

# GIDA

*THE JOURNAL OF FOOD*



E-ISSN 1309 - 6273, ISSN 1300 - 3070

CİLT / VOLUME : 48

SAYI / NUMBER : 2

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 04 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*  
Draughton, 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*  
Konuskan, 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)

- Erem, F. (2023). *Physicochemical, sensory, and bioactive properties of gluten-free puddings produced with aronia derivatives / Aronya türevleri ile üretilen glutensiz pudinglerin fizikokimyasal, duyuusal ve biyoaktif özellikleri* ..... **243-255**
- Avcı, A., Cerit, İ., Hamk, M., Yılmaz Keskin, S. *Improved extraction of bioactive compounds from the pollens of *Typha domingensis* with sequential conventional and ultrasound treatment / *Typha domingensis* polenlerinden biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunda ardışık geleneksel ve ultrasonik yöntemlerin kullanımı* ..... **256-270**
- Turker, I., Isleroglu, H. (2023). *Extraction of bioactive compounds from fenugreek leaves by maceration with D-optimal design / D-optimal tasarım ile çemen otu yapraklarından biyoaktif bileşenlerin maserasyon yoluyla ekstraksiyonu* ..... **305-316**
- Gündüz, A. O., Baştürk, A. (2023). *Some deterioration parameters of edible oils and fats sold in Türkiye markets / Türkiye pazarlarında satılan yemeklik sıvı ve katı yağların bazı bozulma parametreleri* ..... **317-332**
- Güler, Z., Dursun, A. (2023). *Comparison of different solid phase microextraction fibers in extraction of volatile compounds from adipose tissue / Yağ dokusundan uçucu bileşenlerin ekstraksiyonunda farklı katı faz mikroekstraksiyon fiberlerinin karşılaştırılması* ..... **422-434**
- Yılmaz., E. Bildi E. (2023). *Preparation and quality evaluation of enriched salad dressings based on cold-pressed safflower oil / Soğuk preslenmiş aspir yağından zenginleştirilmiş salata soslarının hazırlanması ve kalite değerlendirilmesi* ..... **471-482**
- Yücepe, M., Akalan, M., Bayrak Akay, K., Karakuş, M. Ş., Karaaslan, A., Başyigit, B., Karaaslan, M. (2023). *Determination of the characteristic attributes of cottonseed protein concentrate / Pamuk çekirdeği protein konsantresinin karakteristik özelliklerinin belirlenmesi* ..... **483-497**

## Araştırmalar (Türkçe) / Researches (Turkish)

- Kamiloğlu, A., Memiş, H. (2023). *Lactiplantibacillus plantarum* EK148'in et proteinleri içeren ortamda gama amino bütirik asit üretimi ve optimizasyonu / *Gamma aminobutyric acid production and optimization by Lactiplantibacillus plantarum* EK148 in media containing meat proteins ..... **271-284**
- İspirli, H., Dertli, E. (2023). Geleneksel yollarla üretilmiş turşu örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanması ve bazı fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi / *Isolation of lactic acid bacteria from traditional pickle samples, their identification using molecular methods, and determination of some functional properties* ..... **360-380**
- Terzioğlu, M. E., Arslaner, A., Bakırcı, İ. (2023). Çilekle zenginleştirilmiş manda yoğurdunun kalite karakteristikleri ile yağ asidi kompozisyonu, ACE inhibitör aktivite ve HMF içeriği bakımından incelenmesi / *Investigation of strawberry-enriched buffalo yoghurt in terms of quality characteristics and fatty acid composition, ACE inhibitor activity and HMF content* ..... **381-393**
- Mutlu, C., Candal Uslu, C., Erbaş, M. (2023). C vitamininin 2-keto-L-gulonik asit molekülünden üretimi için farklı metodların araştırılması / *Investigation of different methods for production of vitamin C from 2-keto-L-gulonic acid molecule* ..... **394-404**
- Yapıcı, S., Kivanç, M. (2023). Ceviz yaprak ekstratlarının antioksidan, antimikrobiyel ve antibiyofilm aktivitesi / *Antioxidant, antimicrobial and antibiofilm activity of leaf extracts of walnut* ..... **405-421**
- Yılmaz, H. (2023). Çörek otundan izole edilen proteinlerin model gıda emülsiyonlarında kullanımı ve oral prosesinin tribolojik incelenmesi / *The use of proteins isolated from nigella sativa in model food emulsions and the tribological investigation of their oral processes* ..... **435-444**
- Şat, İ. G., Yıldırım, B., Binici, H. İ. (2023). Kahvaltılık yeni bir ürün: Işkın (*Rheum ribes* L.) reçeli / *A new breakfast product: Işkın (Rheum ribes L.) jam* ..... **445-458**
- Cerit, İ., Erdem, E. N., Yıldırım, M., Dursun, M. E., Tekgül, S., Kaya, Z., Demirkol, O. (2023). Endüstriyel domates atıklarından karotenoid ekstraksiyonunun yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyonu / *Optimization of carotenoid extraction from industrial tomato waste by response surface methodology* ..... **459-470**

## Derlemeler (Türkçe) / Reviews (Turkish)

- Kayıoğlu, Ç., Türksoy, S. (2023). Ozon uygulamasının tahıl ve ürünleri üzerindeki etkileri / *The effect of ozone treatment on cereals and products* ..... **285-304**
- Kahve, A. N., Bayrak, E. (2023). Çimlendirilen tane ve filiz ürünlerin beslenmedeki rolü ve önemi / *The role and importance of germinated grain and sprout products in nutrition* ..... **333-346**
- Arslan, A., Yalçın, E. (2023). Pseudo-tahılların anti-besinsel bileşikleri ve azaltma yöntemleri / *Antinutritional compounds of pseudocereals and reducing methods* ..... **347-359**



## PHYSICOCHEMICAL, SENSORY, AND BIOACTIVE PROPERTIES OF GLUTEN-FREE PUDDINGS PRODUCED WITH ARONIA DERIVATIVES

Fundagül Erem\*

Zonguldak Bülent Ecevit University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Zonguldak, Türkiye

Received /Geliş: 25.08.2022; Accepted / Kabul: 04.02.2023; Published online / Online baskı: 10.02.2023

Erem, F. (2023). *Physicochemical, sensory, and bioactive properties of gluten-free puddings produced with aronia derivatives* GIDA (2023) 48 (2) 243-255 doi: 10.15237/ gida.GD22081

Erem, F. (2023). Aronya türevleri ile üretilen glutensiz pudinglerin fizikokimyasal, duyuusal ve biyoaktif özellikleri. GIDA (2023) 48 (2) 243-255 doi: 10.15237/ gida.GD22081

### ABSTRACT

This study aimed to investigate the properties of gluten-free puddings, in which antioxidant activity was enhanced by adding aronia powder and aronia fiber powder. The coconut flour in the control sample was partially substituted with aronia derivatives at 0.25%, 0.5%, and 1.0% concentrations. Increasing the substitution levels resulted in a decrease in Brix, L\*, and b\* values, and an increase in the a\* and  $\Delta E^*$  values, total phenolic content and antioxidant activity of the puddings ( $P < 0.05$ ). The results obtained showed that the highest concentrations of aronia derivatives substantially ( $P < 0.05$ ) increased the syneresis index; however, there were no significant differences at low substitution levels. Besides, aronia derivatives did not cause a substantial change in the sensory properties of the puddings, except for the consistency in the mouth. Since coconut flour and aronia were found compatible with each other sensorily, they may be valorized together in the development of different food products.

**Keywords:** Aronia, coconut flour, gluten-free, pudding

### ARONYA TÜREVLERİ İLE ÜRETİLEN GLUTENSİZ PUDİNGLERİN FİZİKOKİMYASAL, DUYUSAL ve BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİ

#### ÖZ

Bu çalışma aronya tozu ve aronya lifi tozu ilave edilerek antioksidan aktivitesi artırılan glutensiz pudinglerin özelliklerini araştırmayı amaçlamıştır. Kontrol örneğindeki hindistan cevizi unu, aronya türevleri ile %0.25, %0.5 ve %1.0 konsantrasyonlarında kısmen ikame edilmiştir. İkame seviyesinin artırılması örneklerin Briks, L\*, ve b\* değerinde azalışa, a\* ve  $\Delta E^*$  değeri, toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan aktivitesinde artışa yol açmıştır ( $P < 0.05$ ). Elde edilen sonuçlar, aronya türevlerinin en yüksek konsantrasyonunun sinerez indeksini önemli ölçüde ( $P < 0.05$ ) artırdığını; ancak düşük ikame seviyelerinde önemli bir farklılık olmadığını göstermiştir. Ayrıca, aronya türevleri ağızdaki kıvam dışında, pudinglerin duyuusal özelliklerinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. Hindistan cevizi unu ve aronya türevlerinin birbirleriyle duyuusal olarak uyumlu oldukları bulunduğundan, bunlar farklı gıda ürünlerinin geliştirilmesinde birlikte değerlendirilebilirler.

**Anahtar kelimeler:** Aronya, hindistan cevizi unu, glutensiz, puding

\* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar

✉: fundagulerem@beun.edu.tr

☎: (+90) 372 291 2630

☎: (+90) 372 257 4023

Fundagül Erem; ORCID no: 0000-0003-1562-0686



## INTRODUCTION

Gluten is a protein complex, composed of two fractions called glutenin and gliadin, which is found in certain cereals such as wheat, rye, and barley. It is an important compound that determines the technological properties of bakery products thanks to its ability to form a three-dimensional protein network (de Lorgeril and Salen, 2014; Šmídová and Rysová, 2022). On the other hand, there are also some health issues derived from gluten. According to the terminology and classification proposed in a conference held in London in February 2011, celiac disease (CD), gluten ataxia, dermatitis herpetiformis, wheat allergy, and non-celiac gluten sensitivity are the gluten-related disorders (Sapone et al., 2012; Tovoli et al., 2015). The most well-known gluten-related disorder, CD, which has an increasing prevalence rate worldwide, is a common immune-based disorder triggered by gluten intake, especially in genetically predisposed individuals (Gatti et al., 2020). Apart from CD, there is also an increase in the number of individuals suffering from non-celiac gluten sensitivity and wheat allergy (Mansueto et al., 2014). The treatment that could be applied for gluten-related disorders is to follow a gluten-free diet. Except for people who suffer from gluten-related disorders, there is also a growing increase in the number of healthy individuals adopting gluten-free nourishment as a lifestyle (Sabeñça et al., 2021). Therefore, developing gluten-free products which are acceptable to consumers, and have gained functional properties, is becoming the interest of food manufacturers, scientists, and health professionals dramatically (Khoury et al., 2018).

Even though there is not a commonly recognized definition, functional foods are generally defined as processed or natural foods that have potentially positive effects on health when consumed regularly, beyond basic nutrition. They may reduce the risk of noncommunicable diseases. However, to be regarded as functional, their safety and functionality should be proved by clinical and experimental trials and should be compatible with the regulations of the country (Granato et al. 2020, Alongi and Anese 2021).

One of the most important issues regarding the functional foods is since they do not heal or prevent diseases, they should not be qualified as medications. The most described and studied functional ingredients are polyunsaturated fatty acids, probiotics, prebiotics, synbiotics, and antioxidants (Granato et al. 2020).

Coconut flour is generally obtained by milling the residue of the coconut which remains after the extraction of coconut milk and the subsequent defatting process (Bawalan, 2000; Gunathilake et al., 2009). According to another procedure, it may also be produced without the defatting process (Hopkin et al., 2022). Coconut flour is rich in dietary fiber, which makes it a potential functional food (Trinidad et al., 2006), is gluten-free, has a comparable protein content to wheat (Ramaswamy, 2014), and is also free of trans-fatty acids (Adeloye et al., 2020). It can be used in the production of several products such as bread, cookies, cake, noodles, and desserts, either alone or blended with other flour samples up to a certain level, and as a filler and bulking agent in the products (Gunathilake and Abeyrathne, 2008).

Fruits in the berries class are known as rich in phenolic compounds, which exhibit high antioxidant activity (Oszmiański and Wojdyło, 2005). In several studies, aronia (*Aronia melanocarpa*), known as black chokeberry, has also been reported to have high antioxidant activity, which arises from its phenolic compounds (Oszmiański and Wojdyło, 2005; Gralec et al., 2019; Meng et al., 2019; Rodríguez-Werner et al., 2019; Banach et al., 2020). Due to its bioactive compounds, especially phenolic compounds, aronia also has antidiabetic, antimutagenic, hepatoprotective, and immunomodulatory properties and may be beneficial for health by protecting against several chronic diseases such as heart diseases, cancer, diabetes, etc. (Kulling and Rawel, 2008; Gajic et al., 2020). Its functional properties make aronia a good candidate for using it, its powder, or other derivatives as an ingredient in foods, juices, and drinks (Du and Myracle, 2018; Rodríguez-Werner et al., 2019; Vidović et al., 2019).

Several studies on the usage of coconut flour in the production of bread (Gunathilake et al., 2009), biscuits (Jiamjariyatam et al., 2021), cookies (Paucean et al., 2017; Marikkar et al., 2020), noodles (Gunathilake and Abeyrathne, 2008), cake (Hopkin et al., 2022), snacks (Mihiranie et al., 2017), or breakfast cereal (Okafor and Usman, 2014; Usman and Okafor, 2016) are available. Coconut flour was generally used as a dietary fiber source and the compositional, textural, and sensory qualities of the products were determined in these studies. It was reported that using coconut flour up to a certain level depending on the product type was found advantageous and feasible. However, no study that valorized coconut flour as the main thickening agent in pudding production could be found. On the other hand, only one study could be found in the literature that used aronia extract in puddings (Lee and Choi, 2020), and one used aronia juice concentrate in agar gels (Jakubczyk and Kamińska-Dwórznička, 2021); however, there were no data for total phenolic or antioxidant activity in these studies. Due to the consumer

demand for healthy foods, the aim in this study was to produce an acceptable coconut flour-based gluten-free pudding in which antioxidant activity was enhanced by the addition of aronia powder (AP) and aronia fiber powder (AFP) at different substitution levels.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

The ingredients used for the pudding production were: coconut flour (Değirmencibaşı, Smart Kimya, İzmir, Türkiye), xanthan gum (Tito, Smart Kimya, İzmir, Türkiye), freeze-dried aronia powder (Mor Aronya Gıda ve Sağlık, İstanbul, Türkiye), aronia fiber powder (100% micronized organic aronia pulp; Mor Aronya Gıda ve Sağlık, İstanbul, Türkiye), UHT milk (İcim, Türkiye), and granulated refined sugar (Migros, Türkiye). The composition of the ingredients specified by the manufacturers are shown in Table 1. All the chemicals used for the analysis were of analytical grade.

Table 1. Nutritional values of the ingredients

	Coconut flour (g/100g)	AP (g/100g)	AFP (g/100g)	UHT milk (g/100ml)
Carbohydrate	64.0	73.0	13.61	4.7
-Sugar	18.7	41.0	1.11	N
Protein	19.0	2.5	6.94	3.0
Fat	16.0	1.0	3.61	3.0
-Saturated fat	3.0	0.0	0.28	3.0
Fiber	N	19.0	70.0	-

The data given in the table were obtained from the product labels.

N: not declared;

## Methods

### Preparation of puddings

The composition of the pudding samples is given in Table 2. All the dry ingredients were added to the UHT milk, and the mixture was heated with continuous stirring. Cooking was terminated after 5 min of boiling and cooked puddings were transferred into small cups before cooling. After cooling at room temperature, pudding samples were stored at 4 °C overnight before analysis.

In preliminary studies, it was determined that coconut flour was adequate for gelation, however; xanthan gum was also used in the formulation since it made the puddings smoother. Since coconut flour was the primary thickening agent in the formulation, substituting the coconut flour with higher AP and AFP concentrations than 1.0% affected the storage stability and consistency adversely. Therefore, 1.0% was determined as the maximum inclusion level for both AP and AFP.

Table 2. The composition of the pudding samples (g/100g)

	C	AP1	AP2	AP3	AFP1	AFP2	AFP3
UHT milk	81.8	81.8	81.8	81.8	81.8	81.8	81.8
Coconut flour	8.00	7.75	7.50	7.00	7.75	7.50	7.00
Sugar	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Xanthan gum	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Aronia powder	-	0.25	0.50	1.0	-	-	-
Aronia fiber powder	-	-	-	-	0.25	0.50	1.0

C, control sample; AP, samples containing aronia powder; AFP, samples containing aronia fiber powder

### Physicochemical properties of puddings

**Total soluble solids content.** The method of Lee and Choi (2020) was slightly modified for the determination of total soluble solids. Twenty grams of sample was mixed with 40 ml of distilled water and agitated at 130 rpm for an hour at room temperature. Then the mixture was transferred into centrifuge tubes and centrifuged ( $3000 \times g$ , 4 °C) for 20 min (Nuve NF 800R, Ankara, Türkiye). The supernatants were filtered through a filter paper (4–7 µm pore size) and the total soluble solids content (°Brix) was measured with a refractometer (RHB-80ATC, USA).

**Color.** The color of the puddings was measured using a spectral colorimeter (CHN CS-410, China) with a D65 illuminant and an observing angle of 10°, and expressed using CIELab parameters ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  values). A white plate was used as the calibration standard ( $L^* = 98.55$ ,  $a^* = 0$ ,  $b^* = 1.32$ ). The measurements for each formulation were made on five different points of three puddings. The total color difference ( $\Delta E^*$ ) between the control pudding (C) and the aronia-enriched puddings (A) was also calculated using equation (1) (Baixauli et al., 2008). The formulas used for calculating the hue angles considering the different quadrants to express the hue angle as positive numbers (McLellan et al., 1995) are shown in equation (2a-c).

$$\Delta E^* = [(L_C^* - L_A^*)^2 + (a_C^* - a_A^*)^2 + (b_C^* - b_A^*)^2]^{1/2} \quad (1)$$

$$\text{1st quadrant (+a*, +b*)} \\ h^\circ = \text{ArcTan}(b^*/a^*) \quad (2a)$$

$$\text{2nd quadrant (-a*, +b*) and 3rd quadrant (-a*, -b*)} \\ h^\circ = 180 + \text{ArcTan}(b^*/a^*) \quad (2b)$$

$$\text{4th quadrant (+a*, -b*)} \\ h^\circ = 360 + \text{ArcTan}(b^*/a^*) \quad (2c)$$

**Syneresis index.** The syneresis index of the puddings was determined by the method of Valencia et al. (2016) with some modifications. Pudding samples of 15 g were weighed into a 50 ml centrifuge tube and centrifuged at  $3000 \times g$  for 30 min at 5 °C. The syneresis index was expressed as a percentage by dividing the supernatant weight by the sample weight.

**Storage stability.** Ten grams of pudding sample in a pre-weighed plastic cup was stored at 4 °C for 72 h after being wrapped with aluminum foil. Next, the leaching water was removed, and the cup was re-weighed. The ratio of the final weight of the sample to the initial weight of the sample as a percentage was evaluated as the storage stability (Moin et al., 2017).

### Total phenolic content and antioxidant activity of puddings

Extraction of the pudding samples and analysis of antioxidant activity were done according to the methods of Sun et al. (2007) with some modifications. Pudding samples of 10 g were mixed with 20 ml of 99.8% ethanol, and vortexed for approximately 30 s until a homogenized mixture was obtained. Then, the mixture was centrifuged at  $3000 \times g$  for 10 min (Nuve NF 800R, Ankara, Türkiye), and the supernatant was filtered through a quantitative filter paper of 4–7 µm pore size. Supernatants were maintained at –20 °C until the analyses were performed. Dilutions of the extracts were made with 75% ethanol, and 75% ethanol was also used as blank.

**Total phenolic content.** The extract (250  $\mu$ l) was mixed with 1250  $\mu$ l of Folin–Ciocalteu’s phenol reagent (10-fold diluted with distilled water, v/v) and 1000  $\mu$ l of 7.5% sodium carbonate and incubated at 50 °C for 15 min in a dark place, which was followed by measuring the absorbance with a spectrophotometer (Shimadzu UV-1800, Kyoto, Japan) at 750 nm for the determination of total phenolic content (Ramírez-Maganda et al., 2015). Results were calculated as mg gallic acid equivalent/100 g sample by using a calibration curve ( $y=11.176x+0.0038$ ,  $R^2 = 0.9994$ ) generated with the gallic acid standard (5-60 mg/L).

**DPPH analysis.** The DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay was carried out by mixing 2 ml of extract or Trolox standard (6-40  $\mu$ M) with 350  $\mu$ l of 0.5 mM DPPH solved in 99.8% ethanol, and measuring the absorbance value at 517 nm with a spectrophotometer (Shimadzu UV-1800, Kyoto, Japan) after 30 min incubation at room temperature.

**ABTS analysis.** To perform the ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) assay, ABTS•+ radical, which was generated by holding the 7 mM ABTS stock solution containing 2.45 mM potassium persulfate for 12–16 h at room temperature, was diluted with 99.8% ethanol to an absorbance of  $0.70 \pm 0.02$  at 734 nm. Then, 900  $\mu$ l of ABTS•+ radical was mixed with 100  $\mu$ l of extract or Trolox standard (10-280  $\mu$ M), and the absorbance was measured at 734 nm after 6 min from initial mixing.

The scavenging effect was calculated with equation (3) and using the calibration curve ( $y=2.4966x-6.6229$ ,  $R^2 = 0.9994$  for DPPH, and  $y=0.2994x+7.2901$ ,  $R^2 = 0.9998$  for ABTS methods) obtained with the Trolox standard; antioxidant activity results are given as mg Trolox equivalent/100 g sample.

$$\text{Scavenging effect (\%)} = \frac{Abs_{blank} - Abs_{sample}}{Abs_{blank}} \times 100 \quad (3)$$

### Sensory analysis of puddings

Sensory evaluation was carried out by 13 untrained panelists comprising male and female

undergraduate students and staff in the Faculty of Engineering at Zonguldak Bülent Ecevit University; the pudding samples were coded with random letters. Panelists were asked to grade puddings with a 5-point hedonic scale ranging from 1 (dislike extremely) to 5 (like extremely) for each parameter. The parameters were color, taste, odor, consistency (both appearance and in the mouth), and overall appreciation (Gurmeric et al., 2013; Moin et al., 2017).

### Statistical analysis

The effect of the substitution level of AP and AFP on the response values (Brix, color, syneresis index, total phenolic content, antioxidant values, sensory analysis) of the pudding samples was evaluated. The statistically significant differences between the pudding samples were analyzed by performing an analysis of variance (ANOVA) on data using SAS System Software (SAS OnDemand for Academics). The parameters determined as significant at the 95% confidence level were evaluated by Duncan’s multiple range test. All experiments were performed in three replicates and the results of the analysis were given as mean  $\pm$  standard error. Pearson’s correlation coefficients ( $r$ ) between variables were determined with Minitab Statistical Software (Academic version, Minitab Inc. USA).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Physicochemical properties

The total soluble solids content (Brix) and color values of the pudding samples in which coconut flour was partially substituted with AP (aronia powder) and AFP (aronia fiber powder) are shown in Table 3. Increasing the substitution level resulted in a decrease in Brix value and the difference was statistically significant when compared to the control sample ( $P < 0.05$ ). This was probably related to the decrease in the amount of coconut flour in the formulations including AP or AFP. Distinctly from this study, Lee and Choi (2020) determined an increase in the total soluble solids content of puddings with increasing aronia concentration. However, they decreased the amount of milk on increasing the aronia concentration and did not change any other solid ingredient in their formulation.

Table 3. Total soluble solids content and color values of pudding samples.

	Brix (°Bx)	L*	a*	b*	$\Delta E^*$	h*
C	7.83 <sup>a</sup> ± 0.17	86.61 <sup>a</sup> ± 0.44	-0.77 <sup>d</sup> ± 0.03	11.86 <sup>a</sup> ± 0.09	-	93.71 <sup>b</sup> ± 0.15
AP1	7.00 <sup>b</sup> ± 0.00	73.01 <sup>b</sup> ± 0.11	4.18 <sup>c</sup> ± 0.04	3.24 <sup>c</sup> ± 0.05	16.85 <sup>f</sup> ± 0.10	37.77 <sup>d</sup> ± 0.38
AP2	6.57 <sup>c</sup> ± 0.07	65.47 <sup>d</sup> ± 0.19	5.46 <sup>b</sup> ± 0.08	1.08 <sup>f</sup> ± 0.06	24.54 <sup>d</sup> ± 0.25	11.17 <sup>f</sup> ± 0.60
AP3	6.50 <sup>c</sup> ± 0.00	58.50 <sup>f</sup> ± 0.09	6.42 <sup>a</sup> ± 0.06	-1.10 <sup>g</sup> ± 0.03	31.78 <sup>b</sup> ± 0.10	350.27 <sup>a</sup> ± 0.29
AFP1	7.00 <sup>b</sup> ± 0.00	68.75 <sup>e</sup> ± 0.19	4.35 <sup>c</sup> ± 0.04	3.57 <sup>b</sup> ± 0.04	20.35 <sup>e</sup> ± 0.27	39.36 <sup>e</sup> ± 0.34
AFP2	6.67 <sup>c</sup> ± 0.17	60.39 <sup>e</sup> ± 0.23	5.56 <sup>b</sup> ± 0.06	2.40 <sup>d</sup> ± 0.05	28.58 <sup>c</sup> ± 0.54	23.36 <sup>e</sup> ± 0.39
AFP3	6.57 <sup>c</sup> ± 0.07	51.94 <sup>g</sup> ± 0.22	6.40 <sup>a</sup> ± 0.04	1.31 <sup>e</sup> ± 0.03	36.94 <sup>a</sup> ± 0.51	11.57 <sup>f</sup> ± 0.23

C, control sample; AP1, AP2, and AP3, samples containing 0.25%, 0.5% and 1.0% aronia powder, respectively; AFP1, AFP2, and AFP3, samples containing 0.25%, 0.5% and 1.0% aronia fiber powder, respectively. Results are given as mean ± standard error.

Means with a different superscript letter within a column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) among the samples.

The L\*, a\*, and b\* values represent darkness–lightness (from 0 to 100), greenness–redness (from negative to positive), and blueness–yellowness (from negative to positive), respectively (Durmus, 2020). The addition of increasing levels of AP or AFP made the puddings darker ( $P < 0.05$ ) and caused an increase in the redness ( $P < 0.05$ ) and a decrease in the yellowness ( $P < 0.05$ ) of the puddings. The results were similar to the findings of Lee and Choi (2020), who observed lower L\* and b\*, and higher a\* values with an increasing concentration of aronia extract. It was observed that the effect of AFP on the darkness of the puddings was substantially larger ( $P < 0.05$ ) than that of AP, and the yellowness of the AFP-containing puddings was higher ( $P < 0.05$ ) at the same substitution level. According to the manufacturer's declaration, AP is produced by grinding the freeze-dried whole fruit. On the other hand, AFP is produced by drying and grinding the remained aronia pulp at a low temperature after the fruit juice is obtained. The darker color for AFP-containing puddings probably arose from drying process applied. Chen and Martynenko (2018) also determined lower L\* values for blueberry leathers dried from two different purees using forced air drying compared to the freeze-drying method. The color difference of the puddings was statistically significant ( $P < 0.05$ ) and increased with an increasing AP or AFP concentration. It was determined that AFP is more effective than AP in increasing the color difference. The red color is represented by the hue angles of 0° and 360° while the yellow, green, and blue colors are represented by the 90°, 180°, and 270°, respectively (Milovanovic et al., 2020). The hue

angles are given in Table 3. These values showed that the control sample had a yellowish color while AP and AFP-containing samples had reddish colors. Images of the pudding samples are given in Figure 1.

The results for the syneresis index of puddings are shown in Figure 2. The control sample showed no syneresis. However, syneresis was observed for AP- and AFP-containing samples, probably due to the decrease in starch and fiber content, which was caused by lowering the amount of coconut flour. The effect of AP and AFP at lower concentrations (0.25% and 0.5%) on the syneresis index of puddings was not statistically significant and could be considered as negligible. On the other hand, the syneresis indices were calculated as 6.26% and 12.14% for AP- and AFP-containing samples at the concentration of 1%, respectively ( $P < 0.05$ ). Puddings are generally known as milk protein-based starch paste (Lim and Narsimhan, 2006). The reorganization of the starch or retrogradation during gel or paste formation is the main cause of syneresis (Ribotta et al., 2012) and the syneresis phenomenon occurs as a result of the loss of unbound water (da Silva Costa et al., 2020). According to the manufacturer's declaration on the packages, the fiber content of AFP is approximately 3.7-fold higher than that of AP, and AP contains 2.6-fold more sugar (Table 1). AFP was expected to bind water more than AP due to its fiber content. However, the higher sugar content of AP might have prevented starch retrogradation to some extent (Dello Staffolo et al., 2017), thus giving more positive results in terms of syneresis. Moreover, it has also been reported that

chokeberry fiber increases the syneresis in fermented milk samples since its dietary fiber is

poorly soluble and its tannins may precipitate proteins (Szajnar et al., 2021).

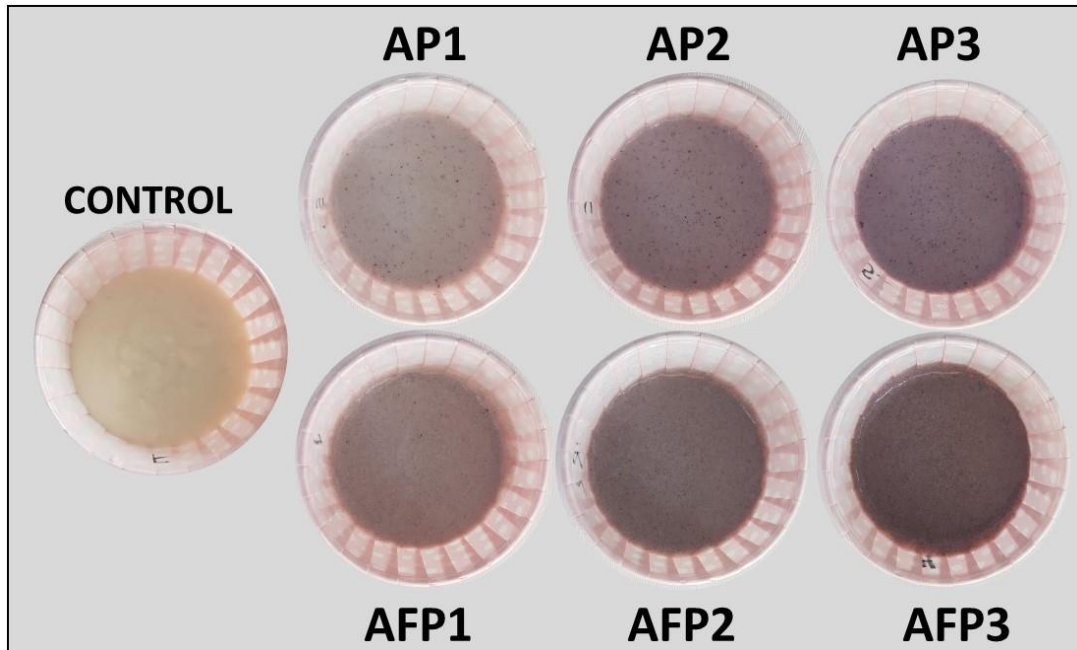


Figure 1. Pudding samples after held in a refrigerator overnight. AP1, AP2, and AP3, samples containing 0.25%, 0.5% and 1.0% aronia powder, respectively; AFP1, AFP2, and AFP3, samples containing 0.25%, 0.5% and 1.0% aronia fiber powder, respectively.

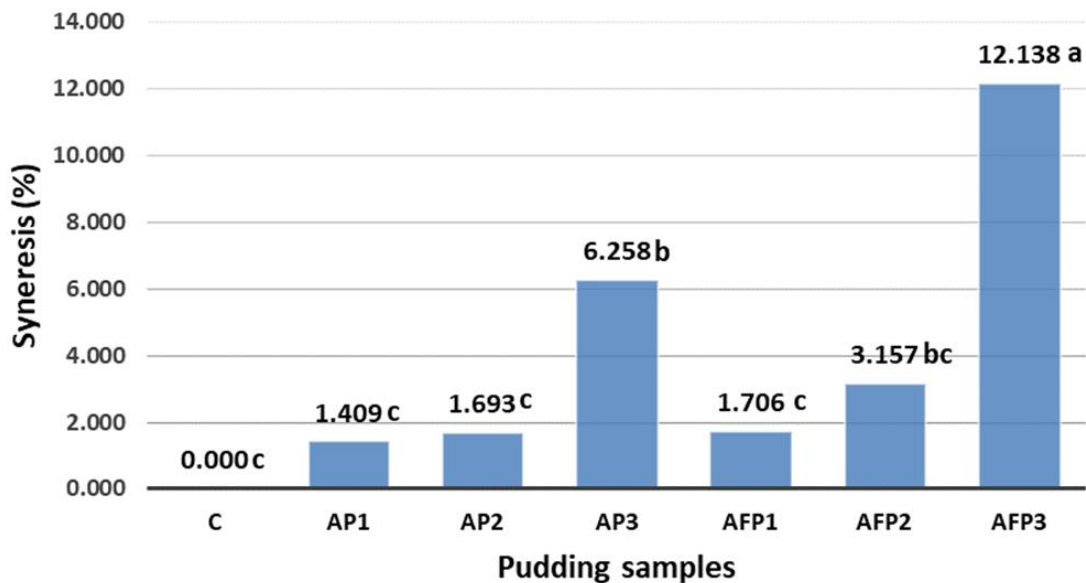


Figure 2. Syneresis index of pudding samples. Different lowercase letters shown with mean values represent significant differences ( $P < 0.05$ ). AP1, AP2, and AP3, samples containing 0.25%, 0.5% and 1.0% aronia powder, respectively; AFP1, AFP2, and AFP3, samples containing 0.25%, 0.5% and 1.0% aronia fiber powder, respectively.

Good storage stability is an important indicator to obtain preferable puddings (Lim and Narsimhan, 2006). While syneresis is calculated depending on the water released from samples under centrifugal forces, storage stability is calculated according to the water expelled from a paste after refrigeration or the freeze–thaw cycle (Moin et al., 2017). The storage stability of the puddings was determined after 72 h storage at 4 °C. For each formulation, three different cups were used for the analysis. After storage, free water was observed only in one cup for AP3 and AFP2, and in two cups for AFP3. The storage stability was calculated as 3.2%, 3.1%, and 4.2% for the mentioned samples, respectively, and the pudding samples could be considered to have good storage stability.

### **Total phenolic content and antioxidant activity of puddings**

The total phenolic content and antioxidant activity results of the pudding samples are shown in Figure 3. It was found that increasing the concentration of AP or AFP increased the total phenolic content and antioxidant activity of the samples significantly ( $P < 0.05$ ). In addition, the effect of AP on the mentioned values was higher than that of AFP. AP3 was determined to have the highest total phenolic content and antioxidant activity (with both DPPH and ABTS methods) among the others ( $P < 0.05$ ), with values of  $23.77 \pm 0.66$  mg GAE/100 g sample,  $26.91 \pm 0.17$  mg TE/100 g sample, and  $37.18 \pm 2.42$  mg TE/100 g sample, respectively. AP3 was followed by  $\text{AFP3} > \text{AP2} > \text{AFP2} > \text{AP1} > \text{AFP1} > \text{C}$  in terms of total phenolic content. However, there were no significant differences between AFP3 and AP2, or between AFP2 and AP1. This result shows that pudding samples had the statistically same total phenolic content when using AP at half the concentration of AFP. In terms of antioxidant activity determined by the DPPH method, the order of samples was  $\text{AP3}, \text{AFP3}, \text{AP2}, \text{AFP2}, \text{AP1}, \text{AFP1},$  and C from highest to lowest value. The order is also the same according to the ABTS method; however, the effect of AP and AFP on antioxidant activity was determined to be statistically the same at 0.25% and 0.50% concentrations.

The heat application in food production is the main handicap to obtaining products rich in antioxidant activity due to the sensitivity of phenolic compounds to heat (Albuquerque et al., 2021); even so, AP or AFP addition resulted in a remarkable increase in the antioxidant activity of the puddings. There were no data for total phenolic or antioxidant activity of aronia-enriched puddings in the literature; however, the antioxidant activity of bakery products (bread, mini baguette, and biscuit) fortified with aronia has been reported to range between 19.1 and 34.2 mg TE/100 g (Catana et al., 2018). Lee and Choi (2016) and Lee and Yoon (2016) found elevated scavenging activity for cookies incorporating an increasing level of AP.

The relationship between total phenolic content, antioxidant activity, aronia concentration, and color values was evaluated with Pearson's correlation (Table 4) and the correlations were found to be strong for both AP- and AFP-containing puddings. It was observed that total phenolic content was highly correlated with antioxidant activity ( $P < 0.01$ ), indicating that the phenolic compounds in the pudding samples were the primary sources of antioxidant activity. Furthermore, DPPH and ABTS results were also positively correlated with each other ( $P < 0.01$ ). The correlation coefficient between total phenolic content and the DPPH test of aronia berries in different stages of development determined by Gralec et al. (2019) ( $r = 0.7$ ) shows them to be positively correlated.

Correlation analysis revealed that there was a strong relation between color values and other parameters (total phenolic content and antioxidant activity).  $L^*$  and  $b^*$  values were negatively correlated with other parameters, while  $a^*$  values were positively correlated. Cömert et al. (2020) reported that the color of fruits and vegetables is compatible with their antioxidant content, and fruits and vegetables containing higher amounts of anthocyanins and total phenols also have a high antioxidant content. They also found that most fruits and vegetables whose hue values are above 180° and below 20° have high antioxidant capacity. When considering the hue



angles (Table 3) and antioxidant activity values (Figure 3) together, the results are consistent with the findings of Cömert et al. (2020).

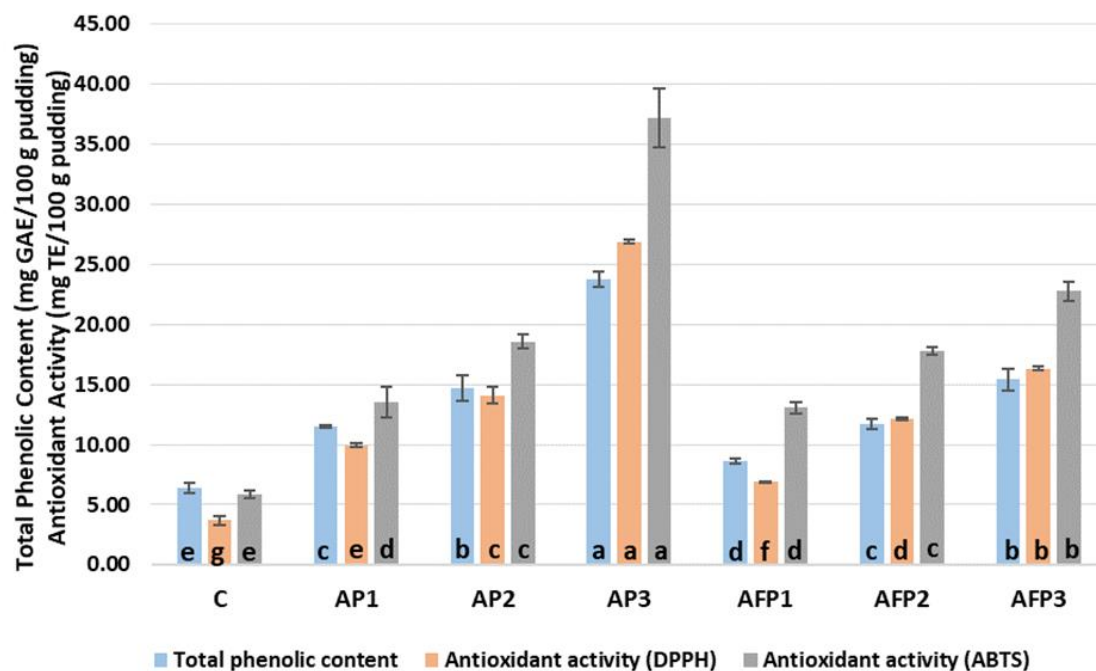


Figure 3. Total phenolic content and antioxidant activity of pudding samples. Different letters for the same-colored bars refer to significant differences ( $P < 0.05$ ) among the samples. AP1, AP2, and AP3, samples containing 0.25%, 0.5% and 1.0% aronia powder, respectively; AFP1, AFP2, and AFP3, samples containing 0.25%, 0.5% and 1.0% aronia fiber powder, respectively.

Table 4. Pearson's correlation coefficients

		Concentration †	TPC	DPPH	ABTS	L*	a*
Aronia Powder	TPC	0.973**					
	DPPH	0.991**	0.967**				
	ABTS	0.965**	0.950**	0.965**			
	L*	-0.949**	-0.919**	-0.950**	-0.890**		
	a*	0.860**	0.832**	0.862**	0.795**	-0.974**	
	b*	-0.878**	-0.851**	-0.880**	-0.816**	0.980**	-0.998**
Aronia Fiber Powder	TPC	0.931**					
	DPPH	0.978**	0.919**				
	ABTS	0.964**	0.878**	0.978**			
	L*	-0.936**	-0.859**	-0.953**	-0.982**		
	a*	0.842**	0.768**	0.868**	0.932**	-0.975**	
	b*	-0.807**	-0.729**	-0.831**	-0.908**	0.957**	-0.996**

TPC: Total Phenolic Content; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

†AP or AFP concentration in the formulation of puddings.

\*\*The correlation is statistically significant ( $P < 0.01$ )

### Sensory analysis

Consumer demand for nutritious and functional foods, especially those high in antioxidant activity, has been growing day by day. However, one of the primary properties that affect consumers' acceptance of a food is its sensory characteristics. The sensory properties of pudding samples are shown in Table 5. Although the panelists did not know the ingredients of the puddings at first, except for the aronia, they all perceived the coconut from its distinct flavor. According to raw data, control sample had the highest odor score probably due to this distinct and well-known flavor. As noted above, coconut flour was the primary thickening agent, and replacing the coconut flour with AP and AFP, especially at higher concentrations, probably decreased the starch and dietary fiber content. The effect of this decrease was observed on the syneresis and storage stability of the puddings. Therefore, the control sample was expected to have the highest consistency score. However; no significant differences were observed for the consistency of the appearance while AP-containing samples were

determined to have the highest scores in terms of consistency in the mouth. Although there were no statistical differences between the pudding samples except for the parameter consistency in the mouth, AP-containing samples were liked more than AFP-containing samples. Addition of 1% AFP caused a substantial decrease in the consistency score ( $P < 0.05$ ); however, all the samples were found acceptable by the panelists. The panelists expressed that coconut flour and aronia were compatible with each other and they could buy all the puddings in case of being commercial products. Considering the overall appreciation of raw data, AP3 was the most preferred sample, which differs from the results of Lee and Choi (2020) who reported that the overall acceptance score of the puddings was decreased for samples containing more than 0.5% aronia extract. Probably, since coconut flour repressed the astringency of aronia, puddings containing AP and AFP at concentrations of 1% were also liked.

Table 5. Sensory analysis results of pudding samples.

	Color	Taste	Odor	Consistency		Overall appreciation
				Appearance	In mouth	
C	3.92 ± 0.33	3.85 ± 0.27	3.85 ± 0.19	3.77 ± 0.32	3.69 <sup>ab</sup> ± 0.24	3.62 ± 0.29
AP1	3.62 ± 0.29	3.92 ± 0.24	3.69 ± 0.21	3.69 ± 0.18	4.00 <sup>a</sup> ± 0.23	4.00 ± 0.20
AP2	4.00 ± 0.25	3.69 ± 0.29	3.77 ± 0.17	3.69 ± 0.18	3.85 <sup>a</sup> ± 0.25	4.08 ± 0.24
AP3	4.15 ± 0.22	4.15 ± 0.25	3.77 ± 0.17	3.92 ± 0.14	4.00 <sup>a</sup> ± 0.25	4.23 ± 0.26
AFP1	3.69 ± 0.26	3.62 ± 0.18	3.62 ± 0.24	3.54 ± 0.24	3.31 <sup>ab</sup> ± 0.29	3.62 ± 0.18
AFP2	3.54 ± 0.27	3.39 ± 0.27	3.31 ± 0.31	3.39 ± 0.27	3.39 <sup>ab</sup> ± 0.31	3.54 ± 0.27
AFP3	4.15 ± 0.22	3.23 ± 0.34	3.69 ± 0.24	4.00 ± 0.23	2.92 <sup>b</sup> ± 0.37	3.54 ± 0.35

C, control sample; AP1, AP2 and AP3, samples containing 0.25%, 0.5% and 1.0% aronia powder, respectively; AFP1, AFP2 and AFP3, samples containing 0.25%, 0.5% and 1.0% aronia fiber powder, respectively. Results are given as mean ± standard error.

Different letters in a column refer to significant differences ( $p < 0.05$ ), which were observed just for consistency in mouth.

### CONCLUSION

Consumers show growing interest in functional foods and gluten-free foods for health problems or just aiming for healthy nutrition. Consumer demands for healthy foods have impelled experts to develop novel food products. In this study, gluten-free puddings prepared with coconut flour were evaluated as a control sample and their antioxidant activity was enhanced by substituting

the coconut flour with AP or AFP. Although all samples were acceptable sensorily, puddings with added AP were more preferable. Aronia or its derivatives (powder, extract, etc.) when used at the right concentrations could be good ingredients to develop different food products high in antioxidant activity without affecting the product negatively. Future studies could be done intended for determining the shelf-life of the

puddings. Microbiological analyses, textural and rheological measurements in addition to compositional and physicochemical analyses could be carried out for this purpose. Moreover, performing in vitro bioaccessibility studies could be beneficial.

### CONFLICT OF INTEREST

The author reports no conflict of interest.

### REFERENCES

- Adeloye, J.B., Osho, H., Idris, L.O. (2020). Defatted coconut flour improved the bioactive components, dietary fibre, antioxidant and sensory properties of nixtamalized maize flour. *Journal of Agriculture and Food Research*, 2:100042.
- Albuquerque, B.R., Heleno, S.A., Oliveira, M.B.P.P., Barros, L., Ferreira, C.F.R. (2021). Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges. *Food and Function*, 12: 14-29.
- Alongi, M., Anese, M. (2021). Re-thinking functional food development through a holistic approach. *Journal of Functional Foods*, 81: 104466.
- Baixaui, R., Salvador, A., Fiszman, S.M. (2008). Textural and colour changes during storage and sensory shelf life of muffins containing resistant starch. *European Food Research and Technology*, 226: 523-530.
- Banach, M., Wiloch, M., Zawada, K., Cyplik, W., Kujawski, W. (2020). Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activity of anthocyanin-rich water-soluble aronia dry extracts. *Molecules*, 25:4055.
- Bawalan, D.D. (2000). The economics of production, utilization and marketing of coconut flour from coconut milk residue. *Coconut Research and Development Journal*, 16 (1): 1-13.
- Catana, M., Catana, L., Iorga, E., Asanica, A.C., Belc, N. (2018). Bakery products fortified with dried fruits of *Aronia melanocarpa*. *Scientific Papers-Series B-Horticulture*, 62: 693-701.
- Chen, Y., Martynenko, A. (2018). Combination of hydrothermodynamic (HTD) processing and different drying methods for natural blueberry leather. *LWT-Food Science and Technology*, 87: 470-477.
- Cömert, E.D., Ataç Mogol, B., Gökmen, V. (2020). Relationship between color and antioxidant capacity of fruits and vegetables. *Current Research in Food Science*, 2: 1-10.
- da Silva Costa, R.A., Bonomo, R.C.F., Rodrigues, L.B., Santos, L.S., Veloso, C.M. (2020). Improvement of texture properties and syneresis of arrowroot (*Maranta arundinacea*) starch gels by using hydrocolloids (guar gum and xanthan gum). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100: 3204-3211.
- De Lorgeril, M., Salen, P. (2014). Gluten and wheat intolerance today: are modern wheat strains involved? *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65 (5): 577-581.
- Dello Staffolo, M., Sato, A.C.K., Cunha, R.L. (2017). Utilization of plant dietary fibers to reinforce low-calorie dairy dessert structure. *Food and Bioprocess Technology*, 10: 914-925.
- Du, X., Myracle, A.D. (2018). Development and evaluation of kefir products made with aronia or elderberry juice: sensory and phytochemical characteristics. *International Food Research Journal*, 25 (4): 1373-1383.
- Durmus, D. (2020). CIELAB color space boundaries under theoretical spectra and 99 test color samples. *Color Research & Application*, 45: 796-802.
- Gajic, D., Saksida, T., Koprivica, I., Vujcic, M., Despotovic, S., Savikin, K., Jankovic, T., Stojanovic, I. (2020). Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) fruit extract modulates immune response in vivo and in vitro. *Journal of Functional Foods*, 66:103836.
- Gatti, S., Lionetti, E., Balanzoni, L., Verma, A.K., Galeazzi, T., Gesuita, R., Scattolo, N., Cinquetti, M., Fasano, A., Catassi, C. (2020). Increased prevalence of celiac disease in school-age children in Italy. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 18 (3): 596-603.
- Gralec, M., Wawer, I., Zawada, K. (2019). *Aronia melanocarpa* berries: phenolics composition and antioxidant properties changes during fruit

- development and ripening. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 31 (3): 214-221.
- Granato, D., Barba, F.J., Bursać Kovačević, D., Lorenzo, J.M., Cruz, A.G., Putnik, P. (2020). Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. *Annual Review of Food Science and Technology*, 11: 93-118.
- Gunathilake, K.D.P.P., Abeyrathne, Y.M.R.K. (2008). Incorporation of coconut flour into wheat flour noodles and evaluation of its rheological, nutritional and sensory characteristics. *Journal of Food Processing and Preservation*, 32: 133-142.
- Gunathilake, K.D.P.P., Yalegama, C., Kumara, A.A.N. (2009). Use of coconut flour as a source of protein and dietary fibre in wheat bread. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 2 (3): 382-391.
- Gurmeric, V.E., Doga, M., Toker, O.S., Senyigit, E., Ersoz, N.B. (2013). Application of different multi-criteria decision techniques to determine optimum flavour of prebiotic pudding based on sensory analyses. *Food and Bioprocess Technology*, 6: 2844-2859.
- Hopkin, L., Broadbent, H., Ahlborn, G.J. (2022). Influence of almond and coconut flours on Ketogenic, Gluten-Free cupcakes. *Food Chemistry: X*, 13: 100182.
- Jakubczyk, E., Kamińska-Dwórznička, A. (2021). Effect of addition of chokeberry juice concentrate and foaming agent on the physical properties of agar gel. *Gels*, 7:137-151.
- Jiamjariyatam, R., Roskhrua, P., Attiwittayaporn, S. (2021). Effect of coconut flour on biscuit quality. *Journal of Culinary Science and Technology*, 20 (3): 278-292.
- Khoury, D.E., Balfour-Ducharme, S., Joye, I.J. (2018). A review on the gluten-free diet: Technological and nutritional challenges. *Nutrients*, 10:1410.
- Kulling, S.E., Rawel, H.M. (2008). Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) – A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Medica*, 74: 1625-1634.
- Lee, J.A., Yoon, J.Y. (2016). The quality and antioxidant properties of cookies containing aronia powder. *Culinary Science & Hospitality Research*, 22 (5): 179-189 [in Korean].
- Lee J.H., Choi, J.E. (2016). Quality characteristics and antioxidant activities of cookies supplemented with aronia powder. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 45 (7): 1071-1076 [in Korean].
- Lee J.H., Choi, I.S. (2020). Physicochemical characteristics and consumer acceptance of puddings fortified with *Cudrania tricuspidata* and *Aronia melanocarpa* extracts. *Food Science and Nutrition*, 8: 4936-4943.
- Lim, H.S., Narsimhan, G. (2006). Pasting and rheological behavior of soy protein-based pudding. *LWT-Food Science and Technology*, 39: 343-349.
- Mansueto, P., Seidita, A., Dalcamo, A., Carroccio, A. (2014). Non-celiac gluten sensitivity: literature review. *Journal of the American College of Nutrition*, 33 (1): 39-54.
- Marikkar, J.M.N., Nagaraja, R., Somawathie, K.M.S., Hewapathirana, H.P.T.D., Yalegama, C., Littardi, P., Chiavaro, E. (2020). Effect of coconut testa flour on cookie characteristics. *Italian Journal of Food Science*, 32 (1): 209-221.
- McLellan, M.R., Lind, L.R., Kime, R.W. (1995). Hue angle determinations and statistical analysis for multiquadrant Hunter L, a, b data. *Journal of Food Quality*, 18: 235-240.
- Meng, L., Zhu, J., Ma, Y., Sun, X., Li, D., Li, L., Bai, H., Xin, G., Meng, X. (2019). Composition and antioxidant activity of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* cultivated in Haicheng, Liaoning, China. *Food Bioscience*, 30: 100413.
- Mihiranie, S., Jayasundera, M., Perera, N. (2017). Development of snack crackers incorporated with defatted coconut flour. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 7 (2): 153-159.
- Milovanovic, B., Djekic, I., Miocinovic, J., Djordjevic, V., Lorenzo, J.M., Barba, F.J., Mörlein, D., Tomasevic, I. (2020). What is the color of milk and dairy products and how is it measured? *Foods*, 9 (11):1629.
- Moin, A., Ali, T.M., Hasnain, A. (2017). Characterization and utilization of

- hydroxypropylated rice starches for improving textural and storage properties of rice puddings. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105: 843-851.
- Okafor, G.I., Usman, G.O. (2014). Production and evaluation of breakfast cereals from blends of African yam bean (*Sphenostylis stenocarpa*), maize (*Zea mays*) and defatted coconut (*Cocos nucifera*). *Journal of Food Processing and Preservation*, 38: 1037-1043.
- Oszmiański, J., Wojdyło, A. (2005). *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, 221: 809-813.
- Paucean, A., Man, S., Muste, S., Pop, A. (2017). Development of gluten free cookies from rice and coconut flour blends. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca-Food Science and Technology*, 73 (2): 163-164.
- Ramaswamy, L. (2014). Coconut flour - a low carbohydrate, gluten free flour a review article. *International Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine*, 4 (1): 1426-1436.
- Ramírez-Maganda, J., Blancas-Benítez, F.J., Zamora-Gasga, V.M., García-Magaña, M.L., Bello-Pérez, L.A., Tovar, J., Sáyago-Ayerdi, S.G. (2015). Nutritional properties and phenolic content of a bakery product substituted with a mango (*Mangifera indica*) 'Ataulfo' processing by-product. *Food Research International*, 73: 117-123.
- Ribotta, P.D., Colombo, A., Rosell, C.M. (2012). Enzymatic modifications of pea protein and its application in protein-cassava and corn starch gels. *Food Hydrocolloids*, 27 (1): 185-190.
- Rodríguez-Werner, M., Winterhalter, P., Esatbeyoglu, T. (2019). Phenolic composition, radical scavenging activity and an approach for authentication of *Aronia melanocarpa* berries, juice, and pomace. *Journal of Food Science*, 84 (7): 1791-1798.
- Sabença, C., Ribeiro, M., de Sousa, T., Poeta, P., Bagulho, A.S., Igrejas, G. (2021). Wheat/gluten-related disorders and gluten-free diet misconceptions: A review. *Foods*, 10: 1765-1789.
- Sapone, A., Bai, J.C., Ciacci, C., Dolinsek, J., Green, P.H.R., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Rostami, K., Sanders, D.S., Schumann, M., Ullrich, R., Villalta, D., Volta, U., Catassi, C., Fasano, A. (2012). Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Medicine*, 10:13.
- Šmídová, Z., Rysová, J. (2022). Gluten-free bread and bakery products technology. *Foods*, 11: 480.
- Sun, Y., Hayakawa, S., Ogawa, M., Izumori, K. (2007). Antioxidant properties of custard pudding dessert containing rare hexose, D-psicose. *Food Control*, 18: 220-227.
- Szajnar, K., Pawlos, M., Znamirska, A. (2021). The effect of the addition of chokeberry fiber on the quality of sheep's milk fermented by *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus acidophilus*. *International Journal of Food Science*, 2021: 7928745.
- Tovoli, F., Masi, C., Guidetti, E., Negrini, G., Paterini, P., Bolondi, L. (2015). Clinical and diagnostic aspects of gluten related disorders. *World Journal of Clinical Cases*, 3 (3): 275-284.
- Trinidad, T.P., Mallillin, A.C., Valdez, D.H., Loyola, A.S., Askali-Mercado, F.C., Castillo, J.C., Encabo, R.R., Masa, D.B., Maglaya, A.S., Chua, M.T. (2006). Dietary fiber from coconut flour: A functional food. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 7: 309-317.
- Usman, G.O., Okafor, G.I. (2016). Organoleptic properties and perception of maize, African yam bean, and defatted coconut flour-based breakfast cereals served in conventional forms. *Food Science and Nutrition*, 4 (5): 716-722.
- Valencia, M.S., Salgado, S.M., Andrade, S.A.C., Padilha, V.M., Livera, A.V.S., Stamford, T.L.M. (2016). Development of creamy milk chocolate dessert added with fructooligosaccharide and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81. *LWT-Food Science and Technology*, 69: 104-109.
- Vidović, S., Ramić, M., Ambrus, R., Vladić, J., Szabó-Révész, P., Gavarić, A. (2019). Aronia berry processing by spray drying: from by product to high quality functional powder. *Food Technology and Biotechnology*, 57 (4): 513-524.



**IMPROVED EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM THE  
POLLENS OF *TYPHA DOMINGENSIS* WITH SEQUENTIAL  
CONVENTIONAL AND ULTRASOUND TREATMENT**

**Ayşe Avcı<sup>1</sup>, İnci Cerit<sup>1\*</sup>, Mohammed Hamk<sup>1,2</sup>, Semra Yılmaz Keskin<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Sakarya University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Sakarya, Turkey

<sup>2</sup>Food Science and Quality Control Dept., Halabja Technical College of Applied Sciences, Sulaimani Polytechnic University, Halabja, Iraq

<sup>3</sup>Sakarya University, Faculty of Science, Department of Chemistry, Sakarya, Turkey

Received/Geliş 19.12.2022; Accepted /Kabul: 05.02.2023; Published online/Online baskı 11.02.2023

Avcı, A., Cerit, İ., Hamk, M., Yılmaz Keskin, S. Improved extraction of bioactive compounds from the pollens of *Typha domingensis* with sequential conventional and ultrasound treatment. GIDA (2023) 48 (2) 256-270 doi: 10.15237/gida.GD22129

Avcı, A., Cerit, İ., Hamk, M., Yılmaz Keskin, S. *Typha domingensis* polenlerinden biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunda ardışık geleneksel ve ultrasonik yöntemlerin kullanımı. GIDA (2023) 48 (2) 256-270 doi: 10.15237/gida.GD22129

**ABSTRACT**

*Typha domingensis* pollen is obtained from staminate flowers of plant that is edible. In this study, bioactive compounds from pollen were extracted using ethanol and methanol with conventional method. Further ultrasonication was applied to the samples to improve extraction efficiency. The extraction yield was higher with ethanol (26.3±0.14%) than with methanol (25.4±0.3%) and applying ultrasonication increased the yields significantly ( $P < 0.05$ ). Total phenolic compounds in ethanol and methanol extracts were determined as 9.83±0.48 and 9.71±0.55 mg GAE/g dry matter with the conventional method, and 11.76±0.64 and 12.74±0.37 mg GAE/g dry matter after ultrasonication, respectively. The flavonoid content with ethanol extraction was significantly higher than with methanol in both conventional and ultrasonication methods ( $P < 0.05$ ). Antioxidant activities using DPPH, ABTS, CUPRAC, and FRAP tests, were determined, and enhanced antioxidant capacities were observed after ultrasonication. The bioactive compounds were qualitatively analyzed using UV-VIS spectroscopy and FTIR which confirmed the presence of polyphenols.

**Keywords:** *Typha domingensis* pollen, extraction, ultrasonication, bioactive compounds

***TYPHA DOMINGENSIS* POLENLERİNDEN BİYOAKTİF BİLEŞİKLERİN  
EKSTRAKSİYONUNDA GELENEKSEL VE ULTRASONİK YÖNTEMLERİN  
ARDIŞIK KULLANIMI**

**ÖZ**

*Typha domingensis* bitkisinin, erkek çiçeklerinden elde edilen polen, yenilebilir özelliindedir. Bu çalışmada, polenden biyoaktif bileşikler, etanol ve metanol kullanılarak geleneksel yöntemle ekstrakte edilmiştir. Ardından, ekstraksiyon verimliliğini artırmak için örneklere ultrasonikasyon uygulanmıştır.

\* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar

✉: incicantik@sakarya.edu.tr

☎: (+90) 264 295 5847

Ayşe Avcı; ORCID no: 0000-0001-7202-397X

İnci Cerit; ORCID no: 0000-0002-3106-8951

Mohammed Hamk; ORCID no: 0000-0003-0748-1743

Semra Yılmaz Keskin; ORCID no: 0000-0002-9467-3171

Etanol ile ekstraksiyon verimi ( $26.3 \pm 0.14$ ), metanole ( $25.4 \pm 0.3$ ) göre daha yüksek bulunmuş ve ultrasonikasyon uygulaması verimi önemli ölçüde artırmıştır ( $P < 0.05$ ). Etanol ve metanol ekstraktlarında, toplam fenolik bileşik içerikleri, geleneksel yöntemle sırasıyla  $9.83 \pm 0.48$  ve  $9.71 \pm 0.55$  mg GAE/g, ultrasonikasyon uygulamasından sonra ise  $11.76 \pm 0.64$  ve  $12.74 \pm 0.37$  mg GAE/g kuru madde olarak belirlenmiştir. Etanol ekstraksiyonundaki flavonoid içeriği hem geleneksel hem de ultrasonikasyon yöntemlerinde metanolden önemli ölçüde yüksek olmuştur ( $P < 0.05$ ). Örneklerin antioksidan aktiviteleri DPPH, FRAP, ABTS ve CUPRAC yöntemleriyle belirlenmiş ve sonuçlar ultrasonikasyonun antioksidan kapasitelerini de arttırdığını göstermiştir. Biyoaktif bileşikler, UV-VIS spektroskopisi ve FTIR ile kalitatif olarak analiz edilmiş ve polifenollerin varlığı doğrulanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Typha domingensis* pollen, ekstraksiyon, ultrasonikasyon, biyoaktif bileşikler

## INTRODUCTION

*Typha* species, also called as cattail, are perennial, herbaceous, rhizomatous plants belonging to the Typhaceae family. Genus *Typha* is the only member of the family and consists of about 15 members (Rao and Divya, 2016; Al-Bader, 2018; Sorourian et al., 2020). *Typha* species are excessively invading and grow wildly, especially in tropical wetlands such as marshes, lagoons, and lakes, and the length can reach 2-3 m (Sorourian et al., 2020; Pandey et al., 2022). It has been also reported that the species may grow worldwide, except Antharctis, because of their high growth rates under suitable conditions such as light, water, and nutrients. In such cases, they may colonize and dominate large areas (Bansal et al., 2019; Cruz et al., 2019). *Typha domingensis* is monoecious and develops inflorescence as spikes. The inflorescence contains both staminate (male) and pistillate (female) flowers. Pistillate flowers are brown and densely packed that possess a cylindrical shape. Staminate flowers are yellow and located at the top of the plant (Bansal et al., 2019; Carvalho and Mariath, 2019). Staminate flowers can produce 216 to 4000 kg of pollens per hectare (Arenas and Scarpa, 2003).

As they are widely distributed at wetlands, people living around that area have been utilizing the different parts of the plant for various purposes since ancient times (Corneanu et al., 2014). Owing to high cellulose content (about 67%), they are used for craftwork, in the production of fabrics, making vessels, cattle feeding, the manufacture of boats in some countries (Garcia et al., 2019; Barbero-Barrera et al., 2021; John et al., 2022; Pandey et al., 2022). They are also used for medicinal treatments such as diarrhea, wounds, dysmenorrhea, nose bleeding, and burns (Akkol

et al., 2011; Corneanu et al., 2014; Karbon and Alhammer, 2020; Sorourian et al., 2020). Recently, *Typha* species have been attracted for the potential utilization as biomass in the production of bio-based materials such as furfural and ethanol, and for bioremediation (Garcia et al., 2019; Eid et al., 2020; Mukthar et al., 2020; Pandey et al., 2022). Different parts of the plants such as rhizome, shoots, and pollens are edible and have been consumed as food in some countries including Southern Iraq, India, South America, China and New Zealand (Zhang et al., 2020). It is consumed either fresh or after cooking (Al-Bader, 2018). Pollen from staminate flowers of *T. domingensis* is yellow in color and used in powder form. It has high nutritional value that contains proteins (0.112-0.184 g/g), carbohydrates (0.101-0.174 g/g), vitamin C (1.176-2.319 mg/g) and minerals such as calcium, phosphorus, magnesium, and iron (Arenas and Scarpa, 2003). It also contains bioactive compounds such as phenolics and flavonoids. Characteristic golden yellow color of the pollen is in consequence of the flavonoids (Aljazzy et al., 2021). Pollen may be mixed with sugar or honey and served as dessert or may be included in bread and cake formulations (Zhang et al., 2020). In southern Iraq, pollen is used to produce a sweet called as Khirret (Aljazzy et al., 2021). It has been consumed by Native Americans in bread making, for thickening soup, to give yellow color to rice dishes, and a refreshing beverage is also prepared from the pollen (Linskens and Jorde, 1997; Arenas and Scarpa, 2003; Corneanu et al., 2014).

Polyphenols are secondary metabolites produced by plants as a part of defense mechanism for protection from environmental damage. They include flavonoids, isoflavonoids, and non-



flavonoids which have beneficial effects on human health owing to their antioxidant properties (Hasan et al., 2017). Thus, recent studies have focused on the utilization of polyphenols in the production of functional foods and nutraceuticals after the extraction and separation from the plants (Altemimi et al., 2015). Besides conventional methods, new strategies have been introduced to improve the extraction efficiency of polyphenols from the plants, such as microwave-assisted extraction, ultrasound-assisted extraction, and supercritical fluid extraction (Altemimi et al., 2016). Ultrasound-assisted extraction is one the most attractive methods which have been widely applied in recent years because it is a fast, simple, and efficient method (Altemimi et al., 2016; Lafarga et al., 2019; Tarone et al., 2021). Applying ultrasound to the extraction medium creates cavitation where air bubbles are formed and subsequently collapse resulting in the disruption of the cells (Zafra-Rojas et al., 2020). Polyphenols are generally bounded to carbohydrates and proteins (Goula et al., 2016). Ultrasonication helps the liberation of bioactive compounds from plant matrices by breaking down these molecules (Lohani and Muthukumarappan, 2021).

In the literature, there are several studies about the extraction of phytochemicals from *T. domingensis* pollen using various methods. However, to the best of our knowledge, there is no report about the ultrasonication-assisted or sequential extraction. Therefore, in the current study, it was aimed to combine ultrasonic extraction with conventional extraction in order to improve the extraction of phytochemicals from *T. domingensis* pollen. In this context, phytochemicals were extracted using both conventional and sequential conventional and ultrasonication-assisted methods. Two extraction solvents (ethanol and methanol) were used. Total phenolic and flavonoid contents as well as antioxidant properties samples obtained using different methods were determined comparatively. Additionally, phytochemicals were also examined qualitatively with FTIR and UV-VIS spectroscopy.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Ethanol, methanol, hydrochloric acid, potassium persulfate, Folin-Ciocalteu phenol reagent, sodium carbonate, iron(III) chloride hexahydrate, sodium acetate, gallic acid were provided from Merck (Darmstadt, Germany). 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Trolox [(±)-6-hydroxy-106 2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid], Neocuproine, copper (II) chloride, ammonium acetate, 2,4,6-tris(2-pyridyl)-S-triazine (TPTZ), 2,20-azino-bis/3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and potassium persulfate were supplied from Sigma (St. Louis, MO). *T. domingensis* pollens were purchased from local market of Basrah (Iraq).

### Ultrasonic-assisted and conventional extractions of the bioactive compounds from *T. domingensis*

Conventional and sequential conventional and ultrasonic-assisted extraction methods were applied in order to extract the bioactive compounds from *T. domingensis* according to the method described by Jerman et al. (2010) with some modifications. Ethanol (70%) and methanol (70%) were selected as solvents. In the conventional method, solvents (25 mL) were added to weighed samples (2.5 g), and homogenized for 5 min with ultra-turrax (IKA, T18, Germany) followed by the centrifugation at 6100 x g for 20 min then the supernatants were filtered. Sequential conventional and ultrasonication extraction was carried out using the same solvents and the sample amounts. Firstly, the samples were homogenized for 5 min with ultra-turrax, subsequently they were subjected to ultrasonication using a 200 W and 24 kHz ultrasonic device (Bandelin HD2200, Germany). The mixture was placed in a beaker and the probe (TS104) was immersed 1.5 cm from the surface of the solution. To keep the temperature constant (20°C±2), each beaker was held in an ice bath and the temperature was monitored. The ultrasound power and time were adjusted to 120 W and 30 min, respectively. After ultrasonication, the samples were centrifuged (6100 x g for 20 min) and the supernatants were

filtered. All the extracts were kept at 4°C until analysis.

### Extraction yield

To calculate extraction yield, extracts were dried at 50°C until the weight was constant. The extraction yield was then calculated as follows:

$$\text{Extraction yield (\%)} = \frac{\text{extraction weight (g)}}{\text{powder weight (g)}} \times 100$$

### Total phenolic content analysis

The total phenolic content of the extracts was determined according to the method described previously by Wojdylo et al. (2007). Briefly, 25 µL of extract and 75 µL of solvent were mixed with 0.2 mL of Folin–Ciocalteu reagent. One milliliter of sodium carbonate solution was added to the mixture after 3 min. Samples were incubated for 1 h at room temperature. The absorbance was recorded at 765 nm with a spectrophotometer (Shimadzu UV-1240, USA). The results were calculated as mg gallic acid equivalent (GAE) /g dry matter using a gallic acid standard curve ( $R^2 = 0.9986$ ).

### Total flavonoid analysis

The total flavonoid content of the extracted samples was determined using the aluminum chloride colorimetric assay. For this 100 µL sample, 300 µL distilled water and 30 µL NaNO<sub>2</sub> (5%, w/v) were mixed in a tube, and reacted for 5 min. Subsequently, 30 µL AlCl<sub>3</sub> (10%, w/v) was added followed by the addition of 200 µL NaOH (1 mM) after 5 min. Then the final volume was adjusted to 1 mL with distilled water. Absorbance was measured at 510 nm using a UV-VIS spectrophotometer. The amount of flavonoids was calculated using the standard curve which was constructed using quercetin. The results were estimated as mg quercetin equivalent (QE)/g dry matter ( $R^2 = 0.9997$ ) (Egdhami and Sadeghi, 2010; Kamtekar et al., 2014).

### Determination of antioxidant capacities

Antioxidant capacities of extracts were determined with four different assays, which were DPPH scavenging activity, ferric reducing antioxidant power (FRAP), cupric ion reducing

antioxidant capacity (CUPRAC) and ABTS<sup>•+</sup> assay (Huang et al., 2005). DPPH scavenging activity assay was performed using the method of Brand-Williams et al. (1995) with some modifications. In a test tube, 50 µL of extract, 50 µL of solvent and 3 mL of DPPH solution (0.051 mmol/L) were added and mixtures were incubated for 30 min at room temperature. Trolox solutions with different concentrations were used to construct a standard curve ( $R^2 = 0.9986$ ). Absorbance values were recorded at 517 nm and the results were expressed as Trolox equivalent in mg/g in dry matter.

The FRAP assay was applied according to the procedure of Benzie and Strain (1996). FRAP reagent was prepared by mixing 10 mmol/L TPTZ, 20 mmol/L FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O and 300 mmol/L acetate buffer (pH 3.6) in a ratio of 1:1:10 (v/v), respectively. The extract (50 µL) and solvent (50 µL) were transferred into a test tube. Then, 1.8 mL of FRAP reagent and 1.2 mL of distilled water were mixed and incubated at 37°C for 15 min. The results were calculated with respect to the standard curve of Trolox ( $R^2 = 0.9991$ ) and expressed as mg/g in dry matter.

The ABTS assay was performed according to the method described by Re et al. (1999) ABTS<sup>•+</sup> stock solution was prepared 16 h before use by reacting 2.45 mmol/L aqueous solution of K<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub> with 7 mmol/L aqueous solution of ABTS<sup>•+</sup>. Water/ethanol mixture (1:1, v/v) was added to the stock solution until the absorbance value of the working solution was 0.70. Then, 50 µL of the extract was mixed with 3 mL of ABTS<sup>•+</sup> working solution and incubated for 6 min at room temperature. The absorbance values were recorded at 734 nm and the results were expressed as milligram Trolox equivalent per gram dry matter ( $R^2 = 0.9994$ ).

For the CUPRAC assay, 50 µL of extract and 1.05 mL of distilled water were mixed and 1.0 mL each of copper(II) chloride (10<sup>-2</sup> mol/L in distilled water), neocuproine (7.5 × 10<sup>-2</sup> mol/L, in 96% ethanol), and ammonium acetate buffer solution (in distilled water, pH 7.0) were added to complete the final volume to 4.1 mL. After

mixing, the samples were incubated at room temperature for an hour (Apak et al., 2004). Absorbance values were recorded at 450 nm and the results were expressed as Trolox equivalent in mg/g in dry matter ( $R^2 = 0.9971$ ).

### Qualitative analysis of the extracts

The extracts were monitored qualitatively by determining the spectra of supernatants between 200 and 700 nm using a UV–VIS spectrophotometer. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy analyses of the dried extracts were performed on a Perkin Elmer spectrometer (Massachusetts, USA) using Spectrum Two Model by ATR technique. Data was analyzed with Spectrum Software. The spectra were obtained at room temperature in the range of 4000 and 400  $\text{cm}^{-1}$ .

### Statistical analysis

The results were statistically analyzed by ANOVA using SPSS (version 11.5, SPSS Inc., USA). To determine the differences between extracts, Duncan's multiple range test with a significance level of 0.05 was used.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Extraction yields

The extraction yield basically depends on the type of extraction and the plant material. Thus, the extracts of the pollens were prepared by using two different solvents (methanol and ethanol) and two extraction methods. The extraction yields of all the conditions are depicted in Table 1. The extraction yield with ethanol ( $26.34 \pm 0.14\%$ ) was significantly higher than with methanol ( $25.38 \pm 0.31\%$ ) ( $P < 0.05$ ). On the other hand, further application of ultrasonication to the samples led to a significant increase in the yields for both samples ( $P < 0.05$ ). The increase in the extraction yields after ultrasonication using ethanol and methanol were detected as 9.5 and 12.8% respectively. The increase in yield after ultrasonication was attributed to the cavitation bubbles which disrupt the cell wall and also increases the mass transfer rate of the cell components into the extraction solvent (Altemimi et al., 2016; Goula et al., 2016). Furthermore, it aids in removing the

polyphenols from proteins and carbohydrates (Lohani and Muthukumarappan, 2021). Alhajali and Ali-Nizam (2021) reported the extraction yields of *Pistacia atlantica* as 30.12% and 24.20%, respectively. Gonelimali et al. (2018) investigated the extraction yields of various plants using water and ethanol as solvents and applied both conventional and ultrasonication-assisted methods. They reported increased extraction yield with ultrasonication.

Table 1. The extraction yields of the extracts

Extracts		Extraction yields (%)
Ethanolic	E	$26.34 \pm 0.10^b$
	EUS	$29.09 \pm 0.31^a$
Methanolic	M	$25.38 \pm 0.22^c$
	MUS	$29.09 \pm 0.03^a$

Values followed by the different letter shows significant difference within extracts. E and M are the ethanol extracts with conventional method. EUS and MUS are the ethanol and methanol extracts after ultrasonication.

### Total phenolic and flavonoid contents

Total phenolic contents of the ethanol and methanol extracts from the conventional extraction were almost similar and found as  $9.83 \pm 0.48$  and  $9.71 \pm 0.55$  mg GAE/g dry matter, respectively ( $P > 0.05$ ). A significant increase in the total phenolic content has been detected when the samples were treated with ultrasonication ( $P < 0.05$ ), and they were determined to be  $11.76 \pm 0.64$  and  $12.74 \pm 0.37$  mg GAE/g dry matter, respectively (Figure 1a). Unlike the total phenolic contents, flavonoid contents were affected by the type of the solvent. Using ethanol as the extraction solvent yielded in higher flavonoids than methanol (Figure 1b). The total flavonoid amount obtained with methanol was almost half of the flavonoids from the ethanol extraction. Regarding the ultrasonication effect to the extraction of flavonoids, remarkable increases in both extraction solvents have been observed ( $P < 0.05$ ). The total flavonoid contents of ultrasonicated ethanol and methanol extracts were  $3.40 \pm 0.17$  and  $2.07 \pm 0.06$  mg QE/g dry matter. As mentioned before ultrasonication releases the bioactive compounds from the plant matrices which are bounded with carbohydrates

and proteins (Goula et al., 2016; Lohani and Muthukumarappan, 2021). Improved extraction of bioactive compounds from different plant materials using ultrasonication were reported by various researchers (Jermañ et al., 2010; Altemimi et al., 2015; Corbin et al., 2015; Tarone et al., 2021). Altemimi et al. (2016) compared the conventional and ultrasonication-assisted

extraction of phenolic compounds from peaches and pumpkins and found higher phenolic compounds and antioxidant activity with ultrasonication. They also observed the extracted samples under scanning electron microscopy and detected highly damaged cell walls with ultrasonication (Altemimi et al., 2016).

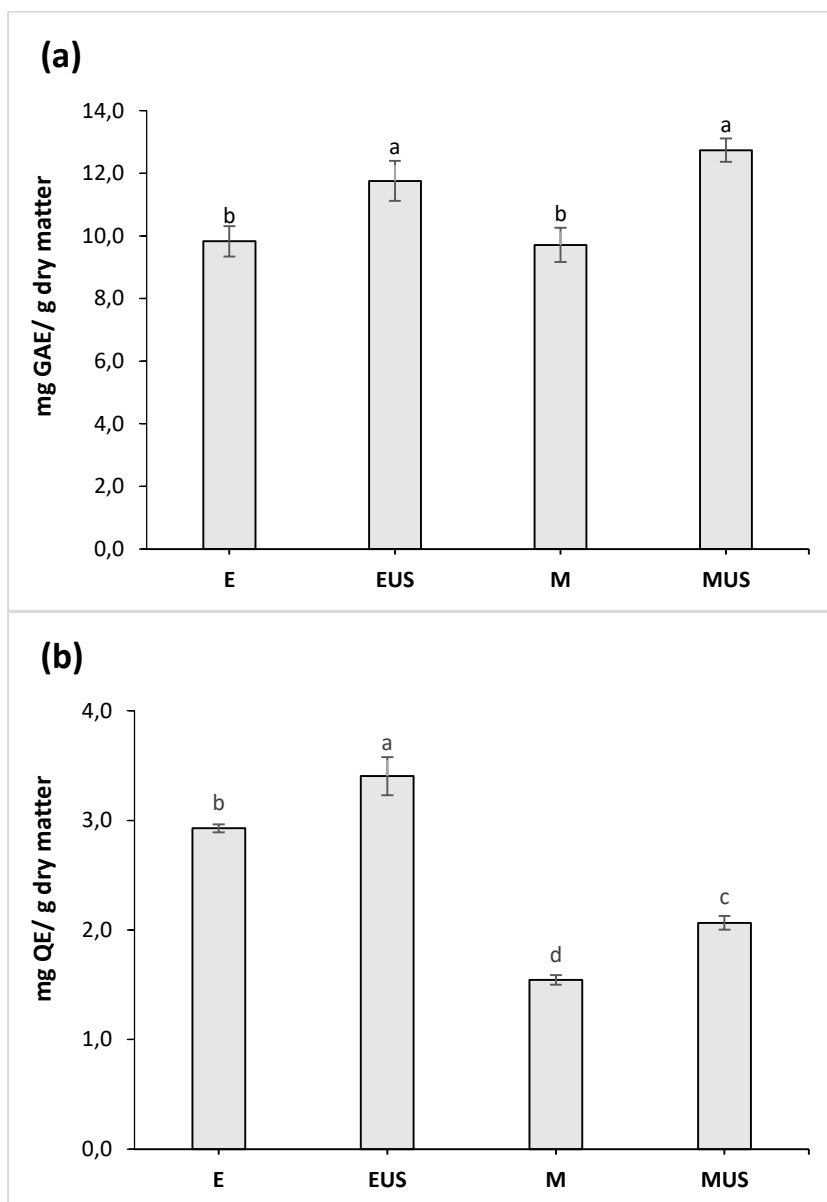


Figure 1. Total phenolic (a) and total flavonoid (b) contents of the extracts. Values followed by the different letter shows significant difference within extracts (E and M are the ethanol extracts with conventional method. EUS and MUS are the ethanol and methanol extracts after ultrasonication)

Total phenolic compounds and flavonoid content of *T. domingensis* pollen were reported by several researchers using different extraction techniques. Chai et al. (2014) determined the total phenolic and flavonoid contents of the staminate flower of *T. domingensis* in the aqueous extracts as  $9.92 \pm 0.14$  mg GAE and  $8.16 \pm 0.12$  mg QE/g dry matter, respectively. Karbon et al. (2019) determined the flavonoid content of the pollen as 1.43 mg rutin equivalent/g dry matter. Sardar et al. (2014) used various extraction solvents for the extraction of bioactive compounds from the pollen and reported the variation in the extracted polyphenols and flavonoid contents depending on the solvent type. They reported methanol as a better solvent for the extraction of polyphenol, while n-hexane was the most effective for flavonoid extraction.

#### Antioxidant activities

To comprehensively examine different aspects of antioxidant activities of the extracts, four different methods were applied, namely DPPH, FRAP, ABTS and CUPRAC. All of these analyses are spectrophotometric electron transfer based assays and measure the ability of an antioxidant in the reduction of an oxidant. However, they differ from each other according to their working pH, applicability to hydrophilic and lyophilic antioxidants and chromogenic redox reagents with different standard potentials. Therefore, the antioxidant potential of the extracts was evaluated with different tests (Apak et al., 2007). According to the results, DPPH values of all extracts ranged from  $1.30 \pm 0.10$  to  $1.58 \pm 0.07$  mg Trolox/g dry matter (Figure 2a). There were significant differences between the DPPH values of the extracts and the highest one belonged to ultrasonicated ethanol extract ( $P < 0.05$ ). Aljazy et al. (2021) examined the antioxidant activity of three pollen extracts (aqueous, ethanol, and hexane) and found that the pollen extracts showed a good ability to inhibit DPPH radical. They reported that the percentage inhibition of the extracts was not significantly different at a concentration of 75 mg/mL. Similarly, this study showed no significant differences between ethanol and methanol extraction.

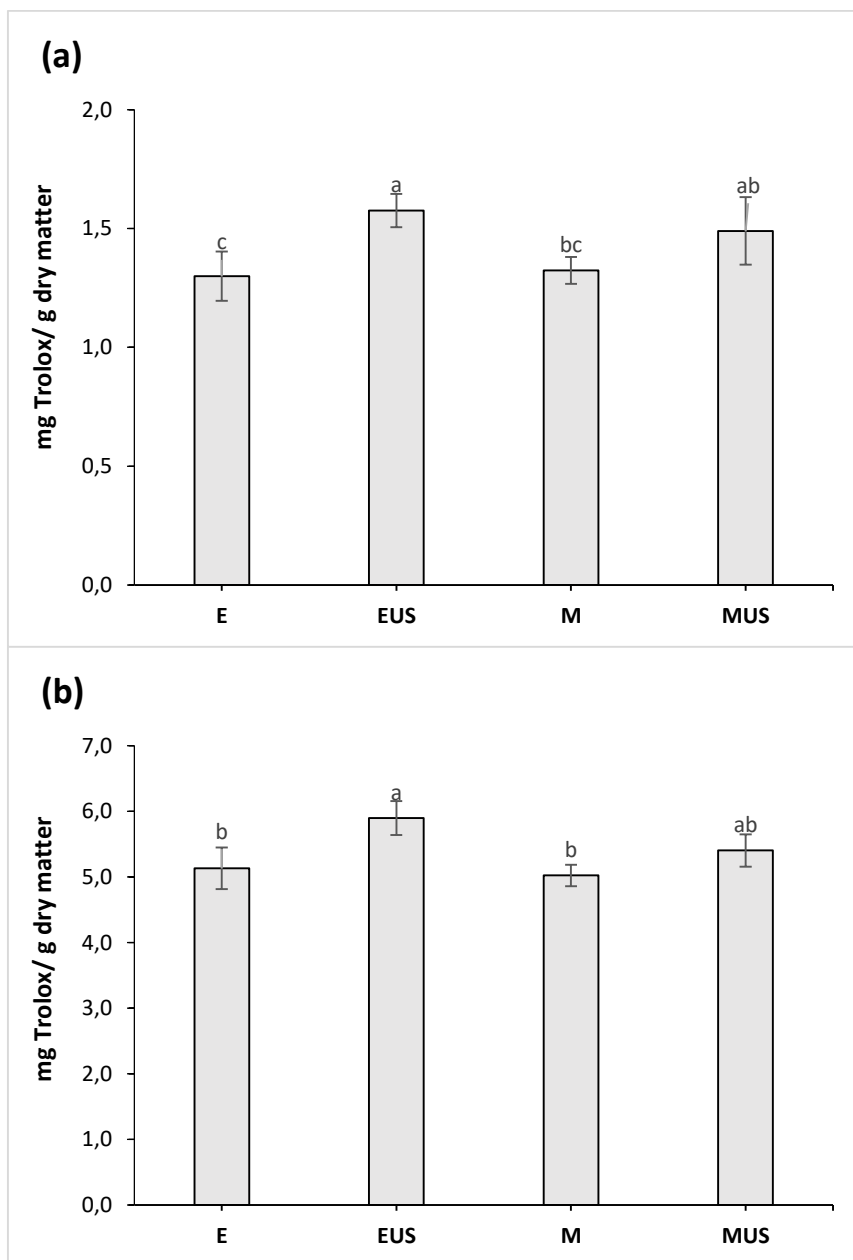
When the FRAP results of the extracts were compared, the lowest value was detected as  $5.02 \pm 0.16$  mg Trolox/g dry matter in methanol, while the highest value was  $5.90 \pm 0.26$  mg Trolox/g dry matter in ultrasonicated ethanol extract (Figure 2b). The FRAP values were not affected by the type of solvents. In the study of Sardar et al. (2014), the effect of different solvents on the antioxidant potential of the pollen of *T. domingensis* was detected with FRAP assay. It was reported that solvent type affected the FRAP assay and the highest value was obtained in methanol extract, which is in contrast with the results of this study.

The ABTS values of the ethanol and methanol extracts from the conventional extraction were almost similar and determined as  $3.67 \pm 0.09$  and  $3.66 \pm 0.03$  mg Trolox/g dry matter, respectively (Figure 2c). The ABTS activity significantly increased after ultrasonic treatment ( $P < 0.05$ ) and the values were detected as  $4.06 \pm 0.08$  mg Trolox/g dry matter for ethanol extract and  $3.90 \pm 0.07$  mg Trolox/g dry matter for methanol extract. Dilshad et al. (2022) conducted a study evaluating phytochemical potential of methanol extract and n-hexane fraction of *T. domingensis*. They found the ABTS value of methanolic extract as 114.31 mg Trolox/g dry matter, which is higher than this study. One important reason could be the differences in extraction times which was longer than our study. The relative antioxidant activities determined by DPPH scavenging, FRAP and ABTS were in agreement (Figure 2c).

CUPRAC is another antioxidant activity method and the principle is that the Cu (II)-neocuprine complex converts the Cu (I)-neocuprine form at the end of the reaction. In this study, CUPRAC values of the ethanol and methanol extracts were  $11.80 \pm 0.14$  and  $9.76 \pm 0.55$  mg Trolox/g dry matter, respectively, which showed the significant effect of the solvent type (Figure 2d) ( $P < 0.05$ ). Moreover, ultrasonicated ethanol extract had the highest CUPRAC value ( $12.01 \pm 0.40$  mg Trolox/g dry matter). When the results of the antioxidant activities were generally examined, much higher values were detected in the samples treated with ultrasonication than in conventional groups. The

phenolic and flavonoid contents of *T. domingensis* extract provide high antioxidant activity by scavenging free radicals with the help of hydrogen atoms of these compounds (Aryal et al., 2019).

Since these bioactive compounds were released more from plant matrices during ultrasonication, significant increases in antioxidant activities were detected after treatment.



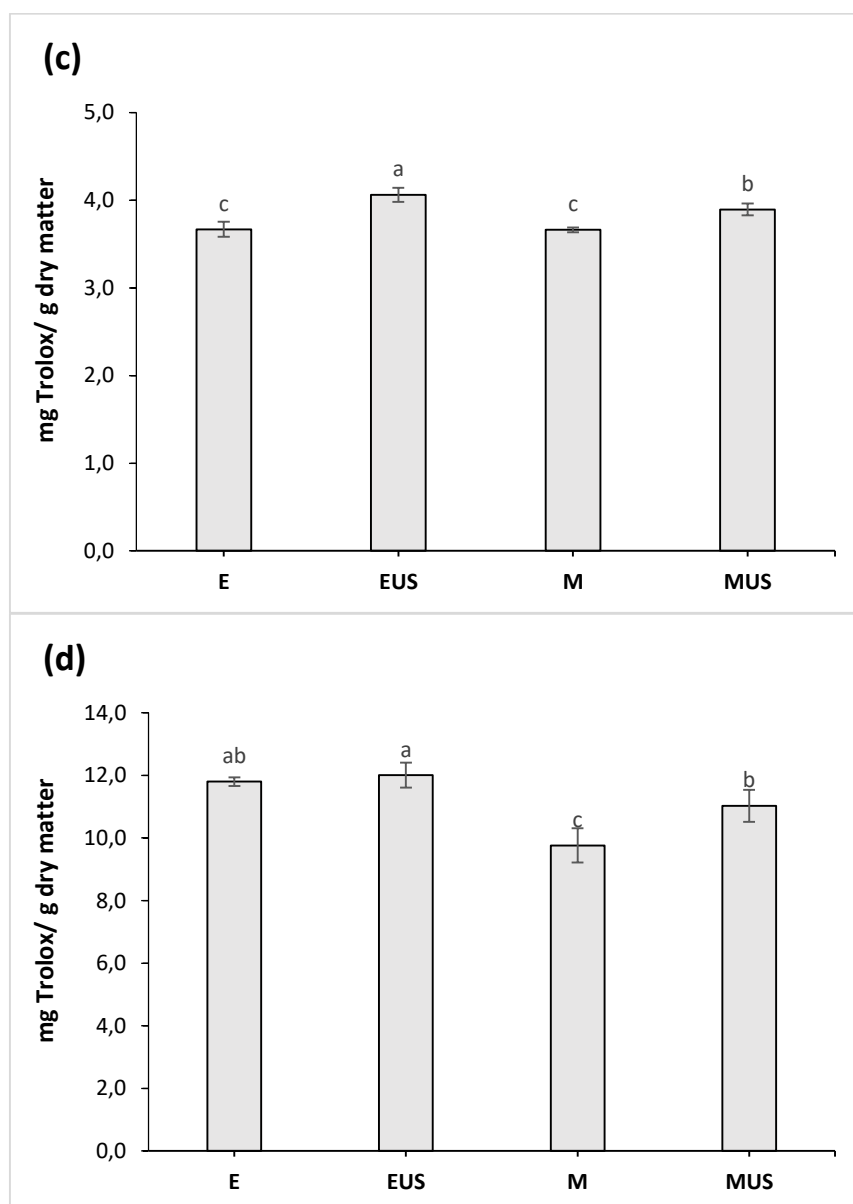


Figure 2. DPPH (a), FRAP (b), ABTS (c) and CUPRAC (d) contents of the extracts. Values followed by the different letter shows significant difference within extracts (E and M are the ethanol extracts with conventional method. EUS and MUS are the ethanol and methanol extracts after ultrasonication).

#### Qualitative determination of phenolic and flavonoids with UV-VIS spectroscopy and FTIR

UV-VIS absorption spectra of the extracts were monitored at 200-700 nm to determine specific absorption wavelengths (Figure 3). There was no absorption at the wavelengths over 400 nm. Main peaks were detected at around 341-347, 261-266, and 200-225 nm. All the samples had similar

peaks, however, their intensities differed which were attributed to the different amounts of the substances. It is known that the phenolic and flavonoids absorb the UV light between 200 and 350 nm which is exerted due to the  $n-\pi^*$  electronic transition of aromatic substances as well as chromophores (Rafi et al., 2018; Song et al., 2020).



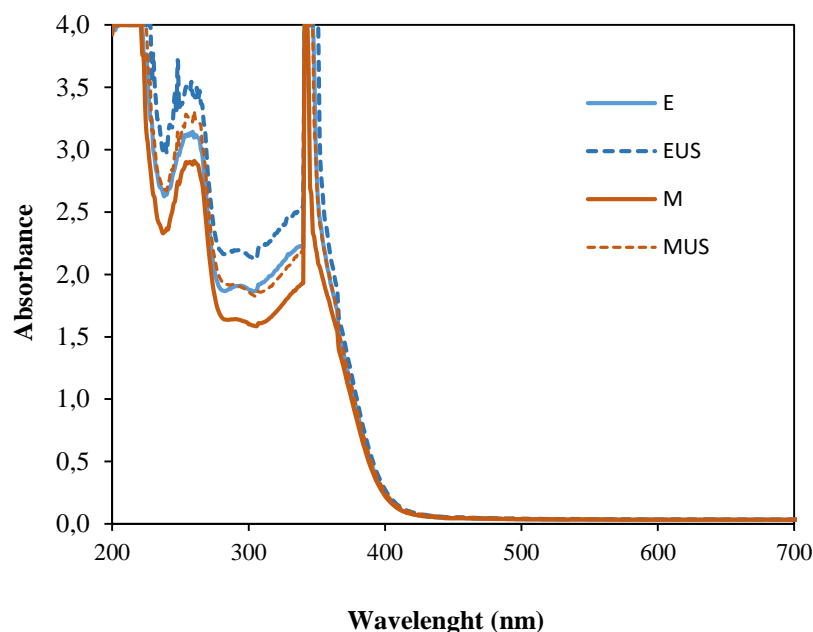


Figure 3. UV-VIS absorption spectra of the ethanol and methanol extracts of *T. domingensis* pollen. E and M are the ethanol extracts with conventional method. EUS and MUS are the ethanol and methanol extracts after ultrasonication.

Fourier transform infrared spectroscopy is a useful tool for the identification of main functional groups and chemical bonds in biological molecules, hence it may provide insight into the presence of certain compounds (Palacio et al., 2014). In the current study, the extracts were dried and subjected to FTIR analysis to confirm the presence of phenolic compounds and flavonoids by detecting the functional groups associated with those molecules (Figure 4a and b). The identical peaks were obtained with the same solvents before and after ultrasonication. However, the intensities of the peaks increased after ultrasonication in both ethanol and methanol extracts that were related with the amount of the chemical compounds in the samples. As the transmittance value is low, absorbance is high which means that the sample contains a higher amount of compounds. The transmittance intensities obtained with FTIR were coherent with the results of the phytochemical analysis performed before and after ultrasonication. The wide peaks between

3600 and 2990  $\text{cm}^{-1}$  were detected in all the samples which were attributed to the stretching vibration of  $-\text{OH}$  groups in phenols and flavonoids (Kalaichelvi and Dhivya, 2017). The peaks at 2926 and 2852  $\text{cm}^{-1}$  were associated with the  $-\text{CH}$  stretching vibrations of aromatic rings (Jain et al., 2016; Collazos-Escobar et al., 2020). The peak at 2852  $\text{cm}^{-1}$  was more apparent in the ethanol extracts than in methanol extracts. The peaks between 1734, and 1600  $\text{cm}^{-1}$  were due to the vibrations and stretching of  $-\text{C}=\text{O}$  groups in flavonoids (Kumar and Roy, 2018). The highly intense peaks at 1043  $\text{cm}^{-1}$  were associated with C-O-C stretch (Jain et al., 2016). The peaks between 987 and 543  $\text{cm}^{-1}$  were attributed to the angular deformation of C-H bonds in aromatic rings (Batista et al., 2016). The presence of  $-\text{OH}$ ,  $-\text{C}=\text{C}-$ , and C-O-C groups confirmed that the extracts contained phenolics and flavonoids (Kumar and Roy, 2018). Thus, existence functional groups and chemical bonds related with polyphenols and flavonoids validated the presence of those molecules.

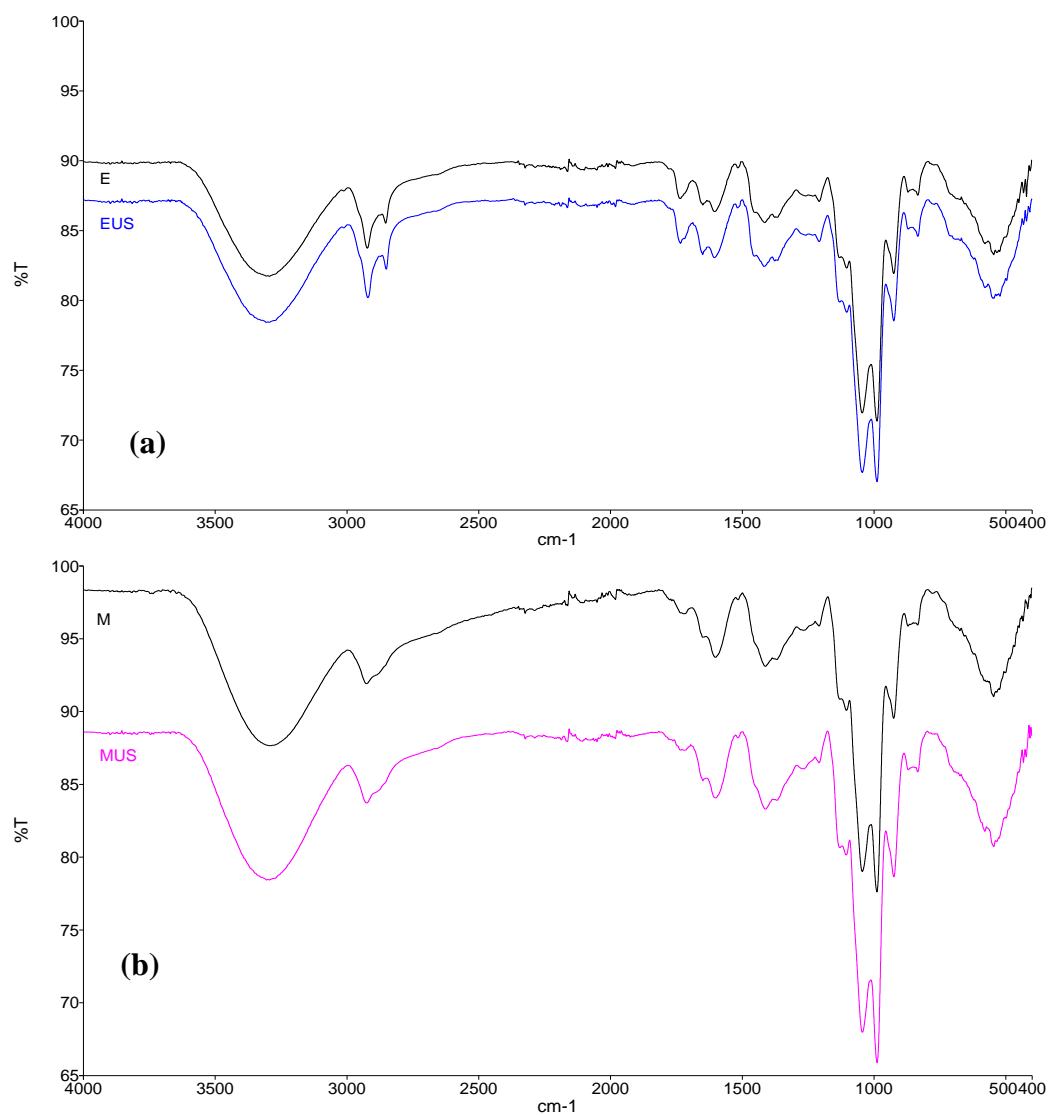


Figure 4. FTIR spectra of ethanol (a) and methanol (b) extracts of *T. domingensis* pollen. E and M are the ethanol extracts with conventional method. EUS and MUS are the ethanol and methanol extracts after ultrasonication.

## CONCLUSIONS

*T. domingensis* pollen which is included in the traditional dishes of some culture were tested for its bioactive compounds. Conventional extraction method was compared with the sequential conventional and ultrasonicated extraction using ethanol and methanol as extraction solvents. Sequential conventional and ultrasonicated extraction significantly improved the extraction yield and the amount of bioactive compounds. In spite of similar total phenolic contents with ethanol and methanol, the total flavonoids were

substantially higher in methanol extracts than ethanol extracts. In addition, sequential extraction resulted in higher antioxidant activities in all conditions which were determined using four different methods (DPPH, ABTS, FRAP and CUPRAC assays). Ethanol extracts exhibited higher antioxidant activities than methanol extracts that indicated the ethanol was better than methanol for the extraction of bioactive compounds from *T. domingensis* pollen. FTIR analyses confirmed the presence of phenolic compounds and flavonoids. It also

indicated that ultrasonication could only increase the amount bioactive compounds, but did not provide the extraction of different compounds.

### CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared no conflict of interest.

### AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Ayşe Avcı: Conceptualization, supervision, methodology, investigation, formal analysis, writing-review & editing. İnci Cerit: Conceptualization, methodology, investigation, formal analysis, writing-review & editing. Mohammed Hamk: Conceptualization, investigation, formal analysis. Semra Yılmaz Keskin: Formal analysis, review & editing. All authors read and approved the final manuscript.

### REFERENCES

- Akkol, E.K., Suntar, I., Keles, H., Yesilada, E. (2011). The potential role of female flowers inflorescence of *Typha domingensis* Pers. in wound management. *Journal of Ethnopharmacology*, 133: 1027–1032, doi:10.1016/j.jep.2010.11.036.
- Al-Bader, S.M. (2018). Characterization and evaluation of fungal growth medium composed pollens powder of cattail (*Typha domingensis* Pers.). *Artículo De Investigación Científica Y Tecnológica*, 6(1): 1-7, doi: 10.15649/2346075X.480.
- Alhajali, O., Ali-Nizam, A. (2021). Phytochemical Screening and Antibacterial Activity of Pistacia atlantica and Pinus canariensis Leaf Extracts. *Journal of the Turkish Chemical Society*, 8(2): 403-418, doi:10.18596/jotcsa.836074.
- Aljazy, N.A.S., Abdulstar, A.R., Alrakabi, J.M.F. (2021). Analytical Study of Phytochemicals and Antioxidant Activity of Pollen (*Typha Domingensis* Pers.) Extracted from The Papyrus Plant and Its Use in Cake Enrichment. *Al-Qadisiyah Journal For Agriculture Sciences*, 11(2): 126-136, doi:10.33794/qjas.2021.132392.1017.
- Altemimi, A., Choudhary, R., Watson, D.G., Lightfoot, D.A. (2015). Effects of ultrasonic treatments on the polyphenol and antioxidant content of spinach extracts. *Ultrasonics Sonochemistry*, 24: 247–25, doi: 10.1016/j.ultsonch.2014.10.023.
- Altemimi, A., Watson, D.G., Choudhary, R., Dasari, M.R., Lightfoot, D.A. (2016). Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Peaches and Pumpkins. *PLoS One*, 11(2): 1-20, doi: 10.1371/journal.pone.0148758.
- Apak, R., Güçlü, K., Ozyürek, M. and 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, doi:10.1021/jf048741x.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S. E., Bektaşoğlu, B., Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12(7): 1496-1547, doi: 10.3390/12071496.
- Arenas, P., and Scarpa, G.F. (2003). The Consumption of *Typha Doingensis* Pers. (Typhaceae) Pollen Among The Ethnic Groups of the Gran Chaco, South America. *Economic Botany*, 57(2): 181-188.
- Aryal, S., Baniya, M.K., Danekhu, K., Kunwar, P., Gurung, R., Koirala, N. (2019). Total phenolic content, flavonoid content and antioxidant potential of wild vegetables from Western Nepal. *Plants*, 8(4): 96, doi:10.3390/plants8040096.
- Bansal, S. Lishawa, S.C. Newman S., Tangen, B.A., Wilcox, D., Albert, D. Anteau, M.J., Chimney M.J., Cressey, R.L., DeKeyser, E., Elgersma, K.J., Finkelstein, S.A., Freeland, F., Grosshans, R., Klug, P.E., Larkin, D.J., Lawrence, B.A., Linz, G., Marburger, J., Noe, G., Otto, C., Reo, N., Richards, J., Richardson, C., Rodgers, L., Schrank, A.J., Svedarsky, D., Travis, S., Tuchman, N., Windham-Myers, L. (2019). Typha (Cattail) Invasion in North American Wetlands: Biology, Regional Problems, Impacts, Ecosystem Services, and Management. *Wetlands*, 39: 645-684, doi: 10.1007/s13157-019-01174-7.
- Barbero-Barrera, M.M., SalasRuiz, A., GalbisMorales, R. (2021). Mechanical and Physical Characterisation of *Typha domingensis* Based Thermal Insulation Boards for Developing Areas such as Nigeria. *Waste and Biomass*

- Valorization*, 12: 5795–5806, doi: 10.1007/s12649-021-01410-4.
- Batista, N.N., Andrade, D.P., Ramos, C.L., Dias, D.R., Schwani R.F. (2016). Antioxidant capacity of cocoa beans and chocolate assessed by FTIR. *Food Research International*, 90: 313-319, doi: 10.1016/j.foodres.2016.10.028.
- Benzie, I.F.F. and Strain, J.J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1): 70–76, doi: 10.1006/abio.1996.0292.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1): 25–30, doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.
- Carvalho, J.D.T., and Mariath, J.E.A. (2019). Synflorescence morphology of species of *Typha* L. (Typhaceae): anatomical and ontogenetic bases for taxonomic applications. *Acta Botanica Brasiliica*, 33(4): 672-682, doi: 10.1590/0102-33062019abb0140.
- Chai, T.T., Mohan, M., Ong, H.C., Wong, F.C. (2014). Antioxidant, Iron chelating and Anti-glucosidase Activities of *Typha domingensis* Pers (Typhaceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research January*, 13 (1): 67-72, doi: 10.4314/tjpr.v13i1.10.
- Collazos-Escobar, G. A., Gutierrez-Guzman, N., Vaquiro-Herrera, H. A., Amoroch-Cruz, C. M. (2020). Moisture dynamic sorption isotherms and thermodynamic properties of parchment specialty coffee (*Coffea arabica* L.). *Coffee Science*, 15:e151684, doi: 10.25186/.v15i.1684.
- Corbin, C., Fidel, T., Leclerc, E.A., Barakzoy, E., Sagot, N., Falguières, A., Renouard, S., Blondeau, J.P., Ferroud, C., Doussot, J., Lainé, E., Hano, C. (2015). Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 26: 176-185, doi: 10.1016/j.ultsonch.2015.02.008.
- Corneanu, M., Corneanu, C.G., Constantin, C. Tripon, S.(2014). Phytoremediation of Some Heavy Metals and Radionuclides from a Polluted Area Located on The Middle Jiu River. Case Study: *Typha Latifolia* L. Oltenia. *Studii și comunicări. Științele Naturii*. 30(2): 208-221.
- Cruz, Y.C., Scarpa, A.L.M., Pereira, M.P., Castro, E.M., Pereira, F.J. (2019). Growth of *Typha domingensis* as related to leaf physiological and anatomical modifications under drought conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41(64): 1-9, doi: 10.1007/s11738-019-2858-1.
- Dilshad, R., Khan, K.R., Saeed, L., Sherif, A.E., Ahmad, S., Ovatlarnporn, C., Nasim, J., Hussain, M., Ghalloo, B.A., Basit, A., Mukhtar, I. (2022). Chemical Composition and Biological Evaluation of *Typha domingensis* Pers. to Ameliorate Health Pathologies: In Vitro and In Silico Approaches. *BioMed Research International*, 8010395, doi: 10.1155/2022/8010395.
- Egdhami, A., Sadeghi, F. (2010). Determination of total phenolic and flavonoids contents in methanolic and aqueous extract of *Achillea millefolium*. *Organic Chemistry Journals*, 2:81-84.
- Eid, E.M., Galal, T.M., Shaltout, K.H., El-Sheikh, M.A., Asaeda, T., Alatar, A.A., Alfarhan, A.H., Alharthi, A., Alshehri, A.M.A., Picó, Y., Barcelo, D. (2020). Biomonitoring potential of the native aquatic plant *Typha domingensis* by predicting trace metals accumulation in the Egyptian Lake Burullus. *Science of the Total Environment*, 714: 1-13, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.136603.
- García, M.T. Zamudio, M.A.M., Loaiza, J.M., Morales, A.B., Alfaro, A., Lopez, F., García, J.C. (2019). Characterization and use of southern cattail for biorefining-based production of furfural. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 9: 333–339, doi: 10.1007/s13399-018-0355-1.
- Gonelimali, F.D., Lin, J., Miao, W., Xuan, J., Charles, F., Chen, M., Hatab, S.R. (2018). Antimicrobial Properties and Mechanism of Action of Some Plant Extracts Against Food Pathogens and Spoilage Microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1639, doi: 10.3389/fmicb.2018.01639.
- Goula, A.M., Thymiatis, K., Kaderides, K. (2016). Valorization of grape pomace: Drying behavior and ultrasound extraction of phenolics. *Food and*

- Bioproducts Processing*, 100: 132-144, doi: 10.1016/j.fbp.2016.06.016.
- Hasan, M.M., Bashir, T., Bae, H. (2017). Use of Ultrasonication Technology for the Increased Production of Plant Secondary Metabolites. *Molecules*, 22: 1-10, doi: 10.3390/molecules22071046.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6): 1841-1856, doi:10.1021/jf030723c.
- Jain, P.K., Soni, A., Jain, P., Bhawsar, J. (2016). Phytochemical analysis of *Mentha spicata* plant extract using UV-VIS, FTIR and GC/MS technique. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(2): 1-6.
- Jerman, T., Trebse, P., Vodopivec, B.M. (2010). Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea europaea*) phenolic compounds. *Food Chemistry*, 123: 175-182, doi: 10.1016/j.foodchem.2010.04.006.
- John, M.O., Rufai, M.A., Sunday, A.J., Fernando, E., Richard, K., Eva, I., Maidala, A., Amos, M., Chana, M., Hannatu, C., Sunday A, O. (2022). Cattail (*Typha domingensis*) silage improves feed intake, blood profile, economics of production, and growth performance of beef cattle. *Tropical Animal Health and Production*, 54(48): 1-8, doi: 10.1007/s11250-022-03066-1.
- Kalaichelvi, K., Dhivya, S.M. (2017). Screening of phytoconstituents, UV-VIS Spectrum and FTIR analysis of *Micrococca mercurialis* (L.) Benth. *International Journal of Herbal Medicine*, 5(6): 40-44.
- Kamtekar, S., Keer, V. Patil, V. (2014). Estimation of phenolic content, flavonoid content, antioxidant and alpha amylase inhibitory activity of marketed polyherbal formulation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4(9): 061-065, doi: 10.7324/JAPS.2014.40911.
- Karbon, M.H., and Alhammer, A.H. (2020). Cytotoxic Effect of Aqueous-Ethanol Extract of *Typha Domingensis* Pers. (Pollen) against Human Breast Cancer Cells *in Vitro*. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(10): 1158-1161, doi:10.31838/srp.2020.10.167.
- Karbon, M.H., Raheem Jaafar Azeez, R.J., Hasan, Z.Y.M., Yaseen, A.N. (2019). Phytochemical Properties and Antioxidant activity of Pollen of *Typha domingensis pers*. Grow in Marshes of Maysan Governorate Southern of Iraq. *Journal of Global Pharma Technology*, 11(9): 564-570.
- Kumar, V., Roy, B.K. (2018). Population authentication of the traditional medicinal plant *Cassia tora* L. based on ISSR markers and FTIR analysis. *Scientific Reports*, 8:10714, doi: 10.1038/s41598-018-29114-1.
- Lafarga, T., Roriguez-Rogue, M.J., Bobo, G., Villaro, S., Aguilo-Aguayo, I. (2019). Effect of ultrasound processing on the bioaccessibility of phenolic compounds and antioxidant capacity of selected vegetables. *Food Science Biotechnology*, 28(6): 1713–1721, doi: 10.1007/s10068-019-00618-4.
- Linskens, H.F., Jorde, W. (1997). Pollen as Food and Medicine-A Review, *Economic Botany* 51(1): 78-87.
- Lohani, U.C., Muthukumarappan, K. (2021). Study of continuous flow ultrasonication to improve total phenolic content and antioxidant activity in sorghum flour and its comparison with batch ultrasonication. *Ultrasonics Sonochemistry*, 71: 1-10, doi: 10.1016/j.ultsonch.2020.105402.
- Mukhtar, A.A. and Abdullahi, I.L. (2020). *Typha* Biomass Energy for Sustainable Management of *Typha domingensis* L. in Affected Communities of Northern Nigeria. *Dutse Journal of Pure and Applied Sciences*, 6(4): 246-252.
- Palacio, S., Aitkenhead, M., Escudero, A., Montserrat-Martí, G., Maestro, M., Robertson, A. J. (2014). Gypsophile chemistry unveiled: Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy provides new insight into plant adaptations to gypsum soils. *PLoS One*, 9: e107285, doi: 10.1371/journal.pone.0107285.
- Pandey, R., Jose, S., Sinha, M.K. (2022). Fiber Extraction and Characterization from *Typha Domingensis*. *Journal of Natural Fibers*, 19(7): 2648-2659, doi: 10.1080/15440478.2020.1821285.
- Rafi, M., Jannah, R., Heryanto, R., Kautsar, A., Septaningsih, D.A. (2018). UV-Vis spectroscopy and chemometrics as a tool for identification and

- discrimination of four *Curcuma* species. *International Food Research Journal*, 25(2): 643-648.
- Rao, M.R.K. and Divya, S.D. (2016). Preliminary Phytochemical Analysis of *Typha domingensis* Rhizome Aqueous Extracts. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 37(1): 30-32.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10): 1231-1237, doi: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3.
- Sardar, A.A., Khan, Z.D., Perveen, A., Farid, S., Khan, I.U. (2014). In vitro antioxidant potential and free radical scavenging activity of various extracts of pollen of *Typha domingensis* Pers. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(2): 279-284.
- Song, X.C., Canellas, E., Asensio, E., Nerin, C. (2020). Predicting the antioxidant capacity and total phenolic content of bearberry leaves by data fusion of UV-Vis spectroscopy and UHPLC/Q-TOF-MS. *Talanta*, 213: 120831, doi: 10.1016/j.talanta.2020.120831
- Sorourian, R., Khajehrahimi, A.E., Tadayoni, M., Azizi, M.H., Hojjati, M. (2020). Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Typha domingensis*: Structural characterization and functional properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 160:758-768, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.05.226.
- Tarone, A.G., Silva, E.K., Barros, H.D.F.Q., Gazarin, G.B.B., Junior, M.R.M. (2021). High-intensity ultrasound-assisted recovery of anthocyanins from jaboticaba by-products using green solvents: Effects of ultrasound intensity and solvent composition on the extraction of phenolic compounds. *Food Research International*, 140: 110048, doi: 10.1016/j.foodres.2020.110048.
- Wojdyło, A., Oszmiański, J. and Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105(3): 940-949, doi: 10.1016/j.foodchem.2007.04.038.
- Zafra-Rojas, Q.Y., González-Martínez, B.E., Cruz-Cansino, N.S., López-Cabanillas, M., Suárez-Jacobo, A., Cervantes-Elizarrarás, A., Ramírez-Moreno, E. (2020). Effect of Ultrasound on *In Vitro* Bioaccessibility of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Blackberry (*Rubus fruticosus*) Residues cv. Tupy. *Plant Foods for Human Nutrition*, 75: 608-613, doi: 10.1007/s11130-020-00855-7.
- Zhang, Y., Geel, B.V., Gosling, W.D., Sun, G., Qin, L., Wu, X., (2020). *Typha* as a wetland food resource: evidence from the Tianluoshan site, Lower Yangtze Region, China. *Vegetation History and Archaeobotany*, 29: 51-60, doi: 10.1007/s00334-019-00735-4.

## **LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM EK148'İN ET PROTEİNLERİ İÇEREN ORTAMDA GAMA AMİNO BÜTİRİK ASİT ÜRETİMİ VE OPTİMİZASYONU**

**Aybike Kamiloğlu\*, Habibe Memiş**

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

Geliş/ Received 08.09.2022; Kabul/ Accepted : 02.02.2023; /Online baskı: Published online 15.02.2023

Kamiloğlu, A., Memiş, H. (2023). *Lactiplantibacillus plantarum* EK148'in et proteinleri içeren ortamda gama amino bütirik asit üretimi ve optimizasyonu. GIDA (2023) 48 (2) 271-284 doi: 10.15237/ gida.GD22087

Kamiloğlu, A., Memiş, H. (2023). *Gamma aminobutyric acid production and optimization by Lactiplantibacillus plantarum* EK148 in media containing meat proteins. GIDA (2023) 48 (2) 271-284 doi: 10.15237/ gida.GD22087

### **ÖZ**

Araştırmada, sucuk kaynaklı *Lactiplantibacillus plantarum* EK148 suşu gama amino bütirik asit (GABA) üretim düzeyi açısından değerlendirilmiştir. GABA üretimine, monosodyum glutamat (MSG) bulunmayan besi ortamına glutamik asit kaynağı olarak et protein izolatu edilerek, sıcaklık, pH ve fermantasyon süresi faktörlerinin etkisi değerlendirilmiştir. Deneysel tasarımda elde edilen sonuçlarla *L. plantarum* EK148 suşu için optimum koşullar % 10 protein ekstraktı konsantrasyonu, 33.3 °C sıcaklık, pH 5.05 ve 96 saat fermantasyon süresi olarak belirlenmiştir. Model ile *L. plantarum* EK148 suşu kullanılarak elde edilen veriler arasındaki uyum eksikliğinin önemsiz olduğu, protein ekstraktı konsantrasyonu ve sıcaklığın GABA üretimi üzerine önemli düzeyde etkili olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışma ile et proteinlerinin glutamik asit kaynağı olarak kullanımı sağlanmış ve MSG içermeyen ortamda *L. plantarum* EK148 suşu kullanılarak GABA üretimi gerçekleştirilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** GABA, *Lactiplantibacillus plantarum*, YYY, optimizasyon, MSG

## **GAMMA AMINOBUTYRIC ACID PRODUCTION AND OPTIMIZATION BY LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM EK148 IN MEDIA CONTAINING MEAT PROTEINS**

### **ABSTRACT**

In the study, *Lactiplantibacillus plantarum* EK148 strain originating from sucuk was evaluated in terms of gamma amino butyric acid (GABA) production level. The effect of temperature, pH and fermentation time factors on GABA production was evaluated by adding meat protein isolate as a source of glutamic acid to a medium without monosodium glutamate (MSG). With the responses obtained in the experimental design, optimum conditions for *L. plantarum* EK148 strain were determined as 10% protein extract concentration, 33.93 °C temperature, pH 5.05 and 96 hours of fermentation time. It was determined that the lack of fit value between the model and the data obtained using the *L. plantarum* EK148 strain was insignificant, and that protein extract concentration and temperature had a significant effect on GABA production. With this study, meat proteins were used as a source of glutamic acid, and GABA production was carried out using *L. plantarum* EK148 strain in MSG-free medium.

**Keywords:** GABA, *Lactiplantibacillus plantarum*, RSM, optimization, MSG

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: abereketoglu@bayburt.edu.tr

☎: (+90) 458 211 1153-1646

Aybike Kamiloğlu; ORCID no: 0000-0002-6756-0331

Habibe Memiş; ORCID no: 0000-0002-2696-7493



## GİRİŞ

Gama amino bütirik asit (GABA), 4 karbonlu ve non-protein aminoasit yapıda olup canlı organizmalarda serbest halde bulunan önemli bir bileşendir. Fizyolojik pH'larda dipolar formda bulunan GABA, suda çözünür bir amino asittir (Shelp vd., 1999). GABA'nın, bitkilerde varlığı uzun yıllardır bilinmektedir (Sorrequieta vd., 2010). Ayrıca, GABA üretimi birçok maya, küf ve bakteri tarafından da gerçekleştirilmektedir. İnsan metabolizması için yapısal birçok rolü vardır. GABA'nın, sinir iletimini inhibe ederek nöronal uyarılabilirliği azaltma işlevi görüp, anksiyete ve depresyonun engellenmesinde, yüksek kan basıncının kontrolünde etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Abdou vd., 2006; Kalueff ve Nutt, 2007; Shimada vd., 2009). Ayrıca diüretik ve antidiyabetik etkilere de sahiptir (Adeghate ve Ponary, 2002). GABA, glutamatın glutamik asit dekarboksilaz (GAD) enzimi tarafından  $\alpha$ -dekarboksilasyonu sonucunda elde edilebilmektedir (Shelp vd., 1999).

GABA göstermiş olduğu fonksiyonel etkilerden dolayı, gıda takviyesi olarak ticari bir öneme sahiptir. Fakat ticari olarak sunulan birçok gıda takviyesi sentetik yollar ile elde edilmektedir. Gıda takviyesi olarak sentetik GABA'nın kullanımının olumsuz etkileri tam olarak açığa kavuşturulmamıştır (Boonstra vd., 2015). Doğal kaynaklara başvurulduğunda ise örneğin; 100 mg düzeyinde GABA sağlayabilmek için yaklaşık olarak 2.34 kg çiğ ıspanak tüketimi sağlanmalıdır (Oh vd., 2003). GABA alımının beslenme ile sağlanmasında bitkilerin yetersiz kalması sonucunda, bu fonksiyonel bileşiğin dışarıdan takviye ediciler ile sağlanması, doğal kabul edilmemektedir (Villegas vd., 2016). Bu nedenle, GABA üretiminde fermentasyon yolunun seçilmesi ve gıdanın doğal yollarla zenginleştirilmesi ilgi görmektedir. Laktik asit bakterilerinin (LAB) yüksek GABA üretim yetenekleri (Dhakal vd., 2012), güvenli (GRAS) olarak kabul görmeleri (Leroy ve De vuyst, 2004) ve fermente gıda, sebze, insan ve hayvan bağırsaklarında sıklıkla bulunmaları (Satokari vd., 2013) nedeni ile ilgi çekicidirler.

Konu ile ilgili çalışmalar değerlendirildiğinde, laktik asit bakterilerinin GABA üretim

aktivitelerini ortamın pH değeri ve ortamdaki glutamik asit varlığının etkilediği görülmektedir. Bu nedenle, GABA üretimini sağlamak amacı ile ortama monosodyum glutamat (MSG) ya da glutamik asit ilavesi yapılmaktadır. Benzer şekilde glutamik asit ilavesi ile laktik asit bakterileri kullanılarak GABA içeriği zenginleştirilmiş gıdalar üzerine birçok araştırma da mevcuttur. Bu gıdalara yoğurt (Park ve Oh, 2007), ekme (Rizello vd., 2008; Coda vd., 2010), peynir (Siragusa vd., 2007; Diana vd., 2014), soya sütü (Ko vd., 2013), fermente sosis (Rataneburee vd., 2013), nohut sütü (Li vd. 2016) vb. örnek verilebilir. Fermente et ürünlerinde, ortamlara kolay adapte olabilmesi ve sahip olduğu probiyotik özellikten dolayı *L. plantarum* türü ön plana çıkmaktadır (de Vries vd. 2006). Yapılan çalışmalarda, MSG kullanımının yaygınlığı ve et ürünleri kaynaklı laktik asit bakterileri üzerine çalışmaların yetersiz olması nedeni ile fermente et ürününden izole edilen *L. plantarum* EK148 suşu ile ortama MSG ilave edilmeden, et proteinlerinden yararlanılarak, GABA üretiminin sağlanması amaçlanmıştır. Bu amaç ile GABA üretimi üzerine farklı et protein ekstrakt düzeyinin yanı sıra farklı pH, fermentasyon süresi ve sıcaklık faktörlerinin etkileri araştırılmıştır. Araştırmada GABA üretiminde farklı koşullar denenmiş ve en yüksek GABA üretimini sağlayan optimum koşul belirlenerek, GABA üretiminin model eldesi sağlanmıştır.

## MATERYAL ve YÖNTEM

GABA üretim yeteneğine sahip, sucuk kaynaklı, *L. plantarum* EK148 (MZ636924.1) suşunun GABA üretiminin, pH ve mikrobiyal gelişim ile etkileşimi 144 saat süresince takip edilmiştir. Bu amaçla MSG ilave edilen de Man Rogosa and Sharpe (MRS) broth besiyerinden yararlanılmıştır.

### Mikrobiyel gelişim eğrilerinin oluşturulması

100 mM MSG içeren MRS broth besiyerine *L. plantarum* EK148 suşunun 1 gecelik kültüründen %1 oranında inokülasyon yapılmıştır. Daha sonra 30 °C'de 144 saatlik inkübasyon süresince 6 saat aralıklarla alınan örneklerin mikrobiyal gelişim nedeniyle oluşan ortam bulanıklığının tespiti amacı ile 600 nm'de absorpsiyon değerleri ve MRS agar kullanılarak LAB sayıları belirlenmiştir. Elde edilen veriler kullanılarak gelişme eğrisi

oluşturulmuştur. Ayrıca alınan örneklerde GABA düzeyi ve pH değerleri belirlenerek GABA üretiminin gelişim ve pH ile ilişkisi incelenmiştir.

#### **GABA üretim düzeyinin belirlenmesi**

GABA üretim düzeyleri, Inertsil ODS 3 kolonu (GL science, 5 µm, 4.6 x 250 mm) yardımıyla HPLC (Shimadzu) cihazı kullanılarak 295-500 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak solvent A (6.25 mL asetik asit, 1.97 g sodyum asetat, 200 mL asetonitril, 1 L ultra saf su) ve solvent B (Asetonitril) kullanılmıştır (1:1, v/v). Türevlendirilmiş örneklerden, 1 µL hacminde enjeksiyon yapılmıştır. 25 °C kolon sıcaklığı ve 1 mL/dk akış hızı kullanılarak ayırım sağlanmıştır. Türevlendirme amacıyla 100 µL örnek, 100 µL DCI (50 mg Dansil klorür, 10 mL aseton) karıştırıldıktan sonra, 800 µL Borat: NaOH (0.2 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10 H<sub>2</sub>O pH 9.3) eklenmiş ve 40 °C'de 30 dk ultrasonik su banyosunda tutulmuştur. Süre sonunda HPLC vialine 500 µL örnek alınmış ve 500 µL metanol eklenerek vial kapakları kapatılmıştır. Türevlendirilen GABA, floresan dedektörü tarafından tespit edilmiştir. GABA'nın belirlenmesinde standart olarak kullanılan ticari GABA'nın (Sigma-Aldrich) alıkonma süreleri ile örneklerin alıkonma süreleri karşılaştırılarak tespit edilmiştir. Örneklerde bulunan GABA konsantrasyonlarını belirlemek için, farklı konsantrasyonlarda (0.01-0.1-0.25-0.50-1.0 mg/mL) hazırlanan standartlar test edilerek, örnekteki GABA seviyesi belirlenmiştir (Tuberoso vd., 2015).

#### **Besi ortamının hazırlanması**

1:10 (w/v) oranında hazırlanan kıyılmış sığır et örneği/30mM fosfat tamponu karışımı ultratürax

yardımı ile homojenize edilmiştir. Ardından 20 dk süre ile 10000 g'de santrifüj edilerek, süpernatant filtre edilmiştir. Kalan pellet üzerine 1:19 (w/v) olacak şekilde 0.1 mM fosfat tamponu ilave edilerek homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnek, 10000 g'de 20 dk santrifüj edilmiştir ve süpernatant filtre edilmiştir (Toldra vd., 1992). Elde edilen süpernatantlar miyofibriller proteinlerden oluştuğundan, sonrasında üzerine eş hacimde 6 M HCl ilave edilerek, 110 °C'de 12 saat bekletilmiştir. İşlem sonrasında nötürleme yapılarak, GABA üretiminde kullanılacak MRS broth besiyerine farklı konsantrasyonlarda (%10, %25, %40) süpernatant ilave edilmiştir. Optimizasyon çalışmasında belirlenen üretim koşullarına uygun olarak, besiyeri pH değeri HCl ve/veya NaOH çözeltileri kullanılarak ayarlanmıştır. Besiyeri toplam hacmine uygun oranda MRS toz besiyeri tartılarak ilave edilmiştir.

#### **Deney tasarımı ve GABA üretiminin optimizasyonu**

Yanıt Yüzey Yöntemi (YYY, Response Surface Methodology) işlemdeki bağımsız değişkenlerin tek veya kombinasyon şeklinde cevap üzerindeki etkilerini incelemektedir. YYY'de öncelikli olarak bağımsız parametreler ve seviyeleri belirlenmektedir. Daha sonra deneysel tasarımın seçimi ve model denkleminin tahmini ve doğrulanması yapılmaktadır. Son olarak, kontur ve yüzey grafiğini elde etmek için optimum noktalar tespit edilmektedir. Çalışmada, GABA üretiminin optimizasyonu için uygulanacak YYY kapsamında incelenen parametreler, Çizelge 1'de verilmiştir. Bu parametrelerin seviyeleri yapılan ön denemeler sonucunda tespit edilmiştir.

Çizelge 1. GABA üretiminde incelenen parametreler ve seviyeleri

Table 1. Parameters and levels studied in GABA production

Değişkenler <i>Independent variables</i>		Değişken seviyeleri <i>Levels</i>		
		-1	0	1
Protein ekstraktı konsantrasyonu (%) <i>Protein extract concentration (%)</i>	X <sub>1</sub>	10	25	40
Sıcaklık (°C) <i>Temperature (°C)</i>	X <sub>2</sub>	30	35	40
pH	X <sub>3</sub>	4	5	6
Fermantasyon süresi (saat) <i>Fermentation time (hour)</i>	X <sub>4</sub>	96	120	144

GABA üreticisi *L. plantarum* suşu ile protein izolatu ilave edilen MRS broth besiyerinde GABA üretiminin optimizasyon çalışmaları yürütülmüştür. MRS broth besiyeri, laktik asit bakterileri için uygun bir et benzeri ortam olarak görülmektedir (Leroy ve De Vuyst, 2001). MRS broth, bileşimi elde edilen protein ekstraktları ile deney tasarımında belirtilen koşullara uygun olacak şekilde hazırlanmıştır. GABA üretimine etki eden önemli parametreler olduğu bilinen protein ekstraktı konsantrasyonu, pH, fermantasyon süresi ve sıcaklık parametreleri YYY kullanılarak optimize edilmiştir. Yanıt Yüzey

Yöntemi kullanılarak bu parametrelerin GABA üretimine etkileri de belirlenmiştir. Bu amaçla MINITAB 19.0 istatistik paket programından yararlanılmıştır.

Çalışmada, 31 deneysel noktadan (24 farklı kombinasyona sahip ve merkezde 7 tekrarlı) oluşan ve dört değişken ile oluşturulan merkezi kompozit istatistiksel dizayn (face centred statistical design,  $\sigma=1$ ) kullanılmıştır. Uygulanan deney tasarımı Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 2. GABA üretiminin optimizasyon çalışmasında kullanılan deney tasarım dizaynı

Table 2. Experimental design used in the optimization study of GABA production

Deneme Run	X <sub>1</sub> *	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>
1	10	30	6	144
2	40	40	4	144
3	25	35	4	120
4	25	35	5	120
5	25	35	5	120
6	25	35	5	144
7	10	40	4	96
8	25	35	6	120
9	25	35	5	120
10	40	35	5	120
11	40	30	6	144
12	10	40	4	144
13	25	35	5	120
14	25	35	5	120
15	10	30	6	96
16	10	30	4	96
17	25	35	5	120
18	25	40	5	120
19	10	40	6	96
20	40	30	4	144
21	40	40	6	96
22	25	30	5	120
23	40	30	6	96
24	10	35	5	120
25	40	40	4	96
26	40	40	6	144
27	40	30	4	96
28	25	35	5	120
29	10	30	4	144
30	25	35	5	96
31	10	40	6	144

\*X<sub>1</sub>, protein ekstraktı konsantrasyonu (%); X<sub>2</sub>, sıcaklık (°C); X<sub>3</sub>, pH; X<sub>4</sub>, fermantasyon süresi (saat).

\*X<sub>1</sub>, protein extract concentration (%); X<sub>2</sub>, temperature (°C); X<sub>3</sub>, pH; X<sub>4</sub>, fermentation time (hours).

Bağımsız değişkenler olarak protein ekstraktı konsantrasyonu (%), pH, sıcaklık (°C) ve fermantasyon süresi (saat) yanıt olarak ise HPLC ile tespit edilen GABA üretimleri (mg/L) üzerine olan etkileri belirlenmiştir. Çoklu Regresyon analizlerinde aşağıda yer alan Eşitlik 1'de verilen polinomal quadratik model ve regresyon katsayıları kullanılmıştır. Bu eşitlikte “Y” yanıt olarak GABA üretim miktarını, “X” değerleri bağımsız değişkenleri (Protein ekstraktı konsantrasyonu, sıcaklık, fermantasyon süresi ve pH) ifade ederken,  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$ ,  $\beta_{ij}$  değerleri ise regresyon katsayılarını belirtmektedir.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_i^2 \quad (1)$$

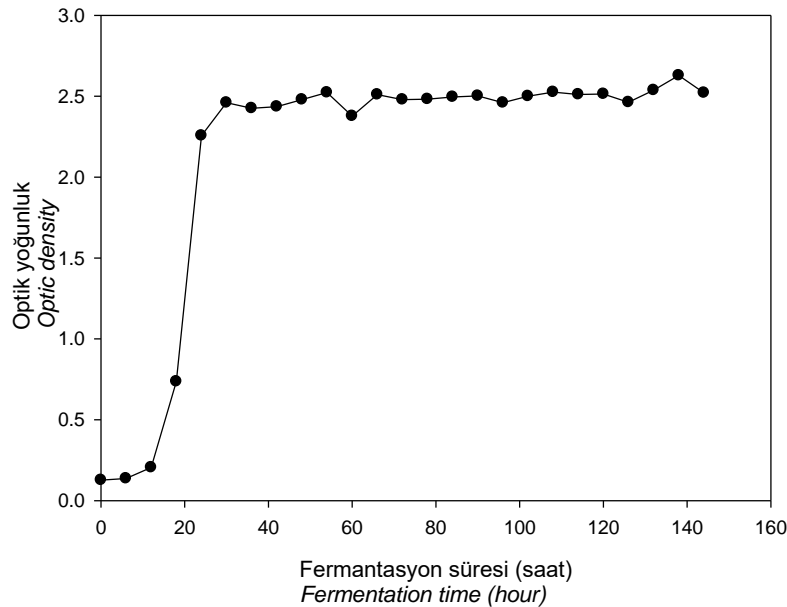
Analiz sonucunda oluşturulan modelin deneysel veriler ile uyumu varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. Model uygunluğunu sağlayabilmek için istatistiki olarak uygun olmayan parametreler modelden çıkarılmıştır. Uygun model seçimi uyum eksikliği (lack of fit) ( $P > 0.05$ ) ve  $R^2$  değerlerinden yararlanılarak sağlanmıştır. Optimum parametrelerin belirlenmesinde en yüksek düzeyde GABA üretiminin sağlandığı

koşul göz önüne alınmıştır. Oluşturulan deneme planı ve elde edilen deneysel veriler kullanılarak gerçekleştirilen modelleme sırasında, elde edilen yanıtların değerlendirilmesi ile gidilen optimizasyon işleminde, istenilirlik derecesi (D) hesaplanmıştır. Çalışma sonucunda doğrulama amacı ile elde edilen optimum parametreler kullanılarak tekrar GABA üretimine gidilmiştir.

## SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### Mikrobiyal Gelişim Eğrileri

*L. plantarum* EK148 suşunun GABA üretim düzeyini, gelişim kinetiğini ve pH etkileşimini belirlemek amacıyla MSG bulunan ortamdan yararlanılmıştır. Bu amaçla, 1 L hacminde hazırlanan MSG içeren MRS broth besiyerinde 30 °C'de 144 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sırasında 6 saatte bir alınan örneklerin spektrofotometrede (600 nm) ölçülen absorbans değerleri ile fermantasyon süresine karşı oluşturulan grafik Şekil 1'de verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere, EK148 suşu 6 saat olan lag fazından sonra log fazına geçmiştir. Bununla birlikte, EK148 suşunun 28 saat sonra durağan faza geçtiği görülmektedir.

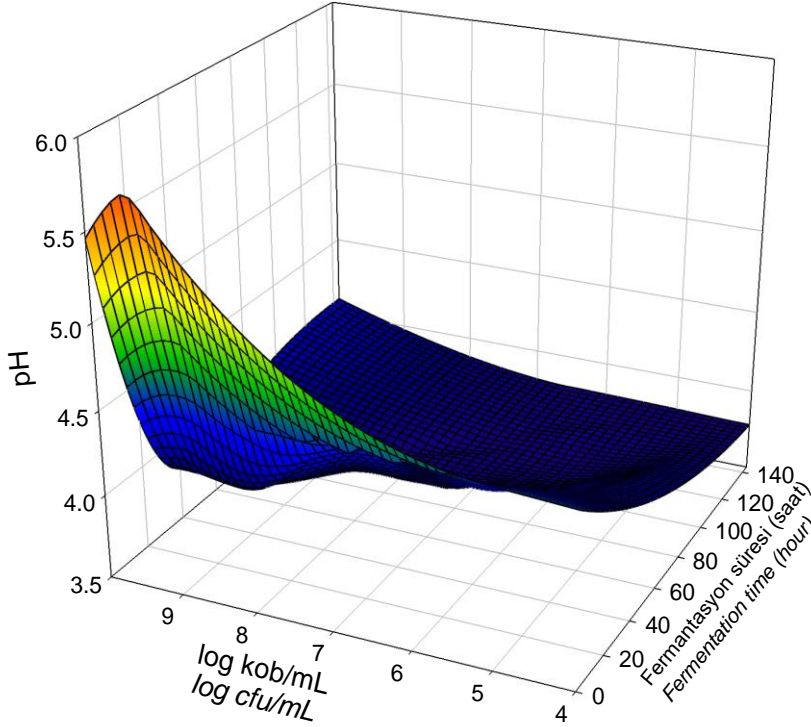


Şekil 1. *L. plantarum* EK148 suşuna ait gelişme eğrisi

Figure 1. Growth curve of *L. plantarum* EK148 strain

144 saat boyunca 6 saat aralıklarla alınan örneklerdeki pH, mikrobiyal sayım değişimini gösteren 3 boyutlu grafik Şekil 2’de verilmiştir. Zamanla mikroorganizma sayısının artışıyla pH’nın düştüğü, düşük pH’nın da

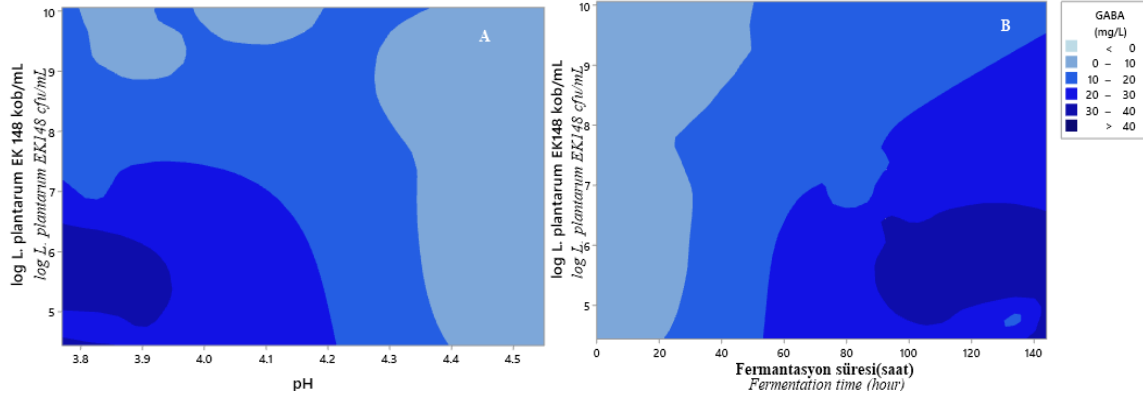
mikroorganizma sayısında azalmaya sebep olduğu görülmektedir. Besiyeri ortamında, biyokütlenin artmasıyla besin kaynaklarının tüketimi, organik asit üretimini de beraberinde getirmiştir. Bu da ortamda pH’nın azalmasını sağlamıştır.



