA</sup>	10.47±0.30 <sup>aA</sup>
	GŞ	12.37±0.40 <sup>aB</sup>	12.47±0.19 <sup>aB</sup>
Renk tonu <i>Color hue</i>	HŞ	0.55±0.0 <sup>aA</sup>	0.65±0.04 <sup>aA</sup>
	GŞ	0.73±0.0 <sup>aB</sup>	0.70±0.0 <sup>bA</sup>

Sonuçlar, ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Aynı satır ve sütundaki farklı harfler o özellik için şarap örneklerinin istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir ( $P \leq 0.05$ ). Satırda küçük harfler, sütunda büyük harfler kullanılmıştır. HŞ: Alkol fermantasyonu bitimi ham şarap, GŞ: 6 ay şişede depolama sonunda genç şarap.

Results were given as mean±standard error. Different letters in the same row and the same column indicate that the wine samples are statistically different for that feature ( $P \leq 0.05$ ). Lowercase letters are used in the row and uppercase letters are used in the column. HŞ: Wines at the end of the alcoholic fermentation, GŞ: Young wines at the end of 6 months of bottle storage.

Karalahna üzümlerinden spontan ve saf maya fermantasyonu ile elde edilen kırmızı şarapların toplam monomerik antosiyenin miktarları sırasıyla 159.04 mg/L ve 181.86 mg/L olarak bulunmuştur. Benzer şekilde Ataol, (2012) Karalahna üzümlerinden spontan fermantasyon tekniği ile şarap üretimi gerçekleştirmiş ve fermantasyon sonunda ham şarapta toplam monomerik antosiyenin miktarını 153.9 mg/L olarak belirlemiştir. Literatürde Karalahna şarabı antosiyeninleri ile ilgili başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Diğer yandan, yerli üzüm çeşitlerimizden Boğazkere ve Öküzgözü üzümlerinden elde edilen kırmızı şarapların daha yüksek toplam monomerik antosiyenin içerdikleri (sırasıyla 212-409 mg/L ve 243-437 mg/L aralığında) belirlenmiştir (Miran, 2018). Başta üzüm çeşidi olmak üzere bağcılık uygulamaları, iklim koşulları ve şarap üretim tekniklerine bağlı

olarak kırmızı şarapta antosiyenin miktarı ve kompozisyonunun değişiklik gösterdiği bilinmektedir (He vd., 2012).

Fermantasyon tekniği karşılaştırıldığında, ticari maya fermantasyonu ile elde edilen kırmızı şarapların toplam monomerik antosiyenin miktarının, spontan fermantasyonla üretilen şaraplara göre istatistiksel açıdan daha yüksek olduğu saptanmıştır. Diğer yandan, aynı proje kapsamında Cabernet sauvignon üzümlerinden benzer koşullarda kırmızı şarap üretimi de gerçekleştirilmiş ve çalışma sonucunda farklı olarak spontan teknikle üretilen Cabernet sauvignon şaraplarının ticari maya ile üretilen şaraplardan daha yüksek TMA içeriğine sahip olduğu saptanmıştır (Çelebi Uzkuç vd., 2022). Bu durum spontan fermantasyonda faaliyet gösteren maya suşların farklılığından kaynaklanabilmektedir. Nitekim önceki

çalışmamızda, Karalahna ve Cabernet sauvignon üzümünün spontan fermantasyonunun ilerleyen aşamalarında maya türlerinin dağılımlarının farklılık gösterdiği saptanmıştır (Çelebi Uzkuç vd., 2020). Şarap üretiminde rol oynayan maya tür ve suşları şarabın renk özelliklerini, fenolik profilini ve antioksidan gücünü değiştirebilmekte ve olgunlaşma sürecinde belirleyici rol alabilmektedir (Caridi vd., 2004, 2021; Ilieva vd., 2017). Örneğin, Martín-Gómez vd. (2021), spontan fermantasyon ile elde edilen kırmızı şarapların toplam fenolik bileşik içeriği ve antioksidan aktivite yönünden daha yüksek değerlere sahip olduğunu belirlemişlerdir. Bununla birlikte, araştırmacılar saf maya fermantasyonu ile üretilen kırmızı şarapların renk yoğunluğu ve antosiyanin konsantrasyonlarının spontan fermantasyona göre daha yüksek olduğunu saptamışlardır.

Altı ay şişede olgunlaşma süreci sonunda monomerik antosiyaninlerin her iki fermantasyon tekniği ile üretilen şaraplarda yaklaşık %70 düzeyinde azaldığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde Cabernet sauvignon şaraplarının 6 ay depolanması sonunda toplam monomerik antosiyaninlerdeki kaybın spontan fermantasyonda %52, ticari maya fermantasyonunda ise %60 olduğu belirlenmiştir (Çelebi Uzkuç vd., 2022). Marquez vd. (2014), Merlot, Syrah ve Tempranillo şaraplarının şişede depolama sürecinde antosiyanin kompozisyonunu araştırdıkları bir çalışmada, 6 ay sonunda monomerik antosiyaninlerde %80 ila %90 arasında azalma olduğunu saptamışlardır. García-Falcón vd. (2007) ise Mencía ve Brancellao kırmızı şaraplarında bir yıl şişede depolama aşamasında antosiyanin kaybını sırasıyla %72 ve %85 olarak tespit etmişlerdir. Depolama sırasında antosiyanin içeriğindeki azalmalar, monomerik bileşiklerin kademeli olarak daha kararlı oligomerlere veya polimerlere dönüşmesinden kaynaklanmaktadır (Monagas vd., 2006). Ticari maya fermantasyonu ile elde edilen ham şarapların toplam fenolik madde miktarı gallik asit cinsinden 2852.4 mg/L, spontan fermantasyon ile elde edilen ham şarapların ise 2588.5 mg/L olarak belirlenmiştir. Diğer yandan Aksoy (2010), Karalahna şaraplarında toplam fenol konsantrasyonunu daha yüksek olarak (4285 mg/L) tespit etmiştir. Şarapların altı aylık

olgunlaşma sonucunda toplam fenolik madde miktarında aynı fermantasyon tekniği için istatistiksel olarak bir farklılık tespit edilmemiştir. Ancak, ticari maya fermantasyon ile üretilen 6 aylık genç şaraplarda fenolik madde miktarı ham şaraba göre daha yüksek düzeyde bulunmuştur. Caridi vd. (2004) iki farklı *S. cerevisiae* suşunun şarabın toplam fenol içeriğinde istatistiksel açıdan önemli ölçüde farklılık yarattığını tespit etmişlerdir. Kullandıkları suşlara göre şarapların toplam polifenol miktarları arasında %23 fark bulunduğu belirtilmiştir. Diğer yandan, başka bir çalışmada 4 farklı *S. cerevisiae* suşunun toplam polifenol indeksleri arasında önemli bir fark saptanmamıştır (Vernhet vd., 2020).

Renk yoğunluğu, kırmızı şarapta rengin doygunluğunun bir ifadesi olarak belirlenmekte olup, üzüm çeşidine göre bu değer 0.3-18 aralığında değişmektedir (Ribéreau-Gayon vd., 2006). Spontan fermantasyon yöntemi ile elde edilen Karalahna şaraplarının renk yoğunluğu değerleri 9.84, ticari fermantasyon yöntemi ile elde edilenlerin ise 10.47 olarak belirlenmiştir. Şarapların renk yoğunluğu değerlerinin fermantasyon tekniğinden etkilenmediği, ancak olgunlaşma sürecinde artış gösterdiği saptanmıştır. Bu durum, olgunlaşma sürecinde, antosiyaninler ile tanenlerin kondenzasyonu sonucu stabil pigmentlerin oluşumu ile açıklanabilmektedir (Carew vd., 2013). Benzer şekilde, Garde-Cerdán vd. (2022) Tempranillo üzümlerinden farklı *S. cerevisiae* suşları ile üretilen şarapların depolama süresince (6-9 ay) renk yoğunluğu değerlerinin artış gösterdiğini belirlemişlerdir. Renk tonu ise, şaraplarda olgunlaşma veya oksidasyon göstergesi olarak yararlanılan bir kavramdır. Karalahna şaraplarının renk tonu değerleri incelendiğinde, fermantasyon tekniğine göre şarapların renk tonu değerlerinin değişmediği, ancak 6 aylık olgunlaşma sonunda özellikle spontan fermantasyonla elde edilen şaraplarda renk tonu değerlerinin artış gösterdiği saptanmıştır. Bu beklenen bir sonuçtur; çünkü depolama sürecinde şaraptaki antosiyaninlerin daha kompleks ve stabil pigmentler oluşturmak üzere kondenzasyona uğradığı veya oksidasyon sonucu degrade olduğu bilinmektedir (Morata vd., 2016).

**Karalahna Şaraplarının Antosiyanin Dağılımı ve Miktarı**

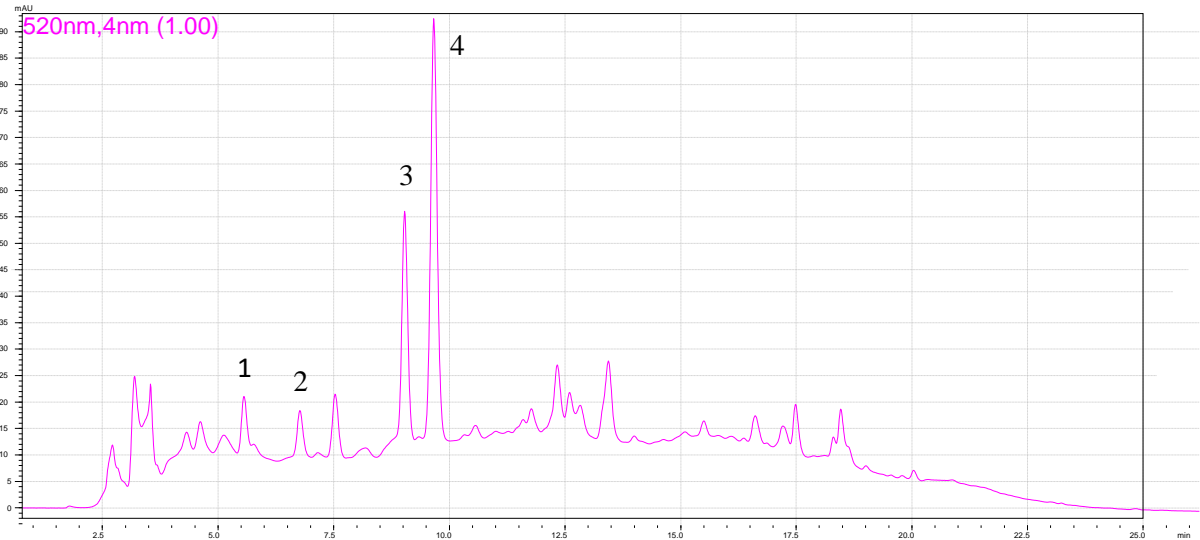
Karalahna şaraplarında malvidin-3-glikozit (mv-3-glu), peonidin-3-glikozit (pn-3-glu), delphinidin-3-glikozit (dp-3-glu) ve siyanidin-3-glikozit (cy-3-glu) olmak üzere dört adet antosiyanin belirlenmiş

olup, şarapların antosiyanin dağılımına ilişkin elde edilen sonuçlar Çizelge 3'te verilmiştir. Ticari maya ile üretilen Karalahna şarabının antosiyanin dağılımına ait bir kromatogram (520 nm) ise Şekil 1'de görülmektedir.

Çizelge 3. Karalahna şaraplarının antosiyanin dağılımı ve konsantrasyonları (mg/L)  
Table 3. Distributions and concentrations of anthocyanins of Karalahna wines (mg/L)

Özellik <i>Properties</i>	Şarap örnekleri <i>Wine samples</i>	Spontan Fermantasyon <i>Spontaneous fermentation</i>	Ticari Maya Fermantasyonu <i>Commercial yeast fermentation</i>
Dp-3-glu	HŞ	6.38±0.45 <sup>aA</sup>	9.77±0.51 <sup>bA</sup>
	GŞ	1.14±0.03 <sup>aB</sup>	1.38±0.05 <sup>bB</sup>
Cy-3-glu	HŞ	3.05±0.19 <sup>aA</sup>	4.81±0.26 <sup>bA</sup>
	GŞ	0.71±0.03 <sup>aB</sup>	0.87±0.04 <sup>bB</sup>
Peo-3-glu	HŞ	20.92±1.48 <sup>aA</sup>	32.00±1.83 <sup>bA</sup>
	GŞ	3.23±0.12 <sup>aB</sup>	4.03±0.19 <sup>bB</sup>
Mv-3-glu	HŞ	54.97±2.96 <sup>aA</sup>	74.55±2.90 <sup>bA</sup>
	GŞ	23.09±0.19 <sup>aB</sup>	24.39±0.34 <sup>aB</sup>

Sonuçlar, ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Aynı satır ve sütundaki farklı harfler o özellik için şarap örneklerinin istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir ( $P \leq 0.05$ ). Satırda küçük harfler, sütunda büyük harfler kullanılmıştır. HŞ: Alkol fermantasyonu bitimi ham şarap, GŞ: 6 ay şişede depolama sonunda genç şarap. Results were given as mean±standard error. Different letters in the same row and the same column indicate that the wine samples are statistically different for that feature ( $P \leq 0.05$ ). Lowercase letters are used in the row and uppercase letters are used in the column. HŞ: Wines at the end of the alcoholic fermentation, GŞ: Young wines at the end of 6 months of bottle storage.



Şekil 1. Karalahna şarabının antosiyanin dağılımı, 520 nm (GŞ-Ticari maya inoküle edilen örnek)

Figure 1. Anthocyanin distribution of Karalahna wine, 520 nm (GŞ-Commercial yeast inoculated sample)

1: dp-3-glu, 2: cy-3-glu, 3: peo-3-glu 4: mv-3-glu

Elde edilen sonuçlara göre Karalahna şaraplarında en yüksek konsantrasyona sahip olan antosiyanin malvidin-3-glikozit olarak belirlenmiştir. Mv-3-glu'ün üzüm ve şaraplarda hakim antosiyanin bileşiği olduğu bilinmektedir (Lingua vd., 2016). Mv-3-glu miktarı spontan ham şaraplarda 54.97 mg/L, ticari ham şaraplarda ise 74.55 mg/L olarak belirlenmiş ve aralarındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. Mv-3-glu miktarının saf maya fermantasyonu ile elde edilen Cabernet sauvignon şaraplarında da yakın değerlerde (72.93 mg/L) olduğu saptanmıştır (Çelebi Uzkuç vd., 2022). Diğer yandan, bahsedilen çalışmada, spontan fermantasyonla elde edilen Cabernet sauvignon kırmızı şaraplarının TMA ve mv-3-glu miktarları ticari maya fermantasyonuna göre istatistiksel açıdan daha yüksektir. Farklı üzüm çeşitlerinden ticari maya ile elde edilen kırmızı şarapların antosiyanin kompozisyonları birbirine oldukça benzer bulunurken, spontan fermantasyon ile elde edilenlerin değişkenlik gösterdiği anlaşılmaktadır. Bu sonuçtan yola çıkarak, spontan fermantasyonda faaliyet gösteren maya florasının antosiyanin profili üzerinde önemli olabileceği görülmektedir. Farklı maya tür ve suşlarının hücre duvarı yapılarına bağlı olarak, antosiyanin adsorpsiyonunda da farklılık gösterdikleri bilinmektedir. Morata vd. (2016), farklı mayalarla gerçekleştirdikleri bir çalışmada mayaların antosiyaninleri adsorbe etme yeteneklerinin ortalama %9.4 ile %11.9 arasında değiştiğini belirlemişlerdir.

Şişede 6 aylık olgunlaşma sonunda spontan fermantasyonla elde edilen Karalahna şaraplarında mv-3-glu miktarında %57.9; ticari fermantasyonla üretilenlerde ise %67.3 oranında azalma olduğu saptanmıştır. Marquez vd. (2014), Merlot, Syrah ve Tempranillo şaraplarında mv-3-glu konsantrasyonunun şişeleme öncesi 75-80 mg/L aralığında iken; 6 ay depolama sonunda %85-92 oranında azaldığını ortaya koymuşlardır. Alkol fermantasyonunun bitiminde peo-3-glu konsantrasyonu spontan ve ticari maya fermantasyonu ile elde edilen Karalahna şaraplarında sırasıyla 20.92 mg/L ve 32.0 mg/L seviyelerinde iken, 6 ay şişede olgunlaşma sonunda peo-3-glu konsantrasyonunun %84-87 düzeyinde azaldığı belirlenmiştir. Cy-3-glu

konsantrasyonu ise spontan ve ticari maya fermantasyonu ile üretilen şaraplarda sırasıyla 3.05 ve 4.81 mg/L olarak tespit edilmiş ve depolama sonucunda %76-81 oranında kayba uğramıştır. Dp-3-glu konsantrasyonu spontan ve ticari şaraplarda 6.38 ve 9.77 mg/L iken, depolama ile %82-85 düzeyinde azalma göstermiştir. Genç kırmızı şaraplarda bulunan monomerik antosiyaninler olgunlaşma ve depolama süreçlerinde daha stabil polimerik bileşiklere dönüştüklerinden (Guadalupe ve Avestaran, 2008), kırmızı şaraplarda gerçekleşen antosiyanin kayıpları beklenen bir durumdur. Depolamaya bağlı olarak antosiyaninlerde meydana gelen azalma düzeyleri literatürdeki çalışmalarla uyumludur (García-Falcón vd., 2007; Marquez vd., 2014).

#### **Karalahna Şaraplarının Fenolik Madde Dağılımı ve Miktarı**

Spontan fermantasyon ve ticari maya fermantasyonu olmak üzere iki ayrı yöntemle üretilen Karalahna şaraplarının renksiz fenolik madde dağılımı ve miktarları Çizelge 4'te verilmiştir. Şaraplarda gallik asit, (+) kateşin, kafeik asit, p-kumarik asit ve ferulik asit olmak üzere 5 adet fenolik bileşen tespit edilmiştir.

Şarapların fenolik madde dağılımı incelendiğinde, tanımlanan renksiz fenolik maddelerin büyük bölümünü gallik asit ve (+) kateşinin oluşturduğu görülmektedir. Fenolik bileşiklerin, uygulanan fermantasyon tekniğine göre (spontan-ticari) istatistiksel olarak farklılık gösterdiği saptanmıştır. Genel olarak, Çizelge 4'te verilen fenolik bileşikler için, ticari maya fermantasyonu ile üretilen şaraplarda fenolik bileşiklerin konsantrasyonlarının spontan tekniğe göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Alkol fermantasyonu bitiminde gallik asit miktarı spontan ve ticari fermantasyonla üretilen şaraplarda sırasıyla 102.98 ve 122.00 mg/L olarak tespit edilmiştir. Benzer şekilde, aynı fermantasyon koşullarında üretilen Cabernet sauvignon şaraplarında da gallik asit miktarları ticari maya fermantasyonu ile üretilen şaraplarda spontan fermantasyon şaraplarına kıyasla daha yüksek düzeyde bulunmuş, ancak değerler daha düşük seviyelerde (sırasıyla 40.0 mg/L ve 33.6

## Karalahna şaraplarının fenolik bileşenleri ve renk özellikleri

mg/L) kalmıştır (Çelebi Uzkuç vd., 2022). Ataol (2012) tarafından Karalahna şaraplarında gallik asit miktarı ise fermantasyon bitiminde 75 mg/L düzeyinde bulunmuştur. Çizelge 4'te görüldüğü üzere, Karalahna şaraplarında gallik asit konsantrasyonu spontan fermantasyonda %86, ticari maya fermantasyonunda ise %75 düzeyinde artış göstermiştir. Başka bir araştırmada da Karalahna şarabı üretiminde, gallik asit miktarının fermantasyon bitiminden birinci aktarmaya kadar geçen süreçte %12.3 düzeyinde artış gösterdiği belirlenmiştir (Ataol, 2012). Fenolik asitlerin

depolama veya olgunlaşma boyunca artışı, antosiyaninlerin degradasyonundan kaynaklanabilmektedir. Özellikle kumaril antosiyaninlerinin degradasyonu, kumarik asidin artışı ile ilişkilendirilmektedir (García-Falcón vd., 2007). Antosiyanin molekülündeki şekerlere; ferulik asit, p-kumarik asit, kafeik asit veya sinapik asitler ile p-hidroksibenzoik, malonik veya asetik asitlerin bağlanmasıyla açıl türevleri meydana gelmektedir. Bu açılma antosiyanin molekülünün stabilitesini artırmaktadır (Rein, 2005).

Çizelge 4. Karalahna şaraplarının fenolik bileşen dağılımları ve konsantrasyonları (mg/L)  
Table 4. Distributions and concentrations of phenolics of Karalahna wines (mg/L)

Özellik <i>Properties</i>	Şarap örnekleri <i>Wine samples</i>	Spontan Fermantasyon <i>Spontaneous fermentation</i>	Ticari Maya Fermantasyonu <i>Commercial yeast fermentation</i>
Gallik asit <i>Galic acid</i>	HŞ	102.98±7.29 <sup>aA</sup>	122.00±6.21 <sup>aA</sup>
	GŞ	191.88±4.26 <sup>aB</sup>	213.61±5.13 <sup>bB</sup>
(+) Kateşin <i>(+) Catechin</i>	HŞ	200.89±14.03 <sup>aA</sup>	242.73±13.23 <sup>bA</sup>
	GŞ	156.04±3.40 <sup>aB</sup>	179.73±3.19 <sup>bB</sup>
Kafeik asit <i>Caffeic acid</i>	HŞ	12.28±0.25 <sup>aA</sup>	13.06±0.30 <sup>aA</sup>
	GŞ	15.50±0.15 <sup>aB</sup>	16.18±0.38 <sup>aB</sup>
p-Kumarik asit <i>p-Coumaric acid</i>	HŞ	8.10±0.06 <sup>aA</sup>	8.76±0.11 <sup>bA</sup>
	GŞ	10.05±0.12 <sup>aB</sup>	11.01±0.18 <sup>bB</sup>
Ferulik asit <i>Ferulic acid</i>	HŞ	12.81±0.23 <sup>aA</sup>	14.04±0.33 <sup>bA</sup>
	GŞ	14.96±0.11 <sup>aB</sup>	15.48±0.17 <sup>bB</sup>

Sonuçlar, ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Aynı satır ve sütundaki farklı harfler o özellik için şarap örneklerinin istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir ( $P \leq 0.05$ ). Satırda küçük harfler, sütunda büyük harfler kullanılmıştır. HŞ: Alkol fermantasyonu bitimi ham şarap, GŞ: 6 ay şişede depolama sonunda genç şarap. Results were given as mean±standard error. Different letters in the same row and the same column indicate that the wine samples are statistically different for that feature ( $P \leq 0.05$ ). Lowercase letters are used in the row and uppercase letters are used in the column. HŞ: Wines at the end of the alcoholic fermentation, GŞ: Young wines at the end of 6 months of bottle storage.

(+) Kateşin konsantrasyonunun da ticari maya fermantasyonu ile üretilen Karalahna şaraplarında istatistiksel olarak daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Alkol fermantasyonu sonunda ticari Karalahna şarabının (+) kateşin miktarının, spontan fermantasyonla elde edilene göre %20 daha fazla olduğu saptanmıştır. Diğer yandan, gallik asitten farklı olarak (+) kateşin konsantrasyonunun 6 ay depolama sonunda kayba uğradığı saptanmıştır. Kayıp düzeyleri

spontan fermantasyonla üretilen şaraplarda %22, ticari maya fermantasyonuyla üretilenlerde ise %26 olarak belirlenmiştir. Fermantasyon tekniği, kafeik asit konsantrasyonu açısından istatistiksel bir farka sebep olmamıştır. Ancak, spontan ve ticari maya fermantasyonu ile üretilen kırmızı şaraplarda 6 ay depolama sonunda kafeik asit miktarı sırasıyla %26 ve %24 düzeyinde artış göstermiştir. Benzer şekilde, García-Falcón vd. (2007) tarafından, ticari saf *S. cerevisiae* suşu ile

üretilen Mencía şaraplarının malolaktik fermantasyondan itibaren bir yıl olgunlaşma sonunda trans-kafeik asit konsantrasyonunda kademeli bir artış olduğu tespit edilmiştir.

Karalahna şaraplarının p-kumarik asit konsantrasyonları ise 8.10-11.01 mg/L aralığında değişmekte olup, ticari maya fermantasyonu ile elde edilen örneklerde istatistiksel olarak daha yüksek değerler bulunmuştur. Bununla beraber, genç şarapların p-kumarik asit konsantrasyonlarının ham şaraplara göre daha yüksek olduğu ve 6 aylık depolama sonunda spontan ve ticari maya fermantasyonuyla üretilen şarapların kafeik asit konsantrasyonlarında sırasıyla %24 ve %26 oranında artış meydana geldiği saptanmıştır. Porgalı ve Büyüktüncel (2012) farklı üzüm çeşitlerinden üretilen yerli kırmızı şaraplarda p-kumarik asit miktarının 1.22 ile 8.24 mg/L arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Şarap örneklerinin ferulik asit miktarı ise 12.81-15.48 mg/L arasında değişmektedir. Ticari maya fermantasyonu ile üretilen şaraplarda ferulik asit miktarı, spontan fermantasyona göre daha yüksek konsantrasyonda bulunmuştur. Diğer yandan, Ataol (2012) Karalahna kırmızı şaraplarında ferulik asit miktarının daha yüksek konsantrasyonda (44 mg/L) olduğunu belirlemiştir. Bu farklılık, üzümün yetiştiği bölge, bağcılık uygulamaları ve şarap üretim tekniklerinden kaynaklanabilmektedir. Depolama ile birlikte şarapların ferulik asit konsantrasyonlarının da artış gösterdiği saptanmıştır. Altı aylık depolama sonunda spontan ve ticari maya fermantasyonuyla üretilen şarapların ferulik asit içeriklerinde sırasıyla %17 ve %10 düzeylerinde artış meydana geldiği belirlenmiştir. Görüldüğü gibi Karalahna şaraplarının 6 ay süreyle şişede depolanması sonunda şarapların kateşin içeriğinde azalma meydana gelirken; gallik asit, kafeik asit, p-kumarik asit ve ferulik asit miktarlarında farklı düzeylerde artış meydana gelmiştir. Şarapların fenolik asit içeriklerinde meydana gelen bu artışın, maruz kalınan sıcaklık-süre ve SO<sub>2</sub> içeriği gibi faktörlerin etkisiyle gerçekleşen antosiyanin degradasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim literatürde de, antosiyaninlerin degradasyon ürünleri olarak gallik

asit, proto-kateşik asit, vanillik asit, sirinjik asit ve p-kumarik asit gibi fenolik asitlerin belirlendiği çalışmalar bulunmaktadır (Fleschhut ve ark., 2006; Kay ve ark., 2009).

Sonuç olarak; Karalahna üzümünden kırmızı şarap üretiminde fermantasyon tekniği ve depolama süreci şarapların antosiyanin ve fenolik kompozisyonu üzerinde etkili bulunmuştur. Ticari *S. cerevisiae* suşunun inokülasyonu ile üretilen şaraplarda toplam ve bireysel fenolik bileşiklerin miktarının daha yüksek olduğu saptanmıştır. Altı aylık depolama sürecinde ise olgunlaşma ile birlikte şarapların toplam monomerik ve bireysel antosiyaninlerinin önemli düzeyde azaldığı, buna karşılık (+) kateşin dışındaki bireysel fenoliklerin farklı düzeylerde artış gösterdiği belirlenmiştir.

#### ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar makalenin herhangi bir kurum, kuruluş, kişi ile mali çıkar çatışması ve yazarlar arasında çıkar çatışması olmadığını bildirmektedir.

#### YAZARLARIN KATKISI

Burcu Şişli, Nesrin Merve Çelebi Uzkuç, Aslı Bayhan ve Ayşegül Kırca Toklucu araştırma faaliyetlerinin planlanma aşaması, uygulanması ve yürütülmesi ile sonuç verilerinin değerlendirilerek makalenin yazımında görev almışlardır.

#### TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenen proje (114 O 431) sonuçlarının bir bölümünden oluşmaktadır. Çalışmamızın gerçekleşmesinde tesis imkânı sağlayan Vinero Bağcılık (Eceabat, Çanakkale) ile Karalahna üzümünü temin ettiğimiz Talay Şarapçılık (Bozcaada, Çanakkale)'a destekleri için teşekkür ederiz. HPLC analizlerinin gerçekleştirilmesinde, destekleri için Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Çevre Sorunları Araştırma ve Uygulama Merkezi (ÇEVSAM)'ne teşekkür ederiz.

#### KAYNAKLAR

Aksoy, M. (2010). Bazı Kırmızı Şarapların Fenolik Madde Profilleri Üzerine Araştırmalar. Çanakkale

Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Türkiye, 77 s.

Anlı R. E. (2006). *Bağlar Güzeli Üzüm ve Üzüm Kültürü*. Yapı Kredi Kültür Sanat Yayıncılık Ticaret ve Sanayi A.Ş., İstanbul. 155-187.

Ataol, G. (2012). Bozcaada'da Üretilen Kırmızı Şaraplarda Üretim Aşamalarının Antioksidan Yapıları Üzerine Etkisi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 64 s.

Blazquez Rojas, I., Smith, P. A., Bartowsky, E. J. (2012). Influence of choice of yeasts on volatile fermentation-derived compounds, colour and phenolics composition in Cabernet Sauvignon wine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(12), 3311–3321. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1142-y>

Boido, E., Dellacassa, E., Carrau, F., Moyna, P. (1999). An Improved Means of Monitoring Malolactic Fermentation in Wines by TLC-Densitometry. *Journal of Planar Chromatography*, 12, 269-271.

Busse-Valverde, N., Bautista-Ortín, A. B., Gómez-Plaza, E., Fernández-Fernández, J. I., Gil-Muñoz, R. (2013). Influence of skin maceration time on the proanthocyanidin content of red wines. *European Food Research and Technology*, 236, 473–481. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1842-4>

Cabaroğlu, T., Canbaş, A. (1993). Şarapçılıkta kükürt dioksit kullanımı ve önemi. *Gıda*, 18(1), 61-66.

Carew, A. L., Smith, P., Close, D. C., Curtin, C., Damberg, R. G. (2013). Yeast effects on Pinot noir wine phenolics, color, and tannin composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(41), 9892–9898. <https://doi.org/10.1021/jf4018806>

Caridi, A., Cufari, A., Lovino, R., Palumbo, R., Tedesco, I. (2004). Influence of Yeast on Polyphenol Composition of Wine. *Food Technology and Biotechnology*, 42(1), 37–40.

Caridi, A., De Bruno, A., De Salvo, E., Piscopo, A., Poiana, M., Sidari, R. (2017). Selected yeasts to enhance phenolic content and quality in red wine from low pigmented grapes. *European Food Research and Technology*, 243(3), 367–378. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2750-9>

Caridi, A., Romeo, R., Bruno, A. De, Masaneo, C., Poiana, M. (2021). Long - term effects of different starter yeasts on colour and natural antioxidant power of red wines. *European Food Research and Technology*, 247, 2391–2398. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03800-3>

Carrascosa, A. V., Bartolome, B., Robredo, S., Leon, A., Cebollero, E., Juega, M., Nunez, Y. P., Martinez, M. C., Martinez-Rodriguez, A. J. (2012). Influence of locally-selected yeast on the chemical and sensorial properties of Albariño white wines. *LWT - Food Science and Technology*, 46(1), 319–325. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.09.011>

Çelebi Uzkuç, N.M., Şişli, B., Karagül Yüceer, Y., Bayhan, A., Kırca Toklucu, A. (2018) Effect of Cold Maceration on Anthocyanin and Volatile Compounds of Karalahna and Cabernet Sauvignon Grape Musts. *Gıda*, 43:663–676. <https://doi.org/10.15237/gida.gd18038>

Çelebi Uzkuç, N. M., Şişli, B., Ay, M., Togay, S. Ö., Karagül Yüceer, Y., Bayhan, A., Kırca Toklucu, A. (2020). Effects of spontaneous fermentation on Karalahna and Cabernet Sauvignon young red wines: volatile compounds, sensory profiles and identification of autochthonous yeasts. *European Food Research and Technology*, 246(1), 81–92. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03395-w>

Çelebi Uzkuç, N. M., Bayhan, A., Kırca, A. (2022). Phenolics and color components of young Cabernet Sauvignon wines : effect of spontaneous fermentation and bottle storage. *European Food Research and Technology*, 248, 393–401. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03884-x>

Dell'Agli, M., Buscialà, A., Bosisio, E. (2004). Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovascular Research*, 63(4), 593–602. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.03.019>

Doyuran, S. D., Güven, S. (2006). Karasakız ve Karalahna üzüm çeşitlerinden elde edilen kırmızı



- şarapların kalite özellikleri üzerine araştırmalar. *Akademik Gıda*, 4(4), 32–34.
- Marquez, A., Serratos, M. P., Merida, J. (2014). Influence of bottle storage time on colour, phenolic composition and sensory properties of sweet red wines. *Food Chemistry*, 146, 507–514. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.103>
- Echave, J., Barral, M., Fraga-Corral, M., Prieto, M.A., Simal-Gandara. (2021). Bottle aging and storage of wines: A review. *Molecules*, 26, 713.
- Escot, S., Feuillat, M., Dulau, L., Charpentier, C. (2001). Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7(3), 153–159. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2001.tb00204.x>
- Fleschhut, J., Kratzer, F., Rechkemmer, G., Kulling, S.E. (2006). Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *European Journal of Nutrition*, 45, 7–18.
- Fuleki, T., Francis, F. J. (1968). Quantative methods for analysis. 2. Determination of total anthocyanin and degradation index in cranberries. *Journal of Food Science*, 33, 78–83.
- Gammacurta, M., Marchand, S., Albertin, W., Moine, V., De Revel, G. (2014). Impact of yeast strain on ester levels and fruity aroma persistence during aging of bordeaux red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 5378–5389. <https://doi.org/10.1021/jf500707e>
- García-Falcón, M. S., Pérez-Lamela, C., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J. (2007). Determination of phenolic compounds in wines: Influence of bottle storage of young red wines on their evolution. *Food Chemistry*, 105(1), 248–259. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.006>
- Garde-Cerdán, Urturi, I.S., Murillo-Peña, R., Iribarren, M., Román, S.M.S, Rubio-Bretón, P., Pérez-Álvarez, E. (2022). Bottle aging affected aromatic and phenolic wine composition more than yeast starter strains. *Applied Sciences*, 12, 4478.
- Giusti, M. M., Wrolstad, R. E. (2001). Unit F1.2. Anthocyanins. Characterization and Measurement with UV-visible Spectroscopy. In R. Wrolstad & S. Schwartz (Eds.), *In Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, pp. 1-13.
- Guadalupe, Z., Ayestarán, B. (2008). Changes in the color components and phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. Cv. “Tempranillo” during vinification and aging. *European Food Research and Technology*, 228(1), 29–38. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0902-2>
- He, F., Liang, N. N., Mu, L., Pan, Q. H., Wang, J., Reeves, M. J., Duan, C. Q. (2012). Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules*, 17(2), 1571–1601. <https://doi.org/10.3390/molecules17021571>
- Holt, H., Cozzolino, D., McCarthy, J., Abrahamse, C., Holt, S., Solomon, M., Smith, P., Chambers, P. J., Curtin, C. (2013). Influence of yeast strain on Shiraz wine quality indicators. *International Journal of Food Microbiology*, 165, 302–311. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.006>
- Ilieva, F., Kostadinović Veličkovska, S., Dimovska, V., Mirhosseini, H., Spasov, H. (2017). Selection of 80 newly isolated autochthonous yeast strains from the Tikveš region of Macedonia and their impact on the quality of red wines produced from Vranec and Cabernet Sauvignon grape varieties. *Food Chemistry*, 216, 309–315. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.049>
- Kay, C.D., Kroon, P.A., Cassidy, A. (2009) The bioactivity of dietary anthocyanins is likely to be mediated by their degradation products. *Molecular Nutrition and Food Research*, 531, 92–101.
- Lesko, A., Nyitrai-Sardy, D., Kallay, M., Balga, I. (2014). The effect of yeast on the anthocyanin characteristics of fermented model solutions. *Acta Alimentaria*, 43(2): 232–238. <https://doi.org/DOI.10.1556/AAlim.43.2014.2.6>
- Lingua, M. S., Fabiani, M. P., Wunderlin, D. A., Baroni, M. V. (2016). From grape to wine: Changes in phenolic composition and its

- influence on antioxidant activity. *Food Chemistry*, 208: 228–238. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.009>
- Marquez, A., Serratos, M. P., Merida, J. (2014). Influence of bottle storage time on colour, phenolic composition and sensory properties of sweet red wines. *Food Chemistry*, 146, 507–514. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.103>
- Miran, Ş.S. (2018). Kırmızı Şarap Üretiminde Bölge (Terroir) Farklılığının Fenolik Bileşim Üzerine Etkisi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 52 s.
- Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B. (2006). Evolution of the phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. during ageing in bottle. *Food Chemistry*, 95(3), 405–412. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.004>
- Morata, A., Escott, C., Loira, I., Del Fresno, J. M., Gonzalez, C., Suarez-Lepe Jose Antonio. (2019). Influence of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts in the formation of pyranoanthocyanins and polymeric pigments during red wine making. *Molecules*, 24(4490): 1–18.
- Morata, A., Loira, I., Heras, J. M., Callejo, M. J., Tesfaye, W., González, C., Suárez-Lepe, J. A. (2016). Yeast influence on the formation of stable pigments in red winemaking. *Food Chemistry*, 197: 686–691. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.026>
- Porgali, E., Büyüktuncel, E. (2012). Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of native red wines by high performance liquid chromatography and spectrophotometric methods. *Food Research International*, 45(1): 145-154.
- Rein, M. J. (2005). Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. Academic Dissertation, University of Helsinki Department of Applied Chemistry and Microbiology Food Chemistry Division, 88 pp.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments Volume 2* (Second Edi). John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, İngiltere, 441 p.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144–153.
- Takush, D. G., Osborne, J. P. (2012). Impact of yeast on the aroma and flavour of Oregon Pinot Noir wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 18(2): 131–137. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2012.00181.x>
- Varela, C., Siebert, T., Cozzolino, D., Rose, L., McLean, H., Henschke, P. A. (2009). Discovering a chemical basis for differentiating wines made by fermentation with “wild” indigenous and inoculated yeasts: Role of yeast volatile compounds. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15(3): 238–248. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00054.x>
- Vernhet, A., Carrillo, S., Rattier, A., Verbaere, A., Cheynier, V., Nguela, J. M. (2020). Fate of anthocyanins and proanthocyanidins during the alcoholic fermentation of thermovinified red musts by different *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(11), 3615–3625. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00413>
- Zhao, Y., Sun, Q., Zhu, S., Du, F., Mao, R., Liu, L., Tian, B., Zhu, Y. (2021). Biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts associated with spontaneous fermentation of Cabernet Sauvignon wines from Shangri-La wine region, China. *Scientific Reports*, 11(1): 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83216-x>



## **GIDA ENDÜSTRİSİNDE SİMBİYOTİKLER, POSTBİYOTİKLER VE PARAPROBİYOTİKLER**

**Eda Nurko\*, Emine Nakilcioğlu**

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

Geliş / *Received*: 13.09.2022 Kabul / *Accepted*: 20.01.2023 Online baskı / *Published online*: 27.01.2023

Nurko, E., Nakilcioğlu, E. (2023). Gıda endüstrisinde simbiyotikler, postbiyotikler ve paraprobiyotikler. GIDA (2023) 48 (1) 144-159 doi: 10.15237/gida.GD22089

*Nurko, E., Nakilcioğlu, E. (2023). Symbiotics, postbiotics, and paraprobiotics in the food industry. GIDA (2023) 48 (1) 144-159 doi: 10.15237/gida.GD22089*

### **ÖZ**

Metabolik, fizyolojik ve immünolojik süreçleri etkileyen, mikroorganizmalar tarafından temsil edilen bağırsak mikrobiyotasının bileşiminde uzun vadeli beslenme alışkanlıkları büyük önem taşımaktadır. Beslenme ile bağlantılı olan mikrobiyota için probiyotiklerin ve prebiyotiklerin kullanımı oldukça popülerdir. Gıda sektörünün genişlemesine önemli ölçüde katkıda bulunan probiyotiklerin canlı mikroorganizma içermesi endüstriyel işlemlerde ve depolamada sorunlara sebep olabilmektedir. Son yıllarda, probiyotik ve prebiyotiklere ek olarak, probiyotik ve prebiyotiklerin kombinasyon halinde kullanıldığı simbiyotikler; mikroorganizmalar tarafından salgılanan metabolik yan ürünler olan postbiyotikler ve cansız mikrobiyel hücreler olan paraprobiyotikler oldukça ilgi görmeye başlamıştır. Bu çalışmada, simbiyotikler, postbiyotikler ve paraprobiyotiklerin işlevleri, sağlığa etkileri ve gıda sektöründeki kullanım alanları hakkında literatür taraması yapılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Fonksiyonel gıda, paraprobiyotik, postbiyotik, prebiyotik, probiyotik, simbiyotik

## **SYMBIOTICS, POSTBIOTICS, AND PARAPROBIOTICS IN THE FOOD INDUSTRY**

### **ABSTRACT**

Long-term dietary habits are of great importance in the composition of the intestinal microbiota, which is represented by microorganisms that affect metabolic, physiological and immunological processes. The use of probiotics and prebiotics for the microbiota associated with nutrition is very popular. The fact that probiotics contain live microorganisms, which contribute significantly to the expansion of the food sector, can cause problems in industrial processes and storage. In recent years, in addition to probiotics and prebiotics, symbiotics in which probiotics and prebiotics are used in combination; postbiotics, which are metabolic by-products secreted by microorganisms, and paraprobiotics, which are non-living microbial cells, have started to attract a lot of attention. In the study, a literature review was conducted on the functions, health effects and uses of symbiotics, postbiotics and paraprobiotics in the food industry.

**Keywords:** Functional food, paraprobiotic, postbiotic, prebiotic, probiotic, symbiotic

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ nurkoeda.ege@gmail.com,

☎ (+90) 232 311 3050,

☎ (+90) 232 342 7592

Eda Nurko; ORCID no: 0000-0001-9598-7407

Emine Nakilcioğlu; ORCID no: 0000-0003-4334-2900

## GİRİŞ

Bağırsak mikrobiyotası, mikroorganizmalar tarafından temsil edilen dinamik bir topluluktur (González vd., 2019; İsmailoğlu ve Yılmaz, 2019). Aynı zamanda, metabolik, immünolojik ve fizyolojik süreçleri içeren fonksiyonlara sahiptir (Çelik ve Ayyıldız, 2022; Ferreira vd., 2022). Sağlıklı bir bireyin bağırsak mikrobiyotası esas olarak *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* bakterilerinden oluşmaktadır (González vd., 2019; Bölükbaş ve Vatansver, 2022). İnsan vücudundaki sistemler, işlevler ve döngüler mikrobiyota ile simbiyotik bir ilişkiye sahiptir (Ferreira vd., 2022). Her bireyin mikrobiyotasında, farklı oranlarda bakteri bulunmaktadır (González vd., 2019; Çelik ve Ayyıldız, 2022). Mikrobiyotanın bozulması sağlık-hastalık sürecini önemli ölçüde etkilemektedir (Tilg vd., 2018; González vd., 2019). Bağırsak mikrobiyotasının bileşiminde ve güçlendirilmesinde uzun vadeli beslenme alışkanlıkları büyük öneme sahiptir (González vd., 2019; Tokay vd., 2022).

Beslenme-sağlık açısından önemli olan mikrobiyota için probiyotikler ve prebiyotikler oldukça popüler hale gelmiştir (Cunningham vd., 2021). Probiyotikler, Gıda ve Tarım Örgütü/Dünya Sağlık Örgütü'ne (FAO/WHO) göre, "yeterli miktarda uygulandığında konakçıya sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmaların mono veya karışık kültürleri" olarak tanımlanmıştır (FAO/WHO, 2002). Yeterli probiyotik miktarı ülkelere göre değişiklik gösterse de, toplamda  $10^8$ - $10^9$  KOB/g probiyotikten az olmamalıdır (Rad vd., 2012). Yeterli probiyotik miktarı, Amerika'da  $10^8$  KOB/g iken Kanada'da porsiyon başına  $10^9$  KOB olacak şekilde standartlar geliştirilmiştir (De Vuyst, 2000; Champagne vd., 2011). Ek olarak, "iyi bakteri" olarak da adlandırılan probiyotikler, bağırsak mikrobiyotasını geliştirmekte ve faydalı etkilerinden dolayı gıda takviyesi olarak kullanılabilir (Sekhon ve Jairath, 2010). Yaygın olarak kullanılan probiyotik mikroorganizmalar arasında, *Lactobacillus* türleri, *Bifidobacterium* türleri, *Saccharomyces* türleri, *Streptococcus* türleri ve *Enterococcus* gibi bakteriler yer almaktadır (İsmailoğlu ve Yılmaz, 2019; Saad vd., 2013). Bifidobakteriler olarak da bilinen laktik asit

bakterileri, faydalı özelliklerinden dolayı, özellikle fermente gıdalarda ve süt ürünlerinde yaygın olarak kullanılan probiyotik türüdür (Peng vd., 2020). Fonksiyonel gıdalar kategorisinde de yer alan probiyotikler, antidiyabetik, antikanserojenik, hipotansif, hipokolesterolemik etkilere sahiptir (Ghoneum ve Gimzewski, 2014; Liang vd., 2020; Won vd., 2021). Ek olarak, ishale karşı da etkinlik göstermektedirler (Rad vd., 2012; Damián vd., 2022; Madrigal-Matute ve Escandell, 2022).

Prebiyotikler ise, FAO/WHO'ya göre, "sınırlı sayıda yerli bakterinin uygun büyümesini veya aktivitesini seçici olarak uyararak konakçı üzerinde faydalı bir fizyolojik etki sağlayan sindirilemeyen maddeler" şeklinde tanımlanmıştır (Sekhon ve Jairath, 2010). Aynı zamanda prebiyotikler, konakçının mikroorganizmaları tarafından seçici olarak kullanılan, gastrointestinal mikrobiyotada değişikliklere neden olan ve sağlığa fayda sağlayan sindirilemeyen gıda bileşenleri olarak tanımlanmaktadır (Sekhon ve Jairath, 2010; Saad vd., 2013; Alves-Santos vd., 2020; Abdi ve Joye, 2021). İnülin, galaktooligosakkaritler, fruktooligosakkaritler gibi dirençli oligosakkaritler ve bazı diyet lifleri, yaygın olarak kullanılan prebiyotikler arasında yer almaktadır (Zaman ve Sarbini, 2016; Alves-Santos vd., 2020). Prebiyotikler, sindirim enzimlerine karşı direnç göstermekte ve bağırsak mikrobiyotası tarafından fermente edilerek kullanılmaktadır (Sekhon ve Jairath, 2010; Zaman ve Sarbini, 2016). Prebiyotikler, yerli ve yararlı bakterilerden olan *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium*'un gelişimini desteklemekte; daha sonra ise konakçı için kısa zincirli yağ asitleri gibi metabolitler üreterek fonksiyonel olarak kabul edilmektedir (Zaman ve Sarbini, 2016; Galyon ve Varlık, 2021). Bağırsak sağlığına fayda sağlamanın yanı sıra, kanserin oluşum riskinin azaltılmasında, kabızlık ve obezitenin önlenmesinde, bağışıklık sisteminin desteklenmesinde de etkilidirler. Ek olarak, kemik sağlığına da fayda sağlamaktadırlar (Rolim, 2015; Alves-Santos vd., 2020; Li vd., 2021).

Bağırsak mikrobiyotasına ve insan sağlığına faydaları olduğu bilinen probiyotik ve prebiyotiklere ek olarak, son yıllarda biyotikler ailesinden olan simbiyotikler, postbiyotikler ve

paraprobiyotikler oldukça ilgi görmektedir (Nataraj vd., 2020; Sak ve Soykut, 2021). Bu derleme çalışmasında, simbiyotiklerin, postbiyotiklerin ve paraprobiyotiklerin tanımı, işlevleri, sağlığa etkileri ve gıda sektöründeki kullanım alanları hakkında yapılan araştırmalar derlenmiştir.

## SİMBİYOTİKLER

### Simbiyotikler ve Sağlığa Etkileri

“Konakçıya sağlık açısından fayda sağlayan canlı mikroorganizmalar ve konakçı mikroorganizmalar tarafından seçici olarak kullanılan substratlardan oluşan karışım” simbiyotikler olarak adlandırılmaktadır (Zepeda-Hernández vd., 2021). Aynı zamanda simbiyotikler, insan vücuduna ve bağırsak sağlığına faydalı olan probiyotikler ve prebiyotiklerin sinerjik ilişkide olduğu bir kombinasyon olarak da bilinmektedir (Mohanty vd., 2018; Bondar, 2021; Miarons vd., 2021). Simbiyotik bir ürün, sağlığa faydalı bakterilerin çoğalmasını ve canlı mikrobiyel gıda takviyelerinin gastrointestinal sistemde hayatta kalmasını desteklemektedir (Pandey vd., 2015; Markowiak ve Ślizewska, 2017). Probiyotikler, ince ve kalın bağırsakta aktiftirler. Prebiyotikler ise kalın bağırsakta probiyotiklerin büyümesine katkı sağlamaktadırlar (Markowiak ve Ślizewska, 2017; Mohanty vd., 2018).

Simbiyotik formülasyonlarda *Lactobacilli*, *Saccharomyces boulardii*, *Bifidobacteria* spp., *Bacillus coagulans* vb., probiyotik suşlar olarak kullanılırken; fruktooligosakkaritler (FOS), ksiloseoligosakkaritler (XOS), galaktooligosakkaritler (GOS) vb. ise prebiyotik olarak kullanılmaktadır (Pandey vd., 2015; Martyniak vd., 2021; Figueiredo ve Oliva-Neto, 2022). Prebiyotikler bakımından zengin olan gıdaların fermente olmasıyla probiyotik içerikleri zenginleşmektedir (Çeltik vd., 2022). Prebiyotiklerin, probiyotikler ve mikrobiyota tarafından fermente edilmesinden sonra, asetat, bütirat ve propiyonat gibi kısa zincirli yağ asitlerinde artış meydana gelmektedir (Zepeda-Hernández vd., 2021). Fermente gıdalara ek olarak bal ve anne sütü doğal olarak simbiyotik özellik gösteren gıdalar arasında yer almaktadır. Raf ömrü boyunca simbiyotik özellikteki gıdalar,

yaklaşık  $10^4$ - $10^9$  KOB/g canlı probiyotik bakteri içermektedirler (Çeltik vd., 2022). Ek olarak, SDM Gıda Simbiotics (*Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus rhamnosus* ve inülin içeren), Ageflor (*Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus* ve inülin içeren), ARE Pharma Synbiotic (*L. acidophilus*, *B. longum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus paracasei*, *Streptococcus thermophilus* ve inülin içeren), Probien (*L. acidophilus*, *B. longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *L. rhamnosus*, *L. bulgaricus*, *L. paracasei*, *Lactobacillus brevis*, *L. reuteri*, *S.thermophilus*, *Lactobacillus plantarum* ve inülin içeren) gibi markalara ait ticari olarak satılan simbiyotiklerin kullanımı da gün geçtikçe artmaktadır.

Sağlığa faydalı etkileri bulunan simbiyotik gıdaların tüketilmesiyle birlikte artan *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* sayıları ile dengeli bağırsak mikrobiyotası oluşturulur (Markowiak ve Ślizewska, 2017; Mohanty vd., 2018). Ek olarak, siroz hastalarının karaciğer fonksiyonlarının iyileşmesine katkı sağlamaktadır (Pandey vd., 2015). Simbiyotik gıdaların, kanserden koruyucu, ishal ve kabızlık gibi bağırsak problemlerini düzenleyici, hipertansiyonu ve LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein) kolesterolü düşürücü, bağırsak sağlığını dengeleyici ve obeziteyi önleyici etkileri de bulunmaktadır (Çeltik vd., 2022; Crovesy vd., 2021). Sugawara vd. (2006) tarafından yapılan çalışmada, cerrahi operasyon geçiren hastaların hastane enfeksiyonlarına karşı oral simbiyotik (*Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium breve* ve GOS içeren) uygulamasının bağırsak bariyer fonksiyonu, sistemik inflamatuvar yanıtlar ve immün yanıtlar üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Simbiyotik tedaviden sonra enfeksiyöz komplikasyonların (karın içi apse vb.) azaldığı belirtilmiştir.

### Simbiyotiklerin Gıda Sektöründe Kullanımı

Safdari vd. (2021) yaptıkları çalışmada, deve sütünden hazırlanan simbiyotik yoğurdun kimyasal ve reolojik özelliklerini incelemişlerdir. Prebiyotik bileşikler olarak oligosakkarit, polisakkarit ve lignin içeren muz lifi ve muz kabuğu lifi kullanılırken; probiyotik olarak *L. casei* ve *Lactobacillus gasseri* kullanılmıştır. Deve sütüne, etanol ile ekstrakte edilen muz lifleri %0, %0.2, %0.5 ve %1 konsantrasyonlarında eklenmiş ve

homojenize edildikten sonra 95 °C'de 5 dakika boyunca ısı işlem uygulanmıştır. Ardından yoğurda starter bakteri ve probiyotikler eklenmiş, yoğurdun pH'ı Gustaw vd. (2011) tarafından yapılan çalışma referans alınarak 4.4-4.7 aralığında olana kadar 42 °C'deki inkübatörde fermente

edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, artan lif miktarının sinerezis, hidrasyon, pH, yüzey gerilimi, lezzet ve renk özelliklerini önemli ölçüde azalttığı, viskoziteyi, doku kabulünü ve hayatta kalan probiyotiklerin sayısını arttırdığı görülmüştür.

Çizelge 1. Simbiyotiklerin gıda sektöründe kullanıldığı çalışmalar

Simbiyotik Ürün ile Üretimde Kullanılan Probiyotikler ve Prebiyotikler	Çalışmanın Amacı	Çalışmanın Sonucu	Referans
Simbiyotik ekmek üretiminde, probiyotik olarak GanedenBC30 ( <i>B. coagulans</i> GBI-30), prebiyotik olarak ise inülin kullanılmıştır.	Farklı sürelerde (2-56 gün) depolanan dondurulmamış ve dondurulmuş hamurdan, iki farklı simbiyotik ekmek üretmek amaçlanmıştır. Dondurulmamış hamurda %0, %2.5, %5 ve %7.5 oranlarında, dondurulmuş hamurdan elde edilen ekmekte ise %5 inülin kullanılmıştır.	Yapılan analizler sonucunda, inülin ilavesiyle hamurun yumuşaklığı ve su emme kapasitesinin azaldığı görülmüştür. Ancak inülin, ekmeğin depolanması sırasında gerçekleşen nem kaybını ve ekmeğin hacmini azaltmış, kabuk rengini koyulaştırmış ve kırını sertliğini arttırmıştır. 56 günlük depolama süresinde ekmeğin nem içeriği değişmemiş, hacmi azalmış ve sertliği artmıştır. Dondurulmamış hamurdan üretilen ekmeklerde sırasıyla 7.45, 6.45 ve 7.43 log KOB/g olacak şekilde, kabul edilebilir düzeyde probiyotik varlığı gözlemlenmiştir.	(Majzooobi vd., 2019)
Simbiyotik bir tatlı geliştirmeyi amaçlayan çalışmada, probiyotik olarak <i>L. plantarum</i> , prebiyotik olarak ise polidekstroz, inülin ve FOS içeren toz lif karışımı kullanılmıştır.	Yam püresi ve Ubá mango posası kullanarak simbiyotik bir tatlı geliştirmeyi amaçlayan çalışmada 1:1 oranda yam püresi ve Ubá mango posası içeren hamura, <i>L. plantarum</i> eklenmiş ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra, 100 gram tatlı başına 2.5 gram diyet lifi olacak şekilde polidekstroz, inülin ve FOS içeren toz lif karışımı ilave edilmiştir. Kontrol tatlısı (CD), lifli (DF), probiyotikli (DP), probiyotikli ve lifli (DPF) olan tatlı formülasyonları 5 °C'de 16 gün boyunca depolanmıştır.	Geliştirilen tatlı formülasyonları, psödoplastik sıvı davranışı göstermiş ve mikroorganizmaların gelişmesine katkı sağlamıştır. Elde edilen ürünün tatmin edici miktarlarda askorbik asit (C vitamini), diyet lifi ve β-karoten içerdiği belirtilmiştir. β-karoten içeriği 100 g numunede 4 mg civarlarında, toplam diyet lifi ise 100 g DPF'de 8.52 g, DP'de 6.53 g olarak belirlenmiştir. Tatlılardaki <i>L. plantarum</i> sayısının gastrointestinal koşullarda bile 8 log KOB/g'ın üzerinde olduğu görülmüştür.	(de Almeida Costa vd., 2020)

Segura-Badilla vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada, simbiyotik özellikte fonksiyonel hindistan cevizi suyu geliştirilmiştir. Prebiyotik olarak ise *L. rhamnosus* SP1 kullanılmıştır. Farklı lif ve probiyotik konsantrasyonları geliştirilmiş ve MRS sıvı besiyerinde probiyotiklerin büyümesi gözlemlenmiştir. pH ve hedonik ölçek kullanılarak yapılan duyu analizi sonuçlarına göre değerlendirilmesi yapılan hindistan cevizi suyu, 8 saat fermente edilmiş ve 14 gün boyunca buzdolabında depolanmıştır. Yapılan analizler sonucunda, geliştirilen içeceğin pH'ı 3.48 iken probiyotik miktarı  $82 \times 10^8$  KOB/ml olarak belirlenmiştir. *L. rhamnosus*'un, probiyotik olarak kabul edilmesi gereken minimum düzeyin üzerinde olduğu belirtilmiştir. Ancak, ürünün enzimatik aktivitelerden dolayı oluşan istenmeyen doku, tat ve kokunun 1.5 °C'de 15 günlük depolamadan sonra oluşabileceği ve bu durumun tüketici memnuniyetinde azalmaya sebep olabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak, hindistan cevizi suyunun prebiyotik ve probiyotik özellikler eklenerek işlenebileceği görülmüştür.

