

**GIDA** (Gıda Teknolojisi Derneği Yayını)  
**THE JOURNAL OF FOOD** (Published by the Association of Food Technology; Turkey)  
Cilt / Volume: 40 • Sayı / Number: 4 • 2015  
İki ayda bir yayımlanır / Published bimonthly  
**ISSN 1300 - 3070; ISSN 1309 - 6273 (GIDA on-line)**

**Sahibi / Owner**

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

Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

Yönetim Kurulu Başkanı / President of the Association

<b>Editörler Kurulu / Editorial Board</b>	<b>Danışma Kurulu / Advisory Board</b>
<b>Baş Editör/ Editor-in Chief</b> Halkman, A. Kadir <i>Ankara University, Turkey</i>	Alichanidis, Efsthios <i>Aristotle University of Thessaloniki, Greece</i> Aran, Necla <i>Istanbul Technical University, Turkey</i> Artık, Nevzat <i>Ankara University, Turkey</i> Baysal, Taner <i>Ege University, Turkey</i> Boyacı, İsmail Hakkı <i>Hacettepe University, Turkey</i> Certel, Muharrem <i>Akdeniz University, Turkey</i> Draughon, Ann <i>Tennessee University, USA</i> Ekşi, Aziz <i>Ankara University, Turkey</i> El Soda, Morsi <i>University of Alexandria, Egypt</i> Fogliano, Vincenzo <i>University of Napoli Federico II, Italy</i> Ghosh, Bikash C. <i>National Dairy Research Institute, India</i> Gollop, Natan <i>The Volcani Center, ARO, Israel</i> Gökmen, Vural <i>Hacettepe University, Turkey</i> Griffiths, Mansel <i>University of Guelph, Canada</i> Göğüş, Fahrettin <i>Gaziantep University, Turkey</i> Gümüşkesen, Aytaç Saygın <i>Ege University, Turkey</i> Güven, Mehmet <i>Cukurova University, Turkey</i> Heperkan, Dilek <i>Istanbul Technical University, Turkey</i> Ho, Chi-Tang <i>The State University of New Jersey, USA</i> Kaya, Mükerrerem <i>Atatürk University, Turkey</i> Kaymak-Ertekin, Figen <i>Ege University, Turkey</i> Koçak, Celalettin <i>Ankara University, Turkey</i> Köksel, Hamit <i>Hacettepe University, Turkey</i> Morales, Francisco J. <i>CSIC Instituto del Fr o, Spain</i> Mujtaba, Mustafa G. <i>Florida Gulf Coast University, USA</i> Ögel, Zümrüt <i>Middle East Technical University, Turkey</i> Özilgen, Mustafa <i>Yeditepe University, Turkey</i> Paalme, Toomas <i>Tallinn University of Technology, Estonia</i> Parlar, Harun <i>Technical University of Munich, Germany</i> Raspor, Peter <i>University of Primorska, Slovenia</i> Rezessy-Szabo, Judit M. <i>Corvinus University of Budapest, Hungary</i> Şahin, Serpil <i>Middle East Technical University, Turkey</i> Üstünoğlu, Zeynep <i>Michigan State University, USA</i> Yetişemiyen, Atilla <i>Ankara University, Turkey</i>
<b>Editörler / Co-Editors</b> Çakır, İbrahim <i>Abant İzzet Baysal University, Turkey</i> Taban, Birce <i>Ankara University, Turkey</i> Tekin, Aziz <i>Ankara University, Turkey</i> Velioglu, Y. Sedat <i>Ankara University, Turkey</i>	
<b>Yönetim Yeri</b> <b>Adres / Address</b> Büyükelçi Sokak No: 18/1 Kavaklıdere/ Ankara Turkey	
<b>Tel:</b> (+90) 312 596 1180 • <b>Faks:</b> (+90) 312 317 8711 <b>E-posta / E-mail:</b> dergi@gidadernegi.org <b>URL:</b> http://www.gidadernegi.org/dergi.asp	
<b>Yayın Türü:</b> Yaygın süreli ve hakemli	
<b>Basım Yeri / Printing House</b> Sim Matbaacılık Ltd. Şti İvedik Organize San. Böl. Mat-Sit İş Mrk. 1518. Sk. No:2/14 Yenimahalle / Ankara Turkey Tel : (+90) 312 230 22 09 Faks: (+90) 312 230 41 39 e-mail: simmatbaasi@gmail.com	
<b>Yayın Tarihi / Publication Date</b> 15 08 2015	

Bu dergi, uluslararası **CAB Abstracts, Citefactor, Index Copernicus, EBSCO, ULAKBİM** (Yaşam Bilimleri) **FAO Agris** ve **DOAJ** veri tabanları kapsamındadır.

This journal is covered by **CAB Abstracts, Citefactor, Index Copernicus, EBSCO, ULAKBİM** (National Databases) **FAO Agris** and **DOAJ** database systems.

## İçindekiler / Content

---

Başçiftçi ZB, Kınacı G; <i>Investigation on quality characters and correlations among hardness with others in bread wheat</i> / Ekmeklik buğdayda sertlik ile kalite özellikleri arasındaki ilişkilerin araştırılması	187-192
Keven-Karademir F, Avunduk S; <i>Antibacterial and antioxidant activity of Myrtus communis L. growing wild in Marmaris</i> / Marmaris'te yabani olarak yetişen <i>Myrtus communis</i> L.'nin antibakteriyel ve antioksidan aktivitesi	193-199
Oluk CA, Güven M; <i>Ekzopolisakkarit üreten ve üretmeyen kültür kullanımının tulum peynirlerinin serbest yağ asidi kompozisyonu üzerine etkileri</i> / <i>Effects of use of exopolysaccharide producing and non producing culture on free fatty acid composition of tulum cheese</i>	201-208
Yalçınçıray Ö, Anlı, RE; <i>Hicaz narından maserasyon yöntemi ile elde edilen likörlerin toplam fenol içeriğinin ve antioksidan kapasitesinin depolama koşullarına bağlı değişimi</i> / <i>The impact of storage conditions on the phenolic content and antioxidant activity of pomegranate liquors produced by maceration method from Hicaz pomegranate</i>	209-216
Yaman H, Coşkun H; <i>Pastörize keçi sütünün dondurulması ve dondurarak depolaması sırasında meydana gelen değişimler</i> / <i>The changes in pasteurized goat milk during freezing and the frozen storage</i>	217-224
Baş D, Deniz E; <i>Gıda güvenliği ve kalite kontrolünde biyosensörler</i> / <i>Biosensors for food safety and quality control</i>	225-232
Yatmaz E, Turhan İ; <i>Hyaluronik asit ve fermantasyonla üretilmesi</i> / <i>Hyaluronic acid and production by fermentation</i>	233-240
Ergin EA, Zorba NND; <i>Baharatın mikrobiyel yükünü azaltmada kullanılan yeni yöntemler</i> / <i>Application of new technologies for decontamination of spices</i>	241-248

# Editörden,

---

Merhaba,

Dergimizin 4. (Temmuz-Ağustos) sayısını Temmuz 2015 sonunda bastık ve 3. sayı ile birlikte gönderiyoruz. Büyük olasılıkla 5. sayıyı (Eylül-Ekim) en geç Ağustos 2015 ortasında ve 6. sayıyı (Kasım-Aralık) en geç Eylül 2015 ortasında elektronik ortamda sayfa numaraları verilmiş şekilde yayımlarız. Aslında 4 makale ile ilgili işlemler sürüyor. Hepsi hakem aşamasından olumlu şekilde geçti ve yazarlarda redaksiyonel düzeltmeler için bekliyor. Bir diğer deyişle, 5. ve 6. sayılar elektronik ortamda çok daha önce yayımlanabilir. Bu ifade, bu tarihten sonra gelecek tüm makalelerin en erken 2016 yılında basılacağı anlamındadır. Nitekim bu tarihte, yazarda baskı öncesi son kontrol için bekleyen bir makale için "2016 yılı 41. cilt 1. sayıda basılacak" şeklinde künye verdik. Yine bu tarihte, işlemleri devam eden diğer 7 makale için hakem ve yazar işlemleri tamamlanınca, "2016 yılı 41. ciltte basılacak" şeklinde künye vereceğiz.

Dergimiz ile ilgili bazı bilgiler vermek isterim. 4. sayının basılması ile birlikte, 2014 yılından kalan sadece 1 makalemiz var ve o da 2015 yılı 5. sayıda basılacak. Böylece, elimizde 2014 yılında gelmiş ve basım için bekleyen herhangi bir makale bulunmamaktadır ve 5. ve 6. sayılarda 2015 yılında gelmiş makaleler olacaktır. Bu sayımızda basılmış olan 8 makalenin 6 adedi 2014 yılı, 2 adedi ise 2015 yılında gelmiş olan makalelerdir. 2015 yılında gelen 2 makalenin İngilizce araştırma olduğu açıktır. Baskı öncelik sıralamasının İngilizce araştırma, Türkçe araştırma ve Türkçe derleme şeklinde olduğu defalarca tekrarlandı.

Gıdada bilgi kirliliğine karşı oluşturduğumuz facebook sayfasına [www.gidadernegi.org](http://www.gidadernegi.org) sayfasının en altından erişilebilir.

Önceki sayıda 2016 Edirne Ulusal ve 2018 Kapadokya Uluslararası kongrelerimiz için yapılan duyuruları yeni gelişmeler ile tekrarlıyorum. Trakya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü ile ortaklaşa yapacağımız Türkiye 12. Ulusal Gıda Kongresinin tarihi kesinleşti: 05-07 Ekim 2016. 04 Ekim 2016 tarihinde tam gün olarak küçük bir katılım ücreti ile Gıda Mikrobiyolojisi ve paralel olarak Bitkisel Yağ Analizleri kursları olacak. Kongre çarşamba sabahı başlayacak, cuma öğle saatinde bitecek. Cuma öğleden sonra Edirne şehir turu var. Cumartesi günü ise günübirlik Balkan turu olacak. Devamında alternatif olarak Cumartesi-Pazar Balkan turu da var. Kongre web sayfası 2015 Haziran tarihinde kullanıma açılacak: [www.gidakongresi2016.org](http://www.gidakongresi2016.org)

Devamında, Kapadokya'da yapmayı planladığımız 3. Uluslararası Gıda Teknolojisi Kongresi için 2018 yılı sonbaharını kuruşun kaleminden biraz daha silinmez bir kalem ile ajandanıza kaydedin.

Sevgi ve saygılarımla,

Prof. Dr. A. Kadir Halkman

## A Message from the Editor-in-Chief

---

Hello,

We published the 4<sup>th</sup> issue (July-August) of our journal at the end of July 2015 and we are sending it along with the 3<sup>rd</sup> issue. We will most likely print the 5<sup>th</sup> issue (September-October) at the latest in August 2015 and the 6<sup>th</sup> issue (November-December) at the latest in the midst of September 2015 in electronic form, with the given page numbers. The regarding processes of 4 articles have actually been in progress. All of these articles had been accepted during the review process and are waiting for the editorial corrections in the author. In other words; the 5<sup>th</sup> and the 6<sup>th</sup> issues can be printed in electronic form earlier than the printed form. This statement means all of the forthcoming articles can be published in early in the year 2016. Indeed, at this time, we gave a publishing tag as "will be published at the 1<sup>st</sup> issue in volume 41 in the year 2016" to an article which is waiting for the final check at its author. Yet on this day, we will give a publishing tag as "will be published in volume 41 in the year 2016" to other 7 articles when their reviewers and authors complete the regarding processes.

I would like to give you some information about our journal. With the publishing of the 4<sup>th</sup> issue, we have only 1 remaining article waiting for publishing and it will be published at the 5<sup>th</sup> issue of the journal in 2015. Thus, we have no article submitted in 2014 waiting for publish and there will be articles submitted in the year 2015 at both the 4<sup>th</sup> and the 5<sup>th</sup> issues of the journal. The 6 of 8 articles published in this issue were submitted in 2014 while the rest 2 were submitted in 2015. It is clear that 2 articles submitted in 2015 are research articles in English. The main priority in publishing articles is repeated several times as: firstly research article in English, then research article in Turkish, and the latest is the review article in Turkish.

You can acces the facebook page which we created against the information pollution on food, from the bottom of the page of the link [www.gidadernegi.org](http://www.gidadernegi.org).

I would like to repeat the announcements, mentioned in previous issue, of the 12<sup>th</sup> National Food Congress in Edirne in 2016 and 3<sup>rd</sup> International Congress in Cappadocia in 2018, with the newest information. The date of the 12<sup>th</sup> National Food Congress, which will be organized collectively by the Trakya University Department of Food Engineering, announced as on 05-07<sup>th</sup> October 2016. On 04<sup>th</sup> October, there will be whole day food microbiology and vegetable oil analysis courses in parallel sections with a little attendance fee. The congress will begin on Wednesday morning and end at noon on Friday. Edirne city tour will be organized after Friday afternoon and, there will be the daily Balkans tour on Saturday. The congress web site will be open in October 2015. [www.gidakongresi2016.org](http://www.gidakongresi2016.org)

Subsequently, please save to your agenda of the 3<sup>rd</sup> International Congress in Cappadocia in 2018 autumn with a pen that is a little more indelible than a pencil.

Best Regards,  
Prof. A. Kadir Halkman

## INVESTIGATION on QUALITY CHARACTERS and CORRELATIONS AMONG HARDNESS with OTHERS in BREAD WHEAT\*

Zekiye Budak Başçiftçi\*\*, Gülcan Kınacı

Eskisehir Osmangazi University, Faculty of Agriculture, Eskişehir, Turkey

Received / Geliş tarihi: 06.03.2015

Received in revised form / Düzeltilerek Geliş tarihi: 23.06.2015

Accepted / Kabul tarihi: 29.06.2015

### Abstract

Two variety candidate bread wheat, ESOGUZF-1 and ESOGUZF-2 which were improved from the crosses between widely grown winter cultivars Bezostaja 1, Dağdaş 94 and Kınacı 97 were planted together with the parents in Randomised Complete Blocks Design to compare for hardness (HD), protein content (PC), sedimentation value (SV), gluten content (G) and gluten index (GI) and study on correlation between hardness and the others. Values obtained from analysis of the traits were indicated that both lines are suitable for quality bread making. The genotypic and phenotypic variances and the heritability estimates were present high values for investigated traits. Significant and positive correlations were determined between hardness and gluten and gluten index in lines. Considering the interest of industry, farmers and breeders who evaluating the quality of wheat for several uses, this study present lines can be use for those purposes.

**Keywords:** Wheat, quality, hardness, variation, correlation

## EKMEKLİK BUĞDAYDA SERTLİK İLE KALİTE ÖZELLİKLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİLERİN ARAŞTIRILMASI

### Özet

Üç ekmeçlik buğday çeşidinin (Bezostaja 1, Dağdaş 94 ve Kınacı 97) melezlenmesi ile geliştirilen ESOGUZF-1 ve ESOGUZF-2 çeşit adayları tesadüf blokları deneme desenine göre ekilmiştir. Adayların sertlik ile protein içeriği, sedimantasyon değeri, gluten içeriği ve gluten indeksi arasındaki korelasyonu incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre her iki çeşit adayının kaliteli ekmeç yapımına uygun olduğu belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre genotipik varyans, fenotipik varyansın önemli, kalıtım derecesi ise yüksek olduğu tespit edilmiştir. Çeşit adaylarının sertlik ile gluten ve gluten indeksi özellikleri arasındaki korelasyonun önemli ve olumlu çıkmıştır. Denemede kullanılan çeşitlerin adaylarının kalite özellikleri incelendiğinde çeşit adaylarının ıslah programlarına dâhil edilmesi ve üreticilere kullanıma sunulması tavsiye edilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre buğday kalitesi dikkate alındığında her iki çeşit adayının da üreticiler, sanayiciler ve ıslahçılar için kullanımı uygun görülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** Buğday, kalite, sertlik, varyasyon, korelasyon

\* This article is a part of master thesis of Zekiye Budak Başçiftçi / Bu makale Zekiye Budak Başçiftçi'nin Yüksek Lisans Tezinin bir bölümüdür

\*\* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar

✉ zbudak@ogu.edu.tr,

☎ (+90) 222 239 3750/4854,

☎ (+90) 222 324 2990

## INTRODUCTION

Wheat has always been a significant crop in Turkey due to its importance in Turkish diet and agricultural economy. It is widely utilized as bread, bulgur, biscuits, cuscus and macaroni (1).

Population increases in Turkey, same as worldwide in general, demands parallel increase in food production, particularly of wheat. The sectors involved in the production, trading and industrialization of wheat (*Triticum aestivum L.*) are interested in several aspects of its quality. The need of quality wheat grain that fulfills the requirements of the consumers increases the demands of breeding programs which can obtain improved cultivars with better grain quality associated with higher yield. Many quality traits although affected by environmental factors, are under genetic control, which allows manipulation and selection by the breeders (2).

Grain hardness is one of the most important determinants of wheat quality (3, 4) because of its influence on the end-use quality and also yield. Hard or medium hard grain is preferred for manufacture of leavened and flat breads because the levels of damaged starch produced from these wheat classes are appropriate to achieve the high dough water absorption desired by the baker. Their strong flour doughs are also more suitable for mechanized production of leavened breads (5, 6).

On the other hand grain protein content and protein quality are two other major contributors to nutritional quality and play a decisive role in baking performance of wheat flour (7). Although it is influenced by climate and cultural practices (8-10), genes for high grain protein effectively increase the wheat grain protein content in many different environments (11-13). Heritability estimates for protein content has ranged from 15 to 83 % (14, 15).

Protein quality, mainly gluten is responsible for most of viscoelastic properties of wheat flour doughs and gluten viscoelasticity is commonly known as flour or dough strength (16). One another indicator for protein quality is sedimentation value and the Zeleny sedimentation test can be used to obtain estimation of gluten strength (17).

The objective of this study was to investigate main grain quality characters of two hard grain bread

wheats in comparison with the parents and to determine if any correlations exist between hardness and other quality traits.

## MATERIALS and METHODS

Materials used in this study were two winter type variety candidates (ESOGUZF-1 and ESOGUZF-2) and its parents (Bezostaja-1, Dağdaş 94 and Kınacı 97) which are widely grown wheat cultivars in Turkey. Bezostaja-1 and Dağdaş-94 are possess hard grains with high protein content while Kınacı 97 has semi-hard grains, rather less protein but higher yielding potential. ESOGUZF-1 was improved from the crosses of Kınacı 97 and Bezostaja-1 while ESOGUZF-2 was improved from the crosses of Kınacı 97 and Dağdaş 94.

The field experiment was conducted using these candidates and the parents together in 2005-2006 growing season at research fields of Agricultural Faculty of Eskişehir Osmangazi University, Eskişehir, Turkey, in randomized complete blocks design with four replications. Growing techniques such as fertilizing, weed control etc. were done as regular bases and sprinkler irrigation was applied during stem elongation and heading stages. Hardness (HD) and protein content (PC) of grains were determined as dry weight basis by near-infrared reflectance spectroscopy, using Inframatic 8600 (Perten Instruments, Sweden). The value of hardness required to be in between 40-56. Between 49-56 as medium hard, generally preferred for better bread making quality. Protein content over than %12 is acceptable for good bread making quality. Sedimentation values (SV) were determined by the Zeleny Sedimentation Test according to ICC Standards 116 (18). Sedimentation values evaluated as > 15 ml weak, 16-24 ml medium, 25-36 ml strong and over 36< very strong gluten (19). The parameters of wet gluten (G) and gluten index (GI) were determined by ICC standards 137 (20), 155 (21) and 158 (22) using a Glutomatic 2200 instrument (Perten Co., Huddinge, Sweden) on white flour milled on a Brabender Quadromat Junior. 27 g and above accepted as high and less than 20 g as low in gluten. The gluten index was determined using a Centrifuge 2015, according to ICC Standard Method No. 151 (23), and 90 % accepted as high while less than 50 % as low in gluten index (24).

**RESULTS and DISCUSSION**

There were significant differences among the candidates and the parents for investigated characters that indicate a considerable range of genetic variability (Table 1). ESOGUZF-1 has given high values for all traits desirable to make good bread. In comparison with parents it was better for hardness; protein content, sedimentation value and gluten content than the female parent Kınacı 97. It was only higher for gluten index than male parent Bezostaja-1 while lower for other characteristics.

ESOGUZF-2 was superior to both parents for hardness, protein content and gluten content but inferior to female parent Kınacı 97 for gluten index and to male parent Dağdaş 94 for sedimentation value and gluten index. It also had better values for protein content and gluten content than Bezostaja-1.

ESOGUZF-1 and ESOGUZF-2 are good flour yielder due to their endosperm virtuousness as reported by Dobraszczyk (1994) (25) and Haddad et al. (1999) (26). Both are suitable to easy mill since they give readier separation of bran from endosperm after conditioning and the liberated flour are more mobile and easier to shift.

Hardness determined from ESOGUZF-1 was acceptable for good bread making while value of ESOGUZF-2 was slightly over than required level. Under same conditions grain hardness of Bezostaja -1 also exceeds the upper limits.

Protein contents obtained from both lines were quite high and over desired level for good quality bread making.

The highest gluten content was determined in ESOGUZF-2 as 42.45 g which mean a good

technological quality of flour and dough. Graybosch et al. (1996) (27) were reported that the bread making quality of flour is influenced both by protein content and protein type.

Although hardness in ESOGUZF-1 was correlated positively with all other characters but correlation with gluten content was significant and positive. In ESOGUZF-2 same as ESOGUZF-1 hardness was showed positive correlation with all other characters. However it was only correlated significantly with gluten index.

Sedimentation values were varied in candidates and the parents that ranged from 36 ml (Kınacı 97) to 50.75 (Dağdaş 94). Values obtained from the candidates were high that indicate high quality of proteins and good bread-making quality. It is well-known that sedimentation value and gluten content are important quality traits because of their positive correlations with other bread making quality parameters of wheat (28, 29).

Heritability in broad sense was estimated 85 % for hardness and 99 % for gluten content. Genotypic and phenotypic variance were close to each other for protein content, gluten content, gluten index and sedimentation value. Phenotypic variances for hardness were higher than genotypic variance. As Bushuk (1998) (11) pointed out, this result also might be come into being due to environmental conditions.

High heritability of sedimentation value and gluten index coupled with considerable genetic advance in these crosses has indicate that additive gene effects exist for these traits in the lines (Table 2). Results obtained in this study indicated that selection based on these traits could be effective in improving quality.

Table 1: Values of quality parameters and analysis of variance for two improved lines and the parents.

	Protein Content (PC) (%)	Hardness (HD)	Sedimentation Value (SV)	Gluten Content (G)	Gluten Index (GI)
ESOGUZF-1	14.00	55.50	46.00	35.38	92.50
ESOGUZF-2	15.00	57.50	37.25	42.45	77.25
KNC	13.33	51.75	36.00	28.53	97.50
BEZ	14.83	58.25	50.00	39.60	88.25
DDŞ	14.58	51.75	50.75	33.35	97.25
Replications	0.00	0.32	0.13	0.19	2.05
Treatments	1.87	38.17	195.13	117.75	279.18
Crosses	2.00	8.00	153.13	100.11	465.13
Parents	2.58	56.33	276.08	123.33	111.08
P. vs. C.	0.32	32.03	75.21	124.24	429.41
Error	0.02	0.27	2.84	0.92	1.11
LSD %5	0.21	0.08	2.60	1.48	1.62

Table 2: Genetic parameters for the quality characters in the lines and parents

	Genotypic Variance	Phenotypic Variance	Heritability	Genetic Advance
PC	0.50	0.51	0.98	9.92
G	0.25	0.25	0.99	2.64
GI	114.42	121.88	0.94	25.15
SV	38.00	39.13	0.97	30.07
HD	1.92	2.25	0.85	4.66

Table 3: Phenotypic correlation between hardness and the quality characters in the lines

Correlation	Hardness	
	ESOGUZF-1	ESOGUZF-2
PC	0.82	0.91
G	1*	0.92
GI	0.58	0.98*
SV	0.58	0.77

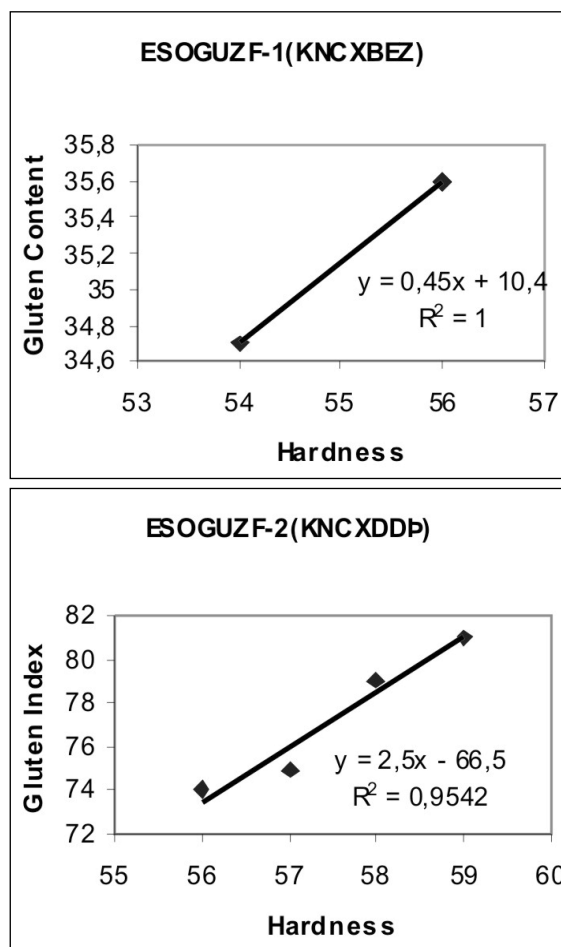


Figure 1: Relationship between gluten content, gluten index and hardness respectively for ESOGUZF-1, ESOGUZF-2

Correlations was ranged from 0,58 to 1 in the ESOGUZF-1 and ESOGUZF-2 for all characters. Highest and significant correlation was obtained between hardness and gluten content in ESOGUZF-1. Gluten index was significantly correlated with hardness in ESOGUZF-2 (Table 3). According to regression analysis, variations in quality parameters accounted to ESOGUZF-1 and ESOGUZF-2 were 100% and 95% respectively (Figure 1).

## CONCLUSION

Many quality traits although affected by environmental factors are under genetic control, which allows manipulation and selection by breeders (5).

The values obtained for all studied characters were indicated that ESOGUZF-1 and ESOGUZF-2 were suitable for production of leavened and streamed breads and hamburger, hotdog buns. Considering the interest for industry, farmers and breeders who evaluating the quality of wheat for several uses, this study present lines with a good technological quality of the grain.

## REFERENCES

1. Zencirci N, Kınacı E, Atlı A, Kalaycı M, Avcı M. 1998. Wheat research in Turkey prospects for global improvement. *Kluwer Academic Publishers* 11-17.
2. Lukow O.M, Mcvetty P.E.B. 1991. Effect of cultivar and environment on quality characteristics of spring wheat. *Cereal Chem*, (68), 597-601.
3. Mailhot W.C, Patton J.C. Criteria of flour quality. In: Pomeranz Y., (Ed.) *Wheat: Chemistry and Technology*, St. Paul, Minnesota, *Am Assoc Cereal Chem*, 1988, Vol. 2, p. 69-90.



4. Pomeranz Y, Williams P.C. 1990. Wheat harness: Its genetic, structural, and biochemical background, measurement, and significance. In: Pomeranz Y., (Ed.) *Advances in Cereal Science and Technology*, St. Paul, Minnesota, *Am Assoc Cereal Chem*, 10, 471- 548.
5. Wrigley C.W. 1991. Improved tests for cereal-grain quality based on better understanding of composition-quality relationships. In: Martin D.J, Wrigley C.W. (Ed.) *Cereals*. Victoria: International Royal Australian Chemical Institute, Australia, 117-120.
6. Faridi H, Foubion J.M. 1995. Wheat usage in North America. In: Faridi, H.; Foubion, J.M. (Ed.). *Wheat end uses around the world*. St.Paul MN, *American Ass. Cereal Chem*, 1-41.
7. Sampson D.R, Flynn D.W, Jui P. 1983. Genetic studies on kernel hardness in wheat using grinding time and near infrared reflectance spectroscopy. *Can J Plant Sci*, 63, 825-832.
8. Campbell C.A., Davidson H.R, Winkelman G.E. 1981. Effect of nitrogen, temperature, growth stage and duration of moisture stress on yield components and protein content of manitou spring wheat. *Can J. Plant Sci*, 22, 45-51.
9. Rao A.C.S, Smith J.L, Jandhyala V.K, Papendick R.I, Parr J.F. 1993. Cultivar and climatic effects on protein content of soft white winter wheat. *Agron J.*, 85, 1023-1028.
10. Uhlen K.A, Hofskjold R, Kalhavd A.H, Sahlstrom S, Longua A, Magnus E.M. 1998. Effects of cultivars and temperature during grain filling on wheat protein content, composition and dough mixing properties. *Cereal Chem.*, 75, 460-465.
11. Bushuk W. 1998. Wheat breeding for end-product use. *Euphytica*, 100, 137-145.
12. Johnson V.A, Mattern P.J. 1978. Improvement of wheat protein quality and quality by breeding. *Adv.Exp.Med.Biol*. 105, 301-316.
13. Weightman R.M, Millar S, Alava J, Foulkes M.J, Fish L, Snape J.W. 2008. Effects of drought and the presence of the 1BL/1RS translocation on grain vitreosity, hardness and protein content in winter wheat. *J Cereal Sci*, 47, 457-468.
14. Stuber C.W, Johnson V.A, Schmidt J.W. 1962. Grain protein content and its relation to other plant and seed characters in the parents and progeny of a cross of *Triticum aestivum L*. *Crop Sci.*, 2, 506-508.
15. Sunderman D, Wise M, Sneed E.M. 1965. Interrelationships of wheat protein content, flour sedimentation value, farinograph peak time and dough mixing and baking characteristics in the F2 and F3 generations of winter wheat *Triticum aestivum L*. *Crop.Sci.*, 5, 537-540.
16. Pena R.J. 2002. Wheat for Bread and other Foods In: Curtis B.C, Rajaram S, Macpherson H. G. (Ed.) *Bread wheat Improvement and Production* Rome, FAO.
17. Zeleny L. 1947. A Simple sedimentation test for estimating the bread making and gluten qualities of wheat flour. *Cereal Chem*. 24, 465-475.
18. Anonymous, 1972. ICC Standards No: 116. Determination of the sedimentation value (according to Zeleny) as an approximate measure of baking quality.
19. Uluöz M. 1965. Buğday, un ve ekmek analiz metodları. Izmir: *E.Ü.Ziraat Fak. Yy*. 91.
20. Anonymous, 1982. ICC Standards No: 137. Mechanical determination of the wet gluten content of wheat flour (Perten Glutomatic).
21. Anonymous, 1994. ICC Standards No: 155. Determination of wet gluten quantity and quality (Gluten Index ac. to Perten) of whole wheat meal and wheat flour (*Triticum aestivum*).
22. Anonymous, 1995. ICC Standards No: 158. Gluten index method for assessing gluten strength in durum wheat (*Triticum durum*).
23. Anonymous, 1990. ICC Standards No: 151. Determination of the sedimentation value - SDS test of durum wheat.
24. Boyacıoğlu H. 1994. Milling training program notes, İstanbul, Turkey, 41 p.
25. Dobraszczyk B.J. 1994. Fracture-Mechanics of vitreous and mealy wheat endosperm. *J Cereal Sci*, 19, 273-282.

26. Haddad A, Mabilie Y.F, Mermet A, Abecassis J, Benet J.C. 1999. Rheological properties of wheat endosperm with a view on grinding behavior. *Powder Technology*, 105, 89-94.
27. Graybosch A.R, Peterson J.C, Shelton R.D, Baenziger S.P. 1996. Genotypic and environmental modification of wheat flour protein composition in relation to end-quality. *Crop Sci*, 36, 296-300.
28. Zeleny L, Greenaway W.T, Gurney G.M, Fifield C.C, Lebsock K.L. 1960. Sedimentation value as an index of dough-mixing characteristics in early-generation wheat selections. *Cereal Chem.*, 37, 673-678.
29. Lebsock K.L, Fifield C.C, Georgia M, Gurney and Greenaway W.T. 1964. Variation and evaluation of mixing tolerance, protein content and sedimentation value in early generation of spring wheat *Triticum aestivum* L. *Crop Sci*. 4,171-174.
30. Boyadjieva D. 1970. Inheritance of sedimentation in F1, F2 and F3 in certain intervarietal hybrids of *Triticum aestivum* L. *Genet Plant Breeding*, 3, 249-257.
31. Kaul A.K. 1967. Inheritance of specific sedimentation value in a spring wheat cross. *Indian J.Genet.* 27, 117-122.
32. Noaman M.M, Taylor G.A, Martin J.M. 1990. Indirect selection for grain protein and grain yield in winter wheat. *Euphtica*, 47, 121-130.
33. Preston K.R, Morgan B.C, Dexter, J.E. 1995. Influence of protein segregation on the quality characteristics of biggar and genesis Canada Prairie spring wheat. *Plant Sci*, 75, 599-604.
34. Rogers D.E, Hosenev R.C, Lookhart G.L, Curren S.P, Lin W.D.A, Sears R.G. 1993. Milling and cooking baking quality of near isogenic lines differing in kernel hardness. *Cereal Chem*, 70, 183-187.
35. Sosulski F.W, Kaul A.K. 1966. A note on the inheritance of sedimentation value in two wheat crosses. *Cereal Chem.*, 43, 623-625.
36. Turnbull K.M, Rahman S. 2002. Endosperm texture in wheat. *J Cereal Sci*, 36, 327-337.

## ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *MYRTUS COMMUNIS* L. GROWING WILD IN MARMARIS

Fikret Keven-Karademir<sup>1\*</sup>, Sibel Avunduk<sup>2</sup>

<sup>1</sup>The Vocational College of Datca, Mugla University, Datca /Mugla, Turkey

<sup>2</sup>Medical Laboratory Techniques Programme, Vocational School of Health Care,  
Mugla University, Marmaris, Mugla, Turkey

Received / Geliş tarihi: 19.05.2015

Received in revised form / Düzeltilerek Geliş tarihi: 30.05.2015

Accepted / Kabul tarihi: 03.06.2015

### Abstract

Three myrtus fruit samples collected from different regions of Marmaris were dried, grinded and extracted with n-hexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and MeOH respectively. The extracts of *Myrtus communis* L. were screened in vitro for their antimicrobial activities using disc diffusion method against four test bacteria. The antimicrobial test results showed that the inhibition zones have been measured between 7 to 16 mm. *S. aureus* was the most sensitive one to all concentrations of all *M. communis* L. samples. *P. aeruginosa* was the most resistant one to all concentrations of *M. communis* L. sample from Yeşil Belde. The antioxidant activity of MeOH extracts has also been determined by DPPH assay. This is the first report of comparative antimicrobial and antioxidant study for *M. communis* L. samples collected from different regions from Marmaris/ Mugla/ Turkey.

**Keywords:** *M. communis* L., disc diffusion method, pathogen bacteria, DPPH method, Marmaris

## MARMARİSTE YABANI OLARAK YETİŞEN *MYRTUS COMMUNIS* L.'NİN ANTİBAKTERİYEL VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİ

### Özet

Marmaris'in üç farklı bölgesinden toplanan *Myrtus* (Mersin ağacı) meyveleri kurutulmuş, öğütülmüş ve sırasıyla, n-hekzan, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ve MeOH ile ekstrakte edilmiştir. Elde edilen kurutulmuş, ekstraktlar dört farklı test bakterisine karşı disk difüzyon yöntemi kullanılarak in vitro olarak taranmıştır. Antimikrobiyel test sonuçları inhibisyon zonlarının 7-16 mm çapında oluklarını göstermiştir. *S. aureus*, *M. communis* L. örneklerinin tüm konsantrasyonlarına karşı en duyarlı olan bakteri iken, *P. aeruginosa* ise Yeşil Belde'den toplanan *M. communis* L. örneklerinin bütün konsantrasyonlarına karşı en dirençli bakteri türü olarak belirlenmiştir. MeOH ekstraktlarının antioksidan aktivitesi, DPPH metodu kullanılarak ölçülmüştür. Bu çalışmada, ilk kez Marmaris'in farklı bölgelerinden toplanan *M. communis* L. örneklerinin karşılaştırmalı olarak antimikrobiyel ve antioksidan aktiviteleri saptanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *M. communis* L., disk difüzyon metodu, patojen bakteri, DPPH metodu, Marmaris

\*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ fkeven@hotmail.com,

☎ (+90) 252 211 13 00,

☎ (+90) 252 211 17 37

## INTRODUCTION

Myrtaceae (*Myrtus communis* L.) is an evergreen shrub growing spontaneously throughout the Mediterranean area. It is a typical annual shrub of the Mediterranean countries including Turkey, Greece, Italy, Algeria, Tunisia, and Morocco. In Turkey, myrtle plants are found within the natural pine forests and riversides in the Mediterranean region, particularly in the Taurus Mountains, 500 to 600 m above sea level (1).

