

GIDA

THE JOURNAL OF FOOD



E-ISSN 1309 - 6273, ISSN 1300 - 3070

CİLT / VOLUME : 50

SAYI / NUMBER : 3

YIL / YEAR : 2025

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. İbrahim ÇAKIR

Yönetim Kurulu Başkanı / President of the Association

Editör / Editor-in Chief Çakır, İbrahim; <i>Bolu Abant İzzet Baysal University, Türkiye</i>	Danışma Kurulu / Advisory Board Acar Soykut, Esra; <i>Bolu Abant İzzet Baysal University, Turkey</i> Atalar, İlyas; <i>Eskişehir Osman Gazi University, Turkey</i> Baysal, Taner; <i>Ege University, Turkey</i> Bezirtzoglou, Eugenia; <i>Democritus University of Thrace, Greece</i> Boyacı, İsmail Hakkı; <i>Hacettepe University, Turkey</i> Bozdoğan Konuşkan, Dilşat; <i>Mustafa Kemal University, Turkey</i> Candoğan, Kezban; <i>Ankara University, Turkey</i> Coşansu Akdemir, Serap; <i>Sakarya University, Turkey</i> Çapanoğlu Güven, Esra; <i>İstanbul Teknik University, Turkey</i> Dertli, Enes; <i>İstanbul Technical University, Turkey</i> Draughon, Ann; <i>Tennessee University, USA</i> El, Sedef Nehir; <i>Ege University, Turkey</i> Erbay, Zafer; <i>Adana Bilim ve Teknik University, Turkey</i> Erten, Hüseyin; <i>Çukurova University, Turkey</i> Fogliano, Vincenzo; <i>University of Napoli Federico II, Italy</i> Ghosh, Bikash C.; <i>National Dairy Research Institute, India</i> Griffiths, Mansel; <i>University of Guelph, Canada</i> Gül, Hülya; <i>Süleyman Demirel University, Turkey</i> Güneşer, Onur; <i>Uşak University, Turkey</i> Ho, Chi-Tang; <i>The State University of New Jersey, USA</i> İşleten Hoşoğlu, Müge; <i>Gebze Teknik University, Turkey</i> Kaban, Güzin; <i>Atatürk University, Turkey</i> Karaaslan, Mehmet; <i>Harran University, Turkey</i> Karaca, Hakan; <i>Pamukkale University, Turkey</i> Kuleaşan, Hakan; <i>Süleyman Demirel University, Turkey</i> Küçükçetin, Ahmet; <i>Akdeniz University, Turkey</i> Mete, Aylin A.; <i>Mersin University, Turkey</i> Morales, Francisco J.; <i>CSIC Instituto del Fr o, Spain</i> Muhtaba, Mustafa G.; <i>Florida Gulf Coast University, USA</i> Özmen Toğay, Sine; <i>Bursa Uludağ University, Turkey</i> Paalme, Toomas; <i>Tallinn University of Technology, Estonia</i> Raspor, Peter; <i>University of Primorska, Slovenia</i> Rezessy-Szabo, Judit M.; <i>Corvinus University of Budapest, Hungary</i> Selli, Serkan; <i>Çukurova University, Turkey</i> Soyer Küçükşenel, Yeşim; <i>Orta Doğu Teknik University, Turkey</i> Tekin, Aziz; <i>Ankara University, Turkey</i> Toker, Ömer S.; <i>Yıldız Teknik University, Turkey</i> Velioglu, Murat; <i>Namık Kemal University, Turkey</i> Yemiş, Oktay; <i>Sakarya University, Turkey</i> Yıldırım, Zeliha; <i>Ömer Halis Demir University, Turkey</i> Yorulmaz, Aslı; <i>Adnan Menderes University, Turkey</i> Yüceer, Yonca; <i>Çanakkale On Sekiz Mart University, Turkey</i>
Editörler / Editors Avcı, Ayşe; <i>Sakarya University, Türkiye</i> Aydın, Furkan; <i>Aksaray University, Türkiye</i> Çevik, Kutlu; <i>Karamanoğlu Mehmetbey University, Türkiye</i> Çolakoglu, A. Sinan; <i>Kabramanmaraş Sütçü İmam University, Türkiye</i> Demirkesen Mert; <i>Ilkem, Ministry of Agriculture And Forestry, Türkiye</i> Demirok Soncu, Eda; <i>Ankara University, Türkiye</i> Erinç, Hakan; <i>Niğde Ömer Halisdemir University, Türkiye</i> Eyiler, Esen; <i>Akdeniz University, Türkiye</i> Kahraman, Kevser; <i>Abdullah Gül University, Türkiye</i> Kuleaşan, Şükran; <i>Mehmet Akif University, Türkiye</i> Oskaybaş Emlek, Betül; <i>Niğde Ömer Halisdemir University, Türkiye</i> Sarcaoğlu, Furkan Türker; <i>Bursa Technical University, Türkiye</i> Torun, Mehmet; <i>Akdeniz University, Türkiye</i> Yılmaz, Merve Sılanur; <i>Bitlis Eren University, Türkiye</i>	
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/ Widely published and peer-reviewed	
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 06 2025	

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 GIDA (2025)50(3)

Araştırmalar (İngilizce) / Researches (English)

Gürbüz, G., Üngür, R. N., Kırıl, E. (2025). Valorization of beetroot skin for the production of nanocellulose reinforced biocomposite films / Pancar kabuğunun nanoselüloz ile güçlendirilmiş biyokompozit film üretimi için değerlendirilmesi .329-341

Sabin, O., Atalar, I., Encu, Ş. B., Cakir, I. (2025). Investigation of the usability of commercial kefir beverages as inoculum in homemade kefir production / Ticari kefir içeceklerinin ev yapımı kefir üretiminde inokulum kaynağı olarak kullanılabilirliğinin araştırılması374-388

Damar, I. (2025). Comparative evaluation of different extraction methods for anthocyanin recovery from red onion peel: Enzyme-assisted, ultrasound-assisted, and ultrasound-assisted enzymatic methods / Kırmızı soğan kabuğundan antosiyanin geri kazanımı için farklı ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırmalı değerlendirmesi: Enzim destekli, ultrason destekli ve ultrason destekli enzimatik yöntemler389-405

Çelebi, K. (2025). Investigation of thermal oxidation of cold pressed poppy (*Papaver somniferum* L.) seed oil with some edible oils / Soğuk preslenmiş haşhaş (*Papaver somniferum* L.) tohumu yağının bazı ticari yağlarla birlikte termal oksidasyonunun araştırılması406-414

Gunes Altuntas, E., Sevim, B., Celik, A. A., Kaymaz, O. (2025). Impact of environmental variables on antimicrobial substance production by lactic acid bacteria: A box-behnken design approach / Çevresel değişkenlerin laktik asit bakterileri tarafından antimikrobiyal madde üretimi üzerindeki etkisi: Box-behnken tasarım yaklaşımı466-478

Araştırmalar (Türkçe) / Researches (Turkish)

İnatçı, Z., Cingöz, A. (2025). At kestanesi (*Aesculus hippocastanum* L.) tohumlarından ultrasonik ve alkali yöntemler kullanarak nişasta ekstraksiyonu ve optimizasyonu / Starch extraction from horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) seeds using ultrasonic and alkaline methods and optimization317-328

Demircioğlu, F., Dündar, A. N., Şahin, O. I., Sarıcaoğlu, F. T. (2025). *Chlorella vulgaris* ilavesinin ekmek kalite kriterleri üzerine etkisi / The effect of *Chlorella vulgaris* addition on bread quality criteria342-360

Review (English) / Derleme (İngilizce)

Karagöz, C., Toluç, Ö. M. (2025). Sustainable food systems: Functional foods and management of food waste / Sürdürülebilir gıda sistemleri: Fonksiyonel gıdalar ve atık yönetimi415-426

Derlemeler (Türkçe) / Review (Turkish)

Yıkıcı, E., Karagül Yüceer, Y. (2025). Lipaz katalizli enzim modifiye krema üretimi ve lezzet katkısı olarak kullanımı / Production of lipase-catalyzed enzyme modified cream and its use as a flavor additive361-373

Özdal, H. R., Nakilcioğlu, E. (2025). Modern ekstraksiyon yöntemlerinin bitkisel protein izolatlarının teknofonksiyonel özelliklerine etkisi / Effect of modern extraction methods on techno-functional properties of plant protein isolates427-441

Apaydın, A. S., Onsekizoğlu Bağcı, P. (2025). Membran ayırma tekniklerinin meyve suyu işlemedeki uygulamaları / Applications of membrane separation techniques in fruit juice processing442-465

**AT KESTANESİ (*AESCULUS HIPPOCASTANUM* L.) TOHURLARINDAN
ULTRASONİK VE ALKALİ YÖNTEMLER KULLANARAK NIŞASTA
EKSTRAKSİYONU VE OPTİMİZASYONU**

Zeynep İNATÇI, Ali CİNGÖZ*

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Tokat,
Türkiye

Geliş / Received 02.01.2025; Kabul / Accepted: 10.04.2025; Online baskı / Published online: 17.04.2025

İnatçı, Z., Cingöz, A. (2025). At kestanesi (*Aesculus hippocastanum* L.) tohumlarından ultrasonik ve alkali yöntemler kullanarak nişasta ekstraksiyonu ve optimizasyonu. GIDA (2025) 50 (3) 317-328 doi: 10.15237/gida.GD25010

İnatçı, Z., Cingöz, A. (2025). Starch extraction from horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) seeds using ultrasonic and alkaline methods and optimization. GIDA (2025) 50 (3) 317-328 doi: 10.15237/gida.GD25010

ÖZ

Bu çalışmada alkali ve ultrason destekli yöntemler kullanılarak at kestanesi (*Aesculus hippocastanum* L.) tohumlarından nişasta ekstraksiyonu ve optimizasyonu amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda optimum ekstraksiyon koşulları yanıt yüzey yöntemi (D-optimal tasarımı) kullanılarak belirlenmiş ve en yüksek nişasta veriminin belirlendiği noktalarda ekstraktlar elde edilmiştir. Alkali yöntem için numune/çözücü oranı (1:1, 1:2, 1:3 w/v), ekstraksiyon süresi (3-12 saat), NaOH oranı (0.25-1 N) bağımsız işlem değişkenleri, ultrason destekli yöntem için 37W ultrason gücü sabit olarak numune/çözücü oranı (1:1, 1:2, 1:3 w/v), ekstraksiyon süresi (30-120 dakika), NaOH oranı (0.25-1 N) bağımsız işlem değişkenleri olarak seçilmiş ve uygulanmıştır. Optimum ekstraksiyon süresi, NaOH oranı ve numune/çözücü oranı alkali yöntem için sırasıyla 12 saat, %1 ve 1:3 w/v; ultrason destekli yöntem için ise sırasıyla 2 saat, %0.68 ve 1:3 w/v olarak belirlenmiştir. Ultrason destekli yöntem nişastaların kül içeriğinde ve b* renk değerinde artışa neden olmuştur. Ekstraksiyon süresi ve çözgen miktarının artması nişasta verimini arttırmıştır.

Anahtar kelimeler: At kestanesi, D-Optimal, nişasta, optimizasyon

STARCH EXTRACTION FROM HORSE CHESTNUT (*Aesculus hippocastanum* L.) SEEDS USING ULTRASONIC AND ALKALINE METHODS AND OPTIMIZATION

ABSTRACT

The aim of this study was to extract and optimize starch from horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) seeds using alkaline and ultrasound-assisted methods. Optimum extraction conditions were determined using response surface methodology (D-optimal design) and extracts were obtained at the points where the highest starch yield was determined. For the alkaline method, sample/solvent ratio (1:1, 1:2, 1:3 w/v), extraction time (3-12 h), NaOH ratio (0.25-1 N) were selected and applied as independent process variables, while for the ultrasound-assisted method, 37 W ultrasound power was selected and applied as a constant and sample/solvent ratio (1:1, 1:2, 1:3

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author:

✉: ali.cingoz@gop.edu.tr

☎: (+90) 356 252 1616

☎: (+90) 356 252 1729

Zeynep İnatçı; ORCID no: 0000-0003-1049-537X

Ali Cingöz; ORCID no: 0000-0003-0958-2679

w/v), extraction time (30-120 min), NaOH ratio (0.25-1 N) as independent process variables. The optimum extraction time, NaOH ratio, and sample/solvent ratio were determined to be 12 h, 1%, and 1:3 w:v for the alkaline method, respectively, and 2 h, 0.68%, and 1:3 w:v for the ultrasonic-assisted method, respectively. The ultrasonic-assisted method caused an increase in the ash content and b* color value of the starches. Increasing the extraction time and the amount of solvent increased the starch yield.

Keywords: Horse chestnut, D-Optimal, starch, optimization

GİRİŞ

Niştasta, α -1,4 glikozidik bağları ile bağlanmış α -D-glikoz monomerlerinden oluşan düz amiloz zincirleri ve α -1,6 glikozidik bağları ile dallanmış amilopektin zincirlerinden oluşan, bitki dokularında yarı kristal granüller halinde bulunan kompleks bir karbonhidrattır (Lemos vd., 2015). Niştasta, tahılların, baklagillerin, yumruların ve köklerin ana bileşenidir (Lu vd., 2012). Gıda maddelerinde jelleştirici, dolgu maddesi, stabilizatör, sorbent polimer ve yapıştırıcı olarak kullanılmaktadır (Vishal Banyal vd., 2023). Yaygın olarak buğday, patates, manyok, pirinç ve mısır gibi endüstriyel ürünlerden üretilen niştastalar farklı yapısal ve teknolojik kalite özelliklerine sahiptir. Bitki türü, hasat zamanı ve çevresel/iklimsel faktörlere bağlı olarak niştastaların özelliklerinde değişimler meydana geldiği bildirilmektedir (Vishal Banyal vd., 2023). 2050 yılına kadar 10 milyarı aşması beklenen nüfusla birlikte, daha fazla gıda ve enerji üretme ihtiyacı ortaya çıkmaktadır. Bu da daha az fosil yakıt, daha düşük gaz emisyonu ve sıfır katı atık için planlama yapılmasını gerektirmektedir (Duque-Acevedo vd., 2020). Gelişmiş ülkeler ürünlerin yaşam döngüsünü uzatmakta ve atıkları üretim süreçlerine dahil ederek daha verimli bir sistem oluşturmaktadırlar (Molina-Moreno vd., 2017).

Aesculus hippocastanum L., yaprak ve çiçeklerinin dekoratif özellikleri ile 16. yüzyılın sonlarından günümüze kadar park, bahçe ve bulvarlarda süs ağacı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Aynı zamanda tohum kabukları ve çiçekleri geleneksel ve tıbbi tedavilerde kullanılan değerli bir bitkidir (Dudek-Makuch ve Matlawska, 2011). Fakat bu değerli bitkiden yeterince faydalanılamamakta ve her yıl tonlarca parçalanmış ve dökülmüş meyvelerini bertaraf etmek zorunda kalan belediyelerin bu imha işlemini düzgün bir şekilde yapması

gerekmektedir (Gullón vd., 2020). Önemli bir niştasta ve yağ kaynağı olan at kestanesinin ana biyoaktif bileşenleri, triterpen saponinler (escin), flavonoidler, kumarinler ve proantosiyanidinler dahil olmak üzere 190 farklı bileşen tanımlanmıştır (Amiri vd., 2019; Owczarek-Januszkiewicz vd., 2023). Anti-besinsel faktörler olarak bilinen glikozit ve saponin varlığı at kestanesi tohumlarını güvensiz gıda sınıfına sokmaktadır (FDA, 2023). At kestanesi tohumlarındaki mevcut bu toksik faktörlerin ortadan kaldırılmasında veya en aza indirilmesinde ıslatma ve ultrason destekli yöntemler kullanılmaktadır (Kaur vd., 2012).

Niştasta üretiminde genellikle geleneksel yöntemler tercih edilmektedir. Ancak zaman ve kimyasal tüketimi açısından dezavantajları olan geleneksel ekstraksiyon uygulamalarının popülaritesi her geçen gün azalmaktadır. Ayrıca, geleneksel yöntemler ekstraksiyon parametrelerinin sinerjik etkilerinin göz ardı edilmesine neden olmaktadır. Ultrason destekli ekstraksiyon, bileşiklerin yapısal ve moleküler özelliklerini korurken, bitkilerden hedeflenen bir maddenin ekstrakte edilmesi için kullanılan modern yöntemlerden bir tanesidir. Bu yöntem solvent ve enerji tüketimini azaltmakta, ekstraksiyon süresini kısaltmakta ve prosesi basitleştirmektedir (Amiri vd., 2019).

Yapılan literatür taramalarında at kestanesinden antioksidan, glikoz ve lignin gibi katma değeri yüksek ürünlerin üretilmesine yönelik çalışmalar tespit edilmiştir (Gullón vd., 2020). Ayrıca literatürde alkali yöntem kullanılarak kestane ve at kestanesinden niştasta üretimi ve ultrasonik destekli yöntemin niştasta partiküllerinin özellikleri üzerindeki etkisini araştıran çalışmalar bulunmaktadır (Castaño vd., 2014; Correia ve Beirão-da-Costa, 2012; Lemos vd., 2015; Rafiq vd., 2016; Shah vd., 2016; Ahmad vd., 2020).

Literatürde at kestanesinde nişasta ekstraksiyonunun ultrason destekli yöntemle optimize edildiği sınırlı sayıda çalışma tespit edilmiştir. Ayrıca D-optimal yöntemin kullanıldığı bir çalışmaya da rastlanmamıştır. Bu çalışmada at kestanesinde iki farklı yöntem kullanılarak nişasta ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve ekstraksiyon işlem şartları D-optimal yöntemi kullanılarak optimize edilmiştir.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Nişasta ekstraksiyonu için kullanılan at kestaneleri (*Aesculum hippocastanum* L.) İstanbul'daki (Türkiye) park ve bahçelerden toplanmış ve toplanan tohumlar kullanılıncaya kadar -18°C'de depolanmıştır. Kimyasal analizlerde kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

Metot

Kimyasal Analizler

At kestanesinin nem ve kül içeriği sırasıyla AACC Standart Yöntem No. 44-01.01 ve 08-01.01'e göre belirlenmiştir (AACC, 2004). Toplam nişasta içeriği Megazyme (Megazyme Ireland Ltd., Co.) K-TSTA kitleri kullanılarak AACC yöntemleri 76.13'e göre belirlenmiştir. Azot içeriğini belirlemek için mikro-Kjeldahl yöntemi kullanılmıştır (AOAC, 2000). Ham yağ, kurutulmuş numunenin petrol eteri ekstraksiyonu ile Ankom XT10 ekstraksiyon sisteminde gravimetrik olarak belirlenmiştir (Ankom Technology Inc., Macedon, NY) (Ankom, 2009). Örneklerin rengi Minolta Chroma Meter (CR-300 Minolta Japan) ile ölçülmüştür. At kestanesi tohumlarının kalınlıkları ve ağırlıkları tespit edilmiştir.

Deneyel Tasarım ve Yanıt Yüzeyi Metodolojisi (YYM) Nişasta üretiminde optimum verim noktasını belirlemek ve elde edilen verilerin regresyon ve grafik analizlerini oluşturmak amacıyla D-optimal deneyel tasarımı kullanılmıştır (Design Expert V.7 Stat-Ease Inc., Minneapolis). Çalışmada seçilen deneyel parametreler literatür göz önünde bulundurularak belirlenmiştir (Correia ve Beirão-da-Costa, 2010; Correia ve Beirão-da-Costa, 2012; Shah vd., 2016; Ahmad vd., 2020). At kestanesinde alkali yöntemle nişasta üretiminde

kullanılan parametreler: Zaman ($X_1=3-12$ saat), NaOH konsantrasyonları ($X_2=0.25, 0.50, 1.00\%$), Numune/çözelti (w/v) oranı ($X_3=1:1, 1:2, 1:3$) olarak seçilmiş, ultrason destekli yöntem parametreleri ise: Zaman ($X_4=30-120$ dk), NaOH konsantrasyonları ($X_5=0.25, 0.50, 1.00\%$), Numune/çözelti (w/v) oranı ($X_6=1:1, 1:2, 1:3$) olarak belirlenmiştir. At kestanesinde nişasta ekstraksiyonu, Çizelge 1'de gösterildiği gibi toplam 22 farklı koşul için yürütülmüştür. Analiz %5 anlamlılık düzeyi ve %95 güven düzeyi ile gerçekleştirilmiştir.

Optimum koşullar, optimum deneyel koşullar altında ekstraksiyonun iki kopya halinde gerçekleştirilmesiyle teyit edilmiştir. Fischer's testi model eşitliğini elde etmek için kullanılmıştır. Student's testi ise regresyon katsayılarının istatistiksel farkını tespit etmek için kullanılmıştır. Elde edilen model denklemleri Eşitlik 1 (alkali yöntem) ve Eşitlik 2'de (ultrason destekli yöntem), katsayılar ise Çizelge 3'de verilmiştir.

$$Y = 22.07 + (1.60 \cdot X_1) + (0.76 \cdot X_2) - (6.59 \cdot X_3) + (1.44 \cdot X_1 X_2) - (3.98 \cdot X_1 X_3) - (0.80 \cdot X_2 X_3) \quad (1)$$

$$Y = 21.60 + (2.31 \cdot X_1) + (1.99 \cdot X_2) - (5.37 \cdot X_3) + (0.63 \cdot X_1 X_2) - (1.47 \cdot X_1 X_3) - (0.18 \cdot X_2 X_3) \quad (2)$$

Nişasta verimi Eşitlik 3 kullanılarak hesaplanmıştır.

Nişasta Verimi (%) =

$$\frac{\text{Ekstraksiyon sonunda elde edilen toplam nişasta (g)}}{\text{Tohumdaki Toplam Nişasta (g)}} \times 100 \quad (3)$$

Örneklerin Hazırlanması

At kestanesi tohumları kabuğundan ayrılmış ve 3-4 mm kalınlığında parçalar halinde doğranmıştır. Dilimlenen at kestaneleri yüzeysel oksidasyonu engellemek ve renkteki kararmayı önlemek amacıyla %0.5 potasyum metabisülfid ve %1 sitrik asit içeren çözeltide 30 dakika bekletilmiş ve ardından 70°C'de 12 saat hava akımlı etüvde (Memmert 100-800, Almanya) kurutulmuştur (Singh vd., 2008). Kurutma sonrası örnekler dilimler halinde kullanılmıştır.

Çizelge 1. At kestanesinde nişasta ekstraksiyonunun deneysel tasarımı ve sonuçları
 Table 1. Experimental design and results of starch extraction from horse chestnut

A-HSC						U-HSC				
Değişkenler Variables			Sonuçlar Results			Değişkenler Variables			Sonuçlar Results	
X ₁	X ₂	X ₃	Gerçek Verim (%) Actual Yield (%)	Tahmin Edilen Verim (%) Predicted Yield (%)		X ₄	X ₅	X ₆	Gerçek Verim (%) Actual Yield (%)	Tahmin Edilen Verim (%) Predicted Yield (%)
1	7.39	0.63	1:1	13.83±0.14	14.71	30	0.25	1:2	20.33±0.11	18.81
2	7.90	1.00	1:1	14.42±0.12	15.99	82.38	0.25	1:3	28.13±0.23	25.66
3	3	1.00	1:3	23.12±0.18	23.21	68.38	1.00	1:3	27.24±0.18	28.12
4	11.30	0.25	1:1	14.54±0.21	13.10	30	0.57	1:3	23.45±0.14	22.99
5	7.08	0.25	1:1	12.80±0.08	13.72	30	1.00	1:2	22.01±0.09	22.55
6	12	0.25	1:2	22.52±0.32	20.17	75	0.61	1:3	28.52±0.13	26.89
7	12	1.00	1:3	38.13±0.28	37.24	30	1.00	1:1	17.65±0.21	15.03
8	12	1.00	1:2	19.10±0.11	22.33	75	0.94	1:1	10.94±0.18	14.93
9	3	0.66	1:1	11.94±0.16	13.91	68.38	1.00	1:3	27.74±0.26	28.12
10	3	0.25	1:2	26.67±0.17	26.17	75	0.62	1:2	23.66±0.21	24.29
11	7.50	0.43	1:3	27.34±0.22	27.85	120	0.68	1:3	28.27±0.19	31.12
12	3	1.00	1:3	20.53±0.23	23.21	82.38	0.25	1:3	21.86±0.20	25.66
13	7.50	0.62	1:2	22.13±0.30	22.82	30	0.25	1:1	8.38±0.08	13.01
14	7.90	1.00	1:1	17.96±0.16	15.99	120	0.68	1:3	34.47±0.33	31.12
15	3	0.25	1:2	23.01±0.13	26.17	120	0.25	1:2	21.30±0.17	24.77
16	5.25	1.00	1:2	26.11±0.08	22.53	118.59	0.60	1:2	33.00±0.26	27.57
17	3	0.66	1:1	16.55±0.12	13.91	120	1.00	1:1	15.85±0.11	15.34
18	12	0.25	1:3	28.62±0.24	31.25	106.13	0.93	1:2	27.34±0.18	29.18
19	7.50	0.25	1:2	23.82±0.36	23.17	75.00	0.44	1:1	14.88±0.06	12.72
20	3	0.25	1:3	25.98±0.11	22.96	120	0.25	1:1	11.19±0.09	10.79
21	12	0.59	1:1	14.58±0.13	15.27	30	0.25	1:2	18.34±0.15	18.81
22	12	1.00	1:3	39.24±0.27	37.24	30	0.25	1:1	15.93±0.16	13.01

X₁=Zaman (saat), X₂=NaOH (%), X₃=Numune/Çözücü (g/mL), X₄=Zaman (dakika), X₅=NaOH (%), X₆=Numune/Çözücü (g/mL), A-HSC: Alkali yöntemle üretilen at kestanesi nişastası, U-HSC: Ultrason destekli yöntemle üretilen at kestanesi nişastası

X₁=Time (h), X₂=NaOH (%), X₃=Sample/Solvent (g/mL), X₄=Time (min), X₅=NaOH (%), X₆=Sample/Solvent (g/mL), A-HSC: Horse chestnut starch produced by alkaline method, U-HSC: Horse chestnut starch produced by ultrasound assisted method

Alkali Yöntem ile Ekstraksiyon

Rafiq vd., (2015) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemi deneme desenine göre dizayn edilmiştir. 100 g kurutulmuş ve dilimlenmiş numuneler farklı örnek/çözgen oranlarında (1:1, 1:2, 1:3 w/v) ve farklı NaOH oranlarında (0.25, 0.50 ve %1) ayarlanmış bazık su ile karıştırılmış ve +4°C'de farklı sürelerde (3-6-12 saat) ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon sonunda, karışım 5 dakika boyunca yüksek hızlı bir öğütücüde (Lavion HC1500Y,

İtalya) öğütülmüş ardından 60 mikronluk bir süzgeçten geçirilmiş ve süzgecin üstü 2-3 kez distile su ile yıkanmıştır. Elde edilen süzöntü 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj (Boeco U-32R, Almanya) edilmiştir. Santrifüj işlemi dört kez tekrarlanmış ve her tekrardan sonra distile su ile yıkanmıştır. Son santrifüj işleminden sonra elde edilen süpernatant büyük bir cam kaba alınmış, 50°C'de 24 saat boyunca hava akımlı etüvde (Memmert 100-800, Almanya) kurutulmuş ve

ardından öğütülerek kapalı kaplarda depolanmıştır.

Ultrason Destekli Yöntemle Ekstraksiyon

Rafiq vd., (2015) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemi deneme desenine göre dizayn edilmiştir. Dilimlenmiş ve kurutulmuş 100 g numune, farklı örnek/çözgen oranlarında (1:1, 1:2, 1:3) ve farklı NaOH oranlarında (0.25, 0.50 ve %1) ayarlanmış bazık su ile karıştırılmış ve 40°C'de farklı sürelerde (30-60-90 dk) ultrasonik su banyosunda (Elmasonic, E30H, Schmidbauer, Almanya) 37 W'da ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon sonunda karışım yüksek hızlı öğütücüde (Lavion HC1500Y, İtalya) 5 dk boyunca öğütülmüş, 60 mikronluk bir süzgeçten geçirilmiş ve süzgecin üstü 2-3 kez distile su ile yıkanmıştır. Elde edilen süzöntü 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj (Boeco U-32R, Almanya) edilmiştir. Santrifüj işlemi dört kez tekrarlanmış ve her tekrardan sonra distile su ile yıkanmıştır. Son santrifüj işleminden sonra elde edilen süpernatant büyük bir cam kaba alınmış, 50°C'de 24 saat boyunca hava akımlı etüvde (Mettler 100-800, Almanya) kurutulmuş ve ardından öğütülerek kapalı kaplarda depolanmıştır (Rafiq vd., 2015).

Saponin Analizi

0.5 g nişasta örneği üzerine 0.5 mL distile su eklenerek 15 dakika çalkalanmıştır. Süre sonunda yaklaşık 0.25 cm köpük oluşumu gözlenen örnekler saponin potitif olarak işaretlenmiştir. (Janarthanan vd., 2012).

Glikozit Analizi

1 g nişasta örneği üzerine 1.5 mL kloroform ve %10'luk amonyak damla damla eklenmiş ve pembe renk oluşumu gözlenen örnekler glikozit potitif olarak işaretlenmiştir. (Janarthanan vd., 2012).

İstatistiksel Analiz

SPSS istatistik programı (SPSS, Inc., Chicago, IL, ABD) kullanılmış, sonuçların varyans analizi (ANOVA) yapılmış ve gruplar arasındaki farklar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile %95 güven aralığında istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Park ve bahçe atıklarından toplanan ve nişasta üretiminde kullanılan at kestanelerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri belirlenmiştir. At kestanesi tohumlarının ortalama tohum ağırlığı 16.01 ± 2.09 g ve kalınlığı 2.44 ± 0.25 cm olarak belirlenmiştir. At kestanesi tohumların sırasıyla 78.78 ± 0.16 , 1.92 ± 0.03 , 4.85 ± 0.17 , 2.06 ± 0.17 ve 30.21 ± 0.46 kuru madde, kül, protein, yağ ve toplam nişasta içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir. At kestanesi tohumlarının 0.39 - 7.78 protein, 1.12 - 3.27 yağ, 1.93 - 3.16 kül ve 35.0 - 38.3 nişasta içerdiği bildirilmiştir (Cukanovi'c vd., 2011; Hassan vd., 2021; Rafiq vd., 2015; Rafiq vd., 2021; Shah vd., 2016). Kullanılan at kestanelerinin bileşimi nişasta oranı haricinde literatürle benzerlik göstermektedir. Nişasta içeriği literatüre göre daha düşük bulunmuştur. At kestanelerinin toplanma zamanı, iklim koşulları ve çeşit gibi faktörler bu farklılığa neden olmaktadır.

İstatistiksel Modelleme

Nişasta, alkali ve ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak ön işlemlerden geçirilmiş at kestanelerinden üretilmiştir. Nişastanın ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu için çok değişkenli yüzey yanıt metodolojisi (YYM) tercih edilmiştir. YYM'nin en önemli avantajı, deneysel çalışma sayısını azaltması, enerji ve hammadde tasarrufu sağlaması ve zamanı kısaltmasıdır. Proses parametreleri, at kestanesinden nişasta üretimini optimize etmek için Çizelge 1'de verilen deneysel tasarıma göre değerlendirilmiştir. Genel belirleme katsayısı (R^2) alkali yöntem için 0.9232 ve ultrason destekli yöntem için 0.8609 olarak bulunmuştur (Çizelge 3). Deneysel sonuçları güvenilir bir şekilde tahmin edebilen indirgenmiş model denklemleri Eşitlik 4 (alkali yöntem) ve Eşitlik 5'de (ultrason destekli yöntem) verilmiştir.

$$Y = 21.460 + (0.951 \cdot X_1) - (8.331 \cdot X_2) + (0.858 \cdot X_1 X_2) - (0.016 \cdot X_1^2) + (4.800 \cdot X_2^2) \quad (4)$$

$$Y = 19.373 + (0.061 \cdot X_1) + (2.042 \cdot X_2) + (0.037 \cdot X_1 X_2) - (1.008 \cdot X_1^2) + (0.645 \cdot X_2^2) \quad (5)$$

Deneysel verilere ve yanıt fonksiyonuna uyum sağlamak için regresyon analizi yapılmıştır. Model

denklemlerine (Eşitlik 1 ve 2) dayanarak, NaOH konsantrasyonuna, zamana ve numune/çözücü oranlarına bağlı olarak nişasta üretim verimliliğini göstermek için bir yüzey grafiği elde edilmiştir (Şekil 1). Nişasta verimi için 2FI modelleri ANOVA ile değerlendirilmiştir (Çizelge 3). Modeller F (16.04 ve 8.25) ve p değerlerine (<0.0001 ve 0.0006) göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca, 0.0001 'den küçük p-değerleri model terimlerinin anlamlılığını göstermektedir. Seçilen parametrelerde en yüksek etki numune/çözelti oranında bulunmuş, bunu zaman takip etmiştir. NaOH oranının istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi tespit edilememiştir.

ANOVA gerçekleştirildikten sonra at kestanesi tohumlarından nişasta ekstraksiyonu için optimum koşulu belirlemek üzere sayısal optimizasyon yapılmıştır. Tüm kontrol parametreleri için (Süre, NaOH oranı ve örnek/çözgen oranı) bir dizi aralık seçilmiştir. Tahmin edilen modeller, kriterler seçildiğinde

arzu edilebilirlik fonksiyonu 1'e yakın değerler vermektedir. Sayısal optimizasyonda elde edilen tahmini parametreler Çizelge 2'de gösterilmektedir. D-optimal tasarım yoluyla tahmin edilen optimum koşullar alkali yöntem için 12 saat ekstraksiyon süresi, %1 NaOH konsantrasyonu ve 1:3 örnek/çözücü oranı ile ultrason destekli yöntem için 2 saat ekstraksiyon süresi, %0.68 NaOH konsantrasyonu ve 1:3 örnek/çözücü oranı olarak oluşturulmuştur. Çizelge 2'de verildiği gibi tahmin edilen modelin doğruluğunu sağlamak için deneylerin üç tekrarı yapılmıştır. Doğruluk deneyi sonucunda A-HSC için nişasta verimi 38.41 ± 0.18 , U-HSC içinse nişasta verimi 32.21 ± 0.77 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar modelden elde edilen verilerle tutarlıdır. Dolayısıyla bu çalışma D-optimal tasarımın at kestanesi tohumundan iki farklı yöntem kullanılarak nişasta ekstrakte etmek için en iyi koşulları değerlendirmede güvenilir, basit ve kullanışlı bir yaklaşım olduğunu doğrulamaktadır.

Çizelge 2. Optimum koşulun doğrulama test sonucu

Table 2. Validation test result of optimum condition

	A-HSC					U-HSC				
	Bağımsız değişkenler <i>Independent variables</i>				Cevaplar <i>Responses</i>	Bağımsız değişkenler <i>Independent variables</i>				Cevaplar <i>Responses</i>
	No	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁ , Nişasta verimi (%) <i>Starch yield (%)</i>	X ₄	X ₅	X ₆	Y ₁ , Nişasta verimi (%) <i>Starch yield (%)</i>	
Gerçek <i>Actual</i>	1	12	1	1:3	38.63	120	0.68	1:3	33.12	
	2	12	1	1:3	38.18	120	0.68	1:3	31.24	
	3	12	1	1:3	38.42	120	0.68	1:3	32.28	
Gerçek ortalama <i>Actual average</i>		12	1	1:3	38.41 ± 0.18	120	0.68	1:3	32.21 ± 0.77	
Tahmin edilen <i>Predicted</i>		12	1	1:3	37.24	120	0.68	1:3	31.12	

X₁=Zaman (saat), X₂=NaOH (%), X₃=Numune/Çözücü (g/mL), X₄=Zaman (dakika), X₅=NaOH (%), X₆=Numune/Çözücü (g/mL), A-HSC: Alkali yöntemle üretilen at kestanesi nişastası, U-HSC: Ultrason destekli yöntemle üretilen at kestanesi nişastası

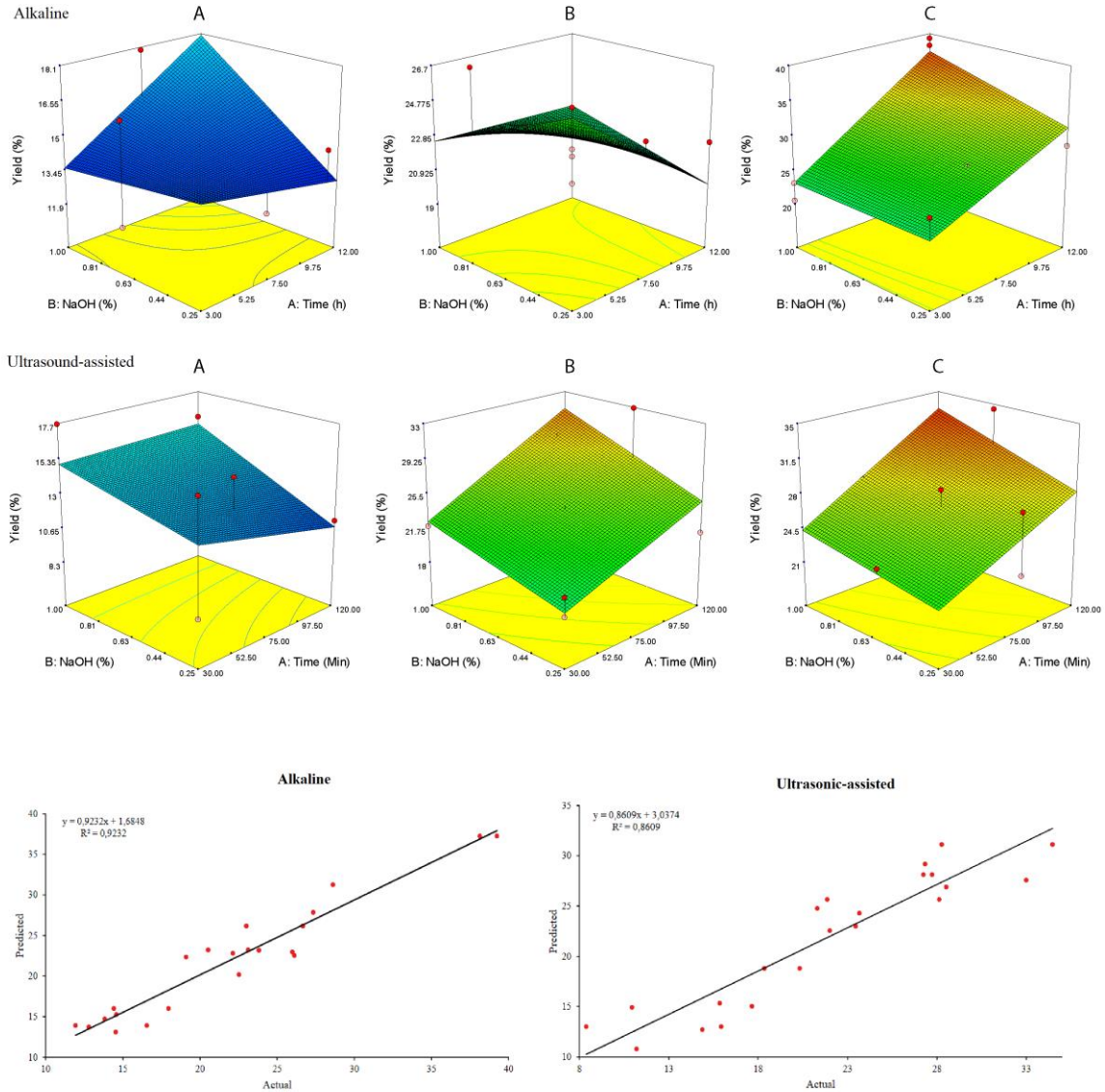
X₁=Time (h), X₂=NaOH (%), X₃=Sample/Solvent (g/mL), X₄=Time (min), X₅=NaOH (%), X₆=Sample/Solvent (g/mL), A-HSC: Horse chestnut starch produced by alkaline method, U-HSC: Horse chestnut starch produced by ultrasound assisted method

Şekil 1'de nişasta veriminin yanıt yüzey grafikleri gösterilmektedir. Deneysel tasarım A (1:1), B (1:2) ve C (1:3) numune/çözücü oranları ile kategorik olarak yapılmıştır. Optimizasyon sonuçlarına göre, en yüksek nişasta verimi alkali yöntem için 12 saat ekstraksiyon süresi, %1 NaOH

konsantrasyonu ve 1:3 örnek/çözücü oranı ile ultrason destekli yöntem için 2 saat ekstraksiyon süresi, %0.68 NaOH konsantrasyonu ve 1:3 örnek/çözücü oranı ile elde edilmiştir. Çalışmada oluşturulan tüm modeller anlamlı ($P < 0.05$), uyum eksikliği değerleri istatistiksel olarak anlamsız

bulunmuştur ($P>0.05$). Oluşturulan modellerin deneysel verileri yuēsek doērulukla aēıklayabilmesi iēin gereken en 6nemli kriterlerden biri de uyum eksikliēi verilerinin istatistiksel olarak anlamsız bulunmasıdır (Türker

ve İřleroēlu, 2023). Bu ēalıřmada, istatistiksel olarak anlamsız uyum eksikliēi deēerleri ($P>0.05$), at keşanesi tohumlarının nişastası iēin oluşturulan modellerin başarısını g6stermiştir.



şekil 1. At keşanesi nişastası verimini tahmin etmek iēin yanıt yuēey grafikleri (A= 1:1 6rnek/ē6z6c6, B=1:2 6rnek/ē6z6c6, C=1:3 6rnek/ē6z6c6)

Figure 1. Response surface plots for estimating horse chestnut starch yield (A=1:1 sample/solvent, B=1:2 sample/solvent, C=1:3 sample/solvent)

Model incelendiğinde ekstraksiyon süresinin ve örnek/çözgen oranının nişasta ekstraksiyonunda istatistiki olarak önemli olduğu ($P<0.05$), NaOH oranının ise ekstraksiyon üzerinde etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Yapılan literatür taramasında at kestanesinden alkali ve ultrasonik yöntemler kullanılarak nişasta üretimi ile ilgili çalışmalar tespit edilmiştir. Rafiq vd. (2015) yaptıkları çalışmada 0.25 N NaOH konsantrasyonunda 1:3 örnek/çözelti oranında 6 saat ekstraksiyon ile nişasta üretimi gerçekleştirmişlerdir. Ayrıca alkali ekstraksiyonda %0.01, 0.1, 0.25 NaOH ve 0.5 N NaOH konsantrasyonlarının kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Correia ve Beirão-da-Costa, 2010; Correia ve Beirão-da-Costa, 2012; Shah vd., 2016). At kestanesinden ultrasonik destekli yağ aside ekstraksiyonunda metanolde 100 W

sonikasyon gücünün kullanıldığı bir çalışma bulunmaktadır (Amiri vd., 2019). Ayrıca Ahmad vd. (2020), alkali ve ultrasonikasyon yöntemlerini kullanarak *A. hippocastanum* tohumları da dahil olmak üzere alternatif kaynaklardan nişasta üretmiştir. Elde edilen nişasta verimi alkali yöntemle (0.5M NaOH, 60 dak., 10°C) %38.14, ultrasonik destekli yöntemde (0.1M NaOH, 30 dak., 40 kHz) ise %34.47 olarak tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar nişasta üretim verimini %25.77 (Wani vd., 2014) olarak rapor etmektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz nişasta verimi literatürden yüksek bulunmuştur. Bu yüksekliğin, bölgesel ve iklimsel koşullar, hasat zamanı ve tür/çeşit farklılıklarından kaynaklandığı öngörülmektedir.

Gizelge 3. Nişasta verimi için varyans analizi
Table 3. Analysis of variance for starch yield

Kaynak Source	Kareler Toplamı Sum of Squares		Serbestlik derecesi Degrees of freedom		Ortalama Kare Mean Square		F Değeri F Value		p-değeri p-value	
	Y ₁	Y ₂	Y ₁	Y ₂	Y ₁	Y ₂	Y ₁	Y ₂	Y ₁	Y ₂
Model	1077.99	925.25	9	9	119.78	102.81	16.04	8.25	< 0.0001	0.0006
X ₁	67.56	55.90	1	1	67.56	55.90	9.05	4.49	0.0109	0.0257
X ₂	12.19	49.67	1	1	12.19	49.67	1.63	3.99	0.2255	0.0690
X ₃	735.85	683.67	2	2	367.93	341.83	49.27	27.44	< 0.0001	< 0.0001
X ₁ X ₂	18.55	3.24	1	1	18.55	3.24	2.48	0.26	0.1410	0.6194
X ₁ X ₃	113.25	51.94	2	2	56.62	25.97	7.58	2.08	0.0074	0.1671
X ₂ X ₃	10.32	1.93	2	2	5.16	0.96	0.69	0.08	0.5199	0.9260
Residual	89.62	149.46	12	12	7.47	12.46				
Lack of Fit	62.02	80.04	7	7	8.86	11.43	1.61	0.82	0.3114	0.6075
Pure Error	27.60	69.43	5	5	5.52	13.89				
Total	1167.61	1074.72	21	21						
R ²	0.92	0.86								
Adjusted R ²	0.87	0.79								
Predicted R ²	0.82	0.75								
PRESS	748.87	548.03								
C.V. (%)	13.51	16.16								

Y₁=Alkali yöntemle üretilen at kestanesi nişastası, Y₂=Ultrason destekli yöntemle üretilen at kestanesi nişastası, X₁=Zaman (saat), X₂=NaOH (%), X₃=Örnek/Çözücü (g/mL), PRESS: Tahmin edilen artık hata kareler toplamı, C.V. (%): Varyasyon katsayısı

Y₁=Horse chestnut starch produced by alkaline method, Y₂=Horse chestnut starch produced by ultrasound assisted method, X₁=Time (h), X₂=NaOH (%), X₃=Sample/Solvent (g/mL), PRESS: Predicted residual error sum of squares, C.V. (%): Coefficient of variation

Kimyasal Özellikler

At kestanesinden alkali (A-HCS) ve ultrason destekli (U-HCS) yöntemlerle üretilen nişastaların kimyasal özellikleri Çizelge 4'te gösterilmiştir. Optimizasyon işlemi sonunda en yüksek verimin elde edildiği noktada üretilen nişastaların kimyasal bileşimleri tespit edilmiştir. A-HCS'nin kimyasal bileşiminde protein, kül ve yağ sırasıyla %0.34±0.07, %0.37±0.05 ve %0.2±0.08 olarak bulunmuştur. U-HCS'nin kimyasal bileşiminde protein, kül ve yağ miktarları sırasıyla %0.36±0.02, %0.56±0.01 ve %0.18±0.01 olarak tespit edilmiştir. Bunlar, izole edilen nişastanın saf olduğunu ve izolasyon yönteminin nişastanın izolasyonunda ve saflaştırılmasında etkili olduğunu göstermektedir (Wani vd., 2014). Benzer çalışmalarda at kestanesi nişastasının %0.20 kül (Castaño vd., 2014), %10.97 nem, %0.31 protein, %0 yağ ve %0.29 kül (Rafiq vd., 2015), %11.14 nem, %0.30 protein, %0.32 kül, %0 yağ (Shah vd., 2016), %11.67 nem, %0.31

protein, %0.33 kül, %0 yağ (Wani vd., 2014) içerdiği bildirilmiştir. A-HCS'nin nem içeriği %6.30 ve U-HCS'nin nem içeriği %9.82 olarak tespit edilmiştir. Nem içeriği nişasta kalitesini ve depolama stabilitesini belirlemektedir (Adedokun ve Itiola, 2010). Ekstraksiyon yönteminin protein ve yağ içeriğini değiştirmediği belirlenmiştir. Nişastaların L* değerleri A-HCS ve U-HCS için sırasıyla 93.61 ve 87.79 olarak tespit edilmiştir. Ultrasonikasyon işleminin örneklerin parlaklık değerlerinde düşüşe neden olduğu belirlenmiştir. Ultrasonikasyon işlemi ile örneklerin a* ve b* değerlerinde ise bir artış tespit edilmiştir. Ultrasonikasyon işlemi ile üretilen nişastalarda renk koyulaşmaktadır. Wani ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada at kestanesi nişastasının L*, a* ve b* değerlerini sırasıyla 97.53-99.09, 0.9-0.56 ve 7.10-8.54 aralığında olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda elde edilen renk değerleri literatür ile benzerlik göstermektedir.

Çizelge 4. At kestanesi nişastalarının kimyasal özellikleri
Table 4. Chemical properties of horse chestnut starches

Parametreler Parameter	A-HCS	U-HCS
Kuru madde (%) Dry matter (%)	93.70±0.15 ^a	90.18±0.08 ^b
Kül (%) Ash (%)	0.37±0.05 ^b	0.56±0.01 ^a
Protein (%) Protein (%)	0.34±0.07 ^a	0.36±0.02 ^a
Yağ (%) Fat (%)	0.12 ± 0.08 ^a	0.18 ± 0.01 ^a
pH pH	9.94±0.07 ^b	10.44±0.02 ^a
Saponin Saponin	ND	ND
Glizozit Glycoside	ND	ND
L*	93.61 ± 0.81 ^a	87.79±0.71 ^b
a*	-1.21 ± 0.11 ^a	-2.55 ± 0.14 ^b
b*	7.86 ± 0.24 ^b	18.14 ± 0.70 ^a

a, b, c, ... harfleri aynı satırdaki örneklerin P<0.05 düzeyinde istatistiksel farklılıklarını göstermektedir ND: Tespit edilemedi, A-HSC: Alkali yöntemle üretilen at kestanesi nişastası, U-HSC: Ultrason destekli yöntemle üretilen at kestanesi nişastası

The letters *a, b, c, ... indicate statistical differences at the P<0.05 level of the samples in the same line ND: Not detected. A-HSC: Horse chestnut starch produced by alkaline method, U-HSC: Horse chestnut starch produced by ultrasound assisted method

Alkali yöntemle üretilen nişastaların daha beyaz, ultrason uygulaması ile üretilen nişastaların ise sarımsı bir renge sahip olduğu tespit edilmiştir. Nişasta örneklerindeki artan 'b*' değerleri, ultrason işlemi ile nişastadan ayrılan monosakkaritlerin karamelizasyona uğramasından kaynaklanmaktadır (Maskan, 2001). At kestanesi, otoyol kenarlarında, park ve bahçelerde yaygın olarak ekilen bir bitkidir. Ancak tohumları toksisitesi nedeniyle insan tüketimi için uygun değildir. Bu bitkinin toksisitesi saponinleri ve glikozitlerinden kaynaklanmaktadır (Yi ve Lee, 2021). Her iki yöntemle üretilen nişastalarda saponin ve glikozitlerin varlığı tespit edilememiştir. Nişasta üretiminin gerçekleştirildiği diğer çalışmalarda saponin ve glikozit varlığının araştırılmadığı tespit edilmiştir. Ekstraksiyonda çözücü olarak NaOH kullanılması nedeniyle ürün bazik pH'da elde edilmiştir.

SONUÇ

Bu çalışmada at kestanesi tohumlarından alkali ve ultrasonik destekli yöntemlerle nişasta ekstrakte edilmiş ve en yüksek nişasta içeriğini sağlayan optimum proses koşulları yanıt yüzey metodolojisi ile belirlenmiştir. En iyi ekstraksiyon performansını örnek/çözgen oranının ve ekstraksiyon süresinin yanıtları etkilemiştir. Her iki yöntemle üretilen nişastaların kimyasal özellikleri tespit edilmiştir. Ultrason destekli yöntem ile üretilen nişastaların sarılık değerinin ve kül içeriğinin alkali yöntemle elde edilen nişastaya göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamız at kestanesi tohumlarından katma değeri yüksek nişasta üretiminin iki farklı yöntemle üretilebileceğini ve optimum koşulları göstermiştir. Doğrulama test sonuçlarına göre alkali yöntemde 38.41 ± 0.18 , ultrason destekli yöntemde ise 32.21 ± 0.77 nişasta ekstraksiyon verimi tespit edilmiş olup alkali yöntemin daha etkili olduğu görülmektedir. Alkali yöntemle üretilen at kestanesi nişastaları başta glutensiz ürünler olmak üzere bazı model gıdalarda kullanıma potansiyeline sahiptir. Fakat gıda sistemlerinde kullanılmadan önce gıdalarda kullanımına izin verilen laktik ya da asetik asit gibi asitlerle nötralize edilmelidir. Ayrıca bu çalışmadan elde edilen bilgilerin alternatif nişasta

kaynakları ile ilgili gelecekteki araştırmalara yol gösterebileceğine inanılmaktadır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu araştırma makalesinde herhangi bir kişi ve/veya kurum ile çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

YAZARLARIN KATKISI

Ali Cingöz; projenin tasarlanması, metodoloji, bulguların değerlendirilmesi ve makale yazımını gerçekleştirmiştir. Zeynep İnatçı; Metodoloji, bulguların değerlendirilmesi ve makalenin düzenlenmesine katkıda bulunmuştur.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma “Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü” tarafından 2022/27 nolu yüksek lisans tez projesi kapsamında desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

AACC. (2004). Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. 11th Edition.

Adedokun, M.O., Itiola, O.A. (2010). Material properties and compaction characteristics of natural and pregelatinized forms of four starches. *Carbohydrate Polymers*, 79(4): 818, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.10.009>.

Ahmad, M., Gani, A., Hassan, I., Huang, Q., Shabbir, H. (2020). Production and characterization of starch nanoparticles by mild alkali hydrolysis and ultra-sonication process. *Scientific Reports*, 109: 435, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60380-0>.

Amiri, S., Shakeri, A., Sohrabi, M., Khalajzadeh, R., Ghasemi, S.E. (2019). Optimization of ultrasonic assisted extraction of fatty acids from *Aesculus hippocastanum* fruit by response surface methodology. *Food Chemistry*, 271: 762, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.144>.

Ankom. (2009). ANKOM Technol Macedon, Rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction-ANKOM technology method 2 AOCS official procedure

- Am 5-04. New York <https://doi.org/10.1201/9780429104527-4>.
- AOAC. (2000). AOAC Official Method. Association of official agricultural chemists, by the United States Department of Agriculture
- Castañó, J., Rodríguez-Lamazares, S., Contreras, K., Carrasco, C., Pozo, C., Bouza, C., Giraldo, D. (2014). Horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) starch: basic physico-chemical characteristics and use as thermoplastic material. *Carbohydrate Polymers*, 112: 677, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.046>.
- Correia, P.R., Beirão-da-Costa, M.L. (2010). Chestnut and acorn starch properties affected by isolation methods. *Starch-Stärke*, 62(8): 421, <https://doi.org/10.1002/star.201000003>.
- Correia, P.R., Beirão-da-Costa, M.L. (2012). Starch isolation from chestnut and acorn flours through alkaline and enzymatic methods. *Food and Bioproducts Processing*, 90(2): 309, <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.06.005>.
- Cukanović, J., Ninić-Todorović, J., Ognjanov, V., Mladenović, E., Ljubojević, M., Kur-jakov, A. (2011). Biochemical composition of horse chestnut seed (*Aesculus hippocastanum* L.). *Archives of Biological Sciences Belgrade*, 63(2): 345.
- Dudek-Makuch, M., Matławska, I. (2011). Flavonoids from the flowers of *Aesculus hippocastanum*. *Acta Polonica Pharmaceutica*, 68(3): 403-408.
- Duque-Acevedo, M., Belmonte-Ureña, L.J., Cortés-García, F.J., Camacho-Ferre, F. (2020). Agricultural waste: Review of the evolution, approaches and perspectives on alternative uses. *Global Ecology and Conservation*, 22: e00902, <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e00902>
- FDA. (2023). *Aesculus hippocastanum* whole. <https://precision.fda.gov/uniisearch/srs/unii/2331W47PSX> (Accessed: 21 November 2024).
- Gullón, P., Gullón, B., Muñiz-Mouro, A., Lú-Chau, T.A., Eibes, G. (2020). Valorization of horse chestnut burs to produce simultaneously valuable compounds under a green integrated biorefinery approach. *Science of the Total Environment*, 730: 139143, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139143>
- Hassan, I., Wani, I.A., Hussain, P.R., Dar, A.H. (2021). Physico-chemical properties of Indian horse chestnut (*aesculus indica*) starch films as affected by γ -irradiation. *Journal of Packaging Technology and Research*, 5(3): 175, <https://doi.org/10.1007/s41783-021-00121-4>.
- Janarthanan, U.K., Varadharajan, V., Krishnamurthy, V. (2012). Physicochemical evaluation, Phytochemical screening and chromatographic fingerprint profile of *Aegle marmelos* (L.) leaf extracts. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 1(3): 813-837.
- Kaur, S., Sharma, S., Dar, B.N., Singh, B. (2012). Optimization of process for reduction of antinutritional factors in edible cereal brans. *Food Science and Technology International*, 18(5): 445-454, <http://dx.doi.org/10.1177/1082013211428236>.
- Lemos, A.M., Abraao, A.S., Cruz, B.R., Morgado, M.L., Rebelo, M., Nunes, F.M. (2015). Effect of granular characteristics on the viscoelastic and mechanical properties of native chestnut starch (*Castanea sativa* Mill). *Food Hydrocolloids*, 51: 317, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.05.021>.
- Lu, Z.H., Donner, E., Yada, R.Y., Liu, Q. (2012). Impact of γ -irradiation, CIPC treatment, and storage conditions on physicochemical and nutritional properties of potato starches. *Food Chemistry*, 133(4): 1195, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.028>.
- Maskan, M. (2001). Kinetics of colour change of kiwifruits during hot air and microwave drying. *Journal of Food Engineering*, 48(2): 169, [https://doi.org/10.1016/s0260-8774\(00\)00154-0](https://doi.org/10.1016/s0260-8774(00)00154-0).
- Molina-Moreno, V., Leyva-Díaz, J.C., Llorens-Montes, F.J., Cortés-García, F.J. (2017). Design of indicators of circular economy as instruments for the evaluation of sustainability and efficiency in wastewater from pig farming industry. *Water*, 9(9): 653, <https://doi.org/10.3390/w9090653>.
- Owczarek-Januszkiewicz, A., Kicel, A., Olszewska, M.A. (2023). *Aesculus hippocastanum* in the pharmaceutical industry and beyond–

- Phytochemistry, bioactivity, present application, and future perspectives. *Industrial Crops and Products*, 193: 116187, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.116187>.
- Rafiq, S.I., Jan, K., Singh, S., Saxena, D.C. (2015). Physicochemical, pasting, rheological, thermal and morphological properties of horse chestnut starch. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9): 5651–5660, <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1692-0>.
- Rafiq, S.I., Muzaffar, K., Rafiq, S.M., Saxena, D.C., Dar, B.N. (2021). Underutilized horse chestnut (*Aesculus indica*) flour and its utilization for the development of gluten-free pasta. *Italian Journal of Food Science*, 33(SP1): 137, <https://doi.org/10.15586/ijfs.v33isp1.2088>.
- Rafiq, S.I., Singh, S., Saxena, D.C. (2016). Effect of heat-moisture and acid treatment on physicochemical, pasting, thermal and morphological properties of Horse Chestnut (*Aesculus indica*) starch. *Food Hydrocolloids*, 57: 103, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.01.009>.
- Shah, U., Gani, A., Ashwar, B.A., Shah, A., Wani, I.A., Masoodi, F.A. (2016). Effect of infrared and microwave radiations on properties of Indian Horse Chestnut starch. *International Journal of Biological Macromolecules*, 84: 166, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.12.020>.
- Singh, G.D., Sharma, R., Bawa, A.S., Saxena, D.C. (2008). Drying and rehydration characteristics of water chestnut (*Trapa natans*) as a function of drying air temperature. *Journal of Food Engineering*, 87(2): 213, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.11.027>.
- Türker, İ., & İşleroglu, H. (2023). Extraction of Bioactive Compounds From Fenugreek Leaves by Maceration with D-Optimal Design. *Gıda*, 48(2): 305-316. <https://doi.org/10.15237/gida.GD22108>
- Vishal Banyal, S., Shukla, A.K., Kumari, A., Kumar, A., Khatak, A., Kumar, M. (2023). Effect of modification on quality parameters of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed starch to valorize its food potential and in-silico investigation of the pharmacological compound against salmonellosis. *Waste and Biomass Valorization*, 14(5): 1610, <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01945-0>.
- Wani, I.A., Jabeen, M., Geelani, H., Masoodi, F.A., Saba, I., Muzaffar, S. (2014). Effect of gamma irradiation on physicochemical properties of Indian Horse Chestnut (*Aesculus indica* Colebr.) starch. *Food Hydrocolloids*, 35: 253, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.06.002>.
- Yi, H.Y., Lee, J.Y. (2021). Poisoning due to consumption of horse chestnut seed. Clinical and experimental emergency medicine. *Clinical and Experimental Emergency Medicine*, 8(4): 333, <https://doi.org/10.15441/ceem.20.004>.

VALORIZATION OF BEETROOT SKIN FOR THE PRODUCTION OF NANOCELLULOSE REINFORCED BIOCOMPOSITE FILMS

Gülşah GÜRBÜZ, Rukiye Nur ÜNGÜR, Emrah KIRTIL*

Department of Chemical Engineering, Gebze Technical University, Kocaeli, Türkiye

Received / Geliş: 13.12.2024; Accepted / Kabul: 14.04.2025; Published online / Online baskı: 25.04.2025

Gürbüz, G., Üngür, R. N., Kirtıl, E. (2025). *Valorization of beetroot skin for the production of nanocellulose reinforced biocomposite films*. GIDA (2025) 50 (3) 329-341 doi: 10.15237/gida.GD24116

Gürbüz, G., Üngür, R. N., Kirtıl, E. (2025). Pancar kabuğunun nanoselüloz ile güçlendirilmiş biyokompozit film üretimi için değerlendirilmesi. GIDA (2025) 50 (3) 329-341 doi: 10.15237/gida.GD24116

ABSTRACT

The extensive use of petroleum-based packaging significantly contributes to environmental pollution, necessitating sustainable alternatives. This study aimed to valorize beetroot skin, an abundant agricultural by-product, by incorporating it into biocomposite films reinforced with crystalline nanocellulose (CNC) to enhance mechanical and barrier properties. Films were produced by blending beetroot skin with gelatin and glycerol, followed by the addition of 3% and 6% CNC. The films were cast, dried, and analyzed for thickness, opacity, color, water solubility, tensile strength, elongation at break, and water vapor permeability. Statistical analysis identified significant differences among formulations. Incorporating 6% CNC increased thickness from 0.12 mm to 0.26 mm, enhanced opacity by 40%, decreased solubility from 60% to below 40%, improved tensile strength from 10 MPa to 15.6 MPa, and reduced water vapor permeability by over 70% to $0.46 \text{ ng} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$. In conclusion, CNC reinforcement successfully improves beetroot skin-based films, potentially offering a viable sustainable biocomposite film solution in packaging applications.

Keywords: Biocomposite, biodegradable film, beetroot skin, crystalline nanocellulose, biodegradable materials, sustainability

PANCAR KABUĞUNUN NANOSELÜLOZ İLE GÜÇLENDİRİLMİŞ BİYOKOMPOZİT FİLM ÜRETİMİ İÇİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZ

Petrol bazlı ambalajların yaygın kullanımı çevre kirliliğine önemli ölçüde katkıda bulunmakta olup, sürdürülebilir alternatifleri zorunlu kılmaktadır. Bu çalışma, bol miktarda tarımsal yan ürün olan pancar kabuğunu değerlendirerek, mekanik ve bariyer özelliklerini artırmak amacıyla kristalin nanoselüloz (CNC) ile güçlendirilmiş biyokompozit filmlerine dahil etmeyi hedeflemiştir. Filmler, pancar kabuğu, jelatin ve gliserolün karıştırılmasıyla üretilmiş, ardından %3 ve %6 CNC eklenmiştir. Filmler dökülmüş, kurutulmuş ve kalınlık, opaklık, renk, suda çözünürlük, çekme mukavemeti, kopma uzaması ve su buharı geçirgenliği açısından analiz edilmiştir. İstatistiksel analiz, formülasyonlar arasında anlamlı farklar belirlemiştir. %6 CNC eklenmesi, kalınlığı 0.12 mm'den 0.26 mm'ye çıkarmış, opaklığı %40 artırmış, çözünürlüğü %60'tan %40'ın altına düşürmüş, çekme mukavemetini 10 MPa'dan 15.6 MPa'ya yükseltmiş ve su buharı geçirgenliğini %70'in üzerinde azaltarak 0.46

* Corresponding author / Sorumlu yazar

✉: emrahkirtıl@gtu.edu.tr

☎: (+90) 542 347 2314

Gülşah Gürbüz; ORCID no: 0009-0007-1051-5955

Rukiye Nur Üngür; ORCID no: 0009-0009-3012-3689

Emrah Kirtıl; ORCID no: 0000-0002-9619-1678

$\text{ng}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$ seviyesine indirmiştir. Sonuç olarak, CNC takviyesi, pancar kabuğuna dayalı biyokompozit filmlerin mekanik ve bariyer özelliklerini başarıyla geliştirmiş olup, uygulanabilir sürdürülebilir bir ambalaj çözümü sunmaktadır.

Anahtar kelimeler: Biyokompozit, biyobozunur ambalaj, pancar kabuğu, kristalin nanoselüloz, biyobozunur malzemeler, sürdürülebilirlik

INTRODUCTION

Packaging is essential for product protection, ensuring quality and safety during storage and transport. However, the extensive use of petroleum-based materials has created a severe environmental crisis. Globally, packaging accounts for 40% of the 353 million tons of plastic waste generated annually, much of which persists for centuries, contributing significantly to pollution and greenhouse gas emissions (Caleb and Belay, 2023; Ghosh et al., 2024). The packaging sector alone is responsible for 19% of the global carbon budget needed to limit warming to 1.5°C, highlighting the urgent need for sustainable alternatives (Verma et al., 2024).

Biodegradable films have emerged as promising solutions, offering sustainability by utilizing natural polymers and waste materials. Agricultural residues like rice husks and sugarcane bagasse are being converted into biopolymers, reducing waste and production costs. These materials align with circular economy principles, transforming waste into resources (Terán Hilares et al., 2018; Vigneswari et al., 2024). With biodegradable films holding a 53% share of the global bioplastics market and an annual production of 1.14 million tons, their adoption in food packaging reflects the dual benefits of environmental protection and economic viability (Fatima et al., 2024).

Despite their potential, the development of biodegradable films faces significant challenges, particularly in mechanical and barrier properties. Biopolymer films often lack the strength, elasticity, and durability required for robust packaging, limiting their performance under stress or prolonged use. Additionally, these films exhibit higher permeability to water vapor and gases compared to synthetic plastics, which can compromise their effectiveness in preserving food (Karimi Sani et al., 2023). Addressing these limitations is crucial, as biodegradable films must match or exceed the performance of conventional materials to gain broader commercial adoption.

Studies have shown that integrating reinforcing agents such as nanocellulose or modifying polymer blends can improve tensile strength and reduce permeability, paving the way for more functional biopolymer films (Ghosh et al., 2024; Ren et al., 2024).

Beetroot (*Beta vulgaris* L.) is a nutrient-rich root vegetable recognized for its high content of bioactive compounds, including betalains, phenolics, dietary fiber, and substantial amounts of cellulose, hemicellulose, and pectin (Chaari et al., 2022; Pedreño and Escribano, 2000). The skin, an abundant byproduct of beetroot processing, is notably rich in betalain pigments (betacyanins and betaxanthins), which not only impart vibrant coloration but also provide antioxidant activity, enhancing UV protection and oxidation resistance in derived films (Pedreño and Escribano, 2000). Due to its low cost, ready availability, and alignment with waste-reduction principles, beetroot skin serves as a promising source of natural polymers for biodegradable films (Zin et al., 2022). Studies have demonstrated that incorporating beetroot skin into film formulations results in bioactive materials with improved mechanical and antioxidant properties, making them suitable for food packaging and preservation (Chaari et al., 2022; Zin et al., 2022). However, to best of our knowledge, there are no studies in literature that uses beetroot skin as the main ingredient to form biocomposite films.

Gelatin has emerged as a widely used film-forming agent due to its biodegradability, edibility, and excellent film-forming capabilities. Derived from collagen, it has been successfully applied in the production of biodegradable films for applications such as food preservation and pharmaceutical coatings. To enhance the mechanical properties of gelatin-based films, glycerol is commonly employed as a plasticizer (Andiati et al., 2023). By reducing brittleness and increasing flexibility, glycerol improves film

usability without compromising structural integrity (Bergo and Sobral, 2007; Jamali et al., 2024). Its compatibility with gelatin and other biopolymers has made it a preferred additive in the formulation of eco-friendly packaging materials (Park et al., 2008).

To overcome the mechanical and barrier limitations of biodegradable films, reinforcing agents like crystalline nanocellulose (CNC) are incorporated to enhance their properties. CNC, derived from cellulose, offers high tensile strength and a large surface area, making it an effective nanofiller in biopolymer matrices. Incorporating CNC can improve tensile strength and reduce permeability, thus enhancing the functionality of biopolymer films (Ren et al., 2024). Chaichi et al. (2017) reported that adding 5% CNC to pectin films increased tensile strength by 84% and reduced water vapor permeability by 40%, demonstrating significant improvements in film performance (Chaichi et al., 2017). Similarly, Reddy and Rhim (2014) found that blending 5% CNC into agar films increased tensile strength by 25% and decreased water vapor permeability by 25%, highlighting CNC's role as a robust reinforcing agent (Reddy and Rhim, 2014).

This study aims to develop sustainable, biocomposite films utilizing beetroot skin, an abundant industrial waste, in combination with gelatin and glycerol. By incorporating CNC at varying concentrations, we seek to enhance the physical and mechanical properties of the films. This innovative approach not only valorizes beetroot skin, contributing to waste reduction and circular economy principles, but also addresses the critical challenge of improving the performance of these films for practical packaging applications. The novelty of this research lies in the synergistic combination of beetroot skin, gelatin, glycerol, and CNC to produce films with superior properties potentially suitable for food packaging. This advancement has the potential to extend shelf life while mitigating environmental pollution caused by conventional plastics, thereby offering a promising solution for eco-friendly packaging materials.

MATERIAL AND METHODS

Materials

Beetroot skins were purchased in bulk (50 kg) from a local grocery store in Gebze, Turkey. Small beetroots were specifically chosen to obtain a higher skin-to-pulp ratio. This single large purchase was made to ensure consistency and minimize variations that could arise from different suppliers or harvest times throughout the study. Gelatin (Type A, from porcine skin) and glycerol ($\geq 99\%$ purity) were obtained from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Darmstadt, Germany). Crystalline nanocellulose (CNC) powder was also sourced from Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Magnesium nitrate hexahydrate ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\geq 98\%$ purity) used for desiccator humidity control was purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). All chemicals were of analytical grade and used without further purification. Distilled water was utilized throughout all experiments.

Methods

Film formation

Films were produced by wet casting method as described by Aydogdu et al. (2018). Beetroot skin powder was prepared by peeling beetroot skins to an approximate thickness of 0.2 mm. The skins were dried at 60 °C for 24 hours, a condition determined through preliminary trials to ensure complete drying. The dried skins were then ground into a fine powder using a coffee grinder (KSPG-4820, Kiwi, Istanbul, Turkey) until a visually uniform powder was obtained.

Beetroot skin powder (8 g) was dispersed in 100 ml distilled water, then gelatin and glycerol were added at either 4% or 8% (w/v), respectively, as per formulations in Table 1. Each mixture was stirred at 60°C and 400 rpm for 10 min (MR 3001 K Hot Plate with Magnetic Stirrer, Heidolph Instruments, Germany) until complete dissolution. The sequence involved adding beetroot skin first, followed by gelatin, then glycerol. After filtration through cheesecloth, 17 ml of each solution was cast into glass petri dishes (10 cm diameter) and dried at 60°C for 17 h (ED 56 Oven, Binder GmbH, Germany). Dried films were stored in a desiccator with $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$.

Table 1. Film Solution Formulations

Sample	Beetroot Skin (% w/v)	Gelatin (% w/v)	Glycerol (% w/v)	CNC (% w/v)
G8G18	8	8	8	0
G8G14	8	8	4	0
G4G18	8	4	8	0
G4G14	8	4	4	0
G8G18-C3	8	8	8	3
G8G14-C3	8	8	4	3
G8G18-C6	8	8	8	6
G8G14-C6	8	8	4	6

For CNC-containing films, CNC was incorporated at 3% or 6% (w/v). CNC was incorporated into films containing 8% w/v gelatin in the film solution. Preliminary mechanical experiments, on the initial trials showed that G8 samples exhibited slightly better mechanical properties (i.e. higher tensile strength) compared to G4 samples. Concentrations were chosen after preliminary trials ensuring stable dispersion. CNC was ultrasonically treated for 4 min at 60% power and 5 cycles (HD2200.2 Ultrasonic Homogenizer, Bandelin Elektronik GmbH and Co. KG, Germany) before adding beetroot skin and proceeding as above. Films were peeled from the glass plates and analyzed within one hour of removal.

Thickness

Film thickness was measured using a digital micrometer (Digimatic Micrometer 293-821-30, Mitutoyo Corp., Japan; accuracy 0.001 mm) at five points per sample (center and four perimeter locations). At least five samples per formulation were measured, and average values with standard deviations were reported (Aydogdu et al, 2018).

Opacity

Opacity was determined with a UV-Vis spectrophotometer (Lambda 35, PerkinElmer Inc., USA) at 600 nm. Rectangular film strips were placed directly in the light path. Absorbance (A_{600}) was recorded, and opacity was calculated as A_{600} divided by film thickness (in mm). Care was taken to avoid fingerprints, wrinkles, or bending (Aydogdu et al, 2018).

Color

Color parameters (L^* , a^* , b^*) were measured using a Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta, Japan) calibrated with a white reference. Films were placed on a white background, and readings were taken at five distinct points per sample. The color parameters were recorded in the CIE Lab^* color space system, where:

- L^* represents the lightness index (ranging from 0 [black] to 100 [white]),
- a^* indicates the red-green coordinate (positive values for red, negative values for green),
- b^* indicates the yellow-blue coordinate (positive values for yellow, negative values for blue).

Bulk density

Samples were prepared by cutting 20×20 mm² square pieces from the films, and an average thickness (x) was determined from three random measurements on these samples. The samples were then dried in a vacuum oven at 70°C for 48 h and weighed. The density was calculated as the ratio of the weight to the volume ($x \times \text{Area}$) of the film (Aydogdu et al, 2018).

Water solubility

Square film samples ($2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$) were dried at 60°C for 24 h, weighed (W_i), then immersed in distilled water at $\sim 25^\circ\text{C}$ for 24 h. After immersion, undissolved material was dried again at 60°C for 24 h and weighed (W_f) (Aydogdu et al, 2018).

The solubility percentage (S) of the films was calculated using Equation 1:

$$S(\%) = \frac{W_i - W_f}{W_i} \times 100 \quad [1]$$

Mechanical properties

Mechanical tests were conducted using a universal testing machine (Z250, Zwick/Roell, Germany) equipped with a flat-faced tensile grip. Film strips (5 mm × 50 mm) conditioned at 50% RH and 23±2°C for 48 h were tested at 25 mm/min crosshead speed. Tensile strength and elongation at break were calculated from the stress-strain data (Aydogdu Emir et al, 2023).

Water vapor permeability (WVP)

Water vapor permeability (WVP) was measured using a modified gravimetric cup method (ASTM E96/E96M-16). The method was used in the author's previous studies (Kirtil et al, 2021). Custom permeability cups (40 mm inner diameter) were filled with 30 ml distilled water to maintain 100% RH inside. Films were sealed onto the cup mouths with rubber gaskets and screw-on lids, ensuring water vapor diffused only through the film surface. Cups were placed in desiccators with silica gel to create a low-RH environment outside; actual outside RH (~15%) was monitored with a digital hygrometer. Each cup was weighed initially and at 1 h intervals for 10 h using an analytical balance (As 220.R2 Plus, Radwag, Radom, Poland; accuracy 0.0001 g). Weight loss over time was plotted, and the linear slope normalized by exposed film area (A) provided the water vapor transmission rate (WVTR).

WVP was calculated by Equation 2:

$$WVP = \frac{WVTR \times \Delta x}{\Delta P} \quad [2]$$

where WVTR is the water vapor transmission rate ($\text{g m}^{-2} \text{s}^{-1}$), Δx is the average film thickness (m), ΔP is the water vapor partial pressure difference across the film (Pa).

The partial pressure difference (ΔP) was calculated using Equation 3:

$$\Delta P = P_{\text{sat}}(RH_i - RH_o) \quad [3]$$

where P_{sat} is the saturation vapor pressure of water at the experimental temperature, obtained from standard reference tables, RH_i is the relative humidity inside the cup (100%), RH_o is the measured relative humidity outside the cup. For

each measurement interval, the RH_o was recorded, and the corresponding ΔP was calculated accordingly.

Statistical analysis

All experiments were conducted using three independent film samples, with each measurement repeated three times for replicates. Data are reported as mean values±standard deviation (SD). Statistical analysis was performed using JMP Pro 18 Student Version (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). One-way analysis of variance (ANOVA) was applied to evaluate significant differences among film solution formulations at a significance level of $P<0.05$. Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) post hoc test was used for pairwise comparisons when significant differences were detected.

RESULTS AND DISCUSSION

Thickness

The thickness of films directly affects their mechanical properties, water vapor permeability, and integrity (Park et al., 2008). In this study, thickness values ranged from 0.118 ± 0.003 mm (G4G14) to 0.258 ± 0.003 mm (G8G18-C6) (Table 2), reflecting the influence of varying glycerol, gelatin, and CNC content, as well as the incorporation of beetroot skin. Higher glycerol concentrations significantly increased thickness compared to lower-glycerol formulations, attributed to the plasticizing effect of glycerol, which enhances molecular mobility during drying (Bergo and Sobral, 2007). In line with the study's goal of improving film properties through natural wastes like beetroot skin and CNC reinforcement, the addition of CNC also led to marked increases in thickness. For example, G8G18-C6, showed the highest thickness, consistent with findings by Chaichi et al. (2017), who reported increased thickness in pectin films containing CNC. This reinforcement occurs through CNC's network formation and hydrogen bonding with the gelatin and beetroot skin matrix (Reddy and Rhim, 2014).

Increasing CNC from 3% to 6% further boosted thickness, highlighting CNC's ability to create a denser structure. Similarly, higher gelatin and glycerol contents (G8G18) increased thickness by

elevating the solid fraction and improving material dispersion, including beetroot skin particles (Andiati et al., 2023). The thickness values observed here align with those reported for

other gelatin-glycerol films and CNC-based bioplastics, typically 0.100–0.300 mm (Park et al., 2008; Ren et al., 2024).

Table 2. Physical properties of films

Sample Names	Thickness (mm)	Opacity	L^*	a^*	b^*
G4G14	0.118 ± 0.003^h	10.35 ± 0.13^c	24.4 ± 0.5^c	20.6 ± 0.6^{ab}	7.6 ± 0.6^c
G4G18	0.143 ± 0.003^{fg}	10.18 ± 0.24^c	24.1 ± 0.8^c	20.9 ± 0.2^a	7.8 ± 0.4^c
G8G14	0.158 ± 0.002^f	10.38 ± 0.16^c	24.2 ± 0.6^c	20.7 ± 0.6^{ab}	7.6 ± 0.3^c
G8G18	0.185 ± 0.001^{de}	10.48 ± 0.16^c	24.4 ± 0.6^c	20.9 ± 0.4^a	7.5 ± 0.5^c
G8G14-C3	0.198 ± 0.003^d	12.62 ± 0.13^b	29.3 ± 0.6^b	20.4 ± 0.1^{ab}	13.2 ± 0.3^b
G8G18-C3	0.215 ± 0.002^c	12.73 ± 0.19^b	29.4 ± 0.6^b	20.5 ± 0.2^{ab}	12.9 ± 0.3^b
G8G14-C6	0.233 ± 0.002^b	14.85 ± 0.15^a	34.1 ± 0.5^a	19.9 ± 0.2^b	17.6 ± 0.3^a
G8G18-C6	0.258 ± 0.003^a	14.54 ± 0.11^a	34.5 ± 0.6^a	19.8 ± 0.2^b	17.5 ± 0.4^a

Sample Names	Bulk Density (g/cm ³)	Water Solubility (%)	Tensile Strength (MPa)	Elongation at Break (%)	WVP (ng·m ⁻¹ ·s ⁻¹ ·Pa ⁻¹)
G4G14	0.692 ± 0.008^d	64.3 ± 1.5^c	10.58 ± 0.14^c	49.5 ± 1.3^{cd}	2.051 ± 0.048^b
G4G18	0.673 ± 0.007^d	75.3 ± 2.1^a	10.02 ± 0.16^c	58.4 ± 0.8^a	2.423 ± 0.074^a
G8G14	0.753 ± 0.005^c	59.7 ± 1.5^{cd}	12.89 ± 0.25^c	47.5 ± 1.4^{de}	1.554 ± 0.092^d
G8G18	0.735 ± 0.004^c	70 ± 2.1^b	11.89 ± 0.16^d	58.3 ± 0.8^a	1.857 ± 0.044^c
G8G14-C3	0.865 ± 0.011^a	49.7 ± 1.8^e	14.42 ± 0.25^b	46.3 ± 0.9^{ef}	0.850 ± 0.035^f
G8G18-C3	0.780 ± 0.005^b	55 ± 2.0^d	13.42 ± 0.25^c	53.2 ± 1.3^b	1.053 ± 0.076^e
G8G14-C6	0.872 ± 0.012^a	39.7 ± 1.7^g	15.62 ± 0.15^a	44.4 ± 1.0^f	0.458 ± 0.059^g
G8G18-C6	0.858 ± 0.007^{ab}	44.7 ± 1.6^f	14.96 ± 0.20^b	52.2 ± 1.0^{bc}	0.651 ± 0.031^{fg}

The increase in thickness observed, particularly in CNC-rich formulations, may also contribute to enhanced opacity and improved moisture barrier properties. Thicker films generally present more tortuous paths for light transmission and water diffusion, potentially augmenting the optical density and reducing WVP. This relationship aligns with the denser, CNC-rich structures previously observed, highlighting the interconnectedness of thickness, opacity, and barrier functionality.

Opacity

Opacity is a critical optical property of films, influencing both visual appeal and protection against light-induced quality loss in packaged foods (Chaari et al., 2022). In line with the study's goal of utilizing beetroot skin and CNC to

enhance film functionality, our results showed that opacity ranged from 10.18 ± 0.24 to 14.85 ± 0.15 (Table 2), with formulations containing CNC consistently more opaque. Films without CNC maintained relatively low opacity values (around 10.18–10.48), attributed to a more homogenous distribution of gelatin and glycerol that reduces light scattering (Bergo and Sobral, 2007). The inclusion of beetroot skin, rich in natural pigments, likely contributed to the base-level opacity, providing a foundation upon which CNC further influenced optical properties.

In contrast, adding CNC significantly heightened opacity, as seen in G8G14-C3 (12.62 ± 0.13) and G8G14-C6 (14.85 ± 0.15). This effect arises from CNC's high refractive index and nanoscale dimensions, which increase light scattering within

the dense biopolymer matrix (Chaichi et al., 2017). Increasing CNC content from 3% to 6% consistently amplified this effect, indicating that CNC concentration outweighs slight compositional shifts in gelatin or glycerol.