## POSTBİYOTİKLER

### Postbiyotikler ve Sağlık Etkileri

Probiyotikler, canlı bakterilerden oluşmakta, ölü bakteri hücrelerini ve bileşenlerini içermemektedir (Cuevas-González vd., 2020). Probiyotiklerin canlı mikroorganizmalardan oluşması, gıdalarda kullanımını ve depolanmasını zorlaştırabilmektedir. Bu nedenle, fayda sağlayan postbiyotiklerin üretimine olan ilgi artmaya başlamıştır (Uğur vd., 2021). Postbiyotikler ise prebiyotik, probiyotik tanımlarına uymayan biyoaktif bileşenleri içermektedir (Moradi vd., 2020). Yunancada, "post" kelimesi sonra anlamına, "bios" kelimesi yaşam anlamına gelmektedir. "Postbiyotik" kelimesi ise bu kelimelerden türetilmiştir (Vinderola vd., 2022). Postbiyotikler, probiyotik olan veya probiyotik olmayan canlı hücreler tarafından salgılanan, peptitler, polisakkaritler, teikoik asitler, enzimler, organik asitler ve hücre yüzeyi proteinleri gibi hücrel lizisten sonra açığa çıkan, konağa faydalı mikrobiyel ürünler veya metabolik yan ürünlerdir (Nataraj vd., 2020; Gökırmaklı vd., 2021; Abbasi vd., 2022). Bakteri-konak etkileşimleriyle açığa çıkan endojen

bileşenler de postbiyotik olarak kabul edilmektedir (Peluzio vd., 2021). Aynı zamanda, postbiyotiklerin, mikrobiyolojik büyüme ve fermentasyon sırasında gıdalarda bulunan mikroorganizmalar tarafından üretilen biyoaktif çözümler bileşenler olduğu belirtilmektedir (Moradi vd., 2020; İçier vd., 2022). Postbiyotikler genellikle, Lactobacillaceae familyasına ait bazı cinsleri veya *Bifidobacterium* cinsine dahil olan cansız suşları içermektedir (Salminen vd., 2021). Ek olarak, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* gibi laktik asit bakterileri tarafından da bakteriyosin üretilmektedir (Damania vd., 2016). Örneğin, fermente süt ürünlerinde, peptidoglikan, laktik asit, postbiyotik olabilecek metabolitler ve bakteriyosinler laktik asit bakterileri tarafından salgılanmaktadır (Uğur vd., 2021). Kefir, salamura sebzeler, yoğurt ve turşu gibi fermente gıdalar da zengin postbiyotik kaynaklardır (Gökırmaklı vd., 2021).

Postbiyotikler, canlı mikroorganizmaları içermediği için tüketimi ile ilgili riskler de azalmaktadır (Żółkiewicz vd., 2020). Depolama sırasında ve endüstriyel işlemlerde, probiyotiklere kıyasla ısıya ve oksijene duyarlı olmadıkları için daha çok ilgi görmeye başlamışlardır. Probiyotik mikroorganizmaların depolanması sırasında önemli bir faktör olan ortam sıcaklığı, postbiyotikleri bir adım öne çıkarmakta, cansız mikroorganizmalara sahip oldukları için raf ömrünü arttırmaktadır (Salminen vd., 2021). Fermentasyon ve besiyeri koşullarına bağlı olarak üretilen postbiyotikler, hücre içermeyen fazın ayrılıp, saflaştırılmasıyla elde edilmekte ve kurutulmuş toz hale getirilmektedir (Żółkiewicz vd., 2020; İçier vd., 2022).

Bağırsak mikrobiyotası tarafından üretilen metabolitlerin, hastalıkları önleme, beslenme, insan sağlığı ve mikrobiyotaya ile bir bağlantısı olduğu düşünülmektedir (Peluzio vd., 2021). Sağlığa faydalı etkileri olduğu düşünülse de moleküler düzeyde gerçekleşen mekanizmaların etkisi henüz kesinleşmemiştir (İçier vd., 2022). Postbiyotik metabolitler, ince bağırsağa ulaştığında antiinflamatuvar aktivite göstermekte; yapılarındaki antimikrobiyel peptitler sayesinde patojenleri öldürmekte ve antioksidan etkileriyle

bağışıklık sistemini güçlendirmektedirler (Pelton, 2020). Prebiyotik ve probiyotiklerin mikrobiyota tarafından fermentasyonu ile oluşan bütirat, bağırsak epitel hücreleri için enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır (Zepeda-Hernández vd., 2021). Aynı zamanda inek sütü alerjisine de etkisi olan postbiyotikler, bağırsak mikrobiyotası tarafından üretilen kısa zincirli yağ asitleri ile lipit metabolizmasında rol oynamakta, kardiyovasküler hastalık riskini azaltmakta ve insülin duyarlılığını düzenlemektedirler (Aguilar-Toalá vd., 2018; Żółkiewicz vd., 2020; Sabahi vd., 2022). Antikanser potansiyeli de olduğu düşünülen postbiyotiklerin, ishali önlediği, farenjit, larenjit, atopik dermatit insidansını ve astım alevlenmelerini azalttığı öne sürülmektedir (Żółkiewicz vd., 2020; Sak ve Soykut, 2021). Ek olarak, postbiyotiklerin anti-obezite, antiproliferatif, antihipertansif ve antiaterojenik etkileri de bulunmaktadır (Aguilar-Toalá vd., 2018; Żółkiewicz vd., 2020; Cabello-Olmo vd., 2021). Kısa zincirli yağ asitlerinden (bütirat, propiyonat ve asetat), vitamin ve minerallere kadar geniş bir yelpazeye sahip olan postbiyotiklerin sağlık üzerindeki olası etki mekanizmaları değişiklik gösterebilmektedir (Peluzio vd., 2021). Marcon vd. (2019)'nin fareler üzerinde yaptıkları çalışmada, *Smallanthus sonchifolius* içeren ürün tüketiminin bütirat sentezini arttırarak, enfeksiyonlara karşı bağırsak epitel hücrelerinin metabolizmasını düzenlediği ve mukozal bağışıklığı koruduğu belirtilmiştir. Dostal vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada ise bir çocuktan alınan immobilize bağırsak mikrobiyotası ile aşılınmış bir in vitro fermentasyon modelinde *Roseburia intestinalis*'in, kolondaki demir (Fe) miktarı ile birlikte işlevi araştırılmıştır. Diyetle alınan Fe miktarının, mikrobiyotadaki azalmış bütirat ve propiyonat konsantrasyonlarını arttırdığı belirtilmiştir.

### Postbiyotiklerin Gıda Sektöründe Kullanımı

Farmasötik ürünlerde, kültür balıkçılığında, tarımda kullanılabileceği belirtilen postbiyotiklerin gıda endüstrisindeki kullanımına olan ilgi de son yıllarda artmıştır (Gökırmaklı vd., 2021; Moradi

vd., 2021). Biyofilmlerin giderilmesinde, kimyasal bulaşanların parçalanmasında, yenilebilir kaplamalarda, gıda patojenlerinin inhibe edilmesinde kullanılan postbiyotikler, gıda katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır (Gökırmaklı vd., 2021; İçier vd., 2022). Son yıllarda gıda alanında postbiyotikler ile ilgili yapılan bazı çalışmalara aşağıda değinilmiştir.

Geleneksel Meksika Cocido peynirinden izole edilen iki *Lactobacillus fermentum* suşu (*L. fermentum* J23 ve J32) tarafından üretilen bakteriyosinleri izole edip, sütteki seçilmiş indikatör mikroorganizmalara karşı olan antimikrobiyel potansiyellerini incelemek Heredia-Castro vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada amaçlanmıştır. *L. fermentum* J23 ve *L. fermentum* J32'nin hücresiz süpernatantlarından elde edilen fraksiyonlar, C18 kolonunda ters fazlı HPLC ile fraksiyonlarına ayrılmıştır. Bakteriyosin içeren fraksiyonların (BCF), indikatör mikroorganizmalara (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Salmonella typhimurium* ve *Salmonella choleraesuis*) karşı antimikrobiyel aktiviteleri disk difüzyon yöntemi ve sütte büyüme inhibisyonu ile belirlenmiştir. Ardından, izole edilmiş BCF, ters fazlı HPLC tandem kütle spektrometrisi ile analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre, BCF'nin indikatör mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel aktivite gösterdiği görülmüştür. *L. fermentum* J23 fraksiyonlarından bir tanesi *Escherichia coli*'ye karşı en yüksek aktiviteyi gösterirken, *L. innocua*, *S. choleraesuis*, *S. aureus* ve *S. typhimurium*'a karşı da aktivite göstermiştir. Aynı zamanda, J23 ve J32'den elde edilen bazı fraksiyonların süte dahil edildikten sonra, nisine (kontrol grubu) göre daha fazla antimikrobiyel etki gösterdiği görülmüştür. Ters fazlı HPLC tandem kütle spektrometrisi analiz sonuçlarına göre, BCF'de birkaç peptid fraksiyonu ve *L. fermentum* J23 fraksiyonlarından en aktif olan 1 bakteriyosin tespit edilmiştir. J23 suşuna ait tespit edilen bakteriyosinin süt ürünlerinde indikatör mikroorganizmalara karşı koruyucu olarak uygulanabileceği sonucuna varılmıştır.



Çizelge 2. Postbiyotiklerin gıda sektöründe kullanıldığı çalışmalar

Çalışmanın Amacı	Postbiyotik Eldesi ve Son Ürün	Çalışmanın Sonucu	Referans
Çiğ tavuk sosisi ve yarı mamul tavuk ürünlerinin raf ömrünü uzatmak için, <i>Lactobacillus paracasei</i> DTA 83 ve <i>Saccharomyces cerevisiae var boulardii</i> 17 ile yarı kültür fermantasyonunda postbiyotik içeren koruyucu (PPCP) üretmek amaçlanmıştır. Aynı zamanda, soğuk zincirin, ürünlerin raf ömrüne olan etkisi değerlendirilmiştir.	<i>L. paracasei</i> DTA 83 ve <i>S. boulardii</i> 17'nin büyümesi amacıyla sırayla 36 ve 30°C sıcaklıklarda 1 gece inkübe edilmiştir. 1/10 (v/v) oranındaki kültürleri, 0.05 M soya proteinini, 0.005 M fosfatı ve 0.1 M glikozu içeren PPCP eldesinde, karıştırma sistemli silindirik biyoreaktör (300 L) kullanılmıştır. Üç günlük fermantasyondan sonra PPCP'ye 90 °C'de 10 dakika ısı işlem uygulanmıştır. Daha sonra ortamda kalan <i>L. paracasei</i> DTA 83 ve <i>S. boulardii</i> 17 varlığı plaka sayımı ile belirlenmiştir. Elektrikli öğütme makinesinde kıyılan tavuk etine diğer bileşenler de eklenmiş ve 90 saniye karıştırılmıştır. Kontrol (PPCP eklenmeden), T1 (PPCP'nin %1.0'i) ve T2 (PPCP'nin %1.5'i) dahil olmak üzere üç parti sosis hazırlanmıştır.	Yapılan çalışmalar sonucunda, çiğ tavuk sosislerine veya yarı pişmiş tavuk ürünlerine eklenen PPCP konsantrasyonu %0.5'in altında olduğunda, kontaminantların inhibe edilemediği; %1.0 ve %1.5 PPCP eklenmesiyle ise kısmi inhibisyon elde edildiği belirtilmiştir. Toplam inhibisyonun %3.0'dan fazla PPCP eklenmesiyle sağlandığı ve bunun da maliyeti ciddi bir şekilde etkileyeceği düşünülmektedir. PPCP'nin 60 günlük soğuk depolamada 5 log KOB/g'dan az miktarda aerobik mezofiliyi kontrol etmek için çiğ tavuk sosislerinde ve yarı pişmiş tavuk ürünlerinde koruyucu olarak kullanılabileceği görülmüştür.	(de Almeida Godoy vd., 2022)
Bakteriyosin üreten <i>L. plantarum</i> Cys5-4 suşunun, aktif maddeler ve çöktürülmüş peptidler (PP) ile hücresiz süpernatant (CFS) olmak üzere iki formda, taze portakal suyundaki ve Latin Amerika'ya özgü fermente bir içecek olan chicha suyundaki koruyucu potansiyeli araştırılmıştır.	<i>Malus sp.</i> 'nin tropikal yabani tür meyvelerinden izole edilen <i>L. plantarum</i> Cys5-4, anaerobik koşullarda 32°C'de MRS sıvı besiyerinde 18 saat boyunca inkübe edilmiştir. MRS sıvı besiyeri ortamları sükröz (%2) takviye edilmiş MRS sıvı besiyeri, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (%2) takviye edilmiş MRS sıvı besiyeri, glikoz (%5) takviye edilmiş MRS sıvı besiyeri, %1 ve %5 Tween20 ile takviye edilmiş sıvı besiyeri ve gliserol (%5) takviye edilmiş MRS sıvı besiyeri olmak üzere oluşturulmuştur. <i>L. plantarum</i> Cys5-4, 24 saat boyunca MRS sıvı besiyerlerine aşılmuştur. Referans suşları olarak <i>E. coli</i> ve <i>Salmonella enterica</i> kullanılmış, <i>L. plantarum</i> Cys5-4'un bu patojenlere karşı antimikrobiyel etkileri gözlemlenmiştir.	Yapılan çalışmalar sonucunda, bakteriyosin eklendikten sonra meyve suyunun pH'ında (4.0) bir değişiklik olmamıştır. Aynı zamanda chicha suyuna CFS Cys5-4 ilave edildiğinde <i>E. coli</i> hücre yoğunluğunun 1. günde 5.46 log KOB/ml'den 5. günde 2.46 log KOB/ml'ye kademeli olarak azaldığı görülmüştür. Portakal suyuna CFS Cys5-4 ilave edildiğinde ise <i>E. coli</i> hücre yoğunluğunun 1. günde 6.0 log KOB/ml'den 5. günde 3.03 log KOB/ml'ye azaldığı gözlemlenmiştir. Ek olarak, 1. günde <i>Salmonella</i> hücre yoğunluğunun düşüşü 4.24 log KOB/ml olarak belirlenmiş ve depolama boyunca aynı aralıkta kalmıştır.	(Tenea ve Barrigas, 2018)

Damania vd. (2016) tarafından yapılan çalışmanın amacı, Yakult'tan (fermente edilmiş probiyotik süt içeceği) bakteriyosin üreten laktik asit bakterisini izole etmek ve LAB tarafından üretilen

bakteriyosin ile antimikrobiyel ambalaj paketleme sistemi geliştirmektir. Aynı zamanda, ambalaj malzemesinin, seçilen patojenik mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyel

etkilerini de incelemişlerdir. Antimikrobiyel ambalaj filmi *L. casei* tarafından üretilen bakteriyosin kullanılarak kaplanmış veya farklı ambalaj malzemelerinin yüzeyine adsorbe edilmiştir. MRS sıvı besiyerine örnekten aşılınmış ve 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra, 30°C'de 24 saat inkübasyondan sonra hücreler santrifüj edilerek ayrılmış ve hücresiz süpernatant (CFS) alınmıştır. Bu çalışmada kâğıt bardaklarda kullanılan plastik kaplı sert kâğıt ve tereyağlarını paketlemek için kullanılan jelatin kâğıtlar (glassine paper) antimikrobiyel ambalaj geliştirmede kullanılmıştır. 2x2 cm olacak şekilde kesilen ambalajlar, fırında sterilize edilmiş ve bakteriyosin içeren CFS solüsyonunda 1 saat bekletilmiştir. Gece boyunca kurumaya bırakılan filmler MRS sıvı besiyeri ile kaplanmış ve 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Kaplanan filmlerin, *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı antimikrobiyel aktivitesi agar difüzyon testi ile belirlenmiştir. Yapılan çalışmanın sonuçlarına göre, *E. coli* ve *S. aureus*'u inhibe etmek için bakteriyosinlerin kullanılabilirliği görülmüştür. Bakteriyosinlerin kullanımı ile birlikte patojenlerin gelişme riski azaltılabilmekte, antimikrobiyel paketleme yapılabilen ve gıdaların raf ömrü uzatılabilmektedir. Ancak, *L. casei* tarafından üretilen bakteriyosinlerin üretimi için optimum koşulları ayarlamak büyük önem taşımaktadır. İn vitro ortamda aktivite gösteren bakteriyosinlerin, in vivo ortamda da test edilmesi gerektiği belirtilmiştir. Ek olarak, bakteriyosinlerden aktif, inert ve antibakteriyel ambalaj filmlerin geliştirilmesi uygun bulursa da, ambalaj filmlerinin belirli bir süre boyunca stabilitesinin de araştırılması gerektiği belirtilmiştir.

### PARAPROBİYOTİKLER

#### Paraprobiyotikler ve Sağlık Etkileri

Canlı mikroorganizmalardan dolayı uygulanabilirlik ve güvenlik sorunlarını beraberinde getiren probiyotiklerin yerine, canlı olmayan mikroorganizmaların da sağlığı olumlu yönde etkileyebileceği düşünülerek “paraprobiyotikler” kavramı ortaya çıkarılmıştır (Choudhury ve Kamilya, 2019; Martyniak vd., 2021). FAO/WHO'ya göre paraprobiyotiklerin tanımı “yeterli miktarda tüketildiğinde tüketicilere fayda sağlayan inaktif (cansız) mikrobiyel hücreler

veya hücre fraksiyonları” olarak yapılmıştır (İçier vd., 2022). Paraprobiyotikler aynı zamanda, “hayalet probiyotikler”, “canlı olmayan probiyotikler” ve “inaktif probiyotikler” olarak da bilinmektedir (Choudhury ve Kamilya, 2019; Siciliano vd., 2021). Paraprobiyotikler polisakkaritler, teikoik asitler ve hücre yüzeyi ile ilişkili proteinler gibi hücre bileşenlerini içeren bozulmamış veya parçalanmış olarak probiyotiklerin inaktif olan mikrobiyel hücrelerinden oluşmaktadır (Nataraj vd., 2020).

Yapılan araştırmalara bakıldığında canlı olmayan/ölü hücrelerin de faydalı biyolojik tepkiler üretebileceği ve immünomodülatör faaliyetleri arttırmak için paraprobiyotiklerin kullanılabilirliği görülmüştür (Akter vd., 2020; Kumar vd., 2021). Cansız hücre bileşenlerinin gastrointestinal sistemde antiinflatuar etki gösterdiği ve patojenik enfeksiyonlara karşı hastalık direncini arttırdığı belirtilmiştir (Akter vd., 2020; Siciliano vd., 2021). Aynı zamanda, ısıyla inaktive edilmiş paraprobiyotik bileşenlerin insan kanser hücrelerine karşı antiproliferatif etki gösterdiği belirtilmiştir (Uğur vd., 2021). Paraprobiyotiklerin, depresyon, stres ve anksiyete semptomlarını hafifletmek için yardımcı olabileceği de belirtilmektedir (Sawada vd., 2019; Siciliano vd., 2021). Bağışıklığı destekleyici sitokin gen ekspresyonunun uyarılması ve hücre sinyal sistemi aktivasyonunun, paraprobiyotiklere uygulanan ısı işlemi ile engellenmediği görülmüştür (Uğur vd., 2021; Siciliano vd., 2021). Ek olarak, paraprobiyotiklerin, alerjik rinit semptomlarını hafiflettiği, solunum yollarının duyarlılığını azalttığı ve soğuk algınlığı riskini düşürdüğü gözlemlenmiştir (Uğur vd., 2021; Kumar vd., 2021). Paraprobiyotiklerin sağlığa etkileri ve işlevleri hakkında literatür çalışmaları bulursa da, kesin yargıları ortaya koyabilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Chung vd., 2019; Akter vd., 2020; Seo vd., 2020; Almada vd., 2021; Kim vd., 2021; Kang vd., 2021; Butera vd., 2022; Lim vd., 2022; Michels vd., 2022).

### Paraprobiyotiklerin Gıda Sektöründe Kullanımı

Bağımsızlığı düşük bireyler ve yaşlılar için, tüketilen gıdalardaki canlı mikroorganizmaların varlığı ve işlevselliği endişe yaratmaktadır (Siciliano vd., 2021). Canlı olmayan mikroorganizmaları içeren paraprobiyotiklerin işlenmesi ve depolanması, probiyotiklere göre daha kolaydır. Paraprobiyotikler için ticari üretim, seçilen mikroorganizmaların geliştirilmesi ve inaktive edilmesi aşamalarından oluşmaktadır (Martyniak vd., 2021). Probiyotik kullanımına ait bazı dezavantajların üstesinden gelebilen paraprobiyotikler, yeni fonksiyonel gıdaların oluşturulmasında ilgi görmektedir (Siciliano vd., 2021). Probiyotiklerin inaktive edilebilmesi için ısı, gama ve ultraviyole ışınları, formalin gibi kimyasallar, yüksek basınçlı kurutma, pH değişiklikleri, radyasyon ve sonikasyon gibi çeşitli yöntemlerin uygulanması gerekmektedir (Deshpande vd., 2018; Martyniak vd., 2021). İnaktivasyon uygulamaları, hücresel yapı bileşenlerini ve biyolojik aktivitelerini farklı şekilde etkileyebilmektedir (İçier vd., 2022). Isı ile inaktive etme yöntemi en yaygın olarak kullanılan yöntem olsa da, seçilen yöntemin mikroorganizmadan gelen faydalı özelliklere zarar vermemesi gerekmektedir (Deshpande vd., 2018; Choudhury ve Kamilya, 2019). İnaktivasyondan sonra, ekstraksiyon, santrifüjleme ve kolon saflaştırma yöntemiyle ayırma gibi üretim aşamaları uygulanmaktadır (Martyniak vd., 2021). Fiziksel ve kimyasal özellikleri ve gıda matrisleriyle doğrudan etkileşime girmemeleri sayesinde, probiyotiklere uygun ortam olmayan meyve suyu gibi birçok gıdaya paraprobiyotikler eklenebilmektedir (Siciliano vd., 2021). Aynı zamanda, antibiyotik direncinden etkilenmemeleri, gıda güvenliğini sağlamaları ve mikroorganizmaların sağlığı geliştirici özelliklerinden de yararlanabilmeleri paraprobiyotiklerin avantajları arasında yer almaktadır (Martyniak vd., 2021; Siciliano vd., 2021). Son yıllarda gıda endüstrisinde yapılan paraprobiyotiklere ait bazı çalışmalara aşağıda yer verilmiştir.

Parvarei vd. (2021)'nin yaptıkları çalışmada, otoklavda (121 °C'de 15 dakika) ısı ile inaktive

edilen *L. acidophilus* ATCCSD 5221 ve *Bifidobacterium lactis* BB-12 paraprobiyotik kültürlerini yoğurda eklemişlerdir. Paraprobiyotikleri içeren numuneler fizikokimyasal özellikleri ve mikro yapıları bakımından incelenmiş ve numunelere FTIR analizleri yapılmıştır. Probiyotik ve paraprobiyotikler, fermantasyon öncesi ve fermantasyon sonrası olmak üzere iki farklı şekilde eklenerek değerlendirilmiştir. Fermantasyon öncesi eklenen probiyotik ve paraprobiyotik içeren numunelerde daha açık ve daha büyük gözenek boyutu, fermantasyondan sonra eklenen probiyotik ve paraprobiyotik içeren numunelerde ise açık renk ve gevşek yapı gözlemlenmiştir. Probiyotik ve paraprobiyotik içermeyen numunelerde ise açık renk ve süngerimsi yapı gözlemlenmiştir. Fermantasyondan önce eklenen paraprobiyotikleri içeren numune, ekzopolisakkaritlerin ve hücre bileşenlerinin varlığından dolayı en düşük sinerezi, en yüksek görünür viskoziteyi ve en yüksek su tutma kapasitesini sergilemiştir. FTIR-ATR spektroskopisinin süt ürünlerindeki spektral bölgeleri tespit etmede çok pratik ve hızlı bir teknik olduğu belirtilmiştir. FTIR-ATR analiz sonuçları incelendiğinde ise paraprobiyotik örneklerde sonucun 1240-1500 cm<sup>-1</sup> olmadığı ve bunun başlangıç kültürleri tarafından karbonhidrat ve alaninin tüketilmesi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir.

Almada vd. (2021) tarafından yapılan çalışmanın amacı, gama ışınları ile inaktive edilmiş *Bifidobacterium animalis* eklenen durum buğdayından üretilen makarna tüketiminin, sıçanların bağırsak mikrobiyotası üzerindeki etkilerini araştırmaktır. Yirmi erkek sıçan, standart diyet ile beslenen (kontrol), makarna içeren diyet ile beslenen (PC) ve paraprobiyotik makarna içeren diyet ile beslenen (PPBI) olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. PPBI'de toplam kolesterol ve serum glikoz seviyelerinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu ve kontrol ile PC gruplarına kıyasla daha fazla *Actinobacteria* ve *Firmicutes*, daha düşük *Bactiodes* içerdiği görülmüştür. Aynı zamanda, PPBI'nin kontrol grubuna kıyasla, daha fazla sayıda *Lactobacillales*, *Coriobacteriales*, *Bacillales*, *Clostridiales* ve *Bifidobacteriales* içerdiği belirtilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, buğday-durum makarnasına paraprobiyotik ilave edilmesinin sağlık için olumlu etkiler yaratabileceği gözlemlenmiştir.

Aydın vd. (2021) yaptıkları çalışmada, fermente sosislerden izole edilen laktik asit bakterilerinin postbiyotik ve paraprobiyotiklerinin antioksidan aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Paraprobiyotikleri hazırlamak için hücreler 5 dakika boyunca sonikasyon işlemi uygulanarak

öldürülmüştür. Antioksidan aktivite, DPPH radikal süpürücü etki yöntemi ile test edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre, postbiyotiklere ait serbest radikal süpürücü etkinin %5.65-76.04 aralığında; paraprobiyotiklere ait serbest radikal süpürücü etkinin ise %5.90-18.07 aralığında olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara göre, postbiyotiklerin paraprobiyotiklerden daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3. Paraprobiyotiklerin gıda sektöründe kullanıldığı çalışmalar

Çalışmanın Amacı	Mikroorganizmayı İnaktive Etme Yöntemi	Çalışmanın Sonucu	Referans
Peynir altı suyu-üzüm suyu içeceğine inaktive edilen <i>Lactobacillus casei</i> eklenmiş ve sağlıklı bireylerdeki hipoglisemik aktivite üzerine etkisi araştırılmıştır. In vitro hipoglisemik aktivite, $\alpha$ -glukozidaz ve $\alpha$ -amilaz inhibisyonu ile değerlendirilirken; in vivo aktivite, ekme ve probiyotik peynir altı suyu içeceği tüketen, ekme ve paraprobiyotik peynir altı suyu içeceği tüketen ve kontrol olarak tek başına ekme tüketen 15 sağlıklı denek kullanılarak belirlenmiştir.	<i>L. casei</i> ohmik ısıtma (8 V/cm, 95 °C/7 dk, 60 Hz) ile inaktive edilmiştir.	Paraprobiyotik üzüm aromalı peynir altı suyu içeceği, hem $\alpha$ -glukozidaz inhibisyonu (%51.8) hem de $\alpha$ -amilaz inhibisyonu (%44.2) göstermiştir. Bu değerler probiyotik içeren örneklerde sırasıyla, %51.2 ve %43.2 olarak belirlenmiştir. Hem paraprobiyotik hem de probiyotik içeren içeceklerin tüketimi ile glikoz değeri, glikoz artış yüzdesi ve pik kan şekeri süresinde değişiklik olmadığı, fakat tokluk glikoz seviyelerinde azalma olduğu görülmüştür.	(Barros vd., 2021)
Fermente süte inaktive edilen <i>L. gasseri</i> CP2305 eklendikten sonra, paraprobiyotik içeren fermente sütün (FM) kabızlığı olan sağlıklı denekler üzerindeki gastrointestinal fonksiyonları incelenmiştir. Denekler, üç hafta boyunca, yapay olarak asitlendirilmiş süt bazlı plasebo içecek veya ısı ile inaktive edilmiş <i>L. gasseri</i> CP2305 ile hazırlanmış fermente süt tüketmişlerdir. Bağırsak hareketlerinin sıklığı ve dışkılama koşulları kaydedilmiş, dışkı metabolitleri ve bağırsak mikrobiyotasının bileşimi analiz edilmiştir.	<i>L. gasseri</i> CP2305 sterilizasyon işlemi ile inaktive edilmiştir.	FM bazlı içecek grubunun, bağırsak fonksiyonunu düzenlediği, özellikle kabızlığı olan denekleri anlamlı ölçüde iyileştirdiği, dışkı renk tonunu ve dışkı çıkış sıklığını olumlu yönde etkilediği ve dışkı örneklerinde kısa zincirli yağ asidi konsantrasyonlarının arttığı görülmüştür. Aynı zamanda, FM bazlı içecek grubu tüketen deneklerin bağırsak mikrobiyotalarında <i>Clostridium</i> küme IV popülasyonunun önemli ölçüde arttığı belirtilmiştir.	(Sawada vd., 2016)

## SONUÇ

Uzun zamandır, bağırsak mikrobiyotasına ve sağlığa faydalı etkileri olduğu bilinen probiyotik ve prebiyotiklere yönelik artan ticari ilgi, gıda sektörünün genişlemesine önemli ölçüde katkıda bulunmuştur. Son yıllarda, canlı mikroorganizmalar olan probiyotik ve prebiyotik yerine, biyotikler ailesinden simbiyotiklerin, postbiyotiklerin ve paraprobiyotiklerin kullanımına olan ilgi artmıştır. Hem probiyotiklerin hem de prebiyotiklerin kombine halde bulunduğu simbiyotikler, insan vücuduna ve bağırsak sağlığına karşı sinerjik etki ile yarar sağlamaktadır. Postbiyotikler ise, canlı bakteriler tarafından salgılanan, konakçıya faydalı olan mikrobiyel ürünler olarak adlandırılmaktadır. Canlı mikroorganizmaları içermeyen ve genellikle fermantasyon sırasında üretilen biyoaktif çözümler maddeler olan postbiyotikler, endüstriyel işlemlerde ısı ve oksijene duyarlı olmadıkları için probiyotiklerden daha çok ilgi görmektedir ve gıda güvenilirliğini sağlamaktadır. Yeterli miktarda tüketilince fayda sağlayan cansız mikrobiyel hücreler ve fraksiyonları olarak bilinen paraprobiyotikler de işleme ve depolama açısından probiyotiklere karşı üstün gelmektedir. Kanserden koruyucu, kabızlık gibi bağırsak problemlerini düzenleyici, bağırsıklığı güçlendirici gibi birçok faydası bulunan simbiyotik, postbiyotik ve paraprobiyotiklerin, gıda alanındaki çalışmaları incelendiğinde yeni fonksiyonel gıdalar oluşturmada kullanılabileceği görülmüştür. Ancak, yapılan çalışmaların hem in vivo hem de in vitro sistemlerde test edilmesi gerektiği düşünülmektedir. Gıda güvenliği açısından risk taşımayan, endüstriyel açıdan işlenmesi ve depolanması daha kolay olan simbiyotik, postbiyotik ve paraprobiyotiklerin farklı gıda ürünlerine de uygulanması ve yapılan çalışmaların genişletilmesi gerekmektedir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

## YAZAR KATKISI

Çalışmanın planlanması, araştırmanın yapılması, çalışmanın yazılması ve son kontrolünün

yapılması aşamalarında Eda Nurko ve Emine Nakilcioğlu görev almıştır.

## KAYNAKÇA

Abbasi, A., Rad, A. H., Ghasempour, Z., Sabahi, S., Kafil, H. S., Hasannezhad, P., Saadat, Y. R., Shahbazi, N. (2022). The biological activities of postbiotics in gastrointestinal disorders. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(22): 5983-6004, <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1895061>.

Abdi, R., Joye, I. J. (2021). Prebiotic potential of cereal components. *Foods*, 10(10): 2338, <https://doi.org/10.3390/foods10102338>.

Aguilar-Toalá, J. E., Garcia-Varela, R., Garcia, H. S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., Hernández-Mendoza, A. (2018). Postbiotics: an evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology*, 75: 105-114, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.009>.

Akter, S., Park, J. H., Jung, H. K. (2020). Potential health-promoting benefits of paraprobiotics, inactivated probiotic cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(4): 477-481, <https://doi.org/10.4014/jmb.1911.11019>.

Almada, C. N., Almada-Érix, C. N., Costa, W. K. A., Graça, J. S., Cabral, L., Noronha, M. F., Gonçalves, A. E. S. S., Santos A., Lollo, P. C., Magnani, M., Sant'Ana, A. S. (2021). Wheat-durum pasta added of inactivated *Bifidobacterium animalis* decreases glucose and total cholesterol levels and modulates gut microbiota in healthy rats. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 72(6): 781-793, <https://doi.org/10.1080/09637486.2021.1877261>.

Alves-Santos, A. M., Sugizaki, C. S. A., Lima, G. C., Naves, M. M. V. (2020). Prebiotic effect of dietary polyphenols: a systematic review. *Journal of Functional Foods*, 74: 104169, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104169>.

Aydın, B., Çiydem, T., Kaya, E., Açık, L. (2021). Evaluation of the antioxidant effects of postbiotics and paraprobiotics in lactic acid bacteria isolated from traditional fermented sausages. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (28):

- 849-852, <https://doi.org/10.31590/ejosat.1011409>.
- Barros, C. P., Grom, L. C., Guimarães, J. T., Balthazar, C. F., Rocha, R. S., Silva, R., Almada, C. N., Pimentel, T. C., Venâncio E. L., Junior, I. C., Maciel, P. M. C., Freitas, M. Q., Esmerino, E. A., Silva, M. C., Duarte, M. C. K. H., Sant'Ana A. S., Cruz, A. G. (2021). Paraprobiotic obtained by ohmic heating added in whey-grape juice drink is effective to control postprandial glycemia in healthy adults. *Food Research International*, 140: 109905, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109905>.
- Bondar, M. (2021). Symbiotics: combinations, advantages of prebiotics and probiotics. *The scientific heritage*, 68(1): 20-26.
- Bölükbaş, M. G., Vatansever, Ş. (2022). Sporcuların bağırsak mikrobiyomu üzerinde egzersizin etkisi: sistematik bir derleme. *Anatolian Clinic the Journal of Medical Sciences*, 27(3): 357-369. <https://doi.org/10.21673/anadoluklin.1059732>
- Butera, A., Gallo, S., Pascadopoli, M., Maiorani, C., Milone, A., Alovise, M., Scribante, A. (2022). Paraprobiotics in non-surgical periodontal therapy: Clinical and microbiological aspects in a 6-month follow-up domiciliary protocol for oral hygiene. *Microorganisms*, 10(2): 337. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020337>
- Cabello-Olmo, M., Araña, M., Urtasun, R., Encio, I. J., Barajas, M. (2021). Role of postbiotics in diabetes mellitus: current knowledge and future perspectives. *Foods*, 10(7): 1590, <https://doi.org/10.3390/foods10071590>.
- Champagne, C. P., Ross, R. P., Saarela, M., Hansen, K. F., Charalampopoulos, D. (2011). Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International journal of food microbiology*, 149(3): 185-193, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.005>
- Choudhury, T. G., Kamilya, D. (2019). Paraprobiotics: an aquaculture perspective. *Reviews in Aquaculture*, 11(4): 1258-1270, <https://doi.org/10.1111/raq.12290>.
- Chung, I. C., OuYang, C. N., Yuan, S. N., Lin, H. C., Huang, K. Y., Wu, P. S., Liu, C. Y., Tsai, K. J., Loi, L. K., Chen, Y. J., Chung A. K., Ojcius, D. M., Chang Y. S., Chen, L. C. (2019). Pretreatment with a heat-killed probiotic modulates the NLRP3 inflammasome and attenuates colitis-associated colorectal cancer in mice. *Nutrients*, 11(3): 516. <https://doi.org/10.3390/nu11030516>
- Crovesy, L., El-Bacha, T., Rosado, E. L. (2021). Modulation of the gut microbiota by probiotics and symbiotics is associated with changes in serum metabolite profile related to a decrease in inflammation and overall benefits to metabolic health: a double-blind randomized controlled clinical trial in women with obesity. *Food & Function*, 12(5): 2161-2170, <https://doi.org/10.1039/D0FO02748K>.
- Cuevas-González, P. F., Liceaga, A. M., Aguilar-Toalá, J. E. (2020). Postbiotics and paraprobiotics: from concepts to applications. *Food research international*, 136: 109502, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109502>.
- Cunningham, M., Azcarate-Peril, M. A., Barnard, A., Benoit, V., Grimaldi, R., Guyonnet, D., Holscher, H. D., Hunter, K., Manurung, S., Obis, D., Petrova, M. I., Steinert, R. E., Swanson, K. S., Sinderen, D., Vulevic, J., Gibson, G. R. (2021). Shaping the future of probiotics and prebiotics. *Trends in Microbiology*, 29(8): 667-685, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.01.003>.
- Çelik, M. N., Ayyıldız, F. (2022). Egzersiz ve bağırsak mikrobiyotası arasındaki ilişki. *İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 7(2): 365-372.
- Çeltik, C., Tayfun, K., Müslümanoğlu, A. Y. (2022). Simbiyotik özellikli gıdalar. *Bütünleyici ve Anadolu Tıbbi Dergisi*, 3(2): 3-12, <https://doi.org/10.53445/batd.1058749>.
- Damania, P., Patel, R., Shaw, R., Kataria, R. P., Wadia, A. (2016). Development of antimicrobial packaging materials for food preservation using bacteriocin from *Lactobacillus casei*. *Microbiology Research*, 7(1): 19-22, <https://doi.org/10.4081/mr.2016.6622>.

- Damián, M. R., Cortes-Perez, N. G., Quintana, E. T., Ortiz-Moreno, A., Noguez, C. G., Cruceño-Casarrubias, C. E., Pardo, M. E. S., Bermúdez-Humarán, L. G. (2022). Functional foods, nutraceuticals and probiotics: a focus on human health. *Microorganisms*, 10(5): 1065, <https://doi.org/10.3390/microorganisms10051065>.
- de Almeida Costa, N., de Almeida Paula, D., Brêda, J. D., Vieira, É. N. R., Martins, E. M. F., Ramos, A. M. (2020). A symbiotic dessert composed of yam (*Dioscorea* sp.) and Ubá mango pulp (*Mangifera indica* L.). *LWT-Food Science and Technology*, 133: 110074, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110074>.
- de Almeida Godoy, C. L., Costa, L. M., Guerra, C. A., de Oliveira, V. S., de Paula, B. P., Lemos Junior, W. J. F., Silva Duarte, V., Luchese, R. H., Bautitz, I. R., Guerra, A. F. (2022). Potentially postbiotic-containing preservative to extend the use-by date of raw chicken sausages and semifinished chicken products. *Sustainability*, 14(5): 2646, <https://doi.org/10.3390/su14052646>.
- De Vuyst, L. (2000). Technology aspects related to the application of functional starter cultures. *Food Technology and Biotechnology*, 38(2): 105-112.
- Deshpande, G., Athalye-Jape, G., Patole, S. (2018). Para-probiotics for preterm neonates—the next frontier. *Nutrients*, 10(7): 871, <https://doi.org/10.3390/nu10070871>.
- Dostal, A., Lacroix, C., Bircher, L., Pham, V. T., Follador, R., Zimmermann, M. B., Chassard, C. (2015). Iron modulates butyrate production by a child gut microbiota in vitro. *MBio*, 6(6): e01453-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01453-15>.
- FAO/WHO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report, 1-11.
- Ferreira, R. D. S., Mendonça, L. A. B. M., Ribeiro, C. F. A., Calças, N. C., Guimarães, R. D. C. A., Nascimento, V. A. D., Gielow, K. D. C. F., Carvalho, C. M. E. C., Castro, A. P., Franco, O. L. (2022). Relationship between intestinal microbiota, diet and biological systems: an integrated view. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(5): 1166-1186, <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1836605>.
- Figueiredo, F. C. D., Oliva-Neto, P. D. (2022). Advances and new perspectives in prebiotic, probiotic and symbiotic products for food nutrition and feed. *Hemicellulose Biorefinery: A Sustainable Solution for Value Addition to Bio-Based Products and Bioenergy*, 311-336.
- Galyon, F., Varlık, C. (2021). Probiyotikler, prebiyotikler ve bunların bağırsak ve cilt sağlığı üzerinde etkileri. *Anadolu Bil Meslek Yüksekokulu Dergisi*, 16(64): 263-289. [https://doi.org/10.17932/IAU.ABMYOD.2006.005/abmyod\\_v16i64002](https://doi.org/10.17932/IAU.ABMYOD.2006.005/abmyod_v16i64002)
- Ghoneum, M., Gimzewski, J. (2014). Apoptotic effect of a novel kefir product, PFT, on multidrug-resistant myeloid leukemia cells via a hole-piercing mechanism. *International journal of oncology*, 44(3): 830-837. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2258>.
- González, S., Fernández-Navarro, T., Arbolea, S., de Los Reyes-Gavilán, C. G., Salazar, N., Gueimonde, M. (2019). Fermented dairy foods: impact on intestinal microbiota and health-linked biomarkers. *Frontiers in microbiology*, 10: 1046, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01046>.
- Gökırmaklı, Ç., Üçgül, B., Güzel-Seydim, Z. B. (2021). Fonksiyonel gıda kavramına yeni bir bakış: postbiyotikler. *Gıda*, 46(4): 872-882, <https://doi.org/10.15237/gida.GD21035>.
- Gustaw, W., Kordowska-Wiater, M., Koziol, J. (2011). The influence of selected prebiotics on the growth of lactic acid bacteria for bio-yoghurt production. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 10(4): 455-466.
- Heredia-Castro, P. Y., Reyes-Díaz, R., Rendón-Rosales, M. Á., Beltrán-Barrientos, L. M., Torres-Llanez, M. J., Estrada-Montoya, M. C., Hernández-Mendoza, A., Gonzáles-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B. (2021). Novel bacteriocins produced by *Lactobacillus fermentum* strains with bacteriostatic effects in

- milk against selected indicator microorganisms. *Journal of Dairy Science*, 104(4): 4033-4043, <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19531>.
- İçier, S., Güzelcan, C., Hıdır, Ş., Türköz, B. K. (2022). Postbiyotikler ve gıda endüstrisinde kullanım alanları. *Gıda*, 47(2): 252-265, <https://doi.org/10.15237/gida.GD21145>.
- İsmailoğlu, Ö., Yılmaz, H. Ö. (2019). Probiyotik kullanımının bağırsak mikrobiyotası üzerine etkisi. *Bandırma Onyedli Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri ve Araştırmaları Dergisi*, 1(1): 38-56.
- Kang, J., Lee, J. J., Cho, J. H., Choe, J., Kyoung, H., Kim, S. H., Kim, H. B., Song, M. (2021). Effects of dietary inactivated probiotics on growth performance and immune responses of weaned pigs. *Journal of Animal Science and Technology*, 63(3): 520. <https://doi.org/10.5187/jast.2021.e44>
- Kim, H., Lim, J. J., Shin, H. Y., Suh, H. J., Choi, H. S. (2021). Lactobacillus plantarum K8-based paraprobiotics suppress lipid accumulation during adipogenesis by the regulation of JAK/STAT and AMPK signaling pathways. *Journal of Functional Foods*, 87: 104824. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104824>
- Kumar, H., Schütz, F., Bhardwaj, K., Sharma, R., Nepovimova, E., Dhanjal, D. S., Verma, R., Kumar, D., Kuča, K., Cruz-Martins, N. (2021). Recent advances in the concept of paraprobiotics: nutraceutical/functional properties for promoting children health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-16, <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1996327>.
- Li, H. Y., Zhou, D. D., Gan, R. Y., Huang, S. Y., Zhao, C. N., Shang, A., Xu, X. Y., Li, H. B. (2021). Effects and mechanisms of probiotics, prebiotics, synbiotics, and postbiotics on metabolic diseases targeting gut microbiota: a narrative review. *Nutrients*, 13(9): 3211, <https://doi.org/10.3390/nu13093211>.
- Liang, X., Lv, Y., Zhang, Z., Yi, H., Liu, T., Li, R., Yu, Z., Zhang, L. (2020). Study on intestinal survival and cholesterol metabolism of probiotics. *LWT*, 124: 109132. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109132>.
- Lim, J. J., Jung, A. H., Suh, H. J., Choi, H. S., Kim, H. (2022). Lactiplantibacillus plantarum K8-based paraprobiotics prevents obesity and obesity-induced inflammatory responses in high fat diet-fed mice. *Food Research International*, 155: 111066. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111066>
- Madrigal-Matute, J., Escandell, S. B. (2022). Colorectal cancer and microbiota modulation for clinical use. A systematic review. *Nutrition and Cancer*, 1-17, <https://doi.org/10.1080/01635581.2022.2108468>.
- Majzoobi, M., Aghdam, M. B. K., Eskandari, M. H., Farahnaky, A. (2019). Quality and microbial properties of symbiotic bread produced by straight dough and frozen part-baking methods. *Journal of texture studies*, 50(2): 165-171, <https://doi.org/10.1111/jtxs.12386>.
- Marcon, L. D. N., de Sousa Moraes, L. F., dos Santos Cruz, B. C., de Oliveira Teixeira, M. D., Bruno, T. C. V., Ribeiro, I. E., Messias, A. C., de Lucas Fortes Ferreira, C. L., de Oliveira, L. L., Peluzio, M. D. C. G. (2019). Yacon (*Smallanthus sonchifolius*)-based product increases fecal short-chain fatty acids and enhances regulatory T cells by downregulating ROR $\gamma$ t in the colon of BALB/c mice. *Journal of Functional Foods*, 55: 333-342. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.02.039>.
- Markowiak, P., Śliżewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9): 1021, <https://doi.org/10.3390/nu9091021>.
- Martyniak, A., Medyńska-Przęczek, A., Wędrychowicz, A., Skoczeń, S., Tomasiak, P. J. (2021). Prebiotics, probiotics, synbiotics, paraprobiotics and postbiotic compounds in IBD. *Biomolecules*, 11(12): 1903, <https://doi.org/10.3390/biom11121903>.
- Miarons, M., Roca, M., Salvà, F. (2021). The role of pro-, pre-and synbiotics in cancer: a systematic review. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 46(1): 50-65, <https://doi.org/10.1111/jcpt.13292>.
- Michels, M., Jesus, G. F. A., Voytena, A. P. L., Rossetto, M., Ramlov, F., Córneo, E., Feuser, P., Gelain, D., Dal-Pizzol, F. (2022). Immunomodulatory effect of bifidobacterium, lactobacillus, and streptococcus strains of



- paraprobiotics in lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses in RAW-264.7 macrophages. *Current Microbiology*, 79(1): 1-14. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02708-1>
- Mohanty, D., Misra, S., Mohapatra, S., Sahu, P. S. (2018). Prebiotics and synbiotics: recent concepts in nutrition. *Food bioscience*, 26: 152-160, <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.10.008>.
- Moradi, M., Kousheh, S. A., Almasi, H., Alizadeh, A., Guimarães, J. T., Yilmaz, N., Lotfi, A. (2020). Postbiotics produced by lactic acid bacteria: the next frontier in food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6): 3390-3415, <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12613>.
- Moradi, M., Molaei, R., Guimarães, J. T. (2021). A review on preparation and chemical analysis of postbiotics from lactic acid bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 143: 109722. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109722>.
- Nataraj, B. H., Ali, S. A., Behare, P. V., Yadav, H. (2020). Postbiotics-parabiotics: the new horizons in microbial biotherapy and functional foods. *Microbial cell factories*, 19(168): 1-22, <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01426-w>.
- Pandey, K. R., Naik, S. R., Vakil, B. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of food science and technology*, 52(12): 7577-7587, DOI: 10.1007/s13197-015-1921-1.
- Parvarei, M. M., Khorshidian, N., Fazeli, M. R., Mortazavian, A. M., Nezhad, S. S., Mortazavi, S. A. (2021). Comparative effect of probiotic and paraprobiotic addition on physicochemical, chemometric and microstructural properties of yogurt. *LWT-Food Science and Technology*, 144: 111177, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111177>.
- Pelton, R. (2020). Postbiotic metabolites: how probiotics regulate health. *Integrative medicine (Encinitas, Calif.)*, 19(1): 25-30.
- Peluzio, M. D. C. G., Martinez, J. A., Milagro, F. I. (2021). Postbiotics: metabolites and mechanisms involved in microbiota-host interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 108: 11-26, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.004>.
- Peng, M., Tabashsum, Z., Anderson, M., Truong, A., Houser, A. K., Padilla, J., ..., Biswas, D. (2020). Effectiveness of probiotics, prebiotics, and prebiotic-like components in common functional foods. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 19(4): 1908-1933, <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12565>.
- Rad, A. H., Akbarzadeh, F., Mehrabany, E. V. (2012). Which are more important: prebiotics or probiotics?. *Nutrition*, 28(11/12): 1196, DOI:10.1016/j.nut.2012.03.017.
- Rolim, P. M. (2015). Development of prebiotic food products and health benefits. *Food Science and Technology*, 35(1): 3-10, <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6546>.
- Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J. M., Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT-Food Science and Technology*, 50(1): 1-16, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.014>.
- Sabahi, S., Homayouni Rad, A., Aghebati-Maleki, L., Sangtarash, N., Ozma, M. A., Karimi, A., ..., Abbasi, A. (2022). Postbiotics as the new frontier in food and pharmaceutical research. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-28, <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2056727>.
- Safdari, Y., Vazifedoost, M., Didar, Z., Hajirostamloo, B. (2021). The effect of banana fiber and banana peel fiber on the chemical and rheological properties of symbiotic yogurt made from camel milk. *International Journal of Food Science*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5230882>.
- Sak, D., Soykut, G. (2021). Biyotikler ailesinin yeni üyesi: postbiyotikler. *Necmettin Erbakan Üniversitesi Genel Sağlık Bilimleri Dergisi*, 3(3), 259-272. <https://doi.org/10.51123/jgehes.2021.35>.
- Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M. M., Sanders, M. E., Shamir, R., Swan, J. R., Szajewska, H., Vinderola, G. (2021). The international scientific association of probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(9): 649-667, <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6>.

- Sawada, D., Kuwano, Y., Tanaka, H., Hara, S., Uchiyama, Y., Sugawara, T., Fujiwara, S., Rokutan, K., Nishida, K. (2019). Daily intake of *Lactobacillus gasserii* CP2305 relieves fatigue and stress-related symptoms in male university Ekiden runners: A double-blind, randomized, and placebo-controlled clinical trial. *Journal of Functional Foods*, 57: 465-476. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.04.022>.
- Sawada, D., Sugawara, T., Ishida, Y., Aihara, K., Aoki, Y., Takehara, I., Takano, K., Fujiwara, S. (2016). Effect of continuous ingestion of a beverage prepared with *Lactobacillus gasserii* CP2305 inactivated by heat treatment on the regulation of intestinal function. *Food Research International*, 79: 33-39, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.11.032>.
- Segura-Badilla, O., Lazcano-Hernández, M., Kammar-García, A., Vera-López, O., Aguilar-Alonso, P., Ramírez-Calixto, J., Navarro-Cruz, A. R. (2020). Use of coconut water (*Cocos nucifera* L) for the development of a symbiotic functional drink. *Heliyon*, 6(3): e03653, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03653>.
- Sekhon, B. S., Jairath, S. (2010). Prebiotics, probiotics and synbiotics: an overview. *Journal of Pharmaceutical Education & Research*, 1(2).
- Seo, K. H., Jeong, J., Kim, H. (2020). Synergistic effects of heat-killed kefir paraprobiotics and flavonoid-rich prebiotics on western diet-induced obesity. *Nutrients*, 12(8): 2465. <https://doi.org/10.3390/nu12082465>.
- Siciliano, R. A., Reale, A., Mazzeo, M. F., Morandi, S., Silveti, T., Brasca, M. (2021). Paraprobiotics: a new perspective for functional foods and nutraceuticals. *Nutrients*, 13(4): 1225, <https://doi.org/10.3390/nu13041225>.
- Sugawara, G., Nagino, M., Nishio, H., Ebata, T., Takagi, K., Asahara, T., Nomoto, K., Nimura, Y. (2006). Perioperative synbiotic treatment to prevent postoperative infectious complications in biliary cancer surgery: a randomized controlled trial. *Annals of surgery*, 244(5): 706. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000219039.20924.88>.
- Tenea, G. N., Barrigas, A. (2018). The efficacy of bacteriocin-containing cell-free supernatant from *Lactobacillus plantarum* Cys5-4 to control pathogenic bacteria growth in artisanal beverages. *International Food Research Journal*, 25(5): 2021-2137.
- Tilg, H., Adolph, T. E., Gerner, R. R., Moschen, A. R. (2018). The intestinal microbiota in colorectal cancer. *Cancer cell*, 33(6): 954-964, <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.004>.
- Tokay, A., Kıvrakdal, Ş., Kayalarlı, B., Artar, A., Ganimet, Ş. (2022). The effect of mediterranean diet in obesity on the intestinal microbiota and reflections of weight loss. *Black Sea Journal of Health Science*, 5(2): 333-343.
- Uğur, E., Bektaş, A., Ulusoy, M., Öner, Z. (2021). Paraprobiyotikler, postbiyotikler ve sağlık üzerine etkileri. *Gıda*, 46(2): 428-442, <https://doi.org/10.15237/gida.GD20141>.
- Vinderola, G., Sanders, M. E., Salminen, S. (2022). The concept of postbiotics. *Foods*, 11(8): 1077, <https://doi.org/10.3390/foods11081077>.
- Won, G., Choi, S. I., Park, N., Kim, J. E., Kang, C. H., Kim, G. H. (2021). In vitro antidiabetic, antioxidant activity, and probiotic activities of *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lacticaseibacillus paracasei* strains. *Current microbiology*, 78(8): 3181-3191.
- Zaman, S. A., Sarbini, S. R. (2016). The potential of resistant starch as a prebiotic. *Critical reviews in biotechnology*, 36(3): 578-584, <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.993590>.
- Zepeda-Hernández, A., Garcia-Amezquita, L. E., Requena, T., García-Cayuela, T. (2021). Probiotics, prebiotics, and synbiotics added to dairy products: uses and applications to manage type 2 diabetes. *Food Research International*, 142: 110208, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110208>.
- Żólkiewicz, J., Marzec, A., Rusczyński, M., Feleszko, W. (2020). Postbiotics—a step beyond pre-and probiotics. *Nutrients*, 12(8): 2189, <https://doi.org/10.3390/nu12082189>.



## THE EFFECT OF DIFFERENT STORAGE CONDITIONS ON ANTHOCYANIN PROFILE OF MERLOT RED WINES

Esma Nur GEÇER<sup>1\*</sup>, Rahmi Ertan ANLI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Technology, Vocational School of Zile, Tokat Gaziosmanpaşa University, Tokat, Turkey

<sup>2</sup>Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, Ankara University, Ankara, Turkey

Received /Geliş: 17.11.2022; Accepted /Kabul: 18.01.2023; Published online /Online baskı: 30.01.2023

Geçer, E.N., Anlı, R.E. (2023). The effect of different storage conditions on anthocyanin profile of merlot red wines. GIDA (2023) 48 (1) 160-170 doi: 10.15237/ gida.GD22111

Geçer, E.N., Anlı, R.E. (2023). Farklı depolama koşullarının merlot şaraplarında antosiyanin profili üzerine etkisi. GIDA (2023) 48 (1) 160-170 doi: 10.15237/ gida.GD22111

### ABSTRACT

Grape variety and health, soil and climate, agricultural techniques used, winemaking processes, storage time and temperature are the most important agents in the phenolic content of red wine. In this study, the effects of storage temperature and time on the distribution of anthocyanin compounds, and the total monomeric anthocyanin (TMA) content of Merlot wines were investigated at the beginning of storage and the following quarterly periods. The amount and distribution of delphinidin 3-glucoside, pelargonin 3-glucoside, malvidin 3-glucoside, cyanidin 3-glucoside, and peonidin 3-glucoside anthocyanins in wine samples were defined quantitatively by modifying HPLC method. When the change in TMA content in wines was evaluated, it was determined that there was a decrease of 13.77% at 4-5 °C, 24.28% at 8-10 °C, 43.93% at 12-14 °C, and 66.29% at 18-20 °C compared to the values before storage at the last of 24 months of storage.