In folk medicine, a decoction of leaves and fruits or infusion of myrtle are used for stomachic, hypoglycemic, cough and oral diseases, antimicrobial, for constipation, appetizing, antihemorrhagic and externally for wound healing (2, 3). In Turkish folk medicine, the leaves and fruits have been used as an antiseptic and for healing wounds as well as in the treatment of urinary diseases (4). Different parts of the plant find various uses in the food industry, such as for flavoring meat and sauces, and in the cosmetic industry (5).

Over the past few years, liqueurs prepared from the berries of myrtle have become popular, (6) while its leaves have been used as a hop substitute in beer and as a cosmetic ingredient in products against hair dandruff (7).

Until now, the majority of studies on myrtle have focused on its volatile fraction (5, 8-18) and of phenolic compounds in leaves and berries (19-27). The leaves contain tannins, flavonoids such as quercetin, catechin and myricetin derivatives and volatile oils (4, 28). The fruits of this plant are mostly composed of volatile oils, tannins, sugars, flavonoids and organic acids such as citric and malic acids (4, 21).

The volatile oil in leaves of *M. communis* L. growing in Turkey contains 1,8-cineole, linalool, myrtenyl acetate and myrtenol as major components (3). In addition, Mansouri et al. (28) reported that a crude methanol extract of *M. communis* L. leaves had potent antibacterial activity against 10 microorganisms, including 6 Gram positive and 4 Gram negative bacteria. A few researches have undertaken the antioxidant activity of myrtle leaf essential oil (28) and extract (30-33).

The main objectives of this study were to investigate the antimicrobial activity of the extracts obtained from *Myrtus communis* L. berries by disc diffusion

method against some pathogen bacteria.

As far as our literature survey could ascertain, our study is different from the previous reports on this plant in terms of plant material collected from different region to evaluate regional variety and the extracts obtained by using different solvents.

## MATERIAL AND METHODS

### Collection of plant material

*M. communis* L. berries were collected from Bozburun, Çetibeli and Yeşil Belde; Marmaris, Turkey.

### Extraction of *M. communis* L. berries

The dried and grinded berries (25 g of samples) were extracted with n-Hexane (500ml), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500ml) and MeOH (500ml) using soxhlet apparatus respectively. The extracts of berries were evaporated to dryness in vacuum at 50 °C. The yields (% w/w dry plant material) of dry extracts are presented in Table 1.

Table 1: The yields of the crude dry extracts

Locality	Extract yield (% w/w)		
	n-Hexane	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	MeOH
Bozburun	1.51	0.71	77.93
Çetibeli	2.24	1.47	73.67
Yeşil Belde	2.01	0.68	91.88

### Antimicrobial assay

*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* were used as test bacteria. Bacteria inoculates were prepared by growing cells in Nutrient broth (Merck) for 24 h at 37 °C (34). These cells suspensions were diluted with peptone water to provide initial cell counts of about 10<sup>5</sup>- 10<sup>6</sup> cfu/ml. The extracts (all extracts were filter-sterilized using a 0.45 µm membrane filter) were prepared at 1%; 2.5%; 5% and 10% concentrations in correspond solvent. 17 ml sterile Mueller–Hinton agar at 45 °C and poured into Petri dishes (9 cm in diameter). Then the agars were allowed to solidify at 4 °C for 1 h. Test bacteria were spread on Muller Hinton Agar. Sterile paper disk of 6 mm diameter were impregnated with this solutions (30 µl) (35). These impregnated disks were applied on solid agar medium in Petri dishes. The treated Petri dishes were left 10-15 minutes at room

temperature and then incubated  $37 \pm 0.1$  °C for 24-48 hours. After the incubation period inhibition zones were measured in millimeters. These experiments were carried out in duplicate (36).

### Antioxidant activity

#### DPPH assays/TLC autographic assay

After developing and drying the TLC plates (samples ranging from 0.1 to 100µg) were sprayed with 0.2% (2mg/ml) of DPPH solution in methanol. The plates were examined half an hour after spraying. Active compounds appeared as yellow spots against a purple background. (37-41).

#### Antioxidant capacity

One ml of 500 µM (0.2 mg/ml) DPPH in methanol was mixed with equal volumes of test compounds at various concentrations, mixed well and kept in the dark for 30 min. The absorbance at 517 nm was monitored in the presence of different concentrations of the samples. Blank experiment was also carried out, with just solvent and DPPH

(i.e., 2 ml of 500 µM in methanol), to determine the absorbance of DPPH before interacting with the compounds. The amount of sample in µg/ml at which the absorbance at 517 nm decreases to half its initial value was used as the IC<sub>50</sub> value of the MeOH extracts (36, 42, 43).

The samples were done in triplicate and the mean value of three was recorded.

### RESULTS AND DISCUSSION

The antibacterial activities of *M. communis* L extracts at different concentrations in vitro test against different pathogenic bacteria were shown in Table 2, 3 and 4.

The inhibition zones were varied related to different concentrations of *M. communis* L extracts. Our results have shown remarkable antimicrobial activity for the n-hexane extract of *M. communis* L (especially BH and ÇH) against all microorganisms tested with inhibition zones.

Table 2: The antimicrobial activity (diameters of growth inhibition zones) of the crude extracts of three *M. communis* L. samples from Bozburun

Microorganisms	Extracts											
	n-Hexane (BH)				CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (BC)				MeOH (BM)			
	10%	5%	2.5%	1%	10%	5%	2.5%	1%	10%	5%	2.5%	1%
<i>S. aureus</i>	14	14	14	12	14	12	12	12	12	11	7	7
<i>P. aeruginosa</i>	12	10	8	8	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. coli</i>	10	8	7	7	7	–	–	–	8	8	8	8
<i>K. pneumonia</i>	12	–	–	–	–	–	10	8	–	–	–	–

Table 3: The antimicrobial activity (diameters of growth inhibition zones) of the crude extracts of three *M. communis* L. samples from Çetibeli

Microorganisms	Extracts											
	n-Hexane (ÇH)				CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (ÇC)				MeOH (ÇM)			
	10%	5%	2.5%	1%	10%	5%	2.5%	1%	10%	5%	2.5%	1%
<i>S. aureus</i>	14	14	14	12	12	–	–	–	10	8	7	–
<i>P. aeruginosa</i>	12	10	8	8	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. coli</i>	10	8	7	7	7	–	–	–	–	–	–	–
<i>K. pneumonia</i>	12	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Table 4: The antimicrobial activity (diameters of growth inhibition zones) of the crude extracts of three *M. communis* L. samples from Yeşil Belde

Microorganisms	Extracts											
	n-Hexane (YH)				CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (YC)				MeOH (YM)			
	10%	5%	2.5%	1%	10%	5%	2.5%	1%	10%	5%	2.5%	1%
<i>S. aureus</i>	10	10	10	8	16	16	14	14	10	8	–	–
<i>P. aeruginosa</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. coli</i>	7	–	–	–	7	–	–	–	–	–	–	–
<i>K. pneumonia</i>	15	14	14	12	–	–	–	–	–	–	–	–

The inhibition zones of *M. communis* L. collected from Bozburun and Çetibeli have shown a similarity. The diameters of growth inhibition zones ranged from 7 to 16 mm, with the highest inhibition zone values observed against the medically important pathogens *S. aureus* (16 mm), *K. pneumoniae* (15 mm) and *P. aeruginosa* (12 mm) at 10% concentrations. Though, dichloromethane extracts (YC) were found to have strong activity against *S. aureus* (16 mm) at 10% concentrations, dichloromethane extracts (ÇC) were exhibited moderate activity against *S. aureus* (12 mm) and *E. coli* (7 mm) at 10% concentrations. Except for *S. aureus*, the MeOH extract of *M. communis* L. collected from Çetibeli, showed no antimicrobial activity against the other microorganisms.

In the case of the MeOH extract of *M. communis* L. from Bozburun, the diameters of growth inhibition zones ranged from 7 to 12 mm, with the highest inhibition zone values observed against the medically important pathogens *S. aureus* (12 mm at 10% concentrations) and *E. coli* (8 mm for all concentrations). As can be seen in Table 4 all extracts from Yeşil Belde did not exhibit antimicrobial activity against *P. aeruginosa*. According to the results of this study, *S. aureus* (ranged from 14 to 16 mm) was the most sensitive one to all concentrations for YC and BC. All extracts of *M. communis* L. samples from Yeşil Belde showed no activity against *P. aeruginosa* at all concentrations.

As a result of the present study, all samples from different regions, showed significant activity against *S. aureus*, weak activity against *P. aeruginosa*. The least active region against *E. coli* was Yeşil Belde.

The free radical scavenging activity of the methanolic extracts of *Myrtus communis* L. tested were determined through the DPPH method and results are presented in Table 5. DPPH is a useful reagent for investigating the free radical scavenging activities of compounds. In the

DPPH test, the extracts were able to reduce the stable radical DPPH to the yellow coloured diphenylpicrylhydrazine. The method is based on the reduction of an alcoholic DPPH solution in the presence of a hydrogen donating antioxidant due to the formation of the non-radical form DPPH-H by the reaction (44).

The methanolic extracts of *Myrtus* berries collected from Bozburun and Çetibeli ( $IC_{50}=1.22$  mg/ml) showed slightly lower scavenging ability on DPPH radicals than the methanolic extract of Yeşil Belde *Myrtus* berries ( $IC_{50}=1.24$ ). However, when compared to quercetin ( $IC_{50}=0.007$ ), all the tested extracts showed significantly lower antioxidant activity.

Gortzi et al. (8, 45), has also studied the methanolic extract of *M. communis* leaves for its antimicrobial activity, they have found 14 mm diameter against *S. aureus* (14 mm) and 12 mm diameter against *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*. We found also same result for n-hexane extracts of *M. communis* L. berries from Bozburun and Çetibeli.

Cherrat et al. (9), have reported that *S. aureus* (24.2 mm) and *Escherichia coli* (7.4-10.8 mm) for essential oil of *M. communis* L. leaves whereas our n-hexane extracts have less active against *S. aureus* (8-14 mm) and they have similar activity for *Escherichia coli* (7-10 mm).

Messaoud et al. (46) have studied antioxidant activity of mature dark blue and white berries from two Tunisian *Myrtus communis*. They obtained their essential oil and they made GC and GC/MS analyses. The total phenol, flavonoid, and flavonol contents and the concentration of the eight anthocyanins, identified by HPLC analysis, were significantly higher in the dark blue fruits. All extracts showed a substantial antioxidant activity, assessed by the free radical scavenging activity and the ferric reducing power, with the dark blue fruit extracts being more effective which we reported our methanol extract of *M. communis* L. berries exhibited strong DPPH scavenging activity, with  $IC_{50}$  values of 1.22 mg/mL.

Table 5: The antioxidant activity (mg/ml) of the MeOH extracts of three *M. communis* L. samples from different regions

Extracts	MeOH			Control
	Bozburun (BM)	Çetibeli (ÇM)	Yeşil Belde (YM)	Quercetin
$IC_{50}$ (mg/ml)	1.22	1.22	1.24	0.007

As for as our literature survey, we could reach a report that showed that the IC<sub>50</sub> values of the methanol extract of myrtle fruit, sampled from Tunisia, was 2.1 mg/ml, (46) which supported our results.

Previous studies on the antibacterial and antioxidant activity of *M. communis* L. involved its' leaves, berries, seeds, essential oil, flower. However, it is difficult to compare the results of different studies on *M. communis* L. Because our samples have been collected from Marmaris-Mugla.

We hope that our results will provide a starting point for the investigations to exploit new natural food additive and ingredient substances present in the extracts of the plant studied.

## REFERENCES

1. Davis PH. 1982. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol. 4. Edinburgh: University Press.
2. Baytop T. 1984. *Plant remedies in Turkey*. Istanbul University (in Turkish): Press No:3255, Faculty of Medicine;. p. 444.
3. Ozek T, Demirci B, Baser KH. 2000. Chemical composition of Turkish myrtle oil. *J Essential Oil Res.* 12, 541-544.
4. Baytop, T. 1999. *Therapy with medicinal Plants in Turkey* (Past and Present). Nobel Tıp Kitapevleri Press, Istanbul.
5. Chalchat JC, Garry RF, Michet A. 1998. Essential oils of Myrtle (*Myrtus communis* L.) of the Mediterranean littoral. *J Essential Oil Res.* 10, 613-617.
6. Nuvoli F. 2004. *Il Mirto della Sardegna*; Zonza Editore: Cagliari, Italy; pp 7-22. Also St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.), another plant containing antibacterial phloroglucinols, has been used as a hop substitute for the production of beer (see: Buhner, S. H. 1998 *Sacred and Herbal Healing Beers*; Brewer Publications: Boulder, CO.).
7. Puybaret C, David B, Charveron M, Mamatas S. 1990. FR 98-11619 19980917, *Chem Abstr.* 112, 195-230.
8. Aleksic V, Knezevic P. 2014. Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. *Microbiol Res.* 169(4): 240-54.
9. Cherrat L, Espina L, Bakkali M, Garcia-Gonzalo D, Pagán R, Laglaoui A. 2014. Chemical composition and antioxidant properties of *Laurus nobilis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils from Morocco and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes for food preservation. *J Sci Food Agric.* 94(6): 1197-1204
10. Weyerstahl P, Marschall H, Rustaiyan A. 1994. Constituents of the essential oil of *Myrtus communis* L. from Iran. *Flavour Fragr.J.* 9, 333-337.
11. Pirisino G, Mulè A, Moretti MDL, Satta M. 1996. Yield and chemical composition of essential oil from self-sown *Myrtus communis* L. from Cuglieri (Sardinia). *Riv. Ital. EPPOS* 7, 159-169.
12. Bradesi P, Tomi F, Casanova J, Costa J, Bernardini AF. 1997. Chemical composition of myrtle leaf essential oil from Corsica (France). *J Essential Oil Res.* 9, 283-288.
13. Koukos PK, Papadopoulou KI, Papagiannopoulos AD, Patiaka D. 2001. Chemicals from Greek forestry biomass: constituents of leaf oil of *Myrtus communis* L. grown in Greece. *J Essential Oil Res.* 13, 245-246.
14. Jerkovic I, Radonic A, Borcic I. 2002. Comparative study of leaf, fruit and flower essential oils from Croatian *Myrtus communis* L. during a one-year vegetative cycle. *J Essential Oil Res.* 14, 266-270.
15. Tuberoso CIG, Barra A, Angioni A, Sarritzu E, Pirisi FM. 2006. Chemical composition of volatiles in Sardinian myrtle (*Myrtus communis* L.) alcoholic extracts and essential oils. *J Agric Food Chem.* 54, 1420-1426.
16. Lawrence BM. 2007. Progress in essential oils. *Perfume and Flavor.* 32, 54-62.
17. Aidi Wannes W, Mhamdi B, Marzouk, B. 2007. Essential oil composition of two *Myrtus communis* L. varieties grown in North Tunisia. *Ital J Biochem.* 56, 180-186.
18. Aidi Wannes W, Mhamdi B, Sriti J, Ben Jemia M, Ouchikh O, Hamdaoui G, Kchouk ME, Marzouk B. 2010. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food Chem Toxicol.* 48(5):1362-70.

19. Martin T, Villaescusa L, De Sotto M, Lucia A, Diaz AM. 1990. Determination of anthocyanic pigments in *Myrtus communis* berries. *Fitoterapia*. 61, 85.
20. Martin T, Villaescusa L, Diaz AM, Ollivier E, Delmas F. 1997. Screening for antiparasitic activity of *Myrtus communis*. *Fitoterapia*. 68, 276-277.
21. Martin T, Rubio B, Villaescusa L, Fernandez L, Diaz AM. 1999. Polyphenolic compounds from pericarps of *Myrtus communis*. *Pharm Biol*. 37, 28-31.
22. Rosa A, Deiana M, Casu V, Corona G, Appendino G, Bianchi F, Ballero M, Dessi M A. 2003. Antioxidant activity of oligomeric acylphloroglucinols from *Myrtus communis* L. *Free Radic Res*. 37, 1013-1019.
23. Mulas M, Spano D, Biscaro S, Parpinello L. 2000. Parametri di qualità dei frutti di mirto (*Myrtus communis* L.) destinati all'industria dei liquori. *Ind Delle Bevande*. 29, 494-498.
24. Montoro P, Tuberoso CIG, Perrone A, Piacente S, Cabras P, Pizza C. 2006. Characterisation by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry of anthocyanins in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur. *J Chromatogr A*. 1112, 232-240.
25. Montoro P, Tuberoso CIG, Piacente S, Perrone A, De Feo V, Cabras P, Pizza C. 2006. Stability and antioxidant activity of polyphenols in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur. *J Pharm Biomed Anal*. 41, 1614-1619.
26. Tuberoso CIG, Melis M, Angioni A, Pala M, Cabras P. 2007. Myrtle hydroalcoholic extracts obtained from different selections of *Myrtus communis* L. *Food Chem*. 101, 806-811.
27. Alipour G, Dashti S, Hosseinzadeh H. 2014. Review of pharmacological effects of *Myrtus communis* L. and its active constituents. *Phytother Res*. 28(8):1125-36.
28. Mansouri S, Foroumadi A, Ghaneie T, Najar AG. 2001. Antibacterial activity of the crude extracts and fractionated constituents of *Myrtus communis*. *Pharm Biol*. 39, 399-401.
29. Yadegarinia D, Gachkar L, Rezaei MB, Taghizadeh M, Alipoor-Astaneh S, Rasooli I. 2006. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochemistry*. 67, 1249-1255.
30. Hayder N, Abdelwahed A, Kilani S, Ben Ammar R, Mahmoud A, Ghedira K, Chekir-Ghedira L. 2004. Anti-genotoxic and free radical scavenging activities of extracts from (Tunisian) *Myrtus communis*. *Mut Res*. 564, 89-95.
31. Sacchetti G, Muzzoli M, Statti GA, Conforti F, Bianchi A, Agrimonti C, Ballero M, Poli F. 2007. Intra-specific biodiversity of Italian myrtle (*Myrtus communis*) through chemical markers profile and biological activities of leaf methanolic extracts. *Nat Prod Res*. 21 (2), 167-179.
32. Gardeli C, Papageorgiou V, Mallouchos A, Theodosis K, Komaitis M. 2008. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L. evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chem*. 107, 1120-1130.
33. Amensour M, Sendra E, Abrini J, Bouhdid S, Pérez-Alvarez JA, Fernández-L pez J. 2009. Total phenolic content and antioxidant activity of myrtle (*Myrtus communis*) extracts. *Nat Prod Com*. 4 (6), 819-824.
34. Halkman AK (ed). 2005. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Başak Matbaacılık. Ankara, Türkiye, 358 p.
35. Kim J, Marshall M R, Wei C. 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *J Agric Food Chem*. 43, 2839-2845.
36. Bradshaw LJ. 1992. *Laboratory Microbiology*. Fourth Edition. Printed in USA. p. 435.
37. Chacha M, Gojase-Moletta G, Majinda RRT. 2005. Antimicrobial and radical scavenging flavonoids from the stem wood of *Erythrina latissima*. *Phytochem*. 66, 99-104.
38. Cuendet M, Hostettmann K, Potterat O. 1997. Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta*. 80, 1144-1152.
39. Cuendet M, Potterat O, Salvi A, Testa B, Hostettmann K. 2000. A stilbene and dihydrochalcones with radical scavenging activities from *Loiseleuria procumbens*. *Phytochem*. 54, 871-874.
40. Takao T, Kitatani F, Wanatabe N, Yagi A, Sakata K. 1994. A Simple Screening Method for Antioxidants and Isolation of Several Antioxidants Produced by Marine Bacteria from Fish and Shellfish. *Biosci Biotechnol Biochem*. 58, 1780-1783.



41. Torres R, Faini F, Modak B, Urbina F, Labbe C, Guerrero J. 2006. Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudate of *Haplopappus multifolius*. *Phytochem.* 67, 984-987.
42. Erasto P, Bojase-Moleta G, Majinda RRT. 2004. Antimicrobial and antioxidant flavonoids from the root wood of *Bolusanthus speciosus*. *Phytochem.* 65, 875-880.
43. Naik GH, Priyadarsini KI, Satav JG, Banavali-kar MM, Sohoni DP, Biyani MK, Mohan H. 2003. Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in Ayurvedic medicine. *Phytochem.* 63, 97-104.
44. Shon MY, Kim TH, Sung NJ. 2003. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Pbellinus baumii* (Phellinus of Hymenochaetaceae) extracts. *Food Chem.* 82, 593-597.
45. Gortzi O, Lalas S, Chinou I, Tsaknis J. 2008. Reevaluation of bioactivity and antioxidant activity of *Myrtus communis* extract before and after encapsulation in liposomes. *Eur. Food Res Technol.* 226:583-590.
46. Messaoud C, Boussaid M. 2011. *Myrtus communis* Berry Color Morphs: A Comparative Analysis of Essential Oils, Fatty Acids, Phenolic Compounds, and Antioxidant Activities. *Chem. & Biodivers.* 8,300-310

## Yazım Kuralları

GIDA (2009) 34 (1): 55-58

[www.gidaderneği.org/](http://www.gidaderneği.org/) Gıda Dergisi / Yayın kuralları

## Makale Gönderimi ve Telif Hakkı Devir Formu

GIDA (2009) 34 (1): 65

[www.gidaderneği.org/](http://www.gidaderneği.org/) Gıda Dergisi / Makale Gönderimi ve Telif Hakkı Devir Formu

## Son Kontrol Listesi

GIDA (2009) 34 (1): 66

[www.gidaderneği.org/](http://www.gidaderneği.org/) Gıda Dergisi / Son Kontrol Listesi

adreslerinden erişilebilir. Yazarlar, makale göndermeden önce yazım kurallarını tam olarak okumalı ve makalelerini burada verilen kurallara göre hazırlamalıdır.

## EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETEN VE ÜRETMİYEN KÜLTÜR KULLANIMININ TULUM PEYNİRLERİNİN SERBEST YAĞ ASİDİ KOMPOZİSYONU ÜZERİNE ETKİLERİ

C. Aylin Oluk<sup>1\*</sup>, Mehmet Güven<sup>2</sup>

<sup>1</sup>T.C.Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Adana

<sup>2</sup>Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Adana

Geliş tarihi / Received: 21.11.2014

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 03.04.2015

Kabul tarihi / Accepted: 01.05.2015

### Özet

Bu çalışmada, ekzopolisakkarit üreten (EPS +) ile ekzopolisakkarit üremeyen (EPS -) yarım yağlı ve EPS (-) tam yağlı Tulum peynirleri 90 gün süreyle olgunlaştırılmış ve depolama süresince serbest yağ asidi kompozisyonu incelenmiştir. İncelenen 10 adet serbest yağ asidi arasında palmitik, oleik ve miristik asitler baskın serbest yağ asitleri olarak belirlenmiştir. Tam yağlı ve EPS (-) kültür ile üretilen tulum peynirinin en yüksek serbest yağ asidi içeriğine sahip olduğu belirlenirken, yarım yağlı EPS (+) ve starter kültür kombinasyonunda *L. helveticus* olan tulum peyniri en düşük serbest yağ asidi içeriği değeri göstermiştir. EPS (+) kültür kullanımı peynirlerin serbest yağ asidi kompozisyonunu etkilememiştir. Depolama süresine bağlı olarak peynirlerin serbest yağ asidi miktarı artmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Tulum Peyniri, ekzopolisakkarit, serbest yağ asidi, gaz kromatografisi, depolama.

## EFFECTS OF USE OF EXOPOLYSACCARIDE PRODUCING AND NON PRODUCING CULTURE ON FREE FATTY ACID COMPOSITION OF TULUM CHEESE

### Abstract

In this study, low fat Tulum cheeses made by EPS (+) and non EPS (-) and full-fat Tulum cheeses produced by EPS (-) cultures were ripened for 90 days and free fatty acid composition was analysed during ripening. Palmitic, oleic and myristic acids were the predominant free fatty acids in the 10 free fatty acid investigated. While full-fat Tulum cheese produced by non-EPS culture had the highest free fatty acid level, low fat Tulum cheeses produced by EPS (+) which contained *L. helveticus* in starter culture combination showed lowest free fatty acid value. Use of exopolysaccharide producing cultures did not influence free fatty acid composition. The amount of free fatty acid increased during storage..

**Keywords:** Tulum cheese, exopolysaccharide, free fatty acid, gas chromatography, storage.

\*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ aylinoluk@yahoo.com, ☎ (+90) 322 334 0055, ☎ (+90) 322 334 0357

## GİRİŞ

Kaliteli bir peynir üretimi için starter kültür kullanımının çok önemli olduğu uzun zamandır vurgulanmaktadır. 19. yüzyılın sonlarında kullanılmaya başlanan starter kültürler, peynirlerde asit gelişimini standardize ederek kalitenin iyileştirilmesini sağlamıştır (1). Starter kültür ilave edilen peynirlerde; laktoz, proteinler ve süt yağının starter enzimlerinin etkisi ile daha hızlı ve yüksek oranda parçalanması nedeniyle, peynirin olgunlaşma süresinde bir kısalma olmakta veya peynirde istenilen düzeyde olgunluğa daha hızlı erişilebilmektedir (2).

Gerek formunu korumak isteyen, gerekse kalp-damar rahatsızlıklarından kaçınan tüketicilerin gıdalarla alınan hayvansal yağ miktarını azaltma eğilimi göstermeleri, az yağlı ya da light olarak üretilen süt ürünlerinin sayısında giderek artış olmasını sağlamıştır. (3). Sağlık bilincine sahip bu tüketiciler, besinlerle alınan yağ oranını azaltmaya yönelirken aynı zamanda tekstür ve tat-aroma bakımından da yüksek nitelikli ürün istemektedir, çünkü damak zevki hala bir ürünün tercih edilmesinde ana unsur olma özelliğini korumaktadır (4).

Laktik asit bakterileri süt ürünlerinde arzulanan tekstür ve stabilitenin sağlanmasında bitkisel ve hayvansal kaynaklı hidrokolloid katkı maddelerine alternatif olarak ekzopolisakkarit kullanımı önerilebilmektedir (5). Bu polimerler, GRAS (Generally Regarded as Safe)'a sahip laktik asit bakterileri tarafından hücre içinde üretildikleri için doğal biyokalınlaştırıcılar olarak düşünülmektedir. Su bağlama yeteneği, proteinler ile etkileşim ve süt serum fazı viskozitesini arttırmak gibi etkileri olmaktadır. Tadı olmayan laktik asit bakterilerinin (LAB) ürettiği EPS'ler uygulanarak üretilen fermente bir ürün, çok daha viskoz hale gelip, ağızda kalma ve damak ile temas süresi ve tat algısı artmaktadır. Bununla birlikte tek tip EPS'in üretimi tüm yapı özellikleri için yeterli olmayabileceği için bir ya da daha fazla starter kültür tarafından çeşitli EPS'lerin üretilmesi gerekebilir. Böylece bir son ürünün yapısını kesin olarak belirlemek ve bir ülkeden diğerine değişebilen müşteri tercihlerini karşılamak mümkün olacaktır. Ancak farklı LAB'den elde edilen polisakkaritlerin kompozisyonlarında, fonksiyonlarında, molekül yapılarında, kararlılıklarında ve proteinlerle etkileşim yeteneklerinde büyük farklılıklar gösterdikleri için elde edilen EPS

konsantrasyonları ve viskozite arasında net bir ilişki tanımlanamamıştır (6). Yapılan araştırmalar bazı EPS'lerin, kolon kanserinin önlenmesinde epitel hücrelerine enerji sağlayan, kısa zincirli yağ asitlerini artırarak bağırsak mikroflorasını değiştirdiğini ortaya koymuşlardır (7,8).

Bu çalışmada yer alan *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, yoğurt, İsviçre tipi ve İtalyan peyirlerinin üretiminde diğer starterler ile birlikte kullanılan termofilik starterlerdendir.(9) Bazı *Lactobacillus helveticus* suşlarının EPS üretmeleri ve bu yolla ürünün su tutma özelliğini arttırmaları sebebiyle Mozzarella peyniri üretiminde kullanıldığı bilinmektedir (10). Sitrata fermente eden *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris biovardiacetylactis* diğer starterler ile birlikte süzme peynir, Quark gibi taze peynirlerin üretiminde kullanılmaktadırlar.(11)

Tulum peynirine has hafif keskin ve ransit aromanın temel kaynağının, lipoliz sonucu oluşan kısa zincirli yağ asitlerinin (C2-C10) olduğu ifade edilmiştir (12). Düşük molekül ağırlıklı yağ asitlerinin olgunlaştırılarak tüketilen farklı peynir çeşitlerinde olduğu gibi, Tulum peynirinde de diğer aroma bileşenleriyle dengeli biçimde bulunması gerekmektedir (13).Farklı tip peynirlerin serbest yağ asidi kompozisyonlarının kullanılan sütün bileşimine, kaynağına, uygulanan peynir yapım teknolojisine ve olgunlaşma süresince lipolitik aktivitenin derecesine bağlı olduğu ifade edilmiştir (14).

Son yıllarda az yağlı ürünlere olan talebin artması, buna karşın yağ içeriğindeki azalmaya bağlı olarak arzu edilen tat ve yapıya sahip peynir üretiminin kısıtlayıcı faktörlerden olması üreticileri çözüm arayışları içerisine itmiştir. Yapılan birçok çalışma işleme tekniklerindeki modifikasyonlar üzerinedir ki bunların dışında starter kültür seçimi önerilen yöntemlerden biridir. Bu bilgilerin ışığında planlanan çalışmada, ekzopolisakkarit üreten laktik asit bakterileri içeren starter kültür kullanılarak yağ içeriği azaltılan Tulum peynirinin istenen kalite özelliklerine uygun olarak üretilmesi ve fonksiyonel özelliklerinin iyileştirilmesinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada, 68 °C'de 10 dakika pastörize edilen inek sütüne ekzopolisakkarit üreten kültürler ilave edilerek üretilen peynirler, tulum basılarak 90 gün süreyle olgunlaştırılmıştır. Tulum peynirlerinin serbest yağ asidi kompozisyonu özellikleri ve olgunlaştırma süresindeki değişimleri incelenmiştir.

**MATERYAL VE METOT****Materyal**

Peynir üretimi Çay Çiftlik Hayvancılık işletmesinden sağlanan sabah sağımı çiğ inek sütleri kullanılarak, Çay Çiftlik peynir üretim bölümünde yapılmıştır. Pıhtılaştırıcı enzim olarak Peyma Hansen San. A.Ş. firmasının ürettiği ticari adı "Mandıra Özel" olan 1/16000 kuvvetinde %100 dana şirdeninden elde edilen sıvı peynir mayası kullanılmıştır. Peynir kültürü olarak Danisco (Kopenhag) firmasının ürettiği starter kültürler kullanılmıştır. B örneğinin starter kültür kombinasyonu için *Streptococcus thermophilus*/*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ile *Lactobacillus helveticus* 1:1 oranında bulunduracak şekilde hazırlanmıştır. Dondurarak kurutulmuş starter kültürler %1 oranında enzim ilavesinden önce süte ilave edilip yaklaşık 30 dakika boyunca ön aktivasyonu sağlanmıştır. K1 ve K2 peynirleri EPS üretmeyen kültürle (*Streptococcus thermophilus* + *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) (FRC 60), A (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* + *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* + *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris biovardiacetylactis*) (CHN22) ve B peynirleri (*Streptococcus thermophilus* + *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* + *L. helveticus*) (YFL901 + LH-B01) EPS üreten kültürle üretilmiştir. SOLVAY marka Kalsiyum klorür, hazırlanan %25'lik çözeltiden 20 g CaCl<sub>2</sub> / 100 L süt hesabı ile peynir sütüne ilave edilmiştir. Peynirlerin tuzlanması Tuz Tebliğine uygun iri salamura tuzu, piyasada bulunan firmalardan temin edilmiştir. Ambalajlamada kullanılan tulumlar Tulum Peyniri Standardı'nda (15) belirtildiği şekilde peynirin özelliğini bozmayan ve peyniri etkilemeyen ve peynirden etkilenmeyen, antraksli bir hayvana ait olmayan ~ 2 kg tulum peyniri alabilecek hacimde olacak şekilde Ereğli'deki dericilerden temin edilmiştir. Peynirler basılmadan önce kıl keçisinden elde edilen deri tulumlar iç yüzeyde bulunan et artıklarından temizlenerek yıkanmış, kuru tuzla ovulmuş ve kurutulmuştur.

**Metot****Tulum Peynir Üretimi**

Peynir üretimi, Çay Çiftlik Ürünleri üretim tesislerinde gerçekleştirilmiştir. Tulum peynirlerinin üretiminde, ısıl işlem, starter kültür ve CaCl<sub>2</sub> ilavesi dışında mümkün olduğunca geleneksel yöntemdeki uygulamalar dikkate alınmıştır. Üretimde

kullanılan inek sütleri, separatörden geçirilerek temizlendikten sonra 55°C'de yağ standardizasyonu yapılmıştır. Separatörden geçirilirken süt %3 ve %1.5 yağlı olmak üzere iki kısma ayrılmıştır. Farklı yağlı olan sütler ayrı ayrı 68°C'de 10 dakika pastörize edilerek mayalama sıcaklığına (38°C±1°C) kadar soğutulmuştur. Tam yağlı süt ayrı, %1.5 yağlı olan sütler 3 eşit kısma ayrılarak buharla sterilize edilen mayalama teknelerine alınmıştır. Tam yağlı kontrol grubu olan süte EPS (-) (K1) ilave edilmiştir. %1.5 yağlı olan süten bir kısmına EPS (-) (K2), A ve B kodlu diğer kısımlara EPS (+) kültürler ilave edilmiştir. Starter kültürlerin hepsi %1 oranında ilave edilmiştir. Ardından sütlere %0.02 oranında CaCl<sub>2</sub> eklenmiş ve yaklaşık 30 dakika pH 6.30'a gelinceye kadar beklenmiş ve sonra 1/16000 kuvvetindeki peynir mayasından 60 dakikada pıhtılaşma sağlanacak biçimde ilave edilmiştir. Mayalama tamamlandıktan sonra oluşan pıhtı buharla sterilize edilen pıhtı kesme bıçakları ile 1 cm<sup>3</sup> boyutunda kesilerek bir süre dinlenmeye bırakılmıştır. Kesilen pıhtı önce cendere bezinde 1.5-2 saat süreyle baskıda bırakılmış daha sonra geleneksel yöntemde de kullanılan tülbent bezinden dikilmiş torbalara aktararak 1 gün üretim yeri içerisinde süzölmeye bırakılmıştır. Peynirler tartıldıktan sonra tekrar dezenfekte edilen tanklara boşaltılarak mercimek büyüklüğünde parçalar oluşacak biçimde elle ufalanmış ve ince kaya tuzu ile %2 oranında tuzlanmıştır. Tuzun peynir kitlesinde homojen dağılımının sağlanması amacıyla yaklaşık 6 saat süreyle belli aralıklarda karıştırılmıştır. Bu aşamadan sonra peynirler 20 kg. civarı peynir alabilen bez torbalara basılarak 1 gün daha dinlendirilmiştir. Dinlenme süresi sonunda peynirler deri kılıflara doldurularak 6±1°C'de 90 gün süreyle depolamaya bırakılmıştır. Olgunlaşmanın 1. ve 90. günlerinde analizler yapılmış ve elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Peynir üretimleri üç tekerrürlü olarak yürütülmüştür.