Although higher gelatin content (e.g., G8G18) marginally increased opacity (10.48 ± 0.16) compared to lower-gelatin films (e.g., G4G18), these differences were not statistically significant. Similar observations have been reported for gelatin-glycerol systems (Park et al., 2008). Literature comparisons further support these findings: CNC additions have been shown to raise opacity by 25–30% in pectin-based films (Chaichi et al., 2017), and analogous results were reported in agar films (Reddy and Rhim, 2014).

Interestingly, the same CNC-induced structural densification that increased opacity and influenced color parameters may also reinforce the polymer network. This structural reinforcement appears to improve mechanical strength while concurrently reducing WVP, illustrating how modifications that affect optical characteristics can cascade into improvements in mechanical robustness and barrier efficiency. These results confirm that CNC plays a dominant role in modulating opacity, building on the inherent contributions of beetroot skin and providing a strategic pathway to tailor optical properties in sustainable, bio-based packaging materials.

Color and appearance

The color and appearance of the films are pivotal for both their visual appeal and potential functional roles, such as providing light protection. Evaluations using the CIE *Lab* system (L^* , a^* , b^*) and examining surface characteristics allowed for an objective analysis of these properties (Pedreño and Escribano, 2000). In line with the study's goal of creating functional films from beetroot skin and CNC, the variations in color metrics presented in Table 2 and Figure 1 offer valuable insights into how composition influences film properties.

L^* values ranged from 24.1 ± 0.8 (G4G18) to 34.5 ± 0.6 (G8G18-C6). Films without CNC (top 2 rows, Figure 1) appeared darker, while those incorporating CNC (bottom 2 rows, Figure 1) were significantly lighter ($P < 0.05$), reflecting CNC's light-scattering properties (Chaichi et al., 2017). Increasing CNC content further brightened the films. Regarding a^* , values were relatively stable (19.8 ± 0.2 to 20.9 ± 0.2), but non-CNC films showed slightly more pronounced redness. Beetroot skin's betalains likely contributed to this hue, while CNC addition diluted these pigments, reducing redness in samples such as G8G18-C6 (Pedreño and Escribano, 2000).

In contrast, b^* values increased substantially with CNC, rising from about 7.5–7.8 in non-CNC films to 17.6 ± 0.3 in G8G14-C6. This enhancement in yellowness may result from the interaction of CNC with the polymer-beetroot matrix, increasing light scattering and altering optical perception (Reddy and Rhim, 2014). Surface characteristics, shown in Figure 1, also changed markedly. Films without CNC (top rows) were smooth and uniform, while those with CNC (bottom rows) exhibited greater heterogeneity. At higher CNC concentrations, structures like G8G18-C6 showed pronounced bumps, likely due to CNC aggregation—a phenomenon also reported in agar films (Reddy and Rhim, 2014). Overall, CNC integration influenced the optical and surface properties by brightening the films, shifting their color metrics, and increasing surface irregularities, while the beetroot skin contributed base-level pigmentation.

Bulk density

Bulk density, shown in Table 2, reflects the compactness of the films and their potential effects on mechanical and barrier properties (Bergo and Sobral, 2007). In line with the study's goal of developing sustainable films from beetroot skin and CNC, films without CNC, such as G4G14 (0.692 ± 0.008) and G4G18 (0.673 ± 0.007), exhibited lower bulk densities, indicating that glycerol variations alone did not significantly enhance compactness. Although glycerol improves flexibility by increasing

molecular mobility (Bergo and Sobral, 2007), it contributes minimally to density when reinforcing agents are absent. In contrast, elevating gelatin content yielded denser matrices (G8G14:

0.753 ± 0.005 ; G8G18: 0.735 ± 0.004), likely due to greater solid fractions that incorporate beetroot skin polymers more effectively (Andiati et al., 2023).

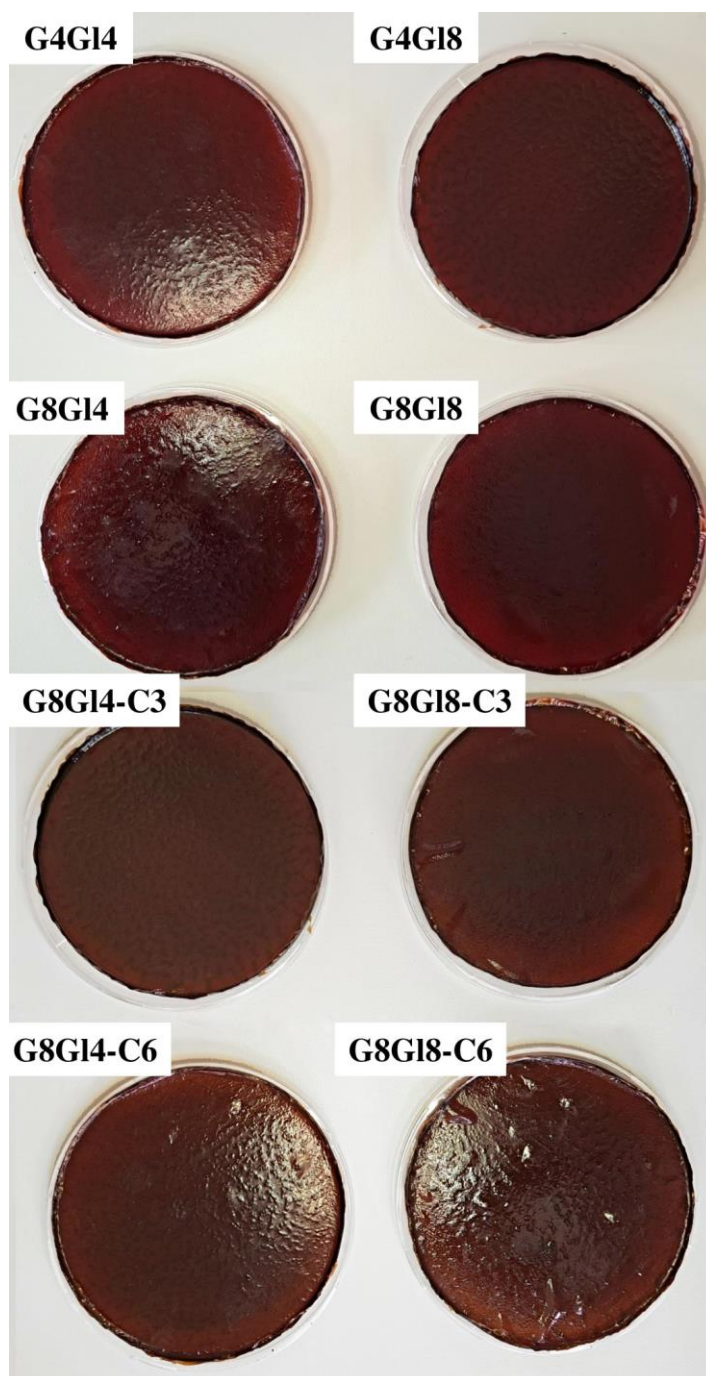


Figure 1. Photos of film samples

Incorporating CNC significantly increased bulk density ($P < 0.05$). G8G14-C3 (0.865 ± 0.011) and G8G14-C6 (0.872 ± 0.012) were markedly denser than G8G14 (0.753 ± 0.005), and similarly, G8G18-C3 (0.780 ± 0.005) and G8G18-C6 (0.858 ± 0.007) surpassed G8G18 (0.735 ± 0.004). These findings, supported by Table 2, suggest that CNC establishes hydrogen bonds with gelatin and beetroot skin constituents, creating more compact networks (Chaichi et al., 2017; Reddy and Rhim, 2014). Increasing CNC concentration further reduced void spaces and enhanced matrix packing, in agreement with previous reports on CNC's reinforcing effects in pectin films (Chaichi et al., 2017). Although G8G14-C6, G8G18-C6 and G8G18-C3 showed high densities, their differences were not statistically significant, indicating that once CNC levels are elevated, variations in glycerol content have a diminished influence on density.

As bulk density rises due to the incorporation of CNC, the films not only become mechanically stronger but also less permeable to water vapor, with lower solubility. This compact, tightly bound matrix correlates with the reduced free volume and enhanced intermolecular interactions that govern mechanical integrity, water resistance, and moisture barrier performance.

These bulk density values align with those observed in CNC-reinforced agar films (Reddy and Rhim, 2014) and fall within a comparable range to other biopolymer matrices. The mechanism involves CNC filling interstitial gaps, thereby reducing porosity and improving compactness (Ren et al., 2024). This synergy between beetroot skin, gelatin, glycerol and CNC contributes to developing denser, high-performance biopolymer films, advancing their potential application in sustainable packaging solutions.

Water solubility

Solubility is a critical parameter in biodegradable films, reflecting their water resistance and suitability for various packaging applications (Cheng et al., 2024). The results, presented in Table 2, indicate how variations in gelatin,

glycerol, and CNC content, as well as the inclusion of beetroot skin, influence water solubility. In line with the study's goal of developing sustainable, functional films from beetroot skin and CNC, formulations without CNC (e.g., G4G14: 64.3 ± 1.5 ; G4G18: 75.3 ± 2.1) were more soluble. The higher solubility of G4G18 compared to G4G14 ($P < 0.05$) can be attributed to increased glycerol, which enhances hydrophilicity by disrupting polymer-polymer interactions and absorbing water (Bergo and Sobral, 2007; Park et al., 2008). Likewise, G8G18 (70 ± 2.1) showed greater solubility than G8G14 (59.7 ± 1.5) ($P < 0.05$), reinforcing glycerol's role in promoting water uptake.

Incorporating CNC significantly reduced solubility ($P < 0.05$), as observed when comparing G8G14-C3 (49.7 ± 1.8) and G8G14-C6 (39.7 ± 1.7) with G8G14 (59.7 ± 1.5). A similar pattern emerged for G8G18-C3 (55 ± 2.0) and G8G18-C6 (44.7 ± 1.6) relative to G8G18 (70 ± 2.1). CNC's hydrophobicity and ability to form dense, interwoven networks with gelatin and beetroot-derived polymers limit water penetration (Chaichi et al., 2017; Ren et al., 2024). Increasing CNC concentration further enhanced water resistance, compacting the matrix and reducing polymer chain mobility. These trends align with earlier studies, where CNC addition in agar films lowered solubility by creating a more crystalline, impermeable structure (Reddy and Rhim, 2014; Xiao et al., 2021).

Higher gelatin content (e.g., G8G14 vs. G4G14) also contributed to reduced solubility, as stronger intermolecular networks form more water-resistant matrices (Andiati et al., 2023). However, once CNC was incorporated at elevated levels, its impact overshadowed gelatin and glycerol effects. The reduced solubility in CNC-rich formulations reflects a tighter, more crystalline network that simultaneously supports higher tensile strength and greater opacity. By limiting water ingress, CNC helps maintain the structural integrity of the film, thereby influencing parameters like mechanical resilience and even color stability over storage.

Mechanical properties

Mechanical properties such as tensile strength and elongation at break are essential parameters for assessing the durability and performance of films in packaging applications (Fatima et al., 2024). The results in Table 2 show that variations in gelatin, glycerol, and CNC content, as well as the inclusion of beetroot skin, significantly influenced these properties. In line with the study's goal of creating robust, eco-friendly films from beetroot skin and CNC, careful adjustment of these components yielded distinct mechanical behaviors suitable for different end-uses.

Tensile strength values ranged from 10.02 ± 0.16 MPa (G4G18) to 15.62 ± 0.15 MPa (G8G14-C6). Formulations without CNC, such as G4G18 and G8G18, exhibited comparatively lower tensile strengths, primarily due to glycerol's plasticizing effect, which diminishes intermolecular interactions within the matrix (Bergo and Sobral, 2007). Increasing gelatin content, as observed in G8G14 compared to G4G14, enhanced tensile strength ($P < 0.05$) by promoting a stronger polymer network that likely interacts favorably with the beetroot skin's inherent biopolymers (Andiati et al., 2023). The substantial improvements in tensile strength upon CNC addition, especially in G8G14-C6 and G8G18-C6, can be attributed to CNC's ability to form hydrogen bonds with the matrix, reinforcing the structure and integrating with beetroot-derived polymers to produce a denser, more cohesive network (Chaichi et al., 2017). Lower glycerol content further amplified CNC's reinforcing effect, as excess glycerol can disrupt polymer packing (Park et al., 2008).

Elongation at break displayed a contrasting trend. Films with higher glycerol content, such as G4G18 ($58.4 \pm 0.8\%$) and G8G18 ($58.3 \pm 0.8\%$), had significantly greater elongation at break ($P < 0.05$), reflecting increased flexibility and molecular mobility (Bergo and Sobral, 2007; Reddy and Rhim, 2014). In contrast, CNC incorporation reduced elongation by introducing rigidity and reducing polymer chain mobility (Ren et al., 2024). Nonetheless, intermediate CNC concentrations (3%) offered a compromise, as

seen in G8G14-C3 and G8G18-C3, which maintained moderate elongation while still benefiting from CNC's reinforcing properties (Chaari et al., 2022).

These mechanical enhancements, stemming from CNC-induced matrix reinforcement, also coincide with reductions in WVP and adjustments in opacity, indicating that a single structural modification can produce widespread improvements in both protective functions and visual characteristics of the film. These findings underscore the delicate interplay among beetroot skin components, gelatin, glycerol, and CNC, enabling the tailoring of mechanical attributes. By balancing rigidity and extensibility, it is possible to produce films with specific mechanical profiles that meet varying packaging requirements. The improved tensile strength from CNC reinforcement and the tunable elongation achieved through glycerol adjustments highlight a versatile strategy for developing sustainable, high-performance biodegradable films.

Water vapor permeability (WVP)

Water vapor permeability (WVP) is a crucial parameter in films particularly the ones designed for food packaging applications, since it reflects their capacity to serve as moisture barriers and maintain food quality (Henning et al., 2022). The results presented in Table 2 show that formulations without CNC, including those containing beetroot skin, exhibited relatively high WVP values. For instance, G4G18 recorded 2.423 ± 0.074 $\text{ng} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$, significantly higher than G4G14 (2.051 ± 0.048 $\text{ng} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$) ($P < 0.05$), a difference primarily linked to the higher glycerol content. Glycerol, as a hydrophilic plasticizer, disrupts polymer networks (including those formed by beetroot-derived polymers) and increases water affinity, thus raising WVP (Bergo and Sobral, 2007; Park et al., 2008). A similar pattern appeared in G8G14 (1.554 ± 0.092 $\text{ng} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$) and G8G18 (1.857 ± 0.044 $\text{ng} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$), confirming glycerol's influence on permeability.

In contrast, incorporating CNC markedly reduced WVP, reflecting CNC's ability to form dense,

crystalline networks that limit water diffusion. In line with the study's objective of enhancing functional properties through CNC addition to beetroot skin-based films, G8G14-C3 ($0.850 \pm 0.035 \text{ ng} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$) and G8G14-C6 ($0.458 \pm 0.059 \text{ ng} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$) displayed substantial improvements compared to G8G14 ($1.554 \pm 0.092 \text{ ng} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$) ($P < 0.05$). Similarly, G8G18-C3 ($1.053 \pm 0.076 \text{ ng} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$) and G8G18-C6 ($0.651 \pm 0.031 \text{ ng} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$) surpassed G8G18 ($1.857 \pm 0.044 \text{ ng} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$), demonstrating CNC's efficacy even in formulations with high glycerol levels (Chaichi et al., 2017; Ren et al., 2024).

Higher CNC concentrations (6%) yielded the lowest WVP values, with G8G14-C6 achieving the most pronounced reduction. CNC's rigid, hydrogen-bonding structures minimize free volume and create tortuous paths for water molecules, counteracting the permeation-facilitating effect of glycerol (Chaari et al., 2022; Reddy and Rhim, 2014). Notably, even in glycerol-rich matrices, CNC significantly offset glycerol's negative influence, as evidenced by G8G18-C6.

The synergy between beetroot skin's intrinsic biopolymers and CNC not only affects thickness and color but also leads to improved mechanical strength and lower WVP. As beetroot-derived polymers integrate into the denser, CNC-reinforced network, they contribute not only to the film's base opacity but also support the overall structural cohesion that underpins improved barrier, mechanical, and optical performance. These findings highlight CNC's dominant role in improving moisture barrier properties, providing a key strategy to enhance WVP in beetroot skin-based biocomposite films. By incorporating CNC, it is possible to produce films with greater resistance to water vapor transmission, potentially extending shelf life and maintaining product quality.

CONCLUSION

This study demonstrates that beetroot skin, an underutilized agro-industrial residue, can serve as a viable base material for producing biocomposite

films when combined with gelatin and glycerol. By incorporating crystalline nanocellulose (CNC), the films achieved substantial enhancements in mechanical strength, density, and moisture barrier properties, surpassing the limitations commonly observed in many biopolymer-based materials. In particular, the CNC-reinforced formulations exhibited reduced solubility, improved tensile strength, and significantly lowered water vapor permeability, indicating their potential for maintaining product quality and extending shelf life in food packaging applications.

Beyond improving functional performance, the developed films retained appealing optical characteristics, with beetroot-derived pigments imparting a distinctive coloration. Although introducing CNC altered film opacity and surface texture, the overall aesthetic remained suitable for commercial uses. The synergy between beetroot skin polymers and CNC created a denser, more cohesive network that balanced rigidity and flexibility, enabling customization of the films' mechanical attributes by adjusting glycerol and CNC concentrations.

These findings highlight the promise of valorizing agricultural byproducts to produce advanced, eco-friendly packaging solutions. The approach aligns with circular economy principles, transforming waste streams into value-added products while mitigating reliance on conventional petroleum-based plastics. Future investigations may focus on fine-tuning CNC content, exploring additional biopolymer combinations, and assessing the films' performance under various storage conditions. By refining these strategies, it may be possible to further improve functional, sensory, and environmental attributes, ultimately guiding this emerging technology toward broader industrial adoption.

ACKNOWLEDGEMENTS

We extend our gratitude to the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBİTAK) for their support in funding this research. This project was funded under the TÜBİTAK 2209 Research Project Support

Program for Undergraduate Students with project number 1919B012305855.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Emrah Kirtıl: Conceptualization, Methodology, Data Curation, Formal Analysis, Writing – Original Draft, Writing – Review Editing, Supervision, Project Administration; Rukiye Nur Üngür: Methodology, Investigation; Gülşah Gürbüz: Methodology, Investigation, Visualization

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest that could have influenced the conduct, interpretation, or publication of this research.

REFERENCES

- Andiati, H. A., Gumilar, J., Wulandari, E. (2023). Utilization of Duck Feet Gelatin with the Additional Glycerol as A Plasticizer on the Physical Properties of Edible Film. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*, 10(3), 289–299, doi:10.23960/JIPT.V10I3.P289-299
- Aydogdu, A., Kirtıl, E., Sumnu, G., Oztop, M. H., Aydogdu, Y. (2018). Utilization of lentil flour as a biopolymer source for the development of edible films. *Journal of Applied Polymer Science*, doi:10.1002/app.46356
- Aydogdu Emir, A., Akgun, M., Kirtıl, E. (2023). Effect of mastic gum integration on improvement of polylactic acid biodegradable films. *Polymer Engineering and Science*, doi:10.1002/PEN.26304
- Bergo, P., Sobral, P. J. A. (2007). Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 21(8), 1285–1289, doi:10.1016/J.FOODHYD.2006.09.014
- Caleb, O. J., Belay, Z. A. (2023). Role of biotechnology in the advancement of biodegradable polymers and functionalized additives for food packaging systems. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 83). Elsevier Ltd, doi:10.1016/j.copbio.2023.102972
- Chaari, M., Elhadeif, K., Akermi, S., Ben Akacha, B., Fourati, M., Chakchouk Mtibaa, A., Ennouri, M., Sarkar, T., Shariati, M. A., Rebezov, M., Abdelkafi, S., Mellouli, L., Smaoui, S. (2022).

Novel Active Food Packaging Films Based on Gelatin-Sodium Alginate Containing Beetroot Peel Extract. *Antioxidants* 2022, Vol. 11, Page 2095, 11(11), 2095, doi:10.3390/ANTIOX11112095

Chaichi, M., Hashemi, M., Badii, F., Mohammadi, A. (2017). Preparation and characterization of a novel bionanocomposite edible film based on pectin and crystalline nanocellulose. *Carbohydrate Polymers*, 157, 167–175, doi:10.1016/J.CARBPOL.2016.09.062

Cheng, J., Gao, R., Zhu, Y., Lin, Q. (2024). Applications of biodegradable materials in food packaging: A review. In *Alexandria Engineering Journal* (Vol. 91, pp. 70–83). Elsevier B.V, doi:10.1016/j.aej.2024.01.080

Fatima, S., Khan, M. R., Ahmad, I., Sadiq, M. B. (2024). Recent advances in modified starch based biodegradable food packaging: A review. In *Heliyon* (Vol. 10, Issue 6). Elsevier Ltd, doi:10.1016/j.heliyon.2024.e27453

Ghosh, T., Roy, S., Khan, A., Mondal, K., Ezati, P., Rhim, J. W. (2024). Agricultural waste-derived cellulose nanocrystals for sustainable active food packaging applications. In *Food Hydrocolloids* (Vol. 154). Elsevier B.V, doi:10.1016/j.foodhyd.2024.110141

Henning, F. G., Ito, V. C., Demiate, I. M., Lacerda, L. G. (2022). Non-conventional starches for biodegradable films: A review focussing on characterisation and recent applications in food packaging. In *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* (Vol. 4). Elsevier Ltd, doi:10.1016/j.carpta.2021.100157

Jamali, A. R., Shaikh, A. A., Dad Chandio, A. (2024). Preparation and characterisation of polyvinyl alcohol/glycerol blend thin films for sustainable flexibility. *Materials Research Express*, 11(4), doi:10.1088/2053-1591/AD4100

Karimi Sani, I., Masoudpour-Behabadi, M., Alizadeh Sani, M., Motalebinejad, H., Juma, A. S. M., Asdagh, A., Eghbaljoo, H., Khodaei, S. M., Rhim, J. W., Mohammadi, F. (2023). Value-added utilization of fruit and vegetable processing by-products for the manufacture of biodegradable food packaging films. In *Food Chemistry* (Vol. 405).

- Elsevier Ltd, doi:10.1016/j.foodchem.2022.134964
- Kirtil, E., Aydogdu, A., Svitova, T., Radke, C. J. (2021). Assessment of the performance of several novel approaches to improve physical properties of guar gum based biopolymer films. *Food Packaging and Shelf Life*, 29(June), 100687, doi:10.1016/j.fpsl.2021.100687
- Park, J. W., Scott Whiteside, W., Cho, S. Y. (2008). Mechanical and water vapor barrier properties of extruded and heat-pressed gelatin films. *Lwt - Food Science and Technology*, 41(4), 692–700, doi:10.1016/J.LWT.2007.04.015
- Pedreño, M. A., Escribano, J. (2000). Studying the oxidation and the antiradical activity of betalain from beetroot. *Journal of Biological Education*, 35(1), 49–51, doi:10.1080/00219266.2000.9655736
- Reddy, J. P., Rhim, J. W. (2014). Characterization of bionanocomposite films prepared with agar and paper-mulberry pulp nanocellulose. *Carbohydrate Polymers*, 110, 480–488, doi:10.1016/J.CARBPOL.2014.04.056
- Ren, H., Huang, Y., Yang, W., Ling, Z., Liu, S., Zheng, S., Li, S., Wang, Y., Pan, L., Fan, W., Zheng, Y. (2024). Emerging nanocellulose from agricultural waste: Recent advances in preparation and applications in biobased food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, 277, 134512, doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2024.134512
- Terán Hilares, R., Kamoei, D. V., Ahmed, M. A., da Silva, S. S., Han, J. I., Santos, J. C. dos. (2018). A new approach for bioethanol production from sugarcane bagasse using hydrodynamic cavitation assisted-pretreatment and column reactors. *Ultrasonics Sonochemistry*, 43, 219–226, doi:10.1016/j.ultsonch.2018.01.016
- Verma, S. K., Prasad, A., Sonika, Katiyar, V. (2024). State of art review on sustainable biodegradable polymers with a market overview for sustainability packaging. In *Materials Today Sustainability* (Vol. 26). Elsevier Ltd, doi:10.1016/j.mtsust.2024.100776
- Vigneswari, S., Kee, S. H., Hazwan, M. H., Ganeson, K., Tamilselvan, K., Bhubalan, K., Amirul, A. A., Ramakrishna, S. (2024). Turning agricultural waste streams into biodegradable plastic: A step forward into adopting sustainable carbon neutrality. In *Journal of Environmental Chemical Engineering* (Vol. 12, Issue 2). Elsevier Ltd, doi:10.1016/j.jece.2024.112135
- Xiao, Y., Liu, Y., Kang, S., Xu, H. (2021). Insight into the formation mechanism of soy protein isolate films improved by cellulose nanocrystals. *Food Chemistry*, 359, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2021.129971
- Zin, M. M., Alsobh, A., Nath, A., Csighy, A., Bánvölgyi, S. (2022). Concentrations of Beetroot (Beta vulgaris L.) Peel and Flesh Extracts by Reverse Osmosis Membrane. *Applied Sciences* 2022, Vol. 12, Page 6360, 12(13), 6360, doi:10.3390/APP12136360

CHLORELLA VULGARIS İLAVESİNİN EKMEK KALİTE KRİTERLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

**Fatma DEMİRCİOĞLU¹, Ayşe Neslihan DÜNDAR^{*1},
Oya Irmak ŞAHİN², Furkan Türker SARICAOĞLU¹**

¹ Bursa Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bursa, Türkiye

² Yalova Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Yalova, Türkiye

Geliş / Received 12.12.2024; Kabul / Accepted: 18.04.2025; Online baskı / Published online: 25.04.2025

Demircioğlu, F., Dündar, A. N., Şahin, O. I., Sarıcaoğlu, F. T. (2025). *Chlorella vulgaris* ilavesinin ekmek kalite kriterleri üzerine etkisi. GIDA (2025) 50 (3) 342-360 doi: 10.15237/ gida.GD24115

Demircioğlu, F., Dündar, A. N., Şahin, O. I., Sarıcaoğlu, F. T. (2025). *The effect of Chlorella vulgaris addition on bread quality criteria. GIDA (2025) 50 (3) 342-360 doi: 10.15237/ gida.GD24115*

ÖZ

Mikroalgler, protein, yağ asitleri, mineral, vitamin, fenolik ve antioksidan gibi besinsel bileşenleri sayesinde düşük besin değerine sahip glutensiz ekmek gibi yeni ve fonksiyonel ürünlerin geliştirilmesinde bir besin kaynağı olarak kullanılabilir. Bu çalışmada, mısır ununa %1, 3, 6 ve 10 oranlarında *Chlorella vulgaris* ilave edilerek üretilen mısır ekmeklerinin (CME) fizikokimyasal, fonksiyonel ve duyuşal özellikleri incelenmiştir. *Chlorella* ilavesi, protein, kül, yağ, su tutma kapasitesi ve antioksidan değerlerinde artışa, nem, hacim ve duyuşal parametrelerde ise azalmaya neden olmuştur. Duyusal değerlendirilmede kontrol ekmeği en yüksek puanları alırken, *Chlorella*'nın kendine has rengi, kokusu ve tadı tüketici kabul edilebilirliğini düşürmüştür. Besinsel olarak en zengin örnek olan CME-10, yüksek mineral ve protein içeriği ile toplam fenolik madde (ekstrakte edilebilir, hidrolize edilebilir) ve antioksidan kapasite (ABTS, CUPRAC ve DPPH) açısından kontrol örneğinden istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Mikroalg, mısır ekmeği, kalite kriterleri

THE EFFECT OF CHLORELLA VULGARIS ADDITION ON BREAD QUALITY CRITERIA

ABSTRACT

The utilisation of microalgae as a food source in the development of new and functional products, such as gluten-free bread with low nutritional value, is a subject of considerable interest. This is due to the nutritional components of microalgae, which include protein, fatty acids, minerals, vitamins, phenolics and antioxidants. The present study investigates the physicochemical, functional and sensory properties of corn bread (CME) produced by adding *Chlorella vulgaris* to corn flour at 1, 3, 6 and 10% ratios. The findings revealed that *Chlorella* addition led to an enhancement in protein, ash, fat, water holding capacity, and antioxidant values, accompanied by a reduction in moisture, volume, and sensory parameters. In the sensory evaluation, the control bread received the highest scores, while the specific colour, odour and taste of *Chlorella* decreased consumer acceptability. CME-10, the most nutritionally rich sample, was statistically significantly higher than the control

* Sorumlu yazar / Corresponding author

✉: ayse.dundar@btu.edu.tr

☎: (+90) 224 300 3501

Fatma Demircioğlu; ORCID no: 0000-0002-2950-1250

Ayşe Neslihan Dündar; ORCID no: 0000-0003-2084-7076

Oya Irmak Şahin; ORCID no: 0000-0003-2225-7993

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

sample in terms of total phenolics (extractable, hydrolyzable) and antioxidant capacity (ABTS, CUPRAC and DPPH) with high mineral and protein content.

Keywords: Microalgae, corn bread, quality criteria

GİRİŞ

Çölyak hastalığı, dünya genelinde %1-2 oranında görülen ve gluten intoleransı nedeniyle bağırsakta emilim bozukluğuna yol açan kronik bir hastalıktır (Holtmeier ve Caspary, 2006). Gluten tüketen çölyak hastalarında besin maddelerinin yeterince emilememesi ve sindirim sorunları ortaya çıkmaktadır (Green vd., 2015). En sık görülen belirtiler arasında karın ağrısı, ishal, kilo kaybı, gaz ve şişkinlik, anemi, ödem ile kemik veya eklem ağrısı yer almaktadır (Kelly vd., 2015; Singh vd., 2019; Bledsoe vd., 2019). Günümüzde bilinen tek tedavi yöntemi ise, hastaların yaşam boyu glutensiz diyet uygulamalarıdır; bu sayede klinik ve histolojik iyileşme sağlanabilmektedir (Ludvigsson ve Murray, 2019). Glutensiz diyetin tedavi yöntemi olarak öne çıkması, glutensiz ürünlere olan ilgiyi artırmıştır (Simic vd., 2018; Wandersleben vd., 2018). Glutensiz diyetle özellikle çölyak hastaları için üretilen çeşitli gıdalar arasında ekmek en çok tüketilenlerden biridir. Glutensiz un karışımlarıyla yapılan ekmeklerde, glutenin su ile etkileşime girdiğinde sağladığı karıştırma toleransı, gaz tutma kapasitesi, esneklik ve uzayabilirlik gibi istenilen reolojik özellikler oluşmaz (Deora vd., 2014; Foschia vd., 2016; El Khoury vd., 2018; Demirkesen ve Ozkaya, 2022). Bu nedenle glutensiz ekmekler genellikle ufalanan bir dokuya, soluk bir kabuk rengine, kısa raf ömrüne sahip olurken, karbonhidrat içeriği yüksek, ancak vitamin, mineral, lipid, diyet lifi ve biyoaktif bileşen açısından daha düşük değerlere sahiptir (Arendt vd., 2008; Matos vd., 2015; Tümer ve Özer, 2018). Bu ekmeklerin zayıf besin değeri, tekstürel ve duyuşal özelliklerini iyileştirmek ve tüketimini artırmak için farklı nişasta kaynakları, baklagil unları, pseudotahıllar, hidrokolloidler, yüzey aktif maddeler, prebiyotikler, enzimler ve bunların kombinasyonlarının kullanımı yaygınlaşmaktadır (Capriles ve Areas, 2014; Tümer ve Özer, 2018).

Mikroalglerin kullanımı, dünya nüfusunun hızla artması ve sınırlı doğal kaynakların giderek daha fazla tüketilmesi nedeniyle oldukça ilgi çekici bir çözüm olarak öne çıkmaktadır. Özellikle

geleneksel tarım ve hayvancılık faaliyetleri su ve arazi kaynakları açısından büyük talepler doğururken, mikroalgler çok daha az kaynak kullanarak besleyici, sürdürülebilir ve çevre dostu bir alternatif sunmaktadır. Mikroalglerin tarım ve hayvancılık ürünlerine kıyasla büyük avantajlar sunmasının sebeplerinden biri, hızlı büyüme kapasiteleri ve çeşitli iklim koşullarında kolayca üretilibilmeleridir. Aynı zamanda, mikroalgler zengin bir protein, omega-3 yağ asitleri, vitamin ve mineral kaynağıdır. Bu da onları hem insan beslenmesi hem de hayvan yemi için ideal bir seçenek haline getirmektedir (Lopes vd., 2020). Mikroalglerin tarımsal kaynaklara kıyasla, daha küçük alanlarda daha hızlı üretim gerçekleştirebilmesinin yanı sıra, elde edilen biyokütlesinin besinsel içeriğinin protein, yağ, vitamin ve mineral açısından dikkate değer olması son 20 yıldır giderek artan bir ilgi görmesine sebep olmuştur. Bununla birlikte, katkı maddesi olarak ilave edildikleri gıdaların besinsel ve teknolojik değerini olumlu anlamda değiştirebilmeleri de gıda teknolojisi açısından mikroalgleri önemli kılmaktadır (Hager ve Arendt, 2013).

Chlorella vulgaris, Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından gıdalarda kullanımı onaylanmış yeşil bir tatlı su mikroalgidir (Anonim, 2023). *Chlorella vulgaris* ciddi bir protein kaynağı olarak, özellikle de vegan ve vejetaryen beslenme planlarına dahil edilmesi mümkün bir gıda alternatiftir (Molino vd., 2018; Lopes vd., 2020; Machado vd., 2020).

Bu çalışmanın amacı, *C. vulgaris* mikroalgi ile elde edilecek mısır ekmeği formülasyonunun optimizasyonudur. Mikroalg ilavesinin ekmeklerin fiziksel, kimyasal, bazı fonksiyonel özellikteki kalite kriterleri ve duyuşal parametrelerine etkileri değerlendirilmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Çalışmada mısır ekmeği üretiminde kullanılan mısır unu, glutensiz kuru maya (*Saccharomyces cerevisiae*), sofra tuzu, gıda tipi ksantan gam

hammaddeleri piyasadan, biyokütlesi kullanılan *Chlorella vulgaris* Akuatik firmasından temin edilmiştir.

Mısır Ekmeğinin Üretimi

Bu çalışmada farklı oranlarda (%1, 3, 6 ve 10) *Chlorella vulgaris* ilave edilerek üretilen mısır

ekmeği (CME) üretilerek kontrol örneği ile karşılaştırılması yapılmıştır. Ekmek hamur karışımlarında kullanılan tüm bileşenler mısır unu bazında yüzde ağırlıkça verilmiş ve ekmek üretiminde kullanılan formülasyonlar Çizelge 1’de verilmiştir.

Çizelge 1. Ekmek formülasyonu

Table 1. Bread formulation

Örnekler	Un (g)	C. vulgaris (g)	Maya (g)	Tuz (g)	Ksantan gam (g)	Su (ml)
Kontrol	100	0	3	2	1.5	107.5
CME-1	99	1	3	2	1.5	107.5
CME-3	97	3	3	2	1.5	107.5
CME-6	94	6	3	2	1.5	107.5
CME-10	90	10	3	2	1.5	107.5

Katı maddeler (mısır unu, glutensiz kuru maya, ksantan gam, tuz), önceden belirlenen miktarda su ile laboratuvar tipi hamur yoğurucuda (Kitchen Aid, Artisan, ABD) 3. kademedeki 5 dakika süreyle karıştırılarak homojen bir hamur elde edilmiştir. Hazırlanan hamurlar, yağlanmış baton tipi ekmek kalıplarına (159 x 109 x 69 mm) aktarılmış ve 35 °C sıcaklıkta 90 dakika boyunca fermente edilmiştir. Fermentasyon sürecini tamamlayan hamurlar önceden ısıtılmış fırında (Venarro/Patisserie Dijital) fan devre dışı bırakılarak 180 °C’de 40 dk pişirilmiştir. Fırından çıkan ekmekler 2 saat boyunca soğutulmaya bırakılarak dinlendirilmiş, ardından kalıptan çıkarılarak 2 saat daha oda sıcaklığında bekletilmiştir. Fiziksel ve kimyasal analizler ile duyuşal değerlendirmeler üretim günü gerçekleştirilmiş olup, diğer analizler için ekmekler numune saklama kaplarında analizlere kadar -18 °C’de muhafaza edilmiştir.

Hammadde ve Ekmek Örneklerinde Yapılan Fizikokimyasal Analizler

Ekmek üretiminde hammadde olarak kullanılan mısır unu, *Chlorella vulgaris* ve CME örneklerinin nem, kül, protein ve yağ miktarları sırasıyla AACC metot no. 44-15.02, 08-01, 46-30, 30-25.01’e göre belirlenmiştir (AACC, 2012). Karbonhidrat miktarı ise FAO (2003)’e göre Atwater genel

faktör sistemi kullanılarak hesaplanmıştır (Anonim, 2003).

$$\% \text{Karbonhidrat} = 100 - (\% \text{Nem} + \% \text{Kül} + \% \text{Protein} + \% \text{Yağ})$$

Su Tutma Kapasitesi Analizi

Örneklerin su tutma kapasiteleri, Sit vd. (2013)’nin yöntemine uygun olarak belirlenmiştir. Bu yöntem doğrultusunda her bir örnekten 2 g tartılarak 50 ml’lik falkon tüplerine alınmış ve üzerine 24 ml distile su eklenmiştir. Örnekler, 60 dakika boyunca çalkalayıcı cihazında (Mipro, MLS3535) karıştırılmıştır. Çalkalama işleminin ardından, 25°C’de 3460 g kuvvetinde 10 dakika boyunca santrifüj (Hettich, Universal 320 R) yapılmıştır. Santrifüj işlemi sonrasında üst faz dikkatlice uzaklaştırılmış ve tüp ağırlığı kaydedilmiştir. Su tutma kapasitesi, örneklerin gramı başına tutulan suyun ml cinsinden miktarı olarak ifade edilmiştir.

Ekstrakte, Hidrolize ve Toplam Fenolik Madde Miktarı Analizi

Örneklerde fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için Vitali vd., (2009)’nin kullandığı yöntemde minör modifikasyonlar uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için örnek (2 g) üzerine 20 mL HCl, metanol ve su çözeltisi (1:80:10, v/v/v) ilave edilmiş, çalkalayıcıda (Mipro, MLS3535) oda sıcaklığında 150 rpm’de 2

saat boyunca çalkalanmıştır. Sonra 4°C’de ve 4000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiş, elde edilen süpernatant analiz zamanına kadar -18°C’de muhafaza edilmiştir. Hidrolize edilebilir fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için ise serbest fenolik ekstraksiyonu sonrası kalan katı kısma 20 mL sülfürik asit ve metanol karışımı (1:10, v/v) ilave edilmiş ve bu karışım 85 °C sıcaklıktaki çalkalamalı su banyosunda (Nuve, ST30) 20 saat inkübe edilmiştir. Ardından örnekler 4°C’de 3500 rpm’de 10 dk santrifüjlenmiş ve süpernatant kısmı -18°C’de analize kadar depolanmıştır.

Örneklerdeki ekstrakte ve hidrolize fenolik madde miktarı, Naczki ve Shahidi (2004) tarafından verilen Folin-Ciocalteu kolorimetrik yöntemine göre belirlenmiştir. Toplam fenolik madde (TFM) miktarı, ekstrakte edilen ve hidroliz sonucu elde edilen fenolik bileşik miktarlarının toplamı olarak hesaplanmıştır. Analizlerde kalibrasyon eğrisi oluşturmak amacıyla standart fenolik bileşik olarak galik asit kullanılmıştır.

Toplam Antioksidan Kapasitesi Analizleri

Antioksidan kapasitesi analizinde DPPH, ABTS ve CUPRAC olmak üzere 3 farklı metod kullanılmış, örneklerdeki toplam antioksidan kapasite sonuçları g / µmol trolox eşdeğeri (TE) olarak verilmiştir (Apak vd., 2004; Vitali vd., 2009). 1 gr örnek metanol/su (70:30, v/v) oranında hazırlanmış %70’lik metanol içeren ekstraksiyon çözeltisi ile 10 mL hacminde karıştırılmıştır. Karışım, oda sıcaklığında 2 saat süreyle çalkalamalı su banyosunda ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyonun ardından numuneler 3000 rpm’de 10 dakika süreyle santrifüjlenmiş, elde edilen süpernatantlar filtrelenerek analizlerde kullanılmak üzere ayrılmıştır.

CUPRAC metodu ile toplam antioksidan kapasite analizi; CUPRAC (Bakır (II) İyonu İndirgeme Esaslı Antioksidan Kapasite) metodu ile antioksidan kapasite tayininde Apak vd., (2008)’nın metodu kullanılmıştır. $1,0 \times 10^{-2}$ M Bakır (II) klorür çözeltisi, 1M NH₄AC (amonyum asetat tamponu, pH:7) ve 7.5×10^{-3} M neokuproin çözeltisinden 1’er ml eklenmiş ve üzerine x mL örnek ekstraktı ve (4-x) mL damıtık su, bir deney tüpüne konulmuştur. Karanlık ortamda oda

sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra, spektrofotometrede 450 nm’de kör örneğe karşı absorbans değerleri okunmuştur.

Toplam antioksidan kapasite tayini, Vitali vd. (2009) tarafından geliştirilen DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil) yönteminde bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz için, 100 µL ekstrakt üzerine 3.9 mL 6×10^{-5} M konsantrasyonundaki DPPH çözeltisi eklenmiş ve karışım karanlık ortamda 30 dakika bekletilmiştir. Ardından, absorbans değerleri 515 nm dalga boyunda, kör örneğe karşı spektrofotometre (Thermo Scientific Evolution 201) kullanılarak ölçülmüştür. ABTS metodunda 100 µl ekstrakt, 3.9 ml etanol ve 1 ml 7 mM ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) çözeltisi karıştırılarak örneklerin absorbans değerleri, kör numuneye karşı 734 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında (Thermoscientific Evolution 201) okunarak belirlenmiştir (Apak vd., 2008).

Mineral Madde Analizi

Mineral madde miktarı analizi, Adal (2018) tarafından uygulanan yöntemle gerçekleştirilmiştir. Çalışmada CME örneklerinde bulunan magnezyum (Mg), potasyum (K), kalsiyum (Ca), mangan (Mn), demir (Fe), çinko (Zn), ve fosfor (P) elementlerinin miktarları analiz edilmiştir. Analiz için 0.7 g örneğe 10 ml HNO₃ eklenerek mikrodalgada (CEM Mars 6) yakma işlemi uygulanmıştır. Mikrodalga işlem parametreleri şu şekildedir; rampa süresi 10 dk, tutma süresi 15 dk, sıcaklık 200 °C ve güç 400-1800 W. Mineral madde analizinde ICP-MS (Agilent 7900) (İndüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi) cihazı kullanılmıştır. Cihaz 1550 W güç ve 45 sn örnek tutulma süresi ile çalıştırılmıştır. Kalibrasyon için 0.1–10 mg/L konsantrasyon aralığında hazırlanmış çok elementli standart çözeltiler kullanılmış olup, her elemente ait kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayıları ≥ 0.999 olarak belirlenmiştir. Örneklerdeki mineral içerikleri, cihaz tarafından kalibrasyon eğrileri yardımıyla hesaplanmıştır.

Ağırlık, Hacim, Spesifik Hacim ve Pişme Kaybı Analizi

Oda sıcaklığına kadar soğutulmuş ekmek örneklerinin hacim değerleri (ml) AACC metot 10–05.01'e uygun olarak kolza tohumu yer değiştirme yöntemiyle belirlenmiştir. Spesifik hacim ise, elde edilen hacim değerlerinin ilgili örneklerin ağırlıklarına oranlanmasıyla (ml/g) hesaplanmıştır (AACC, 2015).

Hamurların başlangıç ağırlıkları ve pişirme sonrasında oda sıcaklığında 2-3 saat bekletilerek soğutulan ekmeklerin son ağırlıkları ölçülmüş; bu veriler kullanılarak pişme kaybı oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Safavi ve Gharekhani, 2019).

$$\text{Pişme kaybı (\%)} = \left(X - \frac{Y}{X} \right) \times 100$$

X: Hamur ağırlığı Y: Pişikten sonraki ekmek ağırlığı

Renk Analizi

Ekmek kabuk ve iç kısımlarının renk değerleri, L* (0 siyah; 100 beyaz), a* (- yeşil; + kırmızı), b* (+ sarı; - mavi) değerleri kolorimetre (PCE-CSM3) cihazı ile belirlenmiş, toplam renk farkı (ΔE) ise aşağıdaki formül 3.5'e göre hesaplanmıştır (Diprat vd., 2020).

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

ΔE : Toplam renk farkı, ΔL^* : Kontrol ve örnekteki L parametreleri farkı, Δa^* : Kontrol ve örnekteki a parametreleri farkı ve Δb^* : Kontrol ve örnekteki b parametreleri farkı

Tekstür Analizi

Ekmek içi doku özelliklerini değerlendirmek amacıyla tekstür profili analizi (TPA) analizi, Stable Micro System marka TA-HD Plus model tekstür cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizler, üretim sonrası 1. gününde (24. saat) yapılmış ve 2.5 x 2.5 x 2.5 cm boyutlarında kesilen ekmek dilimleri kullanılmıştır. Ölçümler sırasında P/36 silindir disk prob tercih edilmiş; ön test hızı: 1 mm/s, test hızı: 2 mm/s, son test hızı: 5 mm/s olarak ayarlanmış ve problama işlemi 10 mm derinliğe (%40 deformasyon) kadar ve 5 g algılama kuvveti eşliğinde uygulanmıştır. İki ardışık sıkıştırma döngüsüyle elde edilen grafik üzerinden sertlik, esneklik, yapışkanlık,

sakızimsılık ve çiğnenebilirlik özellikleri değerlendirilmiştir. Hesaplamalar AACC Metot 74-09.01 temel alınarak bazı modifikasyonlarla gerçekleştirilmiştir (AACC, 2015).

Duyusal Değerlendirme

Pişmiş ekmekler, yaşları 10 ile 58 arasında değişen 50 panelist (27 kadın, 23 erkek) tarafından duyuşal olarak değerlendirilmiştir. Panelistler, deneyimli uzmanlar, yarı eğitilmiş ve eğitimsiz katılımcılardan oluşmaktadır. Ekmek numuneleri, tüketiciler tarafından kabul edilebilirlik açısından incelenmiş ve duyuşal özellikler 9 puanlı hedonik skala kullanılarak değerlendirilmiştir (Kahraman, 2016). Panelistler, ekmekleri şekil ve simetri, koku, tat, çiğnenebilirlik, gözenek yapısı ve homojenlik, renk ve genel değerlendirme kriterlerine göre puanlamıştır.

İstatistiksel Analiz

Kontrol ve CME örneklerine ait fiziksel, kimyasal özellikler ve duyuşal değerlendirmeler arasındaki farklılıklar SPSS (SPSS 22.0) istatistik yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir. Veriler %95 güven aralığına tek yönlü varyans analizine (ANOVA) göre değerlendirilmiştir. Farklı formülasyonların istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturduğu durumlarda ($P < 0.05$) örnekler arasındaki farklılıkların belirlenmesi için Duncan (çoklu karşılaştırma) testi uygulanmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Fizikokimyasal Analiz Değerleri

Ham madde ve ekmeklerin fizikokimyasal analiz sonucunda belirlenen değerleri Çizelge 2 ve 3'te verilmiştir.

Literatürde mısır ununun protein içeriği %4.90 ile %8.21, yağ içeriği %1.91 ile %3.90 ve kül içeriği %0.57 ile %1.50 arasında değiştiği bildirilmiştir (Gwirtz ve Garcia-Casal, 2014; Hager ve Arendt, 2013; Kılınççeker ve Hepsağ, 2010; Köten ve Ünsal, 2021; Yılmaz, 2017). Çalışmada kullanılan mısır ununun protein oranı %6.85, yağ oranı %3.22 ve kül oranı %0.75 olarak saptanmış olup, bu değerlerin daha önce literatürde bildirilen aralıklarla uyumlu olduğu görülmüştür. *C. vulgaris* türüne ait kimyasal kompozisyonunun rapor edildiği çalışmalarda protein %38.00 ile %58.10;

yağ %3.13 ile %15.70 ve kül %6.70 ile %24.20 değişen oranlarda tespit edilmiştir (Fradique vd., 2010; Batista vd., 2013; Molino vd., 2018; Qazi vd., 2021). Bu çalışmada kullanılan *C. vulgaris*

örneğinde belirlenen protein, yağ ve kül oranları sırasıyla %56.95, %6.18 ve %5.51 olup, bu değerler de literatürde bildirilen aralıklarla örtüşmektedir.

Çizelge 2. Hammaddelerin fizikokimyasal özellikleri
Table 2. Physicochemical properties of raw materials

	Mısır unu	<i>C. vulgaris</i>				
Nem(%)	11.36±0.03	6.57±0.25				
Kül (%)	0.75±0.07	5.51±0.30				
Protein (%)	6.85±0.03	56.95±0.30				
Yağ (%)	3.22±0.04	6.18±0.61				
Karbonhidrat(%)	77.78±0.74	24.81±0.72				
TPC (mg GAE/100 g)	Ekstrakte edilebilir	84.83±0.14	117.08±1.94			
	Hidrolize edilebilir	119.11±9.57	244.58±1.11			
	Toplam	203.94±9.71	361.67±3.0			
Antioksidan kapasite (µmol TE/g)	CUPRAC	13.68±4.51	312.33±10.48			
	DPPH	13.29±0.94	193.90±10.09			
	ABTS	4.35±0.93	161.89±11.40			
Su tutma kapasitesi (mg/L)	1.25±0.15 ^b	2.11±0.47 ^a	CME-1 1.28±0.13 ^b	CME-3 1.34±0.10 ^b	CME-6 1.38±0.09 ^b	CME-10 1.47±0.04 ^b

Kontrol: %0 *C. vulgaris* ilaveli mısır ekmeği, CME-1: %1 *C. vulgaris* ilaveli mısır ekmeği, CME-3: %3 *C. vulgaris* ilaveli mısır ekmeği, CME-6: %6 *C. vulgaris* ilaveli mısır ekmeği, CME-10: %10 *C. vulgaris* ilaveli mısır ekmeğidir. Değerler, ortalama ± standart sapmadır (n=3). Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir ($P<0.05$).

Mısır unu ve *C. vulgaris* kullanılarak üretilen ekmek örneklerinde protein, yağ, kül ve nem içerikleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlemlenmiştir ($P<0.05$). Yapılan analizler sonucunda, kontrol grubuna kıyasla ekmeklerin nem oranlarında anlamlı bir azalma ($P<0.05$) tespit edilirken, protein, yağ ve kül içeriklerinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi'nin (EFSA) tanımına göre, bir ürünün "arttırılmış protein içeriğine sahip" olarak nitelendirilebilmesi için, benzer zenginleştirilmemiş ürüne kıyasla en az %30 daha fazla protein içermesi gerekmektedir (Qazi vd., 2021). Bu bağlamda, protein miktarında %44.92 oranında artış gösteren CME-3 ekmek örneği, bu kriteri karşılamakta ve "protein yönünden zenginleştirilmiş ürün" olarak değerlendirilebilmektedir.

Güdük (2016), katkı maddesi içermeyen ve tamamen mısır unu kullanılarak üretilen ekmek

örneklerinde iç nem oranını %42.10 ile %43.90 arasında belirlemiştir. Benzer şekilde Wazed ve İslam (2021) çalışmalarında mısır ekmeğinin nem oranını %41.06 olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen kontrol grubuna ait (yalnızca mısır unu içeren) ekmekte ise nem oranı %42.81 olarak ölçülmüştür.

Köten ve Ünsal (2021), buğday unu ile farklı oranlarda mısır unu karıştırılarak (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40 ve 50:50) hazırlanan pandispanya kek örneklerinde, en yüksek kül (%1.59) ve yağ (%7.00) içeriklerinin %50 mısır unu içeren formülasyonda gözlemlendiğini rapor etmişlerdir.

Qazi ve arkadaşları (2021), *Tetraselmis chuii* (TcR), *Chlorella vulgaris* (CvR) ve *Nannochloropsis gaditana* (NgR) türlerine ait ham mikroalg biyokütelleri ile etanol ile işlem görmüş varyantları olan TcT, CvT ve NgT'nin, glutensiz un karışımından (karabuğday:pirinç unu:patates nişastası; 46:31:23)

elde edilen ekmek formülasyonlarına %4 oranında ikame edilerek besinsel, duyuşsal ve reolojik özellikler üzerine etkilerini incelemişlerdir. Söz konusu çalışmada, kontrol glutensiz ekmeklerin nispeten düşük besin içeriğine sahip olduğu, mikroalg katkısı ile ise protein, yağ, kül, mineral

maddeler ve antioksidan kapasite bakımından anlamlı artışlar sağlandığı bildirilmiştir. Benzer şekilde, bu çalışmada da mikroalg içeriği sayesinde besin öğelerinde dikkat çekici düzeyde artışlar gözlemlenmiştir.

Çizelge 3. Ekmeklerin fizikokimyasal özellikleri

Table 3. Physicochemical properties of bread

		Kontrol	CME-1	CME-3	CME-6	CME-10
Nem(%)		42.81±0.25 ^a	42.49±0.47 ^{ab}	41.89±0.21 ^b	40.45±0.69 ^c	38.96±0.34 ^d
Kül (%)		1.13±0.01 ^d	1.17±0.01 ^{cd}	1.23±0.03 ^c	1.44±0.02 ^b	1.55±0.03 ^a
Protein (%)		4.63±0.05 ^c	5.09±0.31 ^d	5.83±0.02 ^c	6.71±0.09 ^b	7.71±0.04 ^a
Yağ (%)		1.39±0.02 ^d	1.58±0.06 ^d	1.79±0.03 ^c	2.22±0.06 ^b	2.71±0.15 ^a
TPC (mg GAE/100g)	Ekstrakte edilebilir	34.97±0.81 ^d	41.97±0.61 ^c	48.26±1.82 ^b	52.55±1.01 ^a	54.40±0.81 ^a
	Hidrolize edilebilir	88.40±1.22 ^d	92.55±0.21 ^c	104.40±3.24 ^b	112.12±1.62 ^a	116.97±3.63 ^a
	Toplam	123.38±0.40 ^c	134.52±0.40 ^d	152.66±1.41 ^c	164.66±2.62 ^b	171.37±2.83 ^a
Antioksidan kapasite (µmol TE/g)	CUPRAC	16.91±0.45 ^c	19.96±0.81 ^d	22.03±0.25 ^c	26.50±0.62 ^b	30.23±1.47 ^a
	DPPH	13.52±0.04 ^{cd}	13.76±0.14 ^c	14.09±0.06 ^b	14.40±0.05 ^a	14.55±0.07 ^a
	ABTS	10.14±0.09 ^c	10.93±0.49 ^{bc}	12.30±1.09 ^b	14.19±0.49 ^a	15.34±0.88 ^a
Hacim (ml)		492.91±5.15 ^a	423.67±1.05 ^b	413.23±7.30 ^b	392.09±3.90 ^c	385.15±2.17 ^c
Ağırlık (g)		325.81±0.23 ^d	326.64±0.24 ^d	335.32±0.86 ^c	345.49±3.02 ^b	350.14±1.97 ^a
Spesifik hacim (ml/g)		1.51±0.01 ^a	1.30±0.01 ^b	1.23±0.03 ^c	1.14±0.02 ^d	1.10±0.01 ^d
Pişme kaybı (%)		14.40±0.57 ^a	11.92±1.09 ^b	11.00±0.87 ^{bc}	10.38±0.49 ^{bc}	9.46±0.56 ^c
Mineral madde içeriği	Mg (mg/kg)	166.93±1.30 ^d	248.86±1.19 ^c	276.5±1.29 ^{bc}	284.98±1.12 ^{bc}	330.16±1.11 ^a
	K (mg/kg)	713.12±1.23 ^c	951.91±1.17 ^b	1047.51±1.56 ^a	1067.18±1.32 ^a	1095.81±0.75 ^a
	Ca (mg/kg)	44.15±5.08 ^d	44.36±6.41 ^d	53.35±5.71 ^c	62.07±5.04 ^b	158.75±0.92 ^a
	Mn(mg/kg)	0.94±7.42 ^d	1.23±1.72 ^c	1.38±2.65 ^b	1.39±6.48 ^b	1.48±0.82 ^a
	Fe (mg/kg)	17.94±1.68 ^c	18.94±2.01 ^d	20.24±0.25 ^{bc}	20.65±0.44 ^b	22.74±0.97 ^a
	Zn (mg/kg)	7.96±7.66 ^d	20.28±2.00 ^{bc}	22.06±3.30 ^{bc}	25.16±1.15 ^b	34.93±0.88 ^a
	P (mg/kg)	536.37±11.67 ^d	872.11±3.81 ^c	1036.25±4.00 ^b	1092.89±8.29 ^b	1236.03±1.98 ^a
Ekmek İçi Renk	L*	70.38±1.60 ^a	50.76±1.96 ^b	40.40±1.97 ^c	35.46±3.39 ^c	18.45±4.56 ^d
	a*	4.71±0.42 ^a	-4.31±0.38 ^b	-5.83±0.29 ^c	-6.50±0.52 ^c	-9.89±0.75 ^d
	b*	43.17±4.10 ^a	22.84±0.99 ^b	17.20±1.00 ^c	11.86±0.61 ^d	5.73±1.04 ^c
	ΔE	-	29.66	41.04	48.22	65.66
Ekmek Kabuğu Renk	L*	75.07±2.57 ^a	60.10±5.60 ^b	50.63±2.35 ^c	42.63±1.38 ^d	33.38±1.16 ^e
	a*	6.08±0.34 ^a	-0.70±0.30 ^b	-1.15±0.19 ^b	-2.02±0.08 ^c	-2.61±0.31 ^d
	b*	36.35±5.23 ^a	26.45±4.27 ^b	20.70±0.77 ^{bc}	16.58±2.35 ^{cd}	9.71±4.55 ^d
	ΔE	-	19.19	29.91	38.84	50.23
Tekstür Profili	Sertlik (N)	40.10±2.21 ^d	46.23±2.26 ^c	50.76±1.67 ^b	57.39±0.72 ^a	61.31±3.43 ^a
	Esneklik	0.84±0.00 ^a	0.83±0.01 ^{ab}	0.82±0.01 ^{bc}	0.81±0.01 ^c	0.79±0.01 ^d
	İç yapışkanlık	0.35±0.02 ^d	0.38±0.01 ^d	0.48±0.02 ^c	0.53±0.01 ^b	0.60±0.02 ^a
	Sakızimsılık	15.60±0.68 ^c	16.64±0.24 ^c	28.39±2.76 ^b	32.73±3.18 ^{ab}	36.55±0.35 ^a
	Çiğnenebilirlik	12.11±0.41 ^c	13.52±0.23 ^c	23.09±1.08 ^b	27.18±3.42 ^{ab}	30.51±0.10 ^a

Kontrol: %0 *C. vulgaris* ilaveli mısır ekmeği. CME-1: %1 *C. vulgaris* ilaveli mısır ekmeği. CME-3: %3 *C. vulgaris* ilaveli mısır ekmeği. CME-6: %6 *C. vulgaris* ilaveli mısır ekmeği. CME-10: %10 *C. vulgaris* ilaveli mısır ekmeğidir. Değerler ortalama ± standart sapmadır (n=3). Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir ($P<0.05$).

Su Tutma Kapasitesi

Su tutma kapasitesi, yüksek protein içeriğine sahip *C. vulgaris*'in ilave miktarıyla paralel olarak artmıştır. Bu duruma mikroalglerin hidrokolloid yapıda olmalarının etkisi olduğu düşünülmektedir. Hammaddeler ve karışımlarında su tutma kapasite değerleri Çizelge 2'de verilmiştir.

Martínez ve Gómez (2017), mısır ununun su bağlama kapasitesini 1.42 ml/g olarak rapor etmiş, Culetu vd. (2021) ise bu değeri 1.40 ml/g olarak bildirmiştir. Garzon vd. (2021), yedi farklı mısır ununda su bağlama kapasitesinin 1.30-1.51 ml/g aralığında değiştiğini ifade etmiştir. Bu çalışmada kullanılan mısır ununun su tutma kapasitesi 1.25 ml/g olarak belirlenmiş olup, bu değer literatürde rapor edilen değerlerden daha düşük olduğu görülmüştür. Bu durumun, mısırın yetiştirme koşulları, besin bileşenleri veya unun granül boyutuna bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Ahmed ve Kumar (2022), *C. vulgaris*'in su tutma kapasitesini 25 °C ve 70 °C sıcaklıklarda sırasıyla 2.54 ml/g ve 2.61 ml/g olarak ölçmüşlerdir. Bu çalışmada kullanılan *C. vulgaris*'in 25 °C'de yapılan su tutma kapasitesi ise 2.11 ml/g olarak tespit edilmiştir ve bu değer, literatürde belirtilen sonuçlara yakınlık göstermektedir. Çizelge 2'de de görüldüğü üzere, mısır ununa eklenen *C. vulgaris* oranının artması, CME örneklerinin su tutma kapasitelerinde bir artışa neden olmuş ve bu durum örneklerin ağırlıklarının artışıyla sonuçlanmıştır.

Benzer şekilde, Garzon vd. (2021), ekmek formülasyonlarına mikroalg tozu eklenmesiyle su absorpsiyonunun sürekli olarak arttığını ve bu artışın, mikroalglerin ekmek üretiminde su absorpsiyonunu artırıcı özelliklere sahip bir hidrokolloid kaynağı olmasıyla ilişkili olduğunu belirtmiştir. Sahni vd. (2018), yağı uzaklaştırılmış *Chlorella* sp. mikroalginden metanol ekstraksiyonu yoluyla klorofil pigmentini uzaklaştırarak elde ettikleri mikroalg küspesini bisküvi formülasyonlarına dahil etmiş ve mikroalg küspesi ilavesiyle bisküvi ağırlığının kademeli olarak 23.62 g'den 23.68 g'ye yükseldiğini rapor etmiştir. Bu ağırlık artışının, mikroalg küspesinin yüksek su

tutma kapasitesine ve nem içeriğine bağlı olduğu ifade edilmiştir.

Hammaddelerin ve Ekmeklerin Toplam Fenolik Madde Miktarı

Tahıllarda fenolik bileşikler serbest, çözünür konjuge ve bağlı formlar halinde bulunur ve bu formlardan bağlı olanlar, fenolik asitlerin büyük bir kısmını oluşturur (Karabulut ve Yemiş, 2019). Gıdalarda bulunan fenolik bileşiklerin serbest ve konjuge formları, metanol, etanol veya aseton:su gibi sulu organik çözücülerle gerçekleştirilen klasik ekstraksiyon yöntemleriyle tespit edilebilmektedir. Ancak bu yöntemler, ekstraksiyon sonrası kalıntılarda kalan ve toplam fenolik bileşiklerin önemli bir kısmını teşkil eden bağlı formları genellikle göz ardı etmektedir (Pérez-Jiménez ve Saura-Calixto, 2015). Meyve, sebze, tahıl ve baklagiller gibi çeşitli gıdalarda yaygın olarak bulunan bağlı ve konjuge fenolik bileşikler, toplam fenolik içeriğin daha doğru bir şekilde belirlenebilmesi için hidrolize yöntemlerinin geliştirilmesini gerekli kılmıştır (Bourvellec ve Renard, 2012). Bu çalışmada ekmek örneklerinin üretiminde kullanılan hammaddeler olan mısır unu, *C. vulgaris* ve ekmeklerin ekstrakte ve hidrolize fenolik madde miktarları belirlenmiş ve Çizelge 2 ve 3'te verilmiştir.

Mısırın toplam fenolik madde içeriği üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde, Deng vd. (2012) tarafından 24 tahıl türü üzerinde yapılan çalışmada, mısırın lipofilik ve hidrofilik bileşikler açısından toplam fenolik içeriği 197 mg GAE/100 g olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde, Argun (2016), at dişi ve sert mısır türlerinde bu değeri 130-252 mg GAE/100 g arasında rapor ederken, Köten ve Ünsal (2021) bu değeri 106 mg GAE/100 g olarak bildirmiştir. Glutensiz unlar üzerine yapılan bir çalışmada Culetu vd. (2021), karabuğday, mısır ve kinoa unlarının sırasıyla 375, 151 ve 136 mg GAE/100 g toplam fenolik içeriğe sahip olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmada kullanılan mısır ununun toplam fenolik içeriği ise 203.94 mg GAE/100 g olarak ölçülmüş ve literatürle uyumlu olduğu gözlemlenmiştir.

Ayrıca, *Chlorella vulgaris* mikroalgine ilişkin literatürde toplam fenolik içeriğin, Batista vd. (2017) tarafından 640 mg GAE/100 g olarak rapor edildiği, farklı çözücülerle yapılan ekstraksiyon çalışmalarında ise 65-317 mg GAE/100 g arasında değiştiği (Abdel-Karim vd., 2019) belirtilmiştir. Qazi vd. (2022), ham ve etanol ön işlemleri *C. vulgaris* için bu değerleri sırasıyla 438 mg GAE/100 g ve 377 mg GAE/100 g olarak bildirmiştir. Bu çalışmada kullanılan *C. vulgaris*'in toplam fenolik içeriği ise 361.67 mg GAE/100 g olarak belirlenmiş ve literatüre uyum göstermiştir. Trehan vd. (2018), sarı mısır unuyla üretilen glutensiz çöreklerde toplam fenolik içeriği 83.16-97.82 mg GAE/100 g arasında, Köten ve Ünsal (2021) ise mısır unu ve buğday unu karışımlarından elde edilen pandispanya keklerinde toplam fenolik madde miktarının en yüksek olduğu örneklerin %50 mısır unu içeren gruplarda (%12.63 mg/100 g) olduğunu bildirmiştir. Qazi vd. (2022), *T. chuii*, *C. vulgaris* ve *N. gaditana* mikroalg biyokütlelerini içeren glutensiz ekmeklerde, ham mikroalg kullanılan örneklerin etanol ön işlemlilere göre daha yüksek toplam fenolik içeriğe sahip olduğunu göstermiştir. Kontrol ekmeğinde bu değer 430 mg GAE/100 g iken, %4 ham *C. vulgaris* içeren ekmekte 438 mg GAE/100 g, ön işlemleri mikroalg içeren ekmekte ise 377 mg GAE/100 g olarak ölçülmüştür.

Yukarıdaki çalışmalarda hidrolize edilebilir fenolik madde değeri belirlenmemiş, ekstrakte edilebilir değerler belirlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen hidrolize edilebilir değerlerin ekstrakte edilebilir oranlara kıyasla yaklaşık 2 kat daha fazla ve fenolik madde içeriği en yüksek olan örneğin CME-10 (%171.37±2.83 mg GAE/100 g) olduğu belirlenmiştir. Kontrol ekmeği ile diğer CME örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($P \leq 0.05$).

Hammaddelerin ve Ekmeklerin Antioksidan Kapasitesi

Yapılan araştırmalar, doğal ürünlerin antioksidan potansiyelinin yalnızca tek bir analiz yöntemi ile değerlendirilmesinin yetersiz olabileceğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle, bir gıdanın antioksidan kapasitesini daha bütüncül şekilde

değerlendirebilmek adına birden fazla analiz yöntemine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada, ekmek örneklerinin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde hızlı, uygulanması kolay, tekrarlanabilirliği yüksek ve maliyeti düşük yöntemler olan DPPH, ABTS ve CUPRAC olmak üzere üç farklı analiz protokolü kullanılmıştır. Hammaddeler ve ekmeklerin toplam antioksidan kapasite sonuçları Çizelge 2 ve 3'te sunulmaktadır.

Deng vd. (2012), 24 farklı tahıl türünün lipofilik bileşikler için tetrahidrofuran ve suda çözünür bileşikler için metanol-asetik asit-su karışımı kullanılarak ABTS toplam antioksidan kapasitesini değerlendirmiş ve mısır tahılının bu değeri 4.52 µmol/g olarak rapor etmiştir. Çelik ve Gökmen (2018), tam tahıllı mısır ununun ABTS antioksidan kapasitesini 4.4 µmol Trolox/g olarak tespit etmiştir. Bu çalışmada ise ABTS antioksidan kapasitesi 4.35 µmol TE/g olarak ölçülmüş ve literatürdeki sonuçlarla uyumlu bulunmuştur.

Batista vd. (2017), *P. tricornutum*, *C. vulgaris* ve *T. suecica* türlerine ait mikroalg biyokütlelerinin TEAC değerlerini sırasıyla 248 µmol TEAC/g, 193 µmol TEAC/g ve 160 µmol TEAC/g olarak tespit etmiştir. Bu çalışmada kullanılan *C. vulgaris*'in DPPH antioksidan kapasitesi 193.90 µmol TE/g olarak belirlenmiştir.

Çelik ve Gökmen (2018), tam tahıllı mısır ununun DPPH antioksidan kapasitesini 2,0 µmol Trolox/g olarak rapor ederken, bu değer bu çalışmada 13.29 µmol TE/g olarak ölçülmüş ve literatür sonuçlarından daha yüksek olduğu görülmüştür.

Capocchi vd. (2017), farklı renklerdeki İtalya'ya özgü mısır unu türleriyle ticari sarı mısır unu antioksidan kapasitelerini karşılaştırmış ve sarı mısır ununda CUPRAC yöntemiyle 9.10 µmol TE/g değerini tespit etmiştir. Bu çalışmada CUPRAC yöntemiyle ölçülen 13.68 µmol TE/g değerinin daha yüksek olması, tahılların yetiştirme koşulları ve genetik farklılıklara bağlanabilir.

Ekmek örneklerinin toplam antioksidan kapasitesi değerleri incelendiğinde ise Çelik ve Gökmen (2018) tam tahıllı mısır ekmeğinin kabuğunda, 200

°C'de 30 dakika pişirme sonrası ABTS ve DPPH antioksidan kapasitelerini sırasıyla 10.80 µmol Trolox/g ve 16.90 µmol Trolox/g olarak rapor etmiştir. Trehan vd. (2018), glutensiz çöreklerde kullanılan sarı mısır ununun DPPH ve ABTS inhibisyonunu sırasıyla 0.73-0.81 µM Trolox/mg ve 3.81-4.92 µM Trolox/mg arasında tespit etmiş ve antioksidan aktivitenin fenolik içerikle ilişkili olduğunu gözlemlemiştir. Qazi vd. (2022), glutensiz ekmek formülasyonlarında kontrol ekmeğinin DPPH antioksidan kapasitesini 2.22 mg Vit.C/g, %4 ham *C. vulgaris* biyokütlesi içeren ekmekte 2.59 mg Vit.C/g ve ön işlemlili *C. vulgaris* içeren ekmekte 1.86 mg Vit.C/g olarak belirlemiştir. Bu çalışmada, ekmek örneklerinin toplam antioksidan kapasitesi *C. vulgaris* ilavesiyle artmış ve en yüksek antioksidan kapasite CUPRAC yöntemiyle CME-10 örneğinde 30.23 ± 1.47 µmol TE/g olarak ölçülmüştür. Tüm ekmek örnekleri arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($P < 0.05$).

Ekmeklerin Mineral Madde Değerleri

Mineraller, insan sağlığı için vazgeçilmez bileşenler olup yapısal, düzenleyici ve katalitik görevleriyle vücutta önemli roller üstlenir. İnsan beslenmesinde temel gereksinimlerden biri olan bu besin öğeleri, genellikle ekmek gibi tahıl bazlı ürünler aracılığıyla alınmaktadır. Ancak, tahıl bazlı ürünlerde bulunan fitatlar gibi inhibitörler, minerallerin biyoyararlılığını sınırlandırabilmektedir. Özellikle fitik asidin yüksek şelatlama kapasitesi, Fe, Zn ve Ca gibi minerallerin emilimini olumsuz yönde etkileyerek biyoyararlanımlarını düşürmektedir (Dewettinck vd., 2008; Torrinha vd., 2019). Bu durum, tahıl ürünlerinin mineral katkılarının etkinliğini sınırlandıran önemli bir faktör olarak değerlendirilmektedir. Ekmeklerin mineral madde içeriği Çizelge 3'te verilmiştir.

Genel olarak, glutensiz ürünlerde ve özellikle mısır unu gibi tahıl kaynaklarında kalsiyum (Ca) gibi makro minerallerin yanı sıra demir (Fe), çinko (Zn) ve mangan (Mn) gibi iz elementlerin miktarlarının düşük seviyelerde olduğu bildirilmektedir (Culetu vd., 2021; Yılmaz, 2017). Literatürde yer alan çalışmalara göre, mısır ununda yer alan bazı temel minerallerin aralıkları

şu şekildedir: Ca: 33.2–193 mg/kg, Mg: 294–930 mg/kg, P: 813.7–2720 mg/kg, K: 1487–3150 mg/kg, Fe: 9.1–24.0 mg/kg, Zn: 5.1–17.3 mg/kg ve Mn: 1.5–5.0 mg/kg (Hager vd., 2012a; Nuss ve Tanumihardjo, 2010; Rybicka ve Świgło, 2017; Suri ve Tanumihardjo, 2016; Yılmaz, 2017). Mısır unu kullanılarak hazırlanan ekmeklerde ise mineral içerikleri şu aralıklarda rapor edilmiştir: Ca: 140–225 mg/kg, Mg: 170.33–370.0 mg/kg, K: 1136–1780 mg/kg, P: 750.67–1090.0 mg/kg, Fe: 11.58–13.0 mg/kg, Zn: 4.0–7.78 mg/kg (Yılmaz, 2017; Torrinha vd., 2019). Öte yandan *Chlorella vulgaris*, toplam mineral içeriği bakımından oldukça zengin bir mikroalg türü olup, özellikle eser elementler açısından önemli bir besin kaynağı olarak öne çıkmaktadır. Bu türün mineral madde oranları ile ilgili yapılan çalışmalarda; Ca: 2700–4730 mg/kg, Mg: 1100–4100 mg/kg, P: 1530–9600 mg/kg, K: 980–21500 mg/kg, Fe: 166.3–6800 mg/kg, Mn: 34.6–4000 mg/kg ve Zn: 17.5–5500 mg/kg aralıklarında değerler bildirilmektedir (Batista vd., 2013; Panahi vd., 2016; Tibbetts vd., 2016). Bu bulgular, *C. vulgaris*'in mineral madde yönünden mısır ununa göre çok daha yüksek düzeylerde içerik sunduğunu ortaya koymaktadır. Kontrol ekmeğindeki magnezyum miktarı 166.93 mg/kg iken, *C. vulgaris* oranının artışıyla bu değer kademeli olarak artmış ve CME-10 örneğinde 330.16 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Literatürde, *C. vulgaris*'in yüksek magnezyum içeriğine sahip olduğu (Batista vd., 2013), bu mineralin besin profiline önemli katkılar sağladığı belirtilmiştir. Çalışmamızda magnezyum miktarındaki bu artış, mikroalg ilavesinin mineral zenginleştirmede etkili olduğunu ortaya koymaktadır.

Potasyum miktarı kontrol örneğinde 713.12 mg/kg olarak ölçülmüş ve *C. vulgaris* ilavesiyle artarak CME-10 örneğinde 1095.81 mg/kg seviyesine ulaşmıştır. Potasyumun, tahıllar ve mikroalgler için doğal bir mineral olduğu ve mikroalglerin özellikle yüksek potasyum içeriğiyle öne çıktığı bildirilmiştir (Deng vd., 2012). Bu çalışmadaki artış, mikroalglerin beslenme açısından potasyum kaynağı olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Kontrol örneğinde oldukça düşük bir değer olan 44.15 mg/kg kalsiyum miktarı, *C. vulgaris* oranının artışıyla belirgin şekilde yükselmiş ve CME-10

örneğinde 158.75 mg/kg olarak ölçülmüştür. Literatürde, mikroalglerin kalsiyum açısından zengin bir kaynak olduğu ve bu mineralin gıdalarda fortifikasyon amacıyla kullanılabileceği rapor edilmiştir (Safar vd., 2015). Bu artış, mikroalg ilavesinin ürünlerin kalsiyum profiline olumlu etkisini desteklemektedir.

Manganez miktarı kontrol örneğinde 0.94 mg/kg iken, *C. vulgaris* ilavesiyle artarak CME-10 örneğinde 1.48 mg/kg seviyesine çıkmıştır. Qazi vd. (2021) çalışmalarında, mikroalg ilavesinin iz minerallerden manganez gibi elementlerin miktarını artırdığı belirtilmiştir. Bu sonuç, mikroalglerin mineral zenginleştirmedeki etkinliğini doğrulamaktadır.

Demir içeriği kontrol ekmeğinde 17.94 mg/kg olarak belirlenmiş ve *C. vulgaris* oranına bağlı olarak artarak CME-10 örneğinde 22.74 mg/kg seviyesine ulaşmıştır. Batista vd. (2013), mikroalglerin demir açısından zengin bir bileşim sunduğunu bildirmiştir. Elde edilen sonuçlar, *C. vulgaris*'in ekmeklerde demir içeriğini artırma potansiyelini göstermektedir.

Çinko miktarı incelendiğinde ise kontrol ekmeğinde 7.96 mg/kg iken, CME-10 örneğinde bu değer yaklaşık dört kat artarak 34.93 mg/kg seviyesine ulaşmıştır. Literatürde mikroalglerin çinko içeriğini artırdığı ve özellikle gluten içermeyen ürünlerin çinko miktarını dengelediği belirtilmiştir (Safar vd., 2015). Bu çalışmada da benzer bir sonuç elde edilmiştir.

Bir diğer makro mineral olan fosfor incelendiğinde kontrol örneğinde 536.37 mg/kg olarak ölçülmüş ve *C. vulgaris* ilavesiyle artış göstererek CME-10 örneğinde 1236.03 mg/kg seviyesine ulaşmıştır. Deng vd. (2012), mikroalglerin yüksek fosfor içeriğiyle tahıllara kıyasla daha fazla mineral katkısı sağladığını belirtmiştir. Çalışmamızdaki sonuçlar bu literatür bulgusuyla uyumludur.

Tabloda görüldüğü üzere, mineral içeriklerin tamamında *C. vulgaris* ilavesiyle belirgin bir artış gözlenmiştir. Bu durum, mikroalglerin ekmeklerin besleyici özelliklerini artırdığı yönündeki literatür

bulgularını destekler niteliktedir. Özellikle magnezyum, potasyum, kalsiyum, demir ve fosfor içeriklerinde belirgin iyileşmeler sağlanmıştır. Elde edilen sonuçlar, mikroalglerin gıda ürünlerinde mineral zenginleştirme amacıyla kullanılabileceğini göstermektedir.

Ekmeklerin Ağırlık, Hacim, Spesifik Hacim ve Pişme Kaybı Değerleri

CME içeren hamurlarda, ksantan gamin yüksek su bağlama kapasitesine ek olarak, *Chlorella vulgaris*'in mısır ununa göre daha fazla su tutabilme özelliği sayesinde, formülasyondaki mikroalg oranı arttıkça hamurun su tutma kapasitesinin de yükseldiği gözlemlenmiştir (Becker, 2007; Graça vd., 2018; Tian vd., 2022). Su tutma kapasitesindeki bu artışın, CME grubundaki örneklerde pişirme sırasında yaşanan kütle kaybını azalttığı ve dolayısıyla pişmiş ürünün ortalama ağırlığını artırdığı düşünülmektedir. Artan ağırlığın ise, ürün hacmi sabit kaldığında spesifik hacim değerinde düşüşe yol açabileceği değerlendirilmektedir. Nitekim, Çizelge 3'te sunulan verilere göre; spesifik hacim, toplam hacim ve pişirme kaybı parametreleri açısından kontrol ve CME grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar belirlenmiştir ($P<0.05$).

Spesifik hacim değerleri, kontrol grubunda en yüksek (1.51 ml/g) iken, ilave oranı arttıkça azalmış ve CME-10 grubunda en düşük değer (1.10 ml/g) ölçülmüştür. Bu düşüş, yüksek su tutma kapasitesinin yanı sıra mikroalglerin protein ve lif içeriğinin ekmek gözenek yapısını olumsuz etkileyerek spesifik hacmi azaltabileceğini bildiren önceki çalışmalarla uyumludur (Kulp ve Ponte, 2000).

Ekmeklerin Renk Değerleri

Ekmeklerin renk parametresi, su aktivitesi, pişirme koşulları, hamura eklenen hidrokoloid ve su miktarı, indirgen şekerler, amino asit içeriği ve pH gibi faktörlere bağlıdır (Sabanis ve Tzia, 2011). Mikroalg biyokütlelerinde bulunan klorofil pigmentinin varlığı, ekmeklerin renklerinde meydana gelen değişikliklerin temel sebebi olarak belirtilmiştir (Khemiri vd., 2020). Ekmek örneklerinde iç ve kabuk kısımlarının renklerini gösteren L^* (0 siyah; 100 beyaz), a^* (- yeşil; +

kırmızı), b^* (+ sarı; - mavi) ve ΔE (toplam renk farkı) parametrelerinin değerlerine ait sonuçlar Çizelge 3'de verilmiştir.

Bu çalışmada yapılan renk analizi, ekmeklerin iç ve kabuk renklerindeki farklılıkların, insan gözü tarafından ayırt edilebilecek seviyede olduğunu Şekil 1

ortaya koymuştur ($\Delta E > 3$) (Garcia-Segovia vd., 2007). *C. vulgaris* ilavesinin artışına paralel olarak ekmek örneklerinin hem kabuk hem de iç renginde, L^* , a^* ve b^* parametre değerleri istatistiksel olarak önemli fark göstermiştir ($P < 0.05$). Ekmek örneklerinin görüntüleri Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. *Chlorella vulgaris* ilaveli ekmek görüntüleri
Figure 1. Images of bread supplemented with *Chlorella vulgaris*

Özellikle, L^* değerinin (açıklık) düştüğü, a^* değerinin (kırmızı-yeşil eksen) negatif yöne kayarak yeşil rengin belirginleştiği ve b^* değerinin (mavi-sarı eksen) değişiklik gösterdiği ortaya konmuştur. Önceki araştırmalar, *Chlorella vulgaris* ilavesinin ekmek ürünlerine yeşil renk tonlarının artmasına neden olduğunu ve bu durumun duyusal kabul edilebilirlik açısından önemli bir etken olabileceğini belirlemiştir (Pereira vd., 2024). Tüketicilerin geleneksel ekmeklerde beklediği altın sarısı veya kahverengi tonlarının yeşil renge dönüşmesi, kabul edilebilirlik üzerinde olumsuz bir etki yaratabilmektedir (Ścieszka ve Klewicka, 2020).