**Keywords:** Merlot wine, HPLC, bottle storage, storage temperature, anthocyanins

## FARKLI DEPOLAMA KOŞULLARININ MERLOT ŞARAPLARINDA ANTOSİYANİN PROFİLİ ÜZERİNE ETKİSİ

### ÖZ

Üzüm çeşidi ve sağlığı, şarap yapım süreçleri, iklim ve toprak, kullanılan tarım teknikleri, depolama sıcaklığı ve depolama süresi kırmızı şarabın fenolik içeriğindeki en önemli etkenlerdir. Bu çalışmada, depolama sıcaklığının ve süresinin, Merlot şarabının antosiyanin bileşiklerinin dağılımı ve toplam monomerik antosiyanin (TMA) içeriği üzerindeki etkileri, depolamanın başlangıcında ve sonraki üç aylık dönemlerde incelenmiştir. Şarap örneklerinde siyanidin 3-glikozit, peonidin 3-glikozit, pelargonin 3-glikozit, delphinidin 3-glikozit ve malvidin 3-glikozit antosiyaninlerinin miktar ve dağılımı modifiye edilmiş HPLC yöntemi ile kantitatif olarak tanımlanmıştır. Şaraplarda 24 aylık depolama sonunda TMA içeriğindeki değişim değerlendirildiğinde depolama öncesi değerlere kıyasla 4-5 °C'de %13.77, 8-10 °C'de %24.28, 12-14 °C'de %43.93 ve 18-20 °C'de %66.29 oranında azalma olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Merlot şarabı, HPLC, şişe depolama, depolama sıcaklığı, antosiyanin

\* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar

✉ esmanurgecer@hotmail.com

☎ (+90) 555 221 2331

Esma Nur Geçer; Orcid ID: 0000-0002-0095-079X

Rahmi Ertan Anlı; Orcid ID: 0000-0002-3320-0629

## INTRODUCTION

Grape is the oldest perennial plant in the world, belonging to the genus *Vitis* of the Vitaceae family. Merlot is the main black grape variety that is included in the compound of the wines produced in the Saint-Emilion and Pomerol regions, which are important sub-regions of the Bordeaux wine region and have become the world variety. Its single wines and blends with Cabernet Sauvignon take attention with their quality (Anli, 2011).

Wine is an alcoholic beverage produced by fermenting fresh grape must. The quality of red wine largely depends on the phenolic compositions that come from the grape and are formed during winemaking (Cheyner et al., 2006). Storage time and conditions also have a significant impact on wine quality. Temperature plays an important role at many stages throughout the development of wine. Wine can be exposed to high temperatures during fermentation, ripening, bottling, transportation, and storage. If the temperature is inadequately controlled at critical control points, high and/or fluctuating temperature accelerates the development process and creates an important risk for the sensory, physical, and chemical properties of the wine and, consequently, the shelf life (Ifie et al., 2018). Studies have shown that wines stored at low temperatures (e.g. <10 °C) have a longer shelf life due to a low risk of spoilage, and when optimal conditions are maintained, fresh-fruity aromas are preserved in a young wine, but it will take longer to develop (Robinson et al., 2010).

The main anthocyanin pigments found in grapes and wines are malvidin, cyanidin, peonidin, delphinidin and petunidin (Han et al., 2008; Ivanova et al., 2011; Ivanova et al., 2015; Han et al., 2017). The most abundant and stable anthocyanin in *Vitis vinifera* grapes is Malvidin 3-glucoside (He et al., 2012; Blanco-Vega et al., 2014; Lukic et al., 2019; Zhao et al., 2022). Malvidin 3-glucoside forms the basis of color in black grapes and the wines produced from them (Riberau-Gayon et al., 2000; Castillo-Munoz et al., 2010; Zhao et al., 2022).

The reduction in anthocyanin concentration is the most common effect of high temperature on non-volatile compounds in red wines. This process allows the unstable color component in the wine to be converted into a more stable form. It is known that monomeric anthocyanins are involved in the formation of polymeric pigments in the reactions occurring during the storage process, especially through the condensation reaction with tannin species (He et al., 2012a; Waterhouse and Zhu 2020; Zhao et al., 2022). It has been noted that this process rate increases at high temperatures (Gomez-Plaza et al., 2000; Scrimgeour et al., 2015; Ifie et al., 2018).

Studies have shown that monomeric anthocyanins in red wines decrease over time even at typical cellar storage temperature during storage, and in wine, polymeric pigments increase with the corresponding color change from purple to red-orange. In this context, it is seen that accelerate to exposure to heat the aging process. It is stated that temperature is a more effective factor in the fate and concentration of anthocyanins than storage time, alcohol, pH and SO<sub>2</sub> (Somers, 1971; Fulcrand et al., 2006; Maury et al., 2010).

Anthocyanins are among the most important antioxidants with health-promoting properties found in black grapes and red wine produced from these grapes. For this reason, the beneficial effects of red wine consumption on human health have attracted attention in recent years (Lingua et al., 2018). Studies have shown that the consumption of foods rich in polyphenols reduces the risk of oxidative stress-related diseases (Nardini and Garaguso, 2018). It also appears to be responsible for maintaining healthy cardiovascular and nervous systems, and the health benefits associated with anthocyanin compounds in wines are widely studied (Paixao et al., 2007; Walzem, 2008; Basli et al., 2012; Schrieks et al., 2013; Biasi et al., 2014; Tuberoso et al., 2017).

This study was carried out to evaluate the changes in anthocyanin compounds of red wines produced from the Merlot grape variety during

storage in wine coolers. The effect of storage temperature on the anthocyanin compound distribution of wines was investigated by applying different storage temperatures to the wines.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

In this study, wine production was executed in Dimes facilities from Merlot grapes harvested from the vineyards of Dimes Vasfi Diren Farm in Tokat in 2015. The wine was produced under controlled fermentation conditions (20-23 °C) with the use of *Saccharomyces cerevisiae* as a starter culture yeast (Zymaflore RX60, Laffort; Zymaflore F83, Laffort; Lalvin ICV D 254, Lallemant) and filled into 750 ml dark glass bottles. Wine bottles were stored in light-proof Vestel VLP-4000 brand wine coolers at 85% relative humidity and at 4 different (4-5 °C, 8-10 °C, 12-14 °C, and 18-20 °C) temperatures. Changes in the anthocyanins composition of the wines were analyzed at the beginning of storage and one in three months.

### Methods

#### pH

Wine pH was measured directly with a glass-electrode pH meter (Hanna HI 2221) (Ough and Amerine, 1988).

#### Total Acidity

For total acidity, a 10 mL wine sample was mixed with 20 mL distilled water and the resultant mixture was titrated with 0.1 N NaOH solution until a pH of 8.2. Results were expressed in g/L tartaric acid equivalent (Ough and Amerine, 1988; Anonymous, 1990).

### Density

Density was determined using a pycnometer at 20 °C (Ough and Amerine, 1988).

### Alcohol

The amount of alcohol was calculated from the density value determined by a pycnometer in the alcoholic liquid obtained as a result of distillation, with the help of special charts, first the weight (g/L) and then the volume (% v/v) (Ough and Amerine, 1988).

### Individual Anthocyanin Compounds by Analytical HPLC

The amount and distribution of pelargonin 3-glucoside, cyanidin 3-glucoside, delphinidin 3-glucoside, malvidin 3-glucoside, and peonidin 3-glucoside anthocyanins in wine samples were determined quantitatively by modifying HPLC method (Anonymous, 2003). Anthocyanin standards, formic acid, and acetonitrile were obtained from Sigma-Aldrich. Stock solutions for all standards were prepared at 1 mg/mL and the standards were dissolved in 0.1% hydrochloric acid. Standard calibration solutions at 5 different concentrations were prepared for the calibration curve. Standards were stored in the dark at -18 °C. Quantitative analysis of anthocyanin compounds was determined by considering the chromatograms at wavelengths where their absorbance was maximum. 100 mL of wine samples used in the analysis were taken and filtered through a 0.45 µm (Millex-HV) membrane filter. 50 µL of the filtrates were taken and injected into the HPLC device (Table 1).

Table 1. HPLC Conditions

Equipment	Shimadzu
Deaerator	DGU-20 A5 Prominence (gradient valve)
Pump	1C-20 AT Prominence
Controller	CMB-20A Prominence
Detector	SPD-M10AVP DAD
Automatic Sample Injection Unit	SIL-10AXL
Column Furnace	CTO-10A
Column	Intersil ODS-3 Reverse Phase (5 µm-25x4.6 mm)
Solvent A	Water/Formic Acid/Acetonitrile (87:10:3)
Solvent B	Water/Formic Acid/Acetonitrile (40:10:50)

Table 2 shows the maximum absorbance, retention time and linearity ( $R^2$ ) of anthocyanin compounds. Quantitative analyses of anthocyanin

compounds were based on the chromatogram of the maximum absorbance wavelength.

Table 2. Retention times, maximum absorbance, and linearity ( $R^2$ ) of the anthocyanin compounds

Antosiyenin Standards	Retention times (min)	Maximum absorbance values (nm)	$R^2$ values
Pelargonin 3-glucoside	3.749	518	0.9987
Delphinidin 3-glucoside	4.040	518	0.9978
Malvidin 3-glucoside	4.100	518	0.9996
Cyanidin 3-glucoside	4.576	518	0.9983
Peonidin 3-glucoside	4.657	518	0.9992

### Total Monomeric Anthocyanin (TMA)

Developed by Guisti and Wrolstad (2003), by pH-differential method TMA contents of wine samples were determined. According to this method, it was incubated in (pH 4.5) 0.4 M  $\text{CH}_3\text{COONa}$  buffer and (pH 1.0) 0.025 M KCl buffer for 15 minutes at room temperature, the spectrophotometric absorptions of the extracts were measured at 700 nm and 520 nm, and the absorbance (A) values and TMA amount were calculated according to the equation 1 and 2 respectively.

$$A = (A_{\lambda 520} - A_{\lambda 700})_{pH 1.0} - (A_{\lambda 520} - A_{\lambda 700})_{pH 4.5} \quad (1)$$

$$TMA (mg/kg) = (A \times MA \times SF \times 1000) / (\epsilon \times 2) \quad (2)$$

A: Absorbance

Molecular weight (MA) of Malvidin 3-glucoside: 493.5 gmol/l

Dilution factor (SF): 5

$\epsilon$  (molar absorption coefficient): 28,000

### Statistical Analysis

All experimental analysis results were performed in triplicate and the results were given as mean value  $\pm$  standard deviation. For the spectrophotometric and chromatographic analysis results obtained for the samples under different storage temperature conditions and storage time stages repeated one-way nested ANOVA analysis of variance and Kruskal Wallis comparison analysis were performed using the Minitab 17 program. In the experiment, there were 4 levels of temperature factor 4-5 °C, 8-10

°C, 12-14 °C, and 18-20 °C. Duncan's test ( $P < 0.05$ ) was used to determine the different groups.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Chemical Analysis

In Merlot wine samples, the pH value was 3.68 at the beginning of the storage, the total acidity amount was 4.42 g/L, the density value was 0.9916 g/mL, and the alcohol content was 16.34% (v/v). The lowest and highest values for pH value in the samples of Merlot wines were measured as 3.59 and 3.81, respectively. After 24 months of storage, pH values increased to 2.85% at 4-5 °C, 3.13% at 8-10 °C, 3.13% at 12-14 °C, and 3.40% at 18-20 °C according to pre-storage values. The total acidity values in Merlot wines varied between 4.09 and 4.95. When the change in the total acidity level in wines is evaluated, it is seen that there is an increase to 5.20% at 12-14 °C, a decrease to 2.43% at 4-5 °C and 4.13% at 18-20 °C compared to the values before storage at the end of 24 months of storage. The density values in wines varied between 0.9913 and 0.9938. There was no statistically significant difference in the density levels of wines at the end of 24 months of storage compared to pre-storage values for all temperatures ( $P \geq 0.05$ ). At the end of storage, the change in alcohol level in wines was examined and determined that it decreased at all temperatures. The lowest and highest values for alcohol value in wines were measured as 13.36 and 16.85, respectively. After 24 months of storage, the decrease in alcohol values compared to pre-storage values is 14.75% at 4-5 °C, 13.95% at 8-10 °C, 15.12% at 12-14 °C and 14.75% at 18-20 °C rate was found. These increases and decreases

were found as statistically significant ( $P < 0.05$ ). pH, total acidity and alcohol values of rose sparkling wines were investigated in the study carried out at 5 °C and 30 °C storage temperatures. According to the study, there was no differences were revealed in pH (2.97), total acidity (7.50 g tartaric acid/L) and alcohol content (12.5% v/v) after 3, 6 and 9 months of storage (Benucci, 2020).

### Individual Anthocyanin Compounds by Analytical HPLC

#### Pelargonin 3-glucoside

The amount of pelargonin 3-glucoside in the wine samples was 65.20 mg/L at the beginning of the storage process (Table 3). When the change in pelargonin 3-glucoside values in wines is evaluated, it is seen that there is an increase in all temperatures at the end of storage.

Table 3. Pelargonin 3-glucoside analysis results

Storage period (months)	Pelargonin 3-glucoside (mg/L)			
	4-5 °C	8-10 °C	12-14 °C	18-20 °C
0	65.20±1.156			
3	197.12±1.796 <sup>Eb</sup>	198.46±0.492 <sup>Eb</sup>	224.30±1.252 <sup>Gc</sup>	172.12±0.755 <sup>Ea</sup>
6	322.22±1.436 <sup>Hd</sup>	303.20±2.669 <sup>Fc</sup>	256.04±0.749 <sup>Hb</sup>	211.92±1.346 <sup>Fa</sup>
9	157.28±2.716 <sup>Dc</sup>	183.32±1.102 <sup>Dd</sup>	123.01±0.542 <sup>Db</sup>	117.06±1.449 <sup>Da</sup>
12	75.16±1.230 <sup>Ca</sup>	124.42±0.766 <sup>Cc</sup>	102.74±0.439 <sup>Cb</sup>	105.42±0.446 <sup>Cb</sup>
15	53.05±0.400 <sup>Ba</sup>	53.71±0.251 <sup>Ba</sup>	57.69±0.655 <sup>Bb</sup>	52.60±0.617 <sup>Ba</sup>
18	24.64±0.836 <sup>Ac</sup>	12.77±0.236 <sup>Aa</sup>	15.56±0.626 <sup>Aa</sup>	28.33±1.285 <sup>Ab</sup>
21	206.34±1.623 <sup>Fa</sup>	211.70±0.556 <sup>Eb</sup>	217.85±2.016 <sup>Fc</sup>	ND
24	233.31±1.344 <sup>Gd</sup>	211.83±0.535 <sup>Ec</sup>	166.21±0.604 <sup>Eb</sup>	116.22±1.204 <sup>Da</sup>

Small letters in the same row indicate the difference between temperatures, and uppercase letters in the same column indicate the difference between months ( $P < 0.05$ ).

ND: Not detected

After 24 months of storage, the increase in pelargonin 3-glucoside values compared to the values 0. month of storage; it was determined that 257.84% at 4-5 °C, 224.89% at 8-10 °C, 154.92% at 12-14 °C, and 78.25% at 18-20 °C. This increase was also found as statistically significant ( $P < 0.05$ ).

#### Delphinidin 3-glucoside

The amount of delphinidin 3-glucoside in the wine samples could not be measured at the beginning of the storage process. The highest value for the amount of delphinidin 3-glucoside in wine samples was determined as 226.55 mg/L at the 9th month of storage period and 4-5 °C storage temperature conditions and the lowest amount of delphinidin 3-glucoside was determined as 4.30 mg/L at the 24th month storage period and 18-20 °C storage temperature conditions (Table 4).

In a study to examine the effect of storage temperature and time on delphinidin 3-glucoside, Monastrell wines were stored at 15-20 °C for 12 months. It was stated that the delphinidin-3-glucoside value, which was 20.93 mg/L before storage, decreased to 31.49% at the end of 3 months, 38.80% at the end of 6 months, 45.48% at the end of 9 months and 50.26% at the end of 12 months (Gomez-Plaza et al., 2000).

#### Malvidin 3-glucoside

In the samples of Merlot wines, the amount of malvidin 3-glucoside was determined as 2.29 mg/L at the beginning of the storage process (Table 5). When the change in the 3-glucoside value of malvidin in wines was evaluated, it was determined that there was an increase of 22.27% in Merlot wines at 18-20 °C compared to the values before storage at the end of 24 months of storage. This increase was also found as statistically significant ( $P < 0.05$ ).

Table 4. Delphinidin 3-glucoside analysis results

Storage period (months)	Delphinidin 3-glucoside (mg/L)			
	ND			
	4-5 °C	8-10 °C	12-14 °C	18-20 °C
0	ND			
3	5.98±0.960 <sup>Ab</sup>	5.76±0.155 <sup>Ab</sup>	4.64±0.635 <sup>Aa</sup>	4.63±0.321 <sup>Aa</sup>
6	16.47±0.515 <sup>Cd</sup>	12.79±0.294 <sup>Cc</sup>	10.67±0.723 <sup>Cb</sup>	9.02±0.555 <sup>Ca</sup>
9	226.55±0.606 <sup>Fd</sup>	125.12±0.554 <sup>Eb</sup>	136.94±0.156 <sup>Fc</sup>	78.26±0.300 <sup>Ea</sup>
12	64.96±0.674 <sup>Ed</sup>	30.81±1.255 <sup>Da</sup>	45.22±0.525 <sup>Ec</sup>	41.35±1.300 <sup>Db</sup>
15	9.65±0.117 <sup>Bd</sup>	7.88±0.441 <sup>Bc</sup>	6.63±0.185 <sup>Bb</sup>	5.86±0.111 <sup>Ba</sup>
18	5.74±0.162 <sup>Aa</sup>	6.43±0.184 <sup>Bb</sup>	5.05±0.059 <sup>Aa</sup>	42.36±1.212 <sup>Dc</sup>
21	5.73±0.217 <sup>Aa</sup>	5.75±0.126 <sup>Aa</sup>	5.09±0.125 <sup>Aa</sup>	ND
24	34.73±1.211 <sup>Dd</sup>	28.81±0.223 <sup>Dc</sup>	21.55±1.074 <sup>Db</sup>	4.30±0.129 <sup>Aa</sup>

Small letters in the same row indicate the difference between temperatures, and uppercase letters in the same column indicate the difference between months ( $P < 0.05$ ).

ND: Not detected

Table 5. Malvidin 3-glucoside analysis results

Storage period (months)	Malvidin 3-glucoside (mg/L)			
	2.75±0.205			
	4-5 °C	8-10 °C	12-14 °C	18-20 °C
0	2.75±0.205			
3	2.89±0.345 <sup>Aa</sup>	3.16±0.096 <sup>Ba</sup>	3.32±0.221 <sup>Ba</sup>	3.05±0.062 <sup>Aa</sup>
6	22.41±0.536 <sup>Fc</sup>	7.59±0.366 <sup>Db</sup>	7.13±0.026 <sup>Db</sup>	4.39±0.017 <sup>Ba</sup>
9	4.15±0.455 <sup>Cb</sup>	5.49±0.146 <sup>Cc</sup>	3.26±0.106 <sup>Ba</sup>	4.04±0.469 <sup>Bb</sup>
12	11.59±0.420 <sup>Ec</sup>	8.61±0.375 <sup>Eb</sup>	5.26±0.347 <sup>Ca</sup>	4.84±0.673 <sup>Ba</sup>
15	4.89±0.335 <sup>Ba</sup>	4.61±0.025 <sup>Ca</sup>	ND	ND
18	8.15±0.158 <sup>Db</sup>	14.69±0.276 <sup>Fc</sup>	28.02±0.885 <sup>Ed</sup>	3.11±0.110 <sup>Aa</sup>
21	2.50±0.065 <sup>Aa</sup>	3.75±0.200 <sup>Bb</sup>	3.64±0.023 <sup>Bb</sup>	ND
24	2.40±0.025 <sup>Aa</sup>	2.35±0.025 <sup>Aa</sup>	2.26±0.007 <sup>Aa</sup>	2.80±0.006 <sup>Ab</sup>

Small letters in the same row indicate the difference between temperatures, and uppercase letters in the same column indicate the difference between months ( $P < 0.05$ ).

In a study conducted to examine the effect of storage temperature and duration on malvidin 3-glucoside, Mencia wines were stored at 15 °C for 12 months, and it was stated that a significant decrease in malvidin 3-glucoside value occurred at the end of storage. At the beginning of storage, the value of malvidin 3-glucoside was determined as 126 mg/L; it was stated that this value decreased to 79 mg/L at the end of the 3rd month and 33 mg/L at the end of the 12th month (Garcia-Falcon et al., 2007).

### Cyanidin 3-glucoside

In the samples of Merlot wines, the amount of cyanidin 3-glucoside was determined as 6.86 mg/L on 0. months of the storage process (Table 6). When the change in the cyanidin 3-glucoside level in wines is evaluated, it is seen that there is an increase in all temperatures at the end of storage.



Table 6. Cyanidin 3-glucoside analysis results

Storage period (months)	Cyanidin 3-glucoside (mg/L)			
0	6.86±0.013			
	4-5 °C	8-10 °C	12-14 °C	18-20 °C
3	8.74±0.255 <sup>Ab</sup>	6.83±0.165 <sup>Aa</sup>	9.92±0.765 <sup>Ac</sup>	6.66±0.187 <sup>Aa</sup>
6	55.09±0.668 <sup>Dd</sup>	25.30±0.712 <sup>Cb</sup>	37.40±0.239 <sup>Dc</sup>	22.68±0.075 <sup>Da</sup>
9	66.30±0.612 <sup>Ed</sup>	51.41±0.420 <sup>Dc</sup>	32.19±0.698 <sup>Cb</sup>	19.93±0.485 <sup>Ca</sup>
12	67.41±1.227 <sup>Ed</sup>	60.61±0.674 <sup>Ec</sup>	14.31±0.020 <sup>Ba</sup>	25.56±0.081 <sup>Eb</sup>
15	162.65±0.724 <sup>Fd</sup>	141.39±1.527 <sup>Fc</sup>	107.44±1.526 <sup>Eb</sup>	65.38±0.765 <sup>Fa</sup>
18	19.50±0.469 <sup>Cb</sup>	7.40±0.046 <sup>Aa</sup>	36.01±0.404 <sup>Dd</sup>	23.11±0.561 <sup>Dc</sup>
21	11.31±0.237 <sup>Bc</sup>	10.10±0.097 <sup>Bb</sup>	8.00±0.445 <sup>Aa</sup>	ND
24	10.54±0.540 <sup>Bb</sup>	10.02±0.065 <sup>Ba</sup>	9.49±0.175 <sup>Aa</sup>	15.58±0.059 <sup>Bc</sup>

Small letters in the same row indicate the difference between temperatures, and uppercase letters in the same column indicate the difference between months ( $P < 0.05$ ).

ND: Not detected

The increase in cyanidin 3-glucoside values, after 24 months of storage compared to the values before storage, was 53.64% at 4-5 °C, 46.06% at 8-10 °C, 38.34% at 12-14 °C, and 18-20 °C 127.11 % in rate was found. This increase was also found as statistically significant ( $P < 0.05$ ).

In a study to examine the effect of storage temperature and time on cyanidin 3-glucoside, Monastrell wines were stored at 15-20 °C for 12 months. The cyanidin 3-glucoside value which was 10.48 mg/L before storage, was determined as 9.77 mg/L at the end of the 3rd month, 9.25 mg/L at the end of the 6th month, 8.66 mg/L at the end of the 9th month and 7.40 mg/L at the end of the 12th month. It was reported that the

cyanidin 3-glucoside value decreased to 6.77% at the end of 3 months, to 11.74% at the end of 6 months, to 17.37% at the end of 9 months, and to 29.39% at the end of 12 months (Gomez-Plaza et al., 2002).

#### Peonidin 3- glucoside

In the samples of Merlot wines, the amount of peonidin 3-glucoside was determined as 1.75 mg/L at the beginning of the storage process (Table 7). When the change in the peonidin 3-glucoside values in wines is evaluated, it is seen that there is an increase in all temperatures at the end of storage.

Table 7. Peonidin 3-glucoside analysis results

Storage period (months)	Peonidin 3-glucoside (mg/L)			
0	1.75±0.300			
	4-5 °C	8-10 °C	12-14 °C	18-20 °C
3	28.78±0.597 <sup>Ec</sup>	20.58±0.540 <sup>Ca</sup>	28.19±1.213 <sup>Fc</sup>	22.85±1.931 <sup>Eb</sup>
6	15.57±1.197 <sup>Ca</sup>	22.40±1.303 <sup>Dd</sup>	20.54±0.474 <sup>Dc</sup>	17.43±1.058 <sup>Db</sup>
9	19.55±1.333 <sup>Dd</sup>	12.45±1.400 <sup>Ab</sup>	16.49±1.464 <sup>Cc</sup>	4.82±0.695 <sup>Aa</sup>
12	38.38±1.434 <sup>Gd</sup>	31.54±1.440 <sup>Ec</sup>	8.46±1.432 <sup>Aa</sup>	15.05±0.170 <sup>Cb</sup>
15	79.50±0.481 <sup>Hc</sup>	80.56±1.525 <sup>Gc</sup>	71.33±1.614 <sup>Gb</sup>	45.22±0.593 <sup>Fa</sup>
18	6.72±0.975 <sup>Aa</sup>	17.72±1.219 <sup>Bd</sup>	10.96±0.101 <sup>Bb</sup>	15.50±0.442 <sup>Cc</sup>
21	12.78±0.933 <sup>Bb</sup>	10.82±0.851 <sup>Aa</sup>	10.75±0.205 <sup>Ba</sup>	ND
24	37.46±0.491 <sup>Fd</sup>	33.42±0.430 <sup>Fc</sup>	26.42±0.881 <sup>Eb</sup>	11.26±0.248 <sup>Ba</sup>

Small letters in the same row indicate the difference between temperatures, and uppercase letters in the same column indicate the difference between months ( $P < 0.05$ ).

ND: Not detected

It was determined that the increase in the peonidin 3-glucoside values after 24 months of storage was 2040.57% at 4-5 °C, 1809.71% at 8-10 °C, 1409.71% at 12-14 °C, and 543.43% at 18-20 °C in Merlot wines compared to the values before storage. This increase was also found as statistically significant ( $P < 0.05$ ).

In a study in which Monastrell wines were stored at 20 °C for 7 months, peonidin-3-glucoside value before storage was determined as 22.22 mg/L. It was reported that at the end of the 3rd month it decreased by 83.03% to 3.77 mg/L and at the end of the 6th month it decreased by 86.05% to 3.10 mg/L (Zafrilla et al., 2003).

In the study conducted by Marquez et al. (2014), Merlot, Shiraz and Tempranillo wines were stored for 12 months at 18-20 °C and the values of peonidin-3-glycosides were measured at the beginning of storage and one in three months.

After 12 months of storage, it was reported that the levels of peonidin-3-glycosides decreased to 91.26% in Merlot wine, 95.15% in Shiraz wine and 82.02% in Tempranillo wine.

#### Total Monomeric Anthocyanin

The effect of different storage temperature conditions and storage time stages on total monomeric anthocyanin in Merlot wines is given in Table 8. In the samples of Merlot wines, the amount of TMA was determined as 223.40 mg/L at the beginning of the storage process. The highest value for the total amount of monomeric anthocyanin in the samples of Merlot wines was determined as 257.15 mg/L under the 6-month storage period and 4-5 °C storage temperature conditions. The lowest total monomeric anthocyanin amount was determined as 75.30 mg/L under the conditions of a storage period of 24 months and a storage temperature of 18-20 °C.

Table 8. TMA analysis results

Storage period (months)	Total Monomeric Anthocyanin (mg/L malvidin 3-glucoside)			
	4-5 °C	8-10 °C	12-14 °C	18-20 °C
0	223.40±1.869			
3	226.17±4.050 <sup>Dd</sup>	219.56±0.062 <sup>Dc</sup>	216.08±0.374 <sup>Hb</sup>	175.32±0.312 <sup>Ga</sup>
6	257.15±0.000 <sup>Fd</sup>	220.67±0.000 <sup>Dc</sup>	204.36±3.739 <sup>Gb</sup>	165.59±0.125 <sup>Fa</sup>
9	246.35±0.436 <sup>Ed</sup>	226.44±0.436 <sup>Ec</sup>	178.45±0.125 <sup>Fb</sup>	144.61±0.374 <sup>Da</sup>
12	245.25±0.436 <sup>Ec</sup>	194.14±0.125 <sup>Cb</sup>	158.67±0.062 <sup>Ea</sup>	156.33±1.246 <sup>Ea</sup>
15	222.08±0.125 <sup>Cc</sup>	228.90±0.062 <sup>Fd</sup>	152.19±0.125 <sup>Db</sup>	104.82±0.312 <sup>Ca</sup>
18	199.78±0.000 <sup>Bd</sup>	170.08±0.125 <sup>Ac</sup>	140.60±0.312 <sup>Cb</sup>	89.89±0.000 <sup>Ba</sup>
21	225.42±0.125 <sup>Dd</sup>	172.24±0.187 <sup>Bc</sup>	137.92±0.000 <sup>Bb</sup>	90.68±0.249 <sup>Ba</sup>
24	192.64±0.249 <sup>Ad</sup>	169.16±0.062 <sup>Ac</sup>	125.27±0.187 <sup>Ab</sup>	75.30±0.436 <sup>Aa</sup>

Small letters in the same row indicate the difference between temperatures, and uppercase letters in the same column indicate the difference between months ( $P < 0.05$ ).

It was determined that the increase in the TMA values after 24 months of storage was 13.77% at 4-5 °C, 24.28% at 8-10 °C, 43.93% at 12-14 °C, and 66.29% at 18-20 °C in Merlot wines compared to the values before storage. This increase was also found as statistically significant ( $P < 0.05$ ).

The findings obtained in the study are also compatible with the literature data. In a study in which Monastrell wines were stored at 20 °C for

7 months, the total anthocyanin value before storage was determined as 386.0 mg/L. It was reported that at the end of the 3rd month it decreased by 76% to 91.8 mg/L and at the end of the 6th month it decreased by 85% to 57.7 mg/L (Zafrilla et al., 2003). Hermosin-Gutierrez et al. (2005) reported that Shiraz, Cencibel and Cabernet Sauvignon wines were stored at 16-18 °C and lost 60%, 62% and 68%, respectively, in total anthocyanin amounts at the end of 9 months. In another study examining the effect of

storage temperature and time on total anthocyanins, it was stated that a significant decrease in the amount of total anthocyanin occurred in Violeta wine depending on the temperature increase. After 2 months of storage, 40% reduction was observed in wines stored at 15 °C. A reduction of 50% was observed in wines stored at 25 °C, 88% in wines stored at 35 °C, and 96% in wines stored at 50 °C (Lago-Vanzela et al., 2014).

The result obtained from the studies is a significant decrease in the level of free anthocyanins due to the formation of polymeric derivatives. It is stated that storage temperature plays an important role in the degradation of wine pigments and polymerization reactions and is the primary environmental factor affecting the changes in the color properties of red wine. Studies have shown that storage length is another important factor affecting wine color, since many of the changes that occur during the storage of wines are time-dependent (Zafrilla et al., 2003; Hermosin-Gutierrez et al., 2005; Lago-Vanzela et al., 2014; Marquez et al., 2014; Ifie et al., 2018).

## CONCLUSION

The findings obtained in the study showed that the storage temperature and time were effective on the total monomeric anthocyanin content and the distribution of anthocyanin compounds in the wines produced from the Merlot variety. It was determined that the total amount of anthocyanins in the wines decreased gradually as the storage temperature increased. This indicates that storage temperature is an important factor for preserving color compounds in wine and preventing early development effects.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest between them.

## AUTHOR CONTRIBUTION

The authors declare that they have contributed equally to the article.

## ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank Assoc. Prof. Dr. Nilüfer VURAL for scientific contribution. This

study was produced from Esmâ Nur GEÇER's Ph.D. thesis titled The Effect of Different Storage Conditions on Antioxidant Property and Phenolic Components of Red Wines.

## REFERENCES

- Anlı, E.R. (2011). *Şarap Tadımı*. İnkılap Yayınları, İstanbul, Türkiye, 215 s.
- Anonymous (1990). Recueil des Methodes Internationales D'Analyse des Vins et des Mouts, Office International de la Vigne et du Vin, 368, Paris.
- Anonymous (2003). Resolution Oeno 22/2003 HPLC-determination of nine major anthocyanins in red and rose wine.
- Basli, A., Soulet, S., Chaher, N., Merillon, J.M., Chibane, M., Monti, J.P. (2012). Wine polyphenols: potential agents in neuroprotection. *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, 2012: 1-14.
- Benucci, I. (2020). Impact of post-bottling storage conditions on colour and sensory profile of a rosé sparkling wine. *Food Science and Technology*, 118:108732.
- Biasi, F., Deiana, M., Guina, T., Gamba, P., Leonarduzzi, G., Poli, G. (2014). Wine consumption and intestinal redox homeostasis. *Redox Biology*, 2: 795-802.
- Blanco-Vega, D., Gomez-Alonso, S., Hermosin-Gutierrez, I. (2014). Identification, content and distribution of anthocyanins and low molecular weight anthocyanin-derived pigments in Spanish commercial red wines. *Food Chemistry*, 158: 449-458.
- Castillo-Munoz, N., Gomez-Alonso, S., Garcia-Romero, E., Hermosin-Gutierrez, I. (2010). Flavonol profiles of vitis vinifera white grape cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23: 699-705.
- Cheyrier, V., Duenas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J.M., Sarni-Manchado, P. (2006). Structure and properties of wine pigments and tannins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3): 298-305.
- Fulcrand, H., Duenas, M., Salas, E., Cheyrier, V. (2006). Phenolic reactions during winemaking and

- aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57: 289-297.
- Garcia-Falcon, M.S., Perez-Lamela, C., Martinez-Carballo, E., Simal-Gandara, J. (2007). Determination of phenolic compounds in wines: Influence of bottle storage of young red wines on their evolution. *Food Chemistry*, 105: 248-259.
- Gomez-Plaza, E., Munoz-Gil, R., Lopez-Roca, J.M., Martinez, A. (2000). Color and phenolic compounds of a young red wine. Influence of wine-making techniques, storage temperature, and length of storage time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 736-741.
- Gomez-Plaza, E., Munoz-Gil, R., Lopez-Roca, J.M., Martinez-Cutillas, A., Fernandez, I. (2002). Maintenance of colour composition of a red wine during storage. Influence of prefermentative practices, maceration time and storage. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 35: 46-53.
- Guisti, M., Wrolstad, R. (2003). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In: Wrolstad, R.E, Editor. Current protocols in food analytical chemistry. New York: John and Wiley, Inc. P F1.2.1-F1.2.13.
- Han, F.L., Zhang, W.N., Pan, Q.H., Zheng, C.R., Chen, H.Y., Duan, C.Q. (2008). Principal component regression analysis of the relation between CIELAB color and monomeric anthocyanins in young Cabernet Sauvignon wines. *Molecules*, 13: 2859-2870.
- Han, F., Ju, Y., Ruan, X., Zhao, X., Yue, X., Zhuang, X., Qin, M., Fang, Y. (2017). Color, anthocyanin, and antioxidant characteristics of young wines produced from spine grapes (*Vitis davidii* Foex) in China. *Journal of Food and Nutrition Research*, 61: 1339-1352.
- He, F., Liang, N.N., Mu, L., Pan, Q.H., Wang, J., Reeves, M.J., Duan, C.Q. (2012). Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules*, 17(2): 1571-1601.
- Hermosin Gutierrez, I., Sanchez-Palomo Lorenzo, E., Vicario Espinosa, A. (2005). Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chemistry*, 92, 269-283.
- Ifie, I., Abranko, L., Villa-Rodriguez, J.A., Papp, N., Ho, P., Williamson, G., Marshall, L.J. (2018). The effect of aging temperature on the physicochemical properties, phytochemical profile and a-glucosidase inhibition of Hibiscus sabdariffa (roselle) wine. *Food Chemistry*, 267: 263-270.
- Ivanova, V., Dörnyei, A., Mark, L., Vojnoski, B., Stafilov, T., Stefova, M. ve Kilar, F. (2011). Polyphenolic content of Vranec wines produced by different vinification conditions. *Food Chemistry*, 124(1): 316-325.
- Ivanova, V., Hermosin-Gutierrez, I., Boros, B., Stefova, M., Stafilov, T., Vojnoski, B., Dörnyei, A., Kilar, F. (2015). Phenolic compounds and antioxidant activity of Macedonian red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 41: 1-14.
- Lago-Vanzela, E.S., Procopio, D.P., Fontes, E.A.F., Ramos, A.M., Stringheta, P.C., Da-Silva, R., Castillo-Munoz, N., Hermosin-Gutierrez, I. (2014). Aging of red wines made from hybrid grape cv. BRS Violeta: Effects of accelerated aging conditions on phenolic composition, color and antioxidant activity. *Food Research International*, 56, 182-189.
- Lingua, M.S., Wunderlin, D.A., Baroni, M.V. (2018). Effect of simulated digestion on the phenolic components of red grapes and their corresponding wines. *Journal of Functional Foods*, 44: 86-94.
- Lukic, I., Radeka, S., Budic-Leto, I., Bubola, M., Vrhovsek, U. (2019). Targeted UPLCQqQ-MS/MS profiling of phenolic compounds for differentiation of monovarietal wines and corroboration of particular varietal typicality concepts. *Food Chemistry*, 300: 125-131.
- Marquez, A., Serratos, M.P., Merida, J. (2014). Influence of bottle storage time on colour, phenolic composition and sensory properties of sweet red wines. *Food Chemistry*, 146: 507-514.
- Maury, C., Clark, A.C., Scollary, G.R. (2010). Determination of the impact of bottle colour and

- phenolic concentrations on pigment development in white wines stored under external conditions. *Analytica Chimica Acta*, 660: 81-86.
- Nardini, M., Garaguso, I. (2018). Effect of sulfites on antioxidant activity, total polyphenols, and flavonoid measurements in white wine. *Foods*, 7: 35-49.
- Ough C.S., Amerine, M.A. (1988). Methods for analysis of must and wines. John Wiley and Sons. New York.
- Paixao, N., Perestrello, R., Marques, J.C., Camara, J.S. (2007). Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rose and white wines. *Food Chemistry*, 105: 204-214.
- Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieau., D. (2000). Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Wine and Stabilization and Treatments. John Wiley And Sons Ltd., England.
- Robinson, A.L., Mueller, M., Heymann, H., Ebeler, S.E., Boss, P.K., Solomon, P.S., Trengove, R.D. (2010). Effect of simulated shipping conditions on sensory attributes and volatile composition of commercial white and red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61: 337-347.
- Schrieks, I.C., Van den Berg, R., Sierksma, A., Beulens, J.W.J., Vaes, W.H.J., Hendriks, H.F.J., (2013). Effect of red wine consumption on biomarkers of oxidative stress. *Alcohol and Alcoholism*. 48: 153-159.
- Scrimgeour, N., Nordestgaard, S., Lloyd, N.D.R., Wilkes, E.N. (2015). Exploring the effect of elevated storage temperature on wine composition. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21: 713-722.
- Somers, T.C. (1971). The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry*, 10: 2175-2186.
- Tuberosoa, C.I.G., Serrelia, G., Congiua, F., Montorob, P., Fenua, M.A. (2017). Characterization, phenolic profile, nitrogen compounds and antioxidant activity of Carignano wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 58: 60-68.
- Walzem, R.L. (2008). Wine and health: state of proofs and research needs. *Inflammopharmacology*, 16: 265-271.
- Waterhouse, A. L., Zhu, J. (2020). A quarter century of wine pigment discovery. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(14): 5093–5101.
- Zafrilla, P., Morillas, J., Mulero, J., Cayuela, J.M., Martinez-Cacha, A., Pardo, F., Nicolas J.M.L. (2003). Changes during storage in conventional and ecological wine: Phenolic content and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 4694-4700.
- Zhao, X., Zhang, N., He, F., Duan, C. (2022). Reactivity comparison of three malvidin-type anthocyanins forming derived pigments in model wine solutions. *Food Chemistry*, 384: 132534.



**INVESTIGATION OF REGULAR AND HYPOALLERGENIC INFANT MILK FORMULAS BY ATR-FTIR SPECTROSCOPY COMBINED WITH MULTIVARIATE ANALYSIS METHODS**

**Dilek Yonar<sup>1\*</sup>, Sevgi Haman Bayari<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biophysics, Faculty of Medicine, Yuksek Ihtisas University, Ankara, Turkey

<sup>2</sup>Department of Physics Engineering, Faculty of Engineering, Hacettepe University, Ankara, Turkey

Received /Geliş: 02.12.2022; Accepted /Kabul: 20.01.2023; Published online /Online baskı: 30.01.2023

Yonar, D., Haman Bayari, S. (2023). Investigation of regular and hypoallergenic infant milk formulas by ATR-FTIR spectroscopy combined with multivariate analysis methods. GIDA (2023) 48 (1) 171-184 doi: 10.15237/gida.GD22123

Yonar, D., Haman Bayari, S. (2023). Standart ve hipoalerjenik bebek sütü formüllerinin ATR-FTIR spektroskopisi ve çok değişkenli analiz yöntemleriyle incelenmesi. GIDA (2023) 48 (1) 171-184 doi: 10.15237/gida.GD22123

**ABSTRACT**

Infant formulas contain nutrients and bioactive ingredients designed to meet the nutrition requirements of infants. The majority of infant formulas are cow's milk (CM) based regular ones. Since CM is one of the most important allergen source, there are specialized formulas such as partially and extensively hydrolyzed, aminoacid-based for CM-allergic infants. In the current study, attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) in combination with multivariate analysis was used to identify the molecular differences between commercially available hypoallergenic (HF) and regular formulas (RF) in Turkey. Higher saturated fatty acid (FA) content and qualitatively longer acyl chained FAs were observed in hypoallergenic formulations. The results of hierarchical cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA) showed that there were differences between the infrared spectra of the two groups. The HF and RF samples were clearly separated from each other in 1200-800 cm<sup>-1</sup> spectral region with 83% variation and 100% accuracy.

**Keywords:** ATR-FTIR spectroscopy, hypoallergenic formula, infant milk formula, multivariate analysis methods

**STANDART VE HİPOALERJENİK BEBEK SÜTÜ FORMÜLLERİNİN ATR-FTIR SPEKTROSKOPİSİ VE ÇOK DEĞİŞKENLİ ANALİZ YÖNTEMLERİYLE İNCELENMESİ**

**ÖZ**

Bebek formülleri, bebeklerin beslenme gereksinimlerini karşılamak için tasarlanmış besinler ve biyoaktif bileşenler içerir. Bebek formüllerinin çoğu inek sütü (CM) bazlı normal formüllerdir. CM en önemli alerjen kaynaklarından biri olduğu için CM alerjisi olan bebekler için kısmen ve yoğun hidrolize, aminoasit bazlı gibi özel formüller bulunmaktadır. Bu çalışmada, Türkiye'de ticari olarak satılan standart ve hipoalerjenik bebek sütü formüllerinin moleküler farklılıklarının ayırt edilebilmesi

\* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar

✉ dilekyonar@yiu.edu.tr

☎ (+90) 312 329 1010/268

☎ (+90) 312 329 1015

Dilek Yonar; ORCID no: 0000-0001-6480-855X

Sevgi Haman Bayari; ORCID no: 0000-0001-9265-1414

amacıyla zayıflatılmış toplam yansıma (ATR)- Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, kemometrik yöntemlerle birlikte kullanılmıştır. Hipoalerjenik formül (HF) örneklerinde standart formüllere (RF) göre önemli derecede daha yüksek doymuş yağ asidi miktarı ve niteliksel olarak daha uzun zincirli yağ asidi gruplarının olduğu bulunmuştur. Hiyerarşik kümeleme analizi (HCA) ve temel bileşen analizi (PCA) sonuçlarına göre, %100 duyarlılık ve %83 varyasyon ile en belirgin ayrımın olduğu spektral bölge 1200-800 cm<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** ATR-FTIR spektroskopisi, bebek sütü formülü, hipoalerjenik formül, çok değişkenli analiz yöntemleri.

## INTRODUCTION

Although breast milk is the optimal source of nutrition for infants, today, the use of ready-made infant formula has increased due to reasons such as insufficient breastfeeding or cutting off breastfeeding of babies from women who have to work.

Infant formula contains nutrients and bioactive ingredients designed to meet the essential nutrition to maintain and support adequate growth and optimal health for infants and as a suitable alternative to breast milk when a mother is unable to breastfeed (Joeckel and Phillips, 2009; Blanchard et al., 2013; Green Corkins and Shurley, 2016). The most common infant formulas are regular ones based on cow's milk. In infant formulas, cow's milk, whey protein concentrate, demineralized whey, carbohydrates such as lactose, maltodextrin, or sucrose and vegetable oils were used. Vitamins and minerals might be added to the formulas (Food and Agriculture Organization, 1981). It is necessary to adjust the whey/casein proteins ratio to support better digestibility and the nutritional needs of the baby (Blanchard et al., 2013). There are also specialized formulas for infants showing signs and symptoms of intolerance and with specific medical conditions, including allergies (Heine et al., 2002; Andres Martinez and Ballew, 2011; Martin et al., 2016; Osborn et al., 2017).

Hypoallergenic infant formulas are advised for infants who cannot be breastfed and have cow's milk allergy (CMA), affecting 2-3% of all babies (Dias et al., 2022). These formulas have shorter, easier digestible and potentially less allergenic proteins obtained by hydrolysis of larger protein chains. There are 3 main varieties of hypoallergenic formulas; partially, extensively hydrolyzed, and free amino acid-based. The partial or extensive cleavage of cow's milk

proteins obtained by peptidases is one of the most effective methods of reducing allergic reactions to these proteins. The American Academy of Pediatrics (AAP) propounds the use of extensively hypoallergenic formulas in babies and children with milk allergies (American Academy of Pediatrics, Committee on Nutrition, 2000). The more extensively the formula hydrolyzes, the less potentially allergenic compounds remain, and the better an allergic infant can tolerate it. Moreover, free amino acid-based formula is formulated with 100% free amino acids for infants whose symptoms of hypersensitivity persist on extensively hydrolyzed cow's milk protein (Nocerino et al., 2021). There is a research about the negative effects of the cow milk processing into the hypoallergenic formula. This research aimed to decide the transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) and the anti-inflammatory activity of hypoallergenic and regular formulas. The authors proposed that hypoallergenic formulas do not have *in vitro* TGF- $\beta$  activity and have lower anti-inflammatory activity in comparison with regular ones (Panahipour et al., 2020).

Infrared (IR) spectroscopy is a technique that has been applied (mid-infrared (MIR) and near-infrared (NIR)) in many fields such as food, agriculture, medicine, biomedical applications, and chemistry (Linker, 2011; Gok et al., 2015; Bayari et al., 2020, Baltacıoğlu, 2022; Yonar et al., 2022).

Infrared spectroscopic analysis is highly sensitive and quick method to obtain high quality spectrum of organic and inorganic compounds. It is a non-destructive technique and can identify even small amount of samples without the requirement of sample preparation by its attenuated total reflectance unit (ATR). Combined with multivariate analysis such as hierarchical cluster

analysis (HCA) and principal component analysis (PCA), FTIR has been useful for additive detection in a variety of food products and routinely used in the dairy industry to determine milk components such as fat, protein, and lactose (Wang et al., 2009; Gok et al., 2015; Granato et al., 2018; Rovere et al., 2021). FTIR spectroscopy has been used to measure the amount of melamine and cyanuric acid in milk and infant formula powders (Mauer et al., 2009; Lu et al., 2009; Jawaid et al., 2014; Huang et al., 2014; García-Miguel et al., 2018). It can be concluded that FTIR spectroscopy coupled with multivariate classification allows for rapid and robust identification and quantification of adulterants in food even if their concentrations are very low. The analysis of whey protein powder intentionally adulterated with either protein or amino acids was carried out by mid-infrared spectroscopy. This study provided evidence that product tampering can be easily monitored with IR method (Saxton and McDougal, 2021). Another study which aimed to observe iron-induced oxidation in liquid infant formula using IR spectroscopy claimed that IR spectroscopy was able to identify the spectral changes specific to lipid oxidation (Daoud et al., 2020). Milk fat and its fatty acid (FA) composition are important in dairy production and human health. Rovere et al. used infrared spectral data to predict FA composition in milk (Rovere et al., 2021).

There are no any other studies to demonstrate the spectral differences between regular and hypoallergenic infant formulas. The aim of the present study was to develop a fast, accurate and reagent free analytical method for determining the spectral differences in fat, protein, carbohydrate of hypoallergenic and regular formulas commercially available in the Turkish markets by using ATR-FTIR spectroscopy in combination with multivariate data analyses.

## MATERIALS AND METHODS

### Sampling

Different random commercial regular (n=6) and hypoallergenic (n=5) infant formula powder samples for babies up to 6 months of age were purchased from markets in Turkey.

### ATR-FTIR spectral data collection and data analysis

ATR-FTIR spectra were recorded on a Perkin Elmer Frontier model FTIR spectrometer (Perkin Elmer Inc., USA) equipped with a Quest single reflection attenuated total reflectance (ATR) accessory (Specac Ltd., UK). A small quantity of the infant formula samples was placed on the diamond ATR crystal plate. To check the reproducibility of the identical spectra, three spectra for individual formula samples were collected in an absorbance mode over the range of 4000–450  $\text{cm}^{-1}$  at 4  $\text{cm}^{-1}$  and 64 co-added scans at room temperature. Prior to sample measurement, a background spectrum of the empty, clean ATR crystal was recorded which is automatically subtracted from the recorded spectra of the samples by using Perkin Elmer Spectrum software (version 10.03.06). The average spectrum was taken for each sample and the baseline corrected average spectra were normalized with respect to  $\nu(\text{OH})$  band (3650–3030  $\text{cm}^{-1}$ ).

The area values under the spectral bands are proportional to the concentration of the respective molecules /the functional groups in the samples. Information about the relative concentration of the respective molecules in the samples can be obtained by the band area/band intensity analysis (Bayarı et al., 2020; Akgun et al., 2021; Yonar et al., 2022). The infrared integrated band area ratios to evaluate spectroscopic data and their suggestions are listed in Table 1.

### Multivariate analysis methods

HCA and PCA were performed to discriminate the HF groups from RF groups based on their spectral differences using Unscrambler X 10.3 software (Camo Software Inc., Norway). The average baseline corrected vector normalized spectra were used for HCA. The similarities between the spectra are determined by using distance calculation and classification algorithms. The results are displayed as dendrograms constructed using Ward's algorithm. Heterogeneity values in the dendrograms represent the magnitude of the similarity and its higher values indicate higher dissimilarity between the groups.



Table 1. The integrated spectral regions and interpretation for the infrared bands used in this study

Integrated band area ratios	Indication
CH <sub>2</sub> as stretching / CH <sub>3</sub> as stretching	aliphatic acyl chain length of fatty acids
CH <sub>2</sub> as stretching / (CH <sub>2</sub> as stretching +CH <sub>2</sub> s stretching)	saturated lipids content
HC=CH olefinic band/ (CH <sub>2</sub> as stretching +CH <sub>2</sub> s stretching)	unsaturation index
ester C=O stretching / (CH <sub>2</sub> as stretching +CH <sub>2</sub> s stretching)	carbonyl amount

PCA is a mathematical tool that aims to represent the variation present in the dataset (Nieuwoudt et al., 2004; Granato et al., 2018;) and used to reduce the dimension of datasets by transforming the old coordinate system (peaks) into the new coordinate system (PCs). In PCA, each spectrum is characterized with a single point on scores plot with axes called principal components (PCs). Loadings plot that displays the variables make the greatest contribution to the principal components is calculated for each PC (Wold et al., 1987).

Prior to analysis, FTIR spectra were pre-processed by performing baseline correction and vector normalization without doing smoothing or any additional pre-processing (Esbensen, 2010). Initially, mean-centered PCA was conducted over whole region, 3050-2800 and 1800-800 cm<sup>-1</sup> spectral regions for the studied groups and then, the best spectral regions as 1700-1500 and 1200-800 cm<sup>-1</sup> were chosen from the loading plots for the analyses. PCA results are presented as score and loading plots.

### Statistics

The results were expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). The data were evaluated using an unpaired (independent) t-test in GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.) to compare the means of the studied groups (two independent groups- regular and hypoallergenic infant formulas) for determining the significance of the difference between them.  $P < 0.05$  was considered as statistically significant. The degree of significance for the comparison of the hypoallergenic formulas with respect to regular ones was denoted as \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

### ATR-FTIR Spectra

Figs. 1A and B show the average ATR-FTIR spectra of the regular (RF) and hypoallergenic infant formula (HF) samples, respectively. Table 2 presents the band assignment of the main bands in agreement with the literature (Sjaunja 1984; Guillén and Cabo, 1997; Kaylegian et al., 2009; Santos et al., 2013; Grelet et al. 2015; Botelho et al., 2015; Ye et al., 2017; Wiercigroch et al., 2017; Balan et al., 2020).

The mid-infrared spectrum contains specific and characteristic absorption bands arising from the functional groups of various biomolecules such as fats, proteins, and carbohydrates. FTIR is widely used for qualitative and quantitative determination of food components.

Whole cow's milk contains 3.2-4.7% fat depending on particularly feeding strategies. Milk fat contains a complex mixture of various lipid substances. These are primarily triglycerides and fatty acids (FAs). Milk fat contains saturated FA and monounsaturated FA, approximately 60-70%, 20-35% and 5%, respectively (Djordjevic et al., 2019).

To obtain information about spectral parameters such as the amount of unsaturation level in fat and aliphatic acyl chain length of FA and the amount of carbonyl group in samples, the integrated area ratios of some specific bands were calculated (Table 1, Fig. 2A-D).

The band area ratios related to saturated FA content and aliphatic acyl chain length in FAs were found to be significantly higher in HF group compared to RF group (Fig. 2A, B) indicating the higher saturated FA content and the presence of

qualitatively longer acyl chained FAs. In addition, there is a unique vibrational band of unsaturated lipids approximately at  $3008\text{ cm}^{-1}$  which is assigned as olefinic C=CH stretching vibration and can be employed for the content of unsaturated FAs. The molecular fingerprint region also contains some considerable lipid-associated spectral bands such as carbonyl (C=O) stretching mode of the lipids located at  $1744\text{ cm}^{-1}$ . The band area ratios related to the carbonyl

amount and unsaturation index (Table 1) were found to be lower in HF group compared to RF group (Fig. 2C, D). The unsaturation index was obtained by taking the ratio of olefinic band area to total saturated FA areas (Table 1). For hypoallergenic infant formulas, increases in the areas of all saturated or unsaturated fatty acids are observed. So the decrease observed in unsaturation index, considering not significant, demonstrates the more increase of saturated FAs.

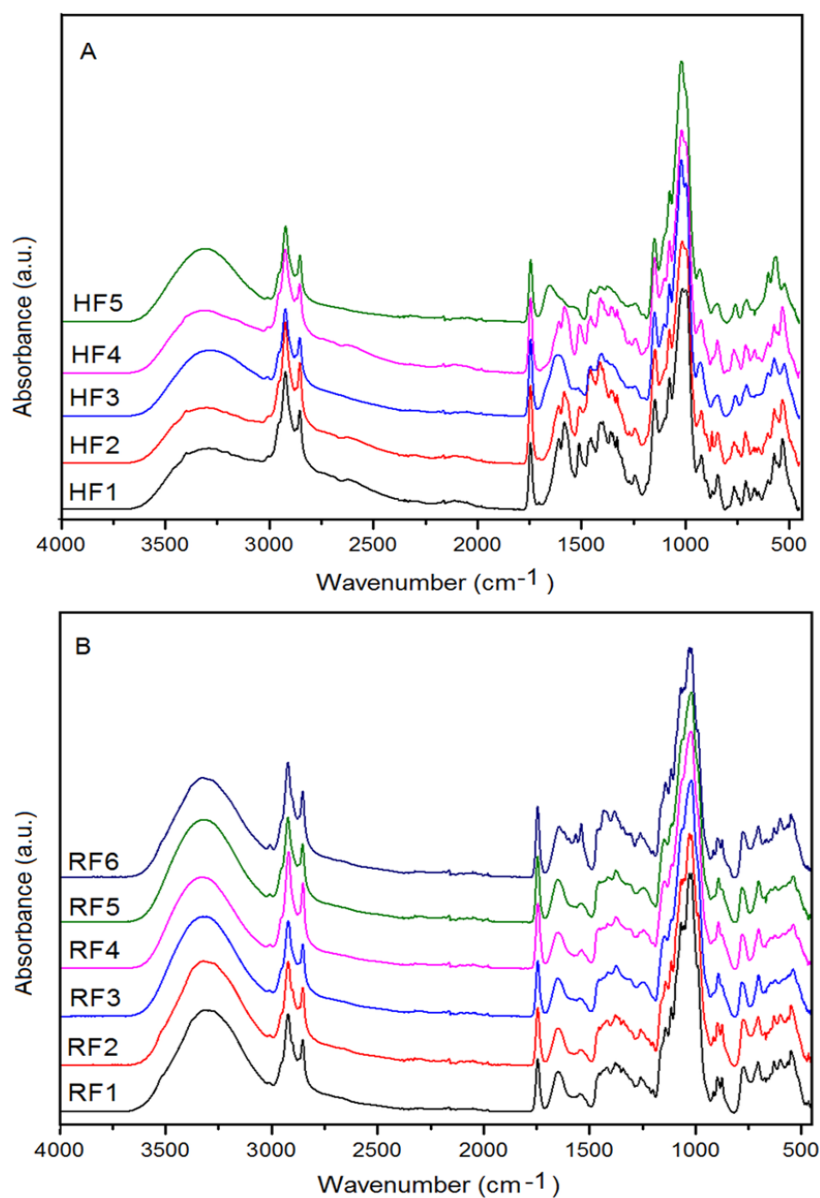


Fig. 1. Comparative ATR-FTIR spectra of A) hypoallergenic (HF) and B) regular infant formula (RF) samples in the  $4000\text{-}450\text{ cm}^{-1}$  region.