**Tulum Peynirlerin Analizleri**

Peynir örneklerinde yağ asitlerinin ekstraksiyonu, Nunez ve ark., (16)'nın kullandığı metot modifiye edilerek yapılmıştır. Mikserden geçirilerek homojenize edilen 100 g peynir üzerine bir miktar dietileter ilave edilerek bir havanda iyice ezilmiş, Bu işlem bir kaç kez tekrar edildikten sonra dietileter-yağ karışımı filtreden geçirilerek süzölmüştür. Daha sonra bu karışım rotary

evaporatöre (40-45°C) bağlanarak eter uçurulmuş ve balon içerisinde kalan yağdan ependorf tüpünün içine 2.1 mL örnekten alınmış üzerine 0.5 mL KOH ve 10 mL hekzan ilave edilmiştir. 15 dakika 4000 rpm santrifüj edilmiş ve üst fazdan 1 mL amber viallere alınmıştır.

Yağ asitlerinin ayrılması sıcaklık programlı GC Clarus 500 (Agilent 7890, USA) gaz kromatografisi cihazı kullanılarak yapılmıştır. Yağ asitleri FAME (Supelco)'ya ait standartlarla çıkış zamanları karşılaştırılarak belirlenmiştir. Analizde, alev iyonizasyon detektörü (FID: Flame Ion Dedector), taşıyıcı olarak Helyum gazı, yanıcı olarak Hidrojen gazı, fused silika kapiler SGE (30 m ~0.32 mm, *i.d.* ~0.25 µm, BP20 0.25 UM, USA kolon kullanılmıştır. 1 µL örnek örnek 140 °C'de enjekte edilerek 5 dk. bekletilmiş, daha sonra her 1 dakikada bir sıcaklık 4 °C yükseltilmiştir. Sıcaklık 220 °C'ye ulaşıncaya kadar 15 dk. beklenmiş ve sonuçlar mg/100g olarak verilmiştir.

#### **İstatistiksel Analizler**

İstatistiksel analizler, Tesadüf Parselleri Deneme Planına göre yapılmış ve SPSS 16.0 paket programı kullanılmıştır. Serbest yağ asitlerinin istatistiksel değerlendirilmesinde sonuçlar, Microsoft Excel programına girilmiş ve çoklu değişken istatistiksel analizleri, NTSYS(Numerical Taxonomy and Multivariante Analysis System Version 2.1) adlı paket program kullanılarak yapılmıştır (17).

### **ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA**

#### **Tulum Peynirlerin Toplam Serbest Yağ Asidi Kompozisyonu**

Süt yağı lipaz enziminin etkinliği ile yağ asidi ve gliserole parçalanırken, laktik asit bakterilerinin lipaz aktivitesi tür ve cinslere göre farklılık gösterir. Lipolitik aktivite sonucu oluşan serbest yağ asitleri, karakteristik peynir aromasını oluşturmaya yardımcı olurlar ve peynirin olgunlaşmasında tat ve tekstür oluşumunda etkilidirler (18). Serbest yağ asitleri alkol, ester, aldehit, keton ve laktonlar gibi diğer aroma bileşenlerinin oluşumuna da öncülük ederler (19-21).

Peynirde lipoliz sonucu oluşan kısa zincirli yağ asitlerinin (C2-C10), Tulum peynirine has hafif keskin ve ransit aromanın oluşumunun temel kaynağı olduğu ifade edilmiştir (22). Düşük molekül ağırlıklı yağ asitlerinin olgunlaştırılarak

tüketilen farklı peynir çeşitlerinde olduğu gibi, Tulum peynirinde de diğer aroma bileşenleriyle dengeli biçimde bulunması gerekmektedir (13). Farklı tip peynirlerin serbest yağ asidi kompozisyonlarının kullanılan sütün bileşimine, kaynağına, uygulanan peynir yapım teknolojisine ve olgunlaşma süresince lipolitik aktivitenin derecesine bağlı olduğu ifade edilmektedir (14).

Bu çalışmada belirlenen 10 adet serbest yağ asidinin özellikleri üzerine farklı starter kültür uygulaması ve olgunlaşma süresinin etkilerine ait sonuçlar kısa zincirli yağ asitlerinden uzun zincirli yağ asitlerine doğru sıralama içinde aşağıda verilmiştir. EPS(-) ve EPS(+) kültür kullanılarak üretilen Tulum peynirlerinin serbest yağ asidi miktarlarının 1. ve 90. gündeki değerleri Çizelge 1'de verilmiştir.

#### **Bütirik Asit (C4) Değeri**

Tüm peynirlerde olgunlaşma süresince bütirik asit oranlarında yükseliş olduğu görülmüş ve bu artış  $P<0.01$  düzeyinde önemli bulunmuştur. Peynirlerin bütirik asit içeriklerine bakıldığında en yüksek değer K1 peynirinde, en düşük değer ise B peynirinde saptanmıştır. Tulum peynirlerinin bütirik asit içerikleri üzerine sütün yağ oranının ve kullanılan starter kültürün önemli düzeyde etkili olduğu belirlenmiştir ( $P<0.01$ ). Benzer sonuçlar yapılan çalışmalarda da bildirilmiştir (23).

#### **Kaproik Asit (C6) Değeri**

Kaproik asit değerlerine bakıldığında olgunlaşmanın 1. gününde en yüksek değeri K1 peyniri alırken A peyniri ve B peyniri birbirine yakın değerler almıştır ( $P>0.01$ ). Olgunlaşmanın 90. gününde K1 peynirinde saptanan değer 26.05 mg/100g olurken, K2 peynirindeki değer 20.78 mg/100g, A peynirinde 8.35 mg/100g ve B peynirinde 1.109 mg/100g olarak belirlenmiştir. Kaproik asit içerikleri bakımından olgunlaşmanın başında A ve B peynirleri birbirine yakın değerler almış, olgunlaşma süresince tüm peynirlerin kaproik asit değerleri artmış ve farklılaşmıştır ( $P<0.05$ ). Bulgular, literatürde belirlenen değerler ile uyumludur (20, 23-25).

#### **Kaprilik Asit (C8) Değeri**

Olgunlaşmanın 1. günü K1 ve K2 peynirlerinin kaprilik asit miktarları birbirine yakın değerler almış ve diğer peynirlerden önemli düzeyde yüksek bulunmuştur ( $P<0.01$ ). Olgunlaşma süresince

Çizelge 1. EPS<sup>+</sup> ve EPS<sup>-</sup> Kültür Kullanılarak Üretilen Tulum Peynirlerinin Olgunlaşma Süresince Saptanan Serbest Yağ Asidi Miktarları mg/100 g

Table 1. Concentrations (mg/100 g) of free fatty acids in Tulum cheeses produced with (LF-EPS1, LF-EPS2) or without (FFC, LFC) exopolysaccharide producing cultures

Peynirler (Cheeses)	Serbest yağ asidi (Free fatty acid)	Olgunlaşma Periyodu (gün) Ripening Period (day)		Serbest yağ asidi (Free fatty acid)	Olgunlaşma Periyodu (gün) Ripening Period (day)	
		1	90		1	90
K1	C4 (Bütirik Asit)	18.80±0.04 <sup>Ab</sup>	40.88±0.26 <sup>Aa</sup>	C6 (Kaproik asit)	8.63±0.19 <sup>Ab</sup>	26.05±0.61 <sup>Aa</sup>
K2		14.05±0.05 <sup>Bb</sup>	29.04±0.93 <sup>Ba</sup>		4.01±0.02 <sup>Bb</sup>	20.78±0.51 <sup>Ba</sup>
A		8.24±0.50 <sup>Cb</sup>	18.86±0.06 <sup>Ca</sup>		1.32±0.20 <sup>Cb</sup>	8.35±0.03 <sup>Ca</sup>
B		4.62±0.05 <sup>Db</sup>	9.02±0.06 <sup>Da</sup>		1.11±0.05 <sup>Ab</sup>	2.64±0.01 <sup>Da</sup>
K1	C8 (Kaprilik Asit)	3.87±0.14 <sup>Ab</sup>	10.79±0.31 <sup>Aa</sup>	C10 (Kaprik Asit)	8.73±0.16 <sup>Ab</sup>	16.95±0.52 <sup>Aa</sup>
K2		3.61±0.18 <sup>Ab</sup>	9.63±0.04 <sup>Ba</sup>		4.90±0.03 <sup>Bb</sup>	14.60±0.52 <sup>Ba</sup>
A		2.24±0.38 <sup>Bb</sup>	4.06±0.02 <sup>Ca</sup>		4.12±0.64 <sup>Cb</sup>	7.94±0.16 <sup>Ca</sup>
B		1.81±0.11 <sup>Bb</sup>	3.02±0.10 <sup>Da</sup>		3.09±0.12 <sup>Db</sup>	6.28±0.26 <sup>Da</sup>
K1	C12 (Laurik Asit)	10.00±0.51 <sup>Ab</sup>	16.05±0.15 <sup>Aa</sup>	C14 (Miristik asit)	14.86±0.37 <sup>Ab</sup>	36.78±0.04 <sup>Aa</sup>
K2		8.78±0.04 <sup>Ab</sup>	16.35±0.15 <sup>Aa</sup>		14.60±0.51 <sup>Ab</sup>	31.27±0.04 <sup>Ba</sup>
A		4.47±0.44 <sup>Bb</sup>	8.50±0.06 <sup>Ca</sup>		10.81±0.31 <sup>Bb</sup>	25.23±0.01 <sup>Da</sup>
B		4.81±0.01 <sup>Bb</sup>	9.98±0.03 <sup>Ba</sup>		9.08±0.04 <sup>Cb</sup>	26.64±0.48 <sup>Ca</sup>
K1	C16 (Palmitik Asit)	40.75±0.37 <sup>Ab</sup>	79.21±0.09 <sup>Aa</sup>	C18 (Stearik Asit)	9.12±0.10 <sup>Ab</sup>	20.59±0.54 <sup>Aa</sup>
K2		36.33±0.17 <sup>Bb</sup>	70.86±0.27 <sup>Ba</sup>		9.08±0.07 <sup>Ab</sup>	19.59±0.53 <sup>Aa</sup>
A		34.05±0.41 <sup>Cb</sup>	60.03±0.08 <sup>Ca</sup>		8.02±0.11 <sup>Bb</sup>	16.02±0.08 <sup>Ba</sup>
B		30.95±0.21 <sup>Db</sup>	51.01±0.14 <sup>Da</sup>		7.31±0.17 <sup>Cb</sup>	18.19±0.04 <sup>Ca</sup>
K1	C18:1 (Oleik asit)	32.71±0.53 <sup>Ab</sup>	81.94±0.81 <sup>Aa</sup>	C18:2 (Linolenik asit)	4.21±0.013 <sup>Aa</sup>	4.32±0.10 <sup>Aa</sup>
K2		28.02±0.11 <sup>Bb</sup>	72.03±1.17 <sup>Ba</sup>		3.96±0.016 <sup>Ba</sup>	4.08±0.02 <sup>Ba</sup>
A		29.15±1.01 <sup>Bb</sup>	61.39±0.16 <sup>Ca</sup>		3.39±0.04 <sup>Ca</sup>	3.54±0.02 <sup>Ca</sup>
B		24.95±0.19 <sup>Cb</sup>	50.22±0.91 <sup>Da</sup>		4.17±0.014 <sup>Aa</sup>	4.18±0.02 <sup>Ba</sup>

Peynirler arasında farklı büyük harfle (sütunlarda) ve olgunlaşma aşamalarındaki (satırlarda) farklı küçük harfler ile gösterilen örnekler arasındaki farklılıklar 0.05 düzeyinde önemlidir.

The differences between samples indicated by higher-case letters (columns) and differences in ripening stages by higher-case letters (rows) are important at the 0.05 level

peynirlerin kaprilik asit miktarları artmış ve en yüksek değere 10.79 mg/100g ile K1 peyniri sahip olmuştur. Yapılan varyans analizi sonucunda bu artışın önemli düzeyde olduğu belirlenmiştir ( $P<0.01$ ). Depolama süresince kaprilik asit oranlarının arttığı birçok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (20, 24, 25).

#### Kaprik Asit (C10) Değeri

Olgunlaşmanın 1. gününde K1 peynirinin kaprik asit miktarının diğer peynirlere oranla yüksek olduğu ve bu durumun olgunlaşma süresince devam ettiği görülmüştür ( $P<0.01$ ). Tulum peynirlerinin olgunlaşmalarının 1. ve 90. günleri arasında kaprik asit içerikleri arasındaki farkın önemli düzeyde olduğu saptanmıştır ( $P<0.05$ ). Tulum peynirinin hafif keskin ve ransit karakterli en önemli ve karakteristik aromasının kaprilik ve kaprik asitlerin sorumlu olabileceği çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (13, 22). Peynirler arasındaki farklılıkların önemini belirlemek için yapılan varyans analizinde peynirlerin  $P<0.01$  düzeyinde farklı olduğu saptanmıştır

#### Laurik Asit (C12) Değeri

Olgunlaşmanın başında K1 ve K2 peynirlerinin diğer peynirlerden daha yüksek laurik asit değerine sahip olduğu görülmüştür ( $P<0.01$ ). Tespit edilen değerler, bazı araştırmacılar tarafından yüksek (26), bazılarında düşük (27), bazı değerler ile paralellik göstermektedir (23). Yapılan varyans analizi sonucunda peynirlerde bu değerlerin olgunlaşma süresince önemli düzeyde arttığı, EPS(+) peynirlerin laurik asit miktarlarının olgunlaşma süresince diğer peynirlerden önemli düzeyde düşük olduğu bulunmuştur ( $P<0.01$ ).

#### Miristik Asit (C14) Değeri

Olgunlaşmanın 90. gününde tüm peynirlerde bu değerler artmış ( $P<0.01$ ), en yüksek miktar K1 peynirinde 36.78 mg/100g olarak saptanmıştır. Olgunlaşmanın başında K1 ve K2 peynirleri benzer miristik asit değerleri gösterirken, olgunlaşmanın 90. günü B peynirinin miristik asit miktarı A peynirinden daha fazla artmıştır ( $P<0.01$ ).

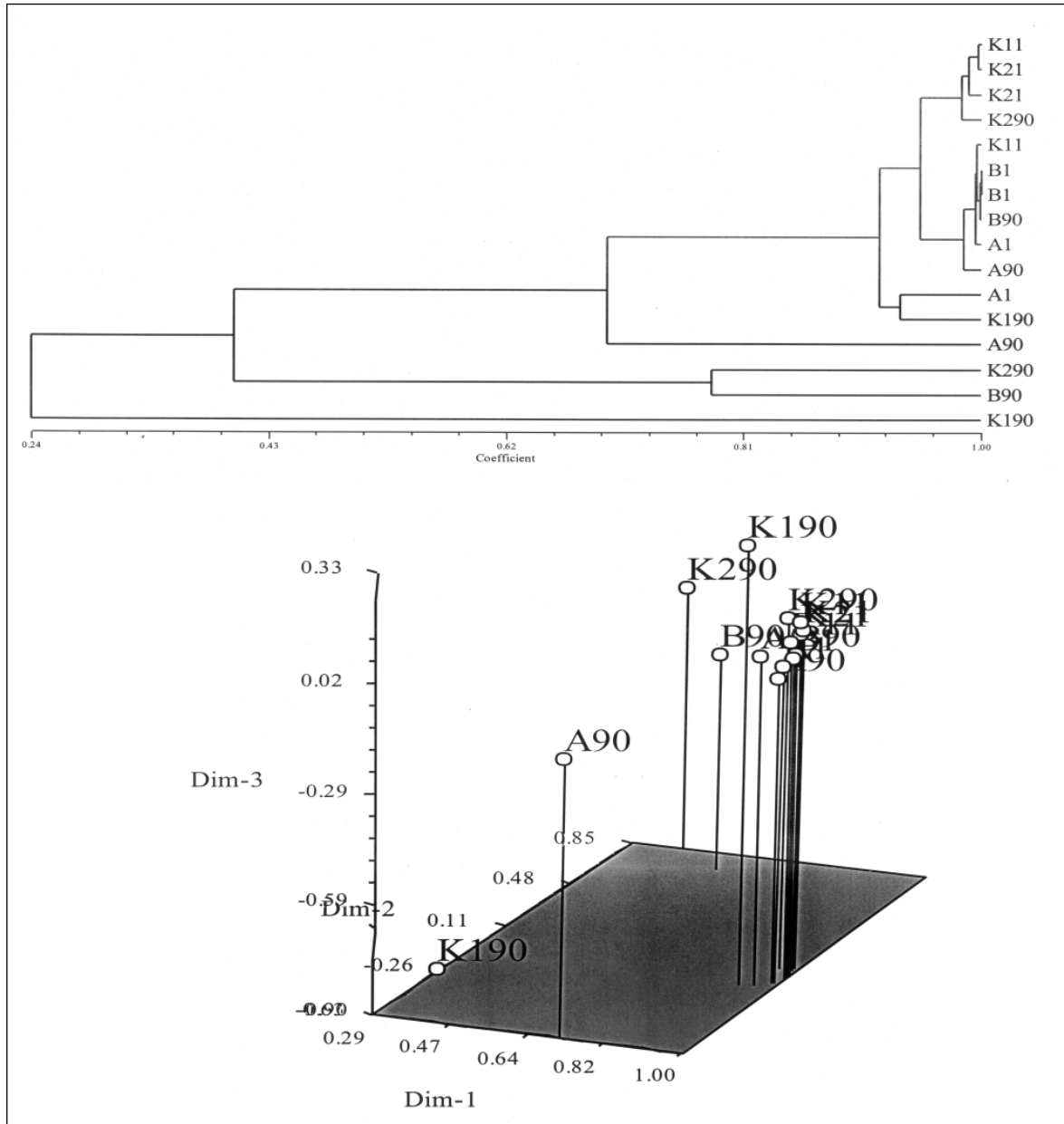
### Palmitik Asit (C16) Değeri

Olgunlaşma süresince tüm peynirlerin palmitik asit miktarları artmıştır ( $P<0.05$ ). EPS(+) ve EPS (-) kültür kullanımı Tulum peynirlerinin palmitik asit içeriklerini önemli düzeyde etkilemiştir ( $P<0.01$ ). Uzun zincirli yağ asitlerinin peynirde tespit edilen yüksek miktarlarına rağmen, peynir aroması üzerinde önemli bir etkilerinin olmadığı bildirilmektedir (28). Yapılan bir araştırmada,

mikrobiyel lipaz ilave edilmeyen kontrol örneğinde en yüksek serbest yağ asidi palmitik asit olarak belirlenmiştir (23).

### Stearik Asit (C18) Değeri

Varyans analizi sonuçlarına göre, peynirlerin stearik asit miktarlarının olgunlaşma süresince önemli düzeyde arttığı, EPS (+) peynirlerin bu değerlerinin diğer peynirlerden önemli düzeyde düşük olduğu bulunmuştur ( $P<0.01$ ). Çalışmanın



Şekil 1. Tulum Peynirlerinin serbest yağ asitlerinin dendrogram ve PCA grafiği  
Figure 1. Dendrogram and PCA graphic of free fatty acid of Tulum Cheeses



her iki olgunlaşma döneminde tespit edilen stearik asit değerlerinin, üretilen Kefalograviera peynirinin stearik asit değerlerinden yüksek (20, 25), Cheddar peynirinin değerlerinden düşük (27), Tulum peyniri değerleri (23) ile benzer sonuçlar gösterdiği belirlenmiştir

#### **Oleik Asit (C18:1) Değeri**

Tüm peynir örneklerinde serbest yağ asitleri içinde en yüksek değere sahip olmuştur. Yapılan çalışmada, serbest yağ asitlerinden uzun zincirli olanlarının baskın olduğunu, bunların içinden en yüksekini palmitik asit olduğunu bunları oleik ve miristik asitlerin takip ettiğini bildirilmiştir (23). Yapılan istatistiksel analiz sonucunda EPS (+) kültürle üretilen A ve B peynirlerinin oleik asit değerlerinin her iki dönemde de diğer peynirlerden önemli düzeyde farklı olduğu bulunmuştur ( $P<0.01$ ).

#### **Linoleik Asit (C18:2) Değeri**

Olgunlaşmanın 1. gününde B peyniri ile K1 peyniri birbirine yakın değerler almış ve en yüksek linoleik asit değeri 4.21 mg/100g ile K1 peynirinde saptanmıştır. Olgunlaşma süresince linoleik asit miktarları artmış ancak bu artış yapılan varyans analizinde önemli bulunmamıştır ( $P>0.05$ ). Peynirlerde saptanan linoleik asit miktarlarının Feta peynirindeki belirlenen değerden yüksek (29), teleme peynirde belirlenen değerden düşük (28) olduğu görülmüştür.

Yapılan çok değişkenli istatistiksel analize göre peynirlerin serbest yağ asitlerinin küme dendrogramları çıkarılmıştır (Şekil 1). Olgunlaşmanın ilk dönemlerinde tüm peynirler aynı kümede yer alırken, olgunlaşmanın sonunda K1 ve K2 birbirine yakın, A ve B peynirleri ise farklı kümelerde yer almıştır. Kümelerde yer alan K2 ve B peynirleri olgunlaşmanın sonunda aynı kümede yer almışlardır. Dendrogramda yukarıdan aşağı doğru gidildikçe olgunlaşmanın arttığı gözlenmiştir. EPS(+) peynirlerin olgunlaşmanın başında ve sonunda aynı grupta yer aldığı, EPS(-) peynirlerden B peynirinin tüm depolama boyunca diğerlerinden düşük ve farklı serbest yağ asidi değerine sahip olduğu görülmüştür.

#### **Sonuç**

Toplam serbest yağ asitleri incelendiğinde, olgunlaşmanın tüm dönemlerinde en düşük içeriğe az yağlı kültürü ile üretilmiş B peynirinde olduğu görülmüş, bunu A peyniri izlemiştir. Tam yağlı ve yarım yağlı kontrol kültürü ile üretilmiş K1 ve K2 peynirleri sırasıyla en yüksek serbest yağ asitlik

değerini göstermişlerdir. Tulum peynirlerinin toplam serbest yağ asitleri miktarları tüm peynirlerde olgunlaşma süresince artmış ve bu artışın önemli düzeyde olduğu görülmüştür ( $P<0.01$ ). Çalışmada belirlenen 10 serbest yağ asidi içinde palmitik, oleik ve miristik asitlerin baskın olan serbest yağ asitleri olduğu belirlenmiştir. Tüm peynirler içinde K1 peyniri serbest yağ asidi içeriği bakımından en yüksek değere sahip peynir olmuş, ekzopolisakkarit üreten kültür kullanımının serbest yağ asidi kompozisyonuna bir etkisi olmadığı görülmüştür.

#### **KAYNAKLAR**

1. Hayaloğlu AA. 2003. Starter olarak kullanılan bazı *Lactococcus* suşlarının beyaz peynirlerin özellikleri ve olgunlaşmaları üzerine etkileri. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Adana, Türkiye, 170s.
2. Yaygın H ve Kılıç S. 1993. Süt Endüstrisinde Saf Kültür. Altındağ Matbaacılık, İzmir, Türkiye, 108 s.
3. Kavas G, Oysun G, Kınık O, Uysal H. 2004. Effect of some fat replacers on chemical, physical and sensory attributes of low-fat white pickled cheese. *Food Chem.*, 88: 381-388.
4. Bryant A, Ustunol, Z. 1995. Consumer acceptance of Cheddar Cheese as influenced by fat reduction. *J. Food Tech.* 30-4: 26-28.
5. Shah NP. 2003. The exopolysaccharide production by starter cultures and their influence on textural characteristics of fermented milk. *Int Dairy Fed*, 101-105.
6. Welman AD, Maddox, IS. 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends in Biotech.* 21: 269-274.
7. Cummings JH, Englyst HN. 1995. Gastrointestinal effects of foodcarbohyd rate. *American J Clin Nutrition*, 61: 938-945.
8. Harris PJ, Ferguson LR. 1993. Dietary fibre: Its composition and role in protection against colorectal cancer. *Mutation Res.* 290: 97-110.
9. Robinson RK. 1985. Dairy Microbiol. Volume 1 The Microbiology of Milk, 51-59.
10. Low D, Ahlgren JA, Horne D, McMahon DJ, Oberg CJ, Broadbent JR. 1998. Role of *Streptococcus thermophilus* MR- 1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention. *Appl. Environ. Microbiol*, 64: 2147- 2151.

11. Champagne CP, Barrette J, Roy D, Rodrigue N. 2006. Fresh-cheesemilk formulation fermented by a combination of freeze-dried citrate-positive cultures and exopolysaccharide-producing lactobacilli with liquid lactococcal starters. *Food Res. Int.* 39: 651-659
12. Hayaloglu AA, Fox, PF, Guven M, Cakmakci S. 2007. Cheeses of Turkey: 1. Varieties ripened in goat-skin bags. *Lait*, 87: 79-95.
13. Guler Z, Uraz, T. 2003. Proteolytic and lipolytic composition of Tulum Cheeses. *Milchwissenschaft*, 9 (10): 502-505.
14. Larrayoz P, Martinez MT, Barron LJ, Torre P, Barcine Y. 1999. The evolution of free fatty acids during the ripening of Idiazabal cheese: Influence of rennet type. *European Food Res Tech*, 210: 9-12.
15. Anonymous, 2006. TS 3001 Tulum peyniri Standardı, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 9 s.
16. Nunez M, Garsia-Aser C, Rodriguaz-Martin, MA, Medina M, Gaya P. 1986. The effect of ripening and cooking temperatures on proteolysis and lipolysis in Manchego cheese. *Food Chem.*, 21: 115-123.
17. Rolf, FJ. 1993. NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 1.18 New York, Exeter, Setauket.
18. Kılıç S. 2001. Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri, Ege Üniv. Ziraat Fak. Yayınları, İzmir, Türkiye, 542s.
19. Ordonez AI, Ibanez FC, Torre P, Barcina Y. 1999. Effect of ewes-milk pasteurization on the free amino acids in Idiazabal cheese. *Int Dairy J*, 9: 135-141.
20. Kondyli E, Massouras T, Katsiari MC, Voutsinas LP. 2003a. Free fatty acids and volatile compounds in low-fat Kefalograviera-type cheese made with commercial adjunct cultures. *Int Dairy J*, 13: 47-54.
21. McSweeney PLH. 2004. Biochemistry of cheese ripening. *Int J Dairy Tech*, 57 (2/3): 127-143.
22. Hayaloğlu AA, Fox PF, Güven M, Çakmakçı S. 2007b. Cheeses of Turkey: 1. Varieties ripened in goat-skin bags. *Lait*, 87: 79-95.
23. Yılmaz G, Ayar A, Akın N. 2005. The effect of microbial lipase on the lipolysis during the ripening of Tulum cheese. *J Food Eng*, 69: 269-274.
24. Buffa M, Guamis B, Pavia M, Trujillo AJ. 2001. Lipolysis in cheese made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats'milk. *Int Dairy J*, 11: 175-179.
25. Kondyli E, Massouras T, Katsiari MC, Voutsinas LP. 2003b. Lipolysis and volatile compounds in low-fat Kefalograviera-type cheese made with commercial special starter cultures. *Food Chem.*, 82: 203-209.
26. Kınık O, Gürsoy O, Seçkin AK. 2005. Cholesterol content and fatty acid composition of most consumed Turkish hard and soft cheeses. *Czech J Food Sci*, 4: 166-172.
27. Voight DD, Chevalier F, Donaghy JA, Patterson MF, Qian MC, Kelly AL. 2012. Effect of high-pressure treatment of milk for cheese manufacture on proteolysis, lipolysis, texture and functionality of Cheddar cheese during ripening. *Innovative Food Sci Emerging Tech*, 13: 23-30.
28. Mallatou H, Pappa EC, Massouras T. 2003. Changes in free fatty acids during ripening of Teleme cheese made with ewes', goats', cows' or a mixture of ewes' and goats'milk. *Int Dairy J*, 13: 211-219.
29. Kondyli E, Katsiari MC, Massouras T, Voutsinas LP. 2002. free fatty acids and volatile compound of low fat feta-type cheese made with a commercial adjunct culture. *Food Chem.*, 79 (2): 199-205.

## HİCAZ NARINDAN MASERASYON YÖNTEMİ İLE ELDE EDİLEN LİKÖRLERİN TOPLAM FENOL İÇERİĞİNİN VE ANTIOKSIDAN KAPASİTESİNİN DEPOLAMA KOŞULLARINA BAĞLI DEĞİŞİMİ

Özlem Yalçınçıray\*, R. Ertan Anlı

Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

Geliş tarihi / Received: 05.12.2014

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 12.01.2015

Kabul tarihi / Accepted: 04.03.2015

### Özet

Sağlık üzerine olumlu etkilerinden dolayı nar ve nar ürünlerinin tüketimi günden güne artmakta ve önem kazanmaktadır. Bu çalışmada, Hicaz narından maserasyon yöntemi ile elde edilen nar likörlerinin oda sıcaklığında (+25 °C) ve buzdolabı sıcaklığında (+4 °C) depolanmasının fenolik içerik ve antioksidan aktiviteye olan etkisi incelenmiştir. Toplam fenol miktarının belirlenmesinde Folin-Ciocalteu metodu, antioksidan aktivite belirlenmesinde ise trolox eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) ve 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) yöntemleri kullanılmıştır. Fenolik içeriğin belirlenmesinde yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılmıştır. Çalışmada 9 farklı fenolik asit miktarının depolama koşullarına bağlı değişimi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre oda sıcaklığında depolanan nar likörlerinin toplam fenol ve antioksidan aktivitesinde yaklaşık %15 artış gözlenirken, buzdolabı koşullarında depolanan likörlerde her iki değerde de ortalama %20 azalma görülmüştür. Buna ek olarak kabuk ve çekirdek ilavesinin incelenen özelliklerde istatistiksel olarak önemli bir artışa sebep olduğu; buna rağmen aroma artırıcı olarak eklenen maddelerin bu özelliklerde artırıcı yada azaltıcı etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. Likörlere ait fenolik dağılım incelendiğinde ise buzdolabında depolanan örneklerin fenolik madde miktarlarında azalma görülmüştür. Oda koşullarında depolanan örneklerde ise gallik asit, protokateşik asit, p-kumarik asit ve kuersetin miktarlarında artma, diğer fenolik madde miktarlarında azalma görülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** Hicaz narı, nar likörü, fenolik bileşikler, antioksidan kapasite

## THE IMPACT OF STORAGE CONDITIONS ON THE PHENOLIC CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF POMEGRANATE LIQUORS PRODUCED BY MACERATION METHOD FROM HİCAZ POMEGRANATE

### Abstract

Day by day the consumption of pomegranate and pomegranate products are increasing and gaining more importance due to its positive effects on health. In this study, the impact of storage at room temperature (+25 °C) and fridge temperature (+4 °C) on phenolic content and antioxidant activity of pomegranate liquors produced by maceration method from Hicaz pomegranate was examined. The total phenolic amount was evaluated by Folin – Ciocalteu method and the determination of antioxidant activity; trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods were used. The phenolic content was evaluated by high performance liquid chromatography (HPLC). In this study, 9 different phenolic acid amount differences, depending on the storage conditions, was determined. According to the results obtained; it was observed that total phenol and antioxidant activity of the liquors stored at room temperature increased about %15. However, both observed variables at the ones stored at fridge conditions decreased almost %20. In addition to these results; adding peelings and seeds to the liquors made a statistically important increase at observed variables; nevertheless adding aromatic drops didn't make any statistically important difference at phenolic content or antioxidant capacity. Examining the phenolic profiles of the liquors; it was seen that the individual phenolic amounts stored at refrigerator conditions decreased. On the other hand, the samples stored at room temperature showed that the levels of gallic acid, protocatechuic acid, p - coumaric acid and quercetin increased but the others decreased.

**Keywords:** Hicaz pomegranate, pomegranate liqueur, phenolic compounds, antioxidant capacity

\*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ ozlem343@yahoo.com,

☎ (+90) 312 436 0696,

☎ (+90) 312 436 0695

## GİRİŞ

Kültür tarihi M.Ö. 3000 yılına kadar dayanan en eski meyve türlerinden olan nar (*Punica granatum*); *Punicaceae* familyasından çok yıllık bir bitki olup genellikle tropik ve subtropik bölgelerde yetişmektedir (1). Ülkemizde Akdeniz, Ege ve Güneydoğu Anadolu en fazla nar üreten bölgeler olmak üzere çok soğuk yöreler dışında hemen her bölgede yetiştirilebilen narın üretimi ve tüketimi giderek artmaktadır (2). 1990'lı yıllarda nar üretimi ~50bin ton civarında iken bu değer 2011 yılında ~217bin ton, 2012 yılında ~315 bin ton ve 2013 yılında ise ~383bin tona ulaşmıştır (3). Koyu kırmızı rengi, mayhoş tadı, işlemeye uygunluğu, yüksek verim, nakliye ve depolamaya uygunluk gibi avantajları nedeniyle son yıllardaki bu artışta "Hicaznar" çeşidinin payı büyük olmuştur (4).

Türk Gıda Kodeksi distile alkollü içkiler tebliğine göre "meyve likörü; Meyvelerin tarımsal kökenli etil alkolde ve/veya tarımsal kökenli distilatta ve/veya tebliğ kapsamında yer alan distilat içkilerinde maserasyonu ile elde elden distile alkollü içkidir". Aynı tebliğe göre üretilen liköre dışarıdan aroma verici maddeler eklenerek aromada artış sağlanabilmektedir (5). Gıda sanayisinde narın işlenebilen kısmı, yani daneleri, meyvenin %52'sini oluşturmakta ve bu danelerin de; %78'i meyve eti, %22'si ise çekirdekten oluşmaktadır (6).

Nar taze meyve olarak tüketilebildiği gibi meyve suyu, meyve konsantresi, nar ekşisi, reçel, şarap gibi çeşitli ürünlere işlenerek de tüketilebilmektedir (7, 8). Narın hangi şekilde işleneceğine karar vermek için pH, asitlik, suda çözünür kuru madde gibi bileşim özelliklerinin yanı sıra fenolik ve antosiyanin bileşimi gibi parametreler önem kazanmaktadır (9).

Tarih boyunca pek çok farklı meyvelerden ve bitkilerden likör üretimi yapılmıştır. Likör üretimi sırasında meyveler bütün olarak veya meyve şırası olarak kullanılabilirdiği gibi, meyve kabukları ya da meyve esansları olarak da kullanılmaktadır. Dünyada pek çok farklı çeşitte likör üretilmesine rağmen nar likörü yakın zamanda üretilmeye başlanmış bir likördür ve ülkemiz için henüz çalışılmamış yeni bir üründür. 2009 yılında Sadeghi vd. nar çekirdeklerinin hidroalkolik ekstraktlarının antioksidan kapasitesini ölçmüş ve Galego vd. 2013 yılında nar meyve ekstraktları ile likörlerinin polifenol ve uçucu bileşenlerinin profillerini belirlemişlerdir (10, 11). Bu iki çalışma dışında nar likörü üzerine yapılmış akademik çalışma yok denecek kadar azdır.

Yüksek antioksidan kapasitesi ve fenolik içeriğinden dolayı vücuttaki serbest radikallerin dokulardaki zararını ortadan kaldırma ve bundan dolayı kanser, kalp ve damar hastalıkları gibi birçok hastalığın

oluşma riskini azaltıcı rol oynaması gibi sağlık üzerine birçok olumlu etkisi bulunan narın popülaritesi giderek artmaktadır (12, 13). Son zamanlarda yapılan çalışmalardan nar suyunun yüksek miktarda antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Nar meyvesinin yüksek antioksidan kapasitesi ve zengin fenolik içeriğini dolayısıyla sağlık üzerine olan olumlu etkilerini; nar meyvesinden meyve suyuna ve hatta nar likörü gibi nardan üretilen diğer ürünlere de aktarılabilirdiği düşünülmektedir.