Şekil 2. *L. plantarum* EK148 suşunun gelişim eğrisi (pH\*log kob/ml\*fermantasyon süresi)  
Figure 2. Growth curve of *L. plantarum* EK148 strain (pH\*log cfu/ml\*fermentation time)

GABA üretim düzeyi üzerine pH ve mikroorganizma sayısının etkisini gösteren grafik Şekil 3A’da verilmiştir. GABA üretiminin 40 mg/L’nin üzerinde olduğu koşullarda *L. plantarum* sayısının yaklaşık olarak 6 log birimdir. Besi ortamında *L. plantarum* sayısının 9 log kob/mL olduğu fermantasyon sürelerine rağmen, GABA üretimi ortamda *L. plantarum* sayısının 3 log birim azalması sonrasında maksimize olduğu görülmektedir. GABA üretiminin *L. plantarum* tarafından üretilen GAD enziminin ortamda bulunan glutamati dekarboksile etmesi ile sağlanmaktadır (Yogeswara vd., 2021). Ortam pH’sının GAD enziminin aktif olduğu pH düzeyine düşmesi ile optimum enzim aktivitesi sonucunda yüksek GABA üretiminin pH’nın 4’ün

altına indiğinde gerçekleştiği görülmektedir. Laktik asit bakterileri, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Cui vd., 2020) ve organik asit (Park vd., 2021) gibi maddeleri üreterek mikrobiyal gelişimi sınırlayabilmektedir. Gelişimin 60. saatinden sonra ortam pH değerinin 4’ün altında olmasının ve sınırlayıcı faktörlerin de etkisiyle *L. plantarum* sayısında azalma başladığı görülmektedir. Şekil 3B’ de yer alan kontur grafiğinde fermantasyon süresi arttıkça ortamda biriken GABA miktarının arttığı görülmektedir. Bununla birlikte GABA içeriğinin yüksek olduğu durumda ortamdaki canlı mikroorganizma sayısının 5 log birimin altında olduğu görülmektedir. 144 saat fermantasyon sonucunda GABA içeriğinin 40 mg/L nin üzerindedir.



Şekil 3. *L. plantarum* EK148 suşunun GABA üretiminin pH (A) ve fermantasyon süresi (B) ile etkileşimi  
Figure 3. The interaction of GABA production of *L. plantarum* EK148 strain with pH and viable cell number

### Deney tasarımı ve GABA üretiminin optimizasyonu

Çizelge 1’de yer alan deney tasarımındaki koşullar kullanılarak elde edilen örneklerin GABA analiz sonuçları Çizelge 3’te verilmiştir. Farklı denemeler ile bağımsız değişkenlerin GABA üretimi üzerine etkileri belirlenmiştir. 2. denemede, protein ekstraktı konsantrasyonunun %40, sıcaklığın 40 °C, pH 4, ve fermantasyon süresinin 144 saat olduğu koşulda, GABA üretimi tespit edilmezken, en yüksek GABA üretimi, protein ekstraktı konsantrasyonunun %25, sıcaklığın 35 °C, pH’nın 5 ve fermantasyon süresinin 96 saat olduğu koşulda 53.6768 mg GABA/L ve protein ekstraktı konsantrasyonunun %10, sıcaklığın 35 °C, pH’nın 5 ve fermantasyon süresinin 120 saat konsantrasyonda 48.85 mg/L GABA üretimi tespit edilmiştir. *L. plantarum* EK148 suşu ile MSG içeren ortamda (100mM) yaklaşık 40 mg/L GABA üretimi sağlanırken, protein izolatu ilave edilen ortamda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Çalışma kapsamında hedeflenen MSG içermeyen ortamda GABA üretiminin sağlanmış olduğu görülmektedir. Literatür tarandığında, MSG ilave edilmeden elde edilen fermente ürünlerdeki GABA miktarı MSG ilave edilen ürünlerdeki GABA miktarından daha az olmaktadır (Villegas vd., 2016). Ratanaburee vd. 2013, MSG ilave edilmeden üretilen Tai fermente domuz sosisi örneklerinde 220 mg/ kg GABA tespit ettikleri çalışmalarında, ortama %0.5 oranında MSG ilavesi ile GABA içeriğinin 828 mg/kg’a yükseldiğini bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada, Sanchart vd., 2017, fermente karides örneklerinde

%0.5 oranında MSG ilavesinin örneklerin GABA içeriğini 2040 mg/kg’dan 2570 mg/kg düzeyini yükselttiğini bildirmişlerdir. Fakat bu çalışmada glutamik asit kaynağı olarak görülen miyofibriller proteinlerin kullanılmasının sonuç üzerinde etkili olduğu görülmektedir.

Çizelge 4’te yer alan ANOVA ve RSM model istatistikleri değerlendirildiğinde, elde edilen kuadratik modelin iyi tahminleme düzeyine sahip olduğu görülmektedir. Elde edilen modelin regresyon katsayısı ( $R^2$ ), ayarlanmış regresyon katsayısı (adj  $R^2$ ) ve tahmini regresyon katsayısı (pre  $R^2$ ) değerleri yüksek olduğu gibi, sağladığı p-değeri de oldukça düşüktür. Bu modelin iyileştirilmesi amacı ile modelde yer alan parametrelerin “backward analizi” ile  $P > 0.1$  düzeyinde önemsiz olanlarının ayrıştırması sağlanmıştır. Model için regresyon katsayısı değerinin %70’in altında olması modelin yetersiz olduğu hakkında bilgi vermektedir (Granato vd., 2010). Bu çalışmada elde edilen modele ait regresyon katsayısı (0.904), ayarlanmış regresyon katsayısı (0.8625) ve tahminlenmiş regresyon katsayısı (0.7908) değerleri %70 üzerinde tespit edilmiştir. Bu çalışmada denklem yüksek regresyon katsayılarına sahip olup model ile deneysel verilerin model ile uyum sağladığı görülmüştür.

Ayrıca modelin uyum eksikliği (lack of fit) değeri önemsiz bulunmuştur ( $P > 0.05$ ). Modelin matematiksel formunun uygunsuzluğundan kaynaklanan hataya, model uygunsuzluğu (Lack of

fit) denilmekte ve model uygunluğu için, bu değerin önemsiz olması gerekmektedir (Box ve Draper, 2007). Bunun anlamı, protein ekstraktı konsantrasyonu, sıcaklık, pH değerı ve fermantasyon süresi *L. plantarum* EK148 suşuyla yapılan GABA üretimine etkilerinin oluşturulan model ile iyi bir şekilde açıklanıp

tahminlenebileceğidir. Optimizasyon sonrasında elde edilen 2. dereceden denklem izelge 5'te verilmiştir. Laktik asit bakterileri ile GABA üretiminin optimizasyonunda kuadratik modelin tercih edildiği çalışmalar oldukça yaygındır (Tajabadi vd., 2015; Zareian vd., 2013).

Çizelge 3. Cevap yüzey yönteminde kullanılan deneysel tasarımı ve yanıtı  
*Table 3. Experimental design and response used in the response surface method*

Deneme <i>Run</i>	X <sub>1</sub> *	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	Y <sub>1</sub>	Y <sub>1</sub> *
1	10	30	6	144	19.4412	28.8137
2	40	40	4	144	0.0000	3.6533
3	25	35	4	120	15.5273	19.1610
4	25	35	5	120	31.9584	32.5105
5	25	35	5	120	40.4055	32.5105
6	25	35	5	144	42.6884	45.6899
7	10	40	4	96	6.2856	12.0015
8	25	35	6	120	26.7139	21.2555
9	25	35	5	120	34.1653	32.5105
10	40	35	5	120	23.0112	25.8990
11	40	30	6	144	9.3289	7.5549
12	10	40	4	144	9.4011	8.8408
13	25	35	5	120	29.9593	32.5105
14	25	35	5	120	35.6397	32.5105
15	10	30	6	96	28.5053	31.9744
16	10	30	4	96	36.7521	29.8798
17	25	35	5	120	23.3636	32.5105
18	25	40	5	120	8.6529	6.4172
19	10	40	6	96	13.7104	14.0960
20	40	30	4	144	7.6237	5.4603
21	40	40	6	96	7.6145	8.9086
22	25	30	5	120	15.8488	16.2599
23	40	30	6	96	11.9277	10.7156
24	10	35	5	120	48.8538	39.1221
25	40	40	4	96	8.9901	6.8141
26	40	40	6	144	8.1233	5.7479
27	40	30	4	96	4.3990	8.6211
28	25	35	5	120	31.3204	32.5105
29	10	30	4	144	32.1721	26.7191
30	25	35	5	96	53.6768	48.8506
31	10	40	6	144	14.6367	10.9353

\*X<sub>1</sub>, protein ekstraktı konsantrasyonu (%); X<sub>2</sub>, sıcaklık (°C); X<sub>3</sub>, pH; X<sub>4</sub>, fermantasyon süresi (saat); Y<sub>1</sub>, GABA miktarı (mg/L); Y<sub>1</sub>\* Tahminlenen GABA miktarı (mg/L)

\*X<sub>1</sub>, protein extract concentration (%); X<sub>2</sub>, temperature (°C); X<sub>3</sub>, pH; X<sub>4</sub>, fermentation time (hours); Y<sub>1</sub>, amount of GABA (mg/L); Y<sub>1</sub>\* Estimated amount of GABA (mg/L)

Çizelge 4. GABA üretim miktarına ait RSM model istatistikleri ve ANOVA analizi  
 Table 4. RSM model statistics and ANOVA analysis of GABA production levels

Kaynak <i>Source</i>	Serbestlik derecesi <i>Degree of freedom</i>	Kareler toplamı <i>Sum of squares</i>	Kareler ortalaması <i>Mean square</i>	F-Değeri <i>F-value</i>	P-değeri <i>P-value</i>
Model	8	4808.23	601.03	23.74	0.000
Lineer	4	1239.63	309.91	12.24	0.000
X <sub>1</sub>	1	738.98	738.98	29.18	0.000
X <sub>2</sub>	1	435.95	435.95	17.22	0.000
X <sub>3</sub>	1	19.74	19.74	0.78	0.387
X <sub>4</sub>	1	44.96	44.96	1.78	0.197
Kareler <i>Squares</i>	3	3448.68	1149.56	45.40	0.000
X <sub>2</sub> * X <sub>2</sub>	1	1272.21	1272.21	50.24	0.000
X <sub>3</sub> * X <sub>3</sub>	1	429.54	429.54	16.96	0.000
X <sub>4</sub> * X <sub>4</sub>	1	618.29	618.29	24.42	0.000
İnteraksiyon <i>Interactions</i>	1	258.29	258.29	10.20	0.004
X <sub>1</sub> * X <sub>2</sub>	1	258.29	258.29	10.20	0.004
Hata <i>Error</i>	21	531.76	25.32		
Uyum eksikliği <i>Lack of fit</i>	15	365.08	24.34	0.88	0.614
Saf hata <i>Pure error</i>	6	166.67	27.78		
Toplam <i>Cor total</i>	29	5339.99			
		R <sup>2</sup>	Ayarlanmış R <sup>2</sup> <i>Adjusted R<sup>2</sup></i>	Tahminlenmiş R <sup>2</sup> <i>Predicted R<sup>2</sup></i>	
Model		%90.04	%86.25	%79.08	

\*X<sub>1</sub>, protein ekstraktı konsantrasyonu (%); X<sub>2</sub>, sıcaklık (°C); X<sub>3</sub>, pH; X<sub>4</sub>, fermantasyon süresi (saat); Y<sub>1</sub>, GABA miktarı (mg/L); Y<sub>1</sub>\*Tahminlenen GABA miktarı (mg/L)

\*X<sub>1</sub>, protein extract concentration (%); X<sub>2</sub>, temperature (°C); X<sub>3</sub>, pH; X<sub>4</sub>, fermentation time (hours); Y<sub>1</sub>, amount of GABA (mg/L); Y<sub>1</sub>\* Estimated amount of GABA (mg/L)

Çizelge 5. Farklı koşullar altında elde edilen GABA üretiminin regresyon denklemi  
 Table 5. Regression equation of GABA production obtained under different conditions

$$GABA (Y_1) = -848.5 - 2.316 X_1 + 56.96 X_2 + 124.1 X_3 - 6.22 X_4 - 0.847 X_2 * X_2 - 12.30 X_3 * X_3 + 0.02562 X_4 * X_4 + 0.0536 X_1 * X_2$$

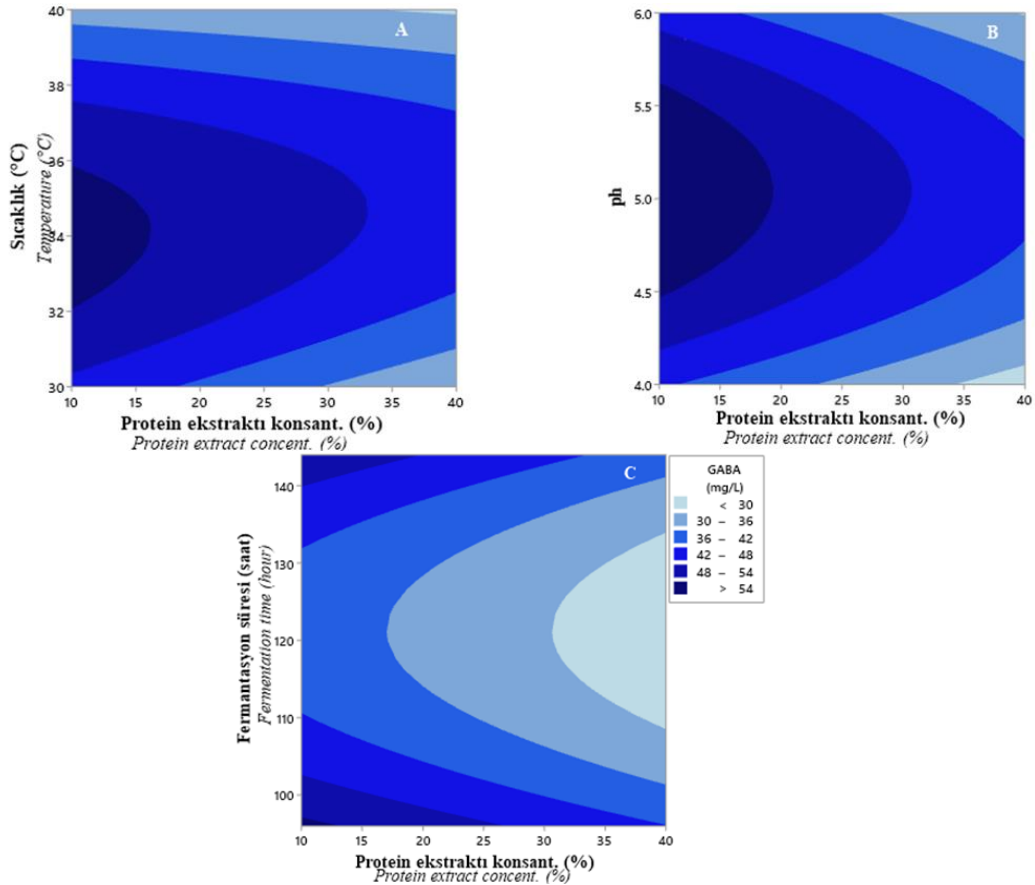
\*X<sub>1</sub>, protein ekstraktı konsantrasyonu (%); X<sub>2</sub>, sıcaklık (°C); X<sub>3</sub>, pH; X<sub>4</sub>, fermantasyon süresi (saat); Y<sub>1</sub>, GABA miktarı (mg/L); Y<sub>1</sub>\*Tahminlenen GABA miktarı (mg/L)

\*X<sub>1</sub>, protein extract concentration (%); X<sub>2</sub>, temperature (°C); X<sub>3</sub>, pH; X<sub>4</sub>, fermentation time (hours); Y<sub>1</sub>, amount of GABA (mg/L); Y<sub>1</sub>\* Estimated amount of GABA (mg/L)



Öncesinde, farklı koşullarda inkübe edilen örneklerin GABA içeriklerinin değerlendirildiği istatistikî veriler Çizelge 4'te verilmiştir. GABA üretim düzeyi üzerine en etkili değişkenlerin protein ekstraktı konsantrasyonu ve sıcaklık olduğu görülmektedir ( $P < 0.01$ ). Bunun yanında sıcaklık\*sıcaklık, süre\*süre, pH\*pH ve protein ekstraktı konsantrasyonu\*sıcaklık interaksiyonlarının da etkili olduğu görülmektedir ( $P < 0.01$ ). Protein ekstraktı konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve fermantasyon süresi ile GABA üretim düzeyi değişimi Şekil 4A-C'de verilmiştir. Şekil 4A'da görüldüğü üzere, yüksek sıcaklık ve yüksek protein ekstraktı konsantrasyonuna sahip örneklerin GABA içeriklerinin daha düşük olduğu görülmüştür. Bunun nedenlerinden biri substrat

olarak artan protein ekstraktı konsantrasyonu GABA üretimi üzerinde sınırlayıcı bir faktör olarak görülebilmektedir. Benzer şekilde, Park vd. (2020) rekombinant *Escherichia coli* suşu ile 500mM, Zhong vd., (2019) ise *Lactobacillus pentosus* SS6 izolatu ile %1 konsantrasyonun üzerinde MSG varlığında, GABA dönüşüm oranının azaldığını bildirmişlerdir. Yapılan ön denemeler ile *L. plantarum* EK148 izolatının 40 °C sıcaklıkta gelişim yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. Fakat yüksek sıcaklık varlığında GABA üretiminin azalmış olduğu Şekil 4A'da görülmektedir. Park vd. (2014), *L. plantarum* K154 ile yapmış oldukları çalışmalarında 40 °C' de iyi bir gelişim göstermesinde rağmen, GABA üretim miktarının 37 °C'ye göre azalmış olduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 4. Farklı deney koşullarında GABA üretim düzeyinin değişimi kontur grafikleri A) protein ekstraktı konsantrasyonu ve sıcaklık, B) protein ekstraktı konsantrasyonu ve pH, C) protein ekstraktı konsantrasyonu ve fermantasyon süresi

Figure 4. Contour plots of the variation of GABA production level under different experimental conditions a) protein extract concentration and temperature, b) protein extract concentration and pH, c) protein extract concentration and fermentation time

Şekil 4B'de ise pH ve protein ekstraktı konsantrasyonunun birlikte GABA üretim düzeyi üzerine etkisi görülmekte olup, GABA üretim düzeyinin, her iki değişkenin en yüksek olduğu durumlarda minimum düzeyde olduğu görülmektedir. pH'nın 5 olduğu koşullarda GABA üretiminin en yüksek olduğu görülmekte iken pH'nın 4.5'in altına inmesi GABA üretimini de azalttığı söylenebilir. Yapılan birçok çalışmada GABA üretiminde başlangıç pH'sının GABA üretimde etkili olduğunu belirtirken, GABA üretiminin genellikle yaklaşık pH 5'te iyi düzeyde olduğunu belirtilmiştir (Komatsuzaki vd., 2008; Tajabadi vd., 2015). Cataldo vd. (2020) başlangıç pH'sını 5.8-7.25 arasında ayarladıkları sistemde *L. brevis* CRL2013'ün etkilenmediğini fakat pH'nın 5.8'in altındaki değerlerde (pH 4) GABA seviyesinde keskin bir düşüş olduğunu tespit etmişlerdir. *L. brevis* AK19B ile elde edilen bu sonuç GABA üretiminin pH'ya bağlılığını ortaya koymaktadır. GABA üretiminde etkili olan GAD enzim aktivitesi üzerinde pH limitleyici olmaktadır (Ohmori vd., 2018; Shin vd., 2014). Bakteriyel aminoasit derboksilazlar ortamdaki H<sup>+</sup> iyonlarını kullanarak hücre dışında alkalileşmeyi sağlarken hücre içinde proton tüketimiyle, strese karşı koyabilmektedirler (De Biase vd., 1999).

Şekil 4C'de fermantasyon süresi ve protein ekstraktı konsantrasyonunun GABA üretim düzeyi üzerinde etkisi görülmektedir. En yüksek GABA üretimi diğer parametrelerde etkisi ile benzer şekilde protein ekstraktı konsantrasyonunun %20'in altında olduğu koşullarda sağlanırken, fermantasyon süresinin 96 saat olduğu koşullarda tespit edilmiştir. Fakat grafikte dikkat çeken diğer bir nokta ise 96 saatin üzerinde gerçekleştirilen fermantasyonlarda daha düşük GABA üretim düzeyi tespit edilirken, 144 saat fermantasyon süresinde tekrar yüksek GABA üretimi gözlenmektedir. GABA üretiminin laktik asit bakterilerinde 144 saate varabildiği bilinmektedir (Komatsuzaki vd., 2005). Laktobasillerde GABA üretiminde hücre içinde GABA'nın üretilip hücre dışına aktarıldığı yaklaşımı mevcuttur (Higuchi vd., 1997). Çalışmada tespit edilen 144 saatteki bu artışın sebebi olarak parçalanmış hücrelerden dolayı ortama salınan GABA miktarının bu değişimde etkili olduğu söylenebilir.

*L. plantarum* EK148 suşu ile GABA üretim koşullarının optimizasyonundan elde edilen model kullanılarak, üretim sonrası sağlanan verilerin uyumluluğu Şekil 5'te gösterilmektedir. Deneysel veriler ile tahmini verilere ait grafiğin R<sup>2</sup> (0.90) değeri 1'e oldukça yakındır. Bunun yanısıra yapılan bu optimizasyon çalışmasında, önerilen GABA üretimini maksimize etmek amacıyla tahmini optimum noktalardan %25 protein ekstraktı konsantrasyonu, 35 °C sıcaklık, pH 5, 96 saat fermantasyon süresi (D=0.91) olan üretim koşullarında GABA üretimi 49 mg/L olarak tahminlenmiştir. Optimum koşullarda yapılan üretim sonucunda 43mg/L GABA üretimi sağlanmıştır. Elde edilen bu sonuç deneysel ve tahmin edilen değerlerin uyum içinde olduğunu göstermektedir.

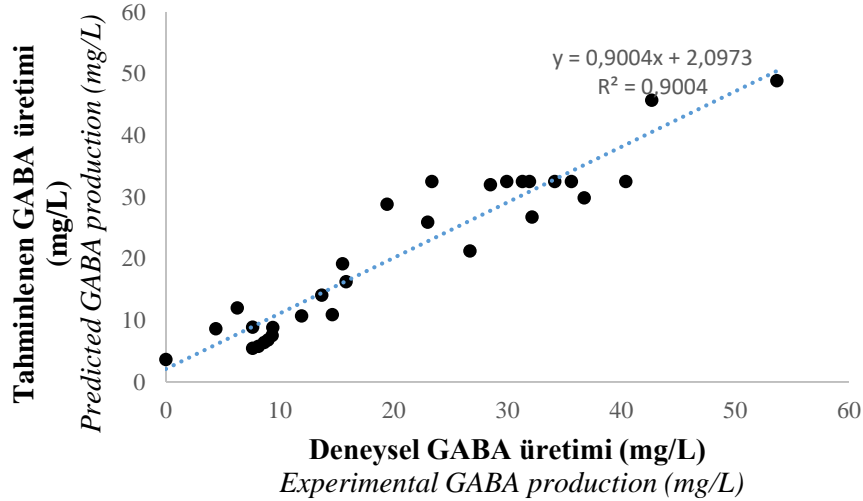
## SONUÇ

Sonuç olarak, çalışmada yerel *L. plantarum* suşu kullanılarak, MSG ilave edilmeyen bir ortam sağlanarak GABA üretiminin optimizasyonu planlanmıştır. Bu amaçla, daha önce GABA aktivitesine sahip *L. plantarum* suşu seçilerek en yüksek üretimi sağlayan suş ile optimizasyon çalışmasına gidilmiştir. Ayrıca *L. plantarum* EK148 suşunun 144 saat süresince 100 mM MSG bulunan MRS ortamında 6 saatlik aralıklarla pH, optik yoğunluk, canlı hücre sayısı ve GABA üretim düzeyi takip edilmiştir.

Deneysel tasarım oluşturmak için ön denemeler ile belirlenen faktör seviyeleri kullanılmıştır. *L. plantarum* EK148 suşunun protein izolatu (%10, %25, %45) içeren MRS ortamında, sıcaklık (30, 35 ve 40 °C), başlangıç pH değeri (4.0, 5.0 ve 6.0), fermantasyon süresi (96, 120 ve 144 saat) ve faktörleri esas alınarak oluşturulan deney tasarımı (Yanıt Yüzey Yöntemi) kullanılarak, optimum üretim koşulları belirlenmiştir. Optimizasyon çalışmasında elde edilen modelin, deneysel veriler ile uyumluluğu doğrulanmıştır. Elde edilen optimum koşullarda 49mg/L olarak tahminlenmiştir. Optimum koşullarda deneysel olarak 43mg/L GABA üretimi sağlanmıştır. Yapılan bu çalışma ile et miyofibriller proteinlerinin glutamik asit kaynağı olarak kullanımı sağlanmış ve MSG içermeyen ortamda *L. plantarum* EK148 suşu kullanılarak GABA

üretimi sağlanmıştır. Gelecekte, *L. plantarum* EK148 suşunun GABA üretim düzeylerinin optimize edildikleri koşullar dikkate alınarak biyoreaktörde üretim yapıp, fermentasyon

sıcaklığı, havalandırma hızı gibi faktörlerin de etkilerinin incelenerek daha fazla GABA üretimi hedeflenmektedir.



Şekil 5. *L. plantarum* EK148 suşunun GABA üretimin optimizasyon çalışması ile elde edilen modelin deneysel veriler ile uyumluluğu

Figure 5. Compatibility of the model obtained by optimization study of GABA production of *L. plantarum* EK148 strain with experimental data

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı TOVAG 1200877 proje numarası ile maddi olarak destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

Abdou, A. M., Higashiguchi, S., Horie, K., Kim, M., Hatta, H., Yokogoshi, H. (2006). Relaxation and immunity enhancement effects of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) administration in humans. *Biofactors*, 26(3): 201-208.

Adeghate, E., Ponery, A.S. (2002). GABA in the endocrine pancreas: cellular localization and function in normal and diabetic rats. *Tissue Cell*, 34:1-6.

Boonstra, E., de Kleijn, R., Colzato, L. S., Alkemade, A., Forstmann, B. U., Nieuwenhuis, S. (2015). Neurotransmitters as food supplements: the effects of GABA on brain and behavior. *Frontiers in psychology*, 6; 15-20.

Box, G. E., Draper, N. R. (2007). *Response surfaces, mixtures, and ridge analyses*. John Wiley & Sons, New Jersey, 856.

Cataldo, P. G., Villegas, J. M., Savoy de Giori, G., Saavedra, L., Hebert, E. M. (2020). Enhancement of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) production by *Lactobacillus brevis* CRL 2013 based on carbohydrate fermentation. *International journal of food microbiology*, 333: 108792. doi: [https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.\(2020\).108792](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.(2020).108792)

Coda, R., Rizzello, C. G., Gobbetti, M. (2010). Use of sourdough fermentation and pseudo-cereals and leguminous flours for the making of a functional bread enriched of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA). *International journal of food microbiology*, 137(2):236-245.

Cui, Y., Miao, K., Niyaphorn, S., Qu, X. (2020). Production of Gamma-Aminobutyric Acid from Lactic Acid Bacteria: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3): 995.

- Retrieved from <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/3/995>
- De Biase, D., Tramonti, A., Bossa, F., Visca, P. (1999). The response to stationary-phase stress conditions in *Escherichia coli*: role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system. *Molecular microbiology*, 32(6): 1198-1211.
- De Vries, M. C., Vaughan, E. E., Kleerebezem, M., & de Vos, W. M. (2006). *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, 16(9): 1018-1028.
- Dhakal, R., Bajpai, V. K., Baek, K. H. (2012). Production of GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid) by microorganisms: A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4): 1230-1241.
- Diana, M., Tres, A., Quílez, J., Llombart, M., Rafecas, M. (2014). Spanish cheese screening and selection of lactic acid bacteria with high gamma-aminobutyric acid production. *LWT-Food Science and Technology*, 56(2): 351-355.
- Granato, D., Ribeiro, J. C. B., Castro, I. A., Masson, M. L. (2010). Sensory evaluation and physicochemical optimisation of soy-based desserts using response surface methodology. *Food Chemistry*, 121(3):899-906.
- Higuchi, T., Hayashi, H., Abe, K. (1997). Exchange of glutamate and gamma-aminobutyrate in a *Lactobacillus* strain. *Journal of bacteriology*, 179(10): 3362-3364.
- Kalueff, A. V., Nutt, D. J. (2007). Role of GABA in anxiety and depression. *Depression and anxiety*, 24(7): 495-517.
- Komatsuzaki, N., Nakamura, T., Kimura, T., Shima, J. (2008). Characterization of glutamate decarboxylase from a high  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)-producer, *Lactobacillus paracasei*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 72(2): 278-285.
- Komatsuzaki, N., Shima, J., Kawamoto, S., Momose, H., Kimura, T. (2005). Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food microbiology*, 22(6): 497-504. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.01.002>
- Leroy, F., De Vuyst, L. (2001). Growth of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* strain CTC 494 in MRS broth is strongly reduced due to nutrient exhaustion: a nutrient depletion model for the growth of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10): 4407-4413.
- Leroy, F., De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2): 67-78.
- Li, W., Wei, M., Wu, J., Rui, X., Dong, M. (2016). Novel fermented chickpea milk with enhanced level of  $\gamma$ -aminobutyric acid and neuroprotective effect on PC12 cells. *PeerJ*, 4: e2292.
- Oh, S. H., Moon, Y. J., Oh, C. H. (2003).  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) content of selected uncooked foods. *Journal of Food Science and Nutrition*, 8(1): 75-78.
- Ohmori, T., Tahara, M., Ohshima, T. (2018). Mechanism of gamma-aminobutyric acid (GABA) production by a lactic acid bacterium in yogurt-sake. *Process Biochemistry*, 74: 21-27. doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.08.030>
- Park, J. Y., Park, Y.-L., Choi, T.-R., Kim, H. J., Song, H.-S., Han, Y.-H., . . . Bhatia, S. K. (2020). Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid from monosodium glutamate using *Escherichia coli* whole-cell biocatalysis with glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* KCTC 3498. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 37(12): 2225-2231.
- Park, K. B., Oh, S. H. (2007). Production of yogurt with enhanced levels of gamma-aminobutyric acid and valuable nutrients using lactic acid bacteria and germinated soybean extract. *Bioresource Technology*, 98(8): 1675-1679.
- Park, S. J., Kim, D. H., Kang, H. J., Shin, M., Yang, S.-Y., Yang, J., Jung, Y. H. (2021). Enhanced production of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) using *Lactobacillus plantarum* EJ(2014) with simple medium composition. *LWT*, 137: 110443. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110443>

- Park, S.-Y., Lee, J.-W., Lim, S.-D. (2014). The probiotic characteristics and GABA production of *Lactobacillus plantarum* K154 isolated from kimchi. *Food science and biotechnology*, 23(6): 1951-1957.
- Ratanaburee, A., Kantachote, D., Charernjiratrakul, W., Sukhoom, A. (2013). Enhancement of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in Nham (Thai fermented pork sausage) using starter cultures of *Lactobacillus namurensis* NH2 and *Pediococcus pentosaceus* HN8. *International Journal of food microbiology*, 167(2): 170-176.
- Sanchart, C., Rattanaporn, O., Haltrich, D., Phukpattaranont, P., Maneerat, S. (2017). Enhancement of gamma-aminobutyric acid (GABA) levels using an autochthonous *Lactobacillus futsaii* CS3 as starter culture in Thai fermented shrimp (Kung-Som). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(8): 152. doi: 10.1007/s11274-017-2317-3
- Satokari R.M., Vaughan E.E., Smidt H., Saarela M., Matto J., de Vos W.M. (2013). Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract. *SystApplMicrobiol*, 26:572–584.
- Shelp, B. J., Bown, A. W., McLean, M. D. (1999). Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends in plant science*, 4(11): 446-452.
- Shimada, M., Hasegawa, T., Nishimura, C., Kan, H., Kanno, T., Nakamura, T., Matsubayashi, T. (2009). Anti-hypertensive effect of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)-rich *Chlorella* on high-normal blood pressure and borderline hypertension in placebo-controlled double blind study. *Clinical and Experimental Hypertension*, 31(4): 342-354.
- Shin, S.-M., Kim, H., Joo, Y., Lee, S.-J., Lee, Y.-J., Lee, S. J., Lee, D.-W. (2014). Characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus plantarum* and its C-terminal function for the pH dependence of activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(50): 12186-12193.
- Siragusa, S., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C. G., Coda, R., Gobbetti, M. (2007). Synthesis of  $\gamma$ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. *Applied and environmental microbiology*, 73(22): 7283-7290.
- Sorrequieta, A., Ferraro, G., Boggio, S. B., Valle, E. M. (2010). Free amino acid production during tomato fruit ripening: a focus on L-glutamate. *Amino acids*, 38(5): 1523-1532.
- Tajabadi, N., Ebrahimpour, A., Baradaran, A., Rahim, R. A., Mahyudin, N. A., Manap, M. Y. A., vd. (2015). Optimization of  $\gamma$ -aminobutyric acid production by *Lactobacillus plantarum* Taj-Apis362 from honeybees. *Molecules*, 20(4): 6654-6669.
- Toldrá, F., Aristoy, M. C., Part, C., Cerveró, C., Rico, E., Motilva, M. J., Flores, J. 1992. Muscle and adipose tissue aminopeptidase activities in raw and dry-cured ham. *Journal of Food Science*, 57(4): 816-818.
- Tuberoso, C. I. G., Congiu, F., Serreli, G., Marni, S. (2015). Determination of dansylated amino acids and biogenic amines in Cannonau and Vermentino wines by HPLC-FLD. *Food chemistry*, 175: 29-35.
- Villegas, J. M., Brown, L., Savoy de Giori, G., Hebert, E. M. (2016). Optimization of batch culture conditions for GABA production by *Lactobacillus brevis* CRL 1942, isolated from quinoa sourdough. *LWT - Food Science and Technology*, 67: 22-26. doi: [https://doi.org/10.1016/j.lwt.\(2015\).11.027](https://doi.org/10.1016/j.lwt.(2015).11.027)
- Yogeswara, I. B. A., Kittibunchakul, S., Rahayu, E. S., Domig, K. J., Haltrich, D., Nguyen, T. H. (2021). Microbial Production and Enzymatic Biosynthesis of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid (GABA) Using *Lactobacillus plantarum* FNCC 260 Isolated from Indonesian Fermented Foods. *Processes*, 9(1): 22. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2227-9717/9/1/22>
- Zareian, M., Ebrahimpour, A., Mohamed, A. K. S., Saari, N. (2013). Modeling of glutamic acid production by *Lactobacillus plantarum* MNZ. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(4): 12-12.



## OZON UYGULAMASININ TAHIL VE ÜRÜNLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Çağla Kayışoğlu<sup>1\*</sup> Seçil Türksoy<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hitit Üniversitesi, Bilimsel Teknik Uygulama ve Araştırma Merkezi, Gıda Mühendisliği, Çorum, Türkiye

<sup>2</sup>Hitit Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği, Çorum, Türkiye

Geliş/Received 22.11.2022; / Kabul/Accepted: 10.02.2023 / Online baskı: Published online 23.02.2023

Kayışoğlu, Ç., Türksoy, S. (2023). Ozon uygulamasının tahıl ve ürünleri üzerindeki etkileri. GIDA (2023) 48 (2) 285-304 doi: 10.15237/ gida.GD22117

Kayışoğlu, Ç., Türksoy, S. (2023). The effect of ozone treatment on cereals and products. GIDA (2023) 48 (2) 285-304 doi: 10.15237/ gida.GD22117

### ÖZ

Ozon (O<sub>3</sub>), kimyasal ve mikrobiyal detoksifikasyon amacıyla gıda endüstrisinin farklı alanlarında (taze meyve ve sebzeler, süt ürünleri, meyve suyu işleme endüstrisi, tahıl ve tahıl ürünleri endüstrisi, suların sterilizasyonu ve ambalajlama teknolojisi) yaygın olarak kullanılan ve genellikle güvenli olarak kabul edilen (GRAS) kuvvetli bir oksidan bileşik olup yeşil teknoloji potansiyeline sahiptir. Ozon uygulaması ile gıdaların mikrobiyolojik kalitesi iyileştirilerek raf ömrü uzamakta, ayrıca gıdalardaki mikotoksinler etkili bir şekilde azaltılmakta veya tamamıyla elemine edilebilmektedir. Ayrıca uygulama parametrelerine bağlı olarak tahılın önemli makro ve mikro bileşenlerinden protein, nişasta, renk, mineral madde, biyoaktif bileşenler, yağ, asitlik ve çimlenme kabiliyeti üzerinde olumlu/olumsuz birtakım değişikliklere neden olmakta ve son ürün özelliklerini etkilemektedir. Bu derleme çalışmasının amacı ozonun uygulama parametrelerine bağlı olarak tahılda meydana getirdiği fiziksel, kimyasal, fizikokimyasal ve tekstürel özelliklerindeki değişikliklerin bazı literatür verileri ile açıklanmasıdır.

**Anahtar kelimeler:** Tahıllar, ozon, mikotoksin, nişasta, protein

## THE EFFECT OF OZONE TREATMENT ON CEREALS AND PRODUCTS

### ABSTRACT

Ozone (O<sub>3</sub>) is widely used and generally accepted as safe (GRAS) for chemical and microbial detoxification in different areas of the food industry (fresh fruits and vegetables, dairy products, juice processing industry, grain and cereal products industry, sterilization of water and packaging technology). It is also termed green technology. By ozone application, the microbiological quality of the food is improved, the shelf life is extended, mycotoxins in the food can also be effectively reduced or completely eliminated. Depending on the application parameters, it causes some changes on protein, starch, color, mineral substance, bioactive components, oil, acidity and germination ability, and affects the final product properties. The purpose of this review study is to explain the changes in the physical, chemical, physico-chemical and textural properties of the cereals depending on the application parameters of ozone with some literature data.

**Keywords:** Cereals, ozone, mycotoxin, starch, protein

\* Yazışmalarda sorumlu yazar/Corresponding author:

✉ caglakayisoglu@hitit.edu.tr

☎: (+90) 364 219 2886

☎: (+90) 364 219 2855

Çağla Kayışoğlu; ORCID no: 0000-0002-5235-7963

Seçil Türksoy; ORCID no: 0000-0001-5763-2744

## GİRİŞ

Ozon, Yunanca “ozein” sözcüğünden türetilmiş olup “koklamak” anlamına gelmektedir. Dünyayı çevreleyen atmosferdeki en önemli gazlardan biri olan ozon, biyolojik dengenin ve sürekliliğın sağlanmasında önemli rol oynamaktadır. Ozon gaz haldeyken mavi, sıvı haldeyken opak mavimsiyah renge sahiptir. Kaynama noktası  $-111.97\pm 0.3$  °C ve erime noktası  $-192.57\pm 0.4$  °C'dir. Literatürde ozon, suda kısmen çözünen ve keskin kokuya sahip tek doğal dezenfektan olarak adlandırılmaktadır (Botondi vd., 2021; Hatice Çatal ve Şenol İbanoğlu, 2012; Kaur vd., 2022; Muştı, 2020; Nada vd., 2022; Rangel vd., 2021; Sciorsci vd., 2020; Ünal ve Sel, 2019; F. Zhu, 2018).

Ozon 1840 yılında Christian Fredrick Schönbein tarafından keşfedilmiş olup ilk olarak 1903-1906 yılları arasında bitkiler için su arıtımında, 1940 yılında ise içme suyunun arıtılmasında kullanılmıştır. Avrupa'da gıdaların dezenfeksiyonunda ve işlenmesinde ozon kullanımı uzun senelere dayanmakta olup 1997 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA; Food and Drug Administration) tarafından *güvenli gıda* (GRAS; Generally Recognised As Safe) olarak kabul edilmiş, 2001 yılında ise kullanımına yasal olarak izin verilmiştir. Güçlü bir oksidan olan ozon diğer oksidasyon sistemleriyle karşılaştırıldığında maliyeti yüksek bir sistemdir (Yıldız ve Yangınlar, 2014). Gıda endüstrisinin farklı alanlarında (meyve ve sebze endüstrisi, kırmızı, beyaz et ve balık endüstrisi, tahıl ve tahıl ürünleri endüstrisi, süt ve süt ürünleri, suların sterilizasyonu ve ambalajlama teknolojisi) mikrobiyel yükün azaltılması, mikotoksinlerin dekontaminasyonu ve güvenli ambalajlama amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Bai ve Zhou, 2021; Botondi vd., 2021; Epelle vd., 2022; Kaur vd., 2022; Mayookha vd., 2023; Nickhil vd., 2021; Niveditha vd., 2021; Phan vd., 2022; Qian vd., 2022; Savi vd., 2020; Sivaranjani vd., 2021; Suman, 2021; Tabla ve Roa, 2022; Violleau vd., 2012; Zhang vd., 2022).

Bu derleme çalışması kapsamında, tarladan ürüne tahılların işlenmesi sürecinde farklı aşamalarda ozon uygulamasının hammadde ve son ürünün

kimyasal bileşimi, öğütme özellikleri ve son ürün kalitesi üzerine etkileri hakkında güncel bilimsel veriler derlenmeye çalışılmıştır.

## OZON UYGULAMASININ TANENİN ÖĞÜTME ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Öğütme öncesinde buğday tanelerine yapılan ozon uygulanmasının kırma ve redüksiyon valslerinde gerekli olan enerji miktarını azalttığı ifade edilmektedir. Öğütme öncesi ozon uygulamasının kaba kepek ve zedelenmiş nişasta miktarını azaltırken, ince kepek ve çözünmez özellikteki glutenin polimer protein miktarlarını arttırdığı da belirtilmektedir (Desvignes vd., 2008; Zhu, 2018). Desvignes (2008), yapmış oldukları çalışmada buğdayın tane sertliğine bağlı kalmaksızın, ozon uygulamasının kırma valslerindeki enerjiyi %10-20 oranında azalttığı bildirilmiştir. Ozonlama işleminin unun ekstraksiyon verimi (kepek-endosperm ayrışma oranı) üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada ozonlama (10-60 mg/L, 2-5 saat) ile ekstraksiyon oranının değişmediği tespit edilmiştir (Trombete vd., 2016; Vanier vd., 2017). Farklı tahıl tanelerine (buğday ve mısır) ozon uygulamasının (50 mg/kg, 30 gün) öğütme performansı üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada tahıl ve unun kül, protein ve un veriminde önemli değişiklikler olmadığı dolayısıyla öğütme performansı üzerinde ozon uygulamasının (50 mg/kg) etkili olmadığı bildirilmiştir. (Mendez, 2003).

## OZON UYGULAMASININ MİKROBİYOLOJİK KALİTE İLE UN BİLEŞENLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

### Mikotoksinler ve Patojenler Üzerine Etkisi

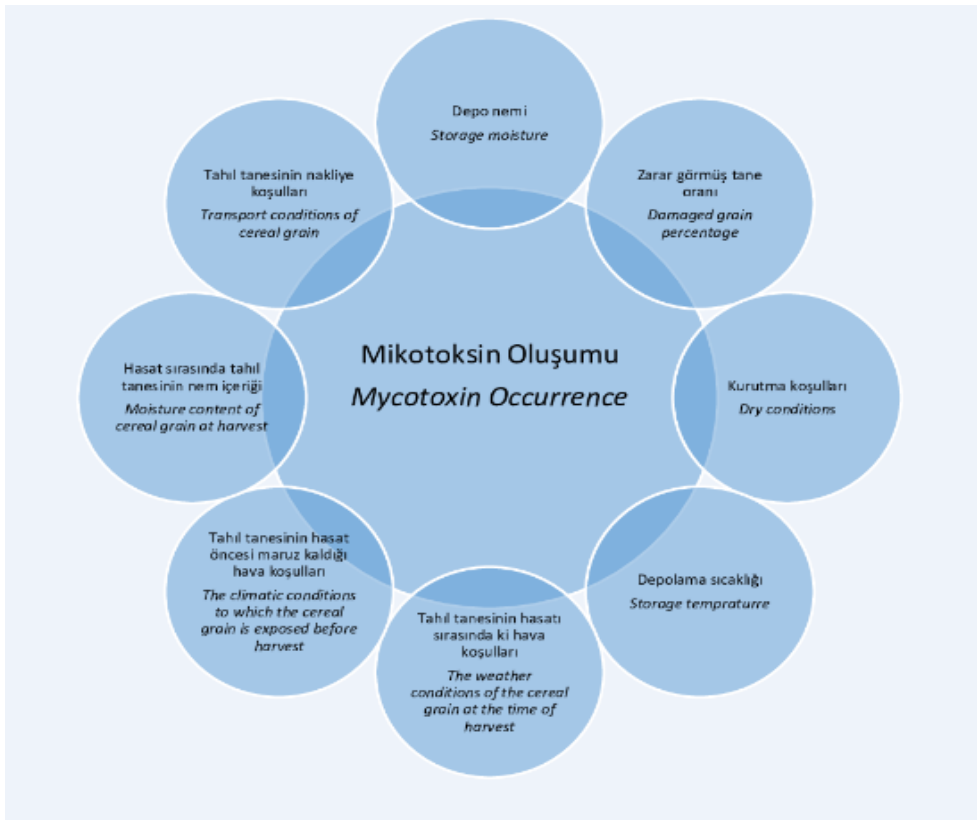
“Güvenli gıda” kavramının önem kazanması ve bu konuda tüketicilerin bilinçlenmesi ile kimyasal koruyucu içermeyen veya az işlem görmüş doğal ve güvenilir gıdaya olan ilgi her geçen gün artmaktadır. Bu durum gıda endüstrisinde kimyasal ajanlara karşı yenilikçi teknolojilere yönelimi de beraberinde getirmiştir. Gıda endüstrisinde özellikle mikrobiyal güvenliği sağlamak için yaygın olarak kullanılan klorinin, izin verilen konsantrasyonlarda sınırlı seviyede etki mekanizmasına sahip olması, gıdaya uygulandığında insan sağlığı için zararlı maddelere



(trihalometanlar) dönüşmesi ve gıdada kalıntı bırakması gibi gıda güvenliği açısından birtakım dezavantajları bulunmaktadır. Bu endişe çevre dostu ve gıda prosesine uygun, insan sağlığı açısından kalıntı bırakmayan, oksitleme gücü klorinden çok daha fazla (1.5 kat) ve mikroorganizmalar üzerinde geniş etki mekanizmasına sahip olan ozon uygulamasının ilgiyi artırmıştır (Afsah-Hejri vd., 2020; Chhem-

Kieth vd., 2022; Elgün ve Bilgiçli, 2019; Qasim vd., 2022; Sivaranjani vd., 2021).

Tahıllar hasat öncesi ve sonrası uygun olmayan koşullar altında (Şekil 1) kontamine olabilmekte, özellikle uygun olmayan sıcaklık, nem vb depolama koşullarında depo zararlısı ve böcek gelişimi ile küf gelişimine bağlı mikotoksin oluşumu gözlenebilmektedir (Hamad vd., 2023; Ingegno ve Tavella, 2022; Mir vd., 2021).



Şekil 1: Tahıl tanesinin tedarik zincirinde mikotoksin oluşumunu etkileyen faktörler (Mir vd., 2021)

Figure 1: Factors affecting mycotoxin formation in the cereal grain supply chain (Mir et al., 2021)

Ozon uygulamasının depolanmış tahıl böcekleri (*Tribolium castaneum*, *Rhizopertha dominica*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Sitophilus oryzae* ve *Ephestia elutella*) ile bakteriler (*Bacillus*, *Koliform*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* ve *Serratia*) ve çeşitli küfler (*Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium*) üzerine inhibe edici etkisi bulunmaktadır (Afsah-Hejri vd., 2020; Chakka vd., 2021; Lillo vd., 2022; Mir vd., 2021, 2022; Nickhil vd., 2021; Sivaranjani vd., 2021; Suman, 2021). Mikroorganizmalar üzerindeki bu inhibe edici etkisi hücre

membranındaki lipoprotein ve glikoprotein yapısında yer alan C=C çift bağlarının oksitlemesi ile gerçekleşmektedir (Afsah-Hejri vd., 2020; Alegbeleye vd., 2022; Chakka vd., 2021; Lillo vd., 2022; Mir vd., 2021, 2022; Nickhil vd., 2021; Sivaranjani vd., 2021; Suman, 2021; Tiwari vd., 2010). Özellikle tahıl tanesinde *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* küflerinin ikincil metabolit ürünleri olan Aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), Aflatoksin B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), Aflatoksin G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>), Aflatoksin G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>), Oksatoksin A, Zearalenon (ZON),



Nivalenol (NIV) ve Deoksinivalenol (DON) mikotoksinlerinin inaktivasyonu için gerekli ozon uygulamasında oksidasyonun etkisi konstrasyon,

süre ve mikotoksin türüne göre değişiklik göstermektedir (Çizelge 1).

Çizelge 1: Ozon uygulamasının tahılların mikotoksin detoksifikasyonu üzerine etkisi (Mir vd., 2022; Sivaranjani vd., 2021)

Table 1: Effect of ozone application on mycotoxin detoxification of grains (Mir et al., 2022; Sivaranjani et al., 2021)

Mikotoksin türü <i>Mycotoxin type</i>	Ozon uygulama <i>Ozone application</i>	Tahıl <i>Cereals</i>	Mikotoksinlerin azalma oranı (%) <i>Reduction percentage of mycotoxin (%)</i>
Deoksinivalenol	Ozon gazı konsantrasyonu 60 mg/L, maruz kalma süresi 300 dakika <i>Ozone gas concentration 60 mg/L, exposure time 300 minutes</i>	Buğday <i>Wheat</i>	64.3
AFB <sub>1</sub>	Ozon gazı konsantrasyonu 60 µmol/mol, maruz kalma süresi 180 dakika <i>Ozone gas concentration 60 µmole/mole, exposure time 180 minutes</i>	Buğday <i>Wheat</i>	94.6
AFB <sub>2</sub>	Ozon gazı konsantrasyonu 60 µmol/mol, maruz kalma süresi 180 dakika <i>Ozone gas concentration 60 µmole/mole, exposure time 180 minutes</i>	Buğday <i>Wheat</i>	84.5
AFG <sub>1</sub>	Ozon gazı konsantrasyonu 60 µmol/mol, maruz kalma süresi 180 dakika <i>Ozone gas concentration 60 µmole/mole, exposure time 180 minutes</i>	Buğday <i>Wheat</i>	80
AFG <sub>2</sub>	Ozon gazı konsantrasyonu 60 µmol/mol, maruz kalma süresi 180 dakika <i>Ozone gas concentration 60 µmole/mole, exposure time 180 minutes</i>	Buğday <i>Wheat</i>	81
Deoksinivalenol	Ozon gazı konsantrasyonu 60 µmole/mole, maruz kalma süresi 120 dakika <i>Ozone gas concentration 60 µmole/mole, exposure time 120 minutes</i>	Buğday <i>Wheat</i>	100
Fusarium	Ozon gazı konsantrasyonu 11 ve 26 mg/g, maruz kalma süresi 15 dakika <i>Ozone gas concentration 11 and 26 mg/g, exposure time 15 minutes</i>	Arpa <i>Barley</i>	36
AFB <sub>1</sub>	Ozon gazı konsantrasyonu 40-90/L, maruz kalma süresi 5-40 dakika <i>Ozone gas concentration 40-90/L, exposure time 5-40 minutes</i>	Mısır <i>Corn</i>	88
AFB <sub>1</sub>	Ozon gazı konsantrasyonu 20-40/L, maruz kalma süresi 5-40 dakika <i>Ozone gas concentration 20-40/L, exposure time 5-40 minutes</i>	Buğday <i>Wheat</i>	97

Tahıl tanesinde oluşan mikotoksinlerin, tanede hem nicelik açısından hem de kalite (çimlenme kabiliyetinin azalması, serbest yağ asidi artışı, nişastanın modifikasyonu, proteinlerin denatüre olması gibi) açısından ortalama %25-30 arasında değer kaybına neden olduğu, ayrıca insan sağlığı açısından kanserojen, teratojenik ve immünoşpresif problemleri de beraberinde getirdiği bildirilmiştir (Arda vd., 2021; da Luz vd., 2022; Hashemi Moosavi vd., 2021; Nada vd., 2022; Sirohi vd., 2021; Ünüsan, 2019). Kumar vd., (2022) farklı tahıl çeşitlerinde (pirinç, buğday ve mısır) bu kaybın en fazla buğdayda en az mısırdada olduğunu, Zhu vd., (2022) ise yine aynı tahıl çeşitleri için bu kaybın en fazla pirinç en az buğdayda olduğunu ve bu kayıpların %55'inin depolama sırasında meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Dolayısı ile hasattan sonra uzun süre depolanan tahıl tanelerinin (buğday, pirinç, mısır, arpa, çavdar, yulaf, darı ve sorgum) depolama koşullarına (sıcaklık ve bağıl nem) bağlı olarak depolama süresi boyunca nicelik ve nitelik bakımından değer kaybına uğramaması için depolama süre, sıcaklık ve bağıl nemine ek olarak düzenli aralıklarda fumigasyon işlemine tabi tutulması gerekmektedir (Gavahian vd., 2021). Fumigasyon işlemi için kullanılan pestisitler genellikle alüminyum fosfit, metil bromür ve fosfin içermektedir. Ancak kullanılan bu kimyasal ajanların hem çevre hem de insan sağlığı için birtakım problemlere yol açtığı ve bu problemlerin küresel hale geldiği bilinmektedir (Sirohi vd., 2021). Bilimsel çalışmalar bu zararı indirgemek için termal olmayan çevre dostu güçlü bir oksidan olan ozon teknolojisinin kimyasal fumigantlara alternatif bir çözüm olduğunu belirtmektedir (Gavahian vd., 2021; Hashemi Moosavi vd., 2021; Nickhil vd., 2021; Sirohi vd., 2021).

Ozon oksidasyonunun tahıl ve ürünlerinin toplam mikroorganizma sayısı ve mikotoksin oranı üzerine etkisi birçok faktöre (mikroorganizmanın türüne, uygulanan tahılın nem içeriğine, ozonun konsantrasyonuna, uygulanma süresine ve sıcaklık) bağlı olarak değişmektedir (Hu vd., 2020). Ozon uygulama süresinin toplam

mikroorganizma sayısı üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada buğday ununa farklı sürelerde (5, 10, 15, 20, 30 dakika) ozon gazı uygulaması ile oksidasyon süresinin artmasına karşı toplam mikroorganizma sayısında önem düzeyinde azalma olmadığı, bunun ise tanedeki nişasta ve proteinin ozon oksidasyonuna karşı sterilizasyon etkisini azaltmasından kaynaklandığı bildirilmiştir (Li vd., 2013). Çalışmada ayrıca ozonlanıp (15 dakika) depolanmış (4 gün) buğday tanesinin toplam mikroorganizma içeriğinde %18 oranda bir azalma olduğu tespit edilmiştir (Li vd., 2013). Çatal ve İbanoglu (2012) ise uygulanan nişasta çeşidine bağlı kalmaksızın (patates, buğday, mısır ve pirinç nişastası) toplam bakteri sayısının, ozonlama işlemiyle (60 g/h, 1 saat) pH değerinin azalmasına paralel olarak tüm nişasta tiplerinde önem düzeyinde azaldığını (buğday nişastası için %40, mısır nişastası için %44, patates nişastası için %60 ve pirinç nişastası için %56 oranında) belirlemişlerdir. Ozon oksidasyonunun etkinliğinin uygulama süresine bağlı olarak değiştiği çalışmada farklı sürelerde (20 ve 60 dakika) ozon uygulaması ile Zearelenon (ZEN) miktarında sırasıyla %60.2 ve %62.3 oranında azalma olduğu saptanmıştır (Pandiselvam vd., 2022).

Uygulama yapılacak olan tahıl tanesinin nem miktarı ozon oksidasyonu için önem arz eden parametrelerden bir diğeri olup tanedeki nem miktarının artışı ile reaktif iyon oluşumunun fazlalaşması oksidasyonun etkisini arttırmaktadır. Sivaranjani vd. (2021) yapmış olduğu çalışmada iki farklı nem içeriğine (%12.4 ve %14.2) sahip pirincin *Rhizopertha Dominica* mortalitesi için gerekli olan sürenin, nemli tahıl tanesinde ozonun difüzyonunun daha yavaş olmasından dolayı daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada ise ozon oksidasyonu sonucunda (90 mg/L ozon, 40 dakika) farklı nem içeriğine (%20.37 ve %13.47) sahip mısırdada AFB<sub>1</sub> oranındaki azalmanın nem içeriği düşük olan örnekte daha fazla (%88.1) olduğu bildirilmiştir (Guo vd., 2021). Dolayısıyla ozon oksidasyonunun nem ve tahıl çeşidine bağlı olarak da değişiklik gösterdiği ve uygulanan yöntemin standardize edilmesi gerektiği çalışmalarda çıkarılabilecek bulgular arasındadır.

Dekontamine edilecek olan mikotoksin türü de ozon uygulamasının etkinliği için önem taşımaktadır. Örneğin, yapılarında çift bağ içermeyen AFB<sub>2</sub> ve AFG<sub>2</sub> mikotoksinleri daha reaktif olup, ozon oksidasyonuna karşı daha dirençlidirler (Sivaranjani vd., 2021). Yapılan bir çalışmada buğday tanesine 180 dk süre ile 60 µmol/mol konsantrasyonda ozon uygulamasının AFB<sub>1</sub> ve AFB<sub>2</sub> miktarlarını %94.6 ve % 84.5 oranlarında azalttığı, bu değerlerin AFG<sub>1</sub> ve AFG<sub>2</sub> için sırasıyla %80 ve %81 olarak bulunduğu rapor edilmiştir (Çizelge 1).

### Un Bileşenleri Üzerine Etkisi

#### *Nişasta*

Tahılların temel bileşeni olan nişasta son ürün özelliklerinin belirlenmesinde kritik öneme sahiptir (Raghunathan vd., 2021; Zhu, 2018). Endüstriyel alanda oldukça geniş kullanım alanına (gıda, kâğıt, kozmetik, ilaç ve tekstil) sahip olan nişastanın doğrudan kullanımını sınırlandıran birtakım faktörler (yüksek termal kararlılık, yüksek retrogradasyon vb.) bulunmaktadır (Castanha vd., 2020; Maniglia vd., 2021; Ojogbo vd., 2020; Özaslan ve İbanoğlu, 2022; Pandiselvam vd., 2022). Bu nedenle doğal nişasta fiziksel, kimyasal veya enzimatik yollarla birtakım modifikasyonlara tabi tutulmaktadır (Hu vd., 2022; Lima vd., 2021; Raghunathan vd., 2021). Nişastanın modifikasyonunda genellikle sodyum hipoklorit, amonyum persülfat ve hidrojen peroksit kullanılmakta olup kullanılan bu kimyasal ajanlar gıda üzerinde birtakım kalıntılar bırakarak hem gıda güvenliğinde problemlere yol açmakta hem de atık işlemede verimsizliğe neden olmaktadır (Raghunathan vd., 2021). Ozon uygulaması düşük saflaştırma maliyeti gerektirmesi, atık su oluşturmaması, oda sıcaklığında dahil uygulanabilmesi, gıdaya uygulandığında kalıntı bırakmaması gibi avantajlarından ötürü nişastanın modifikasyonunda kimyasal oksidanlara karşı tercih edilmesi gereken “çevre dostu” bir yöntemdir (Hu vd., 2022; Maniglia vd., 2021; Zhang vd., 2022).

Teknolojik olarak ozon ile oksidasyon, nişastaya yüksek konsantrasyonlarda dahi düşük viskozite değeri, yüksek stabilite, şişme gücü kabiliyeti, iyi film oluşturma, retrogradasyon eğiliminde azalma

ve yapışkanlık gibi özellikler kazandırabilmektedir. Oksitlenmiş nişasta gıda endüstrisinde stabilizatör, emülgatör, yağ ikame edici olarak geniş bir kullanım alanına sahiptir (Chan vd., 2011; Çatal ve İbanoğlu, 2014; Devu vd., 2022; Lima vd., 2021; Sandhu vd., 2012). Nişastanın oksidasyonunda iki önemli reaksiyon rol oynamaktadır. Bunlardan biri nişasta molekülündeki hidroksil gruplarının (C-2,C-3,C-6'daki –OH) karbonil ve karboksil gruplarına okside olması, bir diğeri ise  $\alpha$ -(1→4) glikozidik bağın parçalaması ile nişastanın amorf ve kristal bölgede depolimerizasyonudur (Ashogbon, 2021; Chan vd., 2011; Çatal ve İbanoğlu, 2014; Hu vd., 2022).

Ozon oksidasyonu ile birlikte tahıl nişastasındaki karboksil grubu sayısının artmasına bağlı olarak pH değerinin düştüğu, şişme gücünün arttığı ve yapıştırma özelliklerinin değiştiği, akış davranış indeksinin değişip Non-newtonyel akış tipi gösterdiği, retrograde olma eğiliminde azalma olduğu literatür verileri ile desteklenmektedir (Çizelge 2) (Chan vd., 2011; Chittrakorn vd., 2014, 2014; Çatal ve İbanoğlu, 2014; Lima vd., 2021; Pandiselvam vd., 2022).

Ozon uygulaması ile nişasta molekülünde meydana gelen değişiklikler oksidasyon süresinin artmasına bağlı olarak matris içindeki amiloz miktarına, amiloz/amilopektin oranına, karbonil ve karboksil gruplarının oksidasyon hızına bağlı olarak nişasta tipleri arasında farklılık göstermektedir (Chan vd., 2011). Yapılan bir çalışmada karbonil içeriği fazla olan tapyoka nişastasının mısır ve sago nişastasına göre ozon oksidasyonundan daha fazla etkilendiği belirlenmiş olup bu bilgiyi destekler niteliktedir (Chan vd., 2011). Nişasta çeşitinin (pirinç, mısır, buğday ve patates) ozon uygulaması (60g/sa, 1 saat) üzerine etkisinin incelediği başka bir çalışmada ise mısır ve patates nişastasının daha büyük morfolojiye sahip olması dolayısıyla ozonun taneye difüzyonunun ve tane içerisindeki penetrasyonunun daha kolay olması, ozon oksidasyonundan en fazla etkilenen nişasta çeşiti konumuna getirmiştir (Çatal ve İbanoğlu, 2012).

Çizelge 2: Ozon uygulamasının nişasta çeşitleri üzerine etkisi (Raghunathan vd., 2021; Sivaranjani vd., 2021)

Table 2: Effect of ozone application on starch varieties (Raghunathan et al., 2021; Sivaranjani et al., 2021)

Nişasta kaynağı <i>Starch source</i>	Ozon akış hızı <i>Ozone flow rate</i>	Ozon uygulama süresi <i>Ozone application time</i>	Ozon oksidasyon sonuçları <i>Ozone oxidation results</i>
Mısır <i>Corn</i>	1L/dk <i>1 L/minute</i>	15 ve 30 dk <i>15 and 30 minute</i>	Jel gücü arttı (%10.7) <i>Gel strength increased (%10.7)</i>
Buğday <i>Wheat</i>	3.3 L/dk <i>3.3 L/minute</i>	0.5, 1, 1.5 ve 2 s <i>0.5, 1, 1.5 ve 2 hour</i>	Düşme sayısı gelişti ve unun beyazlığı arttı. <i>The falling number improved and the whiteness of the flour increased.</i>
Pirinç <i>Rice</i>	0.06 L/dk <i>0.06 L/minute</i>	0.5, 1 ve 2 s <i>0.5, 1 and 2 hour</i>	Yapıştırma viskozitesi arttı. <i>The adhesive viscosity increased.</i>
Buğday <i>Wheat</i>	5 g/s <i>5 g/second</i>	60 dk <i>60 minute</i>	Şişme gücü arttı Tepe ve son viskozite değerleri arttı <i>Inflatable power increased</i> <i>Peak and final viscosity values increased</i>
Mısır <i>Corn</i>	4.2 mg mol/ L <i>4.2 mg mole/ L</i>	60 dk <i>60 minute</i>	Jeletinleşme sıcaklığı arttı Jelatinleşme entalpi değeri azaldı Yapıştırma sıcaklığı arttı Tepe ve son viskozite değerleri azaldı <i>Gelatinization temperature increased</i> <i>Gelatinization enthalpy value decreased</i> <i>Bonding temperature increased</i> <i>Peak and final viscosity values decreased</i>
Pirinç <i>Rice</i>	0.06 L/dk <i>0.06 L/minute</i>	2 s <i>2 hour</i>	Tepe ve son viskozite değerleri azaldı Karbonil ve karboksil içeriği arttırır <i>Peak and final viscosity values decreased</i> <i>Increases carbonyl and carboxyl content</i>

Nişasta çeşidine bağlı kalmaksızın ozon oksidasyonunun tüm nişasta çeşitlerinde artan kayma gerilimi değerlerinde viskozitede azalmaya neden olduğu (Non-Newtonien, shear thinning) belirtilmiştir. Farklı nişasta tiplerine (mısır ve tapyoka) ozon gazı uygulanmasıyla artan uygulama süresine bağlı olarak amorf bölgede meydana gelen amiloz fraksiyonunun depolimerizasyonuna bağlı olarak shear-thinning akış tipine geçildiği, kıvam katsayısının (K) ve

viskozite değerlerinde artış olduğu literatürde mevcuttur (Chan vd., 2011). Ozon uygulamasının nişastanın viskozite değeri üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, buğday nişastasına farklı sürelerde ozon uygulamasıyla (15, 30, 60 dk; 0.00042 g ozon/100g su) moleküldeki glikozidik bağların kısmi bölünmesinden dolayı tepe viskozitesi değerinin uygulama süresi arttıkça %98 oranında azaldığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada ayrıca granüldeki hidroksil gruplarının yerini

oksidasyonla karboksil gruplarının almasından dolayı retrogradasyon entalpi değerinin % 98 azaldığı (Çatal ve İbanoğlu, 2014). Viskozite değerindeki azalmaya paralel olarak ozon oksidasyon süresinin artmasıyla kıvam katsayısı (K) değerini de %18 oranında azaldığı bildirilmiştir (Çatal ve İbanoğlu, 2014). İlaveten nişastanın ozonlama süresi arttıkça jeletanize olma eğiliminin de %67 oranında arttığı belirlenmiştir. Ozon oksidasyonunun nişastanın viskozite değeri üzerindeki etkisinin incelendiği başka bir çalışmada ise buğday ununa farklı sürelerde uygulanan ozon gazı (0.06 L ozon/dk, 5-25 dk) stabilitesinin bundan olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir (Chittrakorn vd., 2014).

Nişasta şişme gücü kabiliyetinin artışının oksidasyonla oluşan hidrofilik karboksil gruplarının (-COOH) amiloz-amilopektinin hidroksil gruplarıyla güçlü bir hidrojen bağı kurmasıyla yapıda daha fazla su tutabilen bir ağın oluşmasından kaynaklanmaktadır (Sandhu vd., 2012). Yapılan bir çalışmada buğday nişastasına ozon uygulamasıyla (2.5 L/dk, 45 ve 30 dk) nişastanın şişme kabiliyetinin %1 oranına arttığı tespit edilmiş olup bu bilgiyi destekler niteliktedir (Sandhu vd., 2012). Nişastanın şişme kapasitesinin belirlendiği başka bir çalışmada ise oksidasyonla şişme kapasitesinde artışın %3 oranında olduğu belirlenmiştir (Hu vd., 2020).

Ozon oksidasyonu ile nişastanın kimyasal yapısında meydana gelen bu modifikasyonlar nişastanın morfolojik görüntüsü üzerinde çok az değişikliğe neden olmaktadır (Lima vd., 2021; Sandhu vd., 2012). Örneğin Lima vd. (2021)'in yaptığı çalışmada manyok nişastasası üzerine ozon oksidasyonunun (45 mg/L ozon) nişastanın morfolojisini ve yüzey özelliklerini değiştirmediğinin gözlemlenmesi bu bilgiyi destekler niteliktedir. Ancak başka bir çalışmada ise tartar karabuğdayına uygulanan ozonlama süresi arttıkça (15 ve 20 dk) nişasta partikül büyüklüğünün azaldığı ve moleküldeki hilum denilen boşlukların büyüdüğu bildirilmiştir (Hu vd., 2022).

Ozon uygulamasının nişasta özellikleri üzerine etkilerinin incelenmesine yönelik çalışmaların çoğunluğu ekstrakte edilmiş nişasta örnekleri

üzerinde yapılmıştır (Vanier vd., 2017). Öğütme öncesi buğday tanelerine uygulanan ozonlama işleminin nişastanın özellikleri üzerine etkisinin, ekstrakte edilmiş nişasta üzerindeki kıyasla çok daha az olduğu belirtilmektedir. Bu durum, tane içerisindeki nişasta granüllerinin protein ve hücre duvarı materyali ile çevrelenmiş bir matriks içerisinde oksidasyondan korunması şeklinde açıklanmaktadır (Zhu, 2018).

#### *Protein*

Nişasta gibi son ürün kalitesinin belirlenmesinde oldukça belirleyici olan proteinlerin ozon uygulaması ile modifikasyonu, çok çalışılan konular arasında yer almaktadır. Yapılan çalışmalarda; ozon uygulamasının ekstrakte edilemeyen polimerik protein oranında, disülfid bağı sayısında, çapraz bağlanmalarda ve gluten molekül ağırlığında artışa, tiyol grubunda azalmaya ve viskoelastik özelliklerde ise değişime yol açtığı bildirilmektedir (Chittrakorn vd., 2014; Violleau vd., 2012; Zhu, 2018).

Ozon uygulamasının tahıl proteinleri üzerindeki etkileri Çizelge 3' de özetlenmiştir.

Obadi vd., (2018) yapmış oldukları çalışmada optimumdan sapan yüksek ozon uygulama konsantrasyonlarında, protein yapısında meydana gelen makaslanmalar sonucu yapının bozulduğunu bildirmişlerdir. Ozon uygulamasının unun protein içeriği üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. Özet olarak, ılıman koşullarda yapılan ozon uygulamasının çapraz bağlanmaları ve interaksiyonları arttırdığı, proteinlerin çözünürlüğünü ise (özellikle glutenin proteini) azalttığı ifade edilmektedir (Zhu, 2018). Diğer yandan, aşırı ozon uygulamasının proteinlerin moleküler yapılarının zayıflamasına neden olduğu, bu durumun ise hamur reolojisinde ve son ürün özelliklerinde önemli değişikliklere yol açtığı belirtilmektedir (Zhu, 2018).

#### *Diğer Bileşenler*

Ozonlama işleminin tahılların besleyici ve fonksiyonel özellikleri üzerindeki etkileri uygulama parametrelerine (konsantrasyon, süre, gaz/sıvı form, sıcaklık vb) bağlı olarak önemli değişiklikler göstermektedir.

Çizelge 3: Ozon Uygulamasının Tahıl Proteinleri Üzerine Etkisi  
 Table 3: Effect of Ozone Application on Cereal Proteins

Materyal <i>Material</i>	Ozon uygulama koşulları (ozon formu, kons., süre) <i>Ozone application conditions</i> ( <i>ozone form, conc., duration</i> )	Sonuçlar <i>Results</i>	Kaynak <i>Source</i>
Ekstrakte proteinler (buğday gluteni, glutenin ve gliadin) <i>Extracted proteins</i> ( <i>wheat gluten, glutenin and gliadin</i> )	Gaz, 5 g/s, 0-1 s <i>Gas, 5 g/s, 0-1 hour</i>	Sülfidril grup sayısında azalma, gluten ve glutenin alt gruplarında azalma, gluten proteinlerinin denatürasyon sıcaklıklarında artış, G' ve G'' değerlerinde artış <i>Decrease in the number of sulfhydryl groups, decrease in gluten and glutenin subgroups, increase in denaturation temperatures of gluten proteins, increase in G' and G'' values</i>	Obadi vd., 2016
Buğday unu <i>Wheat flour</i>	50 mg/kg, 1 s <i>50 mg/kg, 1 hour</i>	Yaş gluten miktarında artış, unun beyazlık değerinde artış, α-amilaz ve viskozite değerinde azalma <i>Increase in wet gluten content, increase in flour whiteness, decrease in α-amylase and viscosity</i>	Zhu, 2018
Buğday unu (orta sert) <i>Wheat flour</i> ( <i>medium hard</i> )	Gaz, 5 mg/L, 0-2 s <i>Gas, 5 mg/L, 0-2 hour</i>	Buğday prolaminlerinin SDS (sodyum dodeksil sülfat) çözünürlüğünde azalma, molekül içi bağlanmadaki artış sonucunda proteinin polimer yapısında artan dayanım, moleküller arası S-S bağlarında artış, çapraz bağlardaki artış ile proteinin sekunder yapısında değişim <i>Decreased SDS (sodium dodecyl sulfate) solubility of wheat prolamins, increased strength in the polymer structure of the protein as a result of the increase in intramolecular binding, increase in intermolecular S-S bonds, increase in cross-links and change in the secondary structure of the protein</i>	Mei vd., 2016
Buğday <i>Wheat</i>	2.0 m <sup>3</sup> NTP/s <i>2.0 m<sup>3</sup> NTP/second</i>	Toplam protein oranının değişmediği ancak ekstrakte edilemeyen protein miktarında artış <i>An increase in the amount of protein that does not change in the total protein ratio but cannot be extracted</i>	Goze vd., 2017
Buğday <i>Wheat</i>	Gaz, 0.4g/h, 5 dk <i>Gas, 0.4g/h, 5 minute</i>	Toplam protein miktarının sabit kaldığı, gluten proteininde ki disülfid bağında ki artış ile ekstrakte edilemeyen polimerik protein miktarında artış <i>The amount of non-extractable polymeric protein increased with the increase in the disulfide bond in the gluten protein, where the total protein amount remained constant.</i>	Elgün ve Bilgiçli, 2019
Buğday <i>Wheat</i>	Gaz, 0.06 L/dk, 10, 20,30, 36 ve 40 minute <i>Gas, 0.06 L/dk, 10, 20,30, 36 and 40 minute</i>	Ekstrakte edilemeyen protein/ekstrakte edilebilir protein oranında artış <i>Increase in non-extractable protein/extractable protein ratio</i>	Chittrakorn vd., 2014
Buğday <i>Wheat</i>	Gaz, 5 g/kg <i>Gas, 5g/kg</i>		Violleau vd., 2012

## Renk

Değirmencilik sektöründe öğütme prosesi sonrasında elde edilen unu piyasaya sürülmeden önce renginin beyazlatılması amacıyla ağartma işlemi uygulanmaktadır. Bunun için oksidatif ajan olarak genellikle aktif soya unu kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalarda, ozon uygulamasının bir yandan karatenoid renk pigmentlerindeki çift bağları kırarak ağartma işlemini etkili bir şekilde sağladığı, diğer yandan gıda güvenliği açısından da önem arz ettiği bildirilmiştir (Chittrakorn vd., 2014; Sivaranjani vd., 2021; Zhu, 2018). Unun ozon gazı ile oksidasyonu sonucunda  $L^*$  (parlaklık) değerinin arttığı,  $b^*$  (sarılık) değerinin azaldığı ifade edilmektedir (Chittrakorn vd., 2014; Demir vd., 2011; Elgün ve Bilgiçli, 2019; Zhu, 2018). Ozon uygulanmış (0.4 g/h, 5 dakika) buğday ununun renk değerlerinin incelendiği çalışmada oksidasyonla birlikte  $L^*$  değerinin (parlaklık) %0.2 ve  $a^*$  değerinin (kırmızılık) %9.4 oranında arttığı,  $b^*$  değerinin (sarılık) ise %8 oranında azaldığı tespit edilmiş olup bu bilgiyi destekler niteliktedir. Çalışma sonucunda ayrıca un ağartma işlemi için 21 günlük dinlendirme işlemi ile ozon oksidasyonunun eşdeğer olduğu da bildirilmiştir (Elgün ve Bilgiçli, 2019). Ozon uygulama parametreleri ve uygulama yapılacak tahıl çeşiti renk değişimi için önemlidir. Luz vd (2022), yapmış oldukları çalışmada pirince ön işlem aşamasında ozon uygulamasıyla (5 L/dk) tüm örneklerde parlaklık ( $L$ ) değerinde artış olduğunu ancak en fazla artışın %6.5 oranında 5 saatlik ozon uygulamasıyla olduğunu belirlemişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada buğday ununa uygulanan ozon gazının (50 mg ozon/kg) unun renk değerlerinde önem düzeyinde değişikliğe neden olmadığı ozon uygulama konsantrasyonunun önemini destekler niteliktedir (Mendez vd., 2003). Tahıl çeşidinin renk değişimi üzerine etkisinin incelendiği çalışmada farklı nişasta tiplerine (buğday, mısır ve pirinç) ozon oksidasyonu sonrasında  $L$  değerinin en yüksek buğday nişastasında olduğu yine tahıl çeşidinin ozon oksidasyonu için önemini destekler niteliktedir (Çatal ve İbanoğlu, 2012). Başka bir çalışmada ise Özaslan ve İbanoğlu (2022), farklı nişasta tipleri (mısır, guar ve guar gam mısır nişastas) üzerine ozon uygulanmasının (60 g ozon/saat, 5, 10, 15, 30

ve 60 dakika) renk değerlerine etkisini incelemiş olup çalışma sonucunda  $L$  değerinin en fazla %16 artışla guar gam-mısır nişastas) çözeltilisine olduğu ve  $a$  değerinde azalmanın en fazla %77 oranında guar gam nişastasında olduğu dolayısıyla nişasta çeşitinin ozon etki mekanizması için önemli bir faktör olduğu çalışmadan çıkarılabilecek sonuçlar arasındadır. Tahıl nişasta çeşitlerinden Adlay nişastasının endüstriyel ölçekte kullanımını sınırlandıran birkaç faktörün (düşük su absorpsiyon, düşük şişme hacmi ve düşük çözünürlük) modifikasyonu amacıyla Subroto vd (2022) ozon oksidasyonu (2 L/dk, 20 dakika) uygulamış olup çalışma sonucunda birlikte  $L$  değerinin %0.7 oranında artış gösterdiği  $a$  değerinin ise %10 oranında azalma gösterdiği tespit edilmiştir. Karabuğday bazlı kompozit un örneklerine ozon uygulanmasıyla (2.4/h)  $L$  değerinde %0.55 oranında artış,  $b$  %3.4 oranında olduğu bunun ise unda bulunan doğal bileşiklerin (karotenoid ve flavon) ozon oksidasyonu ile dekompoze olmasından ve polifenol oksidaz enziminin inhibisyonundan kaynaklandığı bildirilmiştir (Hu vd, 2020).

## Mineral madde içeriği

Ozon uygulamasının toplam mineral madde üzerine etkisinin uygulanan ozon konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiği literatürde bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada buğday örneklerine 30 mg/kg ozon gazı uygulanması ile birlikte Mg, Ca, K, P, Zn, Mn içeriğinin önem düzeyinde arttığı tespit edilmiştir (Broberg vd, 2015). Başka bir çalışmada ise nohut tanesine ozon uygulanması sonucunda (500, 750 ve 1000 mg/kg, 20 ile 30 dakika), düşük dozda ozon uygulamasının (500 ve 750 mg/kg) toplam mineral madde miktarını etkilemediği ancak yüksek dozda uygulamanın (1000 mg/kg) fosfor (%22 oranında) ve demir (%5 oranında) içeriğini arttırdığı, bakır (%25 oranında), çinko (%3 oranında), kalsiyum (%13 oranında) ve potasyum (%87 oranında) içeriklerini ise çapraz bağlanmalar sonucunda önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir (Nickhil vd., 2021).

## Yağ asidi içeriği

Güçlü oksitleme potansiyeline sahip ozon gazı uygulama parametrelerine bağlı olarak tahılda

yağlarının oksidasyonuna neden olmaktadır (Dubois vd., 2006; Savi vd., 2014; Wang vd., 2016). Yapılan çalışmalarda ozon gazı uygulamasının (1500 mg/kg, 0-45 dk) buğday unundaki lipitleri okside ettiği rapor edilmiştir (Sandhu vd., 2011). Benzer şekilde Qi vd. (2016), ozon uygulamasının mısır lipitlerinin asit içeriğini yaklaşık %40 oranında arttırdığını belirtmişlerdir. Buğday ununda ozon uygulamasını içeren başka bir çalışmada (5 g/s, 0-45 dk), ozonlama ile linoleik asit miktarının azaldığı, palmitik asit miktarının ise arttığı ifade edilmiştir. Aynı çalışmada unun asitlik değeri ve lipaz aktivitesinin azaldığı, buna karşın peroksit değerinin arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, lipit oksidasyonuna bağlı olarak uçucu bileşiklerin (haptanal ve hekzanal gibi) konsantrasyonlarında da artış görülmüştür (Obadi vd., 2018). Ozon uygulanmasının (5 g/h) depolama boyunca buğday unu üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada yağ asidi içeriğinin değişmediği hatta depolama sürecinde azaldığı bunun ise buğday tanesinde ki diğer bileşenlerin yağ bileşeni üzerinde koruyucu etkisinden ve hidrolaz enziminin inhibisyonundan kaynaklandığı bildirilmiştir (Li vd, 2013).

Tahıldaki doymuş ve doymamış yağ asitlerinin miktarına bağlı olarak yağ kalitesi değişiklik göstermektedir. Tahıllarda mevcut halde bulunan doymamış yağ asitleri yapılarında bulunan çift bağlardan dolayı oksidasyona daha çok maruz kalmaktadır ve sonucunda istenmeyen ransit tat ve koku oluşumu meydana gelebilmektedir. Dolayısıyla ozon oksidasyonunun tahılların yağ asitleri üzerinde ki olumsuz etkisini minimize edebilmek için uygulanacak olan parametrelerin optimize edilmesi önem taşımaktadır. Ozon oksidasyonunun (50 mg/kg, 30 dakika) farklı tahıl (mısır, buğday ve soya fasulyesi) çeşitlerindeki yağ asidi içeriği üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, ozonun tahıl çekirdeğine nüfuz etmemesinden dolayı toplam yağ asidi içeriğinin oksidasyonla değişmediği bildirilmiş olup bu bilgiyi destekler niteliktedir (Mendez vd., 2003). Buna karşın, bir diğer çalışmada nohut tanesine uygulanan ozon işlemi (500, 750 ve 1000 mg/kg; 20-30 dakika) ile yağ asidi kompozisyonunun önemli ölçüde değiştiği ozon uygulamasıyla doymuş yağ asit miktarının sabit kaldığı ancak

omega 3 ve omega 6 açısından önem arz eden oleik asit miktarının orta derecede ozonlama işlemi ile %16 oranında arttığı, omega 6'nın öncüsü olan linoleik asit miktarının ise %2 oranında arttığı ancak bu sonuçların yüksek dozda ozonlama ile azaldığı belirlenmiştir (Nickhil vd., 2021). Başka bir çalışmada ise buğday ruşeymine ozon (2000, 4000 ve 6000 mg ozon /kg ve 1, 2 ve 4 saat) uygulamasının konsantrasyon ve maruz kalma süresinin artışı ile birlikte %33, %100 ve %57 oranında arttığı tespit edilmiştir (Saroei vd, 2019). Endüstriyel ölçekte önemli yağ kaynağı olan mısıra uygulanan ozon oksidasyonu ile (51 mg/L) peroksit değerinin ozon uygulama süresinin artışıyla orantılı olarak %258 oranında arttığı tespit edilmiştir (Alexandre vd, 2019).

Ozonlama işlemi ile tahılda miristoleik asit, 10-pentadesenoik asit ve heptadesenoik asit gibi birtakım yağ asitlerinin oluşumu meydana gelebilir veya var olan yağ asitlerinin (oleik asit, linoleik asit, palmitoleik asit, hekzadesenoik asit) miktarında artış veya azalma olabilir. Yapılan bir çalışmada nohut tanesine ozon uygulanması sonucunda (500, 750 ve 1000 mg/kg) omega-6 yağ asidinin öncüsü linoleik asit miktarının düşük ve orta dereceli ozonlama ile %2 oranında, oleik asit miktarının ise orta dereceli ozonlama işlemi ile %16 oranında arttığı tespit edilmiştir. Çalışmada ayrıca doymuş yağ asitlerinde ki azalma %0-9 arasında olup tekli doymamış yağ asitlerinden Hekzadesenoik asit, Palmitoleik asit, Oktadesenoik asit ve Eikosenoik asit miktarının sırasıyla %20, %7.69, %4.45 ve %9.43 oranında azalma olduğu tespit edilmiştir (Nickhill vd, 2021). Çalışma sonucunda insan sağlığı için faydalı doymamış yağ asitlerinden linoleik asit ve oleik asit miktarındaki artışın ozonlamanın baklagillerde haşere kontrol önlemleri uygunluğunu desteklemektedir (Nickhill vd, 2021).

#### Biyoaktif bileşenler

Antioksidan maddeler vücudumuzda serbest radikallerin reaksiyonunun engellenmesinde, metalleri bağlayarak oksidasyonun neden olduğu zararların indirgenmesinde dolayısı ile insan sağlığı için çeşitli hastalıkların önlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Kolaç vd, 2017).



Yapılan çalışmada tahıl çekirdeğinde ki hücre duvarı, protein ve nişastanın un/çekirdek matrisine ozonun penetrasyonunu engellediğini dolayısıyla da polifenol bileşiklerin ozon oksidasyonundan daha düşük düzeyde etkilendiği bildirilmiştir (Zhu, 2018). Ozon oksidasyonunun fonksiyonel ve antioksidan bileşikler üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla antioksidan aktivite özelliğine sahip ancak mineral madde bağlayıcı özelliği ile istenmeyen bileşen olarak bilinen fitik asit miktarının uygulanan ozon konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiği, örneğin 0.4 g/L ozon gazı uygulaması ile fitik asit miktarının %17 oranında azaldığı ancak 60 m/m ozon uygulamasının fitik asit miktarında değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir. Ozon oksidasyonu ile fitik asit miktarındaki düşüş mineral biyoyararlılığı açısından dikkate alınması gereken önemli bir fonksiyonel özellik olup ozonun bu konu açısından ön planda tutulması gerektiği kanısına varılmıştır (Elgün ve Bilgiçli, 2019).

Biyoaktif bileşenlerin tkutilmesi kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve diyabet gibi hastalıkların önlenmesiyle insan sağlığı açısından önem arz etmektedir. Dolayısıyla gıdalara uygulanacak olan ozon parametrelerinin optimizasyonu biyoaktif bileşenlerin korunması veya arttırılması açısından önem taşımaktadır. Ozon oksidasyonu ile hücre membranının kısmi parçalanmasıyla bağlı formdaki fenolik bileşenlerin serbest forma dönüşmesi ve oksidasyon sonucu bazı enzimlerin artan aktivitesiyle (fenilalanin amonyak liyaz, stilben sentazlar ve flavonol sentazlar gibi) tanede ki polifenolik bileşen miktarı artmaktadır. Ayrıca oksidatif esmerleşmeye neden olan polifenoloksidaz ve peroksidaz enzimlerinin inhibisyonu ile besin kalitesi artmaktadır (Jackowska vd, 2019; Kaur, 2022). Yapılan bir çalışmada ozon oksidasyonu uygulanmış (5 g/sa) tam tahıl unundan elde edilen yağdaki fenolik madde içeriğinin %107 oranında arttığı bu bilgiyi destekler niteliktedir (Kaur, 2022). Ozonun toplam fenolik madde içeriği üzerine etkisinin incelendiği başka bir çalışmada kolza tohumuna uygulanan ozonlama işlemi ile fenolik bileşen miktarının %19 ve flavanoit miktarının ise %13 oranında arttığı bildirilmiştir (Jackowska vd, 2019). Radikal yakalama aktivitesine ozon

oksidasyonunun etkisinin incelendiği çalışmada ise mısır nişastasına ozonlama işlemiyle (60g/saat) radikal yakalama aktivitesinin %17 oranında arttığı toplam fenolik bileşen miktarınınsa %42 oranında arttığı belirlenmiştir (zaslan ve İbanoğlu, 2022). Ancak başka bir çalışmada uygulanacak olan ozon konsantrasyonun öneminden bahsedilmiş olup, Sarooei vd. (2022) tarafından yapılan çalışmada buğday ruşeymine uyguladıkları ozon konsantrasyonunun artmasıyla (2000, 4000, 6000 mg/kg) antioksidan miktarında ki %25 oranında azalma olduğu bunun ise yüksek konsantrasyonda ozonlama ile hidroksil, süperoksit ve hidroperoksil gibi serbest radikallerin oluşmasından kaynaklandığı bildirilmiştir. Dolayısıyla yüksek dozda ozon gazının antioksidan madde miktarı üzerinde olumsuz etkisi mevcut olduğu sonucuna varılmıştır. Ozon uygulamasının toplam fenolik bileşen miktarını olumlu etkisi ile sonuçlanan çalışmada buğday ununa ozonlama işlemi (5 g/L) toplam fenolik bileşen miktarının uygulama süresinin artışı ile %224 oranında arttığı ve DPPH antioksidan aktivite miktarının %3 oranında arttığı belirlenmiş olup bu sonuçların ozonlama ile kovalent bağların etkilenmesi karoten, tanen, askorbat, flavoprotein ve polifenoller gibi antioksidanların serbest hale geçmesinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Obadi vd, 2018).

#### Asitlik

Ozon uygulaması ile tanedeki karbonil ve karboksil grup içeriklerinin artmasına paralel olarak tahıl tanesinin asitlik miktarının arttığı dolayısı ile tanenin pH değerinin düştüğü bildirilmektedir (Sivaranjani vd., 2021; Zhu, 2018). Hu vd. (2022) karabuğday nişastasına farklı sürelerde (2.5, 7.5, 15 ve 20 dk) ozon gazı uygulaması ile (2.4 g/h akış hızında) karbonil miktarında %263 oranında ve karboksil miktarında %121 oranında artış olduğu ve artan asitlikle birlikte pH değerinde düşüş %5 oranında düşüş olduğunu belirlemişlerdir.

Asitlik ve pH değerinin belirlendiği başka bir çalışmada, manyok nişastasına ozon gazı uygulaması ile karbonil içeriğinin ve karboksil içeriğinin oksidasyonla birlikte arttığı (sırasıyla %8 ve %3) pH değerinin % 31 oranında düştüğü tespit edilmiştir (Lima vd., 2021). Ozonun farklı

nişasta tipleri (buğday, mısır, patates ve pirinç) üzerine etkisinin incelendiği çalışmada ise uygulanan ozon oksidasyonu sonucunda tüm nişasta tiplerinde asitliğin artmasına paralel olarak pH değerinin azaldığı ancak en çok azalmanın %78 oranına patates nişastasında olduğu belirlenmiş olup oksidasyonun pH üzerine etkisinin uygulanan tahıl çeşitine bağlı olmadığı bildirilmiştir (Çatal ve İbanoğlu, 2012). Mısır nişastasına ozon oksidasyonunun etkisinin incelendiği başka bir çalışmada ozonlama ile (60 g/saat) karbonil içeriğinin %90 oranında, karboksil içeriğinin %150 oranında arttığı dolayısıyla pH değerinin düştüğü ve ortam asitliğinin arttığı tespit edilmiştir (Özaslan ve İbanoğlu 2022). Ozon oksidasyonunun ön işlem aşamasında uygulanmasının asitlik üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada pirince ısıtma aşamasında ozon uygulamasıyla (5 L/dk, 1, 2, 3 ve 5 saat) ısıtma atık suyunun pH değerinin %18 oranında düştüğü dolayısıyla ortam asitliğinin arttığı bunun ise ozonlama sırasında ki serbest radikal oluşumundan kaynaklanabileceği ve ortam asitleşmesinin hidrasyonunu desteklediği bildirilmiştir (Luz vd 2022). Yine başka bir çalışmada ise buğday unu ve buğday nişastasının ozonlanmasıyla (1500 mg/kg) karboksilik asit miktarının arttığı bildirilmiş olup çalışmalar birbirini destekler niteliktedir (Sandhu vd, 2012).

Ozon oksidasyonu sonucunda serbest radikallerin oluşumuyla pH'da meydana gelen bu değişiklikler tahıl tanesinin makro bileşenlerinde (protein ve nişasta) modifikasyonlara neden olabilir (Luz vd, 2022). Dolayısıyla ozonlama parametrelerinin optimize edilmesinin önemini bir kez daha vurgulamak gerekmektedir.

#### Çimlenme kabiliyeti

Çimlenmiş tahılların artan besin değeri, bu tahıllara olan ilgiyi de beraberinde getirmiştir. Dolayısıyla çimlenme süresinin azaltılması ve çimlenme kabiliyetinin artırılması amacıyla birtakım uygulamalar mevcut olup bunlardan biri olan ozonun uygulama parametrelerine göre olumlu/olumsuz birtakım etkileri vardır (Ma vd, 2020; Savi vd, 2020). Ozon oksidasyonunun a-amilaz, beta-amilaz,  $\beta$ -glukanaz ve endo-proteaz gibi hidrolitik enzim aktivitesi üzerinde olumlu etkisinin olduğu böylece protein matrisinin

hidrolizi ve nişasta parçalayıcı enzimlerin erişiminin kolaylaşması özellikle ozon uygulamasıyla enzo proteazların aktivitesinin %35 oranında artması maltlama verimi açısından önem taşımaktadır. Ozonlama işlemi ile a-amilaz aktivitesinin %14 oranında arttığı ve arpaya (*Hordeum vulgare* L.) ozon uygulamasıyla (5 mg/cm<sup>3</sup> 120 dakika) 72 saatlik çimlenme kabiliyeti üzerinde %12 oranında artışı bu bilgiyi destekler niteliktedir (Ma vd, 2020). Ancak ozonlama süresinin artışı ile tahıl tanesinin koleoptil ve seminal kökü zarar görebilir dolayısıyla çimlenme kapasitesi düşebilir. 3 saatlik ozon uygulamasının bu köklere zarar verdiği dolayısıyla çimlenme kabiliyetini %12 oranında azalttığı literatürde mevcut olup bu bilgiyi destekler niteliktedir (Savi vd, 2020). Ozonlama süresinin çimlenme kabiliyeti üzerine etkisinin incelendiği başka bir çalışmada artan uygulama süresiyle (2 ve 3 saat) 2 çimlenme kapasitesini %12 oranında azalttığı bildirilmiştir (Zhu, 2018). Ozon uygulamasıyla (0.02-0.04 mg/L, 120 dakika) mısırın çimlenme kabiliyetini %65'den %80'e çıktığı ancak maruz kalma süresinin artışıyla (180 dakika) hücre tahribatının artmasından dolayı çimlenme kabiliyetinin %12.5 oranında azalttığı da literatürde mevcuttur (Sivaranjani vd., 2021). Süre parametresinin mercimeğin çimlenme kabiliyeti üzerine etkisinin incelendiği çalışmada ise ozonlama işlemiyle (1 g/m<sup>3</sup>) en iyi çimlenme oranının %90 oranında 3 ve 10 dakika ozon uygulamasına maruz kalınan örneklerde olduğu bunun yapıdaki C-H oranında ki artıştan kaynaklandığı bildirilmiştir (Souza vd 2021).

#### Ozon Uygulamasının Ürün Üzerine Etkisi

Değirmencilik sektöründe disülfid bağ oluşumunu arttırmak, gluten ağını kuvvetlendirmek, hamur işleme özelliklerini geliştirmek ve ekmek içi yapısının düzgün olmasını sağlamak amacıyla una olgunlaştırma ajanı olarak oksidan madde ilavesi yapılmaktadır. Ancak kimyasal katkı maddelerine alternatif yeşil teknoloji olarak adlandırılan ozon gazının da bu amaçla kullanılabileceği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Mendez vd., 2003; Sivaranjani vd., 2021). Ozon gazının uygulama parametrelerine bağlı olarak tahıl unundan elde edilen hamurda (renk, stabilite, mukavemet, gelişme süresi) ve son üründe olumlu/olumsuz

birtakım değişiklikler meydana gelmektedir (Mendez vd., 2003; Sivaranjani vd., 2021).

Ozon oksidasyonunun hamur ve ekmekte meydana getirdiği değişiklikler üzerine yapılan bir çalışmada ozon uygulanmış (0.4 g/h, 8 dakika) unun su absorpsiyonunun %4, yumuşama derecesinin %8 ve hamur uzama kabiliyetinin %7 oranında azaldığı bildirilmiştir (Demir vd., 2011). Ayrıca ozonlanmış undan elde edilen ekmeğin hacminin %7 ve ekmeğin spesifik hacminin %8, ekmeğin bayatlaması için önemli bir kalite parametresi olan ekmeğin içi gözenek yapısının puanının %14 oranında arttığı tespit edilmiştir (Demir vd., 2011). Başka bir çalışmada ise yumuşak buğday tanesine ozon uygulamasıyla (36 dakika 0.06 L/dakika) kek hacminde önem düzeyinde artışa neden olduğu ve keklerin sertlik derecesinde %18 oranında (klorla oksidasyona kıyasla) düşüş (olduğu tespit edilmiştir (Chittrakorn vd., 2014).

Ekmeğin tekstürel özelliklerinde meydana gelen değişikliklere ek olarak renk özelliklerinde de bazı değişimler meydana gelmektedir (Demir vd., 2011). Ozon uygulamasının ekmeğin renk parametresi üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada 45 dk ozon uygulaması ile karotenoit renk pigmentlerinin oksidasyonu ile ekmeğin daha parlak ve daha beyaz olduğu bildirilmiştir (Zhu, 2018). Başka bir çalışmada ozon uygulanmış buğdaydan elde edilen ekmeğin parlaklığının (L) oksidasyonla birlikte %2 oranında arttığı, sarılık (*b*) ve kırmızılık (*a*) değerinin %14 ve %5 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Elgün, 2019).

Ozon uygulamasının erişte üzerine etkisinin ise daha açık ve parlak renkli erişte oluşumu doğrultusunda olduğu ve oksidasyonun eriştelerin yapışkanlığını azaltıp, sertliğini ve çignenebilirliğini etkilemediği bildirilmiştir (Zhu, 2018). Başka bir çalışmada ise 2 saat boyunca 5mg/L ozon uygulamasının ekmekteki tüm duyuşal özellikleri en düşük seviyeye indirdiği ve ekmeğin sertliğinin artarak tüketici için tercih edilebilirliğini azalttığı bildirilmiştir (Sivaranjani vd., 2021). Tüm bu çalışmalar sonucunda, uygulanacak ozon etkinliği için proses parametrelerinin öncesinde optimize edilmesi gerektiği çıkarılmaktadır (Sivaranjani vd., 2021).

Bai ve Zhou, (2021) erişte ve makarnanın kalitesi ve raf ömrünü arttırmak için hidrokolloitler, proteinler, emülgatörler, ön zenginleştirme ve ekstrüzyon yöntemlerine alternatif yeşil teknoloji kullanımının umut vaat edici olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmalarında buğday unu ve karabuğday unundan elde edilen erişte örneklerine farklı sürelerde ozon gazı 5g/h uygulamasıyla toplam canlı sayısının 0-40 dakika arasında %46 oranında azaldığı dolayısıyla eriştelerin raf ömrünün değiştii de bildirilmiştir. Ayrıca çalışma sonucunda ozon konsantrasyonunun artmasıyla eriştelerin yapısındaki boşluklar azalmış ve tekstürü sıkı bir hal almıştır. Proteinlerin çapraz bağlanmasının artışıyla eriştelerin sertlik ve elastikiyet değerinin uygulanan ozon konsantrasyonunun artmasıyla birlikte arttığı (4100g-5000g arasında) belirlenmiştir. Ozon ve klor uygulanan unlardan yapılan keklerin tekstürel özelliklerinin incelendiği başka bir çalışmada ise; ozonla muamele edilmiş undan yapılan keklerin sertliğinin %18 oranında azaldığı ancak klorlu undan yapılan keklerin sertlik oranının e %11 oranında arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada ozonlama süresinin artmasına paralel olarak kek hamurunun viskozitesinde önemli ölçüde arttığı ve özgül ağırlığın %23 oranında azaldığı dolayısı ile hamura karıştırma sırasında daha fazla oksijen dahil olduğu ve hava kabarcıklarının yapıda daha iyi tutulup oda sıcaklığında hamurun stabilitesinin arttığı belirlenmiştir (Chittrakorn vd., 2014). Raf ömrünün belirlendiği başka bir çalışmada ise; ozonlanmış ve depolanmış buğdaydan (15 dakika, 4 gün depolama) yapılmış eriştelerin depolama süresinin artışı ile birlikte toplam mikroorganizma sayısının %41 oranında azaldığı dolayısı ile eriştelerin mikrobiyolojik raf ömrünün arttığı belirlenmiştir (Li vd., 2013). Eriştelerin raf ömrünü uzatmak için yapılan başka bir çalışmada ise ozon gazı (2.4 g/saat) uygulanan un örneklerinde toplam mikroorganizma sayısının %18 oranında düştüğü dolayısı ile kimyasal koruyucu ajan, su aktivitesi düzenleyicisi, modifiye atmosfer paketlenme, ışınlama ile sterilizasyon ve soğuk zincir taşımaya alternatif çevre dostu teknoloji olarak ozon uygulamasının son üründe mikrobiyal inaktivasyonu sağladığı bildirilmiştir (Hu vd., 2020).

**SONUÇ**

Gıda endüstrisinde çeşitli uygulama alanlarına sahip olan ozon, tahıl teknolojisinde mikrobiyolojik güvenliği sağlamada, fonksiyonel özellikleri geliştirmede ve kalitatif raf ömrünü uzatmada kullanım alanı bulmaktadır. Uygulama, tahılların (özellikle buğday) öğütme özelliklerini olumlu yönde geliştirmektedir. Ancak ozon ile oksidasyonda dikkat edilmesi gereken husus uygulamanın birçok parametreye (ozon uygulama konsantrasyonu, süresi, sıcaklığı, uygulanacak olan tahılın nem miktarı, nişasta ve protein içeriği, nişastanın amiloz/amilopektin oranı vb.) bağlı olarak olumlu ve/veya olumsuz sonuçlar meydana getirmesidir. Dolayısı ile ozon oksidasyonu çalışmalarında optimum parametrelerin ön denemeler ile belirlenip sonrasında uygulamaya geçilmesi gerekmektedir. Endüstriyel ölçekte ozon teknolojisini sınırlandıran en önemli faktör ise yüksek maliyetli bir proses olmasıdır. Ancak bu durum düşük bakım maliyeti gerektirmesi ve uygulandığı ürünün uzun raf ömrüne sahip olması ile tolere edilebilmektedir. Ozon uygulaması diğer stratejiler ile birleştirilerek spesifik uygulamalar için alternatif çözümler yaratılmasında kullanılabilir. Ozonun tahıl ve ürünleri alanında büyük ölçeklerde uygulanmasına yönelik çalışmalarda halen geliştirilmeye açık konular yer almaktadır. Özellikle bu alanda farklı disiplinler ile yapılacak ortak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

**ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI**

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

**YAZAR KATKILARI**

Yazarlar makalenin gerçekleşmesinde, yazılmasında ve yayınlanmasında eşit katkı sağlamışlardır. Yazarlar makalenin son halini okumuş ve onaylamıştır.

**KAYNAKLAR**

Afsah-Hejri, L., Hajeb, P., Ehsani, R. J. (2020). Application of ozone for degradation of mycotoxins in food: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 1777-1808. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12594>

Alegbeleye, O., Odeyemi, O. A., Strateva, M., Stratev, D. (2022). Microbial spoilage of vegetables, fruits and cereals. *Applied Food Research*, 2(1), 100122. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100122>

Arda, B., Onbaşı, E., Öztürk, A., Cınar, A. (2021). Ozon Gazının Ant fungal Ajan Olarak Etkinliğinin Belirlenmesi. *Gıda ve Yem Bilimi*, 2(26), 40-48. ISSN 1303-3107

Ashogbon, A. O. (2021). Dual modification of various starches: Synthesis, properties and applications. *Food Chemistry*, 342, 128325. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128325>

Bai, Y.-P., Zhou, H.-M. (2021). Impact of aqueous ozone mixing on microbiological, quality and physicochemical characteristics of semi-dried buckwheat noodles. *Food Chemistry*, 336, 127709. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127709>

Botondi, R., Barone, M., Grasso, C. (2021). A Review into the Effectiveness of Ozone Technology for Improving the Safety and Preserving the Quality of Fresh-Cut Fruits and Vegetables. *Foods*, 10(4), 748. <https://doi.org/10.3390/foods10040748>

Castanha, N., Matta Junior, M. D. da, Augusto, P. E. D. (2017). Potato starch modification using the ozone technology. *Food Hydrocolloids*, 66, 343-356. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.12.001>

Castanha, N., Miano, A. C., Jones, O. G., Reuhs, B. L., Campanella, O. H., Augusto, P. E. D. (2020). Starch modification by ozone: Correlating molecular structure and gel properties in different starch sources. *Food Hydrocolloids*, 108, 106027. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106027>

Chakka, A. K., Sriraksha, M. S., Ravishankar, C. N. (2021). Sustainability of emerging green non-thermal technologies in the food industry with food safety perspective: A review. *LWT*, 151, 112140. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112140>

Chan, H., Leh, C. P., Bhat, R., Senan, C., Williams, P. A., Karim, A. A. (2011). Molecular structure, rheological and thermal characteristics of ozone-

- oxidized starch. *Food Chemistry*, 126(3), 1019-1024. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.113>
- Chhem-Kieth, S., Holm Rasmussen, L., Rosenfeld, M., Larsen Andersen, M. (2022). Effects of vegetables and fruit with varying physical damage, fungal infection, and soil contamination on stability of aqueous ozone. *Food Bioscience*, 102157. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102157>
- Chittrakorn, S., Earls, D., MacRitchie, F. (2014). Ozonation as an alternative to chlorination for soft wheat flours. *Journal of Cereal Science*, 60(1), 217-221. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2014.02.013>
- Çatal, H., İbanoğlu, Ş. (2012). Structure, Physico-chemical and Microbiological Properties of Ozone-oxidized Wheat, Corn, Potato and Rice Starches. *Journal of Food Science and Engineering*, 2(4). <https://doi.org/10.17265/2159-5828/2012.04.002>
- Çatal, H., İbanoğlu, Ş. (2014). Effect of aqueous ozonation on the pasting, flow and gelatinization properties of wheat starch. *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 577-582. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.025>
- Çetinkaya, N., Pazarlar, S., Paylan, İ. C. (2022). Ozone treatment inactivates common bacteria and fungi associated with selected crop seeds and ornamental bulbs. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(12), 103480. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103480>
- da Luz, S. R., Almeida Villanova, F., Tuchtenhagen Rockembach, C., Dietrich Ferreira, C., José Dallagnol, L., Luis Fernandes Monks, J., de Oliveira, M. (2022). Reduced of mycotoxin levels in parboiled rice by using ozone and its effects on technological and chemical properties. *Food Chemistry*, 372, 131174. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131174>
- Demir, M. K., Elgün, A., Elgün, S. M. (2011). Farklı tip unlara ozon uygulamasının, un, hamur ve ekmek kalitesi üzerine etkisi. *GIDA*, 36(4), Art. 4.
- Desvignes, C., Chaurand, M., Dubois, M., Sadoudi, A., Abecassis, J., Lullien-Pellerin, V. (2008). Changes in common wheat grain milling behavior and tissue mechanical properties following ozone treatment. *Journal of Cereal Science*, 47(2), 245-251. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.04.004>
- Devu, S. S., Dileepmon, R., Kothakota, A., Venkatesh, T., Pandiselvam, R., Garg, R., Jambak, A., Mediboyina, M. K., Kumar, M., Rajkumar, Raghunathan, R., Mousavi Khaneghah, A. (2022). Recent advancements in baking technologies to mitigate formation of toxic compounds: A comprehensive review. *Food Control*, 135, 108707. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108707>
- Dubois, M., Coste, C., Despres, A. G., Efstathiou, T., Nio, C., Dumont, E. (2006). Safety of Oxygreen, an ozon treatment on wheat grains, Part 2. Is there a substantiation equivalence between Oxygreen-treated wheat grains and untreated wheat grains. *Food Additives & Contaminants*, 23, 1-15.
- Elgün, M. S., Bilgiçli, N. (2019). Buğday Ununa Ozon Gazı Uygulamasının Un ve Ekmek Kalitesine Etkisi. *Akademik Gıda*, 329-341. <https://doi.org/10.24323/akademik-gida.647710>
- Epelle, E. I., Macfarlane, A., Cusack, M., Burns, A., Thissera, B., Mackay, W., Rateb, M. E., Yaseen, M. (2022). Bacterial and fungal disinfection via ozonation in air. *Journal of Microbiological Methods*, 194, 106431. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106431>
- Gavahian, M., Sarangapani, C., Misra, N. N. (2021). Cold plasma for mitigating agrochemical and pesticide residue in food and water: Similarities with ozone and ultraviolet technologies. *Food Research International*, 141, 110138. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110138>
- Guo, Y., Zhao, L., Ma, Q., Ji, C. (2021). Novel strategies for degradation of aflatoxins in food and feed: A review. *Food Research International*, 140, 109878. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109878>

- Hamad, G. M., Mehany, T., Simal-Gandara, J., Abou-Alella, S., Esua, O. J., Abdel-Wahhab, M. A., Hafez, E. E. (2023). A review of recent innovative strategies for controlling mycotoxins in foods. *Food Control*, *144*, 109350. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109350>
- Hashemi Moosavi, M., Mousavi Khaneghah, A., Javanmardi, F., Hadidi, M., Hadian, Z., Jafarzadeh, S., Huseyn, E., Sant'Ana, A. S. (2021). A review of recent advances in the decontamination of mycotoxin and inactivation of fungi by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, *79*, 105755. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105755>
- Hu, J., Li, X., Cheng, Z., Fan, X., Ma, Z., Hu, X., Wu, G., Xing, Y. (2022). Modified Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) starch by gaseous ozone: Structural, physicochemical and in vitro digestible properties. *Food Hydrocolloids*, *125*, 107365. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107365>
- Hu, J., Li, X., Jing, Y., Hu, X., Ma, Z., Liu, R., Song, G., Zhang, D. (2020). Effect of gaseous ozone treatment on the microbial and physicochemical properties of buckwheat-based composite flour and shelf-life extension of fresh noodles. *Journal of Cereal Science*, *95*, 103055. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2020.103055>
- Ingegno, B. L., Tavella, L. (2022). Ozone gas treatment against three main pests of stored products by combination of different application parameters. *Journal of Stored Products Research*, *95*, 101902. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2021.101902>
- Kaur, K., Pandiselvam, R., Kothakota, A., Padma Ishwarya, S., Zalpouri, R., Mahanti, N. K. (2022). Impact of ozone treatment on food polyphenols – A comprehensive review. *Food Control*, *142*, 109207. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109207>
- Kolaç, T., Gürbüz, P., Yetiş, G. (2017). Doğal Ürünlerin Fenolik İçeriği Ve Antioksidan Özellikleri. *İstanbul Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi*, *5*(1).
- Li, M., Peng, J., Zhu, K.-X., Guo, X.-N., Zhang, M., Peng, W., Zhou, H.-M. (2013). Delineating the microbial and physical–chemical changes during storage of ozone treated wheat flour. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *20*, 223-229. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.06.004>
- Lillo, E., Cordisco, M., Trotta, A., Greco, G., Carbonari, A., Rizzo, A., Sciorsci, R. L., Corrente, M. (2022). Evaluation of antibacterial oxygen/ozone mixture in vitro activity on bacteria isolated from cervico-vaginal mucus of cows with acute metritis. *Theriogenology*, S0093691X22004459. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.10.031>
- Lima, D. C., Maniglia, B. C., Matta Junior, M. D., Le-Bail, P., Le-Bail, A., Augusto, P. E. D. (2021). Dual-process of starch modification: Combining ozone and dry heating treatments to modify cassava starch structure and functionality. *International Journal of Biological Macromolecules*, *167*, 894-905. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.046>
- Maniglia, B. C., Castanha, N., Rojas, M. L., Augusto, P. E. (2021). Emerging technologies to enhance starch performance. *Current Opinion in Food Science*, *37*, 26-36. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.09.003>
- Mayookha, V. P., Pandiselvam, R., Kothakota, A., Padma Ishwarya, S., Chandra Khanashyam, A., Kutlu, N., Rifna, E. J., Kumar, M., Panesar, P. S., & Abd El-Maksoud, A. A. (2023). Ozone and cold plasma: Emerging oxidation technologies for inactivation of enzymes in fruits, vegetables, and fruit juices. *Food Control*, *144*, 109399. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109399>
- Mei, J., Liu, G., Huang, X., Ding, W. (2016). Effects of ozone treatment on medium hard wheat (*Triticum aestivum* L.) flour quality and performance. *CyTA-Journal of Food*, *14*(3), 449-456. <https://doi.org/10.1080/19476337.2015.1133714>
- Mendez, F., Maier, D. E., Mason, L. J., Woloshuk, C. P. (2003). Penetration of ozone into columns of stored grains and effects on chemical

- composition and processing performance. *Journal of Stored Products Research*, 39(1), 33-44. [https://doi.org/10.1016/S0022-474X\(02\)00015-2](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(02)00015-2)
- Mir, S. A., Dar, B. N., Mir, M. M., Sofi, S. A., Shah, M. A., Sidiq, T., Sunooj, K. V., Hamdani, A. M., Mousavi Khaneghah, A. (2022). Current strategies for the reduction of pesticide residues in food products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 106, 104274. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104274>
- Mir, S. A., Dar, B. N., Shah, M. A., Sofi, S. A., Hamdani, A. M., Oliveira, C. A. F., Hashemi Moosavi, M., Mousavi Khaneghah, A., Sant'Ana, A. S. (2021). Application of new technologies in decontamination of mycotoxins in cereal grains: Challenges, and perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 148, 111976. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.111976>
- Muştu, Ç. (2020). Yiyecek ve İçecek İşletmelerinde Ozon Uygulamaları. *AYDIN GASTRONOMY*, 4(1), 45-53. [https://doi.org/10.17932/IAU.GASTRONOMY.2017.016/2020.401/gas\\_v04i1005](https://doi.org/10.17932/IAU.GASTRONOMY.2017.016/2020.401/gas_v04i1005)
- Nada, S., Nikola, T., Bozidar, U., Ilija, D., Andreja, R. (2022). Prevention and practical strategies to control mycotoxins in the wheat and maize chain. *Food Control*, 136, 108855. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108855>
- Nickhil, C., Mohapatra, D., Kar, A., Giri, S. K., Tripathi, M. K., Sharma, Y. (2021). Gaseous ozone treatment of chickpea grains, part I: Effect on protein, amino acid, fatty acid, mineral content, and microstructure. *Food Chemistry*, 345, 128850. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128850>
- Niveditha, A., Pandiselvam, R., Prasath, V. A., Singh, S. K., Gul, K., Kothakota, A. (2021). Application of cold plasma and ozone technology for decontamination of *Escherichia coli* in foods- a review. *Food Control*, 130, 108338. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108338>
- Nunes, V. M., Moosavi, M., Mousavi Khaneghah, A., Oliveira, C. A. (2021). Innovative modifications in food processing to reduce the levels of mycotoxins. *Current Opinion in Food Science*, 38, 155-161. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.11.010>
- Obadi, M., Zhu, K.-X., Peng, W., Noman, A., Mohammed, K., Zhou, H.-M. (2018). Characterization of oil extracted from whole grain flour treated with ozone gas. *Journal of Cereal Science*, 79, 527-533. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.12.007>
- Ojogbo, E., Ogunsona, E. O., Mekonnen, T. H. (2020). Chemical and physical modifications of starch for renewable polymeric materials. *Materials Today Sustainability*, 7-8, 100028. <https://doi.org/10.1016/j.mtsust.2019.100028>
- Özaslan, Z. T., İbanoğlu, Ş. (2022). Ozonation of corn starch in the presence of guar gum: Rheological, thermal and antioxidant properties. *Food Hydrocolloids*, 124, 107299. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107299>
- Pandiselvam, R., Singh, A., Agriopoulou, S., Sachadyn-Król, M., Aslam, R., Gonçalves Lima, C. M., Khanashyam, A. C., Kothakota, A., Atakan, O., Kumar, M., Mathanghi, S. K., Mousavi Khaneghah, A. (2022). A comprehensive review of impacts of ozone treatment on textural properties in different food products. *Trends in Food Science Technology*, 127, 74-86. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.06.008>
- Phan, L. T., Schaar, H., Saracevic, E., Krampe, J., Kreuzinger, N. (2022). Effect of ozonation on the biodegradability of urban wastewater treatment plant effluent. *Science of The Total Environment*, 812, 152466. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152466>
- Qasim, M., Rafique, M. S., Naz, R. (2022). Water purification by ozone generator employing non-thermal plasma. *Materials Chemistry and Physics*, 291, 126442. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2022.126442>
- Qian, Y.-F., Zhang, J.-J., Liu, C.-C., Ertbjerg, P., Yang, S.-P. (2022). Effects of gaseous ozone treatment on the quality and microbial community of salmon (*Salmo salar*) during cold storage. *Food Control*, 142, 109217.

- <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109217>
- Raghunathan, R., Pandiselvam, R., Kothakota, A., Mousavi Khaneghah, A. (2021). The application of emerging non-thermal technologies for the modification of cereal starches. *LWT*, *138*, 110795. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110795>
- Rangel, K., Cabral, F. O., Lechuga, G. C., Carvalho, J. P. R. S., Villas-Bôas, M. H. S., Midlej, V., De-Simone, S. G. (2021). Detrimental Effect of Ozone on Pathogenic Bacteria. *Microorganisms*, *10*(1), 40. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010040>
- Sandhu, H. P. S., Manthey, F. A., Simsek, S. (2012). Ozone gas affects physical and chemical properties of wheat (*Triticum aestivum* L.) starch. *Carbohydrate Polymers*, *87*(2), 1261-1268. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.09.003>
- Sandhu, H. P. S., Manthey, F. A., Simsek, S., Ohm, J.-B. (2011). Comparison Between Potassium Bromate and Ozone as Flour Oxidants in Breadmaking. *Cereal Chemistry Journal*, *88*(1), 103-108. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-06-10-0085>
- Savi, G. D., Gomes, T., Canever, S. B., Feltrin, A. C., Piacentini, K. C., Scussel, R., Oliveira, D., Machado-de-Ávila, R. A., Cargnin, M., Angioletto, E. (2020). Application of ozone on rice storage: A mathematical modeling of the ozone spread, effects in the decontamination of filamentous fungi and quality attributes. *Journal of Stored Products Research*, *87*, 101605. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2020.101605>
- Savi, G. D., Piacentini, K. C., Bittencourt, K. O., Scussel, V. M. (2014). Ozone treatment efficiency on *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol degradation and its effects on whole wheat grains (*Triticum aestivum* L.) quality and germination. *Journal of Stored Products Research*, *59*, 245-253. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2014.03.008>
- Sciorsci, R. L., Lillo, E., Occhiogrosso, L., Rizzo, A. (2020). Ozone therapy in veterinary medicine: A review. *Research in Veterinary Science*, *130*, 240-246. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.03.026>
- Sirohi, R., Tarafdar, A., Kumar Gaur, V., Singh, S., Sindhu, R., Rajasekharan, R., Madhavan, A., Binod, P., Kumar, S., Pandey, A. (2021). Technologies for disinfection of food grains: Advances and way forward. *Food Research International*, *145*, 110396. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110396>
- Sivaranjani, S., Prasath, V. A., Pandiselvam, R., Kothakota, A., & Mousavi Khaneghah, A. (2021). Recent advances in applications of ozone in the cereal industry. *LWT*, *146*, 111412. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111412>
- Suman, M. (2021). Last decade studies on mycotoxins' fate during food processing: An overview. *Current Opinion in Food Science*, *41*, 70-80. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.015>
- Tabla, R., Roa, I. (2022). Use of gaseous ozone in soft cheese ripening: Effect on the rind microorganisms and the sensorial quality. *LWT*, *170*, 114066. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114066>
- Tiwari, B. K., Brennan, C. S., Curran, T., Gallagher, E., Cullen, P. J., O' Donnell, C. P. (2010). Application of ozone in grain processing. *Journal of Cereal Science*, *51*(3), 248-255. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.01.007>
- Trombete, F., Minguita, A., Porto, Y., Freitas-Silva, O., Freitas-Sá, D., Freitas, S., Carvalho, C., Saldanha, T., Fraga, M. (2016). Chemical, Technological, and Sensory Properties of Wheat Grains (*Triticum aestivum* L.) as Affected by Gaseous Ozonation. *International Journal of Food Properties*, *19*(12), 2739-2749. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1144067>
- Ünal, D., Sel, T. (2019). Ozone Application and Usage in Veterinary Medicine. *Eurasian Journal of Health Sciences*, *2*(4), 182-190.
- Ünusan, N. (2019). Systematic review of mycotoxins in food and feeds in Turkey. *Food Control*, *97*, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.10.015>
- Vanier, N. L., El Halal, S. L. M., Dias, A. R. G., da Rosa Zavareze, E. (2017). Molecular structure, functionality and applications of oxidized starches: A review. *Food Chemistry*, *221*, 1546-1559.



<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.138>

Violleau, F., Pernot, A.-G., Surel, O. (2012). Effect of Oxygreen® wheat ozonation process on bread dough quality and protein solubility. *Journal of Cereal Science*, 55(3), 392-396. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.01.014>

Wang, L., Luo, Y., Luo, X., Wang, R., Li, Y., Li, Y., Shao, H., Chen, Z. (2016). Effect of deoxynivalenol detoxification by ozone treatment in wheat grains. *Food Control*, 66, 137-144. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.01.038>

Yildiz, P. O., Yangilar, F. (2014). Ozon ve Gıda Endüstrisinde Kullanım Alanları. *BEU Journal of Science*, 3 (1), 94-101.

Zhang, Y., Mahidul Islam Masum, Md., Gao, C., Cheng, Y., Guan, J. (2022). Ozone reduces the

fruit decay of postharvest winter jujube by altering the microbial community structure on fruit surface. *Microbiological Research*, 262, 127110. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127110>

Zhu, F. (2018). Effect of ozone treatment on the quality of grain products. *Food Chemistry*, 264, 358-366. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.047>

Zhu, L., Ma, Q., Chen, J., Zhao, G. (2022). Current progress on innovative pest detection techniques for stored cereal grains and thereof powders. *Food Chemistry*, 396, 133706. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133706>



## EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM FENUGREEK LEAVES BY MACERATION WITH D-OPTIMAL DESIGN

**Izzet TURKER, Hilal ISLEROGLU\***

Tokat Gaziosmanpaşa University, Faculty of Engineering and Architecture, Food Engineering Dept., Tokat,  
Turkey

Received / Geliş: 04.11.2022; Accepted / Kabul: 14.02.2023; Published online / Online baskı: 27.02.2023

Turker, I., Isleroglu, H. (2023). Extraction of Bioactive Compounds from Fenugreek Leaves by Maceration with D-optimal Design. GIDA (2023) 48 (2) 305-316 doi: 10.15237/gida.GD22108

Turker, I., Isleroglu, H. (2023). D-optimal Tasarım ile Çemen Otu Yapraklarından Biyoaktif Bileşenlerin Maserasyon Yoluyla Ekstraksiyonu. GIDA (2023) 48 (2) 305-316 doi: 10.15237/gida.GD22108

### ABSTRACT

In this study, optimum extraction conditions of bioactive compounds from fenugreek leaves (*Trigonella foenum graecum* L.) were investigated using response surface methodology and the extracts having the highest total phenolic content, total flavonoid compounds, antioxidant activity and total saponin content were achieved. The independent process variables were solvent mixture ratio (water and ethanol, 0-100%), temperature (25-65°C) and sample-solvent ratio (10-50 g/L), and a constant extraction time of 120 minutes was used for all the design points. The experimental study was arranged according to D-optimal combined design and the process conditions were optimized using desirability function approach. Results showed that the extraction of phenolic compounds and antioxidant activity were increased at increasing water ratios and temperature and decreasing sample-solvent ratio. Saponins were extracted better when 25% ethanol was used as solvent. The optimum extraction conditions were determined as 100% of water, 49.71°C of temperature, and 10 g/L of sample-solvent ratio.

**Key words:** Fenugreek leaves, phenolic compounds, extraction, optimization, saponin

### D-OPTİMAL TASARIM İLE ÇEMEN OTU YAPRAKLARINDAN BİYOAKTİF BİLEŞENLERİN MASERASYON YOLUYLA EKSTRAKSİYONU

### ÖZ

Bu çalışmada çemen otu (*Trigonella foenum graecum* L.) yapraklarından biyoaktif bileşenlerin optimum ekstraksiyon koşulları yanıt yüzey yöntemi kullanılarak belirlenmiş ve en yüksek toplam fenolik madde, toplam flavonoid, antioksidan aktivite ve toplam saponin içeriğine sahip ekstraktlar elde edilmiştir. Çözgen karışım oranı (su ve etanol, %0-100), sıcaklık (25-65°C) ve örnek-çözgen oranı (10-50 g/L) bağımsız işlem değişkenleri olarak seçilmiş ve tasarımın tüm noktalarında 120 dakikalık ekstraksiyon süresi sabit olarak uygulanmıştır. Deneysel çalışma D-optimal birleşik tasarıma göre düzenlenmiş ve istenirlik fonksiyonu yaklaşımı kullanılarak işlem koşulları optimize edilmiştir. Sonuçlara göre çözgünde bulunan suyun yüzdesi ve ekstraksiyon sıcaklığı arttıkça, örnek-çözgen oranı azaldıkça fenolik bileşenlerin miktarı artış göstermiştir. Saponinler ise çözgen olarak %25 etanol kullanıldığında daha iyi ekstrakte edilmişlerdir. Optimum ekstraksiyon koşulları %100 saf su, 49.71°C ekstraksiyon sıcaklığı ve 10 g/L örnek-çözgen oranı olarak belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Çemen otu yaprağı, fenolik bileşenler, ekstraksiyon, optimizasyon, saponin

\* Corresponding author /Yazışmalardan sorumlu yazar

✉: hilal.isleroglu@gop.edu.tr

☎: (+90) 356 252 1616/2888

☎: (+90) 356 252 1729

Izzet Turker; ORCID no: 0000-0003-0107-1962

Hilal Isleroglu; ORCID no: 0000-0002-4338-9242

## INTRODUCTION

Fenugreek (*Trigonella-foenum graecum* L.) is a medicinal plant and originates from Western Asia and Southeastern Europe (Khoja et al., 2021). Fenugreek seeds are used as spices and the leaves of the plant consumed as a green vegetable in the diet. Both fresh and dried fenugreek leaves are edible, and fenugreek leaves are reported as a good source of various minerals and vitamins, especially they are rich in choline (Srinivasan, 2006). In literature, the beneficial effects of fenugreek on hyperglycemia, hyperinsulinemia, and glycosylated hemoglobin were presented and it was also reported that the consumption of fenugreek could help controlling body weight, liver glycogen and have a significant effect on carbohydrate metabolic enzymes (Devi et al., 2003; Srinivasan, 2006). The fenugreek can also show antidiabetic effects. Moreover, fenugreek can lower the serum cholesterol, can raise HDL-cholesterol, can have lipid lowering effects in mellitus diet, and can improve the amount of the fecal excretion (Chaturvedi and Pant, 1987; Chaturvedi and Pant, 1988; Annida et al., 2004). Because of its health benefits, fenugreek leaves are freshly consumed; however, most of the fenugreeks have been discarded, the seeds of the plant are mostly used for spice production or medicinal purposes. Fenugreek leaves have a great potential for obtaining biomaterials and simple extraction methods can be used for this purpose. Extraction is a unit operation used to separate or produce bioactive materials from the plants or foods (Chouhan et al., 2019). Extraction conditions extensively affect the extraction yield or activity of the bioactive compounds, and the important parameters for an extraction process are generally defined as the solvent type, sample-solvent ratio and the temperature (Goli et al., 2005; Belguith-Hadriche et al., 2013; Zuorro et al., 2016). In literature, there are several studies reporting that the extraction yield of phenolic materials can be enhanced by increasing the temperature (Yang et al., 2009; Mokrani et al., 2016). Temperature increment may lead to get a softer plant texture, so that phenol-protein and phenol-polysaccharide interactions get weakened. This phenomenon can ensure obtaining higher amounts of phenolics in the extract (Mokrani et

al., 2016). On the other hand, the extraction yields of phenolic compounds may get lowered at increasing temperatures, therefore it is important to determine the optimum extraction temperature for an individual plant or the food (Silva et al., 2007; Ballard et al., 2009; Yim et al., 2012). In literature, maceration has been used extensively for the extraction of biomaterials from different parts of the plants. It is a cheap and a consistent method to produce phenolic-rich extracts. For this reason, it is vital to determine the optimum extraction conditions to produce fenugreek leaf extracts having the maximum amount of phenolics and saponins. To the best of our knowledge, there is no study in the literature presenting the optimum extraction conditions of biomaterials from the fenugreek leaves.

In this study, the extraction conditions namely solvent mixture ratio, sample-solvent ratio and temperature were evaluated to obtain phenolic compounds from the fenugreek leaves and were optimized to achieve the highest amount of the bioactive materials.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant Material

Fenugreek leaves were provided from a local farmer at the harvest time in August 2021, and the plants were provided from Kayseri Province. The area where the plants were harvested located in the central Anatolia region with the geographical coordinates of 38° 44' north and 35° 29' east, and the elevation above sea level was 1054 m. Fenugreeks were harvested when the plants reached their peak of vegetative growth (2 months after planting, before flowering). Prior to extraction processes, the fresh leaves were pulled out from the plant stems and then the leaves were dried in the shade for 72 hours until their moisture contents were lower than 10% ( $8.42 \pm 0.22\%$ , wet basis). After that, the dry leaves were crumbled by hand and the samples were sieved through a sieve having 630  $\mu\text{m}$  pore diameter to remove the dust and soil residuals. The dried and cleaned samples were stored in dark at room temperature (25°C) for further analysis.

### Chemicals

Diosgenin was purchased from Cayman Chemical (Michigan, USA). Quercetin was purchased from BLD Pharmatech Ltd. (Shanghai, China). Sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ ) and analytical grade ethanol were purchased from Tekkim Chemicals (Istanbul, Turkey). Folin-Ciocalteu reagent, sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), aluminum chloride ( $\text{AlCl}_3$ ), potassium persulfate ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ), sodium acetate ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) and sulfuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) were purchased from Merck Chemicals (Darmstadt, Germany). Gallic acid, sodium hydroxide ( $\text{NaOH}$ ), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), Trolox and vanillin were purchased from Sigma-Aldrich Co. (Steinheim, Germany). The chemicals used in this study were of analytical grade.

### Extraction process and experimental design

Maceration was applied using water and ethanol as solvents to obtain biochemicals from the fenugreek leaves. The dried fenugreek leaves and water-ethanol mixture were agitated at 400 rpm

for 120 minutes using a magnetic stirrer having a heating unit. Beakers with a volume of 100 ml were used as the extraction containers. The temperature of the magnetic stirrer was adjusted to the temperature value specified in the experimental design for each run. The lids of the beakers were kept close during the extraction process. After that, the samples were centrifuged at 4637 g (Hettich 320 R, Germany) for five minutes and then were filtered using a coarse filter paper. Filtered samples were used for the chemical analyses. The percentage of water in the solvent mixture (0-100%), percentage of ethanol in the solvent mixture (0-100%), temperature (25-65°C) and sample-solvent ratio (10-50 g/L) were chosen as independent variables. The experimental D-optimal combined design is shown in Table 1. Response surface methodology was used to optimize the extraction conditions of biomaterials from the fenugreek leaves ensuring the highest total phenolic compounds (TPC), total flavonoid compounds (TFL) and antioxidant activity (AA) (both DPPH and ABTS methods) according to the desirability function approach.

Table 1. The experimental design and analysis results

Run	Water	Ethanol	Temperature	Sample-solvent	TPC	TFL	AA (DPPH)	AA (ABTS)	TSC
	(%) C <sub>1</sub>	(%) C <sub>2</sub>	(°C) X <sub>1</sub>	(g/L) X <sub>2</sub>					
1	50	50	45	30	19.20±0.16	9.68±0.13	0.87±0.00	7.86±0.07	20.78±0.17
2	0	100	35	20	5.80±0.10	2.98±0.09	0.23±0.02	2.07±0.04	7.72±0.40
3	75	25	25	50	23.02±0.16	11.64±0.06	1.10±0.03	9.27±0.32	20.84±0.21
4	100	0	65	10	25.65±0.45	13.06±0.03	1.20±0.01	10.97±0.22	20.72±0.64
5	100	0	35	20	25.47±0.24	12.63±0.13	1.25±0.03	10.50±0.42	17.65±0.32
6	50	50	45	30	18.84±0.24	9.52±0.11	0.88±0.03	7.30±0.33	21.08±0.09
7	0	100	65	50	8.06±0.80	4.01±0.06	0.35±0.01	3.30±0.09	13.51±0.13
8	75	25	25	10	23.53±0.38	11.81±0.03	1.10±0.01	9.65±0.13	21.36±0.26
9	75	25	25	10	22.99±0.13	11.48±0.03	1.08±0.02	8.96±0.13	24.09±0.26
10	100	0	65	50	22.59±0.32	10.94±0.08	1.05±0.01	9.36±0.09	17.26±0.13
11	0	100	65	10	10.17±0.80	4.99±0.02	0.48±0.00	3.88±0.27	11.62±0.64
12	50	50	45	30	19.53±0.20	9.46±0.03	0.90±0.01	7.35±0.04	21.02±0.60
13	0	100	25	50	2.58±0.76	1.51±0.01	0.14±0.00	0.82±0.21	7.19±0.05
14	25	75	65	10	14.45±1.12	6.90±0.20	0.75±0.01	5.99±0.49	16.90±0.64
15	66.67	33.33	55	20	21.71±0.18	10.43±0.12	1.04±0.04	8.98±0.02	21.29±0.32
16	25	75	25	50	12.38±0.22	6.25±0.06	0.64±0.00	5.06±0.04	15.78±0.15
17	75	25	55	40	23.52±0.28	11.48±0.09	1.08±0.00	9.90±0.14	21.18±0.39
18	0	100	65	50	7.79±0.15	4.10±0.13	0.41±0.01	2.98±0.12	12.29±0.05
19	25	75	65	10	14.72±0.29	7.18±0.15	0.69±0.01	5.87±0.22	18.27±0.52
20	100	0	65	50	22.88±0.41	11.33±0.12	1.07±0.02	9.14±0.11	17.15±0.13
21	75	25	65	10	22.52±0.92	11.13±0.05	1.03±0.01	8.51±0.58	22.55±0.64
22	100	0	25	50	24.98±1.02	12.62±0.12	1.19±0.01	10.06±0.30	13.38±0.05
23	25	75	25	10	12.49±0.06	6.23±0.03	0.67±0.02	5.39±0.62	15.17±0.52
24	25	75	25	10	12.72±0.89	6.54±0.04	0.69±0.00	5.96±0.36	14.44±0.26

TPC: Total Phenolic Content (mg gallic acid/g dry sample), TFL: Total Flavonoid Compounds (mg quercetin/g dry sample), AA: Antioxidant Activity (mg Trolox/g dry sample), TSC: Total Saponin Content (mg diosgenin/g dry sample), ± values represent the standard deviations between two values of the related analysis results.

### Analysis

#### *Total phenolic compounds*

Folin-Ciocalteu method described by Singleton and Rossi (1965) was used for the determination of TPC. 250  $\mu$ L of sample was mixed with 250  $\mu$ L of Folin-Ciocalteu reagent diluted with ultrapure (Milli-Q) water (1:1, v/v). 500  $\mu$ L of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (210 g/L) solution and 4 mL of ultrapure water were mixed with this mixture. The samples were centrifuged at 1456 g (Hettich Eba 21, Germany) for 10 minutes after incubation at 25°C for 25 minutes. The absorbance of the supernatants was measured at 760 nm (T80+, PG Instruments, United Kingdom) and gallic acid was used as a standard. The TPC were presented as mg gallic acid/g dry sample.

#### *Total flavonoid compounds*

Spectrophotometric aluminium chloride method was used to determine TFL of the fenugreek leaf extracts (Belguith-Hadriche et al., 2013). The diluted samples (1:10, 1 mL) were mixed with 4 mL of ultrapure water and 0.3 mL of 5%  $\text{NaNO}_2$  in a 15 mL test tube. This mixture was incubated for 5 minutes at 25°C. Following that, 0.3 mL of 10%  $\text{AlCl}_3$  was added to the test tube and incubated for 6 minutes. After incubation, 2 mL of 1 M NaOH solution was added, and the volume of the solution reached 10 mL with ultrapure water. The absorbance of the samples was read at 510 nm, and total flavonoid compounds (TFL) were expressed as mg quercetin/g dry sample.

#### *Antioxidant activity*

DPPH and ABTS methods were used for the determination of the antioxidant activity (AA) of the samples. Slightly modified version of DPPH method was performed following to the method of Pajak et al. (2019). We mixed 50  $\mu$ L of sample with 1.95 mL of 0.1 mM DPPH and this mixture was incubated for 30 minutes in dark at 25°C. We determined the absorbance of the samples at 515 nm wavelength. The AA of the fenugreek leaf extracts was expressed as mg Trolox/g dry sample.

Slightly modified version of ABTS-reducing AA analysis was performed according to the

procedure of Pajak et al. (2019). ABTS- $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  solution was prepared using 7 mM ABTS stock solution and 2.45 mM  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  solution. These solutions were mixed on an equal basis and incubated for at least 16 hours at room temperature and in the dark. Following to incubation, 1 mL of this solution was diluted with 54 mL of buffer solution (20 mM sodium acetate, pH 4.5), and a 0.700 absorbance value was set at 734 nm wavelength. We mixed 150  $\mu$ L of extract and 2850  $\mu$ L of adjusted solution of ABTS and incubated it for 30 minutes at room temperature and in the dark. The AA (ABTS) of samples was presented as mg Trolox/g dry sample.

#### *Total saponin content*

The method of Akbari et al. (2019) with slight modifications was used for the determination of TSC of the extracts. 0.2 mL of the extract was mixed with 0.35 mL of 0.8% vanillin prepared in ethanol and 0.8 mL of distilled water. After that, 1.25 mL of  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (72%, v/v) was added to the tube and the cap of the tube was closed, and this mixture was gently mixed. Then the cap was loosened, and the samples were placed into a water bath adjusted to 60°C and were incubated for 10 minutes. When incubation time ended, all the samples were taken rapidly into an ice bath. The absorbance values of the samples were measured at 544 nm, and TSC values of the samples were expressed as mg diosgenin/g dry sample.