Öte yandan, gastronomik uygulamalarda mikroalg kaynaklı renk değişimlerinin maskelenmesi için bazı stratejilerin uygulanabileceği öne sürülmektedir. Örneğin, Gouveia vd. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada, tereyağlı bisküvilerde *Chlorella vulgaris* kullanımının neden olduğu renk değişimlerinin kakao ve vanilin gibi bileşenlerle dengelenerek duyusal kabulü artırabileceği belirtilmiştir (Schüler vd., 2020). Benzer şekilde, Dündar vd. (2023) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, doğal tatlandırıcı ve baharat eklenmesinin mikroalg kaynaklı istenmeyen renk tonlarını hafifletebileceği ifade

edilmiştir (Qazi vd., 2021; Qazi vd., 2022). Bu stratejilerin, ürünlerin pazarlanabilirliğini artırmaya yönelik önemli katkılar sağlayabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, mikroalg ilavesinin ekmeklerin renk özellikleri üzerindeki etkinliğinin yanı sıra, uygulayıcıların bu durumu dengelemek için çeşitli bileşenlerden faydalanmaları gerektiği ortadadır. Bu bağlamda, mikroalglerin duyusal kabul edilebilirliğini artırmak amacıyla yapılan çalışmalar, yalnızca renk değişimlerinin üstesinden gelmekle kalmayıp, aynı zamanda ürünlerin genel besin kalitesini de artırmayı hedeflemektedir (Khemiri vd., 2020, Qazi vd., 2022).

Ekmeklerin Tekstür Profili Analizi (TPA) Değerleri

Ekmek örneklerine ait 1. gün (24. saat) tekstür analiz sonuçları Çizelge 3'te sunulmuştur. Sertlik parametresi açısından en yüksek değer, 61.31 ± 3.43 N ile CME-10 örneğinde ölçülürken, en düşük değer 40.10 ± 2.21 N ile kontrol grubunda kaydedilmiştir. Kontrol ve CME grupları arasındaki bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($P < 0.05$).

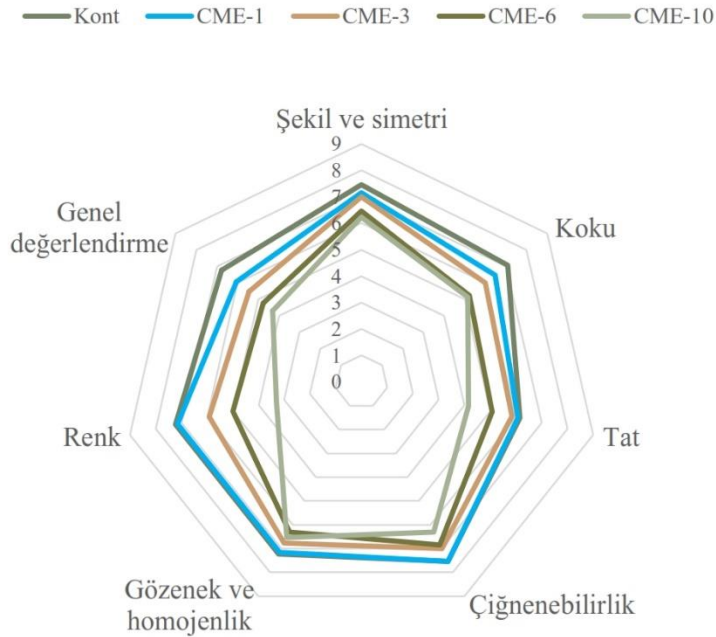
C. vulgaris mikroalglerinin yapısında bulunan protein ve karbonhidratların yanı sıra, doğal hidrokolloid özellikleri, hamur matrisinde yapı dayanımının artırılması ve suyun tutulmasında etkin rol oynamaktadır (Gouveia vd., 2007; Uribe-Wandurraga vd., 2020a). Bu çalışmada, mikroalg konsantrasyonunun artmasıyla birlikte, CME grubunda sertlik, iç yapışkanlık, sakızimsılık ve çiğnenebilirlik değerlerinde artış, buna karşılık esneklik değerlerinde azalma gözlemlenmiştir. Esneklik düzeylerindeki bu azalma, spesifik hacimdeki düşüşle ilişkili olabilir. Elde edilen bulgular, literatürde bildirilen verilerle de uyum göstermektedir. Gouveia vd. (2007), geleneksel tereyağlı bisküvilerde %0.5–3.0 arasında değişen *C. vulgaris* ilavesiyle sertlikte artış raporlamışlardır. Benzer şekilde, Batista vd. (2017) buğday unu bazlı bisküvilerde %2–6 oranında farklı mikroalg türleri (*A. platensis*, *C. vulgaris*, *T. suecica*, *P. tricornutum*) ile yapılan formülasyonlarda sertlikte anlamlı artışlar kaydetmişlerdir. Qazi vd. (2021), %4 oranında *C. vulgaris* eklenen glutensiz ekmeklerde; Uribe-Wandurraga vd. (2020b), tahıl unuyla hazırladıkları 3D baskı çerezlerde %1–4 oranında *C. vulgaris* ilavesiyle; yine Qazi vd. (2021),

buğday unu ile üretilen ekmeklerde %12 oranında *T. chui*, *C. vulgaris* ve *M. gaditana* mikroalg biyokütlesi kullanılarak benzer yönde sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada da sertlikteki artışa paralel olarak çiğnenebilirlik değerlerinde yükseliş gözlemlenmiştir. Çiğnenebilirlik, katı bir gıdayı yutulabilir hale getirmek için gereken toplam enerjinin göstergesi olup, bu parametrede kontrol ile CME-10 örnekleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$). Elde edilen sonuçlar, Belorio ve Gómez (2020) tarafından yapılan değerlendirmelerle de örtüşmekte olup, daha düşük spesifik hacme sahip ekmeklerin genel olarak daha yüksek sertlik ve çiğnenebilirlik değerleri sergilediği ifade edilmiştir.

Ekmeklerde Duyusal Değerlendirme

Duyusal değerlendirme sonuçları, 9 puanlı hedonik skala kapsamında görselleştirilmiş olup (9: aşırı derecede beğendim, 5: ne beğendim ne de beğenmedim, 1: aşırı derecede beğenmedim), Şekil 2'de örümcek ağı grafiği şeklinde sunulmuştur.



Şekil 2. Duyusal değerlendirme grafiği

Figure 2. Sensory evaluation chart

Duyusal değerlendirme sonuçlarına göre, tüm parametrelerde en yüksek puan kontrol örneğine verilmiştir. Buna karşın, gözenek ve homojenlik dışındaki tüm kriterlerde en düşük puanı CME-10 örneği almıştır. *Chlorella vulgaris* ilavesinin ekmekğin besinsel değerini artırmasına rağmen, yüksek oranlarda kullanımı (%6-10), yeşilimsi renk değişimi, balıgımsı koku ve acı tat gibi istenmeyen duysal etkiler oluşturarak tüketici memnuniyetini düşürmektedir (Caporgno ve Mathys, 2018; Schüler vd., 2020).

Belorio ve Gómez (2020), sertlik ve çiğnenabilirlik değerlerinin arttığını rapor etmiş, Graça vd. (2018) ise dokusal özelliklerin duysal kalite açısından önemli olduğunu vurgulamıştır (Qazi vd., 2021). Ancak, düşük seviyelerde (%1-3) kullanımının kabul edilebilirliği koruyabileceği belirtilmektedir. Bazı çalışmalar, mikroalglerin ekmeğe katılmasının duysal profili iyileştirebileceğini göstermektedir (Freitas vd., 2023; Mahmoud vd., 2024). Ayrıca, doğal tatlandırıcılar veya baharatların eklenmesiyle tat ve aroma uyumu artırılabilir (Qazi vd., 2022; Dündar vd., 2023).

Mikroalglerin tat ve kokusu, tüketici kabulünü zorlaştırabilen faktörler arasındadır (Schüler vd., 2020; Dantas vd., 2021). Bu nedenle, ekmek formülasyonlarında mikroalg kullanımı dikkatle değerlendirilmelidir. Düşük seviyelerde ekleme, olumlu etkiler sağlayabilirken, pazarlama stratejileri de göz önünde bulundurulmalıdır (Qazi vd., 2021; Qazi vd., 2022).

SONUÇ

Bu çalışma, sarı mısır unu ve *Chlorella vulgaris* mikroalginin bir arada kullanılarak üretilen ekmeklerin besinsel ve fizikokimyasal özelliklerindeki değişimleri kapsamlı bir şekilde değerlendirmiştir. Çalışma sonuçları, *C. vulgaris* ilavesinin ekmeklerin protein, yağ, kül ve mineral içeriğini önemli ölçüde artırdığını göstermiştir. Özellikle magnezyum, potasyum, kalsiyum, demir, çinko ve fosfor gibi minerallerin içeriğinde gözlemlenen artışlar, mikroalglerin mineral zenginleştirme amacıyla kullanılabileceğini ortaya koymuştur. Ayrıca, *C. vulgaris*'in yüksek su tutma kapasitesinin, ekmeklerin nem içeriğinde azalmaya, pişirme kayıplarının ise azalmasına katkı

sağladığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, mikroalg ilavesiyle spesifik hacim ve gözenek yapısında azalma meydana gelmiş, bu durum yüksek protein ve lif içeriğinin ekmek yapısını olumsuz etkileyebileceğini göstermiştir.

Duyusal değerlendirme sonuçları, panelistlerin *C. vulgaris* oranı arttıkça ekmeklerde belirgin istenmeyen koku ve acımsı tat algıladıklarını ortaya koymuş, bu durum özellikle CME-10 örneğinde düşük puanlarla sonuçlanmıştır. Ancak, besinsel değerlerin artışıyla birlikte antioksidan kapasitelerdeki iyileşmeler, bu tür mikroalglerin işlenmiş gıdalarda fonksiyonel bir bileşen olarak kullanıma potansiyelini desteklemektedir. Genel olarak bu çalışma, *C. vulgaris* ilavesinin mısır unlu ekmeklerin besin içeriğini zenginleştirdiğini ancak ürün kalitesi ve duysal özellikler üzerindeki etkilerinin optimize edilmesi gerektiğini vurgulamaktadır.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar doğrultusunda, mikroalg ilavesine bağlı olarak ekmeklerin besinsel değerlerinde önemli iyileşmeler sağlanırken, duysal özelliklerde bazı olumsuzluklar tespit edilmiştir. Bu durumun giderilmesi için, mikroalg kullanım oranlarının optimize edilmesi ve tat-aroma uyumunu artıracak doğal tatlandırıcılar, baharatlar veya aromatik bileşenlerin eklenmesi önerilmektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar makale ile ilgili herhangi bir kişi veya kurum ile çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

YAZARLARIN KATKISI

Fatma Demircioğlu; kavramsallaştırma, laboratuvar analizleri, metodoloji, yazma-orişinal taslak, Ayşe Neslihan Dündar; kavramsallaştırma, veri iyileştirme, metodoloji, supervizyon, Oya Irmak Şahin ve Furkan Türker Sarıcaoğlu; biçimsel analiz, doğrulama, görselleştirme aşamalarına katkı sağlamıştır. Tüm yazarlar makalenin yazımına katkıda bulunmuş, son halini okumuş ve onaylamışlardır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, birinci yazarın Bursa Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Gıda

Mühendisliği Anabilim Dalı'nda tamamladığı “*Chlorella vulgaris*’in mısır ekmeğine ilavesinin ekmek kalite kriterleri ve hamur reolojisi üzerine etkisi” başlıklı yüksek lisans tezinden kısmen uyarlanmıştır.

KAYNAKLAR

AACC (2015). Approved methods of American Association of Cereal Chemists International (11th ed.). St. Paul, MN, USA.

Abdel-Karim, O. H., Gheda, S. F., Ismail, G. A., Abo-Shady, A. M. (2019). Phytochemical Screening and antioxidant activity of *Chlorella vulgaris*. Delta Journal of Science, 41(1), 79-91.

Adal, S. (2018). Yumurta kabuğu tozu kullanılarak mineral madde bakımından zenginleştirilen ekmeklerin bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi (Yüksek lisans tezi). Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.

Ahmed, H., Kumar, P. (2022). Effect of high-pressure treatment on oscillatory rheology, particle size distribution and microstructure of microalgae *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira platensis*. *Algal Research*, 62: 102617.

Anonim, (2003). Danish food composition databank. Erişim: 05 Mayıs 2018. <http://www.foodcomp.d>

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26): 7970–7981.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Esin, M. (2008). Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchimica Acta*, 160(4): 413–419.

Arendt, E.K., Dal Bello, F. (Eds.). (2008). Gluten-free cereal products and beverages. London: Academic Press.

Argun, M. Ş. (2016). Ülkemizde yetiştirilen bazı mısır çeşitlerine uygulanan alkali pişirme işleminin

mısır unlarının karakteristik özellikleri üzerine etkilerinin araştırılması. (Doktora tezi).

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.

Batista, A.P., Niccolai, A., Biondi, N., Rodolfi, L., D’Ottavio, M., Tredici, M.R. (2017). Microalgae as potential sources of high-value compounds for food and feed. *Journal of Applied Phycology*, 29(3): 1357–1372.

Becker, E.W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25(2): 207–210.

Belorio, M., Gómez, M. (2020). Effect of hydration on gluten-free breads made with hydroxypropyl methylcellulose in comparison with psyllium and xanthan gum. *Foods*, 9(11): 1548.

Bledsoe, A.C., King, K.S., Larson, J.J., Snyder, M., Absah, I., Choung, R.S., Murray, J.A. (2019). Micronutrient deficiencies are common in contemporary celiac disease despite lack of overt malabsorption symptoms. *Mayo Clinic Proceedings*, 94(7): 1253–1260.

Bourvellec, L.B., Renard, C.M.G.C. (2012). Interactions between polyphenols and macromolecules: Quantification methods and mechanisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(3): 213–248.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.

Capocchi, A., Bottega S., Spanò C., Fontanini D. (2017). Phytochemicals and antioxidant capacity in four Italian traditional maize (*Zea mays* L.) varieties. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 68(5): 515-524.

Caporgno, M. ve Mathys, A. (2018). Trends in microalgae incorporation into innovative food products with potential health benefits. *Frontiers in Nutrition*, 5.

- Capriles, V.D., Arêas, J.A.G. (2014). Novel approaches in gluten-free breadmaking: Interface between food science, nutrition, and health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5): 871–890.
- Culetu, A., Susman, I. E., Duta, D. E., Belc, N. (2021). Nutritional and functional properties of gluten-free flours. *Applied Sciences*, 11(14), 6283.
- Çelik, İ., Gökmen, V. (2018). Impact of thermal processing on total phenolic and antioxidant capacities of whole grain cereals. *Journal of Cereal Science*, 81: 55–60.
- Dantas, D., Cahú, T., Oliveira, C., Abadie-Guedes, R., Roberto, N., Santana, W., Bezerra, R. (2021). *Chlorella vulgaris* functional alcoholic beverage: effect on propagation of cortical spreading depression and functional properties. *Plos One*, 16(8), e0255996.
- Demirkesen, I., Ozkaya, B. (2022). Recent strategies for tackling the problems in gluten-free diet and products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(3): 571–597.
- Deng, G.F., Xu, X.R., Guo, Y.J., Xia, E.Q., Li, S., Wu, S., Chen, F., Ling, W.H., Li, H.B. (2012). Determination of antioxidant property and their lipophilic and hydrophilic phenolic contents in cereal grains. *Journal of Functional Foods*, 4, 906–914.
- Deora, N.S., Deswal, A., Mishra, H.N. (2014). Alternative approaches towards gluten-free dough development: Recent trends. *Food Engineering Reviews*, 6(3): 89–104.
- Dewettinck, K., Van Bockstaele, F., Kuhne, B., Van de Walle, D., Courtens, T.M., Gellynck, X. (2008). Nutritional value of bread: Influence of processing, food interaction, and consumer perception. *Journal of Cereal Science*, 48(2): 243–257.
- Diprat, A.B., Silveira Thys, R.C., Rodrigues, E., Rech, R. (2020). *Chlorella sorokiniana*: A new alternative source of carotenoids and proteins for gluten-free bread. *LWT*, 134: 110020.
- Dündar, A., Şahin, O., Sarıcaoglu, F. (2023). Low-fat cookies with *chlorella vulgaris*: effects on dough rheology, physical, textural and sensory properties of cookies. *Gıda / the Journal of Food*, 48(3), 526–544.
- El Khoury, D., Balfour-Ducharme, S., Joye, I.J. (2018). A review on the gluten-free diet: Technological and nutritional challenges. *Nutrients*, 10(10): 1410.
- Freitas, M., Ferreira, J., Nunes, M., Raymundo, A. (2023). The chemistry and bioactive properties behind microalgae-enriched gluten-free breads. *International Journal of Food Science & Technology*, 59(2), 872–885.
- Foschia, M., Horstmann, S., Arendt, E.K., Zannini, E. (2016). Nutritional therapy—Facing the gap between coeliac disease and gluten-free food. *International Journal of Food Microbiology*, 239: 113–124.
- Fradique, M., Batista, A.P., Nunes, M.C., Gouveia, L., Bandarra, N.M., Raymundo, A. (2010). Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(10): 1656–1664.
- Garcia-Segovia, P., Andrés-Bello, A., Martínez-Monzó, J. (2007). Effect of cooking method on mechanical properties, color, and structure of beef muscle (*M. pectoralis*). *Journal of Food Engineering*, 181: 64–72.
- Garzon, R., Skendi, A., Antonio Lazo-Velez, M., Papageorgiou, M., Rosell, C. M. (2021). Interaction of dough acidity and microalga level on bread quality and antioxidant properties. *Food Chemistry*, 344.
- Gouveia, L., Batista, A.P., Miranda, A., Empis, J., Raymundo, A. (2007). *Chlorella vulgaris* biomass used as colouring source in traditional butter cookies. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(3): 433–436.
- Graça, C., Fradinho, P., Sousa, I. Raymundo, A. (2018). Impact of *Chlorella vulgaris* on the rheology of wheat flour dough and bread texture. *LWT-Food Science and Technology*, 89 (November 2017), 466–474.
- Green, P.H., Lebowhl, B., Greywoode, R. (2015). Celiac disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(5): 1099–1106.
- Güdü, H. (2016). Mısırlı ekmeklerde mısır unu seviyesi ve katkı kullanımının kalite üzerine etkisi.

- Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Erzurum, 104 s.
- Gwartz, J.A., Garcia-Casal, M.N. (2014). Processing maize flour and corn meal food products. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1312(1): 66–75.
- Hager, A.S., Arendt, E.K. (2013). Influence of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), xanthan gum and their combination on loaf specific volume, crumb hardness and crumb grain characteristics of gluten-free breads based on rice, maize, teff and buckwheat. *Food Hydrocolloids*, 32(1): 195–203.
- Holtmeier, W., Caspary, W.F. (2006). Celiac disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 1(1): 3.
- Kahraman, G. (2016). Development of gluten-free bread formulations based on chickpea flour: Optimization of formulation, evaluation of dough properties and bread quality. Unpublished doctoral dissertation, İzmir Institute of Technology, İzmir, Turkey
- Karabulut, I., Yemiş, O. (2019). Fenolik Bileşiklerin Bağlı Formları ve Biyoyararlılığı. *Akademik Gıda*, 17 (4): 526-537.
- Kelly, C.P., Bai, J.C., Liu, E., Leffler, D.A. (2015). Advances in diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology*, 148(6): 1175–1186.
- Khemiri, S., Khelifi, N., Nunes, M. C., Ferreira, A., Gouveia, L., Smaali, I., Raymundo, A. (2020). Microalgae biomass as an additional ingredient of gluten-free bread: Dough rheology, texture quality and nutritional properties. *Algal Research*, 50, 101998.
- Kılınççeker, O., Hepsağ, F. (2010). Kaplama malzemesi olarak mısır unlarının bazı kalite özelliklerinin belirlenmesi. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5(2): 20–27.
- Köten, H., Ünsal, A.M. (2021). Mısır unu ilavesinin pandispanya tipi keklerin morfojeometrik, fonksiyonel ve tekstürel özelliklerine etkisi. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 25(2): 172-184.
- Kulp K, Ponte Jr J.G (Eds.), (2000), Handbook of cereal science and technology (2nd Ed.), *Marcel Dekker*, New York, USA, 1-30.
- Lopes, A.P., Santos, F.M., Silva, T.F.C.V., Vilar, V.J.P., Pires, J.C.M. (2020). Outdoor cultivation of the microalga *Chlorella vulgaris* in a new photobioreactor configuration: The effect of ultraviolet and visible radiation. *Energies*, 13(8): 1962.
- Ludvigsson, J.F., Murray, J.A. (2019). Epidemiology of celiac disease. *Gastroenterology Clinics of North America*, 48(1): 1-18.
- Machado, A., Pereira, H., Costa, M., Santos, T., Carvalho, B., Soares, M., Silva, J. (2020). Development of an organic culture medium for autotrophic production of *Chlorella vulgaris* biomass. *Applied Sciences*, 10(6): 2156.
- Mahmoud, N., Ferreira, J., Raymundo, A., Nunes, M. (2024). Enhancing the protein, mineral content, and bioactivity of wheat bread through the utilisation of microalgal biomass: a comparative study of *Chlorella vulgaris*, *Phaeodactylum tricornutum*, and *Tetraselmis chuii*. *Applied Sciences*, 14(6), 2483.
- Martinez, M.M., Gómez, M. (2017). Rheological and microstructural evolution of the most common gluten-free flours and starches during bread fermentation and baking. *Journal of Food Engineering*, 197, 78–86.
- Matos, M.E., Rosell, C.M. (2015). Understanding gluten-free dough for reaching breads with physical quality and nutritional balance. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(4): 653–661.
- Molino, A.M., Miccio, G., Iovine, A., Marino, T., Musmarra, D. (2018). Microalgae characterization for consolidated and new application in human food, animal feed and nutraceuticals. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15 (11), 1–21.
- Naczki, M., Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5): 1523–1542.
- Nuss, E.T., Tanumihardjo, S.A. (2010). Maize: A paramount staple crop in the context of global

- nutrition. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(4): 417–436.
- Panahi, Y., Darvishi, B., Sahebkar, A., Jowzi, N., Beiraghdar, F., Tayarani-Najaran, Z. (2016). *Chlorella vulgaris*: A multifunctional dietary supplement with diverse medicinal properties. *Current Pharmaceutical Design*, 22(2): 164–173.
- Pereira, T., Barroso, S., Pinto, F., Silva, F., Teixeira, P., Mendes, S., Gil, M. (2024). Application of microalgae as natural colorant for pastry and confectionary products. *Food Science & Nutrition*, 12(11), 9479–9492.
- Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F. (2015). Macromolecular antioxidants or non-extractable polyphenols in fruit and vegetables: Intake in four European countries. *Food Research International*, 74, 315–323.
- Qazi, W. M., Ballance, S., Kousoulaki, K., Uhlen, A. K., Kleinegris, D. M. M., Skjånes, K., Rieder, A. (2021). Protein enrichment of wheat bread with microalgae: *Microchloropsis Gaditana*, *Tetraselmis Chui* and *Chlorella Vulgaris*. *Foods*, 10 (12).
- Qazi, M. W., de Sousa, I. G., Nunes, M. C., Raymundo, A. (2022). Improving the nutritional, structural, and sensory properties of gluten-free bread with different species of microalgae. *Foods*, 11 (3).
- Rybicka, I., Gliszczy-Swiglio, A. (2017). Minerals in grain gluten-free products. The content of calcium, potassium, magnesium, sodium, copper, iron, manganese, and zinc. *Journal of Food Composition and Analysis*, 59, 61–67.
- Sabanis, D., Tzia, C. (2011). Effect of hydrocolloids on selected properties of gluten-free dough and bread. *Food Science and Technology International*, 17(4): 279–291.
- Safar, H., Van Wagenen, J., Møller, P., Jacobsen, C. (2015). Microalgal carotenoids: A review of production, extraction, stability, and bioaccessibility. *Marine Drugs*, 13(9): 5462–5487.
- Safavi, N., Gharekhani, M. (2019). The effect of sodium caseinate and microbial transglutaminase enzyme on rheological, physical, and sensorial properties of corn-based gluten-free bread. *Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology*, 7(4): 365–376.
- Sahni, P., Sharma, S., Singh, B. (2019). Evaluation and quality assessment of defatted microalgae meal of *Chlorella* as an alternative food ingredient in cookies. *Nutrition and Food Science*, 49 (2), 221–231.
- Schüler, L., Morais, E., Trovão, M., Machado, A., Carvalho, B., Carneiro, M., ... ve Varela, J. (2020). Isolation and characterization of novel *chlorella vulgaris* mutants with low chlorophyll and improved protein contents for food applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8.
- Scieszka, S. ve Klewicka, E. (2020). Influence of the microalga *chlorella vulgaris* on the growth and metabolic activity of *Lactobacillus* spp. bacteria. *Foods*, 9(7), 959.
- Simić, M., Žilić, S., Šimuruna, O., Filipčev, B., Škrobot, D., Vančetović, J. (2018). Effects of anthocyanin-rich popping maize flour on the phenolic profile and the antioxidant capacity of mix-bread and its physical and sensory properties. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 68(4): 299–308.
- Singh, N., Singh, S., Shevkani, K. (2019). Maize: Composition, bioactive constituents, and unleavened bread. *Flour and Breads and Their Fortification in Health and Disease Prevention*, 111–121.
- Sit, N., Misra, S., Deka, S. C. (2013). ‘Physicochemical, functional, textural and colour characteristics of starches isolated from four taro cultivars of north-east India’, *Starch-Stärke*, 65: (11-12), 1011-1021.
- Suri, D.J., Tanumihardjo, S.A. (2016). Effects of different processing methods on the micronutrient and phytochemical contents of maize: from A to Z. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15 (5), 912–926.
- Tian, S., Wang, F., Luo, M., Yan, F., Ke, D., Chen, H., Gao, S. (2022). Effect of *Chlorella pyrenoidosa* powder on rheological properties and fermentation characteristics of dough. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46 (4), 1–10.

- Tibbetts, S. M., MacPherson, T., McGinn, P. J., Fredeen, A. H. (2016). In vitro digestion of microalgal biomass from freshwater species isolated in Alberta, Canada for monogastric and ruminant animal feed applications. *Algal Research*, 19, 324–332.
- Torrinha, Á., Oliveira, M., Marinho, S., Paíga, P., Delerue-Matos, C. Simone, M. (2019). Mineral Content of Various Portuguese Breads: Characterization, Dietary Intake, and Discriminant Analysis. *Molecules*, 24 (2787).
- Trehan, S., Singh, N., Kaur, A. (2018). Characteristics of white, yellow, purple corn accessions: phenolic profile, textural, rheological properties and muffin making potential. *Journal of Food Science and Technology*, 55 (6), 2334–2343.
- Tümer, E., Özer, S. (2018). Bazı fonksiyonel ürünlerin glutensiz ekmek üretiminde ekmek nitelikleri üzerine etkisi. *Çukurova Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 36: 6.
- Uribe-Wandurraga, Z. N., Igual, M., García-Segovia, P., Martínez-Monzó, J. (2020a). In vitro bioaccessibility of minerals from microalgae-enriched cookies. *Food and Function*, 11 (3), 2186–2194.
- Uribe-Wandurraga, Z. N., Igual, M., Reino-Moyón, J., García-Segovia, P., Martínez-Monzó, J. (2020b). Effect of microalgae (*Arthrospira platensis* and *Chlorella vulgaris*) addition on 3D printed cookies. *Food Biophysics*, 16 (1), 27–39.
- Vitali, D., Dragojević, I. V., Šebečić, B. (2009). Effects of incorporation of integral raw materials and dietary fibre on the selected nutritional and functional properties of biscuits. *Food Chemistry*, 114 (4), 1462–1469.
- Wandersleben, T., Morales, E., Burgos-Diaz, C., Barahona, T., Labra, E., Rubilar, M., Salvo-Garrido, H. (2018). Enhancement of functional and nutritional properties of bread using a mix of natural ingredients from novel varieties of flaxseed and lupine. *LWT – Food Science and Technology*, 91: 48–54.
- Wazed, M. A., Islam, M. R. (2021). Influence of barley, corn and rice flour on physical, chemical and sensory characteristics of gluten-free bread. *Malaysian Journal of Halal Research*, 4 (2), 36–41.
- Yılmaz, V.A. (2017). Hamsi unu ile zenginleştirilen mısır ekmeğinin özellikleri ve raf ömrünün belirlenmesi (Doktora tezi). Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.

LİPAZ KATALİZLİ ENZİM MODİFİYE KREMA ÜRETİMİ VE LEZZET KATKISI OLARAK KULLANIMI

Ezgi YIKICI¹, Yonca KARAGÜL YÜCEER^{2*}

¹ Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ezine Gıda İhtisas Organize Sanayi Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Ezine, Çanakkale, Türkiye

² Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Çanakkale, Türkiye

Geliş / Received 14.01.2025; Kabul / Accepted: 14.04.2025; Online baskı / Published online: 28.04.2025

Yıkıcı, E., Karagül Yüceer, Y. (2025). Lipaz katalizli enzim modifiye krema üretimi ve lezzet katkısı olarak kullanımı. GIDA (2025) 50 (3) 361-373 doi: 10.15237/ gida.GD25017

Yıkıcı, E., Karagül Yüceer, Y. (2025). Production of lipase-catalyzed enzyme modified cream and its use as a flavor additive. GIDA (2025) 50 (3) 361-373 doi: 10.15237/ gida.GD25017

ÖZ

Enzim modifiye süt ürünleri üretiminde kullanılan başlıca enzim grubunu lipazlar oluşturmaktadır. Süt kremasının lipaz enzimi ile hidrolizasyonu ve esterifikasyonu sonucu oluşan ürüne lipolize krema (enzim modifiye krema- EMK) denilmektedir. EMK; konsantre krema-tereyağı aroma eldesi, düşük maliyet, sürdürülebilir endüstriyel uygulanabilirlik ve son ürün kararlılığı nedeniyle birçok yönden avantaj sağlamaktadır. Aroma oluşumu geleneksel süt ürünlerinde olgunlaştırma ve depolama sırasında uzun sürede gerçekleşmektedir. Aylarca sürebilen bu aşamada gıdanın doğal florasından kaynaklanan mikrobiyel faaliyetlerin kontrol altına alınamaması sonucu gıda güvenliği tam olarak sağlanamayabilmektedir. Üretim ve depolama kapasitesinde aksamalar olabilmektedir. Böylece standart ürün üretmekte zorluklar yaşanabilmektedir. Geleneksel üretimdeki bu dezavantajların aksine kontrollü koşullarda uygulanan enzimatik modifikasyonlar ile arzu edilen konsantre aroma ve lezzet 1-7 gün gibi kısa sürede, konsantre halde elde edilmektedir. Literatürde EMK ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu derleme lipaz enziminin özelliklerini, süt teknolojisinde kullanım alanlarını ve lezzet katkısı olarak üretilen EMK konusunda yapılan çalışmaları kapsamaktadır.

Anahtar kelimeler: Lipoliz, enzim modifiye krema, olgunlaşma, lezzet artırıcı

PRODUCTION OF LIPASED ENZYME MODIFIED CREAM AND ITS USE AS A FLAVOR ADDITIVE

ABSTRACT

Lipases are the main enzyme group used in the production of enzyme modified dairy products. The product resulting from the hydrolyzation and esterification of milk cream with lipase enzyme is called lipolyzed cream (enzyme modified cream-EMC). EMC is advantageous in many ways due to concentrated cream-butter flavor production, low cost, sustainable industrial applicability and product stability. Aroma formation occurs in traditional dairy products over a long period of time during ripening and storage. At this stage, which can last for months, food safety may not be fully insured as a result of the failure to control microbial activities originating from the natural flora of the food. Disruptions in production and storage capacity are subject to change. Thus, difficulties may

* Sorumlu yazar / Corresponding author

✉: yoncayuceer@comu.edu.tr

☎: (+90) 286 218 0018/20051

☎s: (+90) 286 218 0541

Ezgi Yıkıcı; ORCID no: 0000-0002-7274-5584

Yonca Karagül Yüceer; ORCID no: 0000-0002-9028-2923

arise in producing standard products. Unlike these disadvantages in traditional production, the desired concentrated aroma and taste can be obtained in a short time such as 1-7 days with enzymatic modifications applied under controlled conditions. Studies on EMC are quite limited in literature. This review covers the properties of the lipase enzyme, its areas of use in dairy technology, and studies on EMC produced to develop flavor in some foods.

Keywords: Lipolysis, enzyme modified cream, maturation, flavor enhancer

GİRİŞ

Enzimler, kimyasal reaksiyonların gerçekleşmesi için gerekli aktivasyon enerjisini düşürerek tepkimeyi hızlandıran protein yapısında katalizörlerdir (Santos vd., 2022; Alzahrani vd., 2024). Enzimatik reaksiyonlar sonucunda gıdaların tat, aroma, renk, doku ve işlenebilirlik gibi özellikleri geliştirilmektedir (Sutay Kocabaş, 2021; Kumar vd., 2024). Doğada neredeyse tüm lezzet bileşenlerinin kaynağı enzim reaksiyonlarıdır. Aroma bileşiklerinin bazıları birincil son ürünlerdir, bazıları ise kimyasal ve enzimatik değişikliklerin ikincil veya üçüncül reaksiyon ürünleridir. Bu nedenle aroma dinamik bir sistemdir ve değişim halindedir (Kılara, 2011; Özatay ve Kaya, 2024).

Enzimlerin-enzimatik katalizörlerin süt endüstrisinde başlıca kullanım nedenleri ve avantajları belirtilmiştir. Bunlar; yeni fiziksel, duyu ve fonksiyonel özellikli süt ve süt ürünleri üretmek, yüksek ürün kalitesi elde etmek, kısıtlanmış sentez yolları ile kapasiteyi arttırmak, diyet ürünlerin hazırlanmasını sağlamak, fonksiyonel özellikleri modifiye etmek, doku ve lezzet gelişimini sağlamak, peynirin olgunlaştırılmasını hızlandırmak, hammadde girdisinde azalma ve düşük enerji kullanımı ile maliyet tasarrufu sağlamak, kimyasal bir reaksiyonun yan ürün oluşturmada gerçekleşmesini sağlamak ve çevre dostu olmaları ile atık oluşturmamalarıdır (Greicius vd., 2023; Castro ve Pinheiro, 2024). Lipaz, proteaz, katalaz, laktaz, transglutaminaz gibi enzimler süt ve ürünlerinin üretiminde veya kalitelerinin artırılmasında kullanılan başlıca enzim gruplarıdır (Mir Khan ve Selamoglu, 2020; Kumar vd., 2024; Özatay ve Kaya, 2024).

Süt yağının lipolizi ile lezzet yoğunluğu artırılmış doğal katkı maddesi elde etme yöntemi, üzerinde çalışılan başlıca konulardan biridir. Son yıllarda süt ve ürünlerine uygulanan enzimatik hidroliz ile

üretilecek enzim modifiye peynir, enzim modifiye krema ve enzim modifiye tereyağı önem kazanmıştır (Erbay vd., 2017). Enzim modifiye süt ürünleri üretimi ile geleneksel üretimde karşılaşılan bazı dezavantajlar da giderilmektedir. Uygulanan enzimatik işlemler ile aylarca depolama sonucu elde edilebilen geleneksel lezzetlerin daha kısa sürede (1-7 gün) konsantre olarak sağlanması, depolama maliyetlerinin bu sayede düşmesi, olgunlaştırma-depolama süresinin uzunluğuna bağlı olarak gıdanın mevcut florasında bulunan mikroorganizmaların kontrolsüz gelişme ihtimali ile bozulmaya sebep olabilecek olası mikrobiyel faaliyetlerin önlenmesi, son ürün kalitesi açısından standart bir üretim sağlanması ile mevcut bazı risklerin ortadan kaldırılması mümkündür. Bu derlemenin amacı lipaz enziminin özelliklerini, süt teknolojisinde kullanım alanlarını, avantajlarını ve lezzet katkısı olarak üretilen enzim modifiye krema (EMK) konusunda yapılan çalışmaları ortaya koyarak önemini vurgulamaktır.

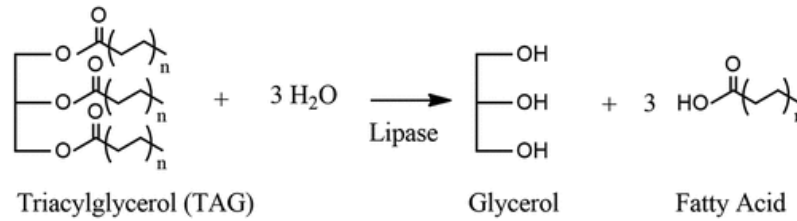
LİPAZLARIN KAYNAKLARI VE ÖZELLİKLERİ

Lipitlerin parçalanmasını sağlayan lipazlar, yağ asitlerini serbest bırakan yağ-su arayüzünde tri-, di- ve monoasilgliserollerini hidrolize eden gliserol ester hidrolazlardır (EC 3.1.1.3). Şekil 1'de gösterildiği gibi lipazlar; suyun varlığında triasilgliseroldeki yağ asidi ester bağının hidrolizinden ve serbest yağ asitlerinin salınımından sorumludur (Hossein vd., 2009; Melani vd., 2020). Genellikle gliserol molekülünün *sn-1* ve *sn-3* karbon pozisyonundaki yağ asitlerinin ester bağlarını birlikte veya ayrı olarak hidrolize ederler (Law, 2010).

Lipazların etki göstermesi için substratların suda çözünmemesi ve emülsifiye edilmesi gerekmektedir (Kılara, 2011; Konkit ve Kim, 2016; Mohammadi vd., 2021; Marwa vd., 2024). Lipazlar, lipoliz olarak adlandırılan hidroliz reaksiyonunun yanı sıra esterifikasyon,

interesterifikasyon, asidoliz, alkoliz ve aminoliz gibi sentez reaksiyonlarını da katalize etmektedir. Sulu ortamlarda hidroliz tepkimesi baskın olarak gerçekleşirken, sentez tepkimeleri su miktarının sınırlı olduğu veya bulunmadığı (organik) ortamda gerçekleşmektedir. Lipazların birincil rolü, lezzet gelişiminin öncüleri olan çeşitli serbest yağ asitlerini açığa çıkarmak ve farklı uçucu bileşiklerin oluşumunu sağlamaktır (Asif vd., 2023). Sonuç olarak son ürünün doğrudan veya dolaylı olarak lezzet gelişimine katkı sağlanmaktadır. Özellikle kısa ve orta zincirli uçucu serbest yağ asitlerinin düşük algılama eşikleri ürün lezzetini doğrudan etkilemektedir (Fraga vd., 2020; Koyuncu ve Batur, 2023). Bu nedenle kısa zincirli (4-8 karbonlu) ve orta zincirli (10-12 karbonlu) yağ asitleri gıda endüstrisinde doğal katkı maddelerine yönelik artan talebi karşılayan aroma vericiler olarak da kullanılmaktadır (Soares vd., 2020). Kısa zincirli yağ asitleri olan bütanoik, hekzanoik ve oktanoik

asitler istenen tereyağı lezzetine önemli katkı sağlayan bileşiklerdir (Kurtovic vd., 2016; Omar vd., 2016; Ulubaş, 2022). Wang ve Xu (2009); yaptıkları çalışmada peynir aromasından sorumlu başlıca yağ asitlerinin bütanoik asit ve hekzanoik asit olduğunu bildirmiştir. Omar vd. (2016) tarafından süt yağının 3 farklı mikrobiyel lipaz ile hidrolize edildiği çalışmada, örneklerde bütanoik asit, hekzanoik asit ve oktanoik asitin baskın olarak açığa çıktığı bildirilmiştir. Bu kısa zincirli yağ asitleri kremamsı, tereyağı ve keskin peynir aromaları ile ilişkilendirilmiştir (Wang ve Xu 2009; Kendirci vd., 2020; Zhang vd., 2021a, Karakus vd., 2022). Lipaz aktivitesini etkileyen başlıca faktörler; enzim türü, enzim kaynağı, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, emülsiyon stabilitesi, yağ-su arayüzeyi, sıcaklık, pH, süre, radyasyon, yüksek basınç, nem, emülgatör kullanımı ve çalkalama işlemi olarak belirtilmiştir (Law, 2010; Kılara, 2011).



Şekil 1. Lipaz hidroliz reaksiyonunun genel şeması (Messaoudi vd., 2010; Melani vd., 2020).

Doğada, çeşitli kaynaklardan temin edilebilen lipazların reaksiyon özelliklerinde önemli farklılıklar vardır ve bu özelliğe enzim özgüllüğü denilmektedir. Çoğunlukla trigliseritlerin gliserol kısmında konumsal özgüllük gösterirler. Bu özgüllük durumu dört gruba ayrılmaktadır. Bunlar: substrata özgüllük (yalnız monoasilgliserollere, mono- ve diasilgliserollere ve yalnızca triasilgliserollere özgüllük gösterme), konumsal özgüllük (*sn-1* ve *sn-3* konumsal özgüllük veya yalnızca *sn-2* konumsal özgüllük gösterme), yağ asidine özgüllük (belirli yağ asitlerine özgül olma durumu) ve özgüllük göstermeme (substrat veya açıl pozisyonlarının hiçbirine tercih göstermeme) durumlarıdır (Hossein vd, 2009; Kılara 2011; Rivero-Pino vd., 2020). Bu durum farklı lipaz enzimleri kullanılarak hidrolize edilen ürünlerin lezzet çeşitliliğini arttırmaktadır (Wang ve Xu 2009). Mikrobiyel

lipazların büyük çoğunluğunun (*Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus delmar*, *Pseudomonas fragi* ve *Penicillium roqueforti* kaynaklı enzimler) ve pregastrik esterazların *sn-1* ve *sn-3*'e konumsal özgüllük gösterdiği düşünülmektedir. Diğer bazı mikrobiyel lipazların (*Candida cylindracea* ve *Staphylococcus aureus* kaynaklı lipazlar) ise herhangi bir özgüllük gösterme özelliği yoktur. Bunlar, trigliserit yapısındaki yağ asitlerini rastgele serbest bırakmaktadır (Kilcawley, 2006; Kılara, 2011). Nyssöola vd. (2015) süt yağında seçici olarak orta ve uzun zincirli yağ asitlerinin salınımını azaltarak doymamış yağ asidi bakımından zengin ürün üretmeyi amaçlamıştır. Bu nedenle çalışmada üç farklı mikrobiyel lipaz (*Candida rugosa* kaynaklı CRU-NS, *Thermomyces lanuginosus* kaynaklı TLA-1,3, *Pseudozyma antarctica* kaynaklı PAN-2) kullanılmıştır. Hidrolize edilmemiş süt yağı ile karşılaştırıldığında, *sn-2*

bölgesine özgülük gösteren PAN-2 (*Pseudozyma antarctica*) lipaz ile muamele edilen numune orta ve uzun zincirli yağ asitleri orantılı olarak azalırken doymamış yağ asitlerinin miktarı artmıştır. Araştırmacılar PAN-2 lipaz ile hidrolize edilen ürünün sağlık açısından potansiyel olarak yararlı olduğunu ve tereyağı ikame ürünlerinin üretiminde kullanılabileceğini bildirmiştir.

Genel olarak lipazlar, kullanılan substrata bağlı olarak pH 6.0- 8.0 ve 30-40 °C'lik bir sıcaklık aralığında aktivite göstermektedir, ancak bu değerler enzimin kaynağına göre değişebilmektedir (Santos vd., 2022). %99 yağlı tereyağı emülsiyonu ve %35 yağlı UHT kremanın substrat olarak kullanıldığı bir çalışmada mikrobiyel kaynaklı altı farklı ticari lipazın mavi küflü peynir lezzeti üretme yeteneği ile lipolitik aktiviteleri incelenmiştir. Sonuçta aromalı peynirlerin hazırlanması için gerekli olan serbest yağ asidi konsantrasyonunun kullanılan UHT krema ile daha fazla açığa çıktığı, lipazların sıcaklık değişimine kıyasla pH değişimine daha hassas olduğu ortaya konmuştur (Tomasini vd., 1993).

Lipazlar doğada mikrobiyel, hayvansal ve bitkisel kaynaklardan elde edilmektedir (Kıymacı vd., 2022; Castro ve Pinheiro, 2024; Fahim vd., 2024). Bitkisel kaynaklı lipazlar yağlı tohumlardan (buğday, badem, fındık, kayısı çekirdeği, hint fasulyesi, antep fıstığı tohumu vb.) izole edilmekle birlikte ticari olarak kullanımları mevcut değildir (Hossein vd., 2009; Kilara, 2011; Borrelli ve Trono, 2015). Süt endüstrisinde aroma üretiminde ve modifikasyon çalışmalarında kullanılan lipazların ana kaynakları mikroorganizmalar ve hayvanlardır. Hayvansal ve mikrobiyel (maya, küf veya bakteriler) kaynaklı lipazlar substrat özelliklerine göre değişim gösterdikleri için farklı lezzetlerin üretiminde önemli rol oynamaktadır. Mikroorganizmaların çeşitliliği sonucu farklı katalitik aktiviteler göstermeleri, yüksek verimleri, kolay ekstraksiyon prosedürleri, ucuz ve hızlı sonuç vermeleri, enzimatik reaksiyon ürünlerinin kararlı ve stabil olması gibi sebeplerden dolayı endüstride mikrobiyel lipaz kullanımı daha yaygındır. Mikrobiyel enzimlerle karşılaştırıldığında hayvansal kaynaklı enzimlerin sayıları ve çeşitleri oldukça azdır. Ancak farklı hayvansal

lipazlar da ticari olarak piyasada bulunmaktadır (Kilara, 2011; Konkrit ve Kim, 2016). Farklı tür memelilerden, balık ve böceklerden lipaz elde edilmiştir. Somon balığından elde edilen sindirim lipazının sütte lezzet bileşenleri oluşturma potansiyelinin araştırıldığı bir çalışmada (Kurtovic vd., 2016), lipolize süt örneklerinde yüksek konsantrasyonlarda bütanoik asit, hekzanoik asit ve 2-heptanon açığa çıkmıştır. Endüstriyel işlemlerde kullanılan hayvansal lipazlar; pregastrik esterazlar (lingual lipaz) ve pankreatik (pankreas bezi) lipazlar olarak iki kaynaktan sağlanmaktadır (Kilara, 2011; Melani vd., 2020). Pankreatik lipazlar hayvanların pankreas bezlerinden (özellikle sığır ve domuz) elde edilmektedir. Pregastrik esterazlar ise geniş getiren genç hayvanların (oğlak, kuzu, buzağı) pregastrik dokularından diğer bir ifade ile epiglot bölgelerinden (dil kökü dokusu) elde edilmektedir (Kilara, 2011; Sutay Kocabaş vd., 2022). Aslında hayvansal enzimler, hayvanların atılan veya az değerli olan organlarından elde edilmektedir. Örneğin; pankreas çok zengin bir enzim (amilaz, proteaz ve lipaz) kaynağıdır. Hayvansal kaynaklı lipazlar, genellikle kısa ve orta zincir uzunluğuna sahip yağ asitlerini hidrolize etmektedir (Mir Khan ve Selamoglu, 2020). Trigliserit yapısındaki *sn-1* ve *sn-3* bölgelerine etki ederek son üründe bütanoik asit miktarını arttırmaktadırlar. Ha ve Lindsay (1993) tarafından 11 farklı lipaz enzimi (hayvansal ve mikrobiyel kaynaklı) ile üç farklı substratın (inek, koyun ve keçi sütü) hidrolize edildiği çalışmada; üç pregastrik lipaz (keçi, buzağı ve kuzu) keçi sütünde diğerlerine kıyasla daha yüksek konsantrasyonlarda C₈ (kaprilik asit) ve C₁₀ (kaprik asit) oluşumuna neden olmuştur. Koyun sütü yağının, domuz pankreas lipazı ile hidrolizasyonu sonucunda ise inek ve/veya keçi sütü yağına göre önemli ölçüde daha yüksek C₄ (bütanoik asit) oluştuğu belirlenmiştir. Her tip pregastrik lipazın (buzağı, oğlak veya kuzu) farklı yağ asidi seçiciliğinden dolayı kendi karakteristik lezzet profili oluşmaktadır (Sowa vd., 2022). 'Tereyağımsı ve hafif biberli' bir aroma buzağı lipazı ile, 'keskin acımsı-baharat' aroması oğlak lipazı ile, güçlü bir 'Pecorino (bir çeşit olgun koyun peyniri)' aroması ise kuzu lipazı kullanılarak elde edilebilmektedir (Hossein vd. 2009; Erbay vd., 2016). Böylece hayvansal enzimler özel kullanım

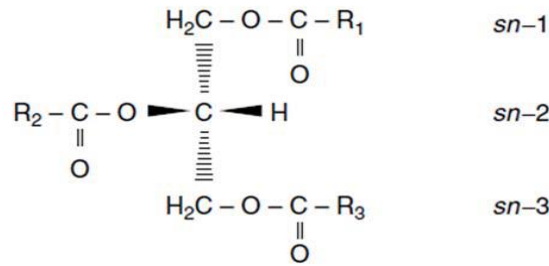
alanlarında avantaj sağlamaktadır. Enzimlerin seçimi, serbest hale geçen yağ asitlerinin nihai profilini ve ortaya çıkan ürünün lezzetini belirlediği için kritik öneme sahiptir (Fraga vd., 2020). Farklı bir çalışmada susuz süt yağına, dört farklı ticari mikrobiyel lipaz (*Rhizomucor miehei*, *Rhizopus oryzae*, *Candida rugosa*, *Candida cylindracea* kaynaklı) uygulanmıştır. Çalışmada 46 uçucu bileşik (3 aldehit, 5 keton, 12 yağ asidi, 23 ester ve 3 lakton) belirlenmiştir. Palatase 20000L'nin (*Rhizomucor miehei* kaynaklı) lipolize süt yağı üretiminde tercih edilme sebebi; yüksek konsantrasyonlarda açığa çıkardığı bütanoik asit, hekzanoik asit, δ -dodekalakton, 2-nonanon, 2-undekanon ve hekzanal ile ilişkilendirilmiştir (Wang ve Xu 2009). Chen vd. (2021) tarafından keçi sütü ürünlerinde ekşimiş-keskin olarak nitelendirilen olumsuz tat algısını değiştirme noktasında yeni aroma bileşikleri üretmek için iki aşamalı lipaz modifikasyonunun etkisi araştırılmıştır. Kullanılan dört ticari lipazdan (*Aspergillus oryzae* tarafından üretilen Palatase 20000L, *Thermomyces lanuginosus*' dan üretilen Lipozyme TL IM, *Candida antarctica*'dan üretilen Novozyme 435, *Candida rugosa*'dan üretilen Candida Rugosa VII) Lipozyme TL IM'nin, 60 °C'de ve pH 8.0'de lipid hidrolizinin katalizinde en verimli enzim olduğu belirlenmiştir. İkinci adımda esterlerin sentezi için yapılan esterifikasyon işlemi ile hoşla gitmeyen “keçi” aromasının yoğunluğu azaltılmıştır. Meyvemsi aromaya sahip esterlerin üründeki toplam uçucu profilin %65'inden fazlasını oluşturduğu bildirilmiştir. Farklı bir çalışmada ise peynire özgü aromaların üretimi için inek, koyun ve keçilerden elde edilen susuz süt yağları on farklı mikrobiyel kaynaklı lipaz ve bir kütinaz tarafından lipoliz edilmiştir. En yüksek hidroliz dereceleri, koyun sütü yağında (%8.7) *Candida cylindracea* kaynaklı AY30TM lipaz ile, koyun sütü yağında (%8.0) *Rhizopus niveus* kaynaklı NTM lipaz ile ve inek sütü yağında (%8.3) *Pseudomonas fluorescens* kaynaklı AK20TM lipaz etkisiyle elde edilmiştir. Enzimlerin çoğu, C_{16:0} (palmitik asit), C_{18:0} (stearik asit), C_{12:0} (laurik asit) ve C_{14:0} (miristik asit) yağ asitlerini yüksek konsantrasyonda açığa çıkarmıştır. Lipolize süt yağlarının peynire özgü aromaların üretimi için alternatif hammadde olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır (Regado vd., 2007).

SÜT KREMASINDA (YAĞINDA) LİPAZLARIN KULLANIMI

Süt serumu içerisindeki süt yağı, emülsiyon halde ve yağ globülleri şeklinde bulunmaktadır. Globüllerin her biri, üç katmanlı globül zarı ile çevrelenmiş trigliserit (triacilgliserol (TAG)) çekirdeğini içermektedir. Trigliseritler süt lipitlerinin %98.3'ünü oluşturmaktadır (Capela vd., 2022). Yaklaşık %2'lik kısımda ise diacilgliseroller, monoacilgliseroller, serbest yağ asitleri, fosfolipitler, steroller, yağda çözünen vitaminler, β -karoten ve yağda çözünen aroma bileşikleri bulunmaktadır. Trigliseritler; üç yağ asidi ile esterleşmiş bir gliserol içeren yapılardır. Bu yapıların doymamışlık dereceleri ve molekül ağırlıkları farklılık göstermektedir. Bu farklılıkların başlıca sebebi; karbon sayısı 4-18 arasında değişen farklı yapıları sahip çok sayıda yağ asidi çeşidinin trigliserit yapısına katılması ile açıklanmaktadır. Yapıya katılan yağ asitleri üç konumda (sn-1, sn-2 ve sn-3 pozisyonları) esterleşme dağılımı göstermektedir (Şekil 2) (MacGibbon ve Taylor 2006). Örneğin 4-6 karbonlu yağ asitleri sn-3, 12-14 karbonlu yağ asitleri genellikle sn-2, 16 karbonlu yağ asidi sn-1 ve sn-2, 18 karbonlu yağ asidi sn-1, 18:1 karbonlu yağ asidi sn-1 ve sn-3 konumlarında esterleşme eğilimindedir (MacGibbon ve Taylor 2006; Moneeb vd., 2021).

Süt yağında yaklaşık 400 farklı yağ asidi çeşidi belirlenmiştir. Bunlar; zincir uzunluğu, doymuşluk derecesi, çift bağların konfigürasyonu ve konjugasyonundaki değişkenlere göre farklılık göstermektedir. Bu yağ asitlerinin büyük çoğunluğu düşük miktarlarda (<%0.01) mevcuttur. Bununla birlikte yapıda baskın olarak bulunan, süt yağı içindeki konsantrasyonu %1 ve üzerinde yaklaşık 15 yağ asidi vardır. Major yağ asitleri kısa zincirli (4-8 karbonlu), orta zincirli (10-12 karbonlu) ve uzun zincirli (14-18 karbonlu) olarak gruplandırılmaktadır (MacGibbon ve Taylor 2006; Atasoy vd., 2022). Özellikle 4-10 karbon atomlu serbest yağ asitleri süt yağının eşsiz lezzetini ve yoğunluğunu geliştirmekten sorumludur (Sowa vd., 2022). Yağ asitleri kontrolsüz şekilde trigliserit yapısından ayrılarak serbest hale geçtiğinde kısa ve uzun zincirli yağ asitleri miktarlarındaki farklılıktan dolayı “ransid” veya “sabunsu” olarak nitelendirilen istenmeyen

tat ve aroma değişiklikleri söz konusu olabilmektedir (Kılara, 2011). Bütanoik, hekzanoik ve oktanoik asit gibi kısa zincirli yağ asitleri, süt ürünlerinde istenen krema, tereyağı ve peynir aroması ile ilişkilendirilen lezzetlere önemli katkıda bulunurken yüksek konsantrasyonlarda açığa çıkan uzun zincirli yağ asitleri sabunsu veya acı tatlara neden olmaktadır (Omar vd., 2016). Tercih edilmeyen bu lezzetlerin ancak kontrollü lipolitik preparatlar ile önlenebileceği, ayrıca gıda endüstrisinde kullanılmak üzere farklı aroma konsantrelerinin de bu yöntemle elde edilebileceği bildirilmektedir (Kilcawley, 2006; Kılara, 2011).



Şekil 2. Trigliserit molekülünün stereospesifik numaralandırma (sn-) kurallarını gösteren Fischer diyagramı (MacGibbon ve Taylor 2006, Motoyama vd., 2010).

Zhang vd. (2016) yaptıkları çalışmada tam yağlı sütü, yağsız sütü ve kremayı *Rhizomucor miehei* den üretilen Palatase 20000L ile hidrolize ederek tam yağlı süt aromasına sahip ancak sadece %0.5 yağ içeren rekombine yağsız süt ürünü üretmeyi amaçlamıştır. Elde edilen ürünlerde açığa çıkan kısa zincirli yağ asitlerinin (bütanoik asit, kaproik asit), yağ asidi etil esterlerin (etil bütirat, etil kaproat, etil kaprat), ketonların (2-heptanon, 2-nonanon, 2-undekanon), hekzanal, dimetil sülfon ve δ-dekalakton gibi diğer uçucu bileşenlerin lezzet profilini önemli derece etkilediği belirlenmiştir. Duyusal değerlendirmede ise istenilen tam yağlı süt aroması elde edilmiştir. Tüketicilerin sağlıklı olarak değerlendirdiği ve tercih ettiği yağsız veya az yağlı süt ürünlerine yönelik lipaz modifikasyonunun kullanılabilirliğinin araştırıldığı benzer çalışmada (Zhang vd., 2021b), tam yağlı pastörize süt, mikrobiyel kaynaklı dört farklı ticari lipaz (Palatase 20000L, Lipozyme TLIM, Lipozyme RMIM ve Novozyme 435) ile modifiye edilmiştir. Lipozyme TLIM lipazın kullanımı ile elde edilen

Tüketici taleplerinin günümüz gıda sektörünün gelişimini şekillendirmesi süt ve ürünleri açısından zengin olan ülkemizde farklı ürün denemelerini beraberinde getirmiştir. Bu amaçla ülkemizde son yıllarda, lipolitik enzimler kontrollü koşullarda kullanılarak hızlandırılmış modifikasyon çalışmalarına yer verilmiştir. Lipazların süt endüstrisinde başlıca kullanım alanları; peynirlerin lezzetini arttırmak, peynir aromaları üretmek, peynir olgunlaşmasını hızlandırmak, süt yağını (krema ve tereyağı) lipolize ederek farklı aromalar açığa çıkarmaktır (Hossein vd., 2009; Chandra vd., 2020).

modifiye yağsız sütte 9 serbest yağ asidi, 21 ester, 6 keton, 4 alkan, 4 aldehit ve 4 diğer bileşikler olmak üzere 48 aroma bileşeni tanımlanmıştır. Özellikle bütanoik asit, hekzanoik asit, heptanoik asit, 2-heptanon, 2-nonanon, nonanal, dekanal ve δ-dekalaktonun aroma zenginleştirmede etkili olduğu bildirilmiştir.

Ayrıca serbest yağ asitleri; esterler, ikincil alkoller, metil ketonlar, aldehitler ve laktonlar gibi birçok lezzet bileşiğinin oluşum reaksiyonunu katalizlemektedir (Chandra vd., 2020; Fatıma vd., 2020). Bu bileşiklerin enzim modifiye süt ürünlerinin aromasına önemli ölçüde katkı sağladığı bilinmektedir (Hossein vd., 2009; Kılara, 2011; Chandra vd., 2020; Kendirci vd., 2020; Tamura vd., 2021).

Süt ürünlerinde esterifikasyon ve alkoliz olmak üzere iki yolla oluşan esterler düşük algılama eşiklerinden dolayı aromaya önemli katkı sağlamaktadır. Ürüne meyvemsi, tatlı ve çiçeksi lezzet kazandırarak yağ asitlerinin neden olduğu

keskinlik ve acılık gibi istenmeyen aromaların azaltılmasına yardımcı olurlar (Wang ve Xu 2009). Zinjanab vd. (2021); UHT tam yağlı sütün etil alkol üreten kültürlerle fermantasyon sürecinin belirli zamanlarında *Rhizomucor miehei* kaynaklı Palatase 20000L ilavesi ile esterleşme tepkimesini incelemiştir. Fermente sütte gerçekleşen transesterifikasyon ile meyvemsi notalara sahip etil esterlerin (etil asetat, etil bütanoat, etil hekzanoat, etil oktanoat, etil dekanolat) farklı miktarlarda oluştuğu ve ürünün meyve aromalı olarak kullanılabileceği bildirilmiştir. Alkollerin yağ asitleri ile ester oluşturmaları ürün lezzetine katkı sağlamaktadır. Özellikle 3-metil-1-butanol, 2-butanol, 2-pentanol ve 2-heptanol gibi alkoller bazı peynirlerde temel aroma bileşeni olarak kabul edilmektedir (Sert, 2022).

Genellikle doymuş yağ asitlerinin β -oksidasyonu veya keto asitlerin dehidrasyonu ile oluşan metil ketonlar ise tatlı, meyvemsi ve kremamsı lezzet ile ilişkilendirilmektedir. 2-undekanon ve 2-nonanon süt ürünlerinin lezzetini bu yolla etkilemektedir (Wang ve Xu 2009). 2-Heptanon Mavi peynir aromasıyla ilişkilendirilmektedir (Zhang vd., 2016). Sitrat metabolizması sonucu oluşan asetoin ise tereyağımsı aroma ile ilişkilendirilen önemli lezzet bileşiklerinden biridir (Ulubaş, 2022). Hem aminoasitlerin katabolizması sonucu hem de doymamış yağ asitlerinin β -oksidasyonu ile aldehitler (heptanal, hekzanal, benzaldehit) oluşmaktadır. Benzaldehit acı badem aromasından, heptanal ve hekzanal yağmsı ve taze çim aromasından sorumludur (Ulubaş, 2022). Ürüne meyvemsi lezzet kazandıran laktonlar ise hidroksi yağ asitlerinin molekül içi esterleşmesi ve halka yapısının oluşumuyla meydana gelen siklik bileşiklerdir. Süt ürünlerinde bulunan δ -dekalakton, δ -hekzalakton, δ -oktalakton ve γ -hekzalaktonun lezzet üzerine olumlu etkisi olduğu bildirilmiştir (Ulubaş, 2022). Tereyağının güçlü, kremamsı tipik aroması ise δ -dodekalakton ile ilişkilendirilmiştir (Wang ve Xu 2009).

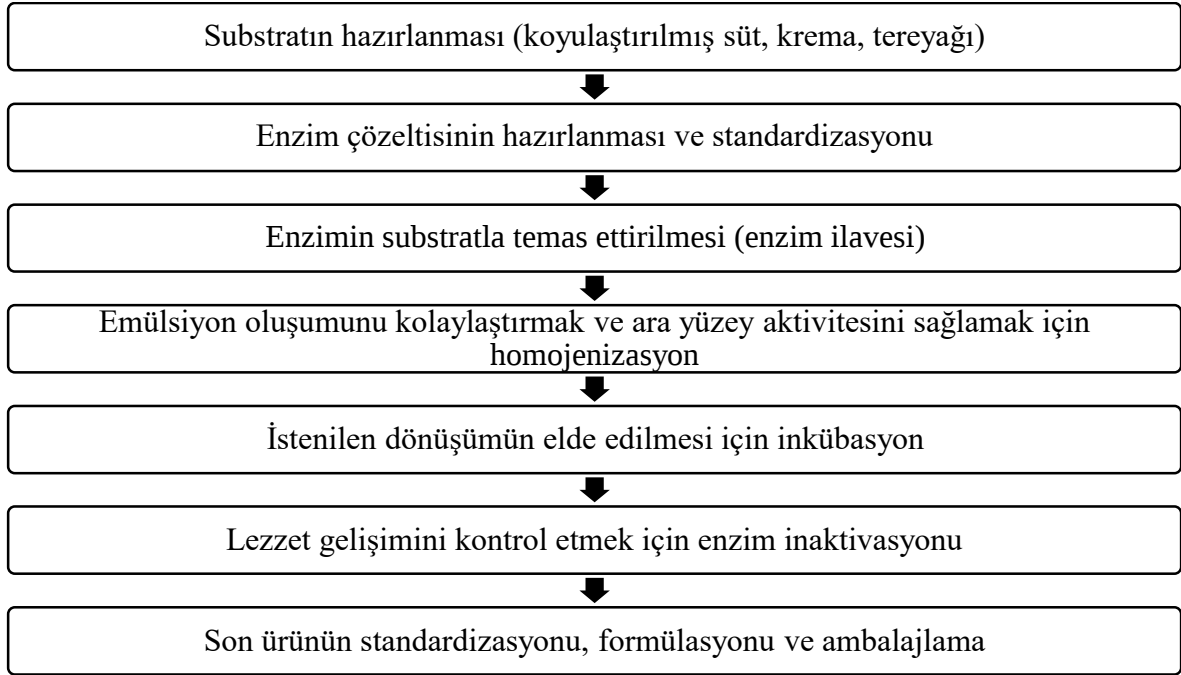
Lipolize Krema- Enzim Modifiye Krema (EMK) Üretimi

Süt yağına lipolitik enzimler eklenerek kontrollü koşullarda inkübasyon sağlanması ile gerçekleştirilen lipoliz prosesi sonucu elde edilen

ürüne literatürde lipolize ya da hidrolize krema denilmektedir (Law, 2010; Kilara, 2011). Son ürün aroma açısından oldukça konsantre halde; tereyağımsı ve kremamsı doğal lezzete sahip olmaktadır. Dolayısıyla elde edilen son ürüne EMK da denilebilmektedir (Erbay vd., 2017; Law, 2010; Sibeijn ve Wouters, 2009; Kilara, 2011). Literatürde süt kremasının lipolizini içeren çalışmalar oldukça sınırlıdır. EMK'lar gıdalara çok düşük seviyelerde eklenerek istenilen standart lezzetin elde edilmesini sağlamaktadır. Bu açıdan değerlendirildiğinde EMK'ların maliyet avantajı sunduğu görülmektedir (Law, 2010). EMK kullanılan ürünlerde hafif lezzet elde etmek için %0.05-0.1 (ağırlık/ağırlık), daha belirgin bir etki için %0.1–0.5 (ağırlık/ağırlık) seviyeleri önerilmektedir (Kilara, 2011).

Enzim modifiye krema üretiminde substrat olarak yoğunlaştırılmış süt, krema ve tereyağı kullanılmaktadır. Kullanılacak lipaz ise amaçlanan gıda uygulamasına bağlı olarak belirlenmektedir. Lipaz standardizasyonu da yapıldıktan sonra lipaz aktivasyonunun sağlanması için substrat ile bir araya getirilmektedir. İstenilen özel tat-aroma elde edilene kadar veya önceden belirlenen bir asit derecesi değerine (ADV) ulaşılan kadar lipaz-substrat etkileşimi kontrollü koşullarda takip edilmektedir (Law, 2010; Chandra vd., 2020). EMK, lipolize krema, üretimi için genel süreç Şekil 3'de belirtilen adımlardan oluşmaktadır (Kilara, 2011).

Genel anlamda tüm enzim modifiye süt ürünleri üretiminde, kontrollü koşullarda olgunlaşma süreci taklit edilmektedir. Bu amaçla substrata (peynir pıhtısı, sadeyağ veya krema) bazı enzimler ilave edilmekte ve karışım belirli bir süre inkübe edilmektedir. Böylece aylarca veya yıllarca sürebilen olgunlaştırma ile elde edilebilen süt ürünlerinin lezzetine kısa süreli inkübasyon sonucunda (1-7 gün) ulaşılabilmektedir (Erbay vd., 2017; Bolat ve Erbay 2022). Enzim modifiye süt ürünleri üretiminde, süt yağını hidrolize etmek için kullanılan lipazlar ile son ürünün lezzet konsantrasyonunda 5 ila 30 kat artış sağlanabilmektedir (Sibeijn ve Wouters, 2009; Law, 2010).



Şekil 3. Enzim modifiye krema üretim aşamaları (Kılara, 2011).

Saerens vd. (2008); *Penicillium roqueforti* esteraz, *Candida cylindracea (rugosa)* lipaz, *Candida cylindracea* ve domuz pankreas lipaz/esteraz karışımı, *Penicillium roqueforti*/ *Rhizomucor miehei* esteraz karışımı, domuz pankreas lipaz tip II ve *Mucor javanicus* enzimlerini süt kremasına uygulayarak son üründe tereyağı aroması oluşumu üzerine etkisini belirlemiştir. Diğer lipazların kullanımına nazaran *Candida cylindraceae* lipaz kullanımı sonucu açığa çıkan ve tereyağı aroması üzerine de etkili olan kısa zincirli serbest yağ asitlerinden bütanoik asit, hekzanoik asit ve oktanoik asit konsantrasyonlarında belirgin artış görülmüştür. Ulubaş (2022) tarafından yapılan farklı bir çalışmada %40 yağlı süt kremasına mikrobiyel kaynaklı Palatase 20000L, Lipomod™ 801MDP, Lipozyme® CALB lipazları ile Lecitase® Ultra (fosfolipaz) eklenerek hidrolizasyon gerçekleştirilmiştir. Enzim modifiye tereyağı (EMT) olarak adlandırılan örneklerde çeşit ve miktar açısından asitlerin baskın olduğu 34 farklı uçucu bileşik (aldehit, keton, lakton, alkol, ester, fenol) tanımlanmıştır. En yüksek oranda açığa çıkan yağ asitlerinin bütanoik asit, hekzanoik asit ve oktanoik asit olduğu, duyuşal olarak tereyağına en çok benzetilen ve en fazla toplam serbest yağ

asidi miktarına sahip örneğin ise Palatase 20000L kullanılarak elde edildiği bildirilmiştir.

Ülkemizde son yıllarda enzim modifiye süt ürünleri üretimine başlanmıştır. Erbay vd. (2017) tarafından; Türkiye’de üretimi gerçekleştirilen, piyasada ticari olarak bulunan ve endüstriyel katkı maddesi olarak da kullanılan tamamı hamur kıvamında sekiz farklı enzim modifiye peynir ve iki farklı enzim modifiye tereyağının temel kimyasal özellikleri, serbest yağ asidi bileşimi ve miktarları ile proteolitik – lipolitik olgunlaşma düzeyleri analiz edilmiştir. Enzim modifiye tereyağı örneklerindeki toplam serbest yağ asidi miktarları arasındaki farklılığın, örneklerin yağ içeriklerinin farklı olmasından (%18.25 ve %45.50) kaynaklandığı bildirilmiştir. Ancak toplam uçucu serbest yağ asidi değerlerindeki farklılık, hedeflenen lezzete ulaşmak için farklı lipolitik enzimlerin kullanılmış olması ile ilişkilendirilmiştir.

Enzim modifiye süt ürünleri, elde edildikleri hammaddeye göre oldukça konsantre bir lezzete sahiptir. Düşük konsantrasyonlarda bile yoğun lezzet verdikleri için; unlu mamullerde (ekmek, kek ve kurabiye karışımları), tahıl ürünlerinde,

şekerlemelerde (çikolata ürünleri), süt ürünlerinde (kahve beyazlatıcılar, peynir ve tereyağı) ve çeşitli diğer ürünlerde (çorbalar, patlamış mısır baharatları, soslar, salata sosları ve atıştırmalık yiyecekler) katkı maddesi olarak kullanımları mevcuttur (Regado vd., 2007; Kilara, 2011; Fraga vd., 2020; Kordi vd., 2022). Enzim modifiye süt ürünlerinin yiyecek ve içeceklerin lezzetini, dokusunu ve aromasını iyileştirmek için kullanımı günümüzde odak noktası olmuştur. Huang vd. (2020), Lipopan F (*Fusarium oxysporum* fungal lipaz) ile modifiye edilmiş süt yağının ekmek yapımı, kalitesi, sindirilebilirliği ve bayatlama üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Lipolize süt yağının kullanıldığı örneklerde kontrol grubuna göre, bayatlama süresinin geciktiği, hamur yapısının güçlendiği ve somun hacminin iyileştiği belirtilmiştir. Ayrıca in vitro sindirim ile ekmeklerin glisemik yükünün kontrol örneklerine göre önemli ölçüde daha düşük olduğu ortaya konmuştur. Çalışma, lipolize süt yağının potansiyel uygulamasını göstererek nihai ürünlerin kalitesi üzerinde olumsuz etkilere yol açmadan, ekmek yapısını iyileştirmek ve düşük glisemik indeksli pişmiş yiyeceklerin hazırlanması için yeni ve pratik bir yöntem sunmuştur.

SONUÇ

Süt ürünlerinin özgün ve karakteristik lezzeti uzun olgunlaşma süreci sonunda meydana gelmektedir. Enzim modifiye süt ürünleri temelinde ise lipolitik enzimler kullanılarak olgunlaşma süreci kontrollü koşullar altında takip edilmektedir. Ülkemizde enzim modifiye süt ürünlerinin üretimine son birkaç yıl içerisinde başlanmıştır. Ancak çeşidinin de fazla olmasından dolayı daha çok peynir olgunlaşması ve lezzet oluşumunun hızlandırılması üzerine yoğunlaşmıştır. Enzim modifiye kremaların ticari örnekleri birkaç tane olmakla birlikte oldukça sınırlıdır. Konu ile ilgili bilimsel literatürdeki çalışmaların sayısı da oldukça az olduğundan konu hakkındaki genel bilgi sınırlıdır. Krema lezzet katkıları ve enzim modifiye kremaların farklı ürünlerde kullanım olanakları hakkında yapılacak bilimsel çalışmalar, hem endüstriyel üretimin desteklenmesi ve çeşitlendirilmesine, hem de bilimsel literatürde var olan boşlukların doldurulmasına yardımcı olacaktır.

Hazırlanan bu derlemede lipazların özellikleri, etki mekanizmaları, süt teknolojisinde kullanım alanları, aroma oluşumundaki etkileri ve lezzet katkısı olarak üretilen enzim modifiye kremalar incelenmiştir. Literatürde bulunan enzim modifiye kremalar ile ürün çeşitliliğini arttırmaya dönük yapılabilecek yeni çalışmalara veri sağlanması amaçlanmıştır. Hem geleneksel krema lezzetlerinin bilimsel olarak tanımlanması (lezzeti karakterize eden bileşikler ve miktarları), hem de enzim modifikasyonları ile bu lezzetlerin elde edilmesi konularında ülkemizde yapılan akademik çalışmaların sınırlı kaldığı görülmektedir. Bu nedenle kullanılabilecek farklı lipolitik enzimlerin birlikte uygulamaları, işlem koşullarının son ürün üzerindeki etkileri ve işlem optimizasyonuna dair çalışmaların detaylandırılması gerektiği düşünülmektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarların bu derleme makale ile ilgili herhangi bir kişi veya kurumla çıkar çatışması bulunmamaktadır.

YAZAR KATKISI

Yazarlar makalenin hazırlanmasında eşit katkıda bulunmuşlardır.

KAYNAKÇA

- Alzahrani, F., Akanbi, T.O., Scarlett, C.J., Aryee, A.N.A. (2024). The use of immobilised enzymes for lipid and dairy processing and their waste products: A review of current. *Processes*, 12(4): 634, doi: 10.3390/pr12040634.
- Asif, M., Nadeem, M., Imran, M., Ullah, R., Tayyab, M., Khan, F.A., Al-Asmari, F., Rahim, M.A., Rocha, J.M., Korma, S.A., Esatbeyoglu, T. (2023). Effect of fat contents of buttermilk on fatty acid composition, lipolysis, vitamins and sensory properties of cheddar-type cheese. *Microbiology*, 14:1209509, doi:10.3389/fmicb.2023.1209509.
- Bolat, E.B., Erbay, Z. (2022). Enzim modifiye peynir ve üretim teknikleri. *Akademik Gıda*, 20(1): 94-102, doi:10.24323/akademik-gida.1097869.
- Borrelli, G.M., Trono, D. (2015). Recombinant lipases and phospholipases and their use as

- biocatalysts for industrial applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9): 20774–20840, doi: 10.3390/ijms160920774.
- Capela, A.P., Lima Tribst, A.A., Duarte Augusto, P.E., Castro Leite Júnior B.R. (2022). Use of physical processes to maximize goat milk cream hydrolysis: Impact on structure and enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, 156: 111343, doi:10.1016/j.foodres.2022.111343.
- Castro, F.F., Pinheiro, K.H. (2024). Esterases and their biotechnological potential in the food industry: a review. *Revista de Ciência de Alimentos e Gastronomia*, 1(2): 15-37.
- Chandra, P., Ranjan Singh, E., Arora, P.K. (2020). Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microbial Cell Factories*, 19: 169-doi: 10.1186/s12934-020-01428-8.
- Chen, X., Wang, J., Stevenson, R.J., Ang, X., Peng, Y., Quek, S.Y. (2021). Lipase-catalyzed modification of milk fat: A promising way to alter flavour notes of goat milk products. *LWT - Food Science and Technology*, 145:111286, doi: 10.1016/j.lwt.2021.111286.
- Erbay, Z., Baş, D., Kendirci, P., Çam, M., Kelebek, H., Salum, P., Selli, S. (2016). Lezzet katkısı olarak peynir ve enzim modifiye peynir tekniğinde güncel durum. *Akademik Gıda*, 14(2): 209-217.
- Erbay, Z., Salum, P., Gövce, G. (2017). Türkiye’de üretilen enzim modifiye süt ürünlerinin lipolitik ve proteolitik olgunlaşma düzeylerinin incelenmesi. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 23(7): 919-925, doi:10.5505/pajes.2016.48830.
- Fahim, Y.A., El-Khawaga, A.M., Sallam, R.M., Elsayed, M.A., Ali Assar, M.F. (2024). A review on lipases: sources, assays, immobilization techniques on nanomaterials and applications, *BioNanoScience*, 14:1780–1797, doi:10.1007/s12668-024-01319-x.
- Fatima, S., Faryad, A., Ataa, A., Joyia, F.A., Parvaiz, A. (2020). Microbial lipase production: A deep insight into the recent advances of lipase production and purification techniques. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 68(3):445-458, doi:10.1002/bab.2019.
- Fraga, J.L., Penha, A.C.B., Silva, K.A., Amaral, P.F.F. (2020). Synergistic action of *Penicillium camemberti* and *Yarrowia lipolytica* lipases in milk fat hydrolysis. *Revista Principia - Divulgação Científica e Tecnológica do IFPB*, 1(50):47-53, doi: 10.18265/1517-03062015v1n50p47-53.
- Greicius, A., Baliutavicius, T., Lastauskiene, E., Gudiukaite, R. (2023). Application of milk permeate as an inducer for the production of microbial recombinant lipolytic enzymes. *Fermentation*, 9(1):27- doi:10.3390/fermentation9010027.
- Ha, J., Lindsay, R.C. (1993). Release of volatile branched-chain and other fatty acids from ruminant milk fats by various lipases. *Journal of Dairy Science*, 76: 677–690.
- Hosseini, J., Kaur, A., Minhas, K.S. (2009). Lipases in dairy industry: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 46(3): 181–189.
- Huang, Z., Brennan, C.S., Zheng, H., Mohan, M.S., Stipkovits, L.S., Liu, W., Kulasiri, D., Guan, W., Zhao, H., Liu, J. (2020). The effects of fungal lipase-treated milk lipids on bread making. *LWT - Food Science and Technology*, 128:109455, doi:10.1016/j.lwt.2020.109455.
- Karakus, M.S., Akgul, F.Y., Korkmaz, A., Atasoy, A.F. (2022). Evaluation of fatty acids, free fatty acids and textural properties of butter and sadeyag (anhydrous butter fat) produced from ovine and bovine cream and yoghurt. *International Dairy Journal*, 126:105229, doi:10.1016/j.idairyj.2021.105229.
- Kendirci, P., Salum, P., Bas, Deniz., Erbay, Z. (2020). Production of enzyme-modified cheese (EMC) with ripened white cheese flavour: II-effects of lipases. *Food and Bioproducts Processing*, 122: 230–244.
- Kıymacı, M.E., Simsek, D., Altanlar, N. (2022). Molecular identification and lipolytic activity of *Yarrowia lipolytica* isolated from yoghurt cream. *Journal of Faculty of Pharmacy of*

- Ankara University, 46(2): 450-457, doi: 10.33483/jfpau.1090889.
- Kilara, A. (2011). Enzymes exogenous to milk in dairy technology: Lipases. In Encyclopedia of Dairy Sciences, J.W. Fuquay, P.F. Fox, P.L.H. McSweeney (ed.), Academic Press, London UK: Elsevier, pp. 728–736.
- Kilcawley, K. (2006). *Enzyme Technology for the Dairy Industry*. In Food Biotechnology, K. Shetty, G. Paliyath, A. Pometto, R.E. Levin, (ed.), Chapter 2.20, Boca Raton: Taylor & Francis Group, CRC Press, pp. 1043-1069.
- Konkit, M., Kim, W. (2016). Activities of amylase, proteinase, and lipase enzymes from *Lactococcus chungangensis* and its application in dairy products. *Journal of Dairy Science*, 99(7): 4999–5007.
- Kordi, M., Salami, R., Bolouri, P., Delangiz, N., Lajayer, B.A., Hullebusch, E.D.V. (2022). White biotechnology and the production of bio products. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 2:413–429, doi: 10.1007/s43393-022-00078-8.
- Koyuncu, M., Batur, S. (2023). The effects of modified atmosphere packaging on the quality properties of water buffalo milk's concentrated cream. *Molecules*, 28(03):1310, doi: 10.3390/molecules28031310.
- Kumar, A., Dhiman, S., Krishan, B., Samtiya, M., Kumari, A., Pathak, N., Kumari, A., Aluko, R.E., Dhewa, T. (2024). Microbial enzymes and major applications in the food industry: a concise review. *Food Production, Processing and Nutrition*, 6:85, doi: 10.1186/s43014-024-00261-5.
- Kurtovic, I., Marshall, S.N., Cleaver, H.L., Miller, M.R. (2016). The use of immobilised digestive lipase from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) to generate flavour compounds in milk. *Food Chemistry*, 199:323-329, doi:10.1016/j.foodchem.2015.12.027.
- Law, B.A. (2010). *Enzymes in dairy product manufacture*. In: *Enzymes in Food Technology*, R.J. Whitehurst, M. van Oort (ed.), Second edition, West Sussex, UK: Wiley Blackwell, pp. 88–102.
- MacGibbon, A. K. H., Taylor, M. W. (2006). *Composition and Structure of Bovine Milk Lipids*. In: *Advanced Dairy Chemistry*, Fox P. F., McSweeney, P. L. H (3rd edition), Volume 2: Lipids, Springer, New York, pp. 1-42.
- Marwa, Y.H., Ali, S.G., Salman, K.H. (2024). Properties of extracellular lipase from isolated bacterial on bovine milk fats. *Archives of Agriculture Sciences Journal*, 7(2): 90–103.
- Melani, N.B., Tambourgi, E.B., Silveira, E. (2020). Lipases: From production to applications. *Separation & Purification Reviews*, 49(2): 143-158, doi:10.1080/15422119.2018.1564328.
- Messaoudi, A., Belguith, H., Gram, I., Hamida, J.B. (2010). Classification of EC 3.1.1.3 bacterial true lipases using phylogenetic analysis. *African Journal of Biotechnology*, 9(48): 8243-8247, doi: 10.5897/AJB10.721.
- Mir Khan, U., Selamoglu, Z. (2020). Use of enzymes in dairy industry: A review of current progress. *Archives of Razi Institute*, 75(1):131-136, doi: 10.22092/ARI.2019.126286.1341.
- Mohammadi, A., Jafari, S.M., Mahoonak, A.S., Ghorbani, M. (2021). Liposomal/Nanoliposomal Encapsulation of Food-Relevant Enzymes and Their Application in the Food Industry. *Food and Bioprocess Technology*, 14:23–38, doi: 10.1007/s11947-020-02513-x.
- Moneeb, A.H.M., Hammam, A.R.A., Ahmed, A.K.A., Ahmed, M.E., Alsaleem, K.A. (2021). Effect of fat extraction methods on the fatty acids composition of bovine milk using gas chromatography. *Food Science & Nutrition*, 9:2936–2942, doi: 10.1002/fsn3.2252.
- Motoyama, M., Ando, M., Sasaki, K., Hamaguchi, H. (2010). Differentiation of Animal Fats from Different Origins: Use of Polymorphic Features Detected by Raman Spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 64(11):1244-1250, doi: 10.1366/000370210793335070.
- Nyyssöola, A., Miettinen, H., Kontkanen, H., Lille, M., Partanen, R., Rokka, S., Jarvenpää, E., Lantto, R., Kruus, K. (2015). Treatment of milk

fat with sn-2 specific *Pseudozyma antarctica* lipase A for targeted hydrolysis of saturated medium and long-chain fatty acids. *International Dairy Journal*, 41, 16-22, doi:10.1016/j.idairyj.2014.09.003.