Bu çalışmada amaç yeni ürün olarak üretilen nar likörünün nar meyvesi kadar yüksek antioksidan özellik gösterip göstermediğinin belirlenmesiyle birlikte üretim çeşidinin ve depolama koşullarının nar likörlerinin antioksidan kapasitesine ve fenolik içeriğine etkisini belirlemektir. Ayrıca bu çalışma ile nar likörüne ait toplam fenol ve antioksidan kapasitesi hakkında yararlanılabilecek bir akademik kaynak oluşturmak amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve YÖNTEM

### Materyal

Çalışmada, Antalya'dan temin edilen 2012 yılı Hicaz narları kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan tüm kimyasal malzemeler saftır. Gallik asit, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), Folin-Ciocalteu reaktifi ve 2,2-azino- bis (3-etilbenzotiazoline-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu (ABTS) ve Trolox<sup>TM</sup> (6-hidroksil-2,5,7,8-tetrametilchroman-2- karboksilik asit) ve diğer kimyasal malzemeler Sigma-Aldrich Kimyasallarından (Amerika) ve Merck Kimyasallarından (Almanya) temin edilmiştir.

### Metot

Likörler kullanılan narların kabuklu, kabuksuz; çekirdekli, çekirdeksiz sıklımlarına ve tarçın, karanfil gibi aroma arttırıcı drog maddelerin eklenip eklenmemesine göre sınıflandırılmıştır. Likörlerin üretilmesi aşamasında temin edilen narlardan çürük ve hasarlı olanlar ayıklandıktan sonra narlar yıkanmış ve 25 kg'lık gruplara ayrılmıştır. Gruplardan 1 tanesi otomatik presler ile sadece ikiye ayrılarak sıkılırken (kabuklu likör örnekleri), diğer gruplardakiler tanelenmiştir (kabuksuz likör örnekleri). Tanelenen gruplardan bir tanesi otomatik preste sıkılırken (kabuksuz ve çekirdekli örnekler) diğeri ise elde sıkılmış ve posa kısmı hemen ayrılmıştır (kabuksuz ve çekirdeksiz örnekler). Elde edilen nar suları bekletilmeden alkol oranları ayarlanmış ve 2-3 ay dinlendirmeye bırakılmıştır. Ayrıca aromatisasyon ve buke verme işlemleri için %96'lık etil alkol içerisinde vanilya, tarçın, karanfil gibi droglar da maserasyona

bırakılmıştır. Dinlendirme işlemi sonunda nar likörlerinin aktarma işlemleri yapılarak likörler süzölmüş ve tortu ayrılmıştır. Hazırlanan likörlerin şeker miktarları ayarlanmış ve aroma kazandırması için bir kısmına hazırlanan droglar eklenmiştir (droglu örnekler). Likörler en son jelatin ile durultma yapılarak 6 ay süre ile eskitilmiş ve şişelenmiştir.

Hazırlanan likörler 1 yıl süre ile buzdolabı ve oda sıcaklığında depolanmıştır. Buzdolabı sıcaklığı olarak +4 °C ve oda sıcaklığı olarak +25 °C seçilmiştir.

Makale içerisinde bulunan tablolarda hazırlanan likör örneklerinden 1: Kabuklu, çekirdekli ve droglu örnek; 2: Kabuksuz, çekirdeksiz ve drogsuz örnek; 3: Kabuksuz, çekirdeksiz ve droglu örnek; 4: Kabuksuz, çekirdekli ve drogsuz örnek; 5: Kabuksuz, çekirdekli ve droglu örnek; 6: kabuklu, çekirdekli ve drogsuz örnek şeklinde numaralandırılarak bahsedilmiştir.

#### Örneklere Yapılan Genel Analizler

Örneklere pH, genel asitlik, suda çözöünen kuru madde, yoğunluk, toplam şeker tayini, toplam fenol tayini, antioksidan aktivite tayini yapılmıştır.

#### Toplam Fenol Tayini

Toplam fenol miktarının belirlenmesinde Slinkard ve Singleton tarafından geliştirilen Folin – Ciocalteu metodu ile toplam fenol tayin yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır (14). Analiz için 20 µL örnek 1,58 mL saf su ile seyreltilmiş ve 100 µL Folin-Ciocalteu reaktifi eklenerek 1- 5 dakika beklenmiştir. Süre sonunda 300 µL %20lik sodyum karbonat çözöltisi eklenerek karıştırılmış ve 25 °C sıcaklıkta ve karanlık ortamda 90 dakika bekletilmiştir. Örneklerin absorbansı spektrofotometrede saf suya karşı 765 nm dalga boyunda okunmuştur. Hesaplama 6 farklı konsantrasyonda gallik asit çözöltileri kullanılarak hazırlanan gallik asit standart eğrisi kullanılmıştır. Sonuçlar ise litrede mg gallik asit eşdeğer (mg GAE/L) olarak verilmiştir.

#### Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi

Antioksidan kapasite belirlenmesi, fenolik bileşenlerin serbest radikalleri önleme yeteneğini ölçebilen DPPH (2,2-difenil-1-picirilhidrazil) kullanılarak yapılmıştır. Analiz Brand – Williams vd. tarafından geliştirilen metodun 0,1 mL örneğe 1,9 mL 0,1 mM metanolik DPPH çözöltisi eklenerek 30 dakika karanlıkta bekletilmesi şeklinde düzenlenmesi ile yapılmıştır (15). 517 nm dalga boyunda metanolden oluşan köre karşı absorbans değerleri kaydedilmiştir. Sonuçlar antioksidan aktivite (% inhibisyon) ve antioksidan kapasite ise litrede mM Troloks eşdeğer (mM / L Troloks Eşdeğeri) şeklinde verilmiştir.

#### Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi

Fenolik içeriğinin belirlenmesinde Özkan ve Göktürk Baydar'ın fenolik bileşikleri belirlemek için geliştirdiği metod düzenlenerek kullanılmıştır (16). Yapılan düzenlemelere göre Mobil faz; A çözöltisi olarak %100 metanol kullanılırken B çözöltisi olarak %2 asetik asit çözöltisi kullanılmıştır. 1 mL/dakika akış hızında gradient akış kullanılmış olup gradient program aşağıda Çizelge 1'de verilmiştir. Analizler öncesinde nar suyu ve nar likör örnekleri 0,45 µm'lik filtrelerden geçirilerek süzölmüş ve doğrudan Shimadzu LC-20 AT model (Shimadzu, Kyoto, Japan) SPD –M 10 A VP DAD dedektörlü HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Analizde ODS –4 kolon kullanılmış ve 50 µL örnek enjekte edilmiştir. Fenolik maddeler 260, 280, 320, 360 nm dalga boyunda incelenmiştir.

Fenol bileşiklerinin tanımlanması, saf maddelerin alıkonma zamanları ve spektrumlarından ve literatür verilerinden yapılmıştır.

Hesaplama: her bir fenolik madde için 5 farklı konsantrasyonda kalibrasyon çözöltileri hazırlanarak HPLC cihazına enjeksiyon yapılmış ve her bir fenolik madde için kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Doğrusal kalibrasyon grafiklerinden elde edilen doğru denklemleri kullanılarak fenolik maddelerin miktarları belirlenmiştir.

#### İstatistik Analizi

Tüm sonuçlar ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. İstatistik analizlerde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Duncan çoklu karşılaştırma yöntemi SPSS programı (Windows version 13.0, SPSS Inc. Chiago, IL) kullanılarak yapılmıştır.

#### Bulgular ve Tartışma

Hazırlanan örneklerin alkol miktarı % 30±2 (V/V) ayarlanmıştır. Likörlerin genel bileşimine ait sonuçlar Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 1. Fenolik maddelerin ayrılmasında zamana karşı mobil faz kompozisyonu (16)\*

Table 1. Mobile phase composition with time for the removal of phenolic substances (16)\*

Zaman (dakika) Time (Minute)	Metanol (% 100) Çözücü A Methanol (%100) Solvent A	%2 Asetik asit Çözücü B %2 Acetic Acid Solvent B
0.00	0	100
3.00	5	95
18.00	20	80
25.00	20	80
30.00	25	75
35.00	30	70
40.00	40	60
55.00	50	50
65.00	60	40
68.00	0	100

\*Taramızdan modifiye edilmiştir. Has been modified by us

Nar likörü üzerine daha önce yapılmış çalışmalarda likörlere ait genel özellikler incelenmediği için çalışmadan elde edilen veriler diğer araştırmacıların nar suları ile yaptıkları çalışmalardaki veriler ile karşılaştırılmıştır.

Çalışmada likörlerin toplam kuru madde miktarları ve yoğunlukları sırasıyla % 20.362-22.458 ve 1.041-1.058 arasında değiştiği belirlenmiştir. Poyrazoğlu vd. nar suyu üzerine yaptıkları çalışmalarında örneklerine ait toplam kuru madde miktarlarını % 16-19 arasında bulmuştur (13). Çalışmamızda belirlediğimiz değerler Poyrazoğlu vd. çalışmalarından elde ettikleri değerlerden daha yüksektir. Bunun nedeni nar likörünün şeker içeriğinin nar suyundan daha fazla olmasıdır.

Likörlerin pH değerleri 3.55-3.77 aralığında; asitlik değerleri ise 7.68-9.93g/L aralığında bulunmuştur. Fischer-Zorn ve Ara nar suyu üzerine yaptıkları çalışmada pH değerini 2.7- 3.9, titrasyon asitliğini ise 1.9-45.0 aralığında; Savran pH değerini 3.3-3.9, titrasyon asitliğini ise 4.6-17.3 aralığında; Artık vd. pH değerini 3.1-4.0, titrasyon asitliğini ise 3.2-11.8 aralığında; Ünal vd. pH değerini 2.4-4.4, titrasyon asitliğini ise 2.2- 55.2 aralığında bulmuştur (17-20). Yapılan çalışmalar nar suyu üzerine olsa da üretilen nar likörünün pH ve asitlik değerleri alkolün düşürücü etkisine rağmen yapılan çalışmalardaki verilerle uyum içerisinde.

Hazırlanan nar likörlerinde toplam indirgen şeker miktarı 144 – 165 mg/ L arasında değişmektedir. Wasila vd. yaptıkları çalışmalarında nar sularında indirgen şeker miktarlarını 200.4 – 277.4 g/L aralığında belirlemiştir (21). Savran ise yapmış olduğu tez çalışmasında; nar suyu örneklerinde; ortalama toplam indirgen şeker miktarını 148.8g/L olarak bulunmuştur (18). Gabbasova ve Abdurazakova ise nar sırasında toplam indirgen şeker miktarının %15.2 -20.5 arasında değiştiğini bildirmiştir (22). Likör üzerine yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz veriler çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Çizelge 3’de antioksidan aktivite incelendiğinde başlangıç değerleri %28.40-69.89, oda sıcaklığında

depolama sonucunda %35.65-77.06; buzdolabı sıcaklığında depolama sonucunda %23.88-61.87 değerleri aralığında değişmektedir. Örneklerde kabuk- çekirdek ve drog etkisi incelendiğinde likörlere drog katılmasının kabuksuz sıkılmış örneklerde istatistiksel olarak bir fark yaratmadığı ancak diğer örneklerde farkın önemli olduğu; kabuk veya çekirdek katılmasının ise antioksidan özelliklere istatistiksel olarak önemli bir etkisinin olduğu belirlenmiştir ( $P<0.05$ ).

Likörlerin hazırlanmasında kullanılan kabuksuz sıkılmış nar sırası %87 ve kabuklu sıkılmış nar sırası %94 antioksidan aktiviteye sahipken, şıralardan nar likörü üretiminde bu aktivite prosese bağlı olarak kabuklu şıradan üretilen likörlerde %62-69 değerlerine, kabuksuz şıradan üretilen likörlerde ise %28-37 arasında değerlere düşmüştür. Bu değerlerdeki azalma istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $P<0.05$ ).

Depolamanın likörlerin antioksidan aktivitesine olan etkisi incelendiğinde; oda sıcaklığı (+25 °C) koşullarında depolanan likörlerin antioksidan aktivitesinde %10-26 aralığında artış görülürken, buzdolabı (+4 °C) koşullarında depolanan likörlerin antioksidan aktivitesinde %8- 27 arasında değişen oranlarda azalma görülmüştür. Bu oranlarda görülen artış ve azalışlar istatistiksel olarak önem taşımaktadır ( $P<0.05$ ).

Çizelge 4’de toplam fenol miktarı başlangıçta 830.8- 1429.3 (mg/L, GAE); oda sıcaklığında depolama sonucunda 1029.1-1559.2 (mg/L, GAE); buzdolabı sıcaklığında depolama sonucunda 729.7-1273.6 (mg/L, GAE) değerleri arasında değişmektedir. Örneklerde kabuk- çekirdek ve drog etkisi incelendiğinde likörlere drog katılması istatistiksel olarak bir fark yaratmadığı ancak diğer örneklerde fark yarattığı; kabuk veya çekirdek katılmasının ise toplam fenol miktarına istatistiksel olarak önemli bir etkisinin olduğu belirlenmiştir ( $P<0.05$ ).

Likörlerin hazırlanmasında kullanılan kabuksuz sıkılmış nar sırası 1629.4 (mg/L, GAE) ve kabuklu

Çizelge 2. Nar likörlerinin genel bileşimi  
Table 2. The general composition of pomegranate liqueurs

Örnek Sample	Toplam kuru madde (%) Total dry matter (%)	pH pH	Titrasyon asitliği (g Tartarik asit / 100 mL) Titratable acidity (g Tartaric acid/100 mL)	Yoğunluk (g/L) Density (g/L)	İndirgen şeker (g/L) Reduced sugar (g/L)
1	22.458±0.833	3.675±0.035	0.9921±0.03	1.058±0.031	162.00±0.026
2	20.362±0.356	3.575±0.021	0.9930±0.04	1.041±0.053	158.50±0.017
3	21.768±0.293	3.555±0.035	0.9286±0.04	1.044±0.079	144.75±0.048
4	22.132±0.927	3.715±0.021	0.9286±0.05	1.054±0.031	165.00±0.024
5	20.873±0.206	3.775±0.007	0.7684±0.01	1.056±0.049	156.50±0.077
6	21.631±0.277	3.555±0.007	0.9606±0.01	1.057±0.054	159.00±0.065

Çizelge 3. Nar likörlerinin antioksidan aktivite ve antioksidan kapasite değerleri  
Table 3. Antioxidant activity and antioxidant capacity of pomegranate liqueurs

Örnek Sample	BAA* (% İnhibisyon) IAA** (%Inhibition)	OSAA* (% İnhibisyon) RTAA** (%Inhibition)	BSAA* (% İnhibisyon) FTAA** (%Inhibition)	BAK* (mM/L Troloks Eşdeğeri) IAC** (mM/L Trolox equivalent)	OSAK* (mM/L Troloks Eşdeğeri) RTAC** (mM/L Trolox equivalent)	BSAK* (mM/L Troloks Eşdeğeri) FTAC** (mM/L Trolox equivalent)
1	62.594±0.53 <sup>Ab</sup>	71.974±0.33 <sup>Bb</sup>	48.788±0.17 <sup>Cb</sup>	0.294±0.02 <sup>Db</sup>	0.346±0.07 <sup>Eb</sup>	0.217±0.08 <sup>Fb</sup>
2	37.906±0.32 <sup>Ac</sup>	41.956±0.24 <sup>Bc</sup>	35.283±0.54 <sup>Cc</sup>	0.157±0.02 <sup>Dc</sup>	0.179±0.01 <sup>Ec</sup>	0.142±0.01 <sup>Fc</sup>
3	37.560±0.57 <sup>Ac</sup>	42.521±0.44 <sup>Bc</sup>	34.794±0.12 <sup>Cc</sup>	0.155±0.03 <sup>Dc</sup>	0.182±0.02 <sup>Ec</sup>	0.139±0.06 <sup>Fc</sup>
4	28.602±0.30 <sup>Ad</sup>	36.007±0.69 <sup>Bd</sup>	24.126±0.53 <sup>Cd</sup>	0.105±0.01 <sup>Dd</sup>	0.146±0.02 <sup>Ed</sup>	0.080±0.02 <sup>Fd</sup>
5	29.283±0.23 <sup>Ad</sup>	35.654±0.43 <sup>Bd</sup>	23.881±0.92 <sup>Cd</sup>	0.109±0.05 <sup>Dd</sup>	0.147±0.02 <sup>Ed</sup>	0.079±0.05 <sup>Fd</sup>
6	69.879±0.37 <sup>Aa</sup>	77.064±0.21 <sup>Aa</sup>	61.874±0.18 <sup>Ca</sup>	0.334±0.014 <sup>Da</sup>	0.374±0.01 <sup>Ea</sup>	0.290±0.01 <sup>Fa</sup>

\*BAA: Başlangıçta Antioksidan Aktivite, OSAA: Oda Sıcaklığında Antioksidan aktivite, BSAA: Buzdolabı Sıcaklığında Antioksidan Aktivite, BAK: Başlangıçta Antioksidan Kapasite, OSAK: Oda Sıcaklığında Antioksidan Kapasite, BSAK: Buzdolabı Sıcaklığında Antioksidan Kapasite. A-F: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0.05) a-d: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0.05) (n=3)

\*\* IAA: Initially Antioxidant Activity, RTAA: Room Temperature Antioxidant activity, RTAA: Fridge Temperature Antioxidant Activity, IAC: Initially Antioxidant Capacity, RTAC: Room Temperature Antioxidant Capacity, RTAC: Fridge Temperature Antioxidant Capacity. A-F: The difference between the averages in the same row indicated with different letters are significantly important (P<0.05) a-d: The difference between the averages in the same column indicated with different letters are significantly important (P<0.05) (n=3)

sıklı nar sırası 1983.8±10.13 (mg/L, GAE) toplam fenol içermektedir. Tablo 3'de verilen toplam fenol miktarı değerleri incelendiğinde likörler üretildikten sonraki toplam fenol değerleri kabuklu şıradan üretilen likörlerde 1359.7-1429.3 (mg/L, GAE) değerlerine, kabuksuz şıradan üretilen likörlerde ise 852.3-1036.3 (mg/L, GAE) arasında değerlere düşmüştür. Bu değerlerdeki azalma istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P<0.05).

Depolamanın likörlerin toplam fenol içeriğine olan etkisi incelendiğinde; oda sıcaklığı (+25 °C) koşullarında depolanan likörlerin toplam fenolik madde içerikleri % 8-26 aralığında artış görülürken, buzdolabı (+4 °C) koşullarında depolanan likörlerin antioksidan aktivitesinde % 7-17 arasında değişen oranlarda azalma görülmüştür. Bu oranlarda görülen artış ve azalışlar istatistiksel olarak önem taşımaktadır (P<0.05).

Çizelge 4. Nar likörlerinin toplam fenol değerleri  
Table 4. Total phenol values of pomegranate liqueurs

Örnek Sample	BTF** ITP** (mg/L, GAE)	OSTF** RTTP** (mg/L, GAE)	BSTF** FTTP** (mg/L, GAE)
1	1359.7±14.28 <sup>Ab</sup>	1476.3±18.92 <sup>Bb</sup>	1165.2±8.49 <sup>Cb</sup>
2	997.8±9.74 <sup>Ac</sup>	1186.9±5.16 <sup>Bc</sup>	876.3±24.35 <sup>Cc</sup>
3	1036.3±17.67 <sup>Ac</sup>	1228.5±24.63 <sup>Bc</sup>	951.8±14.92 <sup>Cc</sup>
4	830.8±16.97 <sup>Ad</sup>	1053.4±12.62 <sup>Bd</sup>	708.1±6.58 <sup>Cd</sup>
5	852.3±23.13 <sup>Ad</sup>	1029.1±22.27 <sup>Bd</sup>	729.7±8.24 <sup>Cd</sup>
6	1429.3±3.53 <sup>Aa</sup>	1559.2±19.45 <sup>Ba</sup>	1273.6±12.06 <sup>Ca</sup>

\*\*BTF: Başlangıçta toplam fenol, OSTF: Oda sıcaklığında toplam fenol, BSTF: Buzdolabı sıcaklığında toplam fenol A-B: Aynı satırda değişik harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0.05) a-d: Aynı sütunda değişik harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0.05) (n=3)

\*\* ITP: Initially Total Phenol, RTTP: Room Temperature Total Phenol, FTTP: Fridge Temperature Total Phenol, A-B: The difference between the averages in the same line indicated with different letters are significantly important (P<0.05) a-d: The difference between the averages in the same column indicated with different letters are significantly important (P<0.05) (n=3)

Yapılan çalışmada oda sıcaklığında depolama sonucunda toplam fenol miktarlarında ve antioksidan aktivitede artış gözlenmiştir. Bunun nedeni olarak nar meyvesinin özellikle kabuk ve çekirdek kısımlarında yaklaşık %28-30 oranında tanen içermesi ve bu tanenleri gallotanenler, ellajitanenler, punicalagin ve punicalin gibi gallagil tanenlerden hidrolize olabilen tanenler oluşturmasıdır (2, 25-27). Hidrolize olabilen tanenlere ek olarak nar yüksek oranda antosiyan bileşikleri ve flavonoidleri de

içermektedir (28). Antosiyaninlerin stabilitelelerini depolama sıcaklığı etkilemekte ve parçalanma hızları sıcaklık arttıkça artmaktadır (29, 30). Antosiyaninleri oluşturan antosiyanidinlerin; yapılarında bulunan fenolik maddelere parçalanmaları ve hidrolize olabilen tanenlerin parçalanma ürünleri olarak ortaya çıkan fenolik bileşikler nedeniyle toplam fenol miktarında, antioksidan aktivite ve antioksidan kapasitede artışa neden olmaktadır (31).

Çizelge 5. Nar likörlerinin fenolik madde dağılımı (mg / L) ve depolama koşullarına bağlı değişimi  
Table 5. Individual phenolic contents in pomegranate liqueurs (mg / L) and their changes depend on storage conditions

Örnek Sample	Depolama koşulları Storage conditions	Gallik asit Gallic acid	(+) -kateşin (+) -catechin	Vanilik asit Vanillic acid	(-) -epikateşin (-) -epicatechin	Protokateşin asit Protocatechuic acid
1	Başlangıç Beginning	13.31±0.21 <sup>Fb</sup>	5.44±0.16 <sup>Ba</sup>	11.74±1.04 <sup>Aa</sup>	13.53±0.28 <sup>Aa</sup>	11.28±0.28 <sup>Db</sup>
	Oda Room	24.30±1.02 <sup>Aa</sup>	4.63±0.11 <sup>Cb</sup>	6.31±0.45 <sup>Gc</sup>	12.63±0.11 <sup>Bb</sup>	12.27±0.62 <sup>Ca</sup>
	Buzdolabı Fridge	8.74±0.27 <sup>Jc</sup>	3.35±0.22 <sup>Cc</sup>	7.97±0.21 <sup>Eb</sup>	11.76±0.35 <sup>Cc</sup>	10.28±0.47 <sup>Ec</sup>
2	Başlangıç Beginning	7.75±0.15 <sup>Kb</sup>	2.11±0.04 <sup>Fa</sup>	9.20±0.36 <sup>Da</sup>	8.91±0.37 <sup>Ea</sup>	8.62±0.17 <sup>Fb</sup>
	Oda Room	15.15±1.08 <sup>Ea</sup>	2.07±0.04 <sup>Fa</sup>	6.47±0.27 <sup>Gc</sup>	7.02±0.09 <sup>Hb</sup>	10.91±0.35 <sup>Da</sup>
	Buzdolabı Fridge	6.97±0.18 <sup>Lc</sup>	1.87±0.03 <sup>Fa</sup>	7.68±0.31 <sup>Eb</sup>	6.50±0.07 <sup>Lc</sup>	7.02±0.28 <sup>Gc</sup>
3	Başlangıç Beginning	7.01±0.27 <sup>Lb</sup>	2.53±0.36 <sup>Ea</sup>	9.82±0.68 <sup>Ca</sup>	9.11±0.49 <sup>Ea</sup>	8.57±0.69 <sup>Fb</sup>
	Oda Room	13.29±0.09 <sup>Aa</sup>	2.47±0.17 <sup>Ea</sup>	6.71±0.18 <sup>Fc</sup>	7.02±0.64 <sup>Hb</sup>	10.65±0.97 <sup>Ea</sup>
	Buzdolabı Fridge	6.66±0.11 <sup>Lc</sup>	2.29±0.19 <sup>Fa</sup>	7.43±0.17 <sup>Eb</sup>	6.47±0.25 <sup>Lc</sup>	6.94±0.79 <sup>Gc</sup>
4	Başlangıç Beginning	10.35±0.17 <sup>Hb</sup>	2.34±0.19 <sup>Ea</sup>	6.27±0.38 <sup>Ga</sup>	9.95±0.11 <sup>Da</sup>	4.08±0.14 <sup>Hb</sup>
	Oda Room	19.31±0.85 <sup>Aa</sup>	1.62±0.23 <sup>Gb</sup>	4.73±0.18 <sup>Lc</sup>	8.67±0.41 <sup>Fb</sup>	5.94±0.21 <sup>Ha</sup>
	Buzdolabı Fridge	7.86±0.15 <sup>Kc</sup>	1.37±0.26 <sup>Gc</sup>	5.29±0.33 <sup>Hb</sup>	7.99±0.34 <sup>Gc</sup>	4.41±0.12 <sup>Hb</sup>
5	Başlangıç Beginning	9.62±0.21 <sup>Hb</sup>	2.37±0.33 <sup>Ea</sup>	6.36±0.36 <sup>Ga</sup>	11.63±0.23 <sup>Ca</sup>	3.96±0.17 <sup>Hb</sup>
	Oda Room	17.13±0.55 <sup>Aa</sup>	1.74±0.18 <sup>Fb</sup>	5.29±0.17 <sup>Hb</sup>	9.34±0.37 <sup>Eb</sup>	5.56±0.50 <sup>Ha</sup>
	Buzdolabı Fridge	7.71±0.47 <sup>Kc</sup>	1.33±0.16 <sup>Gc</sup>	5.49±0.10 <sup>Hb</sup>	8.32±0.29 <sup>Fc</sup>	4.19±0.19 <sup>Hb</sup>
6	Başlangıç Beginning	11.47±1.15 <sup>Gb</sup>	6.05±0.38 <sup>Aa</sup>	10.28±0.41 <sup>Ba</sup>	13.45±0.39 <sup>Aa</sup>	13.33±0.84 <sup>Bb</sup>
	Oda Room	21.31±1.91 <sup>Ba</sup>	4.47±0.17 <sup>Cb</sup>	6.17±0.34 <sup>Gc</sup>	11.94±0.64 <sup>Cb</sup>	14.93±0.98 <sup>Aa</sup>
	Buzdolabı Fridge	7.48±0.53 <sup>Kc</sup>	3.58±0.52 <sup>Dc</sup>	7.04±0.32 <sup>Fb</sup>	9.97±0.62 <sup>Dc</sup>	12.17±0.97 <sup>Cc</sup>

Çizelge 5 devam Table 5 continued

Örnek Sample	Depolama koşulları Storage conditions	Kafeik asit Caffeic acid	p-Kumarik asit p-Coumaric acid	Ferulik asit Ferulic acid	Kuarsetin Quercetin
1	Başlangıç Beginning	1.53±0.11 <sup>Ba</sup>	0.93±0.27 <sup>Fb</sup>	0.98±0.15 <sup>Aa</sup>	0.82±0.06 <sup>Gc</sup>
	Oda Room	1.37±0.217 <sup>Eb</sup>	1.15±0.56 <sup>Da</sup>	0.81±0.24 <sup>Cb</sup>	1.20±0.07 <sup>Ca</sup>
	Buzdolabı Fridge	1.38±0.08 <sup>Db</sup>	0.76±0.09 <sup>Kc</sup>	0.81±0.13 <sup>Cb</sup>	0.91±0.10 <sup>Fb</sup>
2	Başlangıç Beginning	1.21±0.09 <sup>Ga</sup>	1.06±0.38 <sup>Eb</sup>	0.34±0.06 <sup>Ga</sup>	0.38±0.04 <sup>Kc</sup>
	Oda Room	1.15±0.12 <sup>Hb</sup>	1.25±0.43 <sup>Ba</sup>	0.31±0.05 <sup>Hb</sup>	0.97±0.03 <sup>Ea</sup>
	Buzdolabı Fridge	0.95±0.09 <sup>Kc</sup>	0.84±0.07 <sup>Db</sup>	0.26±0.04 <sup>Jc</sup>	0.79±0.04 <sup>Hb</sup>
3	Başlangıç Beginning	1.30±0.08 <sup>Fa</sup>	0.91±0.16 <sup>Gb</sup>	0.36±0.07 <sup>Fa</sup>	0.25±0.05 <sup>Kc</sup>
	Oda Room	1.21±0.09 <sup>Gb</sup>	1.20±0.17 <sup>Ca</sup>	0.31±0.04 <sup>Hb</sup>	0.74±0.04 <sup>Aa</sup>
	Buzdolabı Fridge	1.01±0.10 <sup>Jc</sup>	0.76±0.09 <sup>Kc</sup>	0.27±0.06 <sup>Lc</sup>	0.63±0.03 <sup>Hb</sup>
4	Başlangıç Beginning	0.94±0.08 <sup>La</sup>	0.91±0.13 <sup>Gb</sup>	0.27±0.07 <sup>La</sup>	0.10±0.06 <sup>Gc</sup>
	Oda Room	0.83±0.07 <sup>Mb</sup>	1.27±0.51 <sup>Aa</sup>	0.25±0.08 <sup>Ka</sup>	0.37±0.02 <sup>Ka</sup>
	Buzdolabı Fridge	0.75±0.06 <sup>Nc</sup>	0.88±0.07 <sup>Kc</sup>	0.16±0.07 <sup>Mb</sup>	0.24±0.03 <sup>Hb</sup>
5	Başlangıç Beginning	1.07±0.19 <sup>Ia</sup>	0.86±0.08 <sup>Hb</sup>	0.29±0.09 <sup>Ia</sup>	0.10±0.02 <sup>Cc</sup>
	Oda Room	0.96±0.08 <sup>Kb</sup>	1.19±0.17 <sup>Ca</sup>	0.25±0.08 <sup>Ka</sup>	0.34±0.05 <sup>Aa</sup>
	Buzdolabı Fridge	0.85±0.12 <sup>Nc</sup>	0.73±0.06 <sup>Kc</sup>	0.19±0.03 <sup>Lb</sup>	0.22±0.04 <sup>Hb</sup>
6	Başlangıç Beginning	1.68±0.42 <sup>Aa</sup>	0.99±0.08 <sup>Eb</sup>	0.92±0.20 <sup>Ba</sup>	1.06±0.08 <sup>Dc</sup>
	Oda Room	1.37±0.35 <sup>Ec</sup>	1.24±0.14 <sup>Ba</sup>	0.79±0.13 <sup>Db</sup>	1.32±0.1 <sup>Aa</sup>
	Buzdolabı Fridge	1.49±0.36 <sup>Cb</sup>	0.74±0.09 <sup>Cc</sup>	0.72±0.09 <sup>Eb</sup>	1.25±0.09 <sup>Bb</sup>

A-O: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0.05).

a-c : Aynı örnekte aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0.05).

(n=3) A-O: The difference between the averages in the same column indicated with different letters are significantly important (P<0.05). a-c: The difference between the averages in the same sample and same column indicated with different letters are significantly important (P<0.05). (n=3)



Çalışmada kullanılan likörlere ait fenolik dağılım ve fenolik maddelerin konsantrasyon değerleri ortalama ve standart sapmaları ile çizelge 5’de verilmiştir. Likör örneklerinde fenolik madde miktarlarının çeşitlere bağlı değişimi (+) – kateşin, (-) epikateşin gibi bazı fenolik maddeler hariç istatistiksel olarak önem taşımaktadır ( $P<0.05$ ). Depolama koşullarının fenolik dağılıma etkisi istatistik olarak önemli düzeyde bulunmuştur ( $P<0.05$ ).

Çalışmada hazırlanan likörlerde hidroksibenzoik asitlerden gallik asit, vanilik asit, protokateşik asit; hidroksisinamik asitlerden p-kumarik asit, kafeik ve ferulik asit; kateşinler grubundan (+) – kateşin, (-) epikateşin; flavanollerden kuarsetin miktarları belirlenmiştir. Çalışmada örnekler HPLC cihazına enjekte edilmeden önce herhangi bir hidroliz işlemine maruz bırakılmadığı için belirlenen dağılım fenolik maddelerin serbest formlarıdır. Gallik asit, Vanilik asit, Protokateşik asit ve (-) epikateşin hariç fenolik bileşenler likörlerde minör düzeyde bulunmaktadır. Daha önceden nar likörlerinde fenolik dağılım belirlenmesine yönelik herhangi bir çalışma bulunmadığı için kıyaslama işlemi nar suyu örnekleri ile yapılmıştır.

Hmid ve arkadaşları Morocco’da yetişen nar çeşitlerinde gallik asit miktarını 12.24-88.51 mg/L, (+) – kateşin miktarını 1.31-6.84 mg/L, (-) epikateşin miktarını 1.14-13.88 mg/L, kafeik asit miktarını 0.16-1.64 mg/L, p-kumarik asit miktarını 0.78-5.88 mg/L, ferulik asit miktarını 0.41-4.78 mg/L ve kuarsetin miktarını ise 0.60-5.06 mg/L aralıklarında belirlemiştir (32). Kelebek ve Canbaş ise nar sırasında ortalama gallik asit miktarını 13.95 mg/mL, protokateşik asit miktarını 4.98 mg/mL, kafeik asit 6.39 mg/mL, vanilik asit 2.33 mg/mL düzeyinde belirlemiştir (33). Poyrazoğlu vd. Türkiye’de yetiştirilen nar çeşitlerinde fenolik dağılımı gallik asit 0.03-30.86 g/L, protokateşik asit 0.12-2.09 g/L, (+) – kateşin 0.13-8.44 g/L, kafeik asit 0.10-2.89 g/L, p-kumarik asit 0.02-0.21 g/L, ferulik asit 0.01-0.06 g/L ve kuarsetin miktarını ise 0.23-5.30 g/L aralıklarında belirlemiştir (13).

Nar likörleri ile yapılan çalışmada bulunan değerler genel olarak yukarıda bahsedilen çalışmalarda elde edilen verilerle uyum göstermektedir. Ancak kullanılan nar çeşitlerinin farklılığı ve üretilen üründe alkol bulunması nedeniyle diğer çalışmalarda belirlenen aralığın bir miktar altında olmaları da doğal ve beklenen bir sonuçtur. Depolama süresi sonunda buzdolabında depolanan nar likörü örneklerinde fenolik maddelerin miktarlarında azalma görülmüştür. Buzdolabı koşullarının aksine oda koşullarında depolanan örneklerde ise gallik asit, protokateşik asit, p-kumarik asit ve kuarsetin miktarlarında artma, diğer fenolik madde miktarlarında azalma görülmüştür.

### SONUÇ

Çalışmada kabuklu ve kabuksuz nar sırasında farklı şekilde üretilen nar likörlerinin 1 yıl süre ile oda koşullarında ve buzdolabı koşullarında depolanması sonucunda antioksidan aktiviteleri, toplam fenol miktarları ve fenolik dağılımlarında olan değişimler incelenmiştir. Likör üretiminde drog kullanımının incelenen özelliklere istatistiksel olarak önemli bir etkisi olmadığı ancak kabuk ve çekirdek gibi fenolik açıdan zengin kısımların üretime katılmasının önemli etkide bulunduğu belirlenmiştir. Depolama koşullarının likörlerin incelenen özellikleri üzerinde istatistiksel olarak önemli bir etkisi olduğu da saptanmıştır. Çalışmada nar likörlerinin de nar meyvesi veya nar suyu kadar zengin fenolik ve antioksidan özellik taşıdığı gözlenmiştir.

Depolama süresi boyunca nar likörlerinin fenolik madde miktarlarında meydana gelen değişim, fenolik maddelerin; hidrolizasyon, kondensasyon gibi nedenlerle yapılarının değişmesinden kaynaklanmış olabilmektedir (34, 35). Yapılan çalışmada +25 °C oda koşullarında depolama sonucunda toplam fenol miktarında, antioksidan aktivite ve antioksidan kapasitede gözlenen artışın yukarıda açıklanan antosiyaninlerin, tanenlerin ve flavonoidlerin sıcaklık etkisi nedeniyle parçalanması olduğu düşünülmektedir.