### Statistical analysis

One-sample t-test for the optimum point validation was carried out using the SPSS 22.0 (IBM, USA) package program. The regression analysis which was used to determine the effects of the independent process variables on the responses, and the Design Expert 7.0 (Stat-Ease Inc., USA) package program was used for the optimization study.

### RESULTS AND DISCUSSION

The total phenolic compounds (TPC), total flavonoid compounds (TFL), total saponin (TSC) and antioxidant activity (AA) of the extracts are shown in Table 1. In all conditions, when the solvent was used as only water (100%), the TPC,

TFL and AA values were increased (Table 1). Bioactive compounds of the plant materials are generally extracted with only water and organic solvents (or their mixtures) (Spigno et al., 2007). Our results can be correlated to the polarity of the extraction solvent, and more active compounds' solubility in water than that of in ethanol (Liu et al., 2012). Water and ethanol can be considered as the best solvents for the phenolic compounds extraction from the plant materials (Akbari et al., 2019; Isleroglu and Turker, 2022). However, it is vital to determine the solvent type and percentage of the solvent mixtures for the extraction of bioactive compounds to obtain the highest yield. Our results showed that only water can be used as the extraction solvent to obtain phenolic-rich extracts from the fenugreek leaves which supported the findings of Isleroglu and Turker (2022). Similarly, Fernández-Agulló et al. (2013) reported that only distilled water was the best solvent for the extraction of polyphenols from walnut green husks. Vuong et al. (2011) also reported that the preparation of plant extracts such as papaya leaf extracts, water is the most accessible, the safest and the lowest polluting solvent.

Sample–solvent ratio is another important parameter for the extraction of biomaterials. In general, lower ratios of sample–solvent ratio generate a higher concentration gradient, and this phenomenon increases the driving force of the mass transfer between the sample and the solvent. Hence, the extraction of biomaterials from the samples can be enhanced owing to the increased contact area between the solvent and the sample's surface area (Yancheshmeh et al., 2022). In this study, the highest results were obtained at the conditions having the lowest sample–solvent ratio (10 g/L). Optimization of the temperature is critical for the extraction processes. It was observed that TPC, TFL and AA values were decreased at the highest temperature of the design (65°C). However, TSC values behaved differently from the TPC, TFL and AA values. At lower temperature (25°C), TSC extraction could not be done efficiently, and 75% water percentage–25% ethanol percentage gave the highest TSC values. Same as our study, better saponin extraction was

determined at the presence of ethanol in the solvent mixture, and the ethanol percentage of 25 to 100% affected positively the amount of total saponins (Kwon et al., 2003; Heng et al., 2006). In literature, there are many studies about the fenugreek seed extracts; however, there are only a few studies about phenolic extraction from the fenugreek leaves and none of them are optimization study. Mashkor (2014) used three different solvents to extract phenolics from the fenugreek seeds, and they reported 0.259 mg gallic acid/g dry sample of TPC, which was significantly lower than that of our findings. They also reported that acetone was the most suitable solvent for the phenolic extraction. Higher values of TPC for the fenugreek leaves were found by Hussain et al. (2016) (4.25–4.34 mg gallic acid/g dry sample), but these values were still lower than that of our findings. Only Khan et al. (2022) reported similar results (14.01 mg gallic acid/g sample) in their recent study. More studies should be presented to compare the TPC, TFL and AA values of the fenugreek leaf extracts.

The effects of the process variables on the TPC, TFL, AA and TSC of fenugreek leaf extracts were shown in the analysis of variance (ANOVA) table (Table 2). All the generated models were significant ( $P < 0.05$ ), and lack of fit values were not significant statistically ( $P > 0.05$ ). One of the most important criteria required for the generated models to be able to explain the experimental data with high accuracy is the lack of fit data found to be statistically insignificant (Myers and Montgomery, 1995). In this study, the statistically insignificant values of lack of fit ( $P > 0.05$ ) demonstrated that the success of the generated models for the TPC, TFL, AA and TSC of the fenugreek leaf extracts. Results also showed that the linear mixture effect was significant on the TPC, TFL, AA and TSC values ( $P < 0.05$ ) (Table 2). Interaction of the water percentage–ethanol percentage had the most significant effect for all responses ( $P < 0.05$ ). On the other hand, the interaction of ethanol percentage–temperature–sample–solvent ratio did not exhibit a significant effect on any of the responses ( $P > 0.05$ ). The determined model parameters significantly affected the responses ( $P < 0.05$ ) (Table 2).

Statistical results of the modelling of the TPC, TFL, AA (DPPH) and AA (ABTS) values were also shown in Table 2. The coefficient of determination ( $R^2$ ) values of all different responses were  $>0.988$  which indicated that the generated models were adequate and high

proportion of variability was explained by the data. Moreover, the closeness of the  $R^2$  and adjusted  $R^2$  values showed the goodness of the models, and it was a proof that only statistically significant terms were included in the generated models (Table 2).

Table 2. ANOVA table and statistical parameters

Source	DF	Sum of Squares				
		TPC	TFL	DPPH	ABTS	TSC
Model	11	1112.25	269.83	2.35	188.60	473.62
Linear mixture	1	1013.04	246.91	2.13	172.41	197.74
$C_1C_2$	1	39.36	8.47	0.077	6.22	164.82
$C_1X_1$	1	1.39	0.32	$3.84 \times 10^{-3}$	$9.1 \times 10^{-3}$	5.35
$C_1X_2$	1	3.78	1.01	$5.74 \times 10^{-3}$	0.62	17.60
$C_2X_1$	1	22.98	5.37	0.044	3.45	35.11
$C_2X_2$	1	4.49	0.80	0.010	1.24	2.15
$C_1C_2X_1$	1	0.21	0.23	$5.09 \times 10^{-3}$	0.16	6.45
$C_1C_2X_2$	1	4.55	1.01	$2.38 \times 10^{-3}$	0.88	0.75
$C_1X_1X_2$	1	0.53	0.52	$2.42 \times 10^{-3}$	0.32	0.78
$C_2X_1X_2$	1	$1.09 \times 10^{-3}$	$1.11 \times 10^{-5}$	$3.10 \times 10^{-3}$	0.044	0.096
$C_1C_2X_1X_2$	1	0.75	0.28	$5.64 \times 10^{-3}$	0.30	0.044
Residual	12	0.93	0.36	0.021	2.18	9.42
Lack of Fit	5	0.41	0.11	0.016	1.51	3.69
Pure Error	7	0.52	0.25	$4.39 \times 10^{-3}$	0.67	5.73
Total	23	1113.18	270.19	2.37	190.78	483.03
	$R^2$	$adj\text{-}R^2$	<i>Adequate Precision</i>	<i>PRESS</i>	<i>C.V. (%)</i>	
TSC	0.9992	0.9984	116.53	5.34	1.60	
TFL	0.9987	0.9974	93.86	1.47	2.00	
DPPH	0.9961	0.9926	57.57	0.05	3.33	
ABTS	0.9886	0.9781	33.00	10.53	6.05	
TSC	0.9781	0.9663	30.39	30.88	4.88	

Source	DF	F Value				
		TPC	TFL	DPPH	ABTS	TSC
Model	11	1298.67	817.79	123.30	94.32	54.87
Linear mixture	1	13011.15	8231.72	1228.54	948.46	251.99
$C_1C_2$	1	505.48	282.33	44.21	34.24	210.04
$C_1X_1$	1	17.83	10.72	2.22	0.050	6.82
$C_1X_2$	1	48.52	33.62	3.31	3.43	22.43
$C_2X_1$	1	295.19	179.04	25.62	18.99	44.74
$C_2X_2$	1	57.64	26.77	5.91	6.84	2.74
$C_1C_2X_1$	1	2.70	7.65	2.94	0.90	8.23
$C_1C_2X_2$	1	58.42	33.68	1.38	4.83	0.96
$C_1X_1X_2$	1	6.78	17.21	1.39	1.76	1.00
$C_2X_1X_2$	1	0.014	$3.69 \times 10^{-4}$	0.018	0.24	0.12
$C_1C_2X_1X_2$	1	9.58	9.40	0.033	1.65	0.056
Residual	12					
Lack of Fit	5	1.11	0.65	5.22	3.13	0.90
Pure Error	7					
Total	23					

Table 2. devam

Source	DF	p - Value				
		TPC	TFL	DPPH	ABTS	TSC
Model	11	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Linear mixture	1	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
C <sub>1</sub> C <sub>2</sub>	1	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
C <sub>1</sub> X <sub>1</sub>	1	0.0012	0.0067	0.1623	0.8264	0.0227
C <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1	< 0.0001	< 0.0001	0.0937	0.0890	0.0005
C <sub>2</sub> X <sub>1</sub>	1	< 0.0001	< 0.0001	0.0003	0.0009	< 0.0001
C <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	1	< 0.0001	0.0002	0.0317	0.0226	0.1238
C <sub>1</sub> C <sub>2</sub> X <sub>1</sub>	1	0.1265	0.0171	0.1121	0.3627	0.0141
C <sub>1</sub> C <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	1	< 0.0001	< 0.0001	0.2636	0.0484	0.3475
C <sub>1</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1	0.0231	0.0014	0.2605	0.2089	0.3374
C <sub>2</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1	0.9077	0.9850	0.8957	0.6323	0.7324
C <sub>1</sub> C <sub>2</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1	0.0093	0.0098	0.8598	0.2235	0.8163
Residual	12					
Lack of Fit	5	0.4334	0.6747	0.0557	0.0847	0.5296
Pure Error	7					
Total	23					

C<sub>1</sub>: Water (%), C<sub>2</sub>: Ethanol (%), X<sub>1</sub>: Temperature (°C), X<sub>2</sub>: Sample-solvent ratio (g/L), TPC: Total Phenolic Compounds, TFL: Total Flavonoid Compounds, TSC: Total Saponin Content, DF: Degrees of Freedom, Adj- R<sup>2</sup>: Adjusted R<sup>2</sup>, PRESS: Predicted residual error sum of squares, C.V. (%): Coefficient of variation

The effect of the different process variables on the TPC, TFL, AA and TSC was shown with the response surface graphs in Figure 1. Response surface graphs visually supported our findings, and the higher percentage of water usage for the extraction increased the TPC, TFL, and AA values. The red regions on the Figure 1 show the highest values obtained in the experimental design. For the Figure 1 (a-d), at 10 g/L of sample-solvent ratio where the highest results were obtained, the temperature increment positively affected the extraction of the phenolics, flavonoids and antioxidant activity of the extracts. Vuong et al. (2013) reported that the optimum extraction temperature of papaya leaf polyphenols (using only distilled water as the solvent) was between at 50 and 70°C. They also reported that the extraction efficiency of the polyphenols decreased when the temperature was lower or higher than this temperature range. Irakli et al. (2018) extracted bioactive compounds (25-60°C) from the olive leaves such as oleuropein, phenolic acids and flavonoids. Researchers reported that it

is vital to determine the optimum extraction temperature, because the temperatures beyond a certain value may decompose some phenolic materials, and the low temperatures than that of the optimum value may result with having lower extraction yields. In our study, similar graphs were obtained for the TPC, TFL, and AA values which indicated that AA values were mainly depended on TPC and TFL for the fenugreek leaf extracts. On the other hand, different trend of the TSC is observed in the Figure 1(e). TSC had the higher values at the water percentage of 75%.

Five different second-order polynomial models were generated for the extraction of bioactive compounds from fenugreek leaves, and the TPC, TFL, AA (DPPH), AA (ABTS), and TSC values were maximized to obtain the optimum extraction conditions (Equations 1-5). The relationships between the experimental and predicted data are shown in Figure 2, it was clearly observed that these values were close to each other.

$$\begin{aligned} \text{TPC} &= 0.26C_1 + 0.02C_2 + 1.81 \times 10^{-3}C_1C_2 - 2.97 \times 10^{-6}C_1X_1 - 5.27 \times 10^{-5}C_1X_2 + 1.28 \times 10^{-3}C_2X_1 - 5.91 \times 10^{-4}C_2X_2 \\ &\quad + 9.95 \times 10^{-7}C_1C_2X_2 - 1.05 \times 10^{-5}C_1X_1X_2 + 7.77 \times 10^{-7}C_1C_2X_1X_2 \end{aligned} \quad (1)$$

$$\begin{aligned} \text{TFL} &= 0.13C_1 + 1.21 \times 10^{-3}C_2 + 1.19 \times 10^{-3}C_1C_2 + 1.59 \times 10^{-4}C_1X_1 + 1.96 \times 10^{-4}C_1X_2 + 6.22 \times 10^{-4}C_2X_1 \\ &\quad - 2.43 \times 10^{-4}C_2X_2 - 2.25 \times 10^{-5}C_1C_2X_1 - 4.55 \times 10^{-6}C_1C_2X_2 - 1.03 \times 10^{-5}C_1X_1X_2 + 4.78 \times 10^{-8}C_1C_2X_1X_2 \end{aligned} \quad (2)$$



$$\begin{aligned} \text{DPPH} &= 1.43 \times 10^{-2} C_1 + 6.79 \times 10^{-4} C_2 + 7.54 \times 10^{-5} C_1 C_2 + 6.45 \times 10^{-5} C_2 X_1 - 1.94 \times 10^{-5} C_2 X_2 \end{aligned} \quad (3)$$

$$\begin{aligned} \text{ABTS} &= 9.77 \times 10^{-2} C_1 + 1.65 \times 10^{-2} C_2 + 1.09 \times 10^{-3} C_1 C_2 + 4.09 \times 10^{-4} C_2 X_1 - 4.36 \times 10^{-4} C_2 X_2 - 6.36 \times 10^{-6} C_1 C_2 X_2 \end{aligned} \quad (4)$$

$$\begin{aligned} \text{TSC} &= 1.76 \times 10^{-1} C_1 + 7.60 \times 10^{-3} C_2 + 4.75 \times 10^{-3} C_1 C_2 + 7.08 \times 10^{-4} C_1 X_1 - 1.04 \times 10^{-3} C_1 X_2 \\ &\quad + 1.59 \times 10^{-3} C_2 X_1 - 4.56 \times 10^{-5} C_1 C_2 X_1 \end{aligned} \quad (5)$$

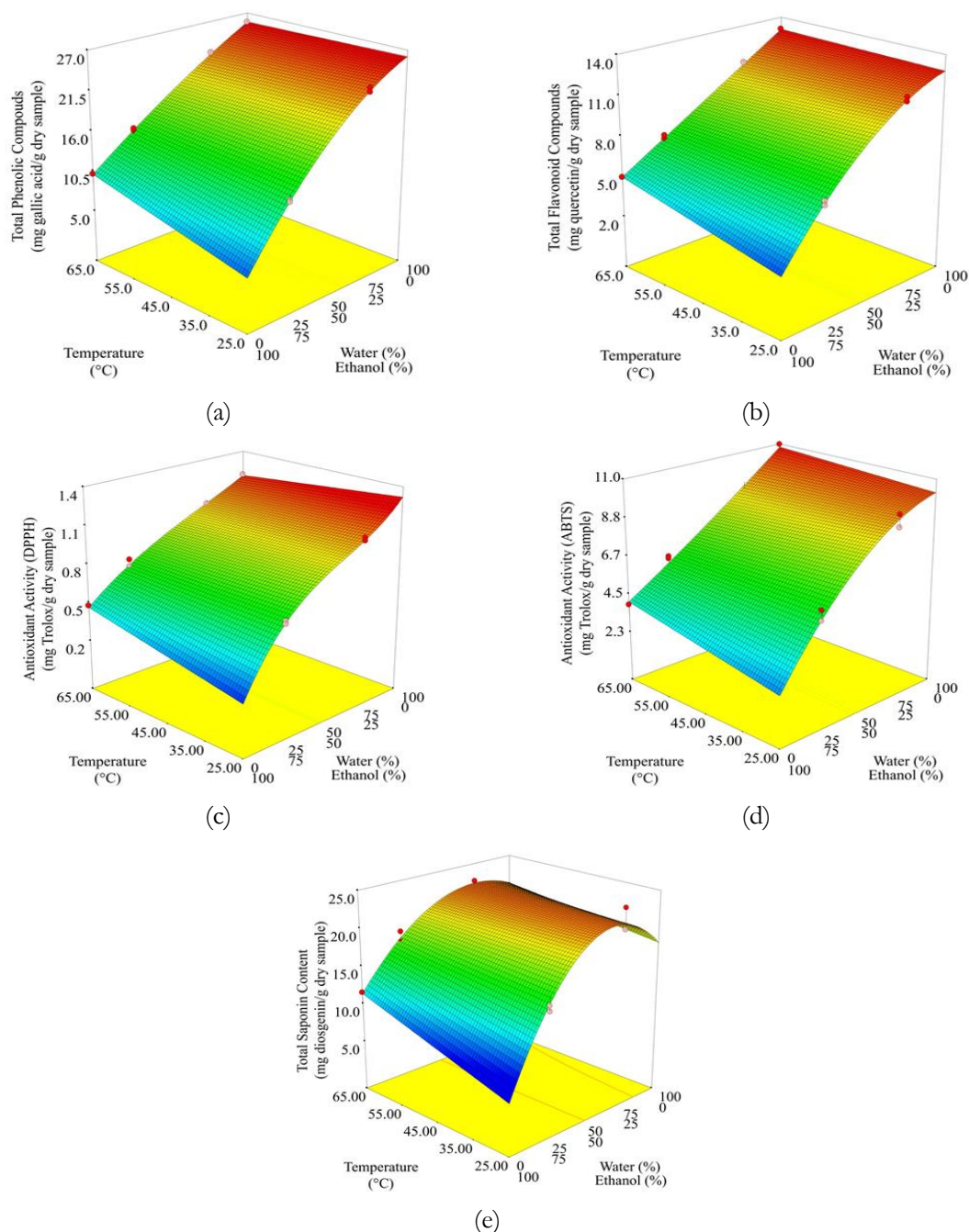


Figure 1. Response surface graphs for (sample–solvent ratio level of 10 g/L): (a) total phenolic compounds, (b) total flavonoid compounds, (c) antioxidant activity-DPPH, (d) antioxidant activity-ABTS, and (e) total saponin content of fenugreek leaf extracts

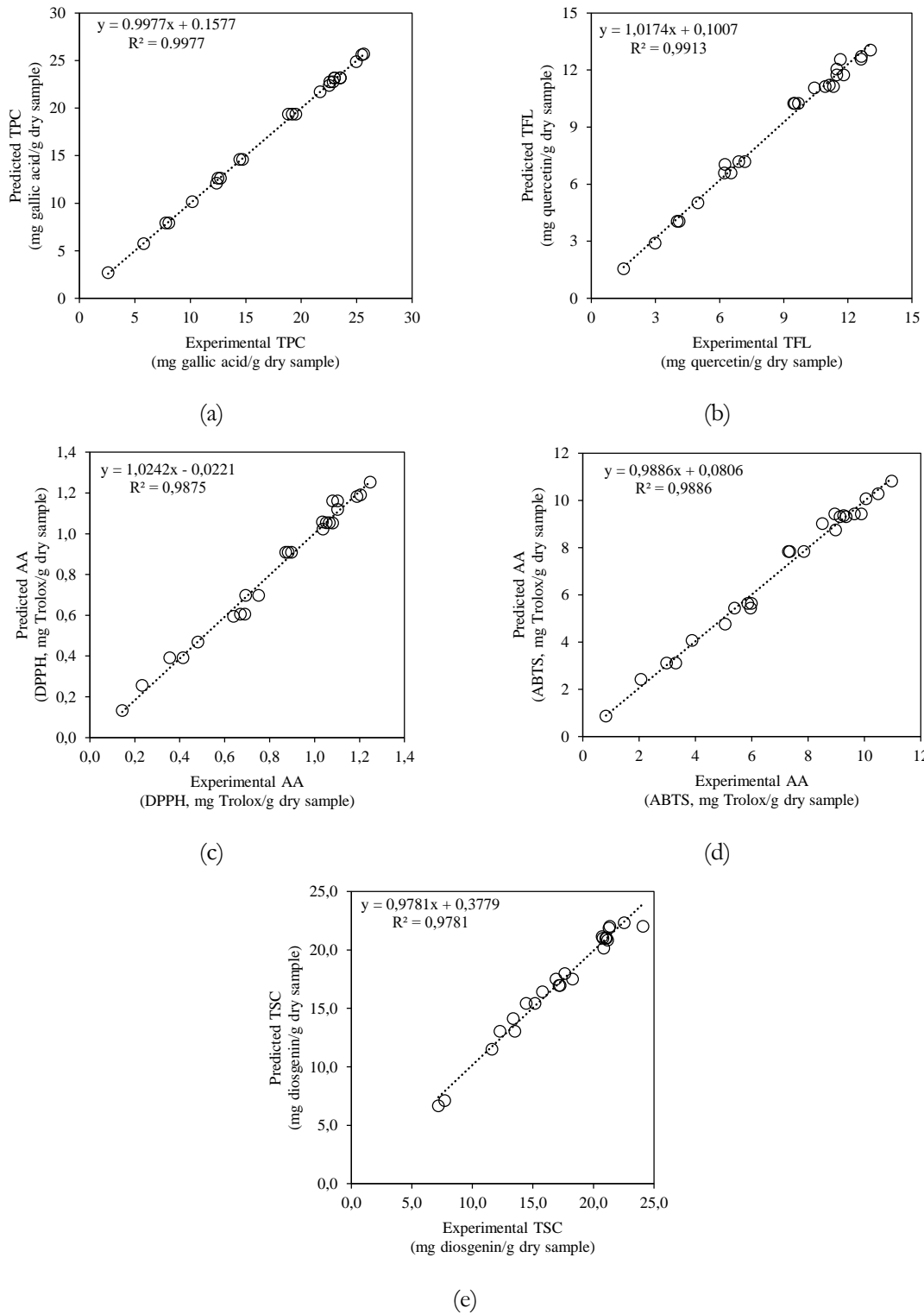


Figure 2. The relation between predicted and experimental data for: (a) total phenolic compounds, (b) total flavonoid compounds, (c) antioxidant activity-DPPH, (d) antioxidant activity-ABTS, and (e) total saponin content of fenugreek leaf extracts

Extraction process was subjected to numerical optimization to determine the optimum process conditions. We found out four different but quite similar optimization results and one of these results having the highest desirability (0.989) was chosen as the optimum point. The predicted optimum extraction conditions were determined as follows: 100% of water, 49.71°C of temperature, and 10.00 g/L of sample–solvent ratio. At this point, TPC was 25.869 mg gallic acid/g dry sample, TFL was 12.968 mg quercetin/g dry sample, AA (DPPH) was 1.247 mg Trolox/g dry sample and AA (ABTS) was 10.607 mg Trolox/g dry sample. The optimum point verification tests were done in thrice. According to the single sample t-test, there was no significant difference between experimental and predicted values at the optimum point ( $P > 0.05$ ).

In this study, phenolic compounds of the fenugreek leaves were extracted and the optimum process conditions ensuring the highest phenolic content, flavonoid content and antioxidant activity were determined by the response surface methodology. Our results showed that water percentage of 100% had the best extraction performance. Other extraction parameters namely extraction temperature and sample–solvent ratio also affected the responses. Our research showed that fenugreek leaves are worth to be investigated because of its high bioactive compounds, and the fenugreek leaf extracts can be produced by cheap and effective methods. Fenugreek leaf extracts produced using only water can be used in the model foods for the future researches.

#### CONFLICT OF INTEREST

As authors we declare there is no conflict of interest.

#### AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Hilal Isleroglu: Project administration, supervision, conceptualization, methodology, writing - review & editing. Izzet Turker: Investigation, formal analysis, writing-review & editing. The final version of the manuscripts was read by all authors.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financially supported by Tokat Gaziosmanpasa University Scientific Research Projects Committee (Project No: 2020/125).

#### REFERENCES

- Akbari, S., Abdurahman, N.H., Yunus, R.M. (2019). Optimization of saponins, phenolics, and antioxidants extracted from fenugreek seeds using microwave-assisted extraction and response surface methodology as an optimizing tool. *Comptes Rendus Chimie*, 22(11-12), 714-727. DOI: 10.1016/j.crci.2019.07.007
- Annida, B., Stanely Mainzen Prince, P. (2004). Supplementation of fenugreek leaves lower lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Medicinal Food*, 7(2), 153-156. DOI: 10.1089/1096620041224201
- Ballard, T.S., Mallikarjunan, P., Zhou, K., O'Keefe, S.F. (2009). Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from peanut skins using response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(8), 3064-3072. DOI: 10.1021/jf8030925
- Belguith-Hadriche, O., Bouaziz, M., Jamoussi, K., Simmonds, M.S., El Feki, A., Makni-Ayedi, F. (2013). Comparative study on hypocholesterolemic and antioxidant activities of various extracts of fenugreek seeds. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1448-1453. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.11.003
- Chaturvedi, V. Pant, M.C. (1987). Effect of feeding *Trigonella foenum-graecum* leaves on serum cholesterol, triglycerides and high density lipoprotein cholesterol in the normal rabbits. *Current Science*, 56, 600–601.
- Chaturvedi, V., Pant, M.C. (1988). Effect of feeding fenugreek leaves (*Trigonella foenum-graecum*) on faecal excretion of total lipids and sterols in the normal albino rabbits. *Current Science*, 57, 81–82.
- Chouhan, K.B.S., Tandey, R., Sen, K.K., Mehta, R., Mandal, V. (2019). Extraction of phenolic principles: value addition through effective sample pretreatment and operational improvement. *Journal of Food Measurement and*

- Characterization*, 13(1), 177-186. DOI: 10.1007/s11694-018-9931-0
- Devi, B.A., Kamalakkannan, N., Prince, P.S.M. (2003). Supplementation of fenugreek leaves to diabetic rats. Effect on carbohydrate metabolic enzymes in diabetic liver and kidney. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 17(10), 1231-1233. DOI: 10.1002/ptr.1357
- Fernández-Agulló, A., Pereira, E., Freire, M. S., Valenta, P., Andrade, P. B., González-Álvarez, J., Pereira, J. A. (2013). Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Industrial Crops and Products*, 42, 126-132. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.05.021
- Goli, A.H., Barzegar, M., Sahari, M.A. (2005). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*, 92(3), 521-525. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.08.020
- Heng, L., Vincken, J.P., Hoppe, K., Van Koningsveld, G.A., Decroos, K., Gruppen, H., ... Voragen, A.G.J. (2006). Stability of pea DDMP saponin and the mechanism of its decomposition. *Food Chemistry*, 99(2), 326-334. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.07.045
- Hussain, P.R., Suradkar, P., Javaid, S., Akram, H., Parvez, S. (2016). Influence of postharvest gamma irradiation treatment on the content of bioactive compounds and antioxidant activity of fenugreek (*Trigonella foenum-graceum* L.) and spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 33, 268-281. DOI: 10.1016/j.ifset.2015.11.017
- 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. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.07.070
- Isleroglu, H., Turker, I. (2022). Ultrasonic-assisted extraction and thermal stability of phytochemicals from fenugreek leaves. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 30, 100390. DOI: 10.1016/j.jarmap.2022.100390
- Khan, M.K.I., Ghauri, Y.M., Alvi, T., Amin, U., Khan, M.I., Nazir, A., ... Maan, A.A. (2022). Microwave assisted drying and extraction technique; kinetic modelling, energy consumption and influence on antioxidant compounds of fenugreek leaves. *Food Science and Technology*, 42, e56020. DOI: 10.1590/fst.56020
- Khoja, K.K., Aslam, M.F., Sharp, P. A., Latunde-Dada, G.O. (2021). In vitro bioaccessibility and bioavailability of iron from fenugreek, baobab and moringa. *Food Chemistry*, 335, 127671. DOI: 10.1002/ptr.1357
- Kwon, J.H., Lee, G.D., Bélanger, J.M., Jocelyn Paré, J.R. (2003). Effect of ethanol concentration on the efficiency of extraction of ginseng saponins when using a microwave-assisted process (MAP™). *International Journal of Food Science & Technology*, 38(5), 615-622. DOI: 10.1046/j.1365-2621.2003.00688.x
- Liu, Y., Kakani, R., Nair, M.G. (2012). Compounds in functional food fenugreek spice exhibit anti-inflammatory and antioxidant activities. *Food Chemistry*, 131(4), 1187-1192. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.09.102
- Mashkor, I.M. (2014). Phenolic content and antioxidant activity of fenugreek seeds extract. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 6(4), 841-844.
- Mokrani, A., Madani, K. (2016). Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. Separation and Purification Technology, 162, 68-76. DOI: 10.1016/j.seppur.2016.01.043
- Myers, R.H., Montgomery, D.C. (eds.) (1995). *Response Surface Methodology, Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, 2nd ed. John Wiley and Sons, New York, USA, 700 p.
- Pająk, P., Socha, R., Broniek, J., Królikowska, K., Fortuna, T. (2019). Antioxidant properties, phenolic and mineral composition of germinated chia, golden flax, evening primrose, phacelia and

- fenugreek. *Food Chemistry*, 275, 69-76. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.09.081
- Silva, E. M., Rogez, H., Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 55(3), 381-387. DOI: 10.1016/j.seppur.2007.01.008
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Spigno, G., Tramelli, L., De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 200-208. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021
- Srinivasan, K. (2006). Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*): A review of health beneficial physiological effects. *Food Reviews International*, 22(2), 203-224. DOI: 10.1080/87559120600586315
- Vuong, Q. V., Golding, J. B., Stathopoulos, C. E., Nguyen, M. H., Roach, P. D. (2011). Optimizing conditions for the extraction of catechins from green tea using hot water. *Journal of Separation Science*, 34(21), 3099-3106. DOI: 10.1002/jssc.201000863
- Vuong, Q. V., Hirun, S., Roach, P. D., Bowyer, M. C., Phillips, P. A., Scarlett, C. J. (2013). Effect of extraction conditions on total phenolic compounds and antioxidant activities of *Carica papaya* leaf aqueous extracts. *Journal of Herbal Medicine*, 3(3), 104-111. DOI: 10.1016/j.hermed.2013.04.004
- Yancheshmeh, B. S., Panahi, Y., Allahdad, Z., Abdolshahi, A., Zamani, Z. (2022). Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from *Achillea kellalensis* using response surface methodology. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 28, 100355. DOI: 10.1016/j.jarmap.2021.100355
- Yang, B., Liu, X., Gao, Y. (2009). Extraction optimization of bioactive compounds (crocin, geniposide and total phenolic compounds) from *Gardenia* (*Gardenia jasminoides* Ellis) fruits with response surface methodology. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(4), 610-615. DOI: 10.1016/j.ifset.2009.03.003
- Yim, H.S., Chye, F.Y., Koo, S.M., Matanjun, P., How, S.E., Ho, C.W. (2012). Optimization of extraction time and temperature for antioxidant activity of edible wild mushroom, *Pleurotus porrigens*. *Food and Bioprocess Processing*, 90(2), 235-242. DOI: 10.1016/j.fbp.2011.04.001
- Zuorro, A., Maffei, G., Lavecchia, R. (2016). Reuse potential of artichoke (*Cynara scolimus* L.) waste for the recovery of phenolic compounds and bioenergy. *Journal of Cleaner Production*, 111, 279-284. DOI: 10.1016/j.jclepro.2015.06.011



## SOME DETERIORATION PARAMETERS OF EDIBLE OILS AND FATS SOLD IN TÜRKİYE MARKETS

**Ali Osman GÜNDÜZ, Ayhan BAŞTÜRK\***

Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, Van Yüzüncü Yıl University, Van, Türkiye

Received / Geliş: 01.01.2023; Accepted / Kabul: 17.02.2023; Published online / Online baskı: 27.02.2023

Gündüz, A. O., Baştürk, A. (2023). Some deterioration parameters of edible oils and fats sold in Türkiye markets. GIDA (2023) 48 (2) 317-332 doi: 10.15237/ gida.GD23010

Gündüz, A. O., Baştürk, A. (2023). Türkiye pazarlarında satılan yemeklik sıvı ve katı yağların bazı bozulma parametreleri. GIDA (2023) 48 (2) 317-332 doi: 10.15237/ gida.GD23010

### ABSTRACT

In this study, some deterioration parameters were determined in nine different types of edible fats and oils (46 samples) obtained from the Turkish market, their compliance with the Turkish Food Codex and Standards was evaluated and compared with the literature. Six samples including (3 margarines, 2 shortenings and 1 riviera olive oil) had peroxide value (PV) that exceeded the codex limit. The oils with the highest PVs were found to be fish oils (8.5-27.4 meqO<sub>2</sub>/kg), peanut oils (9.2-32.1 meqO<sub>2</sub>/kg) and extra virgin olive oils (10.37-17.66 meqO<sub>2</sub>/kg). Free fatty acidity (FFA) content of one of the riviera olive oils (1.29%) and extra virgin olive oil (0.81-1.13%) sample were above the limit value of the Codex. The highest conjugated-diene and -triene were determined in fish oils (9.12-12.3 and 2.42-5.60, respectively). The p-Anisidine values in hazelnut and fish oils ranged from 2 to 61.

**Keywords:** Edible oils, free fatty acidity, deterioration parameters, oxidation, peroxide value, p-Anisidine

### TÜRKİYE PAZARLARINDA SATILAN YEMEKLİK SIVI VE KATI YAĞLARIN BAZI BOZULMA PARAMETRELERİ

#### ÖZ

Bu çalışmada, Türkiye pazarından temin edilen dokuz çeşit yemeklik katı ve sıvı yağda (46 numune) bazı bozulma parametreleri belirlenmiş, bunların Türk Gıda Kodeksi gerekliliklerine uygunluğu değerlendirilmiş ve literatür ile karşılaştırılmıştır. Altı numunede kodeks limitini aşan peroksit sayısı (PS) tespit edilmiştir (3 margarin, 2 katı yağ ve 1 riviera zeytinyağı). En yüksek PS'na sahip yağlar balık yağları (8.5-27.4 meqO<sub>2</sub>/kg), yer fıstığı yağları (9.2-32.1 meqO<sub>2</sub>/kg) ve natürel sızma zeytinyağı (10.37-17.66 meqO<sub>2</sub>/kg) olmuştur. Serbest yağ asitliği (SYA) oranları riviera zeytin yağlarının birinde ve sızma zeytinyağının tamamında sınır değerinin üzerinde çıkmıştır. En yüksek konjuge-dien ve -trien balık yağlarında belirlenmiştir (sırasıyla 9.12-12.3 ve 2.42-5.60). SYA oranları riviera zeytinyağının birinde (%1.29) ve natürel sızma zeytinyağının tamamında (%0.81-1.13) sınır değerinin üzerinde çıkmıştır. Fındık ve balık yağlarında bulunan p-Anisidin değerleri 2 ile 61 arasında değişmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Yemeklik yağlar, serbest yağ asitliği, bozulma parametreleri, oksidasyon, peroksit değeri, p-Anisidin

\*Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar

✉: ayhanbasturk@yyu.edu.tr

☎: +(90) 432 225 1727

☎: +(90) 432 225 1730

Ali Osman Gündüz; ORCID no: 0000-0002-8056-6789

Ayhan Baştürk; ORCID no: 0000-0001-7701-9306

## INTRODUCTION

Fats and oils are vital food components in human nutrition. When stored under inappropriate conditions, they decompose as a result of oxidative and hydrolytic reactions. All fats and oils may undergo oxidation during storage. The level of oxidation depends primarily on external factors such as storage temperature, air (oxygen) concentration and light, as well as minor components such as fatty acid profile, moisture and other impurities, and processing quality. Fat oxidation does not only cause changes in taste, odor and color in foods, but also causes harmful effects on human health by reducing the nutritional quality and safety due to decomposition products (Das, 1991; Rodriguez-Estrada and Caboni, 2002; Zhang et al., 2010). Edible oils with higher unsaturated fatty acids content, especially polyunsaturated fatty acids, are more susceptible to oxidation (Kapich et al., 2010). The oxidation of edible oils begins with the double bonds of fatty acids in the triacylglycerol molecule. The first products of lipid oxidation are hydroperoxides, which are tasteless and odorless and therefore do not significantly impair the sensory quality of the oil (Reindl and Stan, 1982). Since hydroperoxides are generally unstable compounds, they are converted to secondary products of oxidation such as ketones, aldehydes, alcohols, lactones, hydrocarbons and esters. Some of these components, even at very low levels, significantly impair the taste and odor of the oils and fats. Hydrolytic reactions are measured by determining the FFA content in fats and oils. PV, conjugated diene ( $K_{232}$ ) and conjugated triene ( $K_{270}$ ) as primary oxidation products; p-Anisidine value (p-AV) and TBARS analyzes are used as secondary oxidation products (Baştürk, 2019; Chinprahast et al., 2016; Shahidi, 1998; Shi et al., 2015) in determining the oxidation rate in fats and oils.

Within the scope of this study, sunflower oil (7 brands), hazelnut oil (4 brands), corn oil (6 brands), natural extra virgin olive oil (7 brands), riviera olive oil (7 brands), margarine and shortening (9 brands), peanut oil (2 brands), and fish oil capsules (4 brands) which are sold and consumed widely in the markets of Türkiye were

investigated. PV,  $K_{232}$  and  $K_{270}$  measured to monitor the primary products of oxidation, p-AV and TOTOX values were determined to measure secondary products of oxidation, and FFA was measured as an indicator of hydrolytic degradation in all oils and fats samples. The results obtained were evaluated according to the Turkish Food Codex and compared with the literature.

## MATERIALS AND METHODS

### Material

Different cooking oils, fish oils, margarines and shortenings used in the study were obtained in 2019 from Türkiye local markets. Their names and number of brands are shown in Table 1. Extra virgin olive oil is obtained by cold pressing, that is, it is not refined. Riviera olive oil consists of 20% extra virgin olive oil and 80% refined olive oil. Diethyl ether, methanol, sodium hydroxide, sodium bromide, ethyl acetate, glacial acetic acid, acetone and sodium thiosulfate were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). The purity of the chemicals was ensured.

### Methods

#### Preparation of samples

The lipid fractions of margarine and fats were obtained by melting the fats and centrifuged and then filtered through anhydrous sodium sulfate by removing the upper oil phase. In margarines and shortenings, analysis were performed only in the lipid phase. Encapsulated fish oils were removed from the capsules with a sterile needle. Edible oils were obtained from the market. All oils and fats samples were stored at 4 °C in dark until the experiments. Sample brand numbers, types, production dates and codes are presented in Table 1.

#### Determination of free fatty acidity

FFA of oil samples were determined according to AOCS Official Method Ca 5a-40 (AOCS, 2004). Experiments were performed in triplicate and the mean value was used.

Table 1. Description of the samples

Sample names	The number of brands	Production date	Packaging type	Sample code
Sunflower oil (Refined)	seven different brands	March-June 2019	plastic oil bottle (1 liter)	SO1, SO2, SO3, SO4, SO5, SO6, SO7
Hazelnut oil (Refined)	four different brands	September-December 2018	metal tin can (1 liter)	HO1, HO2, HO3, HO4
Peanut oil (Refined)	two different brands	June-August 2018	plastic oil bottle (1 liter)	PO1, PO2
Corn oil (Refined)	six different brands	January-May 2019	plastic oil bottle (1 liter)	CO1, CO2, CO3, CO4, CO5, CO6
ExtraVirgin Olive Oil (Cold-pressed)	seven different brands	4 of them 2018, 3 of them 2019	2 plastic oil bottles (1 liter), 4 glass oil bottles (250 ml), 1 glass oil bottle (150 ml)	EVOO1, EVOO2, EVOO3, EVOO4, EVOO5, EVOO6, EVOO7
Riviera olive oil (Blend from refined and cold pressed)	seven different brands	5 of them 2018, 2 of them 2019	2 plastic oil bottles (1 liter), 4 glass oil bottles (250 ml), 1 glass oil bottle (750 ml)	ROO1, ROO2, ROO3, ROO4, ROO5, ROO6, ROO7
Pastry oil (Shortening) (Refined)	three different brands	March-July 2019	paper package (250 gr, 1 kg, 2.5 kg)	S1, S2, S3
Margarine (Refined)	six different brands	March-May 2019	Package (250 gr)	M1, M2, M3, M4, M5, M6
Fish oil (capsule) (Native-Refined)	four different brands	2 of them July-December 2018, 2 of them January-June 2019	capsule in a capped bottle	FO1, FO2, FO3, FO4

**Peroxide value**

Peroxide values were determined according to AOCS Official Method Cd 8-53 (AOCS, 1989a). All samples were analysed in triplicate. PVs were calculated according to Equation 1.

$$PV = \frac{V \times T \times 1000}{m} \quad (1)$$

where PV= Peroxide value (meqO<sub>2</sub>/kg oil), V= Used sodium thiosulfate solution (mL), T= normality of sodium thiosulfate solution, m = sample weight (g)



**p-Anisidine value**

The p-AV analysis was carried out according to AOCS Official Method Cd 18-90 (AOCS, 1998). 0.5 g oil sample was weighed into a 25 mL graduated flask, completed with hexane up to the scale line. The absorbance of the test tube filled with hexane without sample was read at 350 nm ( $A_1$ ). 5 mL oil (m) was taken into the test tube. 1 mL p-AV (0.25 g/100 mL glacial acetic acid) was added to the test tube. After 10 minutes the absorbance ( $A_2$ ) of the sample was read at 350 nm against the reference cell prepared with hexane and p-AV without sample. The value of p-AV was calculated according to the Equation 2.

$$\text{p-AV} = \frac{25 \times [(1.2 \times A_2) - A_1]}{m} \quad (2)$$

m: Sample weight (g)

**Total oxidation value**

The total oxidation value (Totox) was calculated by adding 2 times PV with the p-AV value (Equation 3) (Shahidi and Wanasundara, 2002).

$$\text{Totox} = (2 \times \text{PV}) + \text{p-AV} \quad (3)$$

**Conjugated-diene and -triene**

Analysis was done according to AOCS Official Method Ch 5-91 (AOCS, 1989b). Specific absorption values were calculated by Equation 4.

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} = K_\lambda = \frac{A_\lambda}{c \times l} \quad (4)$$

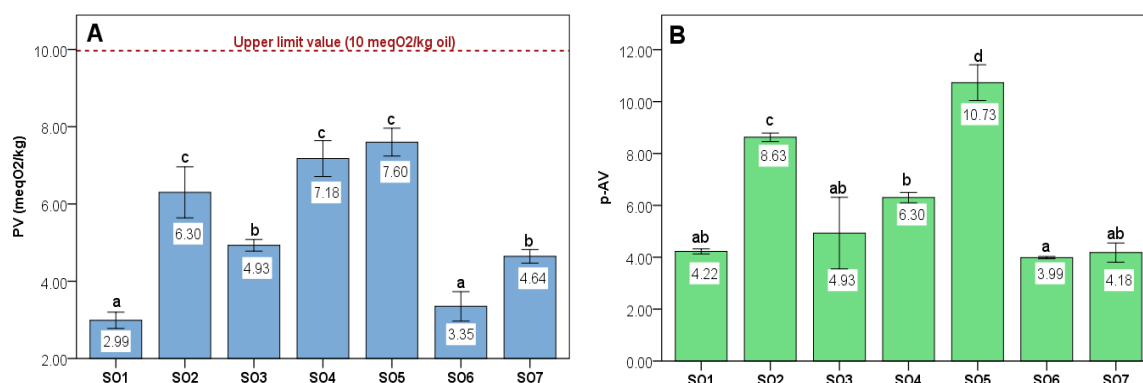
where  $K_\lambda$  = Specific absorption value,  $A_\lambda$  = Absorbance value, c = Concentration of solution (g/100 mL), l = Quartz cuvette length (cm)

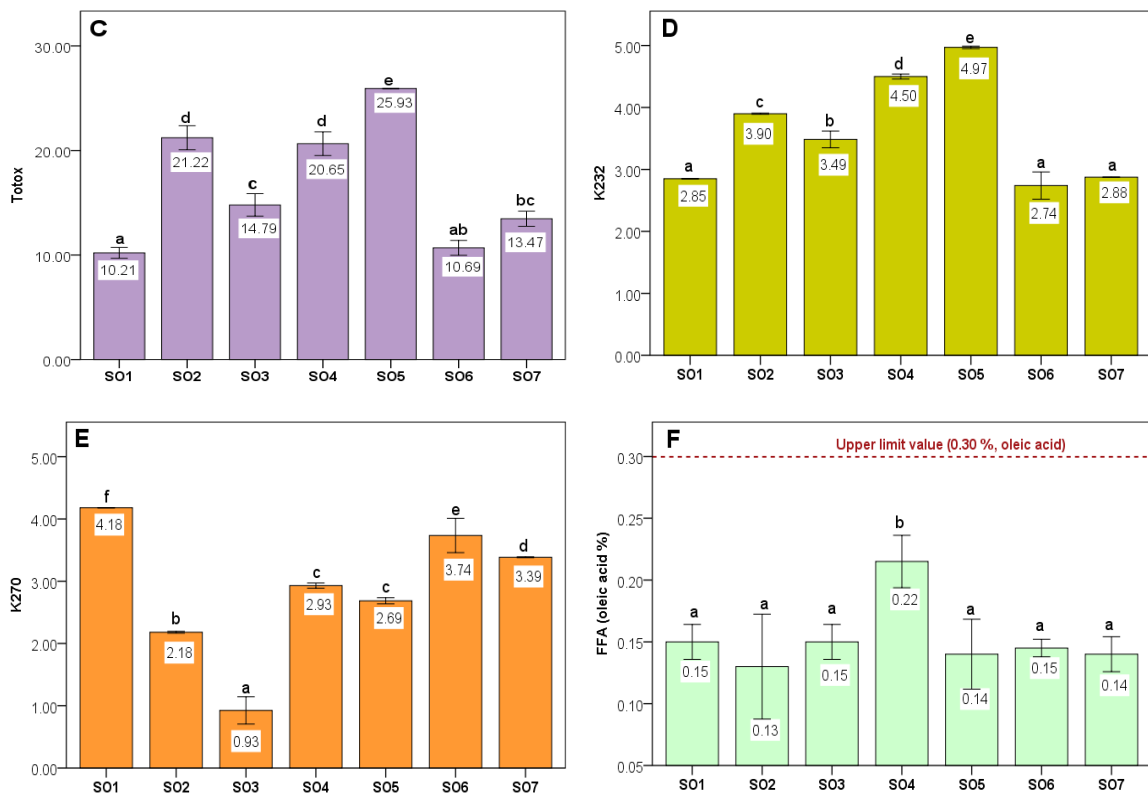
**Statistical analysis**

All data were statistically analyzed using SPSS (version 20.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, Illinois) package program by conducting one-way analysis of variance (ANOVA), and defining a significant difference at  $P < 0.05$  by Duncan test. Besides, the experiments were evaluated by performing three independent measurements for all treatment and expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD).

**RESULTS AND DISCUSSION****Sunflower oils**

The PV, p-AV, totox,  $K_{232}$ ,  $K_{270}$ , and FFA values found in samples of sunflower oil from seven different brands are shown in Figure 1.





SO1-SO7: Sunflower oils (different brands). Different lowercase letters indicate the difference between the mean values of the samples ( $P < 0.05$ ). The upper limit values are the values specified by the “Turkish Food Codex Communiqué on Oils Called by Plant Name” (TGK, 2012).

Figure 1. Certain properties determined in sunflower oils

PV values of the samples were determined the range between 2.99-7.60 meqO<sub>2</sub>/kg ( $P < 0.05$ ). These values are below the 10 meqO<sub>2</sub>/kg PV upper limit value specified in the Turkish Food Codex Communiqué on Oils with Plant Name (TGK, 2012). PV is the primary oxidation product formed by storage of oils under unsuitable conditions (exposure to factors such as heat, light, heavy metal ions, etc.). The PVs of sunflower oils coded with SO2, SO4, and SO6 showed no significant differences.

The p-AV value is a colorimetric measurement (350 nm) based on the color change produced by the reaction between the p-AV reagent and secondary oxidation components (aldehydes, ketones, alcohols and acids). p-AV is a secondary oxidation parameter that occurs as a result of the breakdown of peroxides in the later stages of oxidation in oils and fats. p-AVs of oils and fats ranged between 3.99 to 10.73. The SO5 sample

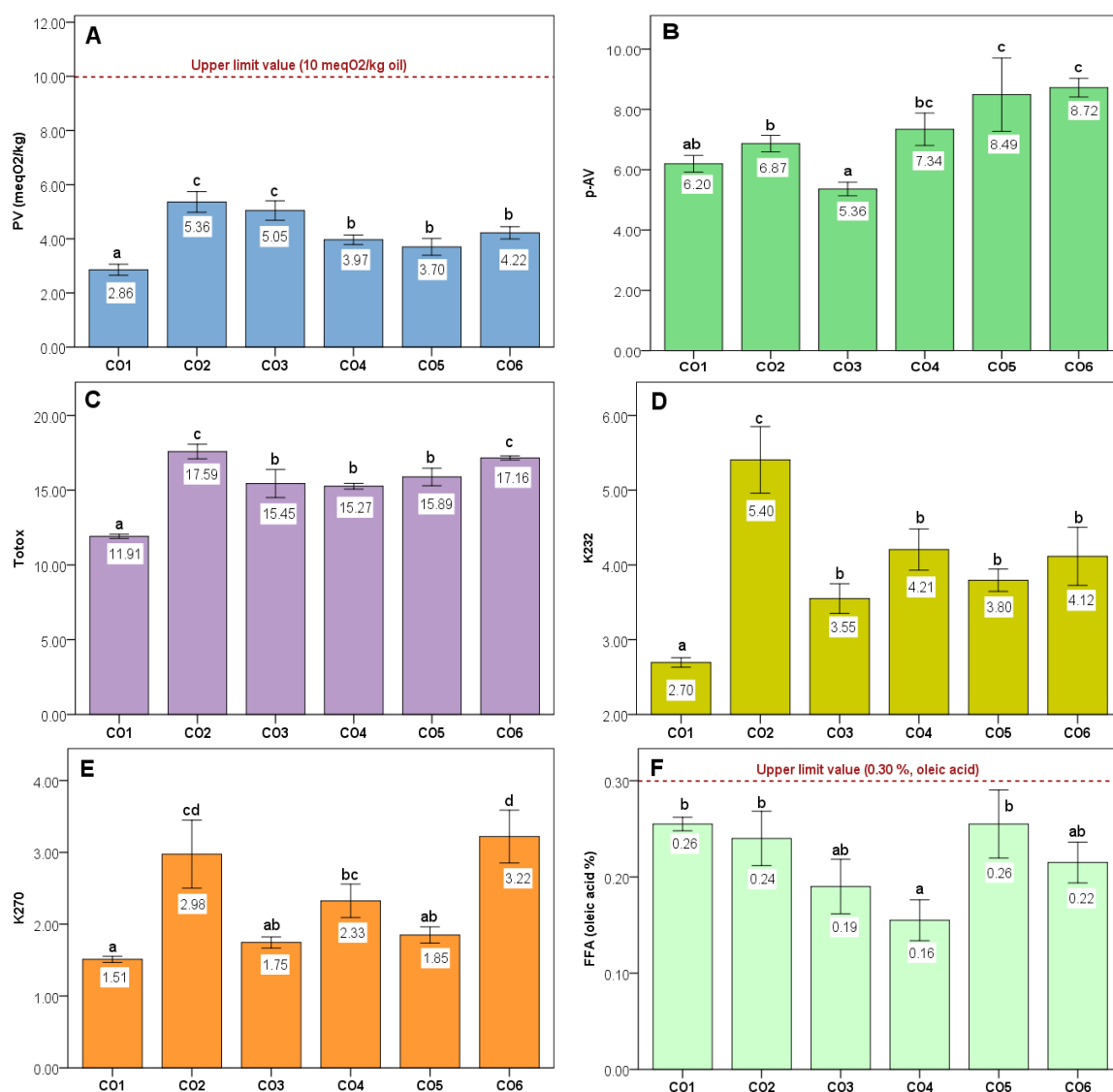
revealed the greatest level, and the SO6 sample revealed the lowest amount. The p-AVs of SO1, SO3 and SO7 sunflower oils were close to each other. However, the values of these and other samples were significantly different ( $P < 0.05$ ). Totox values of SOs varied in the range of 10.21-25.93 ( $P < 0.05$ ). In a previous study, PV, p-AV and totox values in sunflower oil were reported as 4.6 meqO<sub>2</sub>/kg, 5.12 and 14.32, respectively (Ali et al., 2013). Anjum et al. (2006) determined the PVs of 3.77 and 2.60 meqO<sub>2</sub>/kg and p-AVs as 3.24 and 4.99, respectively, in two different sunflower oils. These findings are consistent with the results of our study. Totox values in SO samples were in the range of 10.2 to 25.9 ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference between SO2 and SO4 totox values (Figure 1C). K<sub>232</sub> value was determined in the range of 2.74-4.97 ( $P < 0.05$ ) (Figure 1D), and K<sub>270</sub> was determined in the range of 0.93-4.18 ( $P < 0.05$ ) (Figure 1E). K<sub>232</sub> and K<sub>270</sub> values were reported by Ali et al. (2014) as 1.14

and 0.55, and as 13.18 and 1.66 respectively, by Javidipour et al. (2017) in sunflower oils. Anjum et al. (2006) determined the  $K_{232}$  value as 4.10 and 9.66, and the  $K_{270}$  value as 0.60 and 0.58 in two different sunflower oils. FFA was determined in the range of 0.13-0.22 % in terms of oleic acid in sunflower oil samples (Figure 1F). According to the Turkish Food Codex Communiqué on Oils with Plant Name (TGK, 2012), FFA (in oleic acid, %) in edible sunflower oils should be at most 0.3%. In this case, all the sunflower oil samples

were found to comply with the standard in terms of FFA. This value was determined as 0.16% by Ali et al. (2013) and as 0.10% by Javidipour et al. (2017). Our results were in accordance with the literature.

### Corn oils

PV, p-AV, totox,  $K_{232}$ ,  $K_{270}$  and FFA values determined in six different brands of corn oil samples are shown in Figure 2.



CO1-CO6: Corn oils (different brands). Different lowercase letters indicate the difference between the mean values of the samples ( $P < 0.05$ ). The upper limit values are the values specified by the "Turkish Food Codex Communiqué on Oils Called by Plant Name" (TGK, 2012).

Figure 2. Certain properties determined in corn oils

PVs varying between 2.86-5.36 meqO<sub>2</sub>/kg in the samples ( $P < 0.05$ ) were found appropriate in the codex (Maximum 10 meqO<sub>2</sub>/kg). There were no significant differences between the PVs of CO4, CO5, and CO6 samples. In previous studies, PV in corn oil was determined as 0.8 meqO<sub>2</sub>/kg by Ahmad et al. (2011), 2.55 meqO<sub>2</sub>/kg by Inanc Horuz and Maskan (2015), 4.34 meqO<sub>2</sub>/kg by Ali et al. (2016), 10.2 meqO<sub>2</sub>/kg by Bantchev et al. (2011), 9.96 meqO<sub>2</sub>/kg Baştürk et al. (2018), 2.26 meqO<sub>2</sub>/kg El Boulifi et al. (2010), 3.3 meqO<sub>2</sub>/kg Günç Ergönül and Nergiz (2014) and 3.02 meqO<sub>2</sub>/kg Karakaya and Simsek (2011). Some of these findings were in accordance with our results.

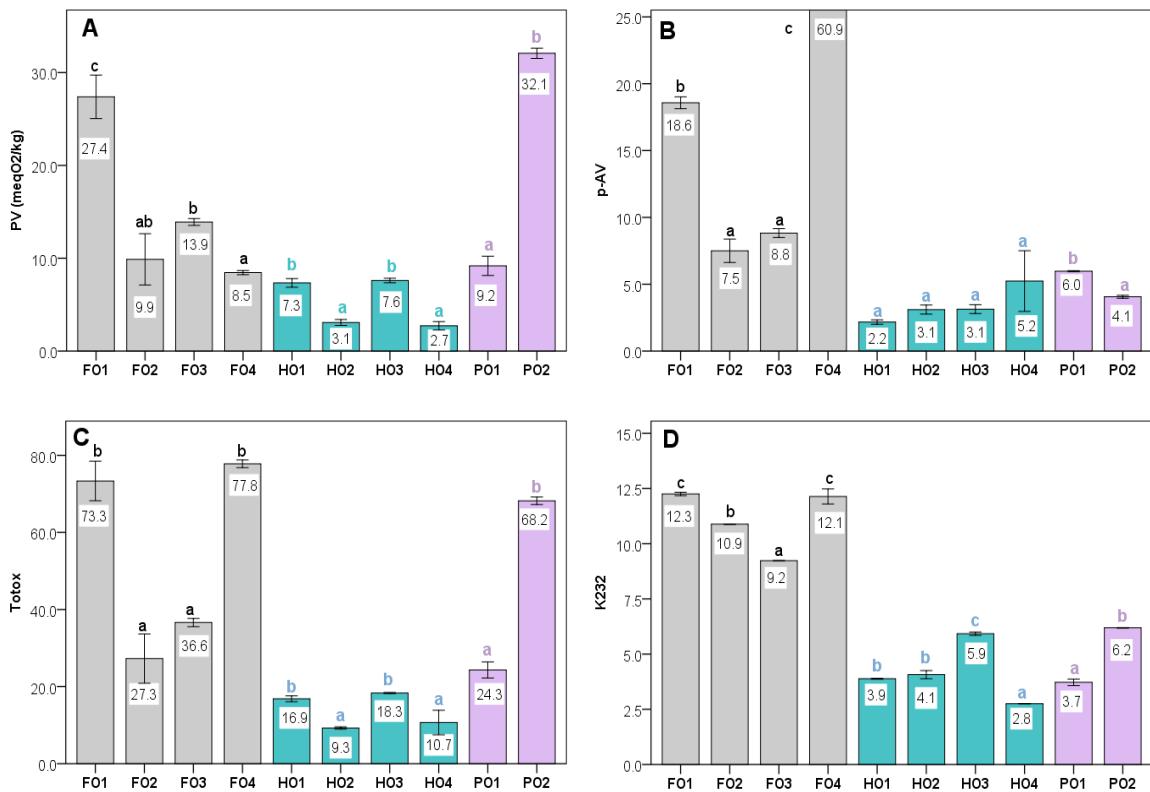
As seen in Figure 2B, p-AVs were found in the range of 5.36-8.72 ( $P < 0.05$ ). In corn oil, p-AV was determined as 2.85 by Inanc Horuz and Maskan (2015), 1.44 by Günç Ergönül and Nergiz (2014), and 1.36 by Inanc and Maskan (2013). Totox values in the samples were determined in the range of 11.91-17.59. Totox values did not differ significantly in CO3, CO4 and CO5

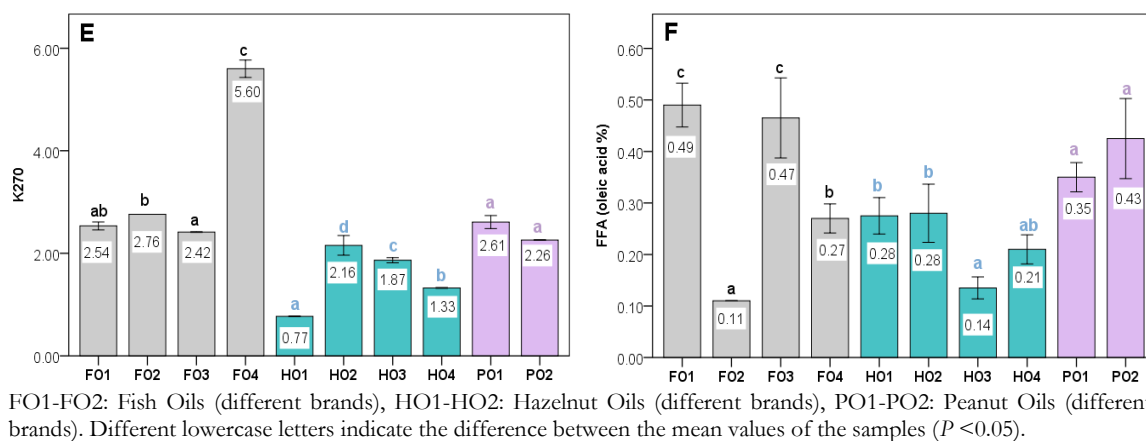
samples. Ali et al. (2016) determined PV, p-AV and totox values in corn oil as 4.34 meqO<sub>2</sub>/kg, 1.22 and 8.90, respectively.

K<sub>232</sub> values of CO3, CO4, CO5 and CO6 samples were quite similar (Figure 2D) however, K<sub>270</sub> values of corn oils samples varied in the range of 1.51-3.22 ( $P < 0.05$ ). K<sub>232</sub> was found to be 1.96 and K<sub>270</sub> to be 0.05 in corn oil by Baştürk et al. (2018). FFA was determined in the range of 0.16-0.26% (Figure 2F). These values are within the limit (0.3% oleic acid) stated in the Turkish Food Codex Communiqué on Oils Called by Plant Name (TGK, 2012). In previous studies, FFA in CO was reported as 0.15% (Ali et al., 2016), and 0.12% (Inanc and Maskan, 2013). Our findings are similar to these results reported in the literature.

**Fish oils, hazelnut oils, and peanut oils**

Figure 3 displays the findings for FOs (4 brands), HOs (4 brands), and POs (2 brands) in terms of PV, p-AV, totox, K<sub>232</sub>, K<sub>270</sub>, and FFA.





In FOs, the following values for PV, p-AV, totox, K<sub>232</sub>, and K<sub>270</sub> were found: 8.45–27.39 meqO<sub>2</sub>/kg for PV, 7.50–60.90 for p-AV, 27.3–77.8 for K<sub>270</sub>, and 0.1–0.49% for FFA. The possible reason for the high levels of some of these parameters is that fish oils are rich in polyunsaturated fatty acids and therefore they are more susceptible to oxidation compared to other edible oils. Fazel et al. (2009) determined the PV levels of 2.7 and 2.3 meqO<sub>2</sub>/kg in carp and tuna fish, which are two important commercial and industrial fish in the Caspian Sea in the north of Iran. The p-AV value was reported as 1.12 and the totox value as 2.48 in New Zealand hoki fish oil (Kindleysides et al., 2012). The PV, p-AV and totox values of the 3 best-selling dietary supplements fish oil in the United States were determined in the range of 25–60 meqO<sub>2</sub>/kg, 15–85 and 55–210, respectively (Mason and Sherratt, 2017). In a study evaluating the content of lipid oxidation products in various seafood omega-3 supplements in Norway, their PV was found in the range of 1.04–10.38 meqO<sub>2</sub>/kg (Halvorsen and Blomhoff, 2011). Sixteen of the best-selling liquid fish oil products in the American market were analyzed by Ritter et al. (2013) and their PV were found to be in the range of 1.0–14.8 meqO<sub>2</sub>/kg. PV of encapsulated fish oil supplements marketed in New Zealand, was detected in the range of 1.09–33.34 and p-AV 3.14–72.63, totox in the range of 16.17–82.58 (Albert et al., 2015). Our results partially overlap with all these literature findings. However, it should be kept in mind that many factors such as fish

oil types, purity, packaging, and storage conditions will surely affect these results.

If HOs are evaluated, the difference between the mean values of the parameters other than p-AV was found to be statistically significant ( $P < 0.05$ ). Their PV ranged from 2.7 to 7.6 meqO<sub>2</sub>/kg (Figure 3A). There were no significant differences between p-AVs of HOs. Their PVs did not exceed the upper limit (10 meqO<sub>2</sub>/kg) which is specified in the Turkish Food Codex Communiqué on Oils Called by Plant Name (TGK, 2012). Totox value was the highest in HO3. K<sub>232</sub> values were higher than K<sub>270</sub> in all samples. FFA values were determined in the range of 0.14–0.28 % in terms of oleic acid. FFA was found to be equal in HO1 and HO2 samples. Tekin et al. (2009) determined the FFA, PV and K<sub>232</sub> values in HO as 0.33%, 1.02 meqO<sub>2</sub>/kg and 0.09, respectively. In HOs, FFA, p-AV, and K<sub>232</sub> values were reported by Tohma and Turan (2015) to be 0.07 (% oleic acid), 2.0, and 0.11, respectively.

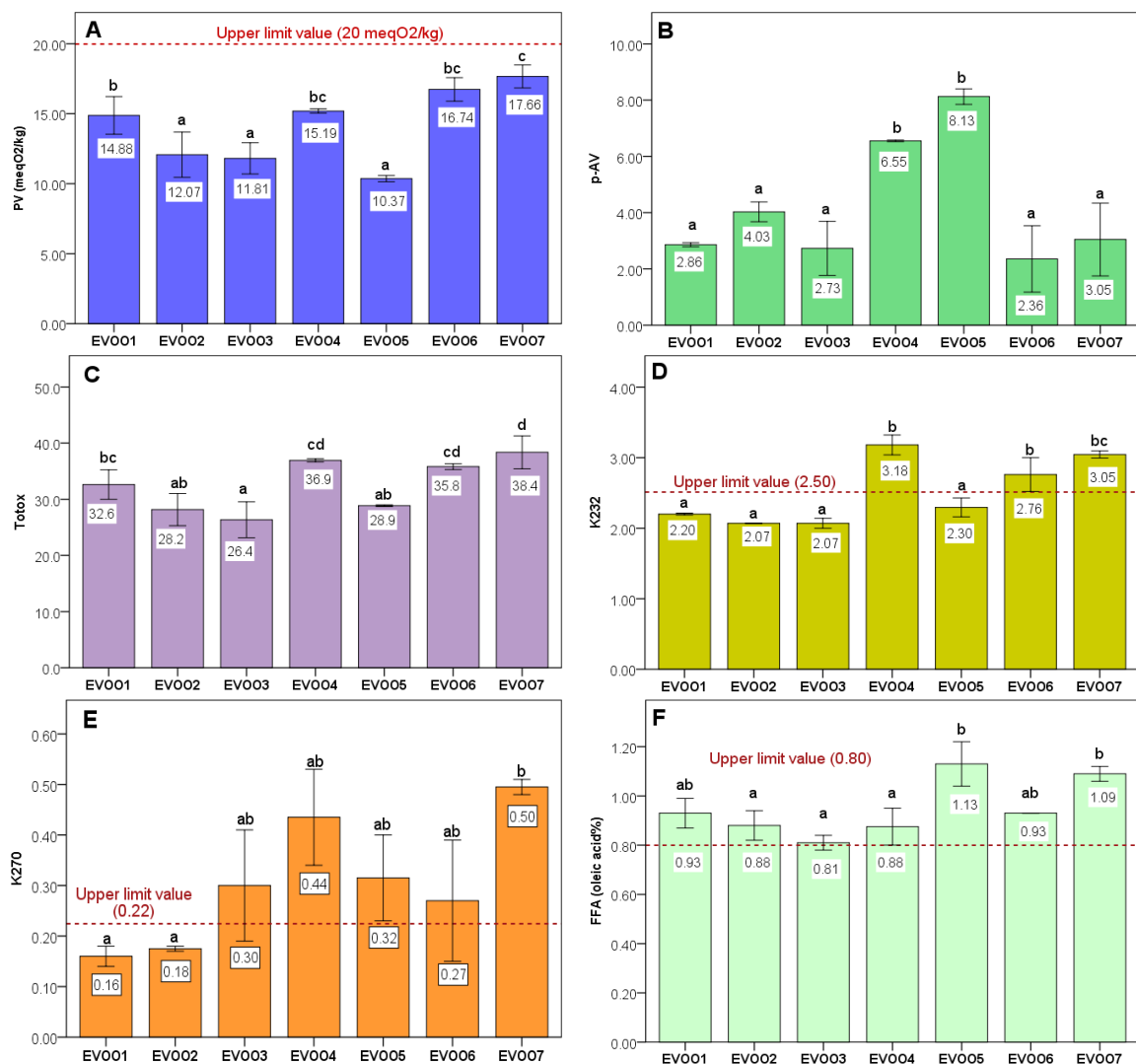
The PV, p-AV, totox, K<sub>232</sub>, K<sub>270</sub>, and FFA findings of two different brands of PO are presented in Figure 3. The difference between the mean in parameters other than K<sub>270</sub> and FFA was found to be significant ( $P < 0.05$ ). The PV of PO2 was above the limit (10 meqO<sub>2</sub>/kg) specified in the codex. In comparison to PO1, PO2's totox value was about 2.8 times higher. While the difference between the K<sub>232</sub> values of the POs was

found to be significant, the  $K_{270}$  values were similar. The FFA of the POs was determined as 0.35% and 0.45% in terms of % oleic acid. FFA in both peanut oils exceeded the upper limit (0.3%) specified in the Turkish Food Codex Communiqué on Oils with Plant Name (TGK, 2012). According to Zhang et al. (2020), PVs and FFAs in peanut oils ranged from 3.36 to 14.93 mmol/kg and 0.35 to 0.69 mgKOH/g, respectively. Tanriverdi (2011) determined PV and FFA values in peanut oil as 9.41 meqO<sub>2</sub>/kg and 16.67% (in terms of oleic acid), respectively.

According to Shi et al. (2015),  $K_{232}$  and  $K_{270}$  levels in peanut oil were 2.28 and 0.32, respectively. In two separate peanut oils, Özcan and Seven (2003) found that the FFA and PV values were 1.45-1.53 (% oleic acid) and 2.08-2.49 meqO<sub>2</sub>/kg, respectively.

**Extra virgin olive oils**

Figure 4 shows PV, p-AV, totox,  $K_{232}$ ,  $K_{270}$ , and FFA values of EVOOs.



EVOO1-EVOO7: Extra virgin olive oils (different brands). Different lowercase letters indicate the difference between the mean values of the samples ( $P < 0.05$ ). The upper limit values are the values specified by the "Turkish Food Codex Communiqué on Olive Oil and Olive Pomace Oil" (TGK, 2017).

Figure 4. Certain properties determined in extra virgin olive oils

As seen in Figure 4A, PVs of EVOOs differed in the range of 10.4–17.7 meqO<sub>2</sub>/kg ( $P < 0.05$ ). According to Turkish Food Codex Communiqué on Olive Oil and Olive Pomace Oil (TGK, 2017), the PV of EVOO should not be more than 20 meqO<sub>2</sub>/kg. As a result, the EVOOs used in the study did not have PVs above the threshold set as the quality requirement. The lowest PVs were in EVOO2, EVOO3, and EVOO5, and the difference between them was not significant ( $P > 0.05$ ). PVs of EVOOs were found to be 17.9 meqO<sub>2</sub>/kg by Ghanbari Shendi et al. (2018), 6.34–11.45 meqO<sub>2</sub>/kg by Jabeur et al. (2022), 4.36 meqO<sub>2</sub>/kg by Keramat and Golmakani (2016), and 15.37 meqO<sub>2</sub>/kg by Tanriverdi (2011).

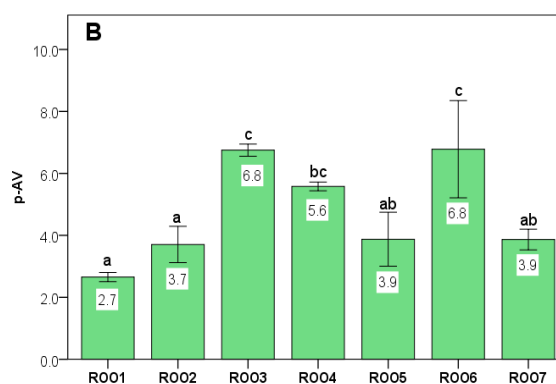
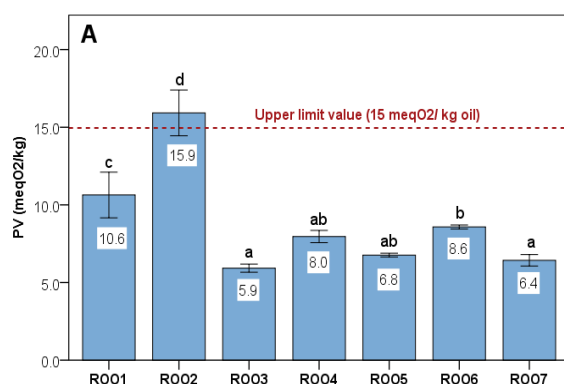
p-AV values in EVOOs were determined in the range of 2.36–8.13 (Figure 4B). p-AVs were close to each other in EVOO4 and EVOO5. There was no significant difference between the PVs of the other EVOOs ( $P > 0.05$ ). By Keramat and Golmakani (2016) p-AV was determined in EVOO at a level of 3.92. Totox values ranged from 26.35 to 38.37 ( $P < 0.05$ ). The lowest was at EVOO3, and the highest was at EVOO7. While K<sub>232</sub> values in EVOOs differed between 2.07 and 3.18, K<sub>270</sub> values were at lower levels (between 0.16–0.50) ( $P < 0.05$ ). Turkish Food Codex Communiqué on Olive Oil and Olive Pomace Oil (TGK, 2017) has specified the upper limits of K<sub>232</sub> and K<sub>270</sub> for EVOOs as 2.5 and 0.22, respectively.

EVOO1, EVOO2, EVOO3, and EVOO5 samples for K<sub>232</sub> and EVOO1 and EVOO2 samples for K<sub>270</sub> were found to be appropriate for the communiqué. In EVOOs, K<sub>232</sub> and K<sub>270</sub> were determined as 1.49 and 0.14 by Keramat and Golmakani (2016), 1.75 and 0.09 by Benmoussa et al. (2016), 1.90–2.21 and 0.06–0.11 (Di Stefano and Melilli, 2020), 1.9 and 0.15 (Ghanbari Shendi et al., 2018), 1.84–2.44 and 0.12–0.15 (Jabeur et al., 2022) respectively.

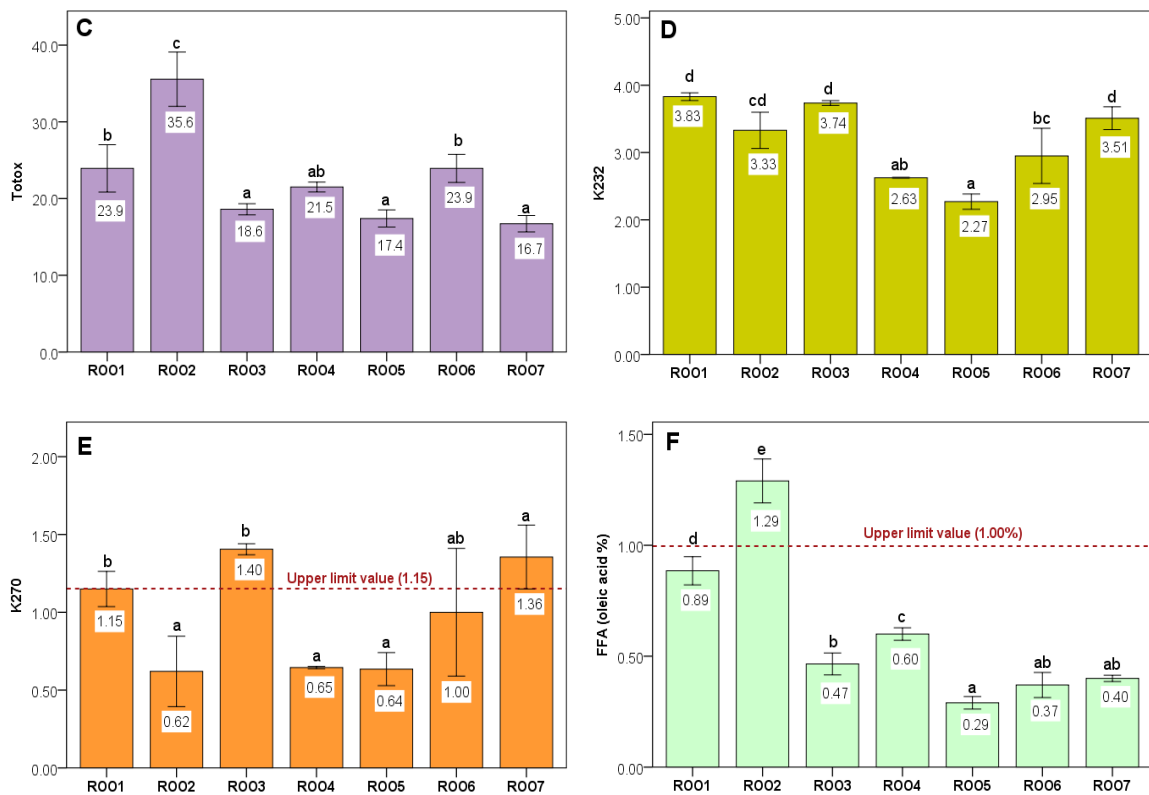
The FFA (% oleic acid) in EVOOs should be  $\leq 0.8$ , according to the same communiqué. Seven different brands of EVOO contained FFAs that ranged from 0.81% to 1.13. All EVOOs had FFA in excess of the legal maximum as a result. FFAs (% oleic acid) of EVOOs were reported as 1.75% (Keramat and Golmakani, 2016), 1.56–2.49% and 0.30–0.42% (Di Stefano and Melilli, 2020), 0.3% (Benmoussa et al., 2016; Ghanbari Shendi et al., 2018), 0.24–0.32% (Jabeur et al., 2022) and 1.45% (Tanriverdi, 2011).

### Riviera olive oils

Riviera olive oil is obtained by mixing natural olive oil in different proportions ranging from 5 to 20% with refined olive oil (Türkoğlu et al., 2012). Seven different brands of ROO were used in the study and the parameters determined for them are shown in Figure 5.







ROO1-ROO7: Riviera olive oils (different brands). Different lowercase letters indicate the difference between the mean values of the samples ( $P < 0.05$ ). The upper limit values are the values specified by the "Turkish Food Codex Communique on Olive Oil and Olive Pomace Oil" (TGK, 2017).

Figure 5. Certain properties determined in Riviera olive oils

According to the Turkish Food Codex Communique on Olive Oil and Olive Pomace Oil (TGK, 2017), the limit values of some criteria in ROO are;  $PV \leq 15 \text{ meqO}_2/\text{kg}$ ,  $FFA (\% \text{ oleic acid}) \leq 1$  and  $K_{270} \leq 1.15$ . PVs of ROOs differed in the range of 5.93-15.93 ( $P < 0.05$ ). Brands other than ROO2 were found to comply with the communiqué. The fact that parameters such as PV,  $K_{270}$  and FFA are above the limit in ROO2 is probably because it was produced a year earlier than other ROOs. PV in ROO was determined as  $4.71 \text{ meqO}_2/\text{kg}$  (Yüzereroğlu, 2021). Inanç (2022) detected PVs of twenty-two ROOs in the range of 1.8 to  $13.05 \text{ meqO}_2/\text{kg}$  oil. Most of the PV results we obtained are in line with these findings.

p-AVs, which are indicators of secondary oxidation products, were determined in the range of 2.66-6.78 ( $P < 0.05$ ). Totox values calculated from PV and p-AV values showed variation in the range of 16.73-35.56 ( $P < 0.05$ ).  $K_{232}$  was found in

the range of 2.27 to 3.83 in ROOs, while  $K_{270}$  was found in the range of 0.62 to 1.40 (Figure 5D and E).  $K_{232}$  values were higher than  $K_{270}$  values in all samples.  $K_{270}$ , ROO3 and ROO7 samples exceeded the limit specified in the communiqué ( $\leq 1.15$ ). Inanç (2022) found the  $K_{270}$  of twenty-two ROOs in the range of 0.17 to 1.57. According to Yüzereroğlu (2021),  $K_{232}$  and  $K_{270}$  values in ROOs were 3.50 and 0.78, respectively. These findings were consistent with some of our ROO results.

FFA values ROOs were determined as in the range of 0.29-1.29%. In the samples other than ROO2, FFA was found suitable according to the communiqué. The ROO2 sample was not found in accordance with the communiqué in terms of both PV and FFA. Possible reason for this may be transportation and storage in unsuitable conditions. Yüzereroğlu (2021) determined the FFA rate in ROO to be 0.26%. The FFA of the

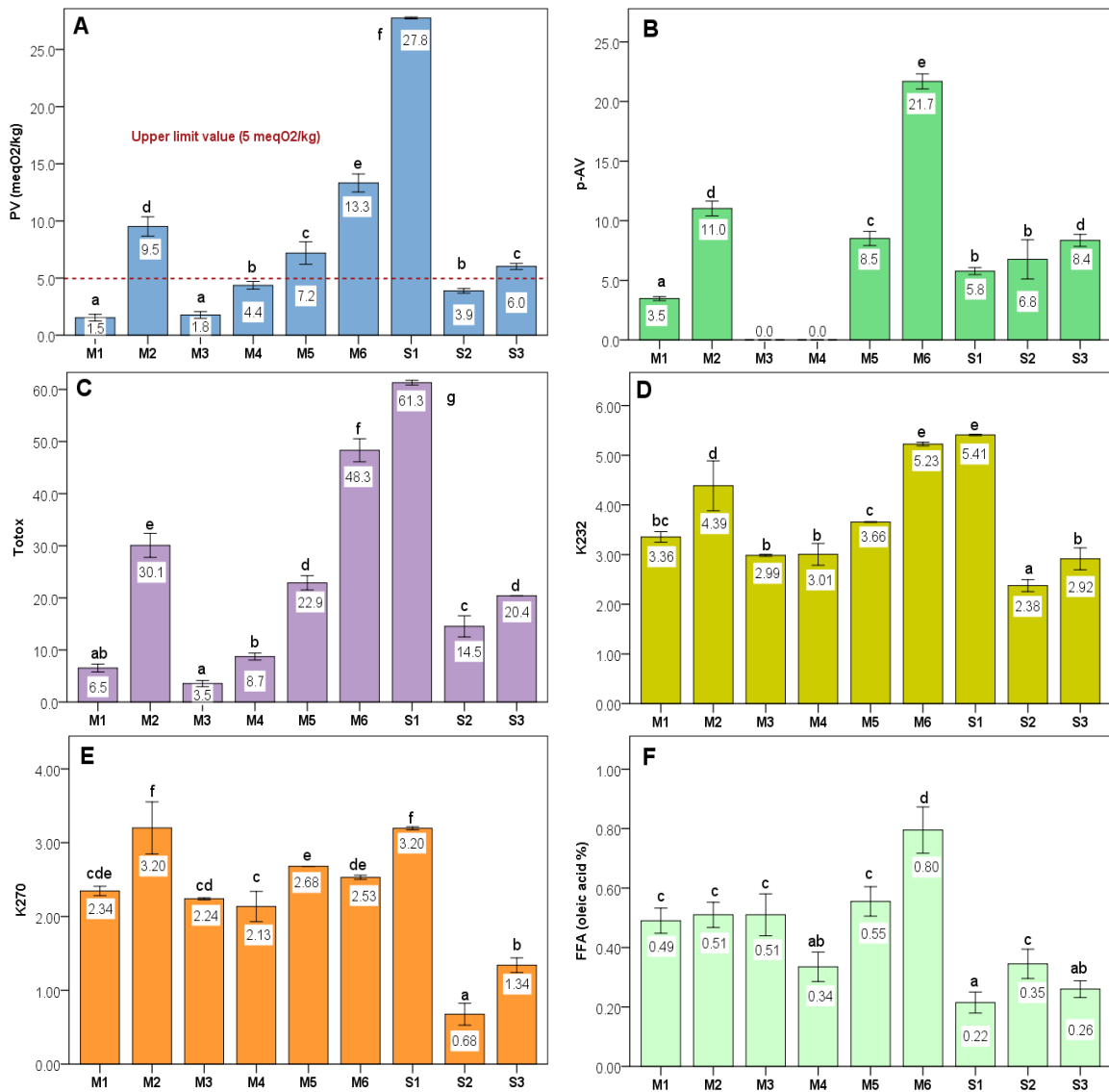


twenty-two ROOs, according to Inanç (2022), was 2.09% in one and 0.10% to 0.90% in the others.

### Margarines and shortenings

Margarines (M) and shortenings (S), like other edible oils and fats, may deteriorate by oxidation under the influence of some factors including temperature, light, heavy metal ions, etc. under

inappropriate storage conditions. As a result of deterioration, properties such as color, smell and taste may change in margarines and this significantly reduces the quality of the product. The results of PV, p-AV, totox, K<sub>232</sub>, K<sub>270</sub> and FFA determined in six margarine (M1-M6) and three shortening (S1-S3) samples used in the study are presented in Figure 6.



M1-M6: Margarines (different brands), S1-S3: Shortenings (different brands). Different lowercase letters indicate the difference between the mean values of the samples ( $P < 0.05$ ). The upper limit values are the values specified by the " TS 2812 Standard of Spreadable margarine/margarine " (TSE, 2022).

Figure 6. Certain properties determined in margarine and shortenings

Their PVs varied in the range of 1.53-27.76 meqO<sub>2</sub>/kg ( $P < 0.05$ ). In the TS 2812 Standard of Spreadable margarine/margarine (TSE, 2022), PV is accepted as 5 meqO<sub>2</sub>/kg at most. Accordingly, M2, M5, M6, S1 and S3 samples were found above the PV limit determined in the standard (Figure 6A). This could possibly be caused by transportation or storage in unsuitable conditions. While p-AV was not detected in M3 and M4 samples, it differed in the range of 3.47-21.69 in other samples ( $P < 0.05$ ). The totox value representing total oxidation was found in the range of 3.54-61.30 in margarine and shortening samples ( $P < 0.05$ ). The increase in K<sub>232</sub> formation during oxidative reactions is considered an important parameter since it provides information about the degradation status of oils. While K<sub>232</sub> was determined in the range of 2.38-5.41 (Figure 6D), K<sub>270</sub> was determined in the range of 0.68-3.20 (Figure 2E). Bozkurt and Baştürk (2018) determined the K<sub>232</sub> value in the range of 2.55-5.72% in five different brands of kitchen margarine, which they obtained from the markets of Iğdır/Türkiye province. The FFA values of the samples varied between 0.22-0.80% ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference between the FFA rates determined in the M1, M2, M3, M5 and S2 brands (Figure 6F). Similarly, M4 and S3 values were close to each other. According to Engler Ribeiro et al. (2017) Brazil's margarine has PV, p-AV, K<sub>232</sub>, and K<sub>270</sub> values of 0.24 meqO<sub>2</sub>/kg, 1.38, 3.54, and 0.20 respectively. In another study, the PV of two different margarines sold in Tehran markets were 1.69 and 1.47 meqO<sub>2</sub>/kg, and the p-AV values were 1.5 and 1.6 (Bahmaei and Eshratbadi, 2016). The FFA of the margarines and shortenings varied between 0.22-0.80% in terms of oleic acid ( $P < 0.05$ ).

## CONCLUSIONS

Many factors such as storage conditions, packaging materials, transportation conditions, chemical composition of oils and fats can affect the shelf life of fats and oils offered to the consumer. Therefore, consumers should pay attention to these conditions and label information when they chose a product from the market shelves. The parameters determined in some edible oils and fats examined within the

scope of the study were above the limits specified in the codex and standards Oils and fats may exhibit various deteriorating behaviors depending on their fatty acid composition and the properties of the raw materials from which they are obtained. For this, variables including the type of packing and the storage environment should be optimized. Additionally, limit values for each parameter for each type of oil and fat should be distinctly established in national and international codex. In this regard, more research is required.

## DECLARATION OF COMPETING INTEREST

The authors have declared no conflict of interest.

## AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Ali Osman GÜNDÜZ: Conceptualization, methodology, investigation, formal analysis, writing-review and editing. Ayhan BAŞTÜRK: Project administration, supervision, conceptualization, methodology, writing review and editing. All authors read and approved the final manuscript.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study is a part of a master dissertation. The authors gratefully acknowledge the support provided for this work by the Van Yüzüncü Yıl University Research Fund (FYL-2019-8058).

## REFERENCES

- Ahmad, F., Al Kanhal Mohamad Ahmad, A. Z., Tariq, H., Marc, A., Achille, T. F., Mory, G., Koffi, P. V. N., Georges, A. N., Chuelong, S., Siriuthane, T. (2011). The Effect on Growth and Lipid Profile in Rats Fed Microwave Heated Corn Oil. *Pakistan Journal of Nutrition*, 10(12), 1104–1108.
- Albert, B. B., Derraik, J. G., Cameron-Smith, D., Hofman, P. L., Tumanov, S., Villas-Boas, S. G., Garg, M. L., Cutfield, W. S. (2015). Fish oil supplements in New Zealand are highly oxidised and do not meet label content of n-3 PUFA. *Scientific Reports*, 5, 7928. <https://doi.org/10.1038/srep07928>
- Ali, M. A., Bin Mesran, M. H., Abd Latip, R., Othman, N. H., Mahmood, N. A. N. (2016).

- Effect of microwave heating with different exposure times on the degradation of corn oil. *International Food Research Journal*, 23(2), 842–848.
- Ali, M. A., Najmaldien, A. H. A., Latip, R. A., Othman, N. H., Majid, F. A. A., Salleh, L. M. (2013). Effect of heating at frying temperature on the quality characteristics of regular and high-oleic acid sunflower oils. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 12(2), 159–167.
- Ali, M. A., Nouruddeen, Z. B., Muhamad, I. I., Abd Latip, R., Othman, N. H. (2014). Effect of Microwave Heating on Oxidative Degradation of Sunflower Oil in the Presence of Palm Olein. *Sains Malaysiana*, 43(8), 1189–1195.
- Anjum, F., Anwar, F., Jamil, A., Iqbal, M. (2006). Microwave roasting effects on the physico-chemical composition and oxidative stability of sunflower seed oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 83(9), 777–784. <https://doi.org/DOI 10.1007/s11746-006-5014-1>
- AOCS. (1989a). *Official Method Cd 8-53. Peroxide value. In Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society (4th ed.)*. AOCS, Champaign, IL, USA.
- AOCS. (1989b). Official Method Ch 5-91. Specific Extinction of Oils and Fats, Ultraviolet Absorption. In *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society*. AOCS, Champaign, IL, USA.
- AOCS. (1998). *Official Method Cd 18-90. p-Anisidine Value. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society*. AOCS Champaign, IL, USA.
- AOCS. (2004). Official Method Ca 5a-40. Free Fatty Acids in Crude and Refined Fats and Oils. In *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society*.
- Bahmaei, M., Eshratbadi, P. (2016). Comparison of Physicochemical Characteristics of Margarine and Butter in Iranian Market During Storage. *Journal of Pharmaceutical & Health Sciences*, 4(3), 181–191.
- Bantchev, G. B., Biresaw, G., Mohamed, A., Moser, J. (2011). Temperature dependence of the oxidative stability of corn oil and polyalphaolefin in the presence of sulfides. *Thermochimica Acta*, 513, 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2010.11.017>
- Baştürk, A. (2019). Effects of microwave and conventional heating on the oxidative stability of corn oil enriched with different antioxidants. *Grasas y Aceites*, 70(4), 1–12. <https://doi.org/10.3989/gya.1044182>
- Baştürk, A., Ceylan, M. M., Çavuş, M., Boran, G., Javidipour, I. (2018). Effects of some herbal extracts on oxidative stability of corn oil under accelerated oxidation conditions in comparison with some commonly used antioxidants. *LWT-Food Science and Technology*, 89, 358–364. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.005>
- Benmoussa, H., Elfalleh, W., Farhat, A., Servili, M., Algabr, M., Romdhane, M. (2016). Impact of Microwave Assisted Infusion on the Quality and Volatile Composition of Olive Oil Aromatized with Rosemary Leaves. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 93(7), 921–928. <https://doi.org/10.1007/s11746-016-2847-0>
- Bozkurt, F., Baştürk, A. (2018). Farklı Depolama Sıcaklıklarının Kahvaltılık ve Mutfak Margarinlerinin Oksidatif Stabiliteleri Üzerine Etkileri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 28(1), 103–111.
- Chinprahast, N., Tungsomboon, T., Nagao, P. (2016). Antioxidant activities of Thai pigmented rice cultivars and application in sunflower oil. *International Journal of Food Science and Technology*, 51(1), 46–53. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12952>
- Das, U. N. (1991). Lipids, lipid peroxidation and human health. *Trends in Food Science & Technology*, 2, 44–45.
- Di Stefano, V., Melilli, M. G. (2020). Effect of storage on quality parameters and phenolic content of Italian extra-virgin olive oils. *Natural Product Research*, 34(1), 78–86. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1587434>
- El Boulifi, N., Bouaid, A., Martinez, M., Aracil, J. (2010). Process Optimization for Biodiesel

- Production from Corn Oil and Its Oxidative Stability. *International Journal of Chemical Engineering*, 2010, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2010/518070>
- Engler Ribeiro, P. C., de Britto Policarpi, P., Dal Bo, A., Barbeta, P. A., Block, J. M. (2017). Impact of pecan nut shell aqueous extract on the oxidative properties of margarines during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(9), 3005–3012. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8141>
- Fazel, M., Sahari, M. A., Barzegar, M. (2009). Comparison of tea and sesame seed oils as two natural antioxidants in a fish oil model system by radical scavenging activity. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(7), 567–576. <https://doi.org/10.3109/09637480801987625>
- Ghanbari Shendi, E., Sivri Ozay, D., Ozkaya, M. T., Ustunel, N. F. (2018). Changes occurring in chemical composition and oxidative stability of virgin olive oil during storage. *OCL - Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*, 25(6), 4–11. <https://doi.org/10.1051/ocl/2018052>
- Günç Ergönül, P., Nergiz, C. (2014). The effect of different filter aid materials and winterization periods on the oxidative stability of sunflower and corn oils. *CyTA - Journal of Food*, 13(2), 174–180. <https://doi.org/10.1080/19476337.2014.931889>
- Halvorsen, B. L., Blomhoff, R. (2011). Determination of lipid oxidation products in vegetable oils and marine omega-3 supplements. *Food & Nutrition Research*, 55(1), 5792. <https://doi.org/10.3402/fnr.v55i0.5792>
- İnanç, A. L. (2022). Piyasada Satışa Sunulan Ayçiçeği Yağı, Mısır Yağı ve Riviera Zeytinyağlarının Safılık Kriterlerinin Belirlenmesi. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 2(1), 241–253. <https://doi.org/10.21597/jist.1016112>
- Inanc Horuz, T., Maskan, M. (2015). Effect of the phytochemicals curcumin, cinnamaldehyde, thymol and carvacrol on the oxidative stability of corn and palm oils at frying temperatures. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 52(12), 8041–8049. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1913-1>
- Inanc, T., Maskan, M. (2013). Testing the Antioxidant Effect of Essential Oils and BHT on Corn Oil at Frying Temperatures: a Response Surface Methodology. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 90(12), 1845–1850. <https://doi.org/10.1007/s11746-013-2351-8>
- Jabeur, H., Ben Hmida, R., Chtourou, I., Bouaziz, M. (2022). Blends of fresh olive oil and old olive oil: Characterization and quantification through chemical and sensory assessment. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 99(1), 3–14. <https://doi.org/10.1002/aocs.12550>
- Javidipour, I., Erinc, H., Basturk, A., Tekin, A. (2017). Oxidative changes in hazelnut, olive, soybean, and sunflower oils during microwave heating. *International Journal of Food Properties*, 20(7), 1582–1592. <http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2016.1214963>
- Kapich, A. N., Korneichik, T. V., Hatakka, A., Hammel, K. E. (2010). Oxidizability of unsaturated fatty acids and of a non-phenolic lignin structure in the manganese peroxidase-dependent lipid peroxidation system. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(2), 136–140. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.09.014>
- Karakaya, S., Simsek, S. (2011). Changes in Total Polar Compounds, Peroxide Value, Total Phenols and Antioxidant Activity of Various Oils Used in Deep Fat Frying. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 88(9), 1361–1366. <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1788-x>
- Keramat, M., Golmakani, M. T. (2016). Effect of Thymus vulgaris and Bunium persicum essential oils on the oxidative stability of virgin olive oil. *Grasas y Aceites*, 67(4), 162. <https://doi.org/ARTN e16210.3989/gya.0337161>
- Kindleysides, S., Quek, S. Y., Miller, M. R. (2012). Inhibition of fish oil oxidation and the radical scavenging activity of New Zealand seaweed extracts. *Food Chemistry*, 133(4), 1624–1631. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.068>
- Mason, R. P., Sherratt, S. C. R. (2017). Omega-3 fatty acid fish oil dietary supplements contain saturated fats and oxidized lipids that may

- interfere with their intended biological benefits. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 483(1), 425–429.
- Özcan, M., Seven, S. (2003). Physical and chemical analysis and fatty acid composition of peanut, peanut oil and peanut butter from ÇOM and NC-7 cultivars. *Grasas y Aceites*, 54(1), 12–18.
- Reindl, B., Stan, H. J. (1982). Determination of volatile aldehydes in meat as 2, 4-dinitrophenylhydrazones using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(5), 849–854.
- Ritter, J. C., Budge, S. M., Jovica, F. (2013). Quality analysis of commercial fish oil preparations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(8), 1935–1939. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5994>
- Rodriguez-Estrada, M. T., Caboni, M. F. (2002). Determination of cholesterol oxidation products by high-performance liquid chromatography. *Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence, and Biological Effects*, 66–100.
- Shahidi, F. (1998). Indicators for evaluation of lipid oxidation and off-flavor development in food. In *Food Flavors: Formation, Analysis, and Packaging Influences* (Vol. 40). [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-4501\(98\)80032-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-4501(98)80032-0)
- Shahidi, F., Wanasundara, U. N. (2002). Methods for measuring oxidative rancidity in fats and oils. In *Food lipids* (pp. 484–507). CRC Press.
- Shi, R., Guo, Y., Vriesekoop, F., Yuan, Q. P., Zhao, S. N., Liang, H. (2015). Improving oxidative stability of peanut oil under microwave treatment and deep fat frying by stearic acid-surfactant-tea polyphenols complex. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(7), 1008–1015. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400371>
- Tanrıverdi, E. (2011). Kızartma yağlarının stabilitesi üzerine bazı baharat uçucu yağlarının etkisi. Master's thesis, Selcuk University, Institute of Science and Technology, Konya, Türkiye
- Tekin, L., Aday, M. S., Yılmaz, E. (2009). Physicochemical Changes in Hazelnut, Olive Pomace, Grapeseed and Sunflower Oils Heated at Frying Temperatures. *Food Science and Technology Research*, 15(5), 519–524.
- TGK. (2012). *Turkish Food Codex Communiqué on Oils Called by Plant Name, Communiqué no. 2012/29*. Official Gazette, p. 28262.
- TGK. (2017). *Turkish Food Codex Communiqué on Olive Oil and Olive Pomace Oil, Communiqué No: 2017/26*. Official Gazette, p. 30183.
- TSE. (2022). TS 2812 *Spreadable margarine/margarine*.
- Tohma, S., Turan, S. (2015). Rosemary plant (*Rosmarinus officinalis* L.), solvent extract and essential oil can be used to extend the usage life of hazelnut oil during deep frying. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(12), 1978–1990. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400382>
- Türkoğlu, H., Kanık, Z., Yakut, A., Güneri, A., Akın, M. (2012). Some Properties of Olive Oils Sold in Nizip and Surroundings. *Journal of the Faculty of Agriculture of Harran University University*, 16(3), 1–8.
- Yüzereroğlu, Ö. (2021). The Effects of Laurel (*Laurus Nobilis* L.) and French Lavender (*Lavandula Stoechas* L.) Essential Oils on Oxidative Stabilities of Refined Sunflower and Riviera Olive Oil. Master's thesis, Aydın Adnan Menderes University, Institute of Science and Technology, Aydın, Türkiye.
- Zhang, D., Li, X., Cao, Y., Wang, C., Xue, Y. (2020). Effect of roasting on the chemical components of peanut oil. *Lwt*, 125, 109249. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109249>
- Zhang, Y., Yang, L., Zu, Y. G., Chen, X. Q., Wang, F. J., Liu, F. (2010). Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. *Food Chemistry*, 118(3), 656–662. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.038>



## ÇİMLENDİRİLEN TANE VE FİLİZ ÜRÜNLERİN BESLENMEDEKİ ROLÜ VE ÖNEMİ

Ayşe Nur KAHVE<sup>a\*</sup>, Ebru BAYRAK<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Aksaray Üniversitesi, Spor ve Sağlık Alanında İhtisaslaşma Koordinatörlüğü, Aksaray, Türkiye

<sup>b</sup>Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Konya, Türkiye

Geliş /Received: 04.10.2022; Kabul /Accepted: 25.02.2023; Online baskı /Published online: 28.02.2023

Kahve, A. N., Bayrak, E. (2023). Çimlendirilen tane ve filiz ürünlerin beslenme rolü ve önemi. GIDA (2023) 48 (2) 333-346 doi: 10.15237/ gida.GD22094

Kahve, A. N., Bayrak, E. (2023). The role and importance of germinated grain and sprout products in nutrition. GIDA (2023) 48 (2) 333-346 doi: 10.15237/ gida.GD22094

### ÖZ

Son yıllarda tüketicilerin besin tercihlerini ve beslenme alışkanlıklarını değiştirme yoluna gitmesi sonucunda organik, glutensiz ve fermente gıdaların tüketiminin yanı sıra çimlendirilmiş tane ve filiz ürünlerinin de tüketimi artmıştır. Çimlendirilmiş tanelerin vitamin, mineral, antioksidatif özellikler ve çeşitli biyoaktif bileşenler yönünden daha zengin olduğu, ayrıca besinlerin yalnızca kimyasal özelliklerinde değil lezzet, koku ve renk gibi duyuşal özelliklerinde de olumlu değişimler gözlemlendiği ortaya konulmuştur. Bununla birlikte çimlenme, makro ve mikro besin öğelerinin emilimini engelleyen enzimleri inaktive etmesinden dolayı yetersiz beslenme sorununa alternatif bir çözüm olarak değerlendirilmektedir. Bu derlemede, bazı besinlerin çimlendirilmesiyle besinsel kompozisyonunda ve fonksiyonel etkilerinde meydana gelen değişimlerin incelenmesi amaçlanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Beslenme, çimlendirme, filiz, fonksiyonel gıda

## THE ROLE AND IMPORTANCE OF GERMINATED GRAIN AND SPROUT PRODUCTS IN NUTRITION

### ABSTRACT

In recent years, as a result of consumers changing their food preferences and dietary habits, consumption of organic, gluten-free and fermented foods has increased as well as the consumption of germinated grain and sprout products. It has been revealed that germinated grains are richer in terms of vitamins, minerals, antioxidant properties and various bioactive components, and positive changes are observed not only in chemical properties but also in sensory properties such as flavor, smell and color. However, it is considered as an alternative solution to the problem of malnutrition because it inactivates enzymes that prevent the absorption of germination, macro and micro nutrients. In this review, it is aimed to examine the changes in the nutritional composition and functional effects of some nutrients by germination.

**Keywords:** Nutrition, germination, sprout, functional food

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉aysenur\_acar993@hotmail.com

☎(+90) 506 278 4746

Ayşe Nur Kahve; ORCID no: 0000-0001-6960-7204

Ebru Bayrak; ORCID no: 0000-0001-7279-3255

## GİRİŞ

Besinlerin raf ömrünün artırılması veya tekstürel özelliklerinin geliştirilmesi amacıyla çeşitli katkı maddelerinin kontrolsüzce kullanılması birçok sağlık probleminin ortaya çıkmasına zemin hazırlamaktadır (Hosseini ve Jafari., 2020). Bu nedenle vitamin, mineral, biyoaktif bileşenler veya antioksidan maddeler yönünden zengin, olabildiğince geleneksel yöntemlerle üretilmiş doğal besinlere karşı ilgi giderek artmaktadır. Buna bağlı olarak son yıllarda tüketiciler besin tercihlerini ve beslenme alışkanlıklarını değiştirme yoluna gitmektedir. Organik, glutensiz, fermente terimlerinin yanı sıra son zamanlarda yenilebilir bitki ve tohum filizleri ve çimlendirme gibi kavramlar ile çığ beslenme akımı gibi farklı beslenme eğilimleri popüler hale gelmiştir (Karaman ve Soylu 2020).

Filizlenme veya çimlenme; su alımını takiben tohum metabolizması sırasında bir dizi enzimatik katabolik reaksiyonu, depo karbonhidratları ve proteinleri hidrolize ederek kökün tohumdan çıkması olayıdır (Beaulieu vd., 2022). Çimlenme, tohum verimini artırmanın uygun maliyetli ve güvenilir bir yoludur. Çağlar boyunca, tahıl ve baklagillerde çekirdek yapısını yumuşatmak, besleyici bileşiklerin miktarını artırmak ve besleyici olmayanları azaltmak için ısıtma ve/veya çimlendirme kullanılmıştır (Ikram vd., 2021).

Çimlendirme işlemi ile normal tanelere kıyasla çimlendirilmiş tanelerin vitamin, mineral, antioksidatif özellikler ve çeşitli biyoaktif bileşenler yönünden daha zengin olduğu ortaya konulmuştur (Lopez vd., 2017). Fenolik asitler, flavonoidler ve tanenler, çimlenmiş yenilebilir tohumlar ve filizlerde tespit edilen en yaygın fenolik bileşikler olarak öne çıkmaktadır (Gan vd., 2017). Ayrıca, bu işlem sayesinde besinlerin yalnızca kimyasal özelliklerinde değil lezzet, koku ve renk gibi duyuşal özelliklerinde de olumlu değişimler gözlenebildiği bildirilmiştir (Kılınçer ve Demir, 2019). Çimlenmenin makro ve mikro besin öğeleri kolay emilim için hazır hale getirerek yetersiz beslenmeyi azaltabileceği de öne sürülmektedir (Om vd., 2020).

Çimlendirilmiş besinler fonksiyonel besin kategorisinde değerlendirilmektedir. Bitkilerin yapılarında genellikle glikozidlere bağlı olarak veya esterleşmiş olarak bulunan, bitkinin büyümesi ve gelişmesinde çeşitli fonksiyonlara sahip sekonder metabolitler olarak bilinen biyoaktif bileşenlerin açığa çıkması veya miktarındaki artış besinlere 'fonksiyonel' özellik kazandırmaktadır. Ayrıca çimlendirilmiş taneler/filizler, filizlenmemiş tohumlara kıyasla daha yüksek polifenolik asit ve flavonoid içeriğine sahip olmasından dolayı fonksiyonel gıda olarak kabul edilebilmektedir. Bu nedenle daha sağlıklı gıda seçimleri için günlük beslenmeye bu ürünleri dahil etmek vurgulanması gereken bir konu haline gelmiştir (Francis vd., 2022).

Bu derlemede, her geçen gün tüketimi artan çimlendirilen tane ve filiz ürünlerin besinsel kompozisyon ve fonksiyonel etkisinde meydana gelen değişimler ile beslenmedeki rolü ve önemi ele alınmıştır.

## ÇİMLENDİRİLMİŞ TAHILLAR VE YALANCI TAHILLAR

Küresel olarak, buğday, pirinç, mısır, yulaf, arpa, çavdar, darı, karabuğday ve kinoa gibi tahıllar, insanlara sağladıkları faydalardan dolayı ekilmekte ve bütün veya öğütülmüş formlarda tüketilmektedir. Son yıllarda bu yararların tüketici tarafından farkındalığının artmasından ötürü tüketimi önemli ölçüde artış göstermiştir. Çimlendirme, tahılların besin değerini artırmanın etkili yöntemlerinden biridir (Ding ve Feng, 2019). Bu bölümde tahılların çimlendirilmesi ve sağlığı geliştirici yönleri üzerinde durulmuştur.

### Yulaf

Dünya çapında yaygın olarak yetiştirilen ve sıklıkla tüketilen yulaf (*Avena sativa* L.); proteinler, lipidler, vitaminler, mineraller,  $\beta$ -glukan, fitokimyasal bileşik olan polifenol ve avenantramidler gibi sekonder bileşikler açısından zengin bir besindir. (Yu vd., 2022). Yulafı yapılan çalışmalarda, yulafın çimlendirilmesi sırasında toplam fenolik içeriğinin (Thang vd., 2020) ve  $\alpha$ -amilazın inhibitör aktivitesinin artması ve  $\alpha$ -glukosidazın azalması ile de yulafın besin değerinin arttığı tespit edilmiştir (Khang vd., 2016). Aparicio-García, vd (2021) tarafından yapılan bir çalışmada filizlenmiş

yulaf tanesi tozuyla filizlenmemiş yulaf tanesi tozunun besinsel kompozisyonları karşılaştırıldığında filizlenmiş yulaf tanesi tozunun protein,  $\beta$ -glukan, tiamin, riboflavin ve mineraller (P, K, Mg ve Ca) açısından daha zengin bir kaynak olduğu bulunmuştur. Kontrol grubuna göre kıyaslandığında daha iyi bir amino asit ve yağ asidi bileşimleri ile  $\gamma$ -aminobütirik asit, serbest fenolik ve antioksidan kapasiteye sahip olduğu ve filizlenmiş yulaf tanesi tozunun glutensiz fonksiyonel bir bileşen olarak kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır (Aparicio-García, vd., 2021).

### Arpa

Son yıllarda özellikle gelişmiş ülkelerde çimlendirilmiş filiz olarak kullanılan arpanın tüketimi de giderek artmaktadır (Al-Ansi vd., 2022). Yapılan bir çalışmada farklı arpa çeşitlerinin çimlendirilmesi kül, protein ve lif içeriğinde, antioksidan özelliklerinde (toplam flavonoid içeriği, toplam fenolik içerik, antioksidan aktivite, metal şelatlama aktivitesi) önemli bir artış sağlamıştır (Bangar vd., 2022). Çimlendirilen arpada taneye göre, doymuş yağ, kül ve toplam karbonhidrat miktarında azalma görülürken, lif, kalsiyum, magnezyum, fosfor ve çinko gibi mineral içeriğinde artış meydana geldiği ortaya konmuştur. Antioksidan aktivite ve total flavonoid içeriği gözlemlendiğinde ise çimlendirilen arpa da daha yüksek seviyelerde olduğu bulunmuştur (Farooqui vd., 2018). Paralel olarak 12 güne kadar çimlendirilen arpada 8.güne kadar fitaz aktivitesi önemli ölçüde artmış ve daha sonra azalma meydana geldiği rapor edilmiştir. Çimlenme sırasında fitaz aktivitesindeki artışa, arpadaki fitat içeriğinde önemli bir azalma (%92-97 oranında) eşlik etmiştir. Filizlenmiş arpanın fitat içeriğinin çimlenme ile azalması, tahılın fosfor kullanılabilirliğini iyileştirmiştir (Bouajila vd., 2020). Al-Ansi vd., (2022) yaptıkları bir çalışmada, 24, 48 ve 72 saat boyunca çimlendirilmiş Highland arpası ekmeği üretiminde kullanılmış ve daha besleyici, antimikrobiyal ve antioksidan özelliklere sahip fonksiyonel bir ekmeği elde edilmiştir. Çimlenme süresinin uzaması (sırasıyla 48 ve 72 saat) gluten ağının oluşumunu olumsuz etkileyerek unun su emilimini, hamur geliştirme süresini ve stabiliteyi azaltmıştır. Yirmi-dört saat boyunca çimlendirilmiş arpa ile yapılan ekmeği, ekmeği

yapma performansını, raf ömrünü, duyu nitelikleri ve genel kabul edilebilirlik üzerindeki etkisini olumlu bir şekilde etkilemiştir. Çimlendirme işleminin, buğday ve arpada besin kalitesini ve fonksiyonel gıda bileşimini iyileştirmenin doğal ve sürdürülebilir bir yolu olduğu düşünülmektedir.

### Karabuğday

Karabuğday (*Fagopyrum esculentum*), Polygonaceae familyasına ait alternatif bir tahıl ürünüdür ve yüzyıllardır kabuğu çıkarılarak tane, un ve erişte olarak tüketilmektedir (Li vd., 2021; Koyama vd., 2013). Karabuğday, önemli miktarda protein, vitamin ve mineral içermekle birlikte, kuersetin ve rutin gibi içerdiği fenolik bileşenlerden dolayı da beslenme açısından önemli bir tahıldır (Jin vd., 2022). Çimlendirilen karabuğdayda, rutin, kuersetin, isoorientin, orientin, isovitexin ve viteksin gibi flavonoller tohumla kıyasla daha yüksek oranda bulunmaktadır. Bu fenolik bileşikler, antimikrobiyal, antioksidan, antikanserojen ve antimutajen özelliklere sahiptirler (Hsu vd., 2008; Hao vd., 2021). Zhang vd. (2015) yaptıkları bir çalışmada, çimlenme süreci boyunca hem antioksidan aktivitenin hem de rutin, vitexin, isovitexin, orientin, izoorientin, klorojenik asit, trans-3-hidroksisinnamik asit ve p-hidroksibenzoik asit gibi fenolik bileşiklerin çimlenme sürecinde önemli ölçüde arttığını bildirmişlerdir. Çimlendirme, karabuğday tohumlarının biyokimyasal ve besinsel bileşimlerinde önemli değişikliklere neden olmuş ve besin değeri iyileştirilmiştir. Ispiryan vd., (2021) tarafından yapılan başka bir çalışmada, çimlendirilmiş karabuğday tanesinin içeriğindeki polioller, fermente olabilir oligosakkaritler, monosakkaritler ve disakkaritlerin değişimleri incelenmiş ve karabuğdayın bileşimindeki sindirilemeyen, çözünür ve fermente karbonhidratların çimlendirme sürecinde düzeylerinin azaldığı saptanmıştır. Bu sebeple karabuğday maltının sağlıklı bir besin olduğu görüşü bildirilmiştir. Bhinder vd., (2022) tarafından yapılan bir çalışmada ise, tartar karabuğdayı 72 saat boyunca çimlenme işlemine tabi tutulmuş ve karabuğdayın antioksidan aktivitesinde %64'lük bir artış sağlanmıştır. Karabuğdayın 48 saatten daha uzun bir süre boyunca çimlendirilmesi ile hamurun



viskoelastisitesi etkilenmiş ve keklerin özgül hacmi azalmış, kekin hamurunun kalın yapışkan olmasına yol açmıştır. Ancak 48 saat boyunca filizlenen karabuğdaydan üretilen keklerde daha düşük sertlikte ve yüksek özgül hacimde kekler elde edildiği belirlenmiştir. Ayrıca tartar karabuğdayı kullanılarak yapılan muffinlerde karabuğdayın neden olduğu acılığın da çimlenmiş karabuğday kullanılarak giderildiği bildirilmiştir. Karabuğdayın 48 saatlik çimlendirme süresi sonucunda fiziksel ve kimyasal özelliklerinde olumlu sonuçlar elde edilmiştir.

### **Kinoa**

Kinoa, besinsel ve biyolojik özelliklerinin yanı sıra çevresel koşullara dayanıklılığı nedeniyle 21. yüzyılın tahıllarından biri olarak kabul gören yalancı tahıl grubuna sahip bir besindir (FAO, 2011). Glutensiz ve yüksek kaliteli protein, lif, karbonhidrat, vitamin, mineral, fitokimyasal ve biyoaktif peptit kaynağıdır. Saponinler, tanenler ve fitik asitler gibi kinoada bulunan antibesinsel faktörler, çinko ve demir gibi minerallerle çözünmeyen kompleksler oluşturarak biyoyararlılığı azaltabilmektedir. Ancak bu durumun kinoa tohumunun çimlendirilmesi ile azaltılabileceği bildirilmiştir (Desai vd. 2009). Kinoa tohumlarının çimlendirilmesinin kimyasal bileşim, mineral madde, C vitamini, antioksidan ve antibesinsel faktörler üzerine etkisini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada, deneysel demir eksikliği anemisi oluşturulmuş albino ratların tedavisinde çimlenmiş kinoa tohumlarının beslenme profili üzerindeki etkisi ve kinoa ile güçlendirilmiş bitkisel beslenmenin antianemik potansiyelleri değerlendirilmiştir. Kinoa tohumlarının çimlenmesi demir, kalsiyum, çinko gibi mineral içerikleri ile C vitamini ve karotenoidleri arttırmış ve antinütrisyonel faktörler olan saponin, fitik asit ve tanenleri azaltmıştır. Ayrıca ratların kırmızı kan hücre profilinde (Hb, Hct, RBCs, WBCs, MCV, MCH) olumlu değişimler olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak çimlenmiş kinoa tohumlarıyla beslenen ratlarda antioksidan, vitamin ve mineral içeriği ile besin bileşiklerinin biyoyararlanımı artmış, antianemik sağlık potansiyelleri ile sonuçlanmıştır (Darwish vd., 2021). Çimlendirilmiş kinoa hakkında yapılan başka bir çalışmada,

çimlendirme işlemi sonucunda elde edilen kinoa ununda indirgen şeker, fenolik bileşik ve protein içeriğinin yanı sıra antioksidan aktivitenin önemli düzeyde arttığı tespit edilmiştir. Bu artışın ise özellikle çimlendirme işleminin 48. ve 72. saatleri arasında olduğu bulunmuştur. Diğer yandan, çimlendirilenin 96. saatinden itibaren örneklerin protein ve polifenol içeriklerinde azalmalar meydana gelmiştir (Bhinder vd., 2021). Suárez-Estrella vd., (2020) tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise, çimlendirilenin kinoadaki protein ve nişasta molekülleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Numunelerin protein yapısında meydana gelen değişimler sonucunda köpük stabilitesinin geliştiği, köpük kapasitesinin ise protein yapısında meydana gelen değişimlerden olumsuz etkilendiği tespit edilmiştir. Filizlenmiş kinoada artan amilolitik enzim aktivitesi sebebiyle ısıtma sonucunda nişasta jelatinleşmesinde artış olduğu bildirilmiştir.

### **Amarant**

Amarant (*Amaranthus hypochondriacus*) atalardan kalma bir besin maddesidir ve peptit kompozisyonu bakımından iyi bir biyoaktif bileşen kaynağıdır. Ayrıca, glutensiz içeriği dolayısıyla bu besine olan ilgi de giderek artmaktadır. Bu yalancı tahıl, yüksek lipid, diyet lifi, vitamin, antioksidan ve esansiyel amino asitlerin mükemmel dengesi nedeniyle iyi kalitede bir protein kaynağıdır (Tania vd., 2020). Çimlendirilmiş amarant, biyoaktif peptitleri geliştirmesinin yanı sıra fitokimyasal kompozitlerin biyoaktivitelerini ve biyoyararlanımını iyileştirmekte ve sağlık açısından değerli özellikleri artırmaktadır (Sandoval-Sicairos vd., 2021). Çimlendirilmiş amarant hidrolizatlarındaki antioksidan kapasite, işlenmemiş amarant hidrolizatlara kıyasla daha yüksektir. Bu etkinin hem çimlenme süreci hem de enzimatik hidroliz yoluyla fenolik bileşiklerin ve peptitlerin salınması ile ilgili olduğu bildirilmiştir (Sandoval-Sicairos vd., 2020). Amarant tanelerinin besinsel kompozisyonunu üst düzeye çıkarmak için çimlenme koşullarını optimize etmeyi amaçlayan bir çalışmada, 28 ila 36°C ve 12–22 saat arasında değişen farklı sıcaklık ve süreler ile çimlendiricide çimlendirilmiş amarant ununun, ham amarant ununa kıyasla daha yüksek protein, antioksidan bileşen, diyet lifi ve

daha az fitik asit ve tanen içerdiği gösterilmiştir. Çimlenme süresi ve sıcaklığındaki artış, protein, antioksidan aktivite ve toplam diyet lifinde önemli bir artışa ve fitik asit ve tanenlerde azalmaya neden olmuştur. Ayrıca ham ve optimize edilerek çimlendirilmiş amarant unu amino asitlerinin yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile kantitatif analizi sonucunda, amarant çimlenmesinin metionin, triptofan ve valin hariç tüm esansiyel amino asitlerinin miktarını artırdığı belirlenmiştir (Chauhan vd., 2022). Amarantın antimikrobiyal etkilerinin incelendiği bir çalışmada ise çimlenmiş ve çimlenmemiş amarant örneklerinden su içinde çözünmüş ekstraktlar hazırlanmış ve örneklerin antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Bu aktivite sonuçlarına göre, çimlendirilmiş amarant örnekleri *Salmonella typhi* gibi şiddetli gastrointestinal sistem patojenlerine karşı dahi çok etkili bir antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Amarant tanelerine uygulanan çimlendirme işleminin duyuşal özellikleri geliştirdiği vitamin C ve posa içeriklerinin artış gösterdiği de rapor edilmiştir (Vora vd., 2014).

### Chia

Chia (*Salvia hispanica L.*), anavatanı Güney Meksika ve Kuzey Guatemala olan ve günümüzde

tüm dünyada yetiştirilen yıllık otsu bir bitkidir. Son yıllarda sağlığı geliştirici özelliklere sahip bitkisel gıdalara olan talepte bir artış olmuştur ve chia, yüksek besinsel ve fonksiyonel değeri ve başta n-3 olmak üzere çoklu doymamış yağ asitlerinden zengin kimyasal bileşimi nedeniyle bu süreçte öne çıkmıştır (de Abreu Silva vd., 2021). Chia tohumunun %35 diyet lifi, %30 yağ, %18 n-3 yağ asidi ve %16.5 protein içermesi popüler olmasında etkili olmuştur (Otondi vd., 2020). Yapılan bir çalışmada, çimlendirilmiş chia tohumunun çığ tohuma kıyasla antioksidan aktivite, kateşin, rutin, ferulik asit ve kafeik asit gibi fenolik bileşenlerin değerlerinde artış olduğu belirlenmiştir. Ancak kumarik asit, resveratrol, sinnamik asit ve kemferol gibi fenolik bileşenlerde azalma meydana gelmiştir. Aynı çalışmada çimlendirilmiş chia tohumunun çığ tohuma kıyasla palmitik, stearik, oleik ve linoleik yağ asidi bileşenleri arttığı bildirilirken, çimlendirme işleminin chia tohumunu besleyici bir gıda haline getirdiği ve katma değeri açısından potansiyel olarak fayda sağlayabileceği sonucuna varılmıştır (Ghafoor vd., 2022). Bazı tahıl ve yalancı tahıllarda çimlendirme süresi ve sıcaklığına bağlı olarak gözlenen değişimler Çizelge 1'de özetlenmiştir.

Çizelge 1. Bazı tahıl ve yalancı tahıllarda çimlenme sonrasında meydana gelen değişimler

Tahıl/ yalancı tahıl	Çimlendirme Sıcaklığı / Süresi	Temel Bulgular	Kaynak
Yulaf	18°C / 96 saat	Protein, β-glukan, tiamin, riboflavin içeriğinde ve antioksidan kapasitede artış	Garcia vd., 2021
Arpa	21°C / 12 gün	Fitaz aktivite düzeyinde artış	Bouajila vd., 2020
Karabuğday	22-23°C / 72 saat	Antioksidan kapasitede artış	Bhinder vd., 2022
Kinoa	25°C / 48 saat	İndirgen şeker, protein, fenolik bileşen içeriğinde ve antioksidan aktivitede artış	Bhinder vd., 2021
Amarant	28- 36°C / 12-22 saat	Protein içeriği, antioksidan, diyet lifinde artış; fitik asit ve tanen miktarında azalış	Chauhan 2022
Chia	20°C / 4 gün	Antioksidan aktivite, kateşin, rutin, ferulik asit ve kafeik asit gibi fenolik bileşenlerde artış	Ghafoor vd., 2022

### ÇİMLENDİRİLMİŞ BAKLAGİLLER

Baklagiller (bezelye, mercimek, fasulye, soya fasulyesi ve nohut), sadece besin kaliteleri nedeniyle değil, aynı zamanda çeşitli çevresel faydaları nedeniyle en önemli mahsullerden

biridir. Baklagil tohumları ve tozları önemli protein, karbonhidrat, vitamin, mineral ve diyet lifi kaynaklarıdır (Raza vd., 2019). Baklagillerin proteinlerinin bir kısmı, fitat ve polifenoller gibi diğer bileşenlerle etkileşim nedeniyle sindirilemez.

Bu nedenle, protein erişilebilirliğini iyileştirme arayışı birçok araştırmacının ilgisini çekmiştir. Çimlendirme, protein sindirilebilirliğini ve protein biyolojik özelliklerini iyileştirmek için bir biyoproses yöntemi olarak önerilmiştir (Ohanenye vd., 2020). Bu bölümde baklagillerin çimlendirme işlemleri ve gerçekleşen değişimler incelenmiştir.

### Soya Fasulyesi

Soya fasulyesi, özellikle Güneydoğu Asya'da dünya çapında yetiştirilen, besin açısından zengin önemli baklagil bitkisidir. (Yim vd., 2009). Protein ve yağ tedarikinin yetersiz olduğu Güney Kore'de, soya fasulyesi, yerli nüfus için önemli besin kaynaklarını temsil eden birkaç geleneksel fermente gıda için birincil kaynak olarak kullanılmıştır. Soya fasulyesi içeren gıdaların tüketiminin meme ve prostat kanseri insidansını azaltmada etkili olduğu ve kardiyovasküler hastalık ve menopoza semptomları üzerinde etkili olduğu bulunmuştur (Khosravi ve Razavi 2021). Bu faydalı etkiler, soya fasulyesindeki çeşitli biyoaktif bileşiklerin, özellikle izoflavonların etkisine atfedilebilir (Eum vd., 2020). Soyanın çimlendirilmesi sonucunda, Cu, Mn, Zn ve Ca gibi minerallere ek olarak  $\alpha$ -amilaz, lesitin,  $\alpha$ -galaktosidaz ve lipaz gibi enzimler ile genistein ve daidzein bileşiklerinin miktarlarında artış meydana gelmektedir. Soyanın tadını olumsuz yönde etkilediği bilinen lipoksigenaz enzimi ile protein sindirilebilirliğini düşüren tripsin enziminin çimlendirme işlemi ile birlikte soya filizlerinde oransal olarak azaldığı bulunmuştur (Plaza vd., 2003). Filizlenen soya fasulyesinin tüketiminin sağlık açısından faydalı olduğu bilinmektedir. Güney Kore'de soya fasulyesinin çimlendirilmesiyle alakalı yapılan bir çalışmada izoflavon içeriği, biyoaktif bileşikleri, antioksidan aktiviteleri değişimleri incelenmiştir. Ayrıca tohum ve filizlerin besin değerleri karşılaştırılmıştır. Sonucunda toplam izoflavon içeriği, soya fasulyesinin tohum aşamasında daha yüksekken, 7 gün çimlendirilmiş soya fasulyesinde toplam fenolik içeriği ve antioksidan aktiviteleri artmıştır. Filiz özlüleri, üstün anti-inflamatuar aktiviteler sergilemiştir. Çimlendirilmiş soya fasulyesinin besin kompozisyonu olarak geliştiği saptanmıştır (Eum vd., 2020). Mastropasqua vd.

(2020) tarafından yapılan bir çalışmada 5 günlük çimlenme sonrası soyanın kırmızı, mavi ve beyaz ışık ve karanlık koşullarının kalite parametreleri üzerindeki etkisi değerlendirilmiş toplam askorbat, çözümlü proteinler, şekerler, fenolik bileşikler ve karotenoidler, klorofiller ve antosiyaninler gibi pigmentler araştırılmıştır. Karanlık uygulama, aydınlatma nedeniyle kuru madde azalmasını engellerken, kırmızı ışık soya fasulyesinde polifenollerde artışa neden olmuştur. Karanlığa nazaran belli dalga boyundaki aydınlatma; C vitamini, karotenoid, klorofil ve antosiyanin içerikleri üzerinde olumlu etki göstermiştir. Soya fasulyesinde çözümlü protein, şekerler ve polifenollerde artış göstermiştir (Mastropasqua vd., 2020).

Soya fasulyesi çeşidinin ve çimlenme süresinin; yapısal değişiklikler, antibesinsel faktör içeriği ve çimlendirilmiş soya fasulyesinin antioksidan aktivitesi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmanın sonucunda, artan çimlenme süresi ile antioksidan aktivitenin arttığı, antibesinsel faktörlerin içeriğinin ise azaldığı belirlenmiştir. Çimlendirmenin soya fasulyesinin fonksiyonel özelliklerini iyileştiren etkili ve ucuz bir yöntem olduğu gösterilmiştir (Hu vd., 2021). Landfeld vd. (2014) soya sütünden yapılan yoğurda çimlendirilmiş soya taneleri eklemiş ve bu tanelerin yoğurdun duysal ve reolojik özellikleri üzerine etkisini araştırmıştır. Çimlendirme işleminin soya fasulyesi tanelerinin kuru madde oranını yükselterek soya sütünden yapılan yoğurtlarda daha iyi bir kıvam elde edilmesi sağlanmıştır.

### Nohut

Pek çok baklagil arasında, nohut (*Cicer arietinum*), besleyici ve biyoaktif bileşimleri nedeniyle insan beslenmesinin önemli bir parçasıdır (Raza vd., 2019). Çok eski zamanlardan beri üretilen nohut, önemli bir baklagildir ve farklı bileşiklerinde antioksidan, antihipertansif, hipokolesterolemik ve antikanser özellikler tanınmıştır (Faridy vd., 2020). Ayrıca, çimlendirilmiş nohutun ratlarda kolesterol düzeyine olumlu etkisinin olduğu bildirilmiştir (Khattak vd., 2007). Nohutun çimlenmesi sırasında farklı çimlenme süreleri ve aydınlatma koşullarının protein çözünürlüğü ve

karotenoid içeriği üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, tüm çimlendirme koşullarında protein çözünebilirliği olumlu yönde etkilenmiş ve en yüksek  $\beta$ -karoten düzeyine 72 saat sarı ışıkta çimlendirilen nohutlarda ulaşılmıştır (Khattak vd., 2008). Aydınlatma koşullarına ilişkin yapılan benzer bir çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, nohutların mavi ışık altında 48 saat süreyle çimlendirilmesi sonucunda nohutlarda istenmeyen bir bileşen olan fitik asit düzeyinin %1.01'den %0.6'ya düştüğü tespit edilmiştir (Khattak vd., 2007). Pigmentli Desi nohutun çimlendirilmesi hakkında yapılan bir çalışmada, 171 saat süreyle 33.7°C'de çimlendirme işleminden sonra çözünebilir lif içeriğinde %26, toplam diyet lifinde %15 ve çözünemeyen lifte ise %15 oranında anlamlı bir artış olduğu bulunmuştur. Bunlara ek olarak, çimlendirme işlemi ile nohutta bulunan ham protein miktarında %16.4 oranında anlamlı bir artış olduğu bildirilmiştir (Domínguez-Arispuro vd., 2017). Nohutun dört günlük çimlendirme işlemi boyunca antioksidan aktivite, askorbik asit, toplam fenolik ve toplam flavonoid içerikleri değerlendirilmiştir. Kuru madde bazında protein içeriğinin arttığı tespit edilmiş, karbonhidrat ve yağ içeriğinin ise çimlenme sırasında azaldığı bildirilmiştir. Askorbik asit içeriğinin yaklaşık 3.52 katına çıktığı, antioksidan aktivitenin 4 günlük çimlenmeden sonra %24.14'den %58.50'ye yükseldiği raporlanmıştır. Ayrıca, su emme kapasitesinin düştüğü, yağ emme kapasitesinin ise arttığı tespit edilmiştir (Kaur ve Prasad, 2022).

### Acı Bakla

Acı bakla (*Lupinus albus*), yaklaşık 2000 yıl önce Mısır'da ortaya çıktığı düşünülen ve daha sonra sağlık üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle geçmişten günümüze birçok toplum tarafından kullanılmaya başlanmış bir mevsim baklagilidir. Yüksek protein ve nispeten düşük yağ içeriğine sahip nişastasız baklagil tohumu olup, besin değeri ve marjinal topraklara ve iklimlere uyum sağlaması nedeniyle dünyanın çeşitli yerlerinde yetiştirilmektedir (Singla vd., 2021). Acı baklanın 2 ve 4 gün boyunca çimlendirilmesiyle mikroyapısal ve fizikokimyasal bileşimlerinin değişimleri araştırılmıştır. Çimlenme ile birlikte Na, Mg, Fe ve Zn miktarları ile asitlik değeri

artmış, dört günlük çimlenme süresi boyunca yağ ve karbonhidrat içeriği azalmıştır (Atudorei vd., 2021). Çimlendirme işleminin acı baklada bulunan fenolik bileşiklerin miktarını artırdığını ve böylece antioksidan kapasitesini yükselttiğini belirten çalışmalar bulunmaktadır (Khan vd., 2018; Saleh vd., 2019). Acı bakla tohumlarının toplam fenolik madde içeriğinin 9 günlük çimlendirme işlemi ile yaklaşık 3 kat arttığı tespit edilmiştir (Duenas vd., 2009).

### Mercimek

Mercimek (*Lens culinaris* Medic.), başlıca Kanada ve Hindistan'da üretilen *Fabaceae* familyasına ait bir bakliyat bitkisidir. Küresel baklagil üretiminde fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.), bezelye (*Pisum sativum* L.) ve nohuttan (*Cicer arietinum* L.) sonra dördüncü sırada yer almaktadır (Kumar ve Pandey 2020). Mercimeğin çimlendirilerek tüketilmesi ile ilgili yapılan bir çalışmada, 5 çeşit mercimek türü kullanılmış ve 16-18 saat boyunca 50±5°C'de, çimlendirme uygulanan mercimeklerin toplam çözünebilir şeker miktarında önemli bir değişiklik gözlenmemişken, nişasta içeriğinde ise %9.93-35.56 oranında bir azalma meydana geldiği saptanmıştır. Mercimeklerin ham protein miktarında ise ortalama olarak %21.63 oranında düşüş meydana geldiği bildirilmiştir. Bu azalışın sebebi olarak çimlendirme sırasında proteaz enzim seviyesinde meydana gelen artışın sorumlu olduğu düşünülmektedir (Pal vd., 2016). Dolayısıyla maksimum verim elde etmek için çimlenme şartlarının optimum düzeyde olması önem taşımaktadır. Geliştirilmiş besinsel ve fonksiyonel özelliklere sahip yeni mercimek unları üretmek için çimlenme koşullarının optimizasyonunu amaçlayan bir çalışmada; fitik asit, askorbik asit ve  $\gamma$ -aminobütirik asit (GABA), fenolik bileşiklerin içeriği ve profili, antioksidan aktivite, beklenen glisemik indeks (GI) ve çimlenme sırasındaki renkler incelenmiştir. Filizlenme, fitik asit içeriğinin azalmasını sağlamış ve askorbik asit, GABA, çözünmeyen fenolik bileşikler, antioksidan aktivite ve beklenen GI seviyelerini arttırmış ve elde edilen mercimek unlarının rengini değiştirmiştir. Filizlenmiş mercimek unlarının besinsel, biyoaktif ve kalite özelliklerini en üst düzeye çıkarmak için en uygun çimlenme sıcaklığı ve süresi gibi işlem koşullarının

3.5 gün boyunca 21°C olduğunu ortaya çıkarmıştır (Rico vd., 2021).

### ÇİMLENDİRİLMİŞ BİTKİLER

Çimlendirme işleminin makromolekülleri üretebilen, parçalayabilen, sindirilebilirliği artıran ve besin değerlerini artıran ekonomik ve etkili bir teknoloji olduğu düşünülmektedir. Çimlendirilen besinlerin askorbik asit, antioksidan kapasite, fenolik asit ve izoflavon içeriklerinin yükseldiği belirlenmiştir (Huang vd., 2014). Bu bölümde bitkilerin çimlendirilmesi sonrasında besin değerlerinin değişimleri ve çimlendirme koşulları incelenmiştir.

#### Brokoli

Brokoli filizi, *Brassica* familyasına ait, besin kalitesi ve ticari değeri yüksek olan yenilebilir bitki türlerinden biridir. Brokoli filizlerinin, askorbik asit, antosiyaninler, glukosinolatlar, fenolik asitler, flavonoidler ve fitokimyasal içerikleri nedeniyle vücudumuzun bağışıklığını veya sağlık durumunu iyileştirmede hayati bir rol oynayabileceği bildirilmiştir (Krishna vd., 2022). Di Bella vd. (2020), üç brokoli çeşidinin brokoli gelişiminin üç farklı aşamasında (filizler, mikro yeşillikler ve bebek yaprakları) fenolik bileşiklerin profilini ve konsantrasyonunu araştırmış ve tüm çeşitlerin brokoli filizlerinde kaempferolün baskın fenolik bileşik olduğunu ortaya koymuştur. Brokoli filizlerinin çimlendirilmesinde LED ışıklarının etkisini araştıran bir çalışma da beyaz, yeşil ve mor LED ışıkların brokoli filizlerinin uzunluğu ve toplam su içeriğini azalttığı gözlemlenmiş, en yüksek askorbik asit ve antosiyanin içeriğinin ise mavi LED ışıkla bulunduğu bildirilmiştir. Perez-Balibrea vd. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, ticari olarak satılan brokoli tohumlarında C vitamini eser miktarlarda saptanmasına rağmen, filizlenme sürecince C vitamini miktarının arttığı rapor edilmiştir. Ayrıca filizlenme ile tohumların flavonoid içeriğinin 2-3 kat, glukosinolat içeriğinin 2 kat azaldığı, bunun aksine fenolik asit içeriklerinin 2-6 kat arttığı tespit edilmiştir.

#### Turp

Turp (*Raphanus sativus* L.), Brassicaceae familyasının temel bir kök sebzesidir, yıllık

bahçecilik ürünü olarak yetiştirilmektedir ve besin değeri nedeniyle dünya çapında tüketilmektedir (Muleke vd., 2021). Turp kökü içerdiği protein ve polisakaritlerin yanı sıra önemli miktarda antioksidan, C vitamini ve glukosinolatlar ile fenolik bileşikler gibi sağlığı geliştirici bileşikler içerir (Attiri vd., 2021). Turp filizlerinin sağlık üzerindeki olumlu etkilerini artırmak için uygun sıcaklık ve su miktarı ile çimlenme süresinin seçiminin büyük önem taşıdığı bildirilmiştir (Bakhshandeh ve Gholamhossieni 2019). Janicki vd. (2005)'in yaptığı bir çalışmada 20°C'de çimlendirilen turpun flavonol içeriğinde anlamlı bir artış gözlemlendiği, sıcaklık değişimlerinin ise flavonol sentezini olumsuz yönde etkilediği belirlenmiştir (Janicki vd., 2005).