Omar, K.A., Gounga, M.E., Liu, R., Mlyuka, E., Wang, X. (2016). Effects of microbial lipases on hydrolyzed milk fat at different time intervals in flavour development and oxidative stability. *Journal of Food Science and Technology*, 53: 1035–1046, doi:10.1007/s13197-015-2158-8.

Özatay, Ş., Kaya, Ç. (2024). Endüstriyel süt ürünleri enzimlerinde güncel yaklaşımlar. *Lapseki Meslek Yüksekokulu Uygulamalı Araştırmalar Dergisi*, 5(9): 15-24, e-ISSN: 2717-8285.

Regado, M.A., Cristovao, B.M., Moutinho, C.G., Balcao, V.M., Aires-Barros, R., Ferreira, J.P.M., Malcata, F.X. (2007). Flavour development via lipolysis of milkfats: changes in free fatty acid pool. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 961–968, doi:10.1111/j.1365-2621.2006.01317.x.

Rivero-Pino, F., Padial-Dominguez, M., Guadix, E.M., Morales-Medina, R. (2020). Novozyme 435 and Lipozyme RM IM preferably esterify polyunsaturated fatty acids at the sn-2 position. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 122: 2000115, doi: 10.1002/ejlt.202000115.

Saerens, K., Descamps, D., Dewettinck, K. (2008). Release of short chain fatty acids from cream lipids by commercial lipases and esterases. *Biotechnology Letters*, 30:311–315, doi: 10.1007/s10529-007-9541-0.

Santos, M.R., Hirata, D.B., Angelotti, J.A.F. (2022). Lipases: Sources of acquisition, ways of production, and recent applications. *Catalysis Research*, 2(2):35, doi:10.21926/cr.2202013.

Sert, D. (2022). Peyniraltı suyu ve yayıkaltından elde edilen kremalardan üretilen tereyağların nitelikleri. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Süt Teknolojisi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Türkiye, 96s.

Sibeijn, M., Wouters, J.A. (2009). In: *Production of Dairy Aromas and Flavors: New Directions*. Dairy-

Derived Ingredients: Food and Nutraceutical Uses. Corredig M. (ed.), Boca Raton, FL, USA, CRC Press, pp. 470- 481.

Soares, A.S., Castro Leite Junior, B.R., Lima Tribst, A.A., Duarte Augusto, P.E., Ramos, A.M. (2020). Effect of ultrasound on goat cream hydrolysis by lipase: Evaluation on enzyme, substrate and assisted reaction. *LWT - Food Science and Technology*, 130:109636, doi:10.1016/j.lwt.2020.109636.

Sowa, A.M., Kreuter, N., Sella, N., Albuquerque, W., Manhard, J., Siegl, A., Ghezellou, P., Li, B., Spengler, B., Weichhard, E., Rühl, M., Zorn, H., Gand, M. (2022). Replacement of Pregastric Lipases in Cheese Production: Identification and Heterologous Expression of a Lipase from *Pleurotus citrinopileatus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(9): 2998–3008, doi: 10.1021/acs.jafc.1c07160.

Sutay Kocabaş, D. (2021). *Gıda endüstrisinde enzimlerin rolü ve ilgili yasal düzenlemeler*. Gıda Biyoteknolojisi, Ögel, ZB. (ed.), 1. Baskı, Türkiye Klinikleri, Ankara, Türkiye, s. 29-38.

Sutay Kocabaş, D., Lyne, J., Ustunol, Z. (2022). Hydrolytic enzymes in the dairy industry: Applications, market and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 119: 467–475, doi: 10.1016/j.tifs.2021.12.013.

Tamura, H., Ueno, S., Naka, A., Zhao, H., Yonekura, L., Isogai, T., Wakui, R., Shiota M. (2021). Characterisation of aroma profile and evaluation of aroma quality in sweet cream butter. *International Dairy Journal*, 114, 104935, doi: 10.1016/j.idairyj.2020.104935.

Tomasini, A., Bustillo, G., Lebeault, J.M. (1993). Fat lipolyzed with a commercial lipase for the production of blue cheese flavour. *International Dairy Journal*, 3(2):117-127, doi: 10.1016/0958-6946(93)90011-N.

Ulubaş, Ç. (2022). Enzim modifiye tereyağı (Emt) üretiminde üretim işlem koşullarının ve enzim tiplerinin belirlenmesi. Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Adana, Türkiye, 96s.

- Wang, B., Xu, S. (2009). Effects of different commercial lipases on the volatile profile of lipolysed milk fat. *Flavour and Fragrance Journal*, 24: 335–340, doi: 10.1002/ffj.1945
- Zhang, W., Wang, B., Ma, C., Pang, X., Lv, J. (2021a). A clarifying reagent and microplate-based method for the high-throughput analysis of lipase activity in milk. *European Food Research and Technology*, 247:2161–2169, doi:10.1007/s00217-021-03702-4.
- Zhang, X., Chen, L., Ai, N., Sun, B. (2021b). Lipase-catalyzed enhancement of milk flavor components in the application of modified skim milk products. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 5:4256–4266, doi: 10.1007/s11694-021-01001-w.
- Zhang, X.M., Ai, N.S., Wang, J., Tong, L.J., Zheng, F.P., Sun, P.G. (2016). Lipase-catalyzed modification of the flavor profiles in recombined skim milk products by enriching the volatile components. *Journal of Dairy Science*, 99, 8665–8679, doi: 10.3168/jds.2015-10773.
- Zinjanab, M.S, Golmakani, M.T., Eskandari, M.H., Toh, M., Liu, S.Q. (2021). Natural flavor biosynthesis by lipase in fermented milk using in situ produced ethanol. *Journal of Food Science and Technology*, 58(5): 1858-1868, doi:10.1007/s13197-020-04697-8.

INVESTIGATION OF THE USABILITY OF COMMERCIAL KEFIR BEVERAGES AS INOCULUM IN HOMEMADE KEFIR PRODUCTION

Ozlem SAHIN¹, Ilyas ATALAR^{*2}, Seyma Betul ENCU¹, Ibrahim CAKIR¹

¹ Department of Food Engineering, Engineering Faculty, Bolu Abant İzzet Baysal University, Bolu, Turkey

² Department of Food Engineering, Agriculture Faculty, Eskisehir Osmangazi University, Eskisehir Turkey

Received / Geliş: 13.01.2025; Accepted / Kabul: 10.04.2025; Published online / Online baskı: 01.05.2025

Sahin, O., Atalar, I., Encu, Ş. B., Cakir, I. (2025). Investigation of the usability of commercial kefir beverages as inoculum in homemade kefir production. GIDA (2025) 50 (3) 374-388 doi: 10.15237/gida.GD25014

Sahin, O., Atalar, I., Encu, Ş. B., Cakir, I. (2025). Ticari kefir içeceklerinin ev yapımı kefir üretiminde inokulum kaynağı olarak kullanılabilirliğinin araştırılması. GIDA (2025) 50 (3) 374-388 doi: 10.15237/gida.GD25014

ABSTRACT

This study examined the potential usage of commercial kefir beverages in producing homemade kefir beverages. For this purpose, two different commercial kefir beverages were used in the fermentation. Microbial growth kinetics, viscosity and pH were monitored during the fermentation process of kefir samples. The logistic model was fitted to lactic acid bacteria, lactococci, total mesophilic aerobic bacteria (TMAB), pH and viscosity growth kinetics. The generation study was completed by repeatedly passing the kefir produced for four days. *Lactic acid bacteria*, *Lactococci*, and TMAB counts remained stable in the following generations. Lactobacilli counts decreased in both brands, while TMAB and lactococci decreased in brand A during storage. Syneresis values under storage conditions were high for both brands. This study shows that kefir can be produced at home using commercial kefir beverage brands and can meet the requirements of Codex Alimentarius if the necessary hygiene conditions and incubation temperature are provided, but structural stability during storage is weak.

Keywords: Kefir, storage, fermentation, commercial kefir, traditional production

TİCARİ KEFİR İÇECEKLERİNİN EV YAPIMI KEFİR ÜRETİMİNDE İNOKULUM KAYNAĞI OLARAK KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZ

Bu çalışma, ticari kefir içeceklerinin ev yapımı kefir içecekleri üretiminde potansiyel kullanımını incelemiştir. Bu amaçla, fermantasyonda iki farklı ticari kefir içeceği kullanılmıştır. Kefir örneklerinin fermantasyon süreci boyunca mikrobiyal büyüme kinetiği, viskozite ve pH izlenmiştir. Laktik asit bakterileri, laktokoklar, toplam mezofilik aerobik bakteriler (TMAB), pH ve viskozite değişiminde lojistik model uygun bulunmuştur. Üretilen kefir dört gün boyunca rejenere edilerek üretim çalışması tamamlanmıştır. Laktik asit bakterileri, Lactococci ve TMAB sayıları sonraki nesillerde sabit kalmıştır. Depolama boyunca Laktobasil sayısı her iki markada da azalırken, TMAB ve laktokoklar depolama sırasında A markasında azalmıştır. Depolama koşullarında sinerisis değerleri her iki marka için yüksek

* Corresponding author / Sorumlu yazar

✉: ilyas.ataral@ogu.edu.tr

☎: (+90) 222 239 3750

Ozlem Sahin; ORCID no: 0000-0002-2715-462X

Ilyas Atalar; ORCID no: 0000-0001-8560-0010

Seyma Betul Encu; ORCID no: 0000-0001-9155-1868

Ibrahim Cakir; ORCID no: 0000-0001-7775-1871

bulunmuştur. Bu çalışma, kefirin ticari kefir içecek markaları kullanılarak evde üretilebileceğini ve gerekli hijyen koşulları ve inkübasyon sıcaklığı sağlandığı takdirde Codex Alimentarius gerekliliklerini karşılayabileceğini ancak yapısal stabilitenin zayıf olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Kefir, depolama, fermentasyon, ticari kefir, geleneksel üretim

INTRODUCTION

Kefir is a fermented beverage originating in Eastern Europe, the Balkans, and the Caucasus. It has a sour, viscous, and slightly alcoholic flavor. (Sharifi et al., 2017). Studies have shown that kefir consumption has a high potential to balance the gut microbiota, reduce diarrhea and constipation, help improve intestinal permeability and regulate the immune system (Prado et al., 2015). There has been a growing interest in kefir consumption due to its potential health benefits and unique flavor.

There are two methods for making kefir: industrial and traditional/homemade. Traditional production is made from kefir grains, which include polysaccharide kefiran and pentasaccharide kefirese, which hold the microbiota (Guzel-Seydim et al., 2021; Kök-Taş et al., 2013). The microbial composition of kefir grains may vary (Gul et al., 2015; Satir and Guzel-Seydim, 2016). Kefir beverages may show different structural, aromatic, and sensory characteristics due to the variable microbiota of kefir grain, the origin of kefir grains, the type of milk, incubation temperature and duration, storage and sanitation conditions. Especially in cases where the kefir grain is not stored under hygienic conditions or its activity is reduced, significant unpleasant differences in the taste, aroma, and texture characteristics of kefir beverages occur (Kim et al., 2018). Besides the short shelf life, kefir grains have a complex structure that is unsuitable for the commercial production of a standard product (Nejati et al., 2020).

The manufacturing of kefir involves the use of microorganisms isolated from kefir grains or starter cultures that comprise freeze-dried lactic acid bacteria and yeasts (Gul et al., 2018; Wang et al., 2021). Starter cultures are available in liquid, lyophilized, and frozen forms. The most commonly used starter culture is lyophilised starter culture (DVS, direct-vat-set) and kefir starter cultures produced with these techniques

are preferred in industrial production (Prado et al., 2015).

Making fermented products in homes is quite widespread. Some claimed that they could not produce a product with the desired qualities when they employed commercial products as the inoculum during production. The problems are mainly weak viscosity and insufficient flavor formation. This research investigates the feasibility of using commercial kefir as a source of inoculum in kefir production when the required hygienic and temperature conditions are provided. This study also aimed to develop an alternative method to home production with kefir grains to standardize the taste, aroma and texture of kefir produced using commercial kefir drinks as starter culture.

Kim et al. (2018) applied the backslopping fermentation method for producing a kefir drink, using traditional kefir produced with kefir grains as the stock culture. The authors stated that the backslopping method is feasible to scale up the production of kefir beverage and backslopped kefir contains the original kefir microbiota with a decreased yeast population. Alves et al. (2023) produced kefir beverages in household conditions with kefir grains. The authors stated that kefir produced using UHT milk under household conditions can provide the Codex Alimentarius requirements. Beverages maintain their properties about physicochemical composition after fermentation and refrigerated storage.

To the best of our knowledge, this study will be the first to investigate the potential use of commercial kefir drinks for fermentation. The two most preferred brands of kefir beverages were used, and the quality parameters of kefir samples were evaluated regarding microbial, rheological, sensory, and physicochemical properties. Fermentation, generation, and storage conditions were also investigated deeply for the first time in this type of production.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The two preferred commercial plain kefir beverages and full-fat UHT milk were purchased from a chain store in Bolu City. Purchased products are coded as Brand A and Brand B. Brand A kefir contains 3.2g /100mL of fat, 3.2g/100mL of carbohydrate, and 2.7g/100mL of protein. Brand B kefir includes 2.4g/100mL of carbohydrates, 2g/100mL of fat, and 2.7g/100mL of protein. MRS Agar, M17 Agar, YGC Agar, and PCA Agar were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Kefir production

Kefir production was carried out with commercial kefir drinks. In preliminary studies, different inoculation rates (1, 3, and 5%) were tested at 25 °C. Preliminary studies showed that 1% and 3% inoculation rates were insufficient for fermentation. The incubation time was prolonged to 30 and 28 h, respectively. However, we achieved a 24-hour incubation by using 5% inoculation rates. The inoculation rate of 5% was chosen as a suitable rate for acidification. After inoculating 5% of two brands of kefir beverages into 2L UHT milk, the samples were kept at 25 °C for about 24 hours. The kefir samples were filled into sterile bottles and stored at 4 °C under refrigerator conditions for 28 days. Produced kefir samples are coded as Brand A and Brand B. On the labels of kefirs supplied from Brand A, it was declared that kefirs were made from homogenized and pasteurized milk and the starter culture content included kefir yeasts, kefir culture and probiotic microorganisms (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus Acidophilus*). Similarly, homogenized and pasteurized milk was used in Brand B, and the starter culture content was declared similar to that of Brand A. The Brand A microbial counts were 7.68 ± 0.03 , 8.32 ± 0.03 , 1.36 ± 0.01 and 6.90 ± 0.08 log CFU/ mL and Brand B were 7.62 ± 0.04 , 8.04 ± 0.02 , 4.28 ± 0.11 and 6.53 ± 0.03 log CFU/mL for *Lactobacilli*, *Lactococci*, yeast and TAMB, respectively. The production of kefir beverages with commercial kefir beverages was conducted twice.

Monitoring the fermentation process

Microbial growth kinetics, viscosity and pH of kefir samples were monitored throughout fermentation. The pH was recorded every hour of fermentation. For microbial growth kinetic analysis, microbial counting was performed every 5 hours during fermentation. The acidification rate ($V_{\max}$) was calculated by the pH change (dpH/dt) with time. $T_{\max}$ (h) is the time when $V_{\max}$ reached the end of incubation; $tpH_{4.5}$ was the time to reach pH 4.5; t_f (h) was the time of completion of fermentation (Atalar, 2019).

Microbiological analysis

The microbiological analysis described below was performed for all kefir samples during fermentation, generation, and storage. Serial dilutions of kefir in 0.1% peptone water were used to investigate the development of microflora. De Man, Rogasa, and Sharp (MRS) agar medium were used to determine the number of lactobacilli in kefir samples. Analyses were performed by pour plate culture counting and incubation was carried out under anaerobic conditions (GasPak™) at 30 °C for 48 hours (Satir & Guzel-Seydim, 2015). M17 agar medium was incubated at 30 °C for 48 h to determine lactococci bacterial counts (Grønnevik et al., 2011). Yeast Extract Glucose Chloramphenicol (YGC) agar medium was used to determine the yeasts in kefir samples. The analysis was carried out using spreading plate method. Petri dishes were incubated at 25 °C for 3 days under aerobic conditions (Teijeiro et al., 2018). Plate Count Agar (PCA) was used to count the total mesophilic aerobic bacteria (TMAB) in kefir samples. The spread plate method was used and samples were incubated under aerobic conditions at 30 °C for 2 days (Corona et al., 2016).

Viscosity analysis

Kefir samples were analyzed in triplicate at 15 °C using a viscometer (AND vibro viscometer SV-10, Japan). Each measurement was performed 9 times (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 and 120 seconds) for 2 minutes at 15-second intervals. These measurements were averaged and expressed in mPa.s (Sarica and Coşkun, 2020).

Generation study

A generation study was performed to investigate the possibility of kefir production using commercial kefir samples many times. The generation study was carried out by the method of Aydemir (2020). The first generation was done with the first kefir beverage produced with commercial kefir beverages. The next kefir production was carried out using a 24-hour kefir sample. In this way, 4 generations of yogurt production were carried out in succession. Four passages were made from kefir produced by using commercial kefir beverages.

Storage analysis

The kefir drinks produced with commercial kefir samples were stored under refrigerator conditions (4 °C) for 4 weeks, on day 1, day 7, day 14, day 21, and day 28. Syneresis, titratable acidity and pH, color analysis, microbiological and sensory analysis were performed during storage.

Syneresis

Kefir samples (25 g) were weighed into a centrifuge tube and centrifuged at 1250 g for 10 min at 4 °C (Sigma 2-16 KC, Germany). The supernatant was poured off and the collected kefir was weighed (final weighing) (Sodini et al., 2005). Serum separation was calculated by means of the following formula (Eq.1)

$$\text{Syneresis (\%)} = \frac{\text{final weighing-tare}}{\text{amounts of sample}} \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

Titratable acidity and pH

The titrimetric method determined the titration acidity of kefir samples as % lactic acid. A digital pH meter was used to measure the pH of the samples. (Orion Star A211, Waltham, MA, USA).

Color analysis

The color parameters of kefir samples were measured with a CIE (International Commission on Illumination) Minolta CR-400 (Osaka, Japan) color analyzer. Before the measurement, the device was calibrated against the white plate. Samples were placed in the glass sample cup of the device and the L*, a*, and b* values of the samples were read. L*; brightness, a*; red-greenness, b*; means yellow-blue.

Sensory analysis

The evaluation was performed using the nine-point hedonic scale. Kefir beverages were analyzed by 15 trained panelists consisting of food engineering department members and graduate students on days 1, 7, 14, 21 and 28 of storage.

Statistical analysis

Multiple comparison tests determined the differences between the kefir drinks. The normality was determined by the Shapiro-Wilk test. One-way ANOVA and Tukey post hoc tests were used to determine the differences when the data were distributed normally. If the data were non-parametric, the Kruskal Wallis test and Mann Whitney U pairwise comparison tests were performed. SPSS 23.0 (IBM, SPSS Statistics 23) program was used for statistical analyses. All analyses were carried out in triplicate for each duplicate sample.

RESULTS AND DISCUSSION

Monitoring the fermentation process

Microbial growth kinetic

For microbial growth kinetic analysis, *lactobacilli*, *lactococci*, total mesophilic aerobic bacteria and yeast were counted every 5 hours during fermentation. The changes in *lactobacilli* count during the incubation of kefir samples obtained using commercial kefir drinks as starter cultures are shown in Figure 1. The provided graph illustrates the growth of *lactobacilli* overtime during the fermentation process for two different brands (Brand A and Brand B). Both brands exhibit a typical logistic growth curve, which is common in microbial growth. The logistic model fits the data well, suggesting that bacterial growth follows a typical S-shaped curve. This indicates that initially, bacteria grow rapidly, but as resources become limited, the growth rate slows down and eventually reaches a plateau.

In terms of growth rate, Brand A shows a faster growth rate for *lactobacilli* than Brand B, especially between 10 and 15 hours. Brand A kefir samples fitted the logistic model better than brand B samples, with adjusted R² values of 0.9602 and 0.8779 for brand A and B kefir samples, respectively. In brand A kefir samples, the

number of lactobacilli, 6.30 log CFU/ mL at the beginning of fermentation, was determined as 7.28 log CFU/mL at the end of the incubation period. The increase in *lactobacilli* counts was significant up to the 15th hour ($P<0.05$), and the increase was not significant after this period. In brand B, *lactobacilli* were 6.40 log CFU/ mL after inoculation and 7.42 log CFU/ mL at the end of incubation. Unlike brand A, the increase in the number of *lactobacilli* is significant until the 20th hour. ($P<0.05$). Similar findings were reported in the literature. Traditional and back-sloping methods for kefir fermentation were compared, and lactic acid bacteria increased between 7 and 9

log CFU/mL during fermentation in both kefir types (Kim et al., 2018). In kefir samples produced with 2% kefir grains, *lactobacilli* count increased to 5.33 log CFU/mL within 12 hours. At the end of the fermentation process, it was reported as 7.63 log CFU/mL (Hikmetoglu et al., 2020). In kefir samples made with 10% kefir grains under home conditions, the LAB count reached 7×10^7 CFU/mL. (Alves et al., 2021). The number of *lactobacilli* after fermentation in kefir samples made with 3% bacterial strain and 2% yeast kefir grains was reported as 8 log CFU/mL (Abdolmaleki et al., 2015).

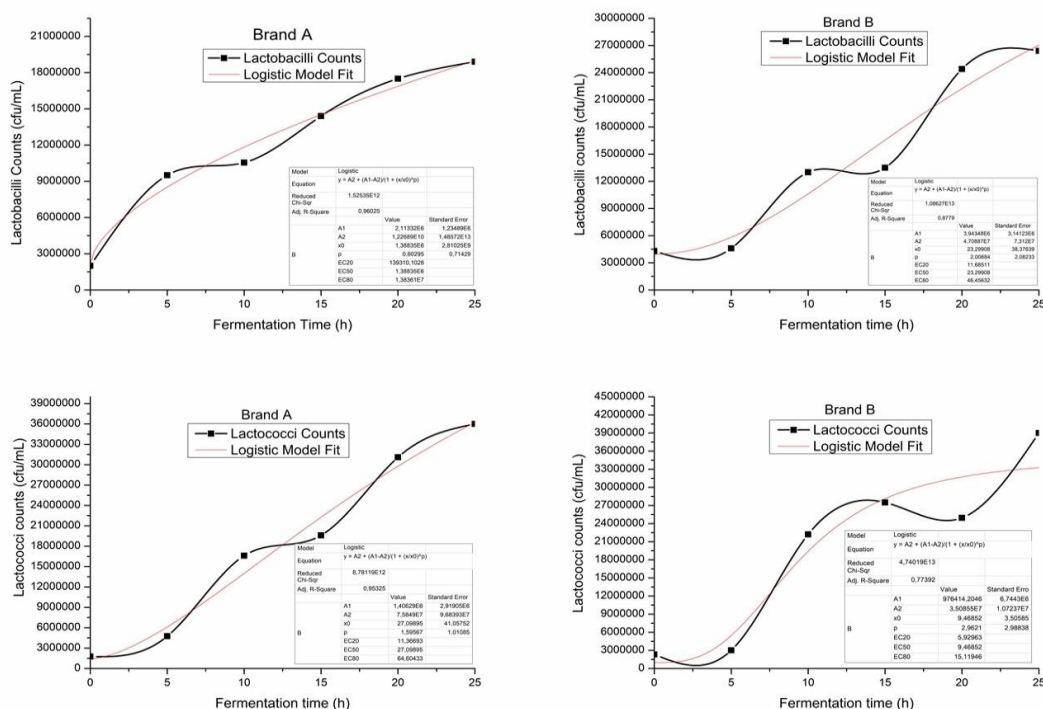


Fig.1. Microbial growth kinetics of kefir samples are produced with Brand A and B beverages. *Lactobacilli* growth kinetics and *Lactococci* growth kinetics

The changes in the number of *lactococci* bacteria during the incubation period of kefir samples are shown in Figure 1. The difference between the two brands is less pronounced for *lactococci*. Brands A and B kefir samples fit the logistic model highly; their adjusted R^2 values were 0.9533 and 0.7739, respectively. In kefir beverages produced from brand A, *lactococci* were 6.24 log

CFU/mL at the beginning of fermentation and 7.56 log CFU/mL at the end of the incubation period. In brand B, *lactococci* were 6.40 log CFU/mL immediately after inoculation and 7.59 log CFU/mL at the end of incubation. The same increasing trend and numbers were observed for both productions. The *lactococci* counts in kefir samples obtained from brands A and B increased

significantly until the 25th hour of fermentation ($P < 0.05$). *Lactococci* growth in kefir samples incubated with commercial kefir starter culture increased from 5.50 log CFU/mL to 9.05 log CFU/mL, and the addition of oleaster flour and high-pressure application increased the growth rate (Gul et al., 2023). Kefir made with starter culture, the counts of *lactococci* increased from 5.80 log CFU/mL to 7.80 log CFU/mL after 24 hours of incubation (García Fontán et al., 2006). Fermented commercial Norwegian kefir samples

showed a *lactococci* count of 8 log CFU/mL (Grønnevik et al., 2011).

The changes in total mesophilic aerobic bacteria count during the incubation period of kefir samples are shown in Figure 2. The kefir samples obtained from brands A and B fit the logistic model, and their adjusted R^2 values were 0.9609 and 0.9887, respectively. This indicates an initial lag phase, followed by exponential growth, and then, a stationary phase in which growth halts.

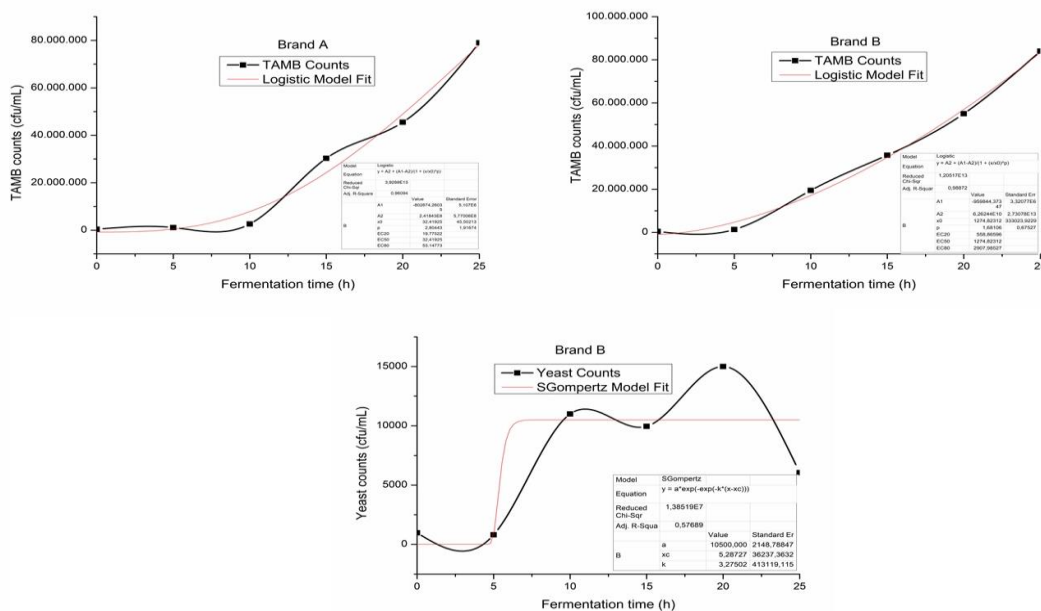


Fig.2. Microbial growth kinetics of kefir samples are produced with Brand A and B beverages. Total mesophilic aerobic bacteria growth kinetics and Yeast growth kinetics

In brand A, the total number of mesophilic aerobic bacteria was 5.52 log CFU/mL at the beginning of fermentation and 7.89 log CFU/mL at the end of the incubation period. In brand B, the total number of mesophilic aerobic bacteria was 5.63 log CFU/mL immediately after inoculation and 7.92 log CFU/mL at the end of the incubation period. This increase was significant during the fermentation until the end of incubation ($P < 0.05$).

The variations in yeast counts of kefir samples during the incubation period are shown in Figure 2. While no yeast growth was observed in kefir

obtained from brand A, yeast change in kefir samples produced from brand B was found to fit the Gompertz model than the logistic model, with a regression coefficient of 0.5769. The yeast population experiences a rapid increase, reaches a peak, and then declines slightly. In brand B, the yeast count was 2.99 log CFU/mL immediately after inoculation and 3.78 log CFU/mL at the end of incubation. A decrease in yeast count was observed after the 20th hour. This decline can be attributed to the competition for nutrients between the microorganisms. The yeast count was 3 log CFU/mL in freshly produced kefir samples (Grønnevik et al., 2011).

Yeast in kefir samples made with kefir starter culture increased from 2 log CFU/mL to 3 log CFU/mL, and hazelnut milk addition promoted the growth rate (Atalar, 2019). In another study, kefir produced with commercial starter culture was not detected after 24h incubation (García Fontán et al., 2006). Some brands refrain from using yeast-included starter cultures due to packaging problems with forming CO₂. The results reveal that using two different kefir brands showed similar microbial growth kinetics during fermentation except yeast viability.

pH change kinetics

The pH changes of kefir samples during the incubation period are shown in Figure 3. The graph obtained from hourly measurements was fitted to the logistic model, and the adjusted R² values were 0.9970 and 0.9916, respectively. The pH values of kefir samples produced from both brands were 6.44 at the beginning of inoculation and decreased to 4.28 in both kefir samples after 24 hours of incubation. The pH values of the original commercial kefir drinks used for fermentation were 4.22 and 4.30 for brands A and B, respectively.

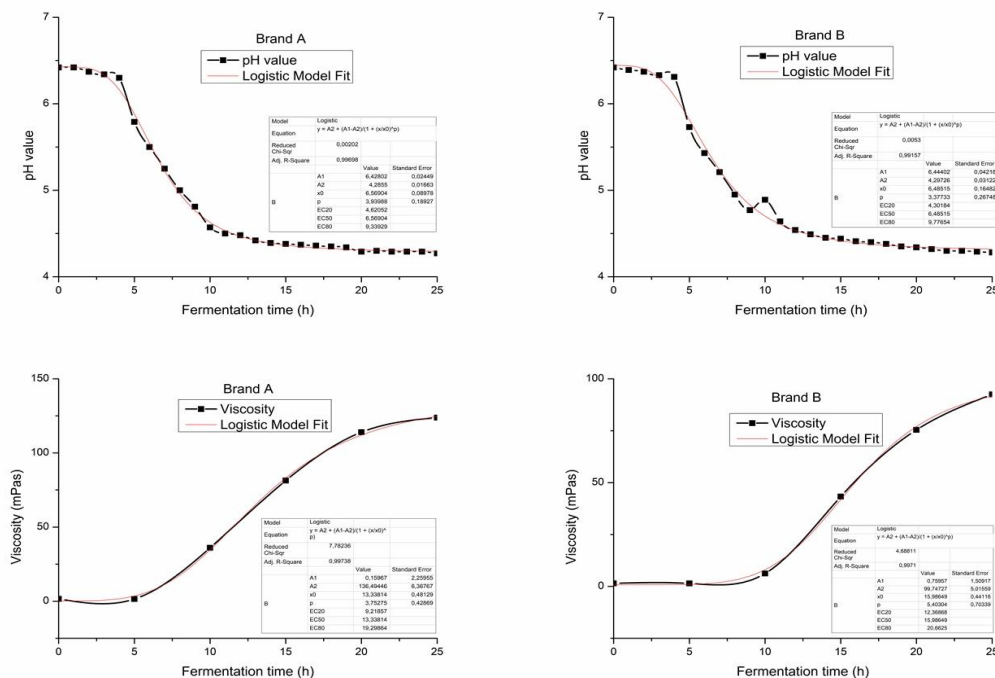


Fig.3 pH and viscosity kinetics of kefir samples produced with Brand A and B beverages

For both brands, the maximum decrease in pH values was determined to be 5 hours. The time for kefir samples to reach pH 4.5 was 11 hours for Brand A and 13 hours for Brand B. $V_{\max}$ values were determined as 9.08 and 5.83 for Brand A and B, respectively. Our findings are in agreement with those of different studies. The acidification kinetics parameters of kefir samples produced with starter culture were reported as $V_{\max}$ between 1.85 and 1.75×10^{-3} pH units per minute, $T_{\max}$ 12 hours and time to $T_{pH5.0}$ 14 hours (Atalar, 2019).

The pH values of kefir drinks produced from Saane, Hair goat and cow milk varied between 4.54 and 4.59 during fermentation (Satir and Guzel-Seydim 2015). The pH values of kefir samples produced from kefir grains incubated at 25°C were 4.85-4.85 and 4.30 at 18, 24, and 48 hours, respectively (Hecer et al., 2019). $V_{\max}$, $T_{\max}$, and $T_{pH5.0}$ values of kefir produced from the starter culture are 0.28 ± 0.01 , 12, and 14, respectively (Gul et al., 2023).

Viscosity change kinetics

The viscosity changes of kefir samples during incubation are shown in Figure 3. The viscosity values of kefir produced with brands A and B were 1.58 mPa.s and 1.44 mPa.s at the beginning of fermentation and 123.79 mPa.s and 92.49 mPa.s at the end of the incubation period. The viscosity variations of brands A and B highly fit a logistic model, with adjusted R^2 values of 0.9974 and 0.9971, respectively. There is a wide range of kefir viscosity values in the literature. Kefir produced from starter culture has a viscosity value of 42.14 mPa.s after fermentation (Sarica & Coşkun, 2020). Kefir made from kefir grains

showed a viscosity of 225 mPa.s (Kök-Taş et al., 2013). The viscosity values of kefir produced with cow milk were 101.1 mPa.s after fermentation (Tratnik et al., 2006).

Generation study

Microbial growth, pH and viscosity changes

Lactobacilli count results of the samples in the generation study for 4 days are given in Figure 4. In kefir drinks produced from brand A, lactobacilli count was 6.45 log CFU/mL at the end of the 4th generation, which was 6.61 log CFU/mL at the first generation.

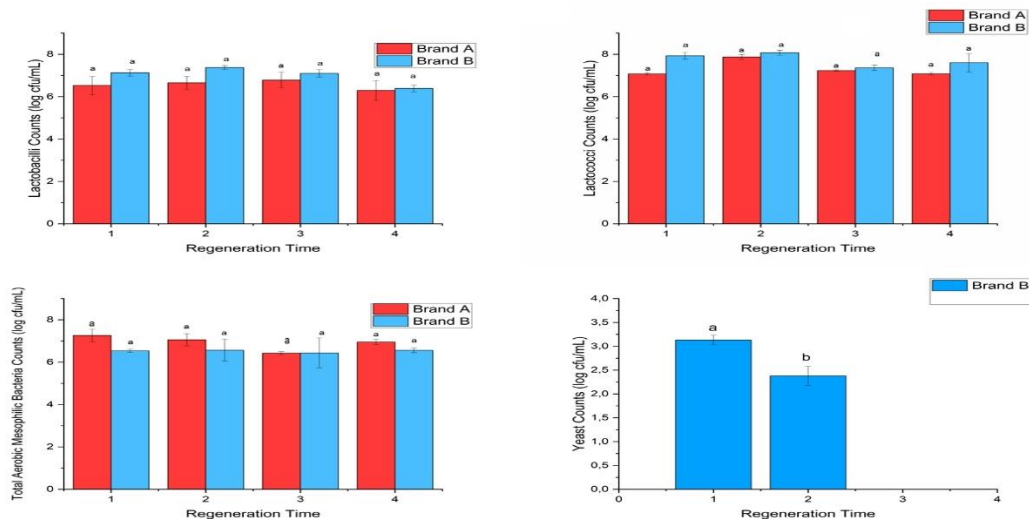


Fig.4. Microbial change of kefir samples produced with Brand A and B beverages during regeneration

In brand B, the number of lactobacilli was 6.63 log CFU/mL after the first generation and 6.46 log CFU/mL at the end of the 4th generation. The generation of kefir samples did not change the number of *lactobacilli* ($P > 0.05$). However, a decline was observed compared to the first-time production results (The results were given in Section 3.1.1). The total number of *lactococci* in kefir beverages produced from brand A was 7.07 log CFU/mL at the first generation and 7.08 log CFU/mL at the end of the 4th generation. In brand B, *lactococci* were 7.92 log CFU/mL after the first generation and 7.6 log CFU/mL at the end of the 4th generation. As in the case of *lactobacilli*, no change in the number of *lactococci* was observed with the generation process ($P > 0.05$). The total

number of mesophilic aerobic bacteria in kefir beverages produced from brand A was 7.02 log CFU/mL for the first generation and 7.02 log CFU/mL at the end of the 4th generation. In brand B, the total number of mesophilic aerobic bacteria was 6.42 log CFU/mL after the first generation and 6.41 log CFU/mL at the end of the 4th generation. The change in the number was found to be insignificant ($P > 0.05$). As shown in Figure 3, while no yeast growth was observed in brand A, the presence of yeast was detected in brand B only in the first and second generations. In kefir produced from brand B, the yeast count was 3.13 log CFU/mL after the first generation and 2.38 log CFU/mL after the second generation ($P < 0.05$). In Summary, the generation

process after the first production decreased the number of microorganisms. However, no change in viability was detected in the generation processes.

The pH values measured for 4 days in the generation study are shown in Figure 5. The pH values of kefir samples produced from brands A and B slightly decreased from the first generation. The pH value of kefir drinks produced from brand A, which was 4.41 for the first generation,

was determined as 4.39 pH at the end of the 4th generation. In brand B, the pH value was 4.51 after the first generation and 4.35 at the end of the 4th generation.

The viscosity of brand A kefir decreased from the first generation to the 3rd generation. However, it is seen that the viscosity increased on the 4th day. When we look at the data for brand B, we see an increase in viscosity values from the first generation.

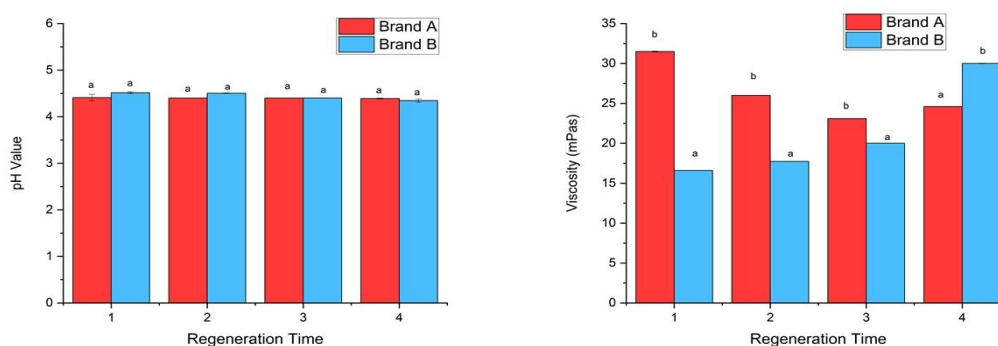


Fig.5. pH and viscosity change of kefir samples produced with Brand A and B beverages during regeneration

Aydemir (2020) purchased four commercial yogurts from the market and investigated their usability in home yogurt production. The yogurts were inoculated into fresh milk and passed four times. Similar to our findings, the time for pH values to reach 4.60 was shortened from the first generation and a lower pH value was reached on the last generation. The viscosity values produced in the first generation were the lowest compared to the other three productions. This may be related to the adaptation of microorganisms to the environment. It was revealed that commercial yogurt can be used as a starter culture in home-type yogurt production.

Storage study

Microbial growth

Microbial counts of the kefir samples in the storage study for 4 weeks are given in Table 1. The number of lactobacilli decreased during storage in kefir samples produced with both brands. The number of lactobacilli was 7.73 log CFU/mL on the first day of storage and 7.02 log CFU/mL at the end

of storage. In kefir produced with brand B, the number of lactobacilli was 7.86 log CFU/mL on the first day and decreased to 7.11 log CFU/mL at the end of storage. The decrease during storage was statistically significant ($P < 0.05$). The decrease is lower than in Norwegian commercial kefir samples, whose lactobacilli count was 8 log CFU/mL, and 2 log decreases were detected in the numbers of lactobacilli in the 4th week of storage (Grønnevik et al., 2011). Goncu et al. (2017) determined that the lactobacilli count of kefir samples was 10.23 log CFU/mL on the 1st day of storage and 9.61 log CFU/mL on the 20th day of storage. Abdolmaleki et al., (2015) found that the lactobacilli count in kefir samples produced using milk, soy milk and whey was 8.28 log CFU/mL on the 1st day of storage and decreased to nearly 5 log CFU/mL on the 28th day of storage.

During storage, the number of lactococci in kefir produced with brand A was 7.29 log CFU/mL on the first day of storage and 6.59 log CFU/mL on

the last day of storage. In kefir produced with brand B, the number of lactococci was 7.77 log CFU/mL on the first day of storage, decreasing to 6.81 CFU/mL at the end of storage. The decreases for both brands were significant ($P<0.05$). This could be attributed to cell proteolysis due to the reduction in pH. Similar findings were observed in the literature. *Lactococci* counts decreased from 9.23 to 8.04 log CFU/mL

during 21 days of storage in kefir samples produced with kefir grains (Kök-Taş et al., 2013). Lactococci levels decreased during storage, and the most significant decrease of approximately 1.5 log units occurred from days 7 and 14, which is statistically significant (Irigoyen, 2005). Abdolmaleki et al., (2015) reported that lactococci counts decreased by roughly 3 log during storage, which was statistically significant ($P<0.01$).

Table 1. Microbial results of kefir samples during storage

Storage Time	Lactobacilli Counts (log CFU/mL)		Lactococci Counts (log CFU/mL)		Yeast Counts (log CFU/mL)		TMAB Counts (log CFU/mL)	
	A Brand	B Brand	A Brand	B Brand	A Brand	B Brand	A Brand	B Brand
1. Day	7.73±0.68 ^{aA}	7.86±0.49 ^{aA}	7.29±0.34 ^{bA}	7.77±0.66 ^{aB}	N.D	4.48±0.03 ^C	7.9±0.14 ^{aA}	8.36±0.07 ^{aA}
7. Day	7.7±0.22 ^{aA}	7.46±0.21 ^{bB}	7.12±0.04 ^{bAB}	8.03±0.11 ^{aB}	N.D	4.86±0.16 ^A	7.81±0.04 ^{bA}	8.48±0.02 ^{aA}
14. Day	7.54±0.08 ^{aBC}	7.13±0.16 ^{bC}	7.24±0.08 ^{bA}	8.21±0.24 ^{aA}	N.D	4.72±0.17 ^B	7.64±0.51 ^{bAB}	8.28±0.21 ^{aAB}
21. Day	7.63±0.04 ^{aB}	7.01±0.16 ^{bCD}	6.59±0.02 ^{bC}	8.38±0.02 ^{aA}	N.D	4.76±0.21 ^{AB}	7.21±0.01 ^{bb}	8.05±0.33 ^{aB}
28. Day	7.02±0.02 ^{aD}	7.11±0.01 ^{aC}	6.59±0.1 ^{bC}	6.81±0.28 ^{aC}	N.D	4.85±0.21 ^A	6.81±0.04 ^{aC}	6.81±0.27 ^{aC}

*N.D: Not Determined. a–b Different superscript lowercase letters in rows indicate significant differences between brands in 95% of confidence ($P<0.05$); A–D Different superscript uppercase letters in columns indicate significant differences between storage periods in 95% of confidence ($P<0.05$)

While the presence of yeast could not be detected in the productions made with brand A, the yeast count in the productions made with brand B was 4.48 log CFU/mL on the first day of storage and 4.85 log CFU/mL on the last day. There was a slight increase in kefir produced from brand B during storage, which was statistically significant ($P<0.05$). Similar findings were observed for Norwegian kefir samples; yeasts constantly increased during storage at the end of 3 weeks. (Grønnevik et al., 2011). In productions made with brand A, the total number of mesophilic aerobic bacteria at the beginning of storage was 7.90 log CFU/mL, while on the last day, it was 6.81 log CFU/mL. In the productions made with brand B, the total number of mesophilic aerobic bacteria, 8.36 CFU/mL on the first day of storage, was found to be 6.81 CFU/mL on the last day of storage. The decrease in total mesophilic aerobic bacteria count was found to be significant on the 28th day of storage in kefir samples produced from both kefir brands ($P<0.05$).

Color properties

The physicochemical changes of kefir samples during the storage period are given in Table 2.

While the L^* value of kefir made with brand A was 84.17 at the beginning of storage, it was 83.83 on the last day of storage. A similar observation was observed in kefir made with brand B; while the L^* value was 84.11 at the beginning of storage, it was found to be 83.96 on the last day of storage. These differences were found to be significant ($P<0.05$). No statistical difference was observed in the a^* values of kefir produced with both brands throughout storage ($P>0.05$). The negative a^* values of kefir samples were due to their slightly green color. While the b^* value of kefir made with brand A was 6.07 at the beginning of storage, it was found to be 5.81 on the last day of storage. This difference was found to be significant ($P<0.05$). A similar observation was observed in kefir made with brand B; while the b^* value was 4.02 at the beginning of storage, it was found to be 3.9 on the last day of storage ($P<0.05$). A significant difference was detected regarding the b^* value in kefir produced from both brands. The color saturation can explain why the difference became stronger during the storage. (Czyżak-Runowska et al., 2022). Kefir samples manufactured from cow and buffalo milks by using kefir grains and starter cultures, L^*

values varied between 91.80 and 92.98, a^* values varied between -0.87 and -1.71, and b^* values ranged between 6.47 and 10.61 (Gul et al., 2018).

Table 2. Physicochemical results of kefir samples during storage

Storage Time	L*		a*		b*	
	A Brand	B Brand	A Brand	B Brand	A Brand	B Brand
1. Day	84.17±0.01 ^{Ca}	84.11±0.01 ^{Aa}	-2.37±0.01 ^{Aa}	-1.62±0.02 ^{Aa}	6.07±0.02 ^{Da}	4.02±0.02 ^{Ab}
7. Day	84.14±0.01 ^{Da}	83.98±0.01 ^{Ba}	-0.89±0.03 ^{Aa}	-1.64±0.02 ^{Ab}	6.25±0.04 ^{Ba}	3.95±0.04 ^{Bb}
14. Day	84.89±0.01 ^{Aa}	83.73±0.01 ^{Da}	-2.37±0.02 ^{Ab}	-1.53±0.01 ^{Aa}	6.54±0 ^{Aa}	3.68±0.02 ^{Eb}
21. Day	84.19±0.01 ^{Ba}	83.95±0.01 ^{Ca}	-2.33±0.01 ^{Ab}	-1.39±0.02 ^{Aa}	6.14±0.01 ^{Ca}	3.81±0.01 ^{Db}
28. Day	83.88±0 ^{Ea}	83.96±0.01 ^{Ca}	-2.37±0.02 ^{Ab}	-1.57±0.35 ^{Aa}	5.81±0.01 ^{Ea}	3.9±0.02 ^{Cb}

Storage Time	pH		Titratable Acidity (% Lactic acid)		Syneresis (%)	
	A Brand	B Brand	A Brand	B Brand	A Brand	B Brand
1. Day	4.58±0.04 ^{Aa}	4.4±0.01 ^{Aa}	0.77±0.0 ^{Aa}	0.78±0.01 ^{Aa}	35.16±1.19 ^{Aa}	28.32±0.96 ^{Bc}
7. Day	4.46±0.01 ^{ABa}	4.41±0.01 ^{Aa}	0.75±0.02 ^{Aa}	0.76±0.03 ^{Aa}	31.34±1.9 ^{Ab}	28.56±0.79 ^{Bc}
14. Day	4.38±0.03 ^{Ba}	4.42±0.02 ^{Aa}	0.74±0.0 ^{Aa}	0.74±0.01 ^{Aa}	29.68±0.45 ^{Bb}	33.14±1.61 ^{Ab}
21. Day	4.41±0.08 ^{ABa}	4.42±0.05 ^{Aa}	0.75±0.01 ^{Aa}	0.75±0.01 ^{Aa}	29.04±0.06 ^{Bb}	41.42±2.01 ^{Aa}
28. Day	4.39±0.12 ^{Ba}	4.4±0.07 ^{Aa}	0.76±0.01 ^{Aa}	0.77±0.01 ^{Aa}	36.2±1.7 ^{Aa}	38.32±1.87 ^{Aa}

*N.D: Not Determined. a–b Different superscript lowercase letters in rows indicates significant differences between brands in 95% of confidence ($P<0.05$); A–D Different superscript uppercase letters in columns indicates significant differences between storage periods in 95% of confidence ($P<0.05$)

Syneresis

In the kefir samples produced from the kefir of brand A, syneresis values were 35.16% on the first day of storage and 36.20% on the last day of storage (Table 2). This difference was not statistically significant ($P>0.05$). In kefir samples produced from brand B kefir, serum separation was found to be 28.32% on the first day of storage and 38.32% on the last day of storage. The increase that occurred, especially after the 14th day, was found to be statistically significant. The syneresis values between the two brands may differ in the exopolysaccharide production levels of used starter cultures. The change in serum separation values of kefirs Kefir produced from cow's milk between the 1st and 14th days was found to be significant ($P<0.05$), while made from goat's milk was found to be insignificant throughout storage ($P>0.05$) (Sarica & Coşkun, 2020). Kefir samples made from kefir grains varied between 25.71–30.12%, and the kefir samples made with starter culture varied between 23.50–28.50% (Yousefvand et al., 2022).

pH and titratable acidity

The acidity change of kefir samples throughout storage is given in Table 2. The pH value of the production with brand A was 4.58 at the beginning, and the pH was found to be 4.39 on the last day of storage due to the metabolic activity of microorganisms, especially lactic acid bacteria, that metabolize lactose and nitrogenous substances in kefir. The pH value of the production made under brand B was 4.4 on the first and last day of storage. While the pH value of the production made with brand A decreased during storage ($P<0.05$), no change was observed in the values of brand B ($P>0.05$). From the first to the last day of storage, the pH of the fermented milk drink from Brazilian milk kefir gradually decreased from 6.55 to 4.31 ($P<0.05$) (Leite et al. 2013). The pH values of kefirs were 4.50, 4.10, and 4.10 on the 1st, 7th, and 15th days of storage, respectively (Öner et al., 2010).

The titratable acidity of kefir samples produced from brand A was 0.77% at the beginning of storage and 0.76% on the last day of storage. The

change during storage was insignificant ($P>0.05$). In the kefir samples produced from brand B, titratable acidity was found to be 0.78% on the first day of storage and 0.77% on the last day, and the change during storage was insignificant ($P>0.05$). The % lactic acid values of kefir samples were determined as 0.89% on the 1st day of storage, 0.84% on the 7th day and 0.92% on the 21st day of storage (Kök-Taş et al., 2013). The titratable acidity value of kefir samples produced from cow and buffalo milk was between 0.64% and 0.76% on the 1st day. The titratable acidity value did not differ between kefir samples during storage (Gul et al., 2015). The % lactic acid values of kefir samples were measured as 0.68, 0.78 and 0.87 during the 1st, 10th, and 20th days of storage, respectively (Goncu et al. 2017).

Sensory properties

The sensory scores for kefir samples produced with commercial kefir beverages are presented in

Fig.6. An increase in taste and aroma values was observed in kefir samples produced from brand A compared to the first day of storage, and the highest score was detected in the samples on the 7th day. The taste and aroma scores in the kefir samples produced from brand B showed a decreased tendency during storage. The highest score was on the 1st day of storage, while the taste and aroma scores decreased as storage progressed ($P<0.05$). While the consistency scores of kefir samples produced from brand A enhanced during storage ($P<0.05$), brand B samples remained constant throughout storage ($P>0.05$). While there was an increase in the color and appearance scores of kefir samples produced from brand A throughout storage ($P<0.05$), a significant decrease was observed in kefir samples produced from brand B on the 28th day of storage ($P<0.05$). In the samples obtained from both kefir brands, the lowest overall liking score was determined on the first day of storage.

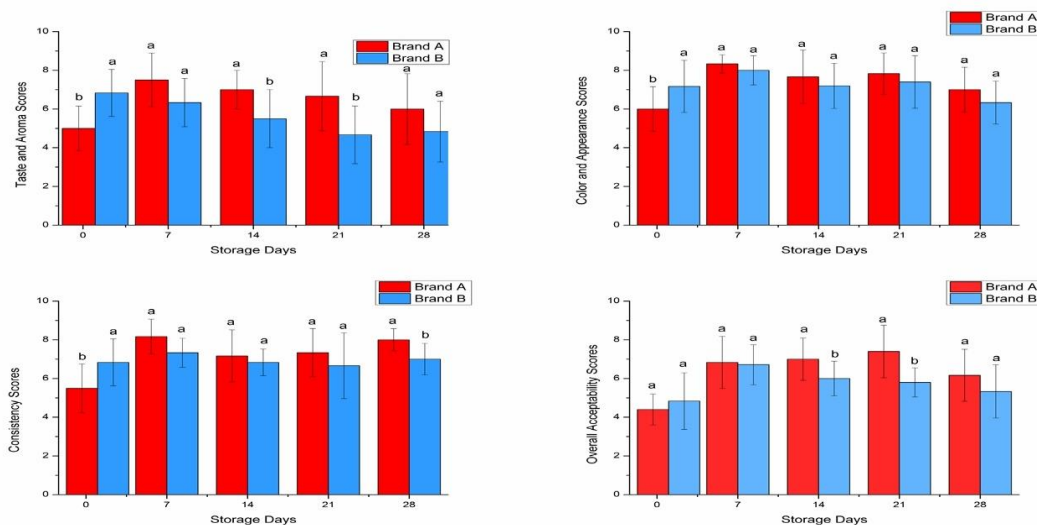


Fig.6. Sensory evaluation of kefir samples produced with Brand A and B beverages during storage

While the highest overall acceptability score for kefir samples produced from brand A was obtained on the 21st day of storage, the highest score was determined for kefir samples produced from brand B on the 7th day of storage. Akbörü (2019) produced kefir using different commercial cultures. The general acceptability of kefir samples received the highest score in the 7th storage. The differences between kefir samples were

statistically significant throughout storage. Goncu et al. (2017) determined that while the general acceptability of kefir samples increased during the first 10 days of storage, but decreased thereafter. The difference may be related to the growth of acidity and the reduction in the content of aroma compounds (such as acetaldehyde) in kefir samples during storage.

CONCLUSION

Within the scope of this study, the potential for producing homemade kefir from commercial kefir beverages was investigated. Fermentation, generation and storage steps were studied to characterize the kefir samples. The fermentation growth kinetics were fitted to the logistic model in *lactobacilli*, *lactococci*, TAMB, pH and viscosity values with 0.8779-0.9973 adjusted R^2 . For both brands, the maximum decrease in pH values was determined to be 5 hours. The time for kefir samples to reach pH 4.5 was 11 hours for Brand A and 13 hours for Brand B. The generation of kefir samples did not change the number of *lactobacilli*, *lactococci*, and TAMB counts during the 4th passing. In kefir produced from brand B, the yeast count was 3.13 log CFU/mL after the first generation and decreased to 2.38 log CFU/mL in the second generation. Yeast was not detected in the third and fourth generations. During storage, *lactobacilli*, *lactococci*, and TAMB counts decreased significantly ($P>0.05$). While no yeast growth was observed in the kefir samples produced from brand A, there was a slight increase in the kefir samples produced from brand B, but this increase was not found to be statistically significant ($P>0.05$). While no statistical difference was observed in the a^* values of kefir produced with both kefir brands throughout storage ($P>0.05$), a significant difference was detected in the b^* and L^* values. During storage, syneresis increased in both kefir brands, indicating structural weakness. The kefir drink produced with Brand B meets the Codex Alimentarius recommendations for fermented milk (Codex Alimentarius Commission, 2003), i.e., the total microorganism count should be at least 10^7 CFU/mL and the yeast count at least 10^4 CFU/mL. As the yeast was not observed in Brand A, kefir drinks produced with Brand A did not provide the required yeast values prescribed by the Codex Alimentarius. Despite structural problems, this technique can be adequate for producing kefir beverages in homemade conditions. However, these commercial kefirs can be collected from market shelves at different periods, and fluctuations in product temperature make it difficult to create a standardized product in terms of quality characteristics in the final product.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors state that they have no conflicts of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Ozlem Şahin: Formal Analysis. Ilyas Atalar: Writing – original draft, Conceptualization, Methodology. Seyma Betul Encu: Formal Analysis. Ibrahim Cakir: Writing – review & editing, Supervision.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Bolu Abant İzzet Baysal University, Council of Scientific Research Projects under Grant Number BAP–2021.09.04.1509.

REFERENCES

- Abdolmaleki F., Mazaheri Assadi M., Akbarirad H. (2015) Assessment of beverages made from milk, soya milk and whey using Iranian kefir starter culture. *International Journal of Dairy Technology* 68(3) 441–447.
- Alves E., Ntungwe E N., Gregório J., Rodrigues L M., Pereira-Leiten C., Caleja C., Pereira E., Barros L., Aguilar-Vilas M V., Rosado C., Rijo P. (2021). Characterization of kefir produced in household conditions: Physicochemical and nutritional profile, and storage stability. *Foods* 10(5) 1–16.
- Atalar I. (2019). Functional kefir production from high pressure homogenized hazelnut milk. *Lwt-Food Science and Technology* 107 256–263.
- Aydemir O. (2020). Commercial yogurts as inoculum in yogurt making and their reusability properties. *Food and Health* 6(4) 213–224.
- Corona O., Randazzo W., Miceli A., Guarcello R., Francesca N., Erten H., Moschetti G., Settanni L. (2016). Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. *LWT - Food Science and Technology* 66 572–581.
- Czyżak-Runowska G., Wójtowski J A., Łęska B., Bielińska-Nowak S., Pytlewski J., Antkowiak I., Stanisławski D. (2022). Lactose Content and Selected Quality Parameters of Sheep Milk Fermented Beverages during Storage. *Animals* 12 (22).

- García Fontán M C., Martínez S., Franco I., Carballo J. (2006). Microbiological and chemical changes during the manufacture of Kefir made from cows' milk, using a commercial starter culture. *International Dairy Journal* 16 (7) 762–767.
- Garrote G L., Abraham A G., De Antoni G L. (1997). Preservation of Kefir Grains, a Comparative Study. *LWT - Food Science and Technology* 30(1) 77–84.
- Goncu B., Celikel A., Guler-Akin M B., Akin M S. (2017). Obogaćivanje kefir vlaknima jabuke i limuna. *Mlječarstvo* 67(3) 208–216.
- Grønnevik H., Falstad M., Narvhus J A. (2011). Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *International Dairy Journal* 21(9) 601–606.
- Gül L B., Bekbay S., Akgün A., Gül O. (2023). Effect of oleaster (*Elaeagnus angustifolia* L.) flour addition combined with high-pressure homogenization on the acidification kinetics, physicochemical, functional, and rheological properties of kefir. *Food Science and Nutrition* 11(9) 5325–5337.
- Gul O., Atalar I., Mortas M., Dervisoglu M. (2018). Rheological, textural, colour and sensorial properties of kefir produced with buffalo milk using kefir grains and starter culture: A comparison with cows' milk kefir. *International Journal of Dairy Technology* 71 73–80.
- Gul O., Mortas M., Atalar I., Dervisoglu M., Kahyaoglu T. (2015). Manufacture and characterization of kefir made from cow and buffalo milk, using kefir grain and starter culture. *Journal of Dairy Science* 98(3) 1517–1525.
- Hecer C., Ulusoy B., Kaynarca D. (2019). Effect of different fermentation conditions on composition of kefir microbiota. *International Food Research Journal* 26(2) 401–409.
- Hikmetoglu M., Sogut E., Sogut O., Gokirmakli C., Guzel-Seydim Z B. (2020). Changes in carbohydrate profile in kefir fermentation. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 23 100220.
- Irigoyen A. (2005). Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chemistry* 90(4) 613–620.
- Kim D H., Jeong D., Song K Y., Seo K H. (2018). Comparison of traditional and backslipping methods for kefir fermentation based on physicochemical and microbiological characteristics. *Lwt* 97 503–507.
- Kök-Taş T., Seydim A C., Özer B., Guzel-Seydim Z B (2013). Effects of different fermentation parameters on quality characteristics of kefir. *Journal of Dairy Science* 96(2) 780–789.
- Leite A. M. O., Leite D. C. A., Del Aguila E. M., Alvares T. S., Peixoto R. S., Miguel M. A., Silva J. T., Paschoalin V. M. F. (2013). Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. *Journal of Dairy Science* 96(7) 4149–4159.
- Nejati F., Junne S., Neubauer P. (2020). A big world in small grain: A review of natural milk Kefir starters. *Microorganisms* 8 (2).
- Öner Z., Karahan A. G., Çakmakçı M. L. (2010). Effects of different milk types and starter culture on kefir. *Gıda* 35 177–182.
- Prado M. R., Blandón L. M., Vandenberghe L. P. S., Rodrigues C., Castro G. R., Thomaz-Soccol V., Soccol C. R. (2015). Milk kefir: Composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in Microbiology* 6 1–10.
- Sarica E., Coşkun H. (2020). Assessment of durability and characteristics of changes in kefir made from cow's and goat's milk. *Italian Journal of Food Science* 32(3) 498–516.
- Satir G., Guzel-Seydim Z. (2015). Influence of Kefir fermentation on the bioactive substances of different breed goat milks. *LWT - Food Science and Technology* 63(2) 852–858.
- Satir G., Guzel-Seydim Z. B. (2016). How kefir fermentation can affect product composition? *Small Ruminant Research* 134 1–7.
- Sharifi M., Moridnia A., Mortazavi D., Salehi M., Bagheri M., Sheikhi A. (2017). Kefir: a powerful probiotics with anticancer properties. *Medical Oncology* 34(11) 1–7.
- Sodini I., Montella J., Tong P. S. (2005). Physical properties of yogurt fortified with various

- commercial whey protein concentrates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85(5) 853–859.
- Teijeiro M., Pérez P. F., De Antoni G. L., Golowczyc M. A. (2018). Suitability of kefir powder production using spray drying. *Food Research International* 112 169–174.
- Tratnik L., Božanić R., Herceg Z., Drgalić I. (2006). The quality of plain and supplemented kefir from goat's and cow's milk. *International Journal of Dairy Technology* 59(1) 40–46.
- Wang H., Sun X., Song X., Guo M. (2021). Effects of kefir grains from different origins on proteolysis and volatile profile of goat milk kefir. *Food Chemistry* 339 128099.
- Yousefvand A., Huang X., Zarei M., Saris P. E. J. (2022). Lacticaseibacillus rhamnosus GG Survival and Quality Parameters in Kefir Produced from Kefir Grains and Natural Kefir Starter Culture. *Foods* 11(4).

**COMPARATIVE EVALUATION OF DIFFERENT EXTRACTION METHODS
FOR ANTHOCYANIN RECOVERY FROM RED ONION PEEL: ENZYME-
ASSISTED, ULTRASOUND-ASSISTED, AND ULTRASOUND-ASSISTED
ENZYMATIC METHODS**

Irem DAMAR*

Trakya University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Edirne, Turkey

Received /Geliş: 11.03.2025; Accepted /Kabul: 07.05.2025; Published online /Online baskı: 13.05.2025

Damar, I. (2025). *Comparative evaluation of different extraction methods for anthocyanin recovery from red onion peel: Enzyme-assisted, ultrasound-assisted, and ultrasound-assisted enzymatic methods.* GIDA (2025) 50 (3) 389-405 doi: 10.15237/ gida.GD25040

Damar, I. (2025). Kırmızı soğan kabuğundan antosiyanin geri kazanımı için farklı ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırmalı değerlendirmesi: Enzim destekli, ultrason destekli ve ultrason destekli enzimatik yöntemler. GIDA (2025) 50 (3) 389-405 doi: 10.15237/ gida.GD25040

ABSTRACT

In this study, enzyme-assisted extraction (EAE), bath and probe type ultrasound-assisted extraction (UAE-B, UAE-P), and ultrasound-assisted enzymatic extraction using bath and probe-type ultrasound (UAEE-B, UAEE-P) were compared to conventional extraction (CE) for recovering anthocyanins from red onion peel. Extracts were analyzed for total phenolic (TPC), total flavonoid (TFC), total monomeric anthocyanin (TMA), antioxidant activities (AA-ABTS, AA-DPPH), individual anthocyanins, and colour parameters. UAEE-B achieved 33.12% higher extraction yield than CE. UAEE-B showed more TPC compared to other methods, while UAEE-B and UAEE-P exhibited statistically significant TFC and TMA content. The extraction methods influenced the concentration of individual anthocyanins in distinct ways. EAE resulted in the highest AA-ABTS, while combined ultrasound- and enzyme-assisted methods showed the greatest efficacy in the AA-DPPH. The colour variation observed was 2.17 ± 0.91 for UAEE-B and 3.48 ± 0.24 for UAEE-P. In conclusion, combining ultrasound- and enzyme-assisted extraction techniques detected to be beneficial for recovering anthocyanins from red onion peel.

Keywords: Red onion peel, anthocyanin, ultrasound-assisted extraction, enzyme-assisted extraction, ultrasound-assisted enzymatic extraction

**KIRMIZI SOĞAN KABUĞUNDAN ANTOSİYANİN GERİ KAZANIMI İÇİN
FARKLI EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI
DEĞERLENDİRMESİ: ENZİM DESTEKLİ, ULTRASON DESTEKLİ VE
ULTRASON DESTEKLİ ENZİMATİK YÖNTEMLER**

ÖZ

Bu çalışmada, kırmızı soğan kabuklarından antosiyaninleri geri kazanmak için enzim destekli ekstraksiyon (EAE), banyo ve prob tipi ultrason destekli ekstraksiyon (UAE-B, UAE-P) ve banyo ve prob tipi ultrason destekli enzimatik ekstraksiyon (UAEE-B, UAEE-P) geleneksel ekstraksiyona (CE) ile karşılaştırılmıştır. Ekstraktlar toplam fenolik (TPC), toplam flavonoid (TFC), toplam monomerik

* Corresponding author / Sorumlu yazar

✉: iremdamar@trakya.edu.tr

☎: +90(284)226 1218/1220

☎: +90(284)226 1225

Irem Damar; ORCID no: 0000-0002-5521-2233

antosiyenin (TMA), antioksidan aktivite (AA-ABTS, AA-DPPH), bireysel antosiyeninler ve renk parametreleri açısından analiz edilmiştir. UAEE-B ile CE'den %33.12 daha yüksek ekstraksiyon verimi elde edilmiştir. UAEE-B diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında daha fazla TPC gösterirken, UAEE-B ve UAEE-P istatistiksel olarak daha yüksek TFC ve TMA içeriği sergilemiştir. Ekstraksiyon yöntemleri, bireysel antosiyeninlerin konsantrasyonunu farklı şekillerde etkilemiştir. EAE en yüksek AA-ABTS ile sonuçlanırken, kombine ultrason ve enzim destekli yöntemler AA-DPPH'de en büyük etkinliği göstermiştir. Gözlemlenen renk değişimi UAEE-B için 2.17 ± 0.91 ve UAEE-P için 3.48 ± 0.24 'dir. Sonuç olarak, ultrason ve enzim destekli ekstraksiyon tekniklerinin birlikte kullanılmasının kırmızı soğan kabuğundan antosiyeninleri geri kazanmak için faydalı olduğu tespit edildi.

Anahtar kelimeler: Kırmızı soğan kabuğu, antosiyenin, ultrason destekli ekstraksiyon, enzim destekli ekstraksiyon, ultrason destekli enzimatik ekstraksiyon

INTRODUCTION

Onion (*Allium cepa* L.) is one of the most critical vegetables cultivated throughout all over the world since ancient times. The production of onion has increased by 25% on a global scale in the last decade and its production has reached nearly 98 million tons (Bains et al., 2023; Lipsa et al., 2024). Onion wastes contain onion peels, roots, the outer two-layered fleshy part, upper and lower parts of onions, and damaged onions (Ersoy et al., 2020). It has been reported that approximately 0.6 million tons of onion waste is produced annually in the European Union as a result of domestic and industrial processing (Kumar et al., 2022). The characteristic composition of onions (caused by sulfur-containing components) limits their use as fertilizer and causes environmental problems. Additionally, the rapid proliferation of phytopathogenic agents in environments where these wastes are present makes onion waste unsuitable for use as animal feed or for landfill management (Chadorshabi et al., 2022).

The chemical composition of various onions (white, yellow and red) contains high amounts of bioactive compounds such as phenolic, flavonoids, anthocyanins, triterpenoids and organosulfurs (Samota et al., 2022). Studies have proven that flavonoid synthesis increases in the peel to protect onions from soil microorganisms and UV light. Therefore, flavonoids are found 20 times more in the peel than in the edible part (Chadorshabi et al., 2022, Bains et al., 2023). Additionally, the concentration of bioactive compounds in red onions has been found to be significantly higher than in other types of onions

(Gorrepati et al., 2024). The characteristic peel colour, ranging from yellow to red/purple, are related to the type of flavonoid compounds. The yellow colour of the peel is due to quercetin, and the red and purple colour is due to the presence of anthocyanins (Celano et al., 2021; Gorrepati et al., 2024). Chadorshabi et al. (2022) reported that the main anthocyanin of red onions was cyanidin 3-glucoside (10.04-233 mg/100 g) and various anthocyanins were determined in some red onion varieties, namely, cyanidin 3-laminaribioside and less amounts of cyanidin, peonidin, and pelargonidin glucosides. Anthocyanins act as a functional agent for health. Therefore, onion peel extracts have been stated to have anticancer, antiobesity, antibacterial, neuroprotective, cardioprotective, and antidiabetic activities (Lipsa et al., 2024). However, the stability of anthocyanins is easily impressed by different factors such as pH, temperature, light, and sugars (acylated and unacylated) (Mirzazadeh et al., 2024).

Therefore, the extraction of anthocyanins from red onion peel without degradation is of critical importance for producing high-value bioactive preparations that could serve as natural alternatives to synthetic colorants and antioxidants in the food industry (Santos et al., 2022). Conventional extraction methods (CE) have some disadvantages such as high solvent usage, long duration, degradation of target components and low yield. Therefore, nowadays, new and green techniques such as ultrasound, microwave, supercritical fluid and enzyme-assisted extraction, which include using non-toxic alternative solvents, safe and sustainable natural

resources, are increasingly preferred in order to enhance the extraction efficiency and process efficiency of anthocyanins (Mirzazadeh et al., 2024). Ultrasound-assisted extraction (UAE) among these methods is based on the effect of mechanical sound waves at frequencies above the human ear's audibility (>20 kHz) on cell walls via cavitation. Ultrasound waves create compression and relaxation cycles in liquid media, creating "cavitation bubbles". These bubbles grow over several cycles, reach a critical size and eventually burst violently, producing high temperature (~5000 K) and pressure (~2000 atm). This process increases the permeability of cell walls, accelerates mass transfer and provides improved penetration (Chemat and Khan 2011; Vinatoru et al., 2017). In enzyme-assisted extraction (EAE), various enzymes such as cellulases, pectinases and hemicellulases are used to break down cell walls of natural matrix. These enzymes cause disruption of the cell wall structure and releases components sugars, proteins, essential oils, and phenolic compounds (Kitryte et al., 2017). The use of enzymes offers advantages such as shorter processing temperatures and times. However, enzyme use has serious limitations such as loss of enzyme activity over time and high cost. Recent studies have reported that ultrasound-assisted enzymatic extraction (UAEE) (ultrasound and enzyme-combined extraction) enhances extraction yield of phenolic compounds, anthocyanins, and carotenoids from fruit and vegetable waste (Tan et al., 2020; Ma et al., 2024; Meral and Demirdoven, 2024; Patil et al., 2024).

In the literature, different extraction methods have been used to recovery anthocyanins and phenolic compounds from dry onion peel. Benito-Román et al. (2021) reported that UAE increased the productivity seven times higher than CE. Jin et al. (2011) emphasized that MAE is more advantageous than CE and UAE for obtaining quercetin from onion peel. Hammad et al. (2024) optimized UAE and EAE for the extraction of phenolic compounds from dried red onion peel. Antioxidant activity results revealed that EAE was more effective than UAE under optimum conditions. Mirzazadeh et al. (2024) examined various modern techniques for anthocyanin extraction from red onion peel,

including solvent extraction, UAE, subcritical water extraction, MAE, pulsed electric field extraction, supercritical fluid extraction, and high hydrostatic pressure-assisted extraction. Their study reported that high hydrostatic pressure-assisted extraction was the most effective method in terms of extraction efficiency and total anthocyanin content.

The aim of this study was to evaluate the influence of the different techniques on the extraction of anthocyanins from red onion peel. Therefore, innovative green extraction methods such as enzyme-assisted extraction (EAE), bath and probe type ultrasound-assisted extraction (UAE), and both bath and probe-type ultrasound-assisted enzymatic extraction (UAEE-B, UAEE-P) were compared with conventional extraction (CE). The extraction efficiency, total phenolic content, flavonoid content, monomeric anthocyanin content, antioxidant activities, concentration of individual anthocyanins and colour parameters of the extracts obtained by these methods were determined. These results will provide the way for the sustainable transformation of these extracts into high-value- added products for food, cosmetics, and pharmaceutical industries.

MATERIAL AND METHODS

Materials

Chemicals and reagents

Folin-Ciocalteu reagent, potassium chloride, gallic acid, sodium acetate, sodium nitrite, sodium carbonate, aluminum chloride hexahydrate, sodium hydroxide, (+)-catechin, 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), potassium persulfate, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH), methanol, citric acid, and the cellulolytic enzyme mixture Viscozyme® L (*Aspergillus aculeatus*, V2010, fungal beta-glucanase units (FBU)/g ≥100), cyaniding 3-glucoside (C3G), cyaniding 3-rutinoside (C3R), and peonidin 3-glucoside (P3G) were purchased from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). Delphinidin 3-rutinoside (D3R) was purchased from Extrasynthese (Geney, France). Ethanol was obtained from Isolab (Istanbul, Turkey), and sodium citrate dihydrate was purchased from Tekkim (Bursa, Turkey).

Red Onion Peel

The outer dry protective layers of red onions were obtained from a local market in Edirne in October 2024. The peels were dried at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 hours, then ground using a Waring blender (Waring 8011 Eb, Vernon Hills, Illinois, USA) and sieved through a 1 mm mesh. The dry matter content of the resulting red onion peel powder (ROPP) was determined to be $92.75 \pm 0.03\%$ using the oven-drying method, and the value was calculated gravimetrically. The ROPP samples were stored at $+4^\circ\text{C}$ until used for extraction studies.

Extraction Methods

The parameters of all extraction methods were determined based on the enzyme's optimum pH value, solid-to-solvent ratio, and temperature conditions, to allow for comparison with the enzyme-assisted methods (Kaur et al., 2016; Nguyen and Nguyen, 2018). Specifically, the extraction durations in bath-type and probe-type ultrasound-assisted extraction, as well as their enzyme-assisted versions, were determined to maintain the enzyme's maximum activity under its optimum temperature and pH conditions, ensure the device's temperature stability, and minimize the risk of enzyme deactivation caused by thermal fluctuations.

Conventional Extraction (CE)

For the extraction process, ROPP samples were prepared at a 1:20 (g/mL) ratio using 0.1 M citric acid-sodium citrate buffer (pH 5.5), adjusting the final solution pH to 4.5. The samples were incubated in a shaking water bath (Memmert, Schwabach, Germany) at 50°C for 2 hours. After incubation, the samples were cooled to room temperature and subsequently filtered through filter paper. The supernatants were collected after centrifugation at 5000 rpm for 10 minutes at 25°C (Sigma 3K 30, Osterode am Harz, Germany). The extracts were kept into amber-colored bottles and stored at -18°C until analysis.

Enzyme-Assisted Extraction (EAE)

The enzymatic extraction of ROPP was performed using the commercially available Viscozyme® L enzyme. The extraction process

involved preparing ROPP samples at a 1:20 (g/mL) ratio using 0.1 M citric acid-sodium citrate buffer, adjusting the final solution pH to 4.5 (Kaur et al., 2016; Kitryte et al., 2017). Subsequently, 1.0% (w/v) Viscozyme® L enzyme was added to the mixture (Nguyen and Nguyen 2018). To ensure optimal enzyme activity, the extraction temperature was set to 50°C (Kaur et al., 2016; Nguyen and Nguyen 2018). The samples were incubated at 50°C in a magnetic stirrer at 200 rpm for 2 hours. At the end of the extraction period, enzyme inactivation was carried out by placing all samples in a 90°C water bath for 5 minutes (Memmert, Schwabach, Germany), followed by cooling to approximately 25°C (Hefzalrahman et al., 2022). The filtration and centrifugation steps following extraction were performed identically to the conventional extraction method.

*Ultrasound-Assisted Extraction (UAE)***Bath-Type Ultrasound-Assisted Extraction (UAE-B)**

Bath-type ultrasound-assisted extraction was performed using an ultrasonic bath (Isolab, Turkey) with 60 W ultrasonic power and a frequency of 40 kHz (dimensions: $150 \times 138 \times 65$ mm, W $\times$ D $\times$ H). ROPP samples were prepared at a 1:20 (g/mL) solid-to-solvent ratio using 0.1 M citric acid-sodium citrate buffer. The extraction was carried out at 50°C for 30 minutes in the ultrasonic bath. The bath temperature was regularly monitored using a calibrated thermometer, and ice was added when necessary to maintain a stable temperature. The preparation of ROPP and UAE-B extraction is presented in Figure 1. Filtration and centrifugation steps were performed identically to the conventional extraction method.

Probe-Type Ultrasound-Assisted Extraction (UAE-P)

Probe-type ultrasound-assisted extraction was carried out using a Bandelin ultrasonic homogenizer (Sonopuls HD 4200, Berlin, Germany), which consisted of a generator (GM 4200), an ultrasonic transducer (UW 200), an amplifier (SH 200 G), and a titanium probe (TS 109, diameter: 9 mm). ROPP samples were

prepared at a 1:20 (g/mL) solid-to-solvent ratio using 0.1 M citric acid-sodium citrate buffer. The extraction was conducted at a constant 20 kHz ultrasound frequency, with an amplitude of 50% at 50°C for 5 minutes. To maintain a stable extraction temperature, an ice jacket was placed around the double-walled extraction vessel. A

calibrated thermometer was used to monitor the temperature throughout the process, ensuring that it remained within the $50\pm5^\circ\text{C}$ range. Filtration and centrifugation steps were carried out identically to the conventional extraction method.

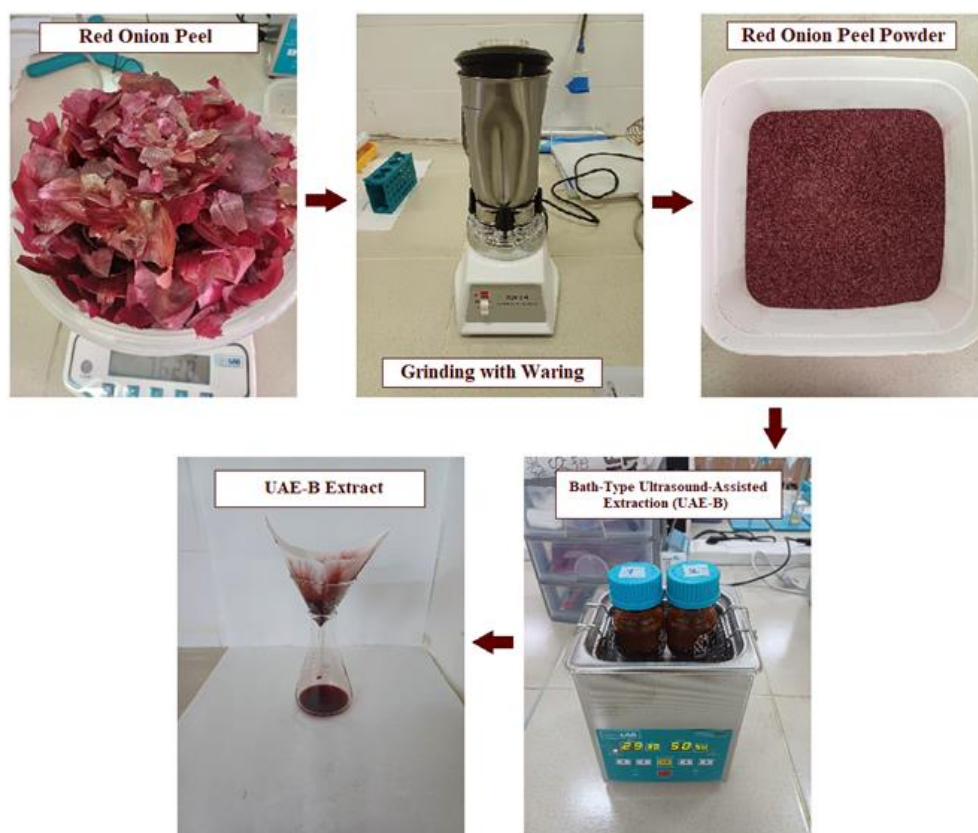


Fig. 1. Preparation of ROPP and UAE-B extraction

Ultrasound-Assisted Enzymatic Extraction (UAEE)
Bath-Type Ultrasound-Assisted Enzymatic Extraction (UAEE-B)
Bath-type ultrasound-assisted enzymatic extraction was performed using the same ultrasonic bath (Sonopuls HD 4200, Berlin, Germany) as described in the bath-type ultrasound-assisted extraction (UAE-B) procedure. ROPP samples were prepared according to the conditions specified for enzyme-assisted extraction (EAE). A 1.0% (w/v) Viscozyme® L enzyme was then added to the mixture. The extraction was conducted at $50\pm2^\circ\text{C}$

for 30 minutes in the ultrasonic bath. The bath temperature was regularly monitored using a calibrated thermometer, and ice was added when necessary to maintain a stable extraction temperature. At the end of the extraction process, all samples were placed in a 90°C water bath for 5 minutes to inactivate the enzyme (Mommert, Schwabach, Germany), followed by cooling to approximately 25°C (Hefzalrahman et al., 2022). Filtration and centrifugation steps were performed identically to the conventional extraction method.