Table 2. Assignments for the main bands in the FTIR spectrum of infant formula<sup>a</sup>

Wavenumber (cm <sup>-1</sup> )	Band Assignment	Presence status
3300	O–H stretching vibrations of water	HF and RF
3008	Olefinic =CH stretching vibration	HF and RF
2954	CH <sub>3</sub> group: C-H antisymmetric stretching	HF and RF
2923	Aliphatic CH <sub>2</sub> group :C-H antisymmetric stretching	HF and RF
2901	C- H stretching	RF
2872	CH <sub>3</sub> group: C-H symmetric stretching	HF and RF
2853	Aliphatic CH <sub>2</sub> group: C-H symmetric stretching	HF and RF
1744	Carbonyl C=O stretching -triglyceride esters	HF and RF
1648	Amide I: C=O and C-N stretching vibration	RF
1608	N-H bending of a primary amine	HF (available in free amino acid-based HF's)
1584	Carboxylic acid: COO <sup>-</sup> antisymmetric stretching	HF (available in free amino acid-based HF's)
1538	Amide II: N–H in plane bending and C–N stretching	RF
1512	N-terminal amino group: NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> scissoring	HF
1467	CH <sub>2</sub> group (C-H bending), fat	HF and RF
1455	CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> groups (C-H asymmetric bending)	HF and RF
1396	Carboxylic acid: COO <sup>-</sup> symmetric stretching	HF (available in free amino acid-based HF's)
1378	CH <sub>3</sub> group (C–H bending)	RF
1350	C-O stretching, deformation CH,	HF
1270	Amino acid side-chain vibrations	HF (free amino acid-based HF's)
1260	Amide III C-N stretching	RF
1244	C-O-C stretching-carbohydrate	HF and RF
1148	C-O-C ether stretching-carbohydrate	HF and RF (shift towards higher wavenumbers in HF)
1115	C-O-C stretching- carbohydrate	RF
1102	O=P–O or phosphate group of the casein proteins / C-O-C stretching of carbohydrate	HF
1076	C-O, C-C, C-H stretching -carbohydrate	HF and RF
1030	C-O stretching –carbohydrate (polysaccharide skeleton)	RF
1018	Phenylalanine-protein/C-O stretching vibrations of glucose	HF and RF
988	C-H out-of-plane bending	HF and RF
896	C-H out-of-plane bending	RF
846	Carbohydrate	HF

<sup>a</sup> The assignments are according to the literature [(Sjaunja 1984; Guilen and Cabo, 1997, Kaylegian et al., 2009, Santos et al. 2013; Grelet et al. 2015; Botelho et al., 2015; Ye et al., 2017; Wiercigroch et al., 2017; Balan et al., 2020)]. RF, Regular infant formula, HF, hypoallergenic infant formula

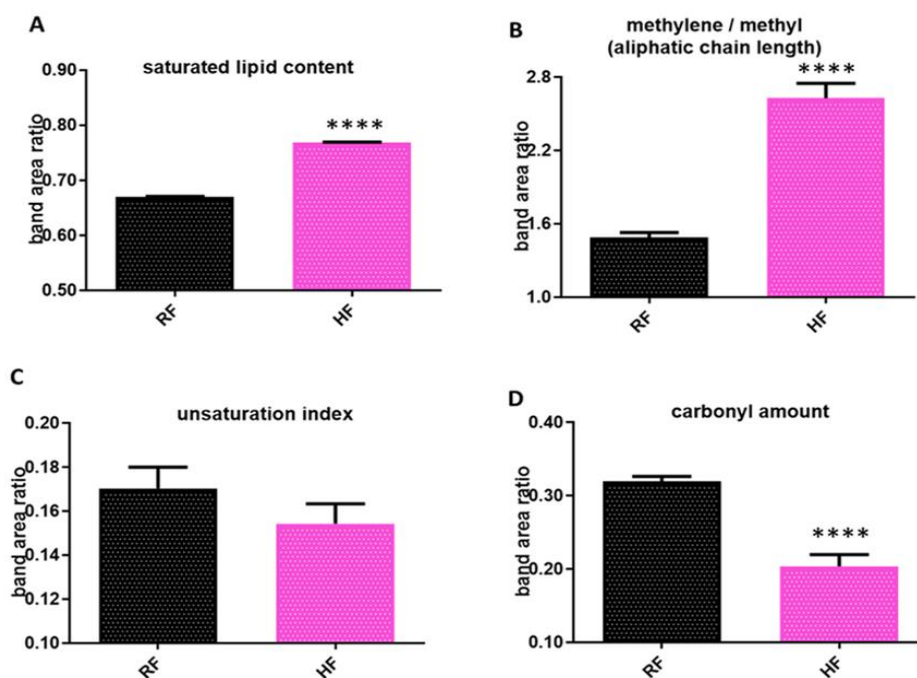


Figure 2. Bar graphs of some band area ratios related to relative amounts for RF and HF groups. A) saturated lipid content, B) aliphatic chain length, C) unsaturation index and D) carbonyl amount (The degree of significance for the comparison of the diseased groups with respect to the control group was denoted as \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ ).

Fats are the primary energy source in infant formula, which provides 40-50% of the infant's energy needs. The fat composition of infant formula changes in accordance with the used fat sources and the potential biological effects are correlated with the diversity of saturated and unsaturated fatty acids. Cow and goat milk fats are not suitable as only fat sources in infant formulas due to large differences in fatty acid profiles, which compared to human milk. Human milk has a lower level of short-chain fatty acids and a higher fraction of unsaturated and long-chain polyunsaturated fatty acids than cow and goat milk. These differences in fatty acid profile are mostly due to differences in fatty acid synthesis mechanisms between them. Because of these differences, in infant formulas made from cow and goat milk, vegetable oils are used as the primary lipid source blended in a combination that provides a similar fatty acid profile to that of human milk (Delplanque et al., 2015; Byrne et al., 2021). The major differences between human milk and formulas are due to the various saturated and unsaturated fatty acids, cholesterol, and

complex lipids. Fatty acid composition reflects nutritional quality. The lipid composition of infant formulas is essential, especially for babies with special needs, as dietary fats are the source of energy and may affect health. Long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) have functional and structural role in infant development. When there is a breakdown of the oral tolerance mechanisms, immune responses to ordinary food allergens can lead to food allergy and it has been hypothesized that certain nutrients, such as essential fatty acids, can positively influence this process. *trans* fatty acids and metabolites of long-chain PUFAs can regulate immune function with their anti-inflammatory properties (Mazzocchi et al., 2018). Therefore, increased long-chain fatty acids and unsaturated fatty acids in hypoallergenic formulas are expected to be higher. Mendonça et al. (2017) aimed to investigate the lipid content and to identify the lipid profile of infant formulas. In that study, the percentages of saturated fatty acids in infant formula and human milk were given and a higher total saturated fatty acid was found in the

extensively hydrolyzed formula as compared to the regular ones (Mendonça et al., 2017). We found that the higher saturated lipid values obtained for the hypoallergenic infant formulas were in accordance with literature.

Proteins have major absorption bands such as the amide I ( $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ ) and amide II ( $\sim 1540\text{ cm}^{-1}$ ) bands in the mid-infrared region. The precise vibrational frequencies of the amide I and II bands depend on the attachment of nitrogen of the N-H and the carbon of the C=O bonds to the peptide bonds. While these bands are observed in regular formulas, they are not seen in hypoallergenic formulas. A carboxylic acid from the C-terminal and a primary amine from the N-terminal will be formed during the hydrolysis of the peptide bond. While the carbonyl group in the peptide will be subjected to electron donation from the nitrogen atom before hydrolysis, the C-terminal carbonyl group will not any more exposed to that donation after peptide bond cleavage and the vibrational frequency of C=O stretching will take away from the  $1650\text{ cm}^{-1}$  to around  $1700\text{ cm}^{-1}$  region (Poulsen et al., 2016). In this case, the absorbance increase at  $1744\text{ cm}^{-1}$  which is carbonyl C=O stretching of triglyceride esters suggests that carbonyl groups in protein may also contribute to this increment. Moreover, the amide II band should reduce during hydrolysis since the C-N bond is cleaved. Due to the forming of a primary amine as hydrolysis occurs, N-H bending is found at approximately  $1600\text{ cm}^{-1}$ . All these changes due to hydrolysis of proteins are predicted to give an alteration in IR spectrum (Fig 1).

The source of carbohydrates in breast milk is lactose. Generally, alternative glucose-derived polymers or sucrose-based carbohydrates are used instead of lactose in infant formulas (Strzalkowski et al., 2022). The absorption bands located in the  $1200\text{--}800\text{ cm}^{-1}$  spectral region are considered as the fingerprint region of carbohydrates and dominated by deformational modes of the C-H/CH<sub>2</sub> and C-C-O groups. It is possible to distinguish bands characteristic for mono and polysaccharides by analyzing the functional groups in this region. The area ratios of some bands related to carbohydrates present in both formulas were evaluated and no significant changes were found. However, due to the complex structural properties of carbohydrates analyses were made statistically based on the spectral differences between the HF and RF samples.

### Cluster Analysis and Principal Components Analysis

The HCA (Figs. 3 and 4) revealed the intragroup similarity within the studied sample groups and generated clusters in each group at the spectral regions of  $1700\text{--}1500$  and  $1200\text{--}800\text{ cm}^{-1}$  regions. The successful differentiation in which all samples are clustered in their own group was obtained in the  $1200\text{--}800\text{ cm}^{-1}$  spectral region (Fig. 3). A cluster with only one sample in the wrong group was observed in the region ( $1700\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ ) which contains mainly the protein functional groups (Fig. 4). The sample observed in the wrong group is a fully hydrolyzed hypoallergenic formula containing rice protein.

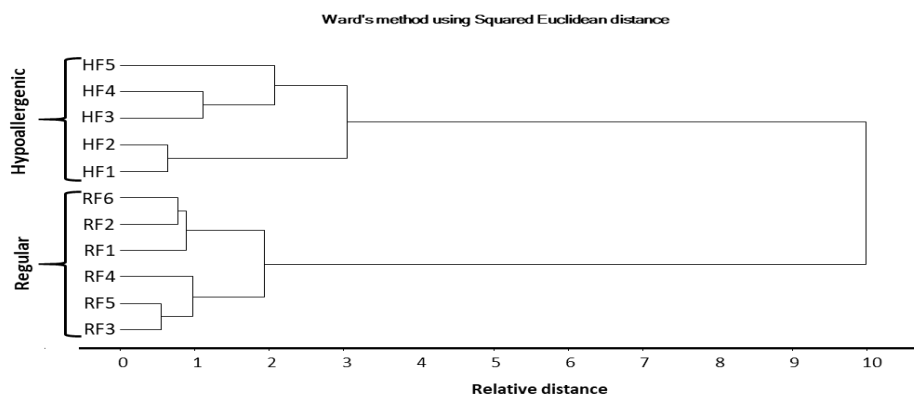


Figure 3. Hierarchical clustering of the studied samples in the  $1200\text{--}800\text{ cm}^{-1}$  spectral region.

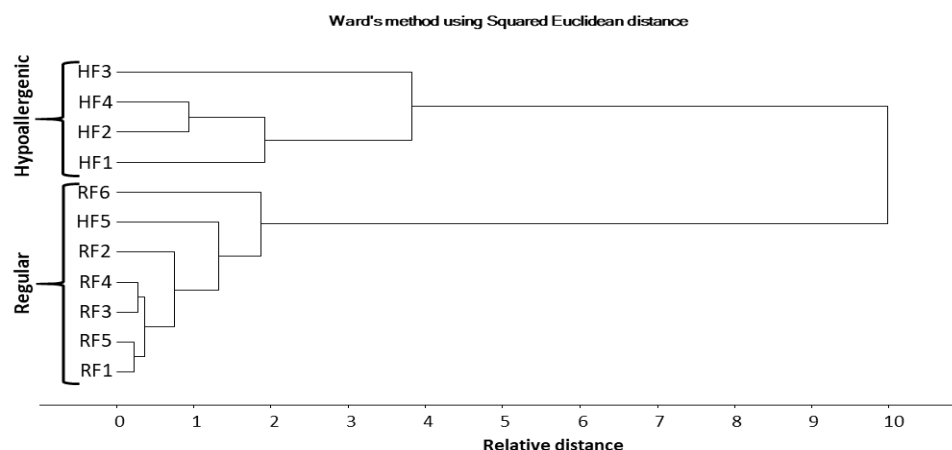


Figure 4. Hierarchical clustering of the studied samples in the 1700–1500  $\text{cm}^{-1}$  spectral region.

Higher heterogeneity between the clusters demonstrates higher dissimilarity among analyzed groups. As seen from Figs. 3 and 4, the heterogeneity was about 10 in the differentiation of HF from RF that indicates higher heterogeneity between hypoallergenic and regular formulas.

In order to measure the efficiency of the discrimination, accuracy, specificity and sensitivity based on the obtained clusters were calculated as follows:

$$\text{Accuracy} = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN}$$

$$\text{Sensitivity} = \frac{TP}{TP + FN}$$

$$\text{Specificity} = \frac{TN}{TN + FP}$$

where;

-FP (false positive): number of RF samples classified as HF,

-FN (false negative): number of HF samples classified as RF,

-TP (true positive): number of HF samples classified as HF,

-TN (true negative): number of RF samples classified as RF.

The calculated accuracy, sensitivity and specificity values were all 100% for 1200–800  $\text{cm}^{-1}$  spectral region, whereas 91, 80, 100% respectively for 1700–1500  $\text{cm}^{-1}$  spectral region. The most excellent differentiation was achieved in the 1200–800  $\text{cm}^{-1}$  region.

PCA was applied to FTIR spectra of both groups, producing a prominent discrimination (score plot) of the different regular (RF) and hypoallergenic infant formula (HF) samples. PCA score plots and the corresponding loading plots for these spectral ranges are presented in Figs. 5 and 6. The PCA scores plots shown in Fig. 5 demonstrated that the clusters of RF and HF samples were clearly separated from each other in the 1200–800  $\text{cm}^{-1}$  spectral region. The main variation among the groups is along the first principal component (PC-1), which describes 83% of the variation (Fig. 5). The observed positive and negative peaks in the loading plots given on the bottom panel of figures indicate peaks which strongly affect the principal components and contribute to the discrimination of the groups under study. In Fig. 5, loadings plot shows the peaks at 1148, 995, 926 and 846  $\text{cm}^{-1}$  can be assigned to C-O/ C-C stretching, C-O-C / C-C / C-O stretching, C-O/ C-C stretching of ring and C-O/ C-C stretching of carbohydrate, respectively (Wiercigroch et al., 2017). These are positively correlated with PC-1. Moreover, the absolute value of the peak at 1067  $\text{cm}^{-1}$  is negative, indicating that PC-1 is negatively correlated to this variable. Even very small spectral differences of the carbohydrate functional groups contribute to the separation in this spectral region in PCA and HCA analyzes (Figs. 3 and 5).

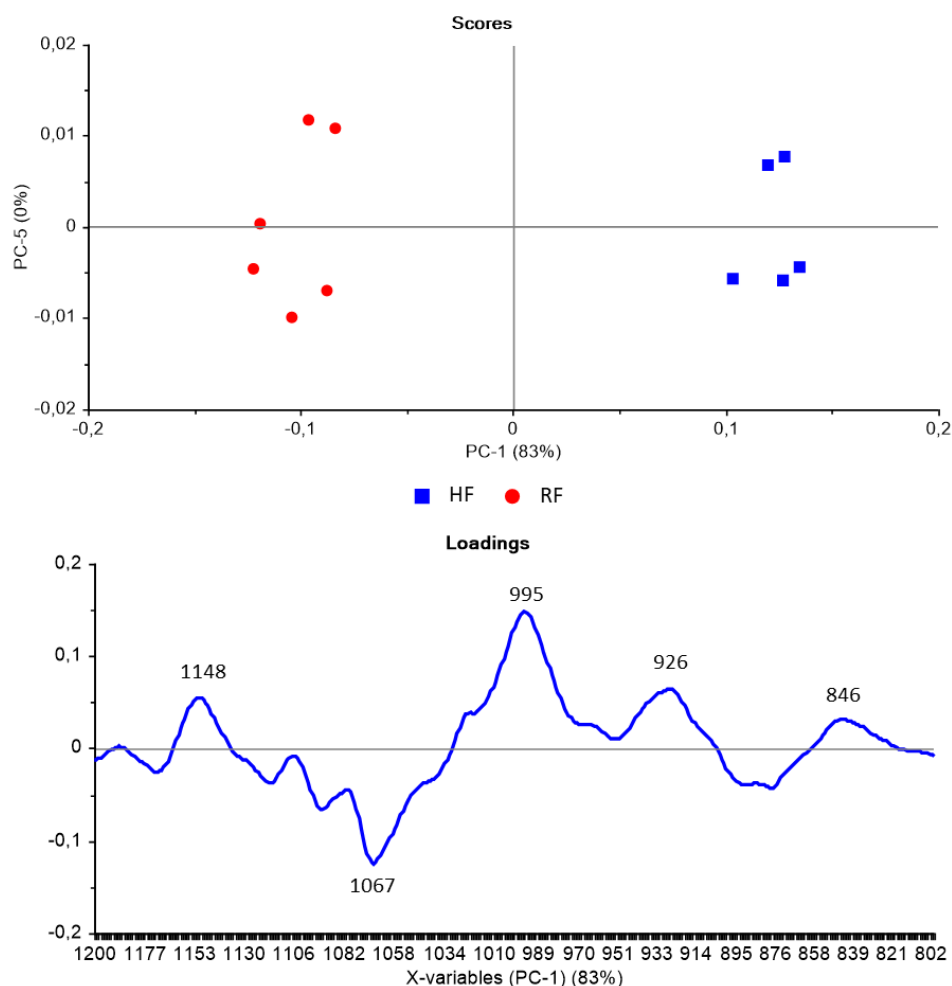


Figure 5. PCA scores and loadings plots for all of the samples over 1200–800  $\text{cm}^{-1}$

The successful differentiation was also obtained in the 1700-1500  $\text{cm}^{-1}$  spectral region with only one sample in the wrong group (Fig. 6). The main variation among the groups is along PC-1, which describes 87% of the variation. The observed positive and negative peaks in the loading plots given on the bottom panel of figure indicate peaks which strongly affect the principal components and contribute to the discrimination of the groups under study.

In Fig. 6, loadings plot shows the peaks at 1608, 1583 and 1510  $\text{cm}^{-1}$  which are positively correlated with PC-1 and at 1657  $\text{cm}^{-1}$  which PC-1 is negatively correlated with that peak. These changes are thought due to the formation of primary amines from new N-terminals and

formation of carboxylic acid from the C-terminals because of the peptide bond hydrolysis.

Although we could not show the contextual changes in the major protein bands amide I and II (not observed in HF samples), very clear clustering (high heterogeneity and 91% accuracy or high variation in PCA) was observed in the 1700-1500  $\text{cm}^{-1}$  region from PCA and HCA results based on spectral changes in RF and HF. This is an indication that the changes related to the hydrolysis process of milk proteins in hypoallergenic formulas are directly reflected to their IR spectrum.

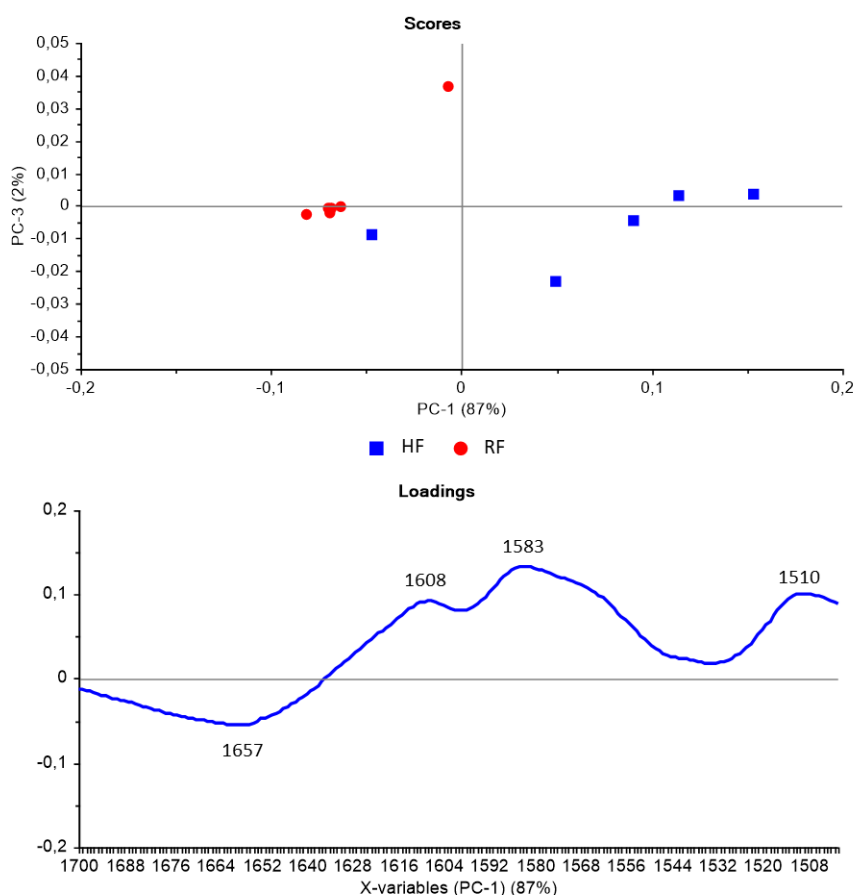


Figure 6. PCA scores and loadings plots for all of the samples over 1700–1500  $\text{cm}^{-1}$

## CONCLUSION

IR spectroscopy was used to monitor the absorbance changes of infant formula powders. The results of the present study indicate that there are many reasonable variations between the spectral parameters of regular and hypoallergenic infant formula samples which come from the difference in ingredients and enzymatic hydrolysis of milk proteins.

A relatively high fat amount compared to protein was found in the infant formula powder. Higher saturated fatty acid content and qualitatively longer acyl chained fatty acids were observed in hypoallergenic formulas. ATR-FTIR spectroscopy combined with multivariate analysis allows the receiving of useful information by single rapid measurement for the classification of infant powder samples. Successful differentiation of regular and hypoallergenic formulas with 83%

variation and 100% accuracy was obtained by HCA and PCA based on spectral differences.

This study reveals the potential power of FTIR spectroscopy for highly sensitive prediction of differences in molecular content of infant foods. FTIR spectroscopy can effectively distinguish protein hydrolysates and different enzymatic processes.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest. The authors are only responsible for the content and writing of this paper.

## AUTHORS CONTRIBUTIONS

DY. design and performed the experiments. DY, SHB. Analyses and interpretation, DY, SHB. contributed to the writing of the paper. All authors read and approved the manuscript.



## ETHICS COMMITTEE APPROVAL

The authors declare that the ethics committee approval is not required for this study.

## REFERENCES

- Akgun, O. M., Haman Bayari, S., Ide, S., Guven Polat, G., Yildirim, C., Orujalipoor, I. (2021). Evaluation of the protective effect on enamel demineralization of CPP-ACP paste and ROCS by vibrational spectroscopy and SAXS: An in vitro study. *Microscopy research and technique*, 84(12), 2977–2987. doi: 10.1002/jemt.23857
- American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition. (2000). Hypoallergenic infant formulas. *Pediatrics*, 106 (2), 346–349, doi: 10.1542/peds.106.2.346
- Balan, B., Dhaulaniya, A.S., Jamwal, R.A., Sodhi, K.K. Kelly, S., Cannavan, A., Singh, D.K. (2020). Application of Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) spectroscopy coupled with chemometrics for detection and quantification of formalin in cow milk, *Vibrational Spectroscopy*, 107, 103033, doi: 10.1016/j.vibspec.2020.103033.
- Baltacioglu, H. (2022). Thermosonication of peach juice: investigation of PPO and POD activities, physicochemical and bioactive compounds changes, and development of FT-IR based chemometric models for the evaluation of quality. *International Journal of Food Science and Technology*, 57, 1688–1697, doi: 10.1111/ijfs.15536.
- Bayari, S. H., Özdemir, K., Sen, E. H., Araujo-Andrade, C., Erdal, Y. S. (2020). Application of ATR-FTIR spectroscopy and chemometrics for the discrimination of human bone remains from different archaeological sites in Turkey. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 237, 118311. doi: 10.1016/j.saa.2020.118311
- Blanchard, E., Zhu, P., Schuck, P. (2013). Infant formula food powders. In: *Handbook of food powders*, Bhandari, B., Bansal, N., Zhang, M. & Schuck, P. (Eds.), 1st ed., United Kingdom.
- Botelho, B. G., Reis, N., Oliveira, L. S., Sena, M. M. (2015). Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. *Food chemistry*, 181, 31–37. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.02.077
- Byrne, M.E., O'Mahony, J.A., O'Callaghan, T.F. (2021). Compositional and Functional Considerations for Bovine-, Caprine- and Plant-Based Infant Formulas. *Dairy*, 2, 695–715. doi: 10.3390/dairy2040054.
- Green Corkins, K., Shurley, T. (2016). What's in the Bottle? A Review of Infant Formulas. *Nutrition in clinical practice: official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*, 31(6), 723–729. doi: 10.1177/0884533616669362
- Daoud, S., Bou-Maroun, E., Waschatko, G., Horemans, B., Mestdagh, R., Billecke, N., Cayot, P. (2020). Detection of Lipid Oxidation in Infant Formulas: Application of Infrared Spectroscopy to Complex Food Systems. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(10), 1432. doi: 10.3390/foods9101432
- Delplanque, B., Gibson, R., Koletzko, B., Lapillonne, A., Strandvik, B. (2015). Lipid Quality in Infant Nutrition: Current Knowledge and Future Opportunities. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 61(1), 8–17. doi: 10.1097/MPG.0000000000000818
- Dias, J.A., Santos, E., Asseiceira, I., Jacob, S., Koninckx, C.R. (2022). The Role of Infant Formulas in the Primary Prevention of Allergies in Non-Breastfed Infants at Risk of Developing Allergies-Recommendations from a Multidisciplinary Group of Experts. *Nutrients*, 14, 4016. doi: 10.3390/nu14194016
- Djordjevic, J., Ledina, T., Baltic, M.Z., Trbovic, D., Babic, M. and Bulajic, S. (2019). Fatty acid profile of milk, *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 333, 012057, doi: 10.1088/1755-1315/333/1/012057.
- Esbensen, K.H. (2010). *Multivariate Data Analysis- In Practice, An Introduction to Multivariate Data Analysis and Experimental Design*, Guyot, D., Westad F. and Houmoller, L.P. (Eds.), CAMO Software, 5th Edition.
- Food and Agriculture Organization – FAO. Codex Alimentarius Commission – CAC. (1981).

- Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Standard for infant formula and formulas for special medical purposes intended for infants. Adopted as a worldwide standard in 1981. Amendment: 1983, 1985, 1987, 2011 and 2015.
- García-Miguel, E., Meza-Márquez, O., Osorio-Revilla, G., Téllez-Medina, D.I., Jiménez-Martínez, C., Cornejo-Mazón, M., Hernández-Martínez, M., Gallardo-Velazquez, T. (2018). Detection of Cyanuric Acid and Melamine in Infant Formula Powders by Mid-FTIR Spectroscopy and Multivariate Analysis. *Journal of Food Quality*. 2018. 1-7. doi: 10.1155/2018/7926768.
- Gok, S., Severcan, M., Goormaghtigh, E., Kandemir, I., Severcan, F. (2015). Differentiation of Anatolian honey samples from different botanical origins by ATR-FTIR spectroscopy using multivariate analysis, *Food Chemistry*, 170, 234-240, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.08.040.
- Granato, D., Santos, J.S., Escher, G.B., Ferreira, B.L., Maggio, R.M. (2018). Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective, *Trends in Food Science & Technology*, 72, 83-90, doi: 10.1016/j.tifs.2017.12.006
- Grelet, C., Fernández Pierna, J. A., Dardenne, P., Baeten, V., Dehareng, F. (2015). Standardization of milk mid-infrared spectra from a European dairy network. *Journal of dairy science*, 98(4), 2150–2160. doi: 10.3168/jds.2014-8764
- Guillén, M.D., Cabo, N. (1997), Infrared spectroscopy in the study of edible oils and fats. *J. Sci. Food Agric.*, 75: 1-11. doi: 10.1002/(SICI)1097-0010(199709)75:1<1::AID-JSFA842>3.0.CO;2-R
- Heine R.G., Elsayed S., Hosking C.S., Hill D.J. (2002). Cow's milk allergy in infancy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2, 217–225. doi: 10.1097/00130832-200206000-00011.
- Huang, Y., Min, S., Duan, J., Wu, L., Li, Q. (2014). Identification of additive components in powdered milk by NIR imaging methods, *Food Chemistry*, 145, 278–283, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.06.116.
- Jawaid, S., Talpur, F. N., Afridi, H. I., Nizamani, S. M., Khaskheli, A. A., Naz, S. (2014). Quick determination of melamine in infant powder and liquid milk by Fourier transform infrared spectroscopy, *Analytical Methods*, 6(14), 5269–5273, doi: 10.1039/C4AY00558A.
- Joeckel, R. J., Phillips, S. K. (2009). Overview of infant and pediatric formulas. *Nutrition in clinical practice: official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*, 24(3), 356–362. doi: 10.1177/0884533609335309.
- Kaylegian, K. E., Lynch, J. M., Fleming, J. R., Barbano, D. M. (2009). Influence of fatty acid chain length and unsaturation on mid-infrared milk analysis. *Journal of dairy science*, 92(6), 2485–2501. doi: 10.3168/jds.2008-1910
- Linker, R. (2011). Application of FTIR Spectroscopy to Agricultural Soils Analysis. In: *Fourier Transforms - New Analytical Approaches and FTIR Strategies*, Nikolic, G. (Ed.), IntechOpen, doi: 10.5772/15732.
- Lu, C., Xiang, B., Hao, G., Xu, J., Wang, Z., Chen, C. (2009). Rapid detection of melamine in milk powder by near infrared spectroscopy, *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 17(2), 59–67, doi: 10.1255/jnirs.829.
- Martin, C. R., Ling, P. R., Blackburn, G. L. (2016). Review of Infant Feeding: Key Features of Breast Milk and Infant Formula. *Nutrients*, 8(5), 279. doi: 10.3390/nu8050279.
- Andres Martinez, J., Ballew, M.P. (2011). Infant Formulas, *Pediatr Rev* 32(5), 179–189. doi: 10.1542/pir.32-5-179.
- Mauer, L.J., Chernyshova, A.A., Hiatt, A., Deering, A., Davis, R. (2009). Melamine detection in infant formula powder using near- and mid-infrared spectroscopy, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(10), 3974–3980, doi: 10.1021/jf900587m.
- Mazzocchi, A., D'Oria, V., De Cosmi, V., Bettocchi, S., Milani, G. P., Silano, M., Agostoni, C. (2018). The Role of Lipids in Human Milk and Infant Formulae. *Nutrients*, 10(5), 567. doi: 10.3390/nu10050567.
- Mendonça, M. A., Araújo, W. M. C., Borgo, L. A., Alencar, E. R. (2017). Lipid profile of different

- infant formulas for infants. *PloS One*, 12(6), e0177812. doi: 10.1371/journal.pone.0177812
- Nieuwoudt H.H., Prior, B.A., Pretorius, I.S., Manley, M., Bauer, F.F. (2004). Principal component analysis applied to Fourier transform infrared spectroscopy for the design of calibration sets for glycerol prediction models in wine and for the detection and classification of outlier samples *J. Agric. Food Chem.* 52(12), 3726-3735. doi: 10.1021/jf035431q.
- Nocerino, R., di Scala, C., Coppola, S., Giglio, V., Carucci, L., Cosenza, L., Voto, L., Iannicelli, A.M., Luzzetti, A., Berni Canani, R. (2021). Tolerability of a new amino acid-based formula for children with IgE-mediated cow's milk allergy. *Italian Journal of Pediatrics*, 47(1):151. doi: 10.1186/s13052-021-01096-3.
- Osborn, D. A., Sinn, J. K., Jones, L. J. (2017). Infant formulas containing hydrolysed protein for prevention of allergic disease and food allergy. *The Cochrane database of systematic reviews*, 3(3), CD003664. doi: 10.1002/14651858.CD003664.pub4.
- Panahipour, L., Abooneghab Tabatabaei, A., Gruber, R. (2020). Hypoallergenic infant formula lacks transforming growth factor beta activity and has a lower anti-inflammatory activity than regular infant formula, *Journal of Dairy Science*, 103(8), 6771-6781, doi: 10.3168/jds.2019-18067.
- Poulsen, N.A., Eskildsen, C.E., Akkerman, M., Johansen, L.B., Hansen, M.S., Hansen, P.W., Skov, T., Larsen, L.B. (2016). Predicting hydrolysis of whey protein by mid-infrared spectroscopy, *International Dairy Journal*, 61, 44-50, doi: 10.1016/j.idairyj.2016.04.002.
- Rovere, G., de Los Campos, G., Lock, A. L., Worden, L., Vazquez, A. I., Lee, K., Tempelman, R. J. (2021). Prediction of fatty acid composition using milk spectral data and its associations with various mid-infrared spectral regions in Michigan Holsteins. *Journal of dairy science*, 104(10), 11242–11258. doi: 10.3168/jds.2021-20267
- Santos, P. M., Pereira-Filho, E. R., Rodriguez-Saona, L. E. (2013). Rapid detection and quantification of milk adulteration using infrared microspectroscopy and chemometrics analysis. *Food chemistry*, 138(1), 19–24. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.10.024
- Saxton, R.; McDougal, O.M., *Whey Protein Powder Analysis by Mid-Infrared Spectroscopy*. *Foods*, 2021, 10, 1033. <https://doi.org/10.3390/foods10051033>.
- Sjaunja, L.O. (1984). Studies on Milk Analysis of Individual Cow Milk Samples, *Acta Agriculturae Scandinavica*, 34:3, 249-259, doi: 10.1080/00015128409435394
- Wang, J., Soojin, J., Qing, L. (2009). Rapid Analysis of Melamine Content in Powdered and Liquid Milk Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Food Science and Biotechnology*. 18. 1199-1203.
- Ward, J. H. (1963). Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of American Statistical Association*, 58, 236.
- Wiercigroch, E., Szafraniec, E., Czamara, K., Pacia, M. Z., Majzner, K., Kochan, K., Kaczor, A., Baranska, M., Malek, K. (2017). Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 185, 317–335. doi: 10.1016/j.saa.2017.05.045
- Wold, S., Esbensen, K., Geladi, P. (1987). Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2 (1-3), 37–52, doi: 10.1016/0169-7439(87)80084-9.
- Ye, M. P., Zhou, R., Shi, Y. R., Chen, H. C., Du, Y. (2017). Effects of heating on the secondary structure of proteins in milk powders using mid-infrared spectroscopy. *Journal of dairy science*, 100(1), 89–95. doi: 10.3168/jds.2016-11443
- Yonar, D., Severcan, M., Gurbanov, R., Sandal, A., Yilmaz, U., Emri, S., Severcan, F. (2022). Rapid diagnosis of malignant pleural mesothelioma and its discrimination from lung cancer and benign exudative effusions using blood serum. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1868(10), 166473. doi: 10.1016/j.bbdis.2022.166473.

## **SOME PHYSICOCHEMICAL AND SENSORY PROPERTIES OF HAZELNUT BEVERAGES ENRICHED WITH VIT-C SOURCE FRUITS AND SHELF LIFE**

**Sakine Kübra Çelik<sup>1</sup>, Emre Turan<sup>2</sup>, Atilla Şimşek<sup>2\*</sup>**

<sup>1</sup> Ministry of Agriculture and Forestry, Ordu Directorate of Provincial Agriculture and Forestry, Ordu, Türkiye

<sup>2</sup> Department of Food Engineering, Faculty of Agriculture, Ordu University, Ordu, Türkiye

Received / Geliş: 30.11.2022; Accepted / Kabul: 18.01.2023; Published online / Online baskı: 01.02.2022

Çelik, S.K., Turan, E., Şimşek, A. (2023). Some physicochemical and sensory properties of hazelnut beverages enriched with VIT-C source fruits and shelf life. GIDA (2023) 48 (1) 185-198 doi: 10.15237/gida.GD22122

Çelik, S.K., Turan, E., Şimşek, A. (2023). VIT-C kaynaklı meyvelerle zenginleştirilmiş fındık içeceklerinin bazı fizikokimyasal ve duyuşal özellikleri ve raf ömrü. GIDA (2023) 48 (1) 185-198 doi: 10.15237/gida.GD22122

### **ABSTRACT**

In this research, drinkable hazelnut milk (HM) processed from the Tombul variety was supplemented with a ratio of 20, 40, and 60% rosehip (*Rosa canina* L.) (R) and strawberry (*Fragaria* sp.) (S) pulps as Vit-C sources and stored to determine physicochemical changes for 6 weeks at 4 and 25 °C. The influence of temperature (T), time (t), and contribution ratio (CR) factors on R and S-HM beverages was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The evident changes in beverages were in total phenolics (TP) and antioxidant activity at the end of 6 weeks' storage. R1, R2, S2, and S3 formulations were the most liked for general acceptability scores, also, selected R and S purees were compatible with hazelnut milk. The optimum shelf life of R-HM and S-HM mixtures was calculated between 6-8 weeks at 15 °C using TP and Vit-C regression equations ( $R^2 = 95.07-99.45\%$ ).

**Keywords:** Hazelnut milk, plant-milk beverages, physicochemical properties, functional food, modelling, stability

### **VIT-C KAYNAKLI MEYVELERLE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ FINDIK İÇECEKLERİNİN BAZI FİZİKOKİMYASAL VE DUYUSAL ÖZELLİKLERİ VE RAF ÖMRÜ**

#### **ÖZ**

Bu araştırmada, Tombul çeşidinden işlenen içilebilir fındık sütüne (HM) %20, 40 ve %60 oranında kuşburnu (*Rosa canina* L.) (R) ve çilek (*Fragaria* sp.) (S) pulpları ilave edilmiş, Vit-C kaynağı olarak ve fizikokimyasal değişiklikleri belirlemek için 4 ve 25 °C'de 6 hafta süreyle depolanmıştır. Sıcaklık (T), süre (t) ve katkı oranı (CR) faktörlerinin R ve S-HM içecekleri üzerindeki etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $P < 0.05$ ). İçeceklerdeki belirgin değişiklikler, 6 haftalık depolamanın sonunda toplam fenolikler (TP) ve antioksidan aktivitede olmuştur. Genel kabul edilebilirlik puanlarına göre en çok R1, R2, S2 ve S3 formülasyonları beğenilmiş, ayrıca seçilen R ve S pürelerinin fındık sütü ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. TP ve Vit-C'ye ait regresyon denklemleri kullanılarak R-HM ve S-HM karışımlarının optimum raf ömrü, 15 °C'de 6-8 hafta arasında hesaplanmıştır ( $R^2 = \%95.07-99.45$ ).

**Anahtar kelimeler:** Fındık sütü, bitkisel sütü içecekler, fizikokimyasal özellikler, fonksiyonel gıda, modelleme, stabilite

\*Corresponding author/ Yazışmalardan sorumlu yazar:

✉: atillasimsek62@yahoo.com

☎: (+90) 452 226 5200

☎: (+90) 452 226 5220

Sakine Kübra Çelik; ORCID no: 0000-0002-1554-185X

Emre Turan; ORCID no: 0000-0002-4289-0107

Atilla Şimşek; ORCID no: 0000-0003-2092-1803

## INTRODUCTION

Hazelnuts, a good energy source (640 kcal /100 g), contain 10-24% protein with 68-72% digestibility and about 62% oil. Also, 25 grams of hazelnuts supply 24% and 25% of the daily vitamin E and B6 needed. On the other hand, hazelnut is a rich food with complex carbohydrates called dietary fibre and phytochemicals such as phenolics and phytosterols (Köksal et al., 2006; Yorulmaz et al., 2009). Hazelnut is one of the most including Fe (3.4-5.8 mg/100 g) and Ca (209 mg/100 g) in vegetable-origin nutrients. These minerals should be consumed with vitamin C source foods (rosehip, citrus juices, kiwi, etc.) for absorption into the body (Şimşek and Aykut, 2007).

Plant-based milky products (legumes, cereals, nuts, seeds, and so-called cereal milk) are homogenized after cooking with water, supplemented with vitamins, minerals, and sweeteners, and packaged and sterilized in the same way as fresh milk (Sethi et al., 2016). On the other hand, researchers emphasize that plant-milk products are alternative food for lactose intolerant, those sensitive to cow's milk, and allergic to milk proteins. In particular, the demand for these products increases day after day because of their high digestibility, the absence of cholesterol, non-allergic proteins, unsaturated fatty acids, low in calories, Vit E, mineral substances, rich in carbohydrates and dietary fibre (Kundu et al., 2018). One of the problems faced by poor people in developing countries is not getting enough protein. To address this problem, promoting policies use of low-cost and high-quality proteins should be advanced (Albuquerque et al., 2015). Plant-based milk products may be a solution for a poor economic group of undeveloped countries, where animal milk supply is insufficient (Sethi et al., 2016).

There are studies in the literature about plant-based milk by different researchers. For example, some physicochemical parameters belonging to peanut, soybean, and coconut milk (Belewu and Belewu, 2007), almond milk (Hasan, 2012), Bambara peanut milk (Murevanhema and Jideani, 2015), irradiated tiger nut milk (Okyere and

Odamtten, 2014), peanut yoghurt (Isanga and Zhang, 2009), and stability of peanut milk-mango mixture (Zhang et al., 2011) had studied by different researchers. Also, Albuquerque et al. (2015) reported changes in the physical-chemical properties of peanut milk enriched with umbu and guava pulp stored for 150 days at 18 °C.

Besides, the effect of high-pressure homogenization and heat treatment on the physicochemical properties and physical stability of almond nut (Bernat et al., 2014), coconut (Tangsuphoom and Coupland, 2005), and soy milk (Cruz et al., 2007) was investigated. In another study, the optimal conditions for homogenization and sterilization in hazelnut milk, and the effects of stabilizers on the stability of hazelnut milk were defined by Lı et al. [2009]. In recent years, the optimum fermentation conditions of hazelnut milk-kefir mix (Liu and Zhou, 2012), the shelf-life (Bernat et al., 2015), and the antioxidant activity (Maleki et al., 2015) of fermented hazelnut milk with lactic acid bacteria were investigated under different storage conditions. Furthermore, Ermis et al. (2018) identified that spray-drying and freeze-drying techniques had a similar effect in obtaining high-quality hazelnut milk powder. Although many researchers have worked on hazelnut milk, there is almost no information about the milk prepared from nut and fruit extract mixtures.

This work aimed to study the main characteristics of hazelnut milk enriched by rosehip and strawberry puree (rich in Vit-C) and revealed by mathematical equations the shelf-life of enriched hazelnut milk at 4 and 25 °C for 6 weeks.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Tombul hazelnut cultivar and strawberry fruit (Albion (*Fragaria* sp.) in the 2017 harvest period were collected in the Ordu province. Strawberry fruits were converted to puree by pulper (Moulinex Masterchef 750 duotronic). Rosehip fruit (*Rosa canina* L.) purees as a commercial sample were obtained from Turkish producers (Öncüler Food-Nesil Food Industry and Trade

Ltd. Co., Merzifon) in a 2.5 kg plastic aseptically filled package that does not contain any additives.

### Preparation of hazelnut beverage formulations

Hazelnut milk (HM) was converted from hazelnuts with a combination of production techniques: soybean, almond, peanut milk, etc. (Wallace and Khaleque, 1971; Rubico et al., 1987; Maghsoudlou et al., 2016). Hazelnuts between 11–13 mm were roasted at 155 °C for 45 minutes, cooled, and removed from their pellicle. After adding tap water (water: hazelnut, 2:1), the mixture was cooked at 100 °C for 20 minutes and passed through a grinder, and then made up to 5lt water. The rosehip, strawberry pups and sugar based on the weight of hazelnut milk were added respectively as 20% (R1, S1), 40% (R2, S2), 60% (R3, S3) and 6%. Then, the mixtures were transformed into drinkable hazelnut beverages with a homogenizer within 5 minutes with a gradual increase rate from 6500 rpm to 24000 rpm, placed in glass jars (200 ml), pasteurized at 85 °C for 15 minutes and stored for 6 weeks at 4 and 25 °C after cooling.

### Methods

#### Physicochemical analysis

The dry matter (DM) was determined with kept at 70 °C (Ecocell, Germany) for 4 hours and calculated as % with weight difference. Water-soluble dry matter (SDM) was measured by a refractometer (HANNA) at 20 °C. The pH values of the samples were detected by a pH meter (Mettler Toledo seven compact S210). Total acidity (TA) in R-HM and S-HM were specified using 0.1N NaOH and expressed as malic and citric acid in terms of g/100g, respectively (Cemeroglu, 2010). The absorbance of the red colour of hydroxymethylfurfural (HMF) with p-toluidine and barbutyric acid was determined by a spectrophotometer (Shimadzu UV mini-1240) at 550 nm wavelength (Cemeroglu, 2010). Vit-C was identified by spectrophotometric measurement of the colour of the ascorbic acid reaction with the 2,6-dichloro-phenol indophenol solution (Cemeroglu, 2010). The total monomeric anthocyanins (AC) concentration was calculated by the pH differential method using a spectrophotometer such as mg cyanidin-3-

glycoside/L (Cemeroglu, 2010). The antioxidant activity (AA) of the samples was determined by the DPPH-RSA (DPPH-radical scavenging activity) method based on measuring the strength of a purple-coloured compound, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazase (DPPH) radical. The results were expressed as mol TE/g by using the Trolox standard curve (Cemeroglu, 2010). Total phenolics (TP) were assigned by spectrophotometric measurement of the colour of phenolic compounds with the Folin-Ciocalteu solution in the alkaline medium as gallic acid equivalent (mg GAE/100 g sample) (Singleton and Rossi, 1965). The viscosity (V) was measured in cP (centipoise) using a viscometer in a 35 ml sample cup at 20 °C (And SV-10 SineWave Vibro Digital Viscometer). Hunter L\*, a\*, and b\* values of products were measured by a color meter (Konica Minolta Cr-410). Stability (serum separation rate, SSR) was calculated by the % ratio of the volume of serum separated during storage periods (0, 2, 4, and 6 weeks) to the total volume (Bernat et al., 2015). The sugar profile of the samples was determined by HPLC (Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000) after filtration and precipitation with Carrez 1 (K<sub>4</sub>Fe (CN)<sub>6</sub>·3H<sub>2</sub>O) and Carrez 2 (ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) solutions.

#### HPLC Conditions

Column: Thermo Scientific Gold Amino 4.6x250mm (5μ)  
 Mobile Phase: %80:20 v/v, ACN (acetonitrile): H<sub>2</sub>O (water)  
 Flow Rate: 1.3 ml /min  
 Temperature: 30 °C  
 Injection Volume: 20 μl  
 Detector: ERC Refractomax 521RID Detector  
 Pump System: Thermo Scientific SR 3000  
 Degasser: MPMINIPURE SUPER UP M  
 Column oven: Thermo Scientific TCC-3000  
 Program: Chromeleon

#### Sensory analysis

Pasteurized and cooled R and S-HM formulations were matured for 24 hours to balance the color, aroma, texture (mouth feeling), structure-consistency (test with a spoon), and flavor. Sensory parameters were scored by 10 panellists trained in Food Engineering using a hedonic scale (Worst rating: 1, Best rating: 5).

**Statistical analysis and modelling**

Experimental design was established in 96 samples with 2 fruit purees x 3 contribution ratio (CR) x 2 storage temperature (*T*) x 4 storage time (*t*) x 2 repetitions. MINITAB 18 program was used for the statistical analysis (ANOVA and Tukey's multi-comparison test) and modelling.

**RESULTS AND DISCUSSION****The physicochemical properties of hazelnut beverage formulations**

Table 1 shows some physicochemical properties of drinkable hazelnut beverages enriched with R and S puree at different concentrations.

Table 1 Some physicochemical properties of hazelnut milk enriched with R and S purees (n= 2)<sup>α</sup>

Properties	Formulations					
	R1	R2	R3	S1	S2	S3
DM (%)	22.08 ± 0.22	21.06 ± 0.58	19.94 ± 0.03	23.56 ± 1.08	22.42 ± 1.57	21.85 ± 2.46
SDM ( <sup>o</sup> Briks)	10.35 ± 0.07	11.70 ± 0.00	12.65 ± 0.07	9.95 ± 0.21	11.45 ± 0.21	12.05 ± 0.07
pH	5.02 ± 0.01	4.40 ± 0.02	4.12 ± 0.04	5.52 ± 0.12	4.67 ± 0.01	4.32 ± 0.01
TA (%)	0.141 ± 0.006	0.263 ± 0.011	0.400 ± 0.012	0.199 ± 0.040	0.308 ± 0.028	0.520 ± 0.002
<u>Sugar Composition (g/100g)</u>						
Glucose	0.356±0.021	0.803±0.018	0.93±0.041	0.833±0.047	1.739±0.033	2.024±0.084
Fructose	0.448±0.028	0.944±0.003	1.076±0.020	0.915±0.024	1.129±0.023	1.914±0.006
Sucrose	6.574±0.004	6.140±0.036	6.276±0.027	6.158±0.021	6.156±0.004	6.334±0.001
Total sugar	7.378±0.053	7.887±0.050	8.283±0.089	7.906±0.091	9.024±0.059	10.271±0.092
HMF (mg/kg)	2.06 ± 0.29	1.87 ± 0.02	2.08 ± 0.28	4.10 ± 0.01	4.86 ± 0.87	4.83 ± 0.66
Vit-C (mg/100g)	17.66 ± 0.46	21.80 ± 0.51	24.96 ± 1.31	11.31 ± 0.34	17.19 ± 0.41	17.37 ± 0.47
AC (mg/L)	-	-	-	7.16 ± 0.60	11.43 ± 0.34	16.75 ± 1.06
TP (GAE mg/ 100g)	183.48 ± 4.81	364.42 ± 6.95	556.78 ± 21.36	38.99 ± 2.46	60.57 ± 1.93	66.15 ± 0.60
DPPH-RSA (%)	63.37 ± 0.49	67.24 ± 0.02	73.96 ± 1.18	62.89 ± 0.30	64.98 ± 1.39	65.16 ± 1.37
AA (µg TE/mg sample)	21.97 ± 0.18	23.41 ± 0.07	25.92 ± 0.44	28.25 ± 0.14	29.20 ± 0.63	29.29 ± 0.62
V (Cp)	11.10 ± 0.42	21.60 ± 0.28	34.20 ± 0.85	28.55 ± 0.64	87.45 ± 0.64	206.50 ± 3.54
<u>Hunter color values</u>						
L	51.78 ± 0.01	49.37 ± 0.82	43.17 ± 0.32	52.79 ± 0.92	51.21 ± 1.15	46.53 ± 0.15
a	6.74 ± 0.03	7.94 ± 1.26	11.11 ± 0.04	5.72 ± 0.03	7.46 ± 0.08	10.50 ± 0.12
b	12.98 ± 0.01	14.51 ± 0.57	14.11 ± 0.22	8.10 ± 0.01	8.19 ± 0.11	7.66 ± 0.11

<sup>α</sup> Mean+Standard deviation (SD)

It is clear from the table that the addition of all two purees caused a significant change in the physicochemical properties of the samples. An increase in puree concentration in the HM samples caused a decrease in the DM and pH of the final products. On the other hand, an increasing trend was observed for SDM, TA, glucose, fructose, sucrose, total sugar, Vit-C, TP, DPPH-RSA, AA, V, Hunter L\*, and a\* values of the samples. Hunter b\* and HMF values showed oscillation in similar limits. Moreover, as seen in Table 1, the amount of AC tends to increase according to the rise of S ratios (20, 40, and 60%).

**Sensory evaluation of hazelnut beverage formulations**

Sensory evaluation results are shown in Fig. 1. The R2 sample was the most admired by panellists

for color, flavor, and acceptability among R-added hazelnut beverages. The rosehip aroma has suppressed the hazelnut aroma in the R2 and R3 examples. For this reason, the R1 product aroma is thought to be more balanced and appreciated. As a result of the evaluation, the rate of fruit puree in the R-added products increased, the feeling (texture) in the mouth was not affected negatively, the flow rate from the spoon decreased, and the consistency increased. The highest score was given to the R3 sample by panellists. The additive rates in the R1 and R2 formulations were the most appropriate according to the general acceptability scores. S-added hazelnut beverages were more liked with their increasing fruit puree ratio. It was an expected result as the increased fruit ratio lowered the product pH and caused the anthocyanin pigment to give a more pronounced

red color under acidic conditions (Cemeroğlu, 2004). The S3 was more liked for color and aroma among S-added groups. However, S3 was found to be more viscous by the panellists and evaluated with the lowest for structure-consistency and texture (sensation in the mouth). Also, the S2 was assessed with the highest texture and structure consistency score by the thickening effect of pectin and sugar in the strawberry structure. Also, as the total sugar content of S was higher than R,

it increased the taste ratio, and therefore, the S2 flavor was the most liked. The general acceptability scores of the S-added groups show that the contribution rate in S2 and S3 formulations were most appropriate. Besides, the panellists stated that R and S puree selected as vitamin C sources are very compatible with hazelnut milk and that the product obtained is a cold drink that can be consumed with pleasure.

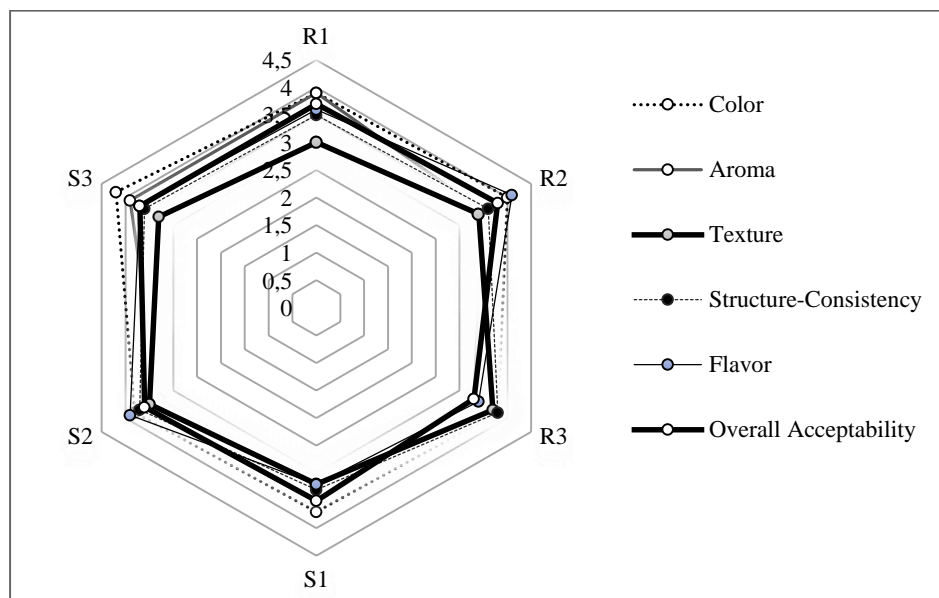


Figure 1. Sensory evaluations of hazelnut milk supplemented with fruit puree

#### Change of some physicochemical properties of hazelnut beverages during storage

In the second part of the study, some physicochemical properties of the HM-fruit puree mixtures stored at 4 and 25°C for 6 weeks were analyzed statistically and obtained mathematical equations that reflected the changes. As a result of ANOVA (Variance analysis), the effect of CR,  $T$  and  $t$  factors on the composition of R-HM and S-HM mixtures was found significant ( $P < 0.05$ ). Tukey multicomparison test results belonging to means of physicochemical parameters that were found significant are discussed below.

DM and SDM showed a slight increase in both puree-added hazelnut milk. The pH values decreased from 5.53 to 4.42 in R-HM and from 5.69 to 4.45 in S-HM as CR increased. On the

other hand,  $T$  and  $t$  factors and pH values increased until the end of the 4th week (4.51-4.95) in R-HM samples, then decreased. Differently, S-HM's pH values increased until the end of the 6th week (4.83-5.16). Also, the pH increases at 25°C in both types of hazelnut milk was higher than those stored at 4°C. Moreover, the change in titration acidity was consistent with pH (Fig. 2a).

Perhaps the reduction in acidity may have been efficient in the damage of Vit-C. The increase in titration acidity (reduction in pH) after 4 weeks may be due to free fatty acids and amino acids released by the breakdown of proteins and fats with organic acids (Albuquerque et al., 2015). On the other hand,  $CR \times t$  and  $T \times t$  interactions increased the HMF content of all R-HM and S-HM samples (Fig. 2b).