#### Yonca

Farklı topraklara ve iklim koşullarına yüksek adaptasyonu ve iyi yem kalitesi sağlamasından dolayı yonca (*Medicago sativa* L.), tüm dünyada yetiştirilen en önemli bitkilerden birisidir (Baxter vd., 2019). Günümüzde bazı ülkelerde yonca sadece hayvan yemi olarak değerlendirilirken, gelişmiş ülkelerde yüksek esansiyel aminoasit içeriği ve C ve B<sub>2</sub> vitamini gibi vitaminler ihtiva etmesinden ötürü insanlar tarafından da sıklıkla tüketilmektedir. Ayrıca çimlendirme uygulanan yonca tohumlarında, Mg, K, Na, Ca, Zn, Fe, Cu, Mn mineralleri ile C, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, E, C ve A vitaminlerinin tohumuna kıyasla yonca filizinde daha yüksek miktarda olduğu belirlenmiştir (Lee vd., 2007). Yapılan son çalışmalarda, kırmızı yonca ve yonca filizlerinde östrojenik aktiviteye sahip yüksek konsantrasyonlarda izoflavon ve flavonoidler bulunmuş ve nutrasötikler olarak insan beslenmesinde kullanımlarının desteklenebileceği vurgulanmıştır (Mattoli vd., 2016; Chiriac vd., 2020a). Yapılan başka bir çalışmada çimlendirilen yonca (*Medicago sativa*) ve kırmızı yoncada (*Trifolium pratense*) Mg, K, Na ve Ca gibi ana mineral elementler ve Zn, Fe, Cu, Ni ve Se gibi eser elementler açısından zengin olduğu bulunmuştur (Chiriac vd., 2020b). Özel bir firma tarafından temin edilen yonca ve soya örnekleri ile bu örneklerin filizlerinin içerikleri hakkında yapılan bir çalışmada yonca tohumları filizlendirildiğinde C ve A vitaminlerinde sırasıyla 10 ve 1.250 kat artış meydana geldiği, soya

tohumlarının filizlerinde ise genistein ve daidzein fitoöstrojenlerinde sırasıyla 3 ve 10 kat artış olduğu bildirilmiştir (Plaza vd., 2003). Başka bir çalışma da 120 saatlik çimlenmeden sonra bazı tohumların içeriği incelenmiş ve sonucunda a-tokoferol içeriği buğdayda 5.3 kat, turpda 5.4 kat, yoncada 6.9 kat ve amarantda 5.2 kat artmıştır. Ayrıca 24 saat ıslatma ve çimlenme sonrasında buğday, amarant ve bezelye tohumlarında toplam fenolik içerik azalırken, diğer türlerin tohumlarında neredeyse iki kat artmıştır (Tarasevičienė vd., 2019). Yonca, buğday ve turp filizleriyle yapılan bir çalışmada ham yağ, protein, polifenol, antioksidan aktivite ve vitamin değişimleri 7 günlük çimlenme boyunca araştırılmıştır. Fenolik bileşikler, antioksidan aktivite ve kateşin miktarları sırasıyla buğday, yonca ve turp filizleri için 7., 5. ve 6. günlerde maksimum seviyelere çıkmıştır. En uygun çimlenme günlerinde alınan yonca ve turp filizleri, E, A ve B<sub>6</sub> vitaminlerinin tavsiye edilen günlük tüketimi karşılamaya katkıda bulunacağı belirlenmiştir. Daha fazla besin içeriği olarak kullanımları için; buğday, yonca ve turp tohumlarının sırasıyla sadece 7, 4 ve 6 gün boyunca filizlenmesinin optimum olduğu ve ardından besin kalitelerinde azalma eğilimi görüldüğü sonucu ortaya çıkmıştır (Francis vd., 2022).

### Börülce

Afrika'nın sosyoekonomik açıdan en önemli baklagillerinden biri olan börülce (*Vigna unguiculata*), özellikle gelişmekte olan ülkelerde sebze, atıştırılabilir ve yemek malzemesi olarak tüketilmektedir. Kuru olgun tohumlar, kaynatma ve konserve için de uygundur. Börülce ekonomik olmakla beraber yetersiz beslenme ve gıda güvensizliği tehditlerini çözmede anahtar olan temel bitki besinleri, mineraller ve proteinlerin sürdürülebilir bir kaynağı olarak kabul edilmektedir (Gonçalves vd., 2016; Ishikawa vd., 2020). Yapılan bir çalışmada üç günlük çimlenme sonucunda börülcenin antioksidan kapasitesinin önemli ölçüde arttığı ve çimlenme süresi uzadıkça içeriğindeki karotenoid miktarında ise azalma gözlemlendiği rapor edilmiştir (James vd., 2020). Börülce tohumlarının filizlendirilerek C vitamini düzeylerinin ve antioksidan aktivitelerinin

araştırıldığı bir çalışmada başlangıçta börülce tohumlarında C vitamini eser miktarlarda saptanmasına rağmen, filizlenme süresince C vitamini içeriğinin %58-67 dolaylarında arttığı tespit edilmiştir. Tohumun antioksidan aktivitesi ise filizlenme işlemi ile giderek artarak 6. günde en yüksek düzeye ulaşmıştır. Sonuç olarak araştırmacılar, filizlendirme işleminin börülce tohumlarının C vitamini içeriğini ve antioksidan kapasitelerini artırmak açısından iyi bir teknik olduğunu tavsiye etmişlerdir (Doblado vd., 2007).

### SONUÇ

Besinlerin çimlendirilmesi uzak doğu ülkelerinde yüzyıllardır kullanılan oldukça eski bir işleme yöntemi olmasına rağmen günlük hayatımızda düşük kalori değeri, yüksek biyolojik aktivitesi, azaltılmış beslenme karşıtı bileşen içeriği ve geliştirilmiş sindirilebilirliği nedeniyle sağlıklı gıda olarak yeni nitelendirilmeye başlanmıştır. Gıdanın besleyici, biyokimyasal ve duyuşsal özelliklerini değiştirmesinin yanında antibesinsel faktörlerin azalmasına neden olduğu için tahılların işlenmesinde beslenme kalitesini iyileştirmek için kullanılmaktadır. Çimlendirilmiş besinler, çimlenmemiş tohumlara kıyasla besin kalitesini etkileyen bazı endojen enzimlerin aktivasyonu ile büyük ölçüde ilişkilidir. Çimlendirilmiş yenilebilir tohumların antioksidan, antidiyabetik ve antikanser etkileri gibi birçok biyoaktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle çimlendirme, yenilebilir tohumların sağlığa olan yararlarını artırmanın iyi bir yoludur. Çimlendirme işleminin bazı besin maddelerinin kompozisyonu ve biyoaktif bileşenlerini olumlu etkilemesinden ötürü insan beslenmesine katkıda bulunabileceği çalışmalarla gösterilmiştir. Çimlendirilmiş tanelerin, gelecekte yapılacak sağlık beyanlarında ve gıda endüstrisinin geliştireceği yeni ürünlerde yararlanılma potansiyeli yüksek besinler olacağı beklenmektedir. Bununla birlikte yapılan son araştırmalar, bazı çimlendirilmiş yenilebilir tahılların ve baklagillerin iyi birer gıda takviyeleri olduğunu ve bunların fonksiyonel gıda formülasyonlarına eklenmesinin sağlık stratejisi için önemli olduğunu göstermektedir. İnsanlar üzerindeki yararlı etkilerini daha iyi anlamak için çimlendirme hakkında daha fazla araştırma yapılmalıdır.

### YAZAR KATKILARI

Bu çalışmanın hazırlanması ve yayımlanmasında ismi geçen yazarlar dışında hiç kimsenin ya da hiçbir kuruluşun katkısı olmamıştır. Her iki yazar da makalenin yazılmasında ve düzenlenmesinde eşit katkı sağlamıştır.

### ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar, bu derleme makalesiyle ilgili olarak başka kişiler ve/veya kurumlar arasında çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

### KAYNAKLAR

Al-Ansi, W., Zhang, Y., Alkawry, T. A. A., Al-Adeeb, A., Mahdi, A. A., Al-Maqtari, Q. A., ... & Wang, L. (2022). Influence of germination on bread-making behaviors, functional and shelf-life properties, and overall quality of highland barley bread. *LWT*, 159, 113200.

Aparicio-García, N., Martínez-Villaluenga, C., Frias, J., & Peñas, E. (2021). Sprouted oat as a potential gluten-free ingredient with enhanced nutritional and bioactive properties. *Food Chemistry*, 338, 127972.

Attri, P., Ishikawa, K., Okumura, T., Koga, K., Shiratani, M., & Mildaziene, V. (2021). Impact of seed color and storage time on the radish seed germination and sprout growth in plasma agriculture. *Scientific reports*, 11(1), 1-10.

Atudorei, D., Stroe, S. G., & Codină, G. G. (2021). Impact of germination on the microstructural and physicochemical properties of different legume types. *Plants*, 10(3), 592.

Bakhshandeh, E., & Gholamhossieni, M. (2019). Modelling the effects of water stress and temperature on seed germination of radish and cantaloupe. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38(4), 1402-1411.

Bangar, S. P., Sandhu, K. S., Trif, M., Manjunatha, V., & Lorenzo, J. M. (2022). Germinated Barley Cultivars: Effect on Physicochemical and Bioactive Properties. *Food Analytical Methods*, 1-8.

Baxter, L. L., Grey, T. L., Tucker, J. J., & Hancock, D. W. (2019). Optimizing temperature requirements for clover seed germination. *Agrosystems, Geosciences & Environment*, 2(1), 1-7.

Beaulieu, J. C., Boue, S. M., & Goufo, P. (2022). Health-promoting germinated rice and value-added foods: a comprehensive and systematic review of germination effects on brown rice. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-34.

Bhinder, S., Kumari, S., Singh, B., Kaur, A., & Singh, N. (2021). Impact of germination on phenolic composition, antioxidant properties, antinutritional factors, mineral content and Maillard reaction products of malted quinoa flour. *Food Chemistry*, 346, 128915.

Bhinder, S., Singh, N., & Kaur, A. (2022). Impact of germination on nutraceutical, functional and gluten free muffin making properties of Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). *Food Hydrocolloids*, 124, 107268.

Bouajila, A., Ammar, H., Chahine, M., Khouja, M., Hamdi, Z., Khechini, J., ... & López, S. (2020). Changes in phytase activity, phosphorus and phytate contents during grain germination of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. *Agroforestry Systems*, 94(4), 1151-1159.

Cabrera-Santos, D., Ordoñez-Salanueva, C.A., Sampayo-Maldonado, S., Campos, J. E., Orozco-Segovia, A., & Flores-Ortiz, C. M. (2021). Chia (*Salvia hispanica* L.) Seed soaking, germination, and fatty acid behavior at different temperatures. *Agriculture*, 11(6), 498.

Chauhan, A., Kumari, N., Saxena, D. C., & Singh, S. (2022). Effect of germination on fatty acid profile, amino acid profile and minerals of amaranth (*Amaranthus* spp.) grain. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16(3), 1777-1786.

Chiriac, E. R., Chițescu, C. L., Sandru, C., Geană, E. I., Lupoaie, M., Dobre, M., ... & Boscencu, R. (2020b). Comparative study of the bioactive properties and elemental composition of red clover (*Trifolium pratense*) and alfalfa (*Medicago sativa*) sprouts during germination. *Applied Sciences*, 10(20), 7249.

Chiriac, E.R., Chițescu, C.L., Borda, D., Lupoaie, M., Gird, C.E., Geana, E.-I., Blaga, G.-V., Boscencu, R. (2020a). Comparison of the Polyphenolic Profile of *Medicago sativa* L. and *Trifolium pratense* L. Sprouts in Different

- Germination Stages Using the UHPLC-Q Exactive Hybrid Quadrupole Orbitrap High-Resolution Mass Spectrometry. *Molecules*, 25, 2321.
- Darwish, A. M., Al-Jumayi, H. A., & Elhendy, H. A. (2021). Effect of germination on the nutritional profile of quinoa (*Cheopodium quinoa* Willd.) seeds and its anti-anemic potential in Sprague–Dawley male albino rats. *Cereal Chemistry*, 98(2), 315-327.
- de Abreu Silva, L., Verneque, B. J. F., Mota, A. P. L., & Duarte, C. K. (2021). Chia Seeds (*Salvia Hispanica* L.) Consumption and Lipid Profile: *A Systematic Review and Meta-analysis*. *Food & Function*.
- Desai, S. D., Desai, D. G., & Kaur, H. (2009). Saponins and their bio-logical activities. *Pharma Times*, 41(3), 13–16.
- Di Bella, M. C., Niklas, A., Toscano, S., Picchi, V., Romano, D., Lo Scalzo, R., & Branca, F. (2020). Morphometric characteristics, polyphenols and ascorbic acid variation in Brassica oleracea L. novel foods: Sprouts, microgreens and baby leaves. *Agronomy*, 10(6), 782.
- Ding, J., & Feng, H. (2019). Controlled germination for enhancing the nutritional value of sprouted grains. In *Sprouted grains* (pp. 91-112). AACC International Press.
- Doblado, R., Frías, J., Vidal-Valverde, C., (2007). Changes in vitamin C content and antioxidant capacity of raw and germinated cowpea (*Vigna sinensis* var. carilla) seeds induced by high pressure treatment, *Food Chemistry*, 101,918–923.
- Domínguez-Arispuro, D. M., Cuevas-Rodríguez, E. O., Milán-Carrillo, J., León-López, L., Gutiérrez-Dorado, R., & Reyes-Moreno, C. (2018). Optimal germination condition impacts on the antioxidant activity and phenolic acids profile in pigmented desi chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds. *Journal of food science and technology*, 55(2), 638-647.
- Duenas, M., Hernandez, T., Estrella, I., & Fernandez, D. (2009). Germination as a process to increase the polyphenol content and antioxidant activity of lupin seeds (*Lupinus angustifolius* L.). *Food chemistry*, 117(4), 599-607.
- Eum, H. L., Park, Y., Yi, T. G., Lee, J. W., Ha, K. S., Choi, I. Y., & Park, N. I. (2020). Effect of germination environment on the biochemical compounds and anti-inflammatory properties of soybean cultivars. *PLoS one*, 15(4), e0232159.
- FAO (2011). La Quinoa: Cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial. Oficina Regional Para America Latina Y El Caribe, FAO, 37, 66. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2009.03.010F>
- Faridy, J. C. M., Stephanie, C. G. M., Gabriela, M. M. O., & Cristian, J. M. (2020). Biological activities of chickpea in human health (*Cicer arietinum* L.). A review. *Plant foods for human nutrition*, 75(2), 142-153.
- Farooqui, A. S., Syed, H. M., Talpade, N. N., Sontakke, M. D., & Ghatge, P. U. (2018). Influence of germination on chemical and nutritional properties of Barley flour. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(2), 3855-3858.
- Francis, H., Debs, E., Koubaa, M., Alrayess, Z., Maroun, R. G., & Louka, N. (2022). Sprouts Use as Functional Foods. Optimization of Germination of Wheat (*Triticum aestivum* L.), Alfalfa (*Medicago sativa* L.), and Radish (*Raphanus sativus* L.) Seeds Based on Their Nutritional Content Evolution. *Foods*, 11(10), 1460.
- Gan, Ren-You, Wing-Yee Lui, Kao Wu, Chak-Lun Chan, Shu-Hong Dai, Zhong-Quan Sui, and Harold Corke. "Bioactive compounds and bioactivities of germinated edible seeds and sprouts: An updated review." *Trends in Food Science & Technology* 59 (2017): 1-14.
- Ghafoor, K., Al Juhaimi, F., Özcan, M. M., Uslu, N., Ahmed, I. A. M., & Babiker, E. E. (2022). The effect of boiling, germination and roasting on bioactive properties, phenolic compounds, fatty acids and minerals of chia seed (*Salvia hispanica* L.) and oils. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 27, 100447.
- Gonçalves, A., Goufo, P., Barros, A., Domínguez-Perles, R., Trindade, H., Rosa, E. A., ... & Rodrigues, M. (2016). Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp), a renewed multipurpose crop for a more sustainable agri-food system:



- nutritional advantages and constraints. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(9), 2941-2951.
- Hosseini, H., & Jafari, S. M. (2020). Introducing nano/microencapsulated bioactive ingredients for extending the shelf-life of food products. *Advances in Colloid and Interface Science*, 282, 102210.
- Hsu, C. K., Chiang, B. H., Chen, Y. S., Yang, J. H., & Liu, C. L. (2008). Improving the antioxidant activity of buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn) sprout with trace element water. *Food Chemistry*, 108(2), 633-641.
- Hu, M., Du, X., Liu, G., Zhang, S., Wu, H., & Li, Y. (2022). Germination improves the functional properties of soybean and enhances soymilk quality. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(7), 3892-3902.
- Huang, X., Cai, W., & Xu, B. (2014). Kinetic changes of nutrients and antioxidant capacities of germinated soybean (*Glycine max* L.) and mung bean (*Vigna radiata* L.) with germination time. *Food Chemistry*, 143, 268-276.
- Ikram, A., Saeed, F., Afzaal, M., Imran, A., Niaz, B., Tufail, T., ... & Anjum, F. M. (2021). Nutritional and end-use perspectives of sprouted grains: A comprehensive review. *Food science & nutrition*, 9(8), 4617-4628.
- Ishikawa, H., Ikazaki, K., & Iseki, K. (2021). Visual observation of cowpea pod elongation to predict nitrogen accumulation in immature seeds. *Plant Production Science*, 24(2), 224-229.
- Ispiryran, L., Kuktaite, R., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2021). Fundamental study on changes in the FODMAP profile of cereals, pseudo-cereals, and pulses during the malting process. *Food Chemistry*, 343, 128549.
- James, S., Nwabueze, T. U., Ndife, J., Onwuka, G. I., & Usman, M. A. A. (2020). Influence of fermentation and germination on some bioactive components of selected lesser legumes indigenous to Nigeria. *Journal of Agriculture and Food Research*, 2, 100086.
- Janicki, B., Kupcewicz, B., Napierała, A., & Mądzielewska, A. (2005). Effect of temperature and light (UV, IR) on flavonol content in radish and alfalfa sprouts. *Folia biologica (Kraków)*, 53(4), 121-125.
- Jin, J., Ohanenye, I. C., & Udenigwe, C. C. (2022). Buckwheat proteins: Functionality, safety, bioactivity, and prospects as alternative plant-based proteins in the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(7), 1752-1764.
- Karaman, E. E., & Soyulu, A. G. *Gastronomi Ve Mutfak Sanatları Doktora Öğrencilerinin Çiğ Beslenme (Raw Food) Algılarının Belirlenmesine Yönelik Bir Araştırma*. *Gastroia: Journal of Gastronomy And Travel Research*, 4(2), 251-269.
- Kaur, R., & Prasad, K. (2022). Elucidation of chickpea hydration, effect of soaking temperature, and extent of germination on characteristics of malted flour. *Journal of Food Science*, 87(5), 2197-2210.
- Khan, M. K., Karnpanit, W., Nasar-Abbas, S. M., Huma, Z. E., & Jayasena, V. (2018). Development of a fermented product with higher phenolic compounds and lower anti-nutritional factors from germinated lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(12), e13843.
- Khang, D. T., Vasiljevic, T., & Xuan, T. D. (2016). Bioactive compounds, antioxidant and enzyme activities in germination of oats (*Avena sativa* L.). *International Food Research Journal*, 23(5), 1980.
- Khattak, A. B., A. Zeb, N. Bibi, S. A. Khalil, and M. S. Khattak. (2007). Influence of germination techniques on phytic acid and polyphenols content of chickpea (*Cicer arietinum* L.) sprouts. *Food Chemistry*, 104 (3):1074–1079.
- Khattak, A. B., Zeb, A., & Bibi, N. (2008). Impact of germination time and type of illumination on carotenoid content, protein solubility and in vitro protein digestibility of chickpea (*Cicer arietinum* L.) sprouts. *Food chemistry*, 109(4), 797-801
- Khosravi, A., & Razavi, S. H. (2021). Therapeutic effects of polyphenols in fermented soybean and black soybean products. *Journal of Functional Foods*, 81, 104467.
- Kılınçer, F. N., & Demir, M. K. (2019). Çimlendirilmiş Bazı Tahıl Ve Baklagillerin Fiziksel Ve Kimyasal Özellikleri. *Gıda*, 44(3), 419-429.

- Hao, J., Li, J., & Zhao, D. (2021). Effect of slightly acidic electrolysed water on functional components, antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory ability of buckwheat sprouts. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(7), 3463-3473.
- Koyama, M., Nakamura, C., & Nakamura, K. (2013). Changes in phenols contents from buckwheat sprouts during growth stage. *Journal of Food Science and Technology*, 50(1), 86-93.
- Krishna, H., Janakiram, T., Singh, M. K., Karuppaiah, V., Yadava, R. B., Prasad, R. N., ... & Behera, T. K. (2022). Immunomodulatory potential of vegetables vis-à-vis human health. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 1-20.
- Kumar, S., & Pandey, G. (2020). Biofortification of pulses and legumes to enhance nutrition. *Heliyon*, 6(3), e03682.
- Lee, S. J., Ahn, J. K., Khanh, T. D., Chun, S. C., Kim, S. L., Ro, H. M., ... & Chung, I. M. (2007). Comparison of isoflavone concentrations in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) sprouts grown under two different light conditions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(23), 9415-9421.
- Li, X., Liu, J., Chang, Q., Zhou, Z., Han, R., & Liang, Z. (2021). Antioxidant and antidiabetic activity of proanthocyanidins from *Fagopyrum dibotrys*. *Molecules*, 26(9), 2417. López-Martínez, L. X., Leyva-López, N., Gutiérrez-Grijalva, E. P., & Heredia, J. B. (2017). Effect of cooking and germination on bioactive compounds in pulses and their health benefits. *Journal of Functional Foods*, 38, 624-634.
- Mastropasqua, L., Dipierro, N., & Paciolla, C. (2020). Effects of darkness and light spectra on nutrients and pigments in radish, soybean, mung bean and pumpkin sprouts. *Antioxidants*, 9(6), 558.
- Mattioli, S., Dal Bosco, A., Martino, M., Ruggeri, S., Marconi, O., Sileoni, V., ... & Benincasa, P. (2016). Alfalfa and flax sprouts supplementation enriches the content of bioactive compounds and lowers the cholesterol in hen egg. *Journal of Functional Foods*, 22, 454-462.
- Muleke, E. M. M., Yan, W. A. N. G., Zhang, W. T., Liang, X. U., Ying, J. L., Karanja, B. K., ... & LIU, L. W. (2021). Genome-wide identification and expression profiling of MYB transcription factor genes in radish (*Raphanus sativus* L.). *Journal of Integrative Agriculture*, 20(1), 120-131.
- Murugkar, D. A. (2014). Effect of sprouting of soybean on the chemical composition and quality of soymilk and tofu. *Journal of food science and technology*, 51(5), 915-921.
- Ohanenye, I. C., Tsopmo, A., Ejike, C. E., & Udenigwe, C. C. (2020). Germination as a bioprocess for enhancing the quality and nutritional prospects of legume proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 101, 213-222.
- OM, A., Kiin-Kabari, D. B., & Isah, E. M. (2020). Effects of Processing Methods on In-Vitro Protein Digestibility of Cookies Produced from Sesame Seed Flour Blends.
- Otondi, E. A., Nduko, J. M., & Omwamba, M. (2020). Physico-chemical properties of extruded cassava-chia seed instant flour. *Journal of Agriculture and Food Research*, 2, 100058.
- Pal, R. S., Bhartiya, A., Yadav, P., Kant, L., Mishra, K. K., Aditya, J. P., & Pattanayak, A. (2017). Effect of dehulling, germination and cooking on nutrients, anti-nutrients, fatty acid composition and antioxidant properties in lentil (*Lens culinaris*). *Journal of food science and technology*, 54(4), 909-920.
- Pérez-Balibrea, S., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2011). Genotypic effects on the phytochemical quality of seeds and sprouts from commercial broccoli cultivars. *Food Chemistry*, 125(2), 348-354.
- Plaza, L., de Ancos, B., & Cano, P. M. (2003). Nutritional and health-related compounds in sprouts and seeds of soybean (*Glycine max*), wheat (*Triticum aestivum*. L) and alfalfa (*Medicago sativa*) treated by a new drying method. *European Food Research and Technology*, 216(2), 138-144.
- Raza, H., Zaaboul, F., Shoaib, M., & Zhang, L. (2019). An overview of physicochemical composition and methods used for chickpeas

- processing. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, 7(5), 495-500.
- Rico, D., Peñas, E., del Carmen García, M., Rai, D. K., Martínez-Villaluenga, C., Frias, J., & Martín-Diana, A. B. (2021). Development of Antioxidant and Nutritious Lentil (*Lens culinaris*) Flour Using Controlled Optimized Germination as a Bioprocess. *Foods*, 10(12), 2924.
- Saleh, H. M., Hassan, A. A., Mansour, E. H., Fahmy, H. A., & El-Bedawey, A. E. F. A. (2019). Melatonin, phenolics content and antioxidant activity of germinated selected legumes and their fractions. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 18(3), 294-301.
- Sandoval-Sicairos, E. S., Domínguez-Rodríguez, M., Montoya-Rodríguez, A., Milán-Noris, A. K., Reyes-Moreno, C., & Milán-Carrillo, J. (2020). Phytochemical compounds and antioxidant activity modified by germination and hydrolysis in mexican Amaranth. *Plant Foods for Human Nutrition*, 75(2), 192-199.
- Sandoval-Sicairos, E. S., Milán-Noris, A. K., Luna-Vital, D. A., Milán-Carrillo, J., & Montoya-Rodríguez, A. (2021). Anti-inflammatory and antioxidant effects of peptides released from germinated amaranth during in vitro simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 343, 128394.
- Singla, P., Sharma, S., & Singh, A. (2021). Lupine: A Versatile Legume with Enhanced Nutritional Value. In *Handbook of Cereals, Pulses, Roots, and Tubers* (pp. 427-448). CRC Press.
- Suárez-Estrella, D., Bresciani, A., Iametti, S., Marengo, M., Pagani, M. A., & Marti, A. (2020). Effect of sprouting on proteins and starch in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Plant Foods for Human Nutrition*, 75(4), 635-641.
- Tang, S., Mao, G., Yuan, Y., Weng, Y., Zhu, R., Cai, C., & Mao, J. (2020). Optimization of oat seed steeping and germination temperatures to maximize nutrient content and antioxidant activity. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(9), e14683.
- Taniya, M. S., Reshma, M. V., Shanamol, P. S., Krishnan, G., & Priya, S. (2020). Bioactive peptides from amaranth seed protein hydrolysates induced apoptosis and antimigratory effects in breast cancer cells. *Food Bioscience*, 35, 100588.
- Tarasevičienė, Ž., Viršilė, A., Danilčenko, H., Duchovskis, P., Paulauskienė, A., & Gajewski, M. (2019). Effects of germination time on the antioxidant properties of edible seeds. *CyTA-Journal of Food*, 17(1), 447-454.
- Vora, J. D., Rane, A. G., & Jadhav, P. (2014). Biochemical, Antimicrobial And Organoleptic Studies On The Germination Profile Of Finger Millet (*Eleusine Coracana*). *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*, 3(4), 123.
- Yim, J. H., Lee, O. H., Choi, U. K., & Kim, Y. C. (2009). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of ethanolic extracts of *Glycine max* (L.) Merr and *Rhynchosia nulubilis* seeds. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(11), 4742-4753.
- Yu, Y., Zhou, L., Li, X., Liu, J., Li, H., Gong, L., ... & Sun, B. (2022). The progress of nomenclature, structure, metabolism, and bioactivities of oat novel phytochemical: avenanthramides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(2), 446-457.
- Zhang, G., Xu, Z., Gao, Y., Huang, X., Zou, Y., & Yang, T. (2015). Effects of germination on the nutritional properties, phenolic profiles, and antioxidant activities of buckwheat. *Journal of food science*, 80(5), H1111-H1119.



## PSEUDO-TAHILLARIN ANTI-BESİNSEL BİLEŞİKLERİ VE AZALTMA YÖNTEMLERİ

Ayşenur Arslan, Erkan Yalçın\*

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bolu, Türkiye

Geliş/ Received 31.10.2022; Kabul/ Accepted : 20.02.2023; /Online baskı: Published online 28.02.2023

Arslan, A., Yalçın, E. (2023). Pseudo-tahılların anti-besinsel bileşikleri ve azaltma yöntemleri. GIDA (2023) 48 (2) 347-359 doi: 10.15237/ gida.GD22106

Arslan, A., Yalçın, E. (2023). Antinutritional compounds of pseudocereals and reducing methods. GIDA (2023) 48 (2) 347-359 doi: 10.15237/ gida.GD22106

### ÖZ

Pseudo-tahıllar, karabuğday, kinoa ve amaranttan meydana gelmektedir. Glutensiz olmaları sebebiyle, çölyak hastalığı veya glutene hassasiyeti bulunan bireyler için çok önemli gıda kaynaklarıdır. Pseudo-tahılların tüketiminin, anti-besinsel bileşiklerinin gıda güvenliğini riske atması sebebiyle sınırlandırıldığı bildirilmiştir. Pseudo-tahıllar, saponin, tanen, nitrat, okzalit, lektin, proteaz inhibitörleri ve fitik asit gibi bazı anti-besinsel bileşikler içerirler. Anti-besinsel bileşiklerin, gıdanın sindirilirliğini ve besin öğelerinin emilimini engelleyerek, besinsel değerini azalttığı belirtilmiştir. Bu bileşiklerin sebep olduğu zararlı metabolik olayları azaltmak/ortadan kaldırmak için pseudo-tahılların tüketiminden önce uygun bir teknikle işlenmesi gerekir. Uygulanacak yöntem seçilirken anti-besinsel bileşiklerin kimyasal yapısı, tohum içerisindeki dağılımı, biyolojik etkileri, ısıya duyarlılıkları ve suda çözünürlükleri ile işlemin maliyetinin bilinmesi tavsiye edilmektedir. Bu yöntemler kavuz ayırma, mekanik aşındırma, su ile yıkama, ıslatma, kaynatma, kavurma, ekstrüzyon, çimlendirme, fermantasyon, yüksek hidrostatik basınç ve genetik yöntemlerdir.

**Anahtar kelimeler:** Pseudo-tahıllar, karabuğday, kinoa, amarant, anti-besinsel bileşikler

## ANTINUTRITIONAL COMPOUNDS OF PSEUDOCEREALS AND REDUCING METHODS

### ABSTRACT

Pseudocereals consist of buckwheat, quinoa and amaranth. Due to their gluten-free nature, they are very important food sources for people suffering from celiac disease or gluten sensitivity. It is reported that the consumption of pseudocereals is limited by antinutritional compounds which have some risks for food safety. Pseudocereals contain some antinutritional compounds, such as saponin, tannin, nitrate, oxalate, lectin, protease inhibitors and phytic acid. It is indicated that antinutritional compounds decrease the nutritional value by preventing the digestibility of food and the absorption of nutrients. Pseudocereals must be processed with appropriate technic in order to reduce or suppress unsafe metabolic pathways. It is recommended that the chemical structure of seeds, their distribution in the seed, biological effects, heat sensitivity, water solubility and processing cost of antinutritional compounds should be known while choosing the reducing method. These processing technics are hull/husk separating, mechanical abrasion, washing with water, steeping, boiling, roasting, extrusion, germination, fermentation, high hydrostatic pressure and genetic methods.

**Keywords:** Pseudocereals, buckwheat, quinoa, amaranth, antinutritional compounds

\*Yazışmalardan sorumlu yazar / corresponding author;

✉: yalcin\_e@ibu.edu.tr

☎: (+90) 374 253 4640 / 5832

☎: (+90) 374 253 4558

Ayşenur Arslan; ORCID No: 0000-0003-1658-746X

Erkan Yalçın; ORCID No: 0000-0002-7417-9088

## GİRİŞ

Pseudo-tahıllar son yıllarda besinsel özelliklerinin ayrıcalıklığı sayesinde gıda endüstrisi ve tüketiciler nezdinde popülerlik kazanmıştır. Glutensiz olmaları sebebiyle, çölyak hastalığı veya glutene hassasiyeti bulunan bireyler için çok önemli gıda kaynaklarıdır. Gıda formülasyonlarında geniş uygulama alanı bulabilen pseudo-tahıllar, kinoa, amarant ve karabuğdaydan oluşmaktadır. Bununla birlikte kinoa, karabuğday ve amarant; saponin, tanen, nitrat, lektin, okzalit, proteaz inhibitörleri ve fitik asit gibi bazı anti-besinsel bileşikler içerirler. Anti-besinsel bileşikler, tek mideli hayvanların performanslarını ve yaşamlarını olumsuz yönde etkileyen maddelerdir. Örneğin; besin emiliminde azalma ve bunun sonucunda büyüme ve ağırlık artışında gerileme, tiroit bezi fonksiyonunda azalma, lokal kanama, divalent katyonların ve amino asitlerin şelatlanarak absorpsiyonlarında azalma ve sonucunda dengesiz beslenmenin ortaya çıkması ve bağışıklık sisteminin değişmesi gibi olumsuz etkiler belirtilmiştir. Gıdalarda bulunan anti-besinsel bileşiklerin gıdaların besinsel değerini düşürerek, sindirilirliği ve besinlerin emilimini azalttığı veya engellediği çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Satheesh ve Fanta 2018; Mir vd., 2018; Thakur ve Kumar, 2019; Gobbetti vd., 2020; Manyelo vd., 2020; Melini ve Melini, 2021; Thakur vd., 2021a).

## ANTI-BESİNSEL BİLEŞİKLER

### Fitik Asit

Fitik asit (miyo-inositol heksakisfosfat) veya fitat (fitik asitin tuz formu), bitkideki toplam fosforun %50-85'ini kapsayan başlıca fosfor deposudur. Fitik asit, yüksek negatif yükü sebebiyle, minerallerin ( $Ca^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  gibi) yanısıra nişasta, protein ve enzimleri de şelatlayarak biyoyararlanımlarını azalttığı bildirilmiştir. Gıdaların fitat içeriği, fitaz enziminin eklenmesiyle azaltıldığı çalışmalarda gösterilmiştir (Filho vd., 2017; Sinha ve Khare, 2017; Satheesh ve Fanta 2018; Manyelo vd., 2020; Melini ve Melini, 2021).

### Saponinler

Saponinler, sulu çözeltilerde köpürme meydana getiren, yoğun acı tada sahip yüzey aktif maddelerdir. Saponinlerin, bitkilerin, zararlı

mikroorganizmalara, kuşlara ve böceklere karşı kendisini korumak için sentezlediği bitki glikozitleri olduğu bildirilmiştir. Saponinlerin, bir veya daha fazla monosakkarit veya oligosakkarite bağlı aglikon biriminden meydana geldiği belirtilmiştir. Saponinlerin şeker birimleri yüksek hidrofilik özellikler gösterirken, saponinler (sadece triterpen fraksiyonu tarafından oluşturulur) lipofilik özellikler gösterdiği belirtilmiştir. Saponinler, proteinler ve lipitler (kolesterol) ile kompleks bileşikler oluştururlar ve hemolitik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Filho vd., 2017; Sinha ve Khare, 2017; Mattila vd., 2018; Mir vd., 2018; Suárez-Estrella vd., 2018; Hernández-Ledesma, 2019; Yousif vd., 2020; Melini ve Melini, 2021).

### Tanenler

Tanenler bitkilerde yaygın olarak bulunan polifenolik bileşiklerdir. Başlıca tanenler, kondense tanenler ve hidrolize tanenlerdir. Kondense tanenler, flavan-3-ol birimlerinden oluşan oligomerler veya polimerler olduğu bildirilmiştir. Hidrolize tanenler, sırasıyla gallik ve elajik asitlere hidrolize edilebilen galloanninleri ve elajitanninleri içerdiği belirtilmiştir. Tanenler, protein ve nişasta ile kompleks oluşturarak birçok sindirim enziminin inaktivasyonuna sebep olduğu bildirilmiştir. Tripsin ve kimotripsin enzimlerinin aktivitesini azaltarak protein sindirilirliğini düşürdüğü, amilaz ve lipaz enzimlerinin aktivitelerini engelleyerek gıdaların besinsel değerini azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca, bağırsak mukozasında hasar meydana getirerek demir, glukoz ve B<sub>12</sub> vitamini emilimini engellediği çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir (Thakur vd., 2019; Manyelo vd., 2020; Melini ve Melini, 2021).

### Proteaz İnhibitörleri

Proteaz inhibitörlerinin anti-besinsel aktivitesi, ince bağırsaktaki tripsin ve kimotripsin enzimlerinin aktivitesini baskılayarak, protein sindirilirliğini azalttığı ve amino asit emilimini ve proteinlerin biyoyararlanımını düşürdüğü belirtilmiştir. Proteaz inhibitörleri, kanserojen maddeler olarak da tanımlanmıştır. Proteaz inhibitörleri, özel protein yapıları sebebiyle, üretilen ürünlerde hala bir miktar aktivite göstermesine rağmen, ısl işleme kolayca denatüre

edilebileceği belirtilmiştir (Filho vd., 2017; Sinha ve Khare, 2017; Satheesh ve Fanta 2018; Manyelo vd., 2020).

### Lektinler (Fitohemaglutininler)

Fitohemaglutininler olarak da adlandırılan lektinler, protein (glikoprotein) yapısındaki bileşikler olup, karbonhidratlara bağlanma yeteneğine sahip oldukları bildirilmiştir. Lektinler, kırmızı kan hücrelerinin pıhtılaşmasına (aglutinasyon) sebep olduğu belirtilmiştir. Lektinin sindirim enzimleri üzerine doğrudan etkisi sebebiyle besinlerin biyoyararlanımını azalttığı bildirilmiştir. İnsanlarda gastroenterit, mide bulantısı ve ishale sebep olduğu söylenmektedir. Lektinlerin, bağırsak sistemi epitelini tahrip etme, hücrenin mitoz bölünmesine müdahale etme, lokal kanamalara sebep olma, böbrek, karaciğer ve kalp dokularında tahribat gibi çeşitli etkileri farklı çalışmalarda incelenmiştir (Sinha ve Khare, 2017).

### Okzalatlara

Okzalata, okzalik asitin tuzu olup toksik bir maddedir ve sağlık için büyük risk oluşturduğu söylenmektedir. İnsanlar tarafından metabolize edilemediği ve hem metabolizma tarafından üretilen hem de beslenme ile alınan okzalatin idrarla birlikte atıldığı, ancak tüm okzalatlara ise çözünür olmadığı belirtilmiştir. Gıdalarda bulunan minerallerin biyoyararlanımını engellediği söylenmektedir. Örneğin vücutta bulunan kalsiyumu bağladığı belirlenmiştir. Tüm böbrek taşlarının yaklaşık %85'i kalsiyum okzalata veya kalsiyum fosfat kristali olduğu ve okzalata alımının gecikmiş etkisinin böbrek yetmezliği olduğu araştırmalarda belirtilmiştir. Vücuttaki düşük dozlardaki okzalata ayrıca baş ağrısı, kaslarda seğirme ve kramplara sebep olduğu vurgulanmıştır. Daha yüksek dozların kişiyi hızla şoka soktuğu, zayıf ve düzensiz kalp atışına, kan basıncında düşüğe ve kalp yetmezliğine sebep olduğu bildirilmiştir (Filho vd., 2017; Sinha ve Khare, 2017; Satheesh ve Fanta 2018; Manyelo vd., 2020).

### Nitrat (NO<sub>3</sub>) ve Nitrit (NO<sub>2</sub>)

Nitratlar, bitkilerin gelişmeleri için gerekli azot kaynakları olduğu ve bitkilerin topraktan nitratları

olarak proteinler gibi daha karmaşık azot formlarına dönüştürdükleri bildirilmiştir. Özellikle azotlu gübreleme, herbisit kullanımı, kuraklık veya don gibi durumlar fotosentez sürecini yavaşlattığı ve bitkilerin nitrat biriktirdiği belirlenmiştir. İnsan vücudunda %0.5-2 arasındaki nitrat kanda methemoglobin, %10 düzeyindeki nitrat cilt ve dudaklarda mavi renk oluşumuna (siyanoz), %25 düzeyinde nitratın halsizlik ve hızlı nabız atımına, %50-60 düzeyindeki nitratın bilinç kaybına sebep olduğu belirtilmiştir. İnsan vücudunda nitratların, A vitamini metabolizmasına ve tiroit bezlerinin işlevlerine müdahale ettiği de vurgulanmıştır. Nitrat, nitrite indirgenebilir ve nitritler ise kandaki hemoglobine bağlanarak, hemoglobinin oksijen taşıma kabiliyetini kaybettirdiği söylenmiştir. Bu anti-besinsel bileşiklerin, suda kaynatma veya buharda pişirme yöntemleri ile kısmen uzaklaştırıldığı/azaltıldığı rapor edilmiştir (Sinha ve Khare, 2017; Bhattarai, 2018; Mir vd., 2018; Manyelo vd., 2020).

### PSEUDO-TAHILLAR VE YAPISINDA BULUNAN ANTI-BESİNSEL BİLEŞİKLER

#### Kinoa (*Chenopodiaceae*, *Chenopodium quinoa*)

Kinoada bulunan anti-besinsel bileşiklerin triterpenik saponinler, fitik asit, tanenler, nitratlar, okzalatlara ve tripsin inhibitörleri olduğu belirtilmiştir. Kinoadaki anti-besinsel bileşikler uygun işleme yöntemleri uygulandığında bu bileşiklerin yok edilebileceği veya gıda güvenliğini tehdit etmeyecek düzeylere düşürülebileceği araştırmalarda belirtilmiştir (Satheesh ve Fanta, 2018; Castro-Alba vd., 2019; Fotschki vd., 2020).

Fotschki vd. (2020), kinoada fitik asit miktarını 8.3 mg/g olarak tespit etmişlerdir. Ham kinoada fitik asit miktarı 10.4 mg/g ve işlem görmüş kinoalarda 7.8 mg/g iken; çavdarda 7.7 mg/g, buğdayda 8.7 mg/g, mercimekte 8.4 mg/g ve baklada 8.0 mg/g olarak bulunmuştur (Demir ve Bilgiçli, 2020). Koziol (1992), beş farklı kinoa çeşidinde fitik asit miktarını 10.5-13.1 mg/g arasında bulmuştur. Bulunan değerlerin, Mezgebo vd. (2018)'nin, arpa (9.7-11.6 mg/g), mısır (8.9-9.9 mg/g), pirinç (8.9 mg/g) ve buğdayda (6.2-13.5 mg/g) bildirdiği

değerlere yakın olduğu görülmüştür. Bhinder vd. (2021), beyaz ve siyah kinoa örneklerinde fitik asit miktarını sırasıyla; 375.3 mg/100 g ve 445.7 mg/100 g olarak bulmuşlardır. Reguera vd. (2018) tarafından, İspanya, Peru ve Şili'de yetiştirilen üç kinoa çeşidinin fitik asit miktarı araştırılmıştır. Buna göre kinoa tohumlarındaki fitik asit miktarının en çok çevresel faktörlerden etkilendiği sonucu çıkarılmıştır.

Saponin, kinoanın perikarp tabakasında bulunan, keskin ve acı tada sahip toksik özellikte (hemoliz) bir anti-besinsel bileşiktir. Araştırmaların çoğunda kinoada yaklaşık 20 saponin çeşidi rapor edilmiş olsa da son araştırmalarda 43 farklı saponin çeşidi tanımlanmıştır. Saponinlerle ilişkili acı tat, kinoanın gıda olarak kullanımını büyük ölçüde sınırlandırdığı söylenmiştir (Satheesh ve Fanta 2018; Suárez-Estrella vd., 2018). Kinoanın perikarp dış tabakasının, glikozit ve hidrofobik özellikte saponinlerden oluştuğu bildirilmiştir. Kinoadaki saponinlerin başlıca dördü oleanolik asit, hederajenin, fitolakjenik asit ve 30-O-metil-espergulajenattır. Soyma işlemi ile saponin miktarının çoğunun uzaklaştırılabileceği belirtilmiştir (Filho vd., 2017; Mattila vd., 2018; Yousif vd., 2020). Kinoanın karakteristik acı tadının saponin miktarının 1.1 mg/g'den daha yüksek olduğunda ortaya çıktığı belirtilmiştir. Kinoanın perikarpında saponin miktarının 0.1-50 mg/g arasında değiştiği bildirilmiştir. Saponin miktarının büyük ölçüde çevre, iklim koşulları ve genotipten etkilendiği belirtilmiştir (Suárez-Estrella vd., 2018).

Tam kinoa ununun saponin miktarı literatürde %0.03-2.05 arasında değiştiği bildirilmiştir. Kinoa yapraklarındaki toplam saponin miktarının bitkinin gelişimi sırasında arttığı, ancak içeriği tatlı genotiplerde 0.2-0.4 mg/g kuru ağırlık ve acı genotiplerde 4.7-11.3 mg/g kuru ağırlık olduğu ve bunun kinoa tohumlarında bulunan saponin miktarından daha az olduğu bildirilmiştir (Filho vd., 2017; Mir vd., 2018). Bazı araştırmacılar, acı genotiplerdeki saponin miktarını 140-2300 mg/100 g kuru madde arasında, tatlı genotiplerde ise 20-40 mg/100 g kuru madde arasında bulmuşlardır (Mastebroek vd., 2000; Hernández-Ledesma, 2019). Han vd. (2019a), 7 farklı renkli

kinoa çeşidinin saponin miktarını 7.51-12.12 mg oleanolik asit eşdeğeri (OAE)/g kuru ağırlık olarak bulmuştur. Bhinder vd. (2021), beyaz ve siyah kinoa örneklerinde saponin miktarını sırasıyla 1.63 g/100 g ve 2.42 g/100 g olarak bulmuşlardır. Saad-Allah ve Youssef (2018), Afrika'dan topladıkları kinoalarda saponin miktarını 2.76-3.31 mg/g kuru ağırlık arasında tespit etmişlerdir. Han vd. (2019b), Çin'de yetiştirilen pigmentless kinoa çeşidinde toplam saponin miktarını 15.50 mg OAE/g kuru ağırlık olarak tespit etmişlerdir. Del Hierro vd. (2018), İspanya'daki kinoa örneklerinde saponin miktarını etanol, etanol-su ve suda ultrason destekli ekstraksiyonlar ile sırasıyla 5.51 g/100g, 4.43 g/100g ve 0.26 g/100g olarak tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, saponin miktarının ekstraksiyon çözeltisi ve yöntemine göre değiştiği sonucuna varmışlardır.

Diaz-Valencia vd. (2018), 2015 ve 2016 yıllarında Güney Almanya'da yetiştirilen dört farklı renkteki Avrupa kinoa çeşidinde saponin miktarlarını incelemişlerdir. Tatlı çeşitte her iki yetiştirilme mevsiminde (2015'te <0.7 mg/g ve 2016'da 0.0 mg/g) en düşük düzeyde gözlenmişken, Puno, Titicaca ve Zeno çeşitlerinde önemli miktarda saponin (2015'te 2.6-2.8 mg/g ve 2016'da 2.8-3.5 mg/g) tespit etmişlerdir. 2016'da yetiştirilen kinoa örneklerinin yetiştirme mevsiminin daha kurak olması sebebiyle daha yüksek saponin değerlerine sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Reguera vd. (2018), üç farklı ülkede (Şili, Peru ve İspanya) yetiştirilen üç farklı çeşit kinoada saponin miktarını 8-13 g/kg arasında bulmuş olup, aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı, saponin miktarının çevreden çok genotipten etkilendiğini bildirmişlerdir.

Fotschki vd. (2020) kinoada tripsin inhibitör aktivitesini 0.4 IU/mg olarak tespit etmiştir. Araştırmalarda, kinoa tohumlarındaki proteaz inhibitörü konsantrasyonu <50 mg/kg olarak belirtilmiştir. Ayrıca, kinoa tohum kabuğunun uzaklaştırılmasının inhibitör aktivitesi üzerinde önemli etkisinin olmadığı ve proteaz inhibitörünün tohumun perispermde yer aldığı gösterilmiştir. Araştırma sonuçlarına göre sekiz farklı kinoa çeşidindeki tripsin inhibitörü (1.36-

5.04 UTI/mg), soya fasulyesi (24.5-41.5 UTI/mg), fasulye (12.9-42.8 UTI/mg) ve mercimekten (17.8 UTI/mg) daha düşük bulunmuştur (Mattila vd., 2018; Satheesh ve Fanta 2018). Sobota vd. (2019), kinoa örneklerindeki proteaz inhibitörü aktivitesini ortalama 589 U/g olarak bulmuşlar ve sonucun düşük düzeyde olduğunu belirtmişlerdir. Ando vd. (2002), kinoa embriyosu ile tam kinoa ununu karşılaştırmış, embriyonun toplam fitatın %60'ını ve tripsin inhibitör aktivitesinin %89'unu içerdiğini bildirmişlerdir.

Okzalate, kinoanın yaprak ve gövdesinde (258-1029 mg/100 g) yüksek miktarda bulunurken tohumlarında daha düşük miktarda (143-232 mg/100 g) bulunduğu belirtilmiştir (Satheesh ve Fanta, 2018). Jancurová vd. (2009), kinoaadaki en yüksek okzalate içeriğini yapraklarda ve gövdelerde bulunduğunu belirtmiştir. Çözünür okzalate miktarlarının kök ve tohumlarda 59-131 mg/100g, yaprak ve gövdelerde 258-1029 mg/100 g arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Toplam okzalate miktarının ise köklerde ve tohumlarda 143-232 mg/100g, yaprak ve gövdelerde 874-1959 mg/100g arasında değiştiği rapor edilmiştir. Villacrés vd. (2022) ise kinoa yaprakları ve tanelerinde okzalate miktarını sırasıyla 12.9 mg/100 g ve 4.3 mg/100 g olarak bulmuşlardır.

Tam kinoaadaki nitrat (NO<sub>3</sub>) miktarının (63.26 mg/100 g), ıspanak, marul, turp ve pancar gibi sebzelerde bulunan miktardan (100 mg/100 g'nin üzeri) düşük olduğu bildirilmiştir (Filho et al. 2017). Villacrés vd. (2022), kinoa yaprakları ve tanelerinde nitrat miktarını sırasıyla 60.1 mg/100 g ve 21.8 mg/100 g olarak bulmuşlardır.

Kinoa tohumlarının az miktarda tanen içerdiği (%0.53) ve yeterli düzeyde işlemenin miktarı azalttığı söylenmiştir (Melini ve Melini, 2021). Drzewiecki vd. (2018), Peru'da yetiştirilen kinoa tohumlarında toplam tanen miktarını 0.88 mg kateşin eşdeğeri (CE)/g; Saad-Allah ve Youssef (2018), Afrika'dan topladıkları kinoaaldaki tanen miktarını kuru madde üzerinden 0.23-0.31 mg/g arasında bulmuşlardır. Bhinder vd. (2021) ise, beyaz ve siyah kinoa örneklerinde tanen miktarını

sırasıyla 3.41 mg/100 g ve 4.81 mg/100 g olarak belirlemişlerdir.

#### **Amarant (*Amaranthaceae*; *Amaranthus hypochondriacus*, *A. caudatus*, *A. cruentus*)**

Amarantta bulunan anti-besinsel bileşikler tanenler, okzalate, fitatlar, tripsin inhibitörleri, saponinler ve nitratlar olarak belirtilmiştir (Carrizo vd., 2017; Thakur ve Kumar, 2019). Amaranttaki okzalate ve fitatların, besin maddelerinin emilimi üzerindeki etkilerinin daha fazla endişe kaynağı olduğu söylenmektedir. Amarantın yüksek ve kaliteli protein içeriği olmasına rağmen, anti-besinsel bileşiklerin varlığı besinsel biyoyararlanımını kısıtladığı bildirilmiştir (Hejazi vd., 2016)

Hejazi vd. (2016), amarantın fitik asit miktarını %0.3-2.25 arasında tespit etmişler ve fitik asidin protein ve nişastanın sindirimini engellediğini kanıtlamışlardır. Akin-Idowu vd. (2017), 5 amarant çeşidinde yaptığı bir araştırmada en yüksek fitate miktarını *A. hybridus*'ta 1.58 g/100 g olarak bulmuşlardır. Isaac-Bamgboye vd. (2019) ise amarant tohumunda fitate miktarını 17.4 mg/g olarak tespit etmişlerdir.

Saponinin, amarant tohumlarında düşük miktarda (%0.09) bulunduğu ve amarant tohumlarındaki bu düşük saponin konsantrasyonunun tüketiciler için önemli bir toksisite yaratmadığı rapor edilmiştir (Mir vd., 2018). Isaac-Bamgboye vd. (2019) ise amarant tohumunun saponin miktarını 4.8 mg/g olarak belirlemişlerdir. Beniwal vd. (2019), amarant örneğinde saponin miktarını 2.66 g/100 g olarak bildirmişlerdir. Valadez-Vega vd. (2021), *A. hypochondriacus* protein ekstraktlarında saponin miktarını incelemişler ve 145.5 hemoliz birimi/mg olarak tespit etmişlerdir.

Proteaz inhibitörlerinin, amarantta düşük miktarlarda bulunduğu ifade edilmiştir. Hayvanlarda sitotoksik ve toksikolojik etkilere sebep olabileceği rapor edilmiştir (Shadi vd., 2020; Valadez-Vega vd., 2021). Valadez-Vega vd. (2021), tripsin inhibitörü aktivitesini siyah ve sarı amarant tohumlarında sırasıyla 938-2100 TIU/g ve 300-5150 TIU/g arasında bulmuşlardır. Aynı araştırmacılar, *A. hypochondriacus* protein



ekstraktlarında ise tripsin inhibitörü aktivitesini 18 TIU/mg olarak bulmuşlardır. *A. hypochondriacus* protein ekstraktlarında lektin miktarı ise 2.389 hemagglutinin aktivite birimi/mg protein olarak bulunmuştur.

Okzalate bileşiminin amarantta yüksek miktarda bulunduğu bildirilmiştir. Tanen ve fitik aside benzer şekilde okzalatin da tahılların besin ve mineral biyoyararlanımını azalttığı ifade edilmiştir (Hejazi vd., 2016). Gélinas ve Seguin (2007), 30 farklı amarant genotipi ile yaptığı bir araştırmasında toplam okzalate konsantrasyonunu 178-278 mg/100 g arasında bulmuşlardır. Çözünmeyen ve çözünen okzalate miktarını ise sırasıyla 151-224 mg/100 g (%66-86) ve 26-82 mg/100 g (%14-34) arasında tespit etmişlerdir. Shadi vd. (2020), 4 farklı taze yem ve sapıyla hasat edilmiş 4 farklı amarant çeşidinde okzalate miktarını sırasıyla 4.7-13.0 g/kg kuru ağırlık ve 4.5-12.0 g/kg kuru ağırlık arasında bulmuşlardır. Nyonje vd. (2021), amarant yapraklarının okzalate miktarını en düşük *A. cruentus* (205 mg/100 g) ve en yüksek *A. hypochondriacus* (421 mg/100 g) türlerinde tespit etmişlerdir.

Nitratın amarantta yüksek miktarda, özellikle yapraklarda bulunduğu söylenmiştir. Avustralya'da kümes hayvanlarının nitrat bakımından zengin ham amarant tohumları ile beslenmesi sonucu tavukların yüksek ateş sonucu şoka girip, öldüğü bildirilmiştir (Bhattarai, 2018). Shadi vd. (2020), 4 farklı taze yem ve sapıyla hasat edilmiş 4 farklı amarant çeşidinde nitrat miktarını sırasıyla 2.3-3.5 g/kg 0.35-0.51 g/kg kuru ağırlık arasında bulmuşlardır.

Tanenler, amarantta yüksek miktarlarda bulunan, yoğunlaştırılmış acı bitki polifenolikleridir. Tanenlerin, tanenin perispermine kıyasla tohum kabuğunda daha fazla bulunduğu ve miktarının tohumun rengine bağlı olduğu bildirilmiştir. Renkli ve koyu tohumlarda daha yüksek miktarda bulunduğu belirtilmiştir. Amarantın tanen miktarı 0.04-0.8 mg CE/100 g arasında bildirilmiştir (Hejazi vd., 2016; Coelho vd., 2018). Shadi vd. (2020), 4 farklı taze yem ve sapıyla hasat edilmiş 4 farklı amarant çeşidinde toplam tanen miktarını sırasıyla 5.0-6.4 g/kg ve 1.7-4.9 g/kg kuru ağırlık

arasında bulmuşlardır. Valadez-Vega vd. (2021), *A. hypochondriacus* çeşidinin protein ekstraktlarında tanen miktarını 1.28 mg CE/g olarak bulmuşlardır. Akin-Idowu vd. (2017), araştırmalarında 5 amarant çeşidi arasında en yüksek tanen miktarını *A. caudatus* çeşidinde 0.14 g/100 g olarak belirlemiş olup, demir bağlama kapasitesini %66.72 olarak tespit etmişlerdir. Drzewiecki vd. (2018), Peru'da yetiştirilen amarant tohumlarında tanen miktarını 0.23-0.89 mg CE/g arasında bulmuşlardır. Beniwal vd. (2019) ise amarant örneğinde tanen miktarını 1.58 mg/100 g olarak bildirmişlerdir.

### **Karabuğday (*Polygonaceae*; *Fagopyrum esculentum*, *Fagopyrum tataricum*)**

Karabuğdayda bulunan başlıca anti-besinsel bileşiklerin tripsin inhibitörleri ve saponinler olduğu belirtilmiştir. Karabuğday unu ile unlu mamullerin katkılanması sonucu fitat ve tanenler gibi anti-besinsel bileşiklerin varlığı sebebiyle karabuğday proteinlerinin sindirilirliğinin azaldığı ve acı tat oluşumu gibi teknolojik problemlerin meydana geldiği bildirilmiştir (Mattila vd., 2018; Thakur ve Kumar, 2019; Gobbetti vd., 2020).

Karabuğday tohumlarının 35-38 g/kg fitik asit içerdiği bildirilmiştir (Zhang vd., 2012; Thakur vd., 2021a). Fotschki vd. (2020) ise karabuğdaydaki fitik asit miktarını 15.9 mg/g olarak tespit etmişlerdir. Kasar vd. (2021), fitik asit miktarını en yüksek karabuğday kavuzunda %3-3.25 olarak bulmuşlardır. En düşük fitat miktarını ise ince un ve kaba un fraksiyonlarında sırasıyla %0.59-0.62 ve %1.12-1.72 arasında tespit etmişlerdir (Kasar vd., 2021).

Saponin miktarı karabuğday tohumu ve çimlendirilmiş karabuğdayda sırasıyla 80.8 mg soya proteini saponin B eşdeğeri/100 g kuru madde ve 25.4 mg soya proteini saponin B eşdeğeri/100 g kuru madde olarak bulunmuştur (Aloo vd., 2021).

Proteaz inhibitörleri genellikle karabuğday tohumunun endosperm kısmında bulunan anti-besinsel bileşiklerdir. Karabuğday, araştırılan örnekler arasında en güçlü inhibisyon aktivitesine sahipken, tripsin aktivitesi kullanılan farklı protein

konsantrasyonları ile tamamen bloke edilmiştir. Bu, karabuğdayın ya birkaç proteaz inhibitörü ya da tanenler gibi diğer anti-besinsel bileşikler ile birlikte tripsini inhibe ettiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Mattila vd., 2018; Thakur vd., 2021a). Fotschki vd. (2020), karabuğdayda tripsin inhibitörü aktivitesini 13.3 IU/mg olarak tespit etmişlerdir.

Tanenler, karabuğdayda kekre tada sebep olan fenolik bileşiklerdir. Kondense tanenin kantitatif özelliklerinin (ortalama polimerizasyon derecesi, prosiyanidin/propelargonidin oranı) kepek ve un fraksiyonlarında benzer olduğu gözlenmiştir (Mattila vd., 2018; Thakur vd., 2021a). Kasar vd. (2021), karabuğdayda tanen miktarını en yüksekten en aza doğru kepek>kavuz>kaba un>ince un şeklinde sıralamışlar, en yüksek tanen miktarını kepekte (%1.06-1.39) belirlemişlerdir. Zhang vd. (2012), karabuğdayda tanen miktarını %1.6 ve Fotschki vd. (2020) ise 13.9 mg/g olarak tespit etmişlerdir. Drzewiecki vd. (2018), Peru'da yetiştirilen karabuğday tohumunda tanen miktarını 0.93 mg CE/g olarak bulmuşlardır.

### ANTI-BESİNSEL BİLEŞİKLERİ AZALTMA YÖNTEMLERİ

Pseudo-tahılların anti-besinsel bileşiklerini azaltma yöntemleri ıslak (yıkama) yöntemler, kuru yöntemler (ısıl işlem, ekstrüzyon, kavurma veya mekanik aşındırma) ve genetik yöntemler (genetiği değiştirilmiş ve melez tohumlar, örneğin saponinsiz kinoa) olarak sınıflandırılmıştır. Genetik yöntemler sayesinde saponin miktarını azaltmak için tatlı kinoa çeşitleri geliştirilmiştir, ayrıca tatlı kinoa çeşitlerinin acı çeşitlerle melezleştirilmesi denenmiştir (Mir vd., 2018; Mattila vd., 2018; Satheesh ve Fanta 2018; Yousif vd., 2020).

#### Kavuz Ayırma ve Yıkama

Kavuz ayırma, gıda güvenliğini sağlamak ve lezzeti artırmak için hasat sonrası yapılan ilk işlemlerdendir. Tanenler ve saponinler kavuzda yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve miktarlarının azaltılması bakımından etkili bir yöntem olduğu, ancak, fitik asit ve proteaz inhibitörlerini azaltmaya yönelik etkisinin olmadığı belirtilmiştir (Coelho vd. 2018;

Aderibigbe vd. 2020; Manyelo vd. 2020; Kumar vd., 2022). Kinoa tohumlarından saponinleri uzaklaştırmak için kullanılan su ile yıkama yöntemi, hem laboratuvar hem de endüstride en çok kullanılan yöntem olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte, su ile yıkama yönteminin çevre kirliliği yaratması, su israfı, kinoanın çimlenme problemi ve kurutma maliyeti sebebiyle ekonomik ve ekolojik açıdan dezavantajlarının olduğu bildirilmiştir. Endüstride, saponinleri uzaklaştırmak için mekanik aşındırma yönteminin de kullanıldığı söylenmektedir. Ancak bu yöntemin dezavantajının, kepeklerle birlikte protein, vitamin ve mineral kayıplarının da meydana geldiği bildirilmiştir (Filho vd., 2017; Melini ve Melini, 2021). Kinoanın saponin miktarında yıkama işlemi ile azalma sağlandığı fakat tatlı kinoa elde etmek için %30 oranında mekanik aşındırma işleminin yeterli olacağı bildirilmiştir (Srujana vd., 2019).

#### Islatma

Pseudo-tahılların belirli bir süre oda sıcaklığında ıslatılması ile anti-besinsel bileşik miktarında azalma meydana geldiği bildirilmiştir. Islatma suyu işlem sonunda atılmaktadır. Anti-besinsel bileşik miktarındaki azalma, ıslatma ortamına (su, tuzlu su veya bikarbonatlı su) ve süresine bağlıdır. Islatma işlemi ile fitik asit, tanen ve saponin miktarının azaldığı bildirilmiştir (Kumar vd., 2022). Çalışmalarda amarant tohumlarının anti-besinsel bileşiklerinin azalması için 5 saat ıslatmanın yeterli olduğu bildirilmiştir (Coelho vd., 2018; Aderibigbe vd., 2020; Manyelo vd., 2020). Thakur vd. (2021b), amarant, karabuğday ve kinoa örneklerinin anti-besinsel bileşik miktarını azaltmak için oda sıcaklığında 12 ve 24 saat boyunca ıslatma (1:5 oranında) uygulamış, amarantta tanen (%0.065) ve fitik asit (%1.15) miktarının 24 saatlik ıslatma ile sırasıyla %0.056 ve %1.10'a düştüğünü gözlemlemiştir. Karabuğdaydaki tanen (%0.222) ve fitik asit (%1.32) miktarı 24 saatlik ıslatma ile sırasıyla %0.103 ve %1.24'e düştüğü görülmüştür. Kinoada ise tanen (%0.048) ve fitik asit (%1.03) miktarının 24 saatlik ıslatma ile sırasıyla %0.041 ve %0.97'ye düştüğü tespit edilmiştir.

### Isıl İşlemler

Pseudo-tahılların genellikle ısı işlemlerden sonra tüketildiği, özellikle tohum bileşimi, tohum yapısı ve tohum boyutunun kaynatma ile pişirme işlemini etkilediği bildirilmiştir. Moleküler ağırlığı düşük bileşiklerin kaynatma sırasında suya geçtiği gözlenmiştir. Kaynatmanın proteaz inhibitörleri, hemagglutinin aktivitesi, fitik asit, tanenler ve saponinleri azaltma ve *in vitro* protein sindirilirliğinde artış sağladığı bildirilmiştir (Jin vd., 2020; Kumar vd., 2022). Deng vd. (2015), karabuğdayları suda kaynatma işlemi ile fitik asit miktarını, kontrol örneklerine kıyasla %62.7 ve başlangıçtaki tripsin inhibitörü aktivitesi seviyesini de %62.5 oranında azaltmışlardır. Karabuğdayların tanen ve saponin miktarlarında ise suda kaynatma işleminden sonra sırasıyla %35.7 ve %27.6 oranında azalma gözlenmiştir. Beniwal vd. (2019), beyaz kinoa ve amarant örneklerine suda kaynatma işlemi uygulamışlardır. İşlem sonrası amarant ve kinoa örneğinin saponin miktarları sırasıyla 2.66 g/100 g'dan 1.26 g/100 g'a ve 1.42 g/100 g'dan 0.90 g/100 g'a düştüğü gözlenmiştir. İşlem sonrası amarant ve kinoa örneğinin tanen miktarları sırasıyla 1.58 g/100 g'dan 1.14 g/100 g'a ve 0.57 g/100 g'dan 0.13 g/100 g'a azaldığı kaydedilmiştir. Otoklavlama ve haşlama gibi ısı işlemlerin tanen ve okzalit miktarını azaltmada daha etkili olduğu söylenmiştir. Kuru ısıtma işlemi (160°C'de 10 dakika kavurma ve 190°C'de 15 saniye patlatma) ve suda kaynatma işlemi (su:tam tohum, 4:1; su:amarant unu, 6:1) *Amaranthus albus*'a uygulandığında önemli sonuçlar bulunmuştur. Un ve tam tohumun kaynatılması protein sindirilirliğini sırasıyla %24 ve %15 oranında artırırken, kavurmanın protein sindirilirliğini azalttığı bildirilmiştir. Kaynatmanın tanen, fitat ve okzalit miktarını azaltmadaki etkisi, kavurma ve patlatmadan daha fazla olduğu belirtilmiştir (Coelho vd., 2018; Aderibigbe vd., 2020; Manyelo vd., 2020). Beniwal vd. (2019), beyaz kinoa ve amarant örneklerine 180°C'de 10 saniye kavurma işlemi uygulamışlardır. İşlem sonrası amarant ve kinoa örneğinin saponin miktarları sırasıyla 2.66 g/100 g'dan 1.12 g/100 g'a ve 1.42 g/100 g'dan 0.64 g/100 g'a düşüş gösterdiği belirtilmiştir. İşlem sonrası amarant ve kinoa örneğinin tanen miktarları sırasıyla 1.58 g/100 g'dan 0.84 g/100

g'a ve 0.57 g/100 g'dan 0.08 g/100 g'a azaldığı gözlenmiştir. Deng vd. (2015) karabuğday örneklerinde mikrodalga işleminin anti-besinsel bileşik miktarı üzerine etkisini araştırmışlardır. Kontrol örneklerinin fitik asit, tripsin inhibitörü, tanen ve saponin miktarları sırasıyla 18.07 g/100 g, 5.94 g/100 g, 5.13 g/100 g ve 3.23 g/100 g kuru ağırlık değerlerinden sırasıyla 12.03 g/100 g, 5.18 g/100 g, 3.72 g/100 g ve 2.58 g/100 g kuru ağırlık değerlerine azaldığı rapor edilmiştir.

### Çimlendirme

Amarant tanesinin 24 saat çimlendirilmesi, kuru madde kaybı ve anti-besinsel bileşik miktarındaki azalmaya bağlı olarak optimum işleme süresi olarak kaydedilmiştir (Coelho vd., 2018; Aderibigbe vd., 2020). Thakur vd. (2021b), amarant, karabuğday ve kinoa örneklerinin anti-besinsel bileşik miktarını azaltmak için 24, 48 ve 72 saat boyunca 25°C'de çimlendirme işlemi uygulamışlardır. Amarantta tanen (%0.065) ve fitik asit (%1.15) miktarı 72 saatlik çimlendirme sonrası sırasıyla %0.044 ve %0.81'e düştüğü gözlenmiştir. Karabuğdayda tanen (%0.222) ve fitik asit (%1.32) miktarı 72 saatlik çimlendirme sonrası sırasıyla %0.089 ve %1.09'a düştüğü tespit edilmiştir. Kinoa ise tanen (%0.048) ve fitik asit (%1.03) miktarı 72 saatlik çimlendirme sonrası sırasıyla %0.035 ve %0.54'e azaldığı kaydedilmiştir. Bhinder vd. (2021), beyaz ve siyah kinoa örneklerini çimlendirme (24, 48, 72 ve 96 saat), 50°C'de kurutma, öğütme ve ardından eleme işlemleri ile malt ununa işlemişlerdir. Beyaz kinoaaların 24 saat çimlendirme sonrası saponin, tanen ve fitik asit miktarı sırasıyla 1.63 g/100 g'dan 1.13 g/100 g'a, 3.41 mg/100 g'dan 3.21 mg/100 g'a ve 375.27 mg/100 g'dan 308.2 mg/100 g'a düştüğü gözlenmiştir. Siyah kinoaaların 24 saat çimlendirme sonrası saponin, tanen ve fitik asit miktarları sırasıyla 2.42 g/100 g'dan 1.69 g/100 g'a, 4.81 mg/100 g'dan 4.53 mg/100 g'a ve 445.73 mg/100 g'dan 331.93 mg/100 g'a azaldığı kaydedilmiştir. Beniwal vd. (2019), amarant ve beyaz kinoaanın çimlendirme işlemi 32°C'de 48 saat yapmışlardır. İşlem sonrası amarant ve kinoa unlarında saponin miktarları sırasıyla 2.66 g/100 g'dan 0.84 g/100 g'a ve 1.42 g/100 g'dan 0.46 g/100 g'a düşüş gösterdiği bildirilmiştir. Amarant ve kinoa unlarının tanen miktarları ise sırasıyla

1.58 g/100 g'dan 0.68 g/100 g'a ve 0.57 g/100 g'dan 0.03 g/100 g'a azaldığı gözlenmiştir. Hejazi vd. (2016), amarant tohumlarının *in vitro* protein sindirilirliği ve anti-besinsel bileşikleri üzerine malta işleminin etkisini araştırmışlardır. Çimlendirilmiş (24, 36 ve 48 saat sürede ve 22, 26 ve 30°C sıcaklıkta) tohumların, ham tohumlara göre protein içeriği (13.76 g/100 g kuru ağırlık'dan 14.86 g/100 g kuru ağırlık'a) ve protein sindirilirliğinin (%76.03'dan %83.58'e) artış gösterdiği kaydedilmiştir. Çimlendirme işleminden sonra fitik asitte ve okzalatta önemli düşüşler (sırasıyla %30 ve %38 oranlarında) ve tanen miktarında ise artış (%47 oranında) gözlenmiştir. Çalışmada, anti-besinsel bileşik miktarı ile protein sindirilirliği arasında korelasyonların olduğu bildirilmiştir (Hejazi vd., 2016).

### Fermantasyon

Fermantasyon işlemi ile pseudo-tahılların fitik asit, tanen ve enzim inhibitörleri gibi anti-besinsel bileşik miktarlarının azaltılabildiği bildirilmiştir. Pseudo-tahıl unlarına laktik asit bakterilerinin ilave edilmesi ile gerçekleşen fermantasyon işlemi ile özellikle fitik asit miktarında azalma, fenolik bileşik miktarı ve B grubu vitaminlerinde artış sağlandığı belirtilmiştir (Rollán vd., 2019; Caeiro vd., 2022). Cizeikiene vd. (2021), kinoa örneklerinin *L. plantarum* MR24, *L. brevis* R26 ve *L. acidophilus* DSM 20079 bakterileri ile 72 saat fermantasyonu sonrası amilaz aktivitesi (0.259 AU/g) sırasıyla 0.082 AU/g, 0.333 AU/g ve 0.015 AU/g olarak bulunmuştur. Aynı bakterilerin fitaz aktivitesinin (0 PhU/g) ise sırasıyla 0.125 PhU/g, 0.142 PhU/g ve 0.100 PhU/g'a yükseldiği görülmüştür. Fermantasyon sonrası aynı bakterilerin proteaz aktivitesi (0 PU/g) ise sırasıyla 0.038 PU/g, 0.042 PU/g ve 0 PU/g olarak tespit edilmiştir. Bolívar-Monsalve vd. (2017), kinoa örneğinin saponin miktarı üzerine *L. plantarum* ile yapılan fermantasyonun etkisini araştırmışlardır. Kontrol kinoa örneğinde saponin miktarını 141.2 mg/100 g olarak bulmuşlardır. Fermantasyonunda %6 oranında *L. plantarum* kullanılan kinoa hamurlarında saponin miktarının 3. ve 4. günlerde sırasıyla 104.2 mg/100 g ve 80.2 mg/100 g'a düştüğü gözlenmiştir. Fermantasyonunda %8 oranında *L. plantarum*

kullanılan kinoa hamurlarındaki saponin miktarı ise 3. ve 4. günlerde sırasıyla 137.3 mg/100 g ve 91.6 mg/100 g'a azaldığı bildirilmiştir. Castro-Alba vd. (2019) ise, kinoa örneğini *L. plantarum* ile 4 ve 10 saat boyunca 30°C'de fermantasyon işlemine tabi tutmuşlardır. Fitat miktarında, uygulanan koşullara bağlı olarak %19.2-73.0 arasında azalma tespit etmişlerdir. Bazı araştırmacılar ise hem kendiliğinden gerçekleşen fermantasyon hem de *L. plantarum* 299v ile yapılan fermantasyon işlemi ile fitat miktarının %72 oranında azaltıldığını bildirmişlerdir (Melini ve Melini, 2021; Satheesh ve Fanta 2018).

### Diğer Yöntemler

Han vd. (2019b), kinoanın öğütme derecesinin toplam saponin miktarı (15.50 mg OAE/g kuru ağırlık) üzerine etkisini incelemiş ve saponinin 9.02 mg OAE/g kuru ağırlığa düştüğünü belirlemişlerdir. Fitatın hidrolizini gerçekleştirmek için, gıdaların işlenmesi sırasında bitki kaynaklı (örneğin buğday fitazı) veya mikrobiyal kökenli (örneğin laktik asit bakterileri) eksojen fitazın eklenebileceği belirtilmiştir. Endojen fitazı aktive etmek için ise ıslatma, erken aşamada uygulanan ıslık işlem, çimlendirme ve fermantasyon gibi işlemlerin uygulanması tavsiye edilmiştir (Carrizo vd., 2017; Castro-Alba vd., 2019). Deng vd. (2015) tarafından karabuğday örneklerine uygulanan yüksek hidrostatik basınç işlemi sonrası fitik asit, tripsin inhibitörü, tanen ve saponin miktarlarının sırasıyla 9.85 g/100 g, 5.19 g/100 g, 4.11 g/100 g ve 2.76 g/100 g kuru ağırlığa düştüğü kaydedilmiştir.

### SONUÇ

Pseudo-tahıllar çok iyi birer protein, besinsel lif ve birçok vitamin ve mineral kaynağıdır. Bunun yanı sıra, ikincil metabolizma yoluyla üretilen, çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olan ve farklı biyolojik veya ekolojik işlevlere yardımcı olan birçok organik bileşik içerir. Anti-besinsel bileşikler olarak tanımlanan bu bileşikler, besinlerin lezzetini, sindirilirliğini ve biyoyararlanımı üzerine olumsuz etkiler sergiler. Pseudo-tahıllarda bulunan anti-besinsel bileşikler proteaz inhibitörleri (tripsin ve kimotripsin inhibitörü), tanenler, fitik asit, saponinler, okzalatlardan, nitratlar ve lektinlerdir. Bundan dolayı

bu bileşiklerin sebep olduğu zararlı metabolik olayları azaltmak/ortadan kaldırmak için pseudotahılların tüketiminden önce uygun bir teknikle işlenmesi gerekmektedir. Uygulanacak yöntem seçilirken anti-besinsel bileşiklerin kimyasal yapısı, tohum içerisindeki dağılımı, biyolojik etkileri, ısıya duyarlılıkları ve suda çözünürlükleri ile işlemin maliyetinin belirlenmesi tavsiye edilmektedir. Anti-besinsel bileşiklerin azaltılması için kavuz ayırma, yıkama, ıslatma, kaynatma, çimlendirme ve fermantasyon işlemlerinin ilk etapta düşünülmesi gereken yöntemler olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir.

### ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarların, başka kişiler ve/veya kurumlar ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

### YAZAR KATKILARI

AA ve EY derlemeyi birlikte planlamış, yazmış ve son halini onaylamışlardır.

### KAYNAKLAR

Aderibigbe, O.R., Ezekiel, O.O., Owolade, S.O., Korese, J.K., Sturm, B., Hensel, O. (2020). Exploring the potentials of underutilized grain amaranth (*Amaranthus* spp.) along the value chain for food and nutrition security: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(3), 656-669.

Akin-Idowu, P.E., Ademoyegun, O.T., Olagunju, Y.O., Aduloju, A.O., Adebo, U.G. (2017). Phytochemical content and antioxidant activity of five grain amaranth species. *American Journal of Food Science and Technology*, 5(6), 249-255.

Aloo, S.O., Ofosu, F.K., Oh, D.H. (2021). Effect of germination on alfalfa and buckwheat: Phytochemical profiling by UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS, bioactive compounds, and *in vitro* studies of their diabetes and obesity-related functions. *Antioxidants*, 10(10): 1613, 1-18.

Ando, H., Chen, Y.C., Tang, H., Shimizu, M., Watanabe, K., Mitsunaga, T. (2002). Food components in fractions of quinoa seed. *Food Science and Technology Research*, 8(1), 80-84.

Beniwal, S.K., Devi, A., Sindhu, R. (2019). Effect of processing on nutritional and physico-chemical, functional and pasting properties of

amaranth and quinoa flours. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 18(3), 500-507.

Bhatarai, G. (2018). Amaranth: A golden crop for future. Review Article, *Himalayan Journal of Science and Technology*, 2, 108-116.

Bhinder, S., Kumari, S., Singh, B., Kaur, A., Singh, N. (2021). Impact of germination on phenolic composition, antioxidant properties, antinutritional factors, mineral content and Maillard reaction products of malted quinoa flour. *Food Chemistry*, 346: 128915, 1-12.

Bolívar-Monsalve, E.J., Ceballos-González, C., Ramírez-Toro, C., Bolívar, G.A. (2017). Reduction in saponin content and production of gluten-free cream soup base using quinoa fermented with *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(12): e13495, 1-10.

Caeiro, C., Pragosa, C., Cruz, M.C., Pereira, C.D., Pereira, S.G. (2022). The role of pseudocereals in celiac disease: Reducing nutritional deficiencies to improve well-being and health. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2022: 8502169, 1-8.

Carrizo, S.L., Oca, M.C.E., Hébert, M.E., Saavedra, L., Vignolo, G., LeBlanc, J.G., Rollán, G.C. (2017). Lactic acid bacteria from Andean grain amaranth: A source of vitamins and functional value enzymes. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 27(5), 289-298.

Castro-Alba, V., Lazarte, C.E., Perez-Rea, D., Sandberg, A.S., Carlsson, N.G., Almgren, A., Bergenstahl, B., Granfeldt, Y. (2019). Effect of fermentation and dry roasting on the nutritional quality and sensory attributes of quinoa. *Food Science & Nutrition*, 7(12), 3902-3911.

Cizeikiene, D., Gaide, I., Basinskiene, L. (2021). Effect of lactic acid fermentation on quinoa characteristics and quality of quinoa-wheat composite bread. *Foods*, 10(1): 171, 1-16.

Coelho, L.M., Silva, P.M. dos S., Martins, J.T., Pinheiro, A.C., Vicente, A.A. (2018). Emerging opportunities in exploring the nutritional/functional value of amaranth. *Food & Function*, 9(11), 5499-5512.

- Del Hierro, J.N., Herrera, T., García-Risco, M.R., Fornari, T., Reglero, G., Martín, D. (2018). Ultrasound-assisted extraction and bioaccessibility of saponins from edible seeds: Quinoa, lentil, fenugreek, soybean and lupin. *Food Research International*, 109, 440-447.
- Demir, B., Bilgiçli, N. (2020). Changes in chemical and anti-nutritional properties of pasta enriched with raw and germinated quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) flours. *Journal of Food Science and Technology*, 57(4), 3884-3892.
- Deng, Y., Padilla-Zakour, O., Zhao, Y., Tao, S. (2015). Influences of high hydrostatic pressure, microwave heating, and boiling on chemical compositions, antinutritional factors, fatty acids, *in vitro* protein digestibility, and microstructure of buckwheat. *Food and Bioprocess Technology*, 8(11), 2235-2245.
- Diaz-Valencia, Y.K., Alca, J.J., Calori-Domingues, M.A., Zanabria-Galvez, S.J., Cruz, S.H. (2018). Nutritional composition, total phenolic compounds and antioxidant activity of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) of different colours. *Nova Biotechnologica et Chimica*, 17(1), 74-85.
- Drzewiecki, J., Martinez-Ayala, A.L., Lozano-Grande, M.A., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Jastrzebski, Z., Pasko, P., Gorinstein, S. (2018). *In vitro* screening of bioactive compounds in some gluten-free plants. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 186(4), 847-860.
- Filho, A.M.M., Pirozi, M.R., Borges, J.T.S., Sant'Ana, H.M.P., Chaves, J.B.P., Coimbra, J.S.R. (2017). Quinoa: Nutritional, functional, and antinutritional aspects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(8), 1618-1630.
- Fotschki, B., Juśkiewicz, J., Jurgoński, A., Amarowicz, R., Opyd, P., Bez, J., Muranyi, I., Petersen, I.L., Llopis, M.L. (2020). Protein-rich flours from quinoa and buckwheat favourably affect the growth parameters, intestinal microbial activity and plasma lipid profile of rats. *Nutrients*, 12(9): 2781, 1-12.
- Gélinas, B., Seguin, P. (2007). Oxalate in grain amaranth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4789-4794.
- Gobbetti, M., Angelis, M., Cagno, R., Polo, A., Rizzello, C.G. (2020). The sourdough fermentation is the powerful process to exploit the potential of legumes, pseudo-cereals and milling by-products in baking industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(13), 2158-2173.
- Han, Y., Chi, J., Zhang, M., Zhang, R., Fan, S., Huang, F., Xue, K., Liu, L. (2019a). Characterization of saponins and phenolic compounds: Antioxidant activity and inhibitory effects on  $\alpha$ -glucosidase in different varieties of colored quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*, 83(11), 2128-2139.
- Han, Y., Chi, J., Zhang, M., Zhang, R., Fan, S., Dong, L., Huang, F., Liu, L. (2019b). Changes in saponins, phenolics and antioxidant activity of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) during milling process. *LWT-Food Science and Technology*, 114: 108381, 1-7.
- Hejazi, S.N., Orsat, V., Azadi, B., Kubow, S. (2016). Improvement of the *in vitro* protein digestibility of amaranth grain through optimization of the malting process. *Journal of Cereal Science*, 68, 59-65.
- Hernández-Ledesma, B. (2019). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) as a source of nutrients and bioactive compounds: A Review. *Bioactive Compounds in Health and Disease*, 2(3), 27-47.
- Isaac-Bamgboye, F.J., Edema, M.O., Oshundahunsi, O.F. (2019). Nutritional quality, physicochemical properties and sensory evaluation of amaranth-*kunu* produced from fermented grain amaranth (*Amaranthus hybridus*). *Annals. Food Science and Technology*, 20(2), 322-331.
- Jancurová, M., Minarovičová, L., Dandár, A. (2009). Quinoa – A Review. *Czech Journal of Food Sciences*, 27(2), 71-79.
- Jin, J., Ohanenye, I.C., Udenigwe, C.C. (2020). Buckwheat proteins: Functionality, safety, bioactivity, and prospects as alternative plant-based proteins in the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 16: 1-13.

- Kasar, C., Thanushree, M.P., Gupta, S., Inamdar, A.A. (2021). Milled fractions of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) from the Himalayan regions: Grain characteristics, functional properties and nutrient composition. *Journal of Food Science and Technology*, 58(10), 3871-3881.
- Kozioł, M.J. (1992). Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 5(1), 35-68.
- Kumar, Y., Basu, S., Goswami, D., Devi, M., Shivhare, U.S., Vishwakarma, R.K. (2022). Anti-nutritional compounds in pulses: Implications and alleviation methods. *Legume Science*, 4(2), e111.
- Manyelo, T.G., Sebola, N.A., Rensburg, E.J., Mabelebele, M. (2020). The probable use of *genus amaranthus* as feed material for monogastric animals. *Animals*, 10(9):1504, 1-17.
- Mastebroek, H.D., Limburg, H., Gilles, T., Marvin, H.J.P. (2000). Occurrence of saponins in leaves and seeds of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 80(1), 152-156.
- Mattila, P.H., Pihlava, J.M., Hellström, J., Nurmi, M., Euroala, M., Mäkinen, S., Jalava, T., Pihlanto, A. (2018). Contents of phytochemicals and antinutritional factors in commercial protein-rich plant products. *Food Quality and Safety*, 2(4), 213-219.
- Melini, F., Melini, V. (2021). Impact of fermentation on phenolic compounds and antioxidant capacity of quinoa. *Fermentation*, 7(1): 20, 1-19.
- Mezgebo, K., Belachew, T., Satheesh, N. (2018). Optimization of red teff flour, malted soybean flour, and papaya fruit powder blending ratios for better nutritional quality and sensory acceptability of porridge. *Food Science & Nutrition*, 6:891-903.
- Mir, N.A., Riar, C.S., Singh, S. (2018). Nutritional constituents of pseudo-cereals and their potential use in food systems: A Review. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 170-180.
- Nyonje, W.A., Schafleitner, R., Abukutsa-Onyango, M., Yang, R.Y., Makokha, A., Owino, W. (2021). Precision phenotyping and association between morphological traits and nutritional content in vegetable amaranth (*Amaranthus* spp.). *Journal of Agriculture and Food Research*, 5: 100165, 1-8.
- Reguera, M., Conesa, C.M., Gil-Gómez, A., Haros, C.M., Pérez-Casas, M.Á., Briones-Labarca, V., Bolaños L., Bonilla, I., Álvarez, R., Pinto, K., Mujica, Á., Bascuñán-Godoy, L. (2018). The impact of different agroecological conditions on the nutritional composition of quinoa seeds. *PeerJ*, 14;6:e4442.
- Rollán, G.C., Gerez, C.L., LeBlanc, J.G. (2019). Lactic fermentation as a strategy to improve the nutritional and functional values of pseudocereals. *Frontiers in Nutrition*, 6:98.
- Saad-Allah, K.M., Youssef, M.S. (2018). Phytochemical and genetic characterization of five quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) genotypes introduced to Egypt. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24(4), 617-629.
- Satheesh, N., Fanta, S.W. (2018). Review on structural, nutritional and anti-nutritional composition of teff (*Eragrostis tef*) in comparison with quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Cogent Food & Agriculture*, 4(1): 1546942, 1-27.
- Shadi, H., Rouzbehan, Y., Rezaei, J., Fazaeli, H. (2020). Yield, chemical composition, fermentation characteristics, in vitro ruminal variables, and degradability of ensiled amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) cultivars compared with corn (*Zea mays*) silage. *Translational Animal Science*, 4(4): 1-12.
- Sinha, K., Khare, V. (2017). Review on: Antinutritional factors in vegetable crops. *The Pharma Innovation Journal*, 6(12), 353-358.
- Sobota, A., Świeca, M., Gęsiński, K., Wirkliowska, A., Bochnak, J. (2019). Yellow-coated quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) – Physicochemical, nutritional, and antioxidant Properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(5), 2035-2042.
- Srujana, M.N.S., Kumari, B.A., Suneetha, W.J., Prathyusha, P. (2019). Processing technologies

- and health benefits of quinoa. *The Pharma Innovation Journal*, 8(5), 155-160.
- Suárez-Estrella, D., Torri, L., Pagani, M.A., Marti, A. (2018). Quinoa bitterness: Causes and solutions for improving product acceptability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(11), 4033-4041.
- Thakur, A., Sharma, V., Thakur, A. (2019). An overview of anti-nutritional factors in food. *International Journal of Chemical Studies*, 7(1), 2472-2479.
- Thakur, P., Kumar, K. (2019). Nutritional importance and processing aspects of pseudo-cereals. *Journal of Agricultural Engineering and Food Technology*, 6(2), 155-160.
- Thakur, P., Kumar, K., Dhaliwal, H.S. (2021a). Nutritional facts, bio-active components and processing aspects of pseudocereals: A Comprehensive Review. *Food Bioscience*, 42: 101170, 1-13.
- Thakur, P., Kumar, K., Ahmed, N., Chauhan, D., Rizvi, Q.U.E.H., Jan, S., Singh, T.P., Dhaliwal, H.S. (2021b). Effect of soaking and germination treatments on nutritional, anti-nutritional, and bioactive properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.), quinoa (*Chenopodium quinoa* L.), and buckwheat (*Fagopyrum esculentum* L.). *Current Research in Food Science*, 4: 917-925.
- Valadez-Vega, C., Lugo-Magaña, O., Morales-González, J.A., Delgado-Olivares, L., Izquierdo-Vega, J.A., Sánchez-Gutiérrez, M., López-Contreras, L., Bautista, M., Velázquez-González, C. (2021). Phytochemical, cytotoxic, and genotoxic evaluation of protein extract of *Amaranthus hypochondriacus* seeds. *CYTA – Journal of Food*, 19(1): 701-709.
- Villacrés, E., Quelal, M., Galarza, S., Iza, D., Silva, E. (2022). Nutritional value and bioactive compounds of leaves and grains from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Plants*, 11(2): 213, 1-11.
- Yousif, A.M., Snowball, R., D'Antuono, M.F., Dhammu, H.S., Sharma, D.L. (2020). Water droplet surface tension method – An innovation in quantifying saponin content in quinoa seed. *Food Chemistry*, 343(2): 128483, 1-20.
- Zhang, Z.L., Zhou, M.L., Tang, Y., Li, F.L., Tang, Y.X., Shao, J.R., Xue, W.T., Wu, Y.M. (2012). Bioactive compounds in functional buckwheat food. *Food Research International*, 49(1), 389-395.





**GELENEKSEL YOLLARLA ÜRETİLMİŞ TURŞU ÖRNEKLERİNDEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU, MOLEKÜLER YÖNTEMLER KULLANILARAK TANIMLANMASI VE BAZI FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Hümevra İSPİRLİ<sup>1\*</sup>, Enes DERTLİ<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Bayburt Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarı, Bayburt, Türkiye

<sup>2</sup>Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye

Geliş/ *Received* 29.01.2023; Kabul/ *Accepted* : 26.02.2023; /Online baskı: *Published online* 28.02.2023

İspirli, H., Dertli, E. (2023). Geleneksel yollarla üretilmiş turşu örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanması ve bazı fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi. *GIDA* (2023) 48 (2) 360-380 doi: 10.15237/gida.GD23019

İspirli, H., Dertli, E. (2023). Isolation of lactic acid bacteria from traditional pickle samples, their identification using molecular methods, and determination of some functional properties. *GIDA* (2023) 48 (2) 360-380 doi: 10.15237/gida.GD23019

**ÖZ**

Bu çalışmada ülkemizin farklı illerinden toplanmış 17 adet geleneksel turşu örneğinden Laktik Asit Bakterileri (LAB) izole edilip tanımlanmış ve izolatların fonksiyonel nitelikleri karakterize edilmiştir. Genotipik ayrıştırma sonucunda 9 farklı türe ait 21 suş tespit edilmiştir. Takiben bu 21 suşun potansiyel probiyotik değerlendirmeleri safra tuzlarına direnç ve düşük pH'da gelişim açısından test edilmiş ve *Lactiplantibacillus plantarum* ve *Levilactobacillus brevis* suşlarının yüksek canlılık gösterdiği tespit edilmiştir. İzolatlarının antibiyotik dirençlerinin ise oldukça düşük seviyede olduğu gözlenmiştir. Önemli olarak antifungal aktivite açısından suş spesifik etki gözlenirken, antibakteriyel aktivite noktasında oldukça güçlü aktivite sergilemişlerdir. Son olarak turşu izolatlarının GABA üretim potansiyelleri açığa çıkarılmış ve *Levilactobacillus brevis* VB13 suşunun 0.628±0.11 mg/mL GABA üretebildiği gösterilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar turşuda bulunan LAB çeşitliliğini ve bu suşların fonksiyonel etki potansiyelini göstermesi bakımından önem arz etmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Turşu, Laktik Asit Bakterileri, probiyotik, GABA üretimi

**ISOLATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM TRADITIONAL PICKLE SAMPLES, THEIR IDENTIFICATION USING MOLECULAR METHODS, AND DETERMINATION OF SOME FUNCTIONAL PROPERTIES**

**ABSTRACT**

In this study, Lactic Acid Bacteria (LAB) were isolated and identified from 17 traditional pickled vegetable samples collected from different provinces and their functional roles were characterised. As a result of genotypic separation, 21 strains belonging to 9 different species were identified. These strains were further tested for their potential probiotic roles by testing their bile salts and low pH resistance and strains of *Lactiplantibacillus plantarum* and *Levilactobacillus brevis* demonstrated superior characteristics in terms of survival. The antibiotic resistance of isolates was found to be at very low

\* Yazışmadan sorumlu yazar / *Corresponding author*

✉: humeyra\_ispirli@hotmail.com

☎: (+90) 458 211 1152/3305

☎: (+90) 458 211 1127

Hümevra İspirli; ORCID no: 0000-0002-7601-0374

Enes Dertli; ORCID no: 0000-0002-0421-6103

levels. Importantly, while strain-specific effects were observed in terms of antifungal activity, they showed very strong activity in antibacterial activity. Finally, pickle isolates were tested for GABA production and *Levilactobacillus brevis* VB13 strain demonstrated  $0.628 \pm 0.11$  mg/mL GABA production. The results we obtained are important in terms of showing the diversity of LAB in pickles and the functional effect potential of these strains.

**Keywords:** Pickle, Lactic Acid Bacteria, probiotic, GABA production

## GİRİŞ

Tüketici taleplerine ve Dünya'daki beslenme eğilimindeki değişikliklere paralel olarak son dönemde bitkisel temelli fermente ürünlere olan ilgi çok hızlı bir şekilde artmaktadır (Behera vd., 2020). Ülkemiz fermente ürünler açısından oldukça zengin bir konumdadır ve bitkisel ürünlerin fermentasyonu ile üretilen turşu ülkemiz fermente ürünlerinin başında gelmektedir. Bu kapsamda çok çeşitli sebzeler ve bazı meyveler turşu üretiminde kullanılabilirken, fermantasyonu yürüten Laktik Asit Bakterileri (LAB), hammaddede bulunan ve spontan olarak üründe gelişen türlerin suşlarından oluşmaktadırlar. İlgili LAB'ler ortamda bulunan diğer mikroorganizmaları baskılayıp gelişerek pH'nın düşüşü ve aynı zamanda fermente ürünlerin organoleptik özelliklerinin oluşumu ile neticelenen süreci yönetmektedirler (Tokatlı vd., 2019). Aynı zamanda turşu üretim sürecinin önemli faktörleri olan su aktivitesi, ortam sıcaklığı, kullanılan tuz konsantrasyonu, anaerobiosis ve yüksek asitlik gibi faktörler LAB'nin ortamda dominant olmasına ve neticede istenmeyen diğer mikroorganizmaların inhibisyonuna katkı sağlamaktadır (Erten vd., 2016). LAB'nin diğer mikroorganizmalara karşı gösterdiği bu antagonistik aktivitenin farklı mekanizmalar ile meydana geldiği bilinmektedir. LAB'nin karbonhidrat kaynaklarını fermente etmeleri sonucu ürettikleri laktik ve asetik asit gibi organik asitler nedeni ile düşen pH ya karşı birçok mikroorganizmanın hassasiyet göstermesi, yine LAB tarafından üretilen  $H_2O_2$ 'nin mikroorganizmalar üzerine inhibitör etki göstermesi ve LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin özellikle yakın ilişkili bakteriler üzerine inhibitör etki göstermesi bu mekanizmalar arasında yer almaktadır. Ayrıca LAB tarafından üretilen, diasetil, alkol ve  $CO_2$  gibi bazı metabolitlerinde bazı mikroorganizmalar üzerine inhibitör etki gösterebilmektedir (Tokatlı, 2013). Neticede turşu orijinli LAB türleri yüksek rekabet

güçleri, düşük pH ve yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişip canlılıklarını sürdürme potansiyelleri açısından dikkat çekmekte ve özellikle bitkisel fermente ürünlerin öneminin her geçen gün arttığı günümüzde starter kültür ve önemli olarak potansiyel probiyotik mikroorganizma olarak önem arz etmektedirler (Liu vd., 2022). Ayrıca antimikrobiyal aktiviteye sahip starter kültür suşları, fermente gıdaların patojen ve bozulma etmeni birçok mikroorganizmaya karşı korunmasında, gıda güvenliği ve insan sağlığı açısından en etkin çözümü sunmaktadır (Huang vd., 2009). Bu noktada oldukça farklı bitkisel materyalin kullanılabilirliği geleneksel turşularımızdan LAB türlerinin izolasyonu ve bunların özellikle probiyotik potansiyellerinin belirlenmesi oldukça önem arz etmektedir. Böylece hem ticari probiyotiklere erişimi çok kolay olmayan küçük işletmeler için fonksiyonel starter kültür üretimi ile ilgili bir başlangıç yapılabilecek (Zielińska vd., 2015), hem de büyük çaplı endüstriyel uygulamalar için geleneksel LAB türlerimiz açığa çıkarılmış olabilecektir. Aynı zamanda özgün fonksiyonel starter olabilecek LAB suşlarının izolasyonu geleneksel suşlarımızın korunması ve fermente ürünlerin daha kontrollü şartlarda nitelikli üretimine de katkı sağlayabilecektir (Liu vd., 2022).

Laktik asit bakterileri gıda üretiminde starter kültür olarak kullanılmalarının yanı sıra, endüstride probiyotik olarak da kullanılmaktadırlar. Turşu gibi geleneksel fermente ürünlerden izole edilen LAB suşlarının probiyotik potansiyellerinin değerlendirilmesi amacıyla safra tuzlarına direnç, düşük pH şartlarında canlılıklarını sürdürme, antimikrobiyal etkinlik, düşük antibiyotik direnci gibi önemli parametrelerin ilk olarak değerlendirilmesi ve burada üstün özellik gösteren suşların in vitro ve in vivo denemeler kapsamında test edilmesi gerekmektedir (Zeng vd., 2020). Probiyotik

bakteriler için ilk gereksinim, transfer olduğu aktif alanlarda hayatta kalabilmeleridir. Yararlı bağırsak işlevleri olan probiyotik bakterilerin midenin asidik ortamından geçerken hayatta kalması gerekmektedir. Bununla birlikte bakterilerin bağırsaktaki epitel yüzeylere tutunması; kolonizasyon, immün sistemin aktive edilmesi ve patojenlere karşı antagonistik aktivitenin ön şartı olarak kabul edilmekte ve probiyotik seçimi için temel kriter olarak görülmektedir. Mikroorganizmaların en dıştaki yüzeyinin hidrofobik doğası konakçıya tutunmasını sağlayan birkaç mekanizmadan biridir ve hidrofobisite; probiyotik seçimi için temel kriterlerden birisi olarak görülmektedir (Monteagudo-Mera vd., 2019).

Fermente ve probiyotik gıdaların üretiminde kullanılacak LAB'lerin güvenli mikroorganizmalar olmaları istenmektedir. LAB'lerin antibiyotik direnç geni bulundurmaları durumunda, bu genleri patojenlere veya florada bulunan diğer bakterilere aktarma olasılıkları önemli bir sorun teşkil etmektedir. Bu nedenle gıda sanayiinde farklı amaçlarla kullanılacak LAB'nin antibiyotik direnç genlerine sahip olmaması istenmektedir (Mathur ve Singh, 2005; Zarzecka vd., 2023). Geleneksel kaynaklardan izole edilen özgün LAB türlerinin probiyotik potansiyellerinin ortaya konması adına belirtilen bu kriterlerin test edilerek açığa çıkarılması oldukça önemlidir.

Son dönemde LAB suşlarının fonksiyonel etki mekanizması kapsamında değerlendirilen bir diğer parametrede özellikle beyinde nörotransmitter olarak rol alarak insan sağlığının devamı noktasında fizyolojik fonksiyonları olan önemli bir biyoaktif madde  $\gamma$ -aminobütirik asit (GABA) üretimi gelmektedir (Chakraborty vd., 2023). Yapılan çalışmalar GABA ile zenginleştirilmiş gıdaların tüketiminin kanserli hücrelerin çoğalmasını engelleyebildiğini (Park ve Oh, 2007), hafızayı ve öğrenme yeteneklerini geliştirebildiğini ortaya koymuştur (Miura vd., 2006). Bu yararlı işlevleri nedeniyle GABA artan ticari bir öneme sahiptir. GABA'nın kimyasal veya biyolojik olarak sentezlenmesi için birçok yöntem bulunmasına rağmen (Coda vd., 2010; Inoue vd., 2003; Plokhov vd., 2000), biyolojik yöntemler ile

üretimi kimyasal sentez yöntemlerine göre önemli avantajlar sunmaktadır (Huang vd., 2007). Bu açıdan LAB'ler yüksek düzeyde GABA üretimi için özgün mikroorganizmalar olarak görülmektedir. Özellikle GABA açısından zenginleştirilmiş gıdaların üretiminde kullanılabilme potansiyellerinin yüksek olması nedeniyle GABA üreten LAB'ler büyük bir öneme sahiptir. Yapılan çalışmalar GABA üretiminin LAB türleri arasında önemli düzeylerde farklılık gösterdiğini ortaya koymuş olup (Demirbaş vd., 2017), yüksek miktarlarda GABA üretimi gerçekleştirebilen suşların probiyotik içeren ve fonksiyonel fermente ürünlerin üretiminde kullanımını sağlamak için geleneksel ürünlerimizdeki LAB'lerin GABA üretimi noktasında test edilmesi önem arz etmektedir. Bu noktalardan hareketle bu çalışma kapsamında ülkemizin 7 farklı ilinden toplam 17 farklı geleneksel turşu örneği toplanmış ve turşu örneklerinde yer alan LAB'lerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Turşu örneklerinin pH, organik asit ve şeker içerikleri HPLC analizi ile belirlenmiştir. LAB türlerinin izolasyonunu takiben morfolojik olarak farklı türler rep-PCR analizi ile genotipik ayırma tabii tutulmuş ve genotipik ayırım neticesinde farklı bulunan LAB suşları 16S rRNA geni temelli tanımlanmışlardır. Takiben tanımlanan LAB suşlarının potansiyel probiyotik değerlendirmesi ve fonksiyonel etkileri safra tuzları ve düşük pH'da canlılık, hidrofobisite, antibiyotik hassasiyetinin belirlenmesi, antibakteriyel ve antifungal etkinliklerinin değerlendirilmesi ve son olarak GABA üretim yeteneklerinin açığa çıkartılması kapsamında ortaya konmuştur. Bu sonuçların özellikle geleneksel turşu örneklerimizde bulunan LAB suşlarının fonksiyonel niteliklerini göstermesi bakımından özgün katkılar sunabileceği öngörülmektedir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

PCR çalışmalarında kullanılan bileşenler Thermo Fisher Scientific (ABD) firmasından satın alınmıştır. Mikrobiyolojik analizlerde kullanılan kimyasal malzemeler Merck (Almanya) firmasından ve kullanılan tüm HPLC standartları ise Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin

edilmiştir. Çalışma kapsamında kullanılan bütün kimyasallar analitik safılıktadır.

### Turşu Örnekleri

Çalışma kapsamında LAB'nin izolasyonu için Türkiye'nin farklı illerinden herhangi bir şekilde

starter kültür ilavesi yapılmadan üretilmiş 17 adet geleneksel meyve ve sebze turşu örneği toplanmıştır (Çizelge 1). Toplanan örnekler steril numune kaplarına alınarak soğuk zincirde laboratuvara getirilmiş ve analiz sürecinde buzdolabı şartlarında muhafaza edilmiştir.

Çizelge 1. Toplanan turşu örneklerinin dağılımı  
Table 1. Distribution of the collected pickle samples

Örnek Toplanan İller Sample Collected Provinces	Turşu çeşidi Pickle variety
Bayburt	Salamura fasulye yaprağı (1) Pickled bean leaves
	Fasulye turşusu (2) Bean pickle
	Pazı turşusu (1) Chard pickle
	Kırmızı pancar turşusu (1) Pickled red beetroot
	Lahana turşusu (1) Sauerkraut
	Karnabahar turşusu (1) Cauliflower pickle
	Brokoli turşusu (1) Broccoli pickle
	Dereotlu karışık turşu (1) Mixed dill pickle
	Yabani armut turşusu (1) Pickled wild pear
	Alıç sirkesi (1) Hawthorn vinegar
Giresun	Fasulye turşusu (1) Bean pickle
Nevşehir	Biber turşusu (1) Pickled peppers
İstanbul	Fasulye turşusu (1) Bean pickle
Ankara	Salatalık turşusu (1) Pickled cucumber
Trabzon	Lahana turşusu (1) Sauerkraut
Malatya	Karışık turşu (1) Mixed pickle

### Turşu Örneklerinin Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Toplanan turşu örneklerinin kimyasal özellikleri pH, organik asit ve şeker içerikleri belirlenerek ortaya konmuştur.

#### Turşu örneklerinde pH tayini

Turşu örneklerinin pH'sını belirlemek için dijital pH-metre (WTW Inolab 7110, Almanya) kullanılarak ölçümler yapılmıştır. pH metre standart tampon çözeltiler ile kalibre edildikten sonra ölçüm işlemi  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de gerçekleştirilmiştir.

#### Turşu örneklerinin şeker içeriğinin HPLC ile belirlenmesi

Turşu örneklerinin şeker içeriği HPLC (Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi) cihazı (Schimadzu CBM-20A, Japonya) kullanılarak analiz edilmiştir. Bu amaçla ilk olarak turşu suları  $0.22 \mu\text{m}$ 'lik filtreden geçirilerek HPLC viallerine alınmış ve analiz için  $20 \mu\text{L}$  örnek HPLC'ye verilmiştir. Analizde mobil faz olarak  $\text{H}_2\text{O}$  kullanılmış ve akış hızı  $0.6 \text{ mL/dk}$  olarak ayarlanmıştır. Analiz için kolon sıcaklığı  $85^\circ\text{C}$ 'ye ayarlanmış olup

CONCISE CarboSep CHO 87C ( $300 \times 7.8 \text{ mm}$ , ABD) kolon kullanılarak analiz gerçekleştirilmiştir. Şekerlerin tespiti için refraktif indeks detektörü (Shimadzu RID-10A, Japonya) kullanılmış ve standart şeker olarak glukoz, galaktoz, maltoz ve fruktoz kullanılarak cihazın kalibrasyonu yapılmıştır.

#### Turşu örneklerinin organik asit içeriğinin HPLC ile belirlenmesi

Turşu örneklerinin organik asit içeriği HPLC (Schimadzu CBM-20A, Japonya) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Analizde mobil faz olarak  $10 \text{ mM HClO}_4$  kullanılmış ve mobil faz akış hızı  $0.8 \text{ mL/dk}$  olarak ayarlanmıştır. Analiz edilen turşu suları  $0.22 \mu\text{m}$ 'lik filtreden geçirilerek HPLC viallerine alınmış ve örnekten  $20 \mu\text{L}$  cihaza enjekte edilmiştir. Her bir analiz süresi, organik asit piklerinin çıkış süresine göre 20 dakika olarak belirlenmiştir. Organik asitlerin maksimum absorpsiyonu PDA (Photodiode Array Detector) dedektörde (Shimadzu SPD-M20A, Japonya)  $210 \text{ nm}$  dalga boyunda belirlenmiştir. Analiz için

İnertsil ODS-3 C18 (250 x 4.6 mm 5 µm, Japonya) kolonu kullanılmış ve kolon sıcaklığı 40°C olarak ayarlanmıştır. Standart olarak laktik, asetik, sitrik, propiyonik, okzalik, tartarik ve formik asit kullanılarak kalibrasyon yapılmıştır.

### **Turşu Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması**

#### *Laktobasillerin izolasyonu*

Turşu örneklerinden LAB türlerini izole etmek amacı ile örneklerden 10 gram steril stomacher poşetlerine tartılıp 90 mL steril fizyolojik tuzlu su çözeltisi ilave edilerek homojenize edilmiştir. Daha sonra örneklerden seri dilisyonlar hazırlanmıştır. Laktobasil türlerinin izolasyonu için  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  ve  $10^{-4}$  dilisyonlardan MRS agara yayma yöntemi ile ekim yapıp petri plakaları 37°C de 48 saat aerobik ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda katı besiyeri ortamında gelişen morfolojik olarak farklı olan koloniler seçilip MRS agar ortamına çizilerek saflaştırılmıştır. İzole edilip saflaştırılan kültürler ilgili sıvı besi ortamında geliştirilerek stok solüsyonları sonraki analizlerde kullanılmak üzere %40'luk gliserol kullanılarak hazırlanıp -80° C'de depolanmıştır.

#### *Genomik DNA izolasyonu*

İzole edilen ve saflaştırılan kültürlerden DNA izolasyonu fenol:kloroform:izoamil alkol kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu metod ile bazı izolatlarda sonuç alınamamış olup gerekli görüldüğü durumlarda DNA izolasyonu Genomik DNA Ekstraksiyon Kiti (İnvitrogen, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Fenol:kloroform:izoamil alkol ile DNA izolasyonu için sıvı kültür ortamında bir gece geliştirilmiş kültürden eppendorf tüpü içerisine 1 mL alınarak 10 dakika 8000×g de santrifüj işlemi ile bakteri hücreleri bir araya toplanmıştır. Tüpteki süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra bir araya toplanan hücrelerin üzerine 450 µL TE (Tris EDTA) tamponundan ilave edilip hafif bir karıştırma ile hücrelerin tampon içerisinde süspanse olması sağlanmıştır. Süspanse edilen hücrelere 50 µL %10'luk SDS (Sodyum dodesil sülfat) ve 2 µL Proteinaz K ilave edilip iyice vortekslelendikten sonra 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda

0.5 mL fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) karışımından ilave edilip tüpler baş aşağı çevrilerek iyice karıştırılmış ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İçerik 4°C'de 10 dakika 7000×g de santrifüjlelendikten sonra elde edilen süpernatant benzeri yüksek viskoziteli jel otomatik pipet kullanılarak toplanıp yeni bir tüpe aktarılmıştır. İşlem fenol-kloroform-izoamil alkol karışımı ile bir kez daha tekrarlanıp oluşan süpernatant benzeri yüksek viskoziteli jel yeni bir tüpte toplanmıştır. 5M'lık sodyum asetatın 50 µL içeriğe ilave edilip hafifçe karıştırılmıştır. İçeriğe 1 mL izopropanol ilave edilerek çöken DNA'nın beyaz iplikçikleri oluşana kadar ters-düz edilerek hafifçe karıştırılmıştır. İçerik 3000×g de 10 dakika santrifüjlelendikten sonra süpernatant uzaklaştırılıp, elde edilen pellet üzerine 0.5 mL %70'lik etanol ilave edilip hafif karıştırıldıktan sonra içerik 3000×g de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kalan etanolü uzaklaştırmak için içerik 37°C'de 5-10 dakika bekletilmiş ardından elde edilen DNA 100 µL distile su ilave edilerek süspanse edilmiştir.

#### *rep-PCR analizi ile genotipik karakterizasyon*

İzole edilen ve saflaştırılan kültürlerin farklı suşlara ait olup olmadığını belirlemek için rep-PCR (repetitive element palindromic PCR) analizi yapılmıştır. rep-PCR analizi için daha önce bu kapsamda tanımlanmış olan GTG5 primeri (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') kullanılmıştır. Bu amaç için hazırlanan PCR karışımı ve rep-PCR şartları daha önceki çalışma gibi uygulanmıştır (Dertli vd., 2016).

#### *16S rRNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonu*

rep-PCR işlemi takiben seçilen farklı kolonilere 16S PCR işlemi uygulanmıştır. 16S geninin amplifikasyonu AMP\_F (5'-GAGAGTTTGATYCTGGCTCAG-3') ve AMP\_R (5'-AAGGAGGTGATCCARCCGCA-3') primer çifti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR işlemi için; ekstrakte edilen DNA ların 1 µL'si DNA Polimeraz ile yürütülen PCR da DNA şablonu olarak kullanılmıştır. Bu amaçla hazırlanan PCR karışımı ve PCR şartları daha önceki çalışma gibi uygulanmıştır (Dertli vd., 2016).

PCR ürünlerinin jel elektroforezi ile kontrolü için konsantrasyonu %1 olan agaroz jeli 0.5X Tris borat EDTA (TBE) tamponu kullanılarak hazırlanmıştır. PCR ürününden 10 µL alınarak agaroz jeldeki kuyucuklara yüklenmiş ve TBE tamponu kullanılarak 100 V da 50 dk elektroforez işlemine bırakılmıştır. Elektroforez işleminin ardından jeller 1 mg/L'lik etidyum bromid (Thermo Fisher Scientific, ABD) çözeltisi içerisinde 30 dk bekletilerek jelde yüklü olan DNA parçacıklarının boyanması için beklenmiştir. Bu işlemin ardından jeller deiyonize su içerisinde kısa süre tutularak durulandıktan sonra UV Transilluminatör (Cleaver Scientific, İngiltere) kullanılarak UV ışık altında görüntülenmiştir. GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD) her elektroforetik jelde DNA boyutlayıcısı olarak kullanılmıştır.

#### *Dizi analizi*

Amplifikasyonu takiben saflaştırılan 16S rRNA genine ait PCR ürünlerinin sekans analizi ülkemizde dizileme analizi konusunda hizmet veren Medsantek firmasından (İstanbul, Türkiye) hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sekanslar, %99-100 benzerlik kriteri ile BLAST algoritması kullanılarak hizalanmış ve böylelikle suşlar tanımlanmıştır. Sekans dataları NCBI veri sistemine submit edilmiş olup submission numaraları OQ428838;OQ428858 arasında değişmektedir. Tanımlanan suşların evrimsel ilişkilerini, aralarındaki genom benzerliklerini veya farklılıklarını ortaya koymak için filogenetik analizleri MEGAX paket programı kullanılarak yapılmış ve filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Kumar vd., 2018). Bu bağlamda filogenetik ağaçlar 1000 tekrarlı özyükleme ile neighbour-joining (NJ) metodu kullanılarak oluşturulmuştur (Saitou ve Nei, 1987; Tamura vd., 2004).

#### **İzolatların Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi**

##### *Suşların düşük pH ve safra tuzlarına karşı direncinin belirlenmesi*

Seçilen farklı LAB türlerinin düşük pH ve safra tuzlarına karşı direncinin değerlendirilmesi için izolatlar MRS besiyeri kullanılarak geliştirilmiştir. Ardından kültürler %0.85'lik steril fizyolojik tuzlu su ile iki kez yıkanarak yoğunlukları OD<sub>600</sub> nm de

~ 1'e ayarlanmıştır. Kontrol amaçlı pH ayarlaması yapılmadan ve safra tuzu ilave edilmeden kültürler MRS ortamına %1 oranında inoküle edilmiştir. Aynı şekilde %0.3 (w/v) safra tuzu (Biolife, İtalya) içeren ve 1M HCl ile pH 4'e ayarlanmış MRS besiyeri ortamlarına kültürlerden %1 olacak şekilde inoküle edilerek 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Kültürlerin gelişimleri her dört saatte bir 24 saat boyunca spektrofotometre kullanılarak OD<sub>600</sub> nm de ölçülmüştür (İspirli vd., 2015).

##### *İlgili türlerin hidrofobisite niteliklerinin belirlenmesi*

Seçilen türlerde tutunma analizi Sagdic vd., (2014)'nin yapmış oldukları metoda göre gerçekleştirilmiştir. Bu amaç için geliştirilen kültürler, santrifüj (1200×g, 4°C, 10 dk) işlemi uygulandıktan sonra 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 6.5) ile iki kez yıkanmış ve ardından aynı tampon çözeltide süspense edilmiştir. İzolatların yoğunluğu OD<sub>590</sub> nm'de yaklaşık olarak 1'e ayarlanmış ve deney tüpleri içerisine 3 mL bakteriyel süspansiyon ve 0.6 mL n-heksadekan ilave edilmiştir. Takiben karışım 120 saniye vortekslenmiş ve daha sonra faz ayrışması için hareket ettirmeden 20 dk boyunca 37°C inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası alt faz (sulu) dikkatlice alınıp OD<sub>560</sub> nm'de ölçüm yapılmıştır. % Adezyon aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Adezyon} = [(A_0 - A) / A_0] 100,$$

A<sub>0</sub> ölçümden önceki başlangıç OD değeri

A ise 20 dk'lık inkübasyondan sonraki OD değeri

##### *İlgili türlerin antibiyotik hassasiyetlerinin belirlenmesi*

Seçilen LAB türlerinde antibiyogram testi antibiyotik difüzyon diskleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaç için İspirli vd., (2015)'nin belirttiği metot kullanılmıştır. İlgili besiyerlerinde aktifleştirilen bakteriler 10<sup>7</sup> kob/mL olacak şekilde ayarlanmış ve takiben 100 µL alınarak MRS agar üzerine yayma yöntemi ile ekilmiştir. Ardından antibiyotik diskler (Streptomisin, Penisilin, Kanamisin, Kloramfenikol, Eritromisin, Tetrasiklin, Oksitetrasiklin, Ampisilin) (Bioanalyse, Türkiye) agar üzerine yerleştirilmiş ve petriler 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda oluşan inhibisyon zonları kaydedilerek izolatların antibiyotik hassasiyetleri belirlenmiştir.

#### *İzolatların antifungal aktivitelerinin belirlenmesi*

Seçilen izolatlarının antifungal aktiviteleri gıda güvenliği açısından önem taşıyan *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* ve *Penicillium chrysogenum* test küflerine karşı test edilmiş olup (Bhunia, 2018) ilgili test küfleri Yıldız Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Antifungal etkinin belirlenmesi amacıyla öncelikle test edilen küfler PDA besiyerinde 25-30°C de 5-7 gün boyunca geliştirilmiş ve küf sporları  $1 \times 10^6$  spor/mL olmak koşulu ile hasat işlemi gerçekleştirilmiştir. Seçilen LAB izolatları MRS agar besiyerine 10 µL'lik üç kopya halinde nokta ekim yöntemi ile ekilmiş ve 37°C'de 48 saat boyunca aerobik şartlarda inkübasyona bırakılmıştır. LAB suşlarının gelişimini takiben petrilerin üzerine  $1 \times 10^6$  spor/mL fungus içerecek şekilde PDA soft agar (%0.8 agar) eklenmiştir. Takiben petriler aerobik koşullar altında 30°C'de 48 saat boyunca inkübe edilmiş ve küflerde oluşan inhibisyon zonu ölçülmüştür (Demirbaş vd., 2017). İnhibisyon zonu oluşmuş alanın total ekim yapılan petri alanına bölünmesi ile elde edilmiştir. Sonuç olarak turşu izolatlarının küfler üzerindeki etkisi – inhibisyon yok, + petri alanının %0.1~3'ünde fungal gelişim yok, ++ petri alanının %3~8'inde fungal gelişim yok ve +++ petri alanının %8~12'sinde fungal gelişim yok ve ++++ petri alanının >%12'sinde fungal gelişim yok şeklinde belirlenmiştir (Magnusson ve Schnürer, 2001). Küflere karşı etkinin bakteriyosin benzeri maddelere ilaveten laktik-asetik asit gibi çeşitli son ürünlerden kaynaklanabileceği düşünülmüş dolayısıyla bu işlemler bakterilerin kendisi ile yürütülmüştür.

#### *İzolatların antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi*

Seçilen LAB türlerinin antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla ilgili izolatlar *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Salmonella typhimurium* RSSK 95091 patojen türlerine karşı test edilmiştir. İlgili patojen türler TSB besiyeri içinde 37°C'de geliştirilerek analiz için hazır hale getirilmiştir. LAB suşlarının antibakteriyel etkisinin belirlenmesi için agar noktalama testi kullanılmış olup izolatlar 37°C'de 18-24 saat MRS besiyeri ortamında geliştirildikten sonra, MRS agar ortamına, bir petride 2 farklı suş

olacak şekilde nokta ekim yapıp 37°C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. TSB sıvı ortamında geliştirilen patojen bakteriler %0.8 oranında agar içeren 10 mL yumuşak agar (TSB) ortamına inoküle edilerek, nokta ekim yapılan MRS agar plaklarının üzerine ikinci tabaka halinde dökülmüş ve homojen bir şekilde yayılmıştır. Daha sonra bu ortamlar patojen bakterilerin gelişimi için 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda, izolatların patojen bakterilere karşı oluşturdukları inhibisyon zonları incelenmiştir (Hwanhlem vd., 2011).

#### *LAB suşlarının GABA üretim seviyelerinin HPLC ile belirlenmesi*

LAB suşlarının GABA üretim potansiyelleri Villegas vd., (2016) tarafından ifade edildiği şekilde belirlenmiştir. Bu amaçla tüm suşlar 53 mM MSG içeren MRS sıvı besiyeri ortamlarında 30°C'de 96 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun tamamlanmasının ardından kültür süpernatantları  $6000 \times g$ 'de 15 dakika santrifüj işlemi ile toplanmış ve suşların GABA üretim seviyeleri HPLC (Schimadzu CBM-20A, Japonya) ile belirlenmiştir. Kültür süpernatantlarında bulunan GABA'nın HPLC ile tespit edilebilmesi için süpernatantlar türevlendirme işlemine tabi tutularak analiz için hazır hale getirilmiştir. Türevlendirme işlemi için 100 µL kültür süpernatantı alınarak üzerine aseton ile hazırlanmış 50 mg/mL'lik konsantrasyona sahip dansil klorid çözeltisinden 100 µL, 0.2 M Sodyum borat:NaOH çözeltisinden (pH 9.0) 800 µL ilave edilmiş ve homojen çözelti oluşturmak için vorteks yardımı ile karıştırılmıştır. Elde edilen çözelti ultrasonik banyoda 40°C'de 30 dk inkübasyona tabi tutulmuş ve ardından 12000 rpm'de 10 dk santrifüj işlemi uygulanarak ortamda bulunabilecek safsızlıklar çöktürülmüştür. Santrifüj işlemi sonucunda elde edilen süpernatanta eşit hacimde metanol ilave edilmiş ve sonrasında örnekler 0.22 µm filtreden geçirilerek HPLC viallerine aktarılmıştır. Türevlendirilen örneklerin HPLC'de analizi için mobil faz olarak Solvent A (6.25 mL CH<sub>3</sub>COOH, 1.97 g CH<sub>3</sub>COONa, 200 mL CH<sub>3</sub>CN, son hacim saf su ile 1 L ye tamamlanmıştır) ve Solvent B (Asetonitril) gradient akış eşliğinde 1:1 oranında kullanılmıştır. Mobil faz akış hızı 1 mL/dk olarak, cihaza enjekte edilen örnek miktarı ise 1 µL olacak

şekilde ayarlanmıştır. GABA'nın tespiti FLD (Fluorescence Detector) detektörde (Shimadzu RF-20A, Japonya) 295 nm ve 500 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Analiz için İnertsil ODS-3 C18 (250 x 4.6 mm 5 µm, Japonya) kolonu kullanılmış olup kolon sıcaklığı 25°C'ye sabitlenmiştir. Kültür süpernatantlarındaki GABA seviyeleri, belirtilen HPLC şartlarında ticari bir GABA standardı (Sigma-Aldrich, Almanya) kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi kullanılarak belirlenmiştir.

## SONUÇ VE TARTIŞMA

### Turşu Örneklerinin Bazı Kimyasal Analiz Sonuçları

Toplanan farklı sebze ve meyve turşularının pH, organik asit ve şeker içeriği belirlenmiş olup elde edilen sonuçları Çizelge 2'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlardaki değişkenliğin turşuların olgunluk düzeyindeki farklılıklardan ve farklı meyve ve sebze içeriklerinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 2. Turşu örneklerinin pH, organik asit ve şeker içeriği  
Table 2. pH, organic acid and sugar content of pickle samples

No	Turşu çeşidi <i>Pickle variety</i>	pH	Organik Asit (mg/kg) <i>Organic Acid</i>		Şeker (mg/mL) <i>Sugar</i>	
			Laktik asit <i>Lactic acid</i>	Asetik asit <i>Acetic acid</i>	Glukoz <i>Glucose</i>	Fruktoz <i>Fructose</i>
1	Salamura fasulye yaprağı <i>Pickled bean leaves</i>	4.79	10452.292	3257.550	3.156	2.745
2	Fasulye turşusu <i>Bean pickle</i>	3.00	10132.573	2202.325	-	-
3	Fasulye turşusu <i>Bean pickle</i>	2.99	10344.677	2747.856	-	-
4	Pazı turşusu <i>Chard pickle</i>	3.12	5474.276	2027.272	-	-
5	Lahana turşusu <i>Sauerkraut</i>	3.07	8675.182	3076.300	-	-
6	Fasulye turşusu <i>Bean pickle</i>	3.29	8171.024	2242.348	-	-
7	Karnabahar turşusu <i>Cauliflower pickle</i>	6.67	7044.100	1923.009	-	-
8	Kırmızı pancar turşusu <i>Pickled red beetroot</i>	3.76	1655.532	923.802	11.774	12.383
9	Brokoli turşusu <i>Broccoli pickle</i>	3.07	11230.529	5528.345	2.911	1.613
10	Yabani armut turşusu <i>Pickled wild pear</i>	3.50	2404.117	2187.815	14.457	45.946
11	Dereotlu karışık turşu <i>Mixed dill pickle</i>	2.97	8915.247	6207.088	-	-
12	Biber turşusu <i>Pickled peppers</i>	3.45	5478.982	12404.042	-	-
13	Fasulye turşusu <i>Bean pickle</i>	3.22	9920.611	529.838	-	-
14	Salatalık turşusu <i>Pickled cucumber</i>	3.13	720.622	1266.921	-	-
15	Lahana turşusu <i>Sauerkraut</i>	3.74	4891.030	3343.721	-	-
16	Karaşık turşu <i>Mixed pickle</i>	3.19	312.525	1312.101	-	-
17	Alç sirkesi <i>Hawthorn vinegar</i>	3.06	2217.125	9365.789	-	-

-: Tespit edilmedi



Çizelge 2'den de görüleceği üzere farklı bitkisel materyallerden üretilmiş geleneksel turşuların pH'ları ağırlıklı olarak pH 3 civarında bulurken, karnabahar ve salamura yaprağı turşusunun pH'ları sırasıyla 6.67 ve 4.79 olarak kaydedilmiştir. Turşu örneklerinin pH değerleri kullanılan sebzenin türü, spontan gelişen mikroflora, fermentasyon süresi gibi faktörlere bağlı olarak değişmekle birlikte elde ettiğimiz sonuçlar literatür verileri ile uyum göstermektedir (Aljahani, 2020; Çetin, 2011; Karasu, 2006; Tokatlı vd., 2019). Benzer olarak turşu örneklerinin laktik asit ve asetik asit içerikleri de oldukça değişken bir profil şeklinde meydana gelmiştir. Turşu fermentasyon süreci hem homofermantatif hem de heterofermantatif LAB suşları tarafından yönlendirildiği için farklı oranlarda laktik asit ve asetik asit oranlarının bulunması beklenen bir sonuçtur. Bununla birlikte laktik ve asetik asit bulunma oranı açısından örnekler arasında gözlenen geniş yelpaze, fermentasyonu yürüten mikrofloranın biyokimyasal niteliklerinin bir yansıması olarak görülebilir (Moon vd., 2018). Önemli olarak bazı turşu örneklerinde bulunan laktik asit ve asetik asit miktarları daha önce yapılan bir çalışmada seçilmiş kültürler ile üretilen turşu örneklerinin 6. ayında bulunan laktik asit ve asetik asit oranlarına benzer değerlerde kaydedilmiştir (Tokatlı vd., 2019). Bununla birlikte spontan fermentasyondan kaynaklı düşük miktarlarda laktik-asetik asit üretimi, geleneksel turşu örneklerinde gözlenmiştir (Çizelge 2). Benzer sonuçlar Yuliana vd. (2013) tarafından yapılan çalışma sonucunda da elde edilmiş olup spontan fermentasyon ile üretilen turşu örneğinde toplam laktik asit miktarı LAB ilavesi ile üretilen turşu örneğine göre oldukça düşük bulunmuştur. LAB ilavesinin laktik ve çeşitli organik asitlerin yanı sıra diğer çeşitli metabolitlerin üretimi ile ham maddede hızlı bir asit birikimine neden olduğu ifade edilmiştir (Yuliana vd., 2013). Son olarak geleneksel turşu örneklerinde fermentasyon ortamında kalan glukoz ve fruktoz miktarı tespit edilmiş ve 17 örnekten sadece 4 adet turşu örneğinde glukoz ve fruktoz sırasıyla 2.91-14.45 ve 1.61-45.9 mg/mL oranlarında tespit edilmiştir ve yüksek fruktoz düzeyi armut meyvesi bazlı turşu örneğinde gözlenmiştir. Daha önce gerçekleştirilen bir

çalışmada ise starter ile üretilen turşu örneklerinde 6. ayın sonunda örneklerde kalan glukoz ve fruktoz miktarları sırasıyla 4.4-7.4 ve 0.2-2.1 mg/mL aralığında bulunmuştur (Tokatlı vd., 2019). Elde edilen bu sonuçlar literatür ile uyumluluk gösterse de test edilen parametrelerin turşu çeşidine bağlı olarak oldukça değişkenlik göstermesi turşu fermentasyonu sürecinin çok faktörlü oldukça dinamik bir süreç olduğunu göstermesi bakımından önem arz etmektedir.

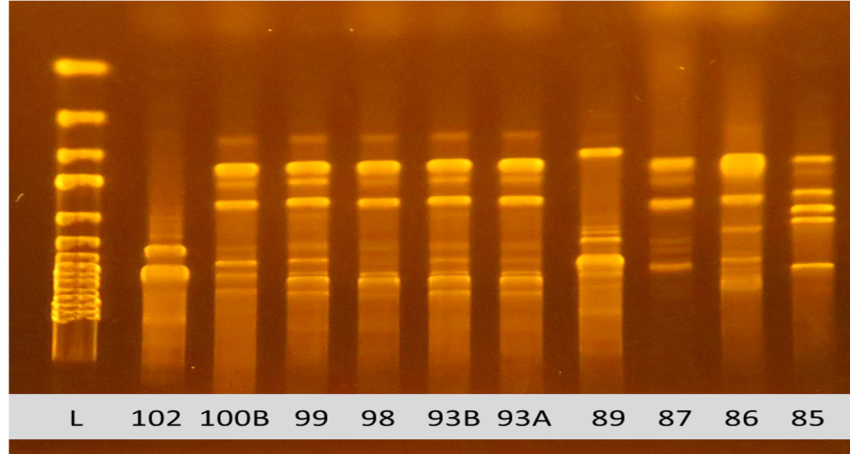
### **Turşu Örneklerinden İzole Edilen Kültürlerin rep-PCR Analizi ile Genotipik Karakterizasyonu**

Toplanan 17 adet turşu örneğinden MRS besiyerine ekim yapılarak toplamda farklı olabileceği düşünülen 47 koloni izole edilerek saflaştırılmış ve gliserol stoğa alınmıştır. Turşu örneklerinden izole edilen suşların genotipik ayrımının gerçekleştirilmesi amacıyla rep-PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Genotipik karakterizasyon metodu olarak seçilen bu işlemde GTG5 primeri kullanılmıştır (Dertli vd., 2016). Şekil 1 izolatların rep-PCR tiplendirmesine esas örnek agaroz jel görüntüsünü göstermektedir.

Şekil 1'den de görüleceği üzere turşu izolatlarının genotipik ayrımı GTG primeri kullanılarak rep-PCR işlemi ile başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve farklı olduğu düşünülen 21 suş bir sonraki basamak olan tanımlama işlemi için seçilmiştir.

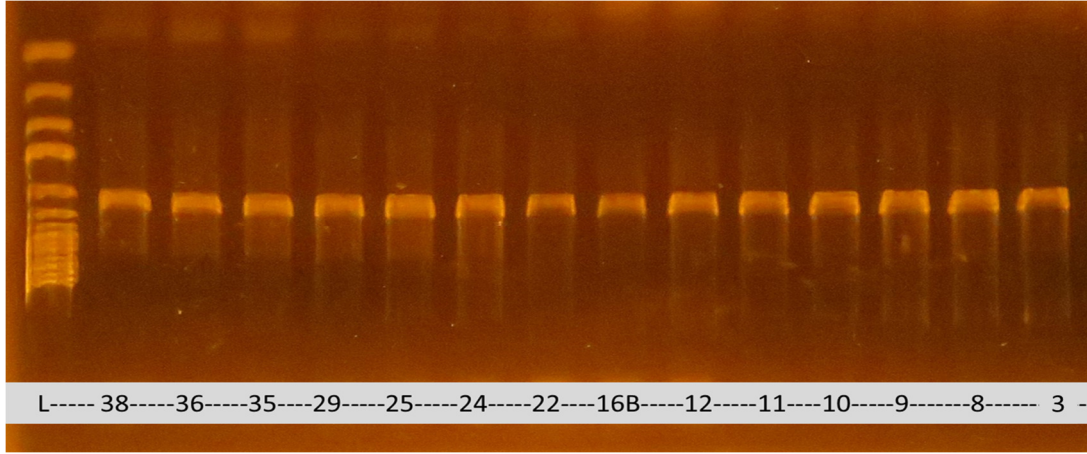
### **İzolatların 16S rRNA Genlerinin Tanımlanması**

rep-PCR sonucu farklı olduğu düşünülen seçilen 21 izolatda 16S rRNA geni ampilifiye edilmiş (Şekil 2) ve hizmet alımı ile sekans analizi gerçekleştirilmiştir. Sekans işleminin ardından sonuçlar BLAST (<http://goo.gl/lohXcq>) veya Ribosomal database project (<http://goo.gl/8OILPU>) veri banklarında mevcut türler ile karşılaştırılarak ilgili izolatların hangi türe ait olduğu belirlenmiştir. İzolatların 16S rRNA dizilerinin NCBI veritabanına yüklenmiş olup erişim numaraları Ek Dosya 1'de verilmiştir.



Şekil 1. Turşu izolatlarının GTG5 profillerini gösteren örnek bir agaroz (%1) jel görüntüsü:

Figure 1. An exemplary agarose (1%) gel image showing GTG5 profiles of pickle isolates: *Levilactobacillus brevis* (85), *Furfurilactobacillus rossiae* (89), *Lactiplantibacillus plantarum* (86, 87, 93A, 93B, 98, 99, 100B), *Pediococcus parvulus* (102)



Şekil 2. Turşu izolatlarının 16S profillerini gösteren agaroz (%1) jel görüntüsü

Figure 2. Agarose (1%) gel image showing 16S profiles of pickle isolates

Genotipik karakterizasyon ve takiben tanımlama işlemlerinin ardından toplanan turşu örneklerinde 9 farklı LAB türüne ait 21 suşun bulunduğu saptanmıştır. Çizelge 3’de tanımlanan suşlar ve bu suşların izole edildiği turşu örneklerini göstermektedir.

Şekil 3 turşu izolatlarının MEGAX hizalanmasını göstermektedir. Şekilden de görüleceği üzere *Lactiplantibacillus plantarum*, *Levilactobacillus brevis*, *Furfurilactobacillus rossiae*, *Pediococcus parvulus*, *Lactocaseibacillus paracasei*, *Lentilactobacillus buchneri*, *Lentilactobacillus diolivorans*, *Enterococcus faecium* ve

*Leuconostoc mesenteroides* suşları başarılı bir şekilde farklı grupları oluşturmuştur.

*Lactiplantibacillus plantarum* suşları farklı ortamlarda bulunsalar da genel olarak turşularda en fazla bulunan LAB türleri arasında bulunmaktadırlar (Mao vd., 2021). Benzer olarak *Levilactobacillus brevis* suşları da farklı turşu ortamlarında bulunan ve özellikle GABA üretimi açısından ön plana çıkan bir türdür (Jin vd., 2023). *Furfurilactobacillus rossiae*’de özellikle fermente meyve temelli ürünlerde bulunmakta olup (Di Cagno vd., 2013) çalışmamız kapsamında karışık turşudan izole edilmiştir. Öte yandan farklı turşu örneklerinden

izole edilen *Pediococcus parvulus*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lentilactobacillus buchneri*, *Lentilactobacillus diolivorans*, *Enterococcus faecium* türlerinin de farklı orijinli turşu örneklerinde bulunabildiği daha önceki çalışmalar kapsamında gösterilmiştir (Bağder vd., 2015; Di Biase vd., 2022; Jonganurakkun vd., 2008; Xiong vd., 2012). Önemli olarak *Leuconostoc mesenteroides* suşu bu çalışma kapsamında fermente bir meyve

turşusundan izole edilmiş olup daha önceki çalışmalarda da bu türün meyve turşularında önemli bir kültür olduğu gösterilmiştir (Chen vd., 2013). Sonuç olarak bu çalışma kapsamında oldukça fazla sayıda LAB türü geleneksel turşularımızdan izole edilmiş olup elde ettiğimiz sonuçlar geleneksel turşularımızda bulunan LAB çeşitliliğini göstermesi bakımından oldukça önem arz etmektedir.