Probe-Type Ultrasound-Assisted Enzymatic Extraction (UAEE-P)

For probe-type ultrasound-assisted enzymatic extraction, ROPP samples were prepared following the conditions specified for enzyme-assisted extraction (EAE). A 1.0% (w/v) Viscozyme® L enzyme was then added to the mixture. The extraction was performed using the same ultrasonic homogenizer and operational settings described for probe-type ultrasound-assisted extraction (UAE-P). The ultrasound application time using the probe-type system was set to 5 minutes, taking into consideration the need to maintain a constant temperature during treatment and to prevent enzyme inactivation. The extraction was conducted at 50% amplitude and $50 \pm 5^\circ\text{C}$ for 5 minutes under continuous ultrasonic treatment. After extraction, samples were subjected to enzyme inactivation by placing them in a 90°C water bath for 5 minutes (Memmert, Schwabach, Germany), followed by cooling to approximately 25°C (Hefzalrahman et al., 2022). Filtration and centrifugation steps were carried out identically to the conventional extraction method.

Parameters evaluated on the extraction

Extraction yield

To calculate the extraction efficiency, the water-soluble part of the extracts was dried in an oven at 50°C until the weight remained constant. The extraction yield was calculated based on the initial amount of dry weight (DW) of the ROPP as follows:

$$\text{Extraction yield (g/100 g DW)} = \frac{\text{Water soluble fraction weight (g)}}{\text{Initial dry weight of ROPP (g)}} \times 100 \quad (1)$$

Extracts Characterization

Total phenolic content was determined using the Folin-Ciocalteu method, following the procedure proposed by Shahidi et al. (2001). The results were expressed as mg gallic acid equivalent (GAE) per g of extract. Total flavonoid content of ROPP was evaluated using the method recommended by Wannes et al., (2010). The results were given as milligrams of catechin equivalent per g of extract. Total monomeric anthocyanin content (TMA) was determined using the pH differential method,

as described by Wrolstad et al. (2005). The results were expressed as mg cyanidin 3-glucoside (C3G) per g of extract. Antioxidant activity was assessed using two different methods. DPPH radical scavenging assay conducted according to the method proposed by Zhang and Hamazu (2004). ABTS radical scavenging assay performed based on the procedure described by Re et al. (1999). The antioxidant activity results were expressed as mmol Trolox equivalent (TE) per g of extract. To account for extraction efficiency, the results were also expressed per unit of dry matter (Syrpas et al., 2021). Total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), and total monomeric anthocyanin content (TMA) were expressed as mg/g dry weight (DW). Antioxidant activity was expressed as $\mu\text{mol TE/g DW}$.

Colour measurement

The colour parameters with CIELAB indices (International Commission on Illumination, Vienna) of ROPP extracts were measured with Minolta CM 3600d spectrophotometer (Konica Minolta Sensing, Inc., Osaka, Japan). L^* (lightness/brightness, 0 = black, 100 = white), a^* (redness/greenness, $a^+ = \text{red}$, $a^- = \text{green}$) and b^* (yellowness/blueness, $b^+ = \text{yellow}$, $b^- = \text{blue}$) colour intensity values were read. The total colour difference (ΔE^*) for anthocyanin extracts compared to the anthocyanin extract from CE was calculated using L^* , a^* and b^* values by means of the following equation:

$$\Delta E^* = [(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2]^{1/2} \quad (2)$$

Where, subscript '0' indicates the values of extracts obtained CE methods. L^* , a^* , and b^* are values of extracts after the other extraction methods.

Identification of anthocyanin by HPLC-DAD

Anthocyanin profile of ROPP was determined by modifying the method suggested by Nour et al. (2013) using reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) instrument (Agilent 1200 system, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The ROPP extracts obtained by CE, EAE, UAE, UAEE-B, and UAEE-P

methods were filtered through a 0.45 μm polyvinylidene fluoride (PVDF) filter and placed in amber vials. Chromatographic separation of anthocyanins was carried out using a C18 RP-column (EC Nucleosil, 150 $\times$ 4.6 mm, 3 μm) column at 40°C and 530 nm with 20 μL sample. Solvent A (acetonitril:water:formic acid, 10:89:1, v/v) and solvent B (acetonitril:water:formic acid, 89:10:1, v/v) used as the mobile phase at 0.5 mL min^{-1} in gradient mode: 0–15 min linear from 3% to 10% solvent B, 15–20 min linear from 10% to 15% solvent B, 20–25 min linear from 15% to 20% solvent B, 25–28 min linear from 20% to 25% solvent B, 28–30 min linear from 25% to 35% solvent B, 30–35 min linear from 35% to 50% solvent B, 35–38 min linear from 50% to 3% solvent B, and 38–40 min isocratic 3% solvent B. Anthocyanins were identified by comparing the retention times of the extracts with those of external standards, and their concentrations were calculated based on calibration curves constructed using these standards, allowing quantification in terms of their own specific equivalents.

Statistical Analysis

The experiments were conducted in independent duplicate, with two parallel analyses for each replicate. The results were expressed as the mean $\pm$ standard error (SE) of the analyses. Comparisons between means were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) with SPSS 27.0 software (SPSS, IBM Corp, USA) Inc., Chicago, IL). Differences between means were analyzed using Duncan's multiple comparison test at a 95% confidence level ($P < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Extraction yields

Anthocyanin recovery from ROPP was investigated using conventional extraction (CE), enzyme-assisted extraction (EAE), ultrasound-assisted extraction (UAE), and their combination, ultrasound-assisted enzymatic extraction (UAEE), to evaluate the efficiency of different techniques in maximizing extraction yield. A comparative view of the effects of six different extraction methods on extraction yields is given in Figure 2.

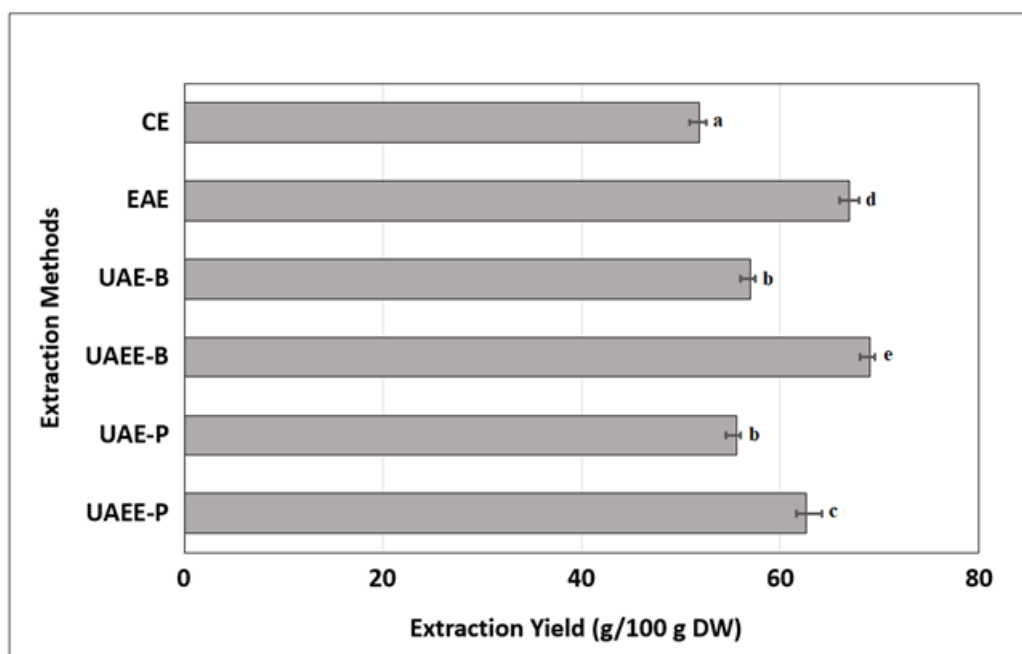


Fig. 2. Comparison of extraction yields obtained from ROPP with different extraction methods. Different superscript letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

Extraction efficiency is influenced by multiple factors, including the chemical composition of the plant matrix, particle size, solvent type and concentration, temperature, and extraction time. Among these, the extraction technique plays a crucial role, as it directly impacts both the yield and quality of the target bioactive compounds (Pagano et al., 2021; Jha and Sit, 2022). The results obtained in this study showed that there were significant differences among the methods used for extraction ($P < 0.05$). It was determined that CE produced the lowest yield (51.87 ± 0.68 g/100 g DW) compared to ultrasound and enzyme-assisted techniques. UAE-B (56.99 ± 0.47 g/100 g DW) and UAE-P (55.57 ± 0.42 g/100 g DW) showed no statistically significant difference in yield ($P > 0.05$), although they demonstrated improved extraction efficiency (approximately 8.50%) compared to CE, but were outperformed by their enzyme-assisted counterparts. The effect of ultrasound is primarily attributed to cavitation phenomena, where the rapid formation and collapse of microscopic bubbles lead to localized shear forces that facilitate the breakdown of cell structures. As a result, this phenomenon enhances the interaction between the solvent and the target compounds, enabling better penetration of the plant matrix by the solvent. During the extraction process, it promotes a more efficient transfer of bioactive compounds from the cellular structure into the solvent, facilitating their release from the matrix into the extraction medium (Chemat and Khan 2011, Vinatoru et al., 2017). UAE-B required 30 minutes to achieve comparable yields, whereas UAE-P reached the same yield in just 5 minutes, which is associated with increased efficiency and reduced energy consumption. This shows a clear advantage of the probe technique in terms of time efficiency and makes it a more practical option for large-scale or time-sensitive extractions.

Among the tested extraction methods, UAEE-B achieved the highest yield (69.05 ± 0.46 g/100 g DW), followed by EAE (66.96 ± 0.97 g/100 g DW) and UAEE-P (62.60 ± 1.54 g/100 g DW), highlighting the effectiveness of enzymatic and ultrasound-assisted techniques in improving extraction efficiency. Notably, under the applied

conditions, the use of Viscozyme L alone resulted in 29.1%, 17.5%, and 20.0% higher extraction yields compared to CE, UAE-B, and UAE-P, respectively. Several studies have confirmed the extraction-enhancing effects of Viscozyme L, a commercially available cellulolytic multi-complex (cocktail) enzyme containing carbohydrases such as arabanase, cellulase, hemicellulase, β -glucanase, xylanase, and pectinase (Kaur et al., 2016). Islam et al. (2023) demonstrated that Viscozyme L hydrolyzes various cell wall and membrane polysaccharides, leading to the effective release of bound and unbound bioactives from plant matrices. Kumar et al. (2019) further supported this, emphasizing that Viscozyme breaks down cell wall polysaccharides, overcomes the physical barrier of phenol-protein-polysaccharide linkages, and facilitates the release of anthocyanins and phenolics. Additionally, Mushtaq et al. (2015) used SEM micrographs to visually confirm that Viscozyme L and other cocktail enzymes degrade the pomegranate peel cell wall, increasing surface area and enhancing the extraction of bound phenolics.

Recent studies have increasingly focused on optimizing extraction techniques by modifying existing methods or integrating multiple approaches, such as enzyme-assisted ultrasound extraction (UAEE), to enhance both efficiency and bioactive compound recovery (Tan et al., 2020; Ma et al., 2024; Meral and Demirdöven, 2024; Patil et al., 2024). In this study, the highest extraction efficiency was achieved using the UAEE-B, which exhibited 9.3% higher efficiency than UAEE-P. The enhanced performance of UAEE-B can be attributed to the synergistic effect of ultrasound and enzymatic treatment, which induces favorable conformational modifications while preserving structural integrity, thereby improving biomolecule extraction, solvent infiltration, and mass transfer (Han et al., 2024). In contrast, the lower efficiency of UAEE-P may be stated by unstable mixing conditions during the process, which can cause localized temperature spikes that negatively impact enzyme activity. Kaur et al. (2016) emphasized that temperature plays a crucial role in disrupting the cell wall and enhancing enzyme

penetration for phenolic release; however, excessive heat can reduce enzymatic activity, leading to suboptimal extraction yields. Moreover, ultrasonic probe extraction involves multiple interacting parameters, such as amplitude, duration, and temperature, while enzymatic extraction is influenced by factors like enzyme concentration, pH, temperature, and solid-liquid ratio. When both techniques were combined, the interaction of numerous variables may have created challenging conditions that adversely affected enzyme stability and activity. In contrast, in this study, UAEE-B is considered to create a more homogeneous and thermally stable environment, which may enhance enzyme efficiency by maintaining controlled temperature conditions and ensuring uniform cavitation distribution.

Phenolic compounds of extracts

The TPC, TFC, TMA, and individual anthocyanin contents of ROPP extracts obtained using different extraction methods are presented in

Table 1. According to Table 1, TPC and TFC amounts of 34.08 mg GAE/g DW and 13.44 mg CE/g DW, respectively, were detected in EAE, while 30.56 mg GAE/g DW of TPC and 11.73 mg CE/g DW of TFC were found in UAE-B. Hammad et al. (2024) optimized the extraction of TPC and TFC components from red onion peel using EAE with the commercial enzyme Viscozyme L and UAE employing an ultrasonic bath system. The TPC and TFC values obtained under these EAE conditions ranged from 23.57 to 41.33 mg GAE/g DW and 13.18 to 21.70 mg quercetin equivalent (QE)/g DW, respectively, which are consistent with the results of our study. However, in UAE higher TPC and TFC values, ranged between 58.93 and 84.02 mg GAE/g DW and 15.94 to 36.24 mg QE/g DW, respectively were obtained. This discrepancy could be attributed to several factors, including using of 80% ethanol as the extraction solvent, the application of higher ultrasonic power, and longer extraction durations.

Table 1. Comparison of the TPC, TFC, TMA and individual anthocyanins of the ROPP extracts obtained different extraction methods

	TPC (mg GAE/g DW)	TFC (mg CE/g DW)	TMA (mg C3G/g DW)	D3R (mg/kg DW)	C3G (mg/kg DW)	C3R (mg/kg DW)	P3G (mg/kg DW)
CE	25.78±0.77 ^a	10.85±0.21 ^b	0.97±0.05 ^a	2.84±0.28 ^{ab}	268.06±4.59 ^a	94.94±1.11 ^a	7.95±0.53 ^a
EAE	34.08±0.77 ^c	13.44±0.14 ^d	1.20±0.02 ^b	4.23±0.03 ^c	345.06±7.73 ^c	116.80±2.55 ^{bc}	10.37±0.42 ^b
UAE-B	30.56±0.52 ^b	11.73±0.01 ^c	1.25±0.02 ^c	3.36±0.05 ^b	316.14±2.93 ^b	123.98±1.05 ^c	10.40±0.24 ^b
UAEE-B	36.26±0.04 ^d	14.39±0.16 ^e	1.36±0.02 ^d	3.30±0.08 ^b	313.19±6.62 ^b	115.51±1.79 ^{bc}	9.37±0.37 ^b
UAE-P	25.51±0.64 ^a	8.37±0.15 ^a	1.19±0.01 ^b	2.54±0.06 ^a	303.21±9.44 ^b	116.64±4.76 ^{bc}	9.15±0.23 ^b
UAEE-P	33.73±0.67 ^c	14.19±0.22 ^c	1.33±0.03 ^d	4.36±0.31 ^c	299.08±10.78 ^b	111.40±3.81 ^b	9.31±0.65 ^b

CE: conventional extraction, EAE: enzyme-assisted extraction, UAE: ultrasound-assisted extraction, and UAEE-B: bath-type ultrasound-assisted enzymatic extraction, UAEE-P: prop-type ultrasound-assisted enzymatic extraction, D3R: delphinidin 3-rutinoside, C3G: cyanidin 3-glucoside, C3R: cyanidin 3-rutinoside, and P3G: peonidin 3-glucoside, different superscript letters in the same column means significant differences among the groups at $P < 0.05$.

The highest TPC was obtained using UAEE-B, which reached 36.26±0.04 mg GAE/g DW and was significantly different from the other methods ($P < 0.05$). Similarly, the highest amounts of TFC and TMA were also detected in UAEE-B and UAEE-P ($P > 0.05$). UAEE-B provided an increase of 40.65% in TPC, 32.63% in TFC, and 40.21% in TMA compared to CE. UAEE-B had 42.14% more TPC and 71.92% more TFC

compared to UAE-P, while it also had 13.33% more TMA compared to EAE. Overall, the combination of EAE and UAE methods demonstrated greater efficiency in component yield for all three groups compared to using either EAE or UAE alone, in addition to providing an advantage over CE. These results highlight the critical role of enzymes in enhancing phenolic extraction and emphasize that their combined use

with ultrasound significantly improves the recovery of bioactive compounds. This combined approach not only enhanced extraction efficiency but also proved to be more effective than the use of each individual method on its own. Similarly, Kumar et al. (2020) reported that Viscozyme L and microwave treatment provided a synergistic advantage, showing that enzyme-assisted microwave extraction (EMAE) was more effective than both EAE and MAE alone in enhancing phenolic extraction and antioxidant activity from pomegranate peel. In line with this, Davidson et al. (2023) investigated the extraction of polyphenols and oil from raspberry pomace using various extraction methods, including control extraction, EAE, UAE, two sequential extraction approaches (UAE → EAE, EAE → UAE) and synergistic approach of US and alkaline protease (UEAE). The findings indicated that the UEAE outperformed the individual extraction methods, yielding a higher recovery of polyphenols. In this context, the use of enzymes alone enhances extraction efficiency by breaking down the cell wall structure and facilitating the release of phenolic compounds. Enzymes hydrolyze polysaccharides and the lignocellulosic matrix in the cell wall, making it easier for phenolic compounds to migrate from inside the cell into the extraction medium (Kumar et al., 2022; Islam et al., 2023). This process removes cellular barriers, allowing solvents to penetrate more effectively and improving the recovery of phenolic compounds (Ribeiro, 2024). On the other hand, ultrasound applications enhance mass transfer and increase solvent-sample interactions by physically disrupting cell walls through the mechanical cavitation effect. Ultrasonic waves generate microjets and shockwaves that break down the cell structure, thereby improving the solubility of phenolic compounds and enhancing extraction efficiency (Chemat and Khan, 2011; Vinatoru et al., 2017). Although each method offers distinct advantages, the combined use of hydrolytic effect of the enzyme and cavitation phenomenon of ultrasound (US) facilitates both the chemical and mechanical disruption of cellular structures while also improving solvent penetration, leading to a higher extraction yield of phenolic compounds.

Anthocyanins are a key characteristic of red onion varieties, giving them their distinct red/purple colour. These compounds are predominantly found in the skin and outer fleshy layers, while in the edible portion, they are restricted to a single layer of epidermal cells (Celano et al., 2021). In this study, the main identified anthocyanins using different extraction methods were D3R, C3G, C3R, and P3G. C3G has been identified as the predominant anthocyanin of ROPP (Table 1). Celano et al. (2021) emphasized that cyanidin is the predominant anthocyanin in red onion and identified three cyanidin derivatives (cyanidin 3-laminaribioside, cyanidin 3-malonilglucoside, cyanidin 3-malonillaminaribioside) in two different red onion varieties using UHPLC-HRMS/MS. Similarly, Chadorshabi et al. (2022) reported that cyaniding 3-glucoside is the major anthocyanin in onion peel, with anthocyanin concentrations ranging from 10.04 to 233 mg/100 g. In addition, Gorrepati et al. (2024) identified 34 anthocyanins in the acidified methanol extract of onion skin using LC-MS [UHPLC-Orbitrap MS], including 10 cyanidin, 10 delphinidin, 4 peonidin, 4 petunidin, 3 pelargonidin, and 2 malvidin derivatives and stated that cyanidin-3-(6-malonylglucoside), delphinidin, and delphinidin-3-galactoside were the predominant pigment in dark red variety.

The results in Table 1 demonstrated that the CE method was not effective enough to extract individual anthocyanins compared to other extraction methods, providing statistically significantly lower anthocyanin content of up to 23.6% ($P < 0.05$), indicating its lower efficiency in anthocyanin recovery. The insufficient efficiency of the CE can be attributed to oxidative degradation due to longer extraction times and the thermal and pH instability of anthocyanins, which makes them more susceptible to degradation (Celano et al., 2021). Additionally, the use of citrate buffer alongside solvents such as ethanol and methanol in CE may have also contributed to the lower extraction yields (Kitryte et al., 2017). When examining the concentrations of individual anthocyanins in ROPP extracts, contrary to the results obtained for TMA, the synergistic methods did not exhibit significant

advantages, particularly for C3R and P3G ($P > 0.05$). Notably, the EAE method was statistically superior for C3G, while EAE and UAEE-P methods demonstrated a statistically significant advantage over other methods for D3R ($P < 0.05$). Differences in interactions between extraction methods and individual anthocyanins can be attributed to two factors: one is the improved efficiency of Viscozyme-based EAE extraction, in particular, by targeting the structural integrity of the plant cell wall (Kumar et al., 2022). The synergistic effect of enzymes such as cellulase, xylanase, and β -glucanase facilitates the hydrolysis of cellulose and hemicellulose, effectively degrades the cell wall matrix, and increases the accessibility of intracellular anthocyanins. This enzymatic degradation, combined with optimal enzyme concentration and temperature, promotes the release of bound water molecules and hydrophilic anthocyanins, thereby improving extraction efficiency (Kumar et al., 2022). And the other can be the differences in the chemical structure, stability, and extraction sensitivity of anthocyanins and the intracellular localization of these compounds.

Antioxidant activity of extracts

The antioxidant activity values obtained by ABTS and DPPH of ROPP extracts for the extraction

methods are presented in Figure 3. The lowest AA-ABTS value ($94.85 \pm 0.28 \mu\text{mol TE/g DW}$) was obtained using UAE-P for ROPP extract. The extracts obtained through the CE and UAE-B showed values of 123.67 ± 3.00 and $122.20 \pm 1.05 \mu\text{mol TE/g DW}$, respectively, with no statistically significant difference ($P > 0.05$). The highest AA-ABTS value ($199.35 \pm 1.13 \mu\text{mol TE/g DW}$) was achieved using the EAE method. This was followed by UAEE-B ($172.71 \pm 9.87 \mu\text{mol TE/g DW}$) and UAEE-P ($164.30 \pm 2.42 \mu\text{mol TE/g DW}$), where enzymatic treatment was combined with ultrasonic bath and probe, respectively. The lowest AA-DPPH value ($64.14 \pm 1.29 \mu\text{mol TE/g DW}$) was obtained using the CE for ROPP extract. This was followed by the UAE-B and UAE-P methods, with values of 71.19 ± 0.29 and $71.09 \pm 1.30 \mu\text{mol TE/g DW}$, respectively. The UAEE-P method yielded a higher value ($85.51 \pm 0.30 \mu\text{mol TE/g DW}$), while the highest AA-DPPH values were obtained using the EAE and UAEE-B methods, with values of 91.16 ± 0.99 and $93.20 \pm 0.78 \mu\text{mol TE/g DW}$, respectively. There was no statistically significant difference between the EAE and UAEE-B methods ($P > 0.05$).

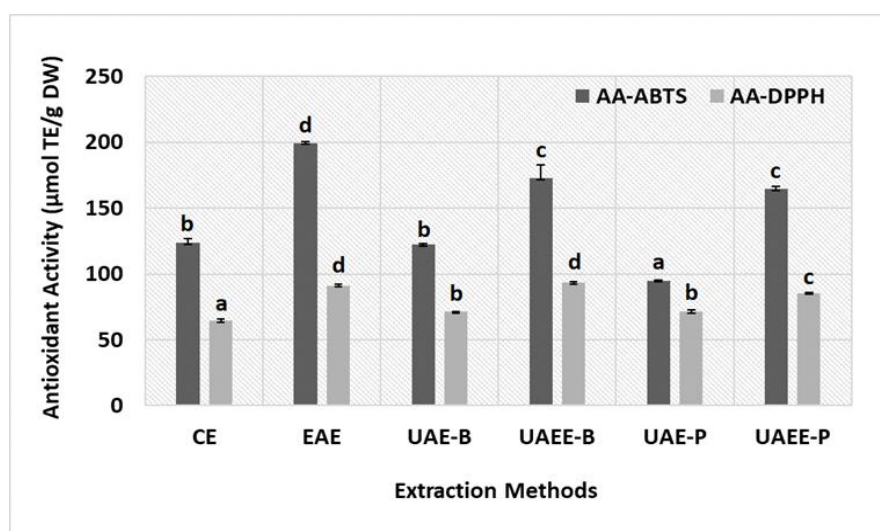


Fig. 3. CE: conventional extraction, EAE: enzyme-assisted extraction, UAE: ultrasound-assisted extraction, and UAEE-B: bath-type ultrasound-assisted enzymatic extraction, UAEE-P: prop-type ultrasound-assisted enzymatic extraction, different superscript letters indicate significant differences among the groups ($P < 0.05$).

As seen in Figure 3, the antioxidant activity obtained using the ABTS radical is higher than the values obtained with the DPPH radical for all methods. Since using a single method for antioxidant activity assessment is not scientifically recommended due to the complex composition of plant samples, the electron transfer-based DPPH and ABTS decolorization assays are among the most frequently employed methods to determine the antioxidant capacity of plant extracts (Islam et al., 2023). ABTS is effective in measuring the antioxidant activity of both water-soluble (hydrophilic) and fat-soluble (lipophilic) compounds, making it a versatile method. In contrast, DPPH is more specific to lipophilic antioxidants and is predominantly used in organic solvent-based systems (Santos et al., 2022). Similarly, in a study conducted by Santos et al. (2022), the radical scavenging capacity (%) obtained with ABTS was higher than that obtained with DPPH, which was attributed to the lower presence of lipophilic compounds in purple onion peel extracts.

The results of this study state that the CE has a limited effect on antioxidant capacity. The lower yield of TPC, TFC, and TMA obtained with CE compared to other techniques suggests that this method is ineffective in efficiently transferring bioactive compounds into the solvent. This limitation may be attributed to the degradation of heat-sensitive compounds and the fact that the extraction efficiency of CE is restricted by solvent diffusion. Ultrasound-assisted methods, particularly UAE-B and UAE-P, provided up to 11% higher antioxidant activity in the DPPH assay compared to CE. However, ultrasound alone resulted in lower antioxidant activity than enzyme-assisted methods. A comparable trend was observed in the study conducted by Hammad et al. (2024), where EAE of purple onion peel extracts yielded higher antioxidant activity than ultrasound-assisted extracts. This finding suggests that enzymes enhance the release of phenolic compounds by breaking down polysaccharide and protein structures in the cell wall, thereby improving their extraction efficiency. One of the most striking findings is that the highest ABTS value was obtained using the EAE method,

whereas the highest DPPH values were observed for both UAE-B and EAE. This result suggests that commercially available enzyme applications may play a selective role in extracting different antioxidant compounds including water and methanol-soluble antioxidative phenolics and exhibit varying effects depending on the radical type being assessed (Kaur et al., 2016). Additionally, antioxidant activity values determined by DPPH were found to be higher in enzyme-assisted extraction methods compared to those without enzymatic treatment. This may be attributed to the fact that DPPH is a sterically hindered radical, and its reactivity is influenced by molecular accessibility. Browning products or intermediate reaction compounds may react more rapidly with DPPH than larger, bulkier antioxidant molecules, potentially leading to higher measured antioxidant activity (Buyuktuncel, 2013).

Colour measurements of extracts

The different extraction methods have varying effects on the L^* , a^* , and b^* colour parameters of the extracts, as shown in Table 2. Similarly, the values of L^* , a^* , b^* were significantly affected by different extraction methods, which was following the previous studies on carotenoids from lemon peels (Meral and Demirdöven, 2024) and anthocyanins from blue pea flower (Gamage and Choo, 2023). In terms of colour parameters, the extracts obtained using EAE, UAE-B, and UAE-P exhibited similar behavior. These extracts were observed to have a lighter colour, a more intense red colour, and higher yellow values. There is no statistically significant difference among all colour parameters between the CE and UAE-B processes ($P > 0.05$). However, the UAE-P extract was found to have a more yellowish colour compared to these methods. This situation can be associated with the negative impact on enzyme activity due to greater temperature variation during extraction. Additionally, Tiwari et al. (2010) show that higher amplitude levels and treatment times have adverse effects on the anthocyanin content of grape juice. In this study, even though there is no increase in amplitude levels, the localized high temperature and pressure, depending on the sample-to-solvent

ratio, are thought to cause anthocyanin degradation.

Table 2. The colour coordinates and change of anthocyanin extracts of ROPP obtained from various extraction methods

	L*	a*	b*	ΔE^*
CE	9.34 $\pm$ 0.10 ^a	31.00 $\pm$ 0.26 ^a	11.20 $\pm$ 0.18 ^a	0.00 $\pm$ 0.00 ^a
EAE	10.20 $\pm$ 0.11 ^b	33.03 $\pm$ 0.26 ^b	12.82 $\pm$ 0.18 ^{bc}	2.73 $\pm$ 0.67 ^{bc}
UAE-B	8.90 $\pm$ 0.05 ^a	30.06 $\pm$ 0.10 ^a	10.46 $\pm$ 0.08 ^a	1.28 $\pm$ 0.19 ^{ab}
UAEE-B	10.03 $\pm$ 0.19 ^b	32.62 $\pm$ 0.44 ^b	12.48 $\pm$ 0.33 ^b	2.17 $\pm$ 0.91 ^{bc}
UAE-P	10.58 $\pm$ 0.42 ^b	33.60 $\pm$ 0.98 ^b	13.59 $\pm$ 0.66 ^{cd}	3.74 $\pm$ 0.91 ^c
UAEE-P	8.69 $\pm$ 0.18 ^a	30.26 $\pm$ 0.38 ^a	14.30 $\pm$ 0.22 ^d	3.48 $\pm$ 0.24 ^c

Different superscript letters in the same column means significant differences among the groups at $P < 0.05$.

Regarding the parameter ΔE^* , while greater changes were observed in extracts obtained from UAE-P, smaller changes of ΔE^* were obtained for UAE-B. Santos et al. (2022) associated the ΔE^* in anthocyanin-rich extracts with the thermosensitive behavior of anthocyanins, noting that high temperatures modulate these compounds, leading to yellowish or brown colour indicative of pigment degradation. Moreover, Patras (2019) attributed higher ΔE^* values primarily to variations in the red component (Δa^*), with a lesser influence from lightness (ΔL^*) and an even smaller impact from changes in the blue component (Δb^*). Additionally, the observed colour shifts in the presence of different compounds were associated with factors such as pH influence, tautomeric form interconversion, copigmentation effects, anthocyanin polymerization, and browning. Colour differences are considered very distinct when ΔE^* is more than 3, distinct when ΔE^* is between 3 and 1.5, and a small difference when ΔE^* is less than 1.5 (Gamage and Choo, 2023). Accordingly, UAE-P and UAEE-P extracts had very distinct colour difference compared to the CE. This situation is consistent with the decrease in L^* , a^* , and b^* values and the possible anthocyanin degradation. On the other hand, the UAEE-B extract, having the highest bioactive compound content, shows a ΔE^* of 2.17, which falls within the moderate range of colour difference. Given that anthocyanins are responsible for the characteristic red/purple colour of red onion varieties (Celano et al., 2021), this moderate ΔE^*

value can be considered a favorable outcome, as it indicates that colour alterations due to polymerization and degradation are relatively limited, thereby preserving the extract's chemical stability, visual characteristics and potentially maintaining its functional properties. This situation indicates that the extract's anthocyanin content, colour, and stability index support its potential application in various bio-industries, such as the pharmaceutical, cosmetic, and food sectors (Santos et al., 2022).

CONCLUSION

This study highlights the potential of green extraction techniques for the efficient recovery of anthocyanins from red onion peel, a significant food industry waste. For this purpose, traditional extraction methods were compared with enzyme-assisted, ultrasound-assisted and combined techniques (ultrasound and enzyme), evaluating extraction yield and the characteristic properties of the obtained extract. The results indicate that these environmentally friendly approaches can enhance extraction efficiency and extract characteristics while preserving the structural integrity and bioactivity of anthocyanins compared to conventional extraction. The use of a complex enzyme mixture, such as Viscozyme, in the extraction process facilitated the disruption of red onion peel cell wall integrity. As a result, enzyme-assisted and combined methods provided a significant advantage over ultrasound-only techniques in terms of both extraction yield and bioactive compound concentration. Similarly,

in terms of antioxidant activity, the use of a single enzyme and the combined application of enzymes with ultrasound demonstrated a significant advantage. Although the extraction methods had different effects on individual anthocyanins, the total monomeric anthocyanin content in the combined methods, including both UAEE-B and UAEE-P, was found to be statistically different from the other methods. When the colour change values calculated according to the traditional method, which are an indicator of the stability of anthocyanins in the extract, were compared, it was found that UAEE-B was more advantageous than UAEE-P. Finally, when comparing the application time, it should not be overlooked that the procedure carried out with the UAEE-P takes 5 minutes and the procedure carried out with the UAEE-B takes 30 minutes. In conclusion, this study has demonstrated that the combined application of enzymes and ultrasound offers significant advantages in anthocyanin recovery from red onion skins, particularly in preserving production quality. Additionally, future research should focus on optimizing the factors influencing these combined methods to develop more specific and sustainable extraction techniques specifically suited for ROPP while also assessing their economic feasibility. This approach would enable the environmentally friendly and cost-effective production of anthocyanin extracts from ROPP, facilitating their use in the food, pharmaceutical, and other industries both as functional ingredients and natural colorants.

In addition, it was observed that integrated extraction processes involving ultrasound application and enzyme addition yielded higher results in only 30 and 5 minutes, respectively, compared to the conventional method, which required 2 hours at 50°C. This highlights the time-saving advantage of these “green” extraction techniques. However, in order to determine whether these methods are truly more sustainable and economically viable, analyses on carbon footprint and cost are needed. For these methods to present a viable alternative at an industrial scale, comprehensive evaluations must be conducted,

taking into account equipment requirements, energy consumption, and enzyme costs.

FUNDING: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

DATA AVAILABILITY: The authors declare that the data supporting the findings of this study are available within the article files and, if necessary, the data files can be presented by the corresponding author.

DECLARATIONS: The author declares no competing interests.

REFERENCES

- Bains, A., Sridhar, K., Singh, B. N., Kuhad, R. C., Chawla, P., Sharma, M. (2023). Valorization of onion peel waste: From trash to treasure. *Chemosphere*, 343: 140178, doi: 10.1016/j.chemosphere.2023.140178.
- Benito-Román, Ó., Blanco, B., Sanz, M. T., Beltrán, S. (2021). Freeze-dried extract from onion (*Allium cepa* cv. Horcal) skin wastes: Extraction intensification and flavonoids identification. *Food and Bioprocess Processing*, 130: 92-105, doi: 10.1016/j.fbp.2021.09.005.
- Buyuktuncel, E. (2013). Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 17(2): 93-103, doi: 10.12991/201317377.
- Celano, R., Docimo, T., Piccinelli, A. L., Gazzerri, P., Tucci, M., Di Sanzo, R., Rastrelli, L. (2021). Onion peel: Turning a food waste into a resource. *Antioxidants*, 10(2): 304, doi: 10.3390/antiox10020304.
- Chadorshabi, S., Hallaj-Nezhadi, S., Ghasempour, Z. (2022). Red onion skin active ingredients, extraction and biological properties for functional food applications. *Food Chemistry*, 386: 132737, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.132737.
- Chemat, F., Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics*

- Sonochemistry*, 18(4): 813-835, doi: 10.1016/j.ultsonch.2010.11.023.
- Davidson, M., Louvet, F., Meudec, E., Landolt, C., Grenier, K., Périno, S., ..., Saad, N. (2023). Optimized single-step recovery of lipophilic and hydrophilic compounds from raspberry, strawberry and blackberry pomaces using a simultaneous ultrasound-enzyme-assisted extraction (UEAE). *Antioxidants*, 12(10): 1793, doi: 10.3390/antiox12101793.
- Ersoy, Ş. K., Tütem, E., Başkan, K. S., Apak, R. (2020). Valorization of red onion peels for quercetin recovery using quercetin-imprinted polymer. *Journal of Chromatographic Science*, 58(2): 163-170, doi.org/10.1093/chromsci/bmz079.
- Gamage, G. C. V., Choo, W. S. (2023). Hot water extraction, ultrasound, microwave and pectinase-assisted extraction of anthocyanins from blue pea flower. *Food Chemistry Advances*, 2: 100209, doi.org/10.1016/j.focha.2023.100209.
- Gorrepati, K., Kumar, A., Ahammed Shabeer, T. P., Khan, Z., Satpute, P., Anandhan, S., ..., Singh, M. (2024). Characterization and evaluation of antioxidant potential of onion peel extract of eight differentially pigmented short-day onion (*Allium cepa* L.) varieties. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 8: 1469635, doi: 10.3389/fsufs.2024.1469635.
- Hammad, K. S., Hefzalrahman, T., Morsi, M. K., Morsy, N. F., Abd El-Salam, E. A. (2024). Optimization of ultrasound-and enzymatic-assisted extractions of polyphenols from dried red onion peels and evaluation of their antioxidant activities. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 54(2): 247-259, doi.org/10.1080/10826068.2023.2225086.
- Han, K. N., Meral, H., Demirdöven, A. (2024). Recovery of carotenoids as bioactive compounds from peach pomace by an eco-friendly ultrasound-assisted enzymatic extraction. *Journal of Food Science and Technology*, 61(12): 2354-2366, doi.org/10.1007/s13197-024-06001-4.
- Hefzalrahman, T., Morsi, M. K., Morsy, N. F., Hammad, K. S. (2022). Application of enzyme and ultrasound assisted extraction of polyphenols from avocado (*Persea americana* Mill.) peel as natural antioxidants. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 21(2): 129-138, doi.org/10.17306/J.AFS.2022.0980.
- Islam, M. R., Kamal, M., Kabir, M. R., Hasan, M., Haque, A. R., Hasan, S. M. K. (2023). Phenolic compounds and antioxidants activity of banana peel extracts: testing and optimization of enzyme-assisted conditions. *Measurement: Food*, 10: 100085, doi: 10.1016/j.meafao.2023.100085.
- Jha, A. K., Sit, N. (2022). Extraction of bioactive compounds from plant materials using combination of various novel methods: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 119: 579-591, doi: 10.1016/j.tifs.2021.11.019.
- Jin, E. Y., Lim, S., Kim, S. O., Park, Y. S., Jang, J. K., Chung, M. S., Choi, Y. J. (2011). Optimization of various extraction methods for quercetin from onion skin using response surface methodology. *Food Science and Biotechnology*, 20: 1727-1733, doi: 10.1007/s10068-011-0238-8.
- Kaur, C., Rudraa, S. G., Sahac, S., Vargheseb, E., Nagala, S. (2016). Increasing anthocyanin content in black carrot juice by an enzyme assisted process: Optimization using response surface methodology. *Nutrafoods*, 15: 59-67, doi: 10.17470/NF-016-1021-1.
- Kitryte, V., Kraujalienė, V., Šulniūtė, V., Pukalskas, A., Venskutonis, P. R. (2017). Chokeberry pomace valorization into food ingredients by enzyme-assisted extraction: Process optimization and product characterization. *Food and Bioprocess Technology*, 105: 36-50, doi: 10.1016/j.fbp.2017.06.001.
- Kumar, M., Barbhai, M. D., Hasan, M., Punia, S., Dhumal, S., Rais, N., Mekhemar, M. (2022). Onion (*Allium cepa* L.) peels: A review on bioactive compounds and biomedical activities. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 146: 112498, doi: 10.1016/j.biopha.2021.112498.
- Kumar, M., Dahuja, A., Sachdev, A., Kaur, C., Varghese, E., Saha, S., Sairam, K. V. S. S. (2019). Evaluation of enzyme and microwave-assisted conditions on extraction of anthocyanins and total phenolics from black soybean (*Glycine max* L.) seed coat. *International Journal of Biological*

- Macromolecules*, 135: 1070-1081, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.06.034.
- Kumar, M., Tomar, M., Punia, S., Amarowicz, R., Kaur, C. (2020). Evaluation of cellulolytic enzyme-assisted microwave extraction of Punica granatum peel phenolics and antioxidant activity. *Plant Foods for Human Nutrition*, 75: 614-620, doi: 10.1007/s11130-020-00859-3.
- Lipşa, F. D., Stoica, F., Raţu, R. N., Veleşcu, I. D., Cârlescu, P. M., Motrescu, I., Râpeanu, G. (2024). Red onion peel powder as a functional ingredient for manufacturing ricotta cheese. *Foods*, 13(2): 182, doi: 10.3390/foods13020182.
- Ma, N. B., Ton, N. M. N., Le, N. L. (2024). Co-optimization of polysaccharides and polyphenols extraction from mangosteen peels using ultrasound-microwave assisted extraction (UMAE) and enzyme-ultrasound assisted extraction (EUAE) and their characterization. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 18(8): 6379-6393, doi: 10.1007/s11694-024-02656-x.
- Meral, H., Demirdöven, A. (2024). Green extraction of carotenoids from lemon peels. *GIDA*, 49(3): 580-593, doi: 10.15237/gida.GD24039.
- Mirzazadeh, N., Bagheri, H., Mirzazadeh, M., Soleimanimehr, S., Rasi, F., Akhavan-Mahdavi, S. (2024). Comparison of different green extraction methods used for the extraction of anthocyanin from red onion skin. *Food Science & Nutrition*, 12(10): 7347-7357, doi: 10.1002/fsn3.4354.
- Mushtaq, M., Sultana, B., Anwar, F., Adnan, A., Rizvi, S. S. (2015). Enzyme-assisted supercritical fluid extraction of phenolic antioxidants from pomegranate peel. *The Journal of Supercritical Fluids*, 104: 122-131, doi: 10.1016/j.supflu.2015.05.020.
- Nguyen, C. L., Nguyen, H. V. (2018). The quality of mulberry juice as affected by enzyme treatments. *Beverages*, 4(2): 41, doi: 10.3390/beverages4020041.
- Nour, V., Stampar, F., Veberic, R., Jakopic, J. (2013). Anthocyanins profile, total phenolics and antioxidant activity of black currant ethanolic extracts as influenced by genotype and ethanol concentration. *Food Chemistry*, 141(2): 961-966, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.03.105.
- Pagano, I., Campone, L., Celano, R., Piccinelli, A. L., Rastrelli, L. (2021). Green non-conventional techniques for the extraction of polyphenols from agricultural food by-products: A review. *Journal of Chromatography A*, 1651: 462295, doi: 10.1016/j.chroma.2021.462295.
- Patil, N., Yadav, P., Gogate, P. R. (2024). Ultrasound assisted intensified enzymatic extraction of total phenolic compounds from pomegranate peels. *Separation and Purification Technology*, 350: 127967, doi: 10.1016/j.seppur.2024.127967.
- Patras, A. (2019). Stability and colour evaluation of red cabbage waste hydroethanolic extract in presence of different food additives or ingredients. *Food Chemistry*, 275: 539-548, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.09.100.
- 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.
- Ribeiro, B. D., Ferreira, R. D. M., Coelho, L. A. B., Barreto, D. W. (2024). Production of anthocyanin-rich red rose petal extract by enzymatic maceration. *Biomass*, 4(2): 429-441, doi: 10.3390/biomass4020021.
- Samota, M. K., Sharma, M., Kaur, K., Sarita, Yadav, D. K., Pandey, A. K., ..., Rani, H. (2022). Onion anthocyanins: Extraction, stability, bioavailability, dietary effect, and health implications. *Frontiers in Nutrition*, 9: 917617, doi: 10.3389/fnut.2022.917617.
- Santos, L. G., Martins, V. G. (2022). Recovery of phenolic compounds from purple onion peel using bio-based solvents: Thermal degradation kinetics and color stability of anthocyanins. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(12): e17161, doi: 10.1111/jfpp.17161.
- Shahidi, F., Chavan, U. D., Naczki, M., Amarowicz, R. (2001). Nutrient distribution and phenolic antioxidants in air-classified fractions of

- beach pea (*Lathyrus maritimus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2): 926-933, doi: 10.1021/jf0005317.
- Syrpas, M., Valanciene, E., Augustiniene, E., Malys, N. (2021). Valorization of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) pomace by enzyme-assisted extraction: Process optimization and comparison with conventional solid-liquid extraction. *Antioxidants*, 10(5): 773, doi: 10.3390/antiox10050773.
- Tan, J., Li, Q., Xue, H., Tang, J. (2020). Ultrasound-assisted enzymatic extraction of anthocyanins from grape skins: Optimization, identification, and antitumor activity. *Journal of Food Science*, 85(11): 3731-3744, doi: 10.1111/1750-3841.15497.
- Tiwari, B. K., Patras, A., Brunton, N., Cullen, P. J., O'Donnell, C. P. (2010). Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(3): 598-604, doi: 10.1016/j.ultsonch.2009.10.009.
- Vinatoru, M., Mason, T., Calinescu, I. (2017). Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 97: 159-178, doi: 10.1016/j.trac.2017.09.002.
- Wannes, W. A., Mhamdi, B., Sriti, J., Jemia, M. B., Ouchikh, O., Hamdaoui, G., Kchouk, M. E., Marzouk, B. (2010). Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and Chemical Toxicology*, 48(5): 1362-1370, doi: 10.1016/j.fct.2010.03.002.
- Wrolstad, R. E., Durst, R. W., Lee, J. (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science & Technology*, 16(9): 423-428, doi: 10.1016/j.tifs.2005.03.019.
- Zhang, D., Hamauzu, Y. (2004). Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. *Food Chemistry*, 88: 503-509, doi: 10.1016/j.foodchem.2004.01.065.

INVESTIGATION OF THERMAL OXIDATION OF COLD PRESSED POPPY (*Papaver somniferum* L.) SEED OIL WITH SOME EDIBLE OILS

Kamil ÇELEBİ*

Yalova University, Armutlu Vocational School Food Processing Department, Yalova Türkiye

Received /Geliş: 01.03.2025; Accepted /Kabul: 05.05.2025; Published online/Online baskı: 13.05.2025

Çelebi, K. (2025). Investigation of thermal oxidation of cold pressed poppy (*Papaver somniferum* L.) seed oil with some edible oils. GIDA (2025) 50 (3) 406-414 doi: 10.15237/ gida.GD25036

Çelebi, K. (2025). Soğuk preslenmiş haşhaş (*Papaver somniferum* L.) tohumu yağının bazı ticari yağlarla birlikte termal oksidasyonunun araştırılması. GIDA (2025) 50 (3) 406-414 doi: 10.15237/ gida.GD25036

ABSTRACT

The thermal oxidative stability of poppy seed oil (PSO) and refined corn oil (CO), hazelnut oil (HO), walnut oil (WO) were examined. The samples were heated 12 times at 180°C for 5 minutes. The change in total polar matter amount (TPM) and antioxidative capacity level (DPPH), along with some parameters indicating the degree of oxidation, were examined during the study. A significant increase was observed in free fatty acid (FFA), peroxide value (PV), p-Anisidine value (p-AV), conjugated diene (CD), conjugated triene (CT) and TPM of the samples with the applied heating processes ($P<0.05$). However, antioxidative capacity levels decreased significantly ($P<0.05$). Generally, according to initial values, changes in p-AV (66.89), TPM (16.17%) and antioxidative capacity level (46.08%) were observed to be lower in PSO than in other oils. This may be related to the phenolics and tocopherol content. The study was concluded that poppy seed oil could be alternative edible oil.

Keywords: Vegetable oils, antioxidative capacity, hazelnut, walnut

SOĞUK PRESLENMİŞ HAŞHAŞ (*Papaver somniferum* L.) TOHUMU YAĞININ BAZI TİCARİ YAĞLARLA BİRLİKTE TERMAL OKSİDASYONUNUN ARAŞTIRILMASI

ÖZ

Bu çalışmada, haşhaş tohumu yağı (PSO), rafine mısır yağı (CO), fındık yağı (HO) ve ceviz yağı (WO)'nın termal oksidatif stabilitesi incelendi. Yağ örnekleri 180°C'de, 5 dakika boyunca, 12 kez ısıtıldı. Çalışma sırasında, toplam polar madde miktarı (TPM) ve antioksidan aktivite kapasitesindeki (DPPH) değişim, oksidasyon derecesini gösteren diğer parametreler ile birlikte incelendi. Uygulanan ısıtma işlemleri ile birlikte yağ örneklerinin serbest yağ asidi içeriği (FFA), peroksit değeri (PV), p-Anisidin değeri (p-AV), TPM, konjuge dien (CD) ve konjuge trien (CT) değerlerinde önemli bir artış gözlemlendi ($P<0.05$). Bunun yanında, antioksidan aktivite kapasiteleri ise önemli oranda azaldı ($P<0.05$). Genellikle, başlangıç değerlerine göre, PSO örneklerinde p-AV (66.89), TPM (%16.17) ve antioksidan aktivite kapasitesinde (%46.08) ortaya çıkan değişim diğer yağlara göre daha düşüktü. Bu durum fenolik maddeler ve tokoferol içeriği ile ilişkili olabilir. Çalışma sonunda, soğuk preslenmiş haşhaş tohumu yağının alternatif yemelik bir yağ olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Bitkisel yağlar, antioksidan kapasite, fındık, ceviz

*Corresponding author / Sorumlu yazar

✉: kamilcelebi03@gmail.com

☎: (+90) 226 815 5457

Kamil Çelebi; ORCID no: 0000-0002-1944-1207

INTRODUCTION

The poppy (*Papaver somniferum* L.) plant, which belongs to the *Papaveraceae* family, is grown for its capsules and seeds. The plant is mostly cultivated worldwide in countries such as Türkiye, the Czech Republic and Spain (Dabrowski et al., 2020; Şengün et al., 2020). Although the main purpose of poppy cultivation is opium production, edible oil is obtained from its seeds of different colors such as yellow, white and blue (Ghafoor et al., 2019). Poppy seeds generally have an oil content ranging from 28% to 53%, depending on environmental factors (Dabrowski et al., 2020). The main purpose of the oil obtained is to be edible, but it is also widely used in the production of paint, varnish, and soap (Özbek and Ergönül, 2020). The oil consumed for edibles is obtained by cold pressing without refining (Bozan and Temelli, 2003). In this way, it preserves its characteristic taste, special aroma and intense color. Naturally, it is more preferred by consumers (Çakaloğlu et al., 2018). In addition, in terms of nutritional value, cold pressed oils are superior to refined oils (Ayyıldız et al., 2021). Poppy seed oil is very important in nutrition with its polyunsaturated fatty acid profile. Linoleic acid is the dominant fatty acid in its structure, and its ratio varies between 53-74%. This is followed by oleic acid (13-24%) and palmitic acid (8-19%). It contains less stearic acid and linolenic acid (1-2%) (Dabrowski et al., 2020).

Although vegetable oils are vital in human nutrition, they are foodstuffs that can easily undergo oxidation. The biggest factors in oxidation are oxygen, heat, light, enzymes and metals. Oils are especially exposed to high temperatures during the frying process. This causes many reactions, such as oxidation, conjugation and polymerization. The main factor in these reactions is unsaturated fatty acids (Çelebi et al., 2021). As a result of these reactions, compounds such as aldehydes and ketones are released, and the taste, smell and nutritional quality of the oils change. There is a close relationship between the fatty acid composition of vegetable oils and the number of double bonds in their chemical structures with oxidation. In addition, free fatty acids released as a result of

hydrolysis are another factor that negatively affects sensory quality (Yanishlieva and Marinova, 2001).

In this study, the stability of poppy seed oil against oxidation at high temperatures was examined. The same temperature level was applied to refined corn, hazelnut and walnut oil. Other studies have focused mostly on the fatty acid composition and bioactive compounds of oils obtained from poppy seeds of different varieties. In short, investigation of poppy seed oil with different edible oil varieties is quite limited in the literature. This study aims to make poppy seed oil, which is consumed locally and in limited quantities, an alternative commercial option and to increase its consumption rate.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Yellow poppy seeds were used in this study. Seeds harvested in July 2023 were obtained from a local farmer (Şuhut, Afyonkarahisar, Türkiye). Oil extraction was carried out by pressing method (Omabeta, Mirandalong-EU) without applying heat treatment and the oil temperature was 25°C. The oil obtained was filtered, and no refining process was used. Corn, hazelnut and walnut oil were obtained from the local market. The batch numbers of the oils were the same and they were all produced and packaged in 2023. The oils were refined and contained no additives. p-Anisidine and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) used in the analyses were obtained from Sigma (St. Louis, MO). Acetic acid (glacial), diethyl ether, ethanol (96% v/v), ethyl acetate, phenolphthalein, n-hexane, isooctane, chloroform, methanol, potassium hydroxide, potassium iodide and starch were obtained from Isolab (Germany).

Sample preparation and thermal oxidation of oils

The thermal oxidation method was selected based on similar studies in the literature. For this purpose, 2 liters of oil samples were filled into a fryer (Tefal, Uno M, Rumilly, France) and heated at 180°C for 5 minutes. After each heating, the sample was cooled to room temperature and the next heating was started after waiting for

approximately 1 hour. This process was repeated 12 times for each sample. Analyses were performed after every 4 heating periods. All heat treatments were carried out in triplicate ($n=3$).

Determination of fatty acids composition

For fatty acid composition, samples were converted to fatty acid methyl esters using the ISO 5509 (1978) method. After the esterification process, analysis was performed with an Agilent 6890N Gas Chromatograph (GC) equipped with a flame ionization detector (FID) and HP-88 column (i.d. = 0.25 mm, length = 60 m, film thickness = 0.2 μ m, California, United States). The injector and FID temperatures were set at 270°C and 290°C, respectively. The oven temperature was kept at 165°C for 30 minutes, then increased by 10°C per minute and held at 190°C for 20 minutes. Helium (16.4 psi) was used as the carrier gas. Injection volume, split flow and split ratio are 0.2 μ L, 0.4 mL/min, and 1/70, respectively. At the end of the analysis, fatty acid ratios were determined as percentages.

Determination of free fatty acid content (FFA) and peroxide value (PV)

FFA content (%) and PV value (meq O₂/kg oil) of oil samples were determined using IUPAC (1987) and AOCS Cd8b-90 (1997) methods, respectively. All analyses were performed in triplicate ($n=3$).

Determination of p-Anisidine value (p-AV)

AOCS Cd18-90 (1998) method was used for the p-Anisidine value (p-AV), which provides information about the second oxidation products (aldehydes and ketones) of peroxides in oils. This method dissolved 0.1-0.4 g of oil sample in 10 mL isooctane. The absorbance value of the resulting solution was measured at 350 nm against isooctane. Then, 5 mL of the oil solution was taken and mixed with 1 mL of p-Anisidine solution (2.5 g/L glacial acetic acid). In addition, 5 mL isooctane and 1 mL p-Anisidine solution were mixed in another test tube. After approximately 10 minutes, the absorbance value of the prepared solution was measured at 350 nm against the solution containing isooctane. The p-Anisidine value of the oil samples was calculated

using the following formula (Eq. 1). All analyses were performed in triplicate ($n=3$).

$$p-AV = 10x[(1.2x(A_2-A_1))/w] \quad (\text{Eq. 1})$$

In the formula, w , A_1 and A_2 represent the amount of oil weighed, the absorbance value of the oil solution and the absorbance value of the mixture of oil and p-Anisidine solution, respectively.

Determination of conjugated diene (CD) and conjugated triene (CT) values

The IUPAC (1987) method was used for conjugated diene (CD) and conjugated triene (CT) values in oil samples. Accordingly, 0.1 g of the sample was weighed and dissolved in 100 mL isooctane. Then, absorbance values for CD and CT were measured with a spectrophotometer (Shimadzu UV-1240, Japan) at wavelengths of 232 nm and 268 nm, respectively. CD and CT values of oil samples were calculated using the following formula (Eq. 2). All analyses were performed in triplicate ($n=3$).

$$E \% = A_k / (cLxl) \quad (\text{Eq. 2})$$

In the formula, E , A_k , cL and l represent the extinction value, the absorbance value of the sample, the concentration of the oil solution (g/100 mL) and the path length in the 1.00 cm quartz cuvette, respectively.

Determination of total polar matter (TPM)

The total polar matter measuring device Testo 270 (Testo) was used to determine the amount of TPM in oil samples. This device detects total polar matter as a function of electrical conductivity in relation to temperature. Since the amount of TPM varies depending on temperature, the measurement was made within a certain temperature range (40-45°C). In the study, the device was calibrated with calibration oil before the measurement process. All analyses were performed in triplicate ($n=3$).

Antioxidant capacity assay

In the study, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical scavenging method was used to determine the amount of antioxidant

capacity (Brand-Williams et al., 1995). Accordingly, 200 µL of oil sample and 3 mL of 0.051 mM DPPH solution were mixed and then incubated at room temperature for 30 minutes. Afterward, the change in absorbance values was measured at 517 nm wavelength. Antioxidant capacities of oil samples were calculated using the following formula (Eq. 3). All analyses were performed in triplicate (n=3).

$$\text{DPPH scavenging activity (\%)} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

In the formula, A_0 and A_1 represent the absorbance values of the blank sample and the oil sample, respectively.

Statistical analysis

Analyses were performed in triplicate and results were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). SPSS (version 22, SPSS Inc., USA) program was used to analyze the results. The obtained data were examined using a one-way analysis of variance. Duncan test was used to determine the significance of differences between mean values (significance level of 0.05).

RESULT AND DISCUSSION

Fatty acids composition of samples

Generally, vegetable oils have a high rate of unsaturated fatty acids. This accelerates the oxidation that occurs with heat treatment. The composition rates of fatty acids in oil samples without thermal oxidation are given in Table 1. Total saturated fatty acid (SFA) was determined mostly in CO and PSO samples, 13.9% and 11.4%, respectively. Among these, palmitic and stearic acids were the dominant fatty acids. PSO and WO samples contained the most total polyunsaturated fatty acids (PUFA), 74.1% and 62.7%, respectively. The dominant fatty acid in these oil samples was linoleic acid. Rahimi et al. (2011) examined the fatty acid content of 18 types of poppy seed oil. The dominant fatty acid in the samples was linoleic acid (72.55%). In addition, oleic and palmitic acid rates were between 13.30-17.80% and 7.96-10.19%, respectively. At the end of the study, they reported that poppy seed oil can be used as cooking oil. Similarly, Dabrowski et al. (2020) also obtained similar fatty acid rates in their study.

Table 1. The major fatty acid compositions of oil samples (%).

	PSO	CO	HO	WO
Palmitic (C16:0)	9.06	10.90	5.59	6.40
Palmitoleic (C16:1)	0.15	0.16	0.23	0.12
Stearic (C18:0)	2.05	2.03	2.55	2.48
Oleic (C18:1)	13.70	30.70	75.70	26.20
Linoleic (C18:2)	74.00	53.80	14.60	53.70
γ Linolenic (C18:3)	0.05	0.05	0.05	4.45
α Linolenic (C18:3)	0.05	0.05	0.05	4.05
Arachidic (C20:0)	0.12	0.41	0.21	0.05
Eicosenoic (C20:1)	0.59	0.34	0.05	0.88
Heneikosanoic (C21:0)	0.07	0.05	0.23	0.69
SFA	11.40	13.90	8.78	9.84
MUFA	14.50	31.30	76.10	27.40
PUFA	74.10	53.90	14.70	62.70

PSO: Poppy Seed Oil, CO: Corn Oil, HO: Hazelnut Oil, WO: Walnut Oil

Free acidity content of samples

FFA represents the amount of unesterified fatty acids released as a result of the hydrolysis of triglycerides (Woo et al., 2018). Different compounds are formed as a result of oxidation from unesterified fatty acids. This creates undesirable changes in the sensory and nutritional values of the oils. Therefore, the amount of FFA should not exceed the limits specified in the standards. This parameter is a suitable indicator for investigating the rancidity rate in oils (Iqbal and Bhangar, 2007). The study determined a significant increase in the FFA amount of all oil samples depending on the heating period ($P<0.05$). The resulting increase is given in Table 2. After heat treatments PSO, CO, HO and WO samples of changes were measured as 0.42%, 0.07%, 0.26% and 0.1%, respectively. CO and WO exhibited the best stability against the increase in acidity caused by thermal oxidation. The low increase in acidity may be due to the refining process applied. Similar to this study, Woo et al. (2018) applied thermal oxidation to corn, soybean and palm oil at 150°C for different periods of time. FFA values of oil samples increased at different rates with heat treatments.

Peroxide values of samples

PV indicates the amount of peroxide and hydroperoxide resulting from the oxidation of oils. Therefore, it is an important quality criterion showing the oxidation degree (Zhang et al., 2010). The PV change in oil samples is given in Table 2. Generally, it was seen that the number of heating cycles had a significant effect on the regular increase in PV ($P<0.05$). However, a slightly irregular increase was determined in CO and WO samples. This may be due to the decomposition of hydroperoxides at high temperatures. Hydroperoxides formed in the first stage of oxidation are unstable products. As the reaction progresses, they transform into secondary products such as volatile carbonyl compounds and non-volatile dimers, trimers or polymers (Solak et al., 2018). At the end of the study, the lowest changes were measured in CO and HO samples, 11.42 and 11.74 meq O₂/kg oil, respectively. The reason for the low peroxide change in these samples may be due to their lower

PUFA contents. The change in PV was similar to the findings of Solak et al. (2018) in their study on hazelnut oil.

p-Anisidine values of samples

p-AV is considered the index of aldehyde compounds occurring in oils. It is an important parameter indicating the degree of oxidation in research (Kalantzakis and Blekas, 2006). This value is calculated using the absorbance of the color formed as a result of the reaction of aldehydes and ketones, which are the products of hydroperoxides as a result of oxidation (Çelebi et al., 2021). The changes in oil samples due to heat treatments are given in Table 2. According to the results of the analysis, it was seen that the number of heating cycles had a significant effect on the increase in the p-AV value ($P<0.05$). At the end of the study, WO was most affected by heat treatments, while HO and PSO exhibited the best oxidative stability. These results were consistent with studies using different oils. Wang et al. (2019) applied heat treatments to soybeans, peanuts, perilla and olive oil at 150, 180 and 210°C for 3 days. The study reported that p-AV values increased depending on time at all temperatures, and the most significant change was in perilla oil.

Conjugated diene and conjugated triene values of samples

CD and CT values are parameters expressing the formation of primary and secondary oxidation products in oils. The structures of these products are unstable and lead to the formation of compounds such as aldehydes and ketones in the later stages of oxidation. This situation causes rancidity and a decrease of sensory quality in oils. The amount of conjugated fatty acids resulting from the displacement of double bonds increases with heat treatment. This also increases the sensitivity of oils to oxidation (Bhattacharya et al., 2008). The study showed a significant increase in the CD and CT values of the oil samples with the effect of heat treatments ($P<0.05$). When Table 3 was examined, PSO and WO samples exhibited the highest changes during the heating cycles. However, the lowest changes were determined in HO samples. Zhang et al. (2022) applied thermal oxidation to linseed oil at 180°C for 2 and 4 hours.

CD and CT values increased in oil samples with heat treatments. They reported that the rate of thermal oxidation increase of the samples was

related to the applied temperature level and the oil-oxygen contact area.

Table 2. Free fatty acid (FFA), peroxide value (PV) and p-Anisidine value (p-AV) of oil samples.

Samples		Number of heating cycles			
		0	4	8	12
FFA (%)	PSO	4.16±0.01 ^a	4.28±0.01 ^b	4.48±0.01 ^c	4.58±0.01 ^d
	CO	0.11±0.00 ^a	0.12±0.01 ^b	0.16±0.00 ^c	0.18±0.00 ^d
	HO	0.22±0.00 ^a	0.26±0.01 ^b	0.35±0.00 ^c	0.48±0.00 ^d
	WO	0.18±0.00 ^a	0.22±0.01 ^b	0.25±0.00 ^c	0.28±0.00 ^d
PV (meq O ₂ /kg)	PSO	2.63±0.31 ^a	4.96±0.04 ^b	11.76±0.25 ^c	16.59±0.45 ^d
	CO	6.61±0.29 ^a	13.58±0.04 ^c	12.08±0.27 ^b	18.03±0.17 ^d
	HO	3.97±0.01 ^a	12.35±0.61 ^b	14.36±0.06 ^c	15.71±0.14 ^d
	WO	6.93±0.05 ^a	9.19±0.04 ^c	8.45±0.04 ^b	20.56±0.30 ^d
p-AV	PSO	0.00±0.31 ^a	24.64±0.12 ^b	58.18±0.25 ^c	66.89±0.57 ^d
	CO	10.83±0.09 ^a	43.52±0.62 ^b	76.71±1.21 ^c	96.18±1.55 ^d
	HO	1.47±0.07 ^a	24.54±0.22 ^b	39.69±0.25 ^c	52.15±0.30 ^d
	WO	1.89±0.10 ^a	56.01±1.73 ^b	87.69±1.46 ^c	104.47±1.43 ^d

Values followed by different lowercase (a–d) letters show significant difference for each row ($P<0.05$).

PSO: Poppy Seed Oil, CO: Corn Oil, HO: Hazelnut Oil, WO: Walnut Oil

Table 3. Conjugated diene (CD) and conjugated triene (CT) values of oil samples.

Samples		Number of heating cycles			
		0	4	8	12
CD (%)	PSO	2.08±0.17 ^a	4.32±0.07 ^b	10.72±0.21 ^c	15.92±0.06 ^d
	CO	3.37±0.05 ^a	6.23±0.27 ^b	9.00±0.05 ^c	10.96±1.39 ^d
	HO	6.00±0.10 ^a	5.87±0.16 ^a	9.05±0.64 ^b	12.78±0.17 ^c
	WO	19.60±0.54 ^a	24.68±0.39 ^b	27.60±0.06 ^c	29.23±0.76 ^d
CT (%)	PSO	0.24±0.01 ^a	1.06±0.02 ^b	2.35±0.02 ^c	3.18±0.03 ^d
	CO	1.92±0.08 ^a	3.01±0.02 ^b	4.09±0.00 ^c	4.61±0.37 ^d
	HO	1.08±0.01 ^a	1.74±0.00 ^b	2.22±0.01 ^c	2.67±0.00 ^d
	WO	1.84±0.00 ^a	4.20±0.07 ^b	5.26±0.03 ^c	6.01±0.12 ^d

Values followed by different lowercase (a–d) letters show significant difference for each row ($P<0.05$).

PSO: Poppy Seed Oil, CO: Corn Oil, HO: Hazelnut Oil, WO: Walnut Oil

The amount of total polar matter in the samples

The amount of TPM indicates the degradation of oils caused by thermal oxidation. Polar matters contain non-triglyceride components. TPM is a parameter related to the primary and secondary oxidation products formed in oils with heat treatment. It increases with the period and degree of heat treatment applied. The amount of TPM for frying oils is limited to 25% (Ceylan and

Basturk, 2022). When Figure 1 was examined, it could be seen that the TPM amounts increased significantly with the effect of heating cycles ($P<0.05$). In the fourth heating cycle, the TPM amounts of all samples were measured at an acceptable level. But, at the end of the study, PSO, HO and WO samples exceeded this level. In a similar study, frying with palm olein oil was applied 12 times at 180°C. It was reported that the TPM amounts of all samples increased

significantly depending on the number of heat treatments (Ceylan and Basturk, 2022).

Antioxidant activity capacity of samples

The DPPH free radical scavenging method is frequently used when examining the radical scavenging effects of foods because it is simple and fast. In this method, the change in color of the DPPH radical due to its reduction by the antioxidant substance is measured spectrophotometrically (Magalhaes et al. 2008; Albayrak et al. 2010). The antioxidative capacity change of oil samples is given in Figure 1. There was a significant decrease in all samples with the

effect of thermal oxidation ($P<0.05$). Especially in the fourth heating cycle, the decrease in HO and WO samples was more evident. CO (29.11%) and PSO (46.08%) samples exhibited the lowest changes when the heating cycles were completed. Freitas et al. (2017) who investigated the effect of thermal oxidation on antioxidative capacity, applied heat treatment to soybean oil at 180°C for 20 hours. They reported that the antioxidative capacities of oil samples decreased significantly depending on the heat treatment time.

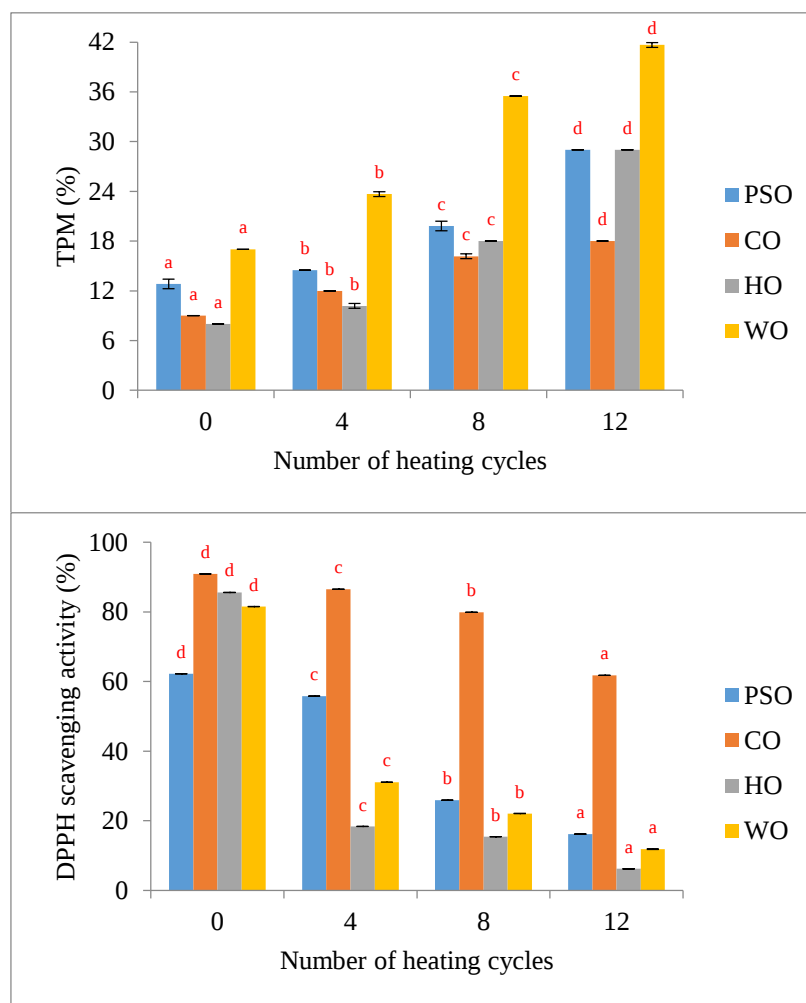


Figure 1. Total polar matter (TPM) and DPPH scavenging activity values of oil samples. Values followed by different lowercase (a–d) letters show significant difference between heating cycles ($P<0.05$). PSO: Poppy Seed Oil, CO: Corn Oil, HO: Hazelnut Oil, WO: Walnut Oil

CONCLUSION

There are many studies on the thermal oxidative stability of different types of oils in the literature. However, the stability of poppy seed oil was investigated with other oils for the first time in this study. During heating cycles, poppy seed oil exhibited high free fatty acid, hydroperoxide amount and conjugation. This may be because poppy seed oil was unrefined and had unsaturated fatty acid content. On the other hand, according to initial values, changes in p-AV (66.89), TPM (16.17%) and antioxidative capacity level (46.08%) were observed to be lower than other oils. This may be due to the fact that poppy seeds and oil contain some phenolic compounds and tocopherols (α , β , γ , δ) (Ghafoor et al., 2019). This study showed that unrefined poppy seed oil could be an alternative to commercial edible oils.

Nowadays, interest in natural and unprocessed foods is increasing. This situation is also valid for vegetable oil varieties. For example, the processing steps applied in the refining or hydrogenation process change the cis-trans structure of the oil and increase the amount of saturated fatty acids. Therefore, research should be conducted on oil varieties obtained from different seeds or fruits that are resistant to changing climatic conditions during the cultivation process and have high oxidative stability.

CONFLICTS OF INTEREST

The author has declared no conflicts of interest.

FUNDING FOR RESEARCH

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Kamil ÇELEBİ: Investigation, methodology and analysis, writing, original draft, review and editing, visualization, validation.

REFERENCES

- Albayrak, S., Sağdıç, O., Aksoy, A. (2010). The assays used for assessing antioxidant capacities of herbal products and foods. *Erciyes University Journal of the Institute of Science and Technology*, 26(4): 401-409.
- AOCS Cd8b-90 (1997). Peroxide value, acetic acid, isooctane method.
- AOCS Cd18-90 (1998). p-Anisidine value.
- Ayyıldız, H.F., Topkafa, M., Sherazi, S.T.H., Mahesar, S.A., Kara, H. (2021). Investigation of the chemical characteristics and oxidative stability of some commercial cold-pressed oils. *Konya Journal of Engineering Sciences*, 9(4): 904-916.
- Bhattacharya, A.B., Sajilata, M.G., Tiwari, S.R., Singhal, R.S. (2008). Regeneration of thermally polymerized frying oils with adsorbents. *Food Chemistry*, 110: 562-570.
- Bozan, B., Temelli, F. (2003). Extraction of poppy seed oil using supercritical CO₂. *Journal of Food Science*, 68(2): 422-426.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28: 25-30.
- Ceylan, M.M., Basturk, A. (2022). Investigation of the effects of uckun (*Rheum ribes* L.), quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), and propolis extracts on the thermal oxidation of palm olein oil during the deep-frying process. *J. Food Process Preserv.*, 46: e16210.
- Çakaloğlu, B., Özyurt, V.H., Ötleş, S. (2018). Cold press in oil extraction. A review. *Ukrainian Food Journal*, 7(4): 640-654.
- Çelebi, K., Cerit, I., Demirkol, O. (2021). Effect of hops oil on sunflower oil thermal stability. *Progress in Nutrition*, 23(4): e2021310.
- Dabrowski, G., Czaplicki, S., Konopka, I. (2020). Composition and quality of poppy (*Papaver somniferum* L.) seed oil depending on the extraction method. *LWT-Food Science and Technology*, 134: 110167.
- Freitas, I.R., Cattelan, M.G., Rodrigues, M.L., Luzia, D.M.M., Jorge, N. (2017). Effect of grape seed extract (*Vitis labrusca* L.) on soybean oil under thermal oxidation. *Nutrition and Food Science*, 47(5): 610-622.

- Ghafoor, K., Özcan, M.M., AL-Juhaimi, F., Babiker, E.E., Fadimu, G.J. (2019). Changes in quality, bioactive compounds, fatty acids, tocopherols, and phenolic composition in oven- and microwave- roasted poppy seeds and oil. *LWT-Food Science and Technology*, 99: 490-496.
- Iqbal, S., Bhanger, M.I. (2007). Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. *Food Chemistry*, 100(1): 246-254.
- ISO 5509 (1978). Animal and vegetable fats and oils-preparation of methyl esters of fatty acids.
- IUPAC (1987). Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives.
- Kalantzakis, G., Blekas, G. (2006). Effect of greek sage and summer savory extracts on vegetable oil thermal stability. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(10): 842-847.
- Magalhaes, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L.F.C. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613(1): 1-19.
- Özbek, Z.A., Ergönül, P.G. (2020). Determination of physicochemical properties, fatty acid, tocopherol, sterol, and phenolic profiles of expeller-pressed poppy seed oils from Turkey. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 97: 591-602.
- Rahimi, A., Kiralan, M., Arslan, N., Bayrak, A., Doğramacı, S. (2011). Variation in fatty acid composition of registered poppy (*Papaver somniferum* L.) seed in Turkey. *Academic Food Journal*, 9(3): 22-25.
- Solak, R., Turan, S., Kurhan, S., Erge, H.S., Karabulut, I. (2018). Thermal oxidation kinetics of refined hazelnut oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 95: 497-508.
- Şengün, İ.Y., Yücel, E., Öztürk, B., Kılıç, G. (2020). Fatty acid composition, total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of varieties of poppy (*Papaver somniferum*) seed oils. *GIDA*, 45(5): 954-962.
- Wang, Y., Zhu, M., Mei, J., Luo, S., Leng, T., Chen, Y., Nie, S., Xie, M. (2019). Comparison of furans formation and volatile aldehydes profiles of four different vegetable oils during thermal oxidation. *Journal of Food Science*, 84(7): 1966-1978.
- Woo, Y.S., Kim, M.J., Lee, J.H. (2018). Correlation of the solid-fat content in vegetable oils with other parameters during thermal oxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 95: 1179-1187.
- Yanishlieva, N.V., Marinova, E.M. (2001). Stabilisation of edible oils with natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103(11): 752-767.
- Zhang, Y., Yang, L., Zu, Y., Chen, X., Wang, F., 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.
- Zhang, Z., Wei, Y., Guan, N., Li, B., Wang, Y. (2022). Changes in chemical composition of flaxseed oil during thermal-induced oxidation and resultant effect on DSC thermal properties. *Molecules*, 27: 7135.

SUSTAINABLE FOOD SYSTEMS: FUNCTIONAL FOODS AND MANAGEMENT OF FOOD WASTE

Ceren KARAGÖZ*, Özlem Merve TOLUÇ

Department of Nutrition and Dietetics, Graduate School of Education, Bahçeşehir University, İstanbul, Türkiye

Received /Geliş: 21.02.2025; *Accepted /Kabul:* 12.05.2025; *Published online /Online baskı:* 26.05.2025

Karagöz, C., Toluç, Ö. M. (2025). *Sustainable food systems: Functional foods and management of food waste. GIDA (2025) 50 (3) 415-426 doi: 10.15237/ gida.GD25033*

Karagöz, C., Toluç, Ö. M. (2025). Sürdürülebilir gıda sistemleri: Fonksiyonel gıdalar ve atık yönetimi. GIDA (2025) 50 (3) 415-426 doi: 10.15237/ gida.GD25033

ABSTRACT

The increasing global population, changing consumption patterns and climate change are putting significant pressure on food systems. There is a strong focus on the development of sustainable food systems that prioritize the efficient use of resources, reduce environmental impacts, and ensure that everyone has access to healthy nutritious food. Functional foods are known for their high nutritional values and beneficial bioactive components that positively affect human health. Additionally, they have the potential to help reduce food waste. This review examines the relationship between functional foods and sustainable nutrition and the impacts of food waste in this context by referencing current academic literature. Also, detailed examination of upcycled foods that revalue food waste and attribute economic value according to circular economy principles were given. It is expected that reducing food waste will provide significant benefits for the environment, economy, and health through the inclusion of sustainable nutrition practices and functional foods.

Keywords: Upcycled foods, functional foods, food waste, sustainable nutrition, sustainable food systems

SÜRDÜRÜLEBİLİR GIDA SİSTEMLERİ: FONKSİYONEL GIDALAR VE ATIK YÖNETİMİ

ÖZ

Artan küresel nüfus, değişen tüketim alışkanlıkları ve iklim değişikliği, gıda sistemleri üzerinde önemli bir baskı oluşturuyor. Kaynakların verimli kullanımına öncelik veren, çevresel etkileri azaltan ve herkesin sağlıklı besleyici gıdaya erişimini sağlayan sürdürülebilir gıda sistemlerinin geliştirilmesine güçlü bir şekilde odaklanılmaktadır. Fonksiyonel gıdalar, yüksek besin değerleri ve insan sağlığını olumlu yönde etkileyen faydalı biyoaktif bileşenleri ile bilinmektedir. Ek olarak, gıda israfını azaltmaya yardımcı olma potansiyeline sahiptirler. Bu derleme, fonksiyonel gıdalar ile sürdürülebilir beslenme arasındaki ilişkiyi ve bu bağlamda gıda israfının etkilerini güncel akademik literatüre atıfta bulunarak incelemektedir. Ayrıca, döngüsel ekonomi ilkelerine göre gıda israfını yeniden değerlendiren ve ekonomik değer atfeden ileri dönüştürülmüş gıdaların detaylı incelemesine yer verildi. Gıda israfının azaltılmasının, sürdürülebilir beslenme uygulamaları ve fonksiyonel gıdaların dahil edilmesi yoluyla çevre, ekonomi ve sağlık için önemli faydalar sağlaması beklenmektedir.

Anahtar kelimeler: Fonksiyonel gıdalar, ileri dönüştürülmüş gıdalar, sürdürülebilir beslenme, sürdürülebilir gıda sistemleri, yemek israfı

* *Corresponding author / Sorumlu yazar*

✉: ceren.karagoz@bahcesehir.edu.tr

☎: (+90) 533 137 0997

Ceren Karagöz; ORCID no: 0009-0001-1266-4547

Özlem Merve Toluç; ORCID no: 0009-0009-5694-3597

INTRODUCTION

Today's food systems are vital to environmental sustainability, public health, and economic prosperity. The growing global population, shifting consumer preferences and climate change among other reasons are intensifying food system difficulties. Integrating functional foods into sustainable food system practices promotes resource efficiency, reduces environmental impact, and assures enough food access for all (FAO, 2017; Essa et.al., 2023).

The bioactive components of functional foods have positive effects on human health while also aiming to support environmental balance within the concept of sustainable nutrition (Maqsood et.al., 2020; Santini, 2022; Durazzo et.al., 2022). Sustainable nutrition is the shaping of dietary habits to protect human health and ensure environmental balance (Ruben et.al., 2021; Fanzo et.al., 2022). The enhancement of human well-being and the establishment of ecological balance also encompass economically and socially efficient and fair food production processes (Mustafa et.al., 2021; Sirdey et.al., 2023). However, food waste negatively affects the efficiency of these systems making it difficult to achieve sustainability goals (FAO, 2019).

The major goal of this review is to discuss how functional foods might be integrated into sustainable nutrition systems and to estimate the impact of food waste in this setting, drawing on existing scientific literature. Also, the health benefits of functional foods, how they contribute to environmental sustainability and what they mean economically were examined.

FUNCTIONAL FOODS, BIOACTIVE COMPONENTS AND THEIR EFFECTS ON HEALTH

From a physiological and metabolic standpoint, the active ingredients in functional foods can be viewed as powerful agents against a range of illnesses in the body (Otles and Gokgunnec, 2024). Flavonoids, fiber, essential fatty acids, probiotics, prebiotics and postbiotics are the primary elements that have a good impact on human health. They contribute to boosting

antioxidant ability, postponing structural alterations in antimicrobial cells and bolstering immunity as immunomodulators, among other health advantages (Granato et. al., 2020; Jędrusek-Golińska et.al., 2020; Zaky et.al., 2022).

Liu and colleagues have shown that plant sterols can lower lipid levels through synergistic mechanisms that reduce the risk of cardiovascular disease (Liu et. al., 2024). The efficacy of probiotics to support the maintenance of balanced gut flora is well-known (Indira et. al., 2019). Omega-3 fatty acids can lower the risk of coronary heart disease, according to randomized controlled trials (Salar and Kuruüzüm-Uz, 2021). Additionally, through synergistic effects, antioxidants can improve therapy outcomes for cancer patients (Sever et. al., 2023).

In a review examining the functional food market, the health benefits of these foods are highlighted with specific examples. It points out that government-approved foods often hold bioactive ingredients such as probiotics that support digestive health, antihypertensive peptides that help regulate blood pressure, omega-3 fatty acids that lower triglyceride levels and fiber that helps control blood sugar (Iwatani and Yamamoto, 2019). Recent regulatory modifications have expanded the scope of health claims to include fatigue, eye health, memory enhancement, stress management, sleep quality, joint health, and circulation.