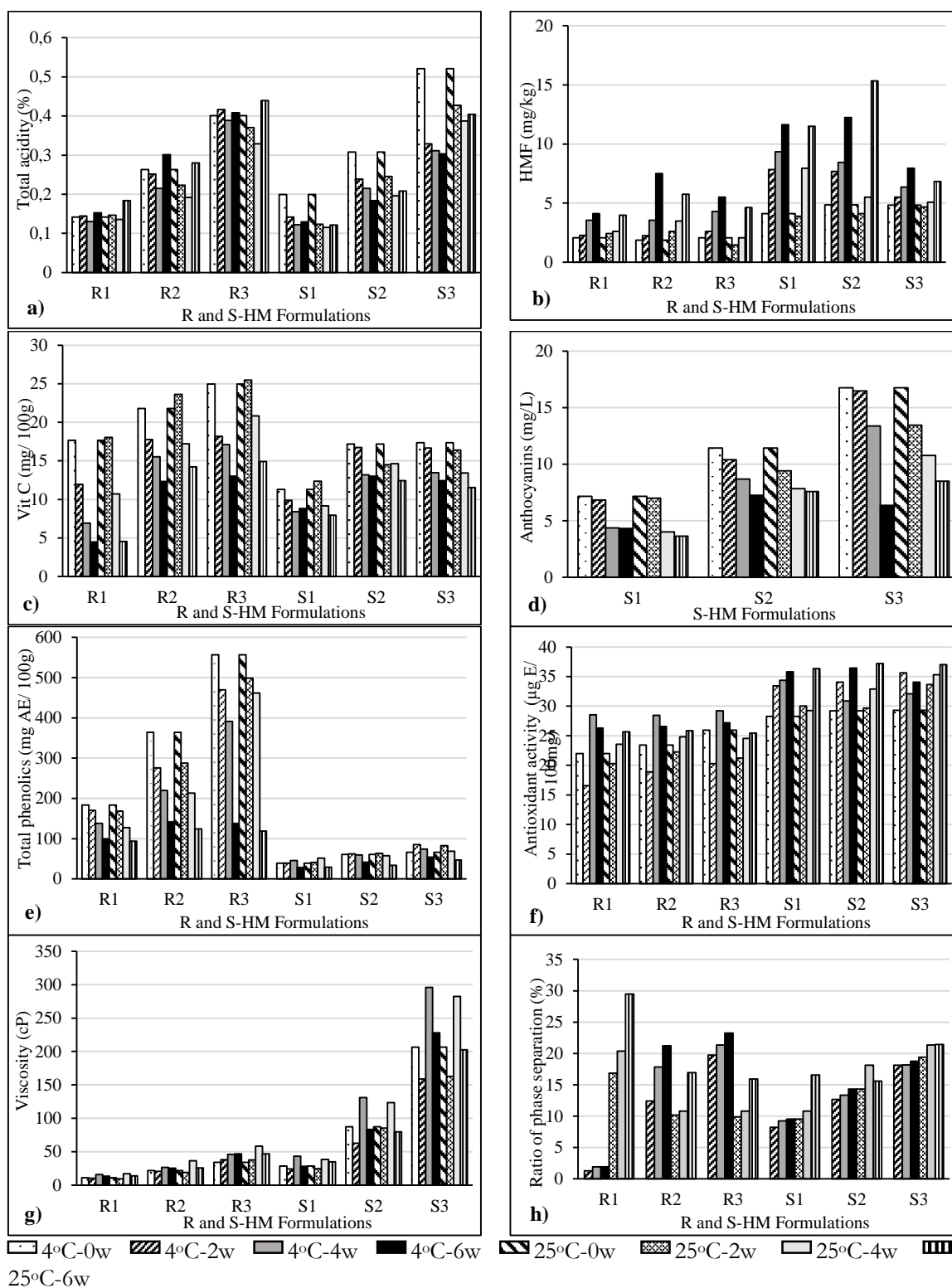


Figure 2. Changes in the physicochemical properties of R and S-HM mixtures during storage at 4 and 25 °C for 6 weeks (n=2).

HMF is also one of the decomposition products of ascorbic acid and combines with amino acids to form brown pigments (Cemeroğlu, 2004). As a matter of fact, in our study, ascorbic acid decreased in increasing storage processes and increased HMF. Moreover, according to the contribution ratio (R3 and S3), the acid environment and glucose amount increase the rate of formation of the reaction in the formation of levulinic acid and acetic acid with the decomposition of HMF (Chang et al., 2006). Indeed, the high total acidity in R3 and S3 confirms this approach.

Vit-C increased with increased CR, while it decreased with increased *t*. Vit-C losses in the last week of storage were 47-53% in R-HM and 25-32% in S-HM. There was no statistical difference between storage at 4 and 25 °C (Fig. 2c). A study on rosehip puree determined that storage at different temperatures and time causes a decrease in ascorbic acid due to increasing temperature and time (Kadikal et al., 2017). Another study reported that the amount of ascorbic acid in strawberries at 5, 10, and 25 °C, 15-day storage was decreased between 53.2-57.3% (Derossi et al., 2010). A similar study found that the ascorbic acid amount of pasteurized strawberry juice decreased by 63.7% after 3 months of storage at refrigerator temperature 4-15 °C (Ayub et al., 2010). Also, ascorbic acid degradation depends on many factors such as storage time and temperature, oxygen, light, pH, and mineral substances (Cemeroğlu, 2004).

In the S-HM beverages, anthocyanin (AC) was affected by CRxTx*t* at the end of 6 weeks' storage at 4 and 25 °C. As CR, *T*, and *t* increased, the amount of AC decreased (Fig. 2d). The decomposition of anthocyanins depends on many factors such as storage temperature and duration, pH, oxygen, heat, light, anthocyanin concentration and chemical structure, and the concentration of phenolic, enzyme, protein, and minerals (Patras et al., 2010). Similarly, Zavala et al. (2004) examined that the amount of anthocyanin in strawberries decreased at 0 and 5 °C during the first 5 days of storage. In another study, Oszmianski and Wojdylo (2009) reported

that the total anthocyanin content of 3 different strawberry purees was decreased after storage for 4 months at 4 and 20 °C.

The total phenolics (TP) belonging to R and S-HM increased with CR but decreased with *t* and no significant differences were found for storage at 4 and 25 °C. Also, the TP of the R groups was higher than the S groups (Fig. 2e). Similarly, Zavala et al. (2004) affirmed that the effect of different storage temperatures (0, 5, and 10 °C) on the TP composition of strawberries was significant. In a similar study on strawberries, the TP was affected by temperature, humidity, and storage time, but the change was not regular (Shin et al. 2007). Reductions in the amount of TP can be explained by the oxidation of phenolic compounds or polymerization with proteins (Cao et al., 2011). However, the decrease in the TP could also result from the degradation of phenolic structures due to an organic acid increase (Maleki et al., 2015).

DPPH-RSA and AA values in our samples showed oscillation during the first 4 weeks of storage by CRx*T*, CRx*t*, and Tx*t* interactions ( $P > 0.05$ ). Then, a slight increase in R-HM beverages and a decrease in S-HM beverages were detected in the 6th week of storage (Fig. 2f). In addition, AA was expected to be higher in R group beverages with higher TP and Vit-C, but they were higher from S groups. The changes in DPPH-RSA and AA may have been influenced by the broken-down of antioxidant compounds such as Vit-C, TP and AC (for S-HM) during storage. On the other hand, the fact that AA is higher in S group samples than in R group samples may be caused by AC, phenolic compounds and derivatives (flavonol, ellagic acid, p-coumaric acids, ellagitannins and glycosylated derivatives of ellagic acid) it contains. In addition, the difference in the amount of Maillard reaction products with known AA properties according to S and R pulps may also have been affected (HMF is higher in S).

As the fruit pulp ratio increased, the increase in viscosity showed a more significant increase in the S group beverages compared to the R group, yet, the change course of viscosity of samples stored

at 4 and 25 °C was found to be similar. Consistent with the pH change, the viscosity ( $V$ ) of the samples increased until the 4th week and decreased at the end of the 6th week due to the increase in CR,  $T$  and  $t$  (Fig. 2g). The difference in the composition of the pulp, the amount of sugar, organic acid, polysaccharide and protein it contains, and the type of sugar is likely to affect the viscosity. In addition, the degree of pasteurization applied under these conditions may have affected the formation of conjugates, namely glycolization, differently. Xi et al. (2020) determined that conjugates formed from the interaction (glycolization) of proteins and sugars in alkaline conditions are emulsifiers and viscosity increases. The sugar type is effective, for example, while glucose exhibits a higher glycolization, dextran was more effective than glucose for emulsion formation and stability. In addition, emulsion stability decreased as the pH increased, which was explained by the formation of disulphide bonds and aggregation. Semenova et al. (2002) summarized the gelation mechanism of globular proteins in the presence of sugars in 3 ways. The first is to increase the protein gelation temperature when sugar is present, the second is to reduce the frequency of protein-protein encounters with the continuous sugar phase is a slower gelling rate increase in viscosity, and the third is to heat at a temperature above the protein denaturation heat and then cool. The third process causes the formation of hard protein gels, but when heated at a temperature below protein denaturation heat or possibly for a short period gives weaker gels. Bernat et al. (2015) reported that the denaturation of protein with the effect of the homogenization (62, 103, 172 MPa) and heat treatment (85 °C-30 min or 121 °C-15 min) process increases viscosity. Cruz et al. (2007) explained that the ultrahigh-pressure homogenization process applied to soy milk increases the viscosity compared to the UHT method, with the growth of particle surface and internal friction. Yıldız and Alpaslan (2012) determined that the viscosity values of rosehip puree and marmalades were affected by pH, pectin and sugar content and the degree of heat treatment applied for production, also reported that peanut drinks with higher processing

temperatures were more viscous. This situation is probably due to changes in protein and carbohydrate structures that were reported by Rubico et al. (1987). Similarly, Wallace and Khaleque (1971) have explained the increase in viscosity in concentrated soymilk during sterilization by the progressive unfolding and aggregation of proteins.

One of the most important problems encountered in the presentation of plant-based milk is the serum separation from the emulsion. In R-HM and S-HM beverages, the serum separation rate (SSR) increased with an increase in the puree rate (CR), temperature ( $T$ ) and storage time ( $t$ ) except for R-HM stored at 25 °C. Also, the rise in SSR of R1 for 6 weeks (45 days) at 25 °C was more than other R and S-HM beverages. The SSR in R-HM beverages at 4 °C increased with increasing the CR and  $t$  factors and decreased at 25 °C with an increase in the CR. But, R1 was stable for up to 6 weeks at 4 °C among all formulations (Fig. 2h). S-HM beverages stored at 4 and 25 °C for 6 weeks showed a linear increase between the increase in S puree ratio,  $T$  and  $t$ , and SSR. SSR varied between 1.91% and 29.5% in R-HM and 9.53-21.4% in S-HM over 45 days. In addition, the increase in SSR was more in S-HM stored at 25 °C and in R-HM stored at 4 °C. Factors such as the composition of the fruit (sugar, TA, protein, pectin, dietary fibre), the amount of added sugar, and the gelation that occurs as a result of thermal degradation during pasteurization can be affected the SSR. As can be seen from Table 1, increasing the pulp ratio decreased the pH, and increased the amount of TA and sugar, so the viscosity increased, the probable cause was gelatination or protein aggregation with the role of sugars (glycosylation). Also, the destabilization in the samples may have been caused by reaching the isoelectric point (pI) in hazelnut milk with the added low-pH pH purees and the precipitation of the proteins. Similarly, Semenova et al. (2002) declared that at  $\text{pH} < \text{pI}$  (protein isoelectric point), weakens as the hydrogen bond between sugars and more protonated protein molecules, sugars become more effective than proteins in binding water molecules, leading to protein dehydration and

subsequently extensive protein aggregation. Bernat et al. (2015) reported that fermented hazelnut milk (pH=3.70-4.80, acidity= 0.100-0.338) had serum separation of 25% after 28 days of storage at 4 °C. They stated that this was due to the low protein content in plant-based milk, which acts as an emulsifier in oil-water emulsions.

In R and S-HM beverages stored at 4 and 25 °C, only water was separated as a phase at the end of the 2nd week, while 3 distinct phase separations were observed after the 2nd week. Phase separation was listed from the bottom to the top as sediment of hazelnut flour, fruit puree-nut milk, and water phase. The homogenization process applied to the hazelnut milk may cause a change in protein structure. Also, the pasteurization temperature may have increased the sedimentation rate by causing both protein denaturation and fat droplets-protein flock or fruit-fat-protein flock and an increase in particle size (Bernat et al., 2015). For this purpose, Li et al. (2009), for optimal stabilization of hazelnut milk, suggested 0.08% carrageenan, 0.08% guar gum, 0.1% sucrose fatty acid ester and 0.15% compound stabilizer. Also, in the same study, the optimum condition of homogenization and sterilization was respectively determined to be 35 MPa at 70 °C and 20 min at 121 °C. Maghsoudlou et al. (2016) reported that the application of ultrasound-assisted stabilization to almond milk to which modified starch, agar, and lecithin were added prevented phase separation due to time and thus preserved the stabilization. Hasan (2012) determined that the sediment layer in unprocessed almond milk stored at 4 and 25 °C for 7 days is higher than in pasteurized almond milk and lecithin-added almond milk. This situation was explained by the fact that homogenization applied before pasteurization and heat treatment caused a more stable distribution. On the other hand, lecithin added to almond milk increased the physical stability and balanced the particle distribution. In another similar study, it was determined that the two-stage homogenization (4-40 MPa) and heat application (1 hour at 50-60-70-80-90 °C) are effective in maintaining emulsion stability in coconut milk (Tangsuphoom and Coupland, 2005).

Hunter L\*, a\*, and b\* colour values of R-HM and S-HM were determined to be affected by CR, *T*, and *t* factors ( $p < 0.05$ , ANOVA). Hunter L\* value decreased with increasing CR in R and S-HM beverages and decreased in both formulation groups during storage. While the decreases at 4 and 25 °C were statistically similar in R1 and S1, the reduction became more pronounced as the pulp ratio increased. Hunter a\* value increased with the increase in CR in R and S-HM beverages and was more in the R groups. While the Hunter a\* value did not change in the R group samples at both temperatures during storage, it decreased in the S2 and S3 beverages and at 25 °C were more than 4 degrees. Hunter b\* values were increased similarly to Hunter a\* with increasing CR, and increases were more in R group beverages than in S groups. Although there were slight fluctuations at both temperature degrees during storage, there was a slight decrease in R2 and R3 in all samples, and these decreases were found to be statistically insignificant ( $P < 0.05$ ). The decrease in L\*, a\* and b\* values during storage was probably related to the decomposition of carotene (R groups) and anthocyanins (S groups) under the influence of pasteurization and storage temperature and the pH value of the environment. In the previous study, Wang et al. (2015) reported that the colour stability of strawberry juice is preserved at pH 3.0 or below during production and storage, too small changes in pH changed significantly the colour stability of strawberry juice due to the pH-dependent characteristics and molecular structures of anthocyanins. Similarly, Buve et al. (2018) reported that ascorbic acid content and Hunter a\* values decreased with increasing temperature and time as a result of storage (32 weeks) of pasteurized strawberry juice at different temperatures (20, 28, 35 and 42 °C).

#### Mathematical Equations for Kinetic Calculations

The mathematical equations of TP, Vit-C, Hunter L\*, a\* and b\* values, V, HMF and AC (for S-HM) belonging to R-HM and S-HM beverages related to *T* and *t* are given respectively in Table 2.

Table 2. Mathematical equations showing the effects of  $T$  and  $t$  on some quality parameters of R-HM and S-HM ( $P < 0.001$ )

Pulp Mix	CR (%)	Parameter	Mathematical equations	R <sup>2</sup> (%)
R-HM	20	TP=	$0.0 + 69.87 T + 2.7 t - 2.469 T^2 - 7.20 \rho + 0.377 T^*t$	95.07
	20	Vit-C=	$0.0 + 4.422 T - 0.987 t - 0.1496 T^2 - 0.1538 \rho + 0.0102 T^*t$	98.32
	20	L*=	$0.0 + 15.039 T - 0.853 t - 0.51788 T^2 + 0.1297 \rho - 0.01025 T^*t$	99.96
	20	a* =	$0.0 + 1.9303 T + 0.1761 t - 0.06662 T^2 - 0.0184 \rho + 0.00070 T^*t$	99.84
	20	b* =	$0.0 + 3.8304 T - 0.019 t - 0.13268 T^2 - 0.0014 \rho + 0.00140 T^*t$	99.87
	20	V=	$0.0 + 1.993 T + 3.63 t - 0.0728 T^2 - 0.429 \rho + 0.0517 T^*t$	97.77
	20	HMF =	$0.0 + 0.4932 T - 0.008 t - 0.01680 T^2 + 0.1126 \rho - 0.01004 T^*t$	96.59
	40	TP=	$78.8 + 69.87 T + 2.7 t - 2.469 T^2 - 7.20 \rho + 0.377 T^*t$	95.07
	40	Vit-C=	$6.076 + 4.422 T - 0.987 t - 0.1496 T^2 - 0.1538 \rho + 0.0102 T^*t$	98.32
	40	L*=	$-2.966 + 15.039 T - 0.853 t - 0.51788 T^2 + 0.1297 \rho - 0.01025 T^*t$	99.96
	40	a* =	$1.622 + 1.9303 T + 0.1761 t - 0.06662 T^2 - 0.0184 \rho + 0.00070 T^*t$	99.84
	40	b* =	$0.902 + 3.8304 T - 0.019 t - 0.13268 T^2 - 0.0014 \rho + 0.00140 T^*t$	99.87
	40	V=	$10.34 + 1.993 T + 3.63 t - 0.0728 T^2 - 0.429 \rho + 0.0517 T^*t$	97.77
	40	HMF =	$0.798 + 0.4932 T - 0.008 t - 0.01680 T^2 + 0.1126 \rho - 0.01004 T^*t$	96.59
S-HM	60	TP=	$253.4 + 69.87 T + 2.7 t - 2.469 T^2 - 7.20 \rho + 0.377 T^*t$	95.07
	60	Vit-C=	$8.436 + 4.422 T - 0.987 t - 0.1496 T^2 - 0.1538 \rho + 0.0102 T^*t$	98.32
	60	L*=	$-8.017 + 15.039 T - 0.853 t - 0.51788 T^2 + 0.1297 \rho - 0.01025 T^*t$	99.96
	60	a* =	$4.035 + 1.9303 T + 0.1761 t - 0.06662 T^2 - 0.0184 \rho + 0.00070 T^*t$	99.84
	60	b* =	$1.231 + 3.8304 T - 0.019 t - 0.13268 T^2 - 0.0014 \rho + 0.00140 T^*t$	99.87
	60	V=	$30.05 + 1.993 T + 3.63 t - 0.0728 T^2 - 0.429 \rho + 0.0517 T^*t$	97.77
	60	HMF =	$0.207 + 0.4932 T - 0.008 t - 0.01680 T^2 + 0.1126 \rho - 0.01004 T^*t$	96.59
	20	TP=	$0.0 + 11.420 T + 8.33 t - 0.3920 T^2 - 1.728 \rho - 0.0366 T^*t$	99.12
	20	Vit-C=	$0.0 + 3.484 T - 0.644 t - 0.11977 T^2 - 0.0094 \rho - 0.00392 T^*t$	99.45
	20	L*=	$0.0 + 15.3871 T - 0.099 t - 0.53107 T^2 + 0.0280 \rho - 0.00942 T^*t$	99.98
	20	a* =	$0.0 + 1.938 T - 0.576 t - 0.06704 T^2 + 0.0527 \rho + 0.00021 T^*t$	97.12
	20	b* =	$0.0 + 2.3235 T + 0.1898 t - 0.07984 T^2 - 0.02646 \rho + 0.00115 T^*t$	99.92
	20	V=	$0.0 + 3.73 T + 13.22 t - 0.122 T^2 - 1.37 \rho - 0.095 T^*t$	95.96
	20	HMF =	$0.0 + 1.718 T - 0.117 t - 0.06156 T^2 + 0.1741 \rho + 0.0065 T^*t$	95.94
20	AC=	$0.0 + 2.499 T - 0.739 t - 0.08743 T^2 - 0.0448 \rho + 0.00427 T^*t$	98.10	
40	TP=	$15.77 + 11.420 T + 8.33 t - 0.3920 T^2 - 1.728 \rho - 0.0366 T^*t$	99.12	
40	Vit-C=	$4.957 + 3.484 T - 0.644 t - 0.11977 T^2 - 0.0094 \rho - 0.00392 T^*t$	99.45	
40	L*=	$-1.777 + 15.3871 T - 0.099 t - 0.53107 T^2 + 0.0280 \rho - 0.00942 T^*t$	99.98	
40	a* =	$1.258 + 1.938 T - 0.576 t - 0.06704 T^2 + 0.0527 \rho + 0.00021 T^*t$	97.12	
40	b* =	$0.0125 + 2.3235 T + 0.1898 t - 0.07984 T^2 - 0.02646 \rho + 0.00115 T^*t$	99.92	
40	V=	$61.2 + 3.73 T + 13.22 t - 0.122 T^2 - 1.37 \rho - 0.095 T^*t$	95.96	
40	HMF =	$0.333 + 1.718 T - 0.117 t - 0.06156 T^2 + 0.1741 \rho + 0.0065 T^*t$	95.94	
40	AC=	$3.691 + 2.499 T - 0.739 t - 0.08743 T^2 - 0.0448 \rho + 0.00427 T^*t$	98.10	
60	TP=	$28.82 + 11.420 T + 8.33 t - 0.3920 T^2 - 1.728 \rho - 0.0366 T^*t$	99.12	
60	Vit-C=	$4.937 + 3.484 T - 0.644 t - 0.11977 T^2 - 0.0094 \rho - 0.00392 T^*t$	99.45	
60	L*=	$-6.786 + 15.3871 T - 0.099 t - 0.53107 T^2 + 0.0280 \rho - 0.00942 T^*t$	99.98	
60	a* =	$2.839 + 1.938 T - 0.576 t - 0.06704 T^2 + 0.0527 \rho + 0.00021 T^*t$	97.12	
60	b* =	$-0.3106 + 2.3235 T + 0.1898 t - 0.07984 T^2 - 0.02646 \rho + 0.00115 T^*t$	99.92	
60	V=	$186.6 + 3.73 T + 13.22 t - 0.122 T^2 - 1.37 \rho - 0.095 T^*t$	95.96	
60	HMF =	$-1.790 + 1.718 T - 0.117 t - 0.06156 T^2 + 0.1741 \rho + 0.0065 T^*t$	95.94	
60	AC=	$7.243 + 2.499 T - 0.739 t - 0.08743 T^2 - 0.0448 \rho + 0.00427 T^*t$	98.10	

CR: Ratio of contribution,  $T$ : temperature (°C),  $t$ : time (week)

Temperature, ( $T$ ) time ( $t$ ) and fruit puree ratio (CR) were effective on some quality parameters of R and S-HM beverages. As a result of the regression analysis of the data belonging to the used quality parameters in determining the shelf life, paraboloid regression was found very important ( $P < 0.001$ ). Also,  $R^2$  values belonging to mathematics equal for both puree-HM beverages changed between 95.07-99.98% (Tables 2).  $T$  and  $t$  linear (or primary), quadratic (or secondary) ( $T^2$ ,  $t^2$ ), and interaction ( $Txt$ ) effects on all parameters of R and S-HM were observed ( $P < 0.001$ ). Another significant result, the primary (direct) or linear effects of  $T$  and  $t$  were higher than the secondary effects in all parameters of both R and S puree mixtures according to coefficients in the regression equation.

The primary effect of  $T$  was positive in the TP and Vit-C equations quality parameters for all mixtures of both purees. Besides, the secondary effect of  $T$  ( $T^2$ ) belonging to TP and Vit-C was negative in all R and S-HM mixtures ratios. On the other hand, while the secondary effect of  $t$  was negative in both quality parameters, the primary effect of  $t$  was negative in Vit-C and positive in TP. The interaction ( $Txt$ ) effect was negative on the TP and Vit-C equations of the S-HM mixtures. It also showed a positive effect on the same quality parameters of R-HM. Optimum shelf life can be calculated from both equations, assuming that Vit-C and TP are reduced by at most half during the storage period in R and S-HM beverages. As a result, the optimum shelf life of 3 different mixtures of R-HM and S-HM was calculated respectively as 6 and 8 weeks at 15 °C, using the TP equation. On the other hand, the optimum shelf life of R-HM and S-HM was calculated as 7.5 and 8 weeks at 15 °C, using the Vit-C equations.

## CONCLUSION

The addition of R and S fortified the rich composition of hazelnut milk with Vit-C, phenolic compounds, sugars, organic acids, colourants (anthocyanins, xanthophylls etc.), and pectins. Hence, the obtained beverages might be considered a new functional food with potential health benefits, such as being suitable for obese

groups (decreased amount of oil due to dilution), vegetarians, lactose-intolerant, or people allergic to animal proteins. In this study, the addition of R and S fruit pulps as a source of Vit-C, to hazelnut milk, although it enriched the composition of the hazelnut milk and improved its drinking properties, negatively affected the stabilization during the storage process. As it is understood, it does not seem possible to eliminate the stabilization problem in such foods by homogenization only. Also, stabilizers should use as an alternative solution. On the other hand, based on the half-lives of the quality parameters, the shelf life of the R and S-HM can be calculated using the mathematical equations formed between temperature and time.

## DECLARATION OF COMPETING INTEREST

The authors have declared no conflict of interest.

## AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Sakine Kübra Çelik: Conceptualization, methodology, investigation, formal analysis, writing - original draft. Emre Turan: Conceptualization, methodology, investigation, formal analysis, writing - original draft. Atilla Şimşek: Project administration, supervision, conceptualization, methodology, writing - review and editing. All authors read and approved the final manuscript.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Ordu University BAP under the BY-1701 project number.

## REFERENCES

- Albuquerque, E.M.B., Almeida F.A.S., Gomes, J.P., Alves, N.M.C., Silva, W.P. (2015). Production of "peanut milk" based beverages enriched with umbu and guava pulps. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 14: 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2013.07.002>
- Ayub, M., Ullah, J., Muhammed, A., Zeb, A. (2010). Evaluation of strawberry juice preserved with chemical preservatives at refrigeration temperature. *International Journal of Nutrition and Metabolism Research*, 2(2): 27-32.

- Belewu, M.A., Belewu, K.Y. (2007). Comparative physicochemical evaluation of tiger nut, soybean and coconut milk sources. *International Journal of Agriculture and Biology*, 9(5): 785–787.
- Bernat, N., Chafer, M., Chiralt, A., Martinez, C.G. (2014). Hazelnut milk fermentation using probiotic *Lactobacillus rhamnosus* and inulin. *International Journal of Food Science and Technology*, 49: 2553-2562. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12585>
- Bernat, N., Chafer, M., Rodriguez-Garcia, J., Chiralt, A., Gonzalez-Martinez, C. (2015). Affect high pressure homogenization and heat treatment on physical properties and stability of almond and hazelnut milks. *LWT-Food Science and Technology*, 62:488-496. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.045>
- Buve, C., Kebede, B.T., Batselier, C.D., Carrillo, C., Pham, H.T.T., Henrick, M., Grauwet, T., Loey, A.V. (2018). Kinetics of colour changes in pasteurised strawberry juice during storage. *Journal of Food Engineering*, 216, 42-51.
- Cao, X.M., Zhang, F.S., Wang, Y.T., Yi, J.Y., Liao, X.J. (2011). Effect of high hydrostatic pressure on enzymes, phenolic compounds, anthocyanins, polymeric color and color of strawberry pulps. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91: 877-885. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4260>
- Cemeroğlu, B. (2004). Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi 1. (2. Baskı), Başkent Klîşe ve Matbaacılık, ISBN: 975- 98578-1-2
- Cemeroğlu, B. (2010). Gıda Analizleri, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, ISBN: 978-975-98578-6-8
- Chang, C., Ma, X., Cen, P. (2006). Kinetics of Levulinic Acid Formation from Glucose Decomposition at High Temperature. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 14(5): 708-712. [https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(06\)60139-0](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(06)60139-0)
- Cruz, N., Capellas, M., Hernández, M., Trujillo, A.J., Guamis, B., Ferragut, V. (2007). Ultra high pressure homogenization of soymilk: Microbiological, physicochemical and microstructural characteristics. *Food Research International*, 40(6): 725-732. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.01.003>
- Derossi, A., Pilli, T.D., Fiore, A.G. (2010). Vitamin C kinetic degradation of strawberry juice stored under non-isothermal conditions. *Food Science and Technology*, 43: 590-595. DOI: 10.1016/j.lwt.2009.10.006
- Ermis, E., Güner, K.Ö., Yılmaz, M. (2018). Characterization of hazelnut milk powders: a comparison of spray-drying and freeze-drying. *International Journal of Food Engineering*, 14: 11-12. DOI: <https://doi.org/10.1515/ijfe-2018-0085>
- Hasan, N.A. (2012). Almond milk production and study of quality characteristics. *Journal of Academia*, 2: 1-8. <https://doi.org/10.24191/joa.v2i1.7964>
- Isanga, J., Zhang, G. (2009). Production and evaluation of some physicochemical parameters of peanut milk yoghurt. *Food Science Technology*, 42: 1132-1138. DOI: 10.1016/j.lwt.2009.01.014
- Kadakal, Ç., Duman, T., Ekinci, R. (2017). Thermal degradation kinetics of ascorbic acid, thiamine and riboflavin in rosehip (*Rosa canina* L.) nectar. *Food Science and Technology*, 38(4): 2-7. doi:<http://dx.doi.org/10.1590/1678-457x.11417>
- Köksal, A.İ., Artık, N., Şimşek, A., Güneş, N. (2006). Nutrient composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties cultivated in Turkey. *Food Chemistry*, 99: 509-515. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.013>
- Kundu, P., Dhankhar, J., Sharma, A. (2018). Development of nondairy milk alternative using soymilk and almond milk. *Current Research in Nutrition and Food Science*, 6(1): 203-210. <http://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.6.1.23>
- Li, Y., Zheng, F., Niu, C. (2009). Study on processing technology and stability of hazelnut milk beverage. *The Beverage Industry*, 1. 2009. ([http://en.cnki.com.cn/Article\\_en/CJFD Total-RYLG200901010.htm](http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFD Total-RYLG200901010.htm)).
- Liu, Y., Zhou, T. (2012). Processing research on Hazelnut-Kefir fermented milk. *China Dairy Industry*, 2012-04. (<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20123175842>).

- Maghsoudlou, Y., Alami, M., Mashkour, M., Shahraki, M.H. (2016). Optimization of ultrasound-assisted stabilization and formulation of almond milk. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40: 828-829. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12661>
- Maleki, N., Khodaiyan, F., Mousavi, M. (2015). Antioxidant activity of fermented hazelnut milk. *Food Science and Biotechnology*, 24(1): 107-115. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0016-0>
- Murevanhema, Y.Y., Jideani, M.A. (2015). Production and characterization of milk produced from Bambara groundnut (*Vigna Subterranea*) varieties. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39: 1485-1498. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12368>
- Okyerere, A.A., Odamtten, G.T. (2014). Physicochemical, functional and sensory attributes of milk prepared from irradiated tiger nut (*Cyperus esculentus* L.). *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7: 583-588. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.09.010>
- Oszmianski, J., Wojdylo, A. (2009). Comparative study of phenolic content and antioxidant activity of strawberry puree, clear, and cloudy juices. *European Food Research and Technology*, 228: 623-631. DOI: 10.1007/s00217-008-0971-2
- Patras, A., Brunton, N.P., O'Donnel, C., Tiwari, B.K. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science Technology*, 21: 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.07.004>
- Rubico, S.M., Resurreccion, A.V.A., Frank, J.F., Beuchat, L.R. (1987). Suspension stability, texture and color of high temperature treated peanut beverage. *Journal of Food Science*, 52(6): 1676-1679. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1987.tb05904.x
- Semenova, M.G., Antipova, A.S., Belyakova, L.E. (2002). Food protein interactions in sugar solutions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 7(5): 438-444.
- Sethi, S., Tyagi, S.K., Anurag, R.K. (2016). Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 53(9): 3408-3423. DOI: 10.1007/s13197-016-2328-3
- Shin, Y., Liu, R.H., Nock, J.F., Holliday, D., Watkins, C.B. (2007). Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 45: 349-357. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.03.007>
- Şimşek, A., Aykut, O. (2007). Evaluation of microelement profile of Turkish hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties for human nutrition and health. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 58(8): 677-688. <https://doi.org/10.1080/09637480701403202>
- Singleton, V.L., Rossi, J.A.Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 6: 144-158.
- Tangsuphoom, N., Coupland, J.N. (2005). Effect of heating and homogenization on the stability of coconut milk emulsions. *Journal of Food Science*, 70(8): 466-470. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb11516.x>
- Wallace, G.M., Khaleque, A. (1971). Studies on the processing and properties of soymilk III. factors affecting concentration of soymilk and its stability during heat sterilization. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 22: 531-535. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740221009>
- Wang, Z., Zhang, M., Wu, Q. (2015). Effects of temperature, pH, and sunlight exposure on the color stability of strawberry juice during processing and storage. *Food Science and Technology*, 60, 1174-1178.
- Xi, C.Y., Kang, N.X., Zhao, C.H., Liu, Y.J., Sun, Z.W., Zhang, T.H. (2020). Effects of pH and different sugars on the structures and emulsification properties of whey protein isolate-sugar conjugates. *Food Bioscience*, 33: 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100507>
- Yıldız, O., Alpaslan, M. (2012). Properties of rosehip marmalades. *Food Technology and Biotechnology*, 50(1): 98-106.



Yorulmaz, A., Velioglu, S., Tekin, A., Şimşek, A., Drover, J.C.G., Ateş, J. (2009). Phytosterols 17 Turkish hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111: 402-408. DOI: 10.1002/ejlt.200800187

Zavala, J.F.A, Wang, S.Y., Wang, C.Y., Aguilar, G.A.G. (2004). Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. *Lebensmittel - Wissenschaft und*

*Technologie*, 37: 687–695. DOI: 10.1016/j.lwt.2004.03.002

Zhang, C.S., Yang, Q.L., Mou, J.C., Liu, Z.Q., Yu, L.N., Sun, J., Bi, J. (2011). Studies on stability of peanut mango milk. *Applied Mechanics and Materials*, (117-119): 25-28. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.117-119.25>

## DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜNÜN *Rheum ribes* KÖKLERİNDEN FENOLİK BİLEŞİK EKSTRAKSİYONU ÜZERİNE ETKİSİ

**Naciye Kutlu Kantar\***

Bayburt Üniversitesi, Gıda İşleme Bölümü, Aydıntepe, Bayburt, Türkiye

Geliş/ Received: 03.11.2022; Kabul/ Accepted: 23.01.2023 Online baskı/ Published online: 02.02.2023

Kutlu Kantar, N. (2023). Derin ötektik çözücünün *Rheum ribes* köklerinden fenolik bileşik ekstraksiyonu üzerine etkisi. GIDA (2023) 48 (1) 199-208 doi: 10.15237/ gida.GD22107

Kutlu Kantar, N. (2023). Impact of deep eutectic solvent on phenolic compound extraction from *Rheum ribes* roots. GIDA (2023) 48 (1) 199-208 doi: 10.15237/ gida.GD22107

### ÖZ

Bu çalışmada ışkın bitkisi (*Rheum ribes*) köklerinden biyoaktif bileşik eldesinde farklı çözücü tipleri değerlendirilmiştir. Yeşil çözücü olarak kolin klorür ve laktik asit ile hazırlanan farklı molar oranda (1:1, 1:2, 1:3) derin ötektik çözücüler ve su kullanılmıştır. Toplam fenolik bileşik miktarı derin ötektik çözücü ile etanol ekstraktına benzer olarak yüksek bulunmuştur. Toplam flavonoid bileşik ekstraksiyonunda en yüksek değer etanol ile elde edilirken ikinci sırada derin ötektik çözücü gelmektedir. Antioksidan aktivite üzerine ise en etkili çözücünün derin ötektik çözücü (1:3) olduğu saptanmıştır. Ek olarak temel bileşen analizi ile farklı çözücüler kullanılarak hazırlanan ışkın ekstraktlarının biyoaktif içerik (toplam fenolik, toplam flavonoid bileşik, antioksidan aktivite) açısından benzerlik/farklılıkları değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, ışkından biyoaktif bileşik ekstraksiyonunda organik çözücülere alternatif olarak derin ötektik çözücünün kullanımı uygun bulunmuştur.

**Anahtar kelimeler:** ışkın, ultrasonik ekstraksiyon, yeşil çözücü, temel bileşen analizi

## IMPACT OF DEEP EUTECTIC SOLVENT ON PHENOLIC COMPOUND EXTRACTION FROM *Rheum ribes* ROOTS

### ABSTRACT

In this study, different solvent types were evaluated in obtaining bioactive compounds from rhubarb (*Rheum ribes*) roots. Deep eutectic solvents prepared with choline chloride and lactic acid in different molar ratios (1:1, 1:2, 1:3) and water were used, as green solvents. The total phenolic compounds were found to be high with deep eutectic solvent similar to the ethanol extract. The highest value is obtained with ethanol for total flavonoid compound extraction, while deep eutectic solvent comes second. For the antioxidant activity, it was determined that the most effective solvent was the deep eutectic solvent (1:3). In addition, the similarities/differences in terms of bioactive compounds (total phenolic, total flavonoid compound, antioxidant activity) of rhubarb extracts prepared using different solvents were evaluated with principal component analysis. As a result, the use of deep eutectic solvent was found to be appropriate as an alternative to organic solvents in bioactive compound extraction from rhubarb.

**Keywords:** Rhubarb, ultrasonic extraction, green solvent, principal component analysis

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: naciye.kutlu@bayburt.edu.tr

☎: (+90) 458 311 4426

☎: (+90) 458 311 4466

Naciye Kutlu; ORCID no: 0000-0002-4075-8823

## GİRİŞ

Geleneksel olarak ışkın ya da ışgın adları ile bilinen *Rheum ribes* bitkisi dağlık bölgelerde yetişmektedir. Bu bitkinin Türkiye, İran, Lübnan başta olmak üzere Rusya, Afganistan, Pakistan gibi ülkelerde yetiştirildiği bilinmektedir (Alaadin vd., 2007). Türkiye’de özellikle Doğu Anadolu Bölgesi’nde yetiştirilen bir bitkidir. Buruk ve ekşi tada sahip olan ışkın bitkisinin kökleri, kabuk kısmı soyularak tüketilebilmektedir. Çiğ olarak tüketilebildiği gibi kavurma, salata ya da çorba yapımında da sıklıkla kullanılmaktadır (Inaltong, 2015; Apuhan ve Beyazkaya, 2019). Işkın farmasötik özellikte bir bitki olup, antimikrobiyal, antihiperglisemi ve antioksidan aktivite gösterdiği yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Farzami Sepehr ve Ghorbanli, 2002; Akkuş, 2018; Keser vd., 2020). Ayrıca ışkın bitkisi A, C ve E vitamini bakımından zengin olup selenyum düzeyi beslenme açısından yeterli orandadır (Munzuroğlu vd., 2000).

Yeşil ve sürdürülebilir teknolojiler yoluyla bitkisel matrislerden doğal bileşiklerin geri kazanılması literatürde geniş çapta araştırılmış olup geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine kıyasla (sokselet, maserasyon, perkolasyon vb.) birçok avantaja sahiptirler (Reina vd., 2023). Örneğin, yeşil ekstraksiyon teknikleri kullanılarak, yüksek tekrar üretilebilirlik, düşük çözücü tüketimi, yüksek son ürün saflığı ve düşük enerji tüketimi sağlanabilir (Chemat vd., 2020). Ultrasonik destekli ekstraksiyon yönteminde ultrasonik banyo kullanılabilirdiğinden kullanımı hem basit hem de az maliyetlidir (Garcia-Salas vd., 2010). Bu yöntemin prensibi ultrasonların (20 kHz-100 MHz frekans) materyalden geçişine bağlı, sıkıştırma ve genişleme döngülerinin neden olduğu kavitasyon sürecine dayanmaktadır. Kavitasyon kabarcıklarının patlaması, parçacıklar arası çarpışmalara neden olur, bu da hücrelerin bozulmasına ve ekstrakte edilebilir bileşiklerin çözücüye daha fazla difüzyonuna neden olmaktadır (Panzella vd., 2020).

Çözücü seçimi ekstraksiyon prosedüründe önemli bir basamaktır (Stalikas, 2007). Bu amaçla ekstraksiyon işlemlerinde, fenolik bileşik veriminde olumlu etki gösteren, fakat göreceli olarak uzun süre, yüksek maliyet, düşük kaynama

noktası, tutuşabilirlik, toksisite ve biyolojik olarak parçalanmama gibi birçok dezavantaja sahip olan organik çözücüler (metanol, etanol, hekzan vb.) kullanılmaktadır (Welton, 2015). Yeşil çözücülerin başında gelen su, sadece polar ve hidrofilik bileşikler için etkili bir ekstraksiyon çözücüsüdür (Zainal-Abidin vd., 2017). Bu nedenle, organik çözücülerle aynı mükemmel ekstraksiyon özelliklerini sergileyen ancak düşük maliyetli ve minimum çevresel etkiye sahip yeşil çözücülere yönelik yüksek bir talep sonucunda derin ötektik çözücüler geliştirilmiştir (Tang vd., 2015; Ruesgas-Ramón vd., 2017). Derin ötektik çözücüler, uygun bir sıcaklıkta bir hidrojen bağı alıcısı (HBA) ve bir hidrojen bağı donörü (HBD) karıştırılarak hazırlanırlar (Abbot vd., 2003). Yaygın organik çözücülerle karşılaştırıldığında derin ötektik çözücüler, düşük fiyat, kolay hazırlama ve kolay bulunabilirlik gibi birçok avantaja sahiptirler. Ayrıca çoğu biyolojik olarak parçalanabilir ve çok düşük toksisiteye sahiptir (Radošević vd., 2015).

Bu çalışmada yeşil çözücü ve yeşil ekstraksiyon yönteminin kullanımı amaçlanmıştır. Işkın bitkisinin ekstraksiyonu sırasında derin ötektik çözücü kullanımı üzerine bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu amaçla, ultrasonik destekli ekstraksiyon uygulamasında 3 farklı molar oranda derin ötektik çözücü kullanılmış ve su, etanol, metanol ve hekzan kullanılarak karşılaştırma yapılmıştır. Temel bileşen analizi ile farklı çözücüler kullanılarak hazırlanan ışkın ekstraktlarının fitokimyasal içerik (toplam fenolik bileşik, toplam flavonoid bileşik, antioksidan aktivite) açısından benzerlik/farklılıkları değerlendirilmiştir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

Işkın bitkisi Bayburt ilinde yerel üreticilerden temin edilmiştir. Analizlerden önce ışkın kökleri soyulmuş, 1.5 cm boyutunda dilimlenerek, 65 °C’de kurutucu (Nüve, FN500, Türkiye) yardımıyla kurutulmuştur. Kurutulmuş ürünler öğütücüden (Aromatic, Fakir Hausgeräte, Almanya) geçirildikten sonra, ekstraksiyon işlemi için buzdolabında +4 °C sıcaklıkta saklanmıştır.

Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

### Yöntem

#### Derin ötektik çözücülerin hazırlanması

Çalışmada hidrojen bağ alıcısı (HBA) olarak kuarterner amonyum tuzu olan kolin klorür, hidrojen bağ donörü (HBD) olarak ise laktik asit kullanılarak farklı molar oranlarda (1:1, 1:2, 1:3) hazırlanmıştır. Derin ötektik çözücüler oluşturulduktan sonra, yüksek viskozite olumsuzluğunu bertaraf etmek adına tüm çözücülere kütlece %50 oranında saf su ilave edilmiştir. Karışım daha sonra homojen renksiz bir sıvı elde edilene kadar çalkalamalı inkübatör (Heidolph, Unimax 1010, Almanya) kullanılarak 30 °C ve 180 rpm'de karıştırılmış ve ardından reaksiyona girmemiş serbest asitleri uzaklaştırmak amacıyla, 80 °C'de 12 saat bekletilmiştir (Xu vd., 2016).

#### Ultrasonik destekli ekstraksiyon

Ekstraktlar, ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Çözücü olarak 3 farklı derin ötektik çözücü, karşılaştırma yapmak amacıyla da saf su, etanol:saf su (%50 v/v), metanol:saf su (%50 v/v), ve hekzan:saf su (%50 v/v) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan çözücüler Çizelge 1'de sunulmuştur. Katı/çözücü oranı 1/10 g/mL olacak şekilde örnekler hazırlanmıştır. Ekstraksiyon işlemi ultrasonik banyo (Kudos, SK2210HP, Hindistan) kullanılarak %100 güçte 60 dakika boyunca uygulanmıştır. Ekstraksiyon sonunda örnekler 30 dakika boyunca 2282×g hızında santrifüj (Hermle, 326K, Almanya) işlemine tabi tutulmuşlardır. Süpernatantlar toplanmış ve analizler öncesinde koyu renkli cam şişeler içerisinde buzdolabında +4 °C sıcaklıkta bekletilmişlerdir.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan çözücüler ve özellikleri

Table 1. Solvents used in the study and their properties

Çözücü <i>Solvent</i>	Özellik <i>Property</i>
DES 1	Kolin klorür:Laktik asit (molar oran 1:1)+%50 saf su
DES 2	Kolin klorür:Laktik asit (molar oran 1:2)+%50 saf su
DES 3	Kolin klorür:Laktik asit (molar oran 1:3)+%50 saf su
Su	Saf su
Etanol	%50 saf su karışımı (v/v)
Metanol	%50 saf su karışımı (v/v)
Hekzan	%50 saf su karışımı (v/v)

#### Toplam fenolik bileşik (TFB)

Toplam fenolik bileşik miktarı belirlenirken McDonald vd. (2001) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. 5 mL Folin-Ciocalteu reaktifi:saf su (1:10 v/v), 4 mL %7.5'lük (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:saf su w/v) sodyum karbonat ve 1 mL 2 kat seyreltilmiş ekstrakt karıştırılmıştır. Karanlıkta ve oda sıcaklığında 60 dakikalık inkübasyonun ardından 750 nm dalga boyunda spektrofotometre ile (Shimadzu, UV-1201V, Japonya) absorbans değerleri ölçülmüştür. Sonuçlar gallik asit eşdeğeri (GAE) (mg GAE/g kuru madde) olarak verilmiştir.

#### Toplam flavonoid bileşik (TFlaB)

Toplam flavonoid miktarı alüminyum klorür spektrometrik yöntem kullanılarak belirlenmiştir (Chandra vd., 2014). 2 mL seyreltilmiş ekstrakt üzerine 2 mL %2'lik (AlCl<sub>3</sub>:saf su w/v) alüminyum klorür eklenerek, oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda 420 nm dalga boyunda spektrofotometre (Shimadzu, UV-1201V, Japonya) ile absorbansları belirlenmiştir. Sonuçlar kuarsetin eşdeğeri (QE) (mg QE/g kuru madde) olarak verilmiştir.

### **Antioksidan aktivite DPPH yöntemi**

Ekstraktların DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radikalini süpürücü etkisi, DPPH ile oluşturdukları rengin 515 nm dalga boyunda ölçümüne ve standart madde ile karşılaştırılması esasına dayanan ve Bao vd. (2005) tarafından tanımlanan yöntemin modifiye edilmiş hali ile belirlenmiştir (Zhou vd., 2009). Bu doğrultuda 100 µL seyreltilmiş ekstrakt üzerine 3.9 mL DPPH ( $6 \times 10^{-5}$  M) solüsyonu eklenmiş ve 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçlar troloks eşdeğeri (TE) (mg TE/g kuru madde) olarak verilmiştir.

### **CUPRAC yöntemi**

Hazırlanan ekstraktlardan 50 µL alınarak üzerine sırasıyla, 1 mL 10 mM  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  çözeltisi, 1 mL 7.5 mM Neocuproine çözeltisi ve 1 mL 1 M amonyum asetat (pH=7) çözeltisi eklenmiştir. Son hacim 4.1 mL olacak şekilde saf su ilave edilerek, 30 dakika süre ile karanlık ortamda bekletilen örneklerin absorbansları 450 nm dalga boyunda belirlenmiştir (Apak vd., 2004). Sonuçlar troloks eşdeğeri (TE) (mg TE/g kuru madde) olarak verilmiştir.

### **FRAP yöntemi**

Ekstraktların demir indirgeyici antioksidan aktivitelerini (FRAP) belirlemek için Benzie ve Strain (1996) tarafından uygulanan yöntem kullanılmıştır. Bu amaçla 900 µL taze olarak hazırlanan FRAP reaktifi (asetat tampon (pH 3.6), 10 mM TPTZ (2,4,6-Tripridyl-s-triazine) solüsyonu, 20 mM  $\text{FeCl}_3$ , 10:1:1 (v/v/v) oranında karıştırılarak hazırlanmıştır) üzerine 100 µL ekstrakt ilave edilerek, 4 dakika bekletilmiş ve ardından absorbans 593 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Sonuçlar troloks eşdeğeri (TE) (mg TE/g kuru madde) olarak verilmiştir.

### **Temel bileşen ve istatistiksel analiz**

Tüm ekstraktlara ait analiz sonuçları, tekerrürlerin ortalaması  $\pm$  standart sapması olarak verilmiştir. Temel bileşen analizi (TBA) ve istatistiksel analizler MINITAB 17.1.1.0 paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Değerlendirme sonucu, istatistiksel açıdan önemli bulunan

değerler Tukey testi ile  $P \leq 0.05$  önem derecesine göre belirlenmiştir.

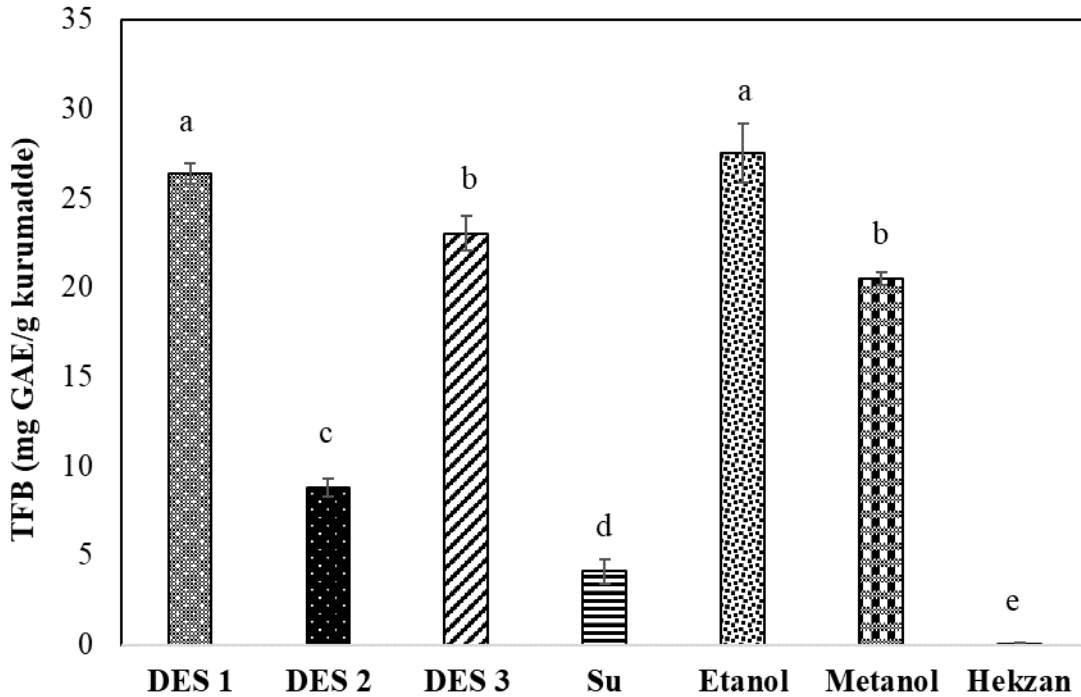
### **SONUÇLAR VE TARTIŞMA**

#### **Çözücülerin toplam fenolik bileşik üzerine etkisi**

Farklı çözücülerin ışıktan toplam fenolik bileşik (TFB) ekstraksiyonuna etkisi Şekil 1'de sunulmuştur. Değerler incelendiğinde 1:1 molar oranda hazırlanan derin ötektik çözücü (DES 1), diğer molar oranda hazırlanan derin ötektik çözücülere göre istatistiksel olarak daha yüksek TFB verimi sağlanmıştır ( $P < 0.05$ ). Bu bulgu derin ötektik çözücülerin hazırlanması sırasında molar oranın ekstraksiyon üzerine etkili olduğunu göz önüne sermiştir. Molar oranı değişimi ile yoğunluk etkilenebilmekte ve ekstraksiyon verimliliğini değiştirebilmektedir (Cui vd., 2017). Su ve diğer organik çözücüler (etanol, metanol ve hekzan) ile karşılaştırıldıklarında, etanol ve DES 1 ile en yüksek miktarda TFB ekstrakte edilmiştir. Etanol ile 27.53, DES 1 ile 26.40 mg GAE/g kuru madde elde edilmiş olup bu iki çözücü arasında istatistiksel olarak fark yoktur ( $P > 0.05$ ). Bu durum uygun koşullarda hazırlanan derin ötektik çözücülerin etkinliğinin organik çözücüler kadar iyi olduğunun kanıtıdır. Metanol ve DES 3 ile ekstrakte edilebilen TFB miktarları sırasıyla 20.49 ve 23.04 mg GAE/g kuru madde olarak ikinci en yüksek grubu oluşturmaktadırlar. DES 2, su ve hekzan düşük verimler sağlamış ve TFB miktarları sırasıyla 8.81, 4.10 ve 0.07 mg GAE/g kuru madde olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmalar incelendiğinde, Bayram vd. (2022) kantaron bitkisinden biyoaktif bileşik ekstraksiyonu sırasında 10 farklı derin ötektik çözücü kullanmıştır. Sonuçlar su, etanol ve metanol ekstraktları ile karşılaştırılmıştır. TFB için en yüksek verim, etanol ve metanol ekstraktlarında elde etmişler fakat bireysel fenolik bileşikler incelendiğinde, klorojenik asit, kumarik asit, kuersetin ve rutin gibi bileşiklerin derin ötektik çözücüler kullanımıyla daha yüksek miktarda ekstrakte edilebildiğini bildirmişlerdir. Diğer bir çalışmada Wojeicchowski vd. (2021) biberiye bitkisinden fitokimyasal ekstraksiyonunda derin ötektik çözücülerini kullanmışlardır. Sonuçta HBD olarak asetik asit, laktik asit, etilen glikol ve 1,2-propandiol kullanılan çözücülerde TFB miktarı

açısından maksimum verim elde edilmiştir. Ayrıca çalışmada derin ötektik hazırlanırken sulu (%30 eklenmiş) ve susuz çözücüler kullanılmış ve su eklenerek hazırlanan derin ötektik çözücü ile %68 daha fazla miktarda TFB ekstraksiyonu sağlandığı rapor edilmiştir. Ek olarak Bubalo vd. (2016), derin ötektik çözücüler kullanarak en iyi ekstraksiyon yöntemi belirleme üzerine bir

çalışma yapmışlar ve ultrasonik destekli ekstraksiyonun mikrodalga destekli ve geleneksel yöntemlere göre daha olumlu etki sağladığını belirtmişlerdir. Sonuç olarak bu çalışmada, ışık köklerinden TFB ekstraksiyonunda organik çözücülere alternatif olarak yeşil çözücünün kullanımı (DES 1) uygun bulunmuştur.