Çizelge 3. İzolatlarının turşu örneklerindeki dağılımı

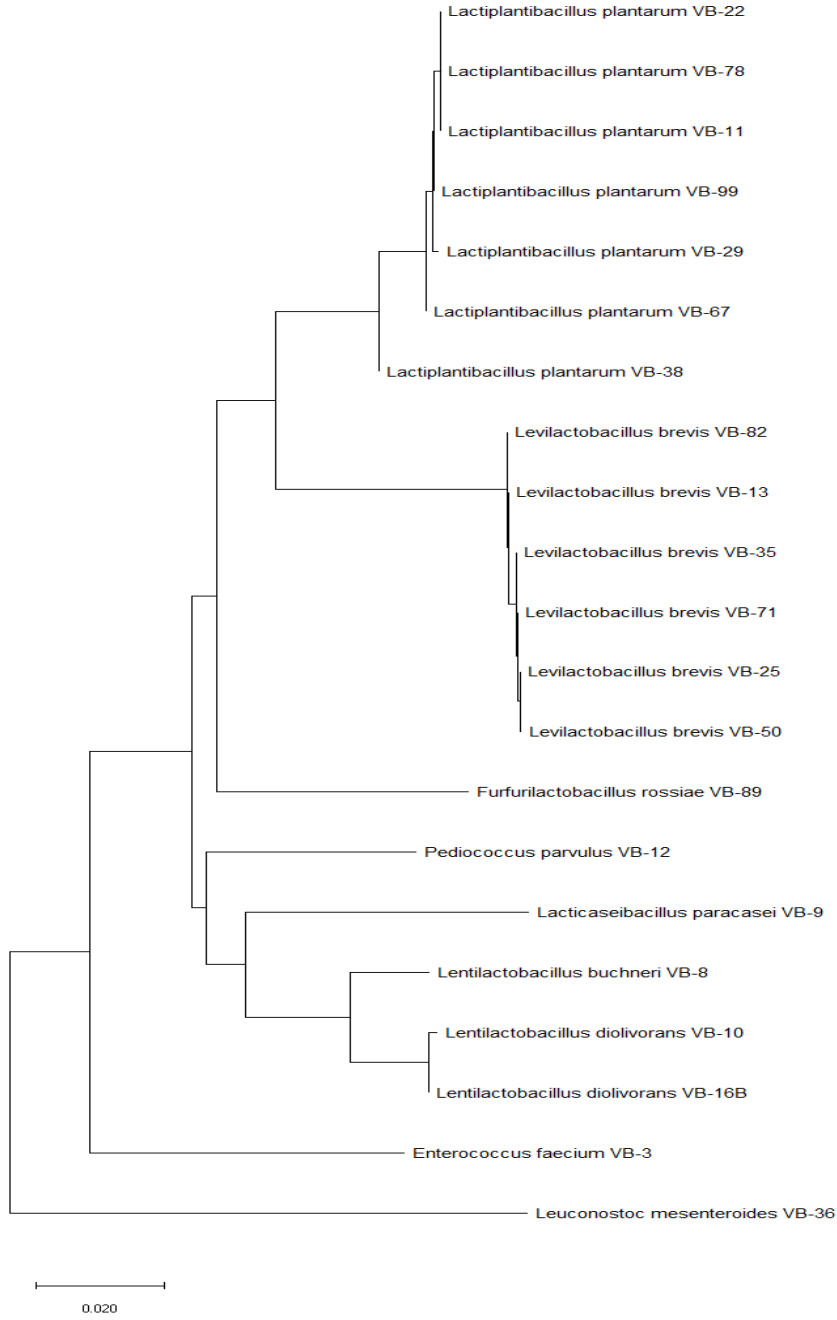
Table 3. Distribution of isolates in pickle samples

Tanımlama sonucu <i>Identification result</i>	İzole edildiği kaynak <i>Source isolated</i>
<i>Enterococcus faecium</i> VB3	Salamura fasulye yaprağı <i>Pickled bean leaves</i>
<i>Lentilactobacillus buchneri</i> VB8	Fasulye turşusu <i>Bean pickle</i>
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> VB9	Fasulye turşusu <i>Bean pickle</i>
<i>Lentilactobacillus diolivorans</i> VB10	Fasulye turşusu <i>Bean pickle</i>
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB11	Pazı turşusu <i>Chard pickle</i>
<i>Pediococcus parvulus</i> VB12	Pazı turşusu <i>Chard pickle</i>
<i>Levilactobacillus brevis</i> VB13	Pazı turşusu <i>Chard pickle</i>
<i>Lentilactobacillus diolivorans</i> VB16B	Lahana turşusu <i>Sauerkraut</i>
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB22	Fasulye turşusu <i>Bean pickle</i>
<i>Levilactobacillus brevis</i> VB25	Karnabahar turşusu <i>Cauliflower pickle</i>
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB29	Kırmızı pancar turşusu <i>Pickled red beetroot</i>
<i>Levilactobacillus brevis</i> VB35	Brokoli turşusu <i>Broccoli pickle</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> VB36	Yabani armut turşusu <i>Pickled wild pear</i>
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB38	Dereotlu karışık turşu <i>Mixed dill pickle</i>
<i>Levilactobacillus brevis</i> VB50	Biber turşusu <i>Pickled peppers</i>
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB67	Fasulye turşusu <i>Bean pickle</i>
<i>Levilactobacillus brevis</i> VB71	Fasulye turşusu <i>Bean pickle</i>
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB78	Salatalık turşusu <i>Pickled cucumber</i>
<i>Levilactobacillus brevis</i> VB82	Lahana turşusu <i>Sauerkraut</i>
<i>Furfurilactobacillus rossiae</i> VB89	Karışık turşu <i>Mixed pickle</i>
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB99	Alıç sirkesi <i>Hawthorn vinegar</i>

### Düşük pH ve Safra Tuzlarına Karşı Direncin Belirlenmesi

Tüketici beklentisi ve bilimsel çalışmalar çerçevesinde turşu izolatlarının fermentasyonu gerçekleştirmek yanında en önemli özelliklerinin başında probiyotik nitelikleri gelmektedir. Bu kapsamda izole ettiğimiz LAB suşlarının ön

probiyotik değerlendirmeleri safra tuzuna ve düşük pH'ya gösterdikleri direnç ölçülerek gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4'den de görüleceği üzere turşu izolatlarının safra tuzu ve düşük pH canlılıkları sırasıyla %13.01-65.18 ve %0.54-35.88 arasında gözlenmiş olup oldukça geniş bir aralık olacak şekilde ilgili özellikleri ölçülmüştür.



Şekil 3. Turşu izolatlarının filogenetik ilişkisini gösteren dendrogram.  
 Figure 3. Dendrogram showing the phylogenetic relationship of the pickle isolates.

Önceki çalışmalara da paralel olmak üzere (Çetin, 2011; Suzuki vd., 2014; Tokatlı vd., 2015; Wang vd., 2010) geleneksel turşu izolatlarımızdan ön probiyotik nitelikleri kapsamında öne çıkan suşlar *Lactiplantibacillus plantarum* (VB11-VB22) ve

*Levilactobacillus brevis* (VB13 – VB82) suşları olmuştur. Öne çıkan suşların safra tuzları ve düşük pH açısından canlılık değerleri önceki çalışmalar ile uyumluluk sergilemektedir (Tokatlı vd., 2015; Wang vd., 2010).

**LAB Türlerinin Hidrofobisite Nitelikleri**

Çalışma kapsamında tanımladığımız suşların potansiyel probiyotik niteliklerini açığa çıkarmak için hidrofobisite özellikleri test edilmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4'de verilmiştir. Çizelgeden de görüleceği üzere turşu izolatlarının % hidrofobisite değerleri % 4.22- % 92.89 değerleri arasında ölçülmüştür. Canlılık açısından ön plana çıkan suşlardan özellikle *Levilactobacillus brevis* (VB13–VB82) suşlarının hidrofobisite değerleri oldukça yüksek bulunurken,

*Lactiplantibacillus plantarum* (VB11–VB22) suşlarının tutunma yüzdeleri de %50'nin üzerinde ölçülmüştür. Bununla birlikte tutunma açısından bu suşlara kıyasla daha yüksek çıkan izolatlar da mevcuttur. Genel olarak elde ettiğimiz hidrofobisite değerleri literatür ile uyumlu olup (Tokatlı vd., 2015) canlılık değerleri açısından öne çıkan suşların aynı zamanda yüksek hidrofobisite değerlerine sahip olması probiyotik potansiyellerini göstermesi bakımından önem arz etmektedir.

Çizelge 4. Turşu izolatlarının safra asitleri ve düşük pH'da canlılık, hidrofobisite (Adezyon %) oranları ve GABA üretim yetenekleri

Table 4. Bile acids and low pH viability, hydrophobicity (Adhesion %) rates and GABA production capabilities of pickle isolates

	Safra tuzu (% Canlılık) <i>Bile salt</i> (% <i>Vitality</i> )	pH 4 (% Canlılık) (% <i>Vitality</i> )	Adezyon (%) <i>Adhesion (%)</i>	GABA (mg/mL)
<i>Ent. faecium</i> VB3	64.40±0.00	1.57±0.74	4.22±0.57	TE*
<i>Lentilactobacillus buchneri</i> VB8	13.01±5.75	23.58±5.75	66.73±9.80	0.398 ± 0.09
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> VB9	14.42±0.92	4.21±1.15	42.06±3.29	TE
<i>Lentilactobacillus diolivorans</i> VB10	13.22±0.26	5.43±3.07	93.80±0.28	TE
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB11	56.70±7.29	31.53±2.06	53.89±2.15	TE
<i>Pediococcus parvulus</i> VB12	13.64±6.43	3.98±0.80	6.02±0.06	TE
<i>Levilactobacillus brevis</i> VB13	65.18±1.82	25.62±1.82	82.24±0.42	0.628 ± 0.11
<i>Lentilactobacillus diolivorans</i> VB16B	25.96±10.53	4.29±0.32	92.89±0.15	TE
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB22	63.88±0.76	25.78±8.72	54.74±2.37	TE
<i>Levilactobacillus brevis</i> VB25	45.16±4.22	11.32±0.87	30.19±0.14	0.408 ± 0.08
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB29	32.37±3.50	37.81±5.31	13.05±2.11	TE
<i>Levilactobacillus brevis</i> VB35	19.04±2.33	9.60±0.42	92.42±0.09	TE
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> VB36	20.64±12.51	0.54±0.00	3.86±5.47	TE
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB38	34.23±4.49	3.42±0.08	38.50±0.57	0.081 ± 0.02
<i>Levilactobacillus brevis</i> VB50	45.43±8.48	20.33±0.29	76.54±0.86	0.492 ± 0.09
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB67	58.05±1.81	15.02±0.09	37.19±2.35	TE
<i>Levilactobacillus brevis</i> VB71	31.75±3.95	13.55±0.72	58.50±2.60	0.489 ± 0.1
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB78	50.00±0.47	1.55±0.31	41.49±2.97	TE
<i>Levilactobacillus brevis</i> VB82	62.55±7.20	35.88±1.71	71.05±6.92	0.454 ± 0.08
<i>Furfurilactobacillus rossiae</i> VB89	14.96±0.52	1.48±0.52	70.79±3.73	TE
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB99	39.06±3.13	30.42±1.15	69.86±0.56	0.096 ± 0.01

TE\*: Tespit edilmedi

**LAB Türlerinin Antibiyotik Hassasiyetleri**

Antibiyotik dirençlilik sorunu uluslararası ölçekte önemli bir sorun olup özellikle probiyotik ve starter olarak kullanılacak suşların antibiyotik dirençlilik ile ilgili sorun oluşturmaması ve özellikle transfer edilebilir antibiyotik direnç genlerini taşıyıp taşımadığı gerekmektedir (Mathur ve Singh, 2005; Zarzecka vd., 2023). Çizelge 5 geleneksel turşu izolatlarımızın oksitetrasiklin, kloramfenikol, streptomisin, penisilin, kanamisin, eritromisin, tetrasiklin ve ampisilin antibiyotiklerine olan hassasiyet testinin sonuçlarını göstermektedir. Çizelge 5’den de görüleceği üzere izolatlar kanamisin ve streptomisin hariç yüksek hassasiyet göstermiştir ve bazı antibiyotiklere karşı suş seviyesinde farklı hassasiyet sonuçları elde edilmiştir. Örneğin *Furfurilactobacillus rossiae* VB89 ve *Lentilactobacillus*

*diolivorans* VB16B oksitetrasikline, *Lentilactobacillus buchneri* VB8, *Lentilactobacillus diolivorans* VB10, *Lentilactobacillus diolivorans* VB16B ve *Lactiplantibacillus plantarum* VB78 tetrasikline karşı direnç göstermişlerdir. Daha önce yapılan çalışmalarda geleneksel gıdalardan izole edilen farklı LAB suşlarının farklı antibiyotik duyarlılıklarının olduğu ifade edilmiştir (Encu vd., 2022; Kaya vd., 2022; Wang vd., 2010). Önemli olarak önceki çalışmalarda da LAB suşlarının kanamisin ve streptomisine karşı oldukça dirençli oldukları not edilmekle birlikte (Dušková vd., 2021; Kaya vd., 2022) bu direncin daha içsel faktörlere bağlı olarak (membran geçirimsizliği) oluşabileceği öne sürülmüştür (Štěpetova vd., 2017). Sonuç olarak geleneksel turşu izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları genel itibarıyla istenen nitelikte gözlenmiştir.

Çizelge 5. Turşu izolatlarının farklı antibiyotiklere karşı hassasiyetleri

Table 5. Susceptibility of pickle isolates to different antibiotics

Suş Strain	İnhibisyon zonu (cm) Inhibition zone (cm)							
	T30	C30	S10	K30	TE30	P10	AM10	E15
VB3	3.0±0.20	2.8±0.01	-	-	2.6±0.20	2.8±0.10	3.4±0.01	3.0±0.02
VB8	1.1±0.10	3.8±0.10	-	-	-	3.4±0.10	3.0±0.01	3.4±0.10
VB9	3.0±0.10	3.0±0.30	-	-	3.1±0.01	3.3±0.01	3.0±0.03	3.2±0.10
VB10	1.2±0.30	3.9±0.20	1.6±0.02	-	-	2.5±0.20	3.8±0.10	4.0±0.05
VB11	1.5±0.01	2.9±0.05	-	-	1.8±0.10	2.5±0.03	3.4±0.01	2.5±0.20
VB12	1.3±0.05	3.2±0.04	-	-	1.8±0.05	3.5±0.01	3.6±0.20	2.4±0.30
VB13	1.6±0.2	2.8±0.30	-	-	1.4±0.07	1.8±0.10	3.2±0.20	2.5±0.04
VB16B	-	2.9±0.01	1.0±0.10	-	-	2.4±0.01	2.7±0.01	3.2±0.02
VB22	1.6±0.01	2.6±0.04	-	-	2.1±0.01	2.3±0.10	2.7±0.10	2.2±0.10
VB25	2.0±0.30	2.9±0.05	1.0±0.10	-	1.5±0.20	1.7±0.03	2.8±0.01	2.5±0.01
VB29	1.3±0.02	2.5±0.10	-	-	2.0±0.04	2.5±0.20	3.4±0.01	2.5±0.20
VB35	1.8±0.10	3.0±0.01	-	-	1.8±0.01	2.5±0.02	3.6±0.30	2.5±0.05
VB36	2.4±0.02	3.4±0.2	1.4±0.1	1.0±0.01	2.3±0.10	3.2±0.01	2.8±0.02	2.8±0.20
VB38	1.6±0.10	2.9±0.20	-	-	1.6±0.30	2.6±0.03	3.7±0.10	2.6±0.20
VB50	2.2±0.04	3.3±0.05	1.1±0.04	-	2.1±0.02	2.7±0.01	3.3±0.20	2.6±0.20
VB67	2.0±0.20	3.4±0.10	-	-	1.7±0.05	3.8±0.10	4.0±0.01	3.4±0.07
VB71	1.6±0.20	3.3±0.30	-	-	1.6±0.01	2.3±0.04	3.2±0.20	2.8±0.30
VB78A	1.8±0.01	2.7±0.01	-	-	-	2.2±0.20	3.2±0.10	2.6±0.04
VB82	1.2±0.04	3.2±0.20	-	-	1.2±0.01	1.7±0.20	3.0±0.05	2.3±0.30
VB89	-	3.5±0.01	-	-	2.7±0.10	2.8±0.01	3.6±0.30	2.5±0.01
VB99	1.8±0.01	2.8±0.10	-	-	1.7±0.20	2.3±0.02	3.6±0.01	2.5±0.01

Uygulamada kullanılan antibiyotikler; T: Oxytetracycline (30 µg), C: Chloramphenicol (30 µg), S: Streptomycin (10 µg), K: Kanamycin (30 µg), TE: Tetracycline (30 µg), P: Penicillin G (10 Units), AM: Ampicillin (10 µg), E: Erythromycin (15 µg), —: İnhibisyon zonu yok. Veriler ortalama ± standart sapmadır (n = 3).

Antibiotics used in practice; T: Oxytetracycline (30 µg), C: Chloramphenicol (30 µg), S: Streptomycin (10 µg), K: Kanamycin (30 µg), TE: Tetracycline (30 µg), P: Penicillin G (10 Units), AM: Ampicillin (10 µg), E: Erythromycin (15 µg), —: No inhibition zone. Data are mean ± standard deviation (n = 3).

**İzolatların Antifungal Aktiviteleri**

Son dönemde starter olarak kullanılabilen LAB türlerinden hem probiyotik özellikler gibi fonksiyonel hem de antifungal-antibakteriyel aktivite gibi ilave teknolojik özellikler sergilemesi beklenmektedir (Demirbaş vd., 2017). Bu kapsamda turşu izolatlarının gıda sanayiinde sorun oluşturan üç önemli küf türüne karşı antifungal aktiviteleri karakterize edilmiştir. Çizelge 6'dan da görüleceği üzere genel itibarıyla turşu izolatları test edilen küflere karşı güçlü antifungal aktivite sergilemiştir. Bununla birlikte test edilen 21 suştan 7 tanesi *A. niger*'e, 2 tanesi *P. chrysogenum*'a ve son olarak 1 tanesi *A. alternata*'ya karşı herhangi bir antifungal aktivite sergilememiştir. Özellikle ön probiyotik aktivite bakımından öne çıkan *Lactiplantibacillus plantarum* (VB11–VB22) suşları

antifungal aktivite açısından da önemli bir aktivite sergilemişlerdir. Daha önce fermente ürünlerden izole edilen farklı LAB türlerinin de önemli antifungal aktivite gösterdikleri farklı çalışmalar ile gösterilmiştir (Chen vd., 2021; Demirbaş vd., 2017; Sathe vd., 2007). Bizim çalışmamızla uyumlu olarak yeni yapılan bir çalışmada fermente zeytinden izole edilen *Lactiplantibacillus plantarum* ve *Levilactobacillus brevis* suşlarının güçlü antifungal aktivite sergiledikleri gösterilmiştir (Abouloifa vd., 2020). Sonuç olarak bitkisel temelli LAB izolatlarının bu kadar yüksek antifungal aktivite sergilemesi bu izolatların sonraki çalışmalarda starter ve biyokoruyucu kültür olarak kullanım potansiyelinin oldukça yüksek olduğunu ortaya koymaktadır.

Çizelge 6. Turşu izolatlarının farklı küflere karşı antifungal aktivitelerinin değerlendirilmesi  
Table 6. Evaluation of antifungal activities of pickle isolates against different molds

	<i>A. niger</i>	<i>P. chrysogenum</i>	<i>A. alternata</i>
<i>Enterococcus faecium</i> VB3	-*	++++	++++
<i>Lentilactobacillus buchneri</i> VB8	++++	++++	-
<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> VB9	+++	++++	++++
<i>Lentilactobacillus diolivorans</i> VB10	+	++++	++++
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB11	+++	++++	++++
<i>Pediococcus parvulus</i> VB12	-	-	+++
<i>Levilactobacillus brevis</i> VB13	+	+++	++++
<i>Lentilactobacillus diolivorans</i> VB16B	-	++	++++
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB22	+++	++++	++++
<i>Levilactobacillus brevis</i> VB25	++++	++++	++++
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB29	+++	++++	++++
<i>Levilactobacillus brevis</i> VB35	-	++	+++
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> VB36	-	+	++
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB38	-	++++	++++
<i>Levilactobacillus brevis</i> VB50	-	-	+++
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB67	++++	++++	++++
<i>Levilactobacillus brevis</i> VB71	++++	++++	++++
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB78	+++	++++	++++
<i>Levilactobacillus brevis</i> VB82	++	++++	++++
<i>Furfurilactobacillus rossiae</i> VB89	+++	++++	++++
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VB99	++++	++++	++++

\*- inhibisyon yok, + petri alanının %0.1~3'ünde fungal gelişim yok, ++ petri alanının %3~8'inde fungal gelişim yok, +++ petri alanının %8~12'sinde fungal gelişim yok ve ++++ petri alanının >%12'sinde fungal gelişim yok.

\*- no inhibition, + no fungal growth in 0.1~3% of petri area, ++ no fungal growth in 3~8% of petri area, +++ no fungal growth in 8~12% of petri area, and ++++ no fungal growth in >12% of the petri area.

### İzolatların Antibakteriyel Aktiviteleri

Probiyotik ve teknolojik nitelik açısından LAB türlerinin bir diğer fonksiyonu da antibakteriyel aktiviteleridir (İspirli ve Dertli, 2021). Bu kapsamda turşu izolatlarının antibakteriyel aktiviteleri *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Salmonella typhimurium* RSSK 95091 suşlarına karşı test edilmiştir. Yapılan test sonucuna göre turşu izolatlarının tamamı test edilen patojenik bakterilere karşı çok güçlü antibakteriyel aktivite göstermiş ve patojen bakteriler test sırasında petri kutusunda herhangi bir gelişim gösterememişlerdir. Daha önceki yapılan çalışmalarda da bazı LAB türlerinin antimikrobiyal uygulamalarında petri kutusunda herhangi bir gelişimin gözlenmediği rapor edilmiştir (İspirli ve Dertli, 2021). LAB türleri ile yapılan antibakteriyel etkinlik testleri bu etkinin daha çok suş spesifik sebeplerden kaynaklandığını ve bu etki gerisinde ilgili suşların bakteriyosin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, organik asitler ve postbiyotik olarak son zamanlarda gündeme gelen toplam diğer metabolitler sebebiyle ortaya çıktığını göstermektedir (Encu vd., 2022; İspirli ve Dertli, 2021; Kaya vd., 2022; Todorov vd., 1999). Örneğin ilginç olarak *Lactiplantibacillus plantarum* tarafından üretilen ekstraselüler veziküllerin antibakteriyel etkinliği olduğu, yine *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus faecium*, *Lentilactobacillus buchneri*, *Lactocaseibacillus paracasei*, *Lentilactobacillus diolivorans*, *Levilactobacillus brevis* ve *Furfurilactobacillus rossiae* 'nin bakteriyosin gibi bileşenler üreterek antibakteriyel kapasite sergiledikleri önceki çalışmalarda ortaya konmuştur (Amini vd., 2022; Demirbaş vd., 2017; Hassanzadazar vd., 2014; Lee vd., 2021; Nasiri Moslem vd., 2022; Purutoğlu vd., 2020; Schurr vd., 2015; Yildirim ve Yildirim, 2001). Sonuç olarak turşu izolatlarının oldukça yüksek antibakteriyel aktivite göstermesi bu suşların sonraki süreçlerde değerlendirilebilme imkanlarını göstermesi bakımından oldukça önemli bir husustur.

### LAB Suşlarının GABA Üretim Seviyeleri

Son dönemde geleneksel LAB izolatlarının teknolojik ve fonksiyonel nitelikleri kapsamında üzerinde en fazla durulan konuların başında

GABA üretimi gelmektedir (Demirbaş vd., 2017). Çizelge 4 turşu izolatlarının GABA üretim miktarlarını göstermektedir. Test edilen 21 izolattan 13'ü GABA üretim kabiliyeti göstermezken diğer 8 izolat ise  $0.081 \pm 0.02$  -  $0.628 \pm 0.11$  mg/mL düzeyinde GABA üretimi göstermiştir. GABA üretimi gösteren 8 suşun 5 tanesi *Levilactobacillus brevis* suşu olup en yüksek GABA üretim kapasitesi yine bir *Levilactobacillus brevis* suşunda gözlenmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuç literatür ile de uyumlu olup LAB suşları arasında en fazla ve yüksek oranda GABA üretimi görülen türlerin başında *Levilactobacillus brevis* gelmektedir (Demirbaş vd., 2017; Villegas vd., 2016; Wu ve Shah, 2017). Öte yandan çalışmamızda en yüksek GABA üretiminin ön probiyotik değerlendirmede de öne çıkan *Levilactobacillus brevis* VB13 suşunda gözlenmesi ayrıca önem arz eden bir husustur. İlerleyen çalışmalarda bu suştan GABA üretim veriminin yükseltilmesine dönük optimizasyon süreçlerine geçilecektir. Çalışmamızda GABA üretimi gözlenen diğer türler olan *Lentilactobacillus buchneri* ve *Lactiplantibacillus plantarum*'un farklı suşlarının GABA üretim kabiliyetinde oldukları daha önceki çalışmalar ile ortaya konmuştur (Cho vd., 2007; Nakatani vd., 2022). Sonuç olarak turşu izolatlarımızın bazıları zihinsel fonksiyonlar için önemli bir bileşen olan GABA üretim kabiliyeti sergilemişler ve ön probiyotik testlerde öne çıkan *Levilactobacillus brevis* VB13 suşu en yüksek GABA üretimini gerçekleştirmiştir. Geleneksel ürünlerimizde GABA gibi biyoaktif bileşenleri üretebilen LAB suşlarının bulunması bu ürünlerin sağlık yararı noktasında etkinliklerinin daha iyi irdelenmesine imkân verebilecektir.

### SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada geleneksel turşu örneklerimizden genotipik ayırım sonucunda 9 farklı türe ait olduğu saptanan toplam 21 adet LAB suşu izole edilerek tanımlanmıştır. Bu 21 suşun potansiyel probiyotik değerlendirmeleri safra tuzlarına direnç, düşük pH'da canlılık ve hidrofobisite testleri ile gerçekleştirilmiş olup *Levilactobacillus brevis* (VB13–VB82) ve *Lactiplantibacillus plantarum* (VB11–VB22) suşları probiyotik potansiyelleri açısından ön plana çıkmıştır. Önemli olarak turşu izolatlarının antibiyotik dirençleri LAB suşlarının



iç faktörlerine bağlı olarak direnç gösterebildikleri kanamisin ve streptomisine karşı gözlenmiş olup geleneksel izolatlarımızın antibiyotik duyarlılıkları sonraki süreçlerde kullanım potansiyellerini göstermektedir. Turşu izolatlarını ön plana çıkartan bir diğer nitelikleri de yüksek antifungal ve antibakteriyel aktiviteleri olmuş olup bu suşların biyokoruyucu olarak kullanım potansiyeli oldukça yüksektir. Son olarak turşu izolatlarının GABA üretim potansiyelleri açığa çıkarılmış ve potansiyel probiyotik kabiliyet gösteren *Levilactobacillus brevis* VB13 suşunun oldukça yüksek miktarda GABA üretimi sergilediği gösterilmiştir. Sonuç olarak geleneksel turşu örneklerimizin yüksek LAB çeşitliliği göstermesi ve bu suşlardan bazılarının ürünlere probiyotik nitelik gibi fonksiyonellik katabilecek özelliklere sahip olması bu ürünlerden beklenen fonksiyonel etkinin sebeplerinin anlaşılabilmesi adına önemli çıktılardır. Bu suşların probiyotik etkinliklerini konu alan ve endüstride özellikle biyokoruyucu starter olarak kullanımları noktasındaki çalışmaların önümüzdeki dönemde hızlanacağı düşünülmektedir.

#### ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarların, başka kişiler ve/veya kurumlar ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

#### YAZARLARIN KATKISI

Çalışmanın planlaması ve sonuçların değerlendirme kısımları iki yazar tarafından planlanmıştır. Hümeysra İspirli laboratuvar çalışmalarını yürütmüş ve makalenin orijinal taslağını oluşturmuştur. Makalenin yazım süreci ise Hümeysra İspirli ve Enes Dertli tarafından gerçekleştirilmiştir.

#### TEŞEKKÜR

Bu çalışma Bayburt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinatörlüğü (BAP) tarafından 2021/69001-01-01 nolu proje ile desteklenmiştir.

#### KAYNAKLAR

Abouloifa, H., Rokni, Y., Bellaouchi, R., Ghabbour, N., Karboune, S., Brasca, M., Salah, R. B., Chihib, N. E., Saalaoui, E., Asehrou, A. (2020). Characterization of Probiotic Properties of Antifungal *Lactobacillus* Strains Isolated from

Traditional Fermenting Green Olives. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(2): 683-696, doi:10.1007/s12602-019-09543-8.

Aljahani, A. H. (2020). Microbiological and physicochemical quality of vegetable pickles. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 19(6): 415-421, doi:https://doi.org/10.1016/j.jssas.2020.07.001.

Amini, E., Salimi, F., Imanparast, S., Mansour, F. N. (2022). Isolation and characterization of exopolysaccharide derived from *Lactocaseibacillus paracasei* AS20 (1) with probiotic potential and evaluation of its antibacterial activity. *Letters in Applied Microbiology*, 75(4): 967-981, doi.org/10.1111/lam.13771.

Bağder Elmacı, S., Tokatlı, M., Dursun, D., Özçelik, F., Şanlıbaba, P. (2015). Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from traditional pickles of the Çubuk region in Turkey. *Folia Microbiologica*, 60(3): 241-251, doi:10.1007/s12223-014-0363-x.

Behera, S. S., El Sheikha, A. F., Hammami, R., Kumar, A. (2020). Traditionally fermented pickles: How the microbial diversity associated with their nutritional and health benefits? *Journal of Functional Foods*, 70, 103971, https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103971.

Bhunja, A.K. (2018). Molds and Mycotoxins. In: *Foodborne Microbial Pathogens*, Springer, New York, NY, pp. 167-174.

Chakraborty, P., Dey, A., Gopalakrishnan, A. V., Swati, K., Ojha, S., Prakash, A., Kumar, D., Ambasta, R. K., Jha, S. K., Dewanjee, S. (2023). Glutamatergic Neurotransmission: A Potential Pharmacotherapeutic Target for the Treatment of Cognitive Disorders. *Ageing Research Reviews*, 101838, https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101838.

Chen, O., Hong, Y., Ma, J., Deng, L., Yi, L., Zeng, K. (2021). Screening lactic acid bacteria from pickle and cured meat as biocontrol agents of *Penicillium digitatum* on citrus fruit. *Biological Control*, 158, 104606, https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104606.

- Chen, Y.-s., Wu, H.-c., Pan, S.-f., Lin, B.-g., Lin, Y.-h., Tung, W.-c., Li, Y.-l., Chiang, C.-m., Yanagida, F. (2013). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from yantaozih (pickled peaches) in Taiwan. *Annals of Microbiology*, 63(2): 607-614, DOI 10.1007/s13213-012-0510-z.
- Cho, Y.-R., Chang, J.-Y., Chang, H.-C. (2007). Production of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from Kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(1): 104-109.
- Coda, R., Rizzello, C. G., Gobbetti, M. (2010). Use of sourdough fermentation and pseudo-cereals and leguminous flours for the making of a functional bread enriched of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA). *International journal of food microbiology*, 137(2-3): 236-245, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.010>
- Çetin, B. (2011). Production of probiotic mixed pickles (Tursu) and microbiological properties. *African Journal of Biotechnology*, 10(66): 14926-14931, DOI: 10.5897/AJB11.2621.
- Demirbaş, F., İspirli, H., Kurnaz, A. A., Yılmaz, M. T., Dertli, E. (2017). Antimicrobial and functional properties of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs. *LWT-Food Science and Technology*, 79: 361-366, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.067>.
- Dertli, E., Mercan, E., Arıcı, M., Yılmaz, M. T., Sağdıç, O. (2016). Characterisation of lactic acid bacteria from Turkish sourdough and determination of their exopolysaccharide (EPS) production characteristics. *LWT - Food Science and Technology*, 71:116-124, [doi:doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.030](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.030).
- Di Biase, M., Le Marc, Y., Bavaro, A. R., De Bellis, P., Lonigro, S. L., Lavermicocca, P., Postollec, F., Valerio, F. (2022). A predictive growth model for pro-technological and probiotic *Lactocaseibacillus paracasei* strains fermenting white cabbage. *Frontiers in Microbiology*, 13, doi: 10.3389/fmicb.2022.907393.
- Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*, 33(1): 1-10, [doi:https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.003](https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.003).
- Dušková, M., Morávková, M., Mrázek, J., Florianová, M., Vorlová, L., Karpíšková, R. (2021). Assessment of antibiotic resistance in starter and non-starter lactobacilli of food origin. *Acta Veterinaria Brno*, 89(4): 401-411, <https://doi.org/10.2754/avb202089040401>.
- Encü, Ş. B., Soykut, E. A., Çakır, İ. (2022). geleneksel yoğurtlardan izole edilen laktik asit bakterilerinin MALDI TOF MS biotyper sistemi ile tanımlanması ve bazı starter kültür özelliklerinin belirlenmesi. *Gıda*, 47(6): 1059-1082, doi: 10.15237/gida.GD22088.
- Erten, H., Boyacı-Gündüz, C. P., Ağırman, B., Cabaroğlu, T. (2016). Fermentation, pickling and Turkish table olives. *Handbook of vegetable preservation and processing*, 209-230.
- Hassanzadazar, H., Ehsani, A., Mardani, K. (2014). Antibacterial activity of *Enterococcus faecium* derived from Koopeh cheese against *Listeria monocytogenes* in probiotic ultra-filtrated cheese. *Veterinary research forum: an international quarterly journal*, 5 (3):169 – 175.
- Huang, J., Mei, L. H., Wu, H., Lin, D. Q. (2007). Biosynthesis of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) using immobilized whole cells of *Lactobacillus brevis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 865-871, DOI 10.1007/s11274-006-9311-5.
- Huang, Y., Luo, Y., Zhai, Z., Zhang, H., Yang, C., Tian, H., Li, Z., Feng, J., Liu, H., Hao, Y. (2009). Characterization and application of an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* 05-10 isolated from Sichuan Pickle, a traditionally fermented vegetable product from China. *Food Control*, 20(11): 1030-1035. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.12.008>
- Hwanhlem, N., Buradaleng, S., Wattanachant, S., Benjakul, S., Tani, A., Maneerat, S. (2011). Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (*Plasom*) and production of *Plasom* from selected strains. *Food Control*, 22(3-4): 401-407, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.010>.

- Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M., Sansawa, H. (2003). Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *European journal of clinical nutrition*, 57(3): 490-495.
- İspirli, H., Dertli, E. (2021). Detection of fructophilic lactic acid bacteria (FLAB) in bee bread and bee pollen samples and determination of their functional roles. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(5), e15414, <https://doi.org/10.1111/jfpp.15414>.
- İspirli, H., Demirbaş, F., Dertli, E. (2015). Characterization of functional properties of *Enterococcus faecium* strains isolated from human gut. *Canadian journal of microbiology*, 61(11): 861-870, <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0446>.
- Jin, Y., Wu, J., Hu, D., Li, J., Zhu, W., Yuan, L., Chen, X., Yao, J. (2023). Gamma-Aminobutyric Acid-Producing *Levilactobacillus brevis* Strains as Probiotics in Litchi Juice Fermentation. *Foods*, 12(2):302, <https://doi.org/10.3390/foods12020302>.
- Jonganurakkun, B., Wang, Q., Xu, S. H., Tada, Y., Minamida, K., Yasokawa, D., Sugi, M., Hara, H., Asano, K. (2008). *Pediococcus pentosaceus* NB-17 for probiotic use. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(1): 69-73, <https://doi.org/10.1263/jbb.106.69>.
- Karasu, N. (2006). Turşu ve zeytinden antagonistik ve probiyotik özellikte laktik starter kültür eldesi. Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Denizli, Türkiye, 78 s.
- Kaya, Y., Erten, T., Vurmaz, M., İspirli, H., Şimşek, Ö., Dertli, E. (2022). Comparison of the probiotic characteristics of Lactic Acid Bacteria (LAB) isolated from sourdough and infant feces. *Food Bioscience*, 47, 101722, [doi:https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101722](https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101722).
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6): 1547–1549, [doi: 10.1093/molbev/msy096](https://doi.org/10.1093/molbev/msy096).
- Lee, B.-H., Wu, S.-C., Shen, T.-L., Hsu, Y.-Y., Chen, C.-H., Hsu, W.-H. (2021). The applications of *Lactobacillus plantarum*-derived extracellular vesicles as a novel natural antibacterial agent for improving quality and safety in tuna fish. *Food Chemistry*, 340, 128104, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128104>.
- Liu, C., Xue, W.-j., Ding, H., An, C., Ma, S.-j., Liu, Y. (2022). Probiotic Potential of Lactobacillus Strains Isolated From Fermented Vegetables in Shaanxi, China. *Frontiers in Microbiology*, 12, 4168, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.774903>.
- Magnusson, J., Schnürer, J. (2001). *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied and environmental microbiology*, 67(1):1-5, <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.1-5.2001>.
- Mao, B., Yin, R., Li, X., Cui, S., Zhang, H., Zhao, J., Chen, W. (2021). Comparative genomic analysis of *Lactiplantibacillus plantarum* isolated from different niches. *Genes*, 12(2): 241, <https://doi.org/10.3390/genes12020241>.
- Mathur, S., Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International journal of food microbiology*, 105(3): 281-295, [doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008).
- Miura, D., Ito, Y., Mizukuchi, A., Kise, M., Aoto, H., Yagasaki, K. (2006). Hypocholesterolemic action of pre-germinated brown rice in hepatoma-bearing rats. *Life sciences*, 79(3): 259-264, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.01.001>.
- Monteagudo-Mera, A., Rastall, R. A., Gibson, G. R., Charalampopoulos, D., Chatzifragkou, A. (2019). Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 6463-6472, <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09978-7>.
- Moon, S. H., Kim, C. R., Chang, H. C. (2018). Heterofermentative lactic acid bacteria as a starter culture to control kimchi fermentation. *LWT*, 88, 181-188, [doi:https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.009](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.009).

- Nakatani, Y., Fukaya, T., Kishino, S., Ogawa, J. (2022). Production of GABA-enriched tomato juice by *Lactiplantibacillus plantarum* KB1253. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 134(5): 424-431, <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2022.08.008>.
- Nasiri Moslem, M., Faezi Ghasemi, M., Amirmozafari, N., Ranji, N. (2022). Antimicrobial activity of *Pediococcus acidilactici* PTCC 1954 and *Leuconostoc mesenteroides* PTCC 1953 isolated from organic meat sausages. *Biological Journal of Microorganism*, doi.10.22108/bjm.2022.134313.1473.
- Park, K. B., Oh, S. H. (2007). Production of yogurt with enhanced levels of gamma-aminobutyric acid and valuable nutrients using lactic acid bacteria and germinated soybean extract. *Bioresource technology*, 98(8): 1675-1679, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.06.006>.
- Plokhov, A. Y., Gusyatiner, M. M., Yampolskaya, T. A., Kaluzhsky, V. E., Sukhareva, B. S., Schulga, A. A. (2000). Preparation of  $\gamma$ -aminobutyric acid using *E. coli* cells with high activity of glutamate decarboxylase. *Applied biochemistry and biotechnology*, 88, 257-265.
- Purutoğlu, K., İspirli, H., Yüzer, M. O., Serencam, H., Dertli, E. (2020). Diversity and functional characteristics of lactic acid bacteria from traditional kefir grains. *International Journal of Dairy Technology*, 73(1): 57-66, <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12633>.
- Sagdic, O., Ozturk, I., Yapar, N., Yetim, H. (2014). Diversity and probiotic potentials of lactic acid bacteria isolated from gilaburu, a traditional Turkish fermented European cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) fruit drink. *Food Research International*, 64, 537-545, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.045>.
- Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4): 406-425, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.
- Sathe, S., Nawani, N., Dhakephalkar, P., Kapadnis, B. (2007). Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6): 2622-2628, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03525.x>.
- Schurr, B. C., Hahne, H., Kuster, B., Behr, J., Vogel, R. F. (2015). Molecular mechanisms behind the antimicrobial activity of hop iso- $\alpha$ -acids in *Lactobacillus brevis*. *Food Microbiology*, 46, 553-563, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.09.017>.
- Štšepetova, J., Taelma, H., Smidt, I., Hütt, P., Lapp, E., Aotäht, E., Mändar, R. (2017). Assessment of phenotypic and genotypic antibiotic susceptibility of vaginal *Lactobacillus* sp. *Journal of Applied Microbiology*, 123(2): 524-534, doi:<https://doi.org/10.1111/jam.13497>.
- Suzuki, S., Kimoto-Nira, H., Suganuma, H., Suzuki, C., Saito, T., Yajima, N. (2014). Cellular fatty acid composition and exopolysaccharide contribute to bile tolerance in *Lactobacillus brevis* strains isolated from fermented Japanese pickles. *Canadian journal of microbiology*, 60(4): 183-191, <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0043>.
- Tamura, K., Nei, M., Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(30): 11030-11035, <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>.
- Todorov, S., Onno, B., Sorokine, O., Chobert, J., Ivanova, I., Dousset, X. (1999). Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough. *International journal of food microbiology*, 48(3): 167-177, [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00048-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00048-3).
- Tokatlı, M. (2013). Ankara çubuk yöresi turşularından izole edilen laktik asit bakterilerinin tanımlanmaları, teknolojik ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi ve starter olarak kullanılma olanaklarının değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Ankara, Türkiye, 183 s.
- Tokatlı, M., Elmacı, S. B., İşleyen, N. A., Özçelik, F. (2019). Seçilmiş endojen laktik starter kültürler ile turşu üretimi. *Gıda*, 44(4): 742-757, <https://doi.org/10.15237/gida.GD19081>.

- Tokatlı, M., Gülgör, G., Bağder Elmacı, S., Arslankoz İşleyen, N., Özçelik, F. (2015). In vitro properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles. *BioMed Research International*, *7*(1), 1-1, <https://doi.org/10.1155/2015/315819>.
- Villegas, J. M., Brown, L., de Giori, G. S., Hebert, E. M. (2016). Optimization of batch culture conditions for GABA production by *Lactobacillus brevis* CRL 1942, isolated from quinoa sourdough. *LWT-Food Science and Technology*, *67*, 22-26, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.027>.
- Wang, C.-Y., Lin, P.-R., Ng, C.-C., Shyu, Y.-T. (2010). Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe*, *16*(6): 578-585, <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.10.003>.
- Wu, Q., Shah, N. P. (2017). High  $\gamma$ -aminobutyric acid production from lactic acid bacteria: emphasis on *Lactobacillus brevis* as a functional dairy starter. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(17): 3661-3672. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1147418>.
- Xiong, T., Guan, Q., Song, S., Hao, M., Xie, M. (2012). Dynamic changes of lactic acid bacteria flora during Chinese sauerkraut fermentation. *Food control*, *26*(1): 178-181, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.027>.
- Yildirim, Z., Yildirim, M. (2001). Characterization of buchnericin LB produced by *Lactobacillus buchneri* LB. *Turkish Journal of Biology*, *25*(1): 73-82.
- Yuliana, N., Nurdjanah, S., Margareta, M. (2013). The Effect of a mixed-starter culture of lactic acid bacteria on the characteristics of pickled orange-fleshed sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Microbiology Indonesia*, *7*(1), 1-1, <https://doi.org/10.5454/mi.7.1.1>.
- Zarzecka, U., Zadernowska, A., Chajęcka-Wierzchowska, W., Adamski, P. (2023). High-pressure processing effect on conjugal antibiotic resistance genes transfer in vitro and in the food matrix among strains from starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*, *110104*, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110104>.
- Zeng, Y., Li, Y., Wu, Q., Zhang, J., Xie, X., Ding, Y., Cai, S. Z., Ye, Q. H., Chen, M. T., Xue, L., Wu, S., Zeng, H. Y., Yang, X. J., Wang J. (2020). Evaluation of the antibacterial activity and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* isolated from Chinese homemade pickles. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, *2020*, 1-11, <https://doi.org/10.1155/2020/8818989>.
- Zielińska, D., Rzepkowska, A., Radawska, A., Zieliński, K. (2015). In vitro screening of selected probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from traditional fermented cabbage and cucumber. *Current microbiology*, *70*, 183-194, DOI [10.1007/s00284-014-0699-0](https://doi.org/10.1007/s00284-014-0699-0).

## **ÇİLEKLE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ MANDA YOĞURDUNUN KALİTE KARAKTERİSTİKLERİ İLE YAĞ ASİDİ KOMPOZİSYONU, ACE İNHİBİTÖR AKTİVİTE VE HMF İÇERİĞİ BAKIMINDAN İNCELENMESİ**

**Murat Emre TERZİOĞLU<sup>\*1</sup>, Ayla ARSLANER<sup>2</sup>, İhsan BAKIRCI<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Erzurum, Türkiye

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

Geliş/ Received 20.10.2022; Kabul/ Accepted: 26.02.2023; Online baskı/ Published online: 08.03.2023

Terzioğlu, M. E., Arslaner, A., Bakırcı, İ. (2023). Çilekle zenginleştirilmiş manda yoğurdunun kalite karakteristikleri ile yağ asidi kompozisyonu, ACE inhibitör aktivite ve HMF içeriği bakımından incelenmesi. GIDA (2023) 48 (2) 381-393 doi: 10.15237/ gida.GD22101

*Terzioğlu, M. E., Arslaner, A., Bakırcı, İ. (2023). Investigation of strawberry-enriched buffalo yoghurt in terms of quality characteristics and fatty acid composition, ACE inhibitor activity and HMF content. GIDA (2023) 48 (2) 381-393 doi: 10.15237/ gida.GD22101*

### **ÖZ**

Mevcut araştırmada ABT-2 probiyotik kültür kullanılarak üretilen manda yoğurtlarına farklı oranlarda (%5, %7.5, %10) çilek püresinin yanı sıra %7.5 oranında şeker ilave edilmiş ve yağ asidi kompozisyonu, ACE inhibitör aktivite ve HMF içeriği açısından incelenmiştir. Ayrıca yoğurt örneklerinde meyve ilavesi ve depolama periyodunun fizikokimyasal, mikrobiyolojik ve duyu analizler üzerine etkisi araştırılmıştır. Manda yoğurduna çilek püresi ilavesinin minör seviyede bulunan çoklu doymamış yağ asitleri hariç tüm yağ asitleri, ACE inhibitör aktivite, HMF içeriği, fizikokimyasal, mikrobiyolojik ve duyu analizler üzerine çok önemli ( $P < 0.01$ ) etkisinin olduğu belirlenmiştir. Meyve ilavesiyle toplam doymuş yağ asitleri ve ACE inhibitör aktivite seviyesinin azaldığı belirlenirken HMF içeriği, toplam tekli doymamış yağ asitleri ve toplam çoklu doymamış yağ asitleri seviyesinde artış saptanmıştır. Bu araştırma sonucunda manda yoğurdunun fonksiyonel gıda olarak tüketimi tavsiye edilebilmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Manda yoğurdu, ABT-2 probiyotik kültür, çilek, yağ asidi kompozisyonu, ACE inhibitör aktivite, HMF

## **INVESTIGATION OF STRAWBERRY-ENRICHED BUFFALO YOGHURT IN TERMS OF QUALITY CHARACTERISTICS AND FATTY ACID COMPOSITION, ACE INHIBITOR ACTIVITY AND HMF CONTENT**

### **ABSTRACT**

In the present study, different ratios (5%, 7.5%, 10%) of strawberry puree added to buffalo yoghurt produced using ABT-2 probiotic culture were investigated in terms of fatty acid composition, ACE inhibitor activity and HMF content. In addition, the effects of fruit addition and storage period on physicochemical, microbiological, and sensory analyses of yoghurt samples were investigated. It was determined that the addition of strawberry puree to buffalo yoghurt had a very significant ( $P < 0.01$ ) effect on all fatty acids, ACE inhibitor activity, HMF content, physicochemical, microbiological and

\*Yazışmalardan sorumlu yazar/Corresponding author

✉: murat.terzioglu@atauni.edu.tr

☎: (+90) 442 231 2485

☎: +90 (442) 231 5878

Murat Emre Terzioğlu; ORCID no: 0000-0001-6370-0694

Ayla Arslaner; ORCID no: 0000-0002-2777-9697

İhsan Bakırcı; ORCID no: 0000-0002-3744-3863

sensory analyses except for the minor polyunsaturated fatty acids. While it was determined that total saturated fatty acids and ACE inhibitor activity levels decreased with the addition of fruit, an increase was found in HMF content, total monounsaturated fatty acids and total polyunsaturated fatty acids. As a result of this research, consumption of buffalo yoghurt as a functional food can be recommended.

**Keywords:** Buffalo yoghurt, ABT-2 probiotic culture, strawberry, fatty acid composition, ACE inhibitor activity, HMF

## GİRİŞ

Son yıllarda dünya genelinde tüketim oranı gittikçe artan yoğurt; belirli sıcaklık ve süre normlarında ısıl işleme tabi tutulan süte yaklaşık %2-3 (w/v) oranında yoğurt starter kültürünün inoküle edilip pH 4.6 oluncaya dek inkübasyonda tutulması sonucu üretilen fermente bir süt ürünüdür. Yoğurt üretiminde hammadde olarak sıklıkla inek sütü tercih edilmesine rağmen, yüksek kurumadde ve eşsiz bileşime sahip manda sütü yoğurt üretimine daha uygun bir süt olarak ön plana çıkmaktadır (Nguyen vd., 2014; Vianna vd., 2019; Gupta vd., 2022). Manda sütü dünya çapında süt üretiminin %15'ini temsil etmekte olup, son yıllarda üretimi bakımından inek sütünden daha fazla büyüme oranı kaydetmiştir. Manda sütü, nihai ürüne olumlu katkılarının yanı sıra inek sütü protein alerjisi olan bireylerde inek sütüne potansiyel bir alternatif kaynak olarak sunulmaktadır. Bu sebeple manda sütü, büyük bir küresel pazar olan süt endüstrisine önemli katkılar sağlamaktadır (Vargas-Ramella vd., 2021). Manda yoğurdunun yağ asidi kompozisyonunda bulunan bütirik, kaprilik, kaprik ve laurik asit gibi kısa ve orta zincirli yağ asitlerinin antikanserojen ve antimikrobiyal etkilerine ilaveten çeşitli hastalıklara karşı koruyucu etkiye sahip olduğu bildirilmektedir. Öte yandan laurik, miristik, stearik ve palmitik asit gibi doymuş yağ asitleri miktarının plazmadaki toplam kolesterol seviyesinin artmasıyla ilişkili olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte oleik asit açısından oldukça zengin bir kaynak olan manda sütü ve yoğurdu plazma kolesterolü, LDL-kolesterolü ve trigliserit seviyesini azaltarak sağlık açısından çeşitli faydalar sağlamaktadır (Ivanova vd., 2011; Ivanova vd., 2021).

Biyoaktif bileşikler olan yağ asitlerine ilaveten fermentasyon, enzimatik hidroliz ya da gastrointestinal sistem yoluyla oluşan biyoaktif peptitler açısından da manda sütü ve yoğurdu

oldukça zengin kaynaklar olup, fonksiyonel gıda veya nutrasötik olarak nitelendirilmektedir (Durak ve Atlıhan Turan, 2020; Estévez vd., 2022). Kardiyovasküler hastalıkların başlıca risk faktörlerinden olan hipertansiyon tedavisinde kullanılan ilaçların yan etkilerinden kaçınmak için doğal kaynakların arayışı hız kazanmıştır. Bu bağlamda antihipertansif aktivite özellikteki biyoaktif peptitlere sahip olan manda sütü ve yoğurdu, anjiyotensin-dönüştürücü enzim (ACE) inhibitör aktivite sağlamakta ve sentetik ACE inhibitörlerine doğal ve sağlıklı ikame kaynaklar olarak gösterilmektedir (Durak ve Atlıhan Turan, 2020). Öte yandan yoğurdun mevcut fonksiyonel özelliklerinin geliştirilmesinde probiyotik mikroorganizmaların ve prebiyotik özelliğe sahip meyvelerin ilavesi kullanılan bir diğer yöntemdir. Günümüzde tüketicilerin bilinçlenmesi ve gıda taleplerinin değişmesiyle birlikte özellikle kolesterol emilimini engelleme ve antiinflamatuvar aktiviteye sahip probiyotik ürünlerin tüketimi daha da ön plana çıkmaktadır. Probiyotik mikroorganizmaların sağlık üzerindeki potansiyel etkilerinden faydalanmak için düzenli tüketimine ilaveten üründe yeterli seviyede ( $10^6$ - $10^8$  kob/mL) canlı probiyotik mikroorganizmanın bulunması önem arz etmektedir (Terzioğlu vd., 2022). Manda sütünün peyniraltı suyu proteinleri ve koloidal kalsiyum açısından zengin bir kaynak olması probiyotik bakterilerin etkisini arttırmaktadır (Da Silva vd., 2020; Ivanova vd., 2021).

Süt ve ürünlerinin sağladığı pek çok faydaya rağmen güvenilir ve raf ömrü uzun bir ürün elde etmek için uygulanan ısıl işlem ve depolama neticesinde 5-hidroksimetilfurfural (HMF) gibi toksik bileşiklerin oluştuğu belirlenmiştir. Maillard reaksiyonunun ileri aşamalarında meydana gelen ve şekerlerin termal bozunma ürünü olan HMF, furfurallar grubuna ait bir bileşiktir. HMF'nin yapılan çalışmalar neticesinde sitotoksik,

genotoksik ve tümöral özellikte olduğu ortaya konmuştur. Bu nedenle, belirli düzeylerin üzerinde sağlık açısından risk teşkil eden HMF'nin süt ve süt ürünlerinde oluşumunun incelenmesinin gıda güvenliği ve ürün kalitesi açısından önemli olduğu değerlendirilmektedir (Van den Oever ve Mayer, 2021; Li vd., 2022). Mevcut çalışmada manda sütünden ABT-2 probiyotik kültür kullanılarak üretilen yoğurtlar farklı oranlarda çilek püresi ile zenginleştirilmiş olup yağ asidi kompozisyonu, ACE inhibitör aktivite ve HMF içeriği açısından incelenmiştir. Buna ilaveten üretilen manda yoğurtlarında meyve ilavesi ve depolama periyodunun fizikokimyasal (toplam kurumadde, yağ, protein, kül, viskozite, titrasyon asitliği ve pH), mikrobiyolojik (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 ve *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 + *L. acidophilus* LA-5) ve duyu analizler üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

### MATERYAL VE METOT

#### Materyal

Yoğurt üretiminde hammadde olarak kullanılan çiğ manda sütü Erzurum (Türkiye) iline ait yerel çiftliklerden, ABT-2 probiyotik kültür CHR Hansen (Süt-Sa, Sakarya/Türkiye) firmasından, çilek ve şeker ise Erzurum (Türkiye) piyasasında faaliyet gösteren yerel marketlerden temin edilmiştir.

#### Yöntem

##### Çilek püresinin hazırlanması

Deneme yoğurt örneklerine ilave edilmek üzere temin edilen çilekler yıkanıp temizlendikten sonra üzerine %7.5 oranında şeker ilave edilerek karıştırılmıştır. Karışım mutfak tipi blender vasıtasıyla homojenize (Cookplus, E64 HBS) edilerek püre haline getirilmiştir. Ardından  $90\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 10 dk ısıtma tabii tutulmuş ve sonrasında oda sıcaklığına soğutulmuştur.

##### Deneme yoğurt üretimi

Deneme yoğurt üretimi Şekil 1'de verilen akış şeması kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Terzioğlu vd., 2022). Yoğurt üretimi tamamlandıktan sonra çilek püresi farklı oranlarda (%5, %7.5 ve %10) yoğurt örneklerine ilave edilmiştir.

#### Fizikokimyasal analizler

Kurt vd. (2015) tarafından ortaya konan metotlar aracılığıyla çiğ manda sütü ve deneme manda yoğurdu örneklerinde toplam kurumadde, yağ, protein, kül, titrasyon asitliği ve pH değerleri belirlenmiş olup, deneme manda yoğurdu örneklerinde bu analizlere ilaveten Bakırcı ve Kavaz (2008) tarafından ortaya konan metoda göre viskozite analizi yapılmıştır.

#### Yağ asidi kompozisyonu analizi

Deneme manda yoğurdu örneklerinin yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesinde gaz kromatografisi (Shimadzu, GC-QP2010), Restek RTX-2330 kapiler kolon (60 m x 0.25 mm x 0.1 µm) ve alev iyonizasyon detektörü (FID) kullanılmıştır (Satchithanandam vd., 2001).

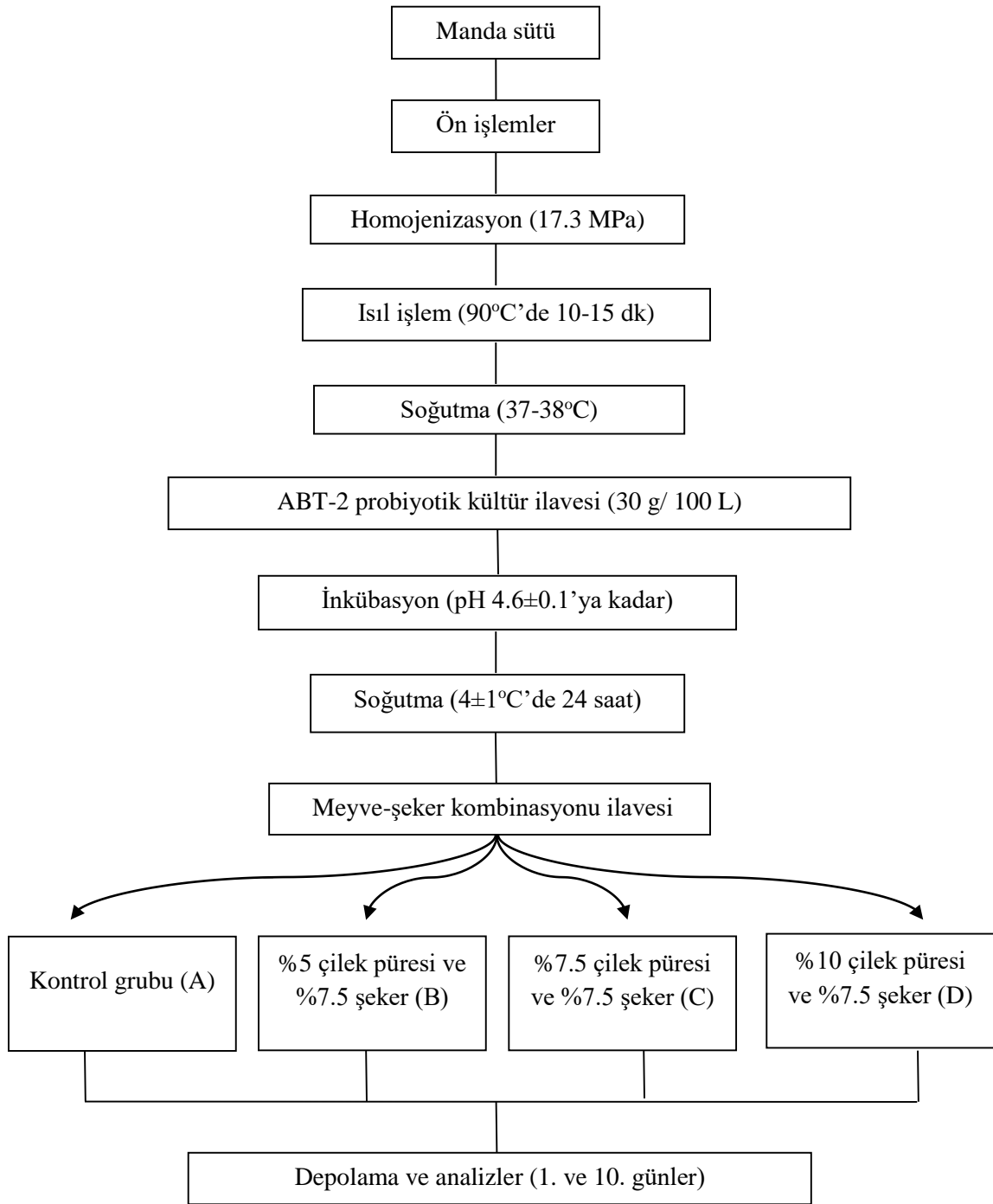
#### ACE inhibitör aktivitenin belirlenmesi

Deneme manda yoğurdu örneklerinin ACE inhibitör aktivitesinin belirlenmesi amacıyla 50 µL yoğurt numunesi üzerine 180 µL hippuril-L-histidil-L-lösin (HHL) çözeltisi ve 20 µL ACE çözeltisi ilave edilmiş ve karışım  $37^\circ\text{C}$ 'de 90 dk inkübasyona bırakılmıştır. Ardından karışıma 250 µL 1 M HCl çözeltisi ilave edilerek inkübasyon sonlandırılmıştır. Karışıma 1.7 mL etil asetat ilave edildikten sonra  $100^\circ\text{C}$ 'de 15 dk evaporasyon işlemi uygulanmıştır. Oluşan hippurik asit çözeltisine 1 mL distile su ilave edilmiş ve UV-spektrofotometrede (Optizen POP) 228 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır (Cushman ve Cheung, 1971; Nakamura vd., 1995).

#### HMF içeriğinin belirlenmesi

Deneme manda yoğurdu örneklerinin HMF içeriği Urgan vd. (2017) tarafından ortaya konulan metotta bazı modifikasyonlar yapılarak tespit edilmiştir. HMF içeriğinin belirlenmesinde, 5 mL yoğurt örneği üzerine 5 mL oksalik asit eklenmiş ve karıştırılmıştır. Sonrasında 1 saat su banyosunda bekletilmiş ve bu işlemi takiben oda sıcaklığına soğutulmuştur. Elde edilen karışım filtre edildikten sonra 4 mL süzüntü alınıp üzerine 1 mL 0.05 M tiyobarbitürik asit çözeltisi eklenmiş ve tekrar su banyosunda bekletilmiştir. Sonrasında spektrofotometrede (Optizen POP) 443 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır.





şekil 1. Deneme probiyotik manda yoğurdu üretimi akış şeması  
Figure 1. The flow chart of the experimental probiotic buffalo yogurt production

#### Mikrobiyolojik analizler

Deneme manda yoğurdu örneklerinde yapılan mikrobiyolojik analizlere ait bilgiler izelge 1'de verilmiştir. *S. thermophilus*, *B. animalis* subsp. *lactis*

BB-12, *L. acidophilus* LA-5 ve *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 + *L. acidophilus* LA-5 sayımı, Terzioğlu vd. (2022) tarafından ortaya konan metoda göre gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 1. Mikroorganizmalar, agar ve inkübasyon şartları  
Table 1. Microorganisms, agar and incubation conditions

Mikroorganizmalar / <i>Microorganisms</i>	Agar / <i>Agar</i>	İnkübasyon Şartları / <i>Incubation Conditions</i>
<i>S. thermophilus</i>	M17 Agar (Oxoid Ltd.)	42°C, 24 saat
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12	MRS Agar (Oxoid Ltd.) + 0.5 g/L sistein (L-Cysteine, Sigma-Aldrich)	37°C, 48 saat
<i>L. acidophilus</i> LA-5	MRS Agar (Oxoid Ltd.) + 1.5 g/L bile (Bile salts, Sigma-Aldrich)	37°C, 48 saat
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12 + <i>L. acidophilus</i> LA-5	MRS Agar (Oxoid Ltd.)	37°C, 48 saat

### Duyusal analizler

Deneme yoğurt örneklerinin duysal analizleri (kıvam, tat, koku, görünüş ve genel kabul edilebilirlik) yaş aralığı 25-30 arasında değişen, 4 kadın ve 4 erkekten oluşan alanında deneyimli 8 laboratuvar personeli panelist tarafından puanlama testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Duyusal analiz parametreleri panelistler tarafından 1-5 puan arasında değerlendirilmiş olup, değerlendirmede 1 puan çok kötü ve 5 puan çok iyi olarak ifade edilmiştir (Bodyfelt vd., 1988).

### İstatistiki analizler

Tam Şansa Bağlı Bloklar Deneme Planına göre yürütülen mevcut çalışmada sade probiyotik manda yoğurdunun yanı sıra %5, %7.5 ve %10 oranında çilek püresi ile %7.5 oranında şeker ilave edilen toplam 4 farklı deneme probiyotik manda yoğurdu örnekleri üretilmiş olup depolamanın 1. ve 10. günlerinde 2 tekerrür olacak şekilde istatistiksel analizler SPSS 20 paket programı ile Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yorumlanmıştır.

### BULGULAR VE TARTIŞMA

#### Çiğ manda sütüne ait fizikokimyasal analiz sonuçları

Mevcut çalışmada hammadde olarak kullanılan çiğ manda sütüne ait fizikokimyasal analiz sonuçları Çizelge 2'de verilmiştir. Manda sütünün toplam kurumadde, yağ, protein, kül, titrasyon asitliği ve pH değerlerinin literatürle uyum içerisinde olduğu tespit edilmiştir (Metin, 2014; Abesinghe vd., 2020; Boukria vd., 2020).

#### Deneme yoğurt örneklerinin fizikokimyasal analiz sonuçları

Kontrol grubu ile farklı oranlarda çilek püresi ilave edilen probiyotik manda yoğurtlarına ait fizikokimyasal analiz sonuçları Çizelge 2'de verilmiştir.

Deneme yoğurt örneklerine meyve ilavesinin tüm fizikokimyasal analizler üzerinde istatistiksel olarak çok önemli ( $P < 0.01$ ) etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Manda yoğurduna farklı oranlarda çilek püresi ilavesi kontrol grubuna kıyasla toplam kurumadde, kül, viskozite ve titrasyon asitliği değerlerinde artışa sebep olurken yağ, protein ve pH değerlerinde azalmaya yol açmıştır. Tami vd. (2022) çeşitli meyveler gibi polifenoller açısından zengin kaynakların yoğurt üretiminde kullanımının daha üstün fizikokimyasal özelliklerle sonuçlanmasını, proteinlerle oluşturulan kompleksler ve toplam kurumadde miktarının artışından kaynaklanabileceğini rapor etmişlerdir.

Deneme yoğurt örneklerinde depolama periyodunun ise viskozite, titrasyon asitliği ve pH değerleri üzerine istatistiksel olarak çok önemli ( $P < 0.01$ ) etkiye sahip olduğu saptanırken, diğer fizikokimyasal analizler üzerine istatistiksel olarak önemli bir etkisinin olmadığı ( $P > 0.05$ ) belirlenmiştir. Deneme yoğurt örneklerinde beklenildiği gibi depolama periyodunun ilerlemesiyle viskozite ve pH değerlerinde azalma tespit edilirken, titrasyon asitliği değerlerinde artış belirlenmiştir. Nitekim yoğurda meyve ilavesiyle fizikokimyasal analizler üzerine benzer etkilerin

gözlendiği çalışmalar literatürde yer almaktadır (Abdel-Hamid vd., 2020; Hameed vd., 2020; Hamdy vd., 2021).

Çizelge 2. Çiğ manda sütü ile deneme probiyotik manda yoğurtlarının fizikokimyasal analiz sonuçları  
Table 2. Physicochemical analysis results of raw buffalo milk and experimental probiotic buffalo yoghurts

		Toplam Kurumadde (%) / Total Solids (%)	Yağ (%) / Fat (%)	Protein (%) / Protein (%)	Kül (%) / Ash (%)	Viskozite (cP) / Viscosity (cP)	Titrasyon Asitliği (%LA) / Titratable Acidity (LA%)	pH
Çiğ Manda Sütü/ Raw Buffalo Milk		16.48±0.10	7.24±0.02	4.14±0.04	0.76±0.01	-	0.21±0.00	6.66±0.01
Deneme Manda Yoğurtları / Experimental Buffalo Yoghurts								
A	17.66±0.10 <sup>d</sup>	7.51±0.05 <sup>a</sup>	4.76±0.05 <sup>a</sup>	0.82±0.02 <sup>d</sup>	8217.25±189.69 <sup>d</sup>	0.96±0.08 <sup>d</sup>	4.34±0.07 <sup>a</sup>	
B	19.52±0.25 <sup>c</sup>	6.75±0.05 <sup>b</sup>	4.50±0.04 <sup>b</sup>	0.90±0.01 <sup>c</sup>	9468.75±265.04 <sup>c</sup>	1.12±0.04 <sup>c</sup>	4.18±0.07 <sup>b</sup>	
C	22.26±0.06 <sup>b</sup>	6.41±0.05 <sup>c</sup>	4.31±0.03 <sup>c</sup>	0.95±0.02 <sup>b</sup>	10393.75±184.01 <sup>b</sup>	1.17±0.04 <sup>b</sup>	4.11±0.07 <sup>c</sup>	
D	23.24±0.21 <sup>a</sup>	6.19±0.04 <sup>d</sup>	4.11±0.06 <sup>d</sup>	1.03±0.03 <sup>a</sup>	118930.75±517.54 <sup>a</sup>	1.21±0.05 <sup>a</sup>	4.03±0.09 <sup>d</sup>	
	**	**	**	**	**	**	**	
Depolama (Gün) / Storage Period (Day)								
1.	20.68±2.43 <sup>a</sup>	6.72±0.54 <sup>a</sup>	4.42±0.29 <sup>a</sup>	0.93±0.09 <sup>a</sup>	10236.25±1549.67 <sup>a</sup>	1.07±0.11 <sup>b</sup>	4.23±0.12 <sup>a</sup>	
10.	20.66±2.30 <sup>a</sup>	6.71±0.53 <sup>a</sup>	4.41±0.23 <sup>a</sup>	0.92±0.08 <sup>a</sup>	9769.00±1358.21 <sup>b</sup>	1.16±0.09 <sup>a</sup>	4.10±0.13 <sup>b</sup>	
	ns	ns	ns	ns	**	**	**	

a-d: sütunlar arasındaki farklılıkları gösterir.

\*\**P* < 0.01; ns: *P* > 0.05; LA: Laktik asit

A: Kontrol manda yoğurdu; B: %5 çilek püresi + %7.5 şeker; C: %7.5 çilek püresi + %7.5 şeker; D: %10 çilek püresi + %7.5 şeker

a-d: Different letters indicate significant differences in column.

\*\**P* < 0.01; ns: *P* > 0.05; LA: lactic acid

A: control buffalo yoghurt; B: %5 strawberry puree + %7.5 sugar; C: %7.5 strawberry puree + %7.5 sugar; D: %10 strawberry puree + %7.5 sugar

### Deneme yoğurt örneklerinin yağ asidi kompozisyonu

Kontrol grubu ile farklı oranlarda çilek püresi ilave edilen probiyotik manda yoğurtlarına ait yağ asidi kompozisyonu sonuçları Çizelge 3'te verilmiştir.

Deneme yoğurt örneklerine meyve ilavesinin miristik asit, palmitik asit, stearik asit, diğer doymuş yağ asitleri, toplam doymuş yağ asitleri, oleik asit, diğer tekli doymamış yağ asitleri, toplam tekli doymamış yağ asitleri, linoleik asit ve toplam çoklu doymamış yağ asitleri üzerinde istatistiksel olarak çok önemli (*P* < 0.01) etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Manda yoğurdunda beklenildiği gibi baskın doymuş yağ asitlerinin miristik asit, palmitik asit ve stearik asit olduğu, baskın tekli doymamış yağ asidinin oleik asit olduğu ve baskın çoklu doymamış yağ asidinin ise linoleik asit olduğu belirlenmiştir. Farklı oranlarda çilek püresinin ilave edilmesiyle toplam doymuş yağ asidi içeriğinin kontrol grubuna kıyasla azaldığı

belirlenmiş olup, kontrol grubu örneklerde toplam doymuş yağ asitleri %66.92 oranındayken çilek püresi ilave edilen örneklerde bu oran %63.05-63.32 arasında değişim göstermiştir. Farklı oranlarda çilek püresinin ilave edilmesiyle toplam tekli doymamış yağ asitlerinin arttığı saptanmış olup, kontrol grubu örneklerde toplam tekli doymamış yağ asitleri %29.54 oranındayken çilek püresi ilave edilen örneklerde bu oran %32.72-32.85 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Çilek püresinin ilave edilmesiyle toplam çoklu doymamış yağ asitlerinde artış belirlenmiş olup, kontrol grubu örneklerde toplam çoklu doymamış yağ asitleri %3.54 oranındayken çilek püresi ilave edilen örneklerde bu oran %3.96-4.10 arasında değişiklik göstermiştir. Süt ürünlerinde yağ asidi kompozisyonu başlıca çiğ sütün yağ asidi içeriğinden etkilenmekle birlikte tür, genotip, laktasyon dönemi, beslenme tipi, beslenme oranı, mevsim ve süt sağım şekli gibi pek çok faktörden etkilenmektedir. Diğer taraftan süt işlemede

## Meyveli probiyotik manda yoğurdunun kalite parametreleri

uygulanan homojenizasyon, ısı işlem ve fermantasyon gibi parametreler de yağ asidi kompozisyonu üzerinde önemli bir rol oynamaktadır (Paszczyk ve Czarnowska-Kujawska, 2022). Ayrıca yoğurda eklenen meyve gibi katkıları çoklu doymamış yağ asitleri miktarını

artırarak özellikle kardiyovasküler hastalıkların riskinin azaltılmasında etkili olmaktadır (İlyasoğlu ve Yılmaz, 2018). Nitekim literatürde manda yoğurdunun yağ asidi kompozisyonu üzerine benzer sonuçlar mevcuttur (Ivanova vd., 2011; Khan vd., 2020).

Çizelge 3. Deneme probiyotik manda yoğurtlarının yağ asidi kompozisyonu (%)  
Table 3. Fatty acid composition of the experimental probiotic buffalo yogurts (%)

	A	B	C	D	
Miristik Asit / <i>Myristic Acid</i> (C14:0)	9.25±0.03 <sup>a</sup>	8.53±0.04 <sup>b</sup>	8.46±0.01 <sup>b</sup>	8.26±0.03 <sup>c</sup>	**
Palmitik Asit / <i>Palmitic Acid</i> (C16:0)	32.32±0.05 <sup>a</sup>	29.94±0.01 <sup>b</sup>	29.68±0.02 <sup>c</sup>	29.14±0.04 <sup>d</sup>	**
Stearik Asit / <i>Stearic Acid</i> (C18:0)	10.71±0.01 <sup>a</sup>	9.17±0.03 <sup>b</sup>	9.04±0.04 <sup>c</sup>	8.87±0.01 <sup>d</sup>	**
Diğer Doymuş Yağ Asitleri / <i>Other Saturated Fatty Acid</i>	14.64±0.06 <sup>d</sup>	15.68±0.04 <sup>c</sup>	16.04±0.04 <sup>b</sup>	16.78±0.03 <sup>a</sup>	**
∑ Doymuş Yağ Asitleri / ∑ <i>Saturated Fatty Acid</i>	66.92±0.03 <sup>a</sup>	63.32±0.04 <sup>b</sup>	63.22±0.03 <sup>c</sup>	63.05±0.05 <sup>d</sup>	**
Oleik Asit / <i>Oleic Acid</i> (C18:1)	26.32±0.04 <sup>d</sup>	28.47±0.01 <sup>c</sup>	28.59±0.01 <sup>b</sup>	28.95±0.02 <sup>a</sup>	**
Diğer Tekli Doymamış Yağ Asitleri / <i>Other Monounsaturated Fatty Acid</i>	3.22±0.02 <sup>c</sup>	4.25±0.01 <sup>a</sup>	4.21±0.01 <sup>a</sup>	3.90±0.02 <sup>b</sup>	**
∑ Tekli Doymamış Yağ Asitleri / ∑ <i>Monounsaturated Fatty Acid</i>	29.54±0.06 <sup>c</sup>	32.72±0.01 <sup>b</sup>	32.80±0.01 <sup>ab</sup>	32.85±0.04 <sup>a</sup>	**
Linoleik Asit / <i>Linoleic Acid</i> (C18:2)	2.91±0.01 <sup>c</sup>	3.67±0.04 <sup>b</sup>	3.73±0.04 <sup>b</sup>	3.88±0.01 <sup>a</sup>	**
Diğer Çoklu Doymamış Yağ Asitleri / <i>Other Polyunsaturated Fatty Acid</i>	0.63±0.09 <sup>a</sup>	0.29±0.08 <sup>b</sup>	0.25±0.08 <sup>b</sup>	0.22±0.11 <sup>b</sup>	*
∑ Çoklu Doymamış Yağ Asitleri / ∑ <i>Polyunsaturated Fatty Acid</i>	3.54±0.08 <sup>b</sup>	3.96±0.04 <sup>a</sup>	3.98±0.04 <sup>a</sup>	4.10±0.09 <sup>a</sup>	**

a-d: satırlar arasındaki farklılıkları gösterir.

\*\* : P < 0.01; \* : P < 0.05

A: Kontrol manda yoğurdu; B: %5 çilek püresi + %7.5 şeker; C: %7.5 çilek püresi + %7.5 şeker; D: %10 çilek püresi + %7.5 şeker

a-d: Different letters indicate significant differences in row.

\*\* : P < 0.01; \* : P < 0.05

A: control buffalo yogurt; B: %5 strawberry puree + %7.5 sugar; C: %7.5 strawberry puree + %7.5 sugar; D: %10 strawberry puree + %7.5 sugar

### Deneme yoğurt örneklerinin ACE inhibitör aktivitesi

Kontrol grubu ile farklı oranlarda çilek püresi ilave edilen probiyotik manda yoğurtlarına ait ACE inhibitör aktivite sonuçları Çizelge 4'te verilmiştir.

Deneme yoğurt örneklerine meyve ilavesinin ACE inhibitör aktivite üzerinde istatistiksel olarak çok önemli (P < 0.01) etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubuna (%27.17) kıyasla

farklı oranlarda çilek püresi ilavesi yapılan örneklerde ACE inhibitör aktivite azalmış olup %18.03-22.53 arasında değişim göstermiştir. Kontrol grubunun ACE inhibitör aktivitesinin, fermantasyonda laktik asit bakterilerinin proteolitik aktivitesi neticesinde meydana gelen antihipertansif özelliğe sahip biyoaktif peptitlerden kaynaklandığı bildirilmektedir (Mirzapour-Kouhdasht ve Garcia-Vaquero, 2022). ACE inhibitör aktivitede meydana gelen

düşüş ise, çilek püresi ilavesiyle protein içeriğinde meydana gelen azalmanın antihipertansif aktiviteye sahip biyoaktif peptitlerin oluşumunu etkilemesiyle açıklanabilmektedir (Kim vd., 2021). Ayrıca yoğurt örneklerinin ACE inhibitör aktivitesindeki farklılıklarda sütün amino asit profili, farklı analitik yöntemlerin kullanılması,

proteoliz derecesi, fermentasyon ve saklama koşulları gibi birçok faktör etkili olmaktadır (Moschopoulou vd., 2018). Mevcut araştırma sonuçlarına göre manda yoğurdunun doğal bir ACE inhibitör kaynağı olabileceği düşünülmektedir.

Çizelge 4. Deneme probiyotik manda yoğurtlarının ACE inhibitör aktivite ve HMF içerikleri  
Table 4. ACE inhibitory activity and HMF contents of experimental probiotic buffalo yoghurts

		ACE İnhibitör Aktivite / ACE Inhibitory Activity (%)	HMF (µmol/L)
Deneme Manda Yoğurtları / Experimental Buffalo Yoghurts	A	27.17±0.55 <sup>a</sup>	16.74±0.32 <sup>d</sup>
	B	22.53±0.61 <sup>b</sup>	24.24±0.06 <sup>c</sup>
	C	21.38±0.13 <sup>b</sup>	28.13±0.44 <sup>b</sup>
	D	18.03±0.90 <sup>c</sup>	29.52±0.28 <sup>a</sup>
		**	**

a-d: sütunlar arasındaki farklılıkları gösterir.

\*\**P* < 0.01

A: Kontrol manda yoğurdu; B: %5 çilek püresi + %7.5 şeker; C: %7.5 çilek püresi + %7.5 şeker; D: %10 çilek püresi + %7.5 şeker

a-d: Different letters indicate significant differences in column.

\*\**P* < 0.01

A: control buffalo yoghurt; B: %5 strawberry puree + %7.5 sugar; C: %7.5 strawberry puree + %7.5 sugar; D: %10 strawberry puree + %7.5 sugar

#### Deneme yoğurt örneklerinin HMF içeriği

Sütü yoğurda dönüştürmeden önce uygulanan ısı işlem esnasında HMF gibi birtakım zararlı bileşiklerin oluştuğu bilinmektedir. Sağlık açısından risk teşkil eden HMF'nin süt ürünlerde belirlenmesi önemli bir kalite parametresi olarak nitelendirilmektedir (Czerwonka vd., 2020). Kontrol grubu ile farklı oranlarda çilek püresi ilave edilen probiyotik manda yoğurtlarına ait HMF içeriği sonuçları Çizelge 4'te verilmiştir. Deneme yoğurt örneklerine meyve ilavesinin HMF içeriği üzerinde istatistiksel olarak çok önemli (*P* < 0.01) etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla meyve ve şeker ilave edilen yoğurt örneklerinde HMF içeriğinin arttığı tespit edilmiştir. Çilek püresi oranının artışıyla HMF içeriğinin arttığı saptanmış olup %10 oranında çilek püresi ilave edilen örneklerde 29.52 µmol/L, %7.5 oranında çilek püresi ilave edilen örneklerde 28.13 µmol/L ve %5 oranında çilek püresi ilave edilen örneklerde 24.24 µmol/L olarak HMF içerikleri saptanmıştır. Çilek püresi oranının

artmasıyla HMF içeriğinin yükselmesinde, çilek içeriğinde bulunan ve indirgen şekerler olan glikoz ve fruktozun etkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca çilek içeriğinde bulunan sakkarozun, asitliğin artması ve ısı işlemin etkisiyle inversiyona uğrayarak HMF oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (Güzel ve Mercan, 2004; Öz ve Kafkas, 2015). Sonuç olarak, Maillard reaksiyonu veya asidik şartlarda heksozların ısıtılması neticesinde oluşan HMF ısı işlem sıcaklığı, ısı işlem süresi, süt bileşimi ve pH gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir (Yangılar, 2013; Xing vd., 2021). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) süt ve süt ürünlerinde HMF'nin bulunabilir maksimum sınırını 15 mg/kg olarak rapor etmiştir (Hou vd., 2022). Mevcut araştırmada kontrol grubu ile şeker ve farklı oranlarda çilek püresi ilave edilen manda yoğurtlarında HMF içeriğinin maksimum sınırın altında olduğu görülmüştür.

## Meyveli probiyotik manda yoğurdunun kalite parametreleri

### Deneme yoğurt örneklerinin mikrobiyolojik analizleri

Deneme yoğurt örneklerine ait *S. thermophilus*, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, *L. acidophilus* LA-5 ve

*B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 + *L. acidophilus* LA-5 sayım sonuçları Çizelge 5'te verilmiştir.

Çizelge 5. Deneme probiyotik manda yoğurtlarının mikrobiyolojik analiz sonuçları (log kob/g)  
Table 5. Microbiological analysis results of the experimental probiotic buffalo yoghurts (log cfu/g)

		<i>S. thermophilus</i>	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12	<i>L. acidophilus</i> LA-5	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12 + <i>L. acidophilus</i> LA-5
Deneme	A	7.21±0.14 <sup>d</sup>	7.13±0.07 <sup>d</sup>	7.19±0.07 <sup>d</sup>	7.26±0.06 <sup>d</sup>
Manda	B	7.39±0.12 <sup>c</sup>	7.28±0.07 <sup>c</sup>	7.36±0.09 <sup>c</sup>	7.43±0.07 <sup>c</sup>
Yoğurtları	/				
<i>Experimental</i>	C	7.53±0.11 <sup>b</sup>	7.50±0.08 <sup>b</sup>	7.57±0.12 <sup>b</sup>	7.67±0.08 <sup>b</sup>
<i>Buffalo Yoghurts</i>	D	7.68±0.12 <sup>a</sup>	7.70±0.09 <sup>a</sup>	7.69±0.09 <sup>a</sup>	7.79±0.05 <sup>a</sup>
		**	**	**	**
Depolama	1.	7.54±0.19 <sup>a</sup>	7.34±0.23 <sup>b</sup>	7.38±0.20 <sup>b</sup>	7.48±0.22 <sup>b</sup>
Periyodu	10.	7.35±0.20 <sup>b</sup>	7.46±0.24 <sup>a</sup>	7.53±0.21 <sup>a</sup>	7.59±0.22 <sup>a</sup>
(Gün) / <i>Storage</i>		**	**	**	**
<i>Period (Day)</i>					

a-d: sütunlar arasındaki farklılıkları gösterir.

\*\**P* < 0.01

A: Kontrol manda yoğurdu; B: %5 çilek püresi + %7.5 şeker; C: %7.5 çilek püresi + %7.5 şeker; D: %10 çilek püresi + %7.5 şeker

a-d: Different letters indicate significant differences in column.

\*\**P* < 0.01

A: control buffalo yoghurt; B: %5 strawberry puree + %7.5 sugar; C: %7.5 strawberry puree + %7.5 sugar; D: %10 strawberry puree + %7.5 sugar

Deneme yoğurt örneklerinde farklı oranlarda çilek püresi ilavesinin ve depolama periyodunun *S. thermophilus*, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, *L. acidophilus* LA-5 ve *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 + *L. acidophilus* LA-5 sayıları üzerine istatistiksel olarak çok önemli (*P* < 0.01) etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla farklı oranlarda çilek püresi ilave edilen örneklerde mikrobiyal gelişimin desteklendiği ve mikroorganizma sayılarının arttığı tespit edilmiştir. Nitekim en yüksek *S. thermophilus*, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, *L. acidophilus* LA-5 ve *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 + *L. acidophilus* LA-5 sayıları, en yüksek oranda çilek püresi ilave edilen örneklerde saptanmıştır. Mikrobiyolojik analiz sonuçları incelendiğinde yoğurt örneklerine çilek püresi ilavesinin ABT-2 probiyotik kültürler için prebiyotik etki oluşturduğu görülmüştür. Depolama periyoduna bağlı olarak ise *S. thermophilus* sayısında azalma görülürken *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, *L. acidophilus* LA-5 ve

*B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 + *L. acidophilus* LA-5 sayılarının arttığı belirlenmiştir. Bu artışın, *S. thermophilus* sayısına bağlı oransal bir artış olduğu düşünülmektedir. Öte yandan depolama periyodu boyunca deneme yoğurt örneklerinde probiyotik mikroorganizma sayısının, terapötik etkiden yararlanmak için probiyotik ürün sınırı olan 10<sup>6</sup> kob/g'dan (Vargas-Ramella vd., 2021) daha fazla olduğu saptanmıştır. Mevcut araştırma sonuçları, probiyotik mikroorganizmaların gelişiminin incelendiği çalışmalarla uyum içerisindedir (Bakırcı ve Kavaz, 2008; Akubor, 2016; Gangwar vd., 2016; Al-Dhabi vd., 2020).

### Deneme yoğurt örneklerinin duyu analizi

Deneme yoğurt örneklerine ait duyu analiz sonuçları Çizelge 6'da verilmiştir.

Deneme yoğurt örneklerinde farklı oranlarda çilek püresi ilavesinin ve depolama periyodunun duyu analiz parametreleri olan kıvam, tat, koku,

görünüş ve genel kabul edilebilirlik üzerine istatistiksel olarak çok önemli ( $P < 0.01$ ) etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla meyveli yoğurt örneklerinde duyu analizi puanlarının arttığı belirlenirken, beklenildiği gibi depolama periyodu boyunca duyu analizi puanları azalmıştır. Duyusal analiz parametrelerinin tümünde en yüksek puanı alan örnek, %5 oranında çilek püresi ilave edilen yoğurt örneğidir. Ayrıca incelenen tüm duyu analizi

parametrelerde kullanılan çilek püresi miktarının artmasıyla puanlar düşüş göstermiştir. Görünüş hariç diğer parametrelerde en düşük puanı kontrol grubu örneği almıştır. Nitekim literatürde yoğurda meyve gibi ilave edilen çeşitli katkıların duyu analizi parametrelerini iyileştirdiği ve panelistler tarafından daha yüksek oranda beğeni aldığı çalışmalar bulunmaktadır (Abdel-Hamid vd., 2020; Hovjecki vd., 2021).

Çizelge 6. Deneme probiyotik manda yoğurtlarının duyu değerlendirme sonuçları  
Table 6. Sensory evaluation results of the experimental probiotic buffalo yoghurts

		Kıvam / Consistency	Tat / Taste	Koku / Smell	Görünüş / Appearance	Genel Kabul Edilebilirlik / Overall Acceptability
Deneme	A	2.84±0.29 <sup>d</sup>	2.83±0.35 <sup>c</sup>	2.61±0.24 <sup>d</sup>	2.86±0.26 <sup>c</sup>	11.14±1.01 <sup>d</sup>
Manda	B	4.14±0.21 <sup>a</sup>	4.09±0.30 <sup>a</sup>	4.16±0.45 <sup>a</sup>	4.08±0.37 <sup>a</sup>	16.47±1.30 <sup>a</sup>
Yoğurtları	C	3.60±0.30 <sup>b</sup>	3.57±0.29 <sup>b</sup>	3.69±0.23 <sup>b</sup>	3.58±0.41 <sup>b</sup>	14.44±1.17 <sup>b</sup>
<i>Experimental</i>	D	3.22±0.28 <sup>c</sup>	3.33±0.34 <sup>b</sup>	3.28±0.20 <sup>c</sup>	2.78±0.42 <sup>c</sup>	12.61±1.21 <sup>c</sup>
<i>Buffalo Yoghurts</i>		**	**	**	**	**
Depolama	1.	3.66±0.51 <sup>a</sup>	3.71±0.49 <sup>a</sup>	3.65±0.69 <sup>a</sup>	3.63±0.61 <sup>a</sup>	14.65±2.23 <sup>a</sup>
Periyodu	10.	3.24±0.54 <sup>b</sup>	3.20±0.51 <sup>b</sup>	3.22±0.56 <sup>b</sup>	3.02±0.56 <sup>b</sup>	12.68±2.08 <sup>b</sup>
(Gün) / <i>Storage</i>		**	**	**	**	**
<i>Period (Day)</i>						

a-d: sütunlar arasındaki farklılıkları gösterir.

\*\* $P < 0.01$

A: Kontrol manda yoğurdu; B: %5 çilek püresi + %7.5 şeker; C: %7.5 çilek püresi + %7.5 şeker; D: %10 çilek püresi + %7.5 şeker

a-d: Different letters indicate significant differences in column.

\*\* $P < 0.01$

A: control buffalo yoghurt; B: %5 strawberry puree + %7.5 sugar; C: %7.5 strawberry puree + %7.5 sugar; D: %10 strawberry puree + %7.5 sugar

## SONUÇ

Son yıllarda fonksiyonel gıdalar hem sağlık üzerindeki sayısız faydaları hem de doğal kaynaklar olmaları nedeniyle dikkatleri üzerine çekmektedir. Fonksiyonel gıda olarak nitelendirilen yoğurt içerdiği besin öğeleri ve biyoaktif bileşiklerle eksiksiz bir süt ürünüdür. Mevcut araştırmada manda sütünden ABT-2 probiyotik kültür kullanılarak üretilen yoğurtlara farklı oranlarda çilek püresi ilave edilmiş ve örnekler çeşitli kalite parametreleri ile biyoaktivite açısından incelenmiştir. Manda yoğurdunun yağ asidi kompozisyonunda doymuş yağ asitlerinin ortalama %67, tekli doymamış yağ asitlerinin ortalama %30 ve çoklu doymamış yağ asitlerinin

ise ortalama %4 olduğu belirlenmiş olup, meyve ilavesiyle doymuş yağ asitlerinde azalma ve doymamış yağ asitlerinde ise artış tespit edilmiştir. Meyve ilavesiyle ACE inhibitör aktivitede azalma saptanırken, toksik bileşik olan HMF miktarında artış belirlenmiştir. Bununla birlikte, mevcut araştırmada tüm yoğurt örneklerinin HMF içeriği EFSA tarafından ortaya konan limitlerin altındadır. Diğer taraftan manda yoğurtlarına çilek püresi ilavesinin probiyotik mikroorganizmaların gelişimini desteklediği ve duyu özellikleri iyileştirdiği ortaya konmuştur.

### ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale için herhangi bir çıkar çatışması beyan etmemiştir.

### YAZAR KATKILARI

Bu araştırmanın planlanması, yürütülmesi ve yazılmasında tüm yazarlar eşit katkı sağlamıştır.

### TEŞEKKÜR

Mevcut araştırmanın bir bölümü 4th International Conference on Advanced Engineering Technologies (ICADET'22)'de özet bildiri olarak sunulmuştur.

### KAYNAKLAR

Abdel-Hamid, M., Romeih. E., Huang, Z., Enomoto, T., Huang, L., Li, L. (2020) Bioactive properties of probiotic set-yogurt supplemented with *Siraitia grosvenorii* fruit extract. *Food Chemistry*, 303: 125400.

Abesinghe, A.M.N.L., Priyashantha, H., Prasanna, P.H.P., Kurukulasuriya, M.S., Ranadheera, C.S., Vidanarachchi, J.K. (2020). Inclusion of probiotics into fermented buffalo (*Bubalus bubalis*) milk: an overview of challenges and opportunities. *Fermentation*, 6(4): 121.

Akubor, P. I. (2016). Quality evaluation and storage properties of yoghurt supplemented with pineapple juice. *International Journal Science and Knowledge*, 5(1): 23-31.

Al-Dhabi, N.A., Valan Arasu, M., Vijayaraghavan, P., Esmail, G.A., Duraipandiyar, V., Kim, Y. O., Kim, H., Kim, H. J. (2020). Probiotic and antioxidant potential of *Lactobacillus reuteri* LR12 and *Lactobacillus lactis* LL10 isolated from pineapple puree and quality analysis of pineapple-flavored goat milk yoghurt during storage. *Microorganisms*, 8(10): 1461.

Bakırcı, I., Kavaz, A. (2008). An investigation of some properties of banana yogurts made with commercial ABT-2 starter culture during storage. *International Journal of Dairy Technology*, 61(3): 270-276.

Bodyfelt, F.W., Tobias, J., Trout, G.M. (1988). *The Sensory Evaluation of Dairy Products*, pp 227-300. New York: AVI Book.

Boukria, O., El Hadrami, E.M., Sameen, A., Sahar, A., Khan, S., Safarov, J., Sultanova, S., Leriche, F., Ait-Kaddour, A. (2020). Biochemical, physicochemical and sensory properties of yoghurts made from mixing milks of different mammalian species. *Foods*, 9(11): 1722.

Cushman, D.W., Cheung, H.S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20: 1637-1648.

Czerwonka, M., Pietrzak-Sajjad, R., Bobrowska-Korczak, B. (2020). Evaluation of 5-hydroxymethylfurfural content in market milk products. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 37(7): 1135-1144.

Da Silva, T.M.S., Piazzentin, A.C.M., Mendonça, C.M.N., Converti, A., Bogsan, C.S.B., Mora, D., de Souza Oliveira, R.P. (2020). Buffalo milk increases viability and resistance of probiotic bacteria in dairy beverages under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Dairy Science*, 103(9): 7890-7897.

Durak, M.Z., Atlıhan Turan, N. (2020). Antihypertensive peptides in dairy products. *American Journal of Biomedical Science & Research*, 7(2): 191-195.

Estévez, N., Fuciños, C., Rodríguez-Sanz, A., Rúa, M.L. (2022). Development and sensory test of a dairy product with ACE inhibitory and antioxidant peptides produced at a pilot plant scale. *Food Chemistry*, 394: 133459.

Gangwar, R., Hai, H., Sharma, N., Kumar, P. (2016). Development and quality evaluation of yoghurt fortified with pineapple, apple and sweet lemon juice (fruit yoghurt). *International Journal of Engineering Research*, 5(3): 621-629.

Gupta, M.K., Viejo, C.G., Fuentes, S., Torrico, D.D., Saturno, P.C., Gras, S.L., Dunshea, F.R., Cottrell, J.J. (2022). Digital technologies to assess yoghurt quality traits and consumers acceptability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102: 5642-5652.

Güzel, Y.M., Mercan, T. (2004). Farklı reçeteler kullanılarak üretilen çilek reçellerindeki hidroksimetilfurfural (HMF) oluşumu ve



- depolama süresindeki değişimi. *Gıda ve Yem Bilimi-Teknolojisi Dergisi*, 6: 1-7.
- Hamdy, S.M., Abdelmontaleb, H.S., Mabrouk, A.M., Abbas, K.A. (2021). Physicochemical, viability, microstructure, and sensory properties of whole and skimmed buffalo set-yogurts containing different levels of polydextrose during refrigerated storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 00: e15643.
- Hameed, A., Inayat, S., Javed, I., Junaid, M., Ahmad, I., Ikram, A., Ali, M. (2020). Physicochemical quality and sensory attributes of soy milk yogurt blended with buffalo milk. *Pakistan Journal of Life and Social Sciences*, 18(2): 92-96.
- Hou, Y., Zhang, X., Liu, X., Wu, Q., Hou, J., Su, P., Guo, Q. (2022). Comparison of the effects of 5-Hydroxymethylfurfural in milk powder matrix and standard water on oxidative stress system of Zebrafish. *Foods*, 11(12): 1814.
- Hovjecki, M., Miloradovic, Z., Mirkovic, N., Radulovic, A., Pudja, P., Miocinovic, J. (2021). Rheological and textural properties of goat's milk set-type yoghurt as affected by heat treatment, transglutaminase addition and storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(14): 5898-5906.
- İlyasoğlu, H., Yılmaz, F. (2019). Characterisation of yoghurt enriched with polyunsaturated fatty acids by using walnut slurry. *International Journal of Dairy Technology*, 72(1): 110-119.
- Ivanova, S., Ilieva, Y., Penchev, P. (2021). Alterations in health-related fatty acids in buffalo milk after processing to traditional dairy products. *Acta Universitatis Cibinensis, Series E: Food Technology*, 25(2): 211-220.
- Ivanova, S., Miteva, D., Nacheva, I., Tsvetkov, T. (2011). Assessment of the effect of the technological processing and the storage term on the fatty acid composition of buffalo yoghurt. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 17(3): 269-276.
- Khan, I.T., Nadeem, M., Imran, M., Khalique, A. (2020). Impact of post fermentation cooling patterns on fatty acid profile, lipid oxidation and antioxidant features of cow and buffalo milk set yoghurt. *Lipids in Health and Disease*, 19(1): 1-12.
- Kim, E.D., Lee, H.S., Kim, K.T., Paik, H.D. (2021). Antioxidant and Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory activities of yogurt supplemented with *Lactiplantibacillus plantarum* NK181 and *Lactobacillus delbrueckii* KU200171 and sensory evaluation. *Foods*, 10(10): 2324.
- Kurt, A., Çakmakçı, S., Çağlar, A. (2015). Süt ve Mamülleri Muayene ve Analiz Metotları Rehberi. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No. 18, 238 s, Erzurum.
- Li, M., Shen, M., Lu, J., Yang, J., Huang, Y., Liu, L., Fan, H., Xie, J., Xie, M. (2022). Maillard reaction harmful products in dairy products: formation, occurrence, analysis, and mitigation strategies. *Food Research International*, 151: 110839.
- Metin, M. (2014). Süt Teknolojisi-Sütün Bileşimi ve İşlenmesi (13. Baskı). Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
- Mirzapour-Kouhdasht, A., Garcia-Vaquero, M. (2022). Cardioprotective peptides from milk processing and dairy products: from bioactivity to final products including commercialization and legislation. *Foods*, 11(9): 1270.
- Moschopoulou, E., Sakkas, L., Zoidou, E., Theodorou, G., Sgouridou, E., Kalathaki, C., Liarakou, A., Chatzigeorgiou, A., Politis, I., Moatsou, G. (2018). Effect of milk kind and storage on the biochemical, textural and biofunctional characteristics of set-type yoghurt. *International Dairy Journal*, 77: 47-55.
- Öz, A.T., Kafkas, E. (2015). Muhafaza süresinin 'Festival' çilek çeşidi meyvelerinde fiziksel özelliklere ve biyokimyasal bileşimine etkisinin belirlenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 25(2): 105-112.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S., Takano, T. (1995) Purification and characterization of angiotensin-converting enzyme inhibitors from sour milk. *Journal of Dairy Science*, 78: 777-783.
- Nguyen, H.T.H., Ong, L., Lefèvre, C., Kentish, S. E., Gras, S.L. (2014). The microstructure and physicochemical properties of probiotic buffalo

- yoghurt during fermentation and storage: a comparison with bovine yoghurt. *Food and Bioprocess Technology*, 7(4): 937-953.
- Paszczyk, B., Czarnowska-Kujawska, M. (2022). Fatty acid profile, conjugated linoleic acid content, and lipid quality indices in selected yogurts available on the Polish market. *Animals*, 12(1): 96.
- Satchithanandam, S., Fritsche, J., Rader, J.I. (2001). Extension of AOAC Official Method 996.01 to the analysis of Standard Reference Material (SRM) 1846 and infant formulas. *Journal of AOAC International*, 84: 805-813.
- Tami, S.H., Aly, E., Darwish, A.A., Mohamed, E.S. (2022). Buffalo stirred yoghurt fortified with grape seed extract: new insights into its functional properties. *Food Bioscience*, 101752.
- Terzioğlu, M.E., Yıldız Küçük, N., Bakırcı, İ. (2022). The effect of pineapple addition at different rates to sheep yoghurt on antioxidant activity, 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) content, and ABT-2 probiotic culture growth. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 15(ÖZEL SAYI I): 84-97.
- Urgu, M., Saatli, T.E., Türk, A., Koca, N. (2017). Determination of hydroxymethylfurfural content of heat-treated milk (pasteurized, UHT and lactose-hydrolysed UHT milk). *Akademik Gıda*, 15(3): 249-255.
- Van den Oever, S.P., Mayer, H.K. (2021). Analytical assessment of the intensity of heat treatment of milk and dairy products. *International Dairy Journal*, 121: 105097.
- Vargas-Ramella, M., Pateiro, M., Maggiolino, A., Faccia, M., Franco, D., De Palo, P., Lorenzo, J. M. (2021). Buffalo milk as a source of probiotic functional products. *Microorganisms*, 9(11): 2303.
- Vianna, F.S., da Cruz Silva Canto, A.C.V., Costa-Lima, B., Salim, A.P., Balthazar, C.F., Costa, M.P., Panzenhagen, P., Rachid, R., Franco, R.M., Conte-Junior, C.A., de Oliveira Silva, A.C. (2019). Milk from different species on physicochemical and microstructural yoghurt properties. *Ciência Rural*, 49(6): e20180522.
- Xing, Q., Fu, X., Liu, Z., Cao, Q., You, C. (2021). Contents and evolution of potential furfural compounds in milk-based formula, ultra-high temperature milk and pasteurised yoghurt. *International Dairy Journal*, 120: 105086.
- Yangilar, F. (2013). Hydroxymethylfurfural (HMF) in dairy products. *Akademik Gıda*, 11(3-4): 70-76.



## C VİTAMİNİNİN 2-KETO-L-GULONİK ASİT MOLEKÜLÜNDEN ÜRETİMİ İÇİN FARKLI METOTLARIN ARAŞTIRILMASI

Ceren MUTLU<sup>1\*</sup>, Cihadiye CANDAL USLU<sup>2</sup>, Mustafa ERBAŞ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Balikesir Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Balıkesir, Türkiye

<sup>2</sup>Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Kütahya, Türkiye

<sup>3</sup>Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya, Türkiye

Geliş/ *Received* 09.12.2022; Kabul/ *Accepted* : 27.02.2023; /Online baskı: *Published online* 08.03.2023

Mutlu, C., Candal Uslu, C., Erbaş, M. (2023). C vitamininin 2-keto-L-gulonik asit molekülünden üretimi için farklı metotların araştırılması. *GIDA* (2023) 48 (2) 394-404 doi: 10.15237/ gida.GD22126

*Mutlu, C., Candal Uslu, C., Erbaş, M. (2023). Investigation of different methods for production of vitamin C from 2-keto-L-gulonic acid molecule. GIDA (2023) 48 (2) 394-404 doi: 10.15237/ gida.GD22126*

### ÖZ

Araştırmada farklı metotlar kullanılarak 2-keto-L-gulonik asit molekülünün esterifikasyonu ve laktonizasyonu ile ülkemizde ilk defa C vitamini üretiminin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda C vitamininin üretimi için dört metot, C vitamininin sodyum tuzunun üretimi için dört metot ve C vitamininin potasyum tuzunun üretimi için ise bir metot olmak üzere toplamda dokuz farklı metot kullanılarak denemeler yapılmıştır. Elde edilen bulgulara göre; doğrudan C vitamini üretimi için %36.07 verim ile Metot-I'in, C vitamininin sodyum tuzu üretimi için %58.56 verim ile Metot-VIII'in ve C vitamininin potasyum tuzu üretimi için ise %28.22 verim ile Metot-IX'un kullanılabilmesi değerlendirilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** 2-keto-L-gulonik asit, C vitamini, esterifikasyon, laktonizasyon

## INVESTIGATION OF DIFFERENT METHODS FOR PRODUCTION OF VITAMIN C FROM 2-KETO-L-GULONIC ACID MOLECULE

### ABSTRACT

In the study, it was aimed to produce vitamin C for the first time in our country by esterification and lactonization of 2-keto-L-gulonic acid molecule using different methods. For this purpose, experiments were carried out using a total of nine different methods as four methods to produce vitamin C, four methods to produce the sodium salt of vitamin C, and one method to produce the potassium salt of vitamin C. According to the obtained results, it was evaluated that Method-I with a yield of 36.07% for the direct production of vitamin C, Method-VIII with a yield of 58.56% for the production of vitamin C sodium salt, and Method-IX with a yield of 28.22% for the production of vitamin C potassium salt could be used.

**Keywords:** 2-keto-L-gulonic acid, vitamin C, esterification, lactonization

\*Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*

✉: ceren.mutlu@balikesir.edu.tr

☎: (+90) 266 612 6319

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

Cihadiye Candal Uslu; ORCID no: 0000-0002-5945-6649

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

## GİRİŞ

C vitamini (L-askorbik asit) insanlar, primatlar ve diğer bazı hayvanlar için metabolik açıdan oldukça önemli olup, küresel pazarda en büyük paya sahip vitamin olarak bilinmektedir. Keşfedildiği 1912 yılının ardından bitkilerden izole edilmesi ve biyokimyasal olarak sentezlenmesi ile ilaç, gıda, içecek, kozmetik ve yem endüstrilerinde sıklıkla kullanılan bir madde haline gelmiştir (Wang vd., 2018).

C vitamini vücutta redoks reaksiyonlarına katılması, toksik serbest radikaller için indirgeyici olması, metaller ve proteinlerle kompleksler oluşturması, bağ dokusu kolajenindeki prolin kalıntılarının 4-hidroksiprolin kalıntısına dönüştürüldüğü enzimatik hidrosilasyon reaksiyonunun kofaktörü olması, fenilalanin ve tirozin metabolizmalarına katılması gibi farklı fonksiyonlara sahip olup, insanlar tarafından sentezlenemediği için günlük olarak dışarıdan alınması zorunlu olan bir vitamindir (Lavrenov ve Preobrazhenskaya, 2005). Günlük C vitamini ihtiyacı vücut ağırlığına, sigara kullanımına, yaşam tarzına, fiziksel aktiviteye, sağlık durumuna ve genetik faktörlere bağlı olarak farklılık göstermekte olup (Nowak, 2021), Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) yetişkinler için 45 mg/gün C vitamini alımını tavsiye ederken, Gıda ve Beslenme Kurulu ve Tıp Enstitüsü C vitamini tüketimini sağlıklı yetişkin erkek ve kadınlar için sırasıyla 90 ve 75 mg/gün olarak önermektedir (Abbas vd., 2012).

İnsan sağlığı açısından birçok faydası bulunan C vitamini gıda sektöründe de antioksidan olması ve dengeleyici özellikleri nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır. Üretilen C vitamininin %25 kadarı gıda ve %15 kadarı ise içecek endüstrisi tarafından değerlendirilmektedir (Bremus vd., 2006). Günümüzde C vitamininden türetilen sodyum askorbat, kalsiyum askorbat, potasyum askorbat ve askorbik asidin yağ asidi esterleri (askorbil palmitat ve askorbil stearat) gibi katkı maddeleri veya doğrudan C vitamininin kendisi farklı birçok ticari üründe bulunmaktadır (Varvara vd., 2016). C vitamini temel olarak protein içeriği ve kalitesi zayıf unlardan üretilen ekmeklerin kalitesini artırmak (Dinani vd., 2023) ve lipit

içeriği yüksek olan gıdalarda oksidasyonu engellemek (Uluata vd., 2015) gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Ayrıca *o*-kinonları koyu renk oluşturmadan önce fenolik bileşiklere indirgeme kabiliyeti nedeniyle esmerleşme önleyici ajan olarak da gıda endüstrisinde kullanılan önemli bir katkı maddesidir (Xu vd., 2020).

Birçok alanda kullanım ihtiyacı bulunan C vitamininin endüstriyel üretimi ilk kez D-glikozu C vitaminine dönüştüren ve kimyasal ve biyokimyasal süreçleri içeren Reichstein sentezi ile gerçekleştirilmiştir. Bu süreçlerin ilk aşamasında D-glikoz indirgenerek D-sorbitole dönüştürülür. D-sorbitol bakteriyel fermantasyon ile gerçekleştirilen oksidasyon sonucunda L-sorboza ve L-sorboz ise daha sonra kimyasal olarak 2-keto-L-gulonata oksitlenir. Son aşamada ise 2-keto-L-gulonat bileşiği C vitaminine laktonize edilir. Günümüzde ise C vitamini üretimi için baskın endüstriyel süreç iki aşamalı fermantasyon yöntemidir. Bu yöntemin ilk adımında D-sorbitol, *Gluconobacter oxydans* mikroorganizması kullanılarak L-sorboz bileşiğine oksitlenir. İkinci adımda ise *Ketogulonigenium vulgare* ve *Bacillus megaterium* mikroorganizmalarının kombinasyonu ile gerçekleştirilen fermantasyon sonucunda L-sorboz, 2-keto-L-gulonik aside (2-KLG) dönüştürüldükten sonra laktonizasyon ile C vitamini elde edilir (Kuivanen vd., 2015). C vitamininin öncü maddesi olan 2-KLG, esterleştirme ve laktonizasyon adımları kullanılarak C vitaminine dönüştürülür (Kaswurm vd., 2013).

C vitamininin dünyada yıllık üretim miktarı yaklaşık olarak 110.000 ton ve toplam ekonomik büyüklüğü ise 500-650 milyon \$ kadardır (Bhand ve Patwardhan, 2015). Dış ticaret verilerine ait raporlarda ülkemizin; 2016 yılı itibari ile kullandığı tüm C vitaminini ithal ettiği, bunun için yaklaşık 8.50 milyon \$ döviz ödemesi yaptığı (Anonim, 2016) ve bu ürünün dış satım potansiyeli de dikkate alındığında 30 milyon \$ kadar bir toplam ticari kapasiteye sahip olduğu değerlendirilmiştir. 2019 yılı verilerine göre ise ülkemizin 12.50 milyon \$ değerinde C vitamini ithal ettiği ve bu nedenle ülkemizdeki toplam C vitamini pazarının 30 milyon \$ hacmini de geçtiği düşünülmektedir

(Anonim, 2021). D-sorbitol ve C vitamini gıda, kimya, ilaç ve kozmetik sektörlerinde geniş kullanım alanları bulunan ve katma değeri yüksek iki ticari üründür. Bu ticari ürünler D-glikoz kullanılarak bir seri kimyasal ve biyokimyasal dönüşüm reaksiyonları dizisi ile bazı yabancı ülkelerde üretilmekte ve pazarlanmaktadır.

Ülkemiz kendi kaynaklarını kullanarak yıllardır D-glikoz üretebilirken, D-glikozun hidrojenizasyonu ile elde edilen D-sorbitolün üretimi ülkemizde ancak birkaç yıl önce başlamış olup, D-sorbitolden C vitamini üretimi ile ilgili ise herhangi bir ticari girişime ve bilimsel çalışmaya rastlanılmamıştır. Belirtilen nedenle ülkemizde C vitamini üretimini ilk kez konu alan bu araştırma ile; birçok alanda kullanım imkânı bulunan ve

değerli bir ticari ürün olan C vitamininin üretim yöntemlerinin araştırılmasının hem daha sonraki bilimsel çalışmalara hem de bu alanda faaliyet göstermek isteyen sanayi kuruluşlarına katkıda bulunacağı ve bu faaliyetlerin bir sonucu olarak da C vitamini açısından dışa bağımlılığın azaltılabileceği değerlendirilmiştir.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Farklı metotlar için kullanılan materyaller Çizelge 1’de verilmiştir. Kimyasallar işlemin niteliğine uygun olarak analitik saflıkta Merck (Almanya), Isolab Laborgeräte GmbH (Almanya), Sigma-Aldrich (Almanya) ve Haihang Industry (Çin) firmalarından temin edilerek kullanılmıştır.

Çizelge 1. 2-KLG molekülünden C vitamini üretimi için kullanılan kimyasallar

Table 1. Chemicals used for the production of vitamin C from 2-KLG molecule

Metotlar/Methods	Kullanılan Kimyasallar/Used Chemicals
Metot-I/Method-I	2-KLG, Toluen ve HCl
Metot-II/Method-II	2-KLG, Toluen, n-bütanol, HCl
Metot-III/Method-III	2-KLG ve HCl
Metot-IV/Method-IV	2-KLG ve H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Metot-V ve Metot-VI/Method-V and /Method-VI	2-KLG, Metanol, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , NaHCO <sub>3</sub>
Metot-VII//Method-VII	2-KLG, Metanol, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Metot-VIII/Method-VIII	2-KLG, Metanol, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ve NaOH
Metot-IX/Method-IX	2-KLG, Metanol, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ve KOH

### Metotlar

Araştırmada; 2-KLG bileşiğinin metil alkol ile esterifikasyonu ve laktonizasyonu ile C vitamini üretilmesi çalışmaları yapılmış ve bu amaçla aşağıda belirtilen 9 farklı metot uygulanmıştır. Uygulanan metotlarla C vitamini ve C vitamininin sodyum ve potasyum tuzlarının üretimleri gerçekleştirilmiştir.

### C vitamini üretim metotları

#### Metot-I

2-KLG bileşiğinden C vitamini üretiminde kullanılan Metot-I için; 250 mL hacmindeki amber bir cam şişe içerisinde bulunan 20 g 2-KLG bileşiği üzerine sırasıyla 20 mL toluen ve 1008 µL HCl eklenmiştir. Ortamda bulunan oksijenin uzaklaştırılması amacıyla şişe içerisine 30 saniye süresince azot gazı verilmiş ve şişe sızdırmaz bir şekilde kapatılmıştır. Bu karışım, karışımın

sıcaklığı 70°C olacak şekilde 300 dakika süresince 500 rpm hızla karanlık bir ortamda manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmıştır. Süre sonunda elde edilen heterojen karışım oda sıcaklığına soğutulmuştur. Elde edilen katı kısım ayrılarak 40°C sıcaklıkta ve 25 mbar vakum basıncında 48 saat süresince kurutulmuş ve analiz edilmiştir (Nadtochi ve Melent’eva, 2001).

#### Metot-II

2-KLG bileşiğinden C vitamini üretiminde kullanılan Metot-II’de, Metot-I’de modifikasyon yapılmıştır. Bu amaçla; 250 mL hacmindeki amber bir cam şişe içerisindeki 20 g 2-KLG bileşiği üzerine sırasıyla 20 mL n-bütanol:toluen (%37.5:62.5) ve 1008 µL HCl eklenmiştir. Diğer aşamalar ise Metot-I’de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir (Nadtochi ve Melent’eva, 2001; Gholap vd., 2017).

### *Metot-III*

2-KLG bileşiğinden C vitamini üretiminde kullanılan Metot-III için; 3 M HCl kullanılarak %10 konsantrasyonunda 2-KLG içeren çözelti amber bir cam şişe içerisinde hazırlanmıştır. Ortamda bulunan oksijenin uzaklaştırılması amacıyla şişe içerisine 30 saniye süresince azot gazı verilmiş ve şişe sızdırmaz bir şekilde kapatılmıştır. Bu karışım 90°C sıcaklıkta 70 dakika süresince 500 rpm hızla karıştırılmıştır. Süre sonunda karışım oda sıcaklığına soğutulmuştur. Elde edilen katı kısım 40°C sıcaklıkta ve 25 mbar vakum basıncında 48 saat süresince kurutulmuş ve analiz edilmiştir (Anonim, 2002).

### *Metot-IV*

2-KLG bileşiğinden C vitamini üretiminde kullanılan Metot-IV için; 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kullanılarak %10 konsantrasyonunda 2-KLG içeren çözelti amber bir cam şişe içerisinde hazırlanmıştır. Ortamda bulunan oksijenin uzaklaştırılması amacıyla şişe içerisine 30 saniye süresince azot gazı verilmiş ve şişe sızdırmaz bir şekilde kapatılmıştır. Bu karışım 80°C sıcaklıkta 240 dakika süresince 500 rpm hızla karıştırılmıştır. Süre sonunda karışım oda sıcaklığına soğutulmuştur. Elde edilen katı kısım 40°C sıcaklıkta ve 25 mbar vakum basıncında 48 saat süresince kurutulmuş ve analiz edilmiştir (Anonim, 2002).

## **C vitamini sodyum tuzu üretim metotları**

### *Metot-V*

2-KLG bileşiğinden C vitamini üretiminde kullanılan Metot-V için; 20 g 2-KLG bileşiği üzerine sırasıyla 60 mL metanol ve 900 µL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eklenmiştir. Bu karışım reaktörün teflon kabı içerisine alınmış ve sistem kapatılarak ortamda bulunan oksijenin uzaklaştırılması amacıyla sistem içerisine 30 saniye süresince karbondioksit gazı verilmiştir. Bu karışım, karışımın sıcaklığı 67-68°C olacak şekilde 30 dakika süresince 250 rpm hızla karıştırılarak 2-KLG bileşiğinin metil esterini oluşturmak amacıyla esterifikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Süre sonunda sistem açılarak karışım içerisine 2.5 g sodyum bikarbonat eklenmiş ve sistem yeniden kapatılarak içerisine 30 saniye süresince karbondioksit gazı verilmiştir. Karışım 60°C sıcaklıkta 120 dakika süresince 250 rpm hızla

karıştırılmıştır. Süre sonunda sistem yeniden açılmış ve elde edilen karışım oda sıcaklığına soğutulduktan sonra filtre edilmiştir. Elde edilen birinci katı kısım ayrılmış ve süzöntü ise bir sonraki aşama için üzerine 2.5 g sodyum bikarbonat eklenerek yeniden reaktöre konulmuştur. Sistem kapatılarak içerisine 30 saniye süresince karbondioksit gazı verilmiştir. Karışım 60°C sıcaklıkta 120 dakika süresince 250 rpm hızla karıştırılmış ve böylece 2-KLG-metil esterinin laktonlaşarak ve sodyum ile bağlanarak C vitamininin sodyum tuzuna dönüşmesi sağlanmıştır. Süre sonunda sistem tekrar açılmış ve karışım oda sıcaklığına soğutulmuştur. Soğutulan karışım filtre kağıdından geçirilmiş ve filtre üstü materyal ayrılarak 40°C sıcaklıkta ve 25 mbar vakum basıncında 48 saat süresince kurutulmuş ve analiz edilmiştir (Anonim, 1992).

### *Metot-VI*

2-KLG bileşiğinden C vitamini üretiminde kullanılan Metot-VI'da, Metot-V'e modifikasyon yapılmıştır. Bu amaçla; 20 g 2-KLG bileşiği üzerine sırasıyla 60 mL metanol ve 900 µL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eklenmiştir. Bu karışım reaktörün teflon kabı içerisine alınmış ve sistem kapatılarak ortamda bulunan oksijenin uzaklaştırılması amacıyla sistem içerisine 30 saniye süresince karbondioksit gazı verilmiştir. Bu karışım, karışımın sıcaklığı 67-68°C olacak şekilde 180 dakika süresince 250 rpm hızla karıştırılarak 2-KLG bileşiğinin metil esterini oluşturmak amacıyla esterifikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Diğer aşamalar ise Metot-V'te belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir (Anonim, 1992).

### *Metot-VII*

2-KLG bileşiğinden C vitamini üretiminde kullanılan Metot-VII için; 26 g 2-KLG bileşiği üzerine sırasıyla 200 mL metanol ve 546 µL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eklenmiştir. Bu karışım reaktörün teflon kabı içerisine alınmış ve sistem kapatılarak ortamda bulunan oksijenin uzaklaştırılması amacıyla sistem içerisine 30 saniye süresince karbondioksit gazı verilmiştir. Bu karışım, karışımın sıcaklığı 65°C olacak şekilde 180 dakika süresince 250 rpm hızla karıştırılarak 2-KLG bileşiğinin metil esterini oluşturmak amacıyla esterifikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Süre sonunda sistem açılarak karışım içerisine 7.4 g

sodyum karbonat eklenmiş ve sistem yeniden kapatılarak içerisine 30 saniye süresince karbondioksit gazı verilmiştir. Karışım 65°C sıcaklıkta 150 dakika süresince 250 rpm hızla karıştırılmış ve böylece 2-KLG-metil esterinin laktonlaşarak ve sodyum ile bağlanarak C vitamininin sodyum tuzuna dönüşmesi sağlanmıştır. Süre sonunda sistem yeniden açılmış ve karışım oda sıcaklığına soğutularak filtre edilmiştir. Elde edilen katı kısım 40°C sıcaklıkta ve 25 mbar vakum basıncında 48 saat süresince kurutulmuş ve analiz edilmiştir (Wang vd., 2012).

#### *Metot-VIII*

2-KLG bileşiğinden C vitamini üretiminde kullanılan Metot-VIII için; 15 g 2-KLG bileşiği üzerine 81.2 mL metanol eklenmiş ve karışım amber bir cam şişe içerisinde tamamen çözününceye kadar 500 rpm hızla manyetik karıştırıcı üzerinde 65°C sıcaklıkta karıştırılmıştır. Çözünme tamamlandıktan sonra karışım üzerine 80 µL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eklenmiştir. Ortamda bulunan oksijenin uzaklaştırılması amacıyla şişe içerisine 30 saniye süresince azot gazı verilmiş ve şişe sızdırmaz bir şekilde kapatılmıştır. Bu karışım, karışımın sıcaklığı 65°C olacak şekilde 270 dakika süresince 500 rpm hızla karıştırılarak 2-KLG bileşiğinin metil esterini oluşturmak amacıyla esterifikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Süre sonunda şişe kapağı üzerinde oluşturulan sistem yardımıyla şişe içerisine metanol ile hazırlanmış 3.7 N NaOH çözeltisi ilave edilmiştir. NaOH çözeltisinin sisteme ilave edilmesi işlemi; 148 dakika süresince 5 dakikada bir 655 µL ve 18 dakika süresince ise 5 dakikada bir 445 µL NaOH ekleme şeklinde gerçekleştirilmiş ve böylece 2-KLG-metil esterinin laktonlaşması ve sodyum ile bağlanarak C vitamininin sodyum tuzuna dönüşmesi sağlanmıştır. Süre sonunda elde edilen heterojen karışım oda sıcaklığına soğutularak süzülmüştür. Elde edilen katı kısım üç kez 7.5 mL metanol ile yıkanmış ve 40°C sıcaklıkta ve 25 mbar vakum basıncında 48 saat süresince kurutularak analiz edilmiştir (Anonim, 1995).

#### **C vitamini potasyum tuzu üretim metodu**

##### *Metot-IX*

2-KLG bileşiğinden C vitamini üretiminde kullanılan Metot-IX için Metot-VIII'de kullanılan

3.7 N NaOH çözeltisi yerine aynı konsantrasyondaki KOH çözeltisi kullanılmış ve böylece C vitamininin potasyum tuzunun üretilmesi sağlanmıştır. Diğer işlemler ise Metot-VIII'e benzer şekilde uygulanmıştır (Anonim, 1995).

#### **D-glikozdan C vitamini üretimi**

Ayrıca araştırmada D-glikozdan C vitamini üretimi için; D-glikozdan D-sorbitol rutenyum katalizörü varlığında 153°C sıcaklık, 60 bar H<sub>2</sub> gazı basıncı ve 1 saat reaksiyon süresince %93.30 verim ile üretilmiştir. Üretilen D-sorbitolden biyoreaktörde L-sorboz; 127.58 g/L D-sorbitol konsantrasyonu, 5.0 başlangıç pH değeri, 35°C sıcaklık, 700 rpm karıştırma hızı ve 1.5 vvm hava akım hızı şartlarında %99.21 verim ile elde edilmiştir. L-sorbozdan oksidasyon ile 2-KLG üretimi; 41.30°C sıcaklık, 8.23 pH değeri ve 195 dakika reaksiyon süresince ortalama %43.70 verim ile gerçekleştirilmiştir. Son olarak ise 2-KLG bileşiğinin belirtilen metotlar ile C vitamini ve sodyum ve potasyum askorbata dönüşümü sağlanmıştır.

#### **Analiz metotları**

##### *HPLC-RID sistemi ile 2-KLG ve C vitamini analizi*

2-KLG ve C vitamininin sodyum ve potasyum tuzlarının analizinde, yukarıdaki metotlar kullanılarak elde edilen katılar uygun oranda ultra saf su ile seyreltilmiş ve HPLC-RID (1260 Infinity II Agilent, ABD) sistemine enjekte edilerek analiz gerçekleştirilmiştir. Analiz 75°C kolon ve 30°C dedektör sıcaklıklarında, Hi-Plex-Ca (Agilent, ABD) kolon kullanılarak ve akış hızı 0.6 mL/dk olan ultra saf su mobil fazı varlığında 10 µL örneğin enjeksiyonu ile gerçekleştirilmiştir (Zhu vd., 2012).

##### *LC-MS sistemi ile 2-KLG ve C vitamini analizi*

2-KLG, C vitamini ve C vitamininin sodyum ve potasyum tuzlarının analizinde, yukarıdaki metotlar kullanılarak elde edilen katılar uygun oranda ultra saf su ile seyreltilmiş, LC-MS (UltiMate 3000 UHPLC ve TSQ Fortis Triple Quadrupole MS dedektör, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) sistemine enjekte edilmiş ve Thermo Hypersil Gold C<sub>18</sub> kolon (50 mm x 2.1 mm x 1.9 µm) kullanılarak analiz

gerçekleştirilmiştir. Mobil faz A olarak su:metanol (%95:5), %0.1 formik asit ve 4 mM amonyum asetat karışımı ve mobil faz B olarak ise su:metanol (%5:95), %0.1 formik asit ve 4 mM amonyum asetat karışımı kullanılmıştır. Mobil fazların gradiyent akış programı Çizelge 2'de verilmiştir. Enjeksiyon hacmi 10 µL, kolon sıcaklığı 40°C, akış hızı 0.25 mL/dk ve toplam

analiz süresi ise 4 dakika olarak ayarlanmıştır. Ayrıca kapiller sıcaklığı 280°C, MS dedektör sıcaklığı 230°C ve sprey voltaj ±3500 V olarak uygulanmıştır (Doğan vd., 2019). Örneklerdeki 2-KLG ve C vitamini miktarları ise farklı konsantrasyonlardaki (0.01-1.00 g/kg) standart maddelerle hazırlanan kurveler yardımıyla belirlenmiştir.

Çizelge 2. Mobil fazların gradiyent akış programı  
Table 2. Gradient flow program of mobile phases

Zaman (dk)	Mobil faz akış hızı (mL/dk)	Mobil faz A (%)	Mobil faz B (%)
Time (min)	Mobile phase flow rate (mL/min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
0	0.25	100	0
0.4	0.25	100	0
1.2	0.25	50	50
2.0	0.25	0	100
3.0	0.25	0	100
3.5	0.25	100	0
4.0	0.25	100	0

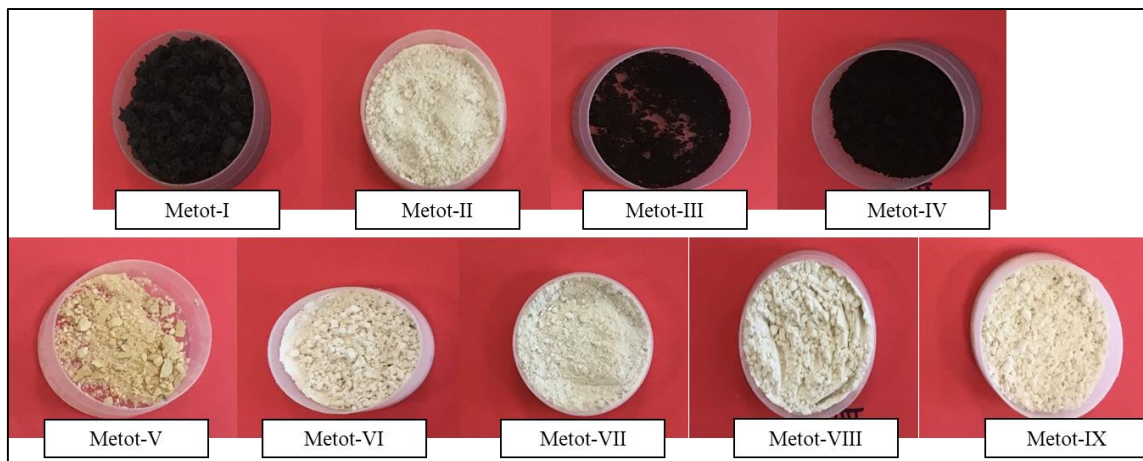
Belirlenen 2-KLG ve C vitamini miktarları kullanılarak aşağıda verilen eşitlik ile üretim verimleri hesaplanmıştır.

$$\text{Üretim verimi (\%)} = \frac{C \text{ vitamini miktarı}}{2\text{-KLG miktarı}} \times 100$$

Eşitlik 1

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Farklı metotlar ile gerçekleştirilen 2-KLG bileşiğinden C vitamini üretimlerinden elde edilen örnekler için bazı görseller Şekil 1'de ve örneklerde tespit edilen 2-KLG ve C vitamini LC-MS miktar analiz sonuçları ise Çizelge 3'te verilmiştir.



Şekil 1. C vitamini (Metot I-II-III ve IV) ve C vitamini sodyum (Metot V-VI-VII ve VIII) ve potasyum (Metot IX) tuzlarının üretimlerinden elde edilen örnekler için bazı görseller

Figure 1. Some images of the samples obtained from the production of vitamin C (Method I-II-III and IV) and sodium (Method V-VI-VII and VIII) and potassium (Method IX) salts of vitamin C



C vitamini olarak üretilen ve Metot-II ile elde edilen örnek haricindeki örneklerin renkleri siyah olurken, C vitamininin sodyum ve potasyum tuzları olarak üretilen örneklerin renklerinin ise beyazımsı sarı renkte oldukları gözlemlenmiştir. Konsantre asit çözeltisinin 70-75°C sıcaklıkta kullanımının ortamdaki bileşenlerin yanmasına neden olabileceği rapor edilmiştir (Gholap vd., 2017). Buna bağlı olarak Metot I'de konsantre HCl kullanımının ve 300 dakika olan uzun uygulama süresinin, Metot III ve IV'te 80-90°C gibi yüksek sıcaklıklar ile Metot IV'te asidik ortamda 240 dakikalık uzun bir uygulama

süresinin neticesinde ortamdaki karbohidrat türevi bileşiklerin yanması ile siyah renkte bir kalıntı elde edildiği değerlendirilmiştir. Metot II'de ise Metot I'e benzer sıcaklık ve sürelerde üretim yapılmasına rağmen ortama eklenen bütanolün rengi koruyucu bir etki göstermiş olabileceği düşünülmüştür. Yapılan bir çalışmada konsantre HCl uygulamasından sonra koyu renkli viskoz bir sıvının oluştuğu ve bu sıvıdan ayrılan çökeltinin n-bütanol:toluen (%37.5:62.5) karışımı ile yıkanması sonucunda açık gri ham ürün elde edildiği bildirilmiştir (Gholap vd., 2017).

Çizelge 3. 2-KLG molekülünden C vitamini üretimlerine ait LC-MS analiz sonuçları

Table 3. LC-MS analysis results of vitamin C production from 2-KLG molecule

Metotlar/Methods	2-KLG (g/kg)	C vitamini/Vitamin C (g/kg)	Verim/Yield (%)
Metot-I/Method-I	536.55	360.74	36.07
Metot-II/Method-II	383.16	22.81	2.28
Metot-III/Method-III	0.28	1.54	0.14
Metot-IV/Method-IV	0.00	0.00	0.00
Metot-V/Method-V	26.36	46.66	4.20
Metot-VI/Method-VI	31.46	272.24	24.50
Metot-VII/Method-VII	20.04	365.50	32.90
Metot-VIII/Method-VIII	113.29	650.69	58.56
Metot-IX/Method-IX	24.26	313.60	28.22

Elde edilen sonuçlara göre doğrudan C vitamini üretim denemelerinden olan Metot I-II-III ve IV karşılaştırıldığında en yüksek üretim miktarı ve veriminin sırasıyla 360.74 g/kg ve %36.07 değerleri olarak Metot-I ile elde edildiği, diğer denemelerde ise üretim verimlerinin çok düşük olduğu ve bu yöntemlerin C vitamini üretimi için uygun olmadığı belirlenmiştir. Metotlar incelendiğinde doğrudan C vitamini üretiminde yalnızca toluen kullanımının; toluen:bütanol çözeltisi, HCl ve H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltileri kullanımından çok daha iyi sonuçlar verdiği değerlendirilmiştir. Metot-I'de belirtilen koşullar ile C vitamini üretiminin yapıldığı bir çalışmada diasetonketogulonik asidin %49.70 verim ile C vitaminine dönüştürülebildiği ve C vitamini üretim veriminin kullanılan HCl konsantrasyonuna ve reaksiyon sıcaklığı ve süresine bağlı olarak değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Nadtochi ve Melent'eva, 2001). Metot-III ve IV, C vitamini üretiminin

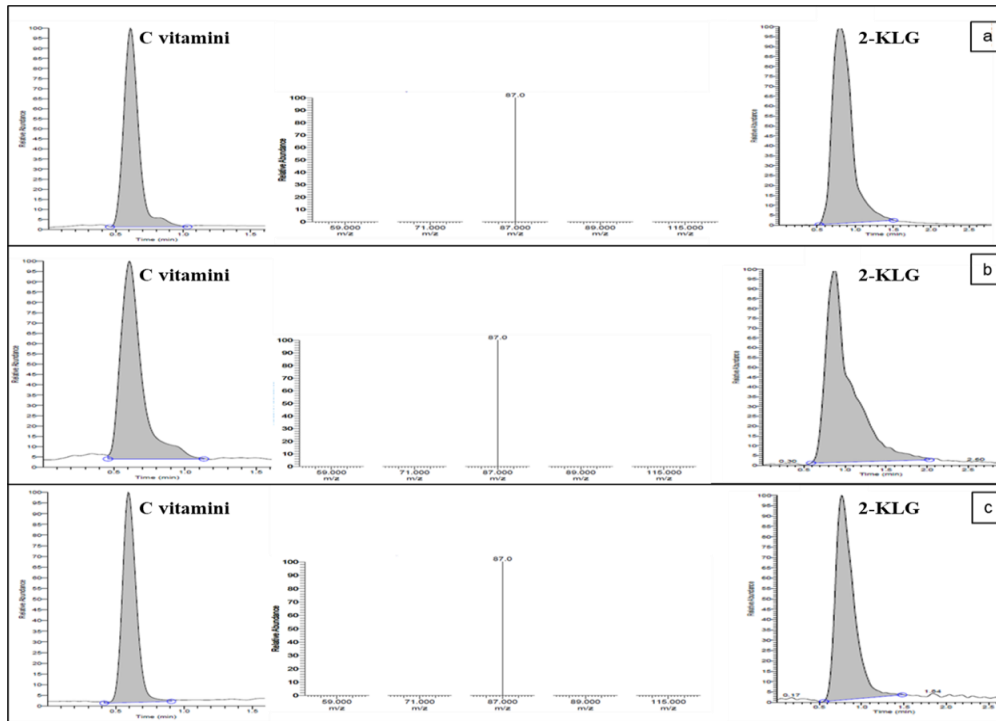
gerçekleştirildiği en eski yöntemler olarak bilinmektedir. Her iki yöntemin kullanıldığı bir çalışmada sırasıyla %65 ve %60 dönüşüm verimleri rapor edilmiştir (Anonim, 2002). Ancak sonuçlar incelendiğinde bu yöntemler ile C vitamini üretiminin gerçekleştirilemediği tespit edilmiştir. Konsantre HCl çözeltisinin 70-75°C sıcaklıkta kullanımının C vitamininin yanmasına yol açabildiği rapor edilmiştir (Gholap vd., 2017). Buradan hareketle üretim sırasında 2-KLG molekülünün miktarında azalma olmasına rağmen C vitamini elde edilememesinin son ürünün reaksiyon sırasında yanma sonucu kaybedilmesi ile ilişkili olabileceği değerlendirilmiştir.

C vitamininin sodyum tuzunun üretimlerinin gerçekleştirildiği denemelerde (V-VI-VII ve VIII) ise örneklerin C vitamini miktarlarının 46.66-650.69 g/kg aralığında değiştiği ve en yüksek C vitamini üretim veriminin %58.56 olarak Metot-VIII'de elde edildiği tespit edilmiştir. Metotlar

incelendiğinde C vitamininin sodyum tuzunun üretiminde sodyum kaynağı olarak NaOH çözeltisinin kullanımının, sodyum bikarbonat ve sodyum karbonat kullanımından daha yüksek sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Ayrıca Metot-V ve VI arasındaki verim farklılığı incelendiğinde ise esterifikasyon süresinin 30 dakikadan 180 dakikaya uzatılmasının son ürünlerdeki C vitamini verimini yaklaşık 5.80 kat artırdığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte Metot-IX ile C vitamininin potasyum tuzu olarak üretilen örnekteki C vitamini miktar ve veriminin 313.60 g/kg ve %28.22 olduğu belirlenmiştir. Yapılan farklı çalışmalarda C vitamininin sodyum tuzunun üretim verimlerinin %90 değerinin üzerinde olduğu rapor edilmiştir (Anonim, 1992; Anonim, 1995; Wang vd., 2012). C vitamini oluşum verimini etkileyen temel faktörlerin reaksiyon sıcaklığı, reaksiyon süresi ve bu reaksiyon sürecinde 2-KLG bileşiğinin metil esterinin sodyum kaynağına olan molar oranı olduğu belirtilmiştir (Wang vd., 2012). Ayrıca reaksiyonun ilk aşamasında 2-KLG molekülünün

metanol ile interaksyonu sonucu gerçekleşen esterleşme düzeyi de C vitamini oluşum verimini etkilemekte ve metil esterinin oluşması C vitamini üretim verimini artırmaktadır (Bommarius ve Riebel-Bommarius, 2004). Endüstride de yaygın olarak kullanılan yöntem, 2-KLG bileşiğinin metanol ile reaksiyona girmesi ile önce metil 2-keto-L-gulonatin üretilmesi ve daha sonra bu bileşiğin alkali katalizör varlığında C vitaminine dönüştürüldüğü ester oluşturma reaksiyonudur (Xu vd., 2008). Belirtilen faktörlere bağlı olarak elde edilen bulguların önceki çalışmalardan farklı olduğu ve Metot-VII ve VIII temel alınarak üretim koşullarının optimize edilmesi ile daha yüksek verimlere ulaşılma potansiyelinin bulunduğu değerlendirilmiştir.

En fazla doğrudan C vitamini üretiminin yapıldığı Metot-I, en fazla C vitamininin sodyum tuzunun üretiminin yapıldığı Metot-VIII ve C vitamininin potasyum tuzunun üretiminin yapıldığı Metot-IX ile üretilen örneklere ait LC-MS kromatogramları ve kütle spektrumları Şekil 2'de verilmiştir.



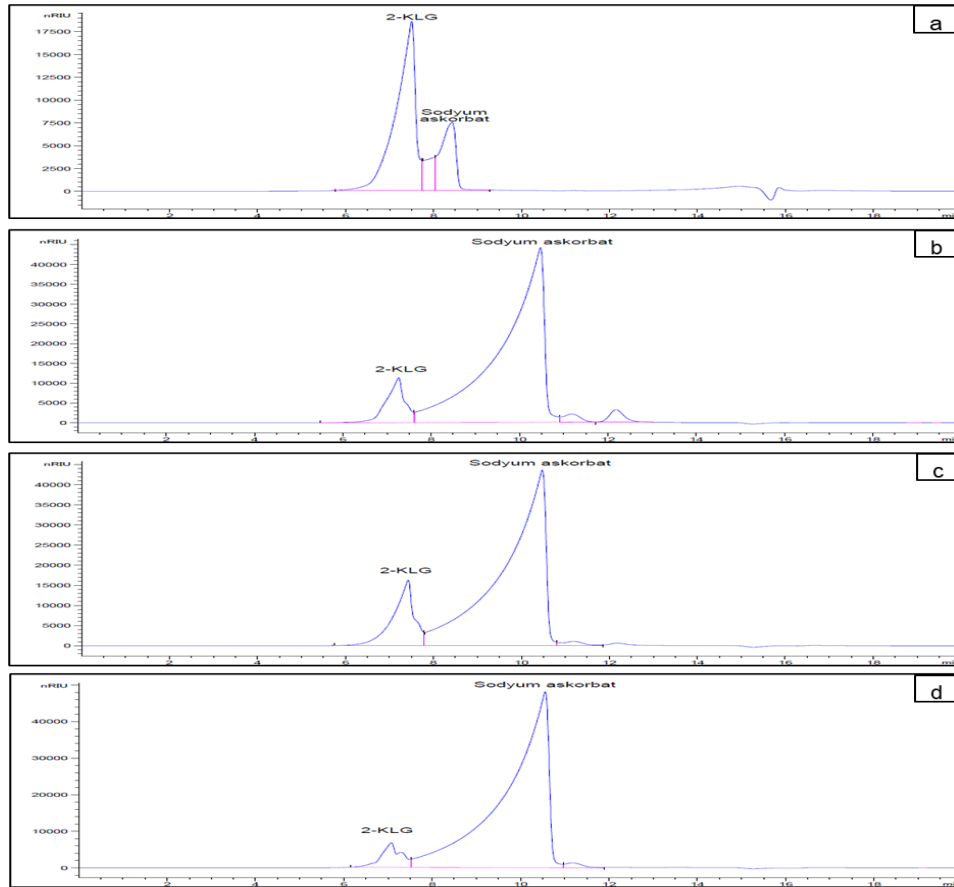
Şekil 2. LC-MS sistemi ile yapılan analizlere ait bazı kromatogramlar (a: C vitamini/Metot-I örneği, b: C vitamini sodyum tuzu/Metot-VIII örneği ve c: C vitamini potasyum tuzu/Metot-IX örneği)

Figure 2. Some chromatograms of the analysis performed with the LC-MS system (a: Vitamin C/Method-I sample, b: Sodium salt of vitamin C/Method-VIII sample, and c: Potassium salt of vitamin C/Method-IX sample)

Yapılan analizde kullanılan C vitamini standardının karakteristik parçalanma ürününe ait m/z oranının 87.00 olduğu belirlenmiştir. 2-KLG standart bileşiği için karakteristik m/z oranının ise 103.00 olduğu tespit edilmiştir. Örneklerdeki incelemelerde C vitamini ve 2-KLG bileşiklerinin varlığı bu m/z oranlarının karşılaştırılmasına ve piklerin alıkonma zamanlarına göre tayin edilmiştir.