For example, according to studies, various components contained in functional foods can help health. Probiotics and prebiotics, contribute to digestive health by regulating gut flora (Pop et.al., 2019; Baroni et.al., 2024; Tinrat and Chomnawang, 2024). It is known that omega-3 fatty acids support cardiovascular health and have anti-inflammatory properties (Kelling et.al., 2024; Tseng et.al., 2024). Additionally, plant-based bioactive compounds can reduce the risk of cancer development and strengthen the immune system due to their antioxidant effects (Mir et.al., 2024). Among the micronutrients involved in physiological processes, it is emphasized that vitamins and minerals (Mu et.al., 2024) play a role

as anti-inflammatory agents in the body, which may counteract cell apoptosis (Cheng et.al., 2024; Yang et.al., 2024). Vitamin D is necessary to keep bone health (Sundar et.al., 2023; Nakamura, 2024); vitamin B12 is needed for the effective functioning of the nervous system (Santos et.al., 2024). Minerals such as calcium, magnesium, and iron are also important for regulating various body functions (Yu et.al., 2023; Suliburska et.al., 2024). Foods having dietary fiber make significant contributions to digestive health, serum cholesterol management and the development of gut microbiota (Ademosun et.al., 2024; Koc et.al., 2024; Cisternas et.al., 2024; Zheng et.al., 2024; Lee et.al., 2024). Omega-3 fatty acids contribute to the regulation of blood pressure by supporting vascular integrity, lowering low-density cholesterol, and controlling triglyceride levels (Asgary et.al., 2018; Shahidi and Ambigaipalan, 2018). Probiotics and prebiotics can aid manage chronic conditions such as type 2 diabetes, irritable bowel syndrome and inflammatory bowel diseases (Yadav et.al., 2022). Antioxidants and phytochemicals are critical for avoiding oxidative stress and chronic inflammation by lowering free radical-induced cellular damage (Kim and Kim, 2018). While vitamin D is known to reduce the incidence of osteoporosis (LeBoff et.al., 2022) calcium, phosphorus and magnesium are needed for bone health (Rondanelli et.al., 2021; Couce and Saenz de Pipaon, 2021). Vitamin C, zinc and probiotics all help to improve the immune system (Siripornpanich et.al., 2022; Djordjevic et. al., 2022).

These health advantages emphasize the value of functional foods and bioactive components in our diet. However, before consuming these meals, visit a healthcare practitioner to ensure that specific needs and health circumstances are met.

SUSTAINABLE NUTRITION AND GLOBAL APPLICATIONS

Sustainable nutrition is defined as a form of nutrition that adopts the principle of low environmental impact while ensuring food and nutrition security for present and future generations and promoting healthy lifestyles (Auestad and Fulgoni, 2015). The main goals of

sustainable nutrition are to supporting optimal growth and development of individuals, improve physical, mental, and social well-being throughout life, prevent various forms of malnutrition, and reduce the risk of diet-related non-communicable diseases. In addition to reducing the risk of non-communicable diseases, it also includes aspects such as providing a fair source of food in terms of quality and price for people living in both rural and urban areas and protecting biodiversity and planetary health (Burlingame and Dernini, 2012; FAO and WHO, 2019). Within this framework, factors such as land use, waste management and greenhouse gas emissions are also included in the concept of sustainable nutrition (Gülsöz and Altan 2021).

Foods have significant impacts on the environment through various means such as greenhouse gas emissions, land use, and water resource use. Especially the trend towards Western-style diets, which are heavily based on high-calorie and animal products, significantly amplifies the environmental impacts of food systems. Due to the continuous increase in the global population and the continuation of current dietary habits, global food consumption is projected to increase by approximately 100% between 2005 and 2050 (Biermann and Rau 2020). Considering these risks, sustainable nutrition methods offer significant opportunities to protect both human health and the planet's ecological balance. However, adopting these sustainable habits can be challenging. Factors such as the insufficient understanding of the concept of sustainable nutrition by consumers, the lack of awareness about the environmental impacts of consumed foods, and the lack of knowledge that carbon and water footprints can be reduced even with simple changes in diets, increase this challenge (Rose et.al., 2022).

A study conducted in the UK (Whittall et.al., 2024) showed that the level of knowledge and awareness about sustainable diets had an impact on the tendency and initiatives to make sustainable changes. According to the results of the study, although the participants were confused about how to make their eating habits

more sustainable, they said that they were willing to make changes in their diets. However, in terms of dietary content, sustainable diets can be confused with healthy diets (Al Masri and König, 2025). In another study conducted in Belgium (Cooreman-Algoed, 2024), various dietary models were evaluated, and it was found that all dietary models showed significant improvements in the Alternative Healthy Eating Index score but caused an increase in water consumption. However, it was also stated that it is possible to create healthy dietary models without increasing the environmental footprint (Mirzaie-Nodoushan, 2020). With this aim, a study was conducted in China to create a dietary model that improves holistic health while also significantly reducing environmental footprints. The findings of the study showed that a diet model designed optimally for Chinese individuals could reduce the environmental footprint by 1.8 times. These results emphasize how important effective dietary models and policies that lead to sustainable nutritional options are in protecting the health and environment of individuals living in rural and urban areas (Dou and Liu, 2024). The existence of proper nutrition policies for healthy and environmentally friendly diets is significant, especially due to different food preferences in rural and urban areas (Wang et. al., 2024).

The Mediterranean Diet is one of the diets that is suitable for both health and sustainability (Metin et.al., 2024; Lorca-Camara et. al. 2024; Álvarez-Álvarez et. al., 2024). In a study conducted by Alvarez et al., it was found that after a one-year Mediterranean Diet intervention was applied to the participants, the environmental impact decreased significantly across all parameters analyzed. In addition, it was found that meat products have the greatest environmental impact among different food groups (Álvarez-Álvarez et. al., 2024).

FOOD WASTE AND ENVIRONMENTAL IMPACTS

Food waste is the situation in which edible food is abandoned or spoils owing to over-preparation, inappropriate storage, or inefficient processing (Kanwal et. al., 2024). As of 2022, it was estimated

that around 1.05 billion tons of food were wasted worldwide at the household, food service, and retail levels. Between 2010 and 2022, Asia-Pacific had the highest average annual food waste of 70.28 kg per capita, while Europe had the lowest at 34.45 kg/person/year. In Europe, non-EU member countries had higher average food waste (56.88 kg/person/year) than EU member countries (34.33 kg/person/year) (Krah et. al., 2024).

Individuals at the consumer end of the food supply chain are held responsible for a huge part of global food waste. Despite the preventable nature of food waste, consumers account for approximately 88% of total food waste. All countries, regardless of their income level (high, middle, or low), contribute significantly to food waste (United Nations Environment Programme, 2024; Liechti et. al., 2024). Avoidable waste is defined as food that was previously edible but has since turned inedible. Unavoidable wastes include non-edible substances like eggshells. Potentially avoidable wastes include wastes that are rarely consumed, such as potato peels (Kohli et. al., 2023). Food waste results in significant economic, social, and environmental problems. The loss of physical products, waste from production inputs (agricultural chemicals, water, etc.) and the energy used to support quality and safety throughout the supply chain contributes to greenhouse gas emissions, which is a concern for the environment (Gage et. al., 2024). Consumers' wasteful behaviors towards food primarily begin in the home environment. Food waste in homes is influenced by several factors such as consumption habits, packaging, planning skills, socioeconomic factors, and levels of environmental awareness. Understanding the factors that affect food waste can help policymakers, academics, and experts develop more effective intervention strategies (Deliberador et. al., 2023).

In a study conducted in Iran, it was found that the religious consequences of food waste were the most effective factor in predicting food waste behavior. Furthermore, it was mentioned that homes with a high socioeconomic class were

more likely to reduce food waste, but those with low income were more likely to waste food (Adaryani et. al., 2024). A comparable study in Poland examined the link between food waste and socio-demographic and economic factors. Data obtained from 500 households showed that there was an annual average of 62.6 kg of edible food wasted and 98.2 kg of non-edible components were wasted. While the amount of food waste was affected by factors such as the number of children, monthly income, age, and employment status of the person preparing the food, it was stated that the most frequently wasted foods were fruits and vegetables, bread, dairy products, beverages, fruit juices, and cold meats (Bilska et. al., 2024). Personal awareness also contributes significantly to food waste reduction (Deliberador et. al., 2023; Secer et. al., 2023). A cross-sectional study conducted in Turkey investigated the effects of personal awareness and social factors in reducing household food waste among consumers in Ankara, Izmir, and Adana. The results of this research show that consumer knowledge is a key source of incentive in minimizing food waste. The authors of the research claimed that economic knowledge had a higher influence on minimizing food waste than awareness of environmental issues (Secer et. al., 2023).

Various strategies are recommended to prevent food waste, such as weekly meal planning, part control, considering the difference between end dates and recommended consumption dates (van Rooijen et. al., 2024). Practices such as tracking food waste in public food areas such as restaurants and cafes, using composting methods, designing menus to minimize waste, and donating food that is still consumable can be effective in reducing food waste (Reardon et. al., 2024; Lévesque et. al., 2024). Within the scope of sustainable waste management, practices such as evaluating food as animal feed can also support food security (Aleisa and Alsaleh 2024).

FUNCTIONAL FOODS IN SUSTAINABLE FOOD SYSTEMS, WASTE MANAGEMENT AND INTEGRATION POTENTIAL

Sustainable food systems have many goals for human and environmental health. To make resource use efficient by supporting the reduction of food waste; to support sustainable agricultural practices, such as organic farming; Issues such as using packaging prepared using recyclable biodegradable materials are among the goals of sustainable food systems (Ahmad et. al., 2024). Sustainable unrefined materials (algae, vegetable protein sources and insects) are being researched for efficient resource use. Getting started from plant sources will make it easier to integrate sustainable protein sources into the food system. Functional components obtained from plant sources; It will be effective in reducing the environmental impacts that enhance traditional agriculture. It will be additive to the ecosystem service by ensuring food traceability (Yu et. al., 2024). Organic farming methods that can be developed within sustainable food systems; It is a powerful step towards improving the oil health and protecting water resources. Improving soil health helps to support soil carbon sequestration, thereby reducing greenhouse gases. Protecting water resources will also be able to prevent water shortage. In agriculture, as a method, rainwater reaping will reduce the pressure on water resources and support ecosystem sustainability (Bhattacharya et. al., 2024). The fact that the energy sources needed for agricultural, packaging, processing and distribution stages consist of renewable sources significantly reduces the environmental footprint. For example, the use of energy-efficient materials suppresses fossil fuel consumption. Facilities that produce their own energy can be proved, and the use of algae as a raw material source, both the fact that they can be grown at cost-effective prices and that they can produce biomass quickly, make algae a promising source in the sustainable food system (Dewan et. al., 2025; Gurau et. al., 2024; Esfandiari Bahraseman et. al., 2025; Pastrana-Pastrana et. al., 2025). Data collected in agricultural, processing and distribution stages; can create policies for sustainable food systems. Finding environmental

impacts and describing areas for improvement; It allows the development of sustainability strategies (Alsaffar, 2016; Lutz, 2021).

Recycling food waste within sustainable food systems contributes to both the protection of product quality and the prevention of waste. This also presents an important opportunity to increase consumer awareness and adopt circular economy principles. Upcycled foods; It create environmental, social, and economic benefits. Storage of food waste, preventing waste generation, reducing the use of existing resources and energy by opening new agricultural areas, using food wastes as compost and fertilizer; reflects the environmental benefits of upcycled foods. Reducing the cost given by businesses for waste management, marketing of upcycled products, supporting local food production; This encompasses the economic benefits of foods. Upcycled foods as a social benefit; It contributes to environmental protection and a circular economy by raising awareness of new workforce and reducing food waste (Thorsen et. al., 2024). Consumers' positive expectations towards upcycled foods, especially the increasing adoption of these foods by young and highly educated individuals, show that this approach will become increasingly widespread (Yilmaz and Kahveci 2022). We can count the benefits of upcycled foods to the circular economy: the use of food wastes, such as straw, for biogas production, the processing of fruit and vegetable pulps as a source of fiber for other foods, and the recycling of fruit wastes using composting methods. Thus, it will be possible to reduce the workload in agriculture, reduce the use of chemical solvents, and promote economic development (Ristivojević et. al., 2024).

The development of processing and packaging methods against the rapid spoilage of food ensures both to preservation of food freshness and to extension of the shelf life of food. Appropriate processing techniques, such as vacuum packaging, are seen as methods that preserve the nutritional value of food and reduce the amount of waste. Sustainable packaging techniques, using recyclable biodegradable packaging, and using uniform material to speed

up recycling; provide welding design. Smart packaging can be used to improve food safety. In the evaluation of domestic wastes, composting organic products such as fruits and vegetables and garden waste is effective. It is necessary to adopt conscious and sustainable approaches at every stage, from the use of household waste in the kitchen to effective food processing and packaging practices, to the evaluation of functional and upcyclable foods (Gonçalves and Maximo 2023).

CONCLUSIONS AND FUTURE PERSPECTIVES

Within the scope of sustainable food systems, there are studies evaluating the effects of functional and recycled foods to prevent food waste and ensure waste management. These studies reveal that functional foods support human health and have the potential to reduce environmental impact in sustainable production methods. Recycled foods, on the other hand, offer a solution to food waste, which is a potential problem of sustainable systems.

Future research should focus on the health effects of functional and recycled foods, sustainable production techniques, processing methods, and consumer behavior. Technological innovations and policy implementations should improve food production processes and reduce waste generation through effective packaging solutions. Governments should address the issue with a comprehensive approach by developing supportive policies for sustainable food systems, sustainable business models of enterprises, conscious choices of consumers, technological developments of research institutions and awareness studies of non-governmental organizations.

REFERENCES

Adaryani, R. L., Palouj, M., Gholami, H., Baghestany, A. A., Damirchi, M. J., Dadar, M., ..., Mohammadzadeh, S. (2024). Predicting household food waste behavior: Bringing food literacy and purchasing power into the theory of planned behavior. *Journal of Retailing and Consumer*

- Services*, 82, 103185. <https://doi.org/10.1016/j.jretconser.2024.104119>.
- Ademosun, A. O., Ajeigbe, O. F., Ademosun, M. T., Ogunraku, O. O., Oboh, G. (2024). Improving gut microbiome through diet rich in dietary fibre and polyphenols: The case for orange peels. *Human Nutrition & Metabolism*, 2024, 200295. <https://doi.org/10.1016/j.hnm.2024.200295>.
- Ahmad, T., Esposito, F., Cirillo, T. (2024). Valorization of agro-food by-products: Advancing sustainability and sustainable development goals 2030 through functional compounds recovery. *Food Bioscience*, 62, 105194. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.105194>.
- Al Masri, M., König, L. M. (2025). Are healthy diets also sustainable? Experimental study using a Fake Food Buffet. *Food Quality and Preference*, 126, 105595. <https://doi.org/10.31234/osf.io/tb5v8>.
- Alsaffar, A. A. (2016). Sustainable diets: The interaction between food industry nutrition, health and the environment. *Food Science and Technology International*, 22(2), 102–111. <https://doi.org/10.1177/1082013215572029>.
- Aleisa, E., Alsaleh, A. (2024). Upcycling food waste into animal feed: An environmental assessment based on food waste quantities in different district types in Kuwait. *Journal of Engineering Research*, <https://doi.org/10.1016/j.jer.2024.09.005>.
- Álvarez-Álvarez, L., Vitelli-Storelli, F., Rubín-García, M., García, S., Bouzas, C., Ruíz-Canela, M., ..., Martínez, J. A. (2024). Impact of mediterranean diet promotion on environmental sustainability: a longitudinal analysis. *Public Health*, 230, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2024.02.010>
- Asgary, S., Rastqar, A., Keshvari, M. (2018). Functional food and cardiovascular disease prevention and treatment: A review. *Journal of the American College of Nutrition*, 37(5), 429–455. <https://doi.org/10.1080/07315724.2017.1410867>.
- Auestad, N., Fulgoni, V. L. (2015). What current literature tells us about sustainable diets: Emerging research linking dietary patterns, environmental sustainability, and economics. *Advances in Nutrition*, 6(1), 19–36. <https://doi.org/10.3945/an.114.005694>.
- Baroni, I., Fabrizi, D., Luciani, M., Magon, A., Conte, G., De Angeli, G., Paglione, G., Ausili, D., Caruso, R. (2024). Probiotics and synbiotics for glycemic control in diabetes: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clinical Nutrition*, 43(4), 1041–1061. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2024.03.006>.
- Bhattacharya, D., Tripathy, S., Swain, D. K., Mitra, A. (2024). Can organic farming improve the soil properties food quality and human health? *Food and Humanity*, 3, 100398. <https://doi.org/10.1016/j.foohum.2024.100398>.
- Biermann, G., Rau, H. (2020). The meaning of meat: (Un)sustainable eating practices at home and out of home. *Appetite*, 153, 104730. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2020.104730>.
- Bilska, B., Tomaszewska, M., Kolożyn-Krajewska, D. (2024). Food waste in polish households – Characteristics and sociodemographic determinants on the phenomenon. Nationwide research. *Waste Management*, 176, 30–40. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2024.01.030>.
- Burlingame, B., Dernini, S. (Eds.). (2012). *Sustainable diets and biodiversity: Directions and solutions for policy, research and action*. Food & Agriculture Organization (FAO), Bioersity International. <https://www.loc.gov/item/2021763063/>.
- Cheng, C., Wang, L., Yu, X., Huang, F., Yang, J., Geng, F., Xia, X., Xiang, X., Xu, S., Deng, Q. (2024). Structural identification and antioxidative activity evaluation of flaxseed lignan macromolecules: Structure-activity correlation. *Food Science and Human Wellness*, 13(6), 3224–3235. <https://doi.org/10.26599/FSHW.2023.9250009>.
- Cisternas, C., Farías, C., Valenzuela, R., Calderon, H., Caicedo, A., Alejandra, E., Muñoz, L. A. (2024). Impact of dietary fiber fraction of chia seed supplementation on hepatic steatosis and other metabolic disturbances in a high-fat diet model. *Journal of Functional Foods*, 119, 106329. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2024.106329>.

- Cooreman-Algoed, M., Boone, L., Dewulf, J., Nachtergaele, P., Taelman, S. E., Lachat, C. (2024). Environmental sustainability and nutritional quality of different diets considering nutritional adequacy. *Science of the Total Environment*, 955, 176967. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.176967>.
- Couce, M. L., Saenz de Pipaon, M. (2021). Bone mineralization and calcium phosphorus metabolism. *Nutrients*, 13(11), 3692. <https://doi.org/10.3390/nu13113692>.
- Deliberador, L. R., Batalha, M. O., da Silva César, A., Masood Azeem, M., Lane, J. L., Rodrigues Silva Carrijo, P. (2023). Why do we waste so much food? Understanding household food waste through a theoretical framework. *Journal of Cleaner Production*, 419, 138246. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.137974>.
- Dewan, A., Sridhar, K., Yadav, M., Bishnoi, S., Ambawat, S., Nagaraja, S. K., Sharma, M. (2025). Recent trends in edible algae functional proteins: Production, bio-functional properties, and sustainable food packaging applications. *Food Chemistry*, 463(Part 4), 141483. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.141483>.
- Djordjevic, B., Milenkovic, J., Stojanovic, D., Velickov, A., Djindjic, B., Jevtovic Stoimenov, T. (2022). Vitamins, microelements and the immune system: Current standpoint in the fight against coronavirus disease 2019. *British Journal of Nutrition*, 128(11), 2131-2146. <https://doi.org/10.1017/S0007114522000083>.
- Dou, Y., Liu, X. (2024). Reducing environmental footprints and promoting health: Optimizing dietary structure in China. *Sustainable Production and Consumption*, 45, 126–138. <https://doi.org/10.1016/j.spc.2023.12.0122>.
- Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B., Cicala, C., Caiazzo, E., Izzo, A. A., Novellino, E., Santini, A. (2019). Polyphenols: A concise overview on the chemistry occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*, 33(9), 2221–2243. <https://doi.org/10.1002/ptr.6419>.
- Esfandiari Bahraseman, S., Dehghani Dashtabi, M., Karbasi, A., Firoozzare, A., Boccia, F., Hosseinzadeh Nazeri, Z. (2025). Moving towards novel and sustainable foods: Investigating consumers' intention to consume algae-based foods in a developing country. *Appetite*, 206, 107801. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2024.107801>.
- Essa, M. M., Bishir, M., Bhat, A., Chidambaram, S. B., Al-Balushi, B., Hamdan, H., Govindarajan, N., Freidland, R. P., Qoronfleh, M. W. (2023). Functional foods and their impact on health. *Journal of Food Science and Technology*, 60(3), 820–834. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05193-3>.
- Fanzo, J., Rudie, C., Sigman, I., Grinspoon, S., Benton, T. G., Brown, M. E., Covic, N., Fitch, K., Golden, C. D., Grace, D., Hivert, M. F., Huybers, P., Jaacks, L. M., Masters, W. A., Nisbett, N., Richardson, R. A., Singleton, C. R., Webb, P., Willett, W. C. (2022). Sustainable food systems and nutrition in the 21st century: A report from the 22nd annual Harvard Nutrition Obesity Symposium. *American Journal of Clinical Nutrition*, 115(1), 18–33. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqab315>.
- FAO and WHO. 2019. Sustainable healthy diets – Guiding principles. Rome.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2017). *The future of food and agriculture: Trends and challenges*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-i6583e.pdf>.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2019). *The State of Food and Agriculture 2019: Moving forward on food loss and waste reduction*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/3/ca6030en/ca6030en.pdf>.
- Gage, E., Wang, X., Xu, B., Foster, A., Evans, J., Terry, L. A., Falagán, N. (2024). Reducing food loss and waste contributes to energy, economic and environmental sustainability. *Journal of Cleaner Production*, 451, 142068. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2024.142068>.
- Gonçalves, M. L. M. B. B., Maximo, G. J. (2023). Circular economy in the food chain: Production, processing and waste management. *Circular*

- Economy and Sustainability*, 3, 1405–1423. <https://doi.org/10.1007/s43615-022-00243-0>.
- 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. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051708>.
- Gurau, S., Imran, M., Ray, R. L. (2024). Algae: A cutting-edge solution for enhancing soil health and accelerating carbon sequestration – A review. *Environmental Technology & Innovation*, 103980. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2024.103980>.
- Gülsöz, S., Altan, E. (2021). Sürdürülebilir Beslenme. Prof. Dr. Muhittin Tayfur. Beslenme ve Diyetetik Güncel Konular - 6. (ss.195-212). Ankara: Hatipoğlu Yayınevi.
- Indira, M., Venkateswarulu, T. C., Abraham Peele, K., Bobby, M. N., Krupanidhi, S. (2019). Bioactive molecules of probiotic bacteria and their mechanism of action: A review. *3 Biotech*, 9(8), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1841-2>.
- Iwatani, S., Yamamoto, N. (2019). Functional food products in Japan: A review. *Food Science and Human Wellness*, 8(2), 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.03.011>.
- Jędrusek-Golińska, A., Górecka, D., Buchowski, M., Wieczorowska-Tobis, K., Gramza-Michałowska, A., Szymandera-Buszk, K. (2020). Recent progress in the use of functional foods for older adults: A narrative review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(2), 835–856. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12530>.
- Kanwal, N., Zhang, M., Zeb, M., Batool, U., Khan, I., Rui, L. (2024). From plate to palate: Sustainable solutions for upcycling food waste in restaurants and catering. *Trends in Food Science and Technology*, 152, 104852. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104687>.
- Kelling, M., Dimza, M., Bartlett, A., Traktuev, D. O., Duarte, J. D., Keeley, E. C. (2024). Omega-3 fatty acids in the treatment of heart failure. *Current Problems in Cardiology*, 49(9), 102730. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2024.102730>.
- Kim, C., Kim, B. (2018). Anti-cancer natural products and their bioactive compounds inducing ER stress-mediated apoptosis: A review. *Nutrients*, 10(8), 1021. <https://doi.org/10.3390/nu10081021>.
- Koc, F., Atzler, J., Sahin, A. W., Arendt, E., Ross, R. P., Stanton, C. (2024). Biscuits for the gut: A symphony of FODMAPs and dietary fibre in gut microbiome for irritable bowel syndrome (IBS) management. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 97, 103832. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2024.103832>.
- Kohli, K., Prajapati, R., Shah, R., Das, M., Sharma, B. K. (2023). Food waste: environmental impact and possible solutions. *Sustainable Food Technology*, 2, 70–80. <https://doi.org/10.1039/d3fb00141e>.
- Krah, C. Y., Bahramian, M., Hynds, P., Priyadarshini, A. (2024). Household food waste generation in high-income countries: A scoping review and pooled analysis between 2010 and 2022. *Journal of Cleaner Production*, 471, 136177. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2024.143375>.
- Lee, H. Y., Park, Y. M., Shin, D. Y., Hwang, H. M., Jeong, H. N., Park, H. Y., Yang, H.-J., Ha, G. S., Ryu, M. S., Seo, J. W., Jeong, D.-Y., Bae, J. S., Kim, B. S., Kim, J. G. (2024). Immune-enhancing effect of fermented soybean food, Cheonggukjang on cyclophosphamide-treated immunosuppressed rat. *Heliyon*, 10(18), e37845. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e37845>.
- LeBoff, M. S., Greenspan, S. L., Insogna, K. L., Lewiecki, E. M., Saag, K. G., Singer, A. J., Siris, E. S. (2022). The clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. *Osteoporosis International*, 33(10), 2049–2102. <https://doi.org/10.1007/s00198-021-05900-y>.
- Lévesque, J., Godin, L., Perreault, V., Mikhaylin, S. (2024). Identifying the factors affecting the implementation of food waste reduction strategies in independent restaurants: Moving towards eco-efficiency. *Journal of Cleaner Production*, 440, 139775. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2024.140765>.

- Liechti, C., Mack, G., Ammann, J. (2024). A systematic literature review of impactful food waste interventions at the consumer level. *Sustainable Production and Consumption*, 52, 552-565. <https://doi.org/10.1016/j.spc.2024.11.023>.
- Liu, B., Chen, K., Chen, X., Wang, J., Shu, G., Ping, Z., Zhang, S. (2024). Health outcomes associated with phytosterols: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses of randomized controlled trials. *Phytomedicine*, 122, 155151. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2023.155151>.
- Lorca-Camara, V., Bosque-Prous, M., Batlle-Bayer, L., Bes-Rastrollo, M., O'Callaghan-Gordo, C., Bach-Faig, A. (2024). Environmental and Health Sustainability of the Mediterranean Diet: A Systematic Review. *Advances in Nutrition*. <https://doi.org/10.1016/j.advnut.2024.100322>.
- Lutz, M. (2021). Healthy sustainable food patterns and systems: A planetary urgency. *Medwave*, 21(7), e8436. <https://doi.org/10.5867/medwave.2021.07.8436>.
- Maqsood, S., Adiamo, O., Ahmad, M., Mudgil, P. (2020). Bioactive compounds from date fruit and seed as potential nutraceutical and functional food ingredients. *Food Chemistry*, 308, 125522. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125522>.
- Metin, Z. E., Çelik, Ö. M., Koç, N. (2024). Relationship between adherence to the Mediterranean diet, sustainable and healthy eating behaviors, and climate change awareness: A cross-sectional study from Turkey. *Nutrition*, 118, 112149. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2023.1122666>.
- Mir, S. A., Dar, A., Hamid, L., Nisar, N., Malik, J. A., Ali, T., Bader, G. N. (2024). Flavonoids as promising molecules in the cancer therapy: An insight. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*, 6, 100167. <https://doi.org/10.1016/j.crphar.2023.100167>.
- Mirzaie-Nodoushan, F., Morid, S., Dehghanisani, H. (2020). Reducing water footprints through healthy and reasonable changes in diet and imported products. *Sustainable Production and Consumption*, 23, 30-41. <https://doi.org/10.1016/j.spc.2020.04.002>.
- Mu, J., Wang, R. D., Zhao, Y. S., Lu, T. C., Chen, S. S., Wang, Y. J., ..., Song, S. H. (2024). Discovery of lignans and curcuminoids as the effective inhibitors of pancreatic lipase: structure-activity relationship and inhibitory mechanism. *Natural Product Research*, 1-6. <https://doi.org/10.1080/14786419.2024.2408657>.
- Mustafa, M. A., Mabhaudhi, T., Massawe, F. (2021). Building a resilient and sustainable food system in a changing world – A case for climate-smart and nutrient dense crops. *Global Food Security*, 28, 100477. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2020.100477>.
- Nakamura, M. (2024). P45. 'Ten-years' zinc administration with alendronate and vitamin D3 to postmenopausal women with lower bone density. *North American Spine Society Journal*, 18(Supplement), 100449. <https://doi.org/10.1016/j.xnsj.2024.100449>.
- Otles, S., Gokgunec, L. (2024). Safety considerations in developing functional foods and nutraceuticals. In G. W. Smithers (Ed.), *Encyclopedia of Food Safety* (2nd ed., pp. 223-230). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822521-9.00156-8>.
- Pastrana-Pastrana, Á. J., Rodríguez-Herrera, R., Solanilla-Duque, J. F., Flores-Gallegos, A. C. (2025). Plant proteins, insects, edible mushrooms and algae: More sustainable alternatives to conventional animal protein. *Journal of Future Foods*, 5(3), 248-256. <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2024.07.004>.
- Pop, O. L., Socaci, S. A., Suharoschi, R., Vodnar, D. C. (2019). Pro and prebiotics foods that modulate human health. In C. M. Galanakis (Ed.), *The role of alternative and innovative food ingredients and products in consumer wellness* (pp. 283-313). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816453-2.00010-3>.
- Reardon, J., Way, K. A., Garrison, M. E. B. (2024). Food waste in restaurants: A qualitative investigation of chefs' practices. *Food and Humanity*, 3, 100399. <https://doi.org/10.1016/j.foohum.2024.100405>.

- Ristivojević, P., Krstić Ristivojević, M., Stanković, D., Cvijetić, I. (2024, October 5). Advances in extracting bioactive compounds from food and agricultural waste and by-products using natural deep eutectic solvents: A circular economy perspective. *Molecules*, 29(19), 4717. <https://doi.org/10.3390/molecules29194717>. PMID: 39407645; PMCID: PMC11478183.
- Rondanelli, M., Faliva, M. A., Tartara, A., Gasparri, C., Perna, S., Infantino, V., Riva, A., Petrangolini, G., Peroni, G. (2021). An update on magnesium and bone health. *Biometals*, 34(4), 715-736. <https://doi.org/10.1007/s10534-021-00305-0>.
- Rose, D., Willits-Smith, A. M., Heller, M. C. (2022). Single-item substitutions can substantially reduce the carbon and water scarcity footprints of US diets. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 115(2), 378-387. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqab3388>.
- Ruben, R., Cavatassi, R., Lipper, L., Smaling, E., Winters, P. (2021). Towards food systems transformation—five paradigm shifts for healthy, inclusive and sustainable food systems. *Food Security*, 13(6), 1423-1430. <https://doi.org/10.1007/s12571-021-01221-4>.
- Salar, B., Kuruüzüm-Uz, A. (2021). Omega-3 yağ asitlerinin kardiyovasküler hastalıklar üzerindeki etkileri: Derleme. *Dergipark Journal of Health Sciences*, 10(3), 123-134. <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/1716121>.
- Santini, A. (2022). Nutraceuticals and functional foods: Is it possible and sustainable for bridging health and food? *Foods*, 11(11), 1608. <https://doi.org/10.3390/foods11111608>.
- Santos, M. E. R. A. dos, Silva, K. G. da, Souza, A. P. da S., Silva, A. B. J. da, Silva, R. F. da, Silva, E. H. A. da, Souza, S. L. de, Barros, W. M. A. (2024). Relationship between vitamin B12 levels and motor development: A systematic review. *Clinical Nutrition ESPEN*, 63, 148-156. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2024.06.026>.
- Secer, A., Masotti, M., Iori, E., Vittuari, M. (2023). Do culture and consciousness matter? A study on motivational drivers of household food waste reduction in Turkey. *Sustainable Production and Consumption*, 38, 69-79. <https://doi.org/10.1016/j.spc.2023.03.024>.
- Sever, A., Toy, Y., Erdoğan, M. K., Gündoğdu, R. (2023). Fitokimyasalların kanser tedavisinde kullanımı: Kombine terapi etkileri. *Dergipark Oncology Research Journal*, 15(1), 45-58. <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/2654878>.
- Shahidi, F., Ambigaipalan, P. (2018). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and their health benefits. *Annual Review of Food Science and Technology*, 9, 345-381. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-111317-095850>.
- Sirdey, N., David-Benz, H., Deshons, A. (2023). Methodological approaches to assess food systems sustainability: A literature review. *Global Food Security*, 38, 100696. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2023.100696>.
- Siripornpanich, S., Chongviriyaphan, N., Manuyakorn, W., Matangkasombut, P. (2022). Zinc and vitamin C deficiencies associate with poor pulmonary function in children with persistent asthma. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 40(2), 103-110. <https://doi.org/10.12932/AP-100620-0878>.
- Suliburska, J., Cholik, R., Kocylowski, R., Bakinowska, E. (2024). Relationship between prepregnancy BMI and the concentrations of iron, calcium, and magnesium in serum and hair during the first trimester of pregnancy in women. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 83, 127388. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2024.127388>.
- Sundar, R., Rai, A. B., Kumar, J. N., Divakar, D. D. (2023). The role of Vitamin D as an adjunct for bone regeneration: A systematic review of literature. *The Saudi Dental Journal*, 35(3), 220-232. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2023.02.002>.
- Thorsen, M., Miroso, M., Skeaff, S., Goodman-Smith, F., Bremer, P. (2024). Upcycled food: How does it support the three pillars of sustainability? *Trends in Food Science & Technology*, 143, 104269. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.104269>.
- Tinrat, S., Chomnawang, M. T. (2024). Exploring local edible plants as potential prebiotic sources

- for their synbiotic applications. *LWT*, 213, 117063. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.117063>.
- Tseng, P. T., Zeng, B. Y., Zeng, B. S., Yeh, P. Y., Stubbs, B., Kuo, J. S., ..., Wu, C. C. (2024). The efficacy and acceptability of anti-inflammatory omega-3 polyunsaturated fatty acid supplements in sepsis management: A network meta-analysis of randomized controlled trials. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 202, 102392. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2024.102392>.
- United Nations Environment Programme. (2024). *Think Eat Save Tracking Progress to Halve Global Food Waste*. Available from: <https://www.unep.org/resources/publication/food-waste-index-report-2024>
- van Rooijen, M. A., Gerdessen, J. C., Claassen, G. D. H., de Leeuw, S. L. J. M. (2024). Optimizing household food waste: The impact of meal planning, package sizes, and performance indicators. *Resources, Conservation and Recycling*, 205, 107203. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2024.107559>.
- Yadav, M. K., Kumari, I., Singh, B., Sharma, K. K., Tiwari, S. K. (2022). Probiotics, prebiotics and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(2), 505-521. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11646-8>.
- Yang, Y., Fan, L., Zhang, B., Wu, G., Liu, J., Ma, C., Li, S., Huang, Y., Cheng, X., Koh, W. Y., Tan, T.-C. (2024). White tea extract exerts antioxidant properties and anti-ageing of *Drosophila melanogaster*. *Pharmacological Research - Natural Products*, 100, 136. <https://doi.org/10.1016/j.prenap.2024.100136>.
- Yilmaz, E., Kahveci, D. (2022). Consumers' purchase intention for upcycled foods: Insights from Turkey. *Future Foods*, 6, 100172. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100172>.
- Yu, F., Yuan, Q., Sheng, X., Liu, M., Chen, L., Yuan, X., Zhang, D., Dai, S., Hou, Z., Wang, Q., Ma, Q. (2024). Understanding carbon footprint: An evaluation criterion for achieving sustainable development. *Chinese Journal of Population, Resources and Environment*, 22(4), 367-375. <https://doi.org/10.1016/j.cjpre.2024.11.001>.
- Yu, X., Xiong, L., Zhao, S., Li, Z., Xiang, S., Cao, Y., Zhou, C., Dong, J., Qiu, J. (2023). Effect of lead, calcium, iron, zinc, copper and magnesium on anemia in children with BLLs $\geq 100 \mu\text{g/L}$. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 78, 127192. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2023.127192>.
- Zaky, A. A., Simal-Gandara, J., Eun, J. B., Shim, J. H., Abd El-Aty, A. M. (2022). Bioactivities, applications, safety, and health benefits of bioactive peptides from food and by-products: A review. *Frontiers in Nutrition*, 8, 815640. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.815640>.
- Zheng, B., Zhao, X., Ao, T., Chen, Y., Xie, J., Gao, X., Liu, L., Hu, X., Yu, Q. (2024). The role of bound polyphenols in the anti-obesity effects of defatted rice bran insoluble dietary fiber: An insight from multi-omics. *Food Chemistry*, 459, 140345. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.140345>.
- Wang, J., Yin, Y., Sun, S., Zhao, J., Tang, Y., Wang, Y., ..., He, Y. (2024). The effect of dietary changes on the water and carbon footprints in China. *Sustainable Production and Consumption*, 49, 276-288.
- Whittall, B., Warwick, S. M., Guy, D. J., Appleton, K. M. (2023). Public understanding of sustainable diets and changes towards sustainability: A qualitative study in a UK population sample. *Appetite*, 181, 106388. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2022.106388>.

MODERN EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİNİN BİTKİSEL PROTEİN İZOLATLARININ TEKNOFONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNE ETKİSİ**Harun Reşit ÖZDAL^{*1}, Emine NAKİLCİOĞLU²**¹ Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü İzmir/ Türkiye² Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İzmir/ Türkiye

Geliş / Received: 10.02.2025; /Kabul / Accepted: 12.05.2025; Online baskı / Published online: 26.05.2025

Özdal, H. R., Nakilcioğlu, E. (2025). Modern ekstraksiyon yöntemlerinin bitkisel protein izolatlarının teknofonksiyonel özelliklerine etkisi. GIDA (2025) 50 (3) 427-441 doi: 10.15237/ gida.GD25026

Özdal, H. R., Nakilcioğlu, E. (2025). *Effect of modern extraction methods on techno-functional properties of plant protein isolates*. GIDA (2025) 50 (3) 427-441 doi: 10.15237/ gida.GD25026

ÖZ

Bitkisel protein kaynaklarının önemi; hayvansal proteinlerin sağlık ve çevre üzerindeki etkileriyle olumlu bir alternatif oluşturmaları, insan nüfusunun artmasına bağlı olarak doğru ve dengeli beslenme için gerekli besin öğelerine olan talebin artması, bitki proteinlerinin sağlık üzerine olan olumlu etkileri ve özel beslenme alışkanlıklarının popülerlik kazanması, tarımının ekolojik ve sürdürülebilir olması gibi nedenlerden dolayı artmaktadır. Bitki materyallerinden protein ekstraksiyonunda kullanılan kimyasal ekstraksiyon metotları geleneksel metotlar olup ekonomik ve yüksek verimli olmaları nedeniyle tercih edilmektedirler. Fakat hayvansal proteinlerle kıyaslandığında hali hazırda düşük teknofonksiyonel özellikler sergileyen bitki proteinlerinin bu özelliklerini geliştirmekte yetersiz kalmaktadır. Gıda endüstrisinde proteinlerin teknofonksiyonel özellikleri birçok gıdanın prosesinde önem taşımaktadır. Bitki proteinlerine olan bu ilginin karşılanması ve bitki kaynaklı protein izolatlarının teknofonksiyonel özelliklerini geliştirecek modern ekstraksiyon metotlarında ön işlem uygulanması ve/veya geleneksel metotlarla kombine halde kullanılması, protein izolatlarının teknofonksiyonel özelliklerini geliştirmede oldukça önemlidir. Son zamanlarda gerçekleştirilen, çalışmalar modern ekstraksiyon metotlarının bitkisel protein izolatlarının teknofonksiyonel özelliklerini geliştirmede etkili olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Bitkisel proteinler, modern ekstraksiyon metotları, teknofonksiyonel özellikler

EFFECT OF MODERN EXTRACTION METHODS ON TECHNO-FUNCTIONAL PROPERTIES OF PLANT PROTEIN ISOLATES**ABSTRACT**

The importance of plant protein sources is increasing due to several factors: they offer a healthier and more environmentally friendly alternative to animal proteins, the growing human population raises the demand for nutrients essential for a balanced diet, and plant proteins have positive health effects. Additionally, special dietary habits are becoming more popular, and plant-based agriculture is ecological and sustainable. Chemical extraction methods used for extracting proteins from plant materials are traditional, preferred for being economical and efficient. However, they are inadequate for enhancing the techno-functional properties of plant proteins, which are generally lower than those of animal proteins. In the food industry, these properties are crucial in many food processes.

* Sorumlu yazar / Corresponding author

✉: harunresit.ozdal@tarimorman.gov.tr

☎: (+90) 232 846 1331

☎: (+90) 232 846 1107

Harun Reşit Özdal; ORCID no: 0009-0005-5844-7221

Emine Nakilcioğlu; ORCID no: 0000-0003-4334-2900

To meet the rising interest in plant proteins, applying pre-treatments and/or combining traditional methods with modern extraction techniques is important to improve these properties. Recent studies have shown that modern extraction methods can effectively enhance the techno-functional properties of plant-based protein isolates.

Keywords: Plant proteins, modern extraction methods, techno-functional properties

GİRİŞ

Pazar araştırma raporlarına göre, gıda endüstrisinin protein bazlı hammaddelere yönelik talebi 2024 yılında 83.7 milyar dolar seviyesindeyken, 2025 yılında 88.5 milyar dolarlık bir işlem hacmine ulaşması beklenmektedir. Yıllık ortalama %5.7'lik bir büyüme ile bu talebin 2034 yılı itibarıyla yaklaşık 145.7 milyar dolar seviyelerine yükselmesi öngörülmektedir (Anonymous, 2025). Yeterli ve dengeli beslenme için makro ve mikro besin öğelerinin insan vücuduna gıdalar yoluyla alınması gerekmektedir (Savarino vd., 2021). Proteinler insan vücudu için gerekli olan makro besin öğelerinden biridir ki içlerinde esansiyel aminoasitleri de barındırırlar. Protein kaynakları çeşitli olmakla birlikte elde edildiği kaynağa göre proteinlerin besinsel kalitesi, sindirilebilirliği, aminoasit profili ve biyoerişebilirliği gibi faktörler değişkenlik göstermektedir (Sá vd., 2020). Son zamanlarda bitkisel proteinlere olan ilgi; bitki proteinlerinin sağlık yararlarına yönelik bilincin artması, hayvansal proteinlerin maliyetlerinin bitkisel proteinlere kıyasla yüksek olması, geleneksel hayvancılığın ekosisteme verdiği zarar, dini değerlerle şekillenen tüketim tercihleri ve vejetaryen beslenmeye olan ilgi gibi sebeplerden dolayı artmaktadır (Ampofo ve Ngadi, 2022). Proteinler sadece besleyici değerleri yüzünden değil aynı zamanda içine kondukları gıdaların bazı kalite niteliklerini, teknofonksiyonel özellikleri sayesinde geliştirdikleri için de gıda endüstrisinde önemli bir hammaddedir (Loveday, 2020; De Angelis vd., 2024).

PROTEİNLERİN

TEKNOFONKSİYONEL ÖZELLİKLERİ

Proteinlerin teknofonksiyonel özellikleri çözünabilirlik, sıvı tutma kapasitesi, köpük oluşturma kapasitesi ve stabilitesi, emülsiyon oluşturma kapasitesi ve stabilitesi gibi özellikler olup bu teknofonksiyonel özellikler gıda endüstrisinde birçok gıdanın işlenmesinde elzem bir öneme sahiptir (De Angelis vd., 2023).

Yumurta akı, süt proteini veya sığır jelatini gibi hayvansal proteinler sahip oldukları teknofonksiyonel özellikleri sayesinde gıda endüstrisinde yoğun bir şekilde kullanılırken, bitkisel proteinlerin fonksiyonel araçlar olarak endüstride kullanımına giderek artan bir ilgi vardır (Subaşı vd., 2022). Proteinlerin teknofonksiyonel özellikleri birçok endüstriyel gıda ürününün üretiminde kritik öneme sahiptir ve birçok faktörden etkilenirler (Malecki vd., 2021). Teknofonksiyonel özellikleri etkileyen faktörler iç ve dış faktörler olmak üzere iki ana gruba ayrılır. İç faktörleri aminoasit dizilimi ve kompozisyonu, molekülün yapısı, büyüklüğü ve reaktifliği ile hidrofobik/ hidrofilik yapıların birbirine oranı gibi özellikler oluştururken, proteinlerin saflığı, pH, iyonik güç, sıcaklık, molekül yapısı, hidrofobiklik ve hidrofiliklik oranı, ekstraksiyon metodu gibi faktörler dış faktörler arasında sayılabilir (Nasrabadi ve ark., 2021).

Çözünabilirlik

Çözünabilirlik proteinler için en kritik teknofonksiyonel özelliklerden birisidir. Çünkü birçok gıda uygulamasında protein çözünürlüğünün yüksek olması beklenirken, köpük oluşturma, emülsifikasyon ve jel oluşturma, proteinlerin çözünürlükleri ile doğrudan bağlantılıdır (Vogelsang-O'Dwyer vd., 2022; Gao vd., 2024). Çözünabilirlik özellikle süt alternatifi yüksek proteinli içeceklerin üretimi için de önemlidir. Bitki proteinlerinin çözünürlüğü hayvansal proteinlerin çözünürlükleri ile kıyaslandığında düşük kalmaktadır. Çözünürlükteki bu düşüklük bitki proteinlerinin fonksiyonel bir bileşen olarak kullanımını sınırlandırmaktadır (Sim vd., 2021).

Proteinlerin çözünürlüğü, itici ve çekici kuvvetler de dahil olmak üzere protein-protein ve protein-su etkileşimlerinin dengesine bağlıdır. Doğal olarak küresel yapıdaki proteinler tipik olarak daha hidrofobik bölgelerin merkeze gömüldüğü, daha hidrofilik bölgelerin ise yüzeyde açığa çıktığı bir

konformasyonda katlanırlar (McClements vd., 2021). Proteinin yapısı, yüzeye maruz kalan polar ve apolar grupların oranı, proteinler arasındaki etkileşimler gibi faktörler çözünürlüğü etkilemektedir (Ptak-Kaczor vd., 2021). Örneğin

benzer yüklü proteinler birbirini iterek çözünürlüğü artırırken, zıt yüklü proteinler birbirlerini çekerek kümeleşmeye sebep olarak çözünürlüğü düşürmektedir (Sathe vd., 2018; Grossmann ve McClements, 2023).

Çizelge 1. Proteinlerin teknofonksiyonel özellikleri ve bu teknofonksiyonel özelliklerin etki şekli ile etki ettiği gıdalar (Kostic vd., 2015; Beniwal ve Das, 2023)

Teknofonksiyonel özellik	Etki şekli	Hangi gıdalarda
Çözünebilirlik	Protein çözünürlüğü	İçecekler
Su emilimi ve bağlanması	Suyun hidrojen bağı, suyun hapsolmesi	Et, sos, sosis, ekmek, kek vb.
Viskozite	Koyuluk, su bağlama, akışa direnç	Çorba, soslar
Jelleşme	Protein matrisi oluşumu ve düzenlenmesi	Et, peynir
Kohezyon ve adsorpsiyon	Protein yapıştırıcı işlev görür	Et, sos, sosis, fırınlanmış ürünler, pasta
Elastiklik	Glutende hidrofobik bağlanma, jeldeki disülfid bağları	Etler, fırıncılık ürünleri
Emülsifikasyon	Yağ emülsiyonlarının oluşumu ve stabilizasyonu	Sosis, sucuk, çorba, kek
Yağ absorpsiyonu	Serbest yağları bağlama	Et, sos
Köpük oluşturma	Gazı hapsedme ve stabilizasyon	Çırpılmış soslar, şifon tatlılar vb.

Emülsifikasyon kapasitesi

Birbiri içinde çözünmeyen sıvıların karışımına emülsiyon, bu karışımın oluşumuna ise emülsifikasyon denmektedir. Proteinlerin emülsifiye edici özellikleri, soslar, sosisler, içecekler ve dondurma gibi gıdalarda, yapı, stabilite ve duysal özellikleri etkilemekte önemli bir rol oynamaktadır (Aryee vd., 2018; Zhang vd., 2023). Proteinler, karışmayan iki faz arasındaki arayüz gerilimini azaltarak emülsiyonları stabilize ederler. Böylece genel serbest enerjiyi düşürerek, ayrışmaya ve kümeleşmeye karşı bir direnç oluştururlar (Henao-Ardila vd., 2024; Liu vd., 2024). Emülsiyonda, küresel yapıdaki proteinler, daha hidrofilik bölgelerinin su fazına, daha hidrofobik bölgelerinin ise yağ fazına uzandığı bir konformasyonda düzenlendiğinde, emülsiyon stabilitesi de artmaktadır (Kim vd., 2020). Emülsifikasyon genel olarak proteinlerin çözünürlüğü ile ilgili olduğu gibi hidrofobik ve hidrofilik bölgelerin uygun bir dengesine ve dağılımına da bağlıdır (McClements vd., 2017; Ricardo vd., 2021).

Köpük oluşturma özelliği

Köpük katı veya sıvı bir faz ile çevrili hava kabarcıkları olarak tanımlanabilir. Köpük

oluşumu ve kararlılığı, kek, dondurma, köpürtülmüş sütli içecekler, çırpılmış soslar ve soslar gibi birçok gıda uygulamasında önemlidir ve bu gıdaların çoğu yüzey aktif madde olarak protein içerirler (Liu vd., 2019; Nasrollahzadeh vd., 2021). Proteinler, arayüz gerilimini azaltarak, hava-su arayüzünde viskoelastik bir tabaka oluşturur ve köpükleri stabilize ederler. Köpük oluşumu ve stabilitesini etkileyen protein özellikleri emülsiyonları etkileyenlerle benzerdir (Delahaije ve Wierenga, 2022). Proteinlerin çözünürlükleri, yapı içindeki hidrofilik ve hidrofobik grupların oranı ve molekülün; boyutu, katlanma konfigürasyonu, yükü gibi etkenler köpük oluşumunu ve stabilitesini etkilemektedir (Amagliani vd., 2021).

Jel oluşturma özelliği

Jelleşme, işlenmiş etler, et analogları, peynir, yoğurt, tofu ve tatlılar dahil olmak üzere birçok gıda için önemli bir diğer teknofonksiyonel özelliktir (Maribao ve Gul, 2024). Jelleşme gıdanın tekstürel özelliklerini etkileyen önemli bir teknofonksiyonel özelliktir ki et ve peynir gibi belirli bir tekstüre sahip gıda ürünlerinin, duysal özelliklerini geliştirmek için bitki proteinlerinin kullanımına yönelik çalışmalara giderek artan bir

ilgi vardır (Kyriakopoulou vd., 2021; Ma vd., 2023).

Proteinlerin jelleşmesi; ısı, kimyasal yöntemler ve enzim uygulamaları ile indüklenebilir. Yöntemler ve koşullar hem jel yapısını hem de sonraki jelleşme özelliklerini (dayanıklılık ve stabilite gibi) etkiler. Bu jellerin (üç boyutlu yapıları nedeniyle) su ve lipitler, şekerler gibi çeşitli diğer bileşenleri tutma kapasitesi, yeni gıda ürünlerinin geliştirilmesinde kullanıma potansiyellerini artırmaktadır (Bessada vd., 2019; Khalesi vd., 2024).

Su ve yağ tutma kapasitesi

Su tutma kapasitesi, 1 g proteinin absorbe edebileceği maksimum suyu ifade ederken yağ tutma kapasitesi 1 g proteinin absorbe edebileceği maksimum yağı ifade etmektedir. Su/yağ tutma kapasitesi önemli bir teknofonksiyonel özelliktir ve gıdanın duyuşal özellikleri, dokusu, ağız hissi, lezzeti ile doğrudan alakalıdır. Yağ tutma kapasitesi protein- yağ etkileşim bölgesindeki apolar aminoasitler ile alakalı iken su tutma kapasitesi protein- su etkileşim bölgesindeki polar aminoasitler ile alakalıdır (Shevkani vd., 2024).

BİTKİ PROTEİNLERİNİ EKSTRAKTE ETMEDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Bitki proteinlerinin ekstraksiyonu temel olarak üç adımdan oluşur. Yağı uzaklaştırma, ekstraksiyon ve kurutma (Tang vd., 2024). Yağı uzaklaştırma adımında petrolü eter, n-hekzan, ve n-pentan gibi çözücüler kullanılırken, sonraki adım olan proteinlerin ayrıştırılması fiziksel ve kimyasal ekstraksiyon olarak ikiye ayrılmaktadır. Fiziksel fraksiyonda hava akımı ile sınıflandırma ve öğütme ya da bunların kombine olarak kullanılması ile proteinlerin parçacık boyutlarına göre sınıflandırılması esastır (Shah vd., 2024). Kimyasal metotta ise; tuz, asit ya da alkali ekstraksiyon yöntemlerinden biri kullanılarak hammaddedeki proteinin çözündürülmesi sonrasında ise çöktürülmesi sağlanır (Tang vd., 2024). Sulu ekstraksiyonda tuzlar, iyonik ve iyonik olmayan deterjanlar, etanol, metanol, tamponlar/güçlü denatürantlar gibi organik bazlı çözücüler ile ortam pH'sının ayarlanması için potasyum hidroksit, sodyum hidroksit gibi alkali

çözeltiler kullanılır (Jayaprakash vd., 2022; Hadidi vd., 2023). Organik çözücüler protein ekstraksiyonunda ve protein çöktürme tekniklerinde önemli bir rol oynar ve yüksek saflıkta protein eldesi sağlarlar. Organik çözücülerden biri olan su birçok protein kaynağından protein eldesinde kullanılırken, polar olmayan proteinlerin eldesinde ise etanol, bütanol, aseton gibi çözücüler kullanılır (Chen vd., 2019).

Kimyasal metotlar, ekstraksiyon verimi ve ürün kalitesini artırmak amacıyla diğer ekstraksiyon metotları ile kombine kullanılabilmektedir (Bose vd., 2019). Süper kritik akışkan ekstraksiyonu, yüksek basınç uygulaması, ultrason ve mikrodalga destekli ekstraksiyon, vurgulu elektrik alan destekli ekstraksiyon, enzim destekli ekstraksiyon vb., ekstraksiyon yöntemleri ekstraksiyon verimini artırmak için kullanıldığı gibi protein izolatlarının teknofonksiyonel özelliklerini geliştirmek ve proteinlerin besinsel niteliğini artırmak için de kullanılmaktadır (Lee vd., 2017; Suárez-Hernández vd., 2024).

Ultrason destekli ekstraksiyonda (UDE), bir prop yardımı ile oluşturulan ses dalgaları bitki hücresi duvarını parçalayarak hücre içeriğinin ortama yayılmasını sağlar. Yüksek ekstraksiyon verimi sağlaması, ekstraksiyon süresini kısaltması, az miktarda çözücüye ihtiyaç duyması ve diğer ekstraksiyon tekniklerine kıyasla çevre dostu olması gibi avantajlara sahip olsa da (Yusoff vd., 2022); yüksek ultrason gücüne bağlı olarak ortamda meydana gelen ısınma ve kavitasyon, bazen protein agregasyonuna, hidrolizasyonuna ve denaturasyonuna sebep olarak hem verime hem de teknofonksiyonel özelliklere etki etmektedir (Wang vd., 2021).

Enzim destekli ekstraksiyon (EDE), enzimlerin hücre duvarı polisakkaritlerini hidrolize etmesi ile hücre duvarı geçirgenliğinin artması sonucunda ekstraksiyon sürecinde hedeflene bileşenlerin verimini artıran bir yöntemdir. Bu ekstraksiyon metodu da çevre dostu olması, yüksek ekstraksiyon verimi, düşük toksisite gibi avantajlara sahip olsa da (Shinwari, 2021); bazen saf enzimlerin maliyeti ekstraksiyon maliyetini yükseltmektedir. Bu ekstraksiyon yönteminde en

yaygın kullanılan enzimler proteaz, pektinaz, selüloz enzimleridir (Fan vd., 2022).

Vurgulu elektrik alan destekli ekstraksiyonda (VEADE) iki elektrot arasında tutulan bitki materyaline birkaç mikro saniyeden mili saniyeye kadar kısa bir süre boyunca 10–80 kV/cm aralığında yüksek elektrik alanı yoğunluğuna sahip bir dizi darbe uygulanır. Hücreye yüksek miktarda elektrik alanı uygulandığında, hücre zarının iyonlar, DNA ve proteinler gibi moleküller için geçirgenliği artarak ekstraksiyon sağlanır. Termal olmayan bir yöntem olarak ısıya duyarlı maddelerin ekstraksiyonunda etkin bir ekstraksiyon yöntemidir. Düşük enerji gereksinimi ve zamandan tasarruf sağlaması avantajları arasında görülse de (Naliyadhara vd., 2022); bu yöntem, diğer geleneksel olmayan yöntemlerle karşılaştırıldığında daha yüksek protein verimi elde etmede nispeten yetersizdir ve verimi artırmak için değişkenlerin optimizasyona ihtiyaç duyar (Golberg vd., 2016).

Mikrodalgalar, 300 MHz ile 300 GHz arasında değişen frekansa sahip iyonlaştırıcı olmayan elektromanyetik radyasyonlardır ve dipol rotasyon ile iyonik iletimi birleştirerek numuneyi ısıtarak bitki matrisinin hücre duvarında bulunan hidrojen bağlarının bozulmasına yol açarlar. Bu bozulma, hücre duvarının gözenek açıklığını artırarak çözücünün hücreye daha iyi sızmasını ve hücre içi bileşiklerin etkili bir şekilde salınmasını kolaylaştırır. Mikrodalga destekli ekstraksiyon (MDE), geleneksel termal ekstraksiyona kıyasla homojen ısıtma, iyileştirilmiş ekstraksiyon oranı, daha az çözücü tüketimi ve daha kısa ekstraksiyon süresi (Lee vd., 2017) gibi çeşitli avantajlara sahiptir ve bu da onu katı-sıvı ekstraksiyonu için uygun bir ekstraksiyon metodu haline getirmektedir. Ancak mikrodalga ile oluşan termal enerji, ısıya duyarlı bileşenlerin ekstraksiyonunu zorlaştırmakta ve ekstraksiyon verimini düşürmektedir.

Yüksek basınç destekli ekstraksiyonda (YBDE), çözücü basıncı 100 ila 1000 MPa aralığında değişirken bitki hücresinin içi ile çevresi arasındaki basınç farkı artar. Bunun sonucunda hücre deformasyona uğrar ve hücre duvarı geçirgenliği

artar. Çözücü, hasarlı hücre duvarı ve hücre zarından hücreye nüfuz ederek çözünür bileşiklerin kütle transferini artırır, ekstraksiyonunu sağlar (Grunovaité vd., 2016). Bu ekstraksiyon yönteminde sıcaklık kullanılmadığı için termal degradasyon gözlenmemekte ve bu onu biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonu için uygun bir ekstraksiyon metodu yapmaktadır (Alexandre vd., 2017).

EKSTRAKSİYON TEKNİĞİNİN TEKNOFONKSİYONEL ÖZELLİKLERE ETKİSİ

Proteinlerin teknofonksiyonel özelliklerini etkileyen birçok unsur vardır. Belirli bir teknofonksiyonel özelliği geliştirmek için protein izolasyonunda prosedürü etkileyen hem iç hem dış faktörlerde değişime gidilebilir. Bu faktörlerden bir tanesi de ekstraksiyon metodudur. Ekstraksiyon metodu ile teknofonksiyonel özellikler arasındaki ilişkiyi araştıran birçok çalışma bulunmaktadır. Örneğin Hussain vd., (2021) patatesten protein izolatu elde etmek için UDE ön işlemi uyguladıkları çalışmalarında, ultrason gücü uygulama süresinin (10, 15, 20 dk) teknofonksiyonel özelliklere etkisini incelemişlerdir. Çalışmada protein çözünürlüğü, ultrason uygulama süresine paralel olarak artış göstermiş, en yüksek %93 olarak ölçülmüştür. Ultrason uygulama süresi arttıkça köpük oluşturma kapasitesi, emülsiyon aktivite indeksi ve stabilitesinde de artış gözlenmiştir. Yine UDE metodu ile zeytin yaprağından protein ekstraksiyonunu ve ekstraksiyon metodunun teknofonksiyonel özelliklere etkisini inceleyen başka bir çalışmada (Ortega vd., 2024), ultrason gücünün STK'de ve YTK'de anlamlı bir fark yaratmadığı, ancak köpük kapasitesi ve stabilitesinin UDE ile daha üstün sonuçlar verdiği görülmüştür. Emülsiyon aktivite indeksinin ultrason desteği ile arttığı, emülsiyon stabilitesinin ise tam tersi olarak klasik metotlarda daha yüksek olduğu görülmüştür.

Kiona protein izolatlarına, yüksek basınç homojenizasyon uygulamasının (YBH) (0, 10, 30, 50 MPa) teknofonksiyonel özelliklere etkilerinin incelendiği bir çalışmada (Luo vd., 2022), partikül boyutunun basınç arttıkça küçüldüğü, bunun

özellikle 30, 50 MPa basınç uygulamasında gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Partikül boyutunun küçülmesi ile çözünürlüğün arttığı, uygulanan basınca bağlı olarak da köpük yapma kapasitesinin/stabilitesinin ve emülsiyon aktivite indeksinin geliştiği görülmüştür. YBH uygulamasının kullanıldığı başka bir çalışmada (Saricaoglu, 2020), farklı basınç uygulamalarının mercimekten elde edilen protein homojenizatları üzerine etkileri incelenmiştir. Uygulanan basınç miktarına bağlı olarak su/yağ tutma, köpük oluşturma kapasitesi ve stabilitesi ile emülsiyon aktivite indeksi kontrol örneklerine kıyasla tüm teknofonksiyonel özelliklerde gelişme gözlenmiştir.

Pirinç kepeğinden MDE, EDE ve klasik alkali ekstraksiyon ile elde edilen protein izolatlarında, ekstraksiyon tekniğinin teknofonksiyonel özellikler üzerine etkileri inceleyen Phongthai ve ark., (2016), en yüksek protein çözünürlüğünü EDE uygulanan örneklerde en düşük çözünürlüğü ise MDE yöntemi kullanılan hidrolizatlarda görülmüştür. Çalışmada en düşük su/yağ tutma kapasitesi, EDE'a tabi tutulmuş örneklerde görülürken bunun sebebinin parçalanma sonucu oluşan küçük moleküllerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Zhang vd., (2017), kanola tohumlarından protein ekstraksiyonu yaptıkları çalışmada, ekstraksiyon metodu olarak vurgulu elektrik alan destekli ekstraksiyon (VEADE) metodunu kullanmışlardır. VEADE uygulamasının ekstraksiyon verimine ve elde edilen izolatların teknofonksiyonel özelliklerine etkilerini inceledikleri çalışmada, elektrik alan uygulamasının belirli bir süreye kadar uygulanmasının kontrol numunelerine göre çözünürlüğü artırdığı görülürken, farklı elektrik alan seviyelerinin su/yağ tutma kapasitesi, emülsiyon ve köpük kapasitesi gibi teknofonksiyonel özellikleri geliştirdiği tespit edilmiştir.

Mateo-Roque vd., (2024), süperkritik CO₂ ekstraksiyonu ile yağı uzaklaştırılmış domates tohumlarından protein ekstrakte ettikleri çalışmada, yağı uzaklaştırma evresinde süperkritik CO₂ kullanılmasının teknofonksiyonel özelliklere olan etkisini incelemişlerdir. Süperkritik CO₂ ile yağı uzaklaştırılan örneklerin çözünürlük ve emülsiyon gibi teknofonksiyonel özellikleri, özellikle su/yağ tutma kapasitesi, hekzan ile muamele edilenlere kıyasla daha üstün bulunmuştur.

Çizelge 2. Ekstraksiyon metodunun teknofonksiyonel özelliklere etkisini araştıran bazı çalışmalar.

Bitki materyali	Ekstraksiyon metodu	Ekstraksiyon değişkenleri	Teknofonksiyonel özellikler	Kaynak
Yerfıstığı unu	MDE ¹ /UDE ² /alkali ekstraksiyonu	Optimum mikrodalga gücü ve süresi (725 W ve 8 dak.) Ultrason gücü ve süresi (%100, 15 dak.)	Verim artışı: MDE (%77) UDE (%136) Çözünürlük (%):MDE (26.55) UDE (27.79) alkali eks. (83.61) STK ^a (g/g): MDE (6.86) UDE (5.33) alkali eks. (0.66) YTK ^b (g/g): MDE (3.51) UDE (3.55) alkali eks. (3.91) KOK ^c (%):MDE (147) UDE (169) alkali eks. (197) EAK ^c (%):MDE (100) UDE (90.54) alkali eks. (95)	Ochoa-Rivas vd., (2017)
Susam tohumu	YBH ³	0, 50, 100, 150 MPa basınç	En yüksek STK ^a (2.2 g/g), YTK ^b (1.91 g/g), EAI ^d 64.63 (m ² /g), KOK ^c (%191.66) ile 100 MPa basınçta uygulanan örneklerde tespit edilmiştir.	Baskıncı ve Gul (2023)

Ekstraksiyon metotlarının teknofonksiyonel özellikler üzerine etkileri

Kenevir tohumu	UDE ²	Optimum (20 kHz) 400 W 12 dak.	Kontrol örneklerine kıyasla ultrasona tabi tutulan örneklerde çözünürlük 3.7 kat artışla %58.9 EAI ^d 1.7 kat artışla 26 m ² /g ve ESI ^f 1.5 kat artış ile 32.3 dk olarak ölçülmüştür.	Liu vd., (2022)
Mercimek	YBH ³	0, 50, 100, 150 MPa basınç	Bulgular, özellikle 100 MPa'ya kadar YBH işleminin, disülfür bağlı alt birimleri daha düşük moleküler ağırlıklı fraksiyonlara bölerek mercimek proteinlerinin açılmasını sağladığını göstermiştir. YBH işlemi, mercimek protein izolatlarında köpürme ve emülsifiye etme özelliklerini önemli ölçüde artırmış, pH 2 ve 4.5 seviyelerinde 50 MPa' ya kadar basınçlarda optimum sonuçlar elde edilmiştir.	Parlak vd., (2024)
Maş fasulyesi	Yüksek yoğunluklu VEAE ⁴	25 kV/cm güç 0, 100, 200, 300, 400 vurgu	25 kV/cm güç ve 300 vurguda çözünürlük % 11.41, EAI 12.46 m ² /g, ESI ise 75.29 dak. olarak bulunmuştur. Ayrıca yüzey hidrofobikliği ve toplam sülfidril miktarı elektrik alan ile artarak en yüksek seviyeye 300 vurguda ulaşmıştır. Yüzey hidrofobikliğindeki değişim protein konformasyonundaki değişim ile açıklanabilir ki bu değişimler teknofonksiyonel özelliklerin gelişimine katkı sağlarlar.	Gulzar vd., (2023)
Pirinç kepeği (iki ayrı cins)	VEAE ⁴	2.3 kV güç 25 dak.	Ekstraksiyon veriminde kontrol örneklerine göre %20.71-22.8 oranlarında artış görülmüştür. Yine kontrol örneklerine göre elektrik alan uygulanan örneklerde YTK ^b %20.29-22.6 oranında, emülsifikasyon özellikleri % 3.3-12.0 oranında, Köpük oluşturma yeteneği ve köpük stabilitesi 1.8 ile 2.9 kat arttığı tespit edilmiştir.	Thongkong vd., (2023)
Börülce	UDE ²	100/200 W (0, 5, 10, 15, 20 dk)	En yüksek, çözünürlük (%68.85), STK ^a (3.69 g/g) , KOK ^c (%83.74) ve köpük stabilitesi (%60.01) ile 10 dk, YTK ^b (5.16 g/g) ise 15 dk 200 W ultrason uygulanan örneklerde görülmüştür. Tüm teknofonksiyonel özellikler kontrol örneklerine kıyasla UDE tabi tutulan örneklerde gelişmiştir.	Loushigam vd., (2023)

Kinoa kepeği	EDE ⁵	Selüloz ve ksilanaz enzimleri	Enzim işlemine tabi tutulan örneklerde ekstraksiyon verimi %3.13'den %7.72'ye yükselmiş, çözünürlük %89.6, KOK %35, köpük stabilitesi 76.4 dakika, emülsiyon kapasitesi %7.6, stabilitesi ise 69 dakika olarak bulunmuştur.	Srinivasu ve Eligar, (2024)
Pinto fasulyesi	YBH ³	50, 100, 180 MPa basınç	En yüksek çözünürlük (%79.06), ESI ^f (100.26 dak.) ve KOK ^c (%87.47) 180 MPa basınç uygulanan örneklerde görülmüştür. Köpük stabilitesi bakımından kontrol örnekleri ile YBH uygulanan örnekler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. EAI ^d kontrol örneğine göre 50 MPa basınç ile artmış (13.81 m ² /g) ve sonrasında anlamlı bir değişim göstermemiştir.	Santos vd., (2024)
Bezelye	UDE ²	20 kHz, %25 güç, 10, 20, 30 dak.	Kontrol örnekleri ile kıyaslandığında KOK ^c ve stabilitesi emülsiyon aktivitesi ve stabilitesi sırası ile %157.5, 42.03, 46.25 ve 53.75 değerlerinden %182.5, 81.57, 72.50 ve 67.50 değerlerine artış göstermiştir. Kontrol numunelerinde partikül boyutu 161.9 nm iken ultrason ile muamele edilen örneklerde 92.9–131.1 nm olarak bulunmuştur.	Özkan vd., (2024)
Şeftali çekirdeği	Isı karıştırmalı ekstraksiyon, MDE ¹ , UDE ² , basınçlı sıvı ekstraksiyonu	Isı karıştırmalı ekstraksiyon (40 °C 10 dak.) MDE (40 °C 10 dak. 350 W güç) UDE (40 kHz, 40 °C 10 dak) basınçlı sıvı ekstraksiyonu (100 bar, 10 dak.)	En yüksek değerler çözünürlük için %4.97 ile UDE ² da, STK ^a için 5.72 g/g ile MDE ¹ da, YTK ^b için 8.01 g/g ile ısı karıştırmalı ekstraksiyonda, EAI ^d için 2.72 m ² /g ile basınçlı sıvı ekstraksiyonunda tespit edilmiştir. Emülsiyon stabilitesi için 28.02 dak. ve köpük stabilitesi için %54.85 sonuçları en yüksek olacak şekilde ısı karıştırmalı ekstraksiyonda görülmüştür.	Rudke vd., (2024)
Hardal otu	MDE ¹	425, 625, 800 W 60, 90, 120 saniye	En yüksek ekstraksiyon verimine (%46.73) 800 W mikrodalga gücünde 120 saniyede ulaşılmıştır. Optimum ekstraksiyon şartlarında protein izolatlarında, su tutma kapasitesi 2.48 (g/g), yağ tutma kapasitesi 0.66 (g/g), emülsiyon stabilitesi %57.89, köpük kapasitesi ise %83 olarak bulunmuştur.	Jahan vd., (2023)

Ekstraksiyon metotlarının teknofonksiyonel özellikler üzerine etkileri

Moringa bitkisi	UDE ²	20 kHz, 750 W (%25, 50, 75), süre (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 dak.)	Optimum ekstraksiyon şartları %75 güç ile 20 dak. ultrason gücü olarak belirlenmiştir. Ekstraksiyon verimi %39.12, çözünürlük %29.82, STK ^a 1.02 (g/g), YTK ^b 1.91(g/g), emülsiyon kapasitesi 75.93 (mg/mL) KOK ^c ise %24.23 olarak ölçülmüştür. Bütün teknofonksiyonel özellikler klasik alkali ekstraksiyonuna kıyasla ultrason desteği ile gelişme göstermiştir.	Fatima vd., (2023)
Susam küspesi	UDE ² , MDE ¹ , Düşük frekansta elektriksel alan destekli ekstraksiyon (DFEADE)	UDE (20 kHz, 750 W, 2.5-20 dak.), MDE (400-600 W, 2.5-20 dak.), DFEADE (60-100 W, 0-40 dak.)	Çalışmada en yüksek STK ^a ve YTK ^b 'yi sırası ile 3.69 (g/g) ve 3.15 (g/g) ile UDE ön işlemi uygulanan protein izolatları verirken, KOK ^c %78.44 ile en yüksek MDE ön işlemi uygulanan izolatlarda, EAI ^d ise en yüksek DFEADE uygulanan örneklerde kaydedilmiştir. En düşük jel oluşturma konsantrasyonu UDE ile ön işleme tabi tutulan izolatlarda görülürken, bunun sebebinin ultrason gücüne bağlı olarak proteinlerin partikül boyunun küçülmesi ve kısmen denatüre olmasından kaynaklığı düşünülmektedir. Köpük stabilitesi dışında, bütün teknofonksiyonel özelliklerin uygulanan ekstraksiyon ön işlemleri ile geliştiği belirtilmiştir.	Mathews vd., (2023)
Ketencik ve sadır otu tohumları	UDE ²	180 W, 20 kHz, 20 dak.	Her iki materyal içinde alkali ekstraksiyonuna kıyasla UDE uygulanan numunelerin bazı teknofonksiyonel özelliklerinde gelişmeler görülmüştür. Ketencik için UDE' da STK ^a 6.76 ve YTK ^b 10.44 g/g iken KOK ^c ve stabilitesi alkali yöntemle kıyasla UDE işlemi uygulanan örneklerde daha yüksek iken EAI ^d de UDE ile artmıştır.	Ngo ve Shahidi, (2021)

¹Mikrodalga destekli ekstraksiyon, ²Ultrason destekli ekstraksiyon, ³Yüksek basınç homojenizasyonu, ⁴Vurgulu elektrik alan destekli ekstraksiyon, ⁵Enzim destekli ekstraksiyon

^aSu tutma kapasitesi, ^bYağ tutma kapasitesi, ^cKöpük oluşturma kapasitesi, ^dEmülsiyon aktivite indeksi, ^eEmülsiyon aktivite kapasitesi, ^fEmülsiyon stabilite indeksi

SONUÇ

Proteinler değerli bir besin maddesi olmasının dışında sahip oldukları teknofonksiyonel özellikleri sayesinde gıdaların işlenmesi ve üretiminde büyük önem taşımaktadır. Ayrıca bu teknofonksiyonel özellikler gıdalarda yapısal temeller oluşturarak daha karmaşık yapıların

oluşumunu sağlamakta ve gıdaların duyuşal özelliklerine de doğrudan etki etmektedir. Su/yağ tutma kapasitesi, köpük oluşturma kapasitesi ve stabilitesi, emülsiyon oluşturma kapasitesi gibi teknofonksiyonel özellikler gıdanın fizikokimyasal özellikleri ile doğrudan alakalı olup gıda matriksindeki hidrofilik/ hidrofobik yapılar

arasındaki dengeden etkilenmektedir. Protein izolatlarının eldesinde kullanılan ekstraksiyon metotları da proteinlerin yapısal özelliklerini etkileyerek teknofonksiyonel özellikleri etkilemektedir. Alkali ekstraksiyon metodu en sık kullanılan geleneksel ekstraksiyon metodu olmakla birlikte proteinlerin sindirilebilirliğine olan etkisi, aminoasit yapılarına verdiği zarar ve tatta olumsuz etkiler yaratması gibi dezavantajlara sahiptir. Modern ekstraksiyon yöntemleri çevre dostu olmaları, düşük enerji tüketimleri ve daha az toksik kalıntı vermeleri gibi avantajlar sunarken, bitki protein izolatlarının teknofonksiyonel özelliklerini de geliştirmektedir. Hayvansal proteinlerle karşılaştırıldığında zayıf teknofonksiyonel özellikler gösteren bitkisel proteinlerin bu özelliklerinin geliştirilmesi, özel beslenme çeşitlerinin trend olduğu günümüzde sektörün ihtiyacını karşılama yolunda oldukça kıymetlidir. Proteinlerin karmaşık yapıları, birbirleri ve diğer yapılarla olan etkileşimleri ve tüm bu faktörlerin teknofonksiyonel özellikler üzerindeki etkileri düşünüldüğünde bu alanda yapılan çalışmalar henüz erken bir evrededir ve bitki proteinlerinin teknofonksiyonel özelliklerinin geliştirilmesi ve bu alanda karşılaşılan diğer sorunların giderilmesi için daha fazla araştırmaya gerek duyulmaktadır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

YAZAR KATKILARI

Makalenin derlenmesinde, yazılmasında ve yayınlanmasında tüm yazarlar katkı sağlamışlardır.

KAYNAKLAR

Alexandre, E. M., Araújo, P., Duarte, M. F., de Freitas, V., Pintado, M., Saraiva, J. A. (2017). High-pressure assisted extraction of bioactive compounds from industrial fermented fig by-product. *Journal of food science and technology*, 54: 2519-2531. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2697-2>

Amagliani, L., Silva, J. V., Saffon, M., Dombrowski, J. (2021). On the foaming properties of plant proteins: Current status and future opportunities. *Trends in Food Science &*

Technology, 118, 261-272. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.10.001>

Ampofo, J., Ngadi, M. (2022). Ultrasound-assisted processing: Science, technology and challenges for the plant-based protein industry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 84: 105955. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.105955>

Anonymous (2025). Protein Ingredients Market Size | Share and Trends 2025 to 2034. <https://www.precedenceresearch.com/protein-ingredients-market>. (Accessed: 15 April 2025)

Aryee, A. N. A., Agyei, D., Udenigwe, C. C. (2018). Impact of processing on the chemistry and functionality of food proteins. In *Proteins in food processing* (pp. 27-45). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00003-6>

Beniwal, A., Das, M. (2023). Protein: It's application in food industry. *Research Trends in Nutrition Science*. sl: Bumi Publishing, 1-25.