Şekil 1. Farklı çözücüler ile elde edilen ekstraktların toplam fenolik bileşik (TFB) miktarları  
 Figure 1. Total phenolic compound (TPC) amounts of extracts obtained with different solvents

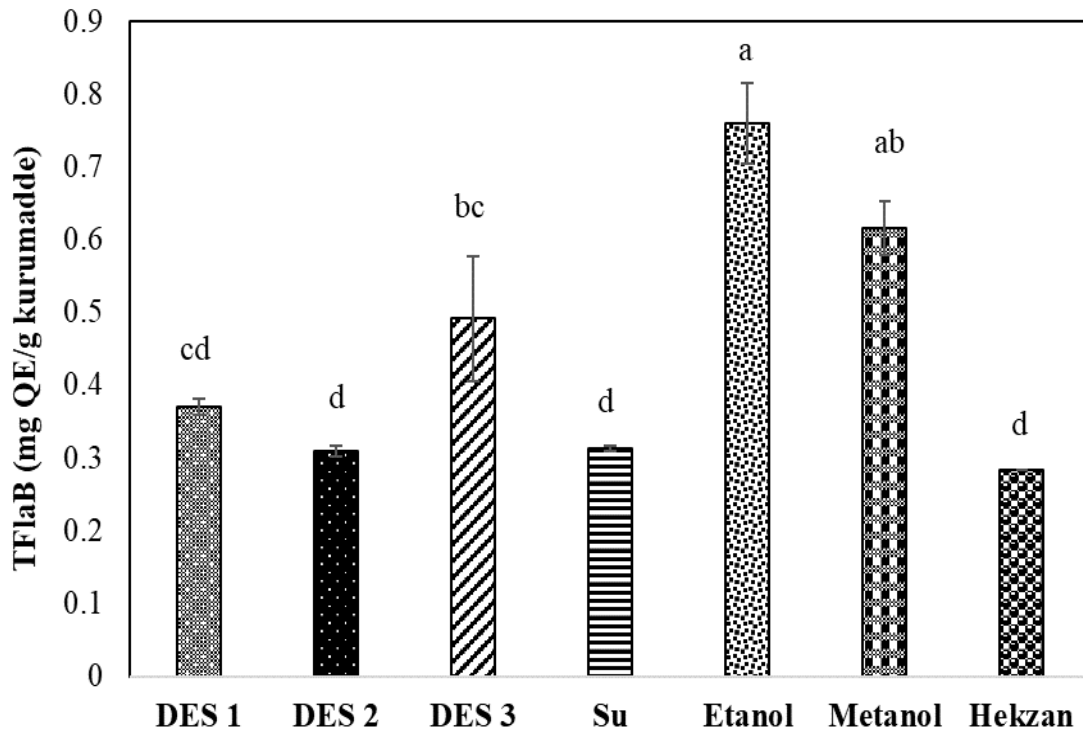
#### Çözücülerin toplam flavonoid bileşik üzerine etkisi

Farklı çözücülerin ışıkından toplam flavonoid bileşik (TFlaB) ekstraksiyonuna etkisi Şekil 2’de verilmiştir. TFlaB ekstraksiyonunda derin ötektik çözücülerin etkisi, TFB ekstraksiyonundaki gibi yüksek bulunmamıştır. En yüksek değer etanol ekstraktı ile 0.76 mg QE/g kuru madde olarak bulunmuştur. İkinci en yüksek değer metanol ekstraktında elde edilmiş olup (0.62 mg QE/g kuru madde), bu değer DES 3 ekstraktı (0.50 mg QE/g kuru madde) ile istatistiksel olarak benzer bulunmuştur ( $P > 0.05$ ). Derin ötektik çözücülerin molar oranının 1:3’den 1:2’ye düştüğünde TFlaB değerinde yaklaşık %37, 1:1’e

düştüğünde ise yaklaşık %25 oranında bir azalma görülmüştür. Molar oranın bu denli etkili olduğu başka çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin, Li vd. (2015), yeşil çay yapraklarından kateşin ekstrakte edebilmek için, bu çalışmada olduğu gibi farklı molar oranda (1:1, 1:2, 1:3, 1:4) kolün klorür:laktik asit ile oluşturulan derin ötektik çözücüler kullanmışlardır. Sonuçta molar oranın 1:1’den 1:2’ye çıkarıldığında ekstraksiyon veriminin arttığı ancak 1:2’den 1:4’e çıkarılmasıyla ekstraksiyon veriminin azaldığını rapor etmişlerdir. Bu durumun laktik asit oranına bağlı olarak viskozitenin değişmesi ve kütle transferini etkilemesinden kaynaklı olabileceği belirtilmiştir. Bu çalışmada DES 2, su ve hekzan ekstraktlarında

en düşük değerler elde edilmiş ve bu değerlerin istatistiksel olarak benzer olduğu saptanmıştır. TFlaB ekstraksiyonunda, derin ötektik çözücü başarısız gibi görünse de metanol kullanımı yerine DES 3'ün tercih edilebilirliği önerilmektedir. Bajkacz ve Adamek (2018) yaptıkları bir çalışmada, farklı HBD, HBA ve molar oranda 17 adet derin ötektik çözücü hazırlanmış ve 10 farklı materyalden (kızılcık, goji meyvesi, üzüm, erik, portakal kabuğu, soğan, brokoli, hardal, biberiye ve karabiber) flavonoid ekstraksiyonu gerçekleştirmişlerdir. En yüksek flavonoid ekstraksiyonu kolin klorür:laktik asit kombinasyonu ile elde edilmiştir. Fakat çalışmada

diğer organik çözücüler ile bir karşılaştırma yapılmamıştır. Zhao vd. (2015) flavonoid ekstraksiyonunda, alkol, asit veya amin bazlı derin ötektik çözücülerin verimlerinin, şeker bazlı derin ötektik çözücülerden daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Bunun nedeni olarak ise şeker bazlı derin ötektik çözücülerin daha yüksek viskoziteye sahip olduğunu ve kütle transferini sınırladığını belirtmişlerdir. Yu vd. (2022), derin ötektik çözücülerin etkinliğinin polariteye de bağlı olduğunu ve asit bazlı HBD'lerin yüksek polaritesinden dolayı polar bileşikler ekstrete etmek için daha uygun olduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 2. Farklı çözücüler ile elde edilen ekstraktların toplam flavonoid bileşik (TFlaB) miktarları  
Figure 2. Total flavonoid compound (TFlaC) amounts of extracts obtained with different solvents

#### Çözücülerin antioksidan aktivite üzerine etkisi

Farklı çözücülerin ışığın antioksidan aktivitesi üzerine etkisi Çizelge 2'de görülmektedir. Antioksidan aktivite değerleri 3 farklı yöntem (DPPH, FRAP ve CUPRAC) ile belirlenmiştir. DPPH değerleri değerlendirildiğinde, en yüksek değere DES 1 ve DES 2 ile erişilmiştir.

İstatistiksel olarak etanol, metanol ve DES 3 ekstraktları birbirine benzer bulunmuştur ( $P > 0.05$ ). En düşük DPPH değeri ise hekzan ile elde edilmiştir. En yüksek FRAP ve CUPRAC değerleri, DES 1, DES 3 ve etanol ekstraktlarında elde edilmiştir. Hekzan ise yine en düşük antioksidan aktiviteyi sağlamıştır. Benzer olarak derin ötektik çözücünün antioksidan aktivite

üzerine bu olumlu etkisi Wu vd. (2020) tarafından da kanıtlanmıştır. L-prolin ve gliserol ile oluşturulan derin ötektik çözücünün *Moringa oleifera* yapraklarından ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen antioksidan aktivite gösteren bileşiklerin miktarı, etanol ve su ile elde edilen değerlere göre daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada da olduğu gibi molar oranın DPPH üzerine etkili olduğu Zannou ve Koca (2020) tarafından da belirtilmiştir. Derin ötektik çözücülerini oluşturan bileşenlerin oranlarının, viskozitenin değişimi kavitasyonun etkisini geliştirerek güçlü H-bağ

etkileşimleri sağladıkları için biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunda önemli olduğu bildirilmiştir. Bayram vd. (2022) 10 farklı derin ötektik çözücü kullanarak kantaron bitkisinden antioksidan aktivite değerlerini CUPRAC ve ABTS yöntemi ile belirlemiş ve yapılan bu çalışmaya benzer şekilde kolin klorür:asetik asit kombinasyonu ile yüksek değerler elde edilmiştir. Sonuçlardan görüldüğü üzere yeşil çözücülerden biri olan derin ötektik çözücünün, antioksidan aktivite üzerine etkisi önemli bulunmuş ve organik çözücüler yerine kullanılabilirleri uygun görülmüştür.

Çizelge 2. Farklı çözücüler ile elde edilen ekstraktların antioksidan aktivite (DPPH, FRAP ve CUPRAC yöntemi ile) değerleri

Table 2. Antioxidant activity (by DPPH, FRAP, and CUPRAC method) amounts of extracts obtained with different solvents

Çözücü Solvent	DPPH (mg TE/g)	FRAP (mg TE/g)	CUPRAC (mg TE/g)
DES 1	0.857±0.02 <sup>ab</sup>	52.073±0.46 <sup>a</sup>	80.817±1.67 <sup>ab</sup>
DES 2	0.911±0.02 <sup>a</sup>	23.873±0.39 <sup>c</sup>	32.917±2.24 <sup>c</sup>
DES 3	0.799±0.06 <sup>bc</sup>	52.610±1.22 <sup>a</sup>	78.733±2.92 <sup>ab</sup>
Su	0.749±0.02 <sup>c</sup>	6.460±0.23 <sup>d</sup>	13.517±0.59 <sup>d</sup>
Etanol	0.818±0.00 <sup>abc</sup>	53.873±0.57 <sup>a</sup>	82.950±1.91 <sup>a</sup>
Metanol	0.853±0.01 <sup>abc</sup>	41.548±1.34 <sup>b</sup>	74.883±2.57 <sup>b</sup>
Hekzan	0.318±0.01 <sup>d</sup>	0.035±0.01 <sup>e</sup>	2.750±0.02 <sup>e</sup>

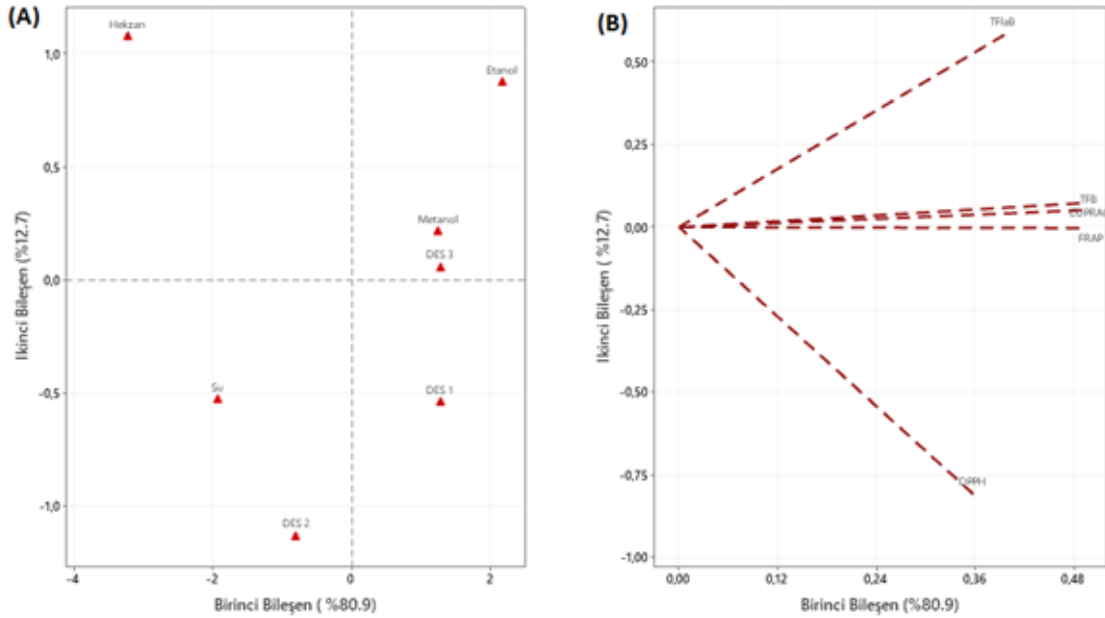
Aynı sütundaki farklı harflere ait (a, b, c, d, e) değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ( $P < 0.05$ )  
Values of different letters (a, b, c, d, e) in the same column are statistically different from each other ( $P < 0.05$ )

### Temel bileşen analizi

Temel bileşen analizi, genel olarak kullanılan bir veri sıkıştırma ve görselleştirme aracıdır (Karoui vd., 2010). Bu çalışmada farklı çözücüler kullanılarak hazırlanan ışkın ekstraktlarının biyoaktif bileşik analizlerinden elde edilen verileri sınıflandırmak ve elde edilen sonuçlar arasındaki farklılıkları/benzerlikleri yorumlamak için temel bileşen analizi gerçekleştirilmiştir. Temel bileşen analizi ile beş değişken (TFB, TFlaB, FRAP, CUPRAC ve DPPH) iki ana bileşene indirgenmiştir. Analiz sonucu elde edilen sonuçlar sırasıyla Şekil 3A ve Şekil 3B'de sunulmuştur. Birinci temel bileşen ve ikinci temel bileşen toplam varyansın sırasıyla %80.9 ve %12.7'sini açıklamaktadır. Elde edilen sonuçlar veri varyansının yüksek bir miktarının %93.6 temel bileşen analizi ile açıklandığını göstermiştir. Şekil

3A'da sol alt karede yer alan su ve DES 2 ekstraktları birinci ve ikinci temel bileşenle negatif, sol üst karede yer alan hekzan ekstraktı birinci temel bileşenle negatif ikinci temel bileşenle pozitif korelasyon göstermiştir. Sağ üst karede bulunan etanol, metanol ve DES 3 ekstraktları birinci ve ikinci temel bileşenle pozitif, sağ alt karede yer alan DES 1 ekstraktı ise birinci temel bileşenle pozitif ikinci temel bileşenle negatif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir. Şekil 3B'de görüldüğü üzere, DES 3'ün TFB, CUPRAC ve FRAP değişkenleri üzerine etkisi yüksek bulunmuştur. Özetle Şekil 3 A ve B'de sunulan veriler, Şekil 1, 2 ve Çizelge 2'de verilen sonuçları doğrulamaktadır. Sonuç olarak, organik çözücülere (etanol ve metanol) alternatif olarak DES 3 çözücüsünün kullanımı önerilmektedir.





Şekil 3. Temel bileşen analiz sonuçları A) İki temel bileşene ait skor grafiği B) İki temel bileşene ait yükleme grafiği

Figure 3. Principal component analysis results A) Score graph of two principal components B) Loading graph of two principal components

## SONUÇ

Çalışma sonucunda, etanol ve DES 1 ile en yüksek miktarda TFB ekstrakte edildiği tespit edilmiştir. Etanol ile 27.53 mg GAE/g kuru madde, DES 1 ile 26.40 mg GAE/g kuru madde elde edilmiş olup bu iki değer istatistiksel olarak birbirine benzer bulunmuştur. TFlaB verimi en yüksek etanol ile elde edilmiş olup ikinci en yüksek değer DES 3 ekstraktında saptanmıştır. Derin ötektik çözücünün molar oranı, 1:3'den 1:2'e düştüğünde TFlaB değerinde yaklaşık %37, 1:1'e düştüğünde ise yaklaşık %25 oranında bir azalma görülmüştür. En yüksek DPPH değerleri DES 1 ve DES 2 çözücülerinin kullanımıyla, en yüksek FRAP ve CUPRAC değerleri ise DES 1, DES 3 ve etanol çözücülerinin kullanımıyla elde edilmiştir. Temel bileşen analizi ile kullanılan çözücülerin ışkın ekstraktlarının biyoaktif içerik (toplam fenolik bileşik, toplam flavonoid bileşik, antioksidan aktivite) açısından benzerlik/farklılıkları değerlendirilmiş ve derin ötektik çözücülerden DES 3'ün etanole en yakın değerleri sağlayan çözücü olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, ışkından biyoaktif bileşik ekstraksiyonunda

organik çözücülere alternatif olarak derin ötektik çözücünün kullanımı uygun bulunmuştur.

## KAYNAKLAR

- Abbott, A.P., Capper, G., Davies, D.L., Rasheed, R.K., Tambyrajah, V. (2003). Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical Communications*, 1:70-71.
- Akkuş, Y. (2018). *Rheum ribes* (Işkın Otu)'nin Metanol Ekstresinin Düzenli Aerobik Yüzme Egzersizi Uygulanan Rat Dokularında Antioksidan ve Histopatolojik Etkileri. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi, Kış Sporları ve Spor Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, Türkiye s. 84.
- Alaadin, A.M., Al-Khateeb, E.H., Jäger, A.K. (2007). Antibacterial activity of the Iraqi *Rheum ribes* root. *Pharmaceutical Biology*, 45(9):688-690.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26):7970-7981.

- Apuhan, A.K., Beyazkaya, T. (2019). Bingöl'ün yenilebilir yabancı bitkilerinin gastronomi turizmüne etkisi üzerine bir araştırma. *Tourism and Recreation*, 1(1):31-37.
- Bajkacz, S., Adamek, J. (2018). Development of a method based on natural deep eutectic solvents for extraction of flavonoids from food samples. *Food Analytical Methods*, 11(5):1330-1344.
- Bao, J.S., Cai, Y.Z., Sun, M., Wang, G., Corke, H. (2005). Anthocyanins, flavonols, and free radical scavenging activity of chinese bayberry (*Myrica rubra*) extracts and their color properties and stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:2327–2332.
- Bayram, S., Kutlu, N., Gerçek, Y.C., Çelik, S., Bayram, N.E. (2022). Bioactive compounds of deep eutectic solvents extracts of *Hypericum perforatum* L.: Polyphenolic-organic acid profile by LC-MS/MS and pharmaceutical activity. *Food Bioscience*, 49:101926.
- Benzie, I.F., Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.*, 239(1):70-76.
- Bubalo, M. C., Ćurko, N., Tomašević, M., Ganić, K.K., Redovniković, I.R. (2016). Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 200:159-166.
- Chandra, S., Khan, S., Avula, B., Lata, H., Yang, M.H., ElSohly, M.A., Khan, I.A. (2014). Assessment of total phenolic and flavonoid content, antioxidant properties, and yield of aeroponically and conventionally grown leafy vegetables and fruit crops: a comparative study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014:253875.
- Chemat, F., Vian, M.A., Fabiano-Tixier, A.S., Nutrizio, M., Jambak, A.R., Munekata, P.E., Lorenzo, J.M., Barba, F.J., Binello, A., Cravotto, G. (2020). A review of sustainable and intensified techniques for extraction of food and natural products. *Green Chemistry*, 22(8):2325-2353.
- Cui, Y., Li, C., Yin, J., Li, S., Jia, Y., Bao, M. (2017). Design, synthesis and properties of acidic deep eutectic solvents based on choline chloride. *Journal of Molecular Liquids*, 236:338-343.
- Farzami Sepehr, M., Ghorbanli, M. (2002). Effects of nutritional factors on the formation of Anthraquinones in callus cultures of *Rheum ribes*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 68(2):171-175.
- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, 15(12):8813-8826.
- Inaltong, T. (2015). Türkiye'nin otları Erişim adresi: <http://www.turkishcuisine.org/ingredients-7/ingredients-used-inturkishcuisine-66/wild-greens-and-herbs-188.html>.
- Karoui, R., Downey, G., Blecker, C. (2010). Mid-infrared spectroscopy coupled with chemometrics: a tool for the analysis of intact food systems and the exploration of their molecular structure– quality relationships– a review. *Chemical Reviews*, 110(10):6144-6168.
- Keser, S., Keser, F., Karatepe, M., Kaygılı, O., Tekin, S., Turkoglu, I., Demir, E., Yilmaz, O., Kirbag, S., Sandal, S. (2020). Bioactive contents, in vitro antiradical, antimicrobial and cytotoxic properties of rhubarb (*Rheum ribes* L.) extracts. *Natural Product Research*, 34(23):3353-3357.
- Li, J., Han, Z., Zou, Y., Yu, B. (2015). Efficient extraction of major catechins in *Camellia sinensis* leaves using green choline chloride-based deep eutectic solvents. *RSC Advances*, 5(114):93937-93944.
- McDonald, S., Prenzler, P.D., Antolovich, M., Robards, K. (2001). Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*, 73(1):73-84.
- Munzuroğlu, Ö., Karataş, F., Gür, N. (2000). A study of the levels of vitamins A, E and C and selenium in rhubarb (*Rheum ribes* L.). *Turkish Journal of Biology*, 24(3):397-404.
- Panzella, L., Moccia, F., Nasti, R., Marzorati, S., Verotta, L., Napolitano, A. (2020). Bioactive phenolic compounds from agri-food wastes: An

- update on green and sustainable extraction methodologies. *Frontiers in Nutrition*, 7:60.
- Radošević, K., Bubalo, M.C., Srček, V.G., Grgas, D., Dragičević, T.L., Redovniković, I.R. (2015). Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 112:46-53.
- Reina, L.J.C., López, G.D., Durán-Aranguren, D.D., Quiroga, I., Carazzone, C., Sierra, R. (2023). Compressed fluids and Soxhlet extraction for the valorization of compounds from Colombian cashew (*Anacardium occidentale*) nut shells aimed at a cosmetic application. *The Journal of Supercritical Fluids*, 192:105808.
- Ruesgas-Ramón, M., Figueroa-Espinoza, M.C., Durand, E. (2017). Application of deep eutectic solvents (DES) for phenolic compounds extraction: Overview, challenges, and opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(18):3591-3601.
- Stalikas, C.D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30(18):3268-3295.
- Tang, B., Zhang, H., Row, K.H. (2015). Application of deep eutectic solvents in the extraction and separation of target compounds from various samples. *Journal of Separation Science*, 38(6):1053-1064.
- Welton, T. (2015). Solvents and sustainable chemistry. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 471(2183):20150502.
- Wojeicchowski, J.P., Marques, C., Igarashi-Mafra, L., Coutinho, J.A., Mafra, M.R. (2021). Extraction of phenolic compounds from rosemary using choline chloride-based deep eutectic solvents. *Separation and Purification Technology*, 258:117975.
- Wu, L., Li, L., Chen, S., Wang, L., Lin, X. (2020). Deep eutectic solvent-based ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from *Moringa oleifera* L. leaves: Optimization, comparison and antioxidant activity. *Separation and Purification Technology*, 247:117014.
- Xu, G.C., Ding, J.C., Han, R.Z., Dong, J.J., Ni, Y. (2016). Enhancing cellulose accessibility of corn stover by deep eutectic solvent pretreatment for butanol fermentation. *Bioresource Technology*, 203:364-369. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.002>.
- Yu, Q., Wang, F., Jian, Y., Chernyshev, V.M., Zhang, Y., Wang, Z., Yuan, Z., Chen, X. (2022). Extraction of flavonoids from Glycyrrhiza residues using deep eutectic solvents and its molecular mechanism. *Journal of Molecular Liquids*, 363:119848.
- Zainal-Abidin, M.H., Hayyan, M., Hayyan, A., Jayakumar, N.S. (2017). New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review. *Analytica Chimica Acta*, 979:1-23.
- Zannou, O., Koca, I. (2020). Optimization and stabilization of the antioxidant properties from Alkanet (*Alkanna tinctoria*) with natural deep eutectic solvents. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(8):6437-6450.
- Zhao, B.Y., Xu, P., Yang, F.X., Wu, H., Zong, M.H., Lou, W.Y. (2015). Biocompatible deep eutectic solvents based on choline chloride: characterization and application to the extraction of rutin from *Sophora japonica*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 3(11):2746-2755.
- Zhou, S., Fang, Z., Lü, Y., Chen, J., Liu, D., Ye, X. (2009). Phenolics and antioxidant properties of bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) pomace. *Food Chemistry*, 112:394-399.



## **SİYEZ KEPEĞİ EKŞİ HAMUR OPTİMİZASYONUNUN EKMEĞİN KALİTE VE BİYOAKTİF NİTELİKLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

**Fatmanur Örü, Müge Hendek Ertop\***

Kastamonu Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Kastamonu, Türkiye

Geliş / Received: 30.10.2022; Kabul / Accepted: 20.01.2023; Online baskı / Published online: 03.02.2023

Örü, F., Hendek Ertop, M. (2023). Siyez kepeği ekşi hamur optimizasyonunun ekmeğin kalite ve biyoaktif nitelikleri üzerindeki etkileri. *GIDA* (2023) 48 (1) 209-226 doi: 10.15237/ gida.GD22121

Örü, F., Hendek Ertop, M. (2023). Effect of the optimization of einkorn bran sourdough on the quality and bioactive properties of the bread. *GIDA* (2023) 48 (1) 209-226 doi: 10.15237/ gida.GD22121

### **ÖZ**

Siyez buğdayı (*Triticum monococcum*), ülkemizde özellikle Kastamonu ilinde yetiştirilen ve yaklaşık on bin yıl önce kültüre alınmış günümüz buğdaylarının atasıdır. Morfolojik yapısı itibarıyla diğer buğdaylardan farklı olarak kavuzuyla hasat edilmekte, kepek tabakası endosperme daha sıkı bağlı olduğundan diğer buğdayların işlendiği modern değirmenlerde öğütülememektedir. Bu nedenle hasadından sonra selektörden geçirme, kavuzdan ayırma işlemleri yapılmakta, tam buğday formunda değirmende kırıldıktan sonra elenerek kepek tabakası ayrılmaktadır. Nişastalı endospermce zengin %25 düzeyinde kepek değirmen atık/yan ürünü olarak ayrılmaktadır. Siyez kepeği iri taneli endosperm içermesi nedeniyle gıda sektöründe kullanım alanı bulamamakta ve hayvan yemi olarak değerlendirilmektedir. Bu çalışmada, buğday unu yerine siyez kepeğinden spontan fermentasyon ile üretilen ekşi mayanın ekmekte kullanımının optimizasyonu yapılmış, ekmeğin kalite ve biyoaktif nitelikleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Optimizasyon sonucu Hamur Verimi (HV):200 oranında hazırlanan siyez kepeği ekşi mayasının ekmekte %34.23 oranında kullanılması gerektiği buna karşılık formülasyondaki su oranının da %52.78 düzeyinde olması gerektiği belirlenmiştir. Üretilen optimize ekmeğin, ekmeğin buğday kepeği içerikli ekmeğe göre daha hacimli, yeme kalitesi, lezzet ve iç dokusu daha iyi olarak nitelendirilmiştir. Aynı zamanda fitik asit degradasyonu, mineral madde ve protein içeriğinde de artış tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Siyez, *Triticum monococcum*, ince kepek, ekşi hamur, ekmeğin

## **EFFECT OF THE OPTIMIZATION OF EINKORN BRAN SOURDOUGH ON THE QUALITY AND BIOACTIVE PROPERTIES OF THE BREAD**

### **ABSTRACT**

Einkorn (*Triticum monococcum*) is the ancestor of today's wheat, especially grown in Kastamonu province in Anatolia and cultivated about ten thousand years ago. Unlike other wheat types due to its morphological structure, it is harvested with its husk, and since the bran layer is more tightly bound to endosperm layer, it cannot be milled by modern mills where other wheats are processed. For this reason, after the harvest, the processes of passing through the selector, and separating from the husk are carried out, and after being crushed in the mill as whole wheat, it is sieved and the bran layer is separated. The branmass at the level of 25%, which is rich in starchy endosperm, is separated

\*Yazışmalardan sorumlu yazar /Corresponding author

✉ mugeertop@kastamonu.edu.tr

☎ (+90) 366 2802968

Fatmanur Örü; ORCID no: 0000-0001-7507-7115

Müge Hendek Ertop; ORCID no: 0000-0003-4300-7790

as a waste/by-product in the mill. Because einkorn bran contains coarse grained endosperm, it cannot be used in the food industry and is considered as animal feed. In this study, the use of sourdough produced by spontaneous fermentation from einkorn bran instead of wheat flour was optimized in bread and its effects on bread quality and bioactive qualities were investigated. As a result of the optimization, it was determined that einkorn bran sourdough prepared with the Dough Yield (DY):200 should be used at a rate of 34.23% in bread, where as the water rate in the formulation should be at the level of 52.78%. The optimized bread produced was characterized as more voluminous, better eating quality, flavor and crumb texture than bread containing wheat bran. At the same time, an increase in phytic acid degradation and mineral content was detected.

**Keywords:** Einkorn, *Triticum monococcum*, fine bran, sourdough, bread

## GİRİŞ

Arkeolojik bulgular, buğdayın ilk olarak Türkiye, Mısır, Etiyopya, Lübnan, Suriye ve İsrail'in bazı bölgelerinde ortaya çıktığını göstermektedir (Lev-Yadun vd., 2000). Türkiye'de siyez buğdayının geçmişi (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*) M.Ö. 9000 yıllarına kadar dayanmaktadır (Piperno vd., 2004). Diploid kabuklu bir buğday olan siyez, Şanlıurfa'nın Karacadağ ilçesinde yetiştirilen ilk buğday türüdür (Heunvd., 1997; Hidalgo ve Brandolini, 2014). Morfolojik yapısı itibarıyla diğer buğdaylardan küçük olan siyez, sıkı kavuz yapısı ve tek başakçıklı olması nedeniyle diğer buğdaylardan farklı olarak kavuzu ile birlikte hasat edilmektedir. Kepek tabakası (perikarp, testa ve aleuron) endosperm tabakasına (unun elde edildiği merkez kısım) daha sıkı bağlıdır ve günümüz buğdaylarından farklı olarak kepek tabakası oranı daha yüksektir (Hendek Ertop ve Atasoy, 2019). Bu morfolojik farklılıklar günümüz buğdaylarının işlendiği modern değirmenlerde siyez buğdayının işlenmesini, aynı ekipman/diyagramın kullanılmasını olanaksız kılmaktadır. Selektörden geçirilerek kirlilik unsurlarından ayrılan siyez buğdayına, mekanik çarpıtma ile merkezkaç prensibine dayalı kavuz soyma işlemini takiben, tam buğday formunda kırma işlemi yapılmakta, öğütme ile kepek fraksiyonu ayrılmaktadır. Tam tanenin kırılması temeline dayandığından, “siyez unu daima bir miktar kepek, siyez kepeği de daima bir miktar endosperm kalıntısı” içermektedir. Bu nedenle siyezün una işlenmesinde kepek/endosperm ayrımı tam olarak yapılamamakta, değirmende randıman %55 düzeyinde kalmakta, kepek olarak ayrılan fraksiyonda nişastalı endosperm kalmaktadır. Kastamonu ilinde değirmenlerde yapılan çalışmalar siyez için kurulan değirmen sistemlerinde yaklaşık %20 kavuz, %25 düzeyinde

de kepek yan/atık ürünü çıktığını göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda, siyezün yüksek yağ (%2.43-4.20), protein (%11.94-18.10) ve mineral madde (2.21-2.47) içeriğine sahip olduğu belirtilmiştir (Brandolini vd., 2008; Hidalgo ve Brandolini, 2012; Hidalgo ve Brandolini, 2014; Hendek Ertop ve Atasoy, 2019, Örü ve Hendek Ertop, 2021).

Ekmekçilikte kepek kullanımı yaygın ve eski bir uygulamadır ve Türk Gıda Kodeksi Ekmek tebliğinde “kepekli ekmek” tanımına göre, ekmek un ağırlığı üzerinden en fazla %30 kepek içermelidir. Sektörel olarak ince buğday kepeği kullanılmakta, genel olarak da ekmek hamuruna yoğurma sırasında direkt olarak ilave edilmektedir. Hamurun tekstürü ve su kaldırma oranı üzerinde de etki göstermektedir. Ekmekte kepek fraksiyonu kullanımı daha düşük hacim ve sıkı içyapı ile karakterize edilmektedir. Geleneksel ekmek yapım metodu olan ekşi maya (ekşi hamur) kullanımı ise Türk Gıda Kodeksi ekmek tebliğine 2012 yılında dahil edilmiştir. Sıvı ön ferment, spontan fermantasyon veya starter ilaveli fermantasyon gibi çeşitleri olan bu yöntem bir miktar hamurun ekşitilmesi metoduna dayanmakta, temel olarak hamurda laktik asit fermantasyonunu 1/100 oranında maya/laktik asit bakteri mikrobiyotası oluşturmaktadır (Gobbetti vd., 1994). Maya popülasyonunun büyük bölümünün *Saccharomyces cerevisiae* olduğu (Salovaara ve Savolainen, 1984), bakterilerin çoğunun ise *Lactobacillus* cinsine ait türler olduğu bilinmektedir (Corsetti ve Settanni, 2007).

Yapılan çalışmalar, spontan fermantasyon olarak bilinen çok kademeli geleneksel ekşi maya üretiminde kepek kullanımının buğdayın dış katmanlarından gelen laktik asit bakterileri

sayesinde fermantasyonu zenginleştirdiğini, asitliği arttırdığını hem ekşi maya kütlelerini hem de kullanıldığı ekmek lezzet profilini daha çok zenginleştirdiğini ortaya koymaktadır (Katina vd., 2006). Ayrıca kepekli gıdalar kalsiyum (Ca), potasyum (K), magnezyum (Mg), demir (Fe), çinko (Zn) gibi mineraller açısından iyi bir kaynaktır. Diğer taraftan buğdayın dış katmanlarına doğru artan fitik asit, miyoinositol heksafosfat yapısı ile bu minerallerin biyoyararlanımını sınırlandırabilmektedir (Poutanen vd., 2009). Ancak ısıtma işlemi, ıslatma, çimlendirme gibi işlemlerin yanı sıra, çok kademeli fermantasyon da önemli bir fitik asit degradasyon prosesi olarak bilinmekte ve fermantasyonla gelişen asitlik ve endojen enzim aktivitesindeki artış antinutrientlerin yıkımında önemli bir araç olmaktadır (Hendek Ertop ve Bektaş, 2018). Yapılan bir araştırmaya göre kepeğin laktik asit bakterileri (LAB) tarafından ön fermantasyonu fitat parçalamasını %90'a kadar arttırmakta ve bu artış özellikle Mg ve P çözünürlüğünde olmaktadır (Poutanen vd., 2009). Ekşi hamur fermantasyonu, tam tahıl unlarının mineral çözünürlüğüne etkili, ancak yalnızca kepek kullanımı durumunda daha az etkilidir (Lioger vd., 2007). Bu durumda ekmek hamuruna direkt kepek fraksiyonu ilave etmek yerine fermente etmek, fitik asit degradesyonu ve buna bağlı mineral biyoyararlanımının artışı açısından önem taşımaktadır.

Bu çalışmada siyez kepeğini fermente ekşi hamura dönüştürüp, kepek içinde kalan unsu endospermin laktik asit bakterilerince fermantasyonu, diğer taraftan fermantasyonla siyez kepeğinin sindiriminin artırılması, irmiğimsi büyük partiküllerin fermantasyon sırasında şişip yumuşayarak hamur içerisinde tekstürel olarak hissedilmeyecek ekmek dokusuyla uyumlu yapıya getirilmesi hedeflenmiştir. Böylece siyez buğdayını una işleyen fabrikalarda önemli bir atık ürün olarak çıkan siyez kepeğini çalışmamızın olası olumlu sonuçları neticesinde sektöre yeni bir ekşi maya hammaddesi olarak kazandırılması hedeflenmiştir. Daha önce siyez buğday kepeği ve buğday kepeklerinin ekşi hamur üretimi ve koşulları hakkında yapılan bir çalışmada (Örü ve Hendek Ertop, 2021), daha az su absorbe etmesi nedeniyle buğday unu için tavsiye edilen (Chavan

ve Chavan, 2011) Hamur Verimi (HV):200 düzeyinde siyez kepeğinden ekşi maya üretiminin mümkün olduğu belirlenmiş, ince buğday kepeği ise yüksek oranda su çektiğinden dolayı en düşük HV:300 oranında ekşi maya hazırlanabileceği tespit edilmiştir. Bu çalışmada, önceki bulgularımızdan yola çıkarak HV:200 oranında hazırlanan siyez kepekli ekşi hamurun buğday ekmeği üretiminde kullanımı Yüzey Yanıt Metodu ile optimize edilmiştir. Endüstriyel olarak kullanımı genel kabul görmüş ekmeklik buğday kepeğine alternatif olarak, teknolojik nedenle önemli düzeyde atık olarak ortaya çıkan endosperm fraksiyonu da içeren siyez kepeğinin ekşi hamur üretiminde kullanımının sektör için bir alternatif olacağı düşünülmektedir. Hem ekşi maya üretimi için sektöre, hem de günümüz tüketicilerinin katkısız, fonksiyonel hammadde ve ürün beklentilerine de önemli bir alternatif sunulması hedeflenmiş, diğer taraftan yüksek miktarlarda çıkan değirmencilik atık/yan ürününün fermantasyonla insan beslenmesinde kullanılabilir forma dönüştürülmesi amaçlanmıştır.

### MATERYAL VE YÖNTEM

Ekşi maya üretiminde kullanılacak siyez ve ekmeklik buğday kepekleri Üçbaşak un fabrikasından (Devrekani, Kastamonu, Türkiye) 2019 yaz döneminde hasat edilmiş buğdaylardan temin edilmiştir. Ekmek üretiminde kullanılacak buğday unu (Bizim Un, Yıldız Holding, Türkiye) (Rutubet %10.59±0.33, kül %0.56±0.06, protein %11.97±0.17, %1.32±0.09, karbonhidrat %64.57), tuz ve instant aktif kuru maya (DrOetker) yerel bir marketten temin edilmiştir.

### Hamur Verimi

Ekşi hamur yapımında performansı etkileyen önemli faktörlerden bir tanesi de un/su oranıdır ve Hamur Verimi (HV) değeri ile ifade edilir. Un ile yapılan çalışmalarda;

$$HV = \frac{(Kullanılan su miktarı + Kullanılan un miktarı)}{Kullanılan un miktarı} \times 100 \quad (1)$$

formülü (1) ile hesaplanan HV=200 değeri en iyi sonuçları verdiği belirtilmektedir (Chavan ve Chavan, 2011).Daha önce yaptığımız bir çalışma

sonucu (Örü ve Hendek Ertop, 2021) yüksek miktarda nişastalı endosperm içeren siyez kepeğiyle de HV:200 (kepek 100 g, su 100ml) oranında ekşi hamur yapılabildiği belirlenmişti. Ancak ekmeklik buğday kepeği düşük nişasta ve yüksek lif içeriği nedeniyle daha fazla su kaldırdığından bu çalışmada HV:400 (kepek 100 g, su 300 ml) oranı ile hazırlanmıştır.

### Spontan Fermantasyonla Ekşi Maya Üretimi

Bu amaçla 100 g kepek, 100 mL (HV:200 için) su ile homojen karışım yapılarak soğutmalı inkübatörde (JSR, Kore) 26 °C'de (Chavan ve Chavan, 2011) fermantasyona bırakılmıştır. Çok aşamalı standart ekşi hamur üretiminde, hamurun iki veya üç defa yenilenmesi (Hansen, 2012), ve pH 4.0-4.5 düzeyinde olması istendiğinden 24 saat aralıkla kepek ekşi mayalarının pH değişimleri tespit edilmiştir. 24 saatlik fermantasyon sonrası HV oranının (200 için) bozulmaması için tekrar 100 g kepek ve 100 mL su ilave edilip karışım yenilenerek, 26 °C de fermantasyona bırakılmıştır. Bu işlem 48.saat'te tekrar edilerek, fermantasyona 72 saat süreyle devam edilmiştir.

### Ekmek Yapımı

Genel olarak siyez buğdayının yüksek proteinli ve diploit kabuklu bir buğday türü olması nedeniyle ekmeklik buğday (*Triticum aestivum*)'dan farklı protein yapısıyla ekmek üretimi için uygun olmadığı ve kullanılabilmesi için farklı ekmek yapım aşamalarının kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi gerektiği yapılan çalışmalarda belirtilmektedir (Hidalgo ve Brandolini, 2011). Bu çalışmada kullanılan ekşi hamur siyez kepeğinden üretildiğinden, bazı ön denemeler yapılmıştır. Direkt hamur metodu (Elgün ve Ertugay, 2011) kullanılarak buğday unu (160 g), tuz (kuru madde üzerinden %1.5 tuz), instant aktif kuru maya (1.76 g) ve deneysel dizaynda önerilen oranlarda ekşi hamur ve su kullanılmıştır. Ekşi hamur kullanımının optimize edildiği farklı çalışmalarda un miktarı üzerinden instant aktif kuru maya kullanımı ort.%1.1 oranında önerilmiştir (Hendek Ertop ve Şeker, 2018; Hayta ve Hendek Ertop, 2019). Hammaddeler bir arada 12 dak yoğurularak (Arçelik), 15 dak kitle fermantasyonu (%75 bağıl nem), şekil verme, 20 dak tava fermantasyonu

(37.5 °C'de, %75 bağıl nem) ve 180 °C'de 35 dak pişirme aşamaları uygulanmıştır.

### Ekşi Maya Kullanım Oranının Yüzey Yanıt Metodu ile Optimizasyonu

#### Deneyel Dizayn

Bu çalışmadaki amaç Siyez kepeğinden üretilen ekşi mayanın, en iyi kalite parametrelerine sahip ekmek üretim formülündeki kullanım miktarını tespit etmek olduğundan “ekşi maya oranı” ve “su kullanım oranı” YYM için etkili “değişken faktörler” olarak belirlenmiştir. Çalışmada Çizelge 1'deki değişken faktör seviyeleri kullanılmıştır. Ekşi maya için ön görülen Hamur Verimi (HV):200 olduğundan ekşi maya kullanıldığı miktarın %50'si kadar suyu da beraberinde hamura taşıyacaktır. Ayrıca siyez normal ekmeklik buğday ununa göre (%60 su kaldırma) daha düşük su kaldırma kapasitesine sahip olduğu da göz önünde bulundurularak deneysel tasarımdaki su oranları %50-56 arasında alınarak deneme deseni oluşturulmuştur. Ekmek yapımında diğer bağımsız faktör ekşi maya kullanım oranı ise en fazla %60 olarak sınırlandırılmıştır ki (un ağırlığı üzerinden), bu durumda ekşi hamurdan gelecek %30 kepek miktarı ile hazırlanacak ekmek, Türk Gıda Kodeksi Ekmek tebliği kepekli ekmek tanımına uygundur. Her iki bağımsız faktörün, Hacim(H), Kabul edilebilirlik (KE) ve Gözenek Faktörü (GF) üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla Yüzey Yanıt Metodu (YYM), Merkezi Bileşen Deneme Desenine göre hazırlanan (Çizelge1) ve Design Expert 7.0.0 paket programı ile hazırlanan deneme deseni kullanılmıştır.

Çizelge 1.Değişken faktör (ekşi maya ve su miktarı) seviyeleri

Table 1. The levels of variable factors (amounts of sourdough and water)

Seviye no Level	Ekşi maya Sourdough %	Su * Water %
-1,68	<b>0.00</b>	<b>50.00</b>
-1	8.79	50.88
0	30.00	53.00
1	51.21	55.12
1,68	<b>60.00</b>	<b>56.00</b>

\*Kullanım oranları 100 g un üzerinden verilmiştir.

\*Usage rates are given on 100 g flour basis

### Ekmek Örneklerinde Hacim, Kabul Edilebilirlik ve Gözenek Analizi

Numunelerin hacim ve spesifik hacimleri için pişirme sonrası 1 saat oda koşullarında soğutulan numunelerde, kolza tohumuyla yer değiştirme esasına dayalı yöntem kullanılarak hacim belirlenmiştir. Ayrıca numunelerin spesifik hacimleri aşağıdaki formülle (2) tespit edilmiştir (Hayta ve Hendek Ertop, 2019).

$$\text{Spesifik hacim (mL/g)} = \frac{\text{Numune hacmi}}{\text{Numune ağırlığı}} \quad (2)$$

Ekmek örneklerinin Kabul Edilebilirlik değerleri, duyu analizi ile panelistler tarafından belirlenmiştir (Özkaya, 1998). Bu formda, hazırlanan ekmeğe örneklerine rastgele farklı kodlar (Altuğ Onoğur ve Elmacı, 2011) atanmıştır. Panelistler, ekmeği Çizelge 2’de verilen özelliklere göre değerlendirmişlerdir.

Puanlama için 1’den (hiç beğenmedim) 5’e kadar (çok beğendim), 5 puanlı hedonik skala kullanılmıştır. Numunenin her özellik açısından aldığı puanlar toplanmış, ortalaması alınarak Kabul Edilebilirlik puanı hesaplanmıştır. Kastamonu Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesinden sigara içmeyen, ekmeği tüketimini seven öğretim üyeleri ve öğrencilerinden seçilen panelistler, duyu değerlendirme formunu (Çizelge2) kullanmışlardır. Her bir duyu değerlendirme niteliği, Çok beğendim:5 puan, Beğendim:4 puan, Orta derecede beğendim:3 puan, Az beğendim:2 puan, Hiç beğenmedim:1 puanı ifade edecek şekilde değerlendirilmiştir. Ekmek örneklerinin iç Gözenek Analizleri ise görüntü işleme tekniğine dayanan yöntemle Hendek Ertop ve Coşkun, (2018)’a göre yapılmıştır. Görüntülerin işlenmesinde Image Proplus 6.0 yazılımı kullanılmıştır.

Çizelge 2. Duyusal değerlendirmede kullanılan ekmeğe kalite özellikleri

Table 2. Bread quality characteristics used to sensory evaluation

Dış özellikler <i>Crust properties</i>	Ekmeğin kabuk rengi <i>Crust color</i>	Her tarafı aynı renkte olmalı, açık, koyulu, benekli olmamalıdır <i>It should be in the same color, it hasn't got light or dark spotted</i>
	Şekil simetrisi <i>Shape symmetry</i>	Düzgün ve simetrik olmalı, basıklık ve çökme olmamalı <i>It should be smooth and symmetrical, there should be no collapse</i>
	Pişme düzgünlüğü <i>Baking uniformity</i>	Tüm yüzeyler düzgün ve eşit kızarmış olmalı <i>All surfaces should be evenly baked</i>
İç özellikler <i>Crumb properties</i>	Kabuk özellikleri <i>Crust attributes</i>	İnce ve kolay parçalanabilir olmalı <i>It should be thin and easily crumble</i>
	Gözenek yapısı <i>Pore homogeneity</i>	Küçük, ince, homojen olmalı <i>It should be small, thin, homogeneous</i>
	İç rengi <i>Crumb color</i>	Kendine özgü ve uniform renkte olmalı <i>It should be uniform in color</i>
	Aroma ve tat <i>Flavor and taste</i>	Kendine özgü olmalı, aşırı ekşi, mayalanmış, yavan veya yabancı tat ve kokuya sahip olmamalı <i>It should not have excessive sour, fermented, bland or foreign taste and odor</i>
	Çiğneme özellikleri <i>Chewing attribute</i>	Hamurumsu ve yapışkan olmamalı <i>It should not be pasty and sticky</i>
	Yapı <i>Crumb texture</i>	Hamurumsu, ıslak, çok kuru, ufalanan yapıda olmamalı, yumuşak ve kadifemsi olmalı <i>It should not be pasty, wet, very dry or crumbly</i> <i>It should be soft and smoothy</i>



### Temel Bileşen Analizleri

Numunelerinden 5 g tartılarak önceden 130 °C'de kurutulmuş darası alınmış kaplara konulmuştur. Etüvde 105 °C'de 12 saat kurutulduktan sonra, kurumadan önceki ve sonraki değerlerin kullanımıyla nem miktarı hesaplanmıştır (AACC Metod 44-19, 1990). Kepek örneklerin kül fırınında 600 °C'de beyaz kül oluşup sabit tartıma gelene kadar yakılmasıyla kül miktarı (%) belirlenmiştir (AACC Metod 08-03, 1990). Kjeldahl yöntemine göre yarı otomatik protein tayin cihazı kullanılarak kepek örneklerinin toplam azot içerikleri tespit edilmiş (AACC Metod 46-12, 1990), sonuçların ifadesi için 5.7 çevirme faktörü ile çarpılmıştır. Soxhlet yöntemi kullanılarak örneklerin toplam yağ içerikleri (AACC Metod 30-25.01, 1990) belirlenmiştir. Tüm değerler 2 paralel olarak çalışılmıştır. Yağ, rutubet, kül ve protein içerik toplamının 100'den çıkartılması ile genel karbonhidrat içeriği hesaplanmıştır. 10 g örnek erlen içine tartılarak, üzerine 100 mL saf su ilave edilerek homojen bir karışım elde edilinceye kadar karıştırılmıştır. Üzerine etil alkolde %3'lük hazırlanmış fenoltalein indikatöründen 3-4 damlatılarak 0.1 N NaOH ile açık kırmızı/pembe renk 1 dak sabit kalıncaya kadar ve pH 8.6 limit olarak kabul edilerek titre edilmiştir.

### Fitik Asit Tayini

Haug ve Lantzsch, (1983) tarafından kullanılan metod uygulanmıştır. 0.06 g örnek 10 ml 0.1 N HCl ile 1 saat çalkalayıcıda çalkalanarak ve toplamda 24 saat aynı kapta bekletilerek ekstrakte edilmiştir. Optik yoğunluk spektrofotometrede 510 nm dalga boyunda yapılmıştır. Kalibrasyon grafiğinin hazırlanmasında fitikasitin sodyum tuzu (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>24</sub>P<sub>6</sub>Na<sub>12</sub>) referans olarak kullanılmıştır. Stok çözelti 0.15 g sodyum fitatın 10 ml saf suda çözündürülmesi ile hazırlanmış, referans solüsyon ise stok solüsyonun HCl ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır (3 ila 30 mikrogram arasındaki).

### Biyoyararlanım

Örnek üzerine 25 mL pepsin çözeltisi (0.03 N HCl + 2 g pepsin) ilave edilip çalkalamalı inkübatörde 37°C'de 3 saat tutulmuş, süre sonunda her bir örnek standart külsüz filtre kâğıdından süzümüştür. Filtre kâğıdında kalan

kısım filtre kâğıdı ile birlikte kül fırınında yakılarak kül miktarı belirlenmiştir. Bulunan değer toplam kül miktarından çıkarılarak sindirilebilir kül miktarı bulunmuştur. Bu değerler kullanılarak aşağıdaki formüle göre mineral biyoyararlanım diğer bir ifadeyle Kül Sindirilebilirlik Oranı (KSO) hesaplanmıştır (3) (Saharan vd., 2001; Bilgiçli ve Türker, 2004; Bilgiçli vd., 2006).

$$KSO(\%) = \frac{\text{Sindirilebilir Kül Miktarı}}{\text{Toplam Kül Miktarı}} \times 100 \quad (3)$$

### Mineral Madde Kompozisyonu

Ön yakma işlemi için HNO<sub>3</sub> (67 % v/v) ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanılmıştır. İçerisinde farklı elementler bulunan standart stok çözeltisi kalibrasyon standartlarının hazırlanmasında kullanılmıştır. Örnekler mikrodalga yakma sistemi (Milestone MLS 1200, İtalya) kullanılarak yakılmış, bunun için %1±0.1 hassasiyette küçük parçalar halinde sistemin teflon şişelerin içerisine tartılıp, üzerine HNO<sub>3</sub> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edilmiştir. Ağzuları kapatılarak sisteme yerleştirilen şişelere ön yakma (oda sıcaklığında) 15 dk., yükselme (1200 W'a 150 °C), 10 dk sabit tutma (1200 W'da 150 °C'de), soğutma (30 dk) 250W yakma programı uygulanmıştır. Örnek çözeltiler oda sıcaklığına soğutulduktan sonar mineral içeriğin tespiti indüktif olarak eşleşmiş plazma optik emisyon spektrometresi (ICP-OES) ile gerçekleştirilmiştir.

### İstatistiksel Analiz

Çalışmada, temel bileşen analizleri 2 paralel, mineral madde içerikleri 3 paralel olarak ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar ortalamaya±standart sapma olarak verilmiştir. Analiz sonuçlarına ait verilerin karşılaştırılmasında SPSS 17.0.1 programı (SPSS Inc., Chicago, Illinois, US); çoklu veriler için ANOVA testi; ikili karşılaştırmalarda ise student-t testi (P< 0.05) kullanılmıştır.

### SONUÇ VE TARTIŞMA

Yazılım programının Merkezi Deneme Deseninin öngördüğü bağımsız faktörlerin seviyeleri deneme dizaynına göre uygulanmış, elde edilen 13 ekmek örneğinde yanıt olarak Kabul Edilebilirlik (KE), Spesifik Hacim (H) ve Gözenek faktörü (GF) değerleri belirlenmiştir (Çizelge 3). Yanıtlar, Design Expert programı ile analiz edilerek hangi fonksiyonun önerildiği belirlenmiştir.

## Ekmek üretiminde siyez kepekli ekşi hamur optimizasyonu

Çizelge 3. Bağımsız faktörlerinin (ekşi maya ve su miktarı) optimizasyonu için elde edilen yanıt değerleri (KE, SH ve GF)

Table 3. Response values (KE, SH and GF) obtained for the optimization of the independent factors (amount of sourdough and water)

Deneme Run	Faktör 1 Ekşi maya Factor1 Sourdough%	Faktör 2 Su Factor 2 Water %	Yanıt 1 Kabul edilebilirlik Response1 Acceptability	Yanıt 2 Spesifik hacim Response2 Specific volume	Yanıt 3 Gözenek faktörü Response3 Pore factor
1	60.00	53.00	3.29	2.65188	373
2	30.00	53.00	3.92	2.95888	602
3	30.00	50.00	3.73	2.81505	595
4	30.00	53.00	3.35	2.94084	525
5	30.00	53.00	3.54	3.04969	504
6	0.00	53.00	2.87	3.05152	490
7	30.00	53.00	4.09	3.14728	658
8	51.21	55.12	3.35	2.92903	446
9	30.00	53.00	3.73	3.00533	516
10	30.00	56.00	3.16	2.98203	504
11	8.79	50.88	3.04	3.18694	832
12	8.79	55.12	3.03	3.27685	794
13	51.21	50.88	3.71	2.77354	515

Çizelge 3'teki veriler Design Expert programı tarafından işlenip, uygun fonksiyonun belirlenmesi yapılırken; SH, GF ve KE bağımsız faktörleri için "Ardışık Model Kareler Toplamı (Tip I)" ve "Model Uyumsuzluğu" testleri yapılmış ve her bir fonksiyon için standart sapma,  $R^2$ , düzeltilmiş  $R^2$

ve öngörülen  $R^2$  değerleri göz önünde bulundurulmuştur. Bu değerler yazılım tarafından karşılaştırılarak önerilen fonksiyon program tarafından belirlenerek her bir fonksiyon için istatistiksel parametreler hesaplatılmıştır (Çizelge 4).

Çizelge 4. Optimizasyonun istatistiksel parametreleri; Model seçimi ve Model uyumsuzluğu testi için belirlenen  $p$  değerleri; model ve bağımsız değişken faktörler için belirlenen  $p$  değerleri (a), Quadratic fonksiyon için varyans analiz sonuçları (b)

Table 4. Statistical parameters of optimization;  $p$  values for model selection and lack of fit tests; model and independent variable factors (a), variance analysis results for Quadratic function (b)

		P-değerleri* P-values*		
		KE	SH	GF
Model seçimi Model selection	Quadratic	<b>0.0223</b>	0.5941	0.6239
	Lineer	0.1795	<b>0.0021</b>	<b>0.0486</b>
	Cubic	0.7449	0.8681	0.3817
	Model uyumsuzluğu	<b>0.9113</b>	<b>0.2888</b>	<b>0.1195</b>
Model ve bağımsız değişken faktörler Model and independent factors	Model	0.0352	0.0021	0.0486
	A-Ekşi maya	<b>0.0495</b>	<b>0.0009</b>	<b>0.0197</b>
	B-Su	0.1216	0.1238	0.4495
	AB	0.4827	-	-
	A <sup>2</sup>	0.0093	-	-
	B <sup>2</sup>	0.1739	-	-

a

Yanıt Response	KE	SH	GF
R <sup>2</sup>	0.77	0.71	0.46
Intercept	+3.73	+2.98	565.69
A-Ekşi maya, % A-Sourdough, %	+0.20	-0.17	-103.81
B-Su, % B-Water, %	-0.15	+0.06	-29.46
AB	-0.088	-	-
A <sup>2</sup>	-0.32	-	-
B <sup>2</sup>	-0.14	-	-

b

\*  $p < 0.05$  istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermektedir

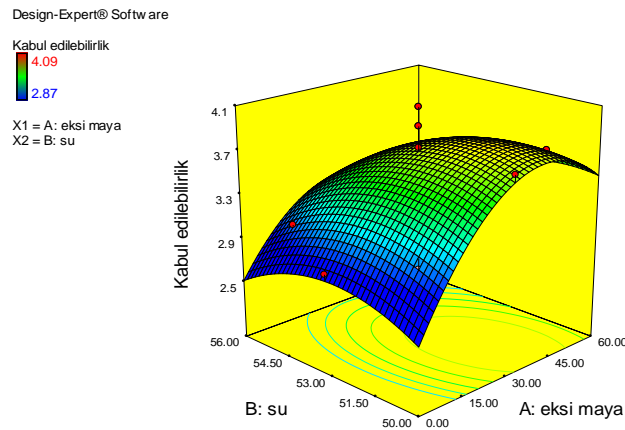
\*\*SH: Spesifik Hacim; GF: Gözenek faktörü; KE: Kabul edilebilirlik

\*\*SH: *Specific volume*; GF: *Pore Factor*; KE: *Acceptability*

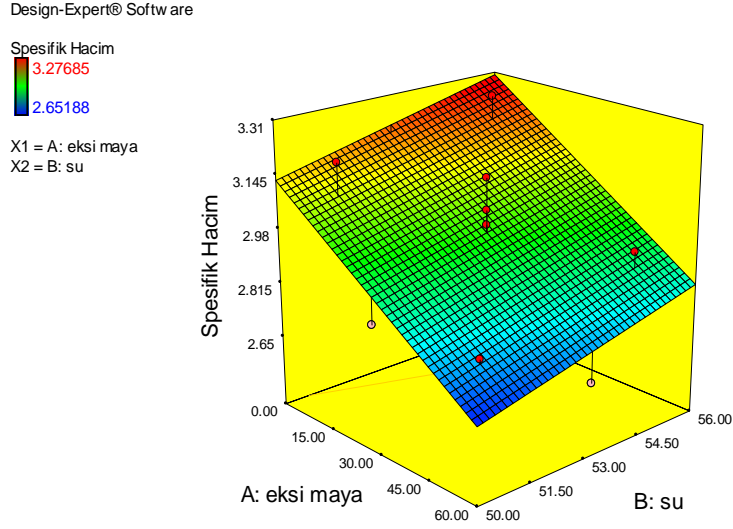
Önerilen fonksiyonların hangisinin en iyi modelleme yaptığı ANOVA ile değerlendirilmiş, en iyi modellemeyi yapan fonksiyon seçilirken; her model için en düşük  $P^*$  değerine sahip olması ( $P < 0.05$ ) yani önem düzeyinin en yüksek olması, “model uyumsuzluğu” değerinin önemli olmaması ( $P > 0.05$ ), bütün model terimlerine ait değerlerin ( $\text{Prob} > F$ )  $< 0.05$  olması, korelasyon katsayısının ( $R^2$ )  $\sim 1$  olması, varyasyon katsayısı (C.V%) minimum olması göz önünde bulundurulmuştur. Çizelge 4 (a)’da görüldüğü gibi bu çalışmada KE için Quadratic, SH ve GF için Linear model önemli ( $P < 0.05$ ), bu modeller için de “model

uyumsuzluğu” değerleri uygun ( $P > 0.05$ ) bulunmuştur. Ayrıca “ $\text{Prob} > F > 0.050$ ” değerine sahip parametreler önemsizdir. Bu durumda, KE, SH ve GF yanıtları için Siyez ekşi mayası (A) kullanım faktörü önemli ( $P < 0.05$ ) bulunurken, Su miktarı (B) faktörü önemsiz ( $P > 0.05$ ) olarak bulunmuştur.