### KAYNAKLAR

1. Schubert SY, Lansky EP. Neeman I. 1999. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *J of Ethnopharmacol.* 66:11-17.
2. Özkal N, Dinç S. 1993. Punica Granatum L. (Nar) Bitkisinin Kimyasal Bileşimi Ve Biyolojik Aktiviteleri. *Ankara Ecz. Fak. Der.* 22, 1-2, Ankara.
3. Anonim 2013. Türkiye İstatistik Kurumu bitkisel üretim istatistikleri, diğer meyveler [http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt\\_id=1001](http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001) (Erişim tarihi 15 Ekim 2014)
4. Kurt H, Güven Ş. 2013. Bir Ziraat Coğrafyası Çalışması: Türkiye’de Nar (*Punica Granatum* L.) Tarımı. *Marmara Coğ. Der.* Sayı: 27, Ocak - 2013, S. 551-574
5. Anonim 2005. Türk Gıda Kodeksi Distile Alkollü İçkiler Tebliği (Tebliğ No:2005/11). Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Ankara. Tebliğ no: 2005/11
6. Kulkarni AP, Aradhya SM. 2005. Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development, *Food Chem*, 93, 2, 319-324.
7. Sarıca Ş. 2011. Nar Suyu Yan Ürünlerinin Hayvan Beslemede Kullanım Olanakları. *Ziraat Fak. Der.*, 28(2), 97-101

8. Cemeroglu B. 1977. Nar suyu üretim teknolojisi üzerine araştırmalar. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yay. No: 664, Ankara
9. Gölcüklü M, Tokgöz H. 2008. Ülkemizde yetiştirilen önemli nar (*Punica granatum*) çeşitlerine ait nar sularının bazı kalite özellikleri. *Hasat Gıda Der*, 274 : 26-31
10. Sadeghi N, Jannat B, Oveisi MS. Hajimahmoodi, M., Photovat, M., 2009. Antioxidant activity of Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) seed extracts. *J Agric Sci and Tech*, 11, 633-638.
11. Galego LR, Jockusch S, Da Silva JP. 2013. Polyphenol and volatile profiles of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit extracts and liquors. *Int J Food Sci and Tech*, 48, 693-700.
12. Sumner MD, Elliot-Eller M, Weidner G, Daubenmier JJ, Chew MH, Merlin R, Raisin CJ, Ornish D. 2005. Effects of pomegranate juice consumption on myocardial perfusion in patients with coronary heart disease. *Am J of Cardiol*, Vol.96,810-814.
13. Poyrazoğlu E, Gökmen V, Artık N. 2002. Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. *J Food Comp and Anal*, Vol.15, 567-575.
14. Slinkard K, Singleton VL. 1977. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *Am J of Enol and Viticul*, 28: 49 – 55.
15. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant capacity. *Food Sci. Tech*. 28 (1), 25-30.
16. Özkan G ve Göktürk Baydar N. 2006. A Direct RP-HPLC Determination of Phenolic Compounds in Turkish Red Wines. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fak Der*, 19(2):229-234.
17. Fischer-Zorn M. ve Ara V. 2007. Pomegranate juice- chemical composition and potential adulteration. *Science & Research*, volume 17, 4s, 204-213.
18. Savran HE. 1999. Nar suyunda organik asit dağılımı (Yüksek Lisans Tezi) Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 25s.
19. Artık N, Murakami H, ve Mori T. 1998. Determination of phenolic compounds in pomegranate juice by using HPLC, *Fruit Proces*. 12, 492-499.
20. Ünal Ç, Velioglu S. ve Cemeroglu B. 1995. Nar sularının bileşim öğeleri. *GIDA*, 20 (6), 339-345.
21. Wasila H, Li X, Liu L, Ahmad I ve Ahmad S. 2013. Peel effects on phenolic composition, and making of pomegranate juice and wine. *J Food Sci*. Vol 78 Nr. 8 pages 1166- 1172.
22. Gabbasova IA, Abdurazakova SK, 1969. Chemical composition of pomegranate juice. *Izv.Vyssh. Ucheb. Za-ved., Pishch Tech* 4, 30-31.
23. Uzuner S. 2008. Nar suyunda farklı üretim ve depolama koşullarında ellajik asit ve toplam antioksidan aktivitelerindeki değişimler. (Yüksek Lisans Tezi) Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Ankara
24. Özgen M, Durgaç C, Serçe S, Kaya C, 2008. Chemical and antioxidant properties of pomegranate cultivars grown in the Mediterranean region of Turkey. *Food Chem*, 111, 703-706.
25. Mena P, Marti N, Garcia-Viguera C. 2014. The impact of processing and storage on the (poly) phenolic fraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) juices. Processing and impact on antioxidants in beverages., Elsevier press. Chapter 18 p.173-184.
26. Shahidi F, Naczki M. 2004. Phenolics in food and nutraceuticals. CRC Press. Chapter4, Phenolic compounds in fruits and vegetables. 1-110p.
27. Gil MI, Tomas-Barberan FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM ve Kader AA. 2000, Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing, *J Agric and Food Chem*, 48, 4581-4589.
28. Mohammad SM, Kashani HH. 2011. Chemical composition of the plant *Punica granatum* L. (Pomegranate) and its effect on heart and cancer. *J Medic Plants Research* Vol. 6(40), pp. 5306-5310, 17 October 2012.
29. Alighourchi H, Barzegar M. 2009. Some physicochemical characteristics and degradation kinetic of anthocyanin of reconstituted pomegranate juice during storage. *J. Food Eng*. 90, 179-185.
30. Asafi N, Cemeroglu B. 2000. Viřne ve nar suyu ve konsantratlarında antosiyaninlerin deđredasyonu. *GIDA* 25 (6) :407-411.
31. Koca İ, Karadeniz B, Tural S. 2006. Antosiyaninlerin antioksidan aktivitesi. Türkiye 9. Gıda Kongresi; 24-26 Mayıs 2006, Bolu.
32. Hmid I, Elothmani D, Hanine H ve Oukabli A. 2013. Comparative study of phenolic compounds and their antioxidant attributes of eighteen pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Morocco. *Arabian J Chem*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.10.011> article in press.
33. Kelebek H, Canbaş A. 2010. Hicaz narı şirasının organik asit şeker ve fenol bileşikleri içeriği ve antioksidan kapasitesi. *GIDA* (2010) 35 (6): 439-444.
34. Cemeroglu B. 2009. Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi.1. Cilt. Kültür ve Turizm Bakanlığı Yayınları. Ankara.
35. Zaouay F, Mena P, Garcia-Viguera C, Mars M. 2012. Antioxidant activity and physico-chemical properties of Tunisian grown pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Industrial Crops and Products* Volume 40, November 2012, Pages 81-89.

## PASTÖRİZE KEÇİ SÜTÜNÜN DONDURULMASI VE DONDURARAK DEPOLAMASI SIRASINDA MEYDANA GELEN DEĞİŞMELER

Hülya Yaman\*, Hayri Coşkun

Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bolu

Geliş tarihi / Received: 26.12.2014

Kabul tarihi / Accepted: 20.02.2015

### Özet

Bu çalışmada, tam yağlı keçi sütünün pastörize edilip dondurulması esnasında ve dondurulan sütlerin 12 aylık depolama süresi boyunca sütle meydana gelen değişimlerin belirlenmesine çalışılmıştır. Bu amaçla, tam yağlı keçi sütü örnekleri süzildükten sonra 65 °C'de 30 dakika pastörize edilerek farklı hacimdeki ambalajlara aktarılmış ve iki farklı sıcaklık derecesinde (-15 ve -35 °C) dondurulmuştur. Dondurulan sütler yine iki farklı depolama sıcaklığında (-18 ile -28 °C) bir yıl süre depolanmışlardır. Depolama süresince keçi sütlerinin toplam mezofilik aerobik bakteri sayısı, koliform bakteri sayısı, pH, titrasyon asitliği, viskozite, sedimentasyon, asitlik derecesi, oksidasyon, renk ve duyu özellikleri incelenmiştir. Araştırmadan elde edilen sonuçlarına göre; keçi sütü örneklerinde koliform bakteri sayısında azalma belirlenirken toplam mezofilik aerobik bakteri sayısında değişim gözlenmemiştir. Titrasyon asitliği miktarlarında önemli değişim olmamış; pH, sedimentasyon, oksidasyon ve ADV değerlerinde önemli artışlar saptanmıştır. Dondurma ve depolama esnasında renk değerlerinde azalmalar tespit edilmiştir. Keçi sütlerinin koku, renk ve görünüş değerleri depolama boyunca değişmemiş, ikinci aydan sonra viskozite değerlerinde artışla ( $p<0.05$ ) hafif partiküllü yapı belirlenmiştir. Genel olarak değerlendirildiğinde proje çıktıları, pastörize keçi sütünü dondurarak saklamak suretiyle, kalitesinde hissedilir bir değişim olmadan raf ömrünün uzatılabileceğini de göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** Keçi sütü, pastörize keçi sütü, dondurulmuş pastörize keçi sütü

## THE CHANGES IN PASTEURIZED GOAT MILK DURING FREEZING AND THE FROZEN STORAGE

### Abstract

In this research, it was aimed to determine some properties of the pasteurized whole fat goat milk after freezing and the frozen storage for twelve months. For this purpose, the goat milk samples were filtered and pasteurized at 65 °C for 30 min, and transferred into two different packages, then frozen at -15 and -35 °C. The packages were stored at -18 and -28°C for one year. During storage period goat milk samples were investigated in terms of their microbiological (total aerobic mesophilic bacteria and coliform bacteria), chemical and biochemical properties (pH, titration acidity %, viscosity, sedimentation, acid degree value, oxidation and colour) and sensory characteristics. According to the results obtained, while the effect of storage time on the counts of coliform bacteria were found to be significant, there were no difference at total aerobic mesophilic bacteria count. At the same time, colour values were observed to be significantly reduced during freezing and storage period. During the storage time; odour, colour and appearance of goat milk samples were not changed, after the second month, the mild particle structure was determined with increasing in viscosity values ( $P<0.05$ ). An overall evaluation the obtained results showed that the freezing and keeping in the frozen storage of pasteurized goat prolonged the shelf life of pasteurized milk without any important change in the quality.

**Keywords:** Goat milk, pasteurized goat milk, pasteurised-frozen goat milk

\*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ hulyayaman@ibu.edu.tr,

☎ (+90) 3742535550,

☎ (+90) 3742535551

## GİRİŞ

Keçi sütü, anne sütüne benzerliğinden dolayı bebeklerin beslenmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Keçi sütündeki proteinleri inek sütü proteinleri ile daha az alerjik özelliklere sahiptir. Bundan dolayı özellikle inek sütüne alerjisi olan çocuklara, çölyak hastalarına ve mide bağırsak sistemi rahatsızlığı olan kişilere terapötik etkilerinin yanı sıra; gelişmekte olan ülkelerde açlık ve malnutrisyon durumunda denge sağlamak için keçi sütü kullanılmaktadır (1-4).

Ancak keçi sütünün üretim miktarı mevsime bağlı olarak değişmektedir. Yaz ve ilkbahar aylarında üretim en yüksek seviyelere ulaşırken, sonbahar ve kış mevsimlerinde üretim düşmekte, hatta sıfırlanmaktadır (5). Süt üretiminin yüksek olduğu dönemlerde keçi sütünün dondurularak muhafaza edilmesi, daha sonraki kıtlık mevsiminde üretimin dengelenmesinde bir fırsat olarak karşımıza çıkmaktadır.

İnek ve koyun sütünün dondurularak muhafaza çalışmalarına sıklıkla rastlanmaktadır. Çalışmalar, İkinci Dünya Savaşı yıllarında gemi hastanelerdeki hastalara taze süt sağlamak amacıyla başlatılmıştır. 1930-1950'li yıllarda sütün dondurularak muhafazası üzerine yoğun çalışmaların olduğu göze çarpmaktadır. Bu tarihten 2000'li yıllara kadar çalışmalara ara verilmişse de konu önemini halen korumaktadır. Yapılan çalışmalarda, özellikle koyun sütünde dondurma işleminin peynirin özelliklerine etkisi araştırılmıştır (6-10).

Sütün dondurulması üzerine yapılan çalışmalar önce fiziksel ve kimyasal yapıda oluşabilecek değişimler üzerine odaklanılmış, daha sonra belirlenen problemlerin giderilmesi ve stabilitenin sağlanması konusunda çalışmalar devam etmiştir. Tam yağlı sütün veya konsantre sütün dondurulması ve depolanması sonucunda, sütün kurumadığı, yağ, protein ve laktoz miktarında herhangi bir değişim görülmediği rapor edilmiştir (6, 7, 11). Ancak sütün dondurulması ile katı bileşenlerin ambalajın alt kısmında toplanma eğilimi gösterdiği belirlenmiştir (6). Yapılan çalışmalara göre sütün dondurulması süt yağın emülsiyon durumunu, laktozun kristalizasyonunu, viskozitede artışı, protein destabilizasyonunu, tat-aroma özelliklerini ve mikrobiyolojik durumu gibi pek çok özelliği etkilemiştir (12-14). İnek sütü ve koyun sütünde yapılan çalışmalar; sütün üç aylık süre boyunca dondurularak depolanmasının kabul edilebilir seviyede değişimle sonuçlandığını ortaya koymuştur (6, 7). Bu nedenle çalışmada ana amaç keçi sütü üretiminin düşük olduğu veya kıtlık

döneminde kullanılmak üzere, keçi sütünün dondurulmasının süte meydana getirdiği değişimleri belirlemek, dondurulmuş keçi sütünün depolama süresini belirlemek ve bu sütün çözündürülerek direk içme sütü olarak kullanılabilirliğini ortaya koymaktır.

Çalışma dizayn edilirken gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan dondurma sıcaklık dereceleri ve ambalaj boyutları göz önünde tutulmuştur. Çalışmada denenen parametreler içinde pastörize keçi sütü için en uygun dondurma sıcaklığı, depolama sıcaklığı ve ambalaj hacmi belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca tüm parametrelerin süte meydana getirdiği değişimler ortaya konmuştur.

## MATERYAL ve YÖNTEM

Hammadde süt olarak, Bolu'da yerel bir süt işletmesinden sağlanan Saanen ırkı tam yağlı keçi sütü kullanılmıştır. Keçi sütünün kuru madde oranı % 13.46±0.152, protein değeri % 3.47±0.223, yağ oranı % 4.58±0.106, laktoz oranı % 4.66±0.002, kül oranı % 0.71±0.039, pH değeri 6.57±0.035 ve titrasyon asitliği laktik asit cinsinden % 0.19±0.013 bulunmuştur. İki tekrarlı olarak planlanan çalışmada, keçi sütü süzme ve pastörizasyon (65°C'de 30dk) işlemlerinden sonra soğutulmuş (4°C), yarım ve bir litrelik HDPE şişelere doldurulmuştur. Şişeler iki gruba ayrılmış, yarısı hava sirkülasyonlu odada -35 °C'de, diğer yarısı -15 °C'de durgun ortamda dondurulmuştur. Dondurulmuş keçi sütü örnekleri; iki ayrı depolama sıcaklığında ( -18 ve -28 °C) 12 ay süre ile depolanmıştır. Depolama sürecinin 0, 3, 6, 9 ve 12. aylarında örnekler 40°C su banyosunda çözündürülerek analiz edilmiştir.

**Kimyasal Analizler:** Keçi sütü örneklerinde pH (pH-meterİnolab, pH 720, Germany), viskozite (+4°C) (AND viscometer SV-10, Japan), yağ (Gerber yöntemi), titrasyon asitliği, toplam kurumadde, kül, toplam azot (15), laktoz (16), peroksit değeri (IDF,1974), sedimantasyon (17) ve asitlik derecesi değeri (ADV) (18) belirlenmiştir. **Mikrobiyolojik Analizler:** Keçi sütü örneklerinin toplam mezofilik aerobik bakteri ve koliform bakteri sayıları yayma plak yöntemiyle (19) yapılmıştır. **Duyusal Analizler:** Keçi sütü örneklerinin duyuşal değerlendirmeleri keçi sütü tüketen deneyimli 12 panelist tarafından yapılmıştır. Örnekler Metin (20)'in sıralama testine uygun olarak değerlendirilmiştir. Kategori ölçeği tat, koku, görünüm, renk ve tekstürel özellikleri içeren 4 puanlı sıralama ölçeği kullanılmıştır. Elde edilen verilerin ortalamaları alınarak genel kabul edilebilirlik değerleri belirlenmiştir. **İstatistiksel Analizler:** Betimsel

ve karşılaştırmalı veri analizleri için SPSS paket software program kullanılmıştır. Çoklu ve ikili karşılaştırmalarda ANOVA ve bağımsız t testi kullanılmıştır (21).

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Yapılan kaynak taramasından; sütün dondurulması ile kimyasal bileşiminde önemli bir değişme meydana gelmediğinden (6, 7, 11, 22) dondurma ve depolama işlemleri boyunca sütün bileşimdeki değişim takip edilmemiştir.

Pastörize ve dondurulmuş keçi sütünün bazı özellikleri Tablo 1'de görülmektedir. Keçi sütü örneklerinde incelenen parametrelere dondurma işleminin önemli bir etkisi görülmemiştir ( $p>0.05$ ). Doan ve Warren (23) yaptıkları çalışmada ölçülebilir miktarda protein sedimentasyonu belirleyememiş, Babcock ve ark. (8, 9) ise 17.5 °C'de dondurulan sütlerde protein sedimentasyonunda hafif bir değişim belirlemişler ve yavaş dondurma işleminin kazein sisteminde kademeli presipitasyona neden olduğu gözlemlenmiştir (23-25). Donma sürecinde laktoz,  $\alpha$ -monohidrat bağlarıyla sıvı fazdaki suyu kendine bağlamaya çalışır ve sonuçta laktoz kristalizasyonu meydana gelir. Donma boyunca sıvı fazdaki suyun azalması ve laktoz kristalizasyonunun artması viskozitede artışa neden olmaktadır. Aynı zamanda sıvı fazdaki suyun azalması kalsiyum konsantrasyonunun artmasına ve dolaylı olarak da kazein misellerinin destabilizasyonuna yol açmaktadır. Donma esnasında süt kalsiyumca doyunluğa ulaşır ve bu durumda kalsiyum iyonları ile dihidrojen fosfat iyonları, hidrojen ve kalsiyum fosfatı oluşturarak çökme eğilimi gösterirler. Hidrojen iyonlarının oluşumu da pH değerinde azalma eğilimi gösterir (26). Laktoz kristalizasyonundan dolayı viskozitede

artış görülürken, düşük sıcaklıkta hızlı dondurma işleminde viskozite değerlerinin daha düşük olduğu görülmüştür. Bell (26) dondurma sıcaklığı arttıkça viskozite değerinde de artış olduğunu rapor etmiştir.

## Titrasyon Asitliği ve pH Değerlerinde Değişmeler

Depolama boyunca yapılan analizler sonucu; pastörize keçi sütü örneklerinde titrasyon asitliği (% laktik asit cinsinden) değerlerine, farklı ambalaj büyüklüğü ve dondurma/depolama sıcaklık parametrelerinin önemli bir etkisi görülmemiştir ( $P>0.05$ ) (Tablo 3). Benzer sonuçlar inek sütünde Babcock ve ark., (9) ile Katsiari ve ark (12) tarafından rapor edilmiştir. Yine ambalaj boyutu ve uygulanan sıcaklıkların pH değerine bir etkisi saptanmamış ( $P>0.05$ ) (Tablo 2), ancak depolamanın üçüncü ayına kadar pH değerlerinde azalma daha sonra artış belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). Sütün dondurulması ve depolanması esnasında pH değerlerindeki bu değişimin büyük oranda içerdiği kalsiyum fosfat, disodyum fosfat ve sodyum karbonatın çökmesinden kaynaklanabileceği tahmin edilmektedir. Suyun donması esnasında çözünür tuzların çökmesi ile pH düşerken, aynı tuzlar daha ileriki dönemde pH'nın yükselmesine katkıda bulunmaktadır (27).

## Viskozite Değerlerinde Değişmeler

Çalışmada keçi sütü örneklerinde; viskozite değerleri yüksek sıcaklıkta (-15 °C) dondurulmuş sütlerde daha yüksek, düşük sıcaklıkta (-35°C) dondurulmuş sütlerde daha düşük bulunmuştur (Tablo 4). Yapılan istatistiksel değerlendirmede keçi sütlerinin viskozite değerleri üzerine dondurma sıcaklığının ve depolama süresinin etkisi önemli bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Benzer sonuçlar konsantre dondurulmuş inek sütünde tespit edilmiştir (24). Süt dondurulduğunda sıvı faz

Çizelge 1. Pastörize ve dondurulmuş keçi sütünün bazı özellikleri  
Table 1. Some properties of pasteurized and frozen goat milk

Özellik Properties	Pastörize Süt Pasteurized Milk	Dondurulmuş süt / Frozen Milk			
		-15 °C 1/2 litre -15 °C 1/2 liter	-35 ° 1/2 litre -35 ° 1/2 liter	-15 °C litre -15 °C 1 liter	-35 °C 1 litre -35 °C 1 liter
pH/pH	6.64±0.028	6.65±0.021	6.63±0.028	6.64±0.028	6.63±0.035
Asitlik (%)/Acidity (%)	0.15±0.014	0.14±0.002	0.15±0.021	0.15±0.021	0.15±0.014
Viskozite (mPa s)/Viscosity (mPa s)	2.77±0.337	3.17±0.057	2.87±0.304	3.19±0.156	3.10±0.424
Sedimentasyon (g Kuru Madde /40 ml süt) Sedimentation (g Dry Matter/40 mL milk)	0.04±0.002	0.04±0.019	0.06±0.007	0.05±0.013	0.05±0.018
ADV (meq KOH/100 g yağ)/ ADV (meq KOH/100 g fat)	0.45±0.224	0.43±0.192	0.46±0.165	0.35±0.037	0.49±0.082
Peroksit değeri (meqO <sub>2</sub> /kg yağ) Peoxide value(meqO <sub>2</sub> /kg fat)	0.04±0.002	0.04±0.038	0.05±0.004	0.03±0.007	0.07±0.004
L*	94.40±0.381	93.75±0.279	94.06±0.078	93.85±0.414	94.04±0.134
a*	-3.13±0.049	-3.21±0.011	-3.16±0.081	-3.22±0.025	-3.14±0.039
b*	11.20±0.434	11.09±0.502	11.20±0.095	11.46±0.021	11.40±0.216

Çizelge 2. Dondurulmuş pastörize keçi sütlerinin depolama boyunca pH değişimleri  
Table 2. pH changes of frozen goat milks during storage

pH			Depolama Süresi (Ay) / Storage Time (Month)							
A	B	C	0	1	2	3	6	9	12	
1/2 L	15	18	6.65±0.021 <sup>aa*</sup>	6.58±0.078 <sup>aa</sup>	6.61±0.120 <sup>aa</sup>	6.53±0.071 <sup>aa</sup>	6.66±0.007 <sup>aa</sup>	6.62±0.028 <sup>aa</sup>	6.68±0.014 <sup>aa</sup>	
		28	6.65±0.021 <sup>ab</sup>	6.56±0.042 <sup>aacd</sup>	6.61±0.028 <sup>abd</sup>	6.47±0.035 <sup>ac</sup>	6.54±0.007 <sup>acd</sup>	6.67±0.021 <sup>ab</sup>	6.71±0.007 <sup>ab</sup>	
	35	18	6.64±0.028 <sup>aa</sup>	6.51±0.007 <sup>ab</sup>	6.56±0.028 <sup>ab</sup>	6.50±0.071 <sup>ab</sup>	6.57±0.014 <sup>ab</sup>	6.60±0.021 <sup>ab</sup>	6.67±0.021 <sup>aa</sup>	
		28	6.64±0.028 <sup>aa</sup>	6.55±0.021 <sup>aa</sup>	6.61±0.049 <sup>aa</sup>	6.48±0.071 <sup>aa</sup>	6.54±0.057 <sup>aa</sup>	6.64±0.064 <sup>aa</sup>	6.65±0.085 <sup>aa</sup>	
1 L	15	18	6.63±0.028 <sup>aa</sup>	6.53±0.028 <sup>aa</sup>	6.53±0.071 <sup>aa</sup>	6.52±0.092 <sup>aa</sup>	6.56±0.000 <sup>aa</sup>	6.62±0.035 <sup>aa</sup>	6.64±0.035 <sup>aa</sup>	
		28	6.63±0.028 <sup>aa</sup>	6.54±0.007 <sup>ab</sup>	6.51±0.057 <sup>ab</sup>	6.47±0.021 <sup>ab</sup>	6.53±0.021 <sup>ab</sup>	6.58±0.021 <sup>ab</sup>	6.63±0.021 <sup>aa</sup>	
	35	18	6.63±0.035 <sup>aa</sup>	6.50±0.014 <sup>aa</sup>	6.50±0.014 <sup>aa</sup>	6.46±0.042 <sup>aa</sup>	6.55±0.141 <sup>aa</sup>	6.60±0.078 <sup>aa</sup>	6.69±0.007 <sup>aa</sup>	
		28	6.63±0.035 <sup>aa</sup>	6.53±0.014 <sup>abc</sup>	6.47±0.042 <sup>abc</sup>	6.45±0.028 <sup>ac</sup>	6.47±0.071 <sup>ac</sup>	6.51±0.021 <sup>abc</sup>	6.60±0.049 <sup>ab</sup>	

A:ambalaj boyutu; B: dondurma sic. °C; C:depolama sic. °C; \*: küçük harfler dikeyde farklı sıcaklık dereceleri arası farkları, büyük harfler yatayda depolama boyunca değişimi göstermektedir./ A:package size; B:frozen temp. °C; C:storage temp. °C; \*: small letters indicate the difference between temperatures in vertical, capital letters indicate the difference during storage in a horizontal.

Çizelge 3. Dondurulmuş pastörize keçi sütlerinin depolama boyunca titrasyon asitliği değişimleri (% laktik asit)  
Table 3. Titration acidity changes of frozen goat milks during storage(% lactic acid)

			Depolama Süresi (Ay) / Storage Time (Month)							
A	B	C	0	1	2	3	6	9	12	
1/2 L	15	18	0.14±0.000 <sup>aa</sup>	0.16±0.014 <sup>aa</sup>	0.16±0.035 <sup>aa</sup>	0.15±0.028 <sup>aa</sup>	0.14±0.007 <sup>aa</sup>	0.16±0.000 <sup>aa</sup>	0.16±0.014 <sup>aa</sup>	
		28	0.14±0.000 <sup>aa</sup>	0.17±0.021 <sup>aa</sup>	0.16±0.021 <sup>aa</sup>	0.16±0.021 <sup>aa</sup>	0.16±0.007 <sup>aa</sup>	0.17±0.028 <sup>aa</sup>	0.17±0.021 <sup>aa</sup>	
	35	18	0.15±0.021 <sup>aa</sup>	0.15±0.014 <sup>aa</sup>	0.17±0.021 <sup>aa</sup>	0.16±0.028 <sup>aa</sup>	0.15±0.014 <sup>aa</sup>	0.16±0.014 <sup>aa</sup>	0.15±0.000 <sup>aa</sup>	
		28	0.15±0.021 <sup>aa</sup>	0.16±0.021 <sup>aa</sup>	0.17±0.035 <sup>aa</sup>	0.14±0.028 <sup>aa</sup>	0.16±0.014 <sup>aa</sup>	0.16±0.007 <sup>aa</sup>	0.16±0.007 <sup>aa</sup>	
1 L	15	18	0.15±0.021 <sup>aa</sup>	0.17±0.021 <sup>aa</sup>	0.15±0.014 <sup>aa</sup>	0.15±0.014 <sup>aa</sup>	0.15±0.000 <sup>aa</sup>	0.17±0.028 <sup>aa</sup>	0.16±0.028 <sup>aa</sup>	
		28	0.15±0.021 <sup>aa</sup>	0.16±0.021 <sup>aa</sup>	0.16±0.021 <sup>aa</sup>	0.16±0.021 <sup>aa</sup>	0.17±0.007 <sup>aa</sup>	0.17±0.042 <sup>aa</sup>	0.18±0.021 <sup>aa</sup>	
	35	18	0.15±0.014 <sup>aa</sup>	0.16±0.021 <sup>aa</sup>	0.16±0.021 <sup>aa</sup>	0.15±0.028 <sup>aa</sup>	0.16±0.014 <sup>aa</sup>	0.19±0.007 <sup>aa</sup>	0.17±0.028 <sup>aa</sup>	
		28	0.15±0.014 <sup>aa</sup>	0.16±0.028 <sup>aa</sup>	0.15±0.021 <sup>aa</sup>	0.15±0.021 <sup>aa</sup>	0.16±0.028 <sup>aa</sup>	0.17±0.028 <sup>aa</sup>	0.18±0.035 <sup>aa</sup>	

A:ambalaj boyutu; B: dondurma sic. °C; C:depolama sic. °C; \*: küçük harfler dikeyde farklı sıcaklık dereceleri arası farkları, büyük harfler yatayda depolama boyunca değişimi göstermektedir./ A:package size; B:frozen temp. °C; C:storage temp. °C; \*: small letters indicate the difference between temperatures in vertical, capital letters indicate the difference during storage in a horizontal.

uzaklaşırken oluşan laktoz kristalleri viskoziteyi artırmaktadır. Zamanla denge noktasına gelmekte ve bu süreçte viskozite değerlerinde hafif azalma gözlenmektedir. Depolama sıcaklığına bağlı olarak oluşan buz ve laktoz kristalleri büyüdükçe viskozite artmaktadır (26).

### Sedimentasyon Değerlerinde Değişmeler

Pastörize keçi sütü örneklerine ait sedimentasyon (çökme) değerleri Tablo 5'de bir araya getirilmiştir. Analiz edilen örneklerin sedimentasyon değerlerinde depolama boyunca artış belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). Keçi sütlerinin sedimentasyon değerlerine literatürde rastlanmazken, çalışmadan elde edilen değerler dondurulmuş koyun sütü için rapor edilen değerlere benzerlik göstermektedir (12, 17).

Normal şartlar altında sütlerde sedimentasyon değerinin "1 g kuru ağırlık /40 ml süt" değerini geçmemesi gerektiği ifade edilmektedir (12, 17). Depolama boyunca keçi sütlerinde sedimentasyon değerlerinde artış önemli ( $P<0.05$ ) görülse de, bu değerler tortulaşma oluşturacak kadar yüksek değildir. Çalışmada ele alınan depolama süresi boyunca tortulaşma bakımından elde edilen

değerler ürünün fiziksel niteliğini bozacak düzeyin çok altındadır. Çalışmamızda elde edilen bulgular, koyun sütünün dondurulması ile bulunan sonuçlarla (12, 17) benzerlik göstermektedir.

### ADV (Asitlik Derecesi Değeri) ve Oksidasyon Değerlerinde Değişmeler

Süt yağının enzim etkisiyle parçalanması sonucu sütlerde serbest yağ asitleri miktarı artmakta ve sütlerde tat ve aroma kusurlarına neden olmaktadır. Çalışmada depolama süresinin 3. ayına kadar ADV değerlerinde artış bu süreden sonra daha stabil olduğu gözlenmiştir (Tablo 6). Yapılan istatistiksel değerlendirmede, ADV üzerine depolama süresinin  $P<0.05$  düzeyinde etkili olduğu görülmüştür. Genel olarak ADV değerlerinde meydana gelen değişim değerlendirildiğinde, lipaz enzimi aktivitesinin düşük derecelerde de aktif olduğudur. Bu durum Antifantakis ve ark., (17), Wendorf ve Rauschenberger (29) ve Katsiari ve ark (12) tarafından da vurgulanmıştır. Sütün doğal lipazı pastörizasyon esnasında denatüre olsa bile, lipoproteinlipaz ancak HTST şartlarında inaktif olmaktadır (29).

## Pastörize Keçi Sütünün Dondurulması ve Dondurarak Depolanması...

Çizelge 4. Dondurulmuş pastörize keçi sütlerinin depolama boyunca viskozite değerlerindeki değişimler (mPa.s)  
Table 4. Viscosity changes of frozen goat milks during storage (mPa.s)

Depolama Süresi (Ay) / Storage Time (Month)										
A	B	C	0	1	2	3	6	9	12	
1/2 L	15	18	3.17±0.057 <sup>aA</sup>	2.81±0.035 <sup>aA</sup>	2.94±0.198 <sup>aA</sup>	3.00±0.262 <sup>aA</sup>	3.22±0.007 <sup>aA</sup>	3.37±0.198 <sup>aA</sup>	3.55±0.318 <sup>abA</sup>	
		28	3.17±0.057 <sup>aAB</sup>	2.51±0.092 <sup>abC</sup>	2.66±0.028 <sup>aAB</sup>	3.01±0.205 <sup>aABC</sup>	2.87±0.085 <sup>aABC</sup>	3.03±0.099 <sup>aABC</sup>	3.35±0.240 <sup>aA</sup>	
	35	18	3.19±0.156 <sup>aAB</sup>	2.33±0.156 <sup>abA</sup>	2.29±0.049 <sup>aA</sup>	3.07±0.346 <sup>aAB</sup>	3.17±0.445 <sup>aAB</sup>	3.50±0.021 <sup>aB</sup>	3.49±0.141 <sup>abB</sup>	
1 L	15	28	3.19±0.156 <sup>aAB</sup>	2.71±0.134 <sup>abAB</sup>	2.59±0.311 <sup>aA</sup>	3.11±0.361 <sup>aAB</sup>	3.14±0.403 <sup>aAB</sup>	3.68±0.226 <sup>aB</sup>	3.66±0.014 <sup>abB</sup>	
		28	2.87±0.304 <sup>aA</sup>	2.32±0.141 <sup>abA</sup>	2.46±0.085 <sup>aA</sup>	3.13±0.438 <sup>aA</sup>	3.02±0.785 <sup>aA</sup>	3.25±0.573 <sup>aA</sup>	3.59±0.134 <sup>abA</sup>	
	35	18	2.87±0.304 <sup>aAB</sup>	2.16±0.304 <sup>abA</sup>	2.38±0.141 <sup>aAB</sup>	3.16±0.424 <sup>aAB</sup>	3.26±0.417 <sup>aAB</sup>	3.33±0.431 <sup>aAB</sup>	3.54±0.240 <sup>abB</sup>	
		28	3.10±0.424 <sup>aBC</sup>	2.02±0.262 <sup>aA</sup>	2.41±0.354 <sup>aAB</sup>	2.77±0.092 <sup>aABC</sup>	2.77±0.156 <sup>aABC</sup>	3.71±0.120 <sup>cdD</sup>	4.18±0.078 <sup>bd</sup>	
	35	18	3.10±0.424 <sup>aABC</sup>	2.10±0.240 <sup>abA</sup>	2.32±0.290 <sup>aAB</sup>	2.58±0.184 <sup>aAB</sup>	2.63±0.035 <sup>aAB</sup>	3.30±0.339 <sup>aBC</sup>	3.89±0.092 <sup>abC</sup>	
		28								

A:ambalaj boyutu; B: dondurma sic.°C; C:depolama sic. °C; \*: küçük harfler dikeyde farklı sıcaklık dereceleri arası farkları, büyük harfler yatayda depolama boyunca değişimi göstermektedir./ A:package size; B:frozen temp. °C; C:storage temp. °C; \*: small letters indicate the difference between temperatures in vertical, capital letters indicate the difference during storage in a horizontal.