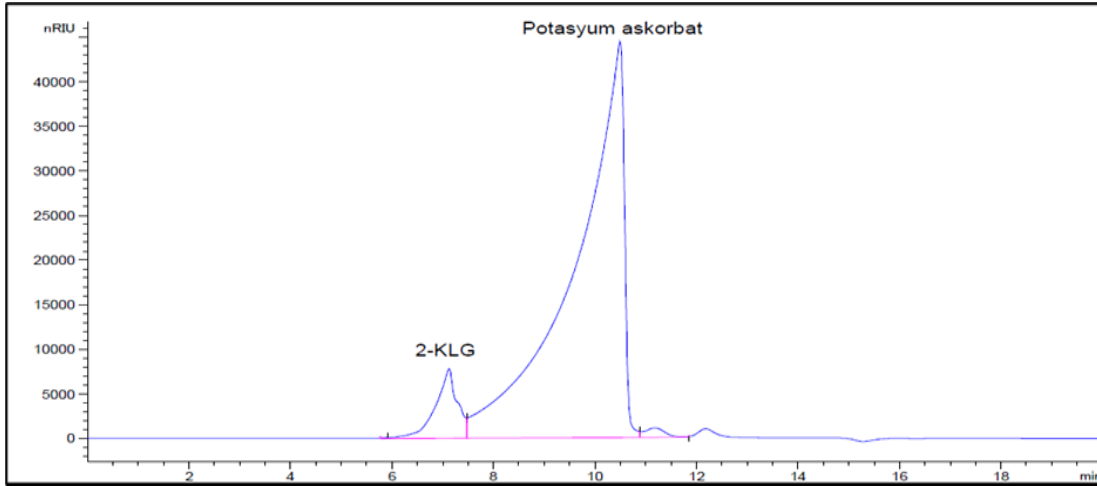
2-KLG bileşiğinden C vitamini sodyum ve potasyum tuzlarının üretimlerinin doğrulanması amacıyla yapılan HPLC analizine ait kromatogramlar ise sırasıyla Şekil 3 ve 4'te verilmiştir. 2-KLG ve C vitamini sodyum tuzu piklerinin alıkonma zamanları ve yapıları referans maddelerle karşılaştırılarak örnek içerisinde bu maddelerin varlığı kontrol edilmiştir. Ayrıca C

vitamini potasyum tuzu bileşiğine ait referans madde temin edilememiş, ancak yine de üretilen bileşiklerin çeşitliliğini sağlamak amacıyla C vitamini sodyum tuzunun üretiminin yapıldığı Metot-VIII yönteminde sodyum kaynağı olarak kullanılan NaOH yerine KOH ilavesi ile modifiye edilerek geliştirilen Metot-IX ile üretilen örneğe ait kromatogram C vitamini sodyum tuzu standart maddesi ile karşılaştırılmış ve her iki pikin aynı alıkonma zamanında geldiği ve yapılarının benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Aynı zamanda LC-MS analiz sonuçları da değerlendirildiğinde elde edilen bu örnekte C vitamini bulunduğu ve ortamda tuz oluşturma potansiyeli bulunan tek iyonun  $K^+$  olması nedeniyle bu bileşiğin C vitamini potasyum tuzu olabileceği değerlendirilmiştir.



Şekil 3. C vitamini sodyum tuzlarının üretimlerinin (a: Metot-V, b: Metot-VI, c: Metot-VII, d: Metot-VIII) doğrulanması amacıyla yapılan HPLC analizine ait kromatogramlar

Figure 3. Chromatograms of HPLC analysis for the verification of vitamin C sodium salts (a: Method-V, b: Method-VI, c: Method-VII, d: Method-VIII) productions



Şekil 4. C vitamini potasyum tuzu üretiminin (Metot-IX) doğrulanması amacıyla yapılan HPLC analizine ait kromatogram

Figure 4. Chromatogram of HPLC analysis for the verification of vitamin C potassium salt (Method-IX) production

## SONUÇ

Araştırmada kullanılan dokuz farklı yöntemden yedisinde %2.28-58.56 verim ile C vitamini üretilebildiği tespit edilmiştir. C vitamini üretiminde bütanol:toluen karışımı yerine yalnızca toluen kullanılmasının, metil alkol ile esterifikasyon işleminin yapılmasının ve esterifikasyon süresinin 30 dakikadan 180 dakikaya çıkarılmasının 2-KLG bileşiğinin C vitaminine dönüşüm miktar ve verimini artırdığı tespit edilmiştir. 2-KLG bileşiğinin %36.07 verim ile C vitaminine (Metot-I) ve %58.56 verim ile sodyum askorbata (Metot-VIII) dönüşümü sağlanmıştır. Metot-I ve VIII temel alınarak üretim koşullarının optimize edilmesi ile daha yüksek üretim verimlerine ulaşılma potansiyelinin olduğu değerlendirilmiştir. Ayrıca araştırmada D-glikozdan C vitamini üretiminde tüm aşamalara ait verimler birlikte değerlendirildiğinde 100 g D-glikozdan 14.59 g C vitamini ve 23.69 g C vitamini içeren sodyum askorbat elde edilebildiği sonucuna ulaşılmıştır.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarların bu araştırma ile ilgili herhangi bir kişi veya kurum ile çıkar çatışması yoktur.

## YAZAR KATKILARI

Bu araştırma Mustafa ERBAŞ tarafından yürütülmüş, üretim denemeleri ve analizler Mustafa ERBAŞ, Ceren MUTLU ve Cihadiye

CANDAL USLU tarafından gerçekleştirilmiş ve makale Ceren MUTLU tarafından yazılmıştır.

## TEŞEKKÜR

Projeye (1005-Ulusal Yeni Fikirler ve Ürünler Araştırma Destek Programı-Proje No: 118O859) verdikleri destek nedeniyle Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

Abbas, S., Da Wei, C., Hayat, K., Xiaoming, Z. (2012). Ascorbic acid: microencapsulation techniques and trends-a review. *Food Reviews International*, 28(4), 343-374.

Anonim. (1992). Process for the production of sodium or potassium L-ascorbate. Patent No: US5128487A, <https://patents.google.com/patent/US5128487A/en> (Erişim tarihi: 25/11/2022).

Anonim. (1995). Process for preparing ascorbic acid. Patent No: US5391770A, <https://patents.google.com/patent/US5391770A/en> (Erişim tarihi: 25/11/2022).

Anonim. (2002). Continuous process for producing L-ascorbic acid. Patent No: WO2002051826A1, <https://patents.google.com/patent/WO2002051826A1/en> (Erişim tarihi: 25/11/2022).

- Anonim. (2016). UN Comtrade Database. <https://comtrade.un.org> (Erişim tarihi: 01/12/2022).
- Anonim. (2021). Trend economy report. [https://trendeconomy.com/data/commodity\\_h2/293627](https://trendeconomy.com/data/commodity_h2/293627) (Erişim tarihi: 01/12/2022).
- Bhand, D.V., Patwardhan, A.V. (2015). Statistical optimization of L-ascorbic acid production by *Xanthomonas campestris* MTCC 2286 using sucrose as a cheap carbon source. *Journal of Biochemical Technology*, 6(1), 922-928.
- Bommarius, A. S., Riebel-Bommarius, B. R. (2004). Biocatalysis: fundamentals and applications. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, Weinheim, 611 pp.
- Bremus, C., Herrmann, U., Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (2006). The use of microorganisms in L-ascorbic acid production. *Journal of Biotechnology*, 124(1), 196-205.
- Dinani, S.T., van der Harst, J.P., Boom, R., van der Goot, A.J. (2023). Effect of L-cysteine and L-ascorbic acid addition on properties of meat analogues. *Food Hydrocolloids*, 134, 108059.
- Dogan, S., Tongur, T., Er kaymaz, T., Erdogan, G., Unal, B., Şık, B., Simsek, T. (2019). Traces of intact paraben molecules in endometrial carcinoma. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 31158-31165.
- Gholap, V., Talekar, V., Gholap, M., Kanawade, A., Phapale, P. (2017). A simple procedure for the one pot synthesis of ascorbic acid as efficiency and recyclable media. National Conference on Research and Developments in Synthetic Organic Chemistry, 39-42 pp.
- Kaswurm, V., van Hecke, W., Kulbe, K. D., Ludwig, R. (2013). Engineering of a bi-enzymatic reaction for efficient production of the ascorbic acid precursor 2-keto-L-gulonic acid. *Biochemical Engineering Journal*, 79, 104-111.
- Kuivanen, J., Penttilä, M., Richard, P. (2015). Metabolic engineering of the fungal D-galacturonate pathway for L-ascorbic acid production. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 1-9.
- Lavrenov, S.N., Preobrazhenskaya, M.N. (2005). L-ascorbic acid: Properties and ways of modification (a review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 39(5), 251-264.
- Nadtochii, M.A., Melent'eva, T. A. (2001). Synthesis of ascorbic acid from diacetone-2-keto-L-gulonic acid. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 35, 231-233.
- Nowak, D. (2021). Vitamin C in human health and disease. *Nutrients*, 13(5), 1595.
- Uluata, S., McClements, D.J., Decker, E.A. (2015). How the multiple antioxidant properties of ascorbic acid affect lipid oxidation in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(6), 1819-1824.
- Varvara, M., Bozzo, G., Celano, G., Disanto, C., Pagliarone, C. N., Celano, G. V. (2016). The use of ascorbic acid as a food additive: technical-legal issues. *Italian Journal of Food Safety*, 5(1), 4313.
- Wang, J. C., Cui, F. X., Li, T. (2012). Optimization of synthesis process for sodium ascorbate. *In Advanced Materials Research*, 550, 10-15.
- Wang, P., Zeng, W., Xu, S., Du, G., Zhou, J., Chen, J. (2018). Current challenges facing one-step production of L-ascorbic acid. *Biotechnology Advances*, 36(7), 1882-1899.
- Xu, B., Zheng, X., Zhang, W., Zhang, X., Zhang, Z., Shang, H. (2008). Kinetics of esterification of 2-keto-L-gulonic acid with methanol catalyzed by cation exchange resin. *Transactions of Tianjin University*, 14(1), 37-42.
- Xu, J., Zhou, L., Miao, J., Yu, W., Zou, L., Zhou, W., Liu, C., Liu, W. (2020). Effect of cinnamon essential oil nanoemulsion combined with ascorbic acid on enzymatic browning of cloudy apple juice. *Food and Bioprocess Technology*, 13(5), 860-870.
- Zhu, Y., Liu, J., Du, G., Zhou, J., Chen, J. (2012). Sporulation and spore stability of *Bacillus megaterium* enhance *Ketogulonigenium vulgare* propagation and 2-keto-L-gulonic acid biosynthesis. *Bioresource Technology*, 107, 399-404.

## CEVİZ YAPRAK EKSTRELERİNİN ANTİOKSİDAN, ANTİMİKROBİYEL VE ANTİBİYOFİLM AKTİVİTESİ

Sevilay YAPICI\*, Merih KIVANÇ

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir, Türkiye

Geliş/Received 25.08.2022; Kabul/ Accepted: 15.02.2023; Online baskı/Published online: 08.03.2023

Yapıcı, S., Kıvanç, M. (2023). Ceviz yaprak ekstralarının antioksidan, antimikrobiyel ve antibiyofilm aktivitesi. GIDA (2023) 48 (2) 405-421 doi: 10.15237/ gida.GD22082

Yapıcı, S., Kıvanç, M. (2023). Antioxidant, antimicrobial and antibiofilm activity of leaf extracts of walnut. GIDA (2023) 48 (2) 405-421 doi: 10.15237/ gida.GD22082

### ÖZ

Bu çalışmada ceviz (*Juglans regia*) yapraklarının su, etil asetat ve metanol ekstralarının antibiyofilm aktivitesi araştırılmıştır. Ekstrelerin antimikrobiyel ve antibiyofilm aktivitesi *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas hydrophila* ve *Salmonella enterica*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *Listeria monocytogenes* Serovar I, *L. monocytogenes* 19111, *L. monocytogenes* 4b 19115, *L. ivanovii* 19119, *L. innocua* 6a 33090, *Streptococcus mutans*, *S. anginosus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus safensis* ve *B. mojavensis*'a karşı araştırılmıştır. Bütün ekstralarının *S. mutans* (1a103), *S. mutans* (2a7) ve *S. aureus* (GMC7) üzerinde antimikrobiyel aktivitesinin olmadığı diğer bakteriler üzerinde ise farklı oranlarda etki gösterdikleri belirlenmiştir. Su ekstrelerinin %99.20 metanol ekstrelerinin %95.05 ve etil asetat ekstrelerinin ise %95.22 oranlarına varan antibiyofilm etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Ekstrelerin biyofilm oluşumunu azaltmada oluşmuş biyofilmi gideriminden daha etkili oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca en yüksek antioksidan aktiviteye etil asetat ekstrelerinin sahip olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Ceviz, *Juglans regia*, antibiyofilm, bitki ekstraları, antibakteriyel etki

## ANTIOXIDANT, ANTIMICROBIAL AND ANTIBIOFILM ACTIVITY OF LEAF EXTRACTS OF WALNUT

### ABSTRACT

In this study, the antibiofilm activity of water, ethyl acetate and methanol extracts of walnut (*J. regia*) leaves were investigated. Antimicrobial and antibiofilm activity of the extracts were investigated against *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. hydrophila*, *S. enterica*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. aureus*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes* Serovar I, *L. monocytogenes* 19111, *L. monocytogenes* 4b 19115, *L. ivanovii* 19119, *L. innocua* 6a 33090, *S. mutans*, *S. anginosus*, *B. cereus*, *B. safensis* and *B. mojavensis*. It was determined that all extracts did not show antimicrobial activity on *S. mutans* (1a103), *S. mutans* (2a7) and *S. aureus* (GMC7), but showed different effects on other bacteria. It was determined that water extract had an antibiofilm effect up to 99.20%, methanol extract 95.05% and ethyl acetate extract 95.22%. It has been determined that the extracts are more effective in preventing biofilm formation than removing the formed biofilm. In addition, it was determined that ethyl acetate activity had the highest antioxidant activity.

**Keywords:** Walnut, *Juglans regia*, antibiofilm, plant extract, antibacterial effect

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: sevilayyapici@ogr.eskisehir.edu.tr

☎: (+90) 530 040 5725

Sevilay Yapıcı; ORCID no: 0000-0003-2298-4892

Merih Kıvanç; ORCID no: 0000-0002-8647-3428

## GİRİŞ

Biyofilmler gıda endüstrisinde önemli sorun teşkil etmektedirler. Biyofilmler gıda işleme ekipmanları ve gıdalar ile temas eden yüzeylere çok kısa sürelerde tutunup giderimi zor olan olgun hallerine dönüşerek insan sağlığını tehdit etmektedirler (Bakırdere, 2015). Bakteriye biyofilmleri hedef alan etkili tedavi yok denecek kadar azdır, çünkü biyofilmler doğal olarak geleneksel antibiyotiklere direnç göstermektedirler (Gilbert ve ark., 2002). Bu durum, seçim baskısını ve buna bağlı olarak direnç gelişimini azaltmak için antibiyofilmler etkili ancak bakterisidal aktiviteye sahip olmayan ajanların keşfine olan ihtiyacı arttırmaktadır (Bakkiyaraj ve ark., 2013). Gıda endüstrisinde de kimyasal koruyucularının kullanımlarının azaltılması ve antibiyotiklere karşı artan direnç nedeniyle doğal antimikrobiyel bileşiklerin kullanımına artan bir ilgi vardır (Cowan, 1999; Oliveira ve ark., 2007).

Bitkiler yeni antimikrobiyel arayışında her zaman, mikrobiyologlar için kaçınılmaz alt yapıyı oluşturmaktadır (Cowan, 1999; Erdoğan ve Everest, 2012). Ceviz, iklim koşullarının uygunluğu nedeniyle ülkemizin tüm tarım bölgelerinde yetiştirilmekte ve özellikle kuru meyve şeklinde çok tüketilmektedir (Bayazit ve ark., 2016). Ayrıca ceviz bitkisinin ağaç, meyve kabuğu ve yaprakları ilaç ve kozmetik endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Mehrabian ve ark., 2000; Stampar ve ark., 2006; Oliveira ve ark., 2008). Ceviz, terapötik olarak aktif birkaç bileşen, özellikle polifenollerini içeren, mikrobiyel enfeksiyonlar, mide ağrısı, tiroit bozuklukları, kanser, kalp hastalıkları ve sinüzit gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde geleneksel tıpta eski çağlardan beri kullanılan bir bitkidir (Bhatia ve ark., 2006). Yapılan çalışmalarda fenollerin ve/veya fenolik özütlerin antimikrobiyel aktivitesi gösterilmiş, antibiyotiklere ve kimyasal koruyuculara karşı iyi bir alternatif oldukları belirtilmiştir (Fernández ve ark., 1996; Hoult ve Payá, 1996; Rauha ve ark., 2000; Puupponen-Pimiä ve ark., 2001; Zhu ve ark., 2004; Proestos ve ark., 2005; Sousa ve ark., 2006; Pereira ve ark., 2006, 2007a,b).

Çalışmamızda, *J. regia* yapraklarının etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının günümüzün önemli

gıda hijyen problemi haline gelmiş olan biyofilm yapısının oluşumunun inhibe edilmesi ve oluşmuş biyofilmlerin giderilmesine karşı etki kapasitesinin araştırılması amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve YÖNTEM

### Test mikroorganizmaları

*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. hydrophila* ve *S. enterica*, *S. warneri* (S22 ve KA 14.1), *S. capitis*, *E. faecium* (1d3 ve MİT 2231), *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. aureus*, GMC7, *L. monocytogenes* (Serovar I, 19111 ve 4b 19115), *L. ivanovii* 19119, *L. innocua* 6a 33090, *S. mutans* (1a21, 2a21, 1a103 ve 2a7), *S. anginosus* KA1260, *B. cereus*, *B. safensis* pca 15.3 ve *B. mojavensis* KA159 Eskişehir Teknik Üniversitesi Mikrobiyoloji biriminden sağlanarak çalışmalarda kullanılmıştır. Bakterilerin saflık kontrolü kültürel ve mikroskopik olarak kontrol edildikten sonra teste alınmıştır.

### Ceviz yaprak ekstraktlarının hazırlanışı

Ceviz yaprakları Ankara Bumsuz Köyü (39.169571 enlem ve 32.687328 boylam) mevkiinden ilkbahar mevsiminde toplanıp çeşme suyu ile yıkandıktan sonra gölgede kurutulmuştur. Kuruduktan sonra küçük parçalar halinde ufalanıp 1:10 oranında etil asetat ( $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ ), metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) ve su ( $\text{H}_2\text{O}$ ) ile ayrı ayrı karıştırılmıştır. Çalkalamalı etüvde ( $37^\circ\text{C}$ , 110 rpm) 24 saat bekletildikten sonra su ekstresi 0.22  $\mu\text{m}$  milipordan direkt olarak geçirilerek, metanol ve etil asetat ekstraktları ise evaporasyon ile çözücülerini uzaklaştırıldıktan sonra uygun çözücü (DMSO (%25)) ile çözdürüldükten sonra 0.22  $\mu\text{m}$  milipordan geçirilerek kullanılmıştır. Ekstraktlar  $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır (Çizelge 1) (Umay, 2007).

Çizelge 1. Ceviz yaprağı ekstraktlarında elde edilen madde miktarları

Table 1. Amount of substance obtained in walnut leaf extracts	
	Madde miktarı (mg/ml) (Amount of substance) (mg/ml)
Ceviz yaprağı ekstraktları (Walnut leaf extracts)	
Metanol (Methanol)	32.50
Etil asetat (Ethyl acetate)	16.00
Su (Water)	11.00

### Test bakterilerinin biyofilm oluşturma kapasitesinin belirlenmesi

Test bakterilerinin biyofilm oluşturma kapasitesi mikrotitrasyon plaka ve kongo kırmızısı agar (CRA) olmak üzere iki yöntemle belirlenmiştir.

### *Mikrotitrasyon plaka testi ile biyofilm oluşum kapasitesinin belirlenmesi*

Test bakterilerinin %2 oranında 9 farklı karbonhidrat ilave edilmiş besiyerlerinde (glukoz, fruktoz, maltoz, laktoz, rafinoz, mannoz, sakkaroz, galaktoz ve nişasta) biyofilm oluşturma durumları belirlenmiş ve en iyi biyofilm oluşturdıkları karbonhidrat antibiyofilm deneylerinde kullanılmıştır. Bakteri kültürleri %2 karbonhidrat içeren 5 ml Triptik Soy Broth (TSB)'a ekilerek 37°C'de gece boyunca geliştirilmiş ve deney öncesi 1/40 oranında seyreltilmiştir. 200'er µl bakteri kültürleri mikrotitrasyon plakasının her bir çukuruına dağıtılmıştır. TSB negatif kontrol olarak kullanılmıştır. İnkübasyondan sonra, bakteri yoğunluğunu tespit etmek için plakalar 490 nm'de spektrofotometrede okunmuştur. Daha sonra kuyucuklar boşaltılıp serum fizyolojik (SF) ile 3'er kere yıkanmıştır. Plakalar kurutulduktan sonra kuyucuklara 200'er µl metanol ilave edilmiştir. 10 dk sonra metanol uzaklaştırıldıktan sonra kuyucuklar 100'er µl %0.1 kristal viyole ilave edilerek boyanmış ve oda sıcaklığında 15 dk bekletilmiştir. Daha sonra plakalar, çeşme suyu ile yıkanmıştır. Plakalar kuruduktan sonra boyanın çözünmesi için 200'er %33'lük glasiyel asetik asit eklenmiş ve spektrofotometrede 570 nm'de absorbans belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar OD570<0.120 (-); OD570=0.120-0.240 (+); OD570=0.240-0.500 (++); OD570=0.500-1.00 (+++); OD570=1.00-2.00 (++++); OD570>2.00 (+++++) skalasına göre değerlendirilmiştir (Nyenje ve ark., 2012).

### *Congo red agar (CRA)'da biyofilm üretiminin fenotipik karakterizasyonu*

Bakteriler %5 (a/h) sakkaroz ile takviye edilmiş %0.08 (a/h) kongo kırmızısı içeren BHI (Brain Heart Infusion) agara ekilmiştir. Mikroorganizmalar 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Biyofilm üreticisi suşlar siyah koloniler oluştururken biyofilm üreticisi olmayan suşlar

kırmızı koloniler oluşturmaktadır (Cotter ve ark., 2009). Koyu siyah koloniler güçlü, siyah-pembe koloniler orta ve pembe koloniler zayıf biyofilm üreticisi olarak derecelendirilmiştir (Şekil 1). Testler çift tekrarlı olarak yapılmıştır.

### **Ceviz yaprağı ekstralarının toplam fenolik madde tayini**

Ceviz yaprağı ekstralarında fenolik miktarı Folin & Ciocalteu (FC) reaktifi ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Bray ve Thorpe, 1954). Toplam fenolik madde tayin edilirken Mavi ve ark.'nın (2004) kullandığı yöntem uygulanmıştır. Bu amaçla, 96 kuyulu düz tabanlı bir mikrolakada ekstraların 10 µl'si ve 10 µl FC fenol reaktifi ile karıştırılıp üzerine 30 µl %2'lik (a/h) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>'ün sulu çözeltisi ilave edilmiştir. Karışıma 250 µl dH<sub>2</sub>O ilave edilip son hacim 300 µl'ye tamamlanmıştır. 30 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildikten sonra mikrolakaya okuyucuda 760 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Kontrol olarak ekstre yerine dH<sub>2</sub>O kullanılmıştır. Aynı prosedür, standart gallik asit çözeltisi için tekrarlanmış ve kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Ekstrelerin toplam fenolik derişimi gallik asit kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır. Deneyler her bir ekstre ve gallik asit için 4 kez tekrarlanmıştır. Sonuçlar mg GAE/g kuru ekstre olarak ifade edilmiştir.

### **Ceviz yaprağı ekstralarının toplam flavonoid madde tayini**

Toplam flavonoid madde tayin edilirken alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde 100 µl test materyali çözeltisi, 400 µl su ve 30 µl %5'lik NaNO<sub>2</sub> ile karıştırılmıştır. 5 dakika sonra 30 µl %10'luk AlCl<sub>3</sub> ilave edilmiştir. 6. dk'da 200 µl 1N NaOH ilave edilip distile su ile son hacim 1000 µl'ye tamamlanmıştır. Negatif kontrol için madde yerine distile su ve standart olarak da kersetin kullanılmıştır. 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 510 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. Absorbans tayini yapıldıktan sonra kersetin standart eğrisi çizilmiş ve grafiğe göre ekstraların flavonoid maddeleri belirlenmiştir (Zhinsen ve ark., 1999).



### **Antioksidan aktivite tayini**

Antioksidan aktivitesi DPPH süpürme aktivitesi ve ABTS persülfat yöntemleri olmak üzere iki ayrı yöntemle belirlenmiştir.

### **DPPH süpürme aktivitesi**

Bu yöntemde 2,2-difenil-1 pikrilhidrazil (DPPH), radikal antioksidan kapasite ölçümleri için kullanılmaktadır. 0.39 ml metanolik DPPH çözeltisi (0.1mM), 0.1 ml ekstre ve 0.49 ml metanol ile karıştırılmıştır. Vortekslenildikten sonra 1 saat karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletilmiştir. Absorbans değeri spektrofotometrede 515 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Kör olarak sadece DPPH çözeltisi kullanılmıştır (Singh ve ark., 2002). Absorbans değerleri belirlendikten sonra aşağıdaki formüle göre ekstrelerin % DPPH süpürme aktiviteleri belirlenmiştir.

$$\text{DPPH süpürme aktivitesi (\%)} = \frac{\text{OD kör} - \text{OD deney}}{\text{OD kör}} \times 100$$

### **ABTS persülfat yöntemi**

ABTS radikalinin okside olarak ABTS+ radikal katyonuna yükseltgenmesi esasına dayanan elektron transfer temelli bir antioksidan kapasite tayin yöntemidir. ABTS+ radikal çözeltisi ile muhtemel antioksidan içeren bir örneğin birleştirilmesi, yükseltgenmiş mavi/yeşil renkli ABTS+ radikal katyonunun indirgenmesi ve renk şiddetinin azalmasına neden olmaktadır (Prior ve ark., 2005). 7 mM ABTS amonyum suda çözülmüş ve 1:1 oranında 2.45 nmol potasyum persülfat ile karıştırılıp oda sıcaklığında 12-16 saat süresince inkübe edilmiştir. Daha sonra elde edilen koyu mavi çözelti pH 7.4'te distile su ile 734 nm dalga boyundaki absorbans değeri 0.7'ye kadar seyreltilmiştir. 150 µl bitki ekstresi 2850 µl seyreltilmiş çözelti ile karıştırılıp 6 ve 10 dakika sonra 30°C de absorbans okunmuştur. Absorbans değerleri aşağıdaki formüle yerleştirilerek antioksidan etki tayin edilmiştir (Huang ve ark., 2005; Selçuk, 2012).

$$\text{ABTS (\%)} = \left\{ 1 - \frac{\text{OD deney}}{\text{OD kör}} \right\} \times 100$$

### **Ceviz yaprağı ekstrilerinin antimikrobiyel aktivitesinin belirlenmesi**

Ceviz yaprağı ekstrilerinin minimal inhibitör konsantrasyonları (MİK) mikro dilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir (CLSI, 2009). MİK analizi, CLSI kılavuz prosedürlerine göre sıvı mikro-seyreltme teknikleri ile Muller Hinton Broth (MHB) kullanılarak yapılmıştır. Bakteriler MHB'de bir gece inkübe edildikten sonra, bakteriler çift kuvvetli sıvı besi yerlerinde 0.5 Mcfarland standardına göre ayarlanmıştır. Steril 96 kuyucuklu mikro plakaların kuyucuklarına her bir ekstre için iki kat seri olarak seyreltilmiş farklı dilüsyonlarından 100'er µl ilave edilmiştir. Ardından 100 µl bakteri süspansiyonu her göze aşılmalıdır. 200'er µl MHB negatif kontrol olarak kullanılmıştır. 37°C'de 24 saat inkübasyonu takiben, 40 µl 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) her kuyucuğa ilave edilmiş ve 10-15 dk daha inkübe edilmiştir. Bakteri büyümesi kuyucuklarda pembe-kırmızı bir renk oluşması ile gözlemlenmiştir. Üremenin önlendiği en düşük konsantrasyonda olan kuyucuktaki konsantrasyon MİK değeri olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak vankomisin (10 mg/ml) ve kloramfenikol (10 mg/ml) kullanılmıştır.

Bakterisidal etkiden bahsedebilmek için canlı bakterilerin miktarının %99.9 azalması gerekmektedir. MİK belirlendikten sonra gözle görülür gelişmenin olmadığı kuyucuklardan Nutrient agar (NA) ekim yapılarak minimal bakterisidal konsantrasyon belirlenmiştir. 37°C'de inkübe edildikten sonra üremenin görülmediği, bakterisidal etkili ekstre konsantrasyonu belirlenmiştir (Kaygusuz ve Töreci, 1998).

### **Antibiyofilm aktivitenin belirlenmesi**

Farklı konsantrasyonlarda ceviz ekstrilerinin biyofilm oluşumunu azaltma ve oluşmuş biyofilmleri giderme kabiliyetleri 96 kuyucuklu polistiren düz tabanlı mikrotitre plakalar ile belirlenmiştir. Bu nedenle 2 farklı deney düzeneği kurularak MİK dozlarının alt, üst ve ara dozlarının etkileri araştırılmıştır. İlk deney düzeneğinde ekstriler ve bakteriler aynı anda ekilmiş ve böylece ekstrilerin biyofilm oluşumunu azaltmadaki kabiliyetleri tayin edilmiştir. İkinci deney düzeneğinde ise öncelikle bakteriler

mikroplakalara ekilerek biyofilm oluşturmaları sağlanmış ve sonra üzerlerine ekstreler ilave edilerek oluşmuş biyofilmler üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Bakteri kültürleri %2 oranında karbonhidrat içeren 5 ml TSB'de 18 saat (37°C'de) geliştirilmiş ve deney öncesi 1/40 oranında seyreltilmiştir. Ekstrelerin her bir konsantrasyonundan kuyucuklara 100 µl dağıtılarak üzerine bakteri kültürlerinden 100'er µl aktarılmıştır. Sadece TSB (%2 şeker içeren) ve bakteri kültürü kontrol olarak kullanılmıştır. 24 saat 37°C'de inkübasyondan sonra mikrotitrasyon plaka testi ile biyofilm oluşum kapasitesinin belirlenmesi bölümünde verilen yöntemle biyofilm miktarı belirlenmiştir. İkinci deney düzenğinde ise 1/40 oranında gecelik kültürden seyreltilmiş bakteri kültüründen 200 µl olacak şekilde plaklara ekilmiş ve 24 saat 37°C inkübe edilerek biyofilm oluşturmaları sağlanmış, sonra kuyucuklardan 100 µl pipetle uzaklaştırılmıştır. Deney gruplarına 100 µl ekstre dilüsyonları, kontrol grubuna ise 100 µl taze TSB (%2 şeker içeren) plakalara aktararak 37°C de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra biyofilm mikrotitrasyon plaka testi ile biyofilm oluşum kapasitesinin belirlenmesi bölümünde verilen yöntemle belirlenmiştir. Sonuçlar mikroorganizma ve besiyeri içeren kontrol sonuçları ile kıyaslanarak %biyofilm giderimi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Sandasi ve ark., 2010).

$$\% \text{Biyofilm giderim} = \frac{\text{ODkör} - \text{ODDeney}}{\text{ODkör}} \times 100$$

### SONUÇ ve TARTIŞMA

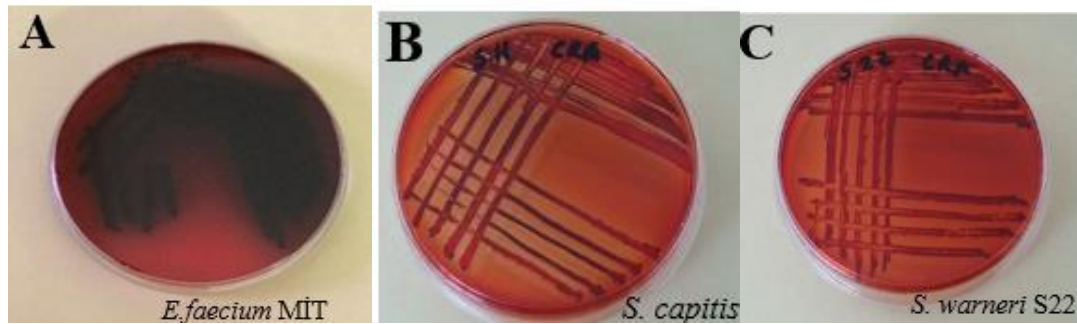
Cevizin, yeşil kabuğu, tohumu, kabuk ve yaprakları, bileşenleri ilaç ve kozmetik sanayinde, geleneksel tıpta fungal veya bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde yoğun bir şekilde yaygın olarak kullanılmaktadır (Wichtl ve Anton, 1999; Stampar ve ark., 2006; Chaleshtori ve ark., 2011). Yapılan çalışmalarda ceviz ürünlerinin antimikrobiyel aktivitelerini gösterilmiştir; ancak ceviz yaprakları ve onların antibiyofilm üzerine etkileri hakkında sayılı çalışma bulunmaktadır (Qadan ve ark., 2005). Araştırmamız yaprak ekstrelerinin antibiyofilm ve antimikrobiyel etkileri ve bu etkilerin oluşma sebepleri üzerine yoğunlaştırılmıştır.

### Test bakterilerinin biyofilm oluşturma kapasitesi

Farklı karbonhidratlar içeren besi yerlerinde test bakterileri farklı oranlarda biyofilm oluşturmuştur. *S. warneri* (KA 14.1 ve S22), *E. faecium* (1d3 ve mit 2231), *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. enterica*, *S. anginosus* KA1260, *S. aureus*, *S. aureus* GMC7, *L. monocytogenes* (Serovar I, 19111, ve 4b 19115), *L. innocua* 6a 33090, *S. mutans* 2a7, *B. mojavensis* KA159 ve *S. capitis* S11 laktozlu, *E. faecalis* 29212 ve *A. hydrophila* ise früktozlu, *B. cereus* ve *B. safensis* pca 15.3 maltozlu, *S. mutans* (1a21, 2a21 ve 1a103) sakkarozlu, *L. ivanovii* 19119 ise glikozlu ortamda en yüksek biyofilm oluşturmuşlardır (Çizelge 2). Antibiyofilm deneylerine bu belirlenen besiyerleri ile devam edilmiştir. Aynı skala aralığında olan sonuçlardan en yüksek absorbansa sahip olan karbonhidrat seçilmiştir. Kongo kırmızı agarda *S. aureus*, *S. aureus* GMC7, *E. faecium* ve *S. warneri* KA 14.1'in güçlü biyofilm oluşturdukları, mikrotitre testi ile de *S. warneri* KA 14.1, *S. aureus* GMC7'nin yüksek biyofilm oluşturdukları gözlenmiştir. Bu değerlere göre *S. aureus* GMC7'nin ve *S. warneri* KA 14.1'in CRA ve mikrotitre deney sonuçlarının uyumlu olduğu *S. aureus* ve *E. faecium* MİT'in ise mikrotitre testine göre orta dereceli olarak değerlendirilebilecekken CRA testine göre güçlü biyofilm oluşturdukları tayin edilmiştir. Sonuçlar mikrotitre testiyle karşılaştırıldığında genel olarak sonuçların uyumlu olduğu görülmüştür (Şekil 1).

### Toplam fenolik ve flavonoit madde içeriği

Ceviz yaprağının bileşiminde fenolik asitler, tanenler, askorbik asit, kafeik asit, flavonoitler, klorogenik asit, ferulik asit, kateşin, vanilik asit, parakumarik asit ve ceviz özüğü juglon bulunmaktadır (Pereira ve ark., 2007b; Pereira ve ark., 2008; Gupta ve ark., 2019). Çeşitli çalışmalar fenollerin ve/veya fenolik ekstraktların antimikrobiyel aktivitesini göstermiştir (Proestos ve ark., 2005; Sousa ve ark., 2006), bu da onları antibiyotiklere ve kimyasal koruyuculara iyi bir alternatif haline getirmektedir. Ceviz yapraklarında bulunan fenoller ve flavonoitler muhtemelen bu bitkiden elde edilen ekstrelerin antibakteriyel aktivitelerinden sorumludur (Stampar ve ark., 2006). Sahip olduğu bu aktivite flavonoik bileşenlerin bakterilerin tutunmasını önlemesi yoluyla olabilir (Gupta vd., 2019).



Şekil 1. Biyofilm oluşumunun CRA besiyerindeki görüntüsü A: güçlü biyofilm; B: orta biyofilm; C: zayıf biyofilm

Figure 1. Image of biofilm formation in CRA medium A: strong biofilm; B: medium biofilm; C: weak biofilm

Çizelge 2. Bakterilerin farklı karbon kaynaklarında biyofilm oluşturma oranları

Table 2. Biofilm formation rates of bacteria in different carbon sources

Bakteriler (Bacteria)	Karbonhidratlar (Carbohydrates) (%2)								
	Glikoz (Glucose)	Fruktoz (Fructose)	Maltoz (Maltose)	Laktöz (Lactose)	Mannoz (Mannose)	Rafinoz (Raffinose)	Sakkaroz (Sucrose)	Galaktoz (Galactose)	Niştasta (Starch)
<i>S. warneri</i> Ka 14.1	-	++	++	+++	++	++	+++	++	++
<i>S. warneri</i> S22	+	-	-	+++	-	++	-	+	-
<i>B. mojavensis</i> Ka 15.9	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	++	-
<i>B. safensis</i> Pca 15.3	+	+	++++	++++	+++	+++	++	++	++
<i>B. cereus</i>	+	-	+++	++	++	++	+++	+	+
<i>S. capitis</i> S11	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++
<i>S. aureus</i>	+	-	-	+++	-	+++	-	++	+
<i>S. aureus</i> Gmc7	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++
<i>L. monocytogenes</i> 19111	+	-	-	+++	+	++	++	+	+
<i>L. monocytogenes</i> 4b 19115	+++	+	+++	+++	++	++	-	+++	++
<i>L. innocua</i> Ga 33090	++	+	+	+++	-	+	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i> Serovar I	++	-	-	+++	++	+	++	++	+
<i>L. ivanovii</i> 19119	+++	-	-	+++	++	+++	+	+	++
<i>S. mutans</i> 1a21	++++	+	++	++	++++	+++	++++	++	++
<i>S. mutans</i> 1a103	++	++	+++	++	+++	+++	++++	++	++
<i>S. mutans</i> 2a21	++++	++++	++	++	+++	+++	++++	++	++
<i>S. mutans</i> 2a7	+++	-	+++	+++	++	+	+	+	+++
<i>S. anginosus</i> KA 1260	-	++	-	+++	++	+++	-	++	+++
<i>E. faecalis</i> 29212	+++	+++	++	+++	+++	++	++	++	+++
<i>E. faecium</i> 1d3	+	-	+	+++	++	+++	-	++	++
<i>E. faecium</i> mit 2231	++	-	-	+++	+	+++	+++	++	-
<i>K. pneumoniae</i>	+++	-	+	++++	++++	++++	+++	+++	+++
<i>P. aeruginosa</i>	+++	-	+++	++++	++	+++	++	+	+
<i>A. hydrophila</i>	+++	+++	+++	+++	++++	++	+	+++	++
<i>S. enterica</i>	+	-	++	+++	++	++	++	++	++

OD570 <0.120 (-); OD570 = 0.120-0.240 (+); OD570 = 0.240-0.500 (++); OD570 = 0.500-1.00 (+++); OD570 = 1.00-2.00 (++++); OD570 >2.00 (+++++)

Doğan ve ark.'larının 2014'te ceviz yaprağının toplam fenolik maddelerine baktıkları bir çalışmada çoktan aza doğru sırasıyla metanol ekstralarında 73.16 ve 69.18 mg GAE/g; etanol ekstralarında 67.12 ve 63.81 mg GAE/g ve su ekstralarında 44.34 ve 48.91 mg GAE/g miktarlarında toplam fenolik bulunduğunu belirtmişlerdir. Zoral ve Turgay (2014) yaptıkları bir çalışmada ceviz yaprağının etil asetat ekstrasında 635.8 mg GAE/100g, metanol

ekstrasında 1650 mg GAE/100g, su ekstrasında 1064.3 mg GAE/100g olarak toplam fenolik maddeleri belirlenmiştir. Çalışmamızda su ekstrasının toplam fenolik içeriği 75.001±0.089 mg GAE/g; metanol ekstrasının toplam fenolik içeriği 50.085±0.121 mg GAE/g ve etil asetat ekstrasının ise 28.632±0.649 mg GAE/g olarak belirlenmiştir (Çizelge 3). Doğan ve ark.'larının çalışmasından farklı olarak çalışmamızda su ekstrasında diğer ekstralara oranla daha fazla

toplam fenolik madde bulunduğu belirlenmiştir. Bu durum çalışmamızda kullandığımız su

ekstreminin çok yoğun renkli bir çözelti olmasına bağlanmıştır.

Çizelge 3. Test materyallerinin toplam fenolik maddeleri

Table 3. Total phenolic contents of test materials

	TP (mg GAE/g)±SP
Ceviz Yaprığı Su ( <i>Walnut leaf water</i> )	75.001±0.089
Ceviz Yaprığı Metanol ( <i>Walnut leaf methanol</i> )	50.085±0.121
Ceviz Yaprığı Etil asetat ( <i>Walnut leaf ethyl acetate</i> )	28.632±0.649

Çalışmamızda test ettiğimiz ceviz yaprağı ekstralarında flavonoid miktarı yüksekten aza doğru 54.990 mg QE/g- 11.439 mg QE/g arasında bulunmuştur (Çizelge 4). Çalışmamızda

elde edilen antimikrobiyel aktivitenin ekstradaki flavonoid miktarı ile paralellik gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4. Ceviz yaprağı ekstralarının toplam flavonoid (TF) maddeleri

Table 4. Total flavonoid (TF) contents of walnut leaf water extracts

	TF mg QE/g
Ceviz Yaprığı Su ( <i>Walnut leaf water</i> )	54.992
Ceviz Yaprığı Etil asetat ( <i>Walnut leaf ethyl acetate</i> )	30.324
Ceviz Yaprığı Metanol ( <i>Walnut leaf methanol</i> )	11.439

#### Antioksidan aktivite

Oksidasyon tepkimelerine neden olan moleküllerin etkilerinin azaltılması veya oksidasyonun engellenmesi işlemlerine antioksidan etki denmektedir. Oksidasyon tepkimeleri sonucunda serbest radikaller üretilmekte ve bunun devamında zincirleme tepkimeler meydana gelerek canlı hücrelere zarar vermektedir. Antioksidanlar bu zincirleme tepkimede serbest radikali ortadan kaldırarak durdurmakta ve radikal yerine kendisi okside olarak oksidasyon tepkimesini gerçekleştirmektedir (Kale ve ark., 2011). Masek ve ark. (2019) yaptıkları bir çalışmada çeşitli ceviz yapraklarının %70'lik etanol ekstralarının antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. Ceviz yapraklarının DPPH indirgeme aktivitesini

%6.72±0.34 ve ABTS+ süpürme aktivitesi ise 6.94±0.35 olarak belirtilmiştir. Çalışmamızda ceviz yaprağı ekstralarının DPPH indirgeme aktivitesinin çoktan aza doğru sırasıyla etil asetat (%91.57), metanol (%39.37) ve su (%8.01) ekstralarında olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 5). ABTS+ süpürme aktivitelerine bakıldığında ise yine en yüksek oranlı olanın etil asetat (%73.25) ekstresine ait olduğu bunu su ekstresi (%46.77) ve metanol ekstresi (%37.24) takip ettiği belirlenmiştir (Çizelge 6). Araştırmacıların sonuçları ile karşılaştırıldığında ceviz yapraklarımızın yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Bu durum bitkilerin toplandığı yerin, laboratuvar şartları, ekstraksiyon koşullarına bağlı olarak farklılık gösterdiği düşünülmektedir.

Çizelge 5. Ceviz yaprağı ekstralarının DPPH giderme yüzdeleri (%)

Table 5. DPPH scavenging activity (%) of walnut leaf water extracts

	DPPH giderme yüzdeleri (%) DPPH scavenging activity (%)
Ceviz yaprağı etil asetat ( <i>Walnut leaf ethyl acetate</i> )	91.57
Ceviz yaprağı metanol ( <i>Walnut leaf methanol</i> )	39.37
Ceviz yaprağı su ( <i>Walnut leaf water</i> )	8.01

Çizelge 6. Ceviz yaprağı ekstrelerinin ABTS+ serbest radikal yakalama aktivitesi (%)  
Table 6. ABTS+ free radical scavenging activity (%) of walnut leaf water extracts

	ABTS+ serbest radikal yakalama aktivitesi (%) ABTS+ free radical scavenging activity (%)	
	6.dk (6th min)	10.dk (10th min)
Ceviz Yaprağı Etil asetat ( <i>Walnut leaf ethyl acetate</i> )	73.25	75.72
Ceviz Yaprağı Su ( <i>Walnut leaf water</i> )	46.77	46.29
Ceviz Yaprağı Metanol ( <i>Walnut leaf methanol</i> )	37.24	36.67

### Antimikrobiyel aktivite

Ceviz yaprağı ekstreleri test mikroorganizmalarına karşı farklı oranlarda antimikrobiyel aktivite göstermiştir. Etil asetat, metanol ve su ekstrelerinin değişen miktarları test bakterilerini inhibe etmiştir. Su ve metanol ekstrelerinin test

edilen bakteriler üzerinde bakterisidal etkilerinin olmadığı belirlenmiştir. Tüm sonuçlar incelendiğinde tüm ekstrelerin ortak olarak *S. mutans* 1a103 ve *S. mutans* 2a7 bakterileri üzerinde antimikrobiyel etkilerinin bulunmadığı belirlenmiştir (Çizelge 7).

Çizelge 7. Ceviz yaprağı ekstrelerinin bakteriler üzerindeki antimikrobiyel aktivite sonuçları  
Table 7. Antimicrobial activity results of walnut leaf extracts on bacteria

Test Bakterileri ( <i>Test bacteria</i> )	Ceviz Yaprağı Ekstreleri (mg/ml) ( <i>Walnut Extracts</i> )			Antibiyotik (mg/ml) ( <i>Antibiotic</i> )				
	Metanol* ( <i>Methanol</i> )	Etil asetat ( <i>Ethyl acetat</i> )	Su* ( <i>Water</i> )	Kloramfenikol ( <i>Chloramphenicol</i> )		Vankomisin ( <i>Vancomycin</i> )		
	MİK MIC	MİK MIC	MBK MBC	MİK MIC	MBK MBC	MİK MIC	MBK MBC	
<i>S. capitis</i> S11	0.51	2.00	4.00	1.38	0.02	10.00	10.00	10.00
<i>S. aureus</i> GMC7	--	--	--	--	0.26	0.51	0.13	--
<i>S. aureus</i>	--	1.00	--	--	0.26	10.00	0.26	10.00
<i>S. warneri</i> KA14.1	2.03	4.00	--	--	0.02	0.51	--	--
<i>S. warneri</i> S22	4.06	4.00	2.00	5.50	0.02	0.51	0.03	0.26
<i>E. faecalis</i> 29212	8.13	8.00	--	2.75	0.13	0.51	0.03	--
<i>E. faecium</i> 1d3	--	2.00	--	5.50	--	--	10.00	10.00
<i>E. faecium</i> MİT 2231	2.03	4.00	--	1.38	0.51	0.51	0.51	0.51
<i>L. ivanovii</i> 19119	--	4.00	--	--	10.00	10.00	0.13	0.13
<i>L. innocua</i> 6a 33090	--	4.00	--	--	10.00	10.00	--	--
<i>L. monocytogenes</i> 4b 19115	--	4.00	--	5.50	0.26	0.26	0.02	0.51
<i>L. monocytogenes</i> 19111	--	--	--	2.75	0.01	--	0.26	--
<i>L. monocytogenes</i> SerovarI	--	--	--	0.34	K	K	K	K
<i>B. cereus</i>	--	4.00	--	--	0.26	10.00	0.02	--
<i>B. safensis</i> PCA 15.3	16.25	4.00	--	--	0.03	0.51	0.01	--
<i>B. mojavensis</i> KA15.9	4.06	4.00	--	--	0.13	0.51	0.03	--
<i>S. mutans</i> 1a103	--	--	--	--	0.26	0.26	--	--
<i>S. mutans</i> 1A21	--	--	--	2.75	0.51	0.51	0.51	0.51
<i>S. mutans</i> 2A21	--	--	--	1.38	0.51	0.51	10.00	10.00
<i>S. mutans</i> 2A7	--	--	--	--	0.01	0.51	0.03	10.00
<i>S. anginosus</i> KA1260	2.03	0.50	--	2.75	10.00	10.00	10.00	10.00
<i>P. aeruginosa</i>	2.03	4.00	--	--	0.51	0.51	10.00	--
<i>K. pneumoniae</i>	16.25	--	--	--	0.26	10.00	10.00	10.00
<i>S. enterica</i>	16.25	--	--	--	0.13	10.00	10.00	--
<i>A. hydrophila</i>	16.25	--	--	1.38	K	K	K	K

\*Bakterisidal etkisi bulunmamaktadır (\*No bactericidal effect).

K: Çalışmalar devam ederken pandemi kısıtlamaları sırasında 2 bakterimiz kontaminasyon nedeniyle deney çalışmalarından çıkarılmıştır (K: While the studies continue, 2 of our bacteria were excluded from the experimental studies due to contamination during the pandemic restrictions).

*E. coli*, *B. subtilis*, *K. pneumoniae* ve *S. aureus* üzerine ceviz yeşil gövdesinin etanol, su ve etil asetat ekstralarının inhibitör etkili olduğu ve etanolik özüt, etil asetat ve su özütleriyle karşılaştırıldığında çok iyi aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Sharma ve ark., 2013). Bu farklılık ekstraksiyon yöntemlerinin farklılığından olabileceği gibi bakterilerin suş farklılığı nedeniyle de olabilmektedir. Çalışmamızda aynı türün bakterilerinin duyarlılığının farklı olduğunu gözlenmiştir.

Darmani ve ark. (2006) ceviz yaprağı su ekstrelerinin *S. mutans*, *S. salivarius*, *Lactobacillus casei* ve *Actinomyces viscosus*'un gelişmesini inhibe ettiğini bildirmiştir. Çalışmamızda bazı *S. mutans* (1a21 ve 2a21) ve *L. monocytogenes* (Serovar I ve 19111) türlerine karşı sadece su ekstresi etki gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 7).

*J. regia*'nın petrol eter, kloroform, etil asetat ve metanol özütlerinin 15 mg/ml'sinin *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus salivarius* ve *S. mutans* üzerinde önemli bir etkinliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Asma ve Yasmine, 2021). Çalışmamızda etil asetat ekstrelerinin *S. capitis*, *S. warneri* S22 üzerinde daha düşük oranlarda antimikrobiyel etkisinin iyi olduğu belirlenmiştir. Metanol ekstrelerinin *S. capitis* üzerindeki MİK değerinin diğer ekstrelelere oranla daha düşük olduğu belirlenmiştir. Yine Asma ve Yasmine tarafından yapılan çalışmada elde edilen değerden daha düşük oranlarda metanol ekstrelerinin *P. aeruginosa* üzerinde etil asetat ekstrelerine oranla daha iyi antimikrobiyel etkisinin olduğu belirlenmiştir (Çizelge 7). Sonuçlar arasında, cevizin toplandığı bölge, toplanma zamanı, deney koşulları gibi birçok etkenden dolayı farklılık görülebilmesi mümkün olabilmektedir.

*P. aeruginosa*'nın metanol ve etil asetat ekstralarına karşı duyarlı iken su ekstrelerine dirençli olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 7). Bulgularımıza benzer veriler Dolatabadi ve ark., (2018) ve Asma ve Yasmine (2021) tarafından da rapor edilmiştir.

Yiğit ve ark. (2009) ceviz yaprağının metanol (0.625 mg/ml) ve su (1.25 mg/ml) ekstrelerinin *S. aureus* ve *P. aeruginosa* üzerine antimikrobiyel etki

gösterdiğini belirlemişlerdir. Pereira ve ark., tarafından yapılan bir çalışmada ceviz yaprağı su ekstrelerinin *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae* türlerine karşı etkili olduğu belirlenmiştir (Pereira ve ark., 2007). Ancak çalışmamızda su ekstralarının söz konusu bakterilere karşı etkisiz kaldığı, metanol ekstrelerinin *P. aeruginosa* (2.03 mg/ml) üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir.

Mehrabian ve ark. (2000) ceviz yaprağı metanol ekstrelerinin daha etkili antimikrobiyel özelliğe sahip olduğunu, bunun aktif maddelerin alkolde farklı maddelerin çözünmesinden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Bu sonuç bizim çalışmamızla da örtüşmektedir.

Kocaçalışkan ve ark. (2018) *Pseudomonas gingivi*, *P. syringae*, *S. aureus*, *B. cereus* ve *Y. enterocolitica*'nın ceviz yaprağının alkol ve su ekstralarına duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar alkol ekstralarının su ekstralarından daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda da genel olarak etil asetat ve metanol ekstralarının su ekstrelerine oranla daha iyi antimikrobiyel aktivite gösterdikleri belirlenmekle birlikte türlere göre bazı farklılıkların olabileceği tayin edilmiştir. Örneğin *B. cereus* üzerinde metanol ekstresi daha etkili iken *L. monocytogenes* türleri üzerinde su ekstrelerinin daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Ceviz yaprağı ekstralarının antimikrobiyel etkilerinin karşılaştırılabilmesi adına kloramfenikol ve vankomisin antibiyotiklerinin aktiviteleri de araştırılmıştır. Antibiyotiklerin bazı bakteriler üzerinde farklı etkiler gösterebildikleri, her üç yaprak ekstrelerinin de etkisiz kaldığı *S. aureus* GMC7'e karşı etkili oldukları ancak vankomisin *L. innocua* ve *S. mutans* 1a103 üzerinde antimikrobiyel aktivitesinin olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 7).

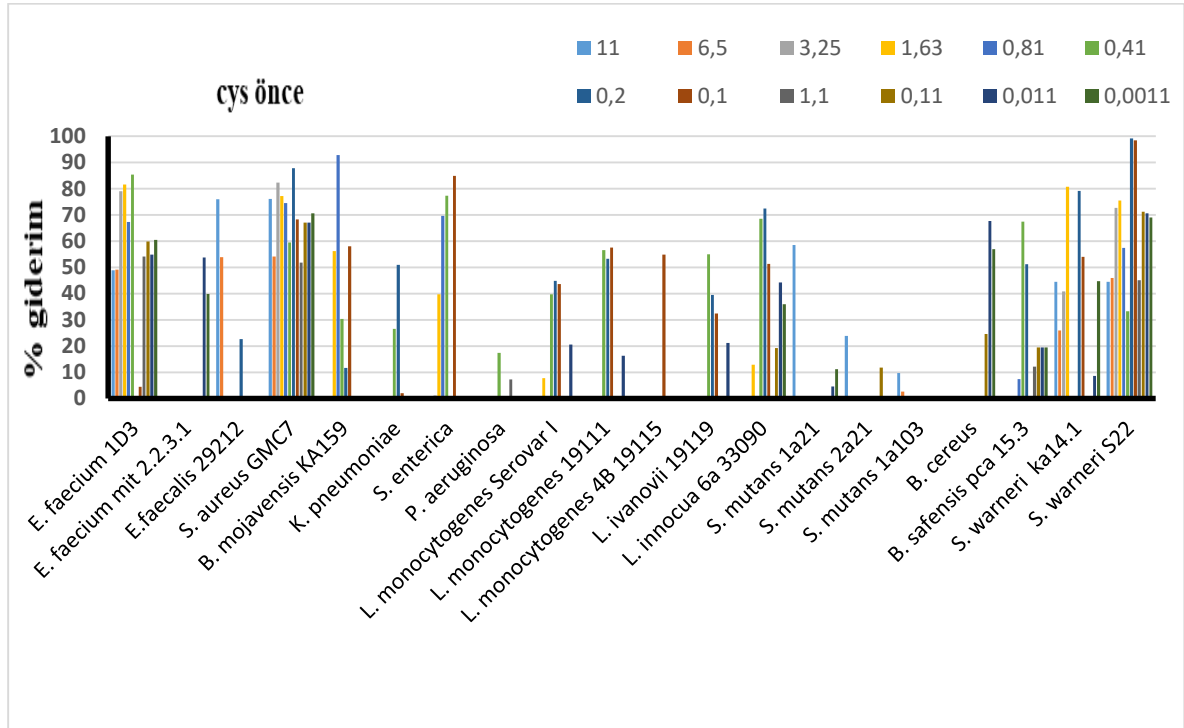
### Antibiyofilm aktivite

Gıda kaynaklı patojenler biyofilm oluşturmakta ve gıda endüstrisi için önemli bir gıda güvenliği sorunu olmaya devam etmektedirler (Gürlük ve ark., 2022). Araştırmamızda dünya çapında hâlâ bir halk sağlığı sorunu olan biyofilm oluşumunun inhibe edilmesi ve giderilmesi üzerine ceviz yaprağı ekstralarının etkileri araştırılmış ve

ekstrelerinin oluşmuş biyofilm gideriminde biyofilm oluşumunun inhibe edilmesine oranla daha az etki gösterdikleri belirlenmiştir. Ekstreler biyofilm oluşumundan önce ilave edildiğinde *Staphylococcus* türlerine karşı konsantrasyona bağlı olarak farklı oranlarda inhibisyon etkisi göstermiştir.

CYS (ceviz yaprağı su) ekstresinin aynı türün farklı suşları üzerinde farklı oranlarda etkili olduğu

görülmüştür. *S. aureus*'un biyofilminin oluşumunu azaltmazken oluşmuş biyofilmi üzerinde %94.33 oranında inhibisyon sağladığı belirlenmiştir. *S. aureus* GMC7 için en yüksek inhibisyon %87.84 oranında yine CYS ekstresi ile elde edilmiştir. *S. warneri* ka14.1 üzerinde %80.69 oranında, *S. warneri* S22 üzerinde ise %99.20 oranında biyofilm oluşumunu inhibe etmiştir (Şekil 2).

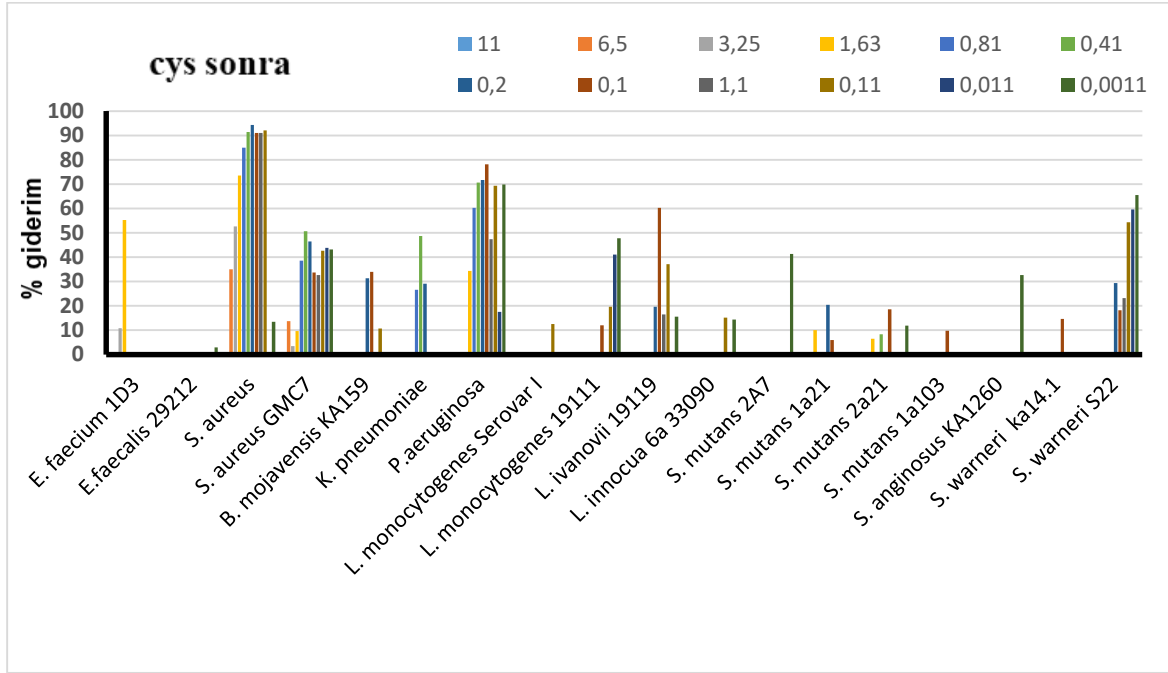


Şekil 2. Ceviz yaprağı su ekstresinin biyofilm oluşmadan önce ortama ilave edilmesi durumunda yüzde biyofilm giderimi

Figure 2. Percent biofilm removal if walnut leaf water extract is added to the medium before biofilm formation

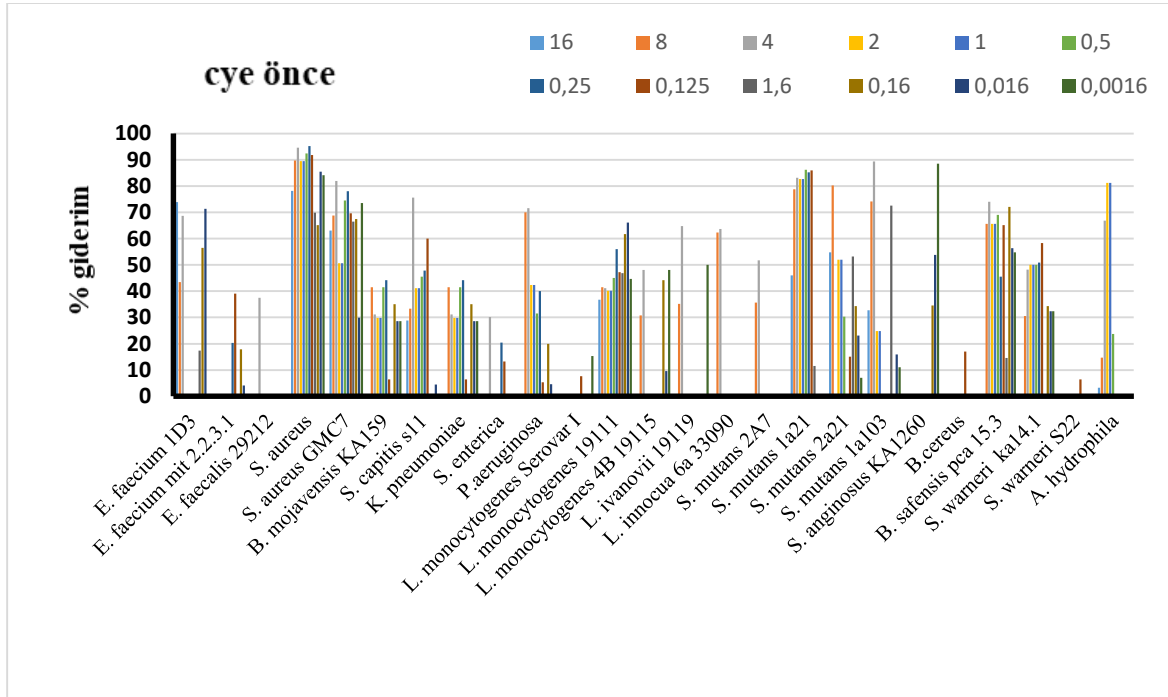
CYS ekstresinin *B. cereus* ve *S. enterica*'nın biyofilm oluşumunu azalttığı ancak oluşmuş biyofilmlerinin gideriminde etkili olmadığı belirlenmiştir (Şekil 3). Bitkilerde bulunan fenolik maddeler arasında en fazla oranda bulunan kersetin ve bazı diğer bileşiklerin bakterilerin DNA replikasyonu için gerekli enzim DNA girazı inhibe ederek etki gösterdiği rapor edilmiştir (Cushnie ve Lamb, 2005). Ekstrelerin biyofilm oluşmadan önce ilave edildiğinde oluşmuş biyofilme karşı daha fazla etkili olmalarının sebeplerinden biri olduğu düşünülmektedir.

CYE (ceviz yaprağı etil asetat) ekstresinin aynı tür üzerinde farklı oranlarda etkili ya da etkisiz olduğu belirlenmiştir. *S. mutans* 1a103'ün biyofilm oluşumunu engellerken (% 89.34), *S. mutans* 2a7 üzerinde etkisiz olduğu belirlenmiştir. *E. faecium* 1d3 üzerinde (%73.91) etkili olduğu tespit edilirken *E. faecium* mit 2231 ve *E. faecalis* 29212'nin oluşan biyofilmleri üzerine etkisi olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4-5).



Şekil 3. Ceviz yaprağı su ekstresinin biyofilm oluştuktan sonra ortama ilave edilmesi durumunda yüzde biyofilm giderimi

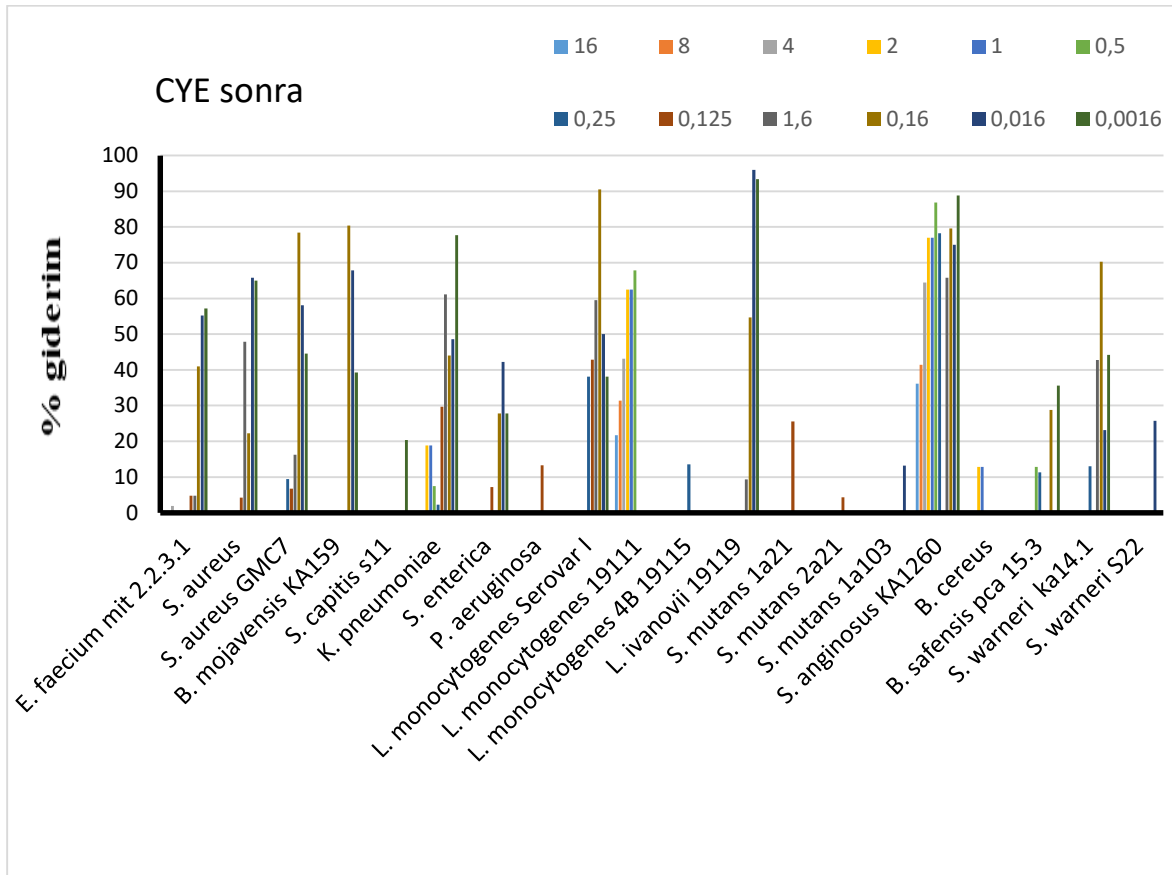
Figure 3. Percent biofilm removal when walnut leaf water extract is added to the medium after biofilm formation



Şekil 4. Ceviz yaprağı etil asetat ekstresinin biyofilm oluşmadan önce ortama ilave edilmesi durumunda yüzde biyofilm giderimi

Figure 4. Percent biofilm removal if walnut leaf ethyl acetate extract is added to the medium before biofilm formation





Şekil 5. Ceviz yaprağı etil asetat ekstresinin biyofilm oluştuktan sonra ortama ilave edilmesi durumunda yüzde biyofilm giderimi

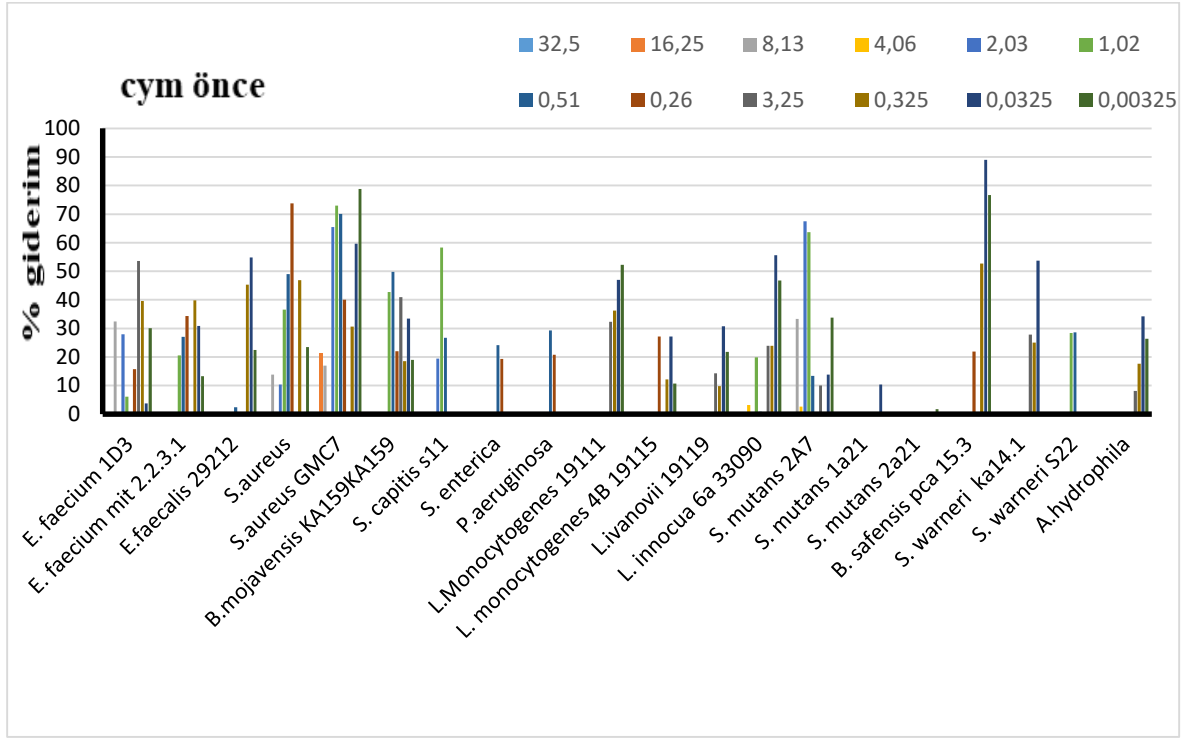
Figure 5. Percent biofilm removal if walnut leaf ethyl acetate extract is added to the medium after biofilm formation

CYM (ceviz yaprağı metanol) ekstresi biyofilm oluşmadan önce ilave edildiğinde *B. cereus* üzerinde etkisiz bulunurken, CYM en yüksek etkiyi %89.04 oranında *B. safensis* üzerinde göstermiştir (Şekil 6). Dirençlerdeki bu farklılık kazanılmış direnç sebebiyle veya çevresel koşullara bağlı olarak gelişmiş olabilir.

CYM ekstresinin *K. pneumoniae* üzerinde antibakteriyel aktivitesi gözlenirken biyofilm oluşumunu engelleyemediği tespit edilmiştir. Sonuçlara genel olarak bakıldığında ise çoğunlukla MİK altı dozlarda antibiyofilm etki gösterdikleri görülmüştür. Bu ve benzeri elde edilen sonuçlar antibakteriyel aktivite ile antibiyofilm aktivite arasında birebir korelasyon bulunmadığını göstermiştir.

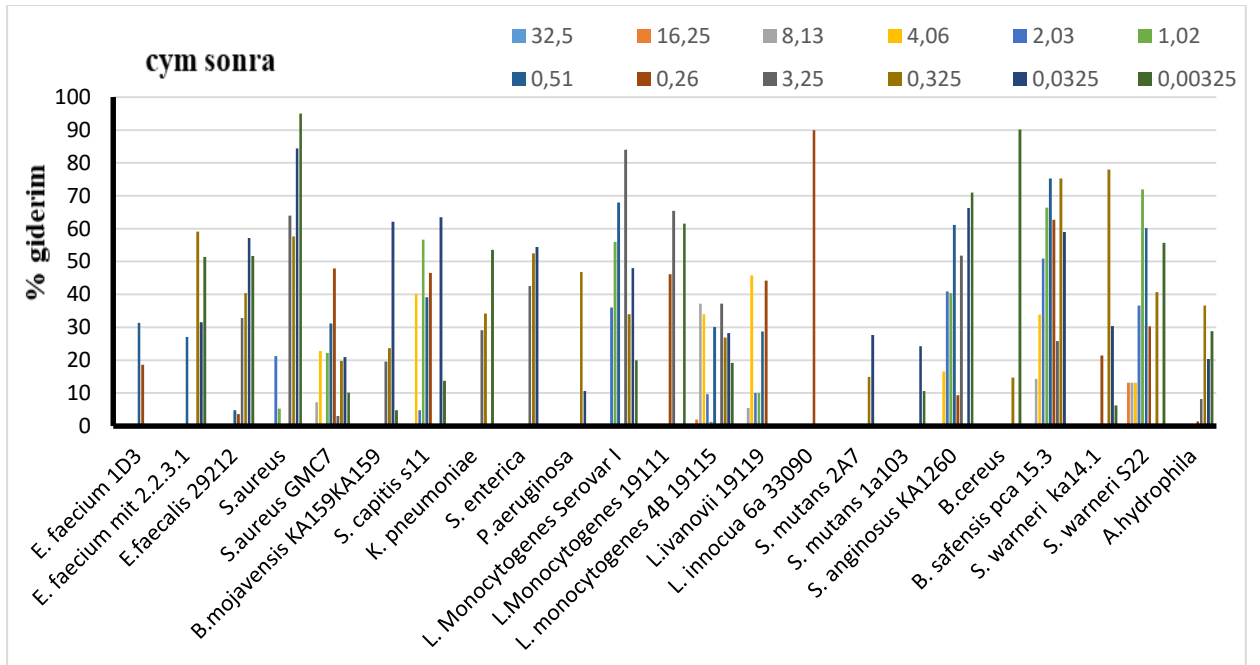
CYS ekstresi enterokoklarda biyofilm oluşumunu türlere göre değişen oranlarda inhibe etmiştir. Enterokoklarda CYM ve CYE ekstresinin antibiyofilm aktivitesi daha düşük olmuştur. Oluşan biyofilm üzerine ise her üç özütünde etkisinin yüksek olmadığı belirlenmiştir (Şekil 2-3).

CYS ve CYM ekstresinin *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunu azaltması çok düşük olduğu oluşmuş biyofilmi oluşumunu daha yüksek oranlarda inhibe ettikleri belirlenmiştir (Şekil 2- Şekil 7). Dolatabadi ve ark. (2018) İran ceviz yaprağı su ve metanolik ekstresinin *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunu engellediği bildirilmiştir (%60). Metanol ekstresinin su ekstresinden daha etkili olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda su ve metanol ekstreslerinden hangisinin daha etkili olduğu bakterilere göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 6. Ceviz yaprağı metanol ekstresinin biyofilm oluşmadan önce ortama ilave edilmesi durumunda yüzde biyofilm giderimi

Figure 6. Percent biofilm removal if walnut leaf methanol extract is added to the medium before biofilm formation



Şekil 7. Ceviz yaprağı metanol ekstresinin biyofilm oluşuktan sonra ortama ilave edilmesi durumunda yüzde biyofilm giderimi

Figure 7. Percent biofilm removal if walnut leaf methanol extract is added to the medium after biofilm formation

Kocaçalışkan ve ark. (2018) alkol ekstralarının su ekstralarına oranla daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda biyofilm oluşmadan önce ekstraların ilave edildiği deney düzenekleri sonuçlarına göre sırasıyla etil asetat, su ve metanol ekstralarının etkili oldukları, oluşmuş biyofilm üzerinde ise sırasıyla etil asetat, metanol ve su ekstralarının etkinlik gösterdikleri belirlenmiştir.

Ekstrelerimizin genel olarak antimikrobiyel aktivitesinin olduğu tespit edilmiştir. İstisnalar bulunmakla birlikte Gram (-) bakterilerine oranla Gram (+) bakteriler üzerinde daha iyi antimikrobiyel aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Metanol ve su ekstrelerinin bakterisidal aktivitesinin bulunmadığı farklı bakteri grupları üzerine etkilerinin farklı olduğu belirlenmiştir. Örneğin *S. mutans* türlerine karşı su ekstrelerinin antibakteriyel aktivitesi daha etkiliyken *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *A. hydrophila* bakterilerine karşı metanol ekstrelerinin daha etkili olduğu belirlenmiştir. Antibiyofilm sonuçları genel olarak karşılaştırıldığında test maddelerimizin biyofilm gideriminden ziyade biyofilm oluşumunu azaltmada daha etkili olduğu görülmüştür. Ekstrelerin biyofilm üzerindeki etki dereceleri kıyaslandığında etki sırasının biyofilm oluşumundan önce ilave edildiklerinde etil asetat, su ve metanol ekstraları şeklinde iken biyofilm oluşumundan sonra ilave edildiklerinde ise etil asetat, metanol ve su ekstraları şeklinde oldukları görülmüştür. Ceviz yapraklarında bulunan ve antimikrobiyel etkiden sorumlu olduğu düşünülen flavonoidlerden,  $\beta$ -halkasında hidroksil grubu olmayan flavonoidlerin, hidroksil grubuna sahip olanlara göre mikroorganizmalara karşı daha aktif oldukları belirtilmiştir (Chabot vd., 1992). Bu bulgu, mikrobiyal hedeflerinin zar olduğu fikrini desteklemektedir. Bu durumun ekstraların biyofilm oluşumunu inhibe etmede oluşmuş biyofilmlerin gideriminden daha etkili olmasına neden olabileceğini düşündürmektedir.

Bitki sekonder metabolitlerinin umut verici özellikleri, mikrobiyal dirence karşı mücadelede alternatif kaynaklar olabile potansiyellerini artırmaktadır (Hussain ve ark., 2012). Alkoloitler, flavonoidler, polifenoller, tanenler gibi fito-bileşenlerin antimikrobiyel ajan olarak

kullanılabilmeleri onların önemini artırmaktadır (Gupta ve Birdi, 2017). Araştırmamız sonucu toplanan deney sonuçlarının ileriki çalışmalarla desteklenmesi ile yeni antimikrobiyel maddelerin elde edilmesi için kullanılabileceklerini göstermektedir. Ancak ceviz yaprağı ekstralarının hangi oranlarda hangi bileşimi içerdiği tam olarak bilinmediğinden öncelikle içeriklerin tayin edilmesi ve sonrasında tek tek ve sinerjistik etkileri tayin edilmesi de tavsiye edilmektedir.

### ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar, bu araştırma makalesiyle ilgili olarak başka kişiler ve/veya kurumlar arasında çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

### YAZAR KATKILARI

Bu çalışmanın hazırlanması ve yayımlanmasında ismi geçen yazarlar dışında hiç kimsenin ya da hiçbir kuruluşun herhangi bir katkısı olmamıştır. Her iki yazar da makalenin yazılmasında ve düzenlenmesinde eşit katkı sağlamıştır.

### KAYNAKLAR

Asma K.A., Yasmine C. (2021). In vitro antimicrobial activity of *Salvadora persica* and *Juglans regia* extracts against microbial strains from oral cavity. *Biocatalysis agricultural biotechnology*, 33, 102003. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102003>.

Bakkiyaraj, D., Nandhinia, J.R., Malathya, B., Pandiana, S.K. (2013). The antibiofilm potential of pomegranate (*Punica granatum* L.) extract against human bacterial and fungal pathogens Biofouling: *The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, Vol. 29, No. 8, 929–937, <http://dx.doi.org/10.1080/08927014.2013.820825>

Bakirdere, S., Yılmaz, M. T., Tornuk, F., Keyf, S., Yılmaz, A., Sagdic, O., Kocabas, B. (2015). Molecular characterization of silver–stearate nanoparticles (AgStNPs): A hydrophobic and antimicrobial material against foodborne pathogens. *Food Research International*, 76, 439–448.

Bayazit, S., Tefek, H., Çalışkan, O. (2016). Türkiye’de ceviz (*Juglans regia* L.) araştırmaları. *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 11(1), 169–179.

- Bhatia, K., Rahman, S., Ali, M., Raisuddin, S. (2006). In vitro antioxidant activity of *Juglans regia* L. bark extract and its protective effect on cyclophosphamide-induced urotoxicity in mice, *Redox Report*, vol. 11, no. 6, pp. 273–279.
- Bray, H.G., Thorpe, W.V., (1954). Analysis of phenolic compounds of interest in metabolism *Meth. Biochem. Anal.* 1, 27-52.
- Chabot, S., Bel-Rhliid, R., Chenevert, R., Piché, Y. (1992). Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker and Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO<sub>2</sub> -enriched conditions. *New Phytol* 122(3): 461-467.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute (2009) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically. *Approved Standard*, 29, 1-65.
- Cotter, J.J., O'gara, J.P., Mack, D., Casey E. (2009) Oxygen-mediated regulation of biofilm development is controlled by the alternative sigma factor  $\sigma\beta$  in *Staphylococcus epidermidis* *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (1):261-264.
- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 564-582.
- Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J., (2005). Antimicrobial activity of flavonoids, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26: 343–356.
- Darmani, H., Nusayr, T., Al-Hiyasat, A.S. (2006). Effects of extracts of miswak and derum on proliferation of Balb/C 3T3 fibroblasts and viability of cariogenic bacteria. *International journal of dental hygiene*, 4: 62-6.
- Doğan, C., Doğan, N., Çelik, Ş. (2014). Farklı Solventlerle Ekstrakte Edilen Ceviz Dış Kabuklarının Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 18 (3), 41-47.
- Dolatabadi, S., Moghadam, H.N., Mahdavi-Ourtakand, M., (2018). Evaluating the antibiofilm and antibacterial effects of *Juglans regia* L. extracts against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis*. 118: 285–289. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.055>.
- Erdoğan, A.E., Everest, A. (2013). Antimikrobiyel Ajan Olarak Bitki Bileşenleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, (2), 27-32.
- Fernández, M., Garcia, M., Sáenz, M., (1996). Antibacterial activity of the phenolic acid fraction of *Scrophularia frutescens* and *Scrophularia sambucifolia*. *Journal of Ethnopharmacology*. 53, 11–14.
- Gilbert, P., Allison, D.G., McBain, A.J. (2002). Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? *Journal of Applied Microbiology*, 92 Suppl:98S-110S. PMID: 12000619.
- Gupta, P.D., Birdi, T.J. (2017) Development of botanicals to combat antibiotic resistance. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*. 8, 266–275.
- Gupta, A., Behl, T., Panichayupakaranan, P. (2019). A review of phytochemistry and pharmacology profile of *Juglans regia*. *Obesity Medicine*. 16:100142. <https://doi.org/10.1016/j.jobmed.2019.100142>.
- Gürlük, N., Koluman A., Kahraman T. (2022). Gıda İşletmelerinde Biyofilm Sorunu ve Gümüş Nanopartikül Uygulamaları, *Aydın Gastronomy*, cilt.6, 1:51-63.
- Hoult, J., Payá, M., (1996). Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *General Pharmacology*. 27, 713–722.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Hussain, M.S., Fareed, S., Ansari, S., Rahman, M.A., Ahmad, I.Z., Saeed, M. (2012) Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 4, 10–20.
- Kale, A.A., Torane, R.C., Deshpande, N.R., Salvekar, J.P. (2011). Antioxidant potential from stem bark of *Juglans regia* L, *Annals of Biological Sciences*. 2 (1) 176–180.
- Kaygusuz, A., Töreci, K., (1998). Antibiyotik Tedavisinde Önemli Olabilecek Parametreler, *Flora*, 3(3):143-164

- Kocaçalışkan İ., Albayrak A., İlhan S., Terzi İ. (2018). Varietal Differences in Antimicrobial Activities of Walnut (*Juglans regia* L.) Leaf Extracts. *Gağiosmanpaşa Journal of Scientific Research*. 7(3):173-180. <http://dergipark.gov.tr/gbad>
- Masek, A., Latos-Brozio, M., Chrzescijanska E., Podsedek, A., (2019). Polyphenolic Profile and Antioxidant Activity of *Juglans regia* L. Leaves and Husk Extracts, *Forests*, 10, 988.
- Mavi, A., Terzi, Z., Ozgen, U., Yildirim, A., Coşkun, M. (2004). Antioxidant properties of some medicinal plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum semperivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum* subsp. *verum* (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. May;27(5):702-5. doi: 10.1248/bpb.27.702. PMID: 15133249.
- Mehrabian, S., Majd, A., Majd, I. (2000). Antimicrobial effects of three plants (*Rubai tinctorum*, *Carthamus tinctorius* and *Juglans regia*) on some airborne microorganisms. *Aerobiologia*; 16:455-58.
- Nyenje, M.E., Green, E., Ndip, R.N. (2012). Biofilm formation and adherence characteristics of *Listeria ivanovii* strains isolated from ready-to-eat foods in Alice, South Africa. *Science World Journal*. 873909. Doi:10.1100/ 2012/873909.
- Oliveira, I., Sousa, A., Valentão, P., Andrade, P., Ferreira, I.C.F.R., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R., Estevinho, L., Pereira, J.A., (2007). Hazel (*Corylus avellana* L.) leaves as source of antimicrobial and antioxidative compounds. *Food Chemistry*. 105, 1018– 1025.
- Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I., Bento, A., Estevinho, L., Pereira, J.A., (2008). Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *J. Food and Chemical Toxicology*. 46, 2326–2331. 10.1016/j.fct.2008.03.017.
- Pereira, J.A., Pereira, A.P.G., Ferreira, I.C.F.R., Valentão, P., Andrade, P.B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., (2006). Table olives from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potential and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 8425– 8431.
- Pereira, A.P., Ferreira, I.C.F.R., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, F., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., Pereira, J.A., (2007a). Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrancosa) leaves. *Molecules* 12, 1153–1162.
- Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., Valentão, P., Andrade, P.B., Ferreira, I.C.F.R., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R., Estevinho, L., (2007b). Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: phenolic compounds, antimicrobial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food and Chemical Toxicology*. 45, 2287–2295.
- Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Bento, A., Estevinho, L., (2008). Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L) cultivars. *Food and Chemical Toxicology*. 46, 2103–2111.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., Oksman-Caldentey, K.M., (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*. 90, 494–507.
- Prior, R.L., Wu, X., Scaich, K., (2005). Standardized methods for the determination antioxidant capacity and phenolics in foods and dieatry supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 3110-3113.
- Proestos, C., Chorianopoulos, N., Nychas, G.-J.E., Komaitis, M., (2005). RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 1190– 1195.
- Rauha, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H., Vuorela, P., (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*. 56, 3–12.
- Qadan, F., Thewaini, A.J., Ali, D.A., Afifi, R., Elkhawad, A., Matalka, K.Z. (2005). The antimicrobial activities of *Psidium guajava* and *Juglans regia* leaf extracts to acne developing organisms. *The American Journal of Chinese Medicine*.

- 33(2): 197-204. doi: 10.1142/S0192415X05002783.
- Sandasi, M., Leonard, C.M., Viljoen, A.M. (2010). The in vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 50(1), 30-35.
- Selçuk, A.R. (2012). Galvinoksil radikali bazlı spektrofotometrik antioksidan aktivite tayin yöntemi ve yaygın olarak kullanılan diğer yöntemlerle kıyaslanması, *Yüksek Lisans Tezi*, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli.
- Chaleshtori, R.S, Chaleshtori, F.S., Rafieian, M. (2011). Biological characterization of Iranian walnut (*Juglans regia*) leaves. *Turkish Journal of Biology*, 35:5, Article 13. <https://doi.org/10.3906/biy-1005-1>
- Sharma, P., Ravikumar, G., Kalaiselvi, M., Gomathi, D., Uma, C. (2013). In vitro antibacterial and free radical scavenging activity of green hull of *Juglans regia*. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. Aug;3(4):298-302. doi: 10.1016/j.jpha.2013.01.006.
- Singh, R.P., Chidambara Murthy, K.N., Jayaprakasha, G.K. (2002) Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(1):81–86
- Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Calhelha, R., Andrade, P.B., Valentão, P., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., Pereira, J.A., (2006). Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives “alcaparra”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 14, 8533– 8538.
- Stampar, F., Solar, A., Hudina, M., Veberic, R., Colari, M. (2006). Traditional walnut liqueur-coctail oil phenolics. *Food Chemistry*. 95:627-31.
- Umay, A. (2007). *Lavandula stoechas*, *Melissa officinalis* ve *Tribulus terrestris* bitkilerinin kimyasal içeriklerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, ADANA.
- Wichtl, M., Anton, R. (1999). *Plantes Thérapeutiques. Technique et Documentation*. Paris.
- Yiğit, D., Yiğit, N., Aktaş, E., Özgen, U. (2009). Ceviz (*Juglans regia* L.)’in antimikrobiyel aktivitesi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*. 39(1-2), 7-11.
- Zhinsen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*. 64, 555-559.
- Zhu, X., Zhang, H., Lo, R., (2004). Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 7272–7278.
- Zoral, F.B., Turgay, Ö., (2014) Çeşitli Gıda Atıklarının Toplam Fenolik Madde İçeriğinin, Antioksidan ve Antimikrobiyel Aktivitelerinin Araştırılması, *KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi*. 17(2).



## COMPARISON OF DIFFERENT SOLID PHASE MICROEXTRACTION FIBERS IN EXTRACTION OF VOLATILE COMPOUNDS FROM ADIPOSE TISSUE

**Zehra Güler\*, Ahmet Dursun**

Hatay Mustafa Kemal University, Faculty of Agriculture, Food Engineering Department, Hatay, Türkiye

Received / Geliş: 18.11.2022; Accepted / Kabul: 10.03.2023; Published online / Online baskı: 15.03.2023

Güler, Z., Dursun, A. (2023). Comparison of different solid phase microextraction fibers in extraction of volatile compounds from adipose tissue. GIDA (2023) 48(2) 422-434 doi: 10.15237/gida.GD22114

Güler, Z., Dursun, A. (2023). Yağ dokusundan uçucu bileşenlerin ekstraksiyonunda farklı katı faz mikroekstraksiyon fiberlerinin karşılaştırılması. GIDA (2023) 48(2) 422-434 doi: 10.15237/gida.GD22114

### ABSTRACT

The volatile compounds (VCs) in headspace of adipose tissues (perirenal, tail, caul) were extracted by solid-phase microextraction (SPME) fiber coated with carboxen/ polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) or divinylbenzene/ carboxen/ polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS). In extraction with CAR/PDMS coating compared to DVB/CAR/PDMS, more VCs were obtained in perirenal (53 versus 41), tail (51 vs 47) and caul (35 vs 33) fats. Increased retention index for aldehydes increased the adsorption on DVB/CAR/PDMS. This fiber also provided a good yield for carboxylic acids. CAR/PDMS fiber could be recommended for VCs from adipose tissues if the goal is to identify aldehydes, especially fatty acid oxidation products and low molecular weight hydrocarbons, as well as greater number of VCs. However, in case of targeting carboxylic acids, esters, and also high molecular weight aldehydes, DVB/CAR/PDMS could be utilized due to its high affinity for mentioned compounds. Furthermore, the optimum extraction time should be studied to determine the time for VCs to reach equilibrium

**Keywords:** Tail fat, aldehydes, polydimethylsiloxane, linoleic acid

### YAĞ DOKUSUNDAN UÇUCU BİLEŞENLERİN EKSTRAKSİYONUNDA FARKLI KATI FAZ MİKROEKSTRAKSİYON FİBERLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

### ÖZ

Adipoz dokuların (böbrek, kuyruk ve gömlek yağ) tepe boşluğundan uçucu bileşenlerin ekstraksiyonu, farklı adsorbant karboksen/ polidimetilsiloksan, (CAR/PDMS) ya da divinilbenzen/ karboksen/ polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) kaplamalı katı faz mikroekstraksiyon fiberleri ile gerçekleştirilmiştir. DVB/CAR/PDMS ile karşılaştırıldığında CAR/PDMS kaplamalı fiber ile ekstraksiyonda böbrek (53'e 41), kuyruk (51'e 47) ve gömlek (35'e 33) yağlarda daha fazla sayıda uçucu bileşen belirlenmiştir. Aldehitlerin alıkonma indeksinin artması, DVB/CAR/PDMS'e adsorpsiyonu artırmıştır. Bu fiber karboksilik asitler için de etkili bir affinite göstermiştir. Adipoz dokularda, özellikle yağ asidi oksidasyon ürünü aldehitlerin, düşük molekül ağırlıklı hidrokarbonların ve ayrıca daha fazla uçucu bileşenin tanımlanması için CAR/PDMS fiberi önerilebilir. Ayrıca, karboksilli asitler, esterler ve yüksek molekül ağırlıklı aldehitlerin belirlenmesinde ise söz edilen bileşenlere

\* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar

✉:zguler@mku.edu.tr

☎:(+90) 326 245 5845

☎:(+90) 326 245 5832

Zehra Güler; ORCID no: 0000-0003-1889-9379

Ahmet Dursun; ORCID no: 0000-0003-0736-8740

affinitesinin yüksek olması nedeniyle DVB/CAR/PDMS kullanılabilir. Bununla birlikte uçucu bileşenlerin dengeye ulaşma zamanını belirlemek için optimum ekstraksiyon sürelerinin araştırılması gerekli olabilmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Kuyruk yağı, aldehitler, polidimetilsiloksan, linoleik asit

## INTRODUCTION

The development of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) has allowed a detailed analysis of the volatile compounds in foods. The methods used in isolating volatile compounds from foods include headspace, distillation, solvent extraction, solid-phase extraction and direct injection (Alonso et al., 2009; Güler 2007; 2014; Güler et al., 2009). Among them, headspace is one of the simplest methods used. Headspace sampling involves static and dynamic headspace techniques. The first is by direct injection of the headspace vapors above a food via “syringe” or “loop headspace”, the latter involves an active cycling of the headspace vapor (Razote et al., 2002; Balasubramanian and Panigrahi, 2010). Nowadays, static headspace (HS)-solid phase microextraction (SPME) is well known and widely used since it is a simple, fast, and solvent-free technique, and also the most satisfactory for determination of VCs (Serrano et al., 2009; Güler et al., 2016; 2019). Because in SPME heating of the tissue sample is minimal and the recovery of VCs is closer to their real content than the values obtained by heating techniques such as distillation or solvent extraction (Alonso et al., 2009). Besides, it does not require an additional sample preparation step that could result in possible loss of analyte and sample contamination (Balasubramanian and Panigrahi, 2010).

HS-SPME is also defined as a sampling technique based on the adsorption of VCs on a polymeric material, namely stationary phase, covering silica fiber, and an equilibrium is reached between the food matrix and the stationary phase (Lorenzo, 2014). The use of single-coated SPME fibers (polydimethylsiloxane vs polyacrylate) with dynamic headspace sampling was not recommended for trace analysis (Elmore et al., 1997). There are 7 types of stationary phase including non-polar polydimethylsiloxane (PDMS), polar (polyacrylate, divinylbenzene (DVB), carbowax-polyethylene glycol (PEG)) and mixed polarity (PDMS/DVB, CAR/PDMS and

DVB/CAR/PDMS). In particular, combined coated has been commonly used for the analysis of VCs with higher recoveries (Lorenzo, 2014). The choice of the fiber coating is an important factor, since the VCs have a wide variation in polarity. Compared to CAR and DVB, which are polar phases, PDMS is not sensitive to polar VCs because it is non-polar (Gianelli et al., 2002). Therefore, the type of stationary phase affecting SPME fiber performance affects the analysis results (Elmore et al., 2001; Marco et al., 2004; Lorenzo, 2014).

HS-SPME technique is also well-suited in the investigation of biodegradation pathways of foods (Balasubramanian and Panigrahi, 2010) such as volatiles from lipid degradation pathways by lipase and lipoxygenase. As lipids are solvents for most VCs, it is important to evaluate their flavor profile (Calkins and Hodgen, 2007). However, the food matrix and target VCs dictate the complexity level of sample extraction. Page and Lacroix (1993) stated that as the lipid content of foods increased, the release of VCs into headspace decreased. So much so that the extraction of VCs may differ from food to food. For vegetables (Jelen et al., 2000) and olive oil (Cavalli et al., 2004), VC extraction is also applied at room temperature (20-25°C), but for animal fats or adipose tissue, the extraction temperature can be up to 100°C (Watkins et al., 2012). Since animal products (meat and/or dairy) release a wide variety of VC, a mid-polar affinity-coated SPME fiber such as CAR/PDMS or DVB/CAR/PDMS could demonstrated as an ideal choice to extract a majority of the volatiles (Balasubramanian and Panigrahi, 2010). It has been reported that CAR/PDMS coated fiber is ideal for VCs with low molecular weight while the DVB/CAR/PDMS coated fiber is for VCs with large molecular weight, namely found in dry-cured ham (Garcia-Esteban et al., 2004). A higher affinity of DVB/CAR/PDMS for aldehydes and CAR/PDMS for ester compounds was reported by Marco et al. (2004) in fermented sausages.



Dynamic headspace techniques have been widely applied to determine VCs of adipose tissues (Priolo et al., 2004; Sivadier et al., 2008; Young et al., 1997; 2003). But, Marsilli (1999) has shown that the cheaper static HS-SPME technique is superior to dynamic headspace analysis in terms of reproducibility and proper baseline with less noise. Moreover, static HS-SPME was used for the analysis of VCs from beef and sheep fats (Watkins et al., 2012) and lamb fat (Vasta et al., 2012). As far as we know, there is no study on which SPME fiber can be recommended for adipose tissues. In addition to volatile compounds (VCs), fatty acids (FAs) composition is an important parameter in terms of fat or adipose tissue quality (Bas et al., 2007). Because FAs can not only directly contribute to flavor but also are precursors for most flavor compounds (Tekin and Güler, 2021).

We aimed to compare extraction performance of CAR/PDMS and DVB/CAR/PDMS coating fibers in headspaces of different adipose tissues (perirenal, tail and caul fats) and to determine whether volatile compound profile and abundance can change depending on fatty acids of adipose tissues.

## MATERIAL AND METHODS

The adipose tissues were obtained from Karagül (Karakul) sheep, three randomly selected depending on same age (24-months) and living weight (50-55 kg), from breed's flock (approximately 100 heads) reared in Muş, province of Türkiye. The adipose tissues (perirenal, tail and caul) were collected within 30-45 min of slaughter and transferred to the laboratory in ice-boxes and then they were vacuum packaged and frozen at  $-18^{\circ}\text{C}$  until analysis.

### Gas chromatography analyzers

Fatty acid composition of adipose tissues was determined as fatty acid methyl ester derivatives using GC-MS (Agilent 6890 chromatography and 5973N mass spectrophotometry; Agilent, Palo Alto, USA) coupled with a capillary column (Supelco SP-2830, 60 m x 0.25 mm id x 0.20  $\mu\text{m}$  film thickness) according to the procedure

described by Rule (1997). GC-MS operating conditions were applied with minor modifications in procedure reported by Peng et al. (2010).

The HS-SPME technique was used to analyze the VCs of adipose tissues according to the method described by Watkins et al. (2012) with minor modifications. Firstly, adipose tissues (10 g) were rendered using a bench-top heater (IKA HS7, Deutschland, Germany) at  $100^{\circ}\text{C}$ . Seven g of molten fat were transferred to 20 mL headspace vials and sealed with polytetrafluoroethylene (PTFE)/silicone septa and steel caps. The vials with sample were pre-heated at  $65^{\circ}\text{C}$  for 5 min prior to insertion of the SPME fiber. Two different coating SPME fibers were used: CAR/PDMS (50/30  $\mu\text{m}$ ) and DVB/CAR/PDMS (75  $\mu\text{m}$ ). Before the analysis, the fibers were preconditioned in the injection port of GC as indicated by the manufacturer. SPME fiber was injected into the headspace where it was held for 45 min. The VCs were chromatographed on a capillary column (HP-INNOWAX; 60 m x 0,25 mm id x 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness). As reported by Dursun and Güler (2019), GC-MS conditions and VCs identification were done.

### Data Analysis

The relative amounts of both VCs and FAs were estimated by the area normalization method. The peak area of each identified compound was integrated, and total peak area was calculated from the equation reported by Güler et al. (2022). Statistical differences between the mean values of adipose tissues were determined one-way ANOVA, and between the mean values of VCs determined with SPME fibers (CAR/PDMS and DVB/CAR/PDMS) were determined t-test by using SPSS program (Version 22, IBM, USA). Duncan's multiple comparison test was used to compare significance being determined at  $P < 0.05$ . Principal component analysis (PCA), based on the correlation matrix, was conducted to determine components which account for most of the total variation in VCs and FAs. The principal components scores presented in a bi-plot and VCs profile presented in cell-plot were

carried out by using JMP Version 13 software (SAS Institute, USA).

**RESULTS AND DISCUSSION**

**Fatty acid profile of adipose tissues**

A total of 22 fatty acids were determined in adipose tissues, including 11 saturated fatty acids (SFA), 6 monounsaturated fatty acids (MUFA), and 5 polyunsaturated fatty acids (PUFA) as shown in Table 1. Stearic acid (C18:0), saturated fatty acid, was found to be in perirenal fat, as the main FA, and oleic acid (*cis*9-C18:1), mono-unsaturated fatty acid, in caul and tail tissues. Similar results were previously reported in perirenal (Bas et al., 2007) and tail (Mahachi et al., 2020) fats. Palmitic acid (C16:0) and margaric acid (C17:0) were the second and third most abundant SFA, respectively, and did not differ between the adipose tissues. Myristic acid (C14:0), was also substantially determined in adipose tissues, which was highest in tail fat. The remaining SFAs were

detected in trace. Oleic acid, the second most abundant FA in perirenal fat, was less than the other ones ( $P < 0.001$ ). The tail and caul fats with high *cis*9-C18:1 and also *cis*9-C16:1 had low stearic acid. This finding was confirmed with the results of Shingfield and Wallace (2014), who stated an inverse relationship between ruminal oleic acid metabolism and its bio-hydrogenation intermediates including *trans*11-C18:1 and C18:0. Furthermore, the externally located adipose tissue may have much more  $\Delta$ 9- desaturase activity (Jiang et al., 2018) than internal ones, thereby replacing stearic acid with oleic acid. Like oleic acid, palmitoleic (*cis*9-C16:1) and elaidic (*trans*9-C18:1) acid were also lowest in perirenal fat (Table 1). Among the PUFA, linoleic, conjugated linoleic (CLA) and  $\alpha$ -linolenic acids, routinely determined in all adipose tissues, were highest in tail fats ( $P < 0.01$ ).

Table 1. Fatty acid methyl esters of adipose tissues

Fatty acids	Adipose tissues				P
	Perirenal	Tail	Caul	Mean	
C10:0	0.08±0.01b	0.15±0.01a	0.08±0.00b	0.11±0.04	***
C12:0	0.12±0.00b	0.23±0.03a	0.05±0.00c	0.14±0.08	***
C13:0	0.03±0.01	0.03±0.00	0.03±0.00	0.03±0.01	ns
C14:0	3.55±0.05b	4.90±0.48a	2.68±0.02c	3.84±0.99	***
C15:0	1.07±0.02a	1.03±0.09a	0.55±0.01b	0.92±0.24	***
C16:0	20.6±0.25	22.2±0.97	21.9±0.67	21.5±0.99	ns
C17:0	4.50±0.09	4.61±0.48	4.22±0.11	4.47±0.31	ns
C18:0	37.8±0.76a	23.0±1.51c	27.1±0.38b	29.6±7.12	***
C19:0	0.91±0.03a	0.65±0.06b	0.72±0.00b	0.76±0.13	***
C20:0	0.66±0.02a	0.24±0.03b	0.16±0.01c	0.38±0.24	***
C22:0	0.12±0.02	-	-	0.04±0.06	-
<i>cis</i> 9-C14:1	-	0.14±0.03	-	0.05±0.07	-
<i>cis</i> 9-C16:1	0.68±0.03c	1.73±0.06b	1.93±0.04a	1.39±0.59	***
<i>cis</i> 9-C18:1	22.0±0.68b	32.3±2.12a	32.1±1.03a	28.4±5.44	***
<i>trans</i> 11-C18:1	3.69±0.06	2.94±0.08	2.96±1.45	3.23±0.67	ns
<i>trans</i> 9-C18:1	0.58±0.02b	0.87±0.03b	1.21±0.29a	0.85±0.28	**
<i>cis</i> 11-C20:1	0.12±0.00	0.12±0.02	0.13±0.01	0.12±0.01	ns
<i>cis</i> 9,12-C18:2	2.30±0.02c	3.27±0.08a	3.07±0.07b	2.86±0.47	***
<i>cis</i> 9, <i>trans</i> 11-C18:2 (CLA)	0.50±0.01c	0.78±0.05a	0.64±0.00b	0.64±0.13	***
<i>cis</i> 9,12,15-C18:3	0.69±0.01a	0.75±0.09a	0.48±0.01b	0.66±0.13	**
<i>cis</i> 8,11,14-C20:3	-	0.03±0.01	-	0.01±0.02	-
<i>cis</i> 5,8,11,14-C20:4	-	0.06±0.02	0.08±0.01	0.04±0.04	-

Data were expressed as mean±standard deviation. The mean values followed by different letters in the same row indicate the significance differences between adipose tissues at \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  levels; ns: not significant ( $P > 0.05$ ); -: not detected.

### Volatile compounds of adipose tissues

As shown in Fig. 1, a total of 58 VCs were identified in headspace of adipose tissues using CAR/PDMS or DVB/CAR/PDMS for extraction. The volatiles were classified into eight chemical groups: aldehydes (21 compounds), hydrocarbons (9), acids (9), ketones (7), phenyl and phenols (4), heterocyclic compounds (3),

alcohols (3) and esters (2). The number of VCs identified was similar to that (55) reported by Vasta et al. (2012) in lamb fat, but lower than the finding of Watkins et al. (2012) in beef and sheep fat. This could be attributed to several factors such as breed, grazing, age, etc. affecting also the adipose tissue fatty acid composition.

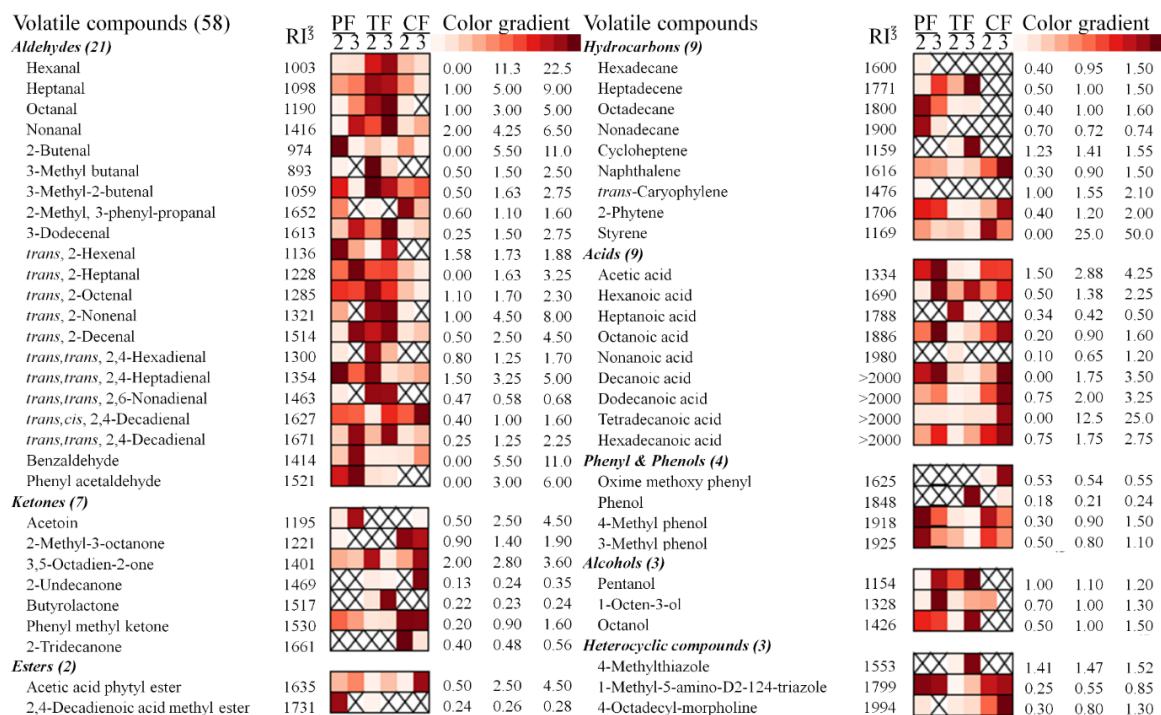


Fig. 1. Cell-plot for the volatile compounds identified in perirenal fat (PF), tail fat (TF) and caul fat (CF) by SPME fiber coating with CAR/PDMS (2) and DVB/CAR/PDMS (3). RI: Retention index based on identified compound retention times, calculated from the linear equation between each pair of straight alkane series (C8-C20). X: not detected.

Only 28 out of 58 VCs were common to all the adipose tissues, which were extracted by both the SPME fibers. The CAR/PDMS fiber extracted a greater number of VCs from perirenal (53 in number), tail (51) and caul (35) fats than DVB/CAR/PDMS (41, 47 and 33, respectively) one.

A remarkable difference in VCs number between SPME fibers was observed for perirenal tissue. Although DVB/CAR/PDMS coating extracted 41 VCs, CAR/PDMS extracted 12 additional VCs, including 3-methyl butenal, *trans,trans*,2,4-

hexadienal, *trans*, 2-nonenal,*trans,trans*,2,6, nonadienal, 2-methyl-3-phenyl-propanal, 2,4-decadienoic acid methyl ester, 4-octadecyl-morpholine, hexadecane, *trans*-caryophyllene, 2-methyl-3-octanone, 2-undecanone, and phenol. Marco et al. (2004) also identified 24 additional VCs in fermented sausage in the case of using CAR/PDMS coating compared to DVB/CAR/PDMS. In contrast, Gianelli et al. (2002) found that DVB/CAR/PDMS extracted VCs in greater number than CAR/PDMS (60 vs 41 VCs, respectively).

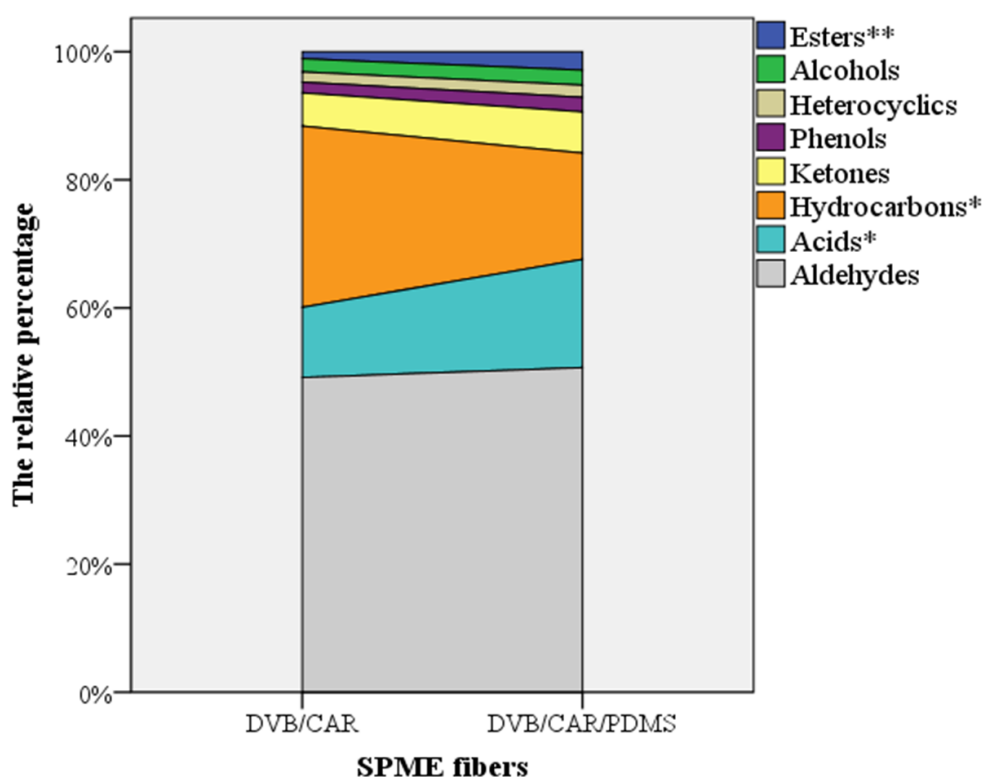


Fig. 2. The mean percentage composition of the chemical groups of VCs in adipose tissues. The mean values were significant different at  $*P < 0.05$  and  $**P < 0.01$  levels.

Aldehydes were the principal chemical group in headspace of adipose tissues, except for caul fat, in terms of their number and their percentage composition (Fig. 1-2). It was not surprising as the high temperature (100°C) used for rendering fat could result in an increased oxidation or degradation products of adipose tissues such as aldehydes and hydrocarbons. Regardless of tissues, a significantly higher percentage of nonanal, benzaldehyde, *trans*, 2-decenal, 3-dodecanal, *trans,cis*, 2,4-decadienal and *trans,trans*, 2,4-decadienal was extracted by DVB/CAR/PDMS fiber. It was observed that as the retention index of aldehydes increased, there were more adsorbed on DVB/CAR/PDMS coating than on CAR/PDMS one. Similar findings were reported previously (Garcia-Esteban et al., 2004; Yu et al., 2008; Lorenzo et al., 2014). Among aldehydes hexanal was determined in tail fat as the principal aldehyde and volatile compound by both SPME fibers. This finding was confirmed by high PUFA level in tail

fat since hexanal is one of the main oxidation products of *cis*-9,12-C18:2 fatty acid. Similarly, as stated by Pan et al. (2005) and Elmore et al. (2005), aldehydes 3-methyl-2-butenal, heptanal, octanal, nonanal, and *trans* isomers of hexenal, heptenal, octenal, nonenal and decenal, derived from oxidation of unsaturated fatty acids, were also determined in highest in tail fat. Besides, their abundance did not a significant between SPME fibers, irrespectively of tissues (Table 2). On the other hand, the relative percentages of 2-butenal in all the adipose tissues and *trans,trans*-2,4-heptadienal in tail and perirenal fats significantly increased in extraction by CAR/PDMS coating. 2-Butenal was identified as the second most abundant volatile compound following styrene in perirenal tissue. In contrast, the relative percentage of benzaldehyde, derived mainly from phenylalanine amino acid, showed a tendency to increase in case of using DVB/CAR/PDMS fiber. This was in consistent with the finding of Marco et al. (2004), but was in disagreement with

that of Garcia-Esteban et al. (2004). These conflicts reports may be related to the applied extraction time since benzaldehyde requires more time to reach equilibrium with CAR/PDMS than with DVB/CAR/PDMS, as stated by Lorenzo (2014). Regardless of tissues, a high extraction proportion by CAR/PDMS coating for 2-butenal may closely be associated with its molecular weight since it is aldehyde with the lowest molecular weight among aldehydes identified. This finding is confirmed that CAR/PDMS fiber is suitable for volatile compounds with small molecular weight, irrespectively of the functional group of chemical compound (Garcia-Esteban et al., 2004). Nevertheless, the increased yield of *trans,trans*, 2,4-heptadienal in extraction by CAR/PDMS coating fiber is probably due to its competitions with *trans*, 2-heptanal at the same extraction. Because the latter aldehyde showed a good yield in extraction by DVB/CAR/PDMS fiber for perirenal and tail fats.

Generally, a relatively high proportion of aldehydes in extraction by DVB/CAR/PDMS coating fiber (Fig.1) could be attributed to its high affinity for aldehydes, especially for molecular weights above 100, as stated by Lorenzo et al. (2014) and Marco et al. (2004).

Regarding to perirenal fat, the most abundant VCs analyzed by CAR/PDMS and DVB/CAR/PDMS were styrene and benzaldehyde, respectively (Fig. 1; Table 2). The first has been reported previously in caudal subcutaneous adipose tissue (Sivadier et al., 2008) and the second in perirenal fat of lambs (Vasta et al., 2012). Possible precursors of styrene are carotenoids, long-chain fatty acid esters, aldehydes, phenylalanine amino acid (Pagot et al., 2007). High styrene presence in perirenal fat may support carotenoid precursor depending on animals' grazing on highland pasture. In addition, oxidation of styrene may produce benzaldehyde. The present study shows that perirenal and caul fats are a good source for styrene and benzaldehyde, irrespectively of fiber coating used. Styrene and 2-phytene abundance in caul fat may utilize as a fingerprint of the feeding system.

Hydrocarbons were the second most abundant chemical group identified in adipose tissues except for caul fat. The CAR/PDMS fiber extracted a significantly ( $P < 0.001$ ) high percentage of hydrocarbons compared to the DVB/CAR/PDMS one (Fig. 1). Besides, 2 additional hydrocarbons (hexadecane and *trans*-caryophyllene) were extracted by the CAR/PDMS coating. Among hydrocarbons, styrene was the principal hydrocarbon, and also VC in perirenal and caul fats. This hydrocarbon was decisive in separating the perirenal and caul fats extracted by CAR/PDMS coating from the others, according to PCA applied on data obtained from volatile compounds (Fig. 3A). This may be related to both the coating fiber and high styrene level in above-mentioned tissues. As shown in Table 2, another principal hydrocarbon, 2-phytene, was obtained at a higher relative percentage in caul fat in extraction with DVB/CAR/PDMS coating compared to CAR/PDMS. But, 2-phytene was both considerably less than styrene and had a molecular weight of about 3 times higher. 2-Phytene, derived from the degradation of chlorophyll by rumen microorganisms (Body, 1977), showed no significant difference in percent composition between the extraction coatings in either perirenal fat or tail fat.

Carboxylic acids were the third most abundant chemical group identified, in terms of their percentage composition. As shown in Fig. 2, acid chemical group was found to be lower by CAR/PDMS fiber than the other one, irrespectively of tissues. As reported by Lorenzo et al. (2014), CAR/PDMS coating showed a lower affinity to acids. Among carboxylic acids, acetic acid was the most abundant acid identified in perirenal fat and had a similar the percentage value in all adipose tissues extracted by both SPME fibers (Table 2). But, tetradecanoic acid was determined in tail and caul fats as the major acid. DVB/CAR/PDMS fiber extraction gave rise to higher proportion of tetradecanoic acid. Similarly, DVB/CAR/PDMS coating extraction increased the proportions of hexanoic, decanoic, dodecanoic, and hexadecanoic acids in perirenal and caul fats.

Table 2. Major volatile compounds of adipose tissues

Major volatile compounds <sup>b</sup>	Perirenal fat		<i>P</i>	Tail fat		<i>P</i>	Caul fat		<i>P</i>
	S (2)	S (3)		S (2)	S (3)		S (2)	S (3)	
Acetic acid	3.50±1.11	4.18±0.31X	<i>ns</i>	1.70±0.55	1.56±0.10Y	<i>ns</i>	3.23±0.59	3.92±0.20X	<i>ns</i>
Hexanoic acid	0.62±0.19y	2.19±0.11	***	1.01±0.26x	2.00±0.17	**	1.18±0.10x	2.16±0.23	**
Decanoic acid	2.77±0.13x	3.38±0.24X	*	0.49±0.05z	0.14±0.00Y	***	1.00±0.37y	4.25±1.09X	**
Dodecanoic acid	1.51±0.14y	1.86±0.05Y	*	0.81±0.18z	0.91±0.03Z	<i>ns</i>	2.17±0.25x	3.84±0.23X	***
Tetradecanoic acid	1.93±0.20xy	1.78±0.26Y	<i>ns</i>	1.07±0.50y	2.56±0.71Y	*	2.73±0.87x	5.15±0.67X	*
Hexadecanoic acid	1.39±0.06y	2.11±0.18Y	**	0.84±0.27z	1.37±0.21Z	<i>ns</i>	2.15±0.08x	3.18±0.34X	**
2-Butenal	10.9±1.45x	0.28±0.05	***	2.46±0.45y	0.40±0.03	***	3.85±1.81y	0.30±0.10	*
Hexanal	2.24±0.49y	2.83±0.48Y	<i>ns</i>	16.4±2.51x	20.3±1.90X	<i>ns</i>	5.37±2.15y	3.62±0.62Y	<i>ns</i>
3-Methyl-2-butenal	2.09±0.29xy	0.60±0.11Z	***	2.75±0.65x	2.37±0.06X	<i>ns</i>	1.40±0.21y	2.13±0.03Y	**
Heptanal	3.72±0.36y	4.56±0.23Y	*	8.17±1.34x	7.77±0.31X	<i>ns</i>	3.92±0.71y	2.15±0.03Z	*
<i>trans</i> , 2-Hexenal	1.86±0.35x	1.67±0.24X	<i>ns</i>	1.58±0.26x	1.80±0.10X	<i>ns</i>	-	-	
Octanal	1.11±0.24y	2.61±0.33Y	**	4.49±0.33x	4.95±0.43X	<i>ns</i>	1.31±0.02y	-	***
<i>trans</i> , 2-Heptanal	1.60±0.14x	3.17±0.36X	**	1.88±0.43x	1.99±0.17Y	<i>ns</i>	0.75±0.22y	0.24±0.03Z	*
Nonanal	2.08±0.32y	5.58±0.38Y	***	4.63±1.03x	6.45±0.64X	<i>ns</i>	2.54±0.37y	4.06±0.08Z	**
<i>trans</i> , 2-Octenal	1.87±0.31xy	1.83±0.20X	<i>ns</i>	2.22±0.38x	1.89±0.10X	<i>ns</i>	1.37±0.15y	1.41±0.12Y	<i>ns</i>
<i>trans,trans</i> , 2,4-Heptadienal	4.95±0.36x	3.34±0.07X	**	4.77±0.59x	1.88±0.04Z	***	2.17±0.37y	3.12±0.07Y	*
Benzaldehyde	2.30±0.32x	10.4±0.35X	***	0.55±0.11z	0.63±0.04Z	<i>ns</i>	0.99±0.17y	5.10±0.23Y	***
<i>trans</i> , 2-Nonenal	3.13±0.41y	-	***	7.37±0.21x	7.68±0.64	<i>ns</i>	1.37±0.07z	-	***
<i>trans</i> , 2-Decenal	0.86±0.12y	4.25±0.77X	**	3.59±0.60x	4.25±0.12X	<i>ns</i>	0.89±0.11y	1.64±0.11Y	***
Phenyl acetaldehyde	4.43±0.86x	5.84±0.80X	<i>ns</i>	0.69±0.04y	0.46±0.03Y	***	-	-	
3-Dodecenal	0.77±0.10y	2.24±0.10Y	***	1.31±0.17x	2.72±0.07X	***	0.42±0.07z	0.86±0.02Z	***
<i>trans,cis</i> , 2,4-Decadienal	1.06±0.15x	1.03±0.19Y	<i>ns</i>	0.47±0.07y	1.20±0.03Y	***	1.05±0.08x	1.92±0.22X	***
<i>trans,trans</i> , 2,4-Decadienal	0.62±0.13	2.08±0.28X	***	0.75±0.14	2.10±0.08X	***	0.46±0.13	0.85±0.11Y	*
Acetic acid phytyl ester	1.53±0.46x	2.16±0.55Y	<i>ns</i>	0.62±0.12y	1.42±0.11Y	***	0.64±0.15y	5.02±0.50X	***
Styrene	17.7±1.89y	8.03±0.42Y	***	9.91±0.92z	3.75±0.26Z	***	45.6±3.06x	24.5±1.57X	***
2-Phytene	1.51±0.28x	1.44±0.22Y	<i>ns</i>	0.44±0.02z	0.47±0.04Z	<i>ns</i>	0.85±0.09y	2.24±0.10X	***
3,5-Octadien-2-one	2.47±0.42	2.35±0.15Y	<i>ns</i>	3.34±0.71	2.10±0.20Y	*	2.50±0.42	4.20±0.15X	**

<sup>b</sup>The compounds with the mean relative percent value above 1% were taken as major volatile compounds. Data were expressed as mean±standard deviation. The mean values followed by different letters in the same row indicate significant differences between perirenal, tail and caul fats adsorbed on DVB/CAR (S2) fiber <sup>x,y,z</sup> and on DVB/CAR/PDMS (S3) fiber <sup>X,Y,Z</sup> (*P* < 0.05). -: not detected; *ns*: not significant (*P* > 0.05); \**P* < 0.005, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001

We detected 7 ketone compounds. Among them 3,5-octanediene-2-one and phenyl methyl ketone were found only in all adipose tissues. The first was also the most abundant ketone as reported by Sivadier et al. (2008) who determined the 3,5-octanediene-2-one as a major compound in adipose tissues. The extraction with different coatings did not differ in ketone number. The highest proportion of 3,5-octanediene-2-one was found to be in caul fat in extraction by DVB/CAR/PDMS, followed by tail fat by CAR/PDMS coating (Table 2). It might have

taken longer to reach equilibrium with DVB/CAR/PDMS at the same extraction time due to a greater number of volatile compounds in tail fat as consequently different affinities of volatiles for the fiber coating. Nevertheless, fiber difference was not affected proportion of 3,5-octanediene-2-one, irrespectively of adipose tissues (Table 2).

Phenols, alcohols, and esters were in less proportion and number in adipose tissues compared to other compounds. 3- and 4- Methyl

phenols were routinely determined. The type of fiber coating did not affect the proportion of phenol in tail fat, but DVB/CAR/PDMS coating had an enhancing effect on these in perirenal and caul fats (Fig. 1). As shown in Fig. 1, alcohols were detected in adipose tissues except for caul fat by DVB/CAR/PDMS. In perirenal and tail fat high alcohol proportions were determined by DVB/CAR/PDMS, like esters. This trend was in disagreement with the findings of Marco et al. (2004) who reported that CAR/PDMS fiber had a higher affinity for lower molecular weight compounds. These differences could be attributed to extraction time since a 15-min extraction with CAR/PDMS coating fiber provided a good yield for esters in headspace of foal dry-cured loin, but extended extraction time up to 45 min with DVB/CAR/PDMS coating as in the present study increased the proportion of ester and decreased the proportion of alcohol, which was highest in sample extracted by DVB/CAR/PDMS fiber for 15 min (Lorenzo, 2014). In addition, identifying a greater number of volatile components by CAR/PDMS coating may result in a reduction in their relative percent composition.

### Principal component analysis

In order to discriminate of SPME fibers, principal component analysis (PCA) was conducted on the data obtained from major VCs identified in adipose tissues extracted by the both fibers (Fig. 3A). PC1 and PC2 explained 67% of total variance in VCs in headspace of adipose tissues. Also, PCA analysis was applied on data from FAs together with VCs. As can be seen in Fig. 3B, the variation between the adipose tissues can all be explained by two components. Tail fat that has a higher aldehyde (Fig. 3A) and PUFA (Fig. 3B) proportion separated from the other ones and positioned on the positive side of PC1. A differentiation between the SPME fibers was proved along PC2 (Fig. 3A), those analyzed with CAR/PDMS and DVB/CAR/PDMS were in the negative and positive sides of PC2, respectively. As can be seen in Fig. 3A, a marked variation between the SPME fibers was also observed for perirenal fat. This may be a consequence of the fact that VCs in more number (12) were detected

by DVB/CAR than by DVB/CAR/PDMS. Most of the major VCs were also located on the above the bi-plot chart. In particular styrene and 2-butenal, which have a higher negative eigenvector of PC2 component, resulted in a higher relative percentage in the analysis of adipose tissues by CAR/PDMS. Carboxylic acids, 2-phytene and acetic acid phytyl ester determined in perirenal and caul fats and aldehydes (*trans,trans,2,4*-decadienal, nonanal, 3-dodecenal, *trans-2* isomers of hexenal, heptenal, octenal, and decenal) found in tail fat extracted by DVB/CAR/PDMS in a high relative percentage were lined along PC2 with high positive eigenvectors (Fig. 3A). But, aldehydes derived from oxidation of fatty acids were clearly separated tail fats from caul and perirenal fats. These aldehydes which have higher levels in tail fat coincide with the fact that tail fat has more oleic, linoleic, CLA and linolenic acids (Fig. 3B). The difference in aldehyde proportions according to the fibers used also clearly distinguished the tail fats from each other.

### CONCLUSION

SPME is an appropriate tool for qualitative analysis of VCs in the headspace of adipose tissues. Both CAR/PDMS and DVB/CAR/PDMS fiber coatings are feasible for studying volatiles from adipose tissue. However, the number of VCs detected in headspace of adipose tissues varied from the tissue to tissue. It was observed that VCs in greater number were extracted by DVB/CAR coating than DVB/CAR/PDMS. Probably due to the detection of VCs in less number, an increase in the relative percentage of VCs extracted by DVB/CAR/PDMS was observed. Tail fat with high oleic, linoleic and linolenic acids was clearly separated from other tissues based on aldehydes, which are fatty acid oxidation products, mainly hexanal. Aldehydes, namely octanal, nonanal, and decanal produced from C18:1; hexanal, *trans-2*-heptenal, *trans-2*-octenal, *trans,trans-2,4*-decadienal, and benzaldehyde from C18:2, and also *trans,trans-2,4*-decadienal, decanal, benzaldehyde from C18:3 can give an information about fatty acid profile of adipose tissue.

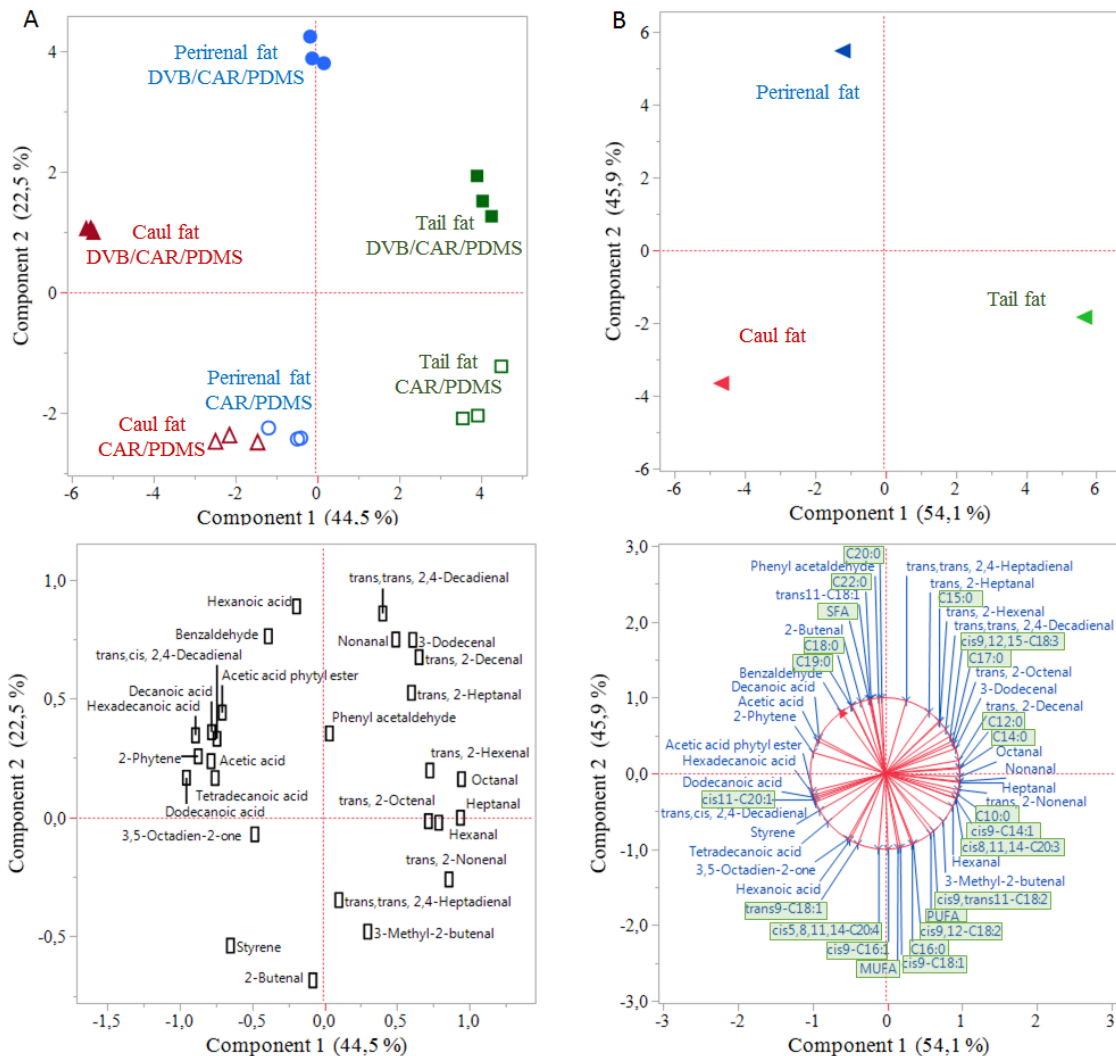


Fig. 3. Results of principal component analysis of VCs (A) and FAs together with VCs (B) identified in perirenal (○), tail (□) and caul (△) fats by CAR/PDMS (empty symbols) and DVB/CAR/PDMS (filled symbols).

Extraction by DVB/CAR/PDMS coating provided a good yield for carboxylic acids and benzaldehyde. If the goal is to identify aldehydes, especially fatty acid oxidation products and hydrocarbons with low molecular weights, as well as a greater number of volatile compounds, CAR/PDMS fiber seems to be recommended for volatile compounds from adipose tissues. But if the target is carboxylic acids, esters, and also aldehydes with high molecular weight, DVB/CAR/PDMS coating may be utilized due to its high affinity for mentioned compounds. Even so, the optimum extraction time should be

examined to determine the time to reach equilibrium avoiding the presence of lipid oxidation products such as aldehydes favored by prolonged exposure.

**CONFLICT OF INTEREST**

The authors have declared no conflicts of interest for this article.

**AUTHOR CONTRIBUTIONS**

Zehra Güler: Project administration, methodology, writing-review & editing. Ahmet



Dursun: Formal analysis, statistical analysis, visualization.

## FUNDING

This work was supported by the Scientific Research Project Fund of Hatay Mustafa Kemal University under the project number 18M015.