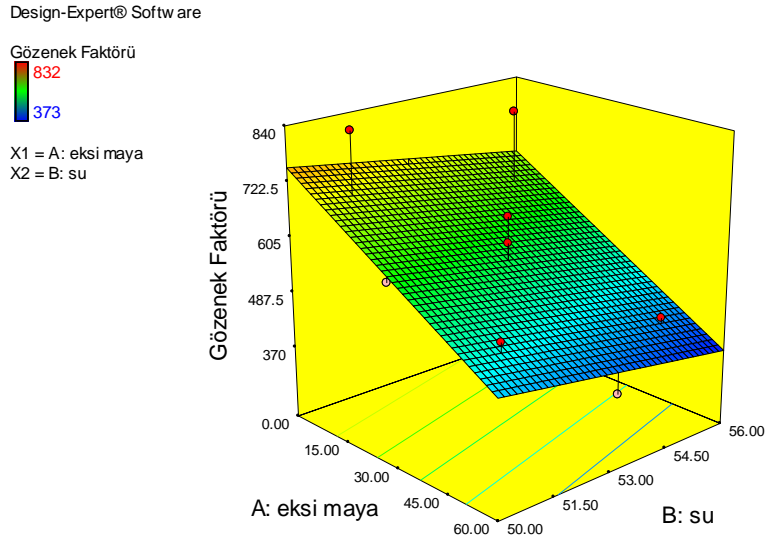
Sistemi modelleyen en iyi fonksiyon ve faktörlere ait program tarafından katsayılar belirlendikten sonra (Çizelge 4), üç boyutlu yüzey yanıt grafikleri, yazılım programı aracılığıyla elde edilmiştir (Şekil 1, Şekil 2, Şekil 3)



Şekil 1. Siyez kepeği ekşi mayası (A) ve Su miktarı (B) bağımsız değişkenleri kullanım oranı parametrelerinin ekmek Kabul Edilebilirlik yanıtına etkisini gösteren yüzey yanıt grafiği  
Figure 1. Response surface plot showing the mutual effect of the amount of einkorn bran Sourdough (A) and Water (B) on Bread Acceptability Response



Şekil 2. Siyez kepeği ekşi mayası (A) ve Su miktarı (B) bağımsız değişkenleri kullanım oranı parametrelerinin ekmek Spesifik Hacim yanıtına etkisini gösteren yüzey yanıt grafiği  
Figure 1. Response surface plot showing the mutual effect of the amount of einkorn bran Sourdough (A) and Water (B) on Bread Specific Volume response



Şekil 3. Siyez kepeği ekşi mayası (A) ve Su miktarı (B) bağımsız değişkenleri kullanım oranı parametrelerinin ekmek Gözenek Faktörü yanıtına etkisini gösteren yüzey yanıt grafiği  
Figure 1. Response surface plot showing the mutual effect of the amount of einkorn bran sourdough (A) and Water (B) on Bread Pore Factor response

Optimizasyonun amacı; istenilen cevabın elde edilmesini sağlayacak parametrelerin kesin değerlerinin belirlenmesini sağlamaktır. Bu çalışmada Desing Expert programıyla sayısal optimizasyon kullanılmış ve optimizasyon kriterleri olarak da Siyez kepeği ekşi mayası kullanım oranı (A), Su oranı (B) faktörleri ile Spesifik Hacim (SH), Gözenek Faktörü (GF) ve Kabul Edilebilirlik (KE) yanıtları “aralıkta” (in range) olarak seçilmiş ve programdan çözümler istenmiştir. Tüm yanıt (SH, GF, KE) değerleri program tarafından bir arada değerlendirilmiş, “İstenirliği=1” (Desirability=1) olan 30 adet çözümden birinci çözüm program tarafından önerilmiş ve kullanımına karar verilmiştir.

Önerilen optimizasyon sonucuna göre %34.23 siyez kepeği ekşi hamuru, %52.78 su kullanılması durumunda 3.77 Kabul Edilebilirlik %2.94 Spesifik hacim, 548.12 Gözenek faktörü elde edilmesi öngörülmüştür.

### Optimizasyon Sonuçlarının Deneysel Doğrulaması

Optimizasyon neticesinde önerilen % 34.23 siyez kepeği ekşi mayası ve % 52.78 su kullanım değerleri ile ekmek üretimi 3 paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Ekmeğe ait SH, GF ve KE sonuçları belirlenmiştir. Tespit edilen sonuçlar Çizelge 5’de verilmiştir.

Çizelge 5. Optimum nokta doğrulama deneme sonuçları (a) ve modelden tahminlenen değerler ile karşılaştırılması (b)

Table 5. Comparison of optimum point verification test results (a) with the estimated values from the model (b)

Deneme No Trial number	Ekşi maya Sourdough %	Su Water %	KE	SH	GF
1	34.23	52.78	4.11	2.97	607.40
2	34.23	52.78	3.90	2.96	569.50
3	34.23	52.78	4.02	2.95	600.90
Ortalama Mean					
Modelden Tahminlenen Estimated from the model			3.77	2.94	592.6

(a)

Yanıt Response	Tahminlenen değer Estimated values	Ortalama deneysel sonuç ( $\pm$ SS) Mean result	Fark Prediction error	P-değeri P-values
KE	3.77	4.01 $\pm$ 0.11	+0.24	0.059
SH	2.94	2.96 $\pm$ 0.01	+0.02	0.074
GF	548.12	592.6 $\pm$ 20.27	+44.48	0.063

(b)

KE: Kabul Edilebilirlik; SH: Spesifik Hacim; GF: Gözenek Faktörü  
KE: Acceptability; SH: Specific Volume; GF: Pore Factor

Her bir yanıt için, optimum nokta doğrulama denemelerinden elde edilen ortalama sonuçlar ile modelden tahminlenen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olup olmadığı tek örnek t-testi uygulanarak belirlenmiştir

(Çizelge 5b). Sonuç olarak optimum nokta ortalama yanıtları modelden tahminlenen değerler arasındaki farklılıklar önemsiz ( $P>0.05$ ) bulunmuştur.

**Optimizasyon Sonrası Optimize ve Kontrol Örneklerinin Karşılaştırılması**

**Fizikokimyasal Kalite Özellikleri**

Bu çalışmada kullanılmak üzere formül optimizasyonu sonucunda elde edilen Siyez kepeği ekşi mayalı Optimize Ekmek (OE) ile karşılaştırmak üzere iki tip kontrol ekmeği üretilmiştir. Ekmeklik buğday kepeği ilaveli ekşi

mayalı Kontrol Ekmeği (KE1) ve ekşi mayasız Kontrol Ekmeği 2'ye (KE2) göre, fizikokimyasal kalite özellikleri açısından karşılaştırma yapılmıştır. Optimizasyon sonucu ekmeğin için belirlenmiş 54.40 g (%34.23) ekşi maya ve 83.20 g (%52.78) su kullanım miktarlarına göre Çizelge 6'daki optimize ve kontrol ekmeğin ürün formülleri oluşturulmuştur.

Çizelge 6. Optimize ve kontrol ekmeğin formülleri  
Table 6. Formulas of optimized and control breads

Ekmek Bread	Un Flour (g)	Ekşi maya Sourdough (g)	Su Water (g)	Tuz Salt (g)	Maya Yeast (g)	Toplam Total (g)
OE	160	54.40 (HV200)	83.20	3	1.76	302.36
KE1	160	108.80 (HV400)	28.80	3	1.76	302.36
KE2	187	0	110.28	3	1.76	302.04

OE: Siyez kepeği ekşi hamurlu optimize ekmeğin KE1: Buğday kepeği ekşi hamurlu ekmeğin; KE2: Kepeksiz/ekşi hamursuz ekmeğin

OE: Optimized sourdough bread with einkorn bran KE1: Wheat bran sourdough bread; KE2: Bran-free/sourdough-free bread

Formüllerde ekşi mayadan da gelen su miktarı göz önünde bulundurularak toplam %58.97 su, aynı kepek içeriği (54.40 g HV200 ekşi hamurda 27.2 g kepek, 108,80 g HV400 ekşi mayada 27.2 g kepek) vardır. Optimize ekmeğin (OE), buğday kepeği ekşi

mayalı ekmeğin (KE1) ile kepeksiz ve ekşi mayasız standart buğday ekmeği (KE2) kontrol örnekleri hazırlanarak bazı fizikokimyasal ve biyoaktif nitelikler açısından karşılaştırmaları yapılmıştır (Çizelge 7)

Çizelge 7. Ekmek örneklerine ait fizikokimyasal özellikler  
Table 7. Physicochemical properties of the bread samples

	OE	KE1	KE2
Protein (%) Protein	12.75±0.18 <sup>b</sup>	13.57±0.05 <sup>a</sup>	11.96±0.05 <sup>c</sup>
Kül (%) Ash	1.01±0.01 <sup>b</sup>	1.37±0.08 <sup>a</sup>	0.78±0.02 <sup>b</sup>
Yağ (%) Fat	0.28±0.04 <sup>a</sup>	0.39±0.03 <sup>a</sup>	0.32±0.00 <sup>a</sup>
Rutubet (%) Moisture	36.16±0.87 <sup>a</sup>	37.77±0.93 <sup>a</sup>	34.79±0.72 <sup>a</sup>
Karbohidrat (%) Carbohydrate	49.80±0.28 <sup>b</sup>	46.90±0.36 <sup>c</sup>	52.15±0.20 <sup>a</sup>
pH pH	4.75±0.03 <sup>b</sup>	4.29±0.09 <sup>b</sup>	5.56±0.18 <sup>a</sup>
Titrasyon asitliği (%) Titratable acidity	6.59±0.02 <sup>b</sup>	11.06±0.00 <sup>a</sup>	3.92±0.01 <sup>c</sup>

Çizelge 7. devam

	OE	KE1	KE2
İnhibisyon (%) <i>Inhibition</i>	24.07±0.09 <sup>b</sup>	43.12±0.14 <sup>a</sup>	17.20±0.02 <sup>c</sup>
Mineral biyoyararlanım (%) <i>Mineral bioavailability</i>	63.21±0.19 <sup>b</sup>	77.31±0.62 <sup>a</sup>	62.59±0.02 <sup>b</sup>
Fitik asit (mg/100 g) <i>Phytic acid</i>	328.59±1.00 <sup>b</sup>	216.89±1.82 <sup>c</sup>	342.03±0.90 <sup>a</sup>
Ağırlık (g) <i>Weight</i>	258.63±3.05 <sup>a</sup>	261.41±2.15 <sup>a</sup>	269.43±2.80 <sup>a</sup>
Hacim (cm <sup>3</sup> ) <i>Volume</i>	765.55±5.00 <sup>b</sup>	530.00±9.00 <sup>c</sup>	820,00±7.00 <sup>a</sup>
Spesifik hacim (mL/g) <i>Specific volume</i>	2.96±0.03 <sup>a</sup>	2.03±0.03 <sup>a</sup>	3.03±1.00 <sup>a</sup>
Kabuk kalınlığı (mm) <i>Crust thickness</i>	3.03±0.51 <sup>a</sup>	2.07±0.16 <sup>a</sup>	2.61±0.17 <sup>a</sup>
Ağırlık kaybı (%) <i>Weight loss</i>	14.46±1.00 <sup>a</sup>	13.54±0.80 <sup>a</sup>	10.80±0.50 <sup>a</sup>

OE:Siyez kepeği ekşi hamurlu optimize ekmeç KE1: Buğday kepeği ekşi hamurlu ekmeç KE2: Kepeksiz/ekşi hamursuz ekmeç

OE:Optimized sourdough bread with einkorn bran KE1: Wheat bran sourdough bread; KE2: Bran-free/ sourdough-free bread

Örneklerin yağ, rutubet, ağırlık, spesifik hacim, ağırlık kaybı gibi özellikleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Buğday kepekli ekşi hamur içeren KE1'in kül içeriği ile mineral biyoyararlanım nitelikleri KE2 ve OE numunelerine göre önemli düzeyde yüksek bulunmuştur. Ekmeçlik buğday kepeği modern değirmenlerde nişastalı endospermden çok net ayrılabilirdiği halde, siyez kepeğinin ve endosperminin morfolojik olarak sıkı bağı olması buna müsaade etmez ve siyez kepeği daima bir miktar nişastalı endosperm içerir. Bu nedenle her iki kepeğin içerik ve nitelikleri birbirlerinden farklıdır (Örü ve Hendek Ertop, 2021). Dolayısıyla ekşi hamurların ilave edildiği ekmeçlerin kül içerikleri de birbirlerinden farklılık göstermiştir. Daha fazla kepek fraksiyonu içeren buğday kepeği ekşi hamurlu KE1 numunesi (108.80 g) en yüksek kül içeriğine (% 1.37) sahipken, bir miktar nişasta fraksiyonu içeren siyez kepeği ekşi hamurlu optimize ekmeç (54.40 g) daha düşük kül (%1.01) içeriğine sahiptir. Kepeksiz ve ekşi hamursuz standart kontrol ekmeği (KE2) ise doğal olarak en düşük kül içeriğine sahiptir. Benzer durum mineral biyoyararlanım için de geçerlidir. KE1 örneğinin aynı zamanda pH değeri daha düşük ve titrasyon

asitliği de (%) daha yüksek bulunmuştur. Ekşi maya üretiminde buğdayın kepeğinden gelen mikroflora, enzimler, mineraller gibi yapıların laktik asit fermantasyonunda etkili olduğu (Hendek Ertop, 2014) yalnızca un ve suyun fermantasyonu ile ekşi hamur yapılabildiği gibi (kepeksiz), buğday kepeğinin ekşi hamura ilavesiyle ekmeç hacminin ve aromatik yapının geliştiğini bildiren çalışmalar da mevcuttur (Katina vd., 2006). Buğday kepeği ekşi hamurunda daha fazla asitlik gelişiminin, ilave edildiği ekmeçte de daha fazla asitlik gelişimine neden olduğu söylenebilir. KE1 örneğinde daha iyi fermente olabilirlik düşüncesi, aslında mineral biyoyararlanım (%77.31) ve fitik asit sonuçları da desteklenmektedir. KE1 ekmeğinde daha etkin laktik asit fermantasyonu sonucu daha fazla endojen fitaz aktivitesi meydana gelmiş, daha etkin fitik asit degradasyonu sonucu diğer ekmeçlere göre (OE:328.59 mg/100 g; KE2: 342.03 mg/100 g) daha düşük fitik asit düzeyi (216.89 mg/100g) elde edildiği düşünülmektedir. Bu durumun, yani etkin fitaz aktivitesinin de fitik asit tarafından bağlanan Ca, Mg gibi pozitif yüklü minerallerin serbest duruma gelmesini sağladığı ve mineral biyoyararlanımın dolaylı olarak arttığı söylenebilir. Bir antinutrient olan fitik asidin 6

fosforlu myo-inositol halka yapısının, tahıllarda zaten kısıtlı olan Zn ve Fe gibi minerallere karşı bağlayıcı ve biyoyararlanımı kısıtlayıcı bir etmen olduğu bilinmektedir (Hendek Ertop vd., 2020). Ekmekte kepek kullanımının en önemli etkilerinden birisi buğdayın kepek fraksiyonunda yoğun olarak bulunan fitik asidin ekmeğin içeriğindeki mineralleri bağlaması ve biyoyararlanımlarını düşürmesidir. Dolayısıyla fermente edilerek ekmeğe katılmış kepekte bu durumun ortadan kalktığı, hatta standart kontrol ekmeğine (KE2: %62.59) göre mineral biyoyararlanımının daha yüksek olduğu (OE: %63.21; KE1: %77.31) açıkça görülmektedir. Ekmekte kepek kullanımıyla ilgili istenmeyen niteliklerinden biri de düşük hacimdir. Hacim sonuçlarından görüleceği üzere en yüksek hacim standart buğday ekmeğinde (KE2: 820.00 cm<sup>3</sup>) elde edilirken ekşi hamurdan gelen kepekten dolayı her iki ekmekte de (OE: 765.55 cm<sup>3</sup>, KE1: 530.00 cm<sup>3</sup>) hacim önemli düzeyde ( $P<0.05$ ) düşük bulunmuştur. Aslında siyez kepeği ekşi hamuru içeren örneğin (OE) hacmi, buğday kepeği içeren örneğe göre daha yüksek ve daha kabul edilebilir düzeydedir. Ekmek örneklerinin antioksidan aktivite (%inhibisyon) değerleri ise birbirlerinden önemli düzeyde ( $P<0.05$ ) farklı bulunmuşlardır. Fırıncılık ürünlerinde antioksidan kapasitenin çeşitli faktörlerden olumlu veya olumsuz yönde etkilendiği bilinmektedir. Bunlardan en önemlisi unlardaki yüksek ekstraksiyon oranıdır ki son üründe yüksek antioksidan kapasiteye neden olur (Michalska vd., 2007). Yani KE2 numunesinde buğday kepeği fraksiyonunun her iki ekmeğe göre daha fazla olması zaten antioksidan aktiviteyi artırabilecek bir niteliklerdir. Diğer taraftan ekşi hamur fermantasyonu sonucu antioksidan aktivitede artış

olması farklı metabolik ve biyokimyasal durumlarla açıklanmaktadır. Ekşi hamurda laktik asit bakterilerinin metabolizmasının kuvvetli antioksidatif etki oluşturabileceği veya fermantasyon süresince lipit oksidasyonuna neden olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca homofermantatif laktobasillerin lipit oksidasyonunu arttırdığı da bilinmektedir (Vermeulen vd., 2007). Pişme sırasında, proteinler ve indirgen şekerlerin karbonil grupları arasındaki reaksiyon sonucunda Maillard reaksiyon ürünleri de yoğun olarak ekmeğin kabuğunda meydana gelmektedir. Yapılan bazı çalışmalar bu bileşiklerin antioksidan nitelik taşıdığını ve fırın ürünlerinin özellikle kabuk kısımlarının bu özelliği kazanmasına neden olduklarını belirtmektedir (Michalska vd., 2007). Farklı bir yaklaşım da biyoaktif peptit oluşumuna dayandırılmasıdır. Ekşi hamur fermantasyonuyla meydana gelen proteoliz ve asidifikasyon arasındaki etkileşim sonucunda biyoaktif peptitler meydana gelmektedir (Rizzello vd., 2008; Coda vd., 2012) bu spesifik protein fragmentlerinin vücut fonksiyonları ve kondüsyonu üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Yapıda bulunan doğal proteinlerin bazı mikrobiyal ve bitkisel proteolitik enzimler tarafından hidrolizi sonucu meydana gelen biyoaktif peptitler genellikle gıda fermantasyonu sırasında artış gösterirler. Bu peptitlerin antioksidatif, antihipertansif, mineral bağlama gibi etkileri vardır. Seçilmiş bazı LAB'lerinin ekşi hamur fermantasyonu süresince antioksidan peptitler ürettikleri de tespit edilmiştir (Coda vd., 2012).

#### Mineral Madde İçeriği

Ekmek örneklerine ait mineral madde içerikleri Çizelge 8'de verilmiştir.

Çizelge 8. Ekmek örneklerine ait mineral madde içerikleri

Table 8. Mineral content of bread samples

Ekmek	Mg (ppm)	Na (ppm)	K (ppm)	Ca (ppm)	P (ppm)
OE	117.70±2.00	2944.40±39.00	1605.30±8.40	478.00±0.70	1222.00±6.60
KE1	172.80±2.20	2855.20±25.90	2270.80±6.80	440.70±6.10	1615.60±16.50
KE2	55.80±0.20	2883.00±22.40	1315.70±9.50	353.20±11.10	884.20±4.40



Ekmek	Fe (ppm)	Mn (ppm)	Se (ppm)	Zn (ppm)	Si (ppm)
OE	18.04±0.15	7.61±0.04	1.31±0.03	36.30±1.40	14.28±0.63
KE1	22.44±0.24	14.58±0.13	4.34±0.08	21.80±0.20	16.60±0.28
KE2	13.52±0.11	5.13±0.03	3.99±0.10	7.20±0.10	13.40±0.25

OE:Siyez kepeği ekşi hamurlu optimize ekmek KE1: Buğday kepeği ekşi hamurlu ekmek; KE2: Kepeksiz/ekşi hamursuz ekmek

OE: *Optimized sourdough bread with einkorn bran* KE1: *Wheat bran sourdough bread*; KE2: *Bran-free/ sourdough-free bread*

Çizelge 8'de görüldüğü üzere buğday ince kepeği ekşi hamuru katkılı ekmekler (KE1) en yüksek mineral madde içeriğine sahiptirler. Diğer taraftan siyez kepeği ekşi hamurlu ekmeğin (OE) mineral madde içeriği de standart buğday ekmeği kontrol örneğine göre daha yüksektir. Benzer nitelikte sonuç Çizelge 7'de verilen kül, protein miktarı gibi fizikokimyasal niteliklerde de görülmüştür. Siyez buğday kepeği ekşi hamur formunda ekmeğe

ilavesiyle, standart buğday ekmeğine göre besinsel açıdan daha iyi sonuçlar vermektedir. Diğer taraftan buğday kepeğine kıyasla nişastalı endosperm fraksiyonu da içermesi daha düşük mineral madde kompozisyonu göstermesine neden olmakta (Örü ve Hendek Ertop, 2021), ilave edildiği ekmeğin niteliklerini bu yönde etkilemektedir.



Şekil 4. Karşılaştırma yapılan ekmek örnekleri (Soldan sağa; KE2, OE, KE1)

Figure 4. Compared bread samples (From left to right; KE2, OE, KE1)

Optimize ekmek nitelikleri (OE) hem iç hem de dış özellikler açısından genel olarak standart buğday ekmeğine (KE2) benzer nitelikte bulunmuştur. Dış ve iç tekstür renkleri, hacimleri, yeme kalitesi ve lezzetleri panelistlerce yakın bulunmuştur. Buğday kepeği ekşi hamuru içeren kontrol örneği (KE1) antioksidan aktivite, fitik asit düzeyi gibi biyoaktif nitelikler açısından çok daha iyi bulunmasına rağmen, duyu analizde panelistler tarafından daha düşük duyu puan

almıştır. Özellikle hacminin daha küçük, iç gözenek yapısının daha sıkışık ve buna bağlı ağızda çiğneme niteliğinin daha zor olması nedeniyle bu niteliklere ait değerlendirme puanları daha düşük düzeyde kalmıştır. Ayrıca panelistler tarafından fermantasyona bağlı ekşi hamur lezzetinin daha yoğun olduğu, kepek lezzeti ile birleştiğinde ekmek lezzet profilinin olumsuz yönde etkilendiği bildirilmiştir.

## Ekmek üretiminde siyez kepekli ekşi hamur optimizasyonu

Çizelge 9 Ekmek örneklerine ait duyu analizi sonuçları  
Table 9. Sensory evaluation results of the bread samples

Dış özellikler <i>Crust properties</i>					
Numune <i>Sample</i>	Kabuk rengi <i>Crust color</i>	Şekil simetrisi <i>Shape symmetry</i>	Pişme düzgünlüğü <i>Baking uniformity</i>	Kabuk özellikleri <i>Crust attributes</i>	
OE	4.00±0.00	4.00±0.25	4.50±0.00	5.00±0.00	
KE1	2.00±0.00	3.00±0.00	3.00±0.00	3.00±0.00	
KE2	5.00±0.00	5.00±0.00	4.50±0.00	5.00±0.00	

İç özellikler <i>Crumb properties</i>					
Numune <i>Sample</i>	Gözenek yapısı <i>Pore homogeneity</i>	İç rengi <i>Crumb color</i>	Aroma ve tat <i>Flavour and taste</i>	Çiğneme özellikleri <i>Chewing attribute</i>	Yapı <i>Crumb texture</i>
OE	5.00±0.00	4.75±0.00	4.50±0.00	4.25±0.25	4.25±0.25
KE1	3.50±0.00	2.00±0.25	2.00±0.25	2.00±0.00	2.50±0.00
KE2	5.00±0.00	5.00±0.00	4.75±0.25	4.50±0.00	4.50±0.00

### SONUÇ

Siyez buğdayı işleyen değirmenlerde %25 düzeyinde atık olarak çıkan nişastalı endosperm granülleri de içeren siyez kepeğinin buğday unu gibi fermente olabildiği ve HV:200 oranıyla ekşi hamur üretimi yapılabileceği, fermantasyonu sonucu bir antinutrient olan fitik asidin yıkıldığı ve biyoyararlanımının arttığı belirlenmiştir. Diğer taraftan fırında ekşi hamur yapımında kullanmadan önce ön bir öğütme prosesiyle boyut küçültmesi yapılarak inceltmesi granül yüzey alanını genişleteceğinden daha kolay fermente olmasına ve kullanıldığı ekmeğin tekstürel ve yeme kalitesinin iyileşmesine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Yapılan optimizasyon sonucu HV:200 oranında hazırlanan siyez kepeği ekşi mayasının ekmeğin hamurunda %34.23 oranında kullanılması gerektiği buna karşılık formülasyondaki su oranının da %52.78 düzeyinde olması gerektiği tespit edilmiştir. Ekmekte kepek kullanımı sonucu karşılaşılan en önemli sorunlar hacmin düşük olması ve fitik asit düzeyinin yüksek olmasıdır. Yapılan çalışma ile siyez kepeği kullanımının buğday kepeğine göre daha hacimli ve kabul edilebilirliği daha yüksek ürünler verdiği belirlenmiştir. Üstelik kepek fraksiyonu

içermesine rağmen, fitik asit düzeyinde standart buğday ekmeğine göre azalma, biyoyararlanım ve protein oranı gibi besinsel niteliklerde ise artış sağlanmıştır. Ayrıca mineral madde kompozisyonu da standart buğday ekmeğine göre daha yüksektir. Genel olarak siyez kepeği ekşi mayalı ekmeğin, buğday kepeği ekşi mayalı ekmeğin ile standart buğday ekmeği arasında nitelikler sergilemiştir. Ekşi maya yapmadan önce öğütme ile granül yapısının inceltmesi, eleme ile standardizasyonu, fermantasyon etkinliğinin artırılması için HV:200 değerinin üzerinde HV 250-300 düzeyinde denemeler yapılarak, buğday kepeği ekşi hamurunun biyoaktif niteliklerine yakın sonuçlar alınabileceği düşünülmektedir. Elde edilen bulgulara göre, değirmencilik yan ürünü olarak açığa çıkan ve hayvan yemi olarak değerlendirilen bu fraksiyonun fırıncılık ürünlerinde kullanım potansiyelinin olduğu da görülmektedir. Buğday kepeği ekşi hamuru kullanılan ekmeğin (KE1) biyoyararlanım, antioksidan aktivite ve fitik asit degradasyonu gibi biyoaktif nitelikler açısından çok daha iyi sonuçlar alınmasına rağmen, duyu değerlendirilmede panelistler tarafından daha düşük duyu skorları alması nedeniyle buğday

kepeği ekşi mayasının daha düşük oranda kullanılması gerektiği de söylenebilir. Günümüz tüketici tercihlerinin ve ekmeğin üretim politikalarının tam buğday ekmeği ve kepekli ekmeğin yönünde değiştiği göz önünde bulundurulduğunda, kepek fraksiyonunun ekşi hamur yapımında kullanımı ekmeği yalnızca diyet lif açısından zenginleştirmekle kalmayacak, aynı zamanda mineral içerik ve biyoyararlanım, antioksidan aktivite, fitik asit degradasyonu gibi önemli biyoaktif nitelikler açısından da geliştirmiş olacaktır.

#### ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Bu makalede yazarların, başka kişiler veya kurumlar ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

#### YAZAR KATKILARI

Bu çalışma Fatmanur ÖRÜ ve Müge HENDEK ERTOP tarafından tasarlanmış ve analizleri gerçekleştirilmiştir. Tüm yazarlar makalenin yazımına katkıda bulunmuş, son halini okuyarak onaylamıştır.

#### TEŞEKKÜR

Bu çalışma Fatmanur ÖRÜ'nün lisans bitirme projesi kapsamında üretilmiştir. Bu proje 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Desteği Programı kapsamında TÜBİTAK-BİDEB tarafından da desteklenmiştir. Yazarlar TÜBİTAK-BİDEB'e teşekkürlerini sunarlar.

#### KAYNAKLAR

AACC. (1990). American Association of Cereal Chemists International, Approved Methods of the AACC (8th ed.), The Association: St. Paul, MN, USA.

Altuğ Onoğur, T., Elmacı, Y. (2011). Gıdalarda Duyusal Değerlendirme, Meta Basım, 130 s., Bornova, İzmir.

Bilgiçli, N., Türker, S. (2004). Tarhanada sindirilebilir protein ve kül miktarı üzerine maya, malt unu ve fitaz katkılarının etkileri, *Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18 (33): 90 – 97.

Bilgiçli, N., Elgun, A., Türker, S. (2006). Effects of various phytase sources on phytic acid content, mineral extractability and protein digestibility of

tarhana, *Food Chemistry*, 98:329–337. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.05.078

Brandolini, A., Hidalgo, A., Moscaritolo, S. (2008). Chemical composition and pasting properties of einkorn (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*) whole meal flour, *Journal of Cereal Science*, 47: 599–609. doi: 10.1016/j.jcs.2007.07.005

Chavan, R.S., Chavan, S.R. (2011). Sourdough Technology-A traditional way for whole some foods: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10: 170-183. doi:10.1111/j.1541-4337.2011.00148.x

Coda, R., Rizzello, C.G., Pinto, D., Gobbetti, M. (2012). Selected lactic acid bacteria synthesize antioxidant peptides during sourdough fermentation of cereal flours. *Applied and Environmental Microbiology*, 78:1087–1096.

Corsetti, A., Settanni, L., (2007). Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Research International*, 40: 539–558.

Elgün, A. ve Ertugay, Z. (2011). Tahıl İşleme Teknolojisi, Atatürk Üniversitesi Yayınları, No:718, Erzurum.

Gobbetti, M., Corsetti, A., Rossi, J. (1994). The sourdough microflora interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of amino acids. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10:275-279.

Hansen, A.S. (2012). Sourdough Bread. In: Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology, Hui, Y.H. (chief ed.), CRC Press; 2nd Edition, the USA, pp.493-515.

Haug, W., Lantzsich, H.J. (1983). Sensitive method for the rapid determination of phytic acid in cereals and cereals products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 34: 1423-1426. doi: 10.1002/jsfa.2740341217.

Hayta, M., Hendek Ertop, M. (2019). Physicochemical, textural and microbiological properties of optimized wheat bread formulations as affected by differently fermented sourdough, *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 11 (3): 283-293, doi:10.3920/QAS2018.1387

- Hendek Ertop, M. (2014). Ekşi hamur formül optimizasyonunun ekmeğin aromatik profili, biyoaktif nitelikleri ve raf ömrü üzerine etkileri, Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri
- Hendek Ertop, M., Bektaş, M. (2018). Enhancement of bioavailable micronutrients and reduction of antinutrients in foods with some processes, *Journal of Food and Health Science*, 4(3): 159-165. doi: 10.3153/FH18016
- Hendek Ertop, M., Coşkun, Y. (2018). Shelf-life, physicochemical, and nutritional properties of wheat bread with optimized amount of dried chickpea sourdough and yeast by response surface methodology, *Journal of Food Processing and Preservation*, 42:e13650.
- Hendek Ertop, M., Şeker, İ.T. (2018). Optimization of The Amount of Chickpea Sourdough and DryYeast in Wheat Bread Formulation: Evaluation of Physicochemical, Sensory and Antioxidant Properties, *Food Science and Technology Research*, 24 (1):45-53, doi: 10.3136/fstr.24.
- Hendek Ertop, M., Atasoy, R. (2019). Comparison of physicochemical attributes of einkorn wheat (*Triticum monococcum*) and durum wheat (*Triticum durum*) and evaluation of morphological properties using scanning electron microscopy and image analysis, *The Journal of Agricultural Science*, 25 (2): 93-99. doi: 10.15832/ankutbd.539009.
- Hendek Ertop, M., Bektaş, M., Atasoy, R. (2020). Effect of cereals milling on the contents of phytic acid and digestibility of minerals and protein, *Ukrainian Food Journal*, 9(1): 136-147. doi: 10.24263/2304-974X-2020-9-1-12.
- Heun, M., Schaefer-Pregl, R., Klawan, D., Castagna, R., Accerbi, M., Borghi, B., Salamini, F. (1997). Site of einkorn wheat domestication identified by DNA finger printing. *Science*, 278: 1312-1314
- Hidalgo, A., Brandolini, A., (2011). Evaluation of heat damage, sugars, amylases and colour in breads from Einkorn, durum and bread wheat flours. *Journal of Cereal Science*, 54: 90-97
- Hidalgo, A., Brandolini, A. (2012). Lipxygenase activity in wholemeal flours from *Triticum monococcum*, *Triticum turgidum* and *Triticum aestivum*. *Food Chemistry*, 131:1499–1503. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.09.132.
- Hidalgo, A., Brandolini, A. (2014). Nutritional properties of einkorn wheat (*Triticum monococcum* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 56: 382–394. doi: 10.1002/jsfa.6382.
- Katina, K., Salmenkallio-Marttila, M., Partanen, R., Forssell, P., Autio, K. (2006). Effects of sourdough and enzymes on staling of high-fibre wheatbread, *LWT Food Science and Technology*, 39: 479–49. doi: 10.1016/j.lwt.2005.03.013.
- Lev-Yadun, S., Gopher, A., Abbo, S. (2000). The cradle of agriculture. *Science* 288: 1602-1603
- Lioger, D., Leenhardt, F., Demigne, C., Remesy, C. (2007). Sourdough fermentation of wheat fractions rich in fibres before their use in processed food. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87:1368–1373. doi: 10.1002/jsfa.2862.
- Michalska, A., Ceglinska, A., Amarowicz, R., Piskula, M.K., Szawara-Nowak, D., Zielinski, H. (2007). Antioxidant contents and antioxidative properties of traditional rye breads, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:734-740.
- Örü, F., Hendek Ertop, M. (2021). Siyez ve ekmeklik buğday kepeğinin ekşi hamur üretiminde kullanım olanağının değerlendirilmesi. *Gıda*. 46(2): 396-407. doi: 10.15237/gida.GD20087
- Piperno, D. R., Weiss, E., Holst, I., Nadel, D. (2004). Processing of wild cereal grains in the upper palaeolithic revealed by starch grain analysis. *Nature* 430: 670-673
- Poutanen, K., Flander, L., Katina, K. (2009). Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food Microbiology*, 26, 693-699. doi: 10.1016/j.fm.2009.07.011.
- Saharan, K., Kheterpaul, N., Bishnoi, S. (2001). HCl-extractibility of minerals from rice bean and faba bean :Influence of domestic processing methods, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2:323-325. doi: 10.1016/S1466-8564(01)00044-3.

Salovaara, H., J. Savolainen. (1984). Yeast type isolated from Finnish sour rye dough starters. *Acta alimentaria Polonica*, 10:241-245.

Rizzello, C.G., Cassone, A., DiCagno, R., Gobbetti, M., (2008). Synthesis of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides and gaminobutyricacid (GABA) during sourdough fermentation by selected lacticacid

bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:6936-6943.

Vermeulen, N., Czerny, M., Gänzle, M.G., Schieberle, P., Vogel, R.F.(2007). Reduction of (E)-2-nonenal and (E, E)-2,4-decadienal during sourdough fermentation, *Journal of Cereal Science*, 45: 78-87.



## FARKLI YAĞLI TOHUMLARDAN ELDE EDİLEN BİTKİSEL SÜTLERDEN ÜRETİLEN KEFİRLERİN BAZI FİZİKSEL VE DUYUSAL ÖZELLİKLERİ

**Emine Mine Çomak Göçer\*, Ebru Koptagel**

Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Antalya, Türkiye

Geliş/ Received 14.10.2022 Kabul/ Accepted: 30.01.2023 /Online baskı/ Published online: 04.02.2023

Çomak Göçer, E. M., Koptagel, E. (2023). Farklı yağlı tohumlardan elde edilen bitkisel sütlerden üretilen kefirlerin bazı fiziksel ve duyuşsal özellikleri. GIDA (2023) 48 (1) 227-241 doi: 10.15237/ gida.GD22098

Çomak Göçer, E. M., Koptagel, E. (2023). Some physical and sensory properties of kefir made from vegetable milk from different nuts. GIDA (2023) 48 (1) 227-241 doi: 10.15237/ gida.GD22098

### ÖZ

Bu çalışmada fındık, badem, fıstık, ceviz ve kaju yağlı tohumlarından katkı maddesi ve şeker ilavesi olmaksızın bitkisel süt üretilmiştir. Bitkisel sütler kefir starter kültürü kullanılarak fermente edilmiştir. Bitkisel sütlerin yanı sıra inek sütünden de kefir üretilmiştir. Üretilen kefir örnekleri 4°C'de 30 gün süreyle depolanmıştır. Depolama süresince kefir örneklerinde belirlenen serum ayrılması değerleri, renk parametreleri ve panelistler tarafından örneklerin duyuşsal özelliklerini değerlendirmek amacıyla verilen puanlar karşılaştırılmıştır. En yüksek serum ayrılması değeri ceviz sütünden üretilen kefir örneğinde (18 ml), en düşük serum ayrılması değeri ise fıstık sütünden üretilen kefir örneğinde (1.16 ml) belirlenmiştir. L\*, a\*, b\*, ΔE değerleri ile panelistler tarafından verilen renk, görünüş, yapı ve kıvam puanlarının depolama süresince azaldığı, buna karşılık kroma, hue açısı ve beyazlık indeksi değerleri ile panelistler tarafından verilen tat ve koku puanlarının ise depolama süresince arttığı tespit edilmiştir. Genel beğeni açısından en çok fındık sütünden üretilen kefir örneği (3.76) beğenilirken, en az kaju sütünden üretilen kefirin (2.46) beğenildiği tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Kefir, bitkisel süt, serum ayrılması, renk, duyuşsal özellik

## SOME PHYSICAL AND SENSORY PROPERTIES OF KEFIR MADE FROM VEGETABLE MILK FROM DIFFERENT NUTS

### ABSTRACT

In this study, vegetable milk was produced from oilseeds of hazelnut, almond, peanut, walnut and cashew without additives and sugar. Vegetable milks were fermented using kefir starter culture. In addition to vegetable milk, kefir was also produced from cow's milk. The kefir samples were stored at 4°C for 30 days. The whey separation values, color parameters and the scores given by the panelists to evaluate the sensory properties of the samples were compared during the storage period. The highest serum separation value was determined in the kefir sample produced from walnut milk (18 ml), and the lowest serum separation value was determined in the kefir sample produced from peanut milk (1.16 ml). It was determined that the L, a, b, ΔE values and the color and appearance, structure and consistency scores given by the panelists decreased during storage, while the chroma, hue angle and whiteness index values and the taste and odor scores given by the panelists increased. In terms of general appreciation, kefir produced from hazelnut milk (3.76) was preferred the most, while kefir produced from cashew milk (2.46) was the least appreciated.

**Keywords:** Kefir, vegetable milk, whey separation, color, sensorial properties

\*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ minecomak@akdeniz.edu.tr

☎ (+90) 242 227 4400

Emine Mine Çomak Göçer; ORCID no: 0000-0002-0710-2785

Ebru Koptagel; ORCID no: 0000-0001-8238-4455

## GİRİŞ

Bitkisel sütler suda çözünmüş veya parçalanmış bitki materyali süspansiyonları olup, görünüş olarak inek sütüne benzemektedirler. Bitkisel sütlerin hayvan sütüne renk ve doku açısından da benzemesi amaçlanmaktadır (Mauro ve Garcia, 2019). Son yıllarda vegan diyetin daha sağlıklı bir beslenme düzeni olduğunu savunan çalışmaların artması, hayvansal gıdaların üretiminin neden olduğu çevre kirliliği, hayvan haklarına olan duyarlılığın artması, gıda trendinin bu yöne çekilmesi nedeniyle vegan diyetini benimseyen kişi sayısının hızla arttığı görülmektedir. Bu nedenle, vegan diyetinde tüketilemeyen hayvansal süt ve süt ürünlerine alternatif olan bitkisel sütlerin önemi artmaktadır (Erk ve ark., 2019). Aynı zamanda bitkisel sütlerin kolesterol içermemesi de talebin artmasına katkıda bulunmaktadır (Vanga ve Raghavan, 2018). İnek sütünde endişe duyulan bir diğer konu ise antibiyotik ve büyüme hormonu varlığıdır. Bitkisel sütlerin hayvansal sütlerden daha sağlıklı olduğu düşüncesiyle Avrupa nüfusunun %15'inin hayvansal süt ve süt ürünlerinden kaçındığı bildirilmiştir (Sethi ve ark., 2016).

Kefir, Doğu Avrupa kökenli, yaygın olarak tüketilen fermente bir süt ürünüdür. Kefir besleyici bir fermente süt içeceği olmasının yanı sıra, probiyotik özelliğiyle insan beslenmesinde önemli bir yere sahiptir (Tomar ve ark., 2017) Kefir üretimi için en yaygın olarak inek sütü kullanılmakla birlikte, keçi, koyun, deve gibi farklı hayvanların sütlerinden ya da soya, pirinç, Hindistan cevizi gibi bitkisel kaynaklardan elde edilen sütlerden de kefir üretilebilmektedir. İnek sütü proteini alerjisi ve laktoz intoleransı hassasiyeti olan ya da vejetaryen/vegan beslenmeyi benimseyen bireyler için inek sütü kefirine alternatif olarak bitkisel sütlerden de kefir üretilebildiği bildirilmektedir (Sethi ve ark. 2016; Vanga ve Raghavan, 2018).

Gıda fermantasyonu, nişasta ve şeker gibi kompleks karbonhidratların, maya ve/veya bakteri tarafından kullanılarak anaerobik koşullar altında, karbondioksit üretimi ve şekerin alkole dönüştürülmesi olarak tanımlanmaktadır. Bitkisel sütlerin fermantasyonu ikincil metabolitlerin

üretimine yol açtığından önem arz etmektedir (Paul ve ark., 2020). Fermantasyonun, bitkisel sütlerin duyuşal profilini iyileştirebileceği belirtilmektedir. Yapılan bir çalışmada n- heksanal ve n- heksanolün eksikliği nedeniyle bitkisel sütlerdeki kumsu tadın mikrobiyal fermantasyon yoluyla azaldığı bulunmuştur (Wang ve ark., 2003). Fermantasyon, sonucunda arzu edilen tat ve aromayı sağlayan uçucu organik bileşikler de meydana gelmektedir. Örneğin ürüne aroma sağlayan diasetil (2,3-butanedion) bileşiğinin ve meyvemsi (yeşil elma) bir tat veren asetaldehit bileşiğinin tahıl bazlı ve yağlı tohum bazlı bitkisel sütlerin fermantasyonu sırasında arttığı bildirilmiştir. Ayrıca bitki bazlı süt alternatiflerinin lezzeti ve tadı fermantasyon sırasında meydana gelen aminoasit seviyelerindeki değişikliklerden de etkilenmektedir (Tanguy ve ark., 2019).

Piyasada bulunan bitkisel sütler katkılı ve şeker ilaveli olması nedeniyle tüketicilerin şeker ilavesiz ürün beklentisini karşılamamaktadır. Bitkisel sütler ve bitkisel sütlerden üretilen fermente ürünlerin geliştirilmesi nispeten yeni bir konu olup bu gıdaların duyuşal özelliklerini araştıran çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Mauro ve Garcia, 2019). Literatürde bitkisel süt ilaveli karışım sütlerden yapılan kefir içeceklerinin kimyasal bileşimi ve duyuşal kalitesini analiz etmek için çalışmalar yapılmıştır (Atalar, 2019; Atik Sözeri ve ark., 2021; Bensmira ve Jiang, 2012; Cui ve ark., 2013; Dos Santos ve ark., 2019; Kesenkas, ve ark., 2011). Söz konusu çalışmalarda %100 bitkisel süt kullanılmamış olup, yağlı tohumlardan elde edilen katkısız ve şeker ilavesiz bitkisel sütlerden üretilen kefirlerin duyuşal özelliklerine yönelik çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada; badem, fıstık, fındık, ceviz ve kajudan elde edilen bitkisel sütler ile inek sütü kefir starter kültürü ile fermente edilerek kefir üretimi gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon sonucu oluşan kefir örneklerinin serum ayrılması değerleri ve renk parametreleri ile duyuşal özellikleri ve bu özelliklerin depolama süresince değişimi takip edilmiştir.

**MATERYAL VE YÖNTEM****Gereç**

Bu çalışmada kullanılan çiğ yağlı tohumlar (yer fıstığı, fındık, badem, ceviz ve kaju) yerel marketten, çiğ inek sütü Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Döner Sermaye İşletmesi'ne bağlı Sığır Çiftliği'nden, kefir starter kültürü (Kefir DC, DuPont Danisco) Türker Endüstri Teknik Makina ve Tic. San. Ltd. Şti. (İstanbul, Türkiye)'den satın alınmıştır. Kefir örnekleri Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Laboratuvarında üretilmiştir.

**Yöntem****Yağlı Tohumlardan Süt Üretimi**

Bitkisel süt örneklerinin üretimi için fındık, yer fıstığı, badem, kaju ve ceviz 12 saat suda bekletilmiş ve kabuklarından arındırılmıştır. Kabuğu soyulan yağlı tohumların üzerine 1:5 [yağlı tohum (g): su (ml)] oranında su ilave edilmiş ve blenderde (Kenwood Thermoresist Cam Blender AT338) 10 dakika karıştırılmıştır. Oluşan yapı bez kese (standart Amerikan pamuklu bez) kullanılarak süzümüştür (Bensmira ve Jiang 2012).

**Yağlı Tohumlardan Elde Edilen Bitkisel Sütlerden ve İnek Sütünden Kefir Üretimi**

Kefir üretiminde kullanılan bitkisel sütler ve çiğ inek sütü 90°C'de 5 dakika ısıtılma tabi tutulmuş ve 25°C'ye soğutulmuştur. Soğutulan sütlere ticari kefir starter kültürü inoküle edilerek (0.015g/L) 25°C'de pH'sı 4.6 oluncaya kadar inkübe edilmiştir (Ebner, 2015). İnkübasyon sonucu elde edilen kefir örnekleri 200 ml'lik kapaklı plastik kaplara doldurulmuş ve 4°C'de 30 gün süre ile depolanmıştır.

**Renk Analizi**

Süt ve kefir örneklerinde CIE L\*, a\*, b\* ve ΔE renk parametrelerini belirlemek için renk ölçüm cihazı (Minolta Colorimeter CR-400, Konica Minolta, Japonya) kullanılmıştır. Örneklerin ölçümünden önce cihazın kalibrasyonu beyaz kalibrasyon plakası (L=95.12, a=-0.33 ve b=3.36) ile yapılmıştır. Ölçümler sonucunda elde edilen L\*, a\* ve b\* değerleri kullanılarak örneklerin

kroma (C) [1], hue açısı (h°) [2] ve beyazlık indeksi (BI) [3] değerleri hesaplanmıştır.

$$C = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad [1]$$

$$H = \tan^{-1} \left( \frac{b^*}{a^*} \right) \quad [2]$$

$$BI = 100 - [(100 - L^*)^2 + (a^*)^2 + (b^*)^2]^{0.5} \quad [3]$$

**Serum ayrılması**

Kefir örneklerinde serum ayrılması analizi, Köksoy ve Kılıç (2004)'in belirttiği yöntemle yapılmıştır. Örnekler 50 ml'lik kapaklı cam mezürlerde 4°C'de depolanmış ve yüzeyde biriken serumun hacmi, depolanmanın 1., 15. ve 30. günlerinde ölçülmüştür.

**Duyusal Analiz**

Örneklerin duyuşal yönden değerlendirilmesi, Akdeniz Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü ile Beslenme ve Diyetetik Bölümü akademik personeli ve lisansüstü öğrencilerinden oluşturulan 22 ila 40 yaş arasındaki 40 kişilik panelist grubu tarafından yapılmıştır. Panelistlerin koku ve tat duyuşunu olumsuz etkileyecek herhangi bir hastalığı bulunmamaktadır.

Depolanmanın 1., 15. ve 30. günlerinde yapılan değerlendirmede renk ve görünüş, yapı ve kıvam, tat ve koku ile genel beğeni puanlandırılmıştır. Duyusal değerlendirme, yemeklerden yaklaşık 2 saat önce veya sonra ortam sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Şeffaf plastik bardaklarda 8°C sıcaklıkta bulunan kefir örnekleri (25 ml) değerlendirme için panelistlere sunulmuştur. Kefir örnekleri üç basamaklı sayılarla kodlanmış ve rastgele sırayla değerlendirilmiştir. Değerlendirme bireysel olarak, iyi aydınlatılmış bir ortamda yapılmış ve ardışık örnekler arasında su tüketmeleri istenmiştir (Ahmadian-Kouchaksaraei ve ark., 2014).

**İstatistiksel analizler**

Araştırma kapsamında yapılan üretimler ile fiziksel ve duyuşal analizler iki tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve analizler paralelli olarak yapılmıştır. Analizlere ait ortalamalar SAS istatistik programı (SAS Instutue Inc. SAS System 9.0) kullanılarak varyans analizine tabi tutulmuş, önemli bulunan varyasyon kaynaklarının etki

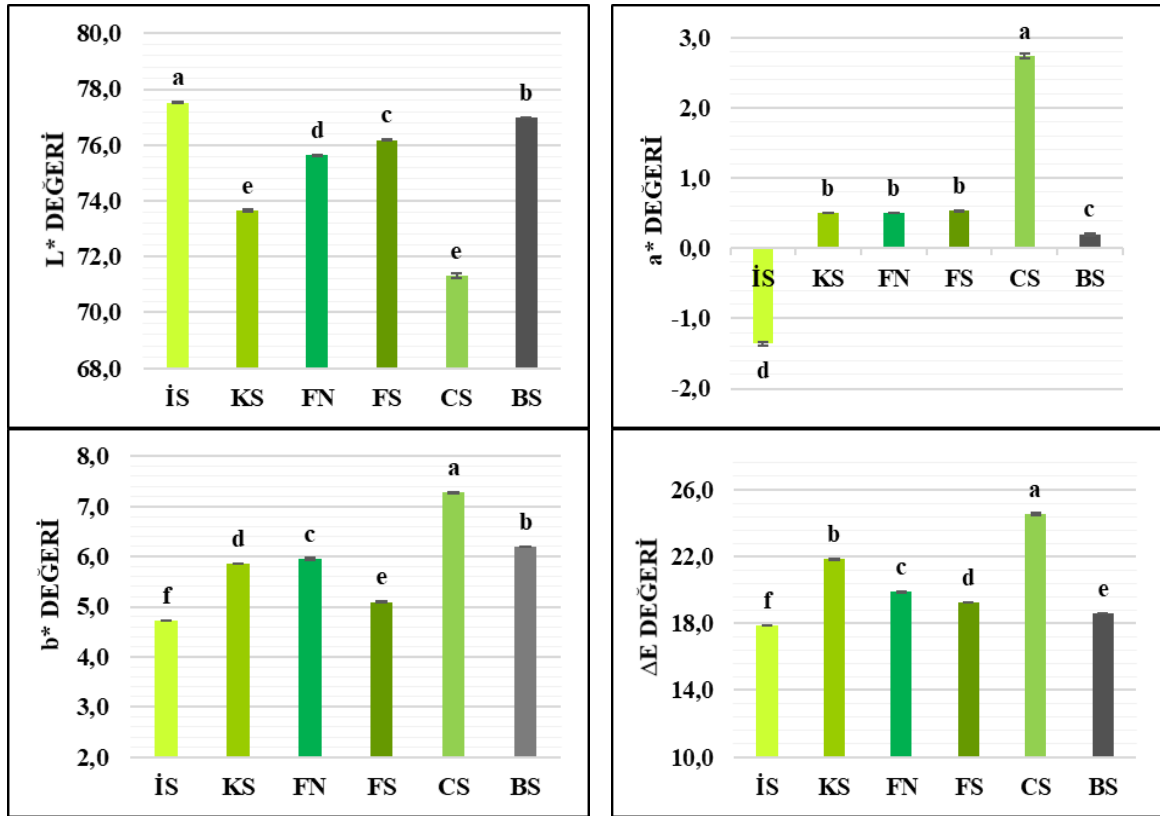


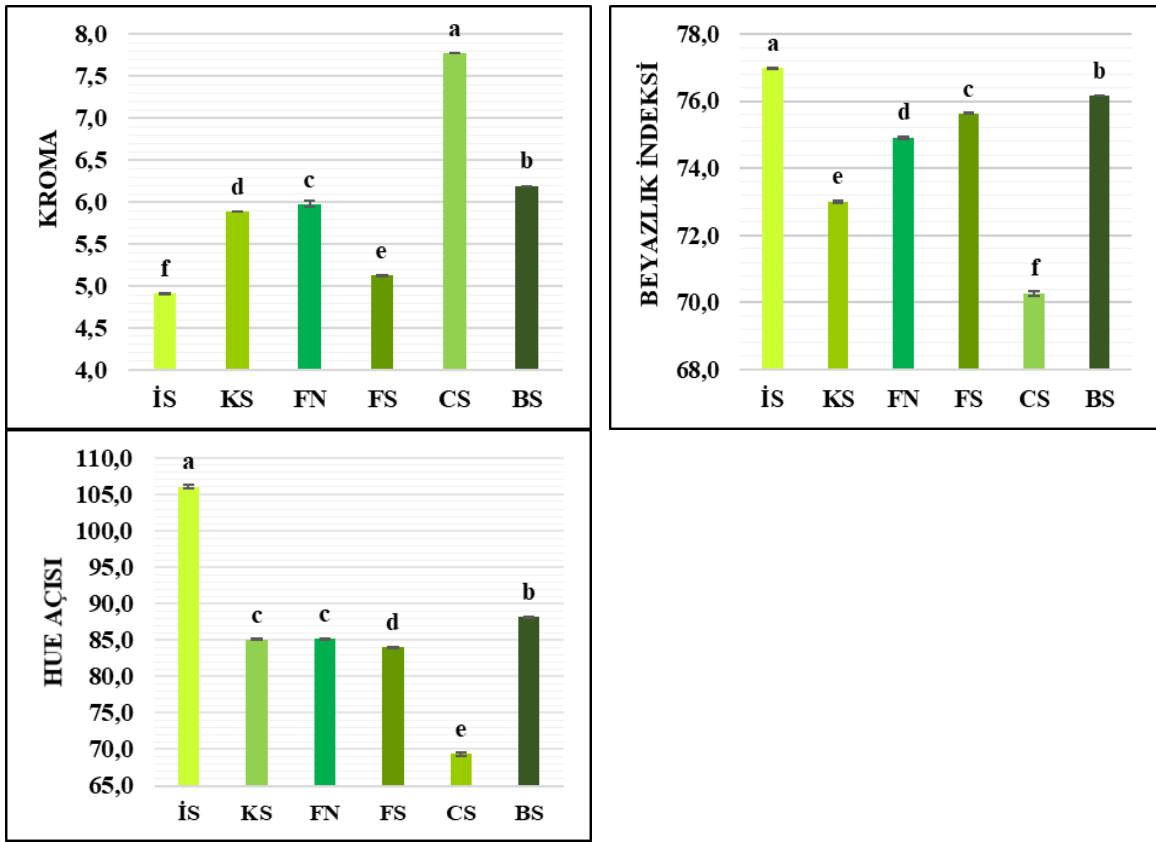
düzeyleri ise Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile değerlendirilmiştir (Düzgüneş ve ark., 1987).

### ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Süt Örneklerinin Renk Analiz Sonuçları

Besinlerde renk, tüketicinin tat algısını, beğenisini ve ürünün kabul edilebilirliğini etkileyen önemli parametrelerden bir tanesidir. Rengin matematiksel olarak ölçülmesini sağlayan  $L^*$  (açıklık) parametresi 0 (siyah) ile 100 (beyaz) arasında aydınlık değerini ifade etmektedir.  $a^*$  parametresinin pozitif değer alması kırmızılığı, negatif değer alması yeşilliği ifade etmektedir.  $b^*$  parametresinin ise pozitif değer alması sarılığı, negatif değer alması maviliği ifade etmektedir (Wadhvani ve McMahan, 2012, Paredes ve ark., 2022). Süt örneklerinin renk analizinde değerlendirilen ortalama  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $\Delta E$ , kroma,

hue açısı ve beyazlık indeksi değerleri kullanılarak hazırlanan grafikler Şekil 1'de sunulmuştur. Ortalama en yüksek  $L$  değeri inek sütünde, ortalama en düşük  $L$  değeri ise ceviz sütünde saptanmıştır. En yüksek ortalama  $a^*$ ,  $b^*$   $\Delta E$  değerlerinin ise inek sütünde olduğu tespit edilmiştir. Ticari badem ve fındık sütlerinin renk analizinin yapıldığı bir çalışmada  $L^*$  değerlerinin çalışmamızda elde edilen  $L^*$  değerlerinden daha düşük olduğu bulunmuştur (Jeske ve ark., 2017). Yapılan başka bir çalışmada yarım yağlı inek sütü ile fındık sütünün renk analizi sonucunda fındık sütünün  $L^*$  değerinin daha düşük  $a^*$  ve  $b^*$  değerinin ise daha yüksek olduğu saptanmıştır (İlyasoğlu ve Yılmaz, 2019). Çalışmamızda da inek sütü ile fındık sütü kıyaslandığında bu sonuçlarla uyumlu olduğu görülmektedir.