Çizelge 5. Dondurulmuş pastörize keçi sütlerinin depolama boyunca sedimantasyon değerlerindeki değişimler (g kurumadde/40 mL süt)  
Table 5.Changes in sedimentation values of frozen goat milks during storage(gDM/40mL Milk)

Depolama Süresi (Ay) / Storage Time (Month)										
A	B	C	0	1	2	3	6	9	12	
1/2 L	15	18	0.05±0.021 <sup>aA</sup>	0.05±0.014 <sup>aA</sup>	0.05±0.014 <sup>aA</sup>	0.05±0.014 <sup>aA</sup>	0.05±0.014 <sup>aA</sup>	0.06±0.021 <sup>aA</sup>	0.06±0.021 <sup>aA</sup>	0.06±0.014 <sup>aA</sup>
		28	0.05±0.021 <sup>aA</sup>	0.05±0.021 <sup>aA</sup>	0.06±0.021 <sup>aA</sup>	0.06±0.021 <sup>aA</sup>	0.07±0.021 <sup>aA</sup>	0.07±0.021 <sup>aA</sup>	0.06±0.028 <sup>aA</sup>	0.07±0.021 <sup>aA</sup>
	35	18	0.05±0.014 <sup>aA</sup>	0.06±0.000 <sup>aAB</sup>	0.07±0.007 <sup>aAB</sup>	0.07±0.000 <sup>aAB</sup>	0.08±0.007 <sup>aAB</sup>	0.08±0.007 <sup>aAB</sup>	0.08±0.007 <sup>aAB</sup>	0.09±0.007 <sup>aB</sup>
1 L	15	28	0.05±0.014 <sup>aA</sup>	0.06±0.007 <sup>aA</sup>	0.06±0.007 <sup>aA</sup>	0.06±0.000 <sup>aA</sup>	0.06±0.007 <sup>aA</sup>	0.06±0.000 <sup>aA</sup>	0.07±0.007 <sup>aA</sup>	0.07±0.007 <sup>aA</sup>
		28	0.06±0.007 <sup>aA</sup>	0.07±0.014 <sup>aA</sup>	0.08±0.007 <sup>aA</sup>	0.08±0.007 <sup>aA</sup>	0.08±0.007 <sup>aA</sup>	0.08±0.007 <sup>aA</sup>	0.09±0.007 <sup>aA</sup>	0.09±0.007 <sup>aA</sup>
	35	18	0.06±0.007 <sup>aA</sup>	0.07±0.014 <sup>aA</sup>	0.07±0.014 <sup>aA</sup>	0.08±0.014 <sup>aA</sup>	0.08±0.014 <sup>aA</sup>	0.09±0.007 <sup>aA</sup>	0.09±0.007 <sup>aA</sup>	0.10±0.007 <sup>aA</sup>
		28	0.06±0.021 <sup>aA</sup>	0.08±0.014 <sup>aA</sup>	0.08±0.014 <sup>aA</sup>	0.09±0.014 <sup>aA</sup>	0.09±0.014 <sup>aA</sup>	0.09±0.007 <sup>aA</sup>	0.09±0.000 <sup>aA</sup>	0.09±0.014 <sup>aA</sup>
	35	18	0.06±0.021 <sup>aA</sup>	0.07±0.014 <sup>aA</sup>	0.07±0.014 <sup>aA</sup>	0.08±0.014 <sup>aA</sup>	0.08±0.014 <sup>aA</sup>	0.08±0.014 <sup>aA</sup>	0.09±0.007 <sup>aA</sup>	0.09±0.007 <sup>aA</sup>
		28								

A:ambalaj boyutu; B: dondurma sic.°C; C:depolama sic. °C; \*: küçük harfler dikeyde farklı sıcaklık dereceleri arası farkları, büyük harfler yatayda depolama boyunca değişimi göstermektedir./ A:package size; B:frozen temp. °C; C:storage temp. °C; \*: small letters indicate the difference between temperatures in vertical, capital letters indicate the difference during storage in a horizontal.

ADV değerindeki artış tüm örnekler dikkate alındığında minimum 0.03 ve maksimum 0.09 peroksit s.meqO<sub>2</sub>/kg yağ şeklinde gerçekleşmiştir (Tablo 7). Ayrıca yarım litrelik ambalajlarda oksidasyonun daha düşük olduğu görülmüştür ve tüm örneklerde depolama boyunca artış belirlenmiştir. Nitekim yapılan istatistiksel değerlendirmede keçi sütlerinin peroksit değerleri üzerine dondurma sıcaklığı ve depolama süresinin

etkisi önemli (P<0.05) bulunmuştur. Çalışmadan elde edilen benzer bulgular, Antifantakis ve ark (17) tarafından koyun sütlerinde tespit edilmiş ve bunun dondurma hızından kaynaklanabileceği vurgulanmıştır.

### Mikrobiyolojik Özelliklerde Değişmeler

Keçi sütü örneklerinin uygulanan işlemler sonucu toplam mezofilik aerobik bakteri ve koliform

Çizelge 6. Dondurulmuş pastörize keçi sütlerinin depolama boyunca ADV değerlerindeki değişimler (meq KOH/100 g yağ)  
Table 6. Changes in ADV values of frozen goat milks during storage (meq KOH/100 g fat)

Depolama Süresi (Ay) / Storage Time (Month)										
A	B	C	0	1	2	3	6	9	12	
1/2 L	15	18	0.44±0.091 <sup>aA</sup>	0.52±0.148 <sup>aAB</sup>	0.78±0.042 <sup>aABC</sup>	0.84±0.064 <sup>aBC</sup>	0.93±0.049 <sup>aBC</sup>	0.95±0.049 <sup>aC</sup>	0.95±0.035 <sup>aC</sup>	
		28	0.14±0.091 <sup>aA</sup>	0.50±0.049 <sup>aA</sup>	0.75±0.297 <sup>aA</sup>	0.71±0.071 <sup>aA</sup>	0.70±0.071 <sup>aA</sup>	0.75±0.021 <sup>aA</sup>	0.82±0.007 <sup>aA</sup>	
	35	18	0.35±0.035 <sup>aA</sup>	0.34±0.028 <sup>aA</sup>	0.65±0.191 <sup>aAB</sup>	0.86±0.085 <sup>aB</sup>	0.86±0.014 <sup>abB</sup>	0.89±0.021 <sup>abB</sup>	0.96±0.007 <sup>aB</sup>	
1 L	15	28	0.35±0.035 <sup>aA</sup>	0.30±0.007 <sup>aA</sup>	0.82±0.064 <sup>aB</sup>	0.85±0.184 <sup>aB</sup>	0.82±0.085 <sup>abB</sup>	0.90±0.035 <sup>abB</sup>	0.95±0.014 <sup>abB</sup>	
		28	0.46±0.170 <sup>aA</sup>	0.56±0.156 <sup>aB</sup>	0.81±0.085 <sup>aABC</sup>	0.95±0.057 <sup>aBC</sup>	0.97±0.071 <sup>bcC</sup>	0.97±0.021 <sup>aC</sup>	1.02±0.007 <sup>aC</sup>	
	35	18	0.46±0.170 <sup>aA</sup>	0.47±0.127 <sup>aA</sup>	0.68±0.262 <sup>aA</sup>	0.90±0.106 <sup>aA</sup>	0.91±0.120 <sup>abA</sup>	0.94±0.042 <sup>aA</sup>	0.99±0.007 <sup>aA</sup>	
		28	0.50±0.078 <sup>aAB</sup>	0.36±0.049 <sup>aA</sup>	0.81±0.198 <sup>aBC</sup>	0.92±0.042 <sup>aC</sup>	0.86±0.014 <sup>abC</sup>	0.88±0.042 <sup>abC</sup>	0.94±0.007 <sup>aC</sup>	
	35	18	0.50±0.078 <sup>aA</sup>	0.40±0.099 <sup>aA</sup>	0.89±0.071 <sup>aB</sup>	0.83±0.021 <sup>aB</sup>	0.84±0.014 <sup>abB</sup>	0.91±0.057 <sup>abB</sup>	0.96±0.042 <sup>aB</sup>	
		28								

A:ambalaj boyutu; B: dondurma sic.°C; C:depolama sic. °C; \*: küçük harfler dikeyde farklı sıcaklık dereceleri arası farkları, büyük harfler yatayda depolama boyunca değişimi göstermektedir./ A:package size; B:frozen temp. °C; C:storage temp. °C; \*: small letters indicate the difference between temperatures in vertical, capital letters indicate the difference during storage in a horizontal.

Çizelge 7. Dondurulmuş pastörize keçi sütlerinin depolama boyunca oksidasyon değerlerindeki değişimler Peroksit değeri (meqO<sub>2</sub>/kg yağ)  
Table 7. Changes in peroxide values of frozen goat milks during storage (meqO<sub>2</sub>/kg fat)

Depolama Süresi (Ay) / Storage Time (Month)										
A	B	C	0	1	2	3	6	9	12	
1/2 L	15	18	0.04±0.000 <sup>abA</sup>	0.04±0.000 <sup>abA</sup>	0.05±0.000 <sup>abA</sup>	0.06±0.000 <sup>abA</sup>	0.08±0.000 <sup>abCA</sup>	0.09±0.000 <sup>abA</sup>	0.13±0.007 <sup>abA</sup>	
		28	0.04±0.000 <sup>abA</sup>	0.04±0.000 <sup>abAB</sup>	0.05±0.000 <sup>abAB</sup>	0.06±0.000 <sup>abBC</sup>	0.08±0.000 <sup>abCCD</sup>	0.10±0.000 <sup>abDE</sup>	0.13±0.007 <sup>abE</sup>	
	35	18	0.03±0.007 <sup>abA</sup>	0.04±0.007 <sup>abA</sup>	0.05±0.007 <sup>abAB</sup>	0.06±0.007 <sup>abABC</sup>	0.07±0.000 <sup>abBCD</sup>	0.09±0.000 <sup>abCD</sup>	0.11±0.007 <sup>abD</sup>	
		28	0.03±0.007 <sup>abA</sup>	0.04±0.007 <sup>abA</sup>	0.05±0.007 <sup>abAB</sup>	0.06±0.007 <sup>abAB</sup>	0.08±0.007 <sup>abBC</sup>	0.09±0.014 <sup>abCD</sup>	0.11±0.014 <sup>abD</sup>	
1 L	15	18	0.06±0.007 <sup>bcA</sup>	0.06±0.007 <sup>abA</sup>	0.07±0.007 <sup>abAB</sup>	0.08±0.007 <sup>abAB</sup>	0.09±0.007 <sup>abBC</sup>	0.11±0.007 <sup>abCD</sup>	0.12±0.007 <sup>abD</sup>	
		28	0.06±0.007 <sup>bcA</sup>	0.06±0.007 <sup>abA</sup>	0.07±0.007 <sup>abA</sup>	0.08±0.007 <sup>abAB</sup>	0.10±0.007 <sup>abBC</sup>	0.12±0.007 <sup>abCD</sup>	0.13±0.007 <sup>abD</sup>	
	35	18	0.07±0.007 <sup>caA</sup>	0.07±0.007 <sup>abA</sup>	0.08±0.007 <sup>abAB</sup>	0.09±0.007 <sup>abBC</sup>	0.10±0.014 <sup>abBCD</sup>	0.12±0.007 <sup>abCD</sup>	0.13±0.007 <sup>abD</sup>	
		28	0.07±0.007 <sup>caA</sup>	0.07±0.007 <sup>abA</sup>	0.08±0.007 <sup>abA</sup>	0.09±0.007 <sup>abAB</sup>	0.11±0.007 <sup>abBC</sup>	0.12±0.000 <sup>abCD</sup>	0.14±0.007 <sup>abD</sup>	

A:ambalaj boyutu; B: dondurma sic. °C; C:depolama sic. °C; \*: küçük harfler dikeyde farklı sıcaklık dereceleri arası farkları, büyük harfler yatayda depolama boyunca değişimi göstermektedir./ A:package size; B:frozen temp. °C; C:storage temp. °C; \*: small letters indicate the

Çizelge 8. Dondurulmuş pastörize keçi sütlerinin depolama boyunca toplam bakteri sayılarındaki değişimler (log kob/mL)  
Table 8. Changes in total bacteria counts of frozen goat milks during storage (log cfu/mL)

Depolama Süresi (Ay) / Storage Time (Month)										
A	B	C	0	1	2	3	6	9	12	
1/2 L	15	18	5.22±0.481 <sup>abA</sup>	4.99±0.361 <sup>abA</sup>	4.82±0.290 <sup>abA</sup>	4.73±0.170 <sup>abA</sup>	4.71±0.163 <sup>abA</sup>	4.28±0.240 <sup>abA</sup>	4.23±0.325 <sup>abA</sup>	
		28	5.22±0.481 <sup>abA</sup>	5.00±0.495 <sup>abA</sup>	4.86±0.488 <sup>abA</sup>	4.62±0.184 <sup>abA</sup>	4.58±0.240 <sup>abA</sup>	4.49±0.318 <sup>abA</sup>	4.51±0.233 <sup>abA</sup>	
	35	18	5.55±0.078 <sup>abA</sup>	4.86±0.566 <sup>abA</sup>	4.78±0.608 <sup>abA</sup>	4.60±0.424 <sup>abA</sup>	4.21±0.559 <sup>abA</sup>	4.21±0.502 <sup>abA</sup>	4.15±0.523 <sup>abA</sup>	
		28	5.55±0.078 <sup>abA</sup>	4.96±0.311 <sup>abA</sup>	4.92±0.332 <sup>abA</sup>	4.81±0.375 <sup>abA</sup>	4.69±0.325 <sup>abA</sup>	4.52±0.269 <sup>abA</sup>	4.41±0.212 <sup>abA</sup>	
1 L	15	18	5.36±0.495 <sup>abA</sup>	5.08±0.368 <sup>abA</sup>	5.03±0.396 <sup>abA</sup>	4.60±0.099 <sup>abA</sup>	4.61±0.092 <sup>abA</sup>	4.27±0.000 <sup>abA</sup>	4.27±0.035 <sup>abA</sup>	
		28	5.36±0.495 <sup>abA</sup>	4.92±0.438 <sup>abA</sup>	4.89±0.738 <sup>abA</sup>	4.83±0.431 <sup>abA</sup>	4.77±0.813 <sup>abA</sup>	4.69±0.799 <sup>abA</sup>	4.56±0.686 <sup>abA</sup>	
	35	18	4.63±0.219 <sup>abA</sup>	4.83±0.785 <sup>abA</sup>	4.77±0.806 <sup>abA</sup>	4.75±0.771 <sup>abA</sup>	4.56±0.725 <sup>abA</sup>	4.28±0.785 <sup>abA</sup>	4.09±0.431 <sup>abA</sup>	
		28	4.63±0.219 <sup>abA</sup>	4.90±0.679 <sup>abA</sup>	4.88±0.679 <sup>abA</sup>	4.82±0.658 <sup>abA</sup>	4.53±0.608 <sup>abA</sup>	4.19±0.219 <sup>abA</sup>	4.19±0.219 <sup>abA</sup>	

A:ambalaj boyutu; B: dondurma sic. °C; C:depolama sic. °C; \*: küçük harfler dikeyde farklı sıcaklık dereceleri arası farkları, büyük harfler yatayda depolama boyunca değişimi göstermektedir./ A:package size; B:frozen temp. °C; C:storage temp. °C; \*: small letters indicate the difference between temperatures in vertical, capital letters indicate the difference during storage in a horizontal.

bakteri sayıları Tablo 8 ve Tablo 9'da bir araya getirilmiştir. Keçi sütü örneklerinde ambalaj ve sıcaklık parametrelerinin mikrobiyel yük üzerine önemli bir etkisi görülmemekle beraber depolama boyunca mikroorganizma sayılarında azalmalar gözlenmiştir. Bu azalmalar toplam mezofilik aerobik bakteri sayısında önemli görülmezken

( $P>0.05$ ) koliform bakteri sayısını etkilediği belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). Benzer sonuçlar Antifantakis ve ark (17) ile Katsiari ve ark (12) tarafından da rapor edilmiştir.

Dondurma işleminin hızı, depolama sıcaklığı ve süresi mikroorganizma sayılarını etkilemektedir. Hızlı dondurma işlemi ile oluşan buz kristallerinin

Çizelge 9. Dondurulmuş pastörize keçi sütlerinin depolama boyunca koliform bakteri sayılarındaki değişimler (log kob/mL)  
Table 9. Changes in coliform bacteria counts of frozen goat milks during storage (log cfu/mL)

Depolama Süresi (Ay) / Storage Time (Month)										
A	B	C	0	1	2	3	6	9	12	
1/2 L	15	18	3.72±0.438 <sup>abA</sup>	3.02±0.247 <sup>abAB</sup>	2.82±0.000 <sup>abAB</sup>	2.80±0.014 <sup>abAB</sup>	1.96±1.018 <sup>abAB</sup>	1.89±0.919 <sup>abAB</sup>	1.35±0.276 <sup>abAB</sup>	
		28	3.72±0.438 <sup>abA</sup>	3.18±0.021 <sup>abAB</sup>	3.02±0.064 <sup>abAB</sup>	2.99±0.042 <sup>abAB</sup>	3.00±0.219 <sup>abAB</sup>	2.54±0.057 <sup>abAB</sup>	2.33±0.304 <sup>abB</sup>	
	35	18	3.19±0.827 <sup>abA</sup>	2.74±0.834 <sup>abA</sup>	2.48±0.488 <sup>abA</sup>	2.79±0.014 <sup>abA</sup>	1.84±0.841 <sup>abA</sup>	1.45±0.007 <sup>abA</sup>	1.24±0.339 <sup>abA</sup>	
		28	3.19±0.827 <sup>abA</sup>	2.93±0.078 <sup>abA</sup>	2.90±0.071 <sup>abA</sup>	2.81±0.064 <sup>abA</sup>	3.04±0.375 <sup>abA</sup>	2.53±0.311 <sup>abA</sup>	2.38±0.092 <sup>abA</sup>	
1 L	15	18	2.87±0.544 <sup>abA</sup>	2.88±0.156 <sup>abA</sup>	2.68±0.014 <sup>abA</sup>	2.68±0.007 <sup>abA</sup>	2.51±0.445 <sup>abA</sup>	2.57±0.318 <sup>abA</sup>	2.60±0.134 <sup>abA</sup>	
		28	2.87±0.544 <sup>abA</sup>	3.19±0.071 <sup>abA</sup>	2.94±0.007 <sup>abA</sup>	2.85±0.057 <sup>abA</sup>	2.74±0.417 <sup>abA</sup>	2.62±0.382 <sup>abA</sup>	2.51±0.247 <sup>abA</sup>	
	35	18	3.25±0.233 <sup>abA</sup>	2.74±0.361 <sup>abAB</sup>	2.61±0.297 <sup>abAB</sup>	2.58±0.283 <sup>abAB</sup>	2.41±0.255 <sup>abAB</sup>	2.23±0.226 <sup>abA</sup>	2.16±0.198 <sup>abCB</sup>	
		28	3.25±0.233 <sup>abA</sup>	2.67±0.396 <sup>abA</sup>	2.68±0.460 <sup>abA</sup>	2.58±0.339 <sup>abA</sup>	2.69±0.396 <sup>abA</sup>	2.49±0.163 <sup>abA</sup>	2.46±0.120 <sup>abA</sup>	

A:ambalaj boyutu; B: dondurma sic. °C; C:depolama sic. °C; \*: küçük harfler dikeyde farklı sıcaklık dereceleri arası farkları, büyük harfler yatayda depolama boyunca değişimi göstermektedir./ A:package size; B:frozen temp. °C; C:storage temp. °C; \*: small letters indicate the difference between temperatures in vertical, capital letters indicate the difference during storage in a horizontal.



Çizelge 10. Dondurulmuş pastörize keçi sütlerinin depolama boyunca renk L (açıklık/ koyuluk) değerlerindeki değişimler  
Tablo 10. Changes in L values (lightness/darkness) of frozen goat milks during storage

		Depolama Süresi (Ay) / Storage Time (Month)									
A	B	C	0	1	2	3	6	9	12		
1/2 L	15	18	93.76±0.276 <sup>ab</sup>	93.73±0.014 <sup>ab</sup>	93.61±0.226 <sup>ab</sup>	93.59±0.042 <sup>ab</sup>	93.62±0.049 <sup>ab</sup>	93.53±0.297 <sup>ab</sup>	90.20±0.078 <sup>ab</sup>		
		28	93.76±0.276 <sup>ab</sup>	93.79±0.191 <sup>ab</sup>	93.71±0.587 <sup>ab</sup>	93.35±0.262 <sup>ab</sup>	93.81±0.085 <sup>ab</sup>	94.03±0.191 <sup>ab</sup>	89.69±0.014 <sup>ab</sup>		
	35	18	93.85±0.410 <sup>ab</sup>	93.80±0.219 <sup>ab</sup>	93.52±0.346 <sup>ab</sup>	93.15±0.636 <sup>ab</sup>	93.49±0.389 <sup>ab</sup>	93.97±0.156 <sup>ab</sup>	90.29±0.467 <sup>ab</sup>		
1 L	15	28	93.85±0.410 <sup>ab</sup>	93.67±0.233 <sup>ab</sup>	93.90±0.332 <sup>ab</sup>	93.55±0.141 <sup>ab</sup>	93.52±0.000 <sup>ab</sup>	94.07±0.354 <sup>ab</sup>	90.14±0.827 <sup>ab</sup>		
		28	94.06±0.078 <sup>ab</sup>	94.05±0.163 <sup>ab</sup>	93.42±0.311 <sup>ab</sup>	93.75±0.035 <sup>ab</sup>	93.76±0.028 <sup>ab</sup>	94.00±0.106 <sup>ab</sup>	90.22±0.233 <sup>ab</sup>		
	35	18	94.04±0.134 <sup>ab</sup>	93.97±0.240 <sup>ab</sup>	93.79±0.127 <sup>ab</sup>	93.48±0.346 <sup>ab</sup>	93.45±0.156 <sup>ab</sup>	93.84±0.884 <sup>ab</sup>	90.37±0.693 <sup>ab</sup>		
		28	94.04±0.134 <sup>ab</sup>	93.96±0.375 <sup>ab</sup>	93.80±0.198 <sup>ab</sup>	93.68±0.007 <sup>ab</sup>	93.72±0.064 <sup>ab</sup>	94.23±0.219 <sup>ab</sup>	90.71±0.693 <sup>ab</sup>		

A:ambalaj boyutu; B: dondurma sic. °C; C:depolama sic. °C; \*: küçük harfler dikeyde farklı sıcaklık dereceleri arası farkları, büyük harfler yatayda depolama boyunca değişimi göstermektedir./ A:package size; B:frozen temp. °C; C:storage temp. °C; \*: small letters indicate the difference between temperatures in vertical, capital letters indicate the difference during storage in a horizontal.

küçük olması mikroorganizmalar üzerinde daha az öldürücü etki yaparken, yavaş dondurma ile daha büyük buz kristalleri oluşmakta ve böylece letal etki artmaktadır. Bununla beraber dondurma sıcaklığının yüksek olduğu durumda yavaş donma, düşük sıcaklıklarda ise hızlı donma olayı meydana gelmektedir. Ayrıca dondurma işlemi sonrası depolama boyunca mikrobiyel yük takip edildiğinde ölen mikroorganizma sayısı başlangıçta yüksek olduğu zaman ilerledikçe azaldığı ve hatta sabit hale geldiği görülmektedir (29).

### Depolama Boyunca Renk ve Duyusal Özelliklerinde Değişmeler

Keçi sütünün rengi içerdiği A vitamininden dolayı daha beyazdır ve L değerleri ortalama 94 civarında bulunmuştur. L değeri incelenen keçi sütü örneklerinde depolamanın sonuna doğru düşüş eğilimi göstermiştir ( $P<0.05$ ) (Tablo 10). Bu azalma depolama süresinin etkisi ile yağ emülsiyonundaki dağılmalar ve protein yapısında meydana gelen değişimlerden kaynaklanabilir (14, 31). Keçi sütlerinin tadı dondurma ve dondurarak depolama

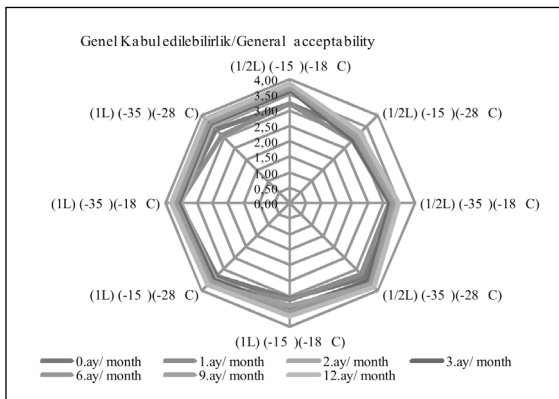
işleminden etkilenmemiştir. Koku değerlerinde de dondurarak saklamanın olumsuz bir etkisine rastlanmamıştır. Benzer şekilde renk ve görünüş puanları olumlu bulunmuştur. Duyusal değerlendirmeler neticesinde elde edilen yapı puanlarına bakıldığında; -15 °C dondurulan sütler, -35 °C'de dondurulanlara kıyasla daha düşük değerler almıştır ( $P<0.05$ ). Yarım litrelik ambalajlarda dondurularak saklanan sütler yapı bakımından daha yüksek ( $P<0.05$ ) puanlar almıştır.

### SONUÇ

Sonuç olarak, keçi sütünün pastörize edildikten sonra dondurulması ve donmuş halde saklanması keçi sütünde, kısa süreli depolamada, önemli değişimler meydana getirmemiştir. Yapılan analizler keçi sütünün pastörize edildikten sonra rahatlıkla dondurulabileceğini ve 9 aya kadar donmuş halde saklanabileceğini ortaya koymuştur. Pastörize keçi sütünün dondurulması ve dondurarak saklanması ile sütün mikrobiyolojik yükünde azalmalara yol açması gıda güvenliği bakımından önemli bir sonuç olarak algılanmıştır. Elde edilen sonuçlar, keçi sütünün pastörize edilerek dondurulmasını ve donmuş halde saklanarak piyasaya sunulmasını mümkün kılmaktadır. Proje çıktıları, pastörize keçi sütünü dondurarak saklamak suretiyle, kalitesinde hissedilir bir değişim olmadan raf ömrünün uzatılabileceğini de göstermiştir.

### TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın; T.C. Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı Sanayi Araştırma ve Geliştirme Genel Müdürlüğü ile Bolu Kalite Yem Sanayi A.Ş. (BOLU) firması tarafından SAN-TEZ Sanayi Tezleri Programı (Proje no: 00348.STZ.2009-1) kapsamında desteklenmesi ve ayrıca Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığınca ödüle layık görülmesi dolayısıyla teşekkür ederiz.



Şekil 1. Dondurulmuş pastörize keçi sütlerinin depolama boyunca duyusal genel kabul edilebilirlik özelliklerindeki değişimler

Figure 1. Changes in sensory general acceptability of frozen goat milks during storage

## KAYNAKLAR

1. Businco L, Bellantij C. 1993. Food Allergy in Childhood, Hypersensitivity to Cow's Milk Allergens, *Clin Exp Allergy*, 23:481-483.
2. Park YW. 1994. Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. *Small Ruminant Res.*,14:151-159.
3. Haenlein GWF. 2004. Goatmilk in human nutrition. *Small Ruminant Res.* 51:155-163.
4. Kaiser C. 1990. Studies on the preparation of pure cow's milk proteins for immunologic differential diagnosis nutritive allergies. *Dissertation, Inst, Physiol, Und Biochem, Nutr, Bundesanstalt fuer Milchforschung*, Universitaet Kiel, Kiel, Germany, 153p.
5. Guo MR, Dixon PH, Park YW, Gilmore JA, Kindstedt PS. 2001. Seasonal Changes in the Chemical Composition of Commingled Goat Milk. *J Dairy Sci.* 84(E, Suppl):79-83.
6. Babcock CJ, Roerig RN, Stabile JN, Dunlap WA, Randall R, 1947a. Frozen Homogenized Milk, II, Effect of Freezing and Storage Temperatures on the Chemical and Bacteriological Properties of Homogenized Milk. *J Dairy Sci.*30(1):49-54.
7. Babcock CJ, Stabile JN, Randall, R, Windham ES. 1947b. Frozen Homogenized Milk, III, Stability of Milk Solids Distribution in Frozen Homogenized Milk *J Dairy Sci*Vol, 30 (9): 733-736.
8. Babcock CJ, Stabile JN, Windham E, Evans LB, Randall R. 1948a. Frozen Homogenized Milk, IV, Keeping Quality of Frozen Homogenized Milk after Thawing. *J Dairy Sci.* 31: 805-810.
9. Babcock CJ, Stabile JN, Windham E, Evans LB, Randall R. 1948b. Frozen Homogenized Milk, V, Effect of Age Before Freezing on the Keeping Quality of Frozen Homogenized Milk. *J Dairy Sci.* 31(9): 811-815.
10. Babcock CJ, Windham E, Randall R. 1950. Homogenized Milk VII, Effect of Agitation during Freezing on the Keeping Quality of Frozen Homogenized Milk. *J Dairy Sci.* 32 (9): 812-816.
11. Weese SJ, Thayne WY, Butcher DF. 1973. Effect of Freezing Rare and Thawing Rate on Milk Properties. *J Dairy Sci.* 56 (2):168-170.
12. Katsiari MS, Voutsinas LP, Kondyli E. 2002. Manufacture of yoghurt from stored frozen sheep's milk. *Food Chemistry.* 77(4):413-420.
13. Samuelson, EG, Thomas KE, Borgstrom G, Hjalmdahl, M. 1957. The manufacture and storage of frozen milk and cream, *J Dairy Sci.* 19:875.
14. Winder WC. 1962. Physical-Chemical Stability of Frozen Whole and Concentrated Milks. *J Dairy Sci.* 45 (8): 1024-1027.
15. Kurt A, Çakmakçı S, Çağlar A. 1996. Süt ve Mamülleri Muayene ve Analiz Metotları Rehberi, *A.Ü. Ziraat Fak. Yay.* No:18, Erzurum, 238s.
16. Miller GL. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 1959. 31(3):426-428.
17. Antifantakis E, Kehagias C, Kotouza I, Kalatzopoulos G. 1980. Frozen stability of sheeps milk under various conditions. *Milchwissenschaft.* 35:80-82
18. Case RA, Bradley RL, Williams RR. 1985. Chemical and Physical Methods, Standard Methods for the Examination of Dairy Products. *In: G,H, Richardson (Editor) APHA*, Washington, D.C. 327-329.
19. Messer JW, Behney HM, Leudecke LO. 1985. Microbiological count methods, Standard Methods For The Examination of Dairy Products. (Editor: *GH Richardson*), 15th ed, *American Public Health Association*. Washington D.C. p, 133-141.
20. Metin M, 1977, Süt ve Mamüllerinde Kalite Kontrolü. *Ankara Ticaret Borsası Yayınları No:1*, Ankara.
21. Devore J, Peck R. 1993. Statistics-the exploration and analysis of data. *Duxpury Press, an Imprint of Wadsworth Publishing Company*, Belmont, California.
22. Zhang RH, Mustafa AF, Ng-Kwai-Hang KF, Zhao X. 2006. Effects of freezing on composition and fatty acid profiles of sheep milk and cheese. *Small Ruminant Res*, 64(3), 203-210.
23. Doan FJ, Warren FG. 1947. Observations on the Instability of the Protein Phase of Frozen Concentrated Milk. *J Dairy Sci.* 30 (11):837-848.
24. Webb BH, Hall SA. 1935. Some Physical Effects of Freezing upon Milk and Cream. *J Dairy Sci.* 18: 275.
25. Bell RW, Mucha TJ. 1951. Means of preventing an oxidized flavor in milk. *J Dairy Sci.*34: 432-437.
26. Bell RW. 1939. Effects of the Cold Storage Temperature, Heat Treatment, and Homogenization Pressure on the Properties of Frozen Condensed Milk. *J Dairy Sci.* 22(2): 89-100.
27. Van Den Berg, L. 1961. Changes in pH of Milk During Freezing and Frozen Storage, *J Dairy Sci*, 44 (1):26-31.
28. Wendorff WL, Rauschenberger SL. 2001. Effect of Freezing on Milk Quality, *Proceedings of the 7th great lakes Dairy sheep symposium* November 1-3, 2001 EAU Claire Wisconsin.
29. Ünlütürk A, Turantaş F. 1999. Gıda Mikrobiyolojisi. Mengi Tan Basımevi. İzmir, Türkiye 598s.
30. Winder WC. 1962. Physical-Chemical Stability of Frozen Whole and Concentrated Milks, *J Dairy Sci*, 45 (8): 1024-1027.
31. Doan FJ, Baldwin FB. 1936. Observations on the Freezing of Milk and Cream, II, The Destruction of the Fat Emulsion in Frozen Cream. *J Dairy Sci*, 19: 225.

## GIDA GÜVENLİĞİ VE KALİTE KONTROLÜNDE BİYOSENSÖRLER

Deniz Baş<sup>1\*</sup>, Ebru Deniz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Çankırı Karatekin Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Nanobiyoanaliz ve  
Gıda Güvenliği Araştırma Grubu, Çankırı

<sup>2</sup>Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Ankara

Geliş tarihi / *Received*: 08.09.2014

Düzeltilerek Geliş tarihi / *Received in revised form*: 20.10.2014

Kabul tarihi / *Accepted*: 28.12.2014

### Özet

Güvenli gıda modern toplum için vazgeçilemez bir gerekliliktir. Dünya genelinde otoriteler gıda güvenliğinin sağlanması için kısıtlamalar getirmekte ve yeni düzenlemeler yapmaktadırlar. Söz konusu kısıtlamalar ve düzenlemelere ek olarak, artan toplumsal kaygılar nedeniyle sürecin sürekli takip edilmesi ve üretici ve tüketicinin korunması amacıyla hızlı ve doğru bir şekilde sonuç alınması gerekmektedir. Bu nedenlerden dolayı, yenilikçi hızlı analiz yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Hızlı analiz yöntemleri içerisinde ileri teknolojilere dayalı disiplinler arası çalışmaların sonucunda ortaya çıkan biyosensörler önemli bir role sahiptir. Bu derleme kapsamında, gıda güvenliği ve kalite kontrolü amacıyla kullanılan biyosensör uygulamalarına yer verilmekte, biyosensörlerin sahip oldukları avantajlar ve dezavantajlar ortaya konularak söz konusu sistemlerin geleceği incelenmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Biyosensörler, gıda güvenliği, kalite kontrol

## BIOSENSORS FOR FOOD SAFETY AND QUALITY CONTROL

### Abstract

Safe food is the indispensable necessity of modern society. All over the world, authorities impose restrictions and make new legal arrangements for making sure that food sold to customers is safe. Due to the extensive public concerns and legal restrictions, it is essential to continuously track the food manufacture and processing, and to get fast and reliable results in order to protect both the consumer and the manufacturer. For these reasons, rapid test methods are considered as a requirement. Among the rapid test methods, biosensors, developed by interdisciplinary studies that rely on advanced technologies, play an important role. Within the context of this review paper, biosensor applications for food safety and food quality are explored; the advantages and disadvantages of biosensors and their future are discussed.

**Keywords:** Biosensors, food safety, quality control

\*Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ denizbas@gmail.com, ☎ +90 (376) 218 9535 – 8354,

☎ +90 (376) 218 9536

## GİRİŞ

Güvenli gıda, besin öğeleri bakımından değerini kaybetmemiş aynı zamanda fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik yasal düzenlemelere uygun, nitelikli ve tüketildiğinde tüketiciye zarar vermeyen gıdadır. Bu noktada, kimyasal ve mikrobiyolojik açıdan güvenilir olma durumu son yıllarda daha fazla önem kazanmış ve gıda güvenliği konusunda tespit, değerlendirme ve analiz yöntemlerini ilgi çekici hale getirmiştir.

Gıda güvenliği, tarladan sofraya kadar alınan tutarlı önlemleri ve yeterli izlemeyi gerektiren bir süreçtir. Bu süreç hammadde temini, gıdanın işlenmesi, nihai ürün elde edilmesi, depolama gibi basamaklardan oluşmaktadır. Bu sürecin her bir basamağında gıda güvenliğini ve kalitesini belirleyen parametrelerin belirlenmesi için birçok analizin yapılmasına, yatırım ve işletme maliyeti oldukça yüksek laboratuarlara dolayısıyla da bu analizleri gerçekleştirecek deneyimli personele ihtiyaç duyulmaktadır. Bunlara ek olarak, kısa sürede düşük maliyetli ve güvenilir sonuçların elde edilmesi bir zorunluluk haline gelmeye başlamıştır. Son yıllarda, gıda güvenliği ve kalitesi ile ilgili yasal düzenlemelerin getirdiği kısıtlamalar ve artan güncel kaygılar bu alanda yenilikçi ve ileri teknolojilere dayalı disiplinler arası çalışmaların sonucunda ortaya çıkan başta biyosensörler olmak üzere hızlı analiz yöntemlerinin popüler olmasına olanak tanımaktadır.