## REFERENCES

- Alonso, A., Vazquez-Araujo, L., Garcia-Martinez, S., Ruiz, J.J., Carbonell-Barrachia, A.A. (2009). Volatile compounds of traditional and virus-resistant breeding lines of *Muchamiel* tomatoes. *European Food Research and Technology*, 230: 315–323. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1173-2>
- Balasubramanian, S., Panigrahi, S. (2011). Solid-phase microextraction (SPME) techniques for quality characterization of food products: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 4: 1-26. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0299-3>
- Bas, P., Berthelot, V., Pottier, E., Normand, J. (2007). Effect of level of linseed on fatty acid composition of muscles and adipose tissues of lambs with emphasis on trans fatty acids. *Meat Science*, 77: 678-688. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.05.022>
- Body, D.R. (1977). Characterization of bovine rumen liquor isoprenoid hydrocarbons with reference to dietary phytol. *Lipids*, 12: 204-207. <https://doi.org/10.1007/BF02533295>
- Calkins, C.R., Hodgen, J.M. (2007). A fresh look at meat flavor. *Meat Science*, 77: 63-80. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.04.016>
- Cavalli, J-F., Fernandez, X., Lizzani-Cuvelier, L., Loiseau, A-M. (2003). Comparison of static headspace, headspace solid phase microextraction, headspace sorptive extraction, and direct thermal desorption techniques on chemical composition of french olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 7709-7716. <https://doi.org/10.1021/jf034834n>
- Dursun, A., Güler, Z. (2019). Effects of types of casing with the different materials on volatile compounds (VCs) of sausages (sucuks) during the ripening. *Mustafa Kemal University Journal of Agricultural Sciences*, 24: 308-3016.
- Elmore, J.S., Cooper, S.L., Enser, M., Mottram, D.S., Sinclair, L.A., Wilkinson, R.G., Wood, J.D. (2005). Dietary manipulation of fatty acid composition in lamb meat and its effect on the volatile aroma compounds of grilled lamb. *Meat Science*, 69: 233-242. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.07.002>
- Elmore, J.S., Erbahadir, M.A., Mottram, D.S. (1997). Comparison of dynamic headspace concentration on tenax with solid phase microextraction for the analysis of aroma volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 2638–2641. <https://doi.org/10.1021/jf960835m>
- Elmore, J.S., Mottram, D.S., Hierro, E. (2001). Two-fibre solid-phase microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry for the analysis of volatile aroma compounds in cooked pork. *Journal of Chromatography A*, 905: 233–240. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)00990-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)00990-0)
- Garcia-Esteban, M., Ansorena, D., Astiasaran, I., Ruiz, J. (2004). Study of the effect of different fiber coatings and extraction conditions on dry cured ham volatile compounds extracted by solid-phase microextraction (SPME). *Talanta*, 64: 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.03.007>
- Gianelli, M.P., Flores, M., Toldra, F. (2002). Optimization of solid phase microextraction (SPME) for the analysis of volatile compounds in dry-cured ham. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82: 1703-1717. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1249>
- Güler, Z. (2007). Changes in salted yoghurt during storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 42: 235-245. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01505.x>
- Güler, Z. (2014). Profiles of organic acid and volatile compounds in acid-type cheeses containing herbs and spices (surk cheese). *International Journal of Food Properties*, 17: 1379-1392. <https://doi.org/10.1080/10942912.2012.697957>

- Güler, Z., Taşdelen, A., Şenol, H., Kerimoğlu, N., Temel, U. (2009). The determination of volatile compounds in set-type yogurts using static headspace gas chromatographic method. *The Journal of Food*, 34: 137-142.
- Güler, Z., Tekin, A., Park, Y.W. (2016). Comparison of biochemical changes in kefir produced from organic and conventional milk at different inoculation rates of kefir grains. *Journal of Food Science and Nutrition Therapy*, 2: 8-14.
- Güler, Z., Tekin, A., Dursun, A. (2019). Chemical changes in strained dairy product produced with organic milk by using kefir grains and yogurt culture during refrigerated storage. *Academic Food*, 17: 306-316. <https://doi.org/10.24323/akademik-gida.647693>
- Güler, Z., Dursun, A., Türkmen, D. (2022). Comparison of pistachio (*Pistacia vera* L.) kernel volatile compounds of “Siirt”, “Uzun” and “Kirmizi” grown in Turkey: Effect of traditional and industrial in-shell roasting. *Journal of Food Process Engineering*, 45: e13957. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13957>
- Jelen, H.H., Obuchowska, M., Zawirska-Wojtasiak, R., Wasowicz, E. (2000). Headspace solid-phase microextraction use for the characterization of volatile compounds in vegetable oils of different sensory quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 2360-2367. <https://doi.org/10.1021/jf991095v>
- Jiang, Q., Li, C., Yu, Y., Xing, Y., Xiao, D., Zhang, B. (2018). Comparison of fatty acid profile of three adipose tissues in Ningxiang pigs. *Animal Nutrition*, 4: 256-259. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.05.006>
- Lorenzo, J.M. (2014). Influence of the type of fiber coating and extraction time on foal dry-cured loin volatile compounds extracted by solid-phase microextraction (SPME). *Meat Science*, 96: 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.06.017>
- Mahachi, L.N., Rudman, M., Arnaud, E., Muchenje, V., & Hoffman, L.C. (2020). Application of fat-tailed sheep tail and backfat to develop novel warthog cabanossi with distinct sensory attributes. *Foods*, 9: Article 1822. <https://doi.org/10.3390/foods9121822>
- Marco, A., Navarro, J.L., Flores, M. (2004). Volatile compounds of dry-fermented sausages as affected by solid-phase microextraction (SPME). *Food Chemistry*, 84: 633-641. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00288-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00288-7)
- Marsili, R.T. (1999). Comparison of solid-phase microextraction and dynamic headspace methods for the gas chromatographic–mass spectrometric analysis of light-induced lipid oxidation products in milk. *Journal of Chromatographic Science*, 37: 17-23. <https://doi.org/10.1093/chromsci/37.1.17>
- Page, B.D., Lacroix, G. (1993). Application of solid-phase microextraction to the headspace gas chromatographic analysis of halogenated volatiles in selected foods. *Journal of Chromatography A*, 648: 199–211. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)83303-A](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)83303-A)
- Pan, S.X., Ushio, H., Ohshima, T. (2005). Comparison of volatile compounds formed by autoxidation and photosensitized oxidation of cod liver oil in emulsion systems. *Fisheries Science*, 71: 6369-647. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2005.01010.x>
- Peng, Y.S., Brown, M.A., Wu, J.P., Liu, Z. (2010). Different oilseed supplements alter fatty acid composition of different adipose tissues of adult ewes. *Meat Science*, 85: 542-549. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.03.003>
- Priolo, A., Cornu, A., Prache, S., Krogmann, M., Kondjoyan, N., Micol, D., Berdague, J-L. (2004). Fat volatiles tracers of grass feeding in sheep. *Meat Science*, 66: 475-481. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(03\)00136-0](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(03)00136-0)
- Razote, E., Jeon, I., Maghirang, R., & Chobpattana, W. (2002). Dynamic air sampling of volatile organic compounds using solid phase microextraction. *Journal of Environmental Science and Health B*, 37: 365–378. <https://doi.org/10.1081/PFC-120004477>
- Rule, D.C. (1997). Direct transesterification of total fatty acids of adipose tissue, and of freeze-dried muscle and liver with boron-trifluoride in

- methanol. *Meat Science*, 46: 23-32. 1  
[https://doi.org/0.1016/s0309-1740\(97\)00008-9](https://doi.org/0.1016/s0309-1740(97)00008-9)
- Serrano, E. Beltrán, J. Hernández, F. (2009). Application of multiple headspace-solid-phase microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry to quantitative analysis of tomato aroma components. *Journal of Chromatography A*, 1216: 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.11.026>
- Shingfield, K.J., Wallace, R.J. (2014). *Synthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans*. In: Conjugated linoleic acids and conjugated vegetable oils. B. Sels and A. Philippaerts (Eds.). Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. <https://doi.org/10.1039/9781782620211-00001>
- Sivadier, G., Ratel, J., Bouvier, F., Engel, E. (2008). Authentication of meat products: Determination of animal feeding by parallel GC-MS analysis of three adipose tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 9803-9812. <https://doi.org/10.1021/jf801276b>
- Tekin, A., Güler, Z. (2021). The effect of ripening medium (goat skin bag or plastic barrel) on the volatile profile, color parameter and sensory characteristics of Tulum cheese. *Journal of Central European Agriculture*, 22: 19-38. <https://doi.org/10.5513/JCEA01/22.1.3051>
- Vasta, V., Ventura, V., Luciano, G., Andronico, V., Pagano, R.I., Scerra, M., Biondi, L., Avondo, M., Priolo, A. (2012). The volatile compounds in lamb fat are affected by the time of grazing. *Meat Science*, 90: 451-456. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.09.006>
- Watkins, P.J., Rose, G., Warner, R.D., Dunshea, F.R., Pethick, D.W. (2012). A comparison of solid-phase microextraction (SPME) with simultaneous distillation–extraction (SDE) for the analysis of volatile compounds in heated beef and sheep fats. *Meat Science*, 91: 99-107. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.12.004>
- Young, O.A., Berdague, J-L., Viallon, C., Rousset-Akrim, S., Theriez, M. (1997). Fat-borne volatiles and sheepmeat odour. *Meat Science*, 45: 183-200. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(96\)00100-3](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(96)00100-3)
- Young, O.A., Lane, G.A., Priolo, A., Fraser, K. (2003). Pastoral and species flavour in lambs raised on pasture, lucerne or maize. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83: 93-104. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1282>
- Yu, A. I., Sun, B. G., Tian, D. T., Qu, W. Y. (2008). Analysis of volatile compounds in traditional smoke-cured bacon (CSCB) with different fiber coatings using SPME. *Food Chemistry*, 110: 233–238. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.040>



## ÇÖREK OTUNDAN İZOLE EDİLEN PROTEİNLERİN MODEL GIDA EMÜLSİYONLARINDA KULLANIMI VE ORAL PROSESİNİN TRİBOLOJİK İNCELENMESİ

Hilal Yılmaz\*

Biyoteknoloji Bölümü, Bartın Üniversitesi, Kutlubey Kampüsü, Bartın, Türkiye

Geliş/ Received 20.01.2023; Kabul/ Accepted : 07.03.2023; /Online baskı: Published online 31.03.2023

Yılmaz, H. (2023). Çörek otundan izole edilen proteinlerin model gıda emülsiyonlarında kullanımı ve oral prosesinin tribolojik incelenmesi. GIDA (2023) 48 (2)435-444 doi: 10.15237/ gida.GD23016

Yılmaz, H. (2023). The use of proteins isolated from nigella sativa in model food emulsions and the tribological investigation of their oral processes. GIDA (2023) 48 (2)435-444 doi: 10.15237/ gida.GD23016

### ÖZ

Kültürümüzde önemli yeri olan çörek otu sıklıkla yağı için tercih edilmektedir ve yağı çıkarılmış küspesinde ise protein gibi değerli bileşikler atık olarak kalmaktadır. Proteinler gıda endüstrisinde yaygın kullanılan emülgatörlerdir. Gıdalarda kullanıldığında, bitkisel proteinlerin oral prosesini anlamak, tat almayı ve duyuşsal kabul edilebilirliği etkilediği için önemlidir. Fakat ağız ortamında salya/mukus ile etkileşime giren çörek otu proteinleri ve bu proteinlerle sabitli emülsiyonların tat alımını etkileyen akış, yağlama, sürtünme ve kayganlık özelliklerindeki (tribolojik özellikler) değişimler daha önce araştırılmamıştır. Bu çalışma ile yağı çıkarılmış çörek otundan elde edilen proteinlerle hazırlanmış sulu çözeltilerin ve emülsiyonların model mukus varlığında ağız ortamında oluşturdukları sürtünme davranış değişiklikleri tribolojik olarak incelenmiştir. Ağız ortamını taklit edici yüzeyler arasında, çörek otu proteiniyle hazırlanmış emülsiyon ve model mukus ayrı ayrı çok iyi kayganlaştırıcı özellik göstermiştir. Fakat emülsiyon ve mukus karıştırıldığında sürtünme katsayısı oldukça artmıştır. Bu durum çörek otu proteini ile mukus proteininin etkileşime girerek emülsiyonda topaklanmaya sebep olduğunu göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** Çörek otu, protein, emülsiyon, münin, oral proses, triboloji

## THE USE OF PROTEINS ISOLATED FROM NIGELLA SATIVA IN MODEL FOOD EMULSIONS AND THE TRIBOLOGICAL INVESTIGATION OF THEIR ORAL PROCESSES

### ABSTRACT

*Nigella sativa*, has an important place in our culture, is often preferred for its oil, and valuable compounds such as protein remain as waste in the oil-cake. Proteins are widely used emulsifiers in the food industry. Understanding the oral process of plant proteins is important as it affects taste and sensory acceptance of foods. However, changes in flow, friction, and lubrication properties (tribological properties) affecting the taste of *Nigella sativa* proteins and their emulsions have not been investigated. In this study, the changes in the friction behavior of the emulsion prepared with the *Nigella Sativa* protein isolates in the presence of model mucus were tribologically investigated. Between the surfaces that mimic the oral environment, the emulsion and model mucus separately showed superior lubricating properties. However, when emulsion and mucus were mixed, the friction coefficient increased considerably. This showed that *Nigella Sativa* protein and mucus protein interacted and caused emulsion flocculation.

**Keywords:** *Nigella sativa*, protein, emulsion, mucin, oral process, tribology

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: hiclebioglu@bartin.edu.tr

☎: (+90) 544 849 0058

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

## GİRİŞ

Çörek otu, *Ranunculacea* (Düğünçiçeğigiller) familyasına ait *Nigella sativa* türüdür ve bitkinin kapsül içerisinde oluşan tohumu besin olarak kullanılır (Baytop, 1984). Çörek otu tohumları, uçucu yağ (% 0.38-0.49), sabit yağ (% 30-40), protein (% 20-30), saponin, melantin, nigellin ve tanen içerirler (Worthen vd., 1998). Çörek otu yağı özellikle sağlık alanında ve gıda teknolojisinde sık kullanılan maddelerden biridir (Bulca, 2014). Çörek otu bitkisinin yağı önemli ekonomik değere sahiptir (Çelik ve Gül, 2016). Günümüzde bitkisel kaynakların gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılabilirliği, kimyasal bileşenlerinin araştırılması ve bunların insan sağlığına olan etkilerinin saptanması önem kazanmıştır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde farmasötik maddelerin maliyetli olmasından dolayı bazı sağlık problemlerinin çözümünde, bitkisel ürünler alternatif tedavi olarak karşımıza çıkmaktadır (Bulca 2014). Çörek otu yağının besleyici ve aroma yönünden zengin özelliği yanında antibakteriyel, antifungal koruyucu özellikleri nedeniyle gıda sanayinde kullanılabilecek çok önemli bir gıda olduğu bildirilmiştir (Kaya vd., 2003). Çörek otu tohumları bazı gıdaların üretiminde (örneğin: macun, pasta, peynir, turşu ve fırıncılık ürünleri gibi) aroma verici olarak da kullanılmaktadır (D'Antuono vd., 2002; Cheikh-Rouhou vd., 2007). Çörek otu tohumu bileşenleri fonksiyonel olup kozmetik ve diyet ek ürünlerinin hazırlanmasında da kullanılmaktadır (Bulca, 2014). Kültürümüzde önemli bir yeri olan ve çok çeşitli kullanımları ve sağlık açısından faydaları bulunan çörek otu, sıklıkla yağı için de tercih edilmektedir ve literatürdeki çoğu çalışma çörek otu yağıyla ilgilidir. Bu bitkinin yağları dışındaki bileşenleri ve bu bileşenlerin fonksiyonel özellikleri yeterince araştırılmamıştır. Yağı çıkarılmış çörek otu küspesi ise çoğunlukla atık olarak kalmaktadır, fakat bu küspe protein gibi değerli bileşikler içermektedir.

Protein kaynağı olarak bitkileri kullanmak, et, süt, yumurta gibi hayvansal protein kaynakları için hayvan sayısının artmasına bağlı sera gazı salınımındaki artışı engeller. Ayrıca, bitkisel protein üretimi için harcanan enerji ve su miktarı, hayvansal protein üretimi için harcanandan

oldukça azdır (González vd., 2011; Asgar vd., 2010). Protein kaynağı olarak bitkilerin kullanımı avantajlı olmasına rağmen, günümüzde gıda formülasyonlarında kullanımı kısıtlıdır. Bu durumun nedenleri, bitkilerden elde edilen proteinlerin yeterince araştırılıp geliştirilmemiş olmasıdır. Bitkisel proteinlerin, protein izolatu (protein içeriği %90 ve üzeri) veya konsantresi (protein içeriği %48—70) ve emülgatör olarak gıda uygulamalarında, ilaç üretimi ve diğer endüstriyel süreçlerde kullanıldığını rapor edilmektedir (Sari vd., 2015; Moure vd., 2006).

Proteinler gıda endüstrisinde polisakkaritlere ve fosfolipitlere ek olarak en yaygın kullanılan emülgatörlerdir (McClements vd.,2004). Emülsiyon birbiri içerisinde çözünmeyen (su ve yağ gibi) iki sıvının sabitleyici üçüncü bir madde (emülgatör) yardımıyla süspansiyon olarak tutulmasıdır. Süt, krema, meşrubat, bebek maması, çorba, kek hamuru, salata sosu ve mayonez emülsiyon içeren gıdalara örnektir. Ayrıca emülsiyonlar, koruyucu, renk ve aroma verici olarak vitaminler ve çeşitli fonksiyonel gıdalarda kullanılır (Velikov ve Pelan, 2008; McClements ve Li, 2010). Hem bitkisel kaynaklara yönelimin artması hem de bitkisel atıkların değerlendirilmesi adına bitkilerden ekstrakte edilen proteinlere olan ilgi son yıllarda artmıştır (Çetiner ve Bilek, 2018). Emülsiyon esaslı gıda ürünleri, oral proses sırasında bileşenlerin türüne ve maruz kaldığı işlem koşullarına göre çeşitli fizikokimyasal, duyuşsal ve biyolojik özellikler sergilemektedir. Gıda emülsiyonlarının oral prosesi sırasında salya/mukus ile karışması, vücut sıcaklığına ısınması veya soğuması, ağızdaki diş, dil ve damak gibi yüzeyler arasında sıkışması gibi çeşitli proseslere maruz kalmaktadır (Dresselhuis vd., 2007).

Ağız boşluğunun fizyolojisi daha önce çalışılmış ve açıklanmıştır, fakat gıda emülsiyonlarının oral proses sırasındaki davranışları hakkında çok az şey bilinmektedir. Gıda emülsiyonlarının oral prosesini anlamak için bazı araştırmacılar emülsiyonların yağ içeriğinden kaynaklı duyuşsal algıların kimyasal ve reolojik (akış) özelliklerini analiz etmeye çalışmışlardır (Sarkar ve Krop, 2019). Diğer yandan salya-emülsiyon

etkileşiminin, emülsiyonların tat/duyusal özellikleri üzerine etkisi olduğu tahmin edilmektedir (Çelebioğlu vd., 2020). Bunun sebebi ağıza alınan bir gıda emülsiyonunun yutuluncaya kadar salyaya maruz kalmasıdır. Salyanın ağızda oluşturduğu viskoelastik yapının en önemli kaynağı içerisindeki glikolize protein olan müsinlerdir. Yapılan çalışmalar protein ile sabitli emülsiyonlarda model salya ve müsinin network oluşumuna bağlı topaklanma oluşturduğunu göstermiştir (Çelebioğlu vd., 2020). Gıdalarda kullanıldığında, bitkisel proteinlerin oral prosesini anlamak, tat almayı ve duyusal kabul edilebilirliği etkilediği için önemlidir. Fakat ağız ortamında salya ile etkileşime giren çörek otu proteinleri ve bu proteinlerle sabitli emülsiyonların tat alımını etkileyen akış, yağlama, sürtünme ve kayganlık özelliklerindeki (reolojik ve tribolojik özellikler) değişimler daha önce çalışılmamıştır.

Reoloji, maddelerin deformasyonu ve akışı ile ilgilenen bilim dalıdır. Reolojik özellikler, gıdaların duyusal görünüş özellikleriyle ilgili olup bazı yapısal ve mekanik özellikler görünüşten anlaşılabilir. Fakat reoloji, protein sabitli emülsiyonlar gibi küçük tanecikli, sıvı/yarı-katı gıda ürünlerinin ağız ortamındaki akış özelliklerinin tat alımıyla bağlantısında yetersiz kalmaktadır. Triboloji bilimi ise iki yüzey arasında ince film halinde bulunan lubrikantın kayma, yağlama ve sürtünme özelliklerini inceleyen bir bilim dalıdır ve son yıllarda özellikle gıda emülsiyonlarının oral prosesini simüle etmek için kullanılmaktadır (Meyer vd., 2011, Vardhanabhati vd., 2011, Chen ve Stokes, 2012, van Aken 2013, Chen vd., 2014). Triboloji tekniklerinin son uygulamaları, salya/mukus ve gıda proteini içeren sıvıların lubrikasyon özelliklerinin nicel karakterizasyonuna da imkân vermektedir (Vardhanabhati vd., 2011, Çelebioğlu vd., 2016). Bu yöntem ile elde edilen veriler mukus ve emülsiyonların içerdiği proteinlerin ağızdaki etkileşimi sonucu tat, kıvam ve aroma algısında önemli etkisi olduğunu göstermiştir (van Aken vd., 2013, Çelebioğlu vd., 2016; 2020). Bu sebeple uygun şartlarda ekstrakt edilen ve fonksiyonel özellikleri anlaşılan bitkisel proteinlerin oral proses sırasında geçirdikleri değişimler yeni ürün formülasyonlarında önemlidir. Buna göre bu

çalışmada yağı çıkarılmış çörek otundan elde edilen proteinlerle hazırlanmış sulu çözeltilerin ve emülsiyonların model mukus varlığında ağız ortamında oluşturdukları sürtünme davranış değişiklikleri tribolojik olarak incelenmiştir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Bitkisel materyallerin ve model mukusun hazırlanması

Bartın yerel marketlerden alınan çörek otu hammadde olarak kullanılmıştır. Analizlerden önce çörek otları öğütülerek 0.25 mm açıklığa sahip elekten geçirilerek ince toz halinde kullanıma hazır hale getirilmiştir. Protein izolasyonu ve izole edilen proteinlerin tribolojik özellikleri çalışmaları için laboratuvar ortamında yağı ayrılmış çörek otu posaları materyal olarak kullanılmıştır. Yağ ayırma işlemi için Soxhlet ekstraktörü ve çözücü olarak hekzan kullanılmıştır. Bu düzenek ile 60°C'de 4 saat boyunca yağ ayırma işlemi yapılmıştır (Hara and Radin, 1978).

Model mukus hazırlamak için kullanılacak olan ve sığır alt çene tükürük bezinden elde edilen müsin proteini (>%95) Merck Millipore'dan (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) satın alınmıştır ve ilave saflaştırma yapılmadan kullanılmıştır. Müsin proteininin kütlece %1'lik çözeltisi fosfat tamponu (PBS) kullanılarak (pH 7) hazırlanmış ve model mukus olarak kullanılmıştır.

### Kimyasal içerik analizleri

Kimyasal içerik analizi için aşağıdaki analitik yöntemler kullanılmıştır (AOAC, 1990):

- (i) Nem miktarı tayini için 1 gram örnek 105°C etüvde sabit ağırlığa gelene kadar kurutulmuş ve aradaki ağırlık farkından nem miktarı yüzde olarak hesaplanmıştır.
- (ii) Kül miktarı tayini için 1 gram örnek 550°C kül fırınında 24 saat yakılarak hesaplanmıştır.
- (iii) Toplam yağ miktarı Soxhlet metodu ile belirlenmiştir.
- (iv) Toplam protein miktarı Kjeldahl metoduyla belirlenmiştir.
- (v) Ham lif miktarı tayini için önce örnekler sülfirik asit çözeltisinde (0,255 N) 30 dakika hidroliz edilmiş ve yıkanmıştır. Daha sonra potasyum hidroksit çözeltisinde (0,313 N) 30

dakika kaynatılmış ve filtre edilip yıkanmıştır. Kalan kısım 105°C'de 24 saat kurutulmuş ve sonra 550°C'de sabit ağırlığa gelene kadar yakılmıştır. Bu prosedür boş kontrol için de yapılmıştır. Kuru organik/inorganik kısım ile kül kısmının arasındaki ağırlık farkı lif miktarını vermiştir (Celebioglu vd., 2012).

(vi) Toplam karbohidrat miktarı ise aşağıdaki fark formülü ile belirlenmiştir (Sahin and Sumnu, 2006):

Toplam karbohidrat miktarı (%) = kuru örnek % - yağ % - protein % - kül % - lif %

Kuru örnek, 105°C etüvde sabit ağırlığa gelene kadar kurutulmuş ve nemi uzaklaştırılmış örnek anlamına gelmektedir.

### Protein İzolasyonu

Protein izolasyonu yağı ayrılmış çörek otu posalarının alkali ekstraksiyonu ve asitle çöktürme işlemleriyle yapılmıştır. Buna göre yağı ayrılmış 10 gram çörek otu posası 300 mL %1 NaOH çözeltisi içinde oda sıcaklığında 1 saat boyunca manyetik karıştırıcıda (300 rpm) karıştırıldıktan sonra santrifüj edilmiştir (2600×g 10 dakika 4 °C). Toplanan süpernatant pH değeri 0.5 M hidroklorik asit kullanılarak pH=3.9'a (izoelektrik noktası) ayarlanarak 300 rpm'de 30 dakika manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Bu aşamanın sonunda çöken proteinler santrifüj ile ayrılarak toplanmıştır.

### Emülsiyon hazırlanması

Çörek otundan izole edilen proteinlerle hem protein çözeltileri hem de bu proteinlerle sabitli emülsiyonlar hazırlanarak triboloji ölçümlerinde kullanılmıştır. Protein çözeltisi kütlece %1 olarak ve 10 mM PBS tamponu kullanılarak pH 7'de hazırlanmıştır. Emülsiyon için ise hazırlanan kütlece %1'lik protein çözeltisine ayçiçek yağı yavaş yavaş eklenerek önce düşük hızda (6,000 rpm), tüm yağ eklendikten sonra ise 30 dk boyunca yüksek hızda (20,000 rpm) Ultra-Turrax homojenizatör (DI 25 basic; IKA-WERKE, Staufen, Germany) kullanılarak karıştırılmıştır. Karıştırma sırasında oluşabilecek sıcaklık yükselmelerini önlemek için su banyosu kullanılmıştır. Hazırlanan emülsiyon kütlece %25 ayçiçek yağı içermektedir (yağ/su oranı 1:3). Aynı

prosedürle ayçiçek yağı yerine çörek otu yağı kullanılarak da karşılaştırma yapılmıştır.

### Triboloji ölçümleri

Protein çözeltisi ve emülsiyonunun yüzeyler arası yağlama/sürtünme özellikleri ile bunların model mukusun kayganlık, sürtünme ve yağlama özelliklerine etkisini karakterize etmek için Pin-on-Disk Tribometresi (Turkyus POD&HT&WT) kullanılmıştır. Bu tribometre düzeneğinde belli bir yükte yüklenmiş küresel pin, düzlem disk üzerinde belli bir hızda git-gel olarak kayarak ilerlemektedir. Bir motor yardımıyla hareket eden disk, pin ve disk arasında sürtünme kuvveti oluşmasını sağlar. Uygulanacak kuvvet pin üzerine ağırlığı bilinen bir yük eklenmesi ile kontrol edilir ve kayan yüzeyler arasında oluşan sürtünme kuvveti gerilim ölçer ile izlenir. Sürtünme katsayısı  $\mu$  ile gösterilir ve aşağıdaki denklem ile hesaplanır:

$$\mu = F_{\text{sürtünme}}/F_{\text{yük}}$$

Sürtünme katsayısı ölçümleri için kullanılacak Polydimethylsiloxane (PDMS) yüzeyleri oluşturmak için PDMS kit (Sylgard 184, Dow Corning) kullanılmıştır. Kontaminasyonu önlemek için PDMS yüzeyler her ölçümde sadece bir kere kullanılmış ve diğer ölçüm için yeni PDMS yüzeyler takılmıştır. Daha sert bir yüzeyi taklit edebilmek için yüksek yoğunluklu polietilen (HDPE) pin ve PDMS yüzey çifti de kullanılmıştır. HDPE pin temizlenerek birçok kez kullanılabilir.

Emülsiyon-mukus sisteminin hıza ve yüke bağlı tribolojik davranışını izlemek için, sırasıyla 0.25 – 100 mm/s kayma hızı aralığı ve 1, 2, 5, 7 ve 10 N yükler seçilmiştir. Her örnek için sürtünme katsayıları oda sıcaklığında en az üç tekrarlı ölçümler sonucu hesaplanmıştır.

### SONUÇ VE TARTIŞMA

#### Çörek otunun kimyasal içerik analizi

Çörek otu kimyasal içerik analizleri nem, kül, protein, yağ, ham lif ve toplam karbohidrat içerikleri ölçümleri olarak üç tekrarlı alınmıştır ve sonuçlar Çizelge 1'de verilmiştir. Çörek otunda bulunan karbohidrat miktarı %34,8 ve ham lif miktarı %10 olarak bulunmuştur. Endüstriyel olarak çoğunlukla yağ için kullanılan çörek otunda %34 gibi yüksek bir miktarda yağ oranı

bulunmuştur. Bu çalışmanın asıl ilgi ve odak noktası olan protein ise %19,5 olarak elde edilmiştir. Bulunan değerler literatür ile uyumludur.

Çizelge 1. Çörek otunun kimyasal içerik analizi  
Table 1. Chemical content analysis of *Nigella Sativa*

Çörek otu bileşenleri <i>Nigella Sativa components</i>	İçerik miktarları <i>Concentration</i>
Yağ / Fat	% 34±0.8
Protein / Protein	% 19.5±0.5
Nem / Moisture	% 1±0.1
Kül / Ash	% 0.7±0.2
Ham lif / Crude fiber	% 10±0.6
Toplam karbonhidrat / <i>Total carbohydrate</i>	% 34,8±0.5

Literatürdeki çörek otu protein miktarını içeren çalışmalar incelendiğinde (Çizelge 2), protein miktarı %19 ila %23 arasında değiştiği görülmektedir. Farklı bölgelerden alınan örneklerde kimyasal içerik miktarındaki değişimler beklenen bir durumdur fakat genel olarak bakıldığında bu çalışma ile verimli bir şekilde protein izole edilebildiği sonucuna varılabilir.

Çizelge 2. Farklı çalışmalarda çörek otundan elde edilen protein miktarlarının karşılaştırılması  
Table 2. Comparison of protein amounts obtained from *Nigella Sativa* in different studies

Çörek otu protein miktarı <i>Protein content of Nigella sativa</i>	Bulunduğu çalışma <i>Studies</i>
% 19.5±0.5	Mevcut çalışma
% 19.2±0.2	Mohammed vd., 2016
% 23.1±1.1	Solati vd., 2014
% 20.0±0.3	Khoddami vd., 2011
% 22.6±0.2	Cheikh-Rouhou vd., 2007
% 23.3±0.6	Shah ve Kasturi, 2003
% 20.8±1.1	Atta, 2003

### Uygulanan yüke bağlı lubrikasyon davranışları

Yağı çıkarılmış çörek otu posasından elde edilen proteinlerle protein çözeltisi ve emülsiyonlar hazırlanarak yüzeyler arası sürtünme ve lubrikasyon davranışlarının yağ ve su fazına göre farklılıkları ve model mukus varlığındaki değişimleri tribolojik olarak karşılaştırılmıştır.

Şekil 1’de PDMS-PDMS yüzey çiftleri arasında kayan akışkan örneklerin oluşturduğu sürtünme katsayısı değerleri pin-on-disk tribometresi ile 1 mm/s hızda 1-10 N yük değişiminde incelenmiştir. Yağ örnekleri, müsin çözeltisi ve çörek otu proteini ile hazırlanmış emülsiyonun sürtünme katsayılarında genel olarak artan yük ile birlikte hafif bir azalış olsa da yüke bağlı önemli değişimler olmamıştır. Diğer yandan yük miktarını 1 N’den 10 N’a artırdığımızda, çörek otu protein çözeltisinin sürtünme katsayısı değeri 0.54’ten 0.29’a önemli bir düşüş göstermiştir. Bunun sebebi, artan yükün oluşturduğu basınç ile protein moleküllerinin PDMS yüzeyindeki boşlukları doldurarak daha pürüzsüz bir yüzey oluşturması ve böylece iki yüzey arasındaki sürtünmeyi azaltmasıdır.

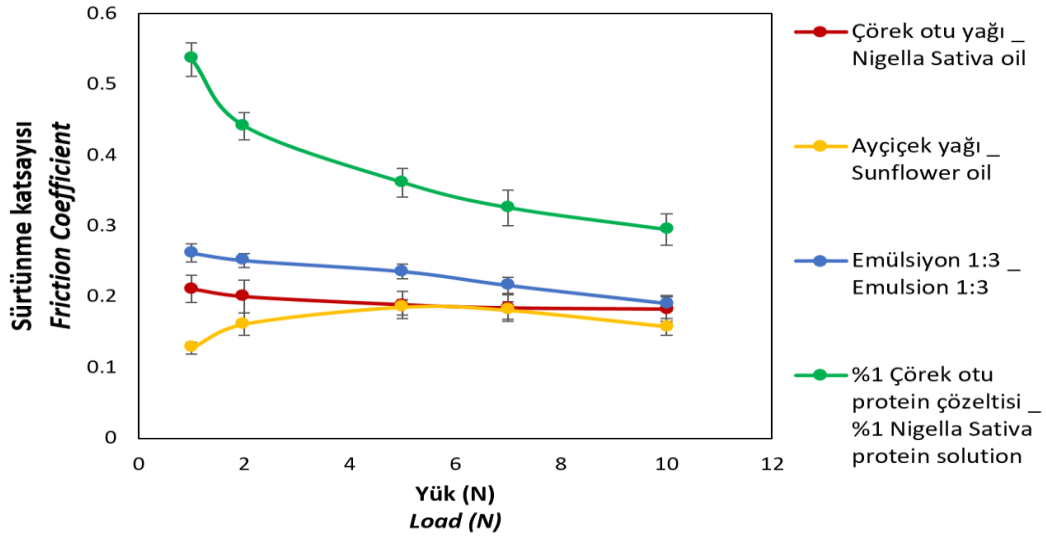
Örneklerin yağlama/lubrikasyon özellikleri karşılaştırıldığında ise PDMS-PDMS yüzeylerinde en iyi lubrikantların sırasıyla müsin çözeltisi>ayçiçek yağı>çörek otu yağı>emülsiyon>çörek otu protein çözeltisi olarak gözlemlenmektedir. Tüm gastrointestinal sistemimizi sararak koruyucu bir ortam sağlayan mukus tabakasının aynı zamanda iyi bir kayganlaştırıcı/lubrikant olduğu bilinmektedir (Çelebioglu vd., 2020). Yağ örneklerine bakıldığında ise ayçiçek yağının çörek otuna göre daha yağlayıcı olduğu görülmektedir. Çörek otu yağı, ayçiçek yağına göre biraz daha fazla sürtünme katsayısı değerleri vermiştir; bu durum çörek otu yağının ( $\rho$ : 1,009.4 - 1,071.2 kg/m<sup>3</sup>) ayçiçek yağına ( $\rho$ : 918.8 kg/m<sup>3</sup>) göre daha yoğun olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Bu çalışmada kullandığımız PDMS yüzeyler hidrofobik ve hafif pürüzlü özelliğe sahip yüzeylerdir. Bu özelliklerinden dolayı PDMS yüzeylerin ağız ortamını (dil ve damak) taklit etmede başarılı bir yüzey olduğu gösterilmiş ve bu sebeple gıda oral proses çalışmalarında sıklıkla tercih edilmiştir (Lee vd., 2005). Farklı yüzey çiftlerini karşılaştırmak için HDPE-PDMS yüzey çifti de kullanılmış ve Şekil 2’de gösterilmiştir. HDPE kullanılan ölçümlerde emülsiyon da yağlar kadar iyi lubrikant özellik göstermiştir, öte yandan çörek otu protein çözeltisi yine nispeten yüksek sürtünme katsayısı değeri verirken bu değer artan



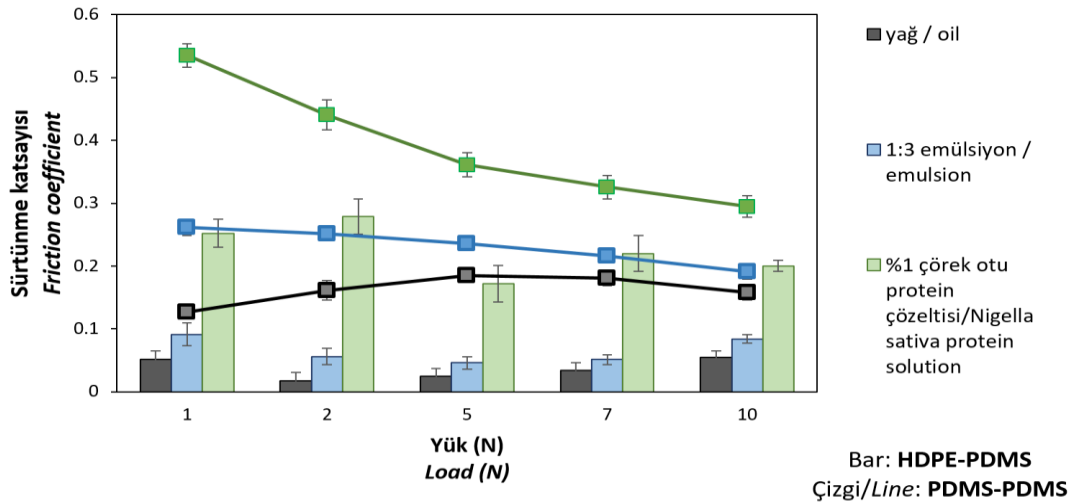
yükle birlikte düşme göstermemiştir. HDPE yüzey de PDMS gibi hidrofobik özelliğe sahip olmasına rağmen PDMS'e göre daha sert ve daha pürüzsüz bir yapıdadır böylece farklı mekanik özelliklere sahiptir. Sonuç olarak, uygulanan yük

ve hız gibi tribolojik ölçüm parametreleri değiştirilirse bile farklı yüzeyler kullanıldığında uygulanan basınç bölgeleri değişeceği için farklı tribolojik sonuçlar elde edilecektir (Çelebioğlu vd., 2016).



Şekil 1. PDMS-PDMS yüzey çifti arasında 1 mm/s hızda kayan örneklerin uygulanan yüke bağlı sürtünme katsayıları

Figure 1. Load dependent friction coefficients of the samples from the sliding contacts of PDMS-PDMS pair at 1 mm/s



Şekil 2. Yüke bağlı sürtünme katsayılarının kullanılan yüzey çiftine göre değişimi (Hız: 1 mm/s) (Bar grafik HDPE-PDMS yüzey çifti, çizgi grafik ise PDMS-PDMS yüzey çifti verilerini göstermektedir.

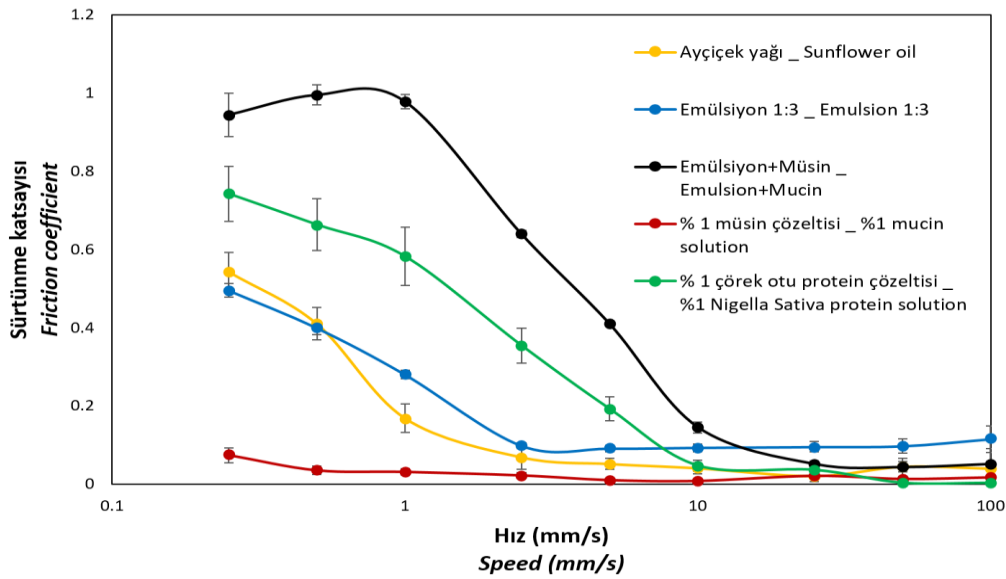
Siyah renk ayçiçek yağını, mavi renk çörek otu proteini ile hazırlanmış 1:3 yağ:su fazı oranında emülsiyonu, yeşil renk ise %1'lik çörek otu proteini çözeltisini temsil etmektedir.

Figure 2. Load dependent friction coefficients from different sliding contacts (Speed: 1 mm/s) (Bar graph represents the data from HDPE-PDMS tribopair, while the line graph fort be PDMS-PDMS. Black color: sunflower oil; Blue color: 1:3 emulsion; Green color: %1 Nigella sativa protein solution).

### Uygulanan hıza bağlı lubrikasyon davranışları

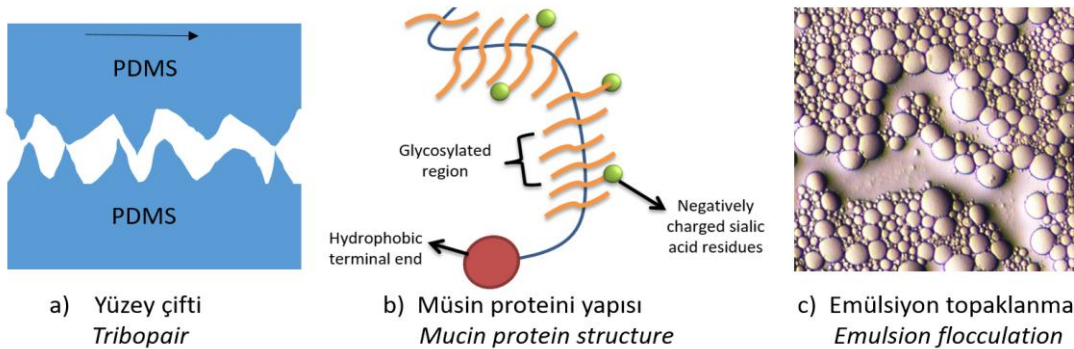
Şekil 3'de çörek otu proteini ile hazırlanan model emülsiyonun, emülsiyon-mukus karışımının ve referans olarak kullanılan yağ ve protein çözeltisi örneklerinin hıza göre değişen sürtünme katsayısı değerleri gösterilmiştir. Bu değerler 1N yük ve 0.25-100 mm/s hız aralığında PDMS-PDMS yüzey çifti kullanılarak ölçülmüştür. Sonuçlara göre tüm örnekler artan hız ile birlikte azalan sürtünme katsayısı davranışı sergilemiştir. Yüksek hız bölgesinde sürtünme katsayısının tekrar artış

göstermemesi kullanılan örneklerin triboçifti arasında elastohidrodinamik lubrikasyon yapamadığını gösterir (Nalam vd., 2010). Bunun anlamı, kullanılan örnekler birbirine temas halindeki PDMS yüzeyleri kayganlaştırabilmiştir fakat yüzeylerin birbiri ile temasını kesecek kadar arayı dolduramamıştır. Bu durum PDMS yüzeyinin pürüzlü olduğundan kaynaklanır çünkü pürüzlü yüzeylerde aralardaki boşluklara lubrikant örnek girse de yine bazı noktalardan triboçiftleri birbirine temas etmeyi sürdürür (Şekil 4a) (Lee vd., 2005).



Şekil 3. PDMS-PDMS yüzey çifti arasında 1 N yük altında kayan örneklerin uygulanan hıza bağlı sürtünme katsayıları

Figure 3. Speed dependent friction coefficients of the samples from the sliding contacts of PDMS-PDMS pair at 1 N load



Şekil 4. PDMS yüzey teması (a), glikolize müsin proteini (b) ve emülsiyon topaklanmasının (c) şematik gösterimi

Figure 4. Illustration of surface contact of PDMS (a), glycosylated mucin protein (b), and emulsion flocculation (c)

Kullanılan örneklerin sürtünme davranışları ayrı ayrı incelendiğinde model mucus olarak hazırlanan % 1'lik mürsin çözeltilisinin üstün kayganlaştırıcı etkiye sahip olduğu görölmektedir. Mürsin proteini glikolize olmuş yapısından (Şekil 4b) dolayı amfifiliktir ve hidroforbik PDMS yüzeylere rahat tutunabilir. Ayrıca izoelektrik noktası 2 civarı olan mürsin proteini bu çalışmada kullanılan pH 7 ortamında negatif yüklü olduğu için moleküler arası elektrostatik itme yardımıyla PDMS yüzeyleri daha rahat ayırabilir ve böylece daha iyi bir lubrikasyon sağlayabilir (Çelebioglu vd., 2016). Yağ örneği ise beklenildiği üzere üstün kayganlaştırıcı etkiye sahiptirler.

Diğer yandan %1'lik çörek otu proteini çözeltilisi zayıf kayganlaştırıcı etki göstermiştir. Bu etki çörek otundan izole edilen proteinlerin düşük amfifilik özelliğe, yani sulu çözeltilerde hidroforbik katmanlara tutunabilme özelliğinin zayıf olduğunu işaret etmektedir. Böylece mürsin proteini ile karşılaştırıldığında çörek otu proteini PDMS yüzeylere daha az tutunabilmekte ve çörek otu protein çözeltilisinin kullanıldığı tribolojik ölçümler sırasında PDMS yüzeyler birbiri ile halen fazlaca temas ederek daha yüksek sürtünme katsayısı vermektedir.

Çörek otundan izole edilen proteini ile hazırlanan model gıda emülsiyonunun sürtünme katsayısı grafiği düşük hızlarda yağdan daha fazla, fakat protein çözeltilisinden oldukça az sürtünme katsayısı verirken, artan hızlarda diğer örnekler kadar düşük sürtünme katsayısına sahip olmuştur (Şekil 3). İlginç olan ise bu emülsiyona model mucus eklendiğinde sürtünme katsayısının özellikle düşük hızlarda protein çözeltilisinin sahip olduğundan bile daha fazla değere ulaşmasıdır. Mürsin proteininden çok farklı lubrikasyon özelliğe sahip proteinlerin model mucus ile karışması, mucusun lubrikasyonunda hızlı bir azalmaya sebep olduğuna dair bulgular literatürdeki benzer çalışmalarda da rapor edilmiştir (Vardhanabhuti vd., 2011; Çelebioglu vd., 2016). Bu durum yüzeylere tutunan toplam moleköl miktarındaki değişimle açıklanmaktadır. Ortamda mürsin proteininden daha küçük boyutlu protein molekülleri olduğunda bunlar yüzeye daha çabuk ulaşım alanı işgal ederek mürsin proteininin

yüzeye tutunmasını engellemektedir. Emülsiyonlarda ise durum biraz daha farklıdır. Gıda emülsiyonları ağız ortamında salya ile etkileşime girdiğinde emülsiyondaki damlacık boyutunun arttığı ve emülsiyon stabilitesinin bozulduğu rapor edilmiştir (Çelebioglu vd., 2020).

Çörek otu proteiniyle hazırlanan emülsiyonun model mucus ile karıştırılması sonucu sürtünme katsayısının da önemli ölçüde arttığı görölmektedir. Bu durum şöyle özetlenebilir: çörek otu proteini ile hazırlanan emülsiyon, mürsin proteini ile hazırlanan model mucus ile karıştırıldığında, protein molekülleri arasındaki etkileşim sonucu mürsinin PDMS yüzeylere tutunması azalmış ve böylece kayganlaştırıcı etkisi de azalmıştır. Öte yandan, yine proteinler arası etkileşim ve rekabet sonucu emülsiyondaki damlacık boyutu artarak emülsiyonda topaklanmaya sebep olmuştur (Şekil 4c). Tüm bunların sonucu olarak da sürtünme katsayısı artmıştır.

Sürtünme katsayısı değişimi ile gıdaların oral prosesinde tat alımının etkilendiğine dair çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda (Sarkar ve Krop, 2019), elde edilen sonuçlar mantıklıdır. Emülsiyonun ağız ortamında mucus ile karışması sonucu dil-damak gibi yüzeyler arası değişen sürtünme, emülsiyonların kremsilik, akıcılık ve dolayısıyla aroma gibi özelliklerini algılamayı sağlamaktadır (Dresselhuis vd., 2007).

Bu çalışma kapsamında, çörek otundan elde edilen proteinlerin emülgatör olarak kullanıldığı model emülsiyonların fizyolojik olarak aktif bölgeden geçerken uğradığı fizikokimyasal ve yapısal değişimleri anlamak, ağızdan sonraki sindirim basamaklarını anlamak için temel oluşturacaktır. Tribolojik yaklaşım, yeni protein kaynaklarının ve bunlarla hazırlanan emülsiyonların fizikokimyasal özelliklerini ürün dizaynı sırasında geliştirerek, gıda emülsiyonlarından yağda çözünür besinlerin artan biyoulaşılabilirliği, azaltılmış doymuş yağ absorpsiyonu ve azaltılmış yağ kullanımı anlamında fayda sağlayabilecektir.

**ÇIKAR ÇATIŞMASI**

Yazar herhangi bir çıkar çatışması beyan etmemektedir.

**REFERANSLAR**

- Asgar, M., Fazilah, A., Huda, N., Bhat, R., Karim, A. (2010). Nonmeat protein alternatives as meat extenders and meat analogs. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9 (5), 513-529.
- Atta, M. B. (2003). Some characteristics of nigella (*Nigella sativa* L.) seed cultivated in Egypt and its lipid profile. *Food chemistry*, 83 (1), 63-68.
- Baytop, T. (1999). Türkiyede bitkiler ile tedavi. *İstanbul Eczacılık Fakültesi Yayınları*, İstanbul, 444.
- Bulca, S. (2014). Çörek otunun bileşenleri ve bu yağın ve diğer bazı uçucu yağların antioksidan olarak gıda teknolojisinde kullanımı. *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 11 (2), 29-36.
- Cheikh-Rouhou, S., Besbes, S., Hentati, B., Blecker, C., Deroanne, C., & Attia, H. (2007). *Nigella sativa* L.: Chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. *Food chemistry*, 101 (2), 673-681.
- Chen, J., Liu, Z., & Prakash, S. (2014). Lubrication studies of fluid food using a simple experimental set up. *Food Hydrocolloids*, 42, 100-105.
- Chen, J., Stokes, J. R. (2012). Rheology and tribology: Two distinctive regimes of food texture sensation. *Trends in Food Science & Technology*, 25 (1), 4-12.
- Çelebioğlu, H. Y., Gudjónsdóttir, M., Chronakis, I. S., Lee, S. (2016). Investigation of the interaction between mucins and  $\beta$ -lactoglobulin under tribological stress. *Food Hydrocolloids*, 54, 57-65.
- 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.
- Çelik, A. D., Aykut, G. (2016). Tıbbi ve aromatik bitki yetiştiriciliği ve dış ticareti: Hatay ili örneği. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 21 (2).
- Çetiner, M., Bilek, S. E. (2018). Bitkisel protein kaynakları. *Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 33 (2), 111-126.
- D'Antuono, L. F., Moretti, A., Lovato, A. F. (2002). Seed yield, yield components, oil content and essential oil content and composition of *Nigella sativa* L. and *Nigella damascena* L. *Industrial crops and products*, 15 (1), 59-69.
- Dresselhuis, D. M., Klok, H. J., Stuart, M. A. C., de Vries, R. J., van Aken, G. A., de Hoog, E. H. (2007). Tribology of o/w emulsions under mouth-like conditions: determinants of friction. *Food Biophysics*, 2 (4), 158-171.
- González, A. D., Frostell, B., Carlsson-Kanyama, A. (2011). Protein efficiency per unit energy and per unit greenhouse gas emissions: potential contribution of diet choices to climate change mitigation. *Food Policy*, 36 (5), 562-570.
- Hara, A. Radin, N.S., (1978). Lipid extraction of tissues with a low toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*, 90, 420-426.
- Helrich, K. (1990). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists: Association of official analytical chemists, Arlington, VA, USA.
- Kaya, M. S., Kara, M., Özbek, H. (2003). Çörek otu (*Nigella sativa*) tohumunun insan hücresel bağışıklık sisteminin CD3+, CD4+, CD8+ hücreleri ve toplam lökosit sayısı üzerine etkileri. *Genel Tıp Dergisi*, 13 (3), 109-112.
- Khoddami, A., Ghazali, H. M., Yassoralipour, A., Ramakrishnan, Y., Ganjloo, A. (2011). Physicochemical characteristics of nigella seed (*Nigella sativa* L.) oil as affected by different extraction methods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88 (4), 533-540.
- Lee, S., Müller, M., Rezwan, K., Spencer, N. D. (2005). Porcine gastric mucin (PGM) at the water/poly (dimethylsiloxane)(PDMS) interface: influence of pH and ionic strength on its conformation, adsorption, and aqueous lubrication properties. *Langmuir*, 21 (18), 8344-8353.

- McClements, D. J. (2004). Protein-stabilized emulsions. *Current opinion in colloid & interface science*, 9 (5), 305-313.
- McClements, D. J., Li, Y. (2010). Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Advances in Colloid and Interface Science*, 159 (2), 213-228.
- Meyer, D., Vermulst, J., Tromp, R., De Hoog, E. (2011). The effect of inulin on tribology and sensory profiles of skimmed milk. *Journal of Texture Studies*, 42 (5), 387-393.
- Mohammed, N. K., Manap, A., Yazid, M., Tan, C. P., Muhiadin, B. J., Alhelli, A. M., Meor Hussin, A. S. (2016). The effects of different extraction methods on antioxidant properties, chemical composition, and thermal behavior of black seed (*Nigella sativa* L.) oil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016.
- Moure, A., Sineiro, J., Domínguez, H., Parajó, J. C. (2006). Functionality of oilseed protein products: A review. *Food Research International*, 39 (9), 945-963.
- Nalam, P. C., Clasohm, J. N., Mashaghi, A., Spencer, N. D. (2010). Macrotribological studies of poly (L-lysine)-graft-poly (ethylene glycol) in aqueous glycerol mixtures. *Tribology Letters*, 37 (3), 541-552.
- Sahin, S., Sumnu, S. (2006). Physical properties of foods: Springer Science & Business Media. In: USA.
- Sari, Y. W., Mulder, W. J., Sanders, J. P., Bruins, M. E. (2015). Towards plant protein refinery: review on protein extraction using alkali and potential enzymatic assistance. *Biotechnology Journal*, 10 (8), 1138-1157.
- Sarkar, A., Krop, E. M. (2019). Marrying oral tribology to sensory perception: A systematic review. *Current Opinion in Food Science*, 27, 64-73.
- Shah, S., Ray, K. S. (2003). Study on antioxidant and antimicrobial properties of black cumin (*Nigella sativa* Linn). *Journal of Food Science and Technology (Mysore)*, 40 (1), 70-73.
- Solati, Z., Baharin, B. S., Bagheri, H. (2014). Antioxidant property, thymoquinone content and chemical characteristics of different extracts from *Nigella sativa* L. seeds. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91 (2), 295-300.
- van Aken, G. A. (2013). Acoustic emission measurement of rubbing and tapping contacts of skin and tongue surfaces in relation to tactile perception. *Food Hydrocolloids*, 31 (2), 325-331.
- Vardhanabhuti, B., Cox, P., Norton, I., Foegeding, E. (2011). Lubricating properties of human whole saliva as affected by  $\beta$ -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 25 (6), 1499-1506.
- Velikov, K. P., Pelan, E. (2008). Colloidal delivery systems for micronutrients and nutraceuticals. *Soft matter*, 4 (10), 1964-1980.
- Worthen, D. R., Ghosheh, O. A., Crooks, P. (1998). The in vitro anti-tumor activity of some crude and purified components of blackseed, *Nigella sativa* L. *Anticancer Research*, 18 (3A), 1527-1532.
- Yilmaz Celebioglu, H., Cekmecelioglu, D., Dervisoglu, M., Kahyaoglu, T. (2012). Effect of extraction conditions on hemicellulose yields and optimisation for industrial processes. *International Journal of Food Science & Technology*, 47 (12), 2597-2605.

## KAHVALTILIK YENİ BİR ÜRÜN: IŞKIN (*Rheum ribes L.*) REÇELİ

İhsan Güngör Şat\*, Bilginur Yıldırım, Halil İbrahim Binici

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

Geliş/ Received: 28.11.2022; Kabul/ Accepted: 12.03.2023; /Online baskı: Published online 31.03.2023

Şat, İ. G., Yıldırım, B., Binici, H. İ. (2023). Kahvaltılık yeni bir ürün: Işkın (*Rheum ribes L.*) reçeli. GIDA (2023) 48 (2) 445-458 doi: 10.15237/ gida.GD22119

Şat, İ. G., Yıldırım, B., Binici, H. İ. (2023). A new breakfast product: Işkın (*Rheum ribes L.*) jam. GIDA (2023) 48 (2) 445-458 doi: 10.15237/ gida.GD22119

### ÖZ

Bu çalışmada, farklı formülasyonlar uygulanarak üretilen reçellerin fizikokimyasal, duyu ve antioksidan özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Taze ışkında (*Rheum ribes L.*) toplam kuru madde, suda çözünür kuru madde, titrasyon asitliği, pH, toplam fenolik madde, DPPH radikali giderme aktivitesi, toplam şeker, indirgen şeker, sakkaroz değerleri sırasıyla %7.66; %4.50; %1.02 (w/v); 4.14; 1.81 mg GAE/100 g; %87.70; 1.68 g/100g; 1.01 g/100g; 0.64 g/100g olarak tespit edilmiştir. Işkın reçele işlenmesi ile toplam fenolik madde ve DPPH değerlerinde azalma olduğu gözlemlenmiştir. En yüksek toplam fenolik madde miktarı R3 tipinde tespit edilmiştir. HMF miktarlarının tüm reçel tiplerinde standartlara uygun olduğu belirlenmiştir. Duyusal açıdan değerlendirilen reçel tipleri arasında en çok beğenilen ve tercih edilen reçel tipi R1 örneği olmuştur. Işkın'ın taze olarak tüketilmesinin yanında reçele de işlenmesi; kahvaltılık ürün çeşitliliğinin zenginleştirilmesi ve katma değeri olan yeni bir ürünün ortaya çıkarılması açısından faydalı olacaktır.

**Anahtar kelimeler:** Işkın (*Rheum ribes L.*), reçel, antioksidan aktivite, toplam fenolik madde, DPPH

## A NEW BREAKFAST PRODUCT: IŞKIN (*Rheum ribes L.*) JAM

### ABSTRACT

In this study, it was aimed to determine the physico-chemical, sensory and antioxidant properties of jams produced by applying different formulations. Total dry matter, water-soluble dry matter, titration acidity, pH, total phenolic content, DPPH radical scavenging activity, total sugar, reducing sugar, sucrose values of fresh ışkın plant (*Rheum ribes L.*) were determined between 7.66%; 4.50%; 1.02% (w/v); 4.14; 1.81 mg GAE/100 g; 87.70%; 1.68 g/100g; 1.01 g/100g; 0.64 g/100g, respectively. It was observed that there was a decrease in total phenolic substance and DPPH values with the processing of light into jam. The highest total phenolic substance content was determined in the R3 type. It was determined that the amounts of HMF were in accordance with the standards in all jam types. Among the jam types evaluated in terms of sensory, the most liked and preferred jam type was the R1 sample. In addition to consuming Işkın as fresh, processing it into jam will be beneficial in terms of enriching the variety of breakfast products and creating a new product with added-value.

**Keywords:** Işkın (*Rheum ribes L.*), jam, antioxidant activity, total phenolic substance, DPPH

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: igsat@atauni.edu.tr

☎: +(90) 442 231 2481

İhsan Güngör Şat; ORCID no: 0000-0001-9868-0208

Bilginur Yıldırım; ORCID no: 0000-0001-8438-6788

Halil İbrahim Binici; ORCID no: 0000-0003-3301-3994

## GİRİŞ

Meyve ve sebzeler yüksek su içerikleri nedeniyle bozulmadan uzun süre depolanamadıkları için çeşitli şekillerde işlenerek farklı ürünler elde edilmektedir. Uzun süreli tüketimlerinin sağlanabilmesi için reçel ve marmelat gibi farklı ürünlere işlenmesi bu ürünleri daha dayanıklı hale getirmektedir. Hammadde çeşidinin bol olması ve üretimlerde farklı metotların kullanılması, üretilen ürünlerin de çeşitliliğini artırmaktadır. Gerek geleneksel gerekse endüstriyel düzeyde kullanılan yöntemlerden biri olan reçel üretimi yaygın olarak kullanılan işleme yöntemlerinden biridir (Cemeroğlu vd., 2003; Turgut vd., 2021). Genel bir ifadeyle reçel; meyvenin sakkaroz ve diğer katkı maddeleri kullanılarak belirli bir kıvama gelene kadar pişirilmesi ile elde edilen bir üründür. Farklı meyve çeşitlerinin bir arada bulunduğu ürünlerde meyve miktarları, standartlarda belirtilen en düşük orana göre hesaplanmaktadır. Reçel üretiminde kullanılacak hammadde ısıtma, soğutma, dondurma veya dondurarak kurutma işlemlerinden uygun olanı ile konsantre edilmektedir. Gerek duyulduğunda geleneksel reçel üretiminde sertleştirme işleminin yapılması için kalsiyum klorür veya kalsiyum laktat çözeltisi kullanılmaktadır. Karbonhidrat ve enerji kaynağı olarak bilinen reçel, çoğunluğunu şekerin oluşturduğu en az 68 Briks çözünür kuru madde içermektedir. 100 gram reçel ortalama 270-280 kalori sağlamaktadır dolayısıyla normal bir insanın günlük enerji ihtiyacının onda birini karşılayabilmektedir (Gülcü, 2012). Reçel, şeker dışında organik asitler, B ve C vitaminleri, aroma maddeleri ve demir, fosfor, kalsiyum, potasyum gibi birçok mineral madde bulundurmaktadır (Cemeroğlu ve Acar, 1986). Reçeller kullanılan meyveye göre farklı miktar ve çeşitte mineral madde içerdikleri için, besleyicilik değerleri daha da artmaktadır (Baysal, 2000). *Rheum ribes* L., Kuzukulağıgiller (*Polygonaceae*) familyasından olup çoğunlukla İran, Irak, Lübnan, Afganistan, Pakistan ve Türkiye'nin doğusunda yetişen çok yıllık otsu bir bitkidir (Şekil 1). Ülkemizde ışkın bitkisi 1000-4000 m rakımda Mayıs-Haziran aylarında kayalıklarda ve çakıl yamaçlarında yetişmektedir. Boyları 40 cm'ye kadar uzayan sürgünler genellikle taban kısmında yapraklı, üst kısımda ise yapraksızdır (Türkmen vd., 2005).

Halk arasında *Rheum ribes* L.; ışkın, eşkin, eşgin, içgin, yayla muz, dağ muz, muz ve uşkun olarak isimlendirilmiştir. Ülkemizde ışkın genellikle kabukları soyulup çiğ olarak tüketilmekle birlikte pişirilmek suretiyle de ışkın çorbası, ışkın yemeği (mıhlama) gibi değişik yemeklerinin yapıldığı da bilinmektedir. Işkın, pH değerinin 3.56 olması sebebiyle ekşi bir tada sahip olup yeşil renkli bir bitkidir. İngiltere ve Avrupa'da popüler olan ışkının sapları ve kökleri kullanılarak çeşitli pastalar, tartlar ve kokteyller yapılmaktadır. Taze ışkın A, C ve E vitamini bakımından zengin olup, yeterli miktarda selenyum içerdiği belirtilmiştir (Munzuroğlu vd., 2000). İçeriğinde aloe emodin, emodin, chrysophanol gibi bileşikler ihtiva etmesi sebebiyle kuvvetli hipoglisemik etki gösterir (Özbek vd., 2004). *R. ribes* L. sadece bir besin kaynağı olarak değil, aynı zamanda insanlar tarafından çeşitli hastalık belirtilerini hafifletmek amacıyla uzun yıllardır kullanılmaktadır (Öztürk vd., 2007). Işkının taze kök, yaprak sapları sebze olarak tüketilirken, kurutulmuş kökleri çeşitli hastalıkların (hemoroid, diyabet ve ülser) tedavisinde yer almaktadır. (Tabata, 1994; Abu-Irmaileh ve Afifi, 2003). Dış kabuğu soyularak yenilen taze ışkın sindirimi kolaylaştırıcı etki göstermektedir (Naqishbandi vd., 2009). Kan şekerinin dengelenmesi için çiğ olarak yenilmesi veya köklerinin kaynatılıp çay olarak tüketilmesi önerilmektedir. Işkın İran'da müşhil ve anti-psoriatik bir ilaç olarak da kullanılmaktadır (Shokravi vd., 1997).

Çalışma materyalimiz olan ışkının halk tarafından hem gıda maddesi olarak hem de çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Işkın meyvesinin bileşimi konusunda birçok çalışma bulunmakla birlikte bu meyveden reçel üretimi ile ilgili herhangi bir bilimsel çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmada, farklı formülasyonlarda ışkın reçelleri üretilerek fizikokimyasal, duyuşsal ve antioksidan özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Araştırma materyali olarak kullanılan *Rheum ribes* L. (Işkın) 2022 yılı mayıs ayında Erzurum piyasasından temin edilmiş 6 farklı reçel üretimi



gerçekleştirilmiştir. Reçeller R1, R2, R3, R4, R5, R6 reçel tipleri şeklinde kodlanmıştır. Bu 6 reçel tipinin 3'üne farklı baharatlar katkı maddesi olarak ilave edilmiştir. Reçel üretimi Erzurum Atatürk Üniversitesi Gıda Mühendisliği Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Kullanılan kristal toz şeker, su, limon, tarçın, zencefil ve karanfil Erzurum'daki yerel bir marketten temin edilmiştir. Meyveler, dış kabuğu soyulup yıkama işlemi yapıldıktan sonra 1 cm boyutlarında kesilerek paslanmaz çelik tencereye alınmıştır. R1 reçel tipi için 500 g ışkın, 500 mL saf su, 500 g toz şeker ve 5 mL limon suyu kullanılarak 55 dk ısıtma işlemi tabi tutulmuştur. R2 reçel tipi için R1'den farklı olarak sırası ile 2 g tarçın, 0.45 g zencefil ve 0.4 g karanfil eklenmiştir. R3 tipi için 500 g ışkın, 500 mL saf su ve 500 g toz

şeker kullanılarak 15 dk ön haşlama işlemine tabi tutulmuş sonra 5 mL limon suyu kullanılmış ve toplamda 40 dk ısıtma işlemi tabi tutulmuştur. R4 tipi için R3'den farklı olarak 2 g tarçın, 0.45 g zencefil ve 0.4 g karanfil eklenmiştir. R5 tipi için 500 g ışkın, 500 mL saf su, 500 mL maden suyu, 500 g toz şeker ve 5 mL limon suyu kullanılmış ve ön haşlama uygulanmadan 40 dk ısıtma işlemi tabi tutulmuştur. R6 tipi için R5'den farklı olarak 2 g tarçın, 0.45 g zencefil ve 0.4 g karanfil eklenmiştir. Her bir reçel numunesi 500 mL'lik kavanozlara konularak +4 °C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Her bir reçel tipi fiziksel ve kimyasal analizlere tabi tutulmuştur. Üretim yöntemine bağlı olarak elde edilen reçellerin yapım özellikleri farklılık göstermektedir. Örneklerin üretim aşamaları Çizelge 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Işkın (*Rheum ribes* L.)  
Figure 1. Işkın (*Rheum ribes* L.)

Çizelge 1. Reçel tiplerine ait formülasyon ve proses koşulları  
Table 1. Formulation and process conditions of jam types

Reçel Tipi/Jam types	Işkın (g)	Su (mL)/Water (mL)	Maden suyu (mL)/ Mineral water	Şeker (g)/Sugar (g)	Limon Suyu (mL)/Lemon juice (mL)	Tarçın (g)/ Cinnamon (g)	Zencefil (g)/ Ginger (g)	Karanfil (g)/Clove (g)	Ön Haşlama (dk)/ Pre- Boiling (min.)	Kaynatma (dk)/Boiling (dk)	Depolama (°C)/Storage (°C)
R1 <sup>1</sup>	500	500	-	500	5	-	-	-	-	55	2-7
R2	500	500	-	500	5	2	0.45	0.4	-	55	2-7
R3	500	500	-	500	5	-	-	-	15	25	2-7
R4	500	500	-	500	5	2	0.45	0.4	15	25	2-7
R5	500	500	500	500	5	-	-	-	-	40	2-7
R6	500	500	500	500	5	2	0.45	0.4	-	40	2-7

<sup>1</sup>R1-6: Formülasyonlar. <sup>1</sup>R1-6: Formulations



## Metot

### *Toplam Kuru Madde (TKM) Tayini*

Kuru madde tayini Cemeroglu (2013)'e göre belirlenmiştir. Örneklerden 3 g alınarak  $105 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de sabit tartıma gelinceye kadar kurutma işlemi yapılmış ve sonuçlar g/100 g olarak verilmiştir.

### *Suda Çözünen Kuru Madde Tayini*

Suda çözünen kuru madde tayininde Abbe refraktometresi (Carl Zeiss) kullanılmıştır. Sonuçlar % olarak ifade edilmiştir (Cemeroglu, 2013).

### *Titrasyon Asitliği Tayini*

Titrasyon asitliği Keleş (1983) ve Cemeroglu (2013)'e göre belirlenmiştir. Taze ışık ve reçel tiplerinden 10 g tartılarak önce blenderden geçirilmiş sonra üzerlerine 20 mL saf su eklenerek manyetik karıştırıcıda iyice parçalanması sağlanmıştır. Daha sonra örnekler kaba filtre kağıdından süzümüştür. 0.1 N NaOH, doldurulmuş bir büretten damla damla erlenmeye baz ilave edilerek fenolfitalin eşliğinde titrasyon yapılmıştır. Titrasyonun son noktası, çözeltinin hafif pembe renge dönüşmesi ile belirlenmiş ve 0.1 N NaOH'den kaç ml sarf edildiği kaydedilerek titrasyon asitliği, susuz sitrik asit cinsinden (SSA) aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır (Cemeroglu, 1992).

$$\text{Asitlik (g/100g)} = (V \cdot f \cdot E \cdot 100) / M$$

V: Titrasyonda harcanan 0.1 N NaOH (mL)

f: Faktör 1 alınır

E: Meyvedeki hâkim organik asidin miliekivalan ağırlığı

M: Alınan örnek miktarı (g)

### *pH analizi*

Örneklerin pH değerleri, pH metre (Mettler Toledo-S210) ile ölçümüştür (Cemeroglu, 2013).

### *Hidroksimetil Furfural (HMF) tayini*

HMF analizi için PG INSTRUMENTS-T60V model spektrofotometre kullanılmıştır. Reçel tiplerinden 20 g alınarak bir miktar saf suda çözüldürülerek son hacim 100 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır. Reçel tipleri homojen hale getirildikten sonra kaba filtre kağıdından süzümüştür. Filtre edilen örneklerden 2'şer mL

alınarak 2 ayrı deney tüpüne aktarılmıştır. Her tüpe 5 mL p-toluidin eklenerek vortekslenmiştir. Deney tüplerinden ilkinde 1 mL barbitürik asit şahit tüpüne ise 1 mL deiyonize su konularak vorteksleme işlemi yapılmıştır. Tüplerin kapakları iyice kapatıldıktan sonra spektrofotometre ile 550 nm de absorbans değerleri ölçülerek aşağıdaki formülle HMF miktarı hesaplanmıştır (Cemeroglu, 2013).

$$\text{HMF (mg/kg)} = 162 \times A$$

A: Deney tüpünün absorbansı - Şahit tüpün absorbansı

162: Düzeltme Faktörü

### *Örnek ekstraktlarının analize hazırlanması*

Toplam fenolik madde ve DPPH analizleri için taze ışık ve reçellere uygulanan ekstraksiyon yönteminde; 100 mL'lik balona 10 g tane kısımlarından örnek tartılarak saf su ve ultraturax yardımı ile parçalama işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra karışım 6000 rpm' de 10 dk santrifüj edilerek üstte kalan berrak kısım Whatman No.1 filtre kağıdı yardımı ile süzümüştür. Taze ışık ve reçellerden elde edilen ekstraktlar analiz edilinceye kadar  $-18^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

### *Toplam Fenolik Madde Tayini (TFM)*

Toplam fenolik madde tayini Gülçin vd. (2004) ve Binici vd. (2021)'e göre modifiye edilerek yapılmıştır. 10 mL'lik tüplere taze ışık ve reçel ekstraktlarından 100 µL alınarak sırası ile üzerine 0.2 N 1 mL folincioaltea, 1.5 mL %20  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  eklenerek saf su ile son hacime tamamlanmıştır. 60 dakika sonra 760 nm de spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır. TFM miktarı mg GAE/100 g ekstrakt olarak hesaplanmıştır.

### *DPPH Radikal Giderme Aktivitesi*

DPPH radikal giderme aktivitesi tayini Gülçin vd. (2004) ve Binici vd. (2021)'nin kullandıkları metotlar modifiye edilerek yapılmıştır.  $10^{-3}$  M DPPH radikali etil alkol ile hazırlanarak son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır. Taze ışık ve reçel ekstraktlarından 100 µL alınarak üzerine 300 µL DPPH eklenmiş ve son hacim etanol ile 3 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra örnekler 30 dakika boyunca karanlık bir ortamda bekletilmiş ve 517 nm dalga boyunda köre karşı okuma yapılmıştır.

Aşağıdaki formül kullanılarak DPPH radikal süpürme aktivitesi reaksiyonu inhibe etme yüzdesi hesaplanmıştır;

% inhibisyon= [(Kontrol absorbanı-Örnek absorbanı)/Kontrol absorbanı] x100

#### *Toplam Şeker, İndirgen Şeker ve Sakkaroz Tayini*

Toplam şeker, indirgen şeker ve sakkaroz tayini Lane-Eynon metodu kullanılarak Cemeroğlu (1992)'e göre yapılmıştır. Bu yöntem ile şeker tayini, alkali ortamda ve kaynama sıcaklığında invert şekerin Fehling çözeltisinde bulunan Cu-II-oksidi suda çözünmeyen Cu-I-okside indirgemesi esasına dayanır. Taze ışkın ve reçel tiplerinden 5 g alınarak kayıpsız olarak 250 mL'lik ölçü balonuna aktarılmıştır. Üzerine doygun nötral kurşun asetat çözeltisinden 2 mL damlatılmış ve balon çizgisine kadar saf su ile tamamlanmıştır. Adi filtre kâğıdı ile süzülükten sonra bir miktar sodyum okzalat ilave edilmiş ve tekrar süzülmüştür. Bu süzüntüden 50'şer mL alınarak iki ayrı 250 mL'lik balona aktarılmıştır. Balonlardan birincisi saf su ile 250 mL'ye çizgisine kadar tamamlanmış, ikincisine 10 mL 1/1'lik HCl ilave edilmiş ve 67-70 °C arasında su banyosunda 5 dakika inversiyona tabi tutulmuştur. İnversiyon sonrasında birkaç damla fenol-fitaleyn damlatılarak 4 N sodyum hidroksit ile nötralize edilmiş ve saf su ile çizgisine tamamlanmıştır. Hazırlanan bu örnek çözeltileri Fehling-I bakır

sülfat pentahidrat (Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) ve Fehling-II sodyum potasyum tartarat tetrahidrat (KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>.4H<sub>2</sub>O) çözeltileri ile kaynatılarak titrasyon yapılmıştır. Sonuçlar aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

Toplam şeker (g/100g): (f/M1) ×100

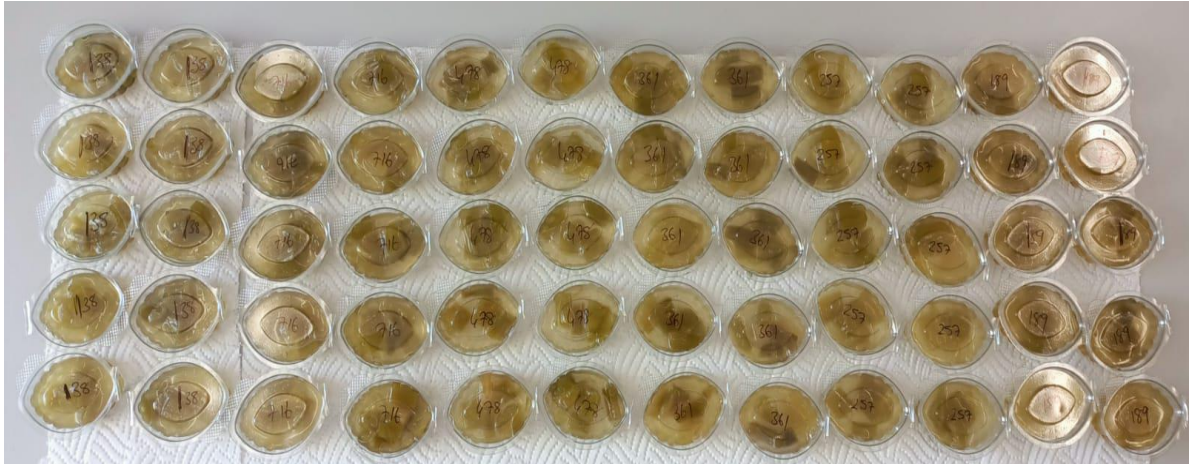
İndirgen şeker (g/100g): (f/M2) ×100

Sakkaroz (%): (Toplam şeker-indirgen şeker) ×100

f: Ayarlama belirlenmiş olan, 10 mL Fehling çözeltisi karışımına eşdeğer invert şeker miktarı, g  
M1: İnversiyondan önceki titrasyonda harcanmış örnek çözeltisinin içerdiği gerçek örnek miktarı, g  
M2: Örneğin inversiyonundan sonraki titrasyonda harcanan miktardaki örnek çözeltisinin içerdiği gerçek örnek miktarı, g

#### *Duyusal Değerlendirme*

Reçel tiplerinin duysal özellikleri Özdoğan (2006) tarafından yapılan yöntemle göre belirlenmiştir. Duyusal analiz için 10 panelist seçilmiş ve panelistler duysal analizde verecekleri skorlar için eğitilmiştir. Reçeller şeffaf plastik kap içerisinde iyi aydınlatılmış beyaz bir zemin üzerine konulmuş (Şekil 2), her bir örnek rastgele numaralanarak kodlanmış; renk, görünüş, yapı, tekstür, tat, koku ve genel kabul edilebilirlik parametrelerinin (1 kötü, 2-3 zayıf, 4-5 orta, 6-7 iyi, 8-9 çok iyi, 10 mükemmel) puanlanması istenmiştir.



Şekil 2. Duyusal analiz için hazırlanan reçel tipleri

*Figure 2. Types of the jam prepared for sensory analysis*

**Renk Tayini**

Renk analizi, renk ölçüm cihazı (Chroma Meter, CR-5, Konika Minolta, Osaka, Japonya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Taze ışkın ve reçel tiplerinin farklı noktalarından yapılan ölçümler ile L\* (beyazlık/siyahlık), a\* (kırmızı/yeşil), b\* (sarı/mavi) renk parametreleri kaydedilmiştir (Binici vd., 2021).

**Viskozite Tayini**

Viskozite tayini için, viskozimetrenin (AND/SW-10) 6 numaralı başlığı kullanılmış, reçel tiplerinin viskoziteleri, 50 devir/dakika kayma hızında ölçülmüştür (Gökalp vd., 1995).

**İstatistiksel Değerlendirme**

Çalışma sonucunda elde edilen verilere varyans analizi uygulanarak, ortalamalar  $P < 0.05$  düzeyinde Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar SPSS 22.0 paket programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. Ayrıca örnekler

arasındaki benzerlik ve farklılıkların tanımlanmasını kolaylaştırmak için tüm verilere temel bileşen analizi (PCA) uygulanmıştır (SIMCA-P + 14.1, UMETRICS, İsveç).

**ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA**

Taze ışkın örneğinde toplam kuru madde (TKM) miktarı %7.66 oranında bulunmuştur (Çizelge 2). Doğan (2016), bir ışkın örneğinde kuru madde miktarını %9.44 olarak tespit etmiştir. Kurt (2022) ışkın örneğinde toplam kuru madde miktarını %7.27 olarak belirlemiştir. Reçel tipleri arasında TKM bakımından önemli ( $P > 0.05$ ) bir farkın olmadığı gözlemlenirken, oranların %69.48-76.88 arasında değiştiği belirlenmiştir (Çizelge 3). Koç ve Yolcu-Ömeroğlu (2019), tarafından yapılan bir çalışmada Anjelika (Melek Otu) reçelinde kuru madde miktarı %72.48 olarak tespit edilmiştir. Yıldırım (2017) tarafından yapılan bir çalışmada geleneksel ve vakum yöntemiyle üretilen kapari reçel tiplerinde TKM miktarları sırası ile %74.13 ve %69.44 olarak bulunmuştur.

Çizelge 2. Reçel üretiminde kullanılan hammaddenin fizikokimyasal özellikleri

Table 2. Physicochemical properties of the raw material used in jam production

Toplam kuru madde (%) <i>Total dry matter (%)</i>	Suda çözünür kuru madde (%) <i>Water soluble dry matter (%)</i>	Titrasyon asitliği (%) <i>Titration acidity (%)</i>	pH	Toplam fenolik madde (mg GAE/g örnek) <i>Total phenolic content (mg GAE/g sample)</i>	DPPH (%) <i>DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)</i>	Toplam şeker (g/100g) <i>Total sugar (g/100g)</i>	İndirgen şeker (g/100g) <i>Reducing sugar (g/100g)</i>	Sakkaroz (%) <i>Sucrose (%)</i>	L*	a*	b*
7.66	4.50	1.02	4.14	1.81	87.70	1.68	1.01	0.64	45.69	-7.13	18.41

Taze ışkın örneğinde SÇKM oranı %4.50 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 2). SÇKM bakımından reçel tipleri arasındaki farkın önemli ( $P < 0.01$ ) olduğu ve en düşük SÇKM oranının %66.75 ile R3 tipinde en yüksek oranın ise %70.50 ile R1 örneğinde olduğu belirlenmiştir. Geleneksel ve ekstra geleneksel reçeller için refraktometre ile tayin edilen SÇKM miktarının en az %68 olması gereklidir (Anonim, 2006). Buna göre reçel tipleri arasında sadece R3 tipine ait reçel örneğinin SÇKM oranı %68'den düşük bulunmuştur. Koç ve Yolcu-Ömeroğlu (2019), tarafından yapılan

çalışmada reçel tiplerinde SÇKM miktarı %72.24 olarak tespit edilmiştir. Yıldırım (2017), kapariden elde edilen reçelerde SÇKM miktarını geleneksel yöntemle üretilen örneklerde %73.01; vakum yöntemi ile üretilen örneklerde ise %68.85 olarak belirlemiştir. Farklı enginar çeşitleri kullanılarak elde edilen reçellerin SÇKM miktarlarının %69.75-70.80 arasında değiştiği tespit edilmiş, gözlemlenen farklılığın haşlama işleminden kaynaklandığı belirtilmiştir (Durmuş 2019).

Çizelge 3. Reçel tiplerinin fizikokimyasal özellikleri  
 Table 3. Physicochemical properties of jam types

	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Toplam kuru madde (%) / Total dry matter (%)	76.88±4.53 <sup>a</sup>	72.79±0.30 <sup>a</sup>	69.48±0.29 <sup>a</sup>	73.89±0.20 <sup>a</sup>	73.12±0.29 <sup>a</sup>	72.74±0.44 <sup>a</sup>
Suda çözünür kuru madde (%) / Water soluble dry matter (%)	70.50±0.00 <sup>a</sup>	69.25±0.35 <sup>b</sup>	66.75±0.35 <sup>d</sup>	69.50±0.00 <sup>b</sup>	69.50±0.00 <sup>b</sup>	68.50±0.00 <sup>c</sup>
Titrasyon asitliği (% w/v) / Titration acidity (%)	0.29±0.00 <sup>b</sup>	0.32±0.01 <sup>a</sup>	0.33±0.01 <sup>a</sup>	0.26±0.01 <sup>c</sup>	0.27±0.01 <sup>c</sup>	0.32±0.01 <sup>a</sup>
pH	3.96±0.00 <sup>b</sup>	3.94±0.01 <sup>b</sup>	3.94±0.01 <sup>b</sup>	4.00±0.01 <sup>a</sup>	3.91±0.01 <sup>c</sup>	3.89±0.00 <sup>c</sup>
<sup>1</sup> HMF (mg/kg)	4.94±0.34 <sup>bc</sup>	4.54±0.00 <sup>c</sup>	6.00±0.23 <sup>a</sup>	4.78±0.11 <sup>c</sup>	5.35±0.23 <sup>b</sup>	3.73±0.23 <sup>d</sup>
Toplam fenolik madde (mg GAE/g örnek) / Total phenolic content (mg GAE/g sample)	0.95±0.01 <sup>c</sup>	1.00±0.00 <sup>c</sup>	1.28±0.01 <sup>a</sup>	1.07±0.14 <sup>c</sup>	1.23±0.05 <sup>ab</sup>	1.11±0.04 <sup>bc</sup>
DPPH (%) / DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)	49.48±0.34 <sup>c</sup>	33.44±0.23 <sup>b</sup>	57.26±0.28 <sup>b</sup>	38.99±0.40 <sup>c</sup>	58.42±0.11 <sup>a</sup>	44.65±0.28 <sup>d</sup>
Toplam şeker (g/100g) / Total sugar (g/100g)	69.03±0.53 <sup>a</sup>	65.17±2.36 <sup>b</sup>	60.51±2.04 <sup>c</sup>	69.22±0.80 <sup>a</sup>	63.50±0.00 <sup>bc</sup>	61.22±1.04 <sup>c</sup>
İndirgen şeker (g/100g) / Reducing sugar (g/100g)	13.37±0.00 <sup>b</sup>	14.31±0.28 <sup>a</sup>	13.04±0.47 <sup>b</sup>	14.51±0.00 <sup>a</sup>	13.03±0.00 <sup>b</sup>	11.55±0.00 <sup>c</sup>
Sakkaroz (%) / Sucrose (%)	52.88±0.50 <sup>a</sup>	48.32±2.51 <sup>b</sup>	45.10±1.49 <sup>b</sup>	51.97±0.70 <sup>a</sup>	47.95±0.00 <sup>b</sup>	47.19±0.99 <sup>b</sup>
L*	30.36±2.52 <sup>ab</sup>	33.68±4.20 <sup>a</sup>	26.05±2.35 <sup>bc</sup>	23.37±0.13 <sup>c</sup>	31.81±2.24 <sup>ab</sup>	23.85±1.48 <sup>c</sup>
a*	-2.08±0.67 <sup>a</sup>	-1.16±0.56 <sup>a</sup>	-1.92±0.23 <sup>a</sup>	-1.76±0.49 <sup>a</sup>	-1.44±0.13 <sup>a</sup>	-1.68±0.24 <sup>a</sup>
b*	14.34±3.84 <sup>a</sup>	12.04±1.51 <sup>a</sup>	13.30±2.23 <sup>a</sup>	11.87±2.50 <sup>a</sup>	10.66±0.30 <sup>a</sup>	12.00±1.29 <sup>a</sup>
Viskozite (Pa.s) / Viscosity (Pa.s)	1.13±0.01 <sup>a</sup>	0.76±0.00 <sup>c</sup>	0.52±0.00 <sup>c</sup>	0.68±0.00 <sup>d</sup>	0.77±0.00 <sup>b</sup>	0.78±0.00 <sup>b</sup>

\*Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. Aynı satırda farklı a-c üst simgeleri ile gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak P<0.05 düzeyinde farklıdır. <sup>1</sup>HMF: 5-hidroksimetilfurfural

\*Values are given as mean±standard deviation. Means shown with different superscripts a-c in the same row are statistically different at the P<0.05 level. <sup>1</sup>HMF: 5-hydroxymethylfurfural

Taze örnekte titrasyon asitliği %1.02 olarak belirlenmiştir (Çizelge 2). Andiç vd. (2009), farklı illerden aldığı ışkın örneklerinin titrasyon asitliğinin %0.84-1.21 arasında olduğunu gözlemlemişlerdir. Taze örneklerin toplam asitlik değerlerinin literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir. Reçel tiplerinin titrasyon asitliğinin %0.26-0.33 arasında değiştiği ve farkın önemli (P<0.01) olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3). Koç ve Yolcu-Ömeroğlu (2019), yaptıkları bir çalışmada toplam asitliği sitrik asit cinsinden %0.1 olarak belirlemiştir. Yıldırım (2017), geleneksel ve vakum yöntemiyle üretilen kapari reçellerinde titrasyon asitliğini 0.65-0.70 g/100g aralığında belirlemiştir. Kullanılan hammaddenin yetiştirme koşulları ve iklim şartlarına bağlı olarak organik asit içerikleri titrasyon asitliği değerlerini etkilemiş olabilir. R4 örneğindeki farklılığın nedeninin ilave edilen katkı maddelerinden olabileceği düşünülmektedir. Işkının yetiştirme koşulları ve iklim şartlarına bağlı olarak organik asit içerikleri

titrasyon asitliği değerlerini etkilemiş olabilir. Üretim aşamalarında titrasyon asitliğinde belirlenen değişimin, askorbik asidin oksidasyon ve ısıl işlemin etkisi ile parçalanmasından kaynaklandığı bildirilmiştir (Uçan vd., 2014).

Taze ışkın örneğinde pH değeri 4.14 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 2). Andiç vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada ışkında pH 3.57 olarak rapor edilmiştir. Bu farklılık bitkinin yetiştiği şartların farklılık göstermesinden kaynaklanabilir. Reçel tiplerinin pH içeriklerinin 3.89-4.00 arasında değiştiği ve reçel tipleri arasında önemli derecede (P <0.01) fark olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3). Reçel tipleri arasında en yüksek pH içeriği 4.00 ile R4 tipinde, en düşük pH içeriği ise 3.89 ile R6 tipinde tespit edilmiştir. Gözlemlenen bu farklılık reçel formülasyonlarının farklı olmasından kaynaklanabilir.

Beklenildiği üzere taze ışıkta HMF tespit edilememiştir. Reçel tiplerinin HMF miktarları arasında önemli ( $P<0.01$ ) fark olduğu gözlemlenirken, oranların 3.73-6.00 mg/kg arasında değiştiği belirlenmiştir (Çizelge 3). En yüksek HMF miktarı 6.00 mg/kg ile R3 reçel tipine ait örnekte bulunmuştur. Örnek tipleri arasında bu farklılığın nedeninin ilave edilen katkı maddelerinin özellikleri, pişirme süreleri, indirgen şeker ve proses koşullarının HMF oluşumuna olan etkisinden kaynaklandığı düşünülebilir. Melekotu reçelinin HMF miktarı 85.2 mg/kg olarak belirlenmiştir (Koç ve Yolcu-Ömeroğlu, 2019). Yıldırım (2017), geleneksel ve vakum yöntemiyle üretilen kapari reçel tiplerinde HMF içeriğini sırasıyla 14.6 mg/kg ve 2.31 mg/kg olarak belirlemiştir. Durmuş (2019), farklı enginar çeşitleri kullanılarak üretilen reçel tiplerinin HMF içeriğinin 36.09 ile 51.79 mg/100 g aralığında olduğunu bildirmiştir. HMF, farklı gıdaların üretimi veya depolanması sırasında oluşan ve kalitenin bozulmasının ölçülmesinde kullanılan indikatörlerden biridir. Isıl işlem uygulanan meyve suyu, reçel, marmelat, jöle, domates salçası gibi birçok üründeki HMF miktarının belli bir seviyenin üzerinde bulunması durumunda renk esmerleşmesine, ürünün tat ve kokusunda önemli bozulmalara, besleyici değerinde azalmalara neden olmaktadır (Hepsağ ve Hayoğlu, 2017). Bu yüzden gıda maddelerinde bulunmasına izin verilen HMF oranları sınırlandırılmış, örneğin birinci sınıf reçel için limit 50 mg/kg ve ikinci sınıf reçel için limit 100 mg/kg olarak belirlenmiştir (Özdoğan 2006). Ancak son dönemde yürürlüğe giren ve yukarıdaki standartları uygulamadan kaldıran Türk Gıda Kodeksi'nin reçel ve meyve suyu tebliğinde HMF parametre olarak belirtilmemiştir (Anonim, 2006). Ürettiğimiz reçel tiplerinin HMF içeriğinin literatürde belirtilenlerden çok daha düşük olduğu görülmektedir.

Taze ışık örneklerinde toplam fenolik madde içeriği 1.81 mg GAE/g olarak tespit edilmiştir (Çizelge 2). Meral (2017) tarafından yapılan bir çalışmada ışık bitkisi güneşte, 50°C ve 80°C'de kurutulmuş ve farklı sıcaklıkların örneklerin antioksidan aktivitesi ve fenolik profili üzerine etkisi araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmada TFM

değerleri 86-236 mg GAE/100g aralığında tespit edilmiş olup en yüksek TFM değerine güneşte kurutulan örneklerde, en düşük TFM değerine ise 80 °C'de kurutulan ışık örneklerinde rastlanmıştır. Güneş (2019), tarafından yapılan bir çalışmada yayla muz ekstraktlarının in vitro fitokimyasal, antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri incelenmiştir. Çalışmada çözücü olarak etil asetat, hekzan, metanol ve saf su kullanılmıştır. Ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri 0.12-0.80 mg GAE/g aralığında tespit edilmiş olup en yüksek fenolik madde içeriğine metanol ekstraktlarında rastlanmıştır. Fitokimyasalların miktarları üzerinde olgunlaşma süresi, genotip, yetiştirme ve iklim koşulları etkili olmaktadır (Lee ve Kader, 2000). Örnekler arasındaki farklılıklar bu sebeplerden kaynaklanabilir. TFM bakımından reçel tipleri arasındaki farklılığın önemli ( $P < 0.01$ ) olduğu gözlemlenirken, reçel tipleri arasında en yüksek TFM %1.28 ile R3 reçel tipinde belirlenmiştir (Çizelge 3). R3 örneğine uygulanan ısıl işlem süresinin kısa olması TFM oranının yüksek çıkmasına sebep olmuş olabilir. Isıl işlem sırasında, ısıya duyarlı fenolik bileşikler gibi bazı biyoaktif bileşenlerin yıkımı nedeniyle gıdanın besin değerinin önemli oranda azaldığı ifade edilmektedir (Choi vd., 2006).

Taze ışık örneklerinde indirgen şeker miktarı, sakkaroz miktarı ve toplam şeker miktarları sırası ile %1.01, %0.64 ve %1.68 olarak bulunmuştur. Andiç vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada ışığın indirgen şeker miktarı %1.64, sakkaroz miktarı %0.11 ve toplam şeker miktarı %1.76 olarak belirlenmiştir. Toplam şeker reçel tipleri arasında en yüksek %69.22 ile R4, en düşük ise %60.51 ile R3 tipinde bulunmuştur (Çizelge 3). Reçellerin jel oluşturması için şeker oranının yaklaşık olarak %68 olması gerekmektedir (Cemeroğlu 2004). Koç ve Yolcu-Ömeroğlu (2019), tarafından yapılan bir çalışmada reçel tiplerinde toplam şeker miktarı %71.10 olarak belirlenmiştir. Yıldırım (2017), acılığı giderilmiş kapari den farklı yöntemlerle elde edilen reçellerde geleneksel yöntemle üretilen örneklerin toplam şeker miktarı %81.02; vakum yöntemi ile üretilen örneklerin ise toplam şeker miktarının %84.41 olduğunu bildirmiştir. Durmuş (2019), farklı enginar çeşitleri kullanılarak üretilen reçel

tiplerinde toplam şeker miktarını 59.51-69.92 g/100 g aralığında belirlenmiştir. Reçel tipleri arasında indirgen şeker miktarının %11.55-14.51 arasında değiştiği ve en yüksek %14.51 ile R4'de, en düşük ise %11.55 ile R6 örneğinde tespit edilmiştir. Sakkarozun inversiyonu ile eşit miktarda glikoz ve fruktoz oluşmaktadır. Reçelin pişirilmesi sırasında sıcaklık, pH ve süreye bağlı olarak sakkarozun inversiyona uğradığı ve böylece oluşan indirgen şeker oranına göre kristalizasyon tehlikesinin ortadan kalktığı bilinmektedir (Cemeroğlu, 2004). Çalışmamızda reçel üretimi açık kazanda yapılmıştır. İndirgen şeker oranları yüksek olduğu için kristalizasyon riski daha azdır. Durmuş (2019), farklı enginar çeşitleri kullanılarak üretilen reçel tiplerinin indirgen şeker miktarlarının 15.75-43.69 g/100 g aralığında olduğunu bildirmiştir. En yüksek sakkaroz %52.88 ile R1'de, en düşük sakkaroz miktarı %47.19 ile R6'da belirlenmiştir. Farklılıkların nedeninin ilave edilen katkı maddelerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Taze ışkın örneğinin DPPH radikali giderme aktivitesi %87.70 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 2). Meral (2017) tarafından yapılan bir çalışmada DPPH radikali giderme aktivitesi değeri güneşte kurutulan örneklerde %52.00-91.00; 50°C de kurutulan örneklerde %23.00-91.00; 80°C'de kurutulan örneklerde ise %11.00-87.00 aralığında bulunmuştur. Öztürk vd. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada da ışkın kök ve gövdelerinin antioksidan aktiviteleri araştırılmış olup bu amaçla iki farklı çözücü kullanılmıştır. Kullanılan metanol ekstraktlarının DPPH aktivitesinin BHT'den daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yıldırım (2019), tarafından yapılan bir çalışmada; *Rheum Ribes* L. ekstrasını içeren sert jelatin üretilmiş ve ekstraktların antioksidan özellik taşıdığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada DPPH radikali giderme aktivitesi %63.17 olarak tespit edilmiştir. Güneş (2019), tarafından yapılan bir çalışmada DPPH radikali giderme aktivitesi etil asetat, hekzan, metanol ve saf su ekstraktlarının 100 mg/ml'lik konsantrasyonlarında sırasıyla %86.86, 77.61, 91.10 ve 84.82 şeklinde tespit edilmiştir. Bu bilgiler ışığında ışkında DPPH radikali giderme aktivitesi değerleri arasında oluşan farklılığın ekstraksiyonda kullanılan çözücü, örnek

konsantrasyonu ve bitkinin yetiştiği şartların farklılık göstermesinden kaynaklanabileceği düşünülebilir. Reçel tipleri arasında en yüksek DPPH radikali giderme aktivitesi %58.42 ile R5, en düşük DPPH radikali giderme aktivitesi ise %33.44 ile R2'de bulunmuştur (P<0.01) (Çizelge 3). Durmuş (2019), farklı enginar çeşitleri kullanılarak üretilen reçel tiplerinde DPPH radikali giderme aktivitesi miktarının kimyasal ekstraktlarda sırasıyla 7.41-7.67 µmol troloks/g kuru ağırlık fiziksel ekstraktlarda ise 2.19 ile 2.44 µmol troloks/g kuru ağırlık aralığında olduğunu tespit etmiştir. Uygulanan ısıl işlemin derecesine bağlı olarak pro-oksidan ve antioksidan moleküller oluşabilir. Isıl işlem sırasında gıdada doğal olarak bulunan antioksidanların yıkıma uğrayabileceği ve antioksidan aktiviteye sahip yeni bileşenlerin oluşabileceği ifade edilmektedir. Bu yeni antioksidan bileşikler Maillard reaksiyonu sırasında özellikle başlangıç safhasında oluşan bileşiklerdir. Uygulanan ısıl işlemin derecesi ve süresi antioksidan özellikleri değiştirebilmektedir (Calligaris vd, 2004).

L\*, a\*, b\* değerleri gıdaların işlenmesi ve depolanması sürecinde meydana gelen kalite değişimleri hakkında bilgi verir. Meyve ve sebzelerde L\*; 0=siyah, 100=beyaz (koyuluk/açıklık), a\*; +a\* kırmızı, -a\* yeşil, b\*; +b\* sarı, -b\* mavi renk yoğunluklarını ifade etmektedir (Şengül vd., 2018). Taze örnekte L, a\* ve b\* değerlerinin sırası ile 45.69 -7.13 ve 18.41 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2). L\* renk değeri bakımından reçel tipleri arasında önemli (P <0.01) fark olduğu, a\* ve b\* renk değerleri bakımından reçel tiplerinin benzer değerlere sahip olduğu tespit edilmiştir (P>0.05) (Çizelge 3). En yüksek L\* (33.68) R2 reçel tipine ait örnekte bulunurken, en düşük L\* değeri (23.37) ise R4 tipi reçel örneklerinde bulunmuştur. Aksay vd. (2018), bütün mandarinlerin reçele işlenmesi ile L\*, a\* ve b\* değerlerinin azaldığını rapor etmişlerdir. R4 örneğine ön haşlama işlemi uygulanması farklılığın sebebi olabilir. Haşlama işleminin koruyucu etkisinin bulunmasına karşın besinlerin özellikle vitaminlerin parçalanmasına ve renk kayıplarına yol açabilmektedir (Keçebaş, 2007). Tamer (2011), L\* değerinin karamelizasyonun bir ölçüsü olduğunu bu durumun hammaddede bulunan

renk pigmentlerinin yüksek sıcaklıkta denatürasyona uğraması sonucu oluştuğunu bildirmiştir.  $a^*$  değeri kırmızı rengin yoğunluğunu gösteren değerdir. Reçel ve ürünlerinde şekerlerin karamelize olmasından kaynaklanan kırmızı renk oluşumu genel olarak arzu edilen bir durum değildir.

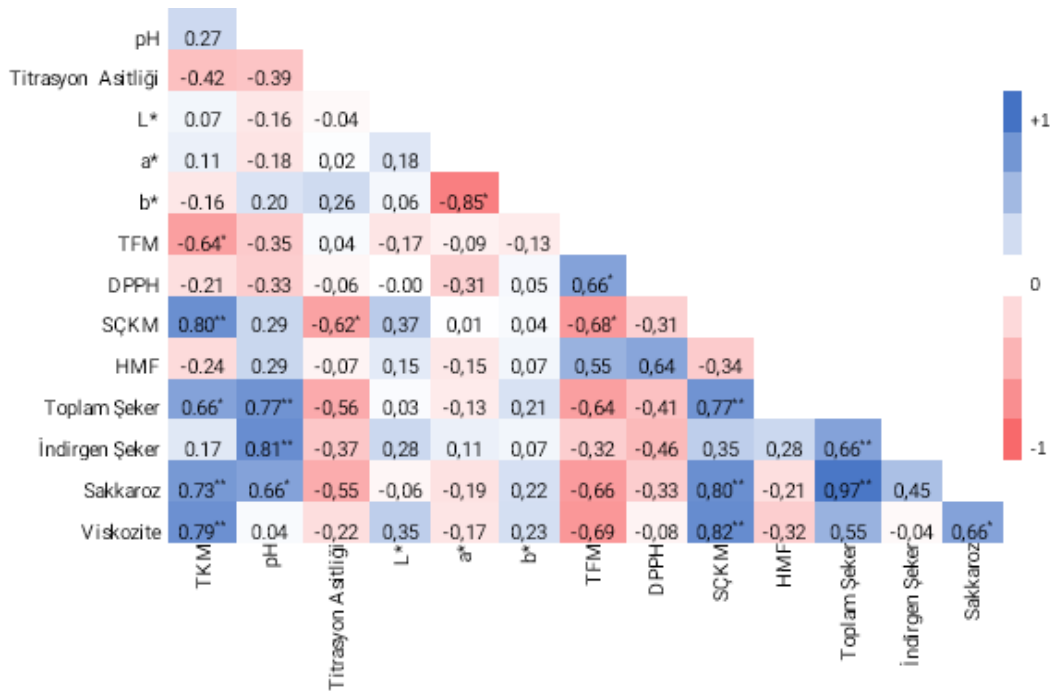
Viskozite bakımından reçel tipleri arasında önemli ( $P < 0.01$ ) fark olduğu tespit edilmiş (Çizelge 3), viskozitesi en yüksek reçelin 1.13 Pa.s ile R1, en düşüğünün ise 0.52 Pa.s ile R3 olduğu belirlenmiştir.

Reçel tiplerine ait duyuşal değerlendirme sonuçları Şekil 5’de verilmiştir. Panelistlerin renk açısından en çok beğendiği reçel tipinin R1 (8.10) olduğu, en düşük puanı ise R5 (5.90) reçel tipinin aldığı görülmektedir.

### Korelasyon ve Temel Bileşen Analizi

Korelasyon analizi iki veya daha fazla değişken arasındaki ilişkiyi ifade eden ve değişkenler

arasındaki neden-sonuç ilişkisini vermeyen ancak nedenselliğin incelenmesinde ön bilgi sağlayan analizdir (Gürbüz ve Şahin, 2014). Taze ışkın ve üretilen ışkın reçellerine ait korelasyon analizi Şekil 3’de gösterilmiştir. Toplam fenolik madde ile DPPH arasında ( $r=0.66$ ,  $P < 0.05$ ) pozitif korelasyon bulunurken, toplam fenolik madde ile suda çözünür kuru madde arasında ( $r=-0.68$ ,  $P < 0.05$ ) negatif korelasyon gözlemlenmiştir. Bu durumda toplam fenolik madde miktarı artarken DPPH değerlerinde de artışın meydana geldiği görülmektedir. Toplam şeker ile pH ve suda çözünür kuru madde arasında ( $0.77$ ,  $P < 0.01$ ) pozitif korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Korelasyon sonuçlarına göre TFM, DPPH, toplam şeker, indirgen şeker ve sakkarozun reçel tipleri üzerine önemli etkisinin olduğu belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre renk maddeleri antioksidan aktiviteyi etkilemektedir. Reçel tiplerinin antioksidan aktivitesini fenolik maddeler etkilemektedir.

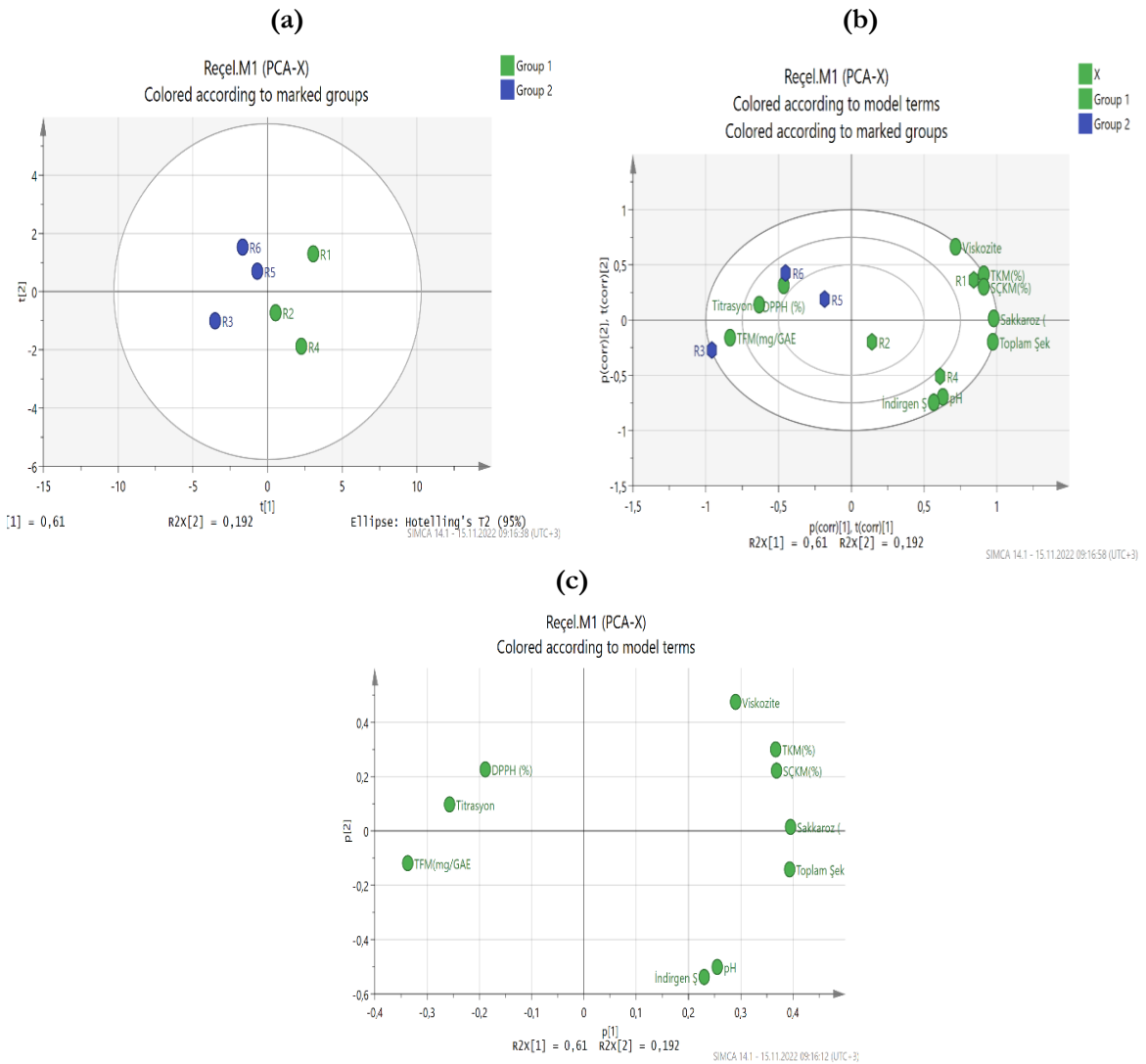


Şekil 3. Reçel tiplerine ait korelasyon analizleri  
Figure 3. Correlation analysis of the jam types



Işkın reçel tiplerinin fizikokimyasal, duyuşal ve antioksidan aktiviteleri arasındaki farklılıkları göstermek için temel bileşen analizi (PCA) uygulanmıştır. Şekil 4'de (a-c), ışkın reçeli tiplerine ait skor grafiği (score scatter plot), birleştirilmiş (biplot) temel bileşen analizi ve y¼kleme grafiği ve y¼kleme grafiği (loading scatter plot) verilmiştir. Yapılan temel bileşen analizine g¼re birinci (PC1 = %61) ve ikinci (PC2 = %19.2) bileşen, toplam varyasyonun %80.2'sini a¼klamaktadır. Şekil 4a'da 4 tip (R2, R4, R5 ve R6) bir arada k¼melenirken, R1 ile R3'¼n farklılaştığı

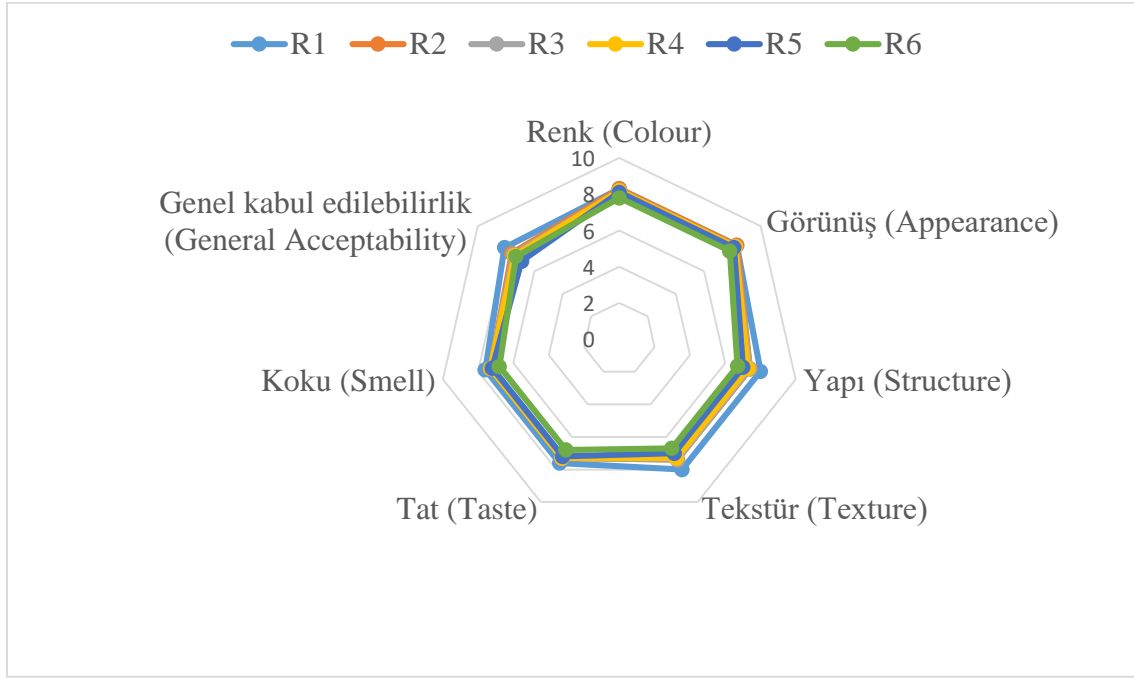
g¼r¼lmektedir. Bu k¼melenmenin sonucunda tipler (R2, R4, R5 ve R6) arasında benzerlik olduğu g¼r¼lmektedir. Diğer taraftan Şekil 4c'de g¼r¼ld¼đu gibi sol b¼lgede DPPH, titrasyon ve TFM yer alırken, sağ b¼lgede viskozite, TKM, S¼KM, sakkaroz, toplam şeker, pH ve indirgen şeker yer almaktadır. Ayrıca R6, R5 ve R3'¼n en y¼ksek DPPH, TFM ve titrasyon asitliği ortalamalarına sahip olduğu g¼r¼lmektedir (Şekil 4b).



Şekil 4. Reçel tiplerine ait a) skor grafiği (score scatter plot), b) birleştirilmiş (biplot) temel bileşen analizi ve y¼kleme grafiği (loading scatter plot)

Figure 4. a) score scatter plot (score scatter plot), b) combined (biplot) basic component analysis and loading plot, c) loading scatter plot (loading scatter plot) of the jam types





Şekil 5. Reçel tiplerinin duyuşal açıdan değeriendirilmesi

Figure 5. Sensory evaluation of jam types

## SONUÇ

Bu çalışmada ışkın meyvesinden üretilen geleneksel ışkın reçellerinin bazı fizikokimyasal ve antioksidan özellikleri ortaya konmuştur. Reçel üretiminde ön işlemlerin yanı sıra şeker ilavesi ve pişirme aşamalarının ışkın reçelinin pH, asitlik, renk gibi fizikokimyasal parametreleri ile duyuşal ve antioksidan aktivitelerinde önemli ölçüde değışime neden olduğu değeriendirilmiştir. Geleneksel ışkın reçellerinin ürün kalitesinin ortaya konması, bu tip ürünlerin sürdürülebilirliğinin sağlanması, sağlıklı beslenme ve gıda güvenliği açısından endüstriyel boyutlarda standardize edilmesine, dolayısıyla yerelde ve ülkesel çapta tarımsal kalkınmaya katkı sağlayacaktır. Farklı üretim şekli ve farklı formülasyonların kullanıldığı reçel tiplerinden en fazla beğenilen örneğin geleneksel reçel üretimi ile yapılan örnek olması sebebiyle alternatif reçel üretim yöntemlerinin tüketici beğenilirliği açısından daha az kabul gördüğü belirlenmiştir. Daha çok taze olarak tüketildiği bilinen ışkının reçel yapılarak da değeriendirilmesinin, yeni bir ürünün ortaya çıkarılması böylece ürün çeşitliliğinin zenginleştirilmesi açısından faydalı olacağı düşünülmektedir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Bu makalede yer alan yazarlar ve kurumlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

## YAZARLARIN KATKISI

Bu makale Bilginur YILDIRIM'ın yüksek lisans tezinden üretilmiştir. Bilginur YILDIRIM analizlerin yürütülmesi, sonuçların istatistiksel olarak değeriendirilmesinde ve makalenin yazım aşamasında görev almıştır. Yazar Halil İbrahim BİNİCİ YÖK 100/2000 Yenilikçi Gıda İşleme Teknolojileri ve Gıda Biyoteknolojileri alanında doktora bursiyeridir ve ham maddenin temininde, analizlerin yürütülmesinde, makalenin yazımı ve bileşen analizlerinin yapımında görev almıştır. İhsan Güngör ŞAT çalışma konusu belirleme, yöntem, makalenin yazımı ve danışmanlık kısımlarında katkı sağlamışlardır.

## KAYNAKLAR

Abu-Irmaileh, B.E., Afifi, FU. (2003). Herbal medicine in Jordan with special emphasis on commonly used herbs. *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 193–7.

- Aksay, S., Tokbaş, H., Arslan, R., Çınar, F. (2018). Some physicochemical properties of the whole fruit mandarin jam. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 6(5), 632-635.
- Andiç, S., Tunçtürk, Y., Ocak, E., Köse, S. (2009). Some chemical characteristics of edible wild Rhubarb species (*Rheum ribes* L.). *Research: Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 5 (6): 973-977.
- Anonim, (2006). TS 3958. Vişne Reçeli Standardı. Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
- Baysal, A. (2000). Genel Beslenme. Hatipoğlu Yayınları, No: 18, Ankara.
- Binici, H.I., Şat, İ.G., Aoudeh, E. (2021). The effect of different drying methods on nutritional composition and antioxidant activity of purslane (*Portulaca oleracea*). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 45(5), 680-689.
- Calligaris, S., Manzocco, L., Anese, M., Nicoli, M.C., (2004). Effect of heattreatment on the antioxidant and pro-oxidant activity of milk *International Dairy Journal*, 14: 421-427.
- Cemeroğlu, B. (2004). Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi. Başkent Klişe Matbaacılık, 628 s, Ankara.
- Cemeroğlu, B. S. (2013). Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi. Bizim Grup Basımevi, Ankara, Türkiye, 312.
- Cemeroğlu, B., (1992). Meyve ve Sebze İşleme Endüstrisinde Temel Analiz Metotları. Biltav Üniversite Kitapları Serisi, 02-2, 377 s, Ankara.
- Cemeroğlu, B., Acar, J. (1986). Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi. Gıda Teknolojisi Derneği, No:6, Ankara.
- Cemeroğlu, B., Karadeniz, F. ve Özkan, M. (2003). Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi 2. Cilt. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, No:36, 628 s, Ankara.
- Choi, Y., Lee, S.M., Chun, J., Lee, H.B., Lee, J., (2006). Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chemistry*, 99: 381-387.
- Doğan, S. (2016). Gevaş (Van) İlçesinde Yöresel Olarak Taze Tüketilen Bazı Yabancı Bitkiler ve Besin Değerlerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Durmuş, F. (2019). Bazı Enginar (*Cynara Cardunculus* Var. *Scolymus* L.) Çeşitlerinden Üretilen Enginar Reçellerinin Fizikokimyasal ve Kalite Özelliklerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Gökalp, H.Y., Kaya, M., Tülek, Y., Zorba, Ö. (1995). Et ve Ürünlerinde Kalite Kontrolü ve Laboratuvar Uygulama Kılavuzu. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları* No: 318, Erzurum.
- Gülcü, M. (2012). Üzüm Reçeli. Tekirdağ Bağcılık Araştırma İstasyonu Müdürlüğü Çiftçi Broşürü, Yayın No: 06.
- Gülçin, İ., Şat, İ.G., Beydemir, Ş., Elmastaş, M., Küfrevioğlu, Ö.İ. (2004). Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). *Food Chemistry*, 87, 393-400.
- Güneş, M. (2019). Yayla Muzu (*Rheum Ribes* L.) Ekstraktlarının İn Vitro Fitokimyasal, Antioksidan ve Antimikrobiyal Özelliklerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kilis.
- Gürbüz, S., Şahin, F. (2014). Sosyal bilimlerde araştırma yöntemleri. *Ankara: Seçkin Yayıncılık*, 271.
- Hepsağ, F., Hayoğlu, İ. (2017). Akdeniz Bölgesinde Satışı Yapılan Bazı Reçellerin Hidroksimetil Furfural Miktarlarının HPLC ile Belirlenmesi ve Değerlendirilmesi. *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*, 7(2/2), 149-160.
- Keçebaş, T., (2007). Farklı Haşlama Uygulamalar ile Saklamanın Kurutulmuş Brokkolinin Renk ve Antioksidan Aktivitesi Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Keleş, F. (1983). Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi Laboratuvar Notları. Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Erzurum.

- Koç, E., Yolcu-Ömeroğlu, P. (2019). Geleneksel Anjelika (Melek Otu) Reçelinin Fizikokimyasal ve Duyusal Özellikleri. *Akademik Gıda* 17(4), 485-496.
- Kurt, Özer. (2022). Effect of Maturity Stages on Potential Nutritive Value of *Rheum ribes* L. Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi, 8(2), 368-375.
- Lee, SK., Kader, AA. (2000). Pre-harvest and post-harvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Post-harvest biology and technology*, 20, 207-220.
- Meral, R. (2017). Farklı sıcaklık derecelerinin uçkun bitkisinin antioksidan aktivitesi ve fenolik profili üzerine etkisi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıbbi Bilimleri Dergisi*, 27(1), 88-94.
- Munzuroğlu, Ö., Karataş, F., Gür, N. (2000). Işgın (*Rheum ribes* L.) bitkisindeki A, E ve C vitaminleri ile selenyum. *Biyoloji Dergisi*, 24, 397-404.
- Naqishbandi, A.M., Josefsen, K., Pedersen, M.E. Jager, A.K. (2009). Hypoglycemic activity of Iraqi *Rheum ribes* root extract. *Pharmaceutical Biology*, 47, 380-383.
- Özbek, H., Ceylan, E., Kara, M., Özgökçe, F., Koyuncu, M. (2004). Hypoglycemic effect of *Rheum ribes* roots in alloxan induced diabetic and normal mice. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science*, 31(2).
- Özdoğan, F., (2006). Domates Reçel Ürünlerinin Geliştirilmesi ve Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale.
- Öztürk, M., Aydoğmuş-Öztürk, F., Duru, M. E., Topçu, G. (2007). Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. *Food Chemistry* 103: 623-630.
- Shokravi, A. and Nasiri, K., (1997). Synthesis of 1,2,3,4,5,6,7,8-Octahydro-9-ethoxy-10-hydroxy-1-anthracenone. *Iran Journal Chemical Engineering*, 16, 10-15.
- Şengül, M., Topdaş, E.F., Doğan, H., Serencam, H. (2018). Artvin ilinde geleneksel olarak üretilen farklı marmelat çeşitlerinin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri, antioksidan aktiviteleri ve fenolik profilleri. *Akademik Gıda*, 16(1), 51-59.
- Tabata, M., Sezik, E., Honda, G., Yesilada, E., Fuki, H., Goto, K. (1994). Traditional medicine in Turkey III. Folk Medicine in East Anatolia, Van and Bitlis provinces. *International Journal of Pharmacognosy*, 32, 3-12 pp.
- Tamer, C. (2011). A Research on raspberry and blackberry marmalades produced from different cultivars. *Journal of Food Processing*, 36(1), 74-80.
- Turgut, D. Y., Tokgöz, H., Gölükcü, M. (2021). Bütün ve Parça Meyvelerden Üretilen Kamkat Reçellerinin Fizikokimyasal ve Fitokimyasal Özellikleri. *Akademik Gıda*, 19(3), 267-274.
- Türkmen, Ö., Çirka, M., Şensoy, S. (2005). Initial Evaluation of a New Edible Wild Rhubarb Species (*Rheum ribes* L.) with a Modified Weighted Scaling Index Method. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 8 (5), 763-765.
- Uçan, F., Ağçam, E., Akyıldız, A. (2014). Doğal Bulanık Limon Suyu Üretimi Üzerine Bir Araştırma. *Gıda*, 39(1): 25-32.
- Yıldırım, N. (2017). Acılığı Giderilmiş Kappariden (*Capparis* spp.) Geleneksel ve Vakum Yöntemleriyle Üretilen Reçellerin Kalite Özelliklerinin Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Isparta.



## ENDÜSTRİYEL DOMATES ATIKLARINDAN KAROTENOİD EKSTRAKSİYONUNUN YANIT YÜZEY YÖNTEMİ İLE OPTİMİZASYONU

İnci Cerit\*, Eda Nur Erdem, Mahmut Yıldırım, Mehmet Emin Dursun,  
Sercan Tekgül, Zeynep Kaya, Omca Demirkol

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

Geliş/ Received: 16.01023; Kabul/ Accepted: 12.03.2023; /Online baskı: Published online 31.03.2023

Cerit, İ., Erdem, E. N., Yıldırım, M., Dursun, M. E., Tekgül, S., Kaya, Z., Demirkol, O. (2023). Endüstriyel domates atıklarından karotenoid ekstraksiyonunun yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyonu. GIDA (2023) 48 (2) 459-470 doi: 10.15237/ gida.GD23012

Cerit, İ., Erdem, E. N., Yıldırım, M., Dursun, M. E., Tekgül, S., Kaya, Z., Demirkol, O. (2023). Optimization of carotenoid extraction from industrial tomato waste by response surface methodology. GIDA (2023) 48 (2) 459-470 doi: 10.15237/ gida.GD23012

### ÖZ

Bu çalışmada, bir domates işleme tesisinden temin edilen atıklardan geleneksel ve ultrason destekli yöntemle karotenoid ekstraksiyonu yapılmıştır. Çözücü olarak etil asetat kullanılmış ve yanıt yüzey yöntemi (response surface methodology, RSM) ile ultrason işleminde uygulanacak parametreler optimize edilmiştir. Ekstraksiyon şartlarından sıcaklık sabit tutularak ultrasonik güç (30-60-90 W), katı:çözgen oranı (1:10, 1:30, 1:50 g/mL) ve süre (5-20-35 dk) üzerinde çalışılmış, elde edilen ekstraktların karotenoid içeriği HPLC cihazında belirlenmiştir. Ayrıca geleneksel yöntemde domates kabuğu:etil asetat oranı 1:30 g/mL olacak şekilde ayarlanarak 75°C'de 120 dk ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Box-Benhken tasarımı yardımıyla belirlenen parametreler doğrultusunda örnek:çözücü oranı 1:50, süre 35 dk, güç 60 W koşullarında en yüksek likopen (197.12 mg/kg) ve β-karoten (12.95 mg/kg) miktarları elde edilmiştir. Geleneksel yöntemle karşılaştırıldığında ultrason ekstraksiyonunda likopen miktarı %21.4 daha az, β-karoten miktarı ise %11.0 daha fazla olduğu belirlenmiştir. Uygulanan tasarımda likopen için uyumlu olan model ikinci dereceden polinom olurken, β-karoten için doğrusal modelin uygun olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Domates atığı, likopen, β-karoten, ultrases, ekstraksiyon

## OPTIMIZATION OF CAROTENOID EXTRACTION FROM INDUSTRIAL TOMATO WASTE BY RESPONCE SURFACE METHODOLOGY

### ABSTRACT

In this study, carotenoid extraction was performed by conventional and ultrasound-assisted method (UAE) from wastes obtained from a tomato processing plant. Ethyl acetate was used as the solvent and parameters were optimized by the response surface methodology (Box-Benhken design). The

\* Sorumlu yazar / Corresponding author

✉: incicantik@sakarya.edu.tr

☎: (+90) 264 295 5847

İnci Cerit; ORCID no: 0000-0002-3106-8951

Eda Nur Erdem; ORCID no: 0000-0002-0341-9240

Mahmut Yıldırım; ORCID no: 0000-0001-8942-5483

Mehmet Emin Dursun; ORCID no: 0000-0003-3201-3781

Sercan Tekgül; ORCID no: 0000-0003-4452-4538

Zeynep Kaya; ORCID no: 0000-0002-5891-2307

Omca Demirkol; ORCID no: 0000-0002-6026-5997

temperature was kept constant and ultrasonic power (30-60-90 W), solid:solvent ratio (1:10, 1:30, 1:50 g/mL) and time (5-20-35 min) were studied. In addition, in the conventional method, the tomato peel:solvent ratio was 1:30 g/mL and the extraction process was carried out at 75°C for 120 min. The highest lycopene (197.12 mg/kg) and  $\beta$ -carotene (12.95 mg/kg) amounts were obtained at solid:solvent ratio of 1:50 g/mL, extraction time of 35 min, and ultrasonic power of 60 W. The amount of lycopene and  $\beta$ -carotene was 21.4% less and 11.0% more in UAE, respectively. The fit model for lycopene was quadratic-polynomial, while the linear model was found to be suitable for  $\beta$ -carotene.

**Keywords:** Tomato waste, lycopene,  $\beta$ -carotene, ultrasound, extraction

## GİRİŞ

Latince adı *Solanum lycopersicum* L. olan domates, Solanaceae (Patlıcangiller) familyasına ait olup tüketim ve üretim miktarı açısından en önemli sebzeler arasında yer almaktadır. Domatesin dünyaya yayıldığı yer Avrupa olmasına karşın Türkiye, Çin, Hindistan, ABD ve Mısır gibi ülkeler en önemli domates üreticilerindedir (Durmuş vd., 2018). 2020 yılı Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) verilerine göre 64.8 milyon ton domates üretimi ile Çin, Dünya domates üretiminde ilk sıradadır. 20.6 milyon ton ile Hindistan ikinci, 13.2 milyon ton ile Türkiye üçüncü sırada yer almaktadır (FAO, 2020). Domates taze tüketiminin yanı sıra gıda sanayisinde salça, sos, ketçap, turşu, domates suyu, domates püresi ve konsantre domates suyu olarak da yaygın bir şekilde işlenmekte ve tüketime sunulmaktadır. Ancak domatesin %5-30 kadarını kabuk ve çekirdek oluşturmaktadır ki bu da oldukça yüksek miktarda bitkisel atık anlamına gelmektedir (Gheonea vd., 2021). Domates atıklarının kontrolü, domates işleme fabrikalarının karşılaştığı en önemli problemlerden biridir. Açığa çıkan atıklar genellikle hayvan yemi ve gübre gibi ekonomik olarak düşük değerli olan ürünlerin üretilmesinde kullanılmaktadır (Strati ve Oreopoulou, 2014). Oysa ki besin değeri ve biyoaktif bileşen özellikleri düşünüldüğünde domates atıklarının değerlendirilmesi hem çevresel faktörler hem de ekonomik nedenlerden dolayı önem arz etmektedir (Işık ve Yapar, 2017). Domates işlenirken açığa çıkan posanın yaklaşık %44'ünü çekirdek ve %56'sını meyve eti ve kabuğu oluşturmaktadır. Posada tokoferoller, polifenoller ve karotenoidler gibi önemli biyoaktif bileşenler bulunmaktadır (Dolatabadi vd., 2016; Munde vd., 2017). Domates atığı, özellikle karotenoidler açısından zengindir ve büyük çoğunluğunu kabukta barındırmaktadır. Kalogeropoulos vd. (2012) tarafından yapılan bir

çalışmada, domates atığında bulunan majör karotenoidlerin likopen (413.7  $\mu$ g/g kuru madde) ve  $\beta$ -karoten (149.8  $\mu$ g/g kuru madde) olduğu belirlenmiştir. Bazı mikroorganizmalar tarafından da sentezlenen lipofilik özelliğe sahip karotenoidler, farklı meyve ve sebzelerde turuncu ile kırmızı renk aralığında bulunan pigmentlerin bir grubudur ve mevcut fonksiyonel grupların tipine bağlı olarak, ksantofil ve karotenler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Khalid vd., 2019). Provitamin A ve antioksidan aktivite gibi fonksiyonlara sahip oldukları için bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, katarakt ve maküler dejenerasyon gibi dejeneratif hastalık riskinin azaltılmasında önemli rol oynarlar. Biyolojik özelliklerinin yanı sıra karotenoidler, fonksiyonel gıdaların formülasyonunda yer alır veya gıda sistemlerinde raf ömrünü uzatmak için kullanılırlar. Aynı zamanda likopen ve  $\beta$ -karoten, çeşitli gıda ürünlerinin renklendirilmesinde kullanılabilen doğal boyalardır (Strati ve Oreopoulou, 2014). Tüm bu nedenlerle, domates atıklarından karotenoid ekstraksiyonu hem çevre kirliliğinin önüne geçmek hem de ekonomik katkı oluşturmak için değerlendirilmelidir.

Ekstraksiyon işleminde en önemli parametrelerden biri uygulanacak yöntem ve çözücü seçimidir. Araştırmacılar, geleneksel yöntemlere alternatif olarak son yıllarda süper kritik karbondioksit ekstraksiyonu, enzim ekstraksiyonu, ultrason ve mikrodalga destekli ekstraksiyon gibi uygulamalara yönelmiştir (Ashraf vd., 2022). Ekstraksiyon yöntemleri, uygulanan sıcaklık, basınç ve hücre parçalanması bakımından değişiklik göstermektedir. Örneğin soxhlet ekstraksiyonunda, kaynama sıcaklığında ve ortam basıncında çözücüler kullanılırken süper kritik sıvı ekstraksiyonu düşük sıcaklık ve yüksek

basınçta çalıştırılır. Buna karşılık ultrason destekli ekstraksiyon, darbeleri elektrik alanı destekli ekstraksiyon ve enzim destekli ekstraksiyonda, hücre içi bileşenlerin salınımının kolaylaştırılması için hücrelerin parçalanmasında sırasıyla ultrason dalgaları, yüksek voltaj darbeleri ve enzimler kullanılmaktadır (Saini ve Keum, 2018). Bu yöntemler arasında ultrason destekli ekstraksiyonun avantajları, zaman ve enerji açısından tasarruf sağlaması ve uygulamasının kolay olmasıdır (Carreira-Casais vd., 2021). Literatürde, karotenoid ekstraksiyonunda ultrasonun kullanıldığı çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Li vd., 2013; Civan vd., 2019; Silva vd., 2019; Umair vd., 2021).

Biyoaktif bileşen ekstraksiyonunda verimi etkileyen bir diğer önemli nokta kullanılacak çözücünün seçimidir. Karotenoidler suda çözünmediklerinden, heksan veya petrol eteri gibi organik çözücülerin kullanımına ihtiyaç vardır (Ho vd., 2015). Ancak bu çözücüler petrol türevli olduğundan çevreye olumsuz etkileri bulunmaktadır ve güvenli kullanım ve depolama prosedürlerinin uygulanması gerekmektedir. Organik çözücülerin kullanımıyla ilgili dezavantajların üstesinden gelmek için yeşil kimya ilkeleri kullanılarak alternatif stratejiler geliştirilebilmektedir. Yeşil çözücüler, düşük toksisite, biyolojik olarak parçalanabilirlikleri ve petrol dışı kaynaklardan sürdürülebilir üretimleri nedeniyle geleneksel organik çözücülere alternatif olmaktadır (Cascant vd., 2017). Bu çözücülere, lipofilik bileşiklerin ekstraksiyonu için yaygın olarak kullanılan çevre dostu bir organik çözücü olan etil asetat örnek olarak verilebilir. Biyobazlı etanolden üretilebilir, havada ve suda biyolojik olarak parçalanabilir olduğu için etil asetat, heksana alternatif olarak düşünülmektedir (Silva vd., 2019).

Bu çalışmanın amacı, yeşil çözücü olarak bilinen etil asetatın ultrason teknolojisi ile endüstriyel domates atıklarından karotenoid ekstraksiyonunda kullanılması ve yanıt yüzey yöntemi ile proses parametrelerinin optimize edilmesidir. Ekstraksiyon parametrelerinden sıcaklık sabit tutularak ultrasonik güç, katı:çözgen oranı ve süre üzerinde çalışılmıştır. Elde edilen

ekstraktların karotenoid içeriği HPLC cihazı ve PDA dedektör yardımıyla belirlenmiştir.

### MATERYAL VE YÖNTEM

#### Materyal

Bu çalışma için gerekli olan domates atığı 2021 yılı Ağustos ayında Bursa'da faaliyet gösteren Tat Gıda Fabrikasından, fabrika atığı (kabuk + çekirdek) olarak temin edilmiştir. Domates atıkları -18 °C'de dondurulmuş ve daha sonra liyofilizatör (Labconco, ABD) yardımıyla -50°C'de 48 saat boyunca kurutulmuştur. Örneklere kuru madde analizi uygulanmış ve kuru madde miktarı %94.0 olarak belirlenmiştir. Kuruyan örnekler, yüzey alanını arttırmak amacıyla öğütülmüş ve homojen bir hammadde elde etmek için 70 mesh elekten geçirilmiştir. Ekstraksiyon işlemine kadar 4°C sıcaklıkta ve karanlıkta muhafaza edilmiştir.

#### Geleneksel yöntem ile ekstraksiyon

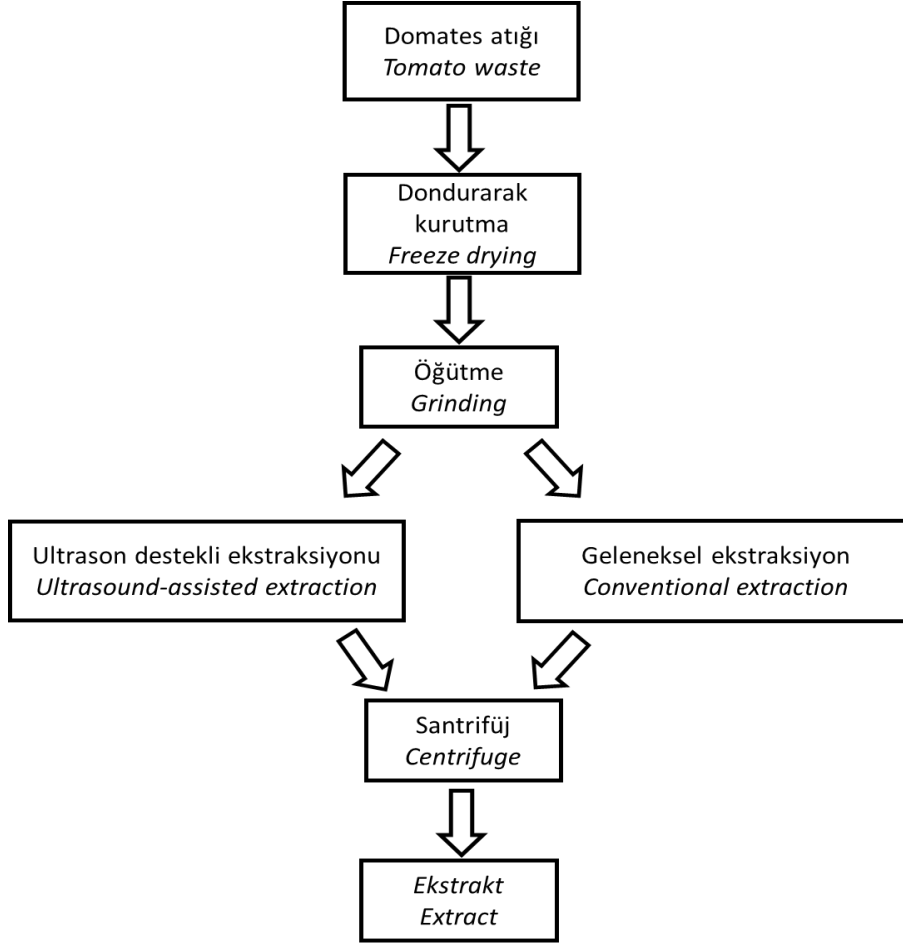
Geleneksel organik çözücü yöntemi ile ekstraksiyon Martinez-Hernandez ve arkadaşlarının (2019) çalışmasına göre yapılmıştır. Domates kabuğu:etil asetat oranı 1:30 g/mL oranında ayarlanmıştır. Karışım 75°C'de 120 dk çalkalamalı su banyosunda bekletilmiştir. Santrifüjlenen (9000 x g, 15°C, 10 dk) karışımda üst faz ayrılmış ve analizler için 4°C'de bekletilmiştir (Şekil 1).

#### Ultrason destekli ekstraksiyon

Ekstraksiyon işlemi için 200 W ve 24 kHz'lik ultrasonik ekstraksiyon cihazı (Bandelin HD2200, Almanya) kullanılmıştır. Ultrason kabine 4.5 mm çapa ve 130 mm uzunluğa sahip olan TS104 Prob sabit olarak yerleştirilmiştir. Hacmi 100 mL olan cam bir beherin içerisine örnekten 1.67 g, çözücüden ise 50 mL konulmuş ve prob yüzeyden 1.5 cm içeri girecek şekilde daldırılmıştır. Sıcaklığı sabit tutmak için (20°C±2) beher, bir buz banyosuna yerleştirilmiş ve sıcaklık sürekli olarak takip edilmiştir. Ekstraksiyon çözücüsünü belirlemek amacıyla, literatürde bazı çalışmalarda (Calvo vd., 2007; Rahimi ve Mikani, 2019) yer alan gıda saflığındaki (food grade) etil asetat, etil alkol ve ayçiçek yağı kullanılarak ön denemeler gerçekleştirilmiştir. Denemelerde, ekstraksiyon parametreleri olarak daha önce yapılan çalışmalarda (Yılmaz vd., 2017; da Silva vd., 2020)

kullanılan parametreler baz alınarak, katı:çözgen oranı 1:30, ultrason gücü 60 W ve süre ise 20 dakika olarak uygulanmıştır. Yapılan karotenoid analizi sonucunda en yüksek karotenoid miktarı

etil asetat ile elde edilmiş olup (Çizelge 1), ekstraksiyon çözücüsü olarak etil asetat kullanılmıştır.