Şekil 1. Süt örneklerinin L\*, a\*, b\*, ΔE, kroma, hue açısı ve beyazlık indeksi değerleri

Figure 1. The L\*, a\*, b\*, ΔE chroma, hue angle and whiteness index values of milk samples

\*İS:İnek sütü, KS:Kaju sütü, FN: Fındık sütü, FS: Fıstık sütü, CS: Ceviz sütü, BS: Badem sütü

\*İS:Cow milk, KS: Cashew milk, FN: Hazelnut milk, FS: Peanut milk, CS: Walnut milk, BS: Almond milk

\*\*Farklı harfler ortalamaların istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir ( $P < 0.05$ ).

\*\*Means with different letters are statistically different ( $P < 0.05$ ).

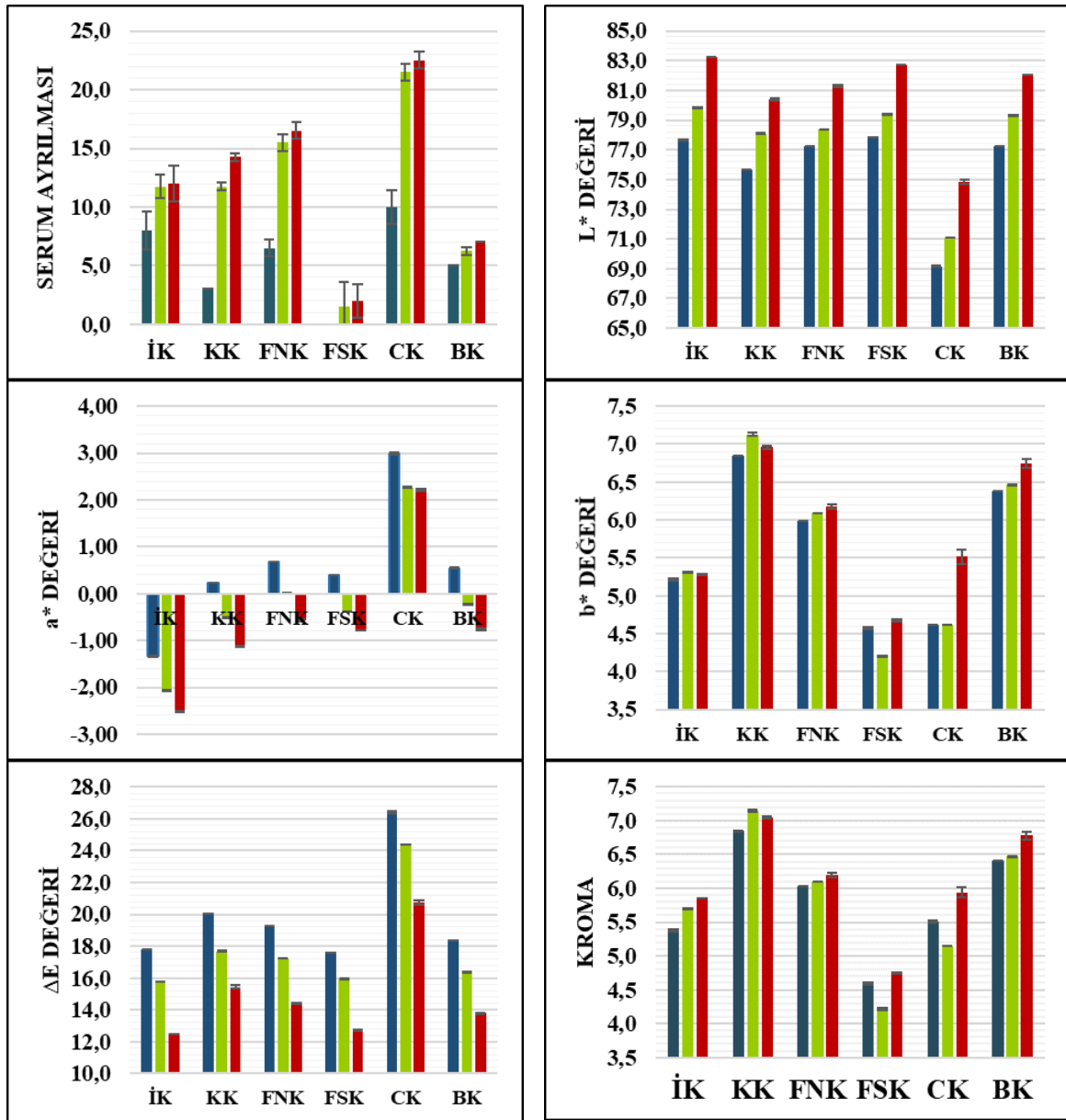
Rengin doygunluğunu ifade eden kroma, rengin kantitatif özelliği olarak kabul edilmekte ve her renk tonu için aynı L\* değerine (açıklığa) sahip gri renge göre farklılık derecesini belirlemeyi sağlamaktadır (Paredes ve ark., 2022). Kroma değeri solgun renklerde düşük, canlı renklerde yüksek değerler almaktadır (Lopez ve ark. 2017). Hue açısı ise herhangi bir rengin mavimsi, kırmızımsı vb. olarak tanımlanmasını sağlayan kalitatif bir özellik olup, 0° ile 360° arasında değerler almaktadır (Tasova ve Özkurt, 2018). Çalışmamızda en yüksek ortalama kroma değeri ceviz sütünde, en yüksek ortalama hue açısı ve beyazlık indeksi değeri inek sütünde saptanmıştır. Ayrıca en düşük ortalama kroma değerinin inek sütünde, en düşük ortalama hue açısı ve beyazlık indeksi değerinin ise ceviz sütünde olduğu

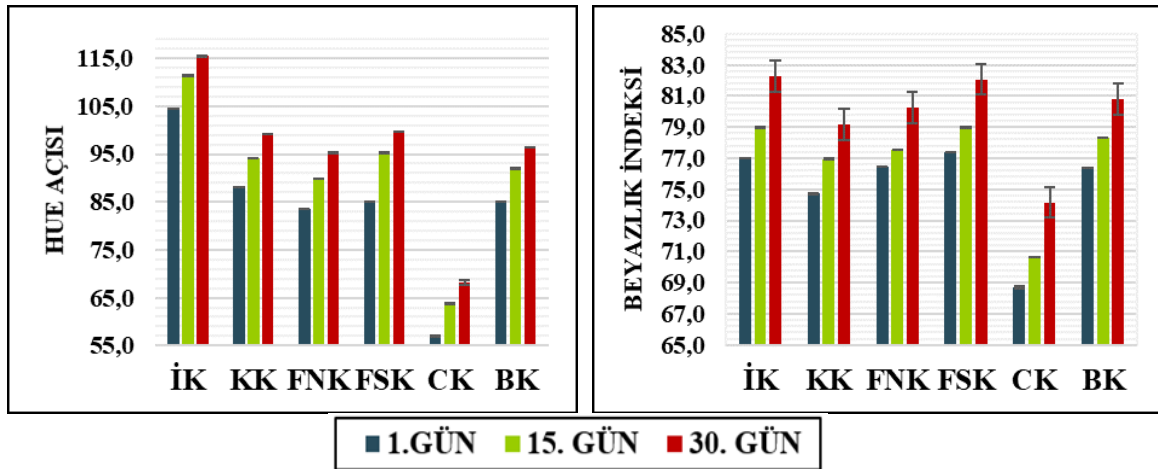
saptanmıştır. Hue açısı değerlerine göre inek sütünün yeşilimsi sarı olduğu gözlenmiş ve ceviz sütünün diğer bitkisel sültere göre daha sarımsı turuncu olduğu tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar incelendiğinde inek sütünün bitkisel sültere göre daha beyaz renge sahip olduğu ve bitkisel sülter içerisinde de en açık renge badem sütünün, en koyu renge ise ceviz sütünün sahip olduğu görülmektedir. Örnekler arasındaki bu farklılığın yağlı tohumlarda bulunan ve sarı renk veren karotenoid, flavonoid ve ksantofil (lutein) gibi renk pigmentlerinin çeşidi ve miktarından kaynaklandığı bildirilmektedir (Yılmaz-Ersan ve Topçuoğlu, 2022; Dini ve ark., 2019).

**Kefir örneklerinin serum ayrılması değerleri**

Serum ayrılması, depolama sırasında protein ağının bozulması ve jel yapının serum fazını tutma yeteneğini kaybetmesiyle ortaya çıkan önemli bir kalite kusurudur (Rasika ve ark., 2021). Kefir örneklerinin ortalama serum ayrılması değerleri kullanılarak hazırlanan grafikler Şekil 2'de sunulmuştur. Kefir örneklerinin serum ayrılması değerleri incelendiğinde en yüksek ortalama

serum ayrılması değeri ceviz sütünden üretilen kefirde, en düşük serum ayrılması değeri fıstık sütünden üretilen kefirde saptanmıştır (Çizelge 1). Ayrıca kefir örneklerinin ortalama serum ayrılması değerlerinin 15 günlük depolamanın sonunda arttığı ( $P < 0.05$ ) ve depolamanın 15. günü ile 30. günü arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ( $P > 0.05$ ) olmadığı bulunmuştur.





Şekil 2. Kefir örneklerinin serum ayrılması,  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $\Delta E$ , kroma, hue açısı ve beyazlık indeksi değerleri  
Figure 2. The whey separation,  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $\Delta E$  chroma, hue angle and whiteness index values of kefir samples

\*İK:İnek sütünden üretilen kefir, KK:Kaju sütünden üretilen kefir, FNK: Fındık sütünden üretilen kefir, FSK: Fıstık sütünden üretilen kefir, CK: Ceviz sütünden üretilen kefir, BK: Badem sütünden üretilen kefir

\*İK: Cow kefir, KK: Cashew kefir, FNK: Hazelnut kefir, FSK: Peanut kefir, CK: Walnut kefir, BK: Almond kefir

\*\*Farklı harfler ortalamaların istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir ( $P < 0.05$ ).

\*\*Means with different letters are statistically different ( $P < 0.05$ ).

Çizelge 1. Depolama süresince kefir örneklerinde belirlenen serum ayrılması değerlerine ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

Table 1. Duncan Multiple Comparison Test results of the means of whey separation values determined in kefir samples during storage

	Serum ayrılması
Ürün çeşidi	***
İK	10.58±4.47 <sup>b</sup>
KK	9.66±4.82 <sup>b</sup>
FNK	12.83±4.52 <sup>b</sup>
FSK	1.16±1.34 <sup>d</sup>
CK	18.00±5.71 <sup>a</sup>
BK	6.08±0.83 <sup>c</sup>
Depolama zamanı	***
1. gün	5.41±3.68 <sup>b</sup>
15. gün	11.37±6.63 <sup>a</sup>
30. gün	12.37±6.79 <sup>a</sup>

\*İK:İnek sütünden üretilen kefir, KK:Kaju sütünden üretilen kefir, FNK: Fındık sütünden üretilen kefir, FSK: Fıstık sütünden üretilen kefir, CK: Ceviz sütünden üretilen kefir, BK: Badem sütünden üretilen kefir

\*İK: Cow kefir, KK: Cashew kefir, FNK: Hazelnut kefir, FSK: Peanut kefir, CK: Walnut kefir, BK: Almond kefir

\*\*Farklı harfler ortalamaların istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir ( $P < 0.05$ ).

\*\*Means with different letters are statistically different ( $P < 0.05$ ).

\*\*\* $P < 0.001$  düzeyinde önemli

\*\*\*Significant at the  $P < 0.001$  level

Yağ globüllerinin çevresi protein yapıda bir membranla çevrili olup, bu protein yapı ara yüzey enerjisini ve yüzey gerilimini azaltarak

emülsiyonların stabilitesini arttırmaktadır. Fermantasyon sırasında artan asitlik, protein yapıdaki membranı bozmakta ve yağ globüllerinin

temasını kolaylaştırarak flokülasyona neden olmaktadır. Bu nedenle protein içeriği düşük emülsiyonlarda faz ayırımı artabilmektedir (Kizzie-Hayford ve ark., 2016). Bununla birlikte yağ içeriği yükseldikçe serum ayrılması değerinin düştüğü de bildirilmiştir (Lucey, 2002). Ayrıca depolama süresince de kefir içerisinde canlılığını sürdüren maya ve bakteriler proteinleri hidrolize etmekte ve protein yapı içerisine hapsolmuş serumun salınmasına neden olmaktadır (Yeniçeri ve ark., 2021). Sütün bileşiminde bulunan proteinlerin, yapısal farklılığı, aminoasit bileşimi, yüzey polaritesi veya hidrofobikliği gibi faktörlerin de serum ayrılması üzerinde etkili olduğu bildirilmektedir (Ozturkoglu-Budak ve ark., 2016). Tüm bu faktörler göz önünde bulundurularak çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara (Çizelge 1) bakıldığında serum ayrılması değerleri arasındaki farklılığın, inek sütü ve yağlı tohumlardan elde edilen bitkisel sütlerin bileşimi ile protein yapıları arasındaki farklılıktan kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir (Gursoy ve ark., 2016). Daha önce yapılan çalışmalarda, suyağ emülsiyonlarında emülgatör görevi gören proteinin bitkisel sütlerde düşük miktarda bulunması nedeniyle bitkisel sütlerde stabilite sorunlarının görüldüğü bildirilmiştir. Bu tip yapısal sorunların ksantan zamkı gibi hidrokolloidlerin eklenmesiyle giderilebildiği bilinmektedir (Bernat ve ark., 2014). Bernat ve ark., (2015) fermente badem sütünün serum ayrılması değerinin depolamanın 1. gününde %11 iken, depolamanın 28. gününde %25.1'e yükseldiğini tespit etmişlerdir. Bernat ve ark., (2014) fermente fındık sütünün serum ayrılması değerinin depolama süresince arttığını belirtmişlerdir. Ermiş ve ark. (2018) yapmış oldukları çalışmada depolamanın 10. gününde ayranın serum ayrılması değerinin (28.50ml/50ml), fermente fındık sütünün serum ayrılması değerinden (14.00ml/50ml) daha yüksek olduğunu saptamışlardır.

### **Kefir Örneklerinin Renk Analiz Sonuçları**

Fermente içeceklerin rengi ham madde çeşidinden, depolama süresinden ve pH'daki farklılıklardan etkilenebilmektedir (Ma ve ark., 2015). Çalışmamızda kefir örneklerinin ortalama  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $\Delta E$ , kroma, hue açısı ve beyazlık

indeksi değerleri kullanılarak hazırlanan grafikler Şekil 2'de sunulmuştur. Kefir örneklerinin  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  ve  $\Delta E$  değerlerine ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları incelendiğinde en yüksek ortalama  $L^*$  değerinin inek sütünden üretilen kefirde, en yüksek ortalama  $a^*$  ve  $\Delta E$  değerinin ceviz sütünden üretilen kefirde ve en yüksek ortalama  $b^*$  değerinin ise kaju sütünden üretilen kefirde olduğu saptanmıştır ( $P < 0.05$ ) (Çizelge 2). Çalışmamızda renk analizine göre  $L^*$  değeri incelendiğinde en açık rengin inek sütünden üretilen kefirde, en koyu rengin ceviz sütünden üretilen kefirde olduğu görülmektedir. Çalışmamızda ceviz sütünden üretilen kefirin diğer kefirlerle göre kırmızılığının daha fazla olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte kırmızılığın en az inek sütünden üretilen kefirde olduğu görülmektedir.  $b^*$  değeri renk parametreleri arasında sarılığı ifade etmekte olup kaju sütünden üretilen kefirin sarılığının diğer örneklerle göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Kefir örneklerinin ortalama  $L^*$  ve  $b^*$  değerlerinin depolama süresince arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak önemli ( $P < 0.05$ ) olduğu, bununla birlikte  $a^*$  ve  $\Delta E$  değerlerinin ise depolama süresince azaldığı ve bu azalışın istatistiksel olarak önemli ( $P < 0.05$ ) olduğu bulunmuştur. Kefir örneklerinin kroma, hue açısı ve beyazlık indeksi değerlerine ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 3'te verilmiştir.

Çalışmamızda hue açısı değerleri incelendiğinde inek sütünden üretilen kefirin renginin depolama boyunca yeşilimsi sarıdan (104.37), sarımsı yeşile (115.45) doğru değiştiği gözlenmiştir. Ceviz kefir hariç diğer bitkisel kefirlerin renginin depolama boyunca sarıdan yeşilimsi sarıya doğru, ceviz sütünden üretilen kefirin renginin ise sarımsı turuncudan (57.02), turuncumsu sarıya (68.20) doğru değiştiği tespit edilmiştir. Bernat ve ark., (2015) tarafından yapılan çalışmada fermente badem sütünün depolama süresince  $L^*$ , hue açısı ve beyazlık indeksi değerlerinin arttığı, kroma değerinin ise azaldığı bulunmuştur. Depolama süresince meydana gelen renk koordinatlarındaki bu değişikliklerin parçacıkların kümelenme düzeyiyle ilişkili olan farklı saydamlık (opaklık) düzeyiyle ilgili olduğu bildirilmiştir. Açıklık değeri

(L\*) ne kadar yüksek olursa, saydamlığın o kadar yüksek olduğu ve beyazlık indeksi doğrultusunda kroma değerinin o kadar düşük olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda depolama süresince badem sütünden üretilen kefirin L\* ve b\* değerleri artarken a\* değerinin azaldığı görülmektedir. Ayrıca depolama boyunca kroma ve beyazlık indeksi değerinin arttığı hue açısı değerinin ise depolamanın 1. günü ile 30. günü arasında azaldığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda L\* değerinin inek sütünden üretilen kefirde, a\* ve b\* değerinin ise fındık sütünden üretilen kefirde yüksek olduğu görülmektedir. Kefirler arasındaki bu farklılığın üretimde kullanılan sütlerin bileşiminde bulunan pigment miktarı ve çeşidinden kaynaklandığı değerlendirilmiştir. Gıdanın rengi tüketicilerin tercihini etkileyen ilk fiziksel özelliklerden biridir. Beyazlık indeksi de önemli kalite parametrelerinden biridir. Yapılan bir çalışmada ticari bitkisel sütlerin sığır sütüne göre beyazlık indeksinin daha düşük olduğu ve koyuluğunun daha fazla olduğu bildirilmiştir (Jeske ve ark.,

2017). Rouhi ve ark. (2015) yapmış oldukları çalışmada mikroorganizma yükünün ürünün renk özelliklerini etkileyebileceğini, yüksek konsantrasyondaki bakteri varlığının ışık saçan partikül gibi davranarak L değerini artırabileceğini bildirmiştir. Ürünün pH değerinin de renk özelliklerini etkileyebileceği, izoelektrik noktada (pH 4.0-4.6) kazein misellerinin kümelenmesi ve parçacık boyutunun değiştiği belirtilmektedir. Söz konusu bu değişikliğin ışığın yansıtma özelliğini de değiştirdiği belirtilmiştir. pH'ı daha yüksek olan ürünlerin parçacık boyutu daha az olduğu için ışığı yansıtmadığı dolayısıyla L\* değerinin de daha düşük olabileceği belirtilmektedir. Çomak Göçer ve Koptagel (2023) badem, kaju, fındık, yer fıstığı ve ceviz kullanarak elde ettikleri bitkisel sütlerden kefir üretimi gerçekleştirmiştir. Söz konusu çalışmada en yüksek pH değerine ceviz sütünden üretilen kefir örneğinin sahip olduğu bildirilmektedir. Çalışmamızda da ceviz sütünden üretilen kefirin L\* değerinin daha düşük olduğu görülmektedir.

Çizelge 2. Depolama süresince kefir örneklerinde belirlenen renk parametrelerine ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

Table 2. Duncan Multiple Comparison Test results of the means of the color parameters determined in kefir samples during storage.

	L*	a*	b*	$\Delta E$
Ürün çeşidi	***	***	***	***
İK	80.22±2.30 <sup>a</sup>	-1.97±0.48 <sup>f</sup>	5.26±0.04 <sup>d</sup>	15.35±2.20 <sup>e</sup>
KK	78.04±1.92 <sup>c</sup>	-0.47±0.54 <sup>e</sup>	6.97±0.11 <sup>a</sup>	17.71±1.86 <sup>b</sup>
FNK	78.95±1.69 <sup>d</sup>	0.04±0.51 <sup>b</sup>	6.08±0.07 <sup>c</sup>	16.98±1.99 <sup>c</sup>
FSK	79.97±2.03 <sup>b</sup>	-0.25±0.49 <sup>d</sup>	4.48±0.20 <sup>f</sup>	15.40±2.02 <sup>e</sup>
CK	71.70±2.36 <sup>f</sup>	2.49±0.35 <sup>a</sup>	4.91±0.42 <sup>e</sup>	23.84±2.33 <sup>a</sup>
BK	79.52±1.95 <sup>c</sup>	-0.14±0.53 <sup>c</sup>	6.52±0.15 <sup>b</sup>	16.17±1.88 <sup>d</sup>
Depolama zamanı	***	***	***	***
1. gün	75.80±3.04 <sup>c</sup>	0.58±1.26 <sup>a</sup>	5.60±0.87 <sup>c</sup>	19.90±3.01 <sup>a</sup>
15. gün	77.60±2.99 <sup>b</sup>	-0.15±1.39 <sup>b</sup>	5.63±1.02 <sup>b</sup>	17.90±2.98 <sup>b</sup>
30. gün	80.74±2.79 <sup>a</sup>	-0.59±1.40 <sup>c</sup>	5.89±0.80 <sup>a</sup>	14.92±2.79 <sup>c</sup>

\*İK:İnek sütünden üretilen kefir, KK:Kaju sütünden üretilen kefir, FNK: Fındık sütünden üretilen kefir, FSK: Fıstık sütünden üretilen kefir, CK: Ceviz sütünden üretilen kefir, BK: Badem sütünden üretilen kefir

\*İK:Cow kefir, KK:Cashew kefir, FNK: Hazelnut kefir, FSK: Peanut kefir, CK: Wallnut kefir, BK: Almond kefir

\*\*Farklı harfler ortalamaların istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir ( $P < 0.05$ ).

\*\*\*Means with different letters are statistically different ( $P < 0.05$ ).

\*\*\* $P < 0.001$  düzeyinde önemli

\*\*\*Significant at the  $P < 0.001$  level

Çizelge 3. Depolama süresince kefir örneklerinde belirlenen kroma, hue açısı ve beyazlık indeksi parametrelerine ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları  
 Table 3. Duncan Multiple Comparison Test results of the means of chroma, hue angle and whiteness index parameters determined in kefir samples during storage

	Kroma	Hue açısı	Beyazlık indeksi
Ürün çeşidi	***	***	***
İK	5.64±0.19 <sup>d</sup>	110.39±4.57 <sup>a</sup>	79.42±2.16 <sup>a</sup>
KK	7.01±0.12 <sup>a</sup>	93.82±4.51 <sup>b</sup>	76.93±1.81 <sup>d</sup>
FK	6.10±0.07 <sup>c</sup>	89.56±4.80 <sup>e</sup>	78.08±1.60 <sup>c</sup>
FSK	4.52±0.22 <sup>f</sup>	93.27±6.11 <sup>c</sup>	79.49±1.96 <sup>a</sup>
CK	5.52±0.32 <sup>e</sup>	63.01±4.61 <sup>f</sup>	71.16±2.27 <sup>e</sup>
BK	6.54±0.16 <sup>b</sup>	91.18±4.66 <sup>d</sup>	78.49±1.81 <sup>b</sup>
Depolama zamanı	***	***	***
1. gün	5.79±0.73 <sup>b</sup>	83.86±13.92 <sup>c</sup>	75.09±3.10 <sup>c</sup>
15. gün	5.79±0.93 <sup>b</sup>	91.07±15.24 <sup>b</sup>	76.89±2.89 <sup>b</sup>
30. gün	6.09±0.74 <sup>a</sup>	95.68±13.99 <sup>a</sup>	79.78±2.73 <sup>a</sup>

\*İK:İnek sütünden üretilen kefir, KK:Kaju sütünden üretilen kefir, FNK: Fındık sütünden üretilen kefir, FSK: Fıstık sütünden üretilen kefir, CK: Ceviz sütünden üretilen kefir, BK: Badem sütünden üretilen kefir

\*İK:Cow kefir, KK:Cashew kefir, FNK: Hazelnut kefir, FSK: Peanut kefir, CK: Walnut kefir, BK: Almond kefir

\*\*Farklı harfler ortalamaların istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir ( $P < 0.05$ ).

\*\*Means with different letters are statistically different ( $P < 0.05$ ).

\*\*\* $P < 0.001$  düzeyinde önemli

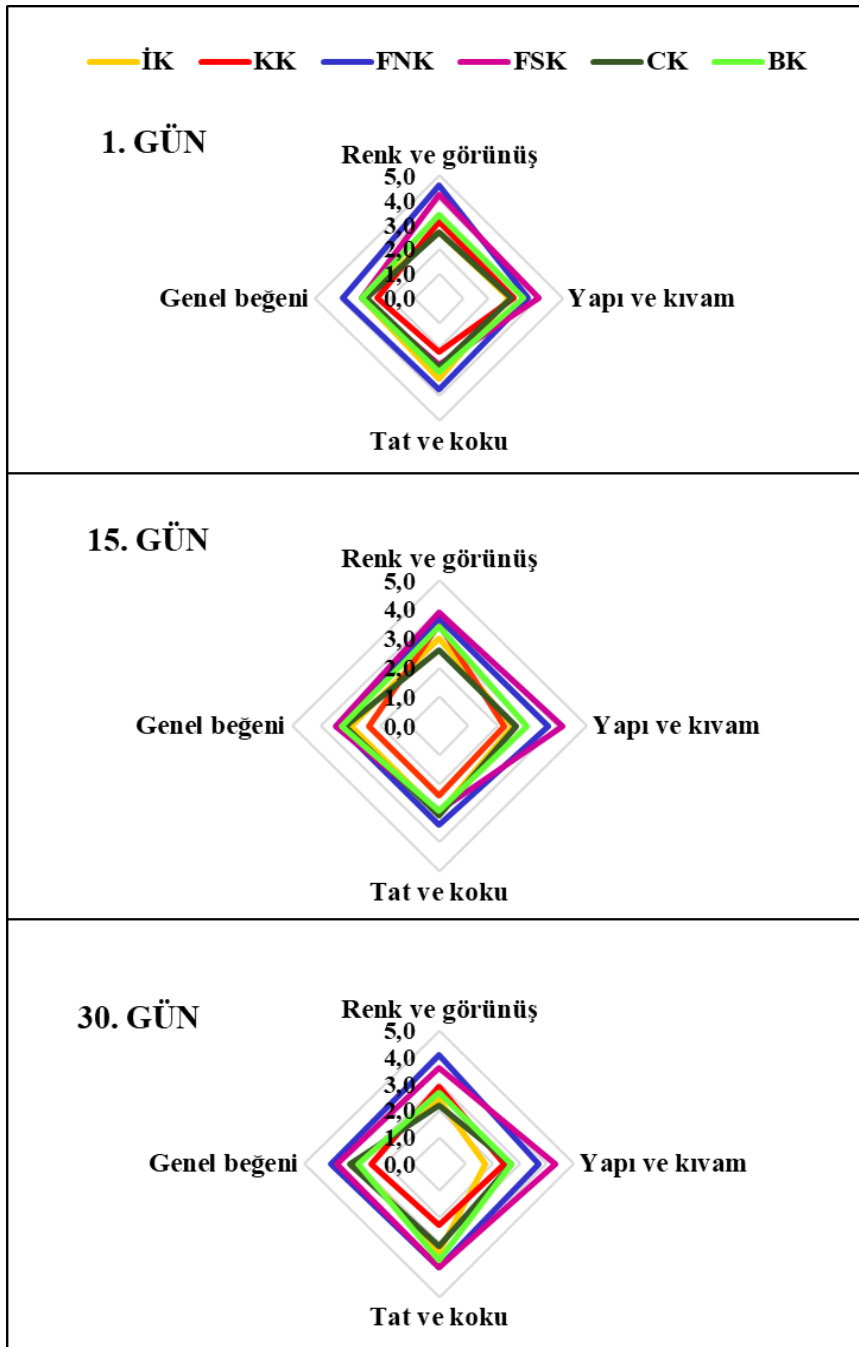
\*\*\*Significant at the  $P < 0.001$  level

### Kefir Örneklerinin Duyusal Analiz Sonuçları

Vejetaryen/vegan beslenen bireylerde bitkisel sültere gösterilen talep artmakla birlikte, daha önce denemediği bir ürünün tadının çekici gelmeyeceği algısı tüketiciler tarafından fermente bitkisel süt ürünlerinin denenmesinde isteksizlik yaratabilmektedir. Lezzet, gıdaların en önemli satın alma kriteri olup, ürünün tadı ile ilgili verilen bilgiler tüketicinin deneme isteğini artırabilmektedir (Mäkinen ve ark., 2016). Çalışmamızda üretmiş olduğumuz kefir örneklerine ait ortalama renk ve görünüş, yapı ve kıvam, tat ve koku ile genel beğeni puanları kullanılarak hazırlanan grafikler Şekil 3'te görülmektedir.

Örnekler renk ve görünüş açısından değerlendirildiğinde en yüksek puanı fındık sütü kullanılarak üretilen kefirin, en düşük puanı ise ceviz sütü kullanılarak üretilen kefirin aldığı tespit edilmiştir (Çizelge 4). Ayrıca kefir örneklerinin beyazlık indeksi değerleri ile panelistlerin verdiği renk ve görünüş puanları arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, inek ve fıstık sütünden üretilen kefir örnekleri en yüksek beyazlık indeksi değerine sahip iken, en yüksek renk ve görünüş puanını alamamıştır. Bununla birlikte en düşük

beyazlık indeksi değerine sahip ceviz sütünden üretilen kefir örneği en düşük renk ve görünüş puanını almıştır. Ayrıca kefir örneklerine verilen ortalama renk ve görünüş puanlarının depolamanın 15. ile 30. günü arasında azaldığı ( $P < 0.05$ ) saptanmıştır. Yapı ve kıvam özellikleri değerlendirildiğinde en yüksek puanı fıstık sütü kullanılarak üretilen kefirin, en düşük puanı ise inek sütü kullanılarak üretilen kefirin aldığı saptanmıştır. 4°C'de 30 günlük depolama süresince örneklere verilen ortalama yapı ve kıvam puanlarının azaldığı belirlenmiştir ( $P < 0.05$ ). Bu azalmanın depolama esnasında örneklerde tespit edilen serum ayrılması değerinin artmasına bağlı olabileceği değerlendirilmiştir. Örneklere verilen tat ve koku puanları karşılaştırıldığında en yüksek puanı fındık sütü kullanılarak üretilen kefirin, en düşük puanı ise kaju sütü kullanılarak üretilen kefirin aldığı tespit edilmiştir. Depolamanın 15. ile 30. günü arasında örneklere verilen tat ve koku puanlarının arttığı belirlenmiştir ( $P < 0.05$ ). Panelistler tarafından verilen genel beğeni puanları değerlendirildiğinde ise en yüksek puanı fındık sütü kullanılarak üretilen kefirin, en düşük puanı ise kaju sütü kullanılarak üretilen kefirin aldığı tespit edilmiştir.



Şekil 3. Kefir rneklerinin renk ve görünüş, yapı ve kıvam, tat ve koku, genel beğeni puanları (tam puan = 5)

Figure 3. Color and appearance, texture and consistency, taste and smell, general appreciation scores of kefir samples (full score = 5)

\*İK:İnek sütünden üretilen kefir, KK:Kaju sütünden üretilen kefir, FNK: Fındık sütünden üretilen kefir, FSK:Fıstık sütünden üretilen kefir, CK: Ceviz sütünden üretilen kefir, BK: Badem sütünden üretilen kefir

\*İK:Cow kefir, KK:Cashew kefir, FNK: Hazelnut kefir, FSK: Peanut kefir, CK: Walnut kefir, BK: Almond kefir

\*\*1 puan: Çok kötü, 2 puan: kötü, 3 puan: orta, 4 puan: iyi, 5 puan: Çok iyi

\*\*1 point: very bad, 2 points: bad, 3 points: fair, 4 points: good, 5 points: very good



Çizelge 4. Depolama süresince kefir örneklerinde belirlenen duyuşal niteliklere ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları  
 Table 4. Duncan Multiple Comparison Test results of the means of sensory qualities determined in kefir samples during storage

Ürün çeşidi	Renk ve görünüş	Yapı ve kıvam	Tat ve koku	Genel beğeni
İK	2.70±0.34 <sup>c</sup>	2.33±0.48 <sup>d</sup>	3.20±0.16 <sup>ab</sup>	3.06±0.27 <sup>b</sup>
KK	3.16±0.42 <sup>b</sup>	2.53±0.37 <sup>d</sup>	2.30±0.22 <sup>c</sup>	2.46±0.14 <sup>c</sup>
FNK	4.13±0.44 <sup>a</sup>	3.66±0.24 <sup>b</sup>	3.66±0.35 <sup>a</sup>	3.76±0.31 <sup>a</sup>
FSK	3.90±0.36 <sup>a</sup>	4.16±0.35 <sup>a</sup>	3.16±0.58 <sup>ab</sup>	3.46±0.39 <sup>ab</sup>
CK	2.50±0.25 <sup>c</sup>	2.73±0.31 <sup>dc</sup>	3.00±0.51 <sup>b</sup>	3.13±0.35 <sup>b</sup>
BK	3.16±0.42 <sup>b</sup>	3.03±0.46 <sup>c</sup>	3.16±0.31 <sup>ab</sup>	3.13±0.18 <sup>b</sup>
Depolama zamanı	*		*	
1. gün	3.45±0.78 <sup>a</sup>	3.28±0.49 <sup>a</sup>	2.95±0.56 <sup>b</sup>	3.10±0.45 <sup>a</sup>
15. gün	3.35±0.45 <sup>a</sup>	3.03±0.75 <sup>ab</sup>	2.95±0.32 <sup>b</sup>	3.13±0.41 <sup>a</sup>
30. gün	2.98±0.72 <sup>b</sup>	2.91±0.89 <sup>b</sup>	3.35±0.64 <sup>a</sup>	3.28±0.57 <sup>a</sup>

\*İK: İnek sütünden üretilen kefir, KK: Kaju sütünden üretilen kefir, FNK: Fındık sütünden üretilen kefir, FSK: Fıstık sütünden üretilen kefir, CK: Ceviz sütünden üretilen kefir, BK: Badem sütünden üretilen kefir

\*İK: Cow kefir, KK: Cashew kefir, FNK: Hazelnut kefir, FSK: Peanut kefir, CK: Walnut kefir, BK: Almond kefir

\*\*Farklı harfler ortalamaların istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir ( $P < 0.05$ ).

\*\*Means with different letters are statistically different ( $P < 0.05$ ).

\* $P < 0.05$  düzeyinde önemli, \*\*  $P < 0.01$  düzeyinde önemli \*\*\* $P < 0.001$  düzeyinde önemli

\*Significant at the  $P < 0.05$  level, \*\*Significant at the  $P < 0.01$  level, \*\*\*Significant at the  $P < 0.001$  level

Fermente ürünlerin görünüş, yapı ve kıvam puanlarının düşük olması serum ayrılmasından kaynaklanabilmektedir (Kizzie-Hayford ve ark., 2016). İlyasoğlu ve Yılmaz (2019) tarafından yapılan çalışmada fındık sütü ile zenginleştirilmiş yoğurdun, inek sütünden üretilen yoğurda göre genel beğeni puanının daha düşük olduğu bulunmuştur. Çalışmamızda fındık sütünden üretilen kefirin genel beğeni puanının inek sütünden üretilen kefire göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Yapılan başka bir çalışmada inek sütünden üretilen yoğurdun görünüş, lezzet ve genel beğeni puanlarının fıstık sütünden üretilen yoğurda göre daha yüksek olduğu ancak doku açısından değerlendirildiğinde fıstık sütünden üretilen yoğurdun daha yüksek puana sahip olduğu belirlenmiştir. Bu durum fıstık sütünden üretilen yoğurdun yağ içeriğinin daha yüksek olmasıyla ilişkilendirilmiştir (Isanga ve Zhang, 2009).

Fermente ürünlerinin stabilitesi, aroması, tadı ve dokusu pH'a bağlı olarak değişebilmektedir. pH'ın azalması ürünlerde proteinlerin çökmesine neden olarak ürünün stabilitesine etki etmektedir. Optimum pH değeri ürünün duyuşal kalitesinin iyileştirmekte ve uçucu organik bileşiklerin aşırı

oluşmasını engelleyerek ürünün aromasını korumaktadır (dos Santos ve ark, 2019). Fermente ceviz sütünün duyuşal özelliklerinin değerlendirildiği bir çalışmada titrasyon asitliği düştükçe duyuşal değerlendirme puanının da düştüğü belirtilmiştir (Cui ve ark., 2013). Bernat ve ark., (2014) tarafından yapılan çalışmada ise titrasyon asitliği değerinin düşük olması, tatlılık üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olduğundan, ürünün genel duyuşal kabulü üzerinde olumlu bir etkiye sahip olabileceği belirtilmiştir. Çalışmamızda 4°C'de 30 gün depolama sonunda tat ve koku ile genel beğeni puanlarındaki artış bir diğer çalışmamızda (Çomak Göçer ve Koptagel, 2023) belirtilen depolama süresi boyunca bitkisel sütlerden üretilen kefir örneklerinin pH değerlerinde tespit edilen artış ile ilişkilendirilmektedir.

## SONUÇ

Sütün bileşiminde bulunan karbonhidrat, protein ve yağ bileşenlerinin konsantrasyonu kefir starter kültürü içerisindeki mikroorganizmaların metabolizmasını ve stabilitesini etkileyerek substrat tüketimi ve metabolit üretimi üzerinde etkili olmaktadır. Yağlı tohumlardan elde edilen

sütler ve inek sütü kıyaslandığında bileşimindeki yüksek yağ oranı ve düşük karbonhidrat oranı ile fermentasyon için zorlu bir ortam oluşturmaktadır. Yapılan bu çalışmada %100 bitkisel süt kullanılarak gıda katkı maddesi ve şeker ilavesi olmadan yağlı tohumlardan elde edilen bitkisel sütlerin kefir starter kültürü ile fermente olabildiği belirlenmiştir. Renk parametreleri incelendiğinde, bitkisel sütler içerisinde en koyu renge ceviz sütünün sahip olduğu saptanmıştır. En açık renk inek sütünden üretilen kefirde, en koyu renk ise ceviz sütünden üretilen kefirde belirlenmiştir. Üretilen kefir örnekleri içerisinde renk ve görünüş, tat ve koku ile genel beğeni puanlarında en yüksek puanı fındık sütünden üretilen kefir örneği almış olup, kaju sütünden üretilen kefir örneği en düşük tat ve koku ile genel beğeni puanlarını almıştır. Çalışmamızda en yüksek serum ayrılması değeri ceviz sütünden üretilen kefir örneğinde tespit edilmiş olup, en düşük renk ve görünüş puanı ile yapı ve kıvam puanını da ceviz sütünden üretilen kefir örneği almıştır. Ayrıca en düşük ortalama serum ayrılması değeri fıstık sütünden üretilen kefir örneğinde tespit edilmiş olup panelistler tarafından verilen en yüksek yapı ve kıvam puanını da fıstık sütünden üretilen kefir örneğinin aldığı görülmektedir. Genel beğeni puanları göz önünde bulundurulduğunda kaju sütü hariç diğer bitkisel sütlerden üretilen kefir örneklerinin inek sütünden üretilen kefir örneğinden daha çok beğenildiği tespit edilmiştir. Bu çalışma badem, fındık, fıstık ve cevizden elde edilen bitkisel sütlerden şeker ve gıda katkı maddesi ilavesi olmaksızın üretilen bitkisel kefir örneklerinin inek sütünden üretilen kefir örneğine kıyasla daha çok tercih edildiğini göstermektedir.

#### ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarların, başka kişiler ve/veya kurumlar ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

#### YAZAR KATKILARI

Bu çalışma Dr. Öğr. Üyesi Emine Mine ÇOMAK GÖÇER danışmanlığında yürütülen Ebru KOPTAGEL'in yüksek lisans tez çalışmasından üretilmiştir. Ebru KOPTAGEL kefir üretiminde, analizlerin yapılmasında ve verilerin değerlendirilmesinde görev almıştır. Emine Mine ÇOMAK GÖÇER çalışmanın planlanmasını,

verilerin değerlendirilmesini ve makalenin yazımını gerçekleştirmiştir. Yazarlar makalenin son halini okumuş ve onaylamıştır.

#### TEŞEKKÜR

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje numarası: TSA-2020-5316).

#### KAYNAKLAR

- Ahmadian-Kouchaksaraei, Z., Varidi, M., Varidi, M.J., Pourazarang, H. (2014). Influence of processing conditions on the physicochemical and sensory properties of sesame milk: A novel nutritional beverage. *LWT-Food science and Technology*, 57(1): 299-305, doi:10.1016/j.lwt.2013.12.028
- Atalar, I. (2019). Functional kefir production from high pressure homogenized hazelnut milk. *LWT- Food Science and Technology*, 107: 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.013>
- Atik Sözeri, D., Gürbüz, B., Bölük, E., Palabıyık, I. (2021). Development of vegan kefir fortified with *Spirulina platensis*. *Food Bioscience*, 42, 101050. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101050>
- Bensmira, M., Jiang, B. (2012). Rheological characteristics and nutritional aspects of novel peanut based kefir beverages and whole milk kefir. *International Food Research Journal*, 19(2): 647-650.
- Bernat, N., Cháfer, M., Chiralt, A., González-Martínez, C. (2014). Hazelnut milk fermentation using probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and inulin. *International Journal of Food Science and Technology*. 49: 2553-2562, doi: 10.1111/ijfs.12585
- Bernat, N., Cháfer, M., Chiralt, A., González-Martínez, C. (2015). Development of a non-dairy probiotic fermented product based on almond milk and inulin. *Food Science and Technology International*, 21(6): 440-53, doi: 10.1177/1082013214543705
- Cui, X.H., Chen, S.J., Wang, Y., Han, J.R. (2013). Fermentation conditions of walnut milk beverage inoculated with kefir grains. *LWT-Food Science*

- Technology*, 50(1): 349-352, doi:10.1016/j.lwt.2012.07.043
- Çomak Göçer, E.M., Koptagel, E. (2023). Production of milks and kefir beverages from nuts and certain physicochemical analysis. *Food Chemistry*, 402, 134252. doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134252.
- Dini, A., Falahati-Pour, S.H., Behmaram, K., Sedaghat, H. (2019). The kinetics of colour degradation, chlorophylls and xanthophylls loss in pistachio nuts during roasting process, *Food Quality and Safety*, 3(4): 251–263, doi.org/10.1093/fqsafe/fyz020.
- dos Santos, D.C., De Oliveira Filho, J.G., Santana, A.C.A., De Freitas, B.S.M., Silva, F.G., Takeuchi, K.P., Egea, M.B. (2019). Optimization of soymilk fermentation with kefir and the addition of inulin: Physicochemical, sensory and technological characteristics. *LWT*, 104: 30-37, doi:10.1016/j.lwt.2019.01.030.
- Düzgüneş, O., Kesici, T., Kavuncu, O., Gürbüz, F. (1987). Araştırma ve Deneme Metodları (İstatistik metodları-II). Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Yayın No: 102, Ankara, s:381
- Ebner, J., Aşçı Arslan, A., Fedorova, M., Hoffmann, R., Küçükçetin, A., & Pischetsrieder, M. (2015). Peptide profiling of bovine kefir reveals 236 unique peptides released from caseins during its production by starter culture or kefir grains. *Journal of Proteomics*, 117: 41–57. doi: 10.1016/j.jprot.2015.01.005.
- Erk, G., Seven, A., Akpınar, A. (2019). Vegan ve vejeteryen beslenmede probiyotik bitkisel bazlı süt ürünlerinin yeri. *Gıda*. 44(3): 453-462, doi:10.15237/gıda.GD18083
- Ermiş, E., Güneş, R., Zent, İ., Çağlar, M.Y., Yılmaz, M.T. (2018) Characterization of hazelnut milk fermented by *lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgarius* and *streptococcus thermophilus*. *Gıda*, 43(4): 677-686, doi: 10.15237/gıda.GD18022
- Gürsoy, O., Yılmaz, Y., Gokce, O., Ertan, K. (2016). Effect of ultrasound power on physicochemical and rheological properties of yoghurt drink produced with thermosonicated milk. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28: 235–241, doi:10.9755/ejfa.2015-09-719
- Isanga, J., Zhang, G. (2009). Production and evaluation of some physicochemical parameters of peanut milk yoghurt. *LWT-Food Science and Technology*, 42(6): 1132-1138, doi:10.1016/j.lwt.2009.01.014
- İlyasoğlu, H., Yılmaz, F. (2019). Preliminary investigation of yoghurt enriched with hazelnut milk. *International Food Research Journal*. 26(2): 631-637.
- Jeske, S., Zannini, E., Arend, E.K. (2017). Evaluation of physicochemical and glycaemic properties of commercial plant-based milk substitutes. *Plant Foods for Human Nutrition*, 72: 26–33, doi:10.1007/s11130-016-0583-0
- Kesenkaş, H., Dinkçi, N., Seçkin, K., Kınık, O., Gönç, S., Günç-Ergönül, P., Kavas, G. (2011). Physicochemical, microbiological and sensory characteristics of soymilk kefir. *African Journal of Microbiology Research*, 5(22): 3737–3746. https://doi.org/10.5897/AJMR11.579
- Kizzie-Hayford, N., Jaros, D., Zahn, S., Rohm, H. (2016). Effects of protein enrichment on the microbiological, physicochemical and sensory properties of fermented tiger nut milk. *LWT*, 74: 319-324, doi:10.1016/j.lwt.2016.07.067
- Köksoy, A., Kılıç, M. (2004). Use of hydrocolloids in textural stabilization of a yoghurt drink, ayran. *Food Hydrocolloids*, 18: 593-600, doi.org/10.1016/j.foodhyd.2003.10.002
- Lopez, C.C., Serio, A., Montalvo, C., Ramirez, C., Álvarez, J.A.P., Paparella, A., Mastrocola, D., Martuscelli, M. 2017. Effect of nisin on biogenic amines and shelf life of vacuum packaged rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) filets. *Journal of Food Science and Technology*. 54(10): 3268-3277 doi: 10.1007/s13197-017-2773-7
- Lucey, J.A. (2002). Formation and physical properties of milk protein gels. *Journal of Dairy Science*, 85: 281-294, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74078-2
- Ma, L., Li, B., Han, F., Yan, S., Wang, L., Sun, J. (2015). Evaluation of the chemical quality traits of soybean seeds, as related to sensory attributes of

- soymilk. *Food Chemistry*, 173: 694-701 doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.096
- Mäkinen, O.E., Wanhalinna, V., Zannini, E., Arendt, E.K. (2016). Foods for special dietary needs: non-dairy plant-based milk substitutes and fermented dairy-type products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(3): 339-49, doi: 10.1080/10408398.2012.761950
- Mauro, C.S.I., Garcia, S. (2019). Coconut milk beverage fermented by *Lactobacillus reuteri*: optimization process and stability during refrigerated storage. *Journal of Food Science and Technology*, 56(2): 854-864, doi: 10.1007/s13197-018-3545-8
- Ozturkoglu-Budak, S., Akal, C., Yetisemiyen, A. (2016). Effect of dried nut fortification on functional, physicochemical, textural, and microbiological properties of yogurt. *Journal of Dairy Science*, 99(11): 8511-8523, doi: 10.3168/jds.2016-11217
- Paredes, J.L., Escudero-Gilete, M.L., Vicario, I.M. (2022). A new functional kefir fermented beverage obtained from fruit and vegetable juice: Development and characterization. *LWT*, 154, 112728, doi: 10.1016/j.lwt.2021.112728
- Paul, A.A., Kumar, S., Kumar, V., Sharma, R. (2020). Milk analog: plant based alternatives to conventional milk, production, potential and health concerns. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(18): 3005-3023, doi: 10.1080/10408398.2019.1674243
- Rasika, D.M.D., Vidanaratchi, J.K., Rocha, R.S., Balthazar, C.F., Cruz, A.G., Sant'Ana, A.S., Ranadheera, C.S. (2021). Plant-based milk substitutes as emerging probiotic carriers. *Current Opinion in Food Science*, 38: 8-20, doi: 10.1016/j.cofs.2020.10.025
- Rouhi, M., Mohammadi, R., Mortazavian, A.M., Sarlak, Z. (2015). Combined effects of replacement of sucrose with d-tagatose and addition of different probiotic strains on quality characteristics of chocolate milk. *Dairy Science & Technology*, 95(2): 115-133, doi:10.1007/s13594-014-0189-y
- Sethi, S., Tyagi, S.K., Anurag, R.K. (2016). Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 53: 3408-3423, doi: 10.1007/s13197-016-2328-3
- Tangyu, M., Muller, J., Bolten, C.J., Wittmann, C. (2019). Fermentation of plant-based milk alternatives for improved flavour and nutritional value. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 103 (23-24): 9263-9275, doi: 10.1007/s00253-019-10175-9
- Tasova, M., Özkurt, M. (2018). Korunga (*Onobrychis sativa* L.) tohumluğunun bazı biyoteknik ve renk özelliklerinin belirlenmesi. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*. 1(2): 48- 58, doi:10.38001/IJLSB.475100
- Tomar, O., Çağlar, A., Akarca, G. (2017). Kefir ve sağlık açısından önemi. *Afyon Kocatepe University Journal of Science and Engineering*, 17: 834-853, doi: 10.5578/fmbd.57533
- Vanga, S.K., Raghavan, V. (2018). How well do plant based alternatives fare nutritionally compared to cow's milk? *Journal of Food Science and Technology*, 55(1): 10-20, doi: 10.1007/s13197-017-2915-y
- Wadhvani, R., McMahon, D.J. (2012). Color of low-fat cheese influences flavor perception and consumer liking. *Journal of Dairy Science*, 95: 2336-2346, doi: 10.3168/jds.2011-5142
- Wang, Y.C., Yu, R.C., Yang, H.Y., Chou, C.C. (2003). Sugar and acid contents in soymilk fermented with lactic acid bacteria alone or simultaneously with bifidobacteria. *Food Microbiology*, 20(3): 333-338, doi: 10.1016/S0740-0020(02)00125-9
- Yeniçeri, Ş.A, Çomak Göçer, E.M., Küçükçetin, A. (2021). Probiyotik bakteri içeren ayranın fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri. *Akademik Gıda*, 19(4): 414-423, doi: 10.24323/akademik-gida.1050733
- Yılmaz-Ersan, L., Topçuoğlu, E. (2022). Evaluation of instrumental and sensory measurements using multivariate analysis in probiotic yogurt enriched with almond milk. *Journal of Food Science and Technology*, 59, 133-143. doi.org/10.1007/s13197-021-04994-w

# İçindekiler / Content

## Araştırmalar (İngilizce) / Researches (English)

- Öztürk, S., Bağder Elmacı, S., Özçelik, F. *Effect of fermentation processes on phenolic content and antioxidant activity during production of black carrot vinegar* / Kara havuç sirkesi üretimi sırasında fermantasyon işlemlerinin fenolik içeriği ve antioksidan aktivitesi üzerine etkisi.....25-37
- Yıldız, S., Karakuş, E., Öztürk-Muti, S. *D-optimal mixture design approach in the production of cookies enriched with dietary fiber sources such as lentil flour, banana fruit and banana peel powder* / Mercimek unu, muz meyve ve muz kabuk tozu gibi diyet lifi kaynakları ile zenginleştirilen bisküvi üretiminde D-optimal karışım tasarımı yaklaşımı .....94-106
- Geçer, E.N., Anlı, R.E. *The effect of different storage conditions on anthocyanin profile of merlot red wines* / Farklı depolama koşullarının merlot şaraplarında antosiyanin profili üzerine etkisi .....160-170
- Yonar, D., Haman Bayarı, S. *Investigation of regular and hypoallergenic infant milk formulas by ATR-FTIR spectroscopy combined with multivariate analysis methods* / Standart ve hipoalerjenik bebek sütü formüllerinin ATR-FTIR spektroskopisi ve çok değişkenli analiz yöntemleriyle incelenmesi .....171-184
- Çelik, S.K., Turan, E., Şimşek, A. *Some physicochemical and sensory properties of hazelnut beverages enriched with VIT-C source fruits and shelf life* / VIT-C kaynaklı meyvelerle zenginleştirilmiş fındık içeceklerinin bazı fizikokimyasal ve duyuşal özellikleri ve raf ömrü.....185-198

## Araştırmalar (Türkçe) / Researches (Turkish)

- Urgu-Öztürk, M. Paslanmaz çelik yüzeylerde süt protein konsantrisi birikiminin ve su ile çalkalama, alkali ve enzimatik temizleme yöntemlerinin etkinliğinin FTIR-ATR ile değerlendirilmesi / *Evaluation of fouling with milk protein concentrate on the stainless steel surfaces and the efficiencies of rinsing, alkaline and enzymatic cleaning methods by using FTIR-ATR as a tool*.....1-15
- Ersoy, G., Arslan-Tontul, S., Erbaş, M. Probiyotik *A. clausii* sporu içeren kek üretimi / *Cake production with probiotic A. clausii spores* .....16-24
- Kanca, N., Altınay, C., Albayrak-Delialioğlu, R. Farklı oranlarda peyniraltı suyu ve süt bazlı fermente içeceklerin bazı özellikleri / *Some properties of whey and milk-based fermented beverages in different proportions*.....38-49
- Yılmaz, H., Şahin, A.R. Kafein molekülünün müsin proteini ile olan etkileşiminin floresan spektroskopisi ile araştırılması / *Investigation of the interaction between caffeine molecule and musin protein by fluorescence spectroscopy technique*.....50-60
- Dündar-Kırıt, B., Sağol, S., Ağçam, E., Akıldız, A. Farklı kurutma yöntemlerinin böğürtlen kalite özellikleri üzerine etkileri ve kuruma kinetiği / *Effects of different drying methods on quality attributes of blackberry and drying kinetic*.....61-72
- Akçay-Salık, R., Bitim, E., Köprüalan-Aydın, Ö., Selçuk, E., Altay, Ö., Kaymak-Ertekin, F. Ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen zeytin yaprağı ekstraktının iyonik jelasyon yöntemi ile enkapsülasyonu ve kefir içeceğinde kullanılması / *Encapsulation of olive leaf extract obtained by ultrasonic-assisted extraction method and use in kefir beverage* .....73-93
- Akdeniz, V. Ultrason uygulamasının yoğurt benzeri fermente süt ürününde farklı probiyotik laktobasil türlerinin canlılığı üzerine etkisi / *Effect of ultrasound application on viability of different probiotic Lactobacillus species in yogurt-like fermented dairy product* .....107-117
- Bayram, M., Topuz, S. Madımaktan (*Polygonum cognatum* Meissn.) yanıt yüzey yöntemi kullanılarak fenolik bileşik ekstraksiyonunun optimizasyonu / *Optimization of phenolic compound extraction using response surface method from madımak (Polygonum cognatum Meissn.)* .....118-129
- Şişli, B., Çelebi-Uzkuç, N.M., Bayhan, A., Kırca-Toklucu, A. Karalahna şaraplarının fenolik bileşenleri üzerine fermantasyon tekniği ve şişede depolamanın etkisi / *Effect of fermentation technique and bottle storage on the phenolic components of Karalahna wines* .....130-143
- Kutlu Kantar, N. Derin eütekik çözücünün *Rheum ribes* köklerinden fenolik bileşik ekstraksiyonu üzerine etkisi / *Impact of deep eutectic solvent on phenolic compound extraction from Rheum ribes roots* .....199-208
- Örü, F., Hendek Ertop, M. Siyez kepeği ekşi hamur optimizasyonunun ekmeğın kalite ve biyoaktif nitelikleri üzerindeki etkileri / *Effect of the optimization of einkorn bran sourdough on the quality and bioactive properties of the bread* .....209-226
- Çomak Göçer, E. M., Koptagel, E. Farklı yağlı tohumlardan elde edilen bitkisel sütlerden üretilen kefirlerin bazı fiziksel ve duyuşal özellikleri / *Some physical and sensory properties of kefir made from vegetable milk from different nuts* .....227-241

## Derlemeler (Türkçe) / Reviews (Turkish)

- Nurko, E., Nakilcioğlu, E. Gıda endüstrisinde simbiyotikler, postbiyotikler ve paraprobiyotikler / *Symbiotics, postbiotics, and paraprobiotics in the food industry*.....144-159