Biyosensör sistemlerinin üretim yöntemlerini, çeşitlerini ve avantajlarını ortaya koyan araştırmalar ve değerlendirmeler, bilimsel literatürde oldukça fazla olmasına rağmen gıda güvenliği ve kalite kontrolü açısından biyosensör uygulamalarının incelendiği ve avantajlarının yanı sıra dezavantajlarının da incelendiği çalışmalara pek rastlanmamaktadır. Bu çalışma kapsamında, gıda güvenliği ve kalite kontrolü açısından biyosensör uygulamalarının incelenmesi, avantaj ve dezavantajlarının tartışılması hedeflenmiştir. Bunlara ek olarak, gıda analizlerinde konvansiyonel yöntemlerin ne kadar önemli olduğu göz ardı edilmeden, biyosensörlerin geleceği ve gıda bilimi ve teknolojisi uzmanlarının bu alana sağlayacağı katkıların önemi vurgulanmaya çalışılmıştır.

## BİYOSENSÖRLER

Gıda analizleri; konvansiyonel olarak kromatografik ve spektroskopik yöntemleri kapsayan enstrümental

analizleri ve mikrobiyolojik analizlerde kullanılan kültürel sayım yöntemlerini içermektedir. Bu yöntemler, güvenilir ve oldukça hassas olmalarına rağmen yüksek yatırım ve işletme maliyetine sahip olmakla birlikte, belirli bir uzmanlık gerektiren, zaman alıcı yöntemlerdir (1). Gelişmiş araştırma ve kalite kontrol laboratuvarları yüksek maliyetli yatırımların yapılması ile yukarıda sayılan imkânlarla erişimde sıkıntı yaşamazken, endüstriyel uygulamalar söz konusu olduğunda cihaz ve uzman için yatırım yapılması her zaman mümkün olmamaktadır. Diğer bir deyişle, endüstride kullanılacak analiz yöntemlerinin kişisel beceri gerektirmeyen ve taşınabilir cihazlarla kısa sürede yapılabilmesi istenmektedir. Aynı zamanda, küçük ve orta ölçekli işletmeler göz önünde bulundurulduğunda analiz yatırım ve işletme maliyetleri oldukça önemli bir parametre olarak karşımıza çıkmaktadır. İşletmelerin bu özel durumları ve günümüz koşulları; hızlı, güvenilir, erişilebilir, düşük maliyetli, uzmanlık gerektirmeyen analiz yöntemlerinin kullanılmasını zorunlu kılmaktadır (1-3). Bu nedenle, konvansiyonel analiz yöntemlerinin tamamlayıcısı ve bazen de alternatifi olacak hızlı ve yenilikçi analiz yöntemlerinin geliştirilmesi/ iyileştirilmesi bir zorunluluk haline gelmiştir.

Söz konusu hızlı ve yenilikçi analiz yöntemleri, nükleik asit ve protein tabanlı yöntemler olarak iki ana başlık altında incelenebilmektedir. Nükleik asit tabanlı yöntemler; polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) ve izotermal amplifikasyon (Loop Mediated Isothermal Amplification, LAMP) stratejilerine dayanmaktadır. Protein tabanlı yöntemler ise ELISA (Enzyme Linked Immunoassay) ve ELISA yönteminin bir türevi olan yanıl akış (Lateral Flow) sistemlerini kapsamaktadır. Yukarıda sözü edilen yöntemler kullanılarak geliştirilmiş olan biyosensör ve biyoanaliz sistemleri, minyatür laboratuvarlar (Lab-on-a-chip, LOC) ve mikro bütüncül analiz sistemleri (Micro Total Analysis Systems,  $\mu$ TAS) ise hızlı ve yenilikçi analiz sistemleri olarak adlandırılabilir. Bu sistemler, üretim ve ölçüm sistematiği açısından bakıldığında tamamı biyosensör ve biyoanaliz yöntemleri başlığı altında incelenebilmekte ve prensip olarak birbirilerinden farklı olmadıkları görülmektedir. Bu noktada, biyosensör ve biyoanaliz kavramlarının detaylı olarak incelenmesi, söz konusu yöntemlerin çalışma prensipleri hakkında yeterli bilgiyi verecektir. Yöntemler arasındaki farklılıklar ölçüm

yönteminden daha ziyade mimari yapıları ve üretim teknolojilerinden kaynaklanmaktadır.

Biyoanaliz; hedef molekülün analizinde biyolojik etkileşimlerin veya biyokimyasal süreçlerin rol aldığı, hedef veya tanıyıcı molekülden en az birinin biyolojik bir molekül olduğu ve görüntüleme sistemleri de dâhil olmak üzere geniş bir yelpazede incelenebilecek ölçüm ve analiz yöntemleri için kullanılan genel bir kavram olarak karşımıza çıkmaktadır. Biyosensör ise herhangi bir biyoanaliz yönteminin bir ara yüz aracılığı ile fizikokimyasal bir dönüştürücüye entegre edilmiş ve çoğunlukla kompakt bir mimariye sahip analitik cihaz olarak tanımlanmaktadır (4).

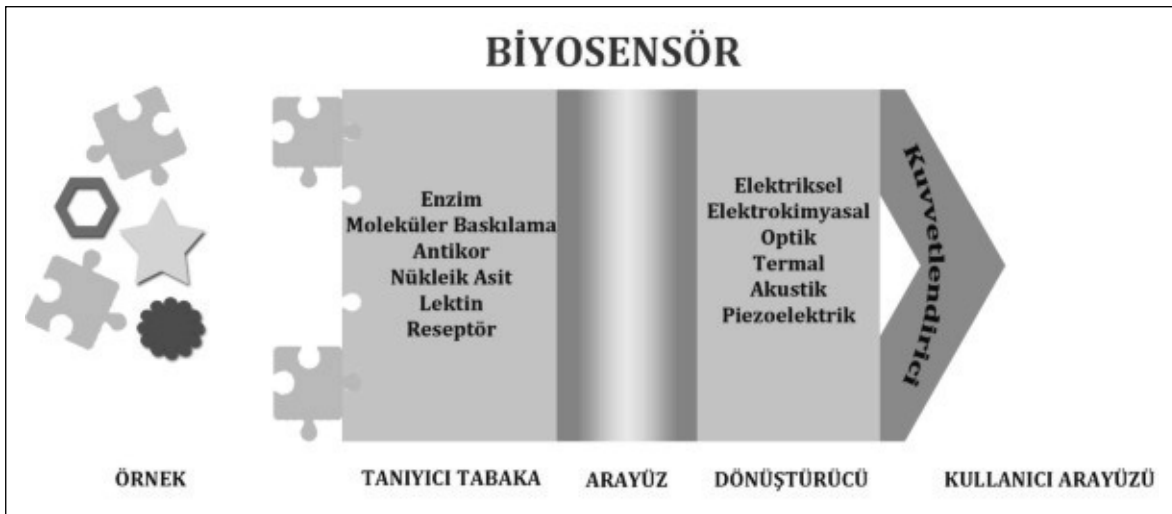
Biyosensör; tanıyıcı katman ve dönüştürücü olarak adlandırılan iki ana kısımdan meydana gelmektedir (Şekil 1). Tanıyıcı katman antikor, aptamer, tek sarmal nükleotid dizisi, protein, enzim veya karbonhidrat gibi herhangi bir biyomolekülün bu katmana tutuklanması ile elde edilmekte ve hedef analitin bu katman ile etkileşimi sonucunda oluşan sinyalin bir dönüştürücü ile hedef analit derişimi ile orantılı olarak sinyal üretilmektedir (5). Farklı özelliklerde dönüştürücü sistemlerinin kullanılabilmesine karşın, pratikte sıklıkla kullanılan dönüştürücüler elektrokimyasal ve optik sinyal işleme sistemleridir.

Hızlı analiz yöntemleri ve elbette biyosensörlerin gelişimi medikal tanı alanındaki çalışmalar ile başlamış ve bu alandaki güçlü gereksinimleri hızlı bir şekilde karşılayabilmek amacıyla önemli bir gelişim göstererek pratikte kullanılabilir cihazlar üretilmiştir. Geliştirilen bu yöntemlerin medikal

tanya paralel olarak çevre, tarım ve gıda endüstrisi gibi sektörlere uyarlanması ile geniş bir kullanım alanı ve pazar ortaya çıkmıştır (6). Bu yöntemlerin gıda güvenliği ve kalitesi amacıyla kullanılabilirliği, gıda endüstrisi ve toplum sağlığı açısından önemli avantajlar yaratmaktadır. Diğer taraftan, gıda matrisinin karmaşık olması, gıdaların fizikokimyasal özelliklerinden kaynaklanan çeşitli dezavantajları da beraberinde getirmektedir. Söz konusu dezavantajlara rağmen biyosensörlerin gıda güvenliği ve kalite kontrolü alanındaki uygulamaları aşağıdaki gibidir.

- Kimyasal bulaşanlar; *pestisit kalıntıları, herbisitler, veteriner ilaç kalıntıları, çevresel bulaşanlar* (7-23),
- Mikrobiyolojik bulaşanlar (24-30),
- Allerjenler (3, 30-32),
- Doğal toksinler; *mikotoksinler, deniz ürünleri toksinleri, patojen toksinleri* (30, 33-47)
- Proses kontaminantları; *polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), biyojen aminler* (48, 49),
- Gıda bileşeni analizi (50, 51),
- Proses kalite ve kontrolü (52-56).

Bu uygulamalar detaylı olarak ele alındığında çeşitli tanıyıcıların kullanılabilirliği ve ölçümlerin doğrudan veya dolaylı olmak üzere iki farklı şekilde yapılabildiği görülmektedir. Kimyasal bulaşanların tayininde genellikle tanıyıcı tabakada kullanılan enzimlerin veya mikroorganizmaların inhibisyonu gözlemlenerek dolaylı ölçümler gerçekleştirilmektedir. Örnek olarak; pestisitler asetilkolin esteraz enziminin inhibisyonu için



Şekil 1 Biyosensör yapısı ve bileşenlerinin şematik gösterimi

kullanılan kimyasallar olduklarından, pestisit analizi için tasarlanan biyosensörlerin ölçüm yöntemi yine aynı mekanizma kullanılarak tasarlanmaktadır. Tanıyıcı tabakada kullanılan asetilkolin esterase enzimi, pestisit varlığında inhibe olacağından, enzim aktivitesindeki azalma pestisit derişiminin nicel olarak belirlenmesine olanak tanımaktadır (7).

Mikrobiyolojik bulaşanlar, allerjenler ve toksinlerin tayininde ise hedef analite özgü antikor veya aptamerin tanıyıcı olarak kullanılması söz konusudur. Yüze plazmon rezonans, kütle-hassas ve empedans sistemleri ile doğrudan ölçüm yapmak mümkün olurken; elektrokimyasal (amperometrik, voltametrik) ve optik sistemlerde tanıyıcı tabakada kullanılan antikor veya aptamere ek olarak enzim veya floresans boya işaretli ikincil antikorun/ aptamerin kullanılması ile dolaylı ölçüm gerçekleştirilmektedir. Doğrudan ölçüm sistemlerinde hedef analitin antikora bağlanması ile dönüştürücü üzerinde hedef analit derişimiyle doğru orantılı bir cevap elde edilmektedir. İkincil antikor veya aptamerin kullanıldığı durumda ise; bu biyomoleküllerin miktarı hedef analit derişimi ile doğru orantılı olduğundan, ikincil antikor/ aptamer üzerindeki işarete ait özgün sinyalin ölçülmesi ile nicel analiz mümkün olmaktadır. Doğrudan ölçüm yöntemleri, ikincil antikor/ aptamer gerektirmediğinden düşük maliyetli, basit analiz sistemlerinin geliştirilmesine olanak tanımaktadır. Doğrudan ölçüm yöntemine örnek olarak; Dudak ve Boyacı tarafından geliştirilen Stafilokokal enterotoksin B (SEB) tayin sistemini incelemek mümkündür. Söz konusu çalışma kapsamında SEB'e özgü peptid dizilimi SEB antikoruna alternatif olarak kullanılmış ve yöntemin alt tayin sınırı 20 µg/ml SEB olarak rapor edilmiştir (42). Böylece SEB tayininde hızlı, basit ve düşük maliyetli bir analiz sistemi ortaya konulmuştur. Dolaylı ölçüm yöntemi için Laschi ve ark. (2006) tarafından geliştirilen ve *Listeria monocytogenes*'e ait gen dizilimi tayininin hedeflendiği çalışma örnek olarak gösterilebilir (44). Bu çalışmada, tanıyıcı tabakada kullanılan tek sarmal oligonükleotide ek olarak ikincil bir oligonükleotid dizilimi kullanılarak ölçüm gerçekleştirilmiştir.

Bunlara ek olarak, bileşen analizlerinin pek çoğu optik veya elektrokimyasal ölçüme dayalı katalitik yöntemlerle gerçekleştirilebilmektedir. Her bir bileşene özgü enzimatik reaksiyon kullanılarak

bileşenlerin nicel analizlerinin yapılması mümkün olabilmektedir. Bunun en bilinen örneği, glukoz oksidaz enziminin katalizlediği reaksiyon sonucunda oluşan hidrojen peroksit miktarının elektrokimyasal olarak ölçüldüğü glukoz biyosensördür (4). Enzimatik biyosensörler çoğunlukla yukarıda değinilen yöntemleri esas alsa da, proteaz enzimi aktivitesinin ölçülmesi amacıyla özgün tasarımların ortaya konulması da mümkün olabilmektedir. Baş ve Boyacı tarafından geliştirilen yöntemde, tanıyıcı katman jelatin filminden oluşmakta ve bu film elektrokimyasal işaretin elektrot yüzeyine difüzyonunu bloke etmektedir. Böylece, proteolitik aktivite sonucunda hidrolize uğrayan jelatin filminin geçirgenliği ve dolayısıyla da elektrokimyasal işaretin difüzyonu artmakta ve proteaz enzimi nicel olarak tayin edilebilmektedir (53).

## **BİYOSENSÖRLERİN AVANTAJLARI VE DEZAVANTAJLARI**

Konvansiyonel yöntemler olarak adlandırılacak olan kromatografik, spektroskopik ve kültürel mikrobiyolojik analizlerden farklı olarak çağımızın gereksinimleri doğrultusunda düşük yatırım maliyetine sahip, uzmanlık gerektirmeyen, hızlı ve taşınabilir analiz yöntemlerine olan ihtiyaçta artış gözlemlenmektedir. Kromatografik, spektroskopik ve bunların kombinasyonu ile oluşan sistemler (LC-MS-MS, GC-MS gibi), son derece hassas sistemler olmalarına karşın yüksek yatırım ve analiz maliyetine sahip olmaları bu yöntemlerin yaygın kullanımını kısıtlamaktadır. Bunun yanı sıra, bu yöntem ve cihazların verimli bir şekilde kullanılabilmesi için konusunda uzman, nitelikli personele ihtiyaç duyulmaktadır. Bu noktada, DNA, aptamer ve immunoafinite tabanlı (ör: ELISA) hızlı analiz yöntemleri ve biyosensör sistemleri/ yöntemleri konvansiyonel gıda analiz yöntemlerinin potansiyel alternatifi olarak karşımıza çıkmaktadır.

ELISA ve yanal akış kitleri gibi hızlı test/analiz yöntemleri yaygın olarak kullanılıyor olsa da otomasyona uygulanabilirliklerinde kısmen başarı sağlanması, kişisel beceri gerektirmeleri, zaman alıcı olmaları ve çoklu analizlerde yüksek maliyetli olmaları, adı geçen yöntemlerin önemli dezavantajlarıdır. Diğer taraftan biyosensörler, geliştirilme felsefelerinin bir parçası olarak basit, kullanıcı dostu, hızlı (kısa cevap süresi), gerçek zamanlı, otomasyona uygun, minyatürize edilebilir ve dolayısıyla taşınabilir olma gibi oldukça

önemli özelliklere sahiptirler. Bu özelliklere ek olarak, biyosensörler çalışma prensiplerinin gereği olarak hedef molekülün analizinde biyolojik etkileşimlerin kullanılmasından dolayı seçiciliği (specificity) ve doğruluğu (accuracy) yüksek olan sistemlerdir.

Nanoteknolojik gelişmelere paralel olarak, nanoyapıların entegrasyonu ve mikroakışkan teknolojilerinin biyosensör sistemlerinde kullanılması ile minyatürize edilebilen ve böylece taşınabilir hale getirilebilen biyosensör sistemleri, düşük güç tüketimi gerçekleştirdikleri için herhangi bir yerde kullanılabilmesi mümkün olduğundan hızlı ve gerçek zamanlı analize olanak tanımaktadırlar (29, 30). Böylece laboratuardan bağımsız olarak analiz yapılabilmesi, günümüz üretim ve denetim süreçlerinin gerçekleştirilmesi aşamasında önemli kolaylıklar sağlamaktadır. Minyatür ve taşınabilir hale getirilme potansiyeli bir diğer önemli avantaj daha sunmaktadır. Küçük hacimlerde analiz gerçekleştirilmesi ile daha az örnek ve reaktif ihtiyacı duyulmakta ve böylece analiz maliyeti önemli ölçüde azaltılmaktadır. Gerek üretim maliyetlerinin düşük olması gerekse de örnek ve reaktif kullanımının azaltılmasıyla ekonomik fayda sağlanması açısından biyosensörleri önemli kılmaktadır. Söz konusu ekonomik fayda, erişimin ve talebin artmasını sağlamakta ve pahalı analitik cihazlara erişimi olmayan kişi, kurum ve kuruluşlar, özellikle de gelişmekte olan ülkeler için önem taşımaktadır. Son olarak, kullanım kolaylığı veya otomasyona uyarlanabilirlikleri uzman personel gereksinimini azaltarak işletme ve analiz maliyetini düşürmektedir.

Biyosensörler, sözü edilen önemli avantajlarının yanı sıra önemli dezavantajlara da sahiptirler. Biyosensörler, bazı analizlerde LC ve/veya LC-MS gibi yöntemlerin sahip olduğu tayin alt sınırı değerlerini şimdilik sağlayamamaktadırlar. Buna ek olarak, gıda matrisinin karmaşık yapısı ve tekstürel özellikler nedeniyle analiz performansında düşüş gözlemlenebilmektedir. Gıda matrisinin karmaşık yapısının neden olduğu dezavantajlı durumun sadece saha analizleri açısından önemli olduğu ancak yerleşik laboratuvarlar açısından bakıldığında parçalayıcı, santrifüj vb. pahalı olmayan temel ekipmanların varlığında bunun bir dezavantaj olarak kabul edilmemesi gerektiğinin de vurgulanması gerekmektedir.

### **BIYOSENSÖRLERİN GELECEĞİ**

Biyosensörlerin kullanımına olan talebin artmasında sözü edilen avantajlarına ek olarak birçok faktör etkilidir. Regülasyondaki gelişmeler dolayısıyla tedarik zincirindeki profesyonellerin rekabet koşullarını iyileştirmek istemesi, yeni nesil sağlık-bilinçli tüketici kitlesinin gıda güvenliğine olan ilgisi vb. bu faktörler arasında sayılabilir.

Düşük işletme ve yatırım maliyetine sahip olması uygun fiyatlı analiz cihazlarının ticari kullanımına olanak tanımaktadır. Cihazlara erişiminin kolay olması ve kullanımının belirli bir uzmanlık gerektirmemesi yeni nesil bilinçli tüketiciye kişisel gıda güvenliği denetimine imkân sağlamaktadır. Bu noktada tıpkı kişisel sağlık gereksinimleri doğrultusunda üretilmiş ve kısa sürede talebin artmasıyla yaygın kullanılmaya başlanmış ve şuan sıradan cihazlar haline gelen biyosensörlerin atası olan kişisel glukoz metre gibi gıda güvenliği için kullanılabilecek biyosensörlerin de giderek artmakta olan sağlık-bilinçli tüketici kitlesinin ihtiyaçları doğrultusunda şekillenmesi kaçınılmaz görülmektedir.

Bunlara ek olarak, halen klinik tanı ve teşhis amacıyla geliştirilmekte olan, her geçen gün daha da yaygınlaşan mikroakışkan teknolojileri temelli minyatür laboratuvarlar ve mikro bütüncül analiz sistemlerinin gıda analizlerine uyarlanmasıyla ve bu alanda daha fazla çalışma gerçekleştirilmesiyle biyosensörlerin gıda analizi uygulamalarının önem kazanacağı düşünülmektedir. Mikro akışkan teknolojisi temelli bu sistemler ile minyatürize analiz platformlarının ortaya konulması, söz konusu sistemlerin herhangi bir güç kaynağına veya bilgisayara gereksinim duymadan akıllı telefonlar ve/veya tabletlere entegre edilebilmesi ile de yerinde hızlı ve güvenilir analizlerin gerçekleştirilmesinin gıda güvenliği ve kalite kontrolü açısından fayda sağlayacağı öngörülmektedir.

Transparency Market Research tarafından yayınlanan biyosensörler ve bu pazarın gelişimi ile ilgili raporda, 2011 yılında 9.9 milyar USD olan pazarın, yıllık ortalama % 9.6 büyüme hızı ile 2018 yılı itibari ile 18.9 milyar USD olacağı tahmin edilmektedir (6).

Sonuç olarak, biyosensörlerin sahip oldukları avantajlar ve pazar raporlarında vurgulandığı gibi yüksek ticari potansiyele sahip olmalarına ek olarak, gıda bilimi ve teknolojisi konularında

araştırma ve geliştirme faaliyetinde bulunan bilim insanlarının biyosensörlere gösterecekleri ilginin artması ile yeni teknolojilerin ortaya konacağı ve bu konuda kayda değer gelişmelerin sağlanacağı düşünülmektedir.

## SONUÇ

Otomasyona uyarlanabilirlik, hızlı analiz süresi ve taşınabilirlik gibi özelliklere sahip olan ve uzmanlık gerektirmeyen biyosensörlerin, emek yoğun ve zaman alıcı gıda analiz yöntemlerine önemli bir alternatif olduğu göz ardı edilemeyecek bir gerçektir. Ancak, sıvı kromatografisi ve kütle spektroskopisi gibi enstrümental yöntemlerin sahip oldukları düşük alt tayin sınırı değerlerini sağlayamamaları nedeniyle, alternatif değil bunların bir tamamlayıcısı olarak düşünülmesi gerekmektedir. Biyosensörler konusundaki çalışmaların pek çoğunun klinik tanı ve teşhise yönelik olduğu ve gıda bilimi ve teknolojisi uzmanlarının bu alana sağlayacakları katkının artması ile söz konusu dezavantajların aşılmasının mümkün olacağı ve biyosensörlerin gıda analizlerinde gösterdikleri performansın artacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Pividori MI, Alegret S. 2010. Micro and nanoparticles in biosensing systems for food safety and environmental monitoring. An example of converging technologies. *Microchim. Acta*, 170(3-4): 227-242.
2. Pérez-L pez B, Merkoçi A. 2011. Nanomaterials based biosensors for food analysis applications. *Trends Food Sci Technol*, 22(11): 625-639.
3. Pilolli R, Monaci L, Visconti A. 2013. Advances in biosensor development based on integrating nanotechnology and applied to food-allergen management. *Trends Anal Chem* 47(0): 12-26.
4. Turner AP. 2000. Biosensors: sense and sensitivity. *Science*, 290(5495): 1315-1317.
5. Chambers JP, Arulanandam BP, Matta LL, Weis A, Valdes JJ. 2008. Biosensor recognition elements. *Curr Issues Mol Biol*, 10(1-2): 1-12.

6. Anonymous. 2013. Biosensors Market (Electrochemical, Optical, Piezoelectric & Thermistor) - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends and Forecast, 2012 - 2018. (Erişim; <http://www.transparencymarketresearch.com/biosensors-market.html>).
7. Audrey S, Beatriz P-S, Jean-Louis M. 2012. Biosensors for pesticide detection: new trends. *American Journal of Analytical Chemistry*, 2012.
8. Cháfer-Pericás C, Maquieira , Puchades R. 2010. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(9): 1038-1049.
9. Chobtang J, De Boer IJ, Hoogenboom RL, Haasnoot W, Kijlstra A, Meerburg BG. 2011. The need and potential of biosensors to detect dioxins and dioxin-like polychlorinated biphenyls along the milk, eggs and meat food chain. *Sensors*, 11(12): 11692-11716.
10. da Costa Silva LM, dos Santos VPS, Salgado AM, Pereira KS. 2013. Biosensors for Contaminants Monitoring in Food and Environment for Human and Environmental Health. In State of the Art in Biosensors - Environmental and Medical Applications, Rinken T. (baş editör), InTech, Croatia, pp. 151-168.
11. Haigh-Fl rez D, de la Hera C, Costas E, Orellana G. 2014. Microalgae dual-head biosensors for selective detection of herbicides with fiber-optic luminescent O< sub> 2</sub> transduction. *Biosensors and Bioelectronics*, 54: 484-491.
12. Huet A-C, Delahaut P, Fodey T, Haughey SA, Elliott C, Weigel S. 2010. Advances in biosensor-based analysis for antimicrobial residues in foods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(11): 1281-1294.
13. Keegan J, Whelan M, Danaher M, Crooks S, Sayers R, Anastasio A, Elliott C, Brandon D, Furey A, O'Kennedy R. 2009. Benzimidazole carbamate residues in milk: Detection by Surface Plasmon Resonance-biosensor, using a modified QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) method for extraction. *Anal Chim Acta*, 654(2): 111-119.
14. Liu S, Zheng Z, Li X. 2013. Advances in pesticide biosensors: current status, challenges, and future perspectives. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405(1): 63-90.



15. Long F, Zhu A, Gu C, Shi H. 2013, Recent Progress in Optical Biosensors for Environmental Applications. In State of the Art in Biosensors - Environmental and Medical Applications, Rinken T. (baş editör),
16. March C, Mancl s J, Jiménez Y, Arnau A, Montoya A. 2009. A piezoelectric immunosensor for the determination of pesticide residues and metabolites in fruit juices. *Talanta*, 78(3): 827-833.
17. Yüce M, Nazır H, Dönmez G. 2010. Using of *Rhizopus arrhizus* as a sensor modifying component for determination of Pb (II) in aqueous media by voltammetry. *Bioresource technology*, 101(19): 7551-7555.
18. Nomngongo PN, Catherine Ngila J, Msagati TA, Gumbi BP, Iwuoha EI. 2012. Determination of selected persistent organic pollutants in wastewater from landfill leachates, using an amperometric biosensor. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*, 50: 252-261.
19. Silveira CM, Gomes SP, Araújo AN, Montenegro M, Todorovic S, Viana AS, Silva RJ, Moura JJ, Almeida MG. 2010. An efficient non-mediated amperometric biosensor for nitrite determination. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(9): 2026-2032.
20. Wang X, Xia S, Zhao J, Zhao H, Renault NJ. 2009. Inhibitive determination of heavy metal ions by conductometric nitrate reductase biosensor. *Chemical Research in Chinese Universities*, 25(4): 443-445.
21. Yu Z, Zhao G, Liu M, Lei Y, Li M. 2010. Fabrication of a novel atrazine biosensor and its subpart-per-trillion levels sensitive performance. *Environmental science & technology*, 44(20): 7878-7883.
22. Yüce M, Nazır H, Dönmez G. 2010. A voltammetric *Rhodotorula mucilaginosa* modified microbial biosensor for Cu (II) determination. *Bioelectrochemistry*, 79(1): 66-70.
23. Zhong Z, Fritzsche M, Pieper SB, Wood TK, Lear KL, Dandy DS, Reardon KF. 2011. Fiber optic monooxygenase biosensor for toluene concentration measurement in aqueous samples. *Biosens Bioelectron*, 26(5): 2407-2412.
24. Sharma H, Agarwal M, Goswami M, Sharma A, Roy S, Rai R, Murugan M. 2013. Biosensors: tool for food borne pathogen detection. *Veterinary World*, 6(12): 968-973.
25. Arora P, Sindhu A, Dilbaghi N, Chaudhury A. 2011. Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens. *Biosens Bioelectron*, 28(1): 1-12.
26. Valadez A, Lana C, Tu S-I, Morgan M, Bhunia A. 2009. Evanescent Wave Fiber Optic Biosensor for *Salmonella* Detection in Food. *Sensors*, 9(7): 5810-5824.
27. Wang Y, Ye Z, Ying Y. 2012. New Trends in Impedimetric Biosensors for the Detection of Foodborne Pathogenic Bacteria. *Sensors*, 12(3): 3449-3471.
28. Jung JH, Cheon DS, Liu F, Lee KB, Seo TS. 2010. A Graphene Oxide Based Immuno-biosensor for Pathogen Detection. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 49(33): 5708-5711.
29. Yoon J-Y, Kim B. 2012. Lab-on-a-chip pathogen sensors for food safety. *Sensors*, 12(8): 10713-10741.
30. Atalay YT, Vermeir S, Witters D, Vergauwe N, Verbruggen B, Verboven P, Nicola BM, Lammertyn J. 2011. Microfluidic analytical systems for food analysis. *Trends Food Sci Technol*, 22(7): 386-404.
31. Krska R, Welzig E, Baumgartner S. 2004. Immunoanalytical detection of allergenic proteins in food. *Anal Bioanal Chem*, 378(1): 63-65.
32. Laube T, Kergaravat SV, Fabiano SN, Hernández SR, Alegret S, Pividori MI. 2011. Magneto immunosensor for gliadin detection in gluten-free foodstuff: Towards food safety for celiac patients. *Biosens Bioelectron*, 27(1): 46-52.
33. Wang XH, Wang S. 2008. Sensors and Biosensors for the Determination of Small Molecule Biological Toxins. *Sensors*, 8(9): 6045-6054.
34. Chen J, Fang Z, Liu J, Zeng L. 2012. A simple and rapid biosensor for ochratoxin A based on a structure-switching signaling aptamer. *Food Control*, 25(2): 555-560.
35. Rasooly A, Herold KE. 2006. Biosensors for the Analysis of Food- and Waterborne Pathogens and Their Toxins. *JAOAC Int*, 89(3): 873-883.
36. Tothill IE. 2011. Biosensors and nanomaterials and their application for mycotoxin determination. *World Mycotoxin J*, 4(4): 361-374.
37. Dudak F, Bas D, Basaran-Akgul N, Tamer U, Boyacı I. 2010. Nano-sized structures for the detection of food components and contaminants. *Front Biosci*, 3: 1109-1127.

38. Campàs M, Garibo D, Prieto-Simón B. 2012. Novel nanobiotechnological concepts in electrochemical biosensors for the analysis of toxins. *Analyst*, 137(5): 1055-1067.
39. Abdul Kadir MK, Tothill IE. 2010. Development of an electrochemical immunosensor for fumonisins detection in foods. *Toxins*, 2(4): 382-398.
40. Alonso-Lomillo MA, Domínguez-Renedo O, Ferreira-Gonçalves L, Arcos-Martínez MJ. 2010. Sensitive enzyme-biosensor based on screen-printed electrodes for Ochratoxin A. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(6): 1333-1337.
41. Arévalo FJ, Granero AM, Fernández H, Raba J, Zúñiga MA. 2011. Citrinin (CIT) determination in rice samples using a micro fluidic electrochemical immunosensor. *Talanta*, 83(3): 966-973.
42. Dudak FC, Boyacı İH. 2014. Peptide-Based Surface Plasmon Resonance Biosensor for Detection of Staphylococcal Enterotoxin B. *Food Anal Method*, 7(2): 506-511.
43. Hervás M, López M, Escarpa A. 2009. Electrochemical immunoassay using magnetic beads for the determination of zearalenone in baby food: An anticipated analytical tool for food safety. *Analytica chimica acta*, 653(2): 167-172.
44. Laschi S, Palchetti I, Marrazza G, Mascini M. 2006. Development of disposable low density screen-printed electrode arrays for simultaneous electrochemical measurements of the hybridisation reaction. *J Electroanal Chem*, 593(1): 211-218.
45. Meneely J, Fodey T, Armstrong L, Sulyok M, Krska R, Elliott C. 2010. Rapid surface plasmon resonance immunoassay for the determination of deoxynivalenol in wheat, wheat products, and maize-based baby food. *J Agric Food Chem*, 58(16): 8936-8941.
46. Stewart LD, Hess P, Connolly L, Elliott CT. 2009. Development and single-laboratory validation of a pseudofunctional biosensor immunoassay for the detection of the okadaic acid group of toxins. *Analytical chemistry*, 81(24): 10208-10214.
47. Wei F, Ho C-M. 2009. Aptamer-based electrochemical biosensor for Botulinum neurotoxin. *Anal Bioanal Chem*, 393(8): 1943-1948.
48. Spier CR, Vadas GG, Kaattari SL, A UM. 2011. Near real-time, on-site, quantitative analysis of PAHs in the aqueous environment using an antibody-based biosensor. *Environ Toxicol Chem*, 30(7): 1557-63.
49. Pospiskova K, Safarik I, Sebel M, Kuncova G. 2013. Magnetic particles-based biosensor for biogenic amines using an optical oxygen sensor as a transducer. *Microchim. Acta*, 180: 311-318.
50. O'Kane A, Wahlström L. 2011. Biosensors in Vitamin Analysis of Foods. *Fortified Foods with Vitamins: Analytical Concepts to Assure Better and Safer Products*: 65-75.
51. Lavecchia T, Tibuzzi A, Giardi MT. 2010. Biosensors for functional food safety and analysis. In *Bio-farms for nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors*, Giardi M.T., Rea G.Berra B. (baş editör), Springer, pp. 267-281.
52. Barthelmebs L, Calas-Blanchard C, Istamboulie G, Marty J-L, Noguer T. 2010. Biosensors as analytical tools in food fermentation industry. In *Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors*, Giardi M.T., Rea G.Berra B. (baş editör), Springer, pp. 293-307.
53. Başı D, Hakkı Boyacı İ. 2010. Rapid method for quantitative determination of proteolytic activity with cyclic voltammetry. *Electroanalysis*, 22(3): 265-267.
54. Barroso MF, Delerue-Matos C, Oliveira M. 2012. Electrochemical evaluation of total antioxidant capacity of beverages using a purine-biosensor. *Food Chemistry*, 132(2): 1055-1062.
55. Pérez S, Bartrol J, Fàbregas E. 2013. Amperometric biosensor for the determination of histamine in fish samples. *Food chemistry*, 141(4): 4066-4072.
56. Kuswandi B, Irmawati T, Hidayat MA, Ahmad M. 2014. A Simple Visual Ethanol Biosensor Based on Alcohol Oxidase Immobilized onto Polyaniline Film for Halal Verification of Fermented Beverage Samples. *Sensors*, 14(2): 2135-2149.

## HYALURONİK ASİT VE FERMANTASYONLA ÜRETİLMESİ

Ercan Yatmaz\*, İrfan Turhan

Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, 07058, Antalya, Türkiye

Geliş tarihi / Received: 24.11.2014

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 04.03.2015

Kabul tarihi / Accepted: 10.03.2015

### Özet

Hyaluronik asit (HA)  $\beta$ -1,3 ve  $\beta$ -1,4 glikozidik bağı ile bağlanmış D-glukuronik asit ve N-asetilglukozamin birimlerinin tekrarlanmasıyla oluşan bir polimerdir. Yüksek viskoelastisite, nem tutma kapasitesi ve biyouyumluluk özelliklerine sahip olmasından dolayı gıda, tıp, kozmetik ve nutrasötik alanlarında kullanılmaktadır. Geleneksel olarak horoz ibiğinden ekstraksiyonla üretilmektedir. Ancak 1980lerden sonra streptokok suşlar kullanılarak fermantasyonla üretimine başlanmış ve günümüzde de rekombinant sistemlerle yüksek moleküler ağırlığa sahip HA üretimi denenmektedir. HA'nın son zamanlarda gıda takviyesi olarak kullanımı oldukça dikkat çekmektedir. Bu çalışmada HA, HA üretim yöntemleri ve fermantasyon teknolojisi ile HA üretiminde karşılaşılan genel problemler ile ilgili bilgilere yer verilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Hyaluronik asit (HA), fermantasyon teknolojisi, streptokok suşları.