Şekil 1. Geleneksel ve ultrason destekli yöntemlerle karotenoid ekstraksiyonu  
Figure 1. Carotenoid extraction by conventional and ultrasound-assisted methods

Çizelge 1. Farklı çözücüler kullanılarak elde edilen likopen ve  $\beta$ -karoten miktarlarına (kuru madde üzerinden) ait ön deneme sonuçları

Table 1. Preliminary results of lycopene and  $\beta$ -carotene obtained using different solvents (based on dry matter)

Çözücü Solvent	Likopen (mg/kg) Lycopene (mg/kg)	$\beta$ -karoten (mg/kg) $\beta$ -carotene (mg/kg)
Ayçiçek yağı Sunflower oil	te nd	te nd
Etül alkol Ethyl alcohol	125.46 $\pm$ 4.18	12.34 $\pm$ 0.51
Etül asetat Ethyl acetate	229.22 $\pm$ 5.12	12.05 $\pm$ 0.45

te: tespit edilemedi  
nd: not detected

### Yanıt yüzey yöntemi uygulaması

Domates atıklarından ultrason yöntemiyle karotenoid ekstraksiyonunda katı:çözgen oranı, süre ve ultrasonik gücün etkileri yanıt yüzey metodu kullanılarak Box-Behnken tasarım ile incelenmiş ve optimum koşullar belirlenmiştir. Bağımsız değişkenlerin alt ve üst limitleri ön denemeler ile belirlenmiştir. 3 farklı katı:çözgen oranı (1:10, 1:30, 1:50 g/mL), 3 farklı süre (5-20-35 dk) ve 3 farklı güç (30-60-90 W) olmak üzere 3 faktör ile çalışılmıştır (Çizelge 2). Üçü merkez nokta olmak üzere 15 deneyden oluşan deneysel tasarımın bağımlı değişkenlerini likopen ve  $\beta$ -karoten miktarları oluşturmuştur. Optimizasyon, Design-Expert (Design-Expert 7.0, USA) istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Deneysel verilerde herhangi bir dönüşüm uygulanmamıştır.

Modelin doğruluğu, programın ANOVA çıktıları olan uyum eksikliği (lack of fit), uyum katsayısı ( $R^2$ ) ve Fisher test değerine ( $F$ -değeri) göre değerlendirilmiştir.

### HPLC ile karotenoid miktarının belirlenmesi

Elde edilen ekstraktlar, şırınga yardımıyla 0.45 mikron filtreden geçirilip süzülerek şişelere aktarılmış ve HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Dolgu maddesinin çapı 3  $\mu$ m, iç çapı 4.6 mm ve uzunluğu 150 mm olan kolon (GL Sciences Inertsil ODS-3 Tokyo, Japonya) kullanılmıştır. Örneklerin karotenoid içeriklerini belirlemede kullanılan HPLC sistemi (Hitachi, Tokyo, Japonya) L-2130 pompa, L-2300 fırın, L-2200 otomatik örnekleme sistemi ve L-2455 PDA (Photo Diode Array) dedektör içermektedir. Dedektörün dalga boyu 470 nm olarak ayarlanmıştır. Mobil faz olarak metanol:tetrahidrofuran (95:5) isokratik çözeltisi kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 30°C, mobil fazın akış hızı 1.0 mL/dk ve enjeksiyon hacmi ise 20  $\mu$ L olarak belirlenmiştir. Bileşiklerin miktarlarını belirlemek amacıyla, 0-50 mg/L aralığında likopen ve 0-10 mg/L aralığında  $\beta$ -karoten standart çözeltileri hazırlanarak kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir ( $R^2_{\text{likopen}}=0.9968$ ;  $R^2_{\beta\text{-karoten}}=0.9984$ ). Her bir örnek üçer defa analiz edilmiş ve ortalama değerler kullanılmıştır.

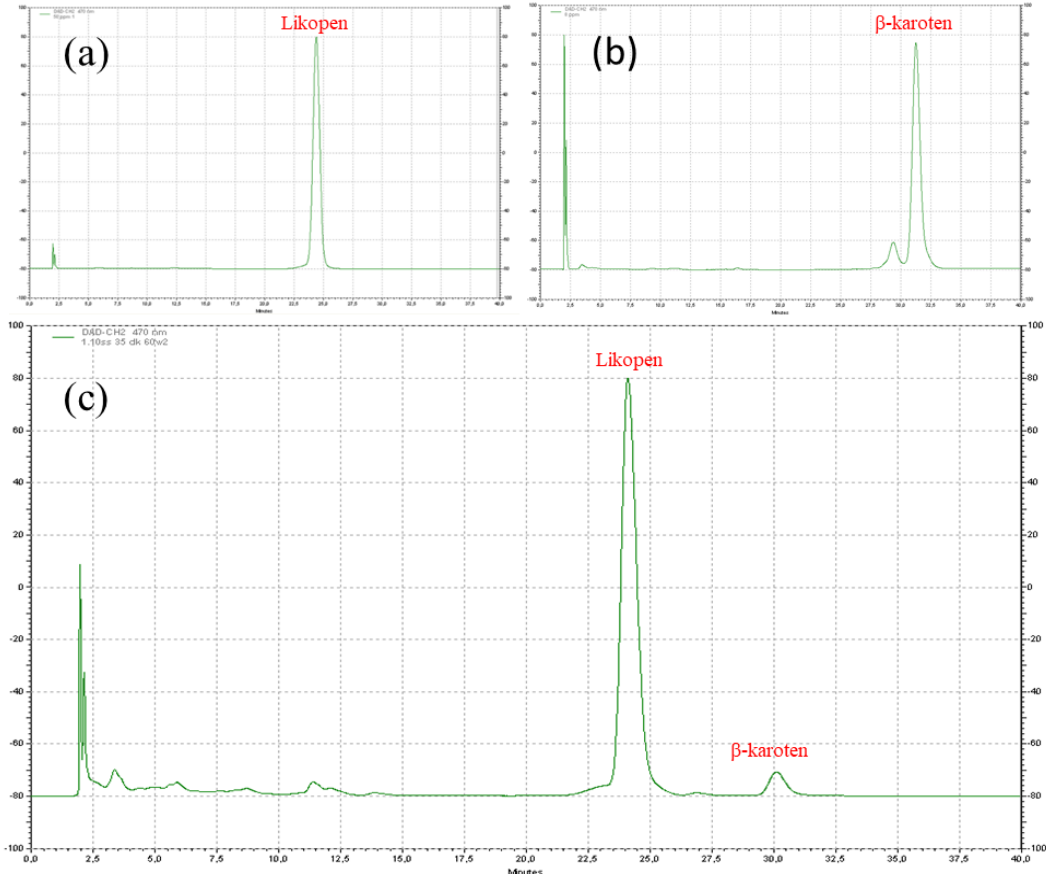
### SONUÇ VE TARTIŞMA

#### Ekstraksiyon çözücüsünün domates kabuğunun likopen ve $\beta$ -karoten miktarı üzerine etkisi

Ekstraksiyon işleminde kullanılan çözücü seçiminin verim üzerine oldukça etkili olduğu bilinmektedir (Kunthakudee vd., 2020). Bu çalışmanın ön denemelerinde, karotenoid ekstraksiyonunda literatürde kullanılan 3 farklı çözücü seçilmiştir. Ekstraksiyon koşulları olarak ultrason uygulaması için belirlenen koşulların orta noktalarında (katı:çözgen oranı 1:30, ultrason gücü 60 W ve süre 20 dk) denemeler gerçekleştirilmiştir. Likopen,  $\beta$ -karoten ve örneğe ait kromatogramlar Şekil 2'de verilmiştir. Karotenoidlerin UV-Vis spektrumları 470 nm dalga boyunda incelenmiş ve elde edilen ekstraktlarda en fazla likopen ve  $\beta$ -karoten olduğu, diğer karotenoidlerin (lutein,  $\alpha$ -karoten vb.) ise tespit edilebilir sınırlar içerisinde yer almadığı belirlenmiştir.

Çizelge 1'de gösterildiği gibi ayçiçek yağı kullanılarak yapılan ekstraksiyon işleminde likopen tespit edilemezken etil asetatın kullanılmasıyla daha yüksek verim elde edilmiştir (likopen<sub>etil alkol</sub>:125.46 mg/kg, likopen<sub>etil asetat</sub>:229.22 mg/kg). Benzer şekilde ayçiçek yağı ile yapılan ekstraksiyon işleminde  $\beta$ -karoten belirlenmemiştir. Kullanılan diğer iki çözücü arasında ise  $\beta$ -karoten konsantrasyonu açısından önemli farkın olmadığı belirlenmiştir ( $\beta$ -karoten<sub>etil alkol</sub>:12.34 mg/kg,  $\beta$ -karoten<sub>etil asetat</sub>:12.05 mg/kg). Azabou vd. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada domates kabuğundan biyoaktif bileşen ekstraksiyonunda distile su, etanol, dietil eter, aseton ve hekzan kullanılmış ve en yüksek verim polar olmayan çözümler olan hekzan ve asetonla elde edilmiştir. Bu çalışmada da polaritesi daha düşük olan etil asetat ile daha yüksek likopen verimi elde edildiği görülmektedir. Ayçiçek yağında karotenoid tespit edilememesi, yüksek viskozite değeri ile ilişkilendirilebilir. Düşük viskozitenin ekstraksiyon işlemi sırasında matris boyunca iyi bir çözücü migrasyonu sağladığı ve böylelikle verimi arttırdığı düşünülmektedir (Goula vd., 2017). Bu sonuçlardan yola çıkarak çalışmanın devamında çözücü olarak etil asetat kullanılmıştır.





Şekil 2. Likopen standardı (a),  $\beta$ -karoten standardı (b) ve örneğe (c) ait HPLC kromatogramları  
Figure 2. HPLC chromatograms of lycopene standard (a),  $\beta$ -carotene standard (b) and sample (c)

### Likopen ve $\beta$ -karoten ekstraksiyonunun optimizasyonu ve model analizi

Deney tasarımı yöntemleri günümüzde birçok farklı alanda sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemler sayesinde deney sayısının azaltılmasıyla birlikte zamandan ve maliyetten tasarruf sağlanmaktadır. Özellikle, Box-Behnken tasarımı, ana faktörü ve optimize edilmiş parametreleri elde etmek için deneylerin istatistiksel planlamasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Box-Behnken genellikle daha az tasarım noktasına sahiptir, bu nedenle daha ucuz ve kolaydır. Box-Behnken, ikinci dereceden modelin parametrelerinin tahmin edilmesine, sıralı tasarımların oluşturulmasına ve modelin uyum eksikliğinin tespit edilmesine izin verdiği için yanıt yüzey metodolojisi için kullanılan iyi bir yöntemdir (Yogita ve Dipak, 2017; Kunthakudee vd., 2020).

Yapılan ön denemelerde örnek:çözücü, süre ve ultrasonik güç parametrelerinin likopen ve  $\beta$ -karoten ekstraksiyonu üzerinde değişken olduğu saptanmıştır. Bu nedenle proses değişkenleri olarak katı:çözgen oranı (1:10, 1:30, 1:50 g/mL), süre (5-20-35 dk) ve gücün (30-60-90 W) ekstraksiyon verimi üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Box-Behnken tasarımı yardımıyla belirlenen parametreler doğrultusunda gerçekleştirilen analizlerin sonucu Çizelge 2'de verilmiştir. En yüksek likopen (197.12 mg/kg) ve  $\beta$ -karoten (12.95 mg/kg) verimi örnek:çözücü oranının 1:50, sürenin 35 dk ve gücün 60 W olduğu koşullarda elde edilmiştir. Geleneksel yöntemle yapılan ekstraksiyon sonucu elde edilen verilerle karşılaştırıldığında (likopen: 250.71 mg/kg;  $\beta$ -karoten: 11.52 mg/kg), ultrason ekstraksiyonu ile likopen miktarının %21.4 daha az,  $\beta$ -karoten miktarının ise %11.0 daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 2. Box-Behnken tasarım için kullanılan bağımsız değişkenler ve seviyeleri  
 Table 2. Independent variables and their levels used for Box-Behnken design

Deney No <i>Experiment No</i>	Bağımsız değişkenler <i>Independent variables</i>			Bağımlı değişkenler <i>Dependent variables</i>	
	Örnek:Çözücü (g/mL) <i>Solid:Solvent</i> (g/mL)	Süre (dk) <i>Time</i> (min)	Güç (W) <i>Power</i> (W)	Likopen (mg/kg) <i>Lycopene</i> (mg/kg)	$\beta$ -karoten (mg/kg) <i><math>\beta</math>-carotene</i> (mg/kg)
1	1:30	20	60	165.67	11.47
2	1:50	35	60	197.12	12.95
3	1:50	20	90	187.39	13.04
4	1:10	20	90	140.71	10.27
5	1:30	35	30	162.87	11.55
6	1:30	5	90	138.33	10.12
7	1:30	20	60	159.36	10.86
8	1:30	20	60	164.18	11.54
9	1:10	35	60	153.94	10.55
10	1:30	5	30	131.82	10.10
11	1:30	35	90	175.58	11.92
12	1:50	20	30	173.06	11.95
13	1:10	20	30	120.23	9.13
14	1:10	5	60	122.25	9.22
15	1:50	5	60	168.18	11.57

Etil asetat-etil laktat çözümleri kullanılarak domates atıklarından likopen ekstraksiyonunun yapıldığı bir çalışmada, ultrason yöntemi ve geleneksel yöntem karşılaştırılmıştır. Box-Behnken tasarımında optimizasyon parametreleri olarak sıcaklık, etil asetat oranı, katı:çözgen oranı ve süre belirlenmiştir. Çalışmada en yüksek likopen miktarı 1334  $\mu\text{g/g}$  olarak tespit edilirken aynı koşullarda geleneksel ekstraksiyonda %9.4 daha az verim elde edildiği rapor edilmiştir (Silva vd., 2019). Civan ve arkadaşları (2019) tarafından yapılan başka bir çalışmada, acı biber salçası atığından elde edilen posadan karotenoid eldesinde ultrason destekli ekstraksiyon uygulanmıştır. Farklı sıcaklık (30, 40, 50, 60°C) ve sürenin (5, 10, 15, 20 dk) ekstraksiyon üzerine etkisinin incelendiği çalışmada, daha düşük enerji ile daha yüksek verimde karotenoid (182.90-184.60 mg/100 g) elde edildiği tespit edilmiştir.

Likopen ve  $\beta$ -karoten içeriklerine dayalı ekstraksiyon parametrelerinin varyans analizleri (ANOVA) ve regresyon katsayıları Çizelge 3 ve Çizelge 4'te gösterilmiştir. Uygulanan Box-Benken tasarımında likopen için uyumlu olan

model ikinci dereceden polinom olurken,  $\beta$ -karoten için doğrusal modelin uygun olduğu görülmüştür. Bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenler üzerinde önemli etkileri olduğu tespit edilmiştir.  $R^2$  değerlerine bakıldığında likopen ve  $\beta$ -karoten için sırasıyla 0.9899 ve 0.9447 olarak belirlenmiştir.  $R^2$  değerlerinin 1'e yakın olması, modelin yüksek bir F değerine sahip olması ve uyum eksikliğinin önemsiz çıkması modellerin verileri yeterince temsil ettiğini göstermektedir (Gençdağ vd., 2019). Çizelge 3 ve 4 incelendiğinde örnek:çözücü, süre ve güç parametrelerinin likopen ve  $\beta$ -karoten ekstraksiyonu üzerinde etkileri istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. Ayrıca gücün likopen miktarı üzerine ikinci derece etkisinin de önemli olduğu görülmektedir.

Bağımsız değişkenlerin likopen miktarı üzerine etkisi Şekil 3'te gösterilmiştir. Uygulanan ultrason gücünün artmasıyla birlikte likopen miktarının da belirli bir noktaya kadar artış gösterdiği, ardından azaldığı gözlenmiştir. Bir diğer bağımsız değişken olan örnek:çözücü oranları incelendiğinde, örnek miktarı ile çözücü hacmi arasındaki fark arttıkça verimin arttığı, en yüksek verimin 1:50 g/mL

oranında elde edildiği görülmektedir. Uygulama süresi ile likopen verimi arasındaki ilişki paralel olurken artışın belli bir süreden sonra azalarak devam ettiği görülmektedir. Domates atıklarından likopen ekstraksiyonunun ayçiçek yağı kullanılarak yapıldığı bir çalışmada ultrasonik güç, katı:çözgen oranı ve süre bağımsız değişkenler olarak belirlenmiş ve yanıt yüzey yöntemi uygulanmıştır. Çalışma sonuçlarına göre,

katı:çözgen oranı ekstraksiyon verimi üzerinde etkili bir parametre olmazken süre ve ultrasonik gücün ekstraksiyonu önemli oranda etkilediği vurgulanmıştır (Rahimi ve Mikani, 2019). Şekil 4'te ise bağımsız değişkenlerin  $\beta$ -karoten ekstraksiyonu üzerine etkileri görülmektedir. Ultrason gücü, süre ve örnek miktarı ile çözücü hacmi arasındaki fark arttıkça  $\beta$ -karoten veriminin doğrusal olarak arttığı belirlenmiştir.

Çizelge 3. Likopen içeriğine dayalı ekstraksiyon parametrelerinin optimizasyonu için ikinci dereceden polinom modeli varyans analizi (ANOVA).

Table 3. Analysis of variance (ANOVA) for the quadratic polynomial model for optimization of extraction parameters based on lycopene content.

Kaynak Source	Kareler Toplamı Sum of squares	Serbestlik Derecesi Degree of freedom	Kareler Ortalaması Mean squares	F-değeri F- value	p-değeri p- value	Sonuç Result
Model / Model	6334.99	9	703.89	54.69	0.0002	Önemli Significant
A-Örnek:Çözücü A- Solid:Solvent	3929.41	1	3929.41	305.28	< 0.0001	
B-Süre B-Time	1836.18	1	1836.18	142.66	< 0.0001	
C-Güç C-Power	322.58	1	322.58	25.06	0.0041	
AB	1.68	1	1.68	0.1303	0.7329	
AC	8.32	1	8.32	0.6466	0.4578	
BC	8.50	1	8.50	0.6602	0.4534	
A <sup>2</sup>	0.2090	1	0.2090	0.0162	0.9036	
B <sup>2</sup>	28.27	1	28.27	2.20	0.1984	
C <sup>2</sup>	206.98	1	206.98	16.08	0.0102	
Kalan Residual	64.36	5	12.87			
Uyum eksikliği Lack of fit	45.29	3	15.10	1.58	0.4097	Önemsiz Not significant
Hata Pure error	19.07	2	9.53			
Düzeltilmiş toplam Correlated total	6399.35	14				

R<sup>2</sup>=0.9899, Ayarlanmış R<sup>2</sup> /Adjusted R<sup>2</sup> =0.9718, Tahmin edilen R<sup>2</sup> /Predicted R<sup>2</sup>=0.8801

Model denklemi/ Model equation=153.28 + 22.16A + 15.15B + 6.35C - 0.6475AB - 1.44AC + 1.46BC + 0.2379A<sup>2</sup> - 2.77B<sup>2</sup> - 7.49C<sup>2</sup>

## Domates atıklarından karotenoid ekstraksiyonunun optimizasyonu

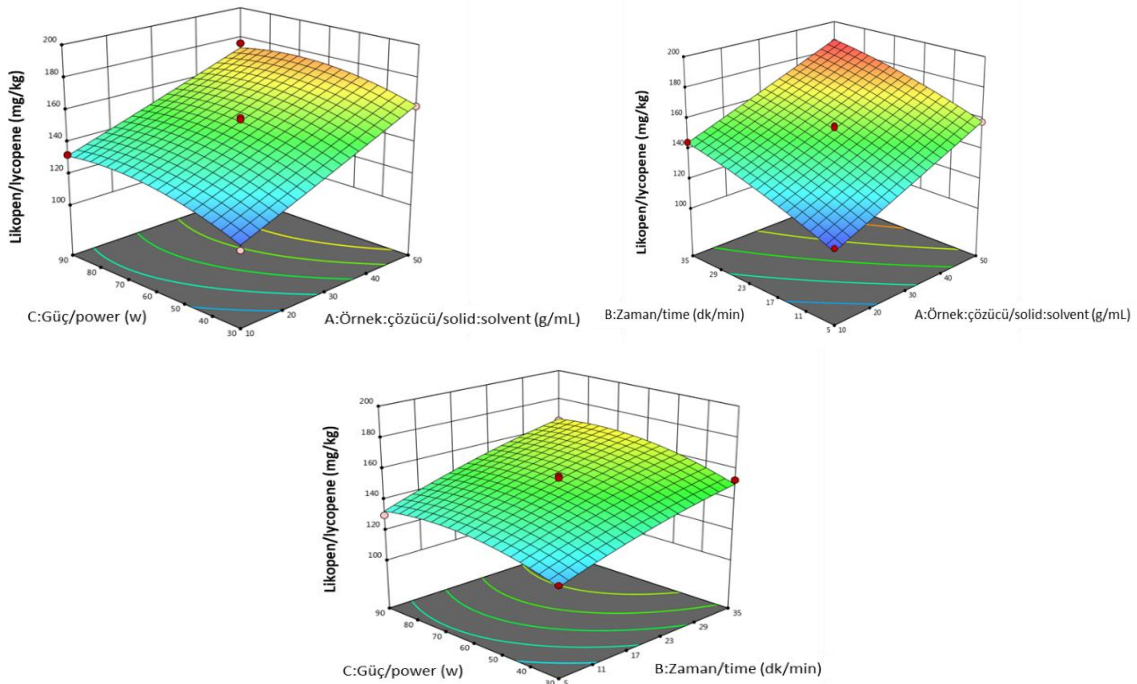
Çizelge 4.  $\beta$ -karoten içeriğine dayalı ekstraksiyon parametrelerinin optimizasyonu için doğrusal model varyans analizi (ANOVA).

Table 4. Analysis of variance (ANOVA) for the linear model for optimization of extraction parameters based on  $\beta$ -carotene content.

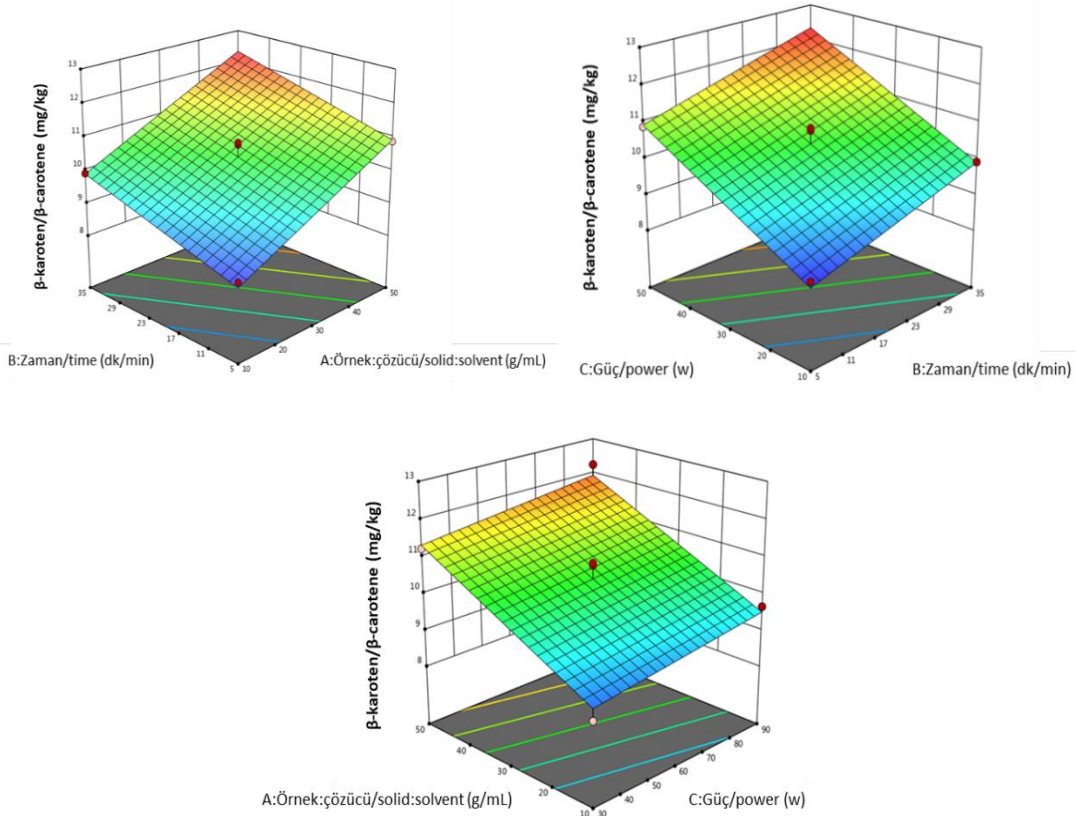
Kaynak Source	Kareler Toplamı Sum of squares	Serbestlik Derecesi Degree of freedom	Kareler Ortalaması Mean squares	F-değeri F- value	p-değeri p-value	Sonuç Result
Model / Model	16.48	3	5.49	62.62	< 0.0001	Önemli Significant
A-Örnek:Çözücü A- Solid:Solvent	11.79	1	11.79	134.39	< 0.0001	
B-Süre B-Time	3.93	1	3.93	44.86	< 0.0001	
C-Güç C-Power	0.7565	1	0.7565	8.63	0.01351	
Kalan Residual	0.9647	11	0.0877			
Uyum eksikliği Lack of fit	0.7182	9	0.0798	0.6476	0.7349	Önemsiz Not significant
Hata Pure error	0.2465	2	0.1232			
Düzeltilmiş toplam Correlated total	17.44	14				

$R^2=0.9447$ , Ayarlanmış  $R^2$  / Adjusted  $R^2=0.9296$ , Tahmin edilen  $R^2$  / Predicted  $R^2=0.9021$

Model denklemi/ Model equation= $10.42 + 1.21A + 0.7012B + 0.3075C$



Şekil 3. Ultrason uygulamasına ait bağımsız değişkenlerin likopen miktarı üzerine etkileri  
Figure 3. The effects of independent variables belonging ultrasound treatment on the lycopene content



Şekil 4. Ultrason uygulamasına ait bağımsız değişkenlerin  $\beta$ -karoten miktarı üzerine etkileri  
*Figure 4. The effects of independent variables belonging ultrasound treatment on the  $\beta$ -carotene content*

## SONUÇ

Bu çalışmada bir fabrikadan temin edilen domates atığından karotenoid ekstraksiyonunda geleneksel ve ultrason destekli yöntemler kullanılmıştır. Ayrıca ekstraksiyon parametrelerinin optimizasyonu için Box-Behnken tasarımı uygulanmıştır. En yüksek likopen ve  $\beta$ -karoten verimi örnek:çözücü oranının 1:50, sürenin 35 dk ve gücün 60 W olduğu koşullarda elde edilmiştir. Ultrason uygulamasının karotenoid ekstraksiyonunda kullanılması, zaman ve enerjiden tasarruf sağladığı ancak yüksek verim elde edebilmek için uygun parametre seçiminin önemli olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca, elde edilen likopen ve  $\beta$ -karoten miktarları karşılaştırıldığında domates kabuğunda likopen miktarının çok daha fazla olduğu, belirlenecek parametrelerde bu durumun göz önünde bulundurulması gerektiği düşünülmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2021-9-33-77 proje numarası ile desteklenmiştir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Bu makalede yazarların arasında herhangi bir çıkar çatışmasının olmadığını beyan ederiz.

## YAZAR KATKISI

İnci Cerit: Çalışmanın planlanması ve yürütülmesi, laboratuvar analizleri, sonuçların analizi ve yorumlanması, makalenin yazımı, Eda Nur Erdem: Laboratuvar analizleri, Mahmut Yıldırım: Laboratuvar analizleri, Mehmet Emin Dursun: Laboratuvar analizleri, Sercan Tekgöl: Laboratuvar analizleri, Zeynep Kaya: Laboratuvar analizleri, Omca Demirkol: Çalışmanın planlanması ve yürütülmesi, sonuçların yorumlanması

**KAYNAKLAR**

- Ashraf, W., Latif, A., Lianfu, Z., Jian, Z., Chenqiang, W., Rehman, A., ... Karim, A. (2022). Technological advancement in the processing of lycopene: a review. *Food Reviews International*, 38(5): 857-883. doi: 10.1080/87559129.2020.1749653
- Azabou, S., Sebü, H., Taheur, F. B., Abid, Y., Jridi, M., Nasri, M. (2020). Phytochemical profile and antioxidant properties of tomato by-products as affected by extraction solvents and potential application in refined olive oils. *Food Bioscience*, 36: 100664. doi: 10.1016/j.fbio.2020.100664
- Calvo, M. M., Dado, D., Santa-María, G. (2007). Influence of extraction with ethanol or ethyl acetate on the yield of lycopene,  $\beta$ -carotene, phytoene and phytofluene from tomato peel powder. *European Food Research and Technology*, 224(5): 567-571. doi:10.1007/s00217-006-0335-8
- Carreira-Casais, A., Otero, P., Garcia-Perez, P., GarciaOliveira, P., Pereira, A. G., Carpena, M., Prieto, M.A. (2021). Benefits and drawbacks of ultrasound assisted extraction for the recovery of bioactive compounds from marine algae. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(17): 9153. doi: 10.3390/ijerph18179153
- Cascant, M.M., Breil, C., Garrigues, S., de la Guardia, M., Fabiano-Tixier, A.S., Chemat, F. (2017). A green analytical chemistry approach for lipid extraction: computation methods in the selection of green solvents as alternative to hexane. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409: 3527-3539. doi: 10.1007/s00216-017-0323-9
- Civan, M., Kumcuoğlu, S., Tavman, Ş. (2019). Acı biber salçası atıklarından ultrason destekli ekstraksiyon işlemiyle karotenoid ekstraksiyonu. *Akademik Gıda*, 17(3): 351-361. doi: 10.24323/akademik-gida.647717
- da Silva Lima, R., Nunes, I. L., Block, J. M. (2020). Ultrasound-assisted extraction for the recovery of carotenoids from guava's pulp and waste powders. *Plant Foods for Human Nutrition*, 75: 63-69. doi: 10.1007/s11130-019-00784-0
- Dolatabadi Z., Elhami Rad A.H., Farzaneh V., Akhlaghi Feizabad S.H., Estiri S.H. and Bakhshabadi H. (2016). Modeling of the lycopene extraction from tomato pulps. *Food Chemistry*, 190:968. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.06.069
- Durmuş, M., Yetgin, Ö., Abed, M. M., Haji, E. K., Akcay, K. (2018). Domates bitkisi, besin içeriği ve sağlık açısından değerlendirilmesi. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 1(2): 59-74. doi: 10.38001/ijlsb.482443
- FAO, 2020. Alıntılanma adresi: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Gençdağ, E., Görgüç, A., Birişik, M., Genç, E., Başkurt, C., Yılmaz, F. M. (2019). Kırmızı pancar suyu üretiminde enzim ön uygulaması: işlem koşullarının meyve suyu verimi, betanin miktarı, toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite üzerine etkisi. *GIDA*, 44(4). doi: 10.15237/gida.GD19053
- Gheonea, I., Aprodu, I., Circiumaru, A., Râpeanu, G., Bahrim, G. E., Stănciuc, N. (2021). Microencapsulation of lycopene from tomatoes peels by complex coacervation and freeze-drying: Evidences on phytochemical profile, stability and food applications. *Journal of Food Engineering*, 288: 110166. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2020.110166
- Goula, A. M., Ververi, M., Adamopoulou, A., Kaderides, K. (2017). Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids from pomegranate wastes using vegetable oils. *Ultrasonics sonochemistry*, 34: 821-830. doi: 10.1016/j.ultsonch.2016.07.022
- Ho, K. K., Ferruzzi, M. G., Liceaga, A. M., San Martín-González, M. F. (2015). Microwave-assisted extraction of lycopene in tomato peels: Effect of extraction conditions on all-trans and cis-isomer yield, *LWT-Food Science and Technology*, 62(1): 160-168. doi: 10.1016/j.lwt.2014.12.061
- Isik, F., Yapar, A. (2017). Effect of tomato seed supplementation on chemical and nutritional properties of tarhana. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(2): 667- 674. doi: 10.1007/s11694-016-9436-7
- Khalid, M., Bilal, M., Iqbal, H. M., Huang, D. (2019). Biosynthesis and biomedical perspectives of carotenoids with special reference to human health-related applications. *Biocatalysis and*

- Agricultural Biotechnology*, 17: 399-407. doi: 10.1016/j.bcab.2018.11.027
- Kalogeropoulos, N., Chiou, A., Pyriochou, V., Peristeraki, A., Karathanos, V. T. (2012). Bioactive phytochemicals in industrial tomatoes and their processing byproducts. *LWT-Food Science and Technology*, 49(2): 213-216. doi: 10.1016/j.lwt.2011.12.036
- Kunthakudee, N., Sunsandee, N., Chutvirasakul, B., Ramakul, P. (2020). Extraction of lycopene from tomato with environmentally benign solvents: Box-Behnken design and optimization. *Chemical Engineering Communications*, 207(4): 574-583. doi: 10.1080/00986445.2019.1610882
- Li, Y., Fabiano-Tixier, A. S., Tomao, V., Cravotto, G., Chemat, F. (2013). Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent. *Ultrasonics sonochemistry*, 20(1): 12-18. doi: 10.1016/j.ultsonch.2012.07.005
- Martínez-Hernández, G. B., Castillejo, N., Artés-Hernández, F. (2019). Effect of fresh-cut apples fortification with lycopene microspheres, revalorized from tomato by-products, during shelf life. *Postharvest Biology and Technology*, 156: 110925. doi: 10.1016/j.postharvbio.2019.05.026
- Munde, P. J., Muley, A. B., Ladole, M. R., Pawar, A. V., Talib, M. I., Parate, V. R. (2017). Optimization of pectinase-assisted and tri-solvent-mediated extraction and recovery of lycopene from waste tomato peels. *Biotechnology*, 7(3): 1-10. doi: 10.1007/s13205-017-0825-3
- Rahimi, S., Mikani, M. (2019). Lycopene green ultrasound-assisted extraction using edible oil accompany with response surface methodology (RSM) optimization performance: Application in tomato processing wastes. *Microchemical Journal*, 146: 1033-1042. doi: 10.1016/j.microc.2019.02.039
- Saini, R. K., Keum, Y. S. (2018). Carotenoid Extraction Methods: A Review of Recent Developments. *Food Chemistry*, 240: 90-103. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.07.099
- Silva, Y., Ferreira, T. A., Celli, G. B., Brooks, M. S. (2019). Optimization of lycopene extraction from tomato processing waste using an eco-friendly ethyl lactate-ethyl acetate solvent: a green valorization approach. *Waste and Biomass Valorization*, 10(10): 2851-2861. doi: 10.1007/s12649-018-0317-7
- Strati, I. F., Oreopoulou, V. 2014. Recovery of carotenoids from tomato processing by-products—a review. *Food Research International*, 65: 311-321. doi: 10.1016/j.foodres.2014.09.032
- Umair, M., Jabbar, S., Nasiru, M. M., Lu, Z., Zhang, J., Abid, M., Zhao, L. (2021). Ultrasound-assisted extraction of carotenoids from carrot pomace and their optimization through response surface methodology. *Molecules*, 26(22): 6763. doi: 10.3390/molecules26226763
- Yılmaz, T., Kumcuoglu, S., Tavman, S. (2017). Ultrasound-Assisted extraction of lycopene and  $\beta$ -carotene from tomato-processing Wastes. *Italian Journal of Food Science*, 29(1): 186-194.
- Yogita, B. W., Dipak, D. P. (2017). An experimental design approach for optimization of spectrophotometric method for estimation of cefixime trihydrate using ninhydrin as derivatizing reagent in bulk and pharmaceutical formulation, *Journal of Saudi Chemical Society*, 21: 101-111. doi: 10.1016/j.jscs.2013.11.001





## PREPARATION AND QUALITY EVALUATION OF ENRICHED SALAD DRESSINGS BASED ON COLD-PRESSED SAFFLOWER OIL

**Emin Yılmaz,\* Emine Bildi**

Çanakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Çanakkale, Türkiye

Received /Geliş: 24.01.2023; Accepted / Kabul: 22.03.2023; Published online / Online baskı: 31.03.2023

Yılmaz, E. Bildi E. (2023). Preparation and quality evaluation of enriched salad dressings based on cold-pressed safflower oil. GIDA (2023) 48 (2) 471-482 doi: 10.15237/ gida.GD23018

Yılmaz, E., Bildi, E. (2023). Soğuk preslenmiş aspir yağından zenginleştirilmiş salata soslarının hazırlanması ve kalite değerlendirilmesi. GIDA (2023) 48 (2) 471-482 doi: 10.15237/ gida.GD23018

### ABSTRACT

The objectives of this study were to prepare and characterize two different salad dressings based on cold-pressed safflower oil. Common physico-chemical and thermal properties, compositions, sensory descriptive analysis, and consumer tests were completed. Both samples had acceptable free fatty acidity, peroxide and pH values, and had color values reflecting the spices (red pepper and green spices). Both dressings were liquid at around -14 to -19 °C and were pourable. They were good sources of essential fatty acids, including around 91-92% of total unsaturated fatty acids. Total phytosterol contents were around 1693-1700 mg/kg, with a majority of  $\beta$ -sitosterol. Further, both samples had around 284 mg/kg of total tocopherols. The panel used 8 sensory terms (consistency, sweet, salty, sour, bitter, spicy, vinegary, and metallic) to describe the samples. Consumers liked their appearance and smell/aroma, but taste/flavor and general acceptance scores were lower. Further studies to improve taste properties are suggested.

**Keywords:** Salad dressing, safflower oil, spice, composition, sensory, consumer

## SOĞUK PRESLENMİŞ ASPİR YAĞINDAN ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ SALATA SOSLARININ HAZIRLANMASI VE KALİTE DEĞERLENDİRİLMESİ

### ÖZ

Bu çalışmanın amacı soğuk-preslenmiş aspir yağından iki farklı tip salata sosu hazırlamak ve ürün karakterizasyonu yapmaktır. Yaygın fizikokimyasal ve termal özellikler, bileşim, duyu tanımlama ve tüketici testleri tamamlanmıştır. İki örnek de kabul edilebilir serbest asitlik, peroksit ve pH değerleri ve katılan baharatın renklerini (kırmızıbiber ve yeşil baharatlar) göstermişlerdir. Her ikisi de -14'den -19 °C'ye kadar likit ve akışkandırlar. Esansiyel yağ asitlerinin iyi kaynağı oldukları ve yaklaşık %91-92 oranında toplam doymamış yağ asitleri içerdikleri belirlenmiştir. Büyük bölümü  $\beta$ -sitosterol olmak üzere 1693-1700 mg/kg toplam fitosterol içermektedirler. İlaveten, 284 mg/kg toplam tokoferol içeriği belirlenmiştir. Panelistler örnekleri 8 terimle (akışkanlık, tatlı, tuzlu, ekşi, acı, baharatlı, sirkemsi, metalik) tanımlamıştır. Tüketiciler örneklerin koku/arasını beğenmiş, ancak tat/lezzet ve genel kabul skorları düşük bulunmuştur. Tat özelliklerini geliştirecek yeni çalışmalar önerilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Salata sosu, aspir yağı, baharat, bileşim, duyu, tüketici

\* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar

✉: eyilmaz@comu.edu.tr

☎: (+90) 286 218 0018/20054

☎: (+90) 286 218 0541

Emin Yılmaz; ORCID no: 0000-0003-1527-5042

Emine Bildi; ORCID no: 0000-0001-9030-7177



## INTRODUCTION

Salad dressings are basically low-pH oil-in-water emulsion products, which may include some other ingredients and aromas, and could have various viscosity profiles. They have gained popularity as consumers go towards healthier eating with salads, aperitifs, side meals, vegetables, and other foods. Usually, salad dressings were poured onto these foods to make them more tasty and healthy. Consequently, salad dressings faced further research to improve their nutritional, technical, and sensory quality (Dickinson and Stainsby, 1982; Manshadi et al., 2019).

Food and Drug Administration (FDA) has defined salad dressings (21CFR169.150) as 'emulsified semisolid food prepared from any vegetable oil, acidifying agent (any vinegar, lemon, and/or lime juice), egg yolk, starchy paste (prepared from a food starch, food starch-modified, tapioca flour, wheat flour, and/or rye flour with water added), optional ingredients, (salt, nutritive carbohydrate sweeteners, any spice or natural flavoring, except if it imparts a yolk color), MSG, stabilizers and thickeners, up to 25% substitution of acidifiers with citric and/or malic acid, sequestrants (e.g., calcium disodium EDTA or disodium EDTA), and crystallization inhibitors (e.g., oxystearin, lecithin, or polyglycerol esters of fatty acids)'. Further, it was stated that salad dressings cannot contain less than 30% by weight of vegetable oil and 4% by weight of egg yolk (FDA, 2012). Similarly, the Turkish Standard for salad dressing (TS 7437) defines these products as 'salad dressing is a product made from vegetable oil, egg and/or egg products, acidifiers, fillers, one or more of the seasoning and other additives in different proportions according to the type of salad dressing which it has a thick consistency or a flowing consistency, produced in accordance with the technique in the form of stable emulsification from the mixture.' The standard identifies two types of salad dressings; the thick sauce is a spoonable produce with egg, cooked or partially cooked starch as filling containing sauces, and flowing sauces as the products which do not contain fillers, and homogenized, prepared with or without eggs (TSE, 1989). Further, the

standard defines its taste and viscosity according to its sub-type as it is and puts limit technical values of min. 30% by weight of oil, min. 0.60% total acidity as acetic acid, max. 0.3% of free fatty acidity, max. 10 meq O<sub>2</sub>/1000 g of peroxide value, pH value between 3.2 and 4.2, and min. egg content of 4% by weight (TSE, 1989).

In literature, there are different studies dealing with different recipe formulations to develop nutritious salad dressings (Mantzouridou et al., 2013; Manshadi et al., 2019), product quality and stability evaluations (Paraskevopoulou et al., 2007; Drakos and Kiosseoglou, 2008; Bortnowska et al., 2014; Sainsbury et al., 2016), sensory evaluations (de Melo et al., 2015; Sainsbury et al., 2016; Manshadi et al., 2019), rheological studies (Diftis et al., 2005; Martinez et al., 2007; Ma et al., 2013) and others. In this study, we aimed to use cold-pressed safflower oil as the oil source and cold-press Milk Thistle seed flour as the starchy material source to develop two different salad dressings with different spices. Cold-pressed oils are regulated by the Turkish Codex (TGK, 2012). These oils were produced from very safe and clean plant seeds or oil-containing plant parts by mild pressing to reduce oil exit temperature below 40 °C (for olive oil it is 37 °C) to keep their bio-actives intact. These oils are not refined. Due to the processing technology, cold-pressed oils contain high levels of bio-active molecules and have unique aromatics. Further, the press-cakes (meals) of cold-pressing are high quality with higher content of remaining oil, protein, and bio-actives and could be used in food formulations.

Evaluation of current research and consumer trends have pointed out that new salad dressings with nutritious ingredients and different tastes could offer consumers choices. Consequently, this study aimed to develop and evaluate two new salad dressings based on cold-pressed safflower oil and cold-pressed Milk Thistle seed press-cake (meal) and spice mixtures. Some physico-chemical, thermal, compositional, and sensory analyses were completed to evaluate the potential of the products.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

The cold-pressed safflower oil was purchased from Onevo Co. (Istanbul, Türkiye). The producer provided fatty acid composition was 0.2% myristate, 6.5% palmitate, 2.5% stearate, 13.0% oleate, 77.3% linoleate, 0.5% gadoleate with 1.10% of free fatty acidity and 10.2 meqO<sub>2</sub>/kg oil peroxide value. The regular apple vinegar (min. 10% acetic acid), the dry spices (chili pepper, pimento, dry mint, and thyme), kitchen salt, and table sugar were bought from local stores. The egg yolk powder (Kor Agro Organik Gıda A.Ş., İzmir), food-grade Xanthan Gum (As Kimya Co., İstanbul), Potassium Sorbate and EDTA (Sigma Chem. Co, St. Louis, US) were purchased. The Milk Thistle seed press-cake used was produced from our previous study (Ayduğan et al., 2022), and its composition was 4.2% moisture, 4.8% crude oil, 17.30% total protein, 4.10% ash, and 69.6% total carbohydrates. The chemicals and standards used were purchased

from Sigma Chem. Co. (St. Louis, USA), and Merck (Darmstad, Germany).

### Preparation of the Salad Dressings

The recipe formulations provided in Table 1 were used to prepare the salad dressing samples. First, the calculated amounts of aqueous phase components (vinegar, sugar, salt, xanthan gum, potassium sorbate, EDTA and Milk Thistle seed press-cake) were dissolved in water. Then, the egg yolk powder was dissolved in the safflower oil. Finally, the aqueous phase was slowly added to the oily phase with the spices mixtures and homogenized (Ultra Turrax, IKA T-25, Germany) first at slow rate (3000 rpm) for 2 min, then at a high rate (15000 rpm) for 8 min. Finally, the prepared dressings were placed into glass jars and closed before placing them into the refrigerator. During the analyses, the samples were stored in the fridge. The prepared samples can be observed in Fig. 1. The sample names and abbreviations indicated in Table 1 were used throughout the paper.

Table 1. The recipe formulations used to prepare the salad dressings

	Peppery Salad Dressing (PSD) (%)	Spicy Salad Dressing (SSD) (%)
Safflower Oil	37.0	37.0
Water	35.0	35.0
Apple Vinegar (10% acetate)	10.0	10.0
Spice Mixture†	10.0	10.0
Sugar	2.5	2.5
Salt	2.0	2.0
Eggyolk Powder	2.0	2.0
Xanthan Gum	0.15	0.15
Milk Thistle Seed Press-cake	2.0	2.0
Potassium Sorbate	0.1	0.1
EDTA	0.1	0.1

†For PSD, a 1:1 mixture of dry chili pepper and pimento; for SSD, a 1:1 mixture of dry mint and thyme.

### Measurement of the Physico-Chemical Properties of the Samples

The samples' instrumental color was measured with a Minolta CR-400 Reflectance colorimetry (Osaka, Japan). The values of  $L^*$  (brightness),  $a^*$  (redness/greenness), and  $b^*$  (yellowness/blueness) were read at multiple sites of each

sample and recorded. 1.0 gram of each sample was dissolved in 10 ml of pure water, and the probe of the pH meter (PB-11, Sartorius, Göttingen, Germany) was submerged to read the pH values.



Figure 1. The salad dressing samples prepared (PSD: peppery salad dressing, SSD: spicy salad dressing).

The oil phase of salad dressings was extracted with hexane 3 times (1:10 = salad dressing: hexane, w/w) at room temperature, and the solvent was evaporated (40 °C) in a rotary evaporator (Heidolph Laborota 4001, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) under vacuum. Then, the free fatty acidity (FFA) of the oils was measured according to the AOCS method Ca 5a-40 (AOCS, 1998). Similarly, the peroxide value (PV) of the extracted oil was measured by following the AOCS method Cd 8-53 (AOCS, 1998). Another oxidation test, the *p*-anisidine value, was completed according to the AOCS method Cd 18-90 (AOCS, 1998), respectively. To analyze total phenolics, the fat of the dressing was first removed by hexane extraction following the procedure of Challacombe et al. (2012). Then, the total phenolics of the solid polar fraction of fat and solid phase were extracted with water/methanol (60/40, v/v) solvent at 1:5 (w/v) ratio 3 times and collected together. Finally, the total phenolics content of the extract was measured following Chotimarkorn et al. (2008) with the Folin-Ciocalteu assay. Standard curve was prepared with the absorbance readings of known concentration solutions of gallic acid standard, and the results were expressed as gallic acid equivalents (mg GAE/100 g oil).

#### Thermal Properties of the Samples

The melting and crystallization onset, peak temperatures, and enthalpy values of the two

salad dressing samples were assessed with Differential Scanning Calorimetry (DSC, Perkin-Elmer 4000 Series, Gorinigen, The Netherlands) following the technique of Yilmaz et al. (2022). The instrument was regularly calibrated with indium and zinc. Around 8-10 mg of salad dressing sample was weighed into the aluminum pan and sealed. The empty pan was the reference. The samples were heated from 20 °C to 110 °C at 10 °C/min rate, and then cooled down to -70 °C at 10 °C/min rate, and kept at that temperature for 3 min for full crystallization. Finally, the samples were heated again to 50 °C by 5 °C/min rate. The Pyris 1 Manager software was used to calculate the thermal parameters.

#### Fatty Acid, Phytosterol and Tocopherol Composition of the Samples

The oil from the salad dressing samples were first extracted with hexane (1:10, dressing: solvent, g: ml) for 3 times, and collected phase were placed into a rotary evaporator (Heidolph Laborota 4001, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), and the solvent was evaporated under vacuum. The AOCS method Ce 2-66 (AOCS, 1998) was applied to the oil to prepare the fatty acid methyl esters. The fatty acid compositions of the samples were then analyzed with an Agilent 7890B gas chromatography-FID (Palo Alto, CA, USA) equipped with an HP 88 capillary column (100 m × 0.25mmID × 0.2 μm film thickness, J&W Scientific Co, CA, USA). The temperature

program was heating at 120 °C for 1 min, increasing temperature to 175 °C by 10 °C/min rate for 10 min, then to 210 °C by 5 °C/min rate for 5 min, and finally to 230 °C by 5 °C/min rate for 5 min. The analysis conditions were 1 µl injection volume, 1:50 injector split ratio, hydrogen as carrier gas (40 ml/min flow rate), dry air with 450 ml/min flow rate as detector gas, 250 °C inlet temperature, and 280 °C detector temperature. The fatty acid identification and quantification were achieved by co-chromatography of FAME mixture standards (37-components, C4- C24, Supelco, Bellefonte, PA, USA). Results were provided as % fatty acid composition.

The phytosterol composition of the extracted oil fraction was determined according to ISO 12228 method (ISO, 1999). First, unsaponifiable matters from the oil samples were separated, and then phytosterol fractions were separated by Thin Layer Chromatography (TLC) following the method. Finally, phytosterol compositions were determined with the Gas Chromatograph-FID (Agilent Technologies 7890B) donated with DB5 capillary column (30 m × 0.25 mm ID × 0.1 µm film thickness, J&W Scientific Co). The temperature program was waiting at 60 °C for 2 min, heating to 220 °C by 40 °C/min rate and waiting for 1 min, heating to 310 °C by 5 °C/min rate and waiting at that temperature for 30 min. The conditions of the analysis were 1 µl injection volume, 1:100 split ratio, 0.7 ml/min hydrogen carrier gas flow rate, hydrogen (30 ml/min) and dry air (400 ml/min) as detector gases, 290 °C inlet temperature, and 300 °C detector temperature. Phytosterols were identified by comparing with commercial standards, and quantification was achieved by using the peak area of  $\alpha$ -cholestanol internal standard.

The technique of Grilo et al. (2014) was followed to measure the tocopherol compositions of the oils extracted from the salad dressings. First, 200 µl of oil sample was diluted to 5 ml with dichloromethane, then the mixture was vortexed for 30 sec and placed into a vial. Tocopherol composition was measured by using an HPLC

(Shimadzu Corporation, Japan) equipped with LC-20AT HPLC pump, DGU-20A5R degasser, CTQ-10ASVP column oven, inertsil ODS-3 column (250 mm × 4.6mm × 5 µm, GL Sciences Inc., Japan), and a RF-20A fluorescent detector. The working conditions were 20 µl injection volume, methanol: water (97: 3, v/v) mixture as the mobile phase, isocratic elution with a flow rate of 1.5 ml/min, 30 °C oven temperature, 290 and 330 nm as the detector wavelengths for excitation and emission, respectively. Commercial standards were used for the identification and quantification of the tocopherols.

### Quantitative Descriptive Sensory Analysis of the Samples

To describe the salad dressings, the Quantitative Descriptive Sensory Analysis (QDA) was followed (Meilgaard et al., 1991). There were 12 panelists composed of 7 women and 5 men aged between 22 and 47 years. First, the panel was trained on different days and sittings totaling for 10 h. Under the moderation of the panel leader, the panel has selected, defined and standardized the sensory terms for these samples. The panel defined sensory terms, and their definitions and standards are shown in Table 2. A 10 cm line scale from the left side of minimum intensity with 1 to the right side of maximum intensity with 10 was used. The samples were coded with three-digit numbers and served at room temperature under daylight in glass cups covered with a lid. During the test, the panel was also provided with drinking water, unsalted crackers, and an expectoration cup. The sensory analyses were replicated in different days in randomized order.

### Consumer Tests for the Samples

The appearance, smell/aroma, taste/ flavor, and general acceptance attributes of the salad dressing samples were assessed with 30 volunteer consumers (26 women, 4 men, 21-34 year old) by using a 5-point hedonic scale (1= Dislike extremely, 5= Like extremely). The samples were coded and served in glass cups covered by lid under daylight at room temperature. Water, unsalted cracker and expectoration cups were provided to consumers besides the sample.

Table 2. The sensory descriptive terms, their definitions and standards used to describe the salad dressing samples

Sensory Term	Definition	Reference
Consistency	The resistance of sample against free flow	Regular mayonnaise
Sweet	Basic taste stimulated by table sugar	5% Sucrose solution
Salty	Basic taste stimulated by kitchen salt	0.3% Salt solution
Sour	Basic taste stimulated by organic acids	Lemon juice
Bitter	Taste on tongue stimulated by caffeine or alkaloids	0.1% Caffeine solution
Spicy	Overall aromas associated with pungent spices	Curry mixture
Vinegary	Aroma notes associated with vinegar	Apple vinegar
Metallic	Aromatic associated with metals, tinny or iron	Metallic coin

### Statistical Analysis

In this study, the two types of salad dressings were prepared two times as the two replicates at different times. In each replicate sample, the analyses were completed three times. There was a completely randomized design for the experiments. The data were given as the mean values of six measurements with standard errors of the means. The two salad dressings were compared with Analysis of Variance and Tukey's test at 95% confidence level. The non-parametric sensory data was compared with Kruskal-Wallis test with Minitab 16.1.1 software (Minitab, State College, PA) (Minitab, 2010; Razali et al., 2021).

## RESULTS AND DISCUSSIONS

### The Physico-Chemical Properties of the Salad Dressings

The measured physico-chemical properties of the prepared salad dressing samples are presented in Table 3. The peppery salad dressing (PSD) had around 2.50% of free fatty acidity (FFA), while it was 2.15% in the spicy salad dressing (SSD) sample. This difference was statistically not significant. Since safflower oil used had 1.10% FFA, this enhanced level must be originating from other oil-containing ingredients (egg yolk and Milk Thistle seed press-cake) used (Table 1). In literature, FFA in salad dressings was reported as 0.8-1.3% (Paraskevopoulou et al., 2007). Turkish Standard for salad dressings (TS 7437) defines 0.3% oleate as max. FFA value. Since in this study, cold-pressed safflower oil was used, and the starting oil had 1.10% of FFA, the TS

standard was not matched. Salad dressings are mostly sour products, and this amount of FFA could not create any taste problems. The peroxide values (PV) of samples were significantly different (Table 3,  $p \leq 0.05$ ), and SSD had a higher value (8.40 meq O<sub>2</sub>/kg) than PSD (3.72 meq O<sub>2</sub>/kg), respectively. The safflower oil used had 10.2 meqO<sub>2</sub>/kg oil PV, and the salad dressing had lower values due to a proportional decrease of the oil phase in the recipe formulation. The TS 7437 limits PV to 10 meq g/1000 g oil. Both samples comply with the standard. Similarly, PVs of 9.65 meq O<sub>2</sub>/kg (Paraskevopoulou et al., 2007) to 1-13 meq O<sub>2</sub>/kg (Let et al., 2007) were reported. Another oil oxidation index, *p*-anisidine value, was also measured. SSD sample had a higher value (Table 3). Since *p*-anisidine value indicates the secondary oxidation level, it could be claimed that the rate of oxidation was slower in the PSD sample due to its composition. The total phenolics content of the samples was also different ( $p \leq 0.05$ ), and SSD sample had higher (129.21 mg GAE/100 g oil) amount than that of the (49.62 mg GAE/100 g oil) PSD sample. It would be due to the phenolic content differences of the added spices. Clearly, there was no linear relationship between total phenolics content and level of oil oxidation. The pH value of the samples was around 4.50-4.78, and not different from each other. The TS 7437 provides pH range of 3.2-4.2 for salad dressings. French salad dressing made with mannoprotein from spent brewer's yeast had around 6.0 pH value and during storage pH was decreased (de Melo et al., 2015).

Table 3. The physico-chemical properties of the salad dressing samples prepared

	Peppery Salad Dressing (PSD)	Spicy Salad Dressing (SSD)
Free Fatty Acidity (% linoleate)	2.50 ± 0.00 <sup>a†</sup>	2.15 ± 0.02 <sup>a</sup>
Peroxide Value (meq O <sub>2</sub> /kg oil)	3.72 ± 0.55 <sup>b</sup>	8.40 ± 1.15 <sup>a</sup>
<i>p</i> -Anisidine Value	3.48 ± 0.46 <sup>b</sup>	4.27 ± 0.54 <sup>a</sup>
Total Phenolics (mg GAE/100 g oil)	49.62 ± 0.12 <sup>b</sup>	129.21 ± 0.11 <sup>a</sup>
pH Value	4.50 ± 0.01 <sup>a</sup>	4.78 ± 0.07 <sup>a</sup>
Color <i>L</i> * Value	40.56 ± 0.10 <sup>b</sup>	42.58 ± 0.17 <sup>a</sup>
Color <i>a</i> * Value	9.42 ± 0.35 <sup>a</sup>	-1.26 ± 0.01 <sup>b</sup>
Color <i>b</i> * Value	20.41 ± 0.90 <sup>a</sup>	14.86 ± 0.01 <sup>b</sup>

<sup>†</sup>Small letters in the same row indicate the significant differences between the samples ( $p \leq 0.05$ ;  $n = 6$ ).

The color values of the samples had significant differences ( $p \leq 0.05$ , Table 3). Both samples can be observed from Fig. 1. Since the added spices and their natural colors were different, the measured color differences are quite expected. The SSD sample was brighter (42.58 *L*\* value). Both samples had certain level of brightness, most possibly due to the light reflecting effect of the oil phase. The *a*\* value indicates the level of redness (+ *a*\* values) and greenness (- *a*\* values). Clearly, SSD had green color while PSD was a red sample (Fig. 1). The added paprika pepper provided the red color, and the added green leafy mint and thyme spices yielded the green color, expectedly. Similarly, the *b*\* value indicates yellowness/blueness on positive/negative number directions (Pomeranz and Meloan, 1991), and both samples had some yellowness, but it was higher in the PSD sample, respectively. Due to the color pigments present in the added spices, these color differences have occurred. In literature, quite diverse color values depending on the ingredients used were reported (Ma et al., 2013; de Melo et al., 2015; Manshadi et al., 2019).

#### Thermal Properties of the Salad Dressings

DSC-determined thermal properties of the salad dressing samples are summarized in Table 4. There were some differences between the samples. The fully crystallized SSD sample had a peak melting temperature of -18.68 °C, and the same was -14.11 °C for PSD sample. Similarly, the crystallization peak temperatures were -30.52

°C and -26.06 °C for SSD and PSD samples, respectively. Clearly, the SSD sample was more liquid at lower temperatures. Since both samples had the identical product formulation, except for the added spices, these thermal behavior differences could be attributed to the added spices. This effect could be due to the oils and essential oils infiltrating from the added spices into the dressing, or it could be a physical effect of spice particulates on the fat crystallization of the safflower oil. For any fat product, the thermal behavior is of course, defined by the fatty acid composition of the oily phase. Since safflower oil is unsaturated, the measured data seems quite proper and expected. Practically, these salad dressings were liquid at refrigerator or even lower temperatures. For any pourable type of salad dressing, it would be better if the sample flowed freely after taking it from the refrigerator. The prepared samples showed acceptable thermal properties as salad dressing samples. No similar data found in the literature.

#### The Fatty Acid, Phytosterol and Tocopherol Compositions of the Salad Dressings

The compositions of fatty acids, phytosterols and tocopherols measured in the salad dressing samples are presented in Table 5. Eight different fatty acids were quantified in both samples. Linoleic acid was the predominant one (77.50% and 78.00%) in both samples, followed by oleic acid (13.58% and 12.98%) and palmitic acid (5.75% and 5.85%) for PSD and SSD samples,

respectively. Myristic, linolenic, arashidic and gadoleic acids were quantified under 1% levels. There was a statistically significant difference only in the oleic acid content for the samples, and the rest were not significantly different ( $p \geq 0.05$ , Table 5). Both samples contained more than 90% of unsaturated fatty acids, including the essential (linoleic and linolenic) fatty acids. In one of our previous studies (Aydeniz et al., 2014), cold-press-produced safflower oil was analyzed for its fatty

acids, and as main components, 75.50-77.43% linoleic acid, 12.29-14.79% oleic acid, and 6.69-6.79% palmitic acids were quantified. Clearly, prepared salad dressing samples had quite similar fatty acid compositions, respectively. Other oil-containing ingredients (egg yolk powder and Milk Thistle seed press-cake) were added at only 2% level, and had not created a big difference in fatty acid composition.

Table 4. The thermal properties of the salad dressing samples prepared

		Peppery Salad Dressing (PSD)	Spicy Salad Dressing (SSD)
Melting	Onset <sub>m</sub> (°C)	-25.56 ± 1.08 <sup>at</sup>	-29.9 ± 1.28 <sup>b</sup>
	T <sub>m</sub> (°C)	-14.11 ± 1.1 <sup>a</sup>	-18.68 ± 3.95 <sup>b</sup>
	ΔH <sub>m</sub> (J/g)	29.96 ± 2.43 <sup>a</sup>	4.14 ± 2.18 <sup>b</sup>
Crystallization	Onset <sub>c</sub> (°C)	-26.14 ± 0.85 <sup>a</sup>	-29.74 ± 2.09 <sup>b</sup>
	T <sub>c</sub> (°C)	-26.06 ± 0.91 <sup>a</sup>	-30.52 ± 2.55 <sup>b</sup>
	ΔH <sub>c</sub> (J/g)	-30.17 ± 2.68 <sup>b</sup>	-4.6 ± 1.12 <sup>a</sup>

<sup>†</sup>Small letters in the same row indicate the significant differences between the samples ( $p \leq 0.05$ ;  $n = 6$ ).

Table 5. The fatty acid (%), phytosterol (mg/kg oil) and tocopherol (mg/kg oil) compositions of the salad dressing samples prepared

	Peppery Salad Dressing (PSD)	Spicy Salad Dressing (SSD)
Myristic acid (C14:0)	0.25 ± 0.03 <sup>at</sup>	0.25 ± 0.01 <sup>a</sup>
Palmitic acid (C16:0)	5.75 ± 0.63 <sup>a</sup>	5.85 ± 0.50 <sup>a</sup>
Stearic acid (C18:0)	2.55 ± 0.37 <sup>a</sup>	2.50 ± 0.45 <sup>a</sup>
Oleic acid (C18:1)	13.58 ± 0.33 <sup>a</sup>	12.98 ± 0.03 <sup>b</sup>
Linoleic acid (C18:2)	77.50 ± 3.45 <sup>b</sup>	78.00 ± 2.15 <sup>a</sup>
Linolenic acid (C18:3)	0.50 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.01 <sup>a</sup>
Arashidic acid (C20:0)	0.20 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.20 ± 0.01 <sup>a</sup>
Gadoleic acid (C20:1)	0.15 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.01 <sup>a</sup>
∑ Saturated	8.75	8.80
∑ Unsaturated	91.73	91.63
β-Sitosterol	915.52 ± 84.37 <sup>a</sup>	913.48 ± 81.69 <sup>a</sup>
Stigmasterol	138.22 ± 10.98 <sup>a</sup>	139.82 ± 11.50 <sup>a</sup>
Campesterol	245.18 ± 31.42 <sup>a</sup>	241.63 ± 32.71 <sup>a</sup>
Δ-7-Stigmastenol	357.26 ± 42.39 <sup>a</sup>	354.37 ± 41.83 <sup>a</sup>
Δ-7-Avenasterol	44.29 ± 6.37 <sup>a</sup>	43.77 ± 5.46 <sup>a</sup>
∑ Sterol	1700.47	1693.07
δ-Tocopherol	30.95 ± 4.03 <sup>a</sup>	32.15 ± 3.89 <sup>a</sup>
β-Tocopherol	139.5 ± 7.74 <sup>a</sup>	138.61 ± 6.52 <sup>a</sup>
γ-Tocopherol	114.22 ± 5.51 <sup>a</sup>	113.58 ± 4.69 <sup>a</sup>
∑ Tocopherol	284.67	284.34

<sup>†</sup>Small letters in the same row indicate the significant differences between the samples ( $p \leq 0.05$ ;  $n = 6$ ).

Five phytosterols were quantified in the samples, with around 915 mg/kg of  $\beta$ -sitosterol as the major one. From higher to lower amounts,  $\beta$ -sitosterol,  $\Delta$ -7-stigmasterol, campesterol, stigmasterol, and  $\Delta$ -7-avenasterol were quantified. There was no significant difference between the two samples (Table 5). Both samples had around 1700 mg/kg total phytosterols. The phytosterol composition reported by Aydeniz et al. (2014) was similar to these samples. These salad dressing samples could be accounted as good sources of phytosterols, as long as phytosterol compositions of the common cold-pressed vegetable oils are considered (TGK, 2012). The positive health effects of phytosterols could be affirmed in any of the main lipid sources (Aydeniz et al., 2014).

Only three tocopherols ( $\delta$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -) were quantified in the samples, with  $\beta$ -tocopherol as the dominant (138-139 mg/kg) one (Table 5). Total tocopherol contents were not different for the PSD and SSD samples. Aydeniz et al. (2014) reported around 1600-2000 mg/kg of  $\alpha$ -tocopherol in a cold-pressed safflower sample, and it was quite different from the findings of this study. This could be attributed to sampling and analysis technique differences.

Overall, the prepared salad dressings were determined to be good sources of nutrient components and would provide quite high quantities of essential fatty acids, phytosterols, and some tocopherols.

### Sensory Descriptive Analysis Results of the Salad Dressings

The prepared fresh salad dressing samples were evaluated by 12 trained sensory panelists by using 8 descriptive terms (Table 6). 'Consistency' was defined as the resistance of salad dressings against the free flow. Both samples had around 8.5-9.5 scores compared with 10 score of mayonnaise samples. Consequently, the samples were not like free-flowing liquids but more like mobile gels, expectedly. This score also indicates the pourability of the dressings. As the main taste, both samples had some 'sweet' values. The product formulations (Table 1) included 2.5% of sugar, but since the sample included aromatic

spices and vinegar, the sweetness perception was reduced, respectively. The panel defined some 'salty' taste, and it would originate from table salt and other ingredients used in product formulations. 'Sour' scores of the samples were similar (2.8), and would be related to the acetic acid present in the vinegar used. There was a significant difference between the samples for 'bitter' scores. The PSD sample had significantly higher bitter values (8.9) than that of the SSD sample (1.25). This is quite an expected finding since the PSD sample had dry chili pepper in the formulation (Table 1). In fact, this was the type of sample which must have a perceptible bitter taste. For the 'spicy' scores, the PSD sample had higher (7.2) than the SSD sample (6.5), and this also would be possible due to the chili pepper and pimento yielding a more spicy sensation than dry mint and thyme mixture used in the other sample. The 'vinegary' scores were moderate and not different between the samples. Finally, both samples had some 'metallic' sensations, possibly caused by the oil oxidation or ingredient interactions.

Table 6. The quantitative sensory descriptive analysis (QDA) results of the salad dressing samples prepared

	Peppery Salad Dressing (PSD)	Spicy Salad Dressing (SSD)
Consistency	8.5 $\pm$ 1.5 <sup>a†</sup>	9.5 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>
Sweet	1.6 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	1.5 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>
Salty	4.7 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	4.2 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>
Sour	2.8 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	2.8 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>
Bitter	8.9 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	1.25 $\pm$ 1.6 <sup>b</sup>
Spicy	7.2 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	6.5 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
Vinegary	3.7 $\pm$ 2.8 <sup>a</sup>	2.4 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>
Metallic	1.2 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>	2.1 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>

<sup>†</sup>Small letters in the same row indicate the significant differences between the samples ( $p \leq 0.05$ ;  $n = 6$ ).

In a study (Ma et al., 2013), lentil flour-enriched canola oil salad dressings were evaluated by a QDA panel with 5 terms (legume flavor, vinegar, acidity, grittiness, firmness and overall flavor attribute). Since we prepared pourable samples,



our panel described sample texture with consistency terms. Further, sour and vinegar were common descriptors. In another study (Sainsbury et al., 2016), sunflower oil salad dressings were described with 14 different sensory terms (pungent, vinegar, eggy, citrus, musty, dairy, green, oil, earthy, metallic, plastic, cardboard, painty and rancid). Clearly, different panels could use a diverse number of descriptors based on primary oil, and ingredient differences. Basically, product formulation ratios, the aroma/flavor potency of the ingredients used, and preparation techniques could differentiate the sensory attributes of the salad dressings. Although egg yolk powder is included in our samples, the panel has not used any terms related to eggs in our samples, possibly due to the concentrated spices and their intense aromas. Finally, Manshadi et al. (2019) used sensory QDA to test their samples with taste, viscosity, color, texture, and overall acceptability terms. The panel differences and goal of each test could cause diverse sensory terms usage, expectedly. Overall, samples prepared in this study seem pourable but consistent, very spicy and bitter, vinegary salad dressings. Any sensory test completed with a consumer test would be more informative about the market success of food products. Hence, a consumer test was also completed for these samples.

### Consumer Test Results of the Salad Dressings

A hedonic test was completed with 30 volunteer consumers, and the results are summarized in Table 7. Except for appearance, there was no significant difference between PSD and SSD samples for smell/aroma, taste/flavor, and general acceptance scores. The appearance of PSD had a higher score. Generally, both samples had scores above 3.0 points (the neutrality point; neither like-nor dislike) for appearance and smell/aroma but lower scores for taste/flavor and general acceptance. Clearly, some modifications to improve the taste/flavor of the prepared salad dressings are needed to enhance their consumer acceptance. Ratio of the ingredients, and especially the kind and amounts of the spices used, could be changed to get a better taste/flavor

and acceptance. Consequently, more research is needed. French salad dressing made with mannoprotein from spent brewer's yeast was evaluated with 60 untrained consumers (de Melo et al., 2015). Flavor, color, taste, texture, overall acceptance, and purchase intention indicated some differences among the samples, usually some decreases after the storage period. There are not many similar studies with consumers in the literature; hence, our results contribute comparable data for upcoming studies.

Table 7. The consumer test results of the salad dressing samples prepared

	Peppery Salad Dressing (PSD)	Spicy Salad Dressing (SSD)
Appearance	3.40 ± 1.03 <sup>at</sup>	2.73 ± 1.14 <sup>b</sup>
Smell/Aroma	3.43 ± 0.97 <sup>a</sup>	3.26 ± 1.58 <sup>a</sup>
Taste/Flavor	2.53 ± 1.07 <sup>a</sup>	2.45 ± 1.33 <sup>a</sup>
General Acceptance	2.90 ± 0.99 <sup>a</sup>	2.85 ± 1.10 <sup>a</sup>

<sup>†</sup>Small letters in the same row indicate the significant differences between the samples ( $p \leq 0.05$ ;  $n = 6$ ).

### CONCLUSIONS

In this study, two different salad dressings were prepared and evaluated. Cold-pressed safflower seed oil and Milk Thistle seed press-cake were used as the functional ingredients. The dressings were prepared according to TS 7437 Turkish salad dressings standard. FFA and PV of the samples were within the acceptable limits of the vegetable oils codex. The pH values were in accordance with the salad dressing standard. The total phenolic content of SSD sample was significantly higher, and both samples showed color values resembling the added spice colors (red pepper and green spices). The dressings had full crystallization temperatures at around -26 to -30 °C, and melting peaks at around -14 to -19 °C, respectively. They were fairly liquid at refrigerator temperatures. Both dressings were found to be good sources of unsaturated and essential fatty acids. Further, they included fairly good amounts of total sterols, with the majority occurring as  $\beta$ -sitosterol. Also, the samples were good sources of

tocopherols. These nutritional sources would make them functional preparations. Sensory descriptive analysis (QDA) was completed with a trained panel and 8 descriptive terms. The samples were mainly described as bitter and/or spicy, vinegary, and salty dressings. The panel has not detected any egg-related sensory descriptor. The samples were found to be consistent but pourable. Lastly, consumer tests indicated that the taste/ flavor of the samples must be enhanced to increase their general acceptance. Consequently, modifications of the kinds and ratios of the ingredients used, especially the spices used, are suggested as new research needs. Overall, nutritionally enhanced and enriched new salad dressing formulas based on cold-pressed oils and press-cakes could be developed to offer consumers new functional foods.

**CONFLICT OF INTERESTS:** The author declares that for this article they have no actual, potential, or perceived conflict of interests.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Manuscript writing: Emin Yılmaz, planning the experiments: Emin Yılmaz and Emine Bildi, laboratory experiments: Emine Bildi and Emin Yılmaz, the idea of the study: Emin Yılmaz, designing the study: Emin Yılmaz, editing original draft: Emin Yılmaz. All authors have read and approved the final manuscript.

#### REFERENCES

AOCS (1998). Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society. 3rd edition, AOCS Press, Champaign, US.

Aydeniz, B., Güneş, O., Yılmaz, E. (2014). Physico-chemical, sensory and aromatic properties of cold press produced safflower oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91: 99-110. <https://doi.org/10.1007/s11746-013-2355-4>.

Aydoğan, A., Ok, S., Yılmaz, E. (2022). Cold-pressed milk thistle seed oil: physico-chemical properties, composition and sensory analysis. *Grasas Aceites*, 73(4): e481. <https://doi.org/10.3989/gya.0894211>

Bortnowska, G., Balejko, J., Schube, V., Tokarczyk, G., Krzeminska, N., and Mojka, K. (2014). Stability and physicochemical properties of model salad dressings prepared with pregelatinized potato starch. *Carbohydrate Polymers*, 111: 624–632. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.015>

Challacombe, C.A., Abdel, E.M., Seetharaman, K., Duizer, L.M. (2012). Influence of phenolic acid content on sensory perception of bread and crackers made from red or white wheat. *Journal of Cereal Science*, 56: 181–188. [Doi:10.1016/j.jcs.2012.03.006](https://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.03.006)

Chotimarkorn, C., Benjakul, S., Silalai, N. (2008). Antioxidative effects of rice bran extracts on refined tuna oil during storage. *Food Research International*, 41: 616–622. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.04.002>

de Melo, A.N.F., Souza, E.L., Araujo, V.B.S., Magnani, M. (2015). Stability, nutritional and sensory characteristics of French salad dressing made with mannoprotein from spent brewer's yeast. *LWT - Food Science and Technology*, 62: 771-774. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.050>

Dickinson, E., Stainsby, G. (1982). *Colloids in food*. Applied Science Publishers, London, UK, 533 p.

Diftis, N.G., Biliaderis, C.G., Kiosseoglou, V.D. (2005). Rheological properties and stability of model salad dressing emulsions prepared with a dry-heated soybean protein isolate-dextran mixture. *Food Hydrocolloids*, 19: 1025–1031. [Doi:10.1016/j.foodhyd.2005.01.003](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.01.003)

Drakos, A., and Kiosseoglou, V. (2008). Depletion flocculation effects in egg-based model salad dressing emulsions. *Food Hydrocolloids*, 22: 218–224. [Doi:10.1016/j.foodhyd.2006.11.003](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.11.003)

FDA (2012). *21 CFR 169 - Food Dressings and Flavorings*. Code of Federal Regulations (annual edition). Date: April 1, 2012.

Grilo, C.E., Costa, P.N., Gurgel, C.S.S., Beserra, A.F.M., Almeida, F.N.S., Dimenstein, R. (2014). Alpha-tocopherol and gamma-tocopherol concentration in vegetable oils. *Food Science and*

- Technology*, 34: 379–385. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612014005000031>.
- ISO (1999). International Standards Official Methods 12228:1999, Animal and Vegetable Fats and Oils-Determination of Individual and Total Sterols Contents—Gas Chromatographic Method. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Let, M.B., Jacobsen, C., and Meyer, A.S. (2007). Ascorbyl palmitate,  $\alpha$ -tocopherol, and EDTA affect lipid oxidation in fish oil enriched salad dressing differently. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 2369–2375. Doi: 10.1021/jf062675c
- Ma, Z., Boye, J.I., Fortin, J., Simpson, B.K., Prasher, S.O. (2013). Rheological, physical stability, microstructural and sensory properties of salad dressings supplemented with raw and thermally treated lentil flours. *Journal of Food Engineering*, 116: 862–872. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.024>
- Manshadi, A.D., Peighambaroust, S.H., Azadmard-Damirchi, S., and Niakosari, M. (2019). Oxidative and physical stability, rheological properties and sensory characteristics of ‘salad dressing’ samples formulated with flaxseed oil and n-OSA starch. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13: 26–33. <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9915-0>
- Mantzouridou, F., Karousioti, A., and Kiosseoglou, V. (2013). Formulation optimization of a potentially prebiotic low-in-oil oat-based salad dressing to improve *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* survival and physicochemical characteristics. *LWT - Food Science and Technology*, 53: 560–568. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.04.005>
- Martinez, I., Riscardo, M.A, Franco, J.M. (2007). Effect of salt content on the rheological properties of salad dressing-type emulsions stabilized by emulsifier blends. *Journal of Food Engineering*, 80: 1272–1281. Doi:10.1016/j.jfoodeng.2006.09.022
- Meilgaard, M., Civille, G.V, Carr, B.T. (1991). *Sensory evaluation techniques*. CRC Press, Boca raton, USA, 354 p.
- Minitab (2010). *Minitab 16.1.1 Statistical Software*. Minitab, Inc., State College, Pennsylvania, USA.
- Paraskevopoulou, D., Boskou, D., and Paraskevopoulou, A. (2007). Oxidative stability of olive oil–lemon juice salad dressings stabilized with polysaccharides. *Food Chemistry*, 101: 1197–1204. doi:10.1016/j.foodchem.2006.03.022
- Pomeranz, Y., Meloan, C.E. (1994). *Food analysis: theory and practice*. Chapman & Hall, New York, USA, 778 p.
- Razali, N.A., Sargent, S.A., Sims, C.A., Brecht, J.K., Berry, A.D., Cheng, G. (2021). Potential of postharvest coatings to maintain freshness of red-fleshed pitaya (*Hylocereus costaricensis*). *Agriculture*, 11: 892. <https://doi.org/10.3390/agriculture11090892>
- Sainsbury, J., Grypa, R., Ellingworth, J., Duodu, K.G., De Kock, H.L. (2016). The effects of antioxidants and shelf life conditions on oxidation markers in a sunflower oil salad dressing emulsion (SOSDE). *Food Chemistry*, 213: 230–237. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.081>
- TGK (2012). *Türk Gıda Kodeksi Bitki Adı İle Anılan Yağlar Tebliği (Turkish Food codex for Vegetable Oils)*, Codex No: 2012/29. T.C. Resmi Gazete, 28262, 12 Nisan 2012, Ankara.
- TSE (1989). *Turkish Standard for Salad Dressings*. Standard number: TS 7437. Turkish Standards Institute, Bakanlıklar, Ankara, Türkiye.
- Yılmaz, E., Demirci, Ş., Keskin Uslu, E. (2022). Red pepper and turmeric-flavored virgin olive oil oleogels prepared with whale spermaceti wax. *Journal of Oleo Science*, 71(2): 187–199 Doi : 10.5650/jos.ess21167

## DETERMINATION OF THE CHARACTERISTIC ATTRIBUTES OF COTTONSEED PROTEIN CONCENTRATE

Melike YÜCETEPE<sup>1</sup>, Merve AKALAN<sup>1</sup>, Kamile BAYRAK AKAY<sup>1</sup>, Mehmet Şükrü  
KARAKUŞ<sup>1</sup>, Asliye KARAASLAN<sup>2</sup>, Bülent BAŞYIĞIT<sup>1</sup>, Mehmet KARAASLAN<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Harran University, Engineering Faculty, Food Engineering Department, Şanlıurfa, Turkey

<sup>2</sup>Harran University, Vocational School, Food Processing Programme, Şanlıurfa, Turkey

Received /Geliş: 18.11.2022; Accepted / Kabul: 03.03.2023; Published online / Online baskı: 03.04.2023

Yücepe, M., Akalan, M., Bayrak Akay, K., Karakuş, M. Ş., Karaaslan, A., Başyigit, B., Karaaslan, M. (2023). Determination of the characteristic attributes of cottonseed protein concentrate. GIDA (2023) 48 (2) 483-497 doi: 10.15237/gida.GD22115

Yücepe, M., Akalan, M., Bayrak Akay, K., Karakuş, M. Ş., Karaaslan, A., Başyigit, B., Karaaslan, M. (2023). Pamuk çekirdeği protein konsantresinin karakteristik özelliklerinin belirlenmesi. GIDA (2023) 48 (2) 483-497 doi: 10.15237/gida.GD22115

### ABSTRACT

The current study focused on characteristic attributes of protein concentrate obtained from oil-free cottonseed. For this, the physicochemical properties namely moisture content, water activity, color, flowability, wettability, and protein solubility of cottonseed protein concentrate (CSPC) were investigated. Water holding capacity (WHC), oil binding capacity (OBC), foaming capacity, foam stability (10 and 30 min), emulsion activity index (EAI) and emulsion stability index (ESI) (10 and 30 min) of proteins were 2.75 g water/g protein, 2.59 g oil/g protein, 29.00%, 93.10% - 69.05%, 6.25 m<sup>2</sup>/g and 29.27-87.81 min, respectively. Bands regarding CSPC in the 45 kDa molecular weight were detected by sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) patterns. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) was used to verify the protein-specific structures. Sheet structures in the surface morphology of CSPC were dominant when scanning electron microscopy (SEM) images were investigated. Thermal gravimetric analyzer (TGA) results showed that the protein concentrate exhibited excellent stability to temperature.

**Keywords:** Cottonseed protein concentrate, techno-functional properties, SDS-PAGE, scanning electron microscopy, thermogravimetric analysis

## PAMUK ÇEKİRDEĞİ PROTEİN KONSANTRESİNİN KARAKTERİSTİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

### ÖZ

Mevcut çalışma, yağsız pamuk tohumundan elde edilen protein konsantresinin karakteristik özelliklerine odaklanmıştır. Bunun için pamuk tohumu proteini konsantresinin (CSPC) nem içeriği,

\* Corresponding author/Yazışmalardan sorumlu yazar:

✉ mehmetkaraaslan@harran.edu.tr

☎: (+90) 414 318 3669

☎: (+90) 414 318 3799

Melike Yücepe; ORCID no: 0000-0002-9581-225X

Merve Akalan; ORCID no: 0000-0002-3926-245X

Kamile Bayrak Akay; ORCID no: 0000-0001-7976-377X

Mehmet Şükrü Karakuş; ORCID no: 0000-0002-1805-8206

Asliye Karaaslan; ORCID no: 0000-0002-3834-0647

Bülent Başyigit; ORCID no: 0000-0002-6617-1836

Mehmet Karaaslan; ORCID no: 0000-0001-8097-9535

su aktivitesi, rengi, akışkanlığı, ıslanabilirliği ve protein çözünürlüğü gibi fizikokimyasal özellikleri incelenmiştir. Proteinlerin su tutma kapasitesi (WHC), yağ bağlama kapasitesi (OBC), köpük oluşturma kapasitesi, köpük stabilitesi (10 ve 30 dakika), emülsiyon aktivite indeksi (EAI) ve emülsiyon stabilite indeksi (ESI) (10 ve 30 dakika) dâhil olmak üzere tekno-fonksiyonel özellikleri sırasıyla 2.75 g su/g protein, 2.59 g yağ/g protein, %29.00, %93.10-%69.05, 6.25 m<sup>2</sup>/g ve 29.27-87.81 dk olarak bulunmuştur. 45 kDa moleküler ağırlıktaki CSPC ile ilgili bantlar, sodyum dodesil-sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) modeli ile tespit edilmiştir. Proteine özgü yapıları tespit etmek için Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) kullanılmıştır. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri incelendiğinde, CSPC'nin yüzey morfolojisindeki tabaka yapısının baskın olduğu bulunmuştur. Termal gravimetrik analizör (TGA) sonuçları, protein konsantrasyonunun sıcaklığa karşı mükemmel stabilite sergilediğini göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** Pamuk tohumu protein konsantrasyonu, tekno-fonksiyonel özellikler, SDS-PAGE, taramalı elektron mikroskobu, termogravimetrik analiz

## INTRODUCTION

The nature of living organisms cannot give permission to synthesize essential amino acids. This deficiency could be eliminated with a balanced protein diet. Therefore, people consume protein-rich foods for growth and health benefits for centuries (Day et al., 2021). With the increasing population growth, the need for nutrients also increases and alternative protein sources are needed (Hua et al., 2019). The prevalence of animal-based proteins is high compared to plant-based ones in the human diet (Sá et al., 2020). However, some drawbacks regarding animal-based proteins are reported in the scientific literature. Their high cost and undesirable effects on health could be given as examples of these problems (Constable and Bange, 2015). Therefore, it cannot be ignored that the demand for plant-based ones has increased in the industry, recently.

Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) is a perennial plant species that belongs to the systematic mallow family (*Malvaceae*) (Constable and Bange, 2015). It is one of the main agricultural products known worldwide and produced for commercial purposes (Baran, 2016; Gao et al., 2022). China, Brazil, Egypt, the USA, Mexico, India, and Pakistan are the leading producing countries (Seal et al., 2015; Kumar et al., 2022; Wei et al., 2022). The annual production in the world is approximately 25 million tons (Khan et al., 2020). Cotton production in Turkey is at a level that cannot be ignored. Cotton farming is intense in certain regions namely Çukurova, Aegean, and South-eastern Anatolia (Yılmaz et al., 2005;

Baran, 2016; Khan et al., 2020; Çullu et al., 2022). This product, which has a very high importance for the world, is widely evaluated as a raw material in different industries (Yılmaz et al., 2005; Van Atta, 2009). A high amount of waste is generated during the production of cotton-derived products. Among these by-products, seeds possess the largest proportion. The cottonseed production, which was 1.064,189 tons (2020), increased by 26.85%, and reached 1.350,000 tons (2021) in Turkey (Anonymous, 2022). The cottonseeds contain approximately 18-25% oil, and 20-25% protein (Saxena et al., 2011). In this context, cottonseeds gain importance because of their nutritional value and different value-added product groups for the economy/society could be produced by using them (Wei et al., 2017; Tepecik et al., 2022). They have been widely evaluated as raw material in the oil industry. After being used in the oil production, oil-free seeds contain a high amount of protein. Therefore, datasets on the extraction of proteins from related materials have been reported in previous studies (Ory and Flick, 1994; Tsaliki et al., 2002; Tunç and Duman, 2007; Ma et al., 2018). In addition to these, the secondary metabolite gossypol is present in cottonseed (Chenoweth et al., 2000). Studies have shown that gossypol is not suitable for human and animal consumption due to its toxic nature (Kumar et al., 2021a; Jacobs et al., 2022). The World Health Organization (WHO) has set the limit for the consumption of gossypol in cotton protein-based products as 450 ppm (Kumar et al., 2021a). Recently, studies have been carried out to reduce gossypol in cotton protein and it has been determined that the proteins obtained by alkaline

extraction method contain gossypol below the desired level (Kumar et al., 2021b).

However, the number of studies on cottonseed protein should be increased to exactly put forth protein attributes. In line with this approach, research has been continued on the extraction of cottonseed protein concentrate (CSPC) and its use as a sustainable protein supplement in recent years (He et al., 2020; Kumar et al., 2021b; Kumar et al., 2022). The current study was conducted to provide innovative datasets related to CSPC and support these previous studies. Therefore, in the present study, it was aimed to obtain CSPC by alkaline extraction method, to determine the physicochemical composition, investigate the techno-functional properties, molecular weights with SDS-PAGE, evaluate certain groups with Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), morphological structure with scanning electron microscopy (SEM) and thermal behaviour by thermal gravimetric analyzer (TGA) of proteins.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Cottonseeds were supplied from a local market in Şanlıurfa province of Turkey. The fibers of the seeds were allocated by treatment with sulfuric acid. The cleaned seeds were ground, then the oil was removed with hexane (1:10, w/v). Defatted seeds were kept at +4 °C until protein extraction. All chemicals were obtained either from Sigma-Aldrich or Merck and were standard analytic grade.

### Protein extraction

The method reported by Yüçetepe et al. (2021) was applied for protein extraction (Yüçetepe et al., 2021). Briefly, 1 gram cottonseed was mixed with 0.12 mol/L NaOH at a ratio of 1:10 (w/v). Samples were held at 37 °C in a water bath for 1 h occasionally mixing. At the end of the period, they were centrifuged at 1420  $\times g$  for 15 min at +4 °C and the supernatant was collected. The pH of the supernatant was adjusted to 4.5 with HCl (0.1 mol/L). After samples were centrifuged at 1420  $\times g$  for 15 min at 4 °C, the precipitate was dried using a freeze dryer (Armfield SB4, Ringwood,

England). The resulting samples were stored in a refrigerator at +4 °C until analyses.

## Analyses

### Moisture content

The moisture content of the samples was calculated gravimetrically. One g sample was left in an oven at 105 °C for 24 hours until it reached a constant weight. Moisture content was calculated by proportioning the weights noted before and after the drying process (Samuelsson et al., 2006).

### Total mineral content

To determine the total mineral content of the samples, 1-4 g of the samples were weighed and incinerated for 16 h in a 600 °C muffle furnace until they reached a constant weight. The total amount of mineral matter was calculated by dividing the initial and final weights by each other (Liu, 2019).

### Oil content

The hexane extraction was carried out with minor modifications (Koubaa et al., 2017). Ten g ground samples were mixed with 100 mL n-hexane in a glass bottle. Solutions were left in the shaker at 150 rpm for 5 h. At the end of the period, the samples were centrifuged at 1420  $\times g$  for 10 min. The supernatant was evaporated with a rotary evaporator system at 55 °C. The amount of oil obtained at the end of the extraction was noted and the oil content (%) was calculated according to Equation (1) below:

$$\text{Oil content (\%)} = \frac{\text{oil weight}}{\text{total sample weight}} \times 100 \quad (1)$$

### Protein content

The protein content of the cottonseed and CSPC was defined by using an organic element analyzer (FlashSmart Elemental, ThermoFisher Scientific, USA). CHNS reactor temperature of 950 °C, GC oven temperature of 65 °C, helium carrier flow of 140 mL/min, helium reference flow of 100 mL/min, oxygen flow of 250 mL/min, oxygen injection time of 5 s, sample delay of 12 s, and total run time of less than 600 s were implemented as fixed parameters for analysis. The protein

content was calculated using a conversion factor of 6.25 (Nx6.25) (Başığit et al., 2020a).

### Water activity

Water activity device (model 4TE, Aqualab, Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA) was used for definition of water activity according to the operating manuals (Turchiuli et al., 2005).

### Color

Color was defined by using a chroma meter (Color Quest, Hunter Associates Laboratory, Inc., Reston, VA 22,090, USA) (Duangmal et al., 2008).

### Hausner ratio and Carr index

For the Hausner ratio and Carr index analyses, the bulk and tapped density values of the proteins were used. Briefly, 5 g CSPC was placed in a 25 mL measuring cylinder and the volume was recorded. The bulk density was defined by dividing the sample weight by the measured volume. For the tapped density, the measuring cylinder was struck by hand 200-hold on flat ground to a constant volume. The tapped density was calculated by the weight of the samples to the final volume ratio (Turchiuli et al., 2005). Hausner ratio and Carr index values calculated using by following Equations (Eqs. 2 and 3):

$$\text{Hausner ratio} = \frac{\text{tapped density}}{\text{bulk density}} \quad (2)$$

$$\text{Carr index} = \frac{\text{tapped density} - \text{bulk density}}{\text{tapped density}} \times 100 \quad (3)$$

### Wettability

One gram sample was transferred manually to 100 mL distilled water (20 °C) in the beaker and the time required for the samples to completely leave the aqueous phase surface was recorded (Turchiuli et al., 2005).

### Protein solubility

Protein solubility was achieved by applying some modifications according to a previous study (Xia et al., 2023). CSPCs were prepared at 15 mg/mL and the pH was adjusted to 7.0. The solution was stirred in a shaker at 150 rpm for 1 h. At the end of the time, the sample was centrifuged at 1420 x

g for 10 min. The Lowry method was used to detect protein in the supernatant. Protein solubility was calculated using the following Equation (Eq 4):

$$\text{Protein solubility (\%)} = \frac{\text{Protein content of the supernatant}}{\text{Total protein of the original sample}} * 100 \quad (4)$$

### Water holding and oil binding capacity

To calculate the water holding (WHC) and oil binding capacities (OBC) of the samples, 1 gram sample was mixed with 10 mL water (for WHC) or 10 mL corn oil (for OBC) in a centrifuge tube. The samples were vortexed manually every 15 min at room temperature. At the end of the period, the tubes were centrifuged for 15 min at 1420 x g at 24 °C. The supernatant was filtered, and the tubes were left for 30 minutes at a 45° angle. The final weights of the samples were noted. WHC and OBC were calculated by the ratio of the final weights of the samples to their initial weights (Cho et al., 2004).

### Foaming properties

The foaming activity and stability were achieved by protein solutions at a concentration of 1 g/100 mL (pH 7.0). For this, 50 mL solution was transferred into a 100 mL measuring cylinder and homogenized at 12000 rpm for 1 min. Volumes were noted before and after the homogenization to use in the calculation of foaming activity and stability values. The foaming activity and stability were calculated according to the following Equations (Eqs 5 and 6):

$$\text{Foaming capacity (\%)} = \frac{(V_a - V_b)}{V_b} * 100 \quad (5)$$

$$\text{Foaming Stability (\%)} = \frac{V_r}{V_a} * 100 \quad (6)$$

Where, V<sub>b</sub> is the volume of solution before homogenization, V<sub>a</sub> is the volume of solution after homogenization, and V<sub>r</sub> is volume of solution at related time (Li et al., 2021).

### Emulsifying properties

The protein sample was prepared with 10 mM potassium buffer (pH 7.0) at a concentration of 0.5 g/100 mL. To form oil-in-water emulsions,

the solution and corn oil were mixed at a ratio of 3:1 (v/v) and homogenized with Ultra-Turrax at 12000 rpm for 1 min. After homogenization, 50  $\mu$ L emulsion was added to the tubes containing 5 ml SDS (0.1%, v/v). The absorbance of solution was read at 500 nm ( $A_1$ ). The same procedure was repeated at the 10<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> min and the emulsion features were calculated by using the Equations (Eqs 7 and 8) below:

$$\text{Emulsifying activity (EAI) (m}^2\text{/g)} = \frac{2 \cdot 2.303 \cdot A_1 \cdot DF}{C \cdot \varphi \cdot \theta \cdot 1000} \quad (7)$$

$$\text{Emulsifying stability (ESI) (min)} = \frac{A_1}{A_1 - A_r} \cdot t \quad (8)$$

Where,  $A_1$  is absorbance of after homogenization, DF is dilution factor, C is protein concentration,  $\varphi$  is optical path,  $\theta$  is volume fraction of oil,  $A_r$  is absorbance at related time (10 or 30 min), and t is 10 or 30 min (Lee et al., 2021).

#### Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

The CSPC was dissolved in sample buffer containing 0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl and 10% (w/v) SDS at a concentration of 10 mg/mL (Ata et al., 2022). The prepared samples were stirred with sample loading buffer (5% Tris-HCl (pH 6.8), 4% glycerol, 0.8% SDS, 0.02% bromphenol blue and 2%  $\beta$ -mercaptoethanol) at a ratio of 1:1 (v/v). SDS-PAGE analysis was performed according to the Laemmli (1970) by using 12% separation gel and 5% stacking gel (Laemmli, 1970). Samples were kept at 95  $^{\circ}$ C for 10 min before being placed in gel lanes. A standard protein mixture (11-190 kDa) was utilized as the molecular weight marker. A 0.1% Coomassie Brilliant Blue G-250 was applied to stain the electrophoresis gel.

#### FTIR analysis

For the FTIR analysis, a FTIR spectrophotometer (IRTracer-100, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) was used. The transmittance spectra of protein concentrate were detected in the wavelength 4000 to 500  $\text{cm}^{-1}$  by applying the data range of 1  $\text{cm}^{-1}$  at ambient temperature (Andrade et al., 2019).

#### SEM analysis

The morphological structures of the sample coated with palladium before analysis were monitored using a SEM (ZEISS Sigma 300 Field Emission SEM, Oberkochen, Germany) at 30 kV (Ortiz et al., 2009).

#### Thermal analysis

TGA (DTG-60H 60H, Shimadzu) were used to detect the thermal behavior of the protein sample. The sample (2.5-3 mg) was weight and placed in the corresponding part of the device. The analysis was carried out at a heating rate of 10 K/min, in an inert atmosphere ( $\text{N}_2$ ), between 30  $^{\circ}$ C and 1000  $^{\circ}$ C (Başyigit et al., 2022a).

#### Statistical analysis

All analyses were performed in three replications. The graphics were drawn using the OriginPro 2021b (Origin Lab Inc.).

## RESULTS AND DISCUSSIONS

#### Chemical composition of cottonseed and cottonseed protein concentrate

The chemical composition of cottonseed and CSPC was investigated, and the results are presented in Table 1. The content of moisture and minerals was found to be 5.72% and 5.12%, respectively. The oil content was 16.85% in the seed. As for protein content, the seed contained 17.09% protein. The standard values for CSPC are <8% for moisture content, <0.35% for total mineral substance content, and >46% for protein content (Kumar et al., 2021b). The values (moisture content: 3.46%, mineral content: 4.92%, protein content: 65.72%) obtained for CSPC in the present study were in line with the standard. Additionally, the oil content in CSPC was detected as 2.02%.

Table 1. Biochemical composition of cottonseed and cottonseed protein concentrate

Analysis	Cottonseed	Cottonseed protein concentrate
Moisture content (%)	5.72 $\pm$ 0.04	3.46 $\pm$ 0.16
Ash content (%)	5.12 $\pm$ 0.17	4.92 $\pm$ 0.21
Protein content (%)	17.09 $\pm$ 0.00	65.72 $\pm$ 0.00
Oil content (%)	16.85 $\pm$ 0.26	2.02 $\pm$ 0.04



### Physicochemical properties of cottonseed protein concentrate

The physicochemical features of CSPC are given in Table 2. The water activity in proteins was 0.35. This means that the unbound water was evaporated at the desired level during drying process. Also, this result was supported by the moisture content of proteins. The lower water activity indicates high stability (the safe-zone category) in CSPC. In other words, proteins are stable against biological and microbiological deterioration (Mathlouthi, 2021). Color is one of the quality parameters playing an important role in consumer preferences.  $L^*$  (lightness-darkness),  $a^*$  (red-green), and  $b^*$  (yellow-blue) values of CSPC were 54.83, 6.77 and 25.04, respectively. The  $L^*$  values for other plant seeds-based proteins including canola, hemp and flaxseed were reported as 26.82, 29.48 and 44.89, respectively (Teh et al., 2014). The darker color for CSPC could be ascribed to raw material type. Also, this phenomenon could be associated with the extraction conditions (Das purkayastha et al., 2015). Positive  $b^*$  value was related to the yellowish color of CSPC. Hausner ratio and Carr index values are parameters that give information about the flow properties and stickiness of samples (Calafato and Picó, 2006). Both are affected by moisture content (Goula et al., 2004). If these values are not at the desired level, the deterioration of the products occurs faster due to the high level of oxygen molecule between the grains (Koç et al., 2011). The Hausner ratio and Carr index values of CSPC were 1.34 and 34.31, respectively (Table 2). Hausner ratio of 1.34 is determinative of reasonable fluency characteristic (Calafato and Picó, 2006). In other words, CSPC was acceptable in terms of flow properties and stickiness (Patil et al., 2013). Wettability is a parameter that shows the settling time of the powder samples by adding the water to their structure. The wettability value of CSPC was found to be 7.79 sec. The low wettability value may be associated with the high hydrophilic groups in protein structure (Turchiuli et al., 2005).

### Protein solubility

Protein solubility affects the texture, color, emulsifying properties, foaming ability and

sensory properties of food products. Therefore, it is one of the most important functions of proteins (Haque et al., 2016). The protein solubility was discussed in this part and results are presented in Table 2. This value for CSPC was 28.75%. The solubility value of CSPC varies in the range of 20-45% at pH 7.0 (Ma et al., 2018). The lower solubility could be related to the pH value. This approach was supported by a previous study. Tsaliki et al. (2002) examined the effect of pH-shifting on CSPC solubility. The authors reported that the solubility increased in parallel with the increase in pH and also, soluble protein content was between 0-20% at pH 7 (Tsaliki et al., 2002). As well as pH, protein solubility depends on temperature, ionic strength, protein structure, and protein concentration (Wang et al., 2019). The results clearly showed that after the proteins are dissolved in alkaline conditions, incorporation into food systems seems to be a more logical approach.

Table 2. Physicochemical properties of cottonseed protein concentrate

Analysis	Cottonseed protein concentrate
Water activity	0.35±0.00
Color ( $L^*$ , $a^*$ , $b^*$ )	54.83±1.19
	6.77±0.93
	25.04±0.19
Carr index	34.31±1.39
Hausner ratio	1.34±0.01
Wettability(sec)	7.79±0.33
Solubility (pH 7.0) (%)	28.75±0.95

### Techno-functional properties of cottonseed protein concentrate

WHC/OBC, foaming activity/stability, and emulsifying activity/stability of proteins were performed, and the results are presented in Table 3. WHC and OBC are associated with hydrophilic and hydrophobic groups in powder products. (Wu et al., 2009). Also, both are directly related to the nature of protein (Hadidi et al., 2021). In our study, WHC value was found to be 2.75 g water/g protein. This feature, which is related to the functionality of proteins, was 1.77 g water/g protein for CSPC in a previous study (Delgado et al., 2019). The rehydration rate of samples

obtained in the current study was superior than that of the previous finding (Haque et al., 2016). As for OBC, proteins exhibiting superior behavior in terms of the relevant property are effective in preserving the flavor and stability of the oil in emulsified foods (Özdemir et al., 2022). OBC of CSPC was 2.59 g oil/g protein. Delgado et al. (2019) reported lower values for CSPC in terms of OBC (Delgado et al., 2019). These differences could be related to the nonpolar side chains and different conformations in the proteins (Khalid et al., 2003). The nonpolar side chains and different conformations might be affected by extraction methods and environmental conditions in which the raw materials are grown.

Foam is defined as a structure formed by a continuous phase consisting of liquid or solid surrounding the air. While the proteins form foam, air bubbles and liquid phase settle at the interface. They prevent air bubbles from coming together and play an effective role in the foam formation. Foam ability of proteins plays an important role in the production of foamy food (Were et al., 1997). They are used especially in the bakery industry as foaming agents (Muthukumaran et al., 2008). Foam capacity and foam stability are the most commonly used parameters when examining the foaming properties of proteins (Yavuz and Özçelik, 2016). Foaming capacity and foaming stability (10<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> min) values (pH 7.0) of CSPC were found to be 29.00%, 93.10% and 69.05%, respectively (Table 3). The similar results were reported by a previous study (Tsaliki et al., 2002).

The emulsion capability of proteins is a desirable feature in the food industry, especially in areas such as emulsified meat products (Özdemir et al., 2022). Emulsion abilities vary according to surface amphiphilicity of proteins, amount of soluble/insoluble protein content and other substances (impurities) (Zielińska et al., 2018). The EAI was detected as 6.25 m<sup>2</sup>/g in CSPC (Table 3). Lower EAI could be attributed to the undesired protein solubility (Table 3). ESI at 10<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> min was determined to be 29.27 and 87.81 min, respectively. Ma et al. (2018) also investigated EAI (13.3-23.1 m<sup>2</sup>/g) and ESI (17.3-29.6 min, at 10<sup>th</sup> min) in CSPC (Ma et al., 2018). In addition to these, the high ESI value at the 30<sup>th</sup> min might be interpreted as the dissolution of some protein and the improvement of the emulsion stability property due to protein passing to the oil-water (Delgado et al., 2019). The techno-functional properties of proteins such as emulsion behavior and foam formation are important features that support each other (Yavuz and Özçelik, 2016). In the food industry, the stability of the product is increased, and the shelf life is extended by using proteins with high emulsion capacity in the production of emulsified foods such as sausage and mayonnaise (Jideani, 2011; Mirzanajafi-Zanjani et al., 2019). In addition, the use of plant proteins in the daily diet for the nutritional needs of the increasing population comes to the fore (Fresco, 2009). For this reason, it is predicted that the use of plant proteins in products such as protein-rich protein bars and protein drinks will become widespread.

Table 3. Techno-functional properties of fruit seed protein concentrate

Analysis	Cottonseed protein concentrate
Water holding capacity (g water/g protein)	2.75±0.00
Oil binding capacity (g oil/ g protein b)	2.59±0.01
Foaming capacity (%)	29.00±1.41
Foaming stability (%) (10 <sup>th</sup> min)	93.10±0.34
Foaming stability (%) (30 <sup>th</sup> min)	69.05±3.37
Emulsifying activity EAI (m <sup>2</sup> /g)	6.25±0.09
Emulsifying stability (ESI10) (min)	29.27±0.28
Emulsifying stability (ESI30) (min)	87.81±0.86

### Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Molecular weight distribution of CSPC was confirmed by SDS-PAGE analysis and the related images are shown in Fig 1A. Two intense specific bands were detected in the 45 kDa molecular weight band. These two bands are the main components of cottonseed proteins (King, 1980). When the CSPC molecular weight fractions in the literature were compared, the two bands were found to overlap (Ma et al., 2018; Delgado et al., 2019). Smaller thin bands were reported in the SDS-PAGE images regarding the CSPC in the previous band (Ma et al., 2018). However, these bands were not observed in our study. The differences could be attributed to the deformation level of disulfide bonds in the proteins depending on extraction methods (Ma et al., 2018). Also, this phenomenon could be ascribed to low protein solubility or solution used to dissolve proteins in the analysis phase.

### FTIR analysis

FTIR analysis is based on the vibrational movements of atoms between molecules. The vibrations forming with the modify of the dipole momentum of the molecules, seem like peaks in the spectrum. Therefore, the FTIR spectrum of a protein is formed as a result of vibrational modes originating from functional groups (peptide

bonds, amino acid side chains) in the protein (Haris, 2013).

The absorption bands for CSPC are presented in Fig 1B. The characteristic structures including Amide A (3000-3500  $\text{cm}^{-1}$ ), Amide B (2850-2980  $\text{cm}^{-1}$ ) (Ebrahimi et al., 2016), Amide I (1700-1600  $\text{cm}^{-1}$ ), Amide II (1600-1500  $\text{cm}^{-1}$ ), and Amide III (1300-1200  $\text{cm}^{-1}$ ) (Kong and Yu, 2007) were exactly observed in the Fig 1B. Amide A and Amide B bands associated with symmetrical stretching of C-H and  $\text{NH}_2$  groups appeared in the wavelengths of 3276  $\text{cm}^{-1}$  and 2985  $\text{cm}^{-1}$ , respectively. The bands representing Amide I related to the C=O stretching vibration were observed in the wavelengths of 1649  $\text{cm}^{-1}$ . The amide II band is important in protein structure analysis and arises from vibrations of the N-H bond at a wavelength of 1522  $\text{cm}^{-1}$ . Both C=O and N-H bonds directly give an idea about the secondary structure of a protein (Cheng et al., 2017; Liu et al., 2018). Amide III was represented in 1212  $\text{cm}^{-1}$  and the spectrum in amide III is governed by the C-N and N-H stretch (Aewsiri et al., 2009; Yüceetepe et al., 2021). The presence of these specific groups indicated that the protein extraction process was successful. Also, the confirmation was showed in the SDS-PAGE part (Fig 1A).

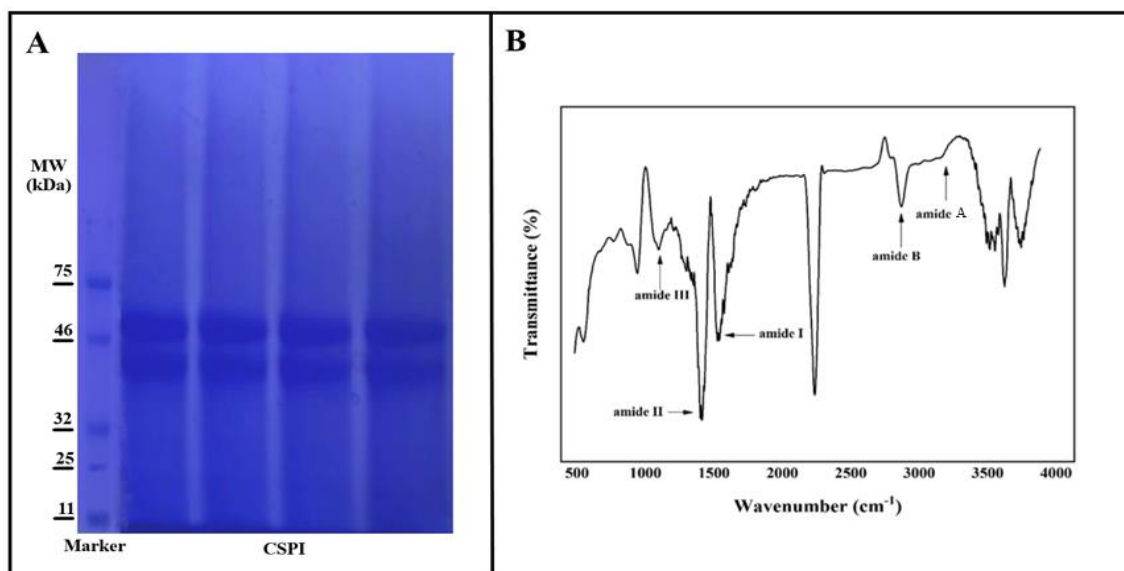


Figure 1. SDS-PAGE pattern (A) and FTIR spectrum (B) of cottonseed protein concentrate

### Morphological structure

Surface morphology of CSPC was identified by SEM and the related appearance is given in Fig 2A. Protein sample possessed a relatively smooth surface. Moreover, the sample was in the form of hard sheet-like structure and these sheets were multi-layered forms. This phenomenon could be explained by the interaction of protein molecules because of long processing time in the freeze-drying method. (Özdemir et al., 2022). Similar images were observed in protein samples dried by freeze-drying system, *e.g.*, the sesame bran protein (Özdemir et al., 2022), sour cherry seed protein (Başyigit et al., 2022a), peanut protein (Liu et al., 2019), moringa stenopetala seed protein (Kebede et al., 2019), soybean protein (Zhao et al., 2015), and rice dreg protein (Zhao et al., 2013).

### Thermal analysis

Thermal analysis is important for the changes that occur with processes such as drying, heat exchange and cooking of foods (Batista et al., 2013). Generally, thermal processes are widely used in packaged food products. Therefore, it is desirable that the ingredients in related foods possess high temperature stability. In this context, TGA is conducted to put forth the dataset

regarding the thermal behavior of materials. With this analysis method, the mass loss in the relevant sample depending on the temperature is revealed. TGA curve of CSPC is presented in Fig 2B. The thermal decomposition of proteins occurred in three main phases in the temperature range of 30–1000 °C. The first mass loss in the protein concentrate was approximately 6% at temperatures below 200 °C. This event might be ascribed to the loss of moisture (Başyigit et al., 2020; Başyigit et al., 2021). A major degradation was observed at phase two (200–600 °C). A mass loss of approximately 83% was reported in this phase. Thermal changes occurring in this range may be associated with the degradation or decomposition of polypeptide chains in the protein (Mshayisa et al., 2021). Similar curves for plant-based proteins were noted in previous studies (Yu et al., 2015; Timilsena et al., 2016; Başyigit et al., 2022a; Başyigit et al., 2022b). In conclusion, TGA analysis showed that CSPC possessed thermal stability up to 600 °C. Considering the temperatures used in food production systems in industry, this temperature level will provide significant advantages to proteins.

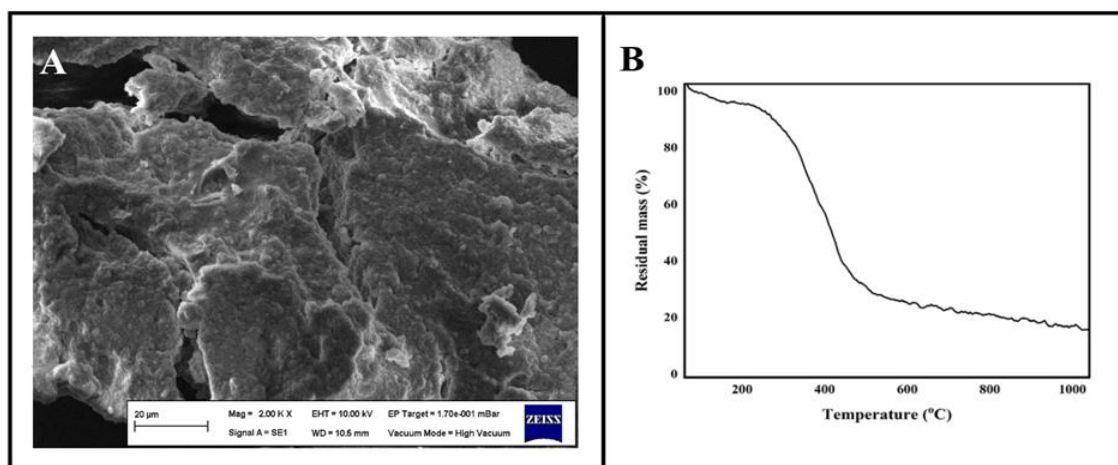


Figure 2. SEM image (A) and TGA curve (B) of cottonseed protein concentrate

### CONCLUSIONS

In recent years, there has been an undeniable trend towards the use of plant proteins in different sectors. However, the resources in the market do not meet the demands sufficiently and

it is predicted that this problem will increase in the coming years. Therefore, extracting proteins from suitable sources and placing them on the market are among issues of global importance. In this context, different perspectives to the literature

and industry were presented with the data obtained from this study. Moreover, this study has guided the evaluation of different food processing by-products as a source of protein. However, further studies are needed to clearly see the effectiveness of cottonseed proteins compared to their counterparts. Therefore, they could be used as an emulsifier and/or ingredient in the food formulations in future applications.

#### ACKNOWLEDGMENTS

Author Melike YÜCETEPE is supported by the Council of Higher Education (CoHE) with 100/2000 Ph.D. scholarship and Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK; 2211-A) Ph.D. scholarship program.

#### CONTRIBUTIONS OF ALL AUTHORS

Melike Yüce-tepe: Formal analysis, Data curation, Investigation, Methodology, Software, Writing – original draft, Writing – review & editing. Merve Akalan: Formal analysis, Investigation, Methodology, Resources, Writing – original draft, Writing – review & editing. Kamile Bayrak Akay: Investigation, Writing – original draft, Writing – review & editing. Mehmet Şükrü Karakuş: Investigation, Software, Writing – original draft, Writing – review & editing. Asliye Karaaslan: Methodology, Visualization, Writing – original draft. Bülent Başığit: Formal analysis, Investigation, Software, Writing – original draft, Writing – review & editing. Mehmet Karaaslan: Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Investigation, Resources, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing.

#### CONFLICTS OF INTEREST

The authors have declared no conflicts of interest for this article.

#### REFERENCES

Aewsiri, T., Benjakul, S., Visessanguan, W. (2009). Functional properties of gelatin from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin as affected by bleaching using hydrogen peroxide. *Food Chemistry*, 115(1), 243-249, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.012>.

Andrade, J., Pereira, C. G., de Almeida Junior, J. C., Viana, C. C. R., de Oliveira Neves, L. N., da Silva, P. H. F., dos Anjos, V. D. C. (2019). FTIR-ATR determination of protein content to evaluate whey protein concentrate adulteration. *LWT-Food Science and Technology*, 99, 166-172, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.079>.

Anonymous. (2022). Turkey Statistical Institution (TUİK), Crop Production Statistics. *Access date:10.10.2022*.

Ata, O., Kumcuoglu, S., Tavman, S. (2022). Effects of sonication on the extraction of pepsin-soluble collagens from lamb feet and product characterization. *LWT-Food Science and Technology*, 159, 113253. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113253>.

Baran, M., F. (2016). Energy efficiency analysis of cotton production in Turkey: A case study for Adiyaman province. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 16(2), 229-233, <https://doi.org/10.5829/idosi.ajeaes.2016.16.2.12857>.

Başığit, B., Sağlam, H., Kandemir, Ş., Karaaslan, A., Karaaslan, M. (2020a). Microencapsulation of sour cherry oil by spray drying: Evaluation of physical morphology, thermal properties, storage stability, and antimicrobial activity. *Powder Technology*, 364, 654-663, <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2020.02.035>.

Başığit, B., Sağlam, H., Köroğlu, K., Karaaslan, M. (2020b). Compositional analysis, biological activity, and food protecting ability of ethanolic extract of *Quercus infectoria* gall. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(9), e14692, <https://doi.org/10.1111/jfpp.14692>.

Başığit, B., Görgüç, A., Gençdağ, E., Cansu, Ü., Yılmaz, F. M., Karaaslan, M. (2022a). Functional characterization of high-yield plant protein powder valorized from de-oiled sour cherry seed using microwave-assisted enzymatic extraction followed by spray-and freeze-drying. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-15, <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03225-2>.

Başığit, B., Yüce-tepe, M., Akyar, G., Karaaslan, A., Karaaslan, M. (2022b). Enhancing thermal and emulsifying resilience of pomegranate fruit

- protein with gum Arabic conjugation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 215, 112516, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112516>.
- Başıyigit, B., Yüce-tepe, M., Karaaslan, A., Karaaslan, M. (2021). High efficiency microencapsulation of extra virgin olive oil (EVOO) with novel carrier agents: Fruit proteins. *Materials Today Communications*, 28, 102618, <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2021.102618>.
- Batista, A. P., Gouveia, L., Bandarra, N. M., Franco, J. M., Raymundo, A. (2013). Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research*, 2(2), 164-173, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.01.004>.
- Calafato, N. R., Picó, G. (2006). Griseofulvin and ketoconazole solubilization by bile salts studied using fluorescence spectroscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 47(2), 198-204, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.01.007>.
- Cheng, H. N., Ford, C., Dowd, M. K., He, Z. (2017). Effects of phosphorus-containing additives on soy and cottonseed protein as wood adhesives. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 77, 51-57, <https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2017.03.008>.
- Chenoweth, P. J., Chase Jr, C. C., Risco, C. A., Larsen, R. E. (2000). Characterization of gossypol-induced sperm abnormalities in bulls. *Theriogenology*, 53(5), 1193-1203, [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00264-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00264-8).
- Cho, S. M., Kwak, K. S., Park, D. C., Gu, Y. S., Ji, C. I., Jang, D. H., Lee, Y. B., Kim, S. (2004). Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (*Isurus oxyrinchus*) cartilage. *Food Hydrocolloids*, 18(4), 573-579, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2003.10.001>.
- Constable, G. A., Bange, M. P. (2015). The yield potential of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Field Crops Research*, 182, 98-106, <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2015.07.017>.
- Çullu, M. A., Teke, M., Aydoğdu, M. H., Günal, H. (2022). Effects of subsidy and regulation policy on soil and water resources of cotton planted lands in Harran Plain, Turkey. *Land Use Policy*, 120, 106288, <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2022.106288>.
- Das purkayastha, M., Dutta, G., Barthakur, A., Mahanta, C. L. (2015). Tackling correlated responses during process optimisation of rapeseed meal protein extraction. *Food Chemistry*, 170, 62-73, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.053>.
- Day, L., Cakebread, J. A., Loveday, S. M. (2021). Food proteins from animals and plants: Differences in the nutritional and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.020>.
- Delgado, E., Valverde-Quiroz, L., Lopez, D., Cooke, P., Valles-Rosales, D., Flores, N. (2019). Characterization of soluble glandless cottonseed meal proteins based on electrophoresis, functional properties, and microscopic structure. *Journal of Food Science*, 84(10), 2820-2830, <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14770>.
- Duangmal, K., Saicheua, B., Sueeprasan, S. (2008). Colour evaluation of freeze-dried roselle extract as a natural food colorant in a model system of a drink. *LWT-Food Science and Technology*, 41(8), 1437-1445, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.08.014>.
- Ebrahimi, S. E., Koocheki, A., Milani, E., Mohebbi, M. (2016). Interactions between *Lepidium perfoliatum* seed gum-grass pea (*Lathyrus sativus*) protein isolate in composite biodegradable film. *Food Hydrocolloids*, 54, 302-314, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.10.020>.
- Fresco, L. O. (2009). Challenges for food system adaptation today and tomorrow. *Environmental Science & Policy*, 12(4), 378-385, <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2008.11.001>.
- Gao, W., Zhu, X., Ding, L., Xu, B., Gao, Y., Cheng, Y., Hu, Y. (2022). Development of the engineered “glanded plant and glandless seed” cotton. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 5, 100130, <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2022.100130>.

- Goula, A. M., Adamopoulos, K. G., & Kazakis, N. A. (2004). Influence of spray drying conditions on tomato powder properties. *Drying Technology*, 22(5), 1129-1151, <https://doi.org/10.1081/DRT-120038584>.
- Hadidi, M., Ibarz, A., & Pouramin, S. (2021). Optimization of extraction and deamidation of edible protein from evening primrose (*Oenothera biennis* L.) oil processing by-products and its effect on structural and techno-functional properties. *Food Chemistry*, 334, 127613, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127613>.
- Haque, M. A., Timilsena, Y. P., Adhikari, B. (2016). Food proteins, structure, and function. *Reference Module in Food Science*, 1A8, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.03057-2>.
- Haris, P. I. (2013). Probing protein-protein interaction in biomembranes using Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828(10), 2265-2271, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.04.008>.
- He, Z., Zhang, D., Olanya, O. M. (2020). Antioxidant activities of the water-soluble fractions of glandless and glanded cottonseed protein. *Food Chemistry*, 325, 126907, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126907>.
- Hua, K., Cobcroft, J. M., Cole, A., Condon, K., Jerry, D. R., Mangott, A., Strugnell, J. M. (2019). The future of aquatic protein: implications for protein sources in aquaculture diets. *One Earth*, 1(3), 316-329, <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2019.10.018>.
- Jacobs, J. L., Davis, D. B., Mullenix, M. K., Koebernick, J. C., Justice, S. M., Dillard, S. L., Stewart Jr, R. L. (2022). Cottonseed characteristics related to beef cattle consumption: Protein degradability, digestibility, and gossypol content. *Applied Animal Science*, 38(5), 409-416, <https://doi.org/10.15232/aas.2022-02304>.
- Jideani, V. A. (2011). Functional properties of soybean food ingredients in food systems. *Soybean-Biochemistry, Chemistry and Physiology*, 345-366.
- Kebede, T. G., Dube, S., & Nindi, M. M. (2019). Characterisation of water-soluble protein powder and optimisation of process parameters for the removal of sulphonamides from wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(21), 21450-21462, <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05272-1>.
- Khalid, E. K., Babiker, E. E., Tinay, A. E. (2003). Solubility and functional properties of sesame seed proteins as influenced by pH and/or salt concentration. *Food Chemistry*, 82(3), 361-366, [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00555-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00555-1).
- Khan, M. A., Wahid, A., Ahmad, M., Tahir, M. T., Ahmed, M., Ahmad, S., Hasanuzzaman, M. (2020). World cotton production and consumption: An overview. *Cotton Production and Uses*, 1-7, [https://doi.org/10.1007/978-981-15-1472-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-15-1472-2_1).
- King, E. E. (1980). Compositional relationships among electrophoretic isolates from cottonseed protein bodies. *Phytochemistry*, 19(8), 1647-1651, [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83786-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83786-3).
- Koç, M., Koç, B., Yılmaz, M. S., Ertekin, F. K., Susyal, G., Bağdathoğlu, N. (2011). Physicochemical characterization of whole egg powder microencapsulated by spray drying. *Drying Technology*, 29(7), 780-788, <https://doi.org/10.1080/07373937.2010.538820>.
- Kong, J., Yu, S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(8), 549-559, <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x>.
- Koubaa, M., Mhemdi, H., Barba, F. J., Angelotti, A., Bouaziz, F., Chaabouni, S. E., Vorobiev, E. (2017). Seed oil extraction from red prickly pear using hexane and supercritical CO<sub>2</sub>: assessment of phenolic compound composition, antioxidant and antibacterial activities. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 97(2), 613-620, <https://doi.org/10.1002/jsfa.7774>.

- Kumar, M., Hasan, M., Choyal, P., Tomar, M., Gupta, O. P., Sasi, M., Kennedy, J. F. (2022). Cottonseed feedstock as a source of plant-based protein and bioactive peptides: Evidence based on biofunctionalities and industrial applications. *Food Hydrocolloids*, 107776, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107776>.
- Kumar, M., Potkule, J., Patil, S., Saxena, S., Patil, P. G., Mageshwaran, V., Kennedy, J. F. (2021b). Extraction of ultra-low gossypol protein from cottonseed: Characterization based on antioxidant activity, structural morphology and functional group analysis. *LWT–Food Science and Technology*, 140, 110692, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110692>.
- Kumar, M., Tomar, M., Punia, S., Grasso, S., Arrutia, F., Choudhary, J., Amarowicz, R. (2021a). Cottonseed: A sustainable contributor to global protein requirements. *Trends in Food Science & Technology*, 111, 100-113, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.058>.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685, <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- Lee, H. W., Lu, Y., Zhang, Y., Fu, C., Huang, D. (2021). Physicochemical and functional properties of red lentil protein isolates from three origins at different pH. *Food Chemistry*, 358, 129749, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129749>.
- Li, X., Shi, J., Scanlon, M., Xue, S. J., Lu, J. (2021). Effects of pretreatments on physicochemical and structural properties of proteins isolated from canola seeds after oil extraction by supercritical-CO<sub>2</sub> process. *LWT–Food Science and Technology*, 137, 110415, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110415>.
- Liu, K. (2019). Effects of sample size, dry ashing temperature and duration on determination of ash content in algae and other biomass. *Algal Research*, 40, 101486, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101486>.
- Liu, M., Wang, Y., Wu, Y., He, Z., Wan, H. (2018). “Greener” adhesives composed of urea-formaldehyde resin and cottonseed meal for wood-based composites. *Journal of Cleaner Production*, 187, 361-371, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.03.239>.
- Ma, M., Ren, Y., Xie, W., Zhou, D., Tang, S., Kuang, M., Du, S. K. (2018). Physicochemical and functional properties of protein isolate obtained from cottonseed meal. *Food Chemistry*, 240, 856-862, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.030>.
- Mathlouthi, M. (2001). Water content, water activity, water structure and the stability of foodstuffs. *Food Control*, 12(7), 409-417, [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(01\)00032-9](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(01)00032-9).
- Mirzanajafi-Zanjani, M., Yousefi, M., Ehsani, A. (2019). Challenges and approaches for production of a healthy and functional mayonnaise sauce. *Food Science & Nutrition*, 7(8), 2471-2484, <https://doi.org/10.1002/fsn3.1132>.
- Mshayisa, V. V., Van Wyk, J., Zozo, B., Rodríguez, S. D. (2021). Structural properties of native and conjugated black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae protein via Maillard reaction and classification by SIMCA. *Heliyon*, 7(6), e07242, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07242>.
- Muthukumaran, A., Ratti, C., & Raghavan, V. G. (2008). Foam-mat freeze drying of egg white and mathematical modeling Part I optimization of egg white foam stability. *Drying Technology*, 26(4), 508-512, <https://doi.org/10.1080/07373930801929581>.
- Ortiz, S. E. M., Mauri, A., Monterrey-Quintero, E. S., Trindade, M. A., Santana, A. S., Favaro-Trindade, C. S. (2009). Production and properties of casein hydrolysate microencapsulated by spray drying with soybean protein isolate. *LWT–Food Science and Technology*, 42(5), 919-923, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.12.004>.
- Ory, R. L., Flick, G. J. (1994). Peanut and cottonseed proteins for food uses. In *New and developing sources of food proteins* (pp. 195-240). Springer, Boston, MA, [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2652-0\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2652-0_7).
- Özdemir, E. E., Görgüç, A., Gençdağ, E., Yılmaz, F. M. (2022). Physicochemical, functional and



- emulsifying properties of plant protein powder from industrial sesame processing waste as affected by spray and freeze drying. *LWT–Food Science and Technology*, 154, 112646, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112646>.
- Patil, S., Suryavanshi, S., Pathak, S., Sharma, S., Patravale, V. (2013). Evaluation of novel lipid-based formulation of  $\beta$ -Artemether and Lumefantrine in murine malaria model. *International Journal of Pharmaceutics*, 455(1-2), 229-234, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.07.033>.
- Sá, A. G. A., Moreno, Y. M. F., Carciofi, B. A. M. (2020). Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 170-184. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.011>.
- Samuelsson, R., Burvall, J., Jirjis, R. (2006). Comparison of different methods for the determination of moisture content in biomass. *Biomass and Bioenergy*, 30(11), 929-934, <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2006.06.004>.
- Saxena, D. K., Sharma, S. K., Sambhi, S. S. (2011). Comparative extraction of cottonseed oil. *ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences*, 6(1), 84-9.
- Seal, S., Panda, A. K., Kumar, S., Singh, R. K. (2015). Production and characterization of bio oil from cotton seed. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 34(2), 542-547, <https://doi.org/10.1002/ep.12011>.
- Teh, S. S., Bekhit, A. E. D., Carne, A., Birch, J. (2014). Effect of the defatting process, acid and alkali extraction on the physicochemical and functional properties of hemp, flax and canola seed cake protein isolates. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 8(2), 92-104, <https://doi.org/10.1007/s11694-013-9168-x>.
- Tepecik, M., Ongun, A. R., Kayikcioglu, H. H., Delibacak, S., Elmaci, O. L., Celen, A. E., İlker, E. (2022). Change in cotton plant quality in response to application of anaerobically digested sewage sludge. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(1), 615-621, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.09.016>.
- Timilsena, Y. P., Wang, B., Adhikari, R., Adhikari, B. (2016). Preparation and characterization of chia seed protein isolate–chia seed gum complex coacervates. *Food Hydrocolloids*, 52, 554-563, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.033>.
- Tsaliki, E., Kechagia, U., Doxastakis, G. (2002). Evaluation of the foaming properties of cottonseed protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 16(6), 645-652, [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(02\)00030-9](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(02)00030-9).
- Tunç, S., Duman, O. (2007). Thermodynamic properties and moisture adsorption isotherms of cottonseed protein isolate and different forms of cottonseed samples. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 133-143, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.015>.
- Turchiuli, C., Eloulalia, Z., El Mansouri, N., Dumoulin, E. (2005). Fluidised bed agglomeration: Agglomerates shape and end-use properties. *Powder Technology*, 157(1-3), 168-175, <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2005.05.024>.
- Van Atta, D. (2009). “White gold” or fool's gold?: The political economy of cotton in Tajikistan. *Problems of Post-Communism*, 56(2), 17-35, <https://doi.org/10.2753/PPC1075-8216560202>.
- Wang, J. S., Wang, A. B., Zang, X. P., Tan, L., Xu, B. Y., Chen, H. H., Ma, W. H. (2019). Physicochemical, functional and emulsion properties of edible protein from avocado (*Persea americana Mill.*) oil processing by-products. *Food Chemistry*, 288, 146-153, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.098>.
- Wei, H. U., Chen, M. L., Zhao, W. Q., Chen, B. L., Wang, Y. H., Wang, S. S., Zhou, Z. G. (2017). The effects of sowing date on cottonseed properties at different fruiting-branch positions. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(6), 1322-1330, [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61537-X](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61537-X).
- Wei, Y., Liu, Y., Ali, A. M., Xiao, R., Liang, C., Meng, Z., Zhang, R. (2022). Rich variant phenotype of *Gossypium hirsutum* L. saturated mutant library provides resources for cotton functional genomics and breeding. *Industrial Crops*

- and Products*, 186, 115232, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115232>.
- Were, L., Hettiarachchy, N. S., Kalapathy, U. (1997). Modified soy proteins with improved foaming and water hydration properties. *Journal of Food Science*, 62(4), 821-824, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb15463.x>.
- Wu, H., Wang, Q., Ma, T., Ren, J. (2009). Comparative studies on the functional properties of various protein concentrate preparations of peanut protein. *Food Research International*, 42(3), 343-348, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.12.006>.
- Xia, S., Shen, S., Song, J., Li, K., Qin, X., Jiang, X., Xue, Y. (2023). Physicochemical and structural properties of meat analogues from yeast and soy protein prepared via high-moisture extrusion. *Food Chemistry*, 402, 134265, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134265>.
- Yavuz, M., Özçelik, B. (2016). Bitkisel protein izolatlarının fonksiyonel özellikleri. *Akademik Gıda*, 14(4), 424-430.
- Yılmaz, I., Akcaoz, H., Ozkan, B. (2005). An analysis of energy use and input costs for cotton production in Turkey. *Renewable Energy*, 30(2), 145-155, <https://doi.org/10.1016/j.renene.2004.06.001>.
- Yu, L., Yang, W., Sun, J., Zhang, C., Bi, J., Yang, Q. (2015). Preparation, characterisation and physicochemical properties of the phosphate modified peanut protein obtained from *Arachin Conarachin L.* *Food Chemistry*, 170, 169-179, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.047>.
- Yücepe, M., Başığit, B., Karaaslan, M. (2021). Design of novel nutritious microcapsules comprising  $\omega$ -5 fatty acids and essential amino acids by assembling pomegranate seed derived macromolecules. *LWT-Food Science and Technology*, 143, 111162, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111162>.
- Zhao, Q., Xiong, H., Selomulya, C., Chen, X. D., Huang, S., Ruan, X., Sun, W. (2013). Effects of spray drying and freeze drying on the properties of protein isolate from rice dreg protein. *Food and Bioprocess Technology*, 6(7), 1759-1769, <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0844-3>.
- Zhao, X., Zhu, H., Zhang, B., Chen, J., Ao, Q., Wang, X. (2015). XRD, SEM, and XPS analysis of soybean protein powders obtained through extraction involving reverse micelles. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92(7), 975-983, <https://doi.org/10.1007/s11746-015-2657-9>.
- Zielińska, E., Karaś, M., Baraniak, B. (2018). Comparison of functional properties of edible insects and protein preparations thereof. *LWT-Food Science and Technology*, 91, 168-174, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.058>.

# İçindekiler / Content

## Araştırmalar (İngilizce) / Researches (English)

- Erem, F. (2023). *Physicochemical, sensory, and bioactive properties of gluten-free puddings produced with aronia derivatives* / Aronya türevleri ile üretilen glutensiz pudinglerin fizikokimyasal, duyu ve biyoaktif özellikleri.....243-255
- Avcı, A., Cerit, İ., Hamk, M., Yilmazer Keskin, S. *Improved extraction of bioactive compounds from the pollens of *Typha domingensis* with sequential conventional and ultrasound treatment* / *Typha domingensis* polenlerinden biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunda ardışık geleneksel ve ultrasonik yöntemlerin kullanımı.....256-270
- Turker, I., Isleroglu, H. (2023). *Extraction of bioactive compounds from fenugreek leaves by maceration with D-optimal design* / D-optimal tasarım ile çemen otu yapraklarından biyoaktif bileşenlerin maserasyon yoluyla ekstraksiyonu.....305-316
- Gündüz, A. O., Baştürk, A. (2023). *Some deterioration parameters of edible oils and fats sold in Türkiye markets* / Türkiye pazarlarında satılan yemeklik sıvı ve katı yağların bazı bozulma parametreleri ..... 317-332
- Güler, Z., Dursun, A. (2023). *Comparison of different solid phase microextraction fibers in extraction of volatile compounds from adipose tissue* / Yağ dokusundan uçucu bileşenlerin ekstraksiyonunda farklı katı faz mikroekstraksiyon fiberlerinin karşılaştırılması ..... 422-434
- Yılmaz, E. Bildi E. (2023). *Preparation and quality evaluation of enriched salad dressings based on cold-pressed safflower oil* / Soğuk preslenmiş aspir yağından zenginleştirilmiş salata soslarının hazırlanması ve kalite değerlendirilmesi .....471-482
- Yücepete, M., Akalan, M., Bayrak Akay, K., Karakuş, M. Ş., Karaaslan, A., Başıyigit, B., Karaaslan, M. (2023). *Determination of the characteristic attributes of cottonseed protein concentrate* / Pamuk çekirdeği protein konsantrisinin karakteristik özelliklerinin belirlenmesi ..... 483-497

## Araştırmalar (Türkçe) / Researches (Turkish)

- Kamiloğlu, A., Memiş, H. (2023). *Lactiplantibacillus plantarum* EK148'in et proteinleri içeren ortamda gama amino bütirik asit üretimi ve optimizasyonu / *Gamma aminobutyric acid production and optimization by Lactiplantibacillus plantarum* EK148 in media containing meat proteins.....271-284
- İspirli, H., Dertli, E. (2023). *Geleneksel yollarla üretilmiş turşu örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanması ve bazı fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi* / *Isolation of lactic acid bacteria from traditional pickle samples, their identification using molecular methods, and determination of some functional properties*.....360-380
- Terzioğlu, M. E., Arslaner, A., Bakırcı, İ. (2023). *Çilekle zenginleştirilmiş manda yoğurdunun kalite karakteristikleri ile yağ asidi kompozisyonu, ACE inhibitör aktivite ve HMF içeriği bakımından incelenmesi* / *Investigation of strawberry-enriched buffalo yoghurt in terms of quality characteristics and fatty acid composition, ACE inhibitor activity and HMF content* .....381-393
- Mutlu, C., Candal Uslu, C., Erbaş, M. (2023). *C vitamininin 2-keto-L-gulonik asit molekülünden üretimi için farklı metodların araştırılması* / *Investigation of different methods for production of vitamin C from 2-keto-L-gulonic acid molecule*.....394-404
- Yapıcı, S., Kıvanç, M. (2023). *Ceviz yaprak ekstraktlarının antioksidan, antimikrobiyal ve antibiyofil aktivitesi* / *Antioxidant, antimicrobial and antibiofilm activity of leaf extracts of walnut* .....405-421
- Yılmaz, H. (2023). *Çörek otundan izole edilen proteinlerin model gıda emülsiyonlarında kullanımı ve oral prosesinin tribolojik incelenmesi* / *The use of proteins isolated from nigella sativa in model food emulsions and the tribological investigation of their oral processes* .....435-444
- Şat, İ. G., Yıldırım, B., Binici, H. İ. (2023). *Kahvaltılık yeni bir ürün: Işkın (*Rheum ribes* L.) reçeli* / *A new breakfast product: Işkın (*Rheum ribes* L.) jam* ..... 445-458
- Cerit, İ., Erdem, E. N., Yıldırım, M., Dursun, M. E., Tekgül, S., Kaya, Z., Demirkol, O. (2023). *Endüstriyel domates atıklarından karotenoid ekstraksiyonunun yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyonu* / *Optimization of carotenoid extraction from industrial tomato waste by response surface methodology* ..... 459-470

## Derlemeler (Türkçe) / Reviews (Turkish)

- Kayıoğlu, Ç., Türksoy, S. (2023). *Ozon uygulamasının tahıl ve ürünleri üzerindeki etkileri* / *The effect of ozone treatment on cereals and products* ..... 285-304
- Kahve, A. N., Bayrak, E. (2023). *Çimlendirilen tane ve filiz ürünlerin beslenme rolü ve önemi* / *The role and importance of germinated grain and sprout products in nutrition* ..... 333-346
- Arslan, A., Yalçın, E. (2023). *Pseudo-tahılların anti-besinsel bileşikleri ve azaltma yöntemleri* / *Antinutritional compounds of pseudocereals and reducing methods* ..... 347-359