Bessada, S. M., Barreira, J. C., Oliveira, M. B. P. (2019). Pulses and food security: Dietary protein, digestibility, bioactive and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 93: 53-68. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.022>

Bose, U., Broadbent, J. A., Byrne, K., Hasan, S., Howitt, C. A., Colgrave, M. L. (2019). Optimisation of protein extraction for in-depth profiling of the cereal grain proteome. *Journal of proteomics*, 197: 23-33. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.02.009>

Chen, R., Wang, X. J., Zhang, Y. Y., Xing, Y., Yang, L., Ni, H., Li, H. H. (2019). Simultaneous extraction and separation of oil, proteins, and glucosinolates from *Moringa oleifera* seeds. *Food chemistry*, 300: 125162. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2024.100906>

De Angelis, D., Latrofa, V., Squeo, G., Pasqualone, A., Summo, C. (2024). Techno-functional, rheological, and chemical properties of plant-based protein ingredients obtained with dry fractionation and wet extraction. *Current Research in Food Science*, 9: 100906. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2024.100906>

- De Angelis, D., Opaluwa, C., Pasqualone, A., Karbstein, H. P., Summo, C. (2023). Rheological properties of dry-fractionated mung bean protein and structural, textural, and rheological evaluation of meat analogues produced by high-moisture extrusion cooking. *Current Research in Food Science*, 7: 100552. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100552>
- Delahaije, R. J., Wierenga, P. A. (2022). Hydrophobicity enhances the formation of protein-stabilized foams. *Molecules*, 27(7): 2358. <https://doi.org/10.3390/molecules27072358>
- Fan, L., Fan, W., Mei, Y., Liu, L., Li, L., Wang, Z., Yang, L. (2022). Mechanochemical assisted extraction as a green approach in preparation of bioactive components extraction from natural products-A review. *Trends in Food Science & Technology*, 129: 98-110. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.09.009>
- Fatima, K., Imran, M., Ahmad, M. H., Khan, M. K., Khalid, W., Al-Farga, A., Eskandrani, A. A. (2023). Ultrasound-assisted extraction of protein from Moringa oleifera seeds and its impact on techno-functional properties. *Molecules*, 28(6): 2554. <https://doi.org/10.3390/molecules28062554>
- Gao, K., Rao, J., Chen, B. (2024). Plant protein solubility: A challenge or insurmountable obstacle. *Advances in colloid and interface science*, 324: 103074. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.103074>
- Golberg, A., Sack, M., Teissie, J., Pataro, G., Pliquet, U., Saulis, G., Frey, W. (2016). Energy-efficient biomass processing with pulsed electric fields for bioeconomy and sustainable development. *Biotechnology for biofuels*, 9: 1-22. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0508-z>
- Grossmann, L., McClements, D. J. (2023). Current insights into protein solubility: A review of its importance for alternative proteins. *Food Hydrocolloids*, 137: 108416. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108416>
- Grunovaitė, L., Pukalskienė, M., Pukalskas, A., Venskutonis, P. R. (2016). Fractionation of black chokeberry pomace into functional ingredients using high pressure extraction methods and evaluation of their antioxidant capacity and chemical composition. *Journal of Functional Foods*, 24: 85-96. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.03.018>
- Gulzar, S., Tagrida, M., Patil, U., Ma, L., Zhang, B., Benjakul, S. (2023). Mung bean protein isolate treated with high-intensity pulsed electric field: characteristics and its use for encapsulation of Asian seabass oil. *Journal of Microencapsulation*, 40(5): 330-344. <https://doi.org/10.1080/02652048.2023.2198030>
- Gültekin Subaşı, B., Vahapoğlu, B., Capanoglu, E., Mohammadifar, M. A. (2022). A review on protein extracts from sunflower cake: Techno-functional properties and promising modification methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(24): 6682-6697. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1904821>
- Hadidi, M., Aghababaei, F., McClements, D. J. (2023). Enhanced alkaline extraction techniques for isolating and modifying plant-based proteins. *Food Hydrocolloids*, 145(5): 109132. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109132>
- Henao-Ardila, A., Quintanilla-Carvajal, M. X., Moreno, F. L. (2024). Emulsification and stabilization technologies used for the inclusion of lipophilic functional ingredients in food systems. *Heliyon*, 10(11): e32150. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e32150>
- Hussain, M., Qayum, A., Zhang, X., Hao, X., Liu, L., Wang, Y., Li, X. (2021). Improvement in bioactive, functional, structural and digestibility of potato protein and its fraction patatin via ultrasonication. *Lwt*, 148: 111747. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111747>
- Jahan, K., Fatima, S., Osama, K., Younis, K., Yousuf, O. (2023). Boosting protein yield from mustard (Brassica juncea) meal via microwave-assisted extraction and advanced optimization methods. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13(17): 16241-16251. <http://dx.doi.org/10.1007/s13399-023-04662-3>
- Jayaprakash, G., Bains, A., Chawla, P., Fogarasi, M., Fogarasi, S. (2022). A narrative review on rice proteins: Current scenario and food industrial

- application. *Polymers*, 14(15): 3003. <https://doi.org/10.3390/polym14153003>
- Kim, W., Wang, Y., Selomulya, C. (2020). Dairy and plant proteins as natural food emulsifiers. *Trends in Food Science & Technology*, 105: 261-272. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.012>
- Khalesi, M., Glenn-Davi, K., Mohammadi, N., FitzGerald, R. J. (2024). Key factors influencing gelation in plant vs. animal proteins: A comparative mini-review. *Gels*, 10(9): 575. <https://doi.org/10.3390/gels10090575>
- Kostić, A. Ž., Barać, M. B., Stanojević, S. P., Milojković-Opšćenica, D. M., Tešić, Ž. L., Šikoparija, B., Pešić, M. B. (2015). Physicochemical composition and technofunctional properties of bee pollen collected in Serbia. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1): 301-309. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.031>
- Kyriakopoulou, K., Keppler, J. K., van Der Goot, A. J. (2021). Functionality of ingredients and additives in plant-based meat analogues. *Foods*, 10(3): 600. <https://doi.org/10.3390/foods10030600>
- Lee, S. Y., Show, P. L., Ling, T. C., Chang, J. S. (2017). Single-step disruption and protein recovery from *Chlorella vulgaris* using ultrasonication and ionic liquid buffer aqueous solutions as extractive solvents. *Biochemical Engineering Journal*, 124: 26-35. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.04.009>
- Liu, C., Damodaran, S., Heinonen, M. (2019). Effects of microbial transglutaminase treatment on physiochemical properties and emulsifying functionality of faba bean protein isolate. *Lwt*, 99: 396-403. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.003>
- Liu, X., Wang, M., Xue, F., Adhikari, B. (2022). Application of ultrasound treatment to improve the technofunctional properties of hemp protein isolate. *Future Foods*, 6: 100176. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100176>
- Liu, Y., Wu, Q., Zhang, J., Yan, W., Mao, X. (2024). Food emulsions stabilized by proteins and emulsifiers: A review of the mechanistic explorations. *International Journal of Biological Macromolecules*, 261(1): 129795. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129795>
- Loushigam, G., Shanmugam, A. (2023). Modifications to functional and biological properties of proteins of cowpea pulse crop by ultrasound-assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 97: 106448. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106448>
- Luo, L., Cheng, L., Zhang, R., Yang, Z. (2022). Impact of high-pressure homogenization on physico-chemical, structural, and rheological properties of quinoa protein isolates. *Food Structure*, 32: 100265. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2022.100265>
- Loveday, S. M. (2020). Plant protein ingredients with food functionality potential. *Nutrition Bulletin*, 45(3): 321-327. <https://doi.org/10.1111/nbu.12450>
- Ma, Y., Chen, F. (2023). Plant protein heat-induced gels: Formation mechanisms and regulatory strategies. *Coatings*, 13(11): 1899. <https://doi.org/10.3390/coatings13111899>
- Malecki, J., Muszyński, S., Sołowiej, B. G. (2021). Proteins in food systems—bionanomaterials, conventional and unconventional sources, functional properties, and development opportunities. *Polymers*, 13(15): 2506. <https://doi.org/10.3390/polym13152506>
- Maribao, I. P., Gul, O. (2024). Effect of high-pressure homogenization pretreatment on gelation behavior and physicochemical, rheological and structural properties of sesame protein isolate with glucono-δ-lactone. *Food Hydrocolloids*, 155: 110240. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.110240>
- Mateo-Roque, P., Morales-Camacho, J. I., Jara-Romero, G. J., Rosas-Cárdenas, F. D. F., Huerta-González, L., Luna-Suárez, S. (2024). Supercritical CO₂ treatment to modify technofunctional properties of proteins extracted from tomato seeds. *Foods*, 13(7): 1045. <https://doi.org/10.3390/foods13071045>
- Mathews, A., Tangirala, A. S., Kumar, S., Anandharaj, A., Rawson, A. (2023). Extraction

- and modification of protein from sesame oil cake by the application of emerging technologies. *Food Chemistry Advances*, 2: 100326. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100326>
- McClements, D. J., Bai, L., Chung, C. (2017). Recent advances in the utilization of natural emulsifiers to form and stabilize emulsions. *Annual review of food science and technology*, 8(1): 205-236. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030216-030154>
- McClements, D. J., Grossmann, L. (2021). The science of plant-based foods: Constructing next-generation meat, fish, milk, and egg analogs. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(4): 4049-4100. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12771>
- Naliyadhara, N., Kumar, A., Girisa, S., Daimary, U. D., Hegde, M., Kunnumakkara, A. B. (2022). Pulsed electric field (PEF): Avant-garde extraction escalation technology in food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 122: 238-255. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.02.019>
- Nasrabadi, M. N., Doost, A. S., Mezzenga, R. (2021). Modification approaches of plant-based proteins to improve their techno-functionality and use in food products. *Food Hydrocolloids*, 118: 106789. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106789>
- Nasrollahzadeh, M., Nezafat, Z., Shafiei, N. (2021). Proteins in food industry. *Biopolym.-Based Met. Nanopart. Chem. Sustain. Appl*, 2: 97-136. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-89970-3.00003-2>
- Ngo, N. T. T., Shahidi, F. (2021). Functional properties of protein isolates from camelina (*Camelina sativa* (L.) Crantz) and flaxseed (*sophia*, *Descurainis sophia* L.) seed meals. *Food Production, Processing and Nutrition*, 3: 1-10. <http://dx.doi.org/10.1186/s43014-021-00076-8>
- Ochoa-Rivas, A., Nava-Valdez, Y., Serna-Saldivar, S. O., Chuck-Hernández, C. (2017). Microwave and ultrasound to enhance protein extraction from peanut flour under alkaline conditions: Effects in yield and functional properties of protein isolates. *Food and Bioprocess Technology*, 10: 543-555. <https://dx.doi.org/10.1007/s11947-016-1838-3>
- Ortega, M. L. S., Orellana-Palacios, J. C., Garcia, S. R., Rabanal-Ruiz, Y., Moreno, A., Hadidi, M. (2024). Olive leaf protein: Extraction optimization, in vitro digestibility, structural and techno-functional properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 256: 128273. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128273>
- Ozkan, G., Tataroglu, P., Gulec, S., Capanoglu, E. (2024). Modification of pea protein isolates by high-intensity ultrasonication: Functional, structural and nutritional properties. *Food Chemistry Advances*, 5: 100793. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100793>
- Parlak, M. E., Sarıcaoglu, F. T., Yilmaz, M. T. (2024). Application of high-pressure homogenization-assisted pH-shift to enhance techno-functional and interfacial properties of lentil protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 157: 110425. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.110425>
- Phongthai, S., Lim, S. T., Rawdkuen, S. (2016). Optimization of microwave-assisted extraction of rice bran protein and its hydrolysates properties. *Journal of cereal science*, 70: 146-154. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.06.001>
- Ptak-Kaczor, M., Banach, M., Stapor, K., Fabian, P., Konieczny, L., Roterman, I. (2021). Solubility and aggregation of selected proteins interpreted on the basis of hydrophobicity distribution. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9): 5002. <https://doi.org/10.3390/ijms22095002>
- Ricardo, F., Pradilla, D., Cruz, J. C., Alvarez, O. (2021). Emerging emulsifiers: Conceptual basis for the identification and rational design of peptides with surface activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9): 4615. <https://doi.org/10.3390/ijms22094615>
- Rudke, C. R. M., Torres, T. M. S., Zielinski, A. A. F., Ferreira, S. R. S. (2024). Comparing green extraction methods for the recovery of protein-rich fraction from peach seeds (*Prunus persica*). *Food Hydrocolloids*, 153: 109991. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.011>

- 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>
- Santos, F. H., de Carvalho Oliveira, L., de Sousa Melo, D., Bakalis, S., Cristianini, M. (2024). Modification of protein concentrate from carioca bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by dynamic high-pressure technology: Structural and techno-functional properties. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 97: 103823. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2024.103823>
- Sathe, S. K., Zaffran, V. D., Gupta, S., Li, T. (2018). Protein solubilization. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 95(8): 883-901. <https://doi.org/10.1002/aocs.12058>
- Saricaoglu, F. T. (2020). Application of high-pressure homogenization (HPH) to modify functional, structural and rheological properties of lentil (*Lens culinaris*) proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 144: 760-769. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.034>
- Savarino, G., Corsello, A., Corsello, G. (2021). Macronutrient balance and micronutrient amounts through growth and development. *Italian journal of pediatrics*, 47(1): 109. <https://doi.org/10.1186/s13052-021-01061-0>
- Shah, H., Ahmed, L., Barry-Ryan, C. (2024). Ensuring compliance: A review of EU regulations and standards for incorporating legume and legume by-product proteins in food formulations. *Heliyon*, 10(21): e39821. <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e39821>
- Shevkani, K., Sharma, P., Singh, B., Kaur, A., Singh, N. (2024). Structural, techno-functional and nutraceutical properties of lentil proteins—a concise review. *International Journal of Food Science & Technology*, 59(10): 6875-6884. <http://dx.doi.org/10.1111/ijfs.17491>
- Shinwari, K. J. (2021). Emerging technologies for the recovery of bioactive compounds from saffron species. *Saffron*, 143-182. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821219-6.00004-X>
- Sim, S. Y. J., Srv, A., Chiang, J. H., Henry, C. J. (2021). Plant proteins for future foods: A roadmap. *Foods*, 10(8): 1967. <https://doi.org/10.3390/foods10081967>
- Srinivasu, S. R., Eligar, S. M. (2024). Physico-chemical and techno-functional characterization of quinoa bran protein concentrate. *Journal of Cereal Science*, 116: 103835. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2023.103835>
- Suárez-Hernández, M. F., Posada Ramirez, S. G., Castillo Cruz, D. D. C., Higuera Ciapara, I., Pacheco López, N. A., Herrera Pool, I. E., Ruiz-Ruiz, J. C. (2024). Effect of integrated extraction techniques on the technofunctional and bioactive properties of *Brosimum alicastrum* Swartz proteins. *Foods*, 13(18): 2875. <https://doi.org/10.3390/foods13182875>
- Tang, J., Yao, D., Xia, S., Cheong, L. Z., Tu, M. (2024). Recent progress in plant-based proteins: From extraction and modification methods to applications in the food industry. *Food Chemistry: X*, 23: 101540. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101540>
- Thongkong, S., Klangpetch, W., Unban, K., Tangjaidee, P., Phimolsiripol, Y., Rachtanapun, P., Phongthai, S. (2023). Impacts of electroextraction using the pulsed electric field on properties of Rice bran protein. *Foods*, 12(4): 835. <https://doi.org/10.3390/foods12040835>
- Varghese, T., Pare, A. (2019). Effect of microwave assisted extraction on yield and protein characteristics of soymilk. *Journal of Food Engineering*, 262: 92-99. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.05.020>
- Vogelsang-O'Dwyer, M., Sahin, A. W., Arendt, E. K., Zannini, E. (2022). Enzymatic hydrolysis of pulse proteins as a tool to improve techno-functional properties. *Foods*, 11(9): 1307. <https://doi.org/10.3390/foods11091307>
- Yusoff, I. M., Taher, Z. M., Rahmat, Z., Chua, L. S. (2022). A review of ultrasound-assisted extraction for plant bioactive compounds: Phenolics, flavonoids, thymols, saponins and proteins. *Food research international*, 157: 111268. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111268>

Zhang, L., Wang, L. J., Jiang, W., Qian, J. Y. (2017). Effect of pulsed electric field on functional and structural properties of canola protein by pretreating seeds to elevate oil yield. *Lwt*, 84: 73-81. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.048>

Zhang, X., Wang, Q., Liu, Z., Zhi, L., Jiao, B., Hu, H., Shi, A. (2023). Plant protein-based emulsifiers: Mechanisms, techniques for emulsification enhancement and applications. *Food Hydrocolloids*,

144: 109008. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109008>

Wang, Q., Wang, Y., Huang, M., Hayat, K., Kurtz, N. C., Wu, X., Zheng, F. (2021). Ultrasound-assisted alkaline proteinase extraction enhances the yield of pecan protein and modifies its functional properties. *Ultrasonics Sonochemistry*, 80: 105789. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105789>

MEMBRAN AYIRMA TEKNİKLERİNİN MEYVE SUYU İŞLEMEDEKİ UYGULAMALARI

Ayşe Seda APAYDIN*, Pelin ONSEKİZOĞLU BAĞCI

Trakya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Türkiye

Geliş / Received 07.02.2025; Kabul / Accepted: 22.05.2025; Online baskı / Published online: 30.05.2025

Apaydın, A. S., Onsekizoğlu Bağcı, P. (2025). Membran ayırma tekniklerinin meyve suyu işlemedeki uygulamaları. GIDA (2025) 50 (3) 442-465 doi: 10.15237/ gida.GD25027

Apaydın, A. S., Onsekizoğlu Bağcı, P. (2025). Applications of membrane separation techniques in fruit juice processing. GIDA (2025) 50 (3) 442-465 doi: 10.15237/ gida.GD25027

ÖZ

Membran ayırma teknikleri, meyve suyu endüstrisinde sürdürülebilir üretim hedefleri doğrultusunda yüksek verimlilik, düşük enerji tüketimi, çevre dostu kaynak kullanımı ve atık azaltımı açısından önemli potansiyele sahiptir. İyileştirilmiş kalite ve besin değerine sahip ürünlerin üretiminde sürdürülebilir süreçlere yönelik ilgi artışıyla, meyve suyu üretiminde berraklaştırma, aroma geri kazanma ve konsantrasyon gibi işlemlerde kullanılan geleneksel teknolojilerin yerine membran ayırma tekniklerinin kullanımı konusundaki çalışmalar son yıllarda ivme kazanmıştır. Bu derlemede mikrofiltrasyon, ultrafiltrasyon, nanofiltrasyon, ters ozmoz, ozmotik distilasyon ve pervaporasyon tekniklerinin temel ilkeleri, meyve suyu işlemede uygulamaları, kullanılan membran yapıları, sistem performansını etkileyen faktörler detaylı olarak açıklanmıştır. Ayrıca membran uygulamalarında karşılaşılan kirlenme olayı kapsamlı olarak ele alınmış, kirlenmeyi etkileyen faktörler ve bu sorunu azaltmaya yönelik geliştirilen stratejiler irdelenmiştir. Güncel araştırmaların bulgularını sentezleyen bu derleme, sürdürülebilir membran proseslerinin tasarımı ve işletimine yönelik bir rehber niteliğindedir. Ayrıca kirlenme yönetimi ve yeni membran yapılarının tasarımı yaklaşımlarını bütüncül olarak inceleyerek meyve suyu teknolojisi alanına özgün bir bakış açısı kazandırmaktadır.

Anahtar kelimeler: Membran filtrasyon, berraklaştırma, konsantrasyon, aroma geri kazanımı, membran kirlenmesi

APPLICATIONS OF MEMBRANE SEPARATION TECHNIQUES IN FRUIT JUICE PROCESSING

ABSTRACT

Membrane separation techniques have significant potential for high efficiency, low energy consumption, environmentally friendly resource use, and waste reduction in the fruit juice industry, in line with sustainable production goals. Growing interest in sustainable processes for producing product with improved quality and nutritional value has been a accelerated research into using membrane separation instead of traditional clarification, aroma recovery, and concentration. This review explains the basic principles of microfiltration, ultrafiltration, nanofiltration, reverse osmosis, osmotic distillation, and pervaporation techniques; their application in juice processing, membrane structures, and performance factors. It also addresses fouling in membrane applications, its influencing factors, and strategies to mitigate it. By synthesizing recent research findings, the review

* Sorumlu yazar / Corresponding author

✉: asedaapaydin@trakya.edu.tr

☎: (+90) 555 060 0252

Ayşe Seda Apaydın; ORCID no: 0009-0009-9686-5423

Pelin Onsekizoğlu Bağcı; ORCID no: 0000-0001-6612-5170

serves as a guide to designing and operating sustainable membrane processes and, through a comprehensive examination at fouling control and new membrane design approaches, provides an original perspective in fruit juice technology.

Keywords: Membrane filtration, clarification, concentration, aroma recovery, membrane fouling

GİRİŞ

Dünyada en çok ticareti yapılan gıda ürünlerinden biri olan meyve suları, şeker, lif, organik asitler, antioksidanlar, karotenoidler, mineraller ve vitaminlerin yanı sıra biyoaktif bileşikler ve fitokimyasalları da içerdiğinden dengeli beslenmede önemli bir yere sahiptir. Son yıllarda işlenmiş gıda ürünleri tercih eden tüketici bilinci doğrultusunda geleneksel ısıl işleme tekniklerine alternatif yeni teknolojiler önem kazanmıştır. Bunlar içerisinde membran ayırma teknikleri ılımlı çalışma koşulları, yüksek seçicilikte ayırım performansı, düşük enerji gereksinimi ve düşük olumsuz çevresel etki gibi çeşitli avantajları ile meyve suyu üretim süreçlerinde öne çıkmaktadır.

Membran filtrasyon teknolojisi 1960'lı yılların başında Loeb ve Souriragin tarafından selüloz asetat membranların keşfedilmesiyle birlikte laboratuvar ortamından endüstriyel boyuta taşınmış ve içecek endüstrisinde kullanımı hızlı bir artış göstermiştir (Tseng, vd., 2022). Geleneksel ayırım süreçlerinde bileşenin ayrılması için gereksinim duyulan kimyasal veya termal dönüşümlere gerek duyulmaması membran ayırım süreçlerinde duyulan enerji gereksinimi azaltmaktadır. Bu sayede hem enerji tasarrufu sağlanmakta hem de ürün içerisindeki ısıya duyarlı biyoaktif bileşikler korunmaktadır (Naeem vd., 2024). 2023 yılında gıda ve içecek işleme için 6.11 milyar \$ olarak rapor edilen küresel membran teknolojisi pazar büyüklüğünün 2024-2030 döneminde %6.6'lık bir Büyüme Oranıyla 2030 yılına kadar 10.04 milyar \$ seviyelerine ulaşması öngörülmektedir (Verified Market Reports, 2024).

Membran ayırma teknikleri günümüzde meyve suyu ve alkollü içeceklerde durultma, saflaştırma, geri kazanım ve konsantrasyon gibi üretim basamaklarında kullanılmaktadır (Castro-Muñoz vd., 2020). Genel bir ifade ile, belirli maddelerin geçmesine ve diğerlerinin tutulmasına izin veren seçici bir bariyer işlevi gören küçük gözeneklere veya ince ağ yapısına sahip çok katmanlı moleküler bir elek olarak tanımlanabilecek

membranların kullanıldığı ayırma süreçlerinde basınç, sıcaklık veya elektriksel potansiyel farkı gibi itici kuvvetler yaratılarak ayırım sağlanır (Biniaz vd., 2022). Meyve suyu işlemede kullanılan membran ayırma teknolojisi uygulamaları itici gücün türüne göre (1) basınç farkına dayalı süreçler: mikrofiltrasyon (MF), ultrafiltrasyon (UF), nanofiltrasyon (NF) ve ters ozmoz (TO); (2), basınç farkına dayalı olmayan diğer süreçler: ozmotik distilasyon (OD) ve pervaporasyon (PV) olarak incelenebilir (Rudolph-Schöpping vd., 2024).

Basınç farkına dayalı süreçlerde permeat akışı için itici güç, membran yüzeyi boyunca sirküle edilen beslemenin ortalama basıncı ile permeat basıncı arasındaki farktır. Bu fark transmembran basınç farkı (TMP) olarak adlandırılır. Basınca dayalı süreçlerden düşük TMP seviyelerinde uygulanan MF ve UF teknikleri meyve suyu endüstrisinde mikroorganizmaların uzaklaştırılması, durultma ve berraklaştırma aşamalarında; yüksek TMP seviyelerinde ayırım sağlayan NF ve TO uygulamaları ise konsantrasyon amacıyla kullanılmaktadır. Hidrofobik mikroporöz membranların kullanıldığı ozmotik distilasyon (OD) ve membran distilasyon (MD) tekniklerinde itici güç membranın iki yüzeyi arasında oluşturulan buhar basıncı farkıdır. Her iki uygulama da meyve sularının atmosferik basınç altında konsantrasyonuna olanak sağlamaktadır. Meyve suyu işlemede aroma ayırma aşamasında kullanılan pervaporasyon tekniğinde ise itici güç membranın iki yüzeyi arasındaki kısmi buhar basıncı farkıdır. Çizelge 1'de membran ayırma tekniklerinin genel özellikleri ve uygulama alanları özetlenmiştir.

Bir membran ayırma sürecinde membranın gözeneklerinden geçen sıvı akımı permeat, membrandan geçemeyen, alıkonulan partiküllerin olduğu akım ise retentat olarak isimlendirilir (Kapi, 2021). Birim zamanda birim membran alanından toplanan permeat miktarını ifade eden

permeat akısı (J_p , kg/m²sa) eşitlik 1 ile hesaplanmaktadır.

$$J_p = \frac{W_p}{A \cdot t} \quad (1)$$

Burada W_p t anında toplanan permeat miktarı (kg), A membran yüzey alanı (m²) ve t permeatın toplandığı zaman (sa)'dır (Yılmaz, 2019).

Çizelge 1. Membran Ayırma Tekniklerinin Genel Özellikleri

Membran Tekniği	İtici Kuvvet ^a	Kütle Aktarım Mekanizması ^b	Membran; Gözenek Boyutu ^a	Basınç Aralığı (bar) ^c	Filtre edilen Partiküller ^a	Uygulamaları ^b
Mikrofiltrasyon (MF)	Transmembran basınç farkı, 10-500 kPa	Konveksiyon	Mikrogözenekli; 0.1–10 µm	0.1-3	Nişasta, Bakteri, Fungi (100000-10 ⁶ Da)	Berraklaştırma, ön arıtma, sterilizasyon
Ultrafiltrasyon (UF)	Transmembran basınç farkı, 0.1-1 MPa	Konveksiyon	Mikrogözenekli; 0.05–0.5 µm	1-10	Makromoleküller, kolloidler, virüs, proteinler (1000-100000 Da)	Konsantrasyon, berraklaştırma, makromoleküler çözeltilerin ayrıştırılması
Nanofiltrasyon (NF)	Transmembran basınç farkı, 0.6-4 MPa	Konveksiyon /Difüzyon	Nanogözenekli; 0.001–0.01 µm	10-50	Şekerler, iki değerli iyonlar (100-1000 Da)	Konsantrasyon, düşük moleküler ağırlıklı organik bileşiklerin saflaştırılması
Ters Ozmoz (TO)	Transmembran basınç farkı, 2-10 MPa	Difüzyon/Konveksiyon	Gözeneksiz; 0.1-1.0 µm	10-100	Tek değerli iyonlar (10-100 Da)	Konsantrasyon, berraklaştırma
Ozmotik Distilasyon (OD)	Buhar basınç farkı	Evaporasyon /Difüzyon/Yoğuşma	Hidrofobik mikrogözenekli; 0.2–1 µm	Atmosferik basınç		Konsantrasyon
Pervaporasyon (PV)	Buhar basıncı ve sıcaklık farkı	Adsorpsiyon /Difüzyon /Desorpsiyon	Homojen polimer gözeneksiz		Azeotropik karışımlar	Uçucu sıvı karışımlarının ayrılması

a: Martín, vd., 2018; b: Castro-Muñoz, vd., 2020; c: Conidi, Castro-Muñoz ve Cassano, 2020

Bir membran sisteminin ayırma performansını yansıtan membran seçiciliği genellikle “alıkonma faktörü” R_f ile tanımlanır ve her çözünen için eşitlik 2 ile hesaplanır:

$$R_f = \left(1 - \frac{C_p}{C_f}\right) * 100 \quad (2)$$

Burada C_f besleme akımındaki çözücü konsantrasyonu (kg/m³) ve C_p permeat akımındaki çözücü konsantrasyonu (kg/m³)'dur.

Meyve suyu üretim süreçlerinde içi boş fiber, tübüler ve spiral sarımlı modüller yaygın olarak tercih edilen membran modül konfigürasyonlarıdır (Charcosset, 2021). Beslemenin bileşimi, akış hızı, sıcaklık ve basınç gibi etmenler de membranın ayırma

performansını etkileyen parametrelerdendir. Membran ayırma sürecinde karşılaşılan en büyük zorluk olan kirlenme olayının neden olduğu konsantrasyon polarizasyonu ve akı azalmasının kontrol altına alınabilmesi için membranın özelliklerinin göz önünde bulundurularak işlem parametrelerinin optimizasyonu önem taşımaktadır.

Bu derlemede, mikrofiltrasyon, ultrafiltrasyon, ters ozmoz, pervaporasyon, ozmotik distilasyon ve entegre membran işlemlerinin kullanımı da dahil olmak üzere, meyve sularının berraklaştırılması ve konsantre edilmesine yönelik membran işlemlerinin genel prensipleri hakkında bilgi verilecek; son önemli teknolojik gelişmeler ve iyileştirmeler ele alınacaktır.

MEYVE SUYU ÜRETİMİNDE KULLANILAN MEMBRAN TEKNOLOJİLERİ

Mikrofiltrasyon ve Ultrafiltrasyon

Meyve suları bileşiminde yer alan polisakkaritler, proteinler, tanenler ve metallerden dolayı doğal olarak bulanıktır (Kaushal vd., 2021). Berrak meyve suyu üretiminde durultma ve berraklaştırma aşamalarında kullanılan geleneksel yöntemler dekantasyon, flokülasyon, santrifüjleme ve enzimatik durultma olarak sıralanmaktadır (Sarbatly vd., 2023). Bu yöntemlerin uzun vakit alması, ürün ve zaman kaybına neden olması ve ileriki adımlarda yüksek maliyetli ekipmanlara ihtiyaç duyulması gibi birçok dezavantajları bulunmaktadır (Conidi vd., 2020). Ayrıca bu yöntemler sürekli bir sistem yerine kesikli işlem adımlarını içermektedir (Chew vd., 2020). Meyve suyu üretiminde berraklaştırma yardımcı maddelerine duyulan gereksinimi ortadan kaldırma, beslemenin besinsel ve aromatik kompozisyonunun daha iyi korunması, işlem süresinin kısılması, ısıl işleme gereksinim duyulmaması, yüksek verimlilik, düşük enerji gereksinimi gibi bir dizi avantaja sahip mikrofiltrasyon (MF) ve ultrafiltrasyon (UF) teknikleri meyve suyu üretiminde berraklaştırma aşamasında geleneksel uygulamalara alternatif olarak giderek daha yaygın tercih edilmektedir (Urošević ve Trivunac, 2020). Meyve suyu üretiminde berraklaştırma aşamasında MF veya UF tekniklerinin kullanımıyla mikrobiyolojik olarak stabil ve yüksek kalitede ürün eldesi yüksek verimle sağlanabilmektedir (Panigrahi vd., 2021).

Meyve suyu işlemede kullanılan MF membranlarının gözenek boyutu 0.1-10 µm düzeylerindedir (Zhu vd., 2024). Tercih edilen MF membran yapıları polipropilen (PP), polikarbonat (PC), polisülfon (PS), polivinil klorür (PVC), alümina, paslanmaz çelik ve silika gibi doğal veya sentetik olabilirler. MF tekniği ile meyve suyu üretiminde bozulmaya neden olan mikroorganizmaların üründen uzaklaştırılmasının yanı sıra turuncgiller gibi meyve sularında bulanıklık etmeni yüksek moleküler ağırlıklı süspanse ve kolloidal katılar da uzaklaştırılarak berraklaştırma etkisi sağlanmaktadır (Demoulin vd., 2022; Díaz-Montes ve Castro-Muñoz, 2019).

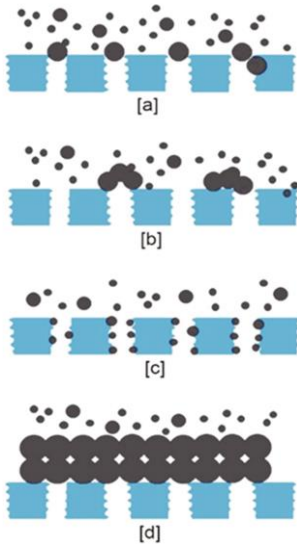
Ultrafiltrasyon membranlarında gözenek boyutu 0.01–0.1 µm aralığında olup, tercih edilen polimerik membran yapıları poliviniliden florür (PVDF), polietersülfon (PES), poliamid (PA) ve polipropilen (PP)'dir (Othman, vd., 2020). UF tekniği meyve suyu işlemede berraklaştırma aşamasında endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır. Maya, küf, mikroskobik organizmalar ve yüksek molekül ağırlıklı kolloidler de bu teknik ile meyve suyundan uzaklaştırılmaktadır (Bevilacqua vd., 2018). UF çalışmalarında kullanılan TMP genellikle 0 ila 500 kPa arasında değişmekle beraber yüksek basınç etkisiyle membran yüzeyinde ani partikül birikiminin oluşmasını engellemek amacıyla genellikle 100 kPa'dan daha düşük TMP değerlerinde çalışılmaktadır.

Ultrafiltrasyon ve mikrofiltrasyon membran teknikleri, meyve suyu işleme süreçlerinde önemli avantajlar sunarak geleneksel termal yöntemlere alternatif oluşturmaktadır. MF, düşük enerji tüketimi ve düşük işletme basıncı gerektirmesi sayesinde ekonomik bir seçenek sunarken, süspanسیون halindeki katıları ve bakterileri etkin bir şekilde uzaklaştırarak meyve suyunun mikrobiyolojik kalitesini artırmaktadır. Bu sayede, ürünün raf ömrü uzatılmakta ve besin içeriği korunmaktadır (Conidi vd., 2020). UF ise daha küçük gözenek boyutları sayesinde mikroorganizmaların yanısıra çözünmüş büyük moleküllerin de uzaklaştırılmasına olanak tanır. Termal işlem gerektirmeyen yapısı sayesinde, şeker karamelizasyonu ve renk değişimi gibi olumsuzluklar önlenerek meyve suyunun doğal aroması ve besin içeriği korunmaktadır (Ma vd., 2024). Ayrıca, UF süreci kolay ölçeklenebilir olup düşük enerji tüketimi ile maliyet avantajı sağlamaktadır. MF ve UF tekniklerinin kullanımı meyve suyu kalitesinin artırılmasını, enerji tüketiminin azaltılmasını ve işlem verimliliğinin optimize edilmesini sağlamaktadır.

Meyve suyu endüstrisinde MF ve UF membranlarının kullanımındaki başlıca problem, sisteme beslenen gıdanın bileşimindeki makro ve mikro partiküllerin membranın gözenekli yapısında ve membranın yüzeyinde birikmesidir. Kirlenme permeat akısının zamanla azalmasına, membran boyunca basınç düşüşünün artmasına

ve membran üzerinde bakteri gelişimine neden olmakla birlikte (Yılmaz ve Bağcı, 2019), membran bakım, işletim maliyetleri ve işlem süresini arttırarak, membran modüllerinin ömrünü ve son ürün kalitesini azaltmaktadır (Lu vd., 2021). Bu tip membran kirlenmeleri konsantrasyon polarizasyonu, kek veya jel oluşumu olarak da adlandırılmaktadır (Rajendran vd., 2021).

Membran kirlenmesi membranın gözenek boyutu ve katı partiküllerin boyutu arasındaki farka bağlı olarak dört farklı mekanizma ile açıklanabilmektedir. Bunlar; partiküllerin membran gözenek girişlerini engellemesi ile gerçekleşen tam gözenek tıkanması (a), katı parçacıkların membran girişinde bir köprü oluşturmasıyla gerçekleşen yarı gözenek tıkanması (b), partiküllerin membran gözenek boyutundan küçük, gözenek duvarlarında çökerek adsorbe olması ile gerçekleşen iç gözenek tıkanması (c) ve partiküllerin membran gözenek boyutundan daha büyük, membran yüzeyinde birikerek bir kek tabakası (d) oluşturmasıdır (Bağcı, 2021). Genellikle UF tekniğinde gözlemlenen membran kirlenmesi mekanizmaları Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Membran kirlenmesi mekanizmaları (a) tam gözenek tıkanması; (b) yarı gözenek tıkanması; (c) iç gözenek tıkanması; (d) kek tabakası oluşumu (Bağcı, 2021)

MF ve UF ayırma teknikleri için genelde partikül adsorpsiyonu ve partikül birikimi olarak iki çeşit kirlenmeden bahsedilir. Partikül adsorpsiyonu geri dönüşü olmayan bir kirlenme olup, hücre dışı makromoleküler etkileşimler olduğundan yapışkan yapıdadır. Partikül birikimi ise pektin gibi maddelerin membranın üst yüzeyinde birikmesiyle yapışkan olmayan yapıda geri dönüşümlü bir kirlenme olarak bilinir. Dış kirlenme ve kek oluşumu burada gözlemlenir. Membran filtrasyon işlemi esnasında kirlenmeye bağlı olarak zamanla permeat akısında kademeli bir azalış gözlemlenir (Rajendran vd., 2021).

Filtrasyon esnasında besleme çözeltisinin membran üzerine dikey akış (dead-end) ve çapraz akış olarak iki tip akışı vardır. Çapraz akış membran yüzeyinde yüksek ve kararlı bir şekilde akar böylece konsantrasyon polarizasyonu oluşumu azaltılır ve membran temizliğini kolaylaştırır (Castro-Muñoz vd., 2020). Membran filtrasyonu için seçicilik kadar geçirgenlik değeri de önemlidir (Mondal vd., 2021). Bu yüzden hidrolik geçirgenlik verilerinden yola çıkılarak membran kirlenmesinin modellendiği çeşitli yaklaşımlar bulunmaktadır. Field modeli, 1982 yılında Hermia tarafından önerilen sabit basınçlı filtrasyonda dikey akış (dead-end) filtrasyon mekanizmalarında kullanılan modelin, çapraz akış filtrasyonu için modifiye edilmesiyle geliştirilmiştir (Pereira vd., 2023). Dört farklı kirlenme mekanizması bu modelde tek bir denklem (eşitlik 3) ile ifade edilmiştir (Field ve Wu, 2022).

$$\frac{dJ}{dt} = k(J - J_{lim})J^{2-n} \quad (3)$$

J_{lim} yataşkın koşullarda elde edilen limit akı, k transmembran basıncına, dinamik permeat viskozitesine, permeat akısı başına tıkanan alana ve membran direncine bağlı olan bir katsayı, n parametresi ise kirlenmenin türüne bağlı olarak (a) tam gözenek tıkanması ($n=2$), (b) yarı gözenek tıkanması ($n=1$), (c) iç gözenek tıkanması ($n=1.5$; $J_{lim}=0$) ve (d) kek tabakası oluşumu ($n=0$) olarak tanımlanmaktadır.

Ghosh ve arkadaşlarının (2018), MF kullanarak jamun suyuna uyguladıkları berraklaştırma çalışmasında membran por çapının kirlenmeye olan etkisi değerlendirilmiştir. Membran gözenek boyutu küçüldükçe permeat akısının da azaldığı; bu azalmanın membran yüzeyindeki kek tabakası oluşumu veya konsantrasyon polarizasyonundan kaynaklandığı gözlemlenmiştir. Ananas suyunun UF ile berraklaştırıldığı bir çalışmada ise çapraz akış hızının artmasıyla membran yüzeydeki makromolekül birikimi azaldığı, daha yüksek basınç değerlerine çıkıldığında dinamik tabakanın sıkışmasıyla reddedilen makromolekül miktarında önemli bir artış görülmemiştir. Bu çalışmaya ek olarak UF ve MF teknikleri karşılaştırılmış, UF için yüzeydeki makromolekül birikiminin ve konsantrasyon polarizasyonunun permeat akısını etkilediği; MF için ise iç gözenek tıkanmaların veya dinamik membran oluşumunun permeat akısı için kontrol faktörü olduğu belirtilmiştir (De Barros vd., 2003).

Membran kirlenmesinin analizi için kullanılan en yaygın bir diğer teori ise permeat akısını TMP ve toplam hidrolik dirençle ilişkilendiren Darcy Yasası'dır. Seri direnç (Resistance-in-series) modeli akı düşüşünün membran direncine ek olarak tersinir ve tersinmez dirençlerden kaynaklandığı belirtir. Bu modelde permeat akısındaki azalmayı etkileyen tüm dirençler (eşitlik 4) özetlenmiştir (Conidi vd., 2020).

$$\frac{1}{R_t} = \frac{1}{R_m} + \frac{1}{R_{firr}} + \frac{1}{R_{frev}} + \frac{1}{R_c} \quad (4)$$

R_m membranın iç direncini, R_{firr} geri dönüştürülemez kirlenme direncini, R_{frev} geri dönüştürülebilir kirlenme direncini R_c membran yüzeyinde biriken kek tabakası direncini, temsil eder (Choi vd., 2005). Geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz kirlenmenin toplamı ile fouling direnci (R_f) elde edilmektedir.

Rezzadori ve arkadaşlarının (2014), MF tekniği kullanılarak çarkıfelek meyvesi içeren meyve suyunda berraklaştırma işleminin gerçekleştirildiği bir deneysel çalışmada permeat akısının davranışı seri direnç modeli ile incelenmiştir. Mikrofiltrasyonun ilk aşamalarında permeat

akısında %50 oranında hızlı bir düşüş gözlemlenmiş, konsantrasyon polarizasyonun bu düşüşte büyük etkiye sahip olduğu belirtilmiştir. Ayrıca akıdaki bu düşüşe kirlenmeden kaynaklı direncin ikincil derecede ve membran direncinin en düşük oranla üçüncül derecede katkı sağladığı söylenmiştir. Bir diğer seri direnç modeli çalışmasında, ön işleme tabi tutulmuş elma suyuna UF işlemi uygulanmış, filtrasyonun başlangıcında gözlemlenen ani akı düşüşünün membran gözenek tıkanması ve konsantrasyon polarizasyonundan; permeat akısı sabit bir hıza ulaşmasının ise membran yüzeyinde oluşan kek tabakasından kaynaklandığı sonucuna varılmıştır (Abdullah vd., 2022).

Genel bir ifade ile kirlenme oluşumunu etkileyen temel faktörler membran yüzey özellikleri, beslemenin özellikleri ve işleme parametreleri olarak sıralanabilmektedir. Meyve sularının MF ve UF teknikleri ile berraklaştırılmasında kullanılacak olan membranın materyali, por çapı, porozitesi, porların dağılımı membran seçiminde dikkate alınması gerekli unsurlardır. Özellikle membran materyalinin beslemenin özelliklerine göre seçimi önemlidir. Farklı meyvelerin MF ile berraklaştırıldığı bir çalışmada misket limonlarından elde edilen besleme ile polisülfon membranlarda çatlamalar olduğu, polivinilden florür membranların ise daha kararlı davrandığı gözlemlenmiştir (Cui ve Muralidhara, 2010). Polisülfon ve polietilenimin MF membranlarının kullanıldığı bir çalışmada ise nar suyunun durultma performansları değerlendirilmiş, membran yapısına TiO_2 ve Al_2O_3 nanopartiküllerinin eklenmesiyle membran hidrofilikliğinin ve gözenekliliğin artması sağlanmıştır. Çalışma sonucunda permeat akısının arttığı ve ürün kalitesinin iyileştiği belirtilmiştir (Severcan vd., 2020). UF membranlarının malzeme yapısının incelendiği bir çalışmada ise polimerik membranlara kıyasla seramik membranlarda çok daha yüksek permeat akısı elde edildiği ve polimerik membranların işleme esnasında daha fazla deforme olduğu belirtilmiştir (Tomczak ve Gryta, 2021). Buna ek olarak MF ve UF sistemlerinde polimerik nano elyaf, polisülfon ve seramik gibi birden fazla kalite kriterini karşılayabilen malzemelerin kullanımının işleme

performansını iyileştirdiği çalışmalarla desteklenmiştir (Sandoval vd., 2019). Membran por çapı, beslemedeki partikül boyutuna uygun seçildiğinde kirlenme riskini azaltarak filtrasyon performansını artırmaktadır (Zhao vd., 2022). Yüksek poroziteye sahip membranlar genellikle daha yüksek akı değerleri sunmakta olup, membran üzerindeki gözeneklerin homojen bir şekilde dağılımı, filtrasyon sürecinde eşit bir akış sağlayarak membran performansının kararlılığını artırmaktadır (Li vd., 2022).

Filtrasyon işleminin verimli bir şekilde gerçekleştirilebilmesi için basınç, sıcaklık ve akış

hızı gibi işletme parametreleri de temelde permeat akısı ve ürün kalitesi temelinde belirlenmektedir. Membran kirliliği, farklı koşullarda detaylı olarak karakterize edilmesi gereken bir olgu olup, optimum çalışma koşullarının belirlenmesi, kirlenme sorunlarının önüne geçilmesine katkı sağlayacaktır. (Lu vd., 2021). Literatürde MF ve UF teknikleri kullanılarak meyve suyu ürünlerinde berraklaştırma amacıyla yapılan çalışmalar incelenmiş olup, en verimli sonuçların elde edildiği parametreler Çizelge 2’de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Çizelge 2. MF ve UF Membranlarının Çeşitli Meyve Sularında Kullanımı

Teknik	Meyve Suyu	Membran tipi	MWCO veya por boyutu	TMP	Membran alanı	Sıcaklık	Kaynak
UF	Elma suyu	Polietersülfon	100 kDa	2 bar	200 cm ²	25 °C	Onsekizoğlu vd., 2010
UF	Mandalina suyu	Polisülfon, içi boş fiber	30 kDa	69 kPa	0.028 m ²	25 °C	Ilame, vd., 2018
MF	Jamun suyu	Polisülfon, içi boş fiber	0.45 µm	137.89 kPa	0.005 m ²	30 °C	Ghos vd., 2018
UF	Portakal suyu	Tubular, PVDF	15 kDa	0.85 bar	0.23 m ²	25 °C	Cassano vd., 2007
UF	Brokoli suyu	PES	50 kDa	105 bar	200 cm ²	60 °C	Yılmaz vd., 2019
MF	Portakal suyu	Seramik membran	0.11 µm	206,8 kPa	7.899x 10 ⁻⁷ m ²	-	Satyannarayana vd., 2023
UF	Kivi suyu	Tubular, PVDF	15 kDa	90 kPa	0.23 m ²	25 °C	Cassano vd., 2007
UF	Kızılcık suyu	PVDF, düz levha	500 kDa	250 kPa	0.014 m ²	15 °C	Perreault vd., 2021
MF	Çilek suyu	Poliamid	0.4 µm	300 kPa	0.7 m ²	20 °C	Arend vd., 2019
UF	Elma suyu	Rejenere selüloz	30 kDa	2.5 bar	0.014 m ²	25 °C	Güleç vd., 2017
UF	Nar suyu	PVDF	30 kDa	3 bar	155 cm ²	25 °C	Bağcı, 2014
MF	Kaktüs armudu suyu	Polisülfon, içi boş fiber	0.1 µm	69 kPa	420 cm ²	20 °C	Mejia vd.,2021
MF	Narenciye suyu	Poliamid	2.5 µm	69 kPa	2.83x10 ⁻³ m ²	28 °C	Singh vd., 2021
UF	Aronya suyu	PES	50 kDa	3 bar	140 cm ²	25 °C	Apaydın, 2024

MWCO:Molecular weight cutoff, TMP: Transmembrane pressure, PES:Polietersülfon, PVDF:Poliviniliden florür

Teoride transmembran basıncındaki artış permeat akısıyla doğru orantılı şekilde artışa neden olmalıdır. Pratikte ise transmembran basıncındaki artış çözeltinin membran yüzeyine hızlı bir şekilde taşınmasına neden olmakta bu durum permeat akısındaki artışı sınırlanmaktadır. Örneğin, membran por çapının ve TMP değerinin permeat

akısına olan etkisinin incelendiği bir çalışmada basıncın 0.3 MPa’a kadar yükselmesiyle birlikte permeat akısında artış gözlemlenmiş, fakat bu değerden daha yüksek basınçlara çıkıldığında sabit bir akı değeri ile karşılaşmıştır. TMP artışı ile itici kuvvetin yerini filtrasyon direncinin aldığı belirli bir basınç değerinden sonra permeat akı

davranışının basınçtan bağımsız hale geldiği belirtilmiştir (Zhu vd., 2018). Bu yüzden membran filtrasyonda zamanla akı düşüşünün veya TMP'nin yükselişinin gözlemlenmediği bir kritik akı değeri belirlenmesi önerilmektedir (Hua vd., 2020). Aronya suyunun iki farklı gözenek boyutuna (150 kDa ve 50 kDa) sahip polietersülfon UF membranları ile berraklaştırıldığı bir çalışmada membran kirliliği akı profilleri üzerinden değerlendirilmiştir. Daha hidrofilik yapıya ve küçük gözenek boyutuna sahip olan membranın diğerine kıyasla yüksek kritik akı değerlerine ulaştığı ve daha az kirlendiğini belirtilmiştir (Apaydın, 2024). Besleme akış hızındaki artış ile süpürme etkisi artarak membran yüzeyinde biriken katı partiküller zorlanmış konveksiyonla daha hızlı uzaklaştırılabilmektedir. Dolayısıyla konsantrasyon polarizasyonunu azalırken, kütle transfer katsayısı artmakta ve permeat akısında da artış gözlemlenmektedir (Apel vd., 2024). Sıcaklık faktörünün kirlenme üzerinde direkt bir etkisinin olmamasına rağmen, dolaylı yoldan sıcaklık artışıyla birlikte besleme akışının viskozitesinde azalma ve permeat akısında ise artışa neden olduğu belirtilmektedir (Lu vd., 2021).

Son yıllarda, membran filtrasyonda membran kirliliğinin önlenmesine yönelik yapay zekâ uygulamalarına dayalı yenilikçi yaklaşımlar dikkat çekmektedir. Yapay sinir ağları kullanılarak filtrasyon koşulları simüle edilebilmekte ve elde edilen sonuçlar kirlenme için kullanılan matematiksel modeller ile karşılaştırılabilmektedir (Lu vd., 2021). Corbatón-Báguena ve arkadaşları (2016), çapraz akışlı UF çalışmalarında membran kirliliğini Field modeli kullanarak değerlendirmişlerdir. Yapay sinir ağları modelini kullanarak transmembran basıncı, akış hızı ve kirlenme dinamiği parametrelerinin permeat akısı üzerindeki etkisi tahmin edilmiştir. Deneysel akı verileri ile modelin tahmin ettiği akı verileri kullanılarak baskın kirlenme mekanizması belirlenmiştir. Çalışma sonucunda modelin farklı işleme parametrelerindeki permeat akısı ve kirlenme mekanizması (iç gözenek tıkanması) tahminlerinin deneysel sonuçlar ile uyumlu olduğu belirtilmiştir (Corbatón-BBáguena vd., 2016). Membran kirliliğinin ve

filtrasyon verimliliğinin makine öğrenmesi modeli ile tahmin edildiği bir diğer çalışmada ise elma kabuklarından elde edilen polifenoller membran filtrasyon tekniği kullanılarak saflaştırılmıştır. Filtrasyon sonunda membran kirliliği hem Hermia modeli hem de görüntü işleme yöntemi ile analiz edilmiştir. Membran görüntülerinden elde edilen sonuçlarda baskın olan tam gözenek tıkanması, Hermia modeli ile doğrulanmıştır. Ayrıca geliştirilen model ile polifenol saflığı ve membran kirlenme derecesi arasındaki ilişki başarılı bir şekilde tahmin edilebilmiştir. Elde edilen tutarlı sonuçlar doğrultusunda yapay zekâ uygulamalarının membran süreçlerinde kullanımının önemli bir potansiyele sahip olduğu belirtilmiştir (Wang vd., 2023).

MF ve UF ile yapılan berraklaştırma çalışmalarında daha yüksek akı değerlerine ulaşmak için depektinizasyon ve yardımcı maddelerin kullanımı gibi ön işlemlerin verimliliği arttırdığı çeşitli çalışmalarda belirtilmektedir (Rudolph-Schöpping vd., 2024; Meher vd., 2023). Portakal ve mandalina suyuna uygulanan MF işlemi öncesinde depektinizasyon işleminin gerçekleştirildiği bir çalışmada pektinaz enzimi kullanılmıştır. Depektinizasyon işlemi uygulanan örneklerde pektik moleküllerin hidrolizi sayesinde ortalama parçacık boyutunun büyük ölçüde değiştiği ve permeat akısının arttığı gözlemlenmiştir (Satyannarayana vd., 2023). Kızılıklık suyunun UF membranları kullanılarak berraklaştırıldığı bir çalışmada ise taze ve depektinize meyve suları farklı por çaplı membranlarda işlenmiştir. En verimli sonuçların depektinize kızılıklık suyu ve daha büyük por çapına sahip olan membran kullanıldığında elde edildiği belirtilmiş, depektinizasyon işlemi ile berraklaştırma sürecinin önemli ölçüde kısaltıldığı gözlemlenmiştir (Perreault vd., 2021). UF kullanılarak nar suyunun berraklaştırması amacıyla yapılan bir diğer çalışmada jelatin, bentonit ve PVPP kullanımının sistem performansına etkisi araştırılmıştır. Durultma yardımcı maddelerinin geleneksel uygulamadaki 1/5'i oranında UF sistemi ile birlikte kullanımının UF proses performansının önemli ölçüde iyileştirdiği sonucuna varılmıştır (Bağcı, 2014). Ultrason teknolojisi de membran kirliliğinin azaltılarak

filtrasyon verimliliğinin artırılması amacıyla uygulanan ön işlemlerden biridir. MF öncesinde ultrason ön işleminin etkisinin incelendiği bir çalışmada jak meyvesinin suyu berraklaştırılmıştır. Filtrasyon süresinin yaklaşık yarıya düşürülmesi, biyoaktif bileşenlerin korunarak permeata geçebilmesi ve membran tıkanmalarının önlenmesi sürecin en büyük avantajları olarak sıralanmıştır. Sono-Mikrofiltrasyon olarak adlandırılan bu entegre sistemin meyve suyu işlemede proses koşullarını iyileştirebileceği yönünde etkili olabileceği belirtilmiştir (Miramontes-Escobar vd., 2024). Paraíso ve arkadaşları (2024), hibiskus özütünün ultrafiltrasyonu çalışmalarında permeat akısını iyileştirmek ve membran kirliliğini azaltmak amacıyla bir ön işlem olarak türbülans promotörü ve ultrason desteği kullanmışlardır. Filtrasyon sırasında türbülans promotörü ve ultrason desteğinin entegre kullanıldığı sistemin en yüksek akı değerlerine ulaştığı, türbülans promotörünün membran yüzeyindeki kayma gerilimini artırarak kirliliğin önemli ölçüde azalmasına neden olduğunu belirtmişlerdir.

Nanofiltrasyon

Nanofiltrasyon (NF) membranları MWCO (molekül ağırlığı ayırma sınırı) değeri 120-1000 Da arasında olan basınçlı dayalı membran ayırma tekniğidir. Meyve suyu üretiminde küçük molekül ağırlığındaki bileşenlerin geri kazanımı ve konsantrasyon amacıyla kullanılmaktadır (Belleville vd., 2021). NF uygulamalarında genellikle spiral, tubular ve plaka-çerçeve membran modülleri tercih edilmektedir (Firman vd., 2020).

Nanofiltrasyon işlemi ile iyonların difüzyon özelliklerine ve yüklerine göre sıvı içerisindeki düşük moleküler ağırlığa sahip çözünmüş maddeler seçici olarak ayrıştırılabilmektedir (Lu vd., 2022). Özellikle diafiltrasyon prosesi ile kombine edildiğinde NF teknolojisi ile meyve sularındaki şekerlerin %30-95 oranında uzaklaştırılması mümkündür (Gagliano vd., 2022). Diafiltrasyon, besleme solüsyonuna su veya solvent eklenerek membranda tutulan makro çözünenlerin membrandan geçen mikro çözünenlerden ayrılma derecesini arttırmaya

yönelik bir yaklaşımdır (Gagliano vd., 2022). Ancak, NF teknolojisi ile şekerlerin benzer moleküler ağırlığa sahip diğer moleküllerden seçici olarak ayrılması son derece zordur. Dolayısıyla doğal meyve sularında şekerin azaltılmasında NF teknolojisinin uygulanabilirliği membranların alıkoyma ve seçicilik özelliklerine bağlıdır. Wei ve arkadaşları (2008), elma suyunun 1 kDa MWCO membran kullanarak 4 bar basınç altında nanofiltrasyonu sonunda permeattaki şeker geri kazanımının %72 ve alıkonulan polifenollerin geri kazanımının %43 civarında olduğunu göstermiştir. Pruksasri ve arkadaşları (2020), bulanık elma suyundaki NF ile şekerin azaltılmasında fenolik madde kayıplarını minimize etmek için mekanik ön fraksiyonlama ve NF kombinasyonunu önermiştir. Çalışmada, ilk aşamada, belirli miktarda elmanın (ham maddenin %45'i) soyulması ve çekirdeğinin çıkarılmasından sonra, düşük polifenol içeriğine sahip bir meyve ham suyu (A) üretilmiştir. İkinci aşamada meyve ham suyu, NF/diafiltrasyon kombinasyonu ile berraklaştırılmıştır. Son olarak elmaların geri kalanının kabuklar ve çekirdeklerle birlikte öğütülmesi, preslenmesi ve santrifüj edilmesiyle üretilen fenolik bileşikler açısından zenginleştirilen B meyve suyuyla NF permeatı karıştırılmıştır. Bu sayede %30 daha az şeker içeren bulanık bir elma suyu elde edildiği ve asitlerin, minerallerin, antioksidan kapasitelerin ve polifenollerin kayıplarının da %11-18 düzeyinde kaldığı rapor edilmiştir. Mekanik fraksiyonlamanın biyofonksiyonel bileşik kayıplarını azaltmak için önemli bir ayırma adımı olduğu ifade edilmiştir. Gangliano ve arkadaşları (2022), ise elmaları soymadan entegre bir NF/diafiltrasyon yaklaşımını araştırmıştır. Üç farklı spiral sarımlı ticari membran kullanıldığı çalışmada, MWCO'su 200-300 Da olan ince film kompozit membran ile seçilen çalışma koşullarında şeker içeriği yaklaşık %60 oranında azaltılırken, fenolik bileşiklerin %70'inden fazlası geri kazanılmıştır.

Nanofiltrasyon geleneksel çok aşamalı termal evaporasyon işleminin bir alternatifi olarak meyve sularının konsantrasyonunda da kullanılmaktadır. Bu teknik, ters ozmoz (TO) uygulamalarına göre yaklaşık %20 daha az enerji tüketimi

sağlamaktadır (Bevilacqua vd., 2018). Ayrıca yüksek ozmotik basınç sınırlamaları dolayısıyla 25-30 °Briks seviyelerine ancak konsantrasyonun sağlanabildiği TO uygulamalarına kıyasla daha yüksek düzeylere kadar konsantrasyon NF ile sağlanabilmektedir. Ancak NF uygulamalarında kullanılan membranların alıkoyma ve seçicilik özelliklerine bağlı olarak ortaya çıkan organik asitler, şeker ve fenolik asitler gibi küçük molekül ağırlıklı bileşen kayıpları tek başına bu yöntemle konsantre üretiminde kullanımını sınırlandırmaktadır. Bu nedenle genel olarak meyve sularının konsantrasyonunda NF teknolojisi TO ve/veya DCMD/OD (doğrudan temaslı membran distilasyon/osmotik distilasyon) ile entegre edilerek kullanılmaktadır (Sotoft vd., 2012). Zeytin posasının entegre membran prosesleri ile konsantre edildiği bir çalışmada UF, NF ve TO teknikleri birlikte kullanılmıştır. Toplam katı madde içeriğini azaltmak ve fenolik bileşikler şekerlerden ayırmak amacıyla UF ön işlemine başvurulmuş, daha sonra NF membranları kullanılarak hidroksitirozol ile vanilik ve ferulik asit gibi fenolik asitler geri kazanılmıştır. Elde edilen nanofiltrasyon permeatını konsantre etmek amacıyla TO işlemi gerçekleştirilmiş böylece saflaştırılmış fenolik bileşiklerin daha yüksek konsantrasyonda retentatta toplanmasını sağlamıştır. Çalışma sonunda yüksek katma değerli bileşiklerce zengin bir ürün eldesi gerçekleştirilmiştir (Sánchez-Arévalo vd., 2024).

Meyve sularının işlenmesinde kullanılan NF membranlarının kirlenme dinamikleri incelendiğinde, MF ve UF membranlarına kıyasla çok daha küçük por yapılarının olması dolayısıyla çoğunlukla kek direnci ve konsantrasyon polarizasyonu kirlenmeden ve performans düşüşünden sorumlu temel etkenler olarak karşımıza çıkmaktadır. Örneğin, doğal çilek suyunun 150-300 Da MWCO değerine sahip bir PVDF membranı (GE Osmonics®, Philadelphia, ABD) kullanılarak 600 kPa'da gerçekleştirilen NF ile konsantrasyonu sırasında membran kirlenme mekanizmalarının incelendiği bir çalışmada, en uygun kirlenme modelinin kek tabakası oluşumu olduğu belirlenmiştir. Ön işlem olarak 0.4 µm por çapındaki poliamid MF membranı (PAM

Selective Membranes, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) ile berraklaştırılan örneklerde ise iç gözenek tıkanmasının membran kirlenmesinden sorumlu temel faktör olduğu belirtilmiştir (Arend vd., 2019). Cai ve arkadaşları (2021), yaban mersini suyunun NF ile konsantrasyonunda permeat akısındaki azalmayı membran yüzeyinde antosiyaninlerin, basit şekerlerin, polisakkaritlerin veya fenolik maddelerin birikimi ve konsantrasyon polarizasyonundaki artışla ilişkilendirmiştir. Çalışmada, membranda biriken kolloidal partiküllerin oluşturduğu agregasyonu ve polarizasyonu sonucu tam gözenek tıkanması olduğu rapor edilmiştir.

Ters Ozmoz

Ters ozmoz (TO), sudaki çözünmüş tuzları, kimyasal bileşenleri ve inorganik kirleticileri ayırmak amacıyla kullanılan bir membran ayırma teknolojisidir. Yüksek basınç altında çalışan bu teknoloji, tipik olarak 20 ila 65 bar arasında değişen basınçlarla, özellikle deniz suyu veya tuzlu suyu arıtma, içme suyu saflaştırma ve atık su arıtımı gibi birçok sektörde yaygın olarak kullanılır (Warsinger vd., 2018). TO teknolojisi yaklaşık 300 Da ve daha küçük çözünmüş maddeleri ayırma yeteneği sayesinde meyve suyu endüstrisinde de önemli bir yer tutar (Zapata-Sierra vd., 2021).

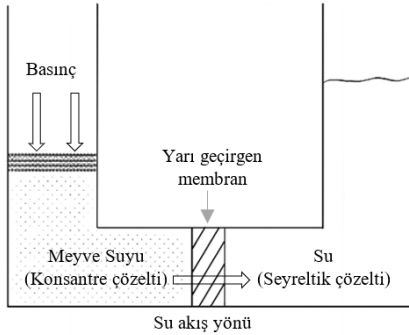
Meyve suyundan suyun uzaklaştırılmasına yönelik bir konsantrasyon tekniği olarak TO membran teknolojisi çalışmalarının kökeni, 1960'ların sonlarına kadar uzanır (Heiranian vd., 2023). Ters ozmozun endüstriyel uygulamalarında ilk önemli adım olan bu çalışmalar, Loeb ve Sourirajan tarafından anizotropik selüloz asetat membranların geliştirilmesinden sadece birkaç yıl sonra başlamıştır. O zamandan bu yana, aserola, elma, üzüm, nar, kivi, ananas, portakal suyu gibi çeşitli meyve suları, laboratuvar ölçeğinde RO teknolojisi ile konsantre edilmiştir (Cassano vd., 2020; Bağcı vd., 2020; Destani vd., 2020). RO teknolojisi, meyve sularının konsantrasyonunda kullanılan geleneksel ısı buharlaştırma yöntemlerinin aksine, suyun ayrışması için herhangi bir faz değişimi gerektirmez. Bu sayede aroma ve flavor kayıpları minimize edilerek son ürün kalitesi iyileştirilmekte ve enerji verimliliği

sağlanabilmektedir (Cassano vd., 2020; Belleville vd., 2021).

Ters ozmoz suyun, yarı geçirgen bir membran aracılığıyla, çözünen madde konsantrasyonunun düşük olduğu ortamdan yüksek olduğu ortama doğru hareket ettiği doğal bir süreç olan ozmozun tersidir (Şekil 2). Suyun çözünen madde konsantrasyonunun yüksek olduğu bölgeye hareketiyle oluşan ozmotik basınç, Gibbs termodinamik ilişkisi kullanılarak hesaplanabilir, ancak seyreltik çözeltilerde Van't Hoff yasası (eşitlik 5), ozmotik basıncın tahmin edilmesinde daha yaygın kullanılan bir modeldir. Van't Hoff Yasası'na göre ozmotik basınç, çözeltinin sıcaklığı ve çözücü içindeki çözünen madde konsantrasyonu ile doğru orantılı; çözünen maddenin moleküler ağırlığı ile ters orantılıdır.

$$\Pi = \frac{cRT}{M} \quad (5)$$

Burada, Π ozmotik basınç (kPa), c çözelti konsantrasyonu (kg/m^3), T mutlak sıcaklık (K), R gaz sabiti ($\text{kPa} \cdot \text{m}^3/\text{kgmol} \cdot \text{K}$) ve M molekül ağırlıktır (kg/kgmol) (Singh ve Heldman, 2020).



Şekil 2. Ters ozmoz filtrasyon sistemi

Ters ozmoz prosesinde, suyun çözünen madde konsantrasyonunun fazla olduğu ortamdan, az olduğu ortama doğru aktarımını sağlamak için ozmotik basınçtan daha büyük bir hidrolik basınç uygulanmalıdır. Konsantrasyon süresince meyve suyundan uzaklaştırılan su ile birlikte ozmotik basınç farkı sürekli artış gösterdiğinden, TO prosesinde sürecin devamlılığını sağlamak için giderek daha yüksek seviyelerde hidrolik basınç

uygulanması zorunlu hale gelir. Ozmotik basınç sınırlaması olarak adlandırılan bu olay meyve sularının TO ile konsantrasyonunun ancak 25-30 °Brix seviyelerine kadar gerçekleştirilebilmesine neden olmaktadır. Bu kuru madde değerlerine ulaşıldığı noktadan itibaren ozmotik basınç farkı daha da artarak işlem verimliliğini azaltır ve daha yüksek basınç değerlerine ihtiyaç duyulmasına yol açar (Wenten vd., 2021). Bu nedenle meyve sularının kimyasal ve mikrobiyal stabilitenin sağlandığı 65-70 °Briks seviyelerindeki konsantrasyonunda TO, ısı evaporasyonunun neden olabileceği zararlardan kaçınmak amacıyla bir ön işlem olarak kullanılır. Berrak nar suyunun yüksek °Briks değerlerinde konsantrasyonu için ters ozmoz ve ozmotik distilasyon tekniklerinin birlikte kullanıldığı bir çalışmada poliamid ince film kompozit TO membranları kullanılmıştır. UF ile berraklaştırma, TO ile ön konsantrasyon işlemleri gerçekleştirilmiş, daha sonra nar suyu OD ile konsantre edilmiştir. Ozmotik basınç sınırlaması nedeniyle TO ile yaklaşık 18 °Briks'e çıkan nar suyu OD ile 60 °Briks'e kadar konsantre edilmiştir. Çalışma sonucunda bir ön işlem olarak TO tekniğinin kullanılmasının konsantrasyon işleminde önemli avantajlara neden olduğu belirtilmiştir (Bagcı vd., 2019).

Meyve suyu işlemede genellikle alümina, polisülfon, polietilen kompozit ve poliamid membranlar kullanılmaktadır (Do Nascimento vd., 2024). TO membranlarının tipik olarak belirgin gözeneklere sahip olmayan yoğun bir yapıya sahip olması nedeniyle TO süreçlerinde ayrıştırma çoğunlukla bir eleme etkisine değil, çözünme-difüzyon mekanizmasına dayanır (Du vd., 2023). Bu nedenle TO prosesinde suyun geçiş hızı oldukça yavaş olur ve membran boyunca önemli bir transmembran akışı elde edebilmek için yüksek transmembran basınç seviyelerine ve mümkün olduğunca ince membran yapılarına gereksinim duyulur (Singh ve Heldman, 2020). TO sırasında membran boyunca su moleküllerinin ve diğer çözünmüş maddelerin geçişi polimer zincirlerinin termal hareketiyle oluşturulan hacimsel elemanlar adı verilen mikroboşluklar aracılığıyla gerçekleşir (Tian vd., 2022). Bu serbest hacim elemanları, geçirgen maddelerin membran boyunca hareketiyle paralel

olarak sürekli olarak ortaya çıkar ve kaybolur. Dolayısıyla TO süreçlerinde ayırma mekanizması, yalnızca moleküllerin boyutuna ve şekline değil, aynı zamanda iyonik yükü ve türü gibi faktörlerle membran arasındaki spesifik etkileşimlere de bağlıdır. Bu etkileşimler, bir TO membranının çözünmüş maddeleri geri çevirme özelliklerinde önemli rol oynar (Baker, 2023).

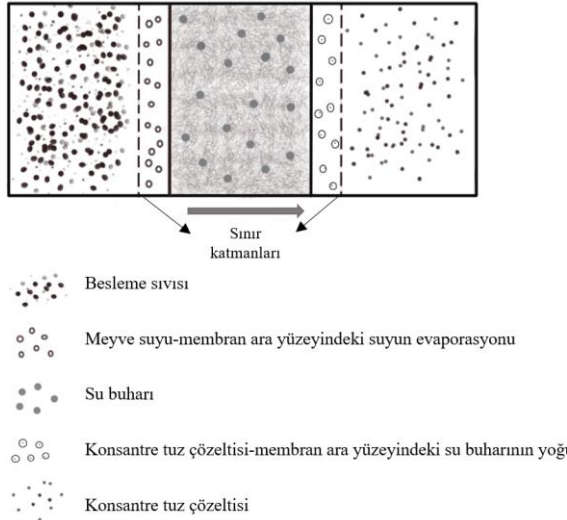
Membran kirlenmesi ters ozmoz teknolojisinin meyve suyu işlemede kullanımında karşılaşılan önemli bir problemdir. Permeat akısının hızla düşmesine neden olan kirlenme olayı, TO membran performansını olumsuz yönde etkiler ve proses verimliliğini düşürür. Kirlenme olayını ve permeat akısını etkileyen başlıca etmenler; basınç, besleme konsantrasyonu, sıcaklık ve besleme hızıdır (Idrees, 2020). Bir TO prosesinde besleme çözeltisinin membrana difüzyon hızı, çözeltinin ozmotik basıncının sabit tutulması koşuluyla, sisteme uygulanan hidrolik basınca bağlıdır. İdeal koşullar altında, permeat akışı, yani çözücünün membran üzerinden geçiş hızı, besleme basıncı ile doğru orantılıdır. Bu durum, TO sistemlerinin tasarımında ve operasyonel yönetiminde önemli bir parametre olarak kabul edilir. Ancak, gerçek operasyonda kirlenme olayı ilerledikçe membranın geçirgenliği azalır ve bu durum permeat akışının basınçtan bağımsız hale gelmesine yol açar. (Sheu ve Wiley, 1983; Liu vd., 2024). Polipropilen TO membranları kullanılarak karpuz suyunun konsantre edildiği bir çalışmada, 40 bar basınçta 30 bar değerine kıyasla daha yüksek permeat akı değerlerine ulaşılmış, basınçtaki artışın membran yüzeyi sınır tabakasındaki kütle transferini arttırdığı belirtilmiştir. Yüksek basınç değerlerinin türbülanslı akışlara neden olarak membran kirlenmesi olgusunu da azalttığı sonucuna varılmıştır (Lai Quoc vd., 2022). Aguiar ve arkadaşları (2012), elma suyunu membran teknikleri kullanarak konsantre ettiği çalışmalarında TO sırasında gözlemlenen permeat akısındaki azalışı hem kirlenme etkileri hem de ürünlerdeki suyun uzaklaştırılması ile artan ozmotik basınç ile açıklamışlardır. Meyve suyunun viskozitesinin artmasıyla birlikte kütle transferine karşı direncin de arttığını ve bu durumun membran geçirgenliği ile akısını azalttığını belirtmişlerdir. Ters ozmoz proseslerinde düşük

işletme basınçları; moleküllerin membran üzerinden geçiş hızının azalmasına, permeat akısı değerinin düşmesine, besleme sıvısında bulunan moleküllerin membran kirlenmesine katkısının artmasına ve sonuç olarak konsantrasyon oranının düşmesine neden olmaktadır (Guo vd., 2023). Sıcaklığın artışı ise işleme kapasitesini arttıran bir parametredir fakat artan sıcaklık uçucu aroma madde kayıplarını da beraberinde getirebilmektedir (Jiao vd., 2004). Ters ozmoz ile yapılan konsantrasyon çalışmasında her 1°C sıcaklık artışının işleme kapasitesini %3-4 oranında arttırdığı belirtilmiştir (Sheu ve Wiley, 1983). Kırmızı şarap konsantrelerinin TO ve NF membranları kullanılarak elde edildiği bir çalışmada sıcaklık ve basınç değerlerinin etkileri değerlendirilmiştir. Yüksek basınç değerleri şekerlerin ve aroma bileşiklerinin tutulmasını sağlarken yüksek sıcaklık, aroma bileşenleri kayıplarına neden olmuştur. Ancak sıcaklık değerinin yükselmesi, besleme sıvısının viskozitesinin azalmasını sağlamış ve daha yüksek geçirgenlik akı değerleri elde edilmesi ile sonuçlanmıştır (Shigidi vd., 2021). Elma suyunun TO membranları ile konsantrasyon sürecinin optimize edildiği bir çalışmada besleme akış hızının işleme olan etkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda besleme akış hızındaki artışın konsantrasyon polarizasyonu oluşumunu azalttığı ve permeat akısını arttırdığı gözlemlenmiş, yüksek akış hızı değerlerinde besleme kanalının ozmotik basıncın azalmasına bağlı olarak membrandan geçen çözünen madde akışını azalttığı belirtilmiştir (Al-Obaidi vd., 2017).

Ozmotik Distilasyon

Atmosferik basınç ve oda sıcaklığı koşullarında, hidrolik basınca gereksinim duyulmadan yüksek °Briks değerlerinde konsantre üretimine olanak sağlayan ozmotik distilasyon (OD) meyve sularının konsantrasyonunda en etkili ve güncel membran ayırma tekniği olarak bilinmektedir. İzotermal membran distilasyon, ozmotik evaporasyon veya gaz membran ekstraksiyon adlarıyla da anılan OD tekniğinde mikrogözenekli bir membran ile birbirinden ayrılan besleme çözeltisi ile hipertonic tuz çözeltisi arasındaki buhar basıncı farkı, su buharının besleme çözeltisinden hipertonic tuz çözeltisine doğru

transferi için itici güç sağlar (Yılmaz, 2019). TO gibi basınç tahrikli membran tekniklerinin aksine itici gücün hidrolik basınç farkı değil, su buharı basıncı farkı olması meyve sularının OD ile konsantrasyonunda 65 °Briks değerinin üzerine çıkabilmesine olanak tanır (Yılmaz, 2019). OD sisteminde su buharının membran boyunca transferi şematik olarak Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3. Ozmotik distilasyon sisteminin şematik gösterimi (Onsekizoğlu'dan adapte edilmiştir, 2010)

İzotermal koşullar altında meyve suyunun konsantre tuzlu su çözeltisi ile konsantre edildiği sistemde membranın hidrofobik yapısı sayesinde su, gözenekler içerisine girememektedir (Conidi vd., 2020). Hidrofobikliğin yanı sıra OD prosesi için kullanılacak olan mikrogözenekli membranlar aynı zamanda iyi termal ve kimyasal dayanıma, sıcaklık polarizasyonunu aza indirmek için iyi ısı iletkenliğe ve mekanik özelliklere sahip olmalıdır (Onsekizoğlu, 2012). Literatürde meyve sularının OD ile konsantrasyonu çalışmalarında genellikle PE, PTFE, PP ve PVDF gibi düşük yüzey serbest enerjili tipik polimerler membranlar içi boş fiber ve plaka çerçeve gibi konfigürasyonlarda tercih edilmiştir (Conidi vd., 2020).

Meyve suları OD ile atmosferik basınç altında ve oda sıcaklığında konsantre edilebildiğinden termal evaporasyonda karşılaşılan kalite kayıplarının büyük ölçüde önüne geçilebilmektedir. Termal

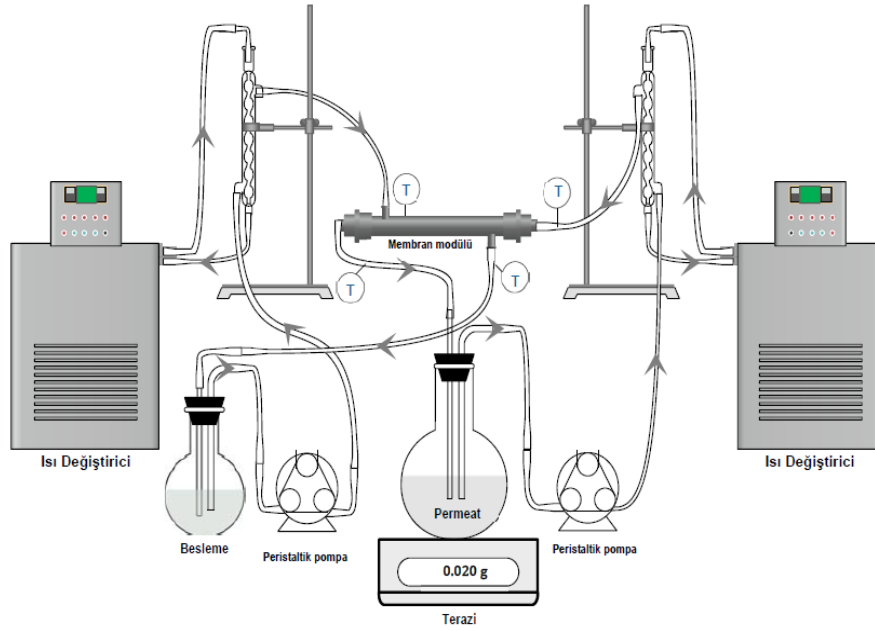
veya vakum evaporasyon ile konsantrasyon işlemlerinde renk bozulmaları ve uçucu aroma bileşenlerin kayıpları gerçekleşebilmektedir (Kaynarcalıdan, 2022). OD sürecinde kullanılan hipertonik tuz çözeltisinde lipofilik karakterdeki aroma bileşenlerinin çözünürlüğünün düşük olması da aroma madde kayıplarını sınırlandıran ve organoleptik özelliklerinin korunmasını sağlayan önemli bir faktördür (Kahvecioğlu, 2019; Roozitalab vd., 2019). Rosella özütü, üzüm ve elma sularının pilot ölçekli hidrofobik ve polipropilen OD membranı ile konsantre edildiği bir çalışmada aroma kayıpları rosella özütü, üzüm ve elma sularında sırasıyla yaklaşık olarak %1-27, %6-31 ve %12-46 aralığında değişmekteyken, vakum buharlaştırma tekniğinde sırasıyla %21-79, %32-100 ve %71-100 aralıklarında olduğu belirtilmiştir (Cissé vd., 2011).

OD sistem performansını etkileyen operasyonel parametreler, beslemenin ve permeatın konsantrasyonları, sıcaklıkları, akış hızları ve kullanılan hipertonik tuz çözeltisinin türü olarak sıralanabilir. Beslemenin sıcaklığındaki artış ve permeatın sıcaklığındaki azalış OD için itici güç olan transmembran buhar basıncı farkının artmasına neden olur. Ananas suyunun OD ile konsantre edildiği bir çalışmada meyve suyu sıcaklığının 15°C kadar artırılması buharlaşma akısını yaklaşık iki kata kadar çıkarmıştır. (Hongvaleerat vd., 2008). OD tekniğinde çalışma koşullarının sistem performansına etkilerinin incelendiği bir çalışmada ise tuzlu veya şekerli çözeltilerin kütle aktarımını etkileyen en önemli etken olduğu belirtilmiştir. Besleme çözeltisinin viskozitesinde meydana gelen artışın, su akısında azalmaya ve konsantrasyon polarizasyona neden olduğu çeşitli çalışmalarla desteklenmiştir (Rehman vd., 2019). Farklı tuzlu su çözeltisi kullanımının OD sistem performansı üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada ise greylift suyu PVDF ve hidrofobik membranlar kullanılarak konsantre edilmiştir. Konsantrasyon performansı CaCl_2 ve yüksek ozmotik basınç üretme potansiyeline sahip AlCl_3 ve LiCl tuzlu çözeltileri ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Tuzlu su ağırlığındaki en az artış gösteren koşullarda, akış hızlarının en yüksek değerlere ulaştığı gözlemlenmiştir. Deney sonunda AlCl_3

çok sayıda iyon içerdiğinden ve LiCl yüksek doygunlukta konsantre bir çözelti olduğundan greylfurt sularının konsantrasyonunda daha verimli sonuçların elde edildiği belirtilmiştir (Takallu vd., 2022). OD sırasında gözlemlenen akı düşüşü ise ozmotik çözelti konsantrasyonundaki azalışından veya yüksek °Briks değerinin üzerine

çıkıldığı zaman gerçekleşen meyve suyu viskozitesindeki artışından kaynaklandığı belirtilmiştir (Onsekizoglu, 2010).

OD tekniğinin laboratuvar ölçekli deneysel şeması Şekil 4'te gösterilmiş olup, membrana giriş ve çıkış hatları şekil üzerinde belirtilmiştir.



Şekil 4. Ozmotik distilasyon düzeneğinin laboratuvar ölçekli şematik gösterimi (Yılmaz ve Bağcı, 2018)

Ozmotik distilasyon sisteminin kullanımda meyve sularındaki biyoaktif bileşenlerin korunması çeşitli çalışmalara konu olmaktadır (Liguori vd., 2021; Kumar vd., 2022). Brokoli suyundaki ısıya duyarlı biyoaktif bileşenlerin geri kazanılmasına yönelik membran tekniklerinin kullanıldığı bir çalışmada ekstraksiyon işlemi UF, konsantrasyon işlemi ise OD ile gerçekleştirilmiştir. UF membranlarından elde edilen permeatta ve OD ile yaklaşık 6 kat konsantre edilen örneklerde biyoaktif bileşiklerin ve toplam antioksidan aktivitenin önemli ölçüde korunduğu belirtilmiştir (Yılmaz, 2019). Mandalina suyunun OD ile konsantrasyonu işlemi öncesinde UF ile berraklaştırmanın yapıldığı bir diğer çalışmada ise meyve suyu 9°Briks'den 60.4°Briks değerine kadar konsantre edilmiştir. UF ve OD sonrası elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında antioksidan aktivite ve toplam fenolik madde miktarının OD örneklerinde en

yüksek seviyelerde olduğu gözlemlenmiştir. Deney sonucunda UF ve OD sistemlerinin birlikte kullanımının geleneksel yöntemlere kıyasla daha verimli sonuçlara neden olduğu belirtilmiştir (Kumar vd., 2020). Vilar ve arkadaşlarının (2025), böğürtlen suyunun ozmotik distilasyonla konsantrasyonunun fizikokimyasal özellikler üzerindeki etkilerini incelediği çalışmada; MF, TO ve OD teknikleri entegre şekilde uygulanmıştır. Ön işlem olarak gerçekleştirilen MF, berraklaştırma amacıyla kullanılmış; ardından TO ve OD teknikleri birlikte kullanılarak 55.5 °Briks'e ulaşan bir konsantre elde edilmiştir. Bu işlem sonucunda, konsantre böğürtlen suyunun antosiyanin içeriği ve antioksidan kapasitesi, beslemeye kıyasla sırasıyla 6.2 ve 7.7 kat artış gösterdiği belirtilmiştir (Vilar vd., 2025). Ancak bu değerlendirmelerde konsantrasyon faktörü de göz önünde bulundurulmalıdır.

Pervaporasyon

Meyve suyu üretiminde meyvenin kendine has aromasının korunması son ürünün kalitesini doğrudan etkileyen önemli bir faktördür. Özellikle konsantrasyon aşamasında uygulanan termal evaporasyon işlemi sırasında alkoller ve aldehitler gibi uçucu nitelikteki aroma bileşenleri kayıpları sıkça gözlenmektedir. Bu kayıpları minimize etmek amacıyla konsantrasyon öncesinde buhar damıtma, kısmi yoğunlaştırma veya sıvı solvent ekstraksiyonu gibi aroma ayırma işlemleri uygulanmaktadır (Berk ve Gökmen, 2024). Ancak bu yöntemler hedef moleküllerin kararlılığını olumsuz yönde etkileyerek aroma geri kazanım verimliliğini düşürebilir (Castro-Muñoz vd., 2023). Sıvı çözeltilerde seyreltik türlerin ayrımı için termal olmayan alternatif membran uygulaması olarak ortaya çıkan pervaporasyon (PV), meyve sularından aroma bileşenlerinin yüksek seçicilikte ayrımına olanak sağlayan yüksek enerji verimliliğine sahip bir tekniktir (Bağcı, 2021). Düşük miktarda enerji tüketimi, kimyasal kullanımına gerek duyulmaması, kontaminasyon riskinin olmaması ve düşük maliyetli olması PV tekniğinin avantajlarından. Dezavantajları ise uzun işlem süreleri, besleme sıvısının saflaştırılması gerekliliği ve membran kirlenmelerinin neden olduğu işletme maliyetleri olarak sıralanabilmektedir (Rochón vd., 2020).

“Permeasyon” ve “evaporasyon” terimlerinden yola çıkarak 1917 yılında Kober tarafından tanımlanan PV tekniği, sıvı karışımları seçici geçirgen bir membran kullanarak kısmi buharlaştırma yoluyla ayrıştırabilen bir ayırma tekniğidir (Tofighy ve Mohammadi, 2020). Pervaporasyonda sıvı besleme membranın seçici yüzeyi ile temas ettirilir ve kimyasal potansiyel farkı itici kuvvetiyle membran içinden geçen maddeler diğer yüzeyden buhar olarak uzaklaştırılır. Uygulamada bu fark, vakum uygulanarak, taşıyıcı gaz beslenmesi yapılarak veya sıcaklık farkıyla permeat tarafındaki buhar basıncının azaltılmasıyla yaratılır (Castro-Muñoz vd., 2023). Her durumda da buhar fazında membranı geçen permeat bir yoğunlaştırıcı vasıtasıyla sıvıya dönüştürülür. Sistemde, çözelti-difüzyon modeline göre üç aşamalı kütle aktarımı söz konusudur: (1) Hedef bileşenin, kimyasal

afiniteye dayalı olarak membranın seçici katmanına adsorpsiyonu, (2) konsantrasyon gradyanı nedeniyle bileşenin membran boyunca difüzyonu, (3) Bileşenin, membran/permeat ara yüzeyinde desorpsiyonu (Conidi, vd., 2020; Wang vd., 2024).

PV teknolojisinde hedef bileşenlerle olan kimyasal afiniteye dayalı olarak seçici bir bariyer işlevi gören membran, sürecin ayırım performansını etkileyen en kritik bileşendir. Membranın seçiciliği meyve suyu gibi sıvı karışımlardan aroma bileşenlerinin ayrılmasında etkin rol oynar (Castro-Muñoz vd., 2023). Genel olarak, hidrofobik membranlar daha az polar veya apolar moleküllerin taşınmasına daha uygun olup, özellikle alkoller, aldehitler ve esterler gibi aroma bileşenlerinin geri kazanımında tercih edilirken, hidrofilik membranlar su ve yüksek polariteye sahip moleküllerin taşınmasını kolaylaştırır (Liv vd., 2020; Silvestre vd., 2019). Bu nedenle, aroma bileşenlerinin etkin bir şekilde ayrılması için doğru membran seçimi, pervaporasyon sürecinde kritik öneme sahiptir. PV sistemlerinde genellikle organofilik kompozit asimetric membranlar tercih edilmekte olup, polidimetilsiloksan (PDMS), PV yoluyla ile meyve sularındaki aroma maddelerinin geri kazanımı konusunda mevcut literatür çalışmalarında açık ara en çok kullanılan malzemedir (Paredes vd., 2024; Rao vd., 2020; Sun vd., 2020).