## HYALURONIC ACID and PRODUCTION BY FERMENTATION

### Abstract

Hyaluronic acid (HA) is a polymer composed of units of N-acetyl glucosamine and D-glucuronic acid linked by  $\beta$ -1,3 and  $\beta$ -1,4 glycosidic bond. Due to the fact that it has desirable viscoelasticity, moisture capacity, and biocompatibility, HA is used for several applications in food, medicine, cosmetics, and nutraceuticals. HA is traditionally extracted from rooster combs, but since 1980s it has been produced by fermentation with streptococcal strains, and recombinant systems have been also tried to produced HA with high molecular weight lately. It has been recently gained attention for food supplement. The main purpose of this study is to present a review about HA, application fields, HA production systems, and problems of HA fermentation.

**Keywords:** Hyaluronic acid (HA), fermentation technology, streptococcal strains.

\*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ ercanytmz@gmail.com,

☎ (+90) 242 310 65 73,

☎ (+90) 242 227 45 64

## GİRİŞ

Fermentasyonla katma değeri yüksek ürünlerin saf kimyasallar ve karmaşık saflaştırma teknikleri ile üretimi uzun yıllardır gerçekleştirilmektedir. Bu ürünler arasında enzimler, organik asitler, biyoetanol, vitamin, antibiyotik ve antikor gibi birçok ürünü saymak mümkündür. Bu ürünlerden bazıları yüksek oranlarda üretilebilirken (biyoetanol) bazılarının üretim miktarı litrede mg (antikor) seviyelerinde kalmaktadır.

Hyaluronik asit (HA),  $\beta$ -1,3 ve  $\beta$ -1,4 glikozidik bağı ile bağlanmış D-glukuronik asit ve N-asetilglukozamin disakkarit birimlerinin tekrarlanmasıyla oluşan ve moleküler ağırlığı  $10^4$ - $10^9$  Da arasında değişiklik gösteren bir polimerdir (1, 2). HA karakteristik yapısal özellikleri sayesinde eklendiği solüsyonlara yüksek viskoelastikiyet ve su tutma kapasitesi sağlamaktadır (3, 4). Bu özellikleri nedeniyle kozmetik ürünlerin üretiminde (5), yara için ilaçların üretiminde (6), doku rejenerasyonunda ve tedavisinde (7-9), ilaçların hedef dokuya ulaştırılmasında (10-13), hedef kimyasalın kontrollü olarak salınımında (14, 15), göz damlası ilaçlarında (16), kalça veya diz implantlarında (17), ortopedik protezlerde (18), deri dokusunun rekonstrüksiyonunda (19), yumuşak dokuların tedavisinde (20), hedef tümörün MR görüntülemesinde (21), periradiküler cerrahi sonrası periapikal dokunun iyileştirilmesinde (22) ve mikro cerrahi işlemlerinde (23) kullanım alanına sahiptir.

HA, yaraların veya yara izlerinin iyileşmesini hücre dışı matriks rejenerasyonu, epitel doku rejenerasyonu, keratinosit transferi, epidermal rejenerasyonu gibi etkilerle sağlamaktadır. Göz cerrahisinde ise kuru göz tedavisinde HA jeli, uygulanacak olan antibiyotik için hem iyi bir taşıyıcı olmakta hem de ortama iyi adapte olduğundan ve zor ayrıldığından ilacın etki süresini uzatmaktadır. İlaçların veriminin artırılmasında da taşıyıcı olarak HA içeren sistemler kullanılmakta ve hedefe ulaşım kolaylaştırılmaktadır. Ayrıca habis tümöründe, akciğer patolojisi çalışmalarında, eklem patolojisi çalışmalarında, estetik cerrahisinde (göğüs cerrahisi, deri dolgu maddeleri ve deri gençleştirmede) de yaygın olarak kullanılmaktadır (24).

Fonksiyonel gıdalar alışıl gelmiş gıda formlarını ifade eden, vücudumuzun genel ihtiyaçlarını karşılamanın yanı sıra fizyolojik ve metabolik

fonksiyonlar üzerinde de ilave faydalar sağlayan sağlığımızı olumlu yönde etkileyen gıdalar veya gıda bileşenleridir (25). Nutrasötikler ise ağızdan alınmak üzere katı, sıvı, kapsül, yumuşak jel vb. haldeki vitamin, mineral, aminoasit, enzimler ve metabolitleri gibi ürünleri içermekte olup ürünlerin kronik bir hastalığa karşı koruyucu veya fizyolojik yarar gösterdiği kanıtlanmış ancak ilaç olarak kabul edilmeyen ürünlerdir (26). Nutrasötik olarak kullanılan ürünler yağ asitleri, karotenoidler, antioksidan vitaminler, fenolik bileşikler, terpenoitler, steroidler, indoller, organik asitler, lifler vb. olup bunların insan sağlığına yararlı etkilerini gösteren bilimsel çalışmalar mevcuttur (26). Örneğin antioksidanlar; lipitlerin peroksidasyonunda veya proteinlerin çapraz bağlanmasında rol alarak doku hasarının oluşmasını önleyebilirler (25). Antioksidan özellikleri ve zengin antioksidan içeriği bakımından yeşil çay oldukça değerli bir ürün olup yüzyıllardır yararlı etkilerinden ötürü kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra domateste bulunan likopenin ise kanser önleyici etki gösterdiği epidemiyolojik çalışmalarla gösterilmiştir (25). Tüm bu bileşenlerin yanı sıra doğal olarak insan vücudunda yer alan ve yaşlandıkça vücuttaki miktarı azalan HA'nın farklı dönemlerde uygun dozlarda alınımının vücutta onarıcı etki göstererek fiziksel hareket kabiliyetini geliştireceği bildirilmektedir (27) (Çizelge 1).

Kullanım alanının genişliği ve önemi ile paralel olarak ihtiyaç duyulan miktarı da her geçen gün artmakta olan HA, dünyada yaklaşık olarak 1 milyar dolarlık bir pazar hacmine sahiptir (28). Ülkemizde de HA, tablet, kapsül vb. ürünler şeklinde takviye ürün tedarikçileri tarafından pazarlanmaktadır.

### Hyaluronik Asit Üretim Yöntemleri

Oldukça geniş kullanım alanına ve ekonomik öneme sahip olan HA ilk zamanlarda horozibiginden pahalı yöntemlerle saflaştırılmaktayken HA'nın fermentasyonla üretilebileceği ortaya konulunca endüstriyel ölçekte üretim bu tekniğe kaymıştır (29). Üretim tekniğinin fermentasyona kaymasındaki temel faktörler üretim yönteminin standardize edilebilir oluşu ve hedeflenen moleküler ağırlığa sahip istenilen miktarda HA'nın yıl boyunca üretilebiliyor oluşudur. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda yumurta kabuğundan da HA ekstraksiyonunun mümkün olduğu ortaya konmuştur (30).

Çizelge 1. HA'nın gıda takviyesi olarak kullanımı ve sağlık üzerine etki şekli (27)

ID	Gıda veya Gıda Bileşeni	Sağlık İlişkisi	Etki şekli
1572	Hyaluronik asit	Eklem sağlığı	Hyaluronik asit (Schiff® Move Free®) yağlamaya yardımcı olur ve eklemleri destekler.
Kullanım şekli: Her bir alım en az 3 mg yüksek moleküler ağırlığa sahip (>700 kDa) HA içermeli.			
1731	Hyaluronik asit/Sodyum hyaluronat	Eklem sağlığı	Eklem hareketliliği ve yağlamaya katkıda bulunur.
Kullanım şekli: 3-5 hafta süresince haftada bir defa 20 mg.			
1932	Sodyum hyaluronat	Eklem sağlığı ile ilgili	Eklem hareketliliğine katkı sağlar.
Kullanım şekli:			
<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; Günlük 25-50 mg arasında kullanılmalı.</li> <li>&gt; 2-3 ay süresince günde 2 defa 50 mg sodyum hyaluronat kullanılmalı ve yılda iki kez tekrarlanmalı.</li> </ul>			
3132	Hyaluronik asit	Eklem hareketliliğinin devamına yardım etme	Eklem hareketliliğinin devamının sağlanmasına yardım eder. Eklemlerin sağlıklı kalmasına yardım eder.
Kullanım şekli: Günde 100 mg.			

Fermantasyonla HA üretiminde ana üretici mikroorganizma olarak *Streptococcus* sp. kullanılmakta ve üretilen ürünün fermantasyon ortamından saflaştırılması sırasında proteinlerin oluşturmuş olduğu güçlükler en büyük dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır (1). Safsızlık unsuru proteinlerin ortamdan uzaklaştırılması, maliyeti artırdığından yeni üretim stratejileri ile bu sorunu önlemek için çalışmalar yapılmaktadır. Bu amaçla kullanılan yöntem rekombinant hücre teknolojisi olup farklı suşlar; *E. coli* (31), *Pichia pastoris* (32), *B. subtilis* (33), *S. thermophilus* YIT 2084 (34, 35), *Lactococcus lactis* (36) geliştirilmiştir. Yeni suşlarla gerçekleştirilen denemelerde HA üretimi gerçekleştirilebilmesine karşın HA üretim miktarları veya moleküler ağırlığı istenilen düzeylerde olmamıştır. Bu nedenle yeni rekombinant suşların geliştirilmesi veya farklı fermantasyon stratejileri ile safsızlıkların en aza indirgenmesi üzerine çalışmalar devam etmektedir. Bu çalışmaların yanı sıra Novozymes firması rekombinant *Bacillus subtilis* ile endüstriyel boyutta yüksek saflıkta HA üretimi yapmaktadır (37). 1 g saf HA'nın 2-5 dolar arasında satışa sunulduğu (kozmetik amaçlı kullanım için) ve 1 kg HA'nın en az 2000 dolar ettiği göz önüne alındığında ne kadar değerli bir ürün olduğu ve kullanım alanlarının genişliği nedeniyle ihtiyaç duyulan miktarın her geçen yıl artacağı açıkça görülmektedir.

### Fermantasyonla Hyaluronik Asit Üretiminde Ana Üretici Olan *Streptococcus* sp. Kullanımı

Daha önce de bahsedildiği üzere HA üretiminde ana üretici mikroorganizma grubu *Streptococcus* sp. olup çalışmaların büyük çoğunluğu bu grup ile gerçekleştirilmiştir. Bu kısımda ilgili

mikroorganizma ile gerçekleştirilen denemeler ve yöntemler hakkında bilgiler verilecektir.

Farklı karıştırıcılar kullanılarak oluşturulan iki tip fermentörde karıştırma hızının HA üretim miktarı ve moleküler ağırlığı üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada *Streptococcus zooepidemicus* kullanılmış ve her iki tip fermentörde de HA'nın moleküler ağırlığı  $4.3 \times 10^6$  Da olarak bulunmuştur (29). Bir başka çalışmada ise *Streptococcus zooepidemicus* (ATCC 39920) ile HA üretiminde karıştırma ve çözülmüş oksijen konsantrasyonunun etkisini araştırmışlardır (38). Denemeler sonucunda çözülmüş oksijen konsantrasyonu için kritik değerin %5 olduğu ve karıştırmanın oksijenin absorpsiyonunu artırdığı ancak HA üretimine bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Çözülmüş oksijen konsantrasyonunun *Streptococcus zooepidemicus* (WSH-24) ile HA üretimine etkisinin incelendiği bir çalışmada da farklı stratejilerle çözülmüş oksijen miktarının kontrolünün HA üretim miktarını etkilediği tespit edilmiştir (39). HA fermantasyonunda n-dodekan ve n-hekzadekanın oksijen vektörü (oksijen taşıyıcısı olarak görev yapan ve oksijene yüksek afinite gösteren organik faz) olarak kullanımının araştırıldığı bir çalışmada, oksijen vektörü ilavesinin HA üretim miktarını ve moleküler ağırlığını artırdığı belirlenmiştir. Çalışma sonucunda maksimum HA konsantrasyonu 4.25 g HA/L ve moleküler ağırlığı  $1.54 \times 10^7$  Da olarak %0.5 (v/v) hegzadekan ilavesi ile gerçekleştirilmiştir (40).

*Streptococcus zooepidemicus* (ATCC 39920) ile gerçekleştirilen bir başka çalışmada tekrarlı-kesikli fermantasyonla HA üretimi amaçlanmıştır. Kesikli kültürde 0.24 g HA/L/sa olan hacimsel üretim oranı değeri tekrarlı-kesikli fermantasyonla 0.59 g

HA/L/sa değerine yükseltmiştir (41). *Streptococcus zooepidemicus* (WSH-24) ile HA üretiminde ise hyaluronidaz enzimi ilavesinin kesikli kültürde üretime etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda hyaluronidaz ilavesi yapılmış ve 0.15 g/L enzim ilavesinin HA üretimini 5.0 g/L'den 6.0 g/L'ye yükselttiği, daha yüksek oranlarda enzim ilavesinin HA üretimine bir etkisinin olmadığı görülmüştür (42). Aynı mikroorganizma ile gerçekleştirilen iki aşamalı fermantasyon stratejisinde de öncelikle yarı-sürekli fermantasyon ile hücre gelişimi sağlanmış ardından sakaroz içeriği 15 g/L'ye ayarlanarak kesikli fermantasyon başlatılmıştır. Deneme sonucunda yalnızca kesikli fermantasyonla 5.0 g/L HA üretilmişken iki aşamalı fermantasyon yöntemiyle üretim miktarı 6.6 g/L'ye yükseltmiştir (43).

Patil vd. (44), farklı besiyeri bileşimlerinde *Streptococcus zooepidemicus* (MTCC 3523) gelişimi ve HA üretimini incelemişler ve en yüksek HA üretimine (0.798 g HA/L); %4.05 glukoz, %5.12 soya peptonu, %0.075 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O ve %0.25 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> içeren besiyerinde ulaşımlardır. Zhang vd. (45), yapmış oldukları çalışmada *S. zooepidemicus* (NJUST01) için optimum besiyeri içeriğini %5 nişasta, %0.3 glukoz, %0.5 pepton, %0.15 MgSO<sub>4</sub> ve %2 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> olarak belirlemişler ve çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilen çalışmada 6.7 g/L HA üretmişlerdir. Farklı bir çalışmada ise *Streptococcus zooepidemicus* (WSH-24) mikroorganizmasının alkali pH'da stres altında HA üretim potansiyeli incelenmiş ve alkali strese HA miktarı 1.5 g/L artış göstererek 6.5 g/L olarak gerçekleşmiştir (46). Besiyeri içeriği optimizasyonu üzerine bir diğer çalışmada ise *Streptococcus* sp. ID9102 için optimum besin bileşimi %4 glukoz, %0.75 maya ekstraktı, %1 kazein-pepton, %0.25 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, %0.05 MgCl<sub>2</sub>, %0.5 NaCl, %0.04 glutamin, %0.06 glutamat ve %0.02 okzalik asit olarak bulunmuştur (47).

Besiyeri karbon/azot (K/A) oranının HA üretimine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise kesikli fermantasyonda en uygun K/A oranının 2:1 olduğu ve fermantasyon veriminin artırılması için mikroorganizmanın durağan faza geçmeden kültür yenilemenin avantaj sağladığı belirtilmiştir (48). Ayrıca başlangıç glukoz konsantrasyonunun erlen çalışmalarında HA üretimi üzerine etkisinin olmadığı ancak reaktör çalışmaları göz önüne alındığında ise başlangıç glukoz konsantrasyonunun

önemli olduğu belirtilmiştir (49). Tüm bu besiyeri optimizasyonu çalışmalarının yanı sıra metal iyonlarının da HA üretimini ve moleküler ağırlığını etkilediği ve özellikle Na<sup>+</sup> iyonunun fermantasyonun başından itibaren ortamda bulunmasının moleküler ağırlığın artmasına katkı sağladığı belirlenmiştir (50).

Farklı zirai kaynaklardan; soya proteini konsantresi hidrolizati, peyniraltı suyu proteini konsantrati ve kaju elma suyu kullanılarak *Streptococcus zooepidemicus* ile HA fermantasyonları gerçekleştirilmiş ve kaju elma suyunda 0.89 g/L HA üretimi sağlanmıştır. Bu değer sentetik ortamda gerçekleştirilen kontrol çalışmasında elde edilen değer (0.86 g/L) ile aynıdır. Ancak zirai kaynaklarla üretilen HA moleküler ağırlığı 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> Da arasında değişirken sentetik ortamda üretilen HA'nın moleküler ağırlığı 10<sup>7</sup> Da olarak bulunmuştur (51).

#### **Fermantasyonla Hyaluronik Asit Üretiminde Rekombinant Mikroorganizma Kullanımı**

HA üretiminde ana üretici mikroorganizmanın kullanıldığı fermantasyonlarda karşılaşılan temel problemlerden birincisi ortamda istenmeyen safsızlıkların (proteinlerin) bulunması ve bu durumun saflaştırma maliyetlerini artırmasıdır. Ayrıca yüksek miktarda ve hedeflenen moleküler ağırlığa sahip HA üretimi de büyük önem arz etmektedir. Tüm bu sorunların üstesinden gelmek için araştırmacılar yeni rekombinant suşlar geliştirerek HA üretim denemeleri gerçekleştirmişlerdir.

Rekombinant hücre teknolojisi ile geliştirilen *E. coli* ile gerçekleştirilen denemelerde moleküler ağırlığı 3.5x10<sup>5</sup> ile 1.9x10<sup>6</sup> Da arasında değişen HA üretimi sağlanmış ancak üretim miktarları 1 g/L'nin çok çok altında gerçekleşmiştir (31). *Bacillus subtilis*'in HA üretiminde kullanılabilirliğinin tespiti amacıyla yapılan bir çalışmada da HA üretimi geliştirilen suşlarla başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş, TPG223 suşunun 6.8 g HA/L (4.5x10<sup>6</sup> Da) ve PG6181 suşunun 2.4 g HA/L (13x10<sup>3</sup> Da) ürettiği belirlenmiştir (33). *Lactococcus lactis* ile yapılan gen transferi çalışmalarında ise geliştirilen rekombinant suş ile 0.65 g/L HA üretimi sağlanabilmiştir (36). *S. thermophilus* (YIT 2084) ile gerçekleştirilen çalışmada ise en yüksek HA üretim değeri 208 mg/L olarak optimum şartlarda gerçekleştirilen deneme sonucunda elde edilmiştir (34). Benzer bir çalışmada ise doğal üretici olan *S. thermophilus* (YIT 2084) rekombine edilerek oluşturulan suş ile yapılan denemeler sonucunda

üretim miktarı yabani suşa göre 6 kat artmış ve 1.2 g/L HA olarak gerçekleşmiştir (35).

Bir diğer rekombinant hücre *Pichia pastoris* ile yüksek moleküler ağırlığa sahip HA üretimi hedeflenmiş, düşük sıcaklıkta (26 °C) gerçekleştirilen fermantasyonlar sonucunda  $2.5 \times 10^6$  Da büyüklüğünde HA üretilmiş ancak üretim miktarı 0.8-1.7 g/L seviyelerinde kalmıştır (32). *S. zooepidemicus* ve rekombinant *L. lactis* ile gerçekleştirilen denemelerde UDP-GlcUA/UDP-GlcNAc hücre içi akış oranının HA moleküler ağırlığı üzerine direkt etkili olduğu bulunmuştur (52).

Tüm bu rekombinant hücrelerle gerçekleştirilen çalışmalar incelendiğinde şu ana kadar geliştirilen suşların üretim miktarları ve üretkenlik değeri açısından yeterli seviyelere ulaşmadığı görülmektedir. Bu nedenle de ana üretici mikroorganizma olan *Streptococcus zooepidemicus* ile yeni fermantasyon stratejileri denenerek yapılan çalışmalara ara vermeden devam edilmektedir.

### **Hyaluronik Asit Üretiminde Farklı Fermantasyon Stratejileri ve Hyaluronik Asidin Saflaştırılması**

HA üretiminde karşılaşılan sorunların üstesinden gelmek, yüksek miktarda ve moleküler ağırlıkta HA üretimi sağlamak amacıyla farklı yöntem ve stratejiler denenmiştir.

Daha önceki bölümlerde açıklandığı üzere HA üretiminin artırılması için kesikli, yarı-kesikli ve diğer fermantasyon stratejileri denenmiş, elde edilen sonuçlar doğrultusunda yeni stratejiler oluşturularak üretimin artırılması ve HA'nın moleküler ağırlığının standardize edilmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bunların yanı sıra yalnızca HA moleküler ağırlığını artırmak üzere glikolitik prosesin zayıflatılmasının (53), UDP-N-asetilglukozamin konsantrasyonunun (54) ve fermantasyon şartlarının optimize edilmesinin (havalandırma, pH, sıcaklık vs.) (55) olumlu sonuçlar gösterdiği belirtilmiştir. Bunların yanı sıra halen yeni üretim stratejileri oluşturularak denemeler yapılmakta, HA üretim miktarının artırılmasına ve moleküler ağırlığının standardize edilmesine çalışılmaktadır.

Yüksek miktarda ve standart özelliklerde ürün üretimi önemli olmakla birlikte elde edilen ürünün en yüksek saflıkta fermantasyon ortamından alınması da kritik öneme sahiptir. HA'nın fermantasyon ortamından saflaştırmak amacıyla ise ultrafiltrasyon ve mikrofiltrasyon yöntemlerinin kombinasyonunun hızlı ve kararlı olduğu belirlenmiş ve uygun kombinasyonla %89 verim sağlanmıştır (56). HA

saflaştırmak amacıyla kriyojel içerisine hapsedilmiş glukuronik asit polimerlerinin kullanıldığı bir araştırmada oluşturulan yapının balık gözünden ve fermantasyon sıvısından HA'nın saflaştırılmasına olanak sağladığı ortaya konmuştur (57).

### **Fermantasyonla Hyaluronik Asit Üretiminde Karşılaşılan Genel Sorunlar**

Rekombinant hücre teknolojisinin HA üretimi amacıyla kullanılabilirdiği ancak HA üretim miktarının ve moleküler ağırlığının oldukça düşük düzeylerde kaldığı daha önceki çalışmalar incelendiğinde görülmektedir. Bu nedenle araştırmacılar ana mikroorganizma olan ve yüksek moleküler ağırlığına sahip HA üretimine imkân sağlayan *Streptococcus zooepidemicus* ile HA üretim miktarını arttırmayı ve farklı tekniklerle %100'e en yakın saflıkta HA elde etmeyi amaçlamışlardır. Ancak yapılan çalışmalar sonucunda en yüksek %89 saflıkta HA elde edilebilmiş ve HA üretim değeri ancak 6-7 g/L (MA:  $3.2 \times 10^6$  Da) düzeylerine ulaşabilmiştir (29). Hyaluronik asidin fermantasyonla üretiminde karşılaşılan sorunları özetlemek gerekirse (1):

-Fermantasyon sıvısında 4-5 g/L HA seviyesine ulaşıldığında viskozite değerlerinin 400-500 mPas değerlerine ulaşması karıştırmanın etkinliğini ve oksijen transfer oranını azaltmaktadır.

-HA sentezi ile hücre gelişimi paralellik göstermekle birlikte UDP-N-asetil-glukozamin ve UDP-glukuronik asit öncül bileşenlerini kullanma açısından bir yarış söz konusudur.

-HA üretimi sırasında en önemli yan ürün olan laktik asidin, fermantasyon ortamında birikmesi hücre gelişimini kısıtladığından HA üretimi olumsuz etkilenmektedir.

-*Streptococcus zooepidemicus* haricinde seçilen mikroorganizmalarla gerçekleştirilen üretimlerde düşük moleküler ağırlığa sahip HA elde edilmesi.

-*Streptococcus zooepidemicus* haricinde seçilen mikroorganizmalarla gerçekleştirilen üretimlerde düşük miktarlarda HA üretiminin sağlanması.

-Rekombinant hücre teknolojisi ile geliştirilen hücrelerle yapılan denemelerde HA üretim miktarlarının 2 g/L'nin oldukça altında gerçekleşmesi ve HA moleküler ağırlığının istenilen düzeyde olmaması.

-HA asit üretimini engelleyen anahtar mekanizmaların halen açıklanamamış olması.

-Tek düze (uniform) moleküler ağırlığa sahip HA üretiminin tam olarak sağlanamamış olması.

## Sonuç

HA, pazar hacmi 1 milyar doların üzerinde olan bir ürün olup bu derece kullanım potansiyeline sahip bir ürünün ekstraksiyon metotları yerine fermantasyonla üretilebilir oluşu maliyetlerin azaltılması ve üretim miktarlarının artırılması yönünden oldukça avantajlıdır. Son zamanlarda gerçekleşen çalışmaların büyük çoğunluğu da fermantasyonla HA üretiminde karşılaşılan temel sorunların üstesinden gelmek için gerçekleştirilmekte olup burada en temel sorunlar istenilen moleküler ağırlığına sahip HA'nın istenilen oranda ve tekdüze olarak üretiminin sürekli/stabil olarak sağlanamamasıdır. Bundan sonraki çalışmalarda üzerinde durulacak en temel sorunlar bunlar olup ana üretici mikroorganizmaya yeni fermantasyon tekniklerinin kombinasyonu uygulanarak veya yeni denenecek rekombinant sistemlerle stabil ve sürekli olarak HA üretiminin sağlanmasının yolu araştırılacaktır. Gıda takviyesi olarak kullanılan HA, tıp ve biyomedikal alanlarında da yaygın kullanım alanına sahiptir. Elde edilecek sonuçlar dâhilinde üretim miktarı artan ve maliyetleri düşen ürünün kullanım alanının da her geçen gün artacağına şüphe yoktur.

## KAYNAKLAR

1. Liu L., Liu Y., Li J., Du G., Chen J. 2011. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microbial Cell Factories* 10:99.
2. Kuo C. K., Li W. J., Tuan R. S. 2013. Chapter II.6.8 - Cartilage and Ligament Tissue Engineering: Biomaterials, Cellular Interactions, and Regenerative Strategies. *Biomaterials Science (Third Edition) An Introduction to Material in Medicine*, Edited by: Buddy D. Ratner, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen and Jack E. Lemons, Academic Press, UK, pp. 1214-1236.
3. Prestwich G. D., Atzet S. 2013. Chapter I.2.7 - Engineered Natural Materials. *Biomaterials Science (Third Edition) An Introduction to Material in Medicine*, Edited by: Buddy D. Ratner, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen and Jack E. Lemons, Academic Press, UK, pp. 195-209.
4. Gomes M., Azevedo H., Malafaya P., Silva S., Oliveira J., Silva G., Mano R. S. J., Reis R. 2013. 16 – Natural Polymers in Tissue Engineering Applications. *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics (A volume in Plastics Design Library)*, Edited by Sine Ebnesajjad, William Andrew, UK, pp. 385-425.
5. DeRosa T. F. 2013. Next Generation of International Chemical Additives. Elsevier, UK, 565 p.
6. Su Z., Ma H., Wu Z., Zeng H., Li Z., Wang Y., Liu G., Xu B., Lin Y., Zhang P., Wei X. 2014. Enhancement of skin wound healing with decellularized scaffolds loaded with hyaluronic acid and epidermal growth factor. *Materials Science and Engineering C* 44:440-448.
7. Naraghi S. B., Christman K. L. 2013. Chapter 3 – Tissue Engineering and the Role of Biomaterial Scaffolds: The Evolution of Cardiac Tissue Engineering. Edited by Goldenberg R. C. D. S., Carvalho A. C. C. D., *Academic Press*, UK, pp. 43-67.
8. Lopes T. D., Riegel-Vidotti I. C., Grein A., Tischer C. A., Faria-Tischer P. C. D. S. 2014. Bacterial cellulose and hyaluronic acid hybrid membranes: Production and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules* 67: 401-408.
9. Lam J., Truong N. F., Segura T. 2014. Design of cell-matrix interactions in hyaluronic acid hydrogel scaffolds. *Acta Biomaterialia* 10: 1571-1580.
10. Vasi A. M., Popa M. I., Butnaru M., Dodi G., Verestiuc L. 2014. Chemical functionalization of hyaluronic acid for drug delivery applications. *Material Science and Engineering C* 38: 177-185.
11. Ilgin P., Avci G., Silan C., Ekici S., Aktas N., Ayyala R. S., John V. T., Sahiner N. 2010. Colloidal drug carriers from (sub)micron hyaluronic acid hydrogel particles with tunable properties for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers* 82: 997-1003.
12. Liu S., Jin M., Quan Y., Kamiyama F., Kusamori K., Katsumi H., Sakane T., Yamamoto A. 2014. Transdermal delivery of relatively high molecular weight drugs using novel self-dissolving microneedle arrays fabricated from hyaluronic acid and their characteristics and safety after application to the skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 86: 267-276.
13. Graz V., Moros M. 2012. Chapter 14 – Nanocarriers as Nanomedicines: Design Concepts and Recent Advances. *Frontiers of Nanoscience (Volume 4)*, Edited by Palmer R. E., Elsevier, UK, pp. 337-440.
14. Pal K., Paulson A. T., Rousseau D. 2013. 14 – Biopolymers in Controlled-Release Delivery Systems. *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics (A volume in Plastics Design Library)*, Edited by Sine Ebnesajjad, William Andrew, UK, pp. 329-363.



15. Nath S. D., Abueva C., Kim B., Lee B. T. 2015. Chitosan-hyaluronic acid polyelectrolyte complex scaffold crosslinked with genipin for immobilization and controlled release of BMP-2. *Carbohydrate Polymers* 115: 160-169.
16. Uccello-Barretta G., Nazzi S., Zambito Y., Di Colo G., Balzano F., Sans M. 2010. Synergistic interaction between TS-polysaccharide and hyaluronic acid: Implications in the formulation of eye drops. *International Journal of Pharmaceutics* 395: 122-131.
17. Fernández-Ronco M. P., Kluge J., Krieg J., Rodríguez-Rojo S., Andreatta B., Luginbuehl R. Mazzotti M. 2014. Improving the wear resistance of UHMWPE implants by in situ precipitation of hyaluronic acid using supercritical fluid technology. *The Journal of Supercritical Fluids* 95: 204-213.
18. Pitarresi G., Palumbo F. S., Calascibetta F., Fiorica C., Stefano M. D., Giammona 2013. Medicated hydrogels of hyaluronic acid derivatives for use in orthopedic field. *International Journal of Pharmaceutics* 449: 84-94.
19. Yan S., Zhang Q., Wang J., Liu Y., Lu S., Li M., Kaplan D. L. 2013. Silk fibroin/chondroitin sulfate/hyaluronic acid ternary scaffolds for dermal tissue reconstruction. *Acta Biomaterialia* 9: 6771-6782.
20. Zhang J., Ma X., Fan D., Zhu C., Deng J., Hui J., Ma P. 2014. Synthesis and characterization of hyaluronic acid/human-like collagen hydrogels. *Materials Science and Engineering C* 43: 547-554.
21. Li J., He Y., Sun W., Luo Y., Cai H., Pan Y., Shen M., Xia J., Shi X. 2014. Hyaluronic acid-modified hydrothermally synthesized iron oxide nanoparticles for targeted tumor MR imaging. *Biomaterials* 35: 3666-3677.
22. Segari W. A. O., Radwan D. A. E. K., Hamid M. A. A. E. 2014. The effect of adding hyaluronic acid to calcium phosphate on periapical tissue healing following periradicular surgery in dogs. *Tanta Dental Journal* 11: 122-129.
23. Qassemyar Q., Gianfermi M. 2014. Supermicrosurgery and hyaluronic acid: Experimental feasibility study of a new method. *Annales de Chirurgie Plastique Esthétique* Article in Press. Doi: 10.1016/j.anplas.2014.08.015.
24. Price R. D., Berry M. G., Navsaria H. A. 2007. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery* 60: 1110-1119.
25. Özer, E. A., Güven, A. 2008. Fonksiyonel Gıdalar ve Nutrasötikler. Türkiye 10. Gıda Kongresi, 21-23 Mayıs, Erzurum, Türkiye, 1119-1120.
26. Başaran, A. A. 2008. Nutrasötikler. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 28: 146-149
27. EFSA 2009. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to hyaluronic acid and maintenance of joints (ID 1572, 1731, 1932, 3132) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006<sup>1</sup>. *EFSA Journal*, 7(9):1266
28. Chong B. F., Blank L. M., Mclaughlin R., Nielsen L. K. 2005. Microbial hyaluronic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66: 341-351.
29. Hasegawa S., Nagatsuru M., Shibutani M., Yamamoto S., Hasebe S. 1999. Productivity of Concentrated Hyaluronic Acid Using a Maxblend Fermentor. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 88 (1): 68-71.
30. Khanmohammadi M., Khoshfetrat A. B., Eskandarneshad S., Sani N. F., Ebrahimi S. 2014. Sequential optimization strategy for hyaluronic acid extraction from eggshell and its partial characterization. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 20: 4371-4376.
31. Yu H., Stephanopoulos G. 2008. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. *Metabolic Engineering* 10: 24-32.
32. Jeong E., Shim W. Y., Kim J. H. 2014. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of hyaluronic acid with high molecular weight. *Journal of Biotechnology* 185: 28-36.
33. Jia Y., Zhu J., Chen X., Tang D., Su D., Yao W., Gao X. 2013. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for the efficient biosynthesis of uniform hyaluronic acid with controlled molecular weights. *Bioresource Technology* 132: 427-431.
34. Izawa N., Hanamizu T., Sone T., Chiba K. 2010. Effects of fermentation conditions and soybean peptide supplementation on hyaluronic acid production by *Streptococcus thermophilus* strain YIT 2084 in milk. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 109(4): 356-360.
35. Izawa N., Serata M., Sone T., Omasa T., Ohtake H. 2011. Hyaluronic acid production by recombinant *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 111(6): 665-670.
36. Chien L. J., Lee C. K. 2007. Hyaluronic acid production by recombinant *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77: 339-346.
37. Anon 2014. [http://www.biopharma.novozymes.com/en/information-centre/brochures-and-datasheets/Documents/Hyasis\\_A3\\_foldout\\_FINAL\\_Web.pdf](http://www.biopharma.novozymes.com/en/information-centre/brochures-and-datasheets/Documents/Hyasis_A3_foldout_FINAL_Web.pdf) (Accessed 27.10.2014)
38. Huang W. C., Chen S. J., Chen T. L. 2006. The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic acid fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 32: 239-243.

39. Liu L., Du G., Chen J., Wang M., Sun J. 2009. Comparative study on the influence of dissolved oxygen control approaches on the microbial hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 32: 755-763.
40. Lai Z. W., Rahim R. A., Ariff A. B., Mohamad R. 2012. Biosynthesis of high molecular weight hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* using oxygen vector and optimum impeller tip speed. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 114(3): 286-291.
41. Huang W. C., Chen, S. J., Chen T. L. 2008. Production of hyaluronic acid by repeated batch fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 40: 460-464.
42. Liu L., Du G., Chen J., Wang M., Sun J. 2008. Influence of hyaluronidase addition on the production of hyaluronic acid by batch culture of *Streptococcus zooepidemicus*. *Food Chemistry* 110: 923-926.
43. Liu L., Du G., Chen J., Wang M., Sun J. 2008. Enhanced hyaluronic acid production by a two-stage culture strategy based on the modeling of batch and fed-batch cultivation of *Streptococcus zooepidemicus*. *Bioresource Technology*, 99: 8532-8536.
44. Patil K. P., Kamalja K. K., Chaudhari B. L. 2011. Optimization of medium components for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* MTCC 3523 using a statistical approach. *Carbohydrate Polymers* 86: 1573-1577.
45. Zhang J., Ding X., Yang L., Kong Z. 2006. A serum-free medium for colony growth and hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* NJUST01. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72: 168-172.
46. Liu L., Wang M., Du G., Chen J. 2008. Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline-stress strategy. *Letters in Applied Microbiology* 46: 383-388.
47. Im J. H., Song J. M., Kang J. H., Kang D. J. 2009. Optimization of