PV işleminin verimliliğini etkileyen temel operasyonel parametreler besleme sıcaklığı ve süzüntü basıncıdır. Besleme sıcaklığındaki artış, amorf bölgedeki polimer zincirlerinin termal hareketliliğini artırarak daha fazla serbest hacim yaratır; dolayısıyla aroma bileşiklerinin membran boyunca difüzyon hızı artar (Wang vd., 2024). Sıcaklık artışı ile birlikte aroma bileşenlerinin denge buhar basıncının yükselmesi de permeat akısındaki artışa katkı sağlayan bir diğer faktördür (Du vd., 2021). Pereira ve arkadaşlarının (2005), böğürtlen suyundan uçucu aroma maddelerinin PVDF PV membranı kullanılarak ayrıldığı bir çalışmada, sıcaklığın sistem performansı üzerine etkisi Arrhenius denkliği kullanılarak incelenmiş, aktivasyon enerjisi arttıkça akı değerlerinin de doğru orantılı olarak arttığı belirtilmiştir (Rao vd., 2020). Diğer taraftan, yüksek sıcaklıklar membran

seçiciliğini olumsuz yönde etkileyebilir (Soares vd., 2020). Örneğin, taze nar suyundaki ve model çözeltideki (aldehit, ester, alkol ve terpen yapılarındaki dört farklı aroma bileşiğinden oluşan) aroma bileşenlerinin plaka çerçeve PV modülünde iki farklı kompozit membran türü ile geri kazanımının karşılaştırılması olarak incelendiği bir çalışmada kullanılan her iki kompozit membranda da yüksek akı değerine ulaşıldığı ve daha düşük zenginleştirme faktörlerine erişilebildiği belirtilmiştir. (Raisi vd., 2008). Dolayısıyla, PV işleminin optimum performansı için besleme sıcaklığının dikkatlice kontrol edilmesi gerekir. PV işleminde, süzüntü tarafındaki basınç da aroma bileşiklerinin geri kazanım verimliliğini önemli ölçüde etkiler. Süzüntü tarafındaki basınç arttığında membran boyunca kısmi basınç farkı azalır. Bu durum aroma maddelerinin taşınımı için membran boyunca itici gücün azalmasına yol açar (Wang vd., 2024; Pereire vd., 2005). Bununla beraber süzüntü basıncının PV ile aroma maddelerinin geri kazanıma etkisi ayrımı yapılacak aroma maddelerinin uçuculuk derecesi ile doğrudan ilişkilidir. Genel olarak, düşük doymuş buhar basıncına sahip alkoller yüksek doymuş buhar basıncına sahip esterlere kıyasla süzüntü basıncındaki değişikliklere daha duyarlıdır (Li vd., 2020). Örneğin, portakal suyundan uçucu aroma bileşiklerinin ticari bir polidimetilsiloksan (PDMS) membranı kullanılarak PV ile geri kazanımı sürecinde süzüntü basıncındaki artışın, limonen, linalool ve a-terpineol gibi bazı aroma bileşiklerinin zenginleştirme faktöründe hafif bir düşüşe neden olduğu, buna karşılık, etil asetat, etil bütirat ve hekzanal gibi bazı aroma bileşiklerinin zenginleştirme faktörlerinin süzüntü basıncının artmasıyla arttığı rapor edilmiştir (Aroujalian ve Raisi, 2007). Aroma maddelerinin uçuculuklarındaki farklılıklar göz önünde bulundurularak süzüntünün aroma profili süzüntü basıncı ile kontrol edilebilir (Wang vd., 2024). Portakal suyu endüstrisinin organik atıklarının değerlendirildiği bir çalışmada enerji tasarrufu sağlamak amacıyla sisteme pervaporasyon işlemi entegre edilmiştir. Pervaporasyon membranlarıyla damıtma kolonunu birleştirerek etanol geri kazanım sürecinin iyileştirilmesinin amaçlandığı bu çalışmada kolondan %99,9 oranında etanol

geri kazanımı sağlanabilmiştir. Pervaporasyonla desteklenen entegre sistem sayesinde enerji ve su tüketimini minimize edilirken; susuz etanol gibi yüksek katma değerli ürünler geri kazanılabilmektedir. Bu yaklaşımın endüstriyel üretimde atıkların değerlendirilmesinde ekonomik ve çevresel olarak sürdürülebilir çözümler sunduğu belirtilmiştir (Marchette vd., 2025).

SONUÇ

Meyve suyu üretim süreçlerinde ürünün kalitesinin ve besin öğelerinin korunması özellikle termal bazlı konsantrasyon işlemleri gibi geleneksel uygulamalarda önemli bir zorluk teşkil etmektedir. Bu tür işlemler, yüksek sıcaklıkların etkisiyle “pişmiş tat” oluşumuna sebep olmakta ve organoleptik özellikleri olumsuz yönde etkilemekte; aynı zamanda ürünün besinsel kalitesinin düşmesine yol açmaktadır. Buna karşın, membran ayırma teknikleri düşük sıcaklık gereksinimleri, düşük enerji tüketimi, gelişmiş ürün kalitesi, yüksek verimlilik ve atıkların azaltılması gibi avantajları sayesinde sürdürülebilir üretim hedeflerine ulaşmada umut verici bir alternatif olarak görülmektedir. Meyve suyu üretiminde MF veya UF teknikleri berraklaştırma aşamasında kullanılan geleneksel depektinizasyon ve berraklaştırma aşamalarına alternatif olarak yaygın olarak tercih edilirken, NF, TO ve OD teknikleri geleneksel termal evaporasyona kıyasla ürün kalitesinin daha iyi korunması ve enerji verimliliği gibi avantajlarıyla giderek popülerleşmekte ve endüstriyel boyuttaki üretimlerde de yaygınlaşmaktadır. Aroma geri kazanımı veya aroma bileşenlerinin konsantrasyon edilmesinde ise PV tekniğinin kullanımı ile olumlu sonuçlar elde edilmektedir. Ancak membran ayırma tekniklerinde kullanılan membranların yüzeyinde ve gözeneklerinde partikül birikimi dolayısıyla ortaya çıkan ve sistem performansının azalmasına neden olan “kirlenme olayı” ve sınırlı membran dayanıklılığı gibi problemler membran bazlı ayırma teknolojilerinin endüstride kullanımını sınırlandırmaktadır. Membran modül konfigürasyonlarının ve membran materyalinin doğru seçimi, operasyonel parametrelerin işletim ve akışkan dinamiği bağlamında optimizasyonu, meyve suyuna uygulanan önfloklaştırma gibi ön işlemler gibi süreç mühendisliği yaklaşımları

kirlenme ve membran ömrü ile ilgili yapısal sınırlamaların üstesinden gelmek için temel faktörler olarak görülmektedir. Membran yüzeylerinin modifikasyonu, yeni nesil membran tasarımları, yapay zekâ destekli süreçlerin kullanımı, ultrason ve entegre membran prosesleri meyve suyu endüstrisindeki uygulamalarda kirlenmenin sınırlandırılması için yeni stratejilerdir. Membran kirlenmesi olayının kontrol edilerek membran ömrünün uzatılmasına yönelik bahsedilen stratejiler sayesinde pilot ölçekli modellerden endüstriyel boyuttaki sistemlere daha hızlı bir geçiş yapılabilecektir. Membran bazlı ayırma tekniklerinin entegrasyonuna yönelik yaklaşımlar özellikle meyve sularının konsantrasyonunda yüksek verimlilikle taze meyve suyu karakteristiklerinin büyük ölçüde korunması bakımından dikkat çekmektedir. Entegre membran ayırma sistemleri, meyve suyu endüstrisi atıklarındaki değerli biyoaktif bileşenlerin yüksek seçicilik ve verimlilikle geri kazanımı ve katma değerli ürün eldesinde de sürdürülebilir ve çevre dostu bir yaklaşım olarak önemli bir potansiyele sahiptir. Bu doğrultuda pazardaki hızlı büyüme potansiyeli, sanayideki giderek artan uygulanabilirliği ve gelecekteki teknolojik yeniliklerle birleşerek meyve suyu endüstrisinde sürdürülebilir, verimli ve kaliteli üretim süreçlerinin yaygınlaşması beklenmektedir.

YAZAR KATKILARI

Tüm yazarlar makalenin hazırlanması, yazımı ve yayınlanmasına katkıda bulunmuşlardır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması beyan etmemektedir.

KAYNAKLAR

Abdullah, S., Karmakar, S., Mishra, S., Pradhan, R. C. (2022). Ultrafiltration of cashew apple juice using hollow fibers for shelf life extension: process optimization, flux modelling and storage study. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 1-11.

Aguir, I. B., Miranda, N. G., Gomes, F. S., Santos, M. C., de GC Freitas, D., Tonon, R. V., Cabral, L. M. (2012). Physicochemical and

sensory properties of apple juice concentrated by reverse osmosis and osmotic evaporation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 137-142.

Al-Obaidi, M. A., Kara-Zaitri, C., Mujtaba, I. M. (2017). Optimum design of a multi-stage reverse osmosis process for the production of highly concentrated apple juice. *Journal of Food Engineering*, 214, 47-59.

Apaydın, A.S. (2024). Aronya suyunun polietersülfon (PES) ultrafiltrasyon membranları ile berraklaştırılması ve membran kirlenme mekanizmalarının incelenmesi. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.

Apel, P. Y., Biesheuvel, P. M., Bobreshova, O. V., Borisov, I. L., Vasil'eva, V. I., Volkov, V. V., ... Yaroslavl'tsev, A. B. (2024). Concentration polarization in membrane systems. *Membranes and Membrane Technologies*, 6(3), 133-161.

Arend, G. D., Rezzadori, K., Soares, L. S., Petrus, J. C. C. (2019). Performance of nanofiltration process during concentration of strawberry juice. *Journal of food science and technology*, 56, 2312-2319.

Aroujalian, A., Raisi, A. (2007). Recovery of volatile aroma components from orange juice by pervaporation. *Journal of Membrane Science*, 303(1-2), 154-161.

Bağcı, P. O. (2014). Effective clarification of pomegranate juice: A comparative study of pretreatment methods and their influence on ultrafiltration flux. *Journal of Food Engineering*, 141, 58-64.

Bağcı, P. O. (2021). Integrated membrane processes in pomegranate juice processing. *Membrane Systems in the Food Production: Volume 2: Wellness Ingredients and Juice Processing*, 207.

Bagci, P. O., Akbas, M., Gulec, H. A., Bagci, U. (2019). Coupling reverse osmosis and osmotic distillation for clarified pomegranate juice concentration: Use of plasma modified reverse osmosis membranes for improved

- performance. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 52, 213-220.
- Bagci, P. O., Kahvecioglu, H., Gulec, H. A., Bagci, U. (2020). Pomegranate juice concentration through the consecutive application of a plasma modified reverse osmosis membrane and a membrane contactor. *Food and Bioproducts Processing*, 124, 233-243.
- Baker, R. W. (2023). *Membrane technology and applications*. John Wiley & Sons.
- Belleville, M. P., Sanchez-Marcano, J., Bargeman, G., Timmer, M. (2021). Nanofiltration in the food industry. *Nanofiltration: Principles, Applications, and New Materials*, 2, 499-542.
- Berk, E., Gökmen, V. (2024). Evaporation in the fruit juice industry. In *Evaporation Technology in Food Processing* (pp. 105-136). Woodhead Publishing.
- Bevilacqua, A., Petrucci, L., Perricone, M., Speranza, B., Campaniello, D., Sinigaglia, M., Corbo, M. R. (2018). Nonthermal technologies for fruit and vegetable juices and beverages: Overview and advances. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(1), 2-62.
- Biniáz, P., Rahimpour, E., Basile, A., Rahimpour, M. R. (2022). Fundamentals of membrane technology. In *Current Trends and Future Developments on (Bio-) Membranes* (pp. 1-23). Elsevier.
- Cai, M., Xie, C., Zhong, H., Tian, B., Yang, K. (2021). Identification of anthocyanins and their fouling mechanisms during non-thermal nanofiltration of blueberry aqueous extracts. *Membranes*, 11(3), 200.
- Cassano, A., Conidi, C., Drioli, E. (2020). A comprehensive review of membrane distillation and osmotic distillation in agro-food applications. *Journal of Membrane Science and Research*, 6(3), 304-318.
- Cassano, A., Donato, L., Drioli, E. (2007). Ultrafiltration of kiwifruit juice: Operating parameters, juice quality and membrane fouling. *Journal of Food Engineering*, 79 (2), 613-621.
- Cassano, A., Marchio, M., Drioli, E. (2007). Clarification of blood orange juice by ultrafiltration: analyses of operating parameters, membrane fouling and juice quality. *Desalination*, 212 (1-3), 15-27.
- Cassano, A., Rastogi, N. K., Basile, A. (2020). Reverse osmosis in food processing. In *Current trends and future developments on (bio-) membranes* (pp. 229-257). Elsevier.
- Castro-Muñoz, R., Ahmad, M. Z., Cassano, A. (2023). Pervaporation-aided processes for the selective separation of aromas, fragrances and essential (AFE) solutes from agro-food products and wastes. *Food Reviews International*, 39(3), 1499-1525.
- Castro-Muñoz, R., Boczkaj, G., Gontarek, E., Cassano, A., Fila, V. (2020). Membrane technologies assisting plant-based and agro-food by-products processing: A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, 95, 219-232.
- Charcosset, C. (2021). Classical and recent applications of membrane processes in the food industry. *Food Engineering Reviews*, 13(2), 322-343.
- Chew, J. W., Kilduff, J., Belfort, G. (2020). The behavior of suspensions and macromolecular solutions in crossflow microfiltration: An update. *Journal of Membrane Science*, 601, 117865.
- Cissé, M., Vaillant, F., Bouquet, S., Pallet, D., Lutin, F., Reynes, M., Dornier, M. (2011). Athermal concentration by osmotic evaporation of roselle extract, apple and grape juices and impact on quality. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(3), 352-360.
- Conidi, C., Castro-Muñoz, R., Cassano, A. (2020). Membrane-based operations in the fruit juice processing industry: A review. *Beverages*, 6(1), 18.
- Conidi, C., Drioli, E., Cassano, A. (2020). Perspective of membrane technology in pomegranate juice processing: a review. *Foods*, 9(7), 889.
- Corbatón-Báguena, M. J., Vincent-Vela, M. C., Gozálvarez-Zafrilla, J. M., Álvarez-Blanco, S., Lora-García, J., Catalán-Martínez, D. (2016).

- Comparison between artificial neural networks and Hermia's models to assess ultrafiltration performance. *Separation and Purification Technology*, 170, 434-444.
- Cui, Z. F., Muralidhara, H. S. (2010). Membrane technology: a practical guide to membrane technology and applications in food and bioprocessing. Elsevier.
- De Barros, S. T. D., Andrade, C. M. G., Mendes, E. S., Peres, L. (2003). Study of fouling mechanism in pineapple juice clarification by ultrafiltration. *Journal of membrane Science*, 215(1-2), 213-224.
- Demoulin, C., Wisniewski, C., Ricci, J., Delalonde, M., Dahdouh, L. (2022). Viscoelastic behavior and fouling propensity of concentrated suspended particles of orange juice with defined size distributions: Towards a better control of the deposit layer properties during microfiltration. *LWT*, 153, 112473.
- Destani, F., Naccarato, A., Tagarelli, A., Cassano, A. (2020). Recovery of aromatics from orange juice evaporator condensate streams by reverse osmosis. *Membranes*, 10(5), 92.
- Díaz-Montes, E., Castro-Muñoz, R. (2019). Metabolites recovery from fermentation broths via pressure-driven membrane processes. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 14(4), e2332.
- Do Nascimento, N. N., Paraíso, C. M., Molina, L. C., Dzyazko, Y. S., Bergamasco, R., Vieira, A. M. S. (2024). Innovative Trends in Modified Membranes: A Mini Review of Applications and Challenges in the Food Sector. *Membranes*, 14(10), 209.
- Du, C., Du, J. R., Feng, X., Wang, J. (2021). Green extraction of perilla volatile organic compounds by pervaporation. *Separation and Purification Technology*, 261, 118281.
- Du, S., Zhao, P., Wang, L., He, G., Jiang, X. (2023). Progresses of advanced anti-fouling membrane and membrane processes for high salinity wastewater treatment. *Results in Engineering*, 17, 100995.
- Field, R. W., Wu, J. J. (2022). Permeate Flux in Ultrafiltration Processes—Understandings and Misunderstandings. *Membranes*, 12(2), 187.
- Firman, L. R., Ochoa, N. A., Marchese, J., Pagliero, C. (2020). Designing of spiral wound nanofiltration multistage process for oil concentration and solvent recovery from soybean oil/n-hexane miscella. *Chemical Engineering Research and Design*, 164, 46-58.
- Gaglianò, M., Conidi, C., De Luca, G., Cassano, A. (2022). Partial removal of sugar from apple juice by nanofiltration and discontinuous diafiltration. *Membranes*, 12(7), 712.
- Ghosh, P., Pradhan, R. C., Mishra, S. (2018). Clarification of jamun juice by centrifugation and microfiltration: Analysis of quality parameters, operating conditions, and resistance. *Journal of Food Process Engineering*, 41(1), e12603.
- Guo, P., Abdollahpour, A., Jazbizadeh, M. H., Semiromi, D. T. (2023). The amount of improvement and therapeutic effect of sports health by increasing the viscosity of peach juice through reverse osmosis and polymer membrane. *Food Bioscience*, 56, 103330.
- Heiranian, M., Fan, H., Wang, L., Lu, X., Elimelech, M. (2023). Mechanisms and models for water transport in reverse osmosis membranes: history, critical assessment, and recent developments. *Chemical Society Reviews*.
- Hongvaleerat, C., Cabral, L. M., Dornier, M., Reynes, M., Ningsanond, S. (2008). Concentration of pineapple juice by osmotic evaporation. *Journal of Food Engineering*, 88(4), 548-552.
- Hua, L., Cao, H., Ma, Q., Shi, X., Zhang, X., Zhang, W. (2020). Microalgae filtration using an electrochemically reactive ceramic membrane: Filtration performances, fouling kinetics, and foulant layer characteristics. *Environmental Science & Technology*, 54(3), 2012-2021.
- Idrees, M. F. (2020). Performance analysis and treatment technologies of reverse osmosis plant—a case study. *Case studies in Chemical and environmental engineering*, 2, 100007.

- Ilame, S. A., Singh, S. V. (2018). Physico-chemical properties of ultrafiltered kinnow (mandarin) fruit juice. *Journal of food science and technology*, 55, 2189-2196.
- Jiao, B., Cassano, A., Drioli, E. (2004). Recent advances on membrane processes for the concentration of fruit juices: a review. *Journal of food engineering*, 63(3), 303-324.
- Kahvecioğlu, H. (2019). Ters ozmoz ve ozmotik distilasyon yöntemleriyle oda sıcaklığında nar suyu konsantresi üretimi. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Kapi, Y. (2021). Stevia ekstraktlarının saflaştırma aşamalarında fonksiyonel bileşiklerin değişiminin saptanması.
- Kaushal, J., Khatri, M., Singh, G., Arya, S. K. (2021). A multifaceted enzyme conspicuous in fruit juice clarification: An elaborate review on xylanase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 193, 1350-1361.
- Kaynarcalıdan, S. (2022). *Ozmotik distilasyon yöntemi ile ısı olmayan koşullarda nar ekşisi üretimi* (Master's thesis, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Kumar, D., Ladaniya, M. S., Gurjar, M., Mendke, S., Kumar, S. (2020). Osmotic membrane distillation for retention of antioxidant potential in Nagpur mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruit juice concentrate. *Journal of Food Process Engineering*, 43(1), e13096.
- Kumar, D., Ladaniya, M. S., Gurjar, M., Mendke, S., Kumar, S. (2022). Positive retention of bioactive compounds and biochemical components of Sathgudi sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) juice concentrate by integrated membrane process. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16(5), 4161-4170.
- Lai Quoc, D., Doan Ngoc Thuc, T., Nguyen Hoang, D. (2022). Flux decline and fouling analysis in reverse osmosis of watermelon juice. *Journal of Food Process Engineering*, 45(12), e14183.
- Li, W., Estager, J., Monbaliu, J. C. M., Debecker, D. P., Luis, P. (2020). Separation of bio-based chemicals using pervaporation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 95(9), 2311-2334.
- Li, X., Younas, M., Rezakazemi, M., Ly, Q. V., Li, J. (2022). A review on hollow fiber membrane module towards high separation efficiency: process modeling in fouling perspective. *Chinese Chemical Letters*, 33(8), 3594-3602.
- Liguori, L., Russo, P., Albanese, D. (2021). Production of highly valued vegetable juice by osmotic distillation technique: Optimization of process parameters. *Chemical Engineering Transactions*, 87, 331-336.
- Liu, W., Livingston, J. L., Wang, L., Wang, Z., del Cerro, M., Younssi, S. A., ... Lin, S. (2024). Pressure-driven membrane desalination. *Nature Reviews Methods Primers*, 4(1), 10.
- Lu, C., Bao, Y., Huang, J. Y. (2021). Fouling in membrane filtration for juice processing. *Current Opinion in Food Science*, 42, 76-85.
- Lu, D., Yao, Z., Jiao, L., Waheed, M., Sun, Z., Zhang, L. (2022). Separation mechanism, selectivity enhancement strategies and advanced materials for mono-/multivalent ion-selective nanofiltration membrane. *Advanced Membranes*, 2, 100032.
- Ma, Z., Noor, I. I., Wang, X., Ren, Y., Wang, J., Wang, Q., ... Liu, H. (2024). A comprehensive review on the recent advances in membrane-based processes for fruit juice concentration. *Food and Bioproducts Processing*.
- Marchette, I. R., Cavallari, R. B. C., Rothier, F. D. C., Bojorge, N. I. B. R., Alhadeff, E. M., Young, A. F., dos Santos, B. F. (2025). Economic assessment and process design to valorize citrus juice industry waste. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*.
- Martín, J., Díaz-Montaña, E. J., Asuero, A. G. (2018). Recovery of anthocyanins using membrane technologies: a review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 48(3), 143-175.
- Meher, J., Durairaj, S., Dharmadhikari, S., Meher, R. (2023). Future Scope of Membrane Technology in Pineapple Juice Processing: A Review. *Membrane and Membrane-Based Processes for Wastewater Treatment*, 181-197.

- Mejia, J. A. A., Yáñez-Fernandez, J. (2021). Clarification processes of orange prickly pear juice (*Opuntia* spp.) by microfiltration. *Membranes*, 11(5), 354.
- Miramontes-Escobar, H. A., Hengl, N., Dornier, M., Montalvo-González, E., Chacón-López, M. A., Achir, N., ... Ortiz-Basurto, R. I. (2024). Coupling Low-Frequency Ultrasound to a Crossflow Microfiltration Pilot: Effect of Ultrasonic Pulse Application on Sono-Microfiltration of Jackfruit Juice. *Membranes*, 14(9), 192.
- Mondal, S., Cassano, A., Conidi, C., De, S. (2021). Quantification of selective transport of fructose and glucose during membrane filtration of pomegranate juice. *Food and Bioprocess Technology*, 14, 272-286.
- Nacem, A., Saeed, B., AlMohamadi, H., Lee, M., Gilani, M. A., Nawaz, R., ... Yasin, M. (2024). Sustainable and green membranes for chemical separations: A review. *Separation and Purification Technology*, 126271.
- Onsekizoğlu, P. (2010). Elma suyu üretiminde ozmotik destilasyon ve membran destilasyon uygulamalarının ürün kalitesine etkileri. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 150-163.
- Onsekizoğlu, P. (2012). Membran distilasyon ve ozmotik distilasyon ile meyve suyu konsantrasyonu. *Gıda*, 37(2), 103-110.
- Othman, M. H. D., Adam, M. R., Pauzan, M. A. B., Hubadillah, S. K., Rahman, M. A., Jaafar, J. (2020). Ultrafiltration Membrane for Water Treatment. *Self-standing Substrates: Materials and Applications*, 119-145.
- Panigrahi, C., Shaikh, A. E. Y., Bag, B. B., Mishra, H. N., De, S. (2021). A technological review on processing of sugarcane juice: Spoilage, preservation, storage, and packaging aspects. *Journal of Food Process Engineering*, 44(6), e13706.
- Paraíso, C. M., dos Santos Pizzo, J., Gibin, M. S., Volnistem, E. A., Visentainer, J. V., Sato, F., ... Madrona, G. S. (2024). Intensified ultrafiltration process for fouling mitigation during concentration of bioactive compounds from hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract: Innovation by using ultrasound and 3D turbulence promoters. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 195, 109612.
- Paredes, D. A. F., Assof, M., Sánchez, R. J., Sari, S., Catania, A., Fanzone, M., Espinosa, J. (2024). Partial dealcoholization of a Malbec wine through pervaporation with a PDMS membrane: Effect of operation temperature on process economics, volatile aroma composition and sensory properties. *Separation and Purification Technology*, 335, 126076.
- Pereira, C. C., Rufino, J. R. M., Habert, A. C., Nobrega, R., Cabral, L. M. C., Borges, C. P. (2005). Aroma compounds recovery of tropical fruit juice by pervaporation: membrane material selection and process evaluation. *Journal of food engineering*, 66(1), 77-87.
- Pereira, G. L. D., Cardozo-Filho, L., Jegatheesan, V., Guirardello, R. (2023). Generalization and Expansion of the Hermia Model for a Better Understanding of Membrane Fouling. *Membranes*, 13(3), 290.
- Perreault, V., Gouin, N., Bérubé, A., Villeneuve, W., Pouliot, Y., Doyen, A. (2021). Effect of pectinolytic enzyme pretreatment on the clarification of cranberry juice by ultrafiltration. *Membranes*, 11(1), 55.
- Pruksasri, S., Lanner, B., Novalin, S. (2020). Nanofiltration as a potential process for the reduction of sugar in apple juices on an industrial scale. *Lwt*, 133, 110118.
- Raisi, A., Aroujalian, A., Kaghazchi, T. (2008). Multicomponent pervaporation process for volatile aroma compounds recovery from pomegranate juice. *Journal of Membrane Science*, 322(2), 339-348.
- Rajendran, S. R., Mason, B., Doucette, A. A. (2021). Review of membrane separation models and technologies: processing complex food-based biomolecular fractions. *Food and Bioprocess Technology*, 14, 415-428.
- Rao, Y., Ni, F., Sun, Y., Zhu, B., Zhou, Z., Yao, Z. (2020). Efficient recovery of the volatile aroma

- components from blackberry juice using a ZIF-8/PDMS hybrid membrane. *Separation and Purification Technology*, 230, 115844.
- Rehman, W. U., Muhammad, A., Younas, M., Wu, C., Hu, Y., Li, J. (2019). Effect of membrane wetting on the performance of PVDF and PTFE membranes in the concentration of pomegranate juice through osmotic distillation. *Journal of Membrane Science*, 584, 66-78.
- Rochón, E., Cortizo, G., Cabot, M. I., Cubero, M. T. G., Coca, M., Ferrari, M. D., Lareo, C. (2020). Bioprocess intensification for isopropanol, butanol and ethanol (IBE) production by fermentation from sugarcane and sweet sorghum juices through a gas stripping-pervaporation recovery process. *Fuel*, 281, 118593.
- Roozitalab, A., Raisi, A., Aroujalian, A. (2019). A comparative study on pomegranate juice concentration by osmotic distillation and thermal evaporation processes. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 36, 1474-1481.
- Rudolph-Schöpping, G., Petrinić, I., Bukšek, H., Lipnizki, F. (2024). Membrane processes in fruit juice production. In *Current Trends and Future Developments on (Bio-) Membranes* (pp. 25-56). Elsevier.
- Sánchez-Arévalo, C. M., Aldegheri, F., Vincent-Vela, M. C., Álvarez-Blanco, S. (2024). Integrated Membrane Process in Organic Media: Combining Organic Solvent Ultrafiltration, Nanofiltration, and Reverse Osmosis to Purify and Concentrate the Phenolic Compounds from Wet Olive Pomace. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(10), 5233.
- Sandoval, A. D. O., Brião, V. B., Fernandes, V. M. C., Hemkemeier, A., Friedrich, M. T. (2019). Stormwater management by microfiltration and ultrafiltration treatment. *Journal of Water Process Engineering*, 30, 100453.
- Sarbatly, R., Sariau, J., Krishnaiah, D. (2023). Recent developments of membrane technology in the clarification and concentration of fruit juices. *Food Engineering Reviews*, 15(3), 420-437.
- Satyannarayana, K. V. V., Sandhya Rani, S. L., Vinoth Kumar, R. (2023). Clarification of citrus fruit juices using microfiltration technique equipped with indigenously developed novel ceramic membrane. *Journal of Food Science and Technology*, 1-11.
- Severcan, S. S., Uzal, N., Kahraman, K. (2020). Clarification of pomegranate juice using PSF microfiltration membranes fabricated with nano TiO₂ and Al₂O₃. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(8), e14559.
- Sheu, M. J., Wiley, R. C. (1983). Preconcentration of apple juice by reverse osmosis. *Journal of Food Science*, 48(2), 422-429.
- Shigidi, I., Anqi, A. E., Elkhaleefa, A., Mohamed, A., Ali, I. H., Brima, E. I. (2021). Temperature impact on reverse osmosis permeate flux in the remediation of hexavalent chromium. *Water*, 14(1), 44.
- Silvestre, W. P., Livinalli, N. F., Baldasso, C., Tessaro, I. C. (2019). Pervaporation in the separation of essential oil components: A review. *Trends in food science & technology*, 93, 42-52.
- Singh, V., Das, C. (2021). Clarification of Citrus fruit (Mosambi) juice by hybrid (Pretreatment and Membrane) process. *Materials Today: Proceedings*, 47, 1384-1388.
- Singh, R. P., Heldman, D. R. (2020). *Introduction to food engineering*. Nobel Akademik Yayıncılık.
- Soares, L. S., Vieira, A. C. F., Fidler, F., Fritz, A. R. M., Di Luccio, M. (2020). Pervaporation as an alternative for adding value to residues of oyster (*Crassostrea gigas*) processing. *Separation and Purification Technology*, 232, 115968.
- Sotoft, L. F., Christensen, K. V., Andrésen, R., Norddahl, B. (2012). Full scale plant with membrane based concentration of blackcurrant juice on the basis of laboratory and pilot scale tests. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 54, 12-21.
- Sun, X., Dang, G., Ding, X., Shen, C., Liu, G., Zuo, C., ... Jin, W. (2020). Production of alcohol-free wine and grape spirit by pervaporation membrane technology. *Food and Bioprocess Processing*, 123, 262-273.

- Takallu, M., Hosseini, H., Mirsaeedghazi, H., Zarouk, S. (2022). Effect of Brine Type on the Performance of Red Grapefruit Juice Concentration by Osmotic Distillation. *Journal of Membrane Science and Research*, 8(4).
- Tian, M., Ma, T., Goh, K., Pei, Z., Chong, J. Y., Wang, Y. N. (2022). Forward Osmosis Membranes: The significant roles of selective layer. *Membranes*, 12(10), 955.
- Tofighy, M. A., Mohammadi, T. (2020). Carbon nanotubes-polymer nanocomposite membranes for pervaporation. In *Polymer nanocomposite membranes for pervaporation* (pp. 105-133). Elsevier.
- Tomczak, W., Gryta, M. (2021). Application of ultrafiltration ceramic membrane for separation of oily wastewater generated by maritime transportation. *Separation and Purification Technology*, 261, 118259.
- Tseng, H. H., Lau, W. J., Al-Ghouthi, M. A., An, L. (Eds.). (2022). *60 Years of the Loeb-Sourirajan Membrane: Principles, New Materials, Modelling, Characterization, and Applications*. Elsevier.
- Urošević, T., Trivunac, K. (2020). Achievements in low-pressure membrane processes microfiltration (MF) and ultrafiltration (UF) for wastewater and water treatment. In *Current Trends and Future Developments on (Bio-) Membranes* (pp. 67-107). Elsevier.
- Verified Market Reports. (2024). Membrane technology for food and beverage processing market: Size and forecast. Retrieved November 19, 2024, from <https://www.verifiedmarketreports.com/product/membrane-technology-for-food-and-beverage-processing-market-size-and-forecast/>
- Vilar, J., Monteiro, F., Corrêa-Filho, L., Gomes, F., Tonon, R., Freitas-Sá, D., ... Cabral, L. (2025). Chemical and Sensory Evaluation of Blackberry (*Rubus* sp.) Juice Concentrated by Reverse Osmosis and Osmotic Evaporation. *Membranes*, 15(1), 10.
- Wang, X., Cui, W., Guo, W., Sun, B., Huang, M., Li, J., ... Meng, N. (2024). Separation techniques for manufacturing fruit spirits: From traditional distillation to advanced pervaporation process. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 23(1), e13278.
- Wang, L., Li, Z., Fan, J., Lu, G., Liu, D., Han, Z. (2023). Prediction of membrane purification by membrane fouling based on mathematic and machine learning models combined with image processing technology. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11(5), 111154.
- Warsinger, D. M., Tow, E. W., Maswadeh, L. A., Connors, G. B., Swaminathan, J. (2018). Inorganic fouling mitigation by salinity cycling in batch reverse osmosis. *Water research*, 137, 384-394.
- Wei, D. S., Hossain, M., Saleh, Z. S. (2008). Separation of polyphenolics and sugar by ultrafiltration: Effects of operating conditions on fouling and diafiltration. *International Journal of Chemical and Biomolecular Engineering*, 1(1), 14-23.
- Wenten, I. G., Khoiruddin, K., Reynard, R., Lugito, G., Julian, H. (2021). Advancement of forward osmosis (FO) membrane for fruit juice concentration. *Journal of Food Engineering*, 290, 110216.
- Yılmaz, E. (2019). Brokolideki biyoaktif bileşenlerin membran prosesleri ile kazanılması. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Yılmaz, E., Bağcı, P. O. (2019). Ultrafiltration of broccoli juice using polyethersulfone membrane: fouling analysis and evaluation of the juice quality. *Food and Bioprocess Technology*, 12(8), 1273-1283.
- Yılmaz, E., Bağcı, P. O. (2018). Production of phytotherapeutics from broccoli juice by integrated membrane processes. *Food chemistry*, 242, 264-271.
- Zapata-Sierra, A., Cascajares, M., Alcayde, A., Manzano-Agugliaro, F. (2021). Worldwide research trends on desalination. *Desalination*, 519, 115305.
- Zhao, F., Han, X., Shao, Z., Li, Z., Li, Z., Chen, D. (2022). Effects of different pore sizes on membrane fouling and their performance in algae harvesting. *Journal of membrane science*, 641, 119916.

Zhu, Z., Luo, X., Yin, F., Li, S., He, J. (2018). Clarification of Jerusalem artichoke extract using ultra-filtration: Effect of membrane pore size and operation conditions. *Food and bioprocess technology*, 11, 864-873.

Zhu, J., Geng, Y., Huang, Y., Ma, C., Dong, L., Chen, F., ... Ji, J. (2024). Emerging Novel

Processing Technologies Towards the Stabilization of Anthocyanins. *Food Reviews International*, 1-30.

**IMPACT OF ENVIRONMENTAL VARIABLES ON ANTIMICROBIAL
SUBSTANCE PRODUCTION BY LACTIC ACID BACTERIA: A BOX-BEHNKEN
DESIGN APPROACH**

**Evrım GUNES ALTUNTAS^{1*}, Busra SEVİM¹,
Asena Aslihan CELİK¹, Özlem KAYMAZ²**

¹ Ankara University, Biotechnology Institute, Ankara-Turkey

² Ankara University, Science Faculty, Statistical Department, Ankara-Turkey

Received /Geliş: 14.01.2025; Accepted /Kabul: 26.05.2025; Published online /Online baskı: 10.06.2025

Gunes Altuntas, E., Sevim, B., Celik, A. A., Kaymaz, O. (2025). *Impact of environmental variables on antimicrobial substance production by lactic acid bacteria: A box-behnken design approach*. GIDA (2025) 50 (3) 466-478 doi: 10.15237/ gida.GD25018

Gunes Altuntas, E., Sevim, B., Celik, A. A., Kaymaz, O. (2025). Çevresel değişkenlerin laktik asit bakterileri tarafından antimikrobiyal madde üretimi üzerindeki etkisi: Box-behnken tasarım yaklaşımı. GIDA (2025) 50 (3) 466-478 doi: 10.15237/ gida.GD25018

ABSTRACT

In this research, we employed a 3-factor Box-Behnken experimental design (BBD) to ascertain the optimal conditions for the production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria (LAB). The experimental parameters encompassed three variables: temperature (30, 35 and 37°C), incubation time (24, 48 and 72 hours), and substrate concentration (1%, 2% and 3%). The production of antimicrobial substances by *Lactiplantibacillus plantarum* F2 isolate was influenced by the incubation period. The highest antimicrobial substance production (average inhibition zone diameter 12.00 mm for antimicrobial activity assay; 12.09 mm for Box-Behnken estimation) of *Pediococcus pentosaceus* 50 isolate was achieved at a temperature of 37°C, an incubation period of 24 hours, and a substrate concentration of 2% in the environment. These findings indicate that the antimicrobial activity of LAB typically intensifies toward the end of the logarithmic phase and into the stationary phase, likely due to the increased production of secondary metabolites.

Keywords: Lactic acid bacteria, antimicrobial activity, optimization, Box-Behnken design

**ÇEVRESEL DEĞİŞKENLERİN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ TARAFINDAN
ANTİMİKROBİYAL MADDE ÜRETİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ: BOX-
BEHNKEN TASARIM YAKLAŞIMI**

ÖZ

Bu araştırmada, laktik asit bakterileri (LAB) tarafından antimikrobiyal madde üretimi için optimum koşulları belirlemek amacıyla 3 faktörlü Box-Behnken deneysel tasarımı (BBD) kullanılmıştır. Deneysel parametreler üç değişkenden oluşmakta olup, bu değişkenler: sıcaklık (30, 35 ve 37°C), inkübasyon süresi (24, 48 ve 72 saat) ve substrat konsantrasyonu (%1, %2 ve %3) olarak

* Corresponding author / Sorumlu yazar

✉: evrimgunes@gmail.com

☎: (+90) 505 319 0439

Evrım Gunes Altuntas; ORCID no: 0000-0003-4897-9388

Busra Sevim; ORCID no: 0000-0001-7751-1405

Asena Aslihan Celik; ORCID no: 0000-0003-2550-1605

Özlem Kaymaz; ORCID no: 0000-0003-1235-8117

belirlenmiştir. *Lactiplantibacillus plantarum* F2 izolatı tarafından antimikrobiyal madde üretiminin, değişen inkübasyon süresinden etkilendiği gözlenmiştir. *Pediococcus pentosaceus* 50 izolatının en yüksek antimikrobiyal madde üretimi (deneysel süreçte elde edilen ortalama inhibisyon zon çapı 12.00 mm; Box-Behnken tasarımında tahmin edilen değer 12.09 mm), inkübasyon sıcaklığı 37°C, inkübasyon süresi 24 saat ve ortamda %2'lik bir substrat konsantrasyonu olduğunda elde edilmiştir. Bu bulgular, LAB'nin antimikrobiyal aktivitesinin genellikle logaritmik fazın sonuna doğru ve durağan fazda arttığını, bunun da muhtemelen ikincil metabolitlerin artan üretiminden kaynaklandığını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Laktik asit bakterileri, antimikrobiyal aktivite, optimizasyon, Box-Behnken tasarımı

INTRODUCTION

Lactic acid bacteria (LAB) are Gram-positive bacteria classified within the Firmicutes phylum, Bacilli class, and Lactobacillales order (Özoğlu et al., 2021; Wang et al., 2021; Ringø et al., 2018). Additionally, the majority of LAB are Generally Regarded as Safe (GRAS) and Qualified Presumption of Safety (QPS) status, making them frequently encountered in the food and health sectors (Zapašnik et al., 2022; Chen and Wang, 2019; Alvarez-Sieiro et al., 2016). LAB play a significant role in the production of fermented foods, including dairy products (such as yogurt and cheese), olives, and pickles, which are part of daily nutrition of the individual (Özoğlu et al., 2021; Wang et al., 2019).

LAB are fermentative bacteria that can carry out the process through two different types of fermentation which are classified as homofermentative and heterofermentative (Zapašnik et al., 2022; Abedi and Hashemi, 2020; Ringø et al., 2018). Homofermentative LAB utilize glucose in the environment as a source of carbohydrate and produce lactic acid, which defines their name (Abedi and Hashemi, 2020; Ringø et al., 2018). On the other hand, heterofermentative LAB can use carbohydrates in the environment as a carbon source and produce not only lactic acid but also acetic acid, alcohol, and carbon dioxide. In all these processes, LAB contribute to antimicrobial activity, preventing the proliferation of pathogens and, in turn, inhibiting the spoilage of food and producing various metabolites that serve as growth inhibitors. Among these metabolites, there are various compounds like bacteriocins, hydrogen peroxide, and diacetyl. Moreover, these metabolites can also inhibit the cellular adhesion

and colonization of pathogenic groups within the gastrointestinal system (Zapašnik et al., 2022; Ringø et al., 2018). Furthermore, LAB, known as probiotics and residing in the intestinal system, can utilize waste materials within the gastrointestinal tract as a carbon source for organic acid production (Wang et al., 2021; Neal-McKinney et al., 2012).

The diversity of metabolites produced by LAB depends on a multitude of factors, including environmental temperature, pH, composition of the growth medium, diversity of carbon and nitrogen sources, bacterial species and strains, as well as various other components (Managamuri et al., 2016; Singh et al., 2016). Optimal conditions can be determined through various growth medium optimizations conducted in a laboratory setting. Prior to experimental processes, statistical modeling for various components aims not only to achieve the most accurate and meaningful results in the optimization process but also to enhance process efficiency, thereby reducing the time and cost associated with manual optimization procedures (Managamuri et al., 2016; Elibol, 2004). Experimental designs often involve methods such as Plackett-Burman Design, Taguchi Design, Central Composite Design, Box-Behnken Design, or a combination of these techniques (Ahsan et al., 2022; Singh et al., 2016). Among these methods, Box-Behnken Design is a straightforward statistical technique, allowing for experimental modeling independently of complex factorial or fractional factorial calculations. In this design, modeling is carried out using three levels for each factor. It operates based on incomplete factorial designs, generating second-degree models, and typically focuses on three fundamental factors (Cardoso et

al., 2025; Singh et al., 2016; Ferreira et al., 2007). Box-Behnken Design is particularly preferred for optimization processes in fermentation-based studies.

This study aimed to optimize the antimicrobial activities of LAB (*Pediococcus pentosaceus* ATCC 43201 reference strain and *Lactiplantibacillus plantarum* F2, *Pediococcus acidilactici* 40, *Pediococcus pentosaceus* 50, *Lactobacillus plantarum* O2 isolated from various food sources) using the Box-Behnken Design method. Three factors (substrate content of the growth medium, temperature, and incubation time) were chosen for statistical modeling. In vitro experiments were conducted under the conditions derived from this model, and the antimicrobial activities of these LAB against *Escherichia coli* ATCC 25922, were assessed. As a result of all experiments, a condition was identified that was statistically significant and found to enhance the antimicrobial effects of the bacteria.

MATERIALS AND METHODS

Material

The lactic acid bacteria (*Lactiplantibacillus plantarum* F2, *Pediococcus acidilactici* 40, *Pediococcus pentosaceus* 50, *Lactobacillus plantarum* O2) which were isolated in the context of previous studies (Project No: 119O343, Çelik 2022), and found to have antimicrobial activity, were used as materials in the current study. De Man Rogosa Sharpe medium (MRS, Merck) was used to activate the isolates and Tryptic Soy Broth or Agar was used for the activation of pathogenic bacteria (*E. coli* ATCC 25922) used as indicator in testing antimicrobial activity *Pediococcus pentosaceus* ATCC 43201 was also used as a reference strain in the experiments.

Determination of the Antimicrobial Activity

In this assay, the well diffusion method proposed by Harris et al. (1989) was used with some modifications. The cultures activated in MRS broth medium inoculated with 1% inoculation rate were centrifuged at 6000 x g for 15 minutes at the end of the period. Following centrifugation, bacteria were separated from the medium with a 0.45 µm pore diameter filter (Sartorius Cellulose

Acetate Membrane Filters) and the supernatant was obtained. The obtained supernatant was used in antimicrobial activity experiments after its pH was adjusted to 6.5. Following this step, the inhibitory effect of the bacterial supernatant on the pathogenic bacteria was observed. For this purpose, 100 µL from each sterile supernatant sample was transferred to wells on TSA (Tryptic Soy Agar), and the Petri dishes were kept at +4°C to allow the supernatant to diffuse. Then, 50 µL of *E. coli* ATCC 25922 were added to 8 mL of soft TSA (at 45°C), mixed, and subsequently transferred onto TSA. After the agar solidified, the Petri dishes were left for incubation for 24 hours. The diameters of the zones formed at the end of the incubation were measured.

The optimization of antimicrobial substance production

There can be many factors that influence the production of antimicrobial substances. Among these, factors like incubation temperature and the type and quantity of the carbohydrate source in the medium are crucial parameters. In this study, the production of antimicrobial substances was attempted to be optimized based on these factors. For incubation temperature, values of 30, 35, and 37°C were selected, and for incubation time, values of 24, 48, and 72 hours were chosen. The concentration of the substrate (glucose present in the medium) was set to 1%, 2%, and 3%. The values included in the experiments were selected based on the literature information provided for the optimum growth conditions of LAB up today (Moradi et al., 2023; Mahato et al., 2021; Rohmatussolihat et al., 2018).

Response Surface Modeling (RSM): RSM is an approach that combines statistical and mathematical techniques to improve and optimize processes. The design space for this process is an n-dimensional space determined by “n independent variables”, where each variable is defined within an acceptable range. RSM constructs empirical models to more precisely and accurately predict the possible values of response variables concerning the inputs. With the established model, the aim is to predict the necessary factor values to achieve the desired

response value and determine the most suitable operating range for the relevant product in the process (Demir et al., 2017).

In RSM, multivariate regression analysis methods are used. The multiple regression model, which includes k regression predictors believed to have an effect on the response variable Y , is represented as Equation 1.1:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \varepsilon \quad (1.1)$$

For $k = 2$, the model is obtained as shown in Equation 1.2:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \varepsilon \quad (1.2)$$

A first-degree response surface model with two predictors and an intercept term is obtained as follows:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \varepsilon \quad (1.3)$$

Equation 1.3 can be referred to as the standard regression model. Similarly, a second-degree response surface model is obtained as shown in Equation 1.4:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \varepsilon \quad (1.4)$$

Here, Y is the dependent variable, β_0 is the intercept, β_1 , β_2 , β_{12} , β_{11} , and β_{22} are regression coefficients, and X_1 and X_2 are independent variables (Montgomery, 2001; Box and Draper, 1987).

Box-Behnken Design: Box-Behnken is one of the types of experimental designs, which is a three-level design that does not include complete

or fractional factorial designs. For the model evaluation, R^2 , R^2 (adj) measurements and the “lack of fit” value for model fit were taken into account. In the Box-Behnken experimental arrangement, one of the factors is fixed at its center value while combinations of all levels of the other factors are applied. First, the level of factor X_1 is fixed, and combinations of levels of factors X_2 and X_3 are applied. Then, the same procedures are applied successively for the levels of factors X_2 and X_3 . The central point values are located in the last rows of the design matrix (Tekindal and Kaymaz, 2018; Tekindal et al., 2012).

With this design, coefficients for the 1st and 2nd-degree models are estimated. In a three-factor Box-Behnken design, 15 experiments need to be conducted.

In this study, a 3-factor Box-Behnken experimental design (Box and Behnken, 1960) was employed to determine the effects of factors that affect antimicrobial production during media optimization and select the optimal conditions. The MINITAB 19 trial version software package (MINITAB Statistical Software, State College, Pennsylvania, USA) was used for the analysis. A significance level of $\alpha = 0.05$ was assumed for all analyses.

The independent variables that influence antimicrobial production, including the range and levels of incubation temperature, incubation time, and substrate concentration, are provided in Table 1.

Table 1 The experimental design levels of selected variables

Variable parameter	Levels		
	-1	0	1
Temperature (X_1)	30°C	35°C	37°C
Time (X_2)	24	48	72
Substrat (X_3)	%1	%2	%3

RESULTS

In the scope of the study, the bacteria investigated were previously isolated from fermented food products. The bacteria with codes of F2, O2, 40, and 50 were identified as *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, and *Pediococcus pentosaceus*, respectively (Project No:119O343; Çelik, 2022). It was observed that these bacteria exhibited inhibitory effects on food pathogens, including *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, and *Escherichia coli* ATCC 25922.

The experiments required for the 3-factor Box-Behnken design, as stated in Table 1, were conducted in the study and the results of the experiments are recorded. In this study the inhibition zone diameters of the isolates on *E. coli* ATCC 25922 pathogen under different conditions are used to predict the Box-Behnken

design the details of the results are presented as Supplementary Material.

The Box-Behnken Design Results of *Pediococcus pentosaceus* ATCC 43201

The Box-Cox transformation was applied to the antimicrobial substance production data because it did not satisfy the assumption of a normal distribution. However, when the variance analysis results were examined, it was seen that the variables in the model, such as temperature, time and substrate amount, which are thought to affect antimicrobial production, did not significantly explain the response variable ($p>0.05$).

The Box-Behnken Design Results of *Lactiplantibacillus plantarum* F2

Antimicrobial zone diameters of *L. plantarum* F2 on *E. coli* ATCC 25922 obtained at different incubation temperatures, incubation times and substrate concentrations are given in the Table 2.

Table 2 The antimicrobial activity zone diameters of *L. plantarum* F2 on *E. coli* pathogen at different conditions

Number	X ₁	X ₂	X ₃	Zone (mm)
1	0	0	0	10.50
2	0	-1	-1	12.50
3	-1	0	1	11.00
4	-1	-1	0	14.00
5	0	-1	1	12.00
6	1	0	-1	11.00
7	0	1	-1	12.50
8	0	0	0	11.50
9	1	-1	0	13.00
10	1	1	0	14.50
11	0	1	1	12.75
12	1	0	1	11.00
13	0	0	0	13.00
14	-1	0	-1	10.50
15	-1	1	0	14.75

Since the antimicrobial production data did not meet the assumption of normality, Box-Cox transformation was applied. When the variance analysis results were examined, it was seen that the main and interaction effects of the variables such as temperature, time and substrate amount, which are thought to have an effect on antimicrobial production, were not significant ($p>0.05$).

However, the quadratic term of incubation time was significant. This situation shows that antimicrobial production does not change linearly but curvilinearly depending on time. This situation suggests the existence of an optimum point where antimicrobial production is maximized at a certain level of time. The reduced model, obtained after eliminating the non-

significant variables, is shown in Table 3. The following regression model explained 67.11% of variability in the data ($R^2(\text{adj})=61.63\%$), and showed an adequate fit (lack of fit, $p=0.76$).

The model based on incubation time obtained for *L. plantarum* F2 bacteria using the data obtained from the experiment is presented below:

Table 3 The results of transformed variance analysis of *L. plantarum* F2

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	2	0.000785	0.000392	12.24	0.001
Linear	1	0.000082	0.000082	2.55	0.136
Time	1	0.000082	0.000082	2.55	0.136
Square	1	0.000766	0.000766	23.91	0.000
Time* Time	1	0.000766	0.000766	23.91	0.000
Error	12	0.000385	0.000032		
Lack-of-Fit	8	0.000207	0.000026	0.58	0.761
Pure Error	4	0.000178	0.000044		
Total	14	0.001170			

Model:

$$\begin{aligned}
 & -\text{Antimicrobial Production}^{-1} \\
 & = -0.0380 - 0.002287 \text{ Time} \\
 & + 0.000025 \text{ Time} * \text{Time}
 \end{aligned}$$

Substrate and temperature variables were excluded from the Contour and Surface plots, as they were not found to be significant in the model. The graphs, therefore illustrate the

relationship between incubation time and antimicrobial production only. Based on the plotted model, the maximum antimicrobial production is estimated to occur at approximately 72 hours. At this time point, the predicted antimicrobial activity zone diameter is 13.94 mm, with a 95% confidence interval of [12.68 mm; 15.48 mm] (Figure 1).

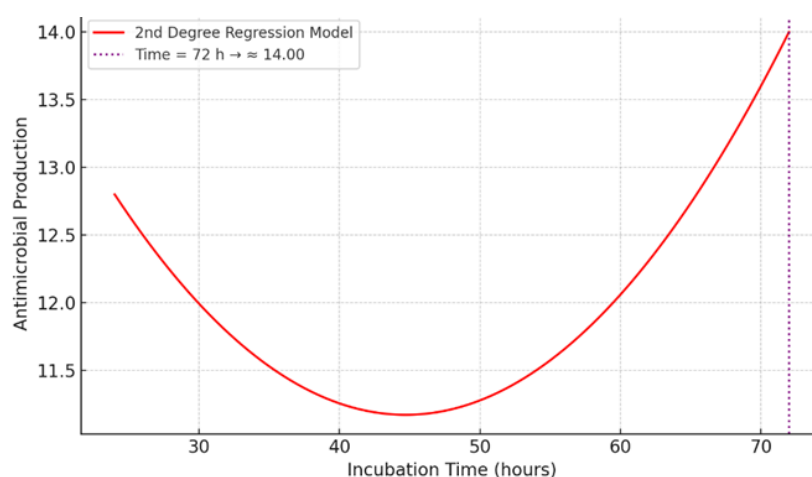


Figure 1 The incubation time related antimicrobial activity of *L. plantarum* F2 isolate according to the 2nd degree regression model.

The Box-Behnken Design Results of *Pediococcus pentosaceus* 50

Antimicrobial zone diameters obtained at different incubation temperatures, incubation

times and substrate concentrations for *P. pentosaceus* 50 on *E. coli* ATCC 25922 are given in the Table 4.

Table 4 The antimicrobial activity zone diameters of *P. pentosaceus* 50 on *E. coli* at different conditions

Number	X ₁	X ₂	X ₃	Zone (mm)
1	0	0	0	9.00
2	0	-1	-1	11.00
3	-1	0	1	9.50
4	-1	-1	0	12.00
5	0	-1	1	11.00
6	1	0	-1	11.00
7	0	1	-1	11.50
8	0	0	0	9.50
9	1	-1	0	12.00
10	1	1	0	12.00
11	0	1	1	9.50
12	1	0	1	10.00
13	0	0	0	11.00
14	-1	0	-1	10.00
15	-1	1	0	12.00

The Box-Cox transformation was applied as the antimicrobial production data violated the assumption of normality. When the variance analysis results were examined, it was seen that the main and interaction effects of the variables such as temperature, time and substrate amount, which are thought to have an effect on antimicrobial production, were not significant ($p > 0.05$). However, the quadratic terms of the variables were significant. This situation shows that antimicrobial production does not change linearly but curvilinearly according to incubation temperature, substrate concentration and incubation time. In this case, the insignificant interaction terms were excluded from the model and the reduced model was obtained as follows. The second-order regression model was established for antimicrobial production. The model coefficients were estimated with a 95% confidence level and the model demonstrated an adequate fit (lack of fit, $p = 0.69$), explaining 94.27% ($R^2(\text{adj}) = 81.17\%$) of the variability in the data. While Table 5 displays the results of transformed variance analysis of *P. pentosaceus* 50, Figure 2 shows the Normal Probability Plot and Pareto Chart of *P. pentosaceus* 50.

The model based on incubation temperature, incubation time and substrate concentration obtained for *P. pentosaceus* ATCC 43201 bacteria

using the data obtained from the experiment is presented below:

Model:

$$\begin{aligned}
 & ((\text{Antimicrobial Production}^{\lambda - 1})) / (\lambda \times g^{\lambda - 1}) \\
 & = 162.1 - 9.53 \text{ Temperature} \\
 & - 0.3559 \text{ Time} + 5.62 \text{ Substrate} \\
 & + 0.1431 \text{ Temperature} \\
 & * \text{Temperature} + 0.003626 \text{ Time} \\
 & * \text{Time} - 1.491 \text{ Substrate} * \text{Substrate} \\
 & (\lambda = 14, g = 10.6830 \text{ is the geometric mean of} \\
 & \text{Antimicrobial Production})
 \end{aligned}$$

Since time was identified as the least influential variable in the model, it was held constant in the contour and surface plots. Optimization analysis revealed that the maximum antimicrobial production occurs at an incubation temperature of 37°C, an incubation time of 24 hours, and a substrate concentration of approximately 2%. Under these conditions, the predicted antimicrobial activity zone diameter is 12.09 mm, with a 95% confidence interval of [11.91 mm; 12.24 mm]. These findings suggest that the specified conditions are favorable for optimal production. When the incubation time was fixed at “24 hours”, the following plots were generated. Figure 3 presents the contour and surface plot analysis results, while Figure 4 illustrates the optimal antimicrobial production levels of each variable for *P. pentosaceus* 50.

Table 5 The results of transformed variance analysis of *P. pentosaceus* 50

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	6	32.0549	5.3425	21.92	0.000
Linear	3	1.3831	0.4610	1.89	0.209
Temperature	1	0.3263	0.3263	1.34	0.281
Time	1	0.2261	0.2261	0.93	0.364
Substrate	1	0.6873	0.6873	2.82	0.132
Square	3	31.6832	10.5611	43.33	0.000
Temperature*Temperature	1	6.5984	6.5984	27.07	0.001
Time*Time	1	14.6776	14.6776	60.22	0.000
Substrate*Substrate	1	7.7989	7.7989	32.00	0.000
Error	8	1.9500	0.2437		
Lack-of-Fit	4	0.7209	0.1802	0.59	0.691
Pure Error	4	1.2291	0.3073		
Total	14	34.0049			

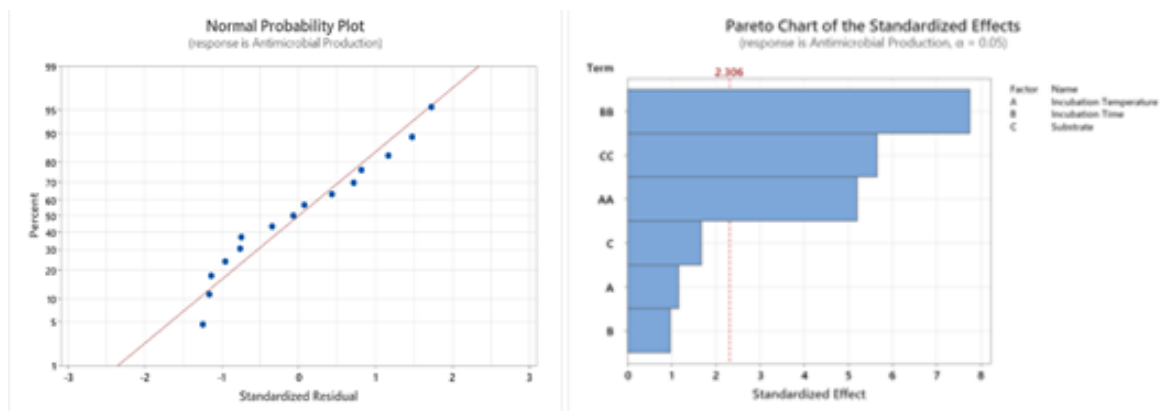


Figure 2 The normal probability plot and pareto chart of *P. pentosaceus* 50

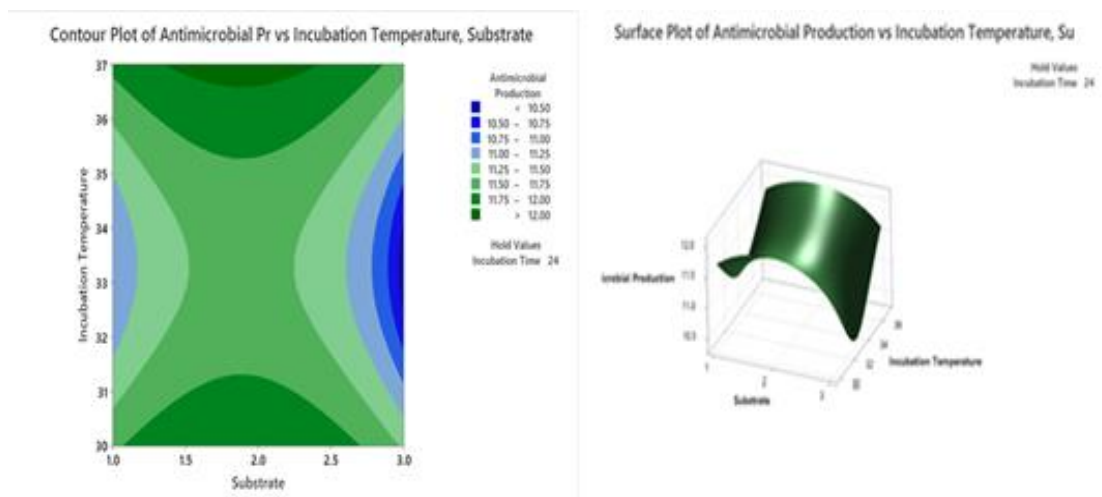


Figure 3 Contour plot and surface plot of variables for *P. pentosaceus* 50 isolate

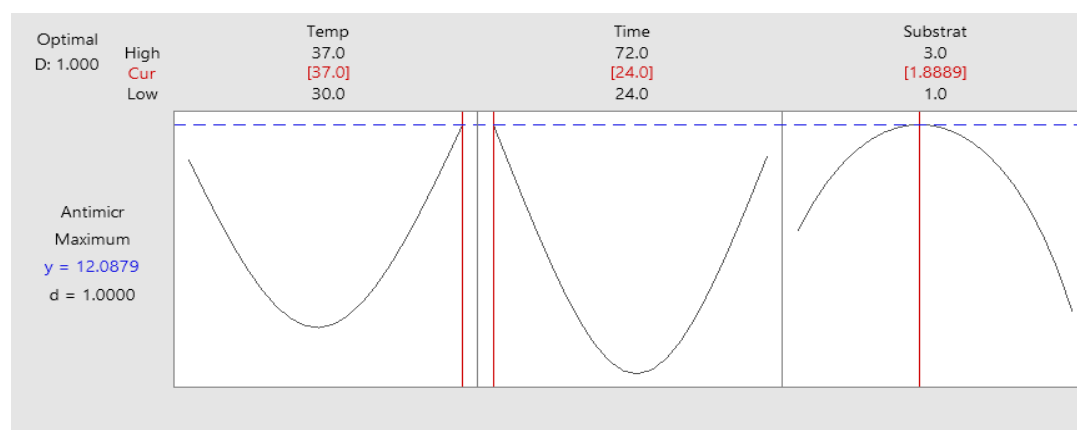


Figure 4 Changes in variables with antimicrobial production, showing the optimal antimicrobial production of each variable for *P. pentosaceus* 50.

The Box-Behnken Design Results of *Pediococcus acidilactici* 40 and *Lactobacillus plantarum* O2 isolates

Antimicrobial production data of isolate *P. acidilactici* 40 and *L. plantarum* O2 was transformed using the Box-Cox transformation due to the lack of conformity with the normal distribution assumption. However, when examining the results of the variance analysis, it is observed that the variables, temperature, time, and substrate amount, which were thought to have an effect on antimicrobial production, do not significantly explain the response variable ($P > 0.05$).

DISCUSSION

The growth conditions are not only affect the survival of the microorganisms but also effect the metabolite production. It is a good way to use models to predict the optimum conditions for the growing and metabolite production of the organisms. Box-Behnken design is an experimental design and a nonlinear model of Response Surface Methodology developed by Box and Behnken in 1960 which is preferred to exhibit and predict the desired conditions for biological samples. Our study showed that Box-Behnken design may be a good vehicle for understanding the optimal conditions for most of the LAB. The most desirable results were obtained for isolate *P. pentosaceus* 50 in the current

study. There are some literature declaring the successful Box-Behnken model for determining optimum conditions for LAB.

While our study focused on the production of antimicrobial substances by LAB, and Zhang et al. (2017) also used the Box-Behnken design for the optimization of culture medium for *Lactobacillus bulgaricus*. The study results indicated that when the glucose concentration is $9.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; caseinhydrolysate concentration is $15.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and glutamate concentration is $7.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ in the medium, the number of viable bacteria of *L. bulgaricus* could reach to $(2.95 \pm 0.07) \times 10^9$, which is very close to the predicted value of the model of $3.00 \times 10^9 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$. The researchers declared that the optimized conditions and models used in the study were feasible and effective.

The lactic acid (which is the best-known antimicrobial substance produced by lactic acid bacteria) production of *Lactobacillus plantarum* JX183220 with cassava flour (*Manihot esculenta* Crantz) in semi-solid fermentation by Response Surface Methodology was searched by Sridevi et al. (2015). Box-Behnken design of Response Surface Methodology was used with different parameters such as substrate concentration, temperature and pH. Maximum production of lactic acid by *Lactobacillus plantarum* JX183220 was

observed on 4th day of incubation with 2% inoculum and 0.3% Calcium carbonate. Optimization using Box -Behnken design of RSM resulted in maximum lactic acid production of 18.3679 g/100 g of cassava at optimum conditions of substrate concentration, 1.225%; Temperature, 36.39°C and pH 6.43. The Box-Behnken design was reported as a convenient tool in optimization process of lactic acid production. The results obtained in the study, especially at the incubation temperature point, are similar to our study.

A study was conducted with an objective to develop a low cost growth medium for enhancing the biomass production of a bio-therapeutic bacterial strain *Lactobacillus plantarum* AS-14 (Manzoor et al., 2017). Cheese whey, corn steep liquor, yeast extract and two operating conditions (temperature and pH) were found to be the most significant parameters in the study. The best culture medium contained 60 g/L cheese whey, 15 g/L glucose and 15 g/L corn steep liquor in addition to other minor ingredients and it resulted in maximum dry cell mass (15.41 g/L) by using response surface methodology (RSM). The second-order polynomial regression model determined that the maximum cell mass production (16.02 g/L) would be obtained at temperature 40°C and pH 6.2. The cost effective medium developed in this research was offered for large-scale commercial application where economics is quite likely important.

Box-Behnken design was used to remove Aflatoxin M1 from the environment using microorganisms (Salem-Bekhit et al. 2023). When the parameters focused on in the study were evaluated, it was similar to the study we conducted in terms of incubation temperature and time. The researchers evaluated a biological method to remove Aflatoxin M1 (AFM1), a harmful toxin in milk derived from contaminated animal feed. Researchers used *Lactobacillus rhamnosus* and *Saccharomyces cerevisiae* to detoxify AFM1. A Box-Behnken design was employed to optimize the microbial ratio, incubation time, and temperature. Using ELISA for detection, the method achieved up to 98.4% AFM1 reduction in

contaminated milk, offering a safe, low-cost, and efficient solution for milk detoxification.

A study performed by Rifa'i et al. (2025) aimed to develop a functional yogurt enriched with green tea (GT) and encapsulated *Lactocaseibacillus paracasei* E1 (LpE1) using a Box-Behnken Design (BBD). The experiment optimized three variables: GT concentration (2–4% w/v), encapsulated LpE1 (2–4% w/v), and incubation time (18–30 h). LpE1 beads, produced by extrusion and characterized via SEM and FT-IR, were spherical (~1.89 mm) and structurally stable. The optimal formulation—4% GT, 2% LpE1, 30 h incubation—achieved high antioxidant activity (89.84% DPPH), significant total phenolic (380.51 mg GAE/g) and flavonoid content (802.65 mg QE/g), good viability (9.55 log CFU/mL), and desirable physicochemical properties. Despite lower consumer acceptance than plain yogurt, the GT-enriched yogurt demonstrated improved functional and health-promoting characteristics, suggesting promise for future probiotic products. The study demonstrates the effective use of the Box-Behnken design in optimizing the experimental conditions.

Lactiplantibacillus plantarum (formerly *Lactobacillus plantarum*) is known for producing antimicrobial peptides (AMPs), particularly bacteriocins, making it valuable in both food preservation and biomedical applications. Similar to our study, a study used Response Surface Methodology (RSM) with a Box-Behnken design to optimize conditions for maximum antibacterial production (Prema et al., 2024). The optimal parameters—35 °C, pH 6.5, and 48 h incubation—led to a more than 10-fold increase in antibacterial yield. Initial pH was the most significant factor influencing production ($p < 0.05$). The findings support the use of Box-Behnken design for efficient scale-up of AMP production from *L. plantarum*.

In our study, 5 bacteria were included to experiments. Among these bacteria one of them (*P. pentosaceus* 50) was more convenient for the modeling study. For *Lactiplantibacillus plantarum* F2

only incubation time could be used as a significant parameter in the modeling study. On the other hand this design could not be applied for some isolates (*P. pentosaceus* ATCC 43201, *P. acidilactici* 40 and *L. plantarum* O2). According to these results, Box-Behnken design can be accepted partially successful in the optimization process prediction. Mainly the growth conditions were take into consideration in this study but the design can be adapted to many other research area of microbiology. In the experiments carried out within the scope of this study, the Box-Behnken design was successfully applied for bacteria *L. plantarum* F2 and *P. pentosaceus* 50. The models developed for both bacterial isolates are presented in the relevant sections. For isolate F2, a model was constructed based solely on incubation time, while for isolate 50, a comprehensive model incorporating all experimental parameters—incubation temperature, incubation time, and substrate concentration—was designed.

CONCLUSION

Several parameters can affect bacterial growth environments. Evaluating these parameters individually may not yield accurate results, and it is necessary to consider the interactions of all these parameters within the matrix. Bacterial cells or bacterial metabolites may need to be produced as products on an industrial scale or in a laboratory setting. Optimal systems are preferred in all of these processes. In this regard, the Box-Behnken design can assist in predicting optimal conditions. In this study, we attempted to establish optimal conditions for the production of antimicrobial substances that are important in the environments where they are present, produced by LAB. The parameters considered in the experiments were incubation temperature, incubation time, and the concentration of substrate in the environment. When examining the results obtained, it is generally observed that longer incubation times lead to a simultaneous increase in antimicrobial production. Furthermore, it was determined that all three parameters were effective in the antimicrobial activity performance of the *P. pentosaceus* 50 which was included in the experiments. However, an optimal system proposal using the Box-Behnken

design could not be made for the antimicrobial production of the three isolates (*P. pentosaceus* ATCC 43201 *P. acidilactici* 40 and *L. plantarum* O2). The model used in the study was found to be partially successful and applicable to microbial processes.

AUTHOR CONTRIBUTION

Conceptualization: EGA. Analysis and data curation: BS, AAC, OK, EGA. Funding acquisition: EGA. Methodology: OK, EGA. Investigation: BS, AAC, OK. Supervision: EGA. Writing – original draft - review & editing: EGA. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no competing interests.

ACKNOWLEDGMENT

The Lactic acid bacteria isolates used in this study were obtained previously in the project supported by TUBITAK Grant No #119O343 and the master degree thesis of Asena Aslihan Celik submitted to Ankara University Science Institute, Ankara-Turkey.

FUNDING

This study was supported by TUSEB (Health Ministry of Turkey) with the Grant No #12028.

REFERENCES

- Abedi, E., Hashemi, S. M. B. (2020). Lactic acid production – producing microorganisms and substrates sources-state of art. *Heliyon*, 6(10), e04974.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04974>
- Ahsan, T., Zang, C., Yu, S., Pei, X., Xie, J., Lin, Y., Liu, X., Liang, C. (2022). Screening, and Optimization of Fermentation Medium to Produce Secondary Metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens*, for the Biocontrol of Early Leaf Spot Disease, and Growth Promoting Effects on Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Fungi*, 8(11).
- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., Kuipers, O. P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology*

- and *Biotechnology*, 100(7), 2939-2951. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7343-9>
- Box, G.E.P., Behnken, D.W. (1960). Some new three level design for study of quantitative variables, *Technometrics*, 2, 455-476.
- Box, G.E.P., Draper N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces, A Wiley-Interscience Publication. 1st ed. Canada John Wiley and Sons pp. 34-57, 304-381, 423-474.
- Cardoso, C.E.D., Almeida, J.C., Rocha, J. et al. (2025). Application of Box-Behnken design to optimize the phosphorus removal from industrial wastewaters using magnetic nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research*, 32, 6804–6816.
- Celik, A.A. (2022). Determination of the amount of lactic and diacetyl produced by *Pediococcus* strains isolated from some fermented foods. Master Degree Thesis submitted to Ankara University Science Institute, Ankara-Turkey.
- Chen, W., Wang, L. (2019). The Preparation Technology of Pharmaceutical Preparations of Lactic Acid Bacteria. In W. Chen (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: Bioengineering and Industrial Applications* (pp. 227-255). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7283-4_9
- Demir, Ö., Aksu, B., Özsoy, Y. (2017). İlaç Formülasyonu Geliştirilmesinde Deney Tasarımı Seçimi ve Kullanım, *Marmara Pharmaceutical Journal*, 21/2: 216-227. DOI: 10.12991/marupj.277719
- Elibol, M. (2004). Optimization of medium composition for actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2) with response surface methodology. *Process Biochemistry*, 39(9), 1057-1062. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00232-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00232-2)
- Ferreira, S.L.C., Bruns, R.E., Ferreira, H.S., Matos, G.D., David, J.M., Brandão, G.C., da Silva, E.G.P., Portugal, L.A., dos Reis, P.S., Souza, A.S., dos Santos, W.N.L. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597(2), 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>
- Harris, L.J., Daeschel, M.A., Stiles, M.E., Klaenhammer, T.R. (1989). Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 52(6), 3784-387.
- Managamuri, U., Vijayalakshmi, M., Poda, S., Ganduri, V. S. R. K., Babu, R. S. (2016). Optimization of culture conditions by response surface methodology and unstructured kinetic modeling for bioactive metabolite production by *Nocardiosis litoralis* VSM-8. 3 *Biotech*, 6(2), 219. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0535-2>
- Mahato, A.K., Kumari, L., Singh, R.S., Alam, M.T. (2021). Fermentative study on optimization of lactic acid production from cane sugar by *Lactobacillus* spp. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*, 8(2): 712-723.
- Manzoor, A., Qazi, J.I., Haq, I.U., Mukhtar, H., Rasool, A. (2017). Significantly enhanced biomass production of a novel bio-therapeutic strain *Lactobacillus plantarum* (AS-14) by developing low cost media cultivation strategy. *Journal of Biological Engineering*, 5;11:17. doi: 10.1186/s13036-017-0059-2. PMID: 28484513; PMCID: PMC5418682.
- Montgomery, D.C. (2001). Design and analysis of experiments, A Wiley-Interscience Publication. 5th ed. Canada, John Wiley and Sons, pp. 427-510.
- Moradi, S., Zeraatpisheh, F., Tabatabaee-Yazdi, F. (2023). Investigation of lactic acid production in optimized dairy wastewater culture medium. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13, 14837–14848. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03230-5>
- Neal-McKinney, J. M., Lu, X., Duong, T., Larson, C. L., Call, D. R., Shah, D. H., Konkel, M. E. (2012). Production of Organic Acids by Probiotic *Lactobacilli* Can Be Used to Reduce Pathogen Load in Poultry. *PLOS ONE*, 7(9), e43928. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043928>
- Özoğlu, Ö., Gümüştaş, M., Özkan, S. A., Güneş-Altuntaş, E. (2021). Investigation of Antimicrobial Activities and Lactic Acid Production Levels of Presumptive Lactic Acid Bacteria Isolated From Naturally Fermented Foods [Research]. *Journal of Agricultural Faculty of*

- Bursa Uludag University, 36(1), 25-40. <https://doi.org/https://doi.org/10.20479/bursa-uludagziraat.943244>
- Prema, P., Ali, D., Nguyen, V.H., Pradeep, B.V., Veeramanikandan, V., Daglia, M., Arciola, C.R., Balaji, P. (2024). A Response Surface Methodological Approach for Large-Scale Production of Antibacterials from *Lactiplantibacillus plantarum* with Potential Utility against Foodborne and Orthopedic Infections. *Antibiotics* (Basel), 13(5):437.
- Project No #119O343. (2023). The searching the effect of structural modifications of pediocin molecule on antimicrobial activity by in silico and in vitro way. The project supported by TUBITAK-Turkey between 2019-2023.
- Rifa'i, M., Fitri Atho'llah, M.F., Arifah, S.N., Suharto, A.R., Fadhilla, A.N., Sa'adah, N.A.M., Ardiansyah, E., Izati, R., Faizah, B.N.A., Fadlilah, D.N., Kavitarina, S.A., Wardhani, S.O., Barlianto, W., Tsuboi, H., Jatmiko, Y.D. (2025). Physicochemical and functional optimization of probiotic yogurt with encapsulated *Lactocaseibacillus paracasei* E1 enriched with green tea using Box-Behnken design. *Applied Food Research*, 5(1), 100690, ISSN 2772-5022.
- Ringø, E., Hoseinifar, S. H., Ghosh, K., Doan, H. V., Beck, B. R., Song, S. K. (2018). Lactic Acid Bacteria in Finfish—An Update [Review]. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01818>
- Rohmatussolihat, R., Lisdiyanti, P., Yopi, Y., Widyastuti, Y., Sukara, E. (2018). Medium Optimization For Antimicrobial Production By Newly Screened Lactic Acid Bacteria. *Annales Bogorienses*, 22(1): 1-11.
- Salem-Bekhit, M.M., Riad, O.K.M., Selim, H.M.R.M., Tohamy, S.T.K., Taha, E.I., Al-Suwayeh, S.A., Shazly, G.A. (2023). Box- Behnken Design for Assessing the Efficiency of Aflatoxin M1 Detoxification in Milk Using *Lactobacillus rhamnosus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Life*, 13, 1667.
- Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., Tripathi, C. K. (2016). Strategies for Fermentation Medium Optimization: An In-Depth Review. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2087. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02087>
- Sridevi, V., Padmaja, M., Sahitya, A., Harsha Vardhan, N., H. Rao, G. (2015). Application of Box-Behnken Design for the Optimized Production of Lactic Acid by Newly Isolated *Lactobacillus plantarum* JX183220 Using Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Flour. *Biotechnology Journal International*, 9(2), 1-9. <https://doi.org/10.9734/BBJ/2015/20236>
- Tekindal, M.A., Bayrak, H., Özkaya, B., Genç, Y. (2012). Box-behnken experimental design in factorial experiments: the importance of bread for nutrition and health running head. *Turkish Journal of Field Crops*, 17(2):115-123.
- Tekindal, M., Kaymaz, Ö. (2018). An evaluation of the psychological life quality of women with disabled children with Box Behnken experimental design. *OPUS Uluslararası Toplum Araştırmaları Dergisi*, 8(15):988-1004.
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, DOI=10.3389/fbioe.2021.612285.
- Wang, S., Chen, P., Dang, H. (2019). Lactic Acid Bacteria and γ -Aminobutyric Acid and Diacetyl. In W. Chen (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: Bioengineering and Industrial Applications* (pp. 1-19). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7283-4_1
- Zapaśnik, A., Sokolowska, B., Bryła, M. (2022). Role of Lactic Acid Bacteria in Food Preservation and Safety. *Foods*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/foods11091283>
- Zhang, B., Shu, G., Bao, C., Cao, J., Tan, Y. (2017). Optimization of Culture Medium for *Lactobacillus bulgaricus* using Box-Behnken Design. *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology*, 21(1): 3-10. <https://doi.org/10.1515/aucft-2017-0001>

İçindekiler / Content GIDA (2025)50(3)

Araştırmalar (İngilizce) / Researches (English)

- Gürbüz, G., Üngür, R. N., Kirtıl, E. (2025). *Valorization of beetroot skin for the production of nanocellulose reinforced biocomposite films* / Pancar kabuğunun nanoselüloz ile güçlendirilmiş biyokompozit film üretimi için değerlendirilmesi.....329-341
- Sabin, O., Atalar, I., Encu, Ş. B., Cakir, I. (2025). *Investigation of the usability of commercial kefir beverages as inoculum in homemade kefir production* / Ticari kefir içeceklerinin ev yapımı kefir üretiminde inokulum kaynağı olarak kullanılabilirliğinin araştırılması.....374-388
- Damar, I. (2025). *Comparative evaluation of different extraction methods for anthocyanin recovery from red onion peel: Enzyme-assisted, ultrasound-assisted, and ultrasound-assisted enzymatic methods* / Kırmızı soğan kabuğundan antosiyanin geri kazanımı için farklı ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırmalı değerlendirmesi: Enzim destekli, ultrason destekli ve ultrason destekli enzimatik yöntemler.....389-405
- Çelebi, K. (2025). *Investigation of thermal oxidation of cold pressed poppy (Papaver somniferum L.) seed oil with some edible oils* / Soğuk preslenmiş haşhaş (Papaver somniferum L.) tohumu yağının bazı ticari yağlarla birlikte termal oksidasyonunun araştırılması.....406-414
- Gunes Altuntas, E., Sevim, B., Celik, A. A., Kaymaz, O. (2025). *Impact of environmental variables on antimicrobial substance production by lactic acid bacteria: A box-behnken design approach* / Çevresel değişkenlerin laktik asit bakterileri tarafından antimikrobiyal madde üretimi üzerindeki etkisi: Box-behnken tasarım yaklaşım.....466-478

Araştırmalar (Türkçe) / Researches (Turkish)

- İnatçı, Z., Cingöz, A. (2025). *At kestanesi (Aesculus hippocastanum L.) tohumlarından ultrasonik ve alkali yöntemler kullanarak nişasta ekstraksiyonu ve optimizasyonu* / Starch extraction from horse chestnut (Aesculus hippocastanum L.) seeds using ultrasonic and alkaline methods and optimization317-328
- Demircioğlu, F., Dünder, A. N., Şahin, O. I., Sarıcaoğlu, F. T. (2025). *Chlorella vulgaris ilavesinin ekmek kalite kriterleri üzerine etkisi* / The effect of Chlorella vulgaris addition on bread quality criteria.....342-360

Reviews (English) / Derlemeler (İngilizce)

- Karagöz, C., Toluç, Ö. M. (2025). *Sustainable food systems: Functional foods and management of food waste* / Sürdürülebilir gıda sistemleri: Fonksiyonel gıdalar ve atık yönetimi.....415-426

Derlemeler (Türkçe) / Review (Turkish)

- Yıkıcı, E., Karagül Yüceer, Y. (2025). *Lipaz katalizli enzim modifiye krema üretimi ve lezzet katkısı olarak kullanımı* / Production of lipase-catalyzed enzyme modified cream and its use as a flavor additive.....361-373
- Özdal, H. R., Nakilcioğlu, E. (2025). *Modern ekstraksiyon yöntemlerinin bitkisel protein izolatlarının teknofonksiyonel özelliklerine etkisi* / Effect of modern extraction methods on techno-functional properties of plant protein isolates.....427-441
- Apaydın, A. S., Onsekizoğlu Bağcı, P. (2025). *Membran ayırma tekniklerinin meyve suyu işlemedeki uygulamaları* / Applications of membrane separation techniques in fruit juice processing.....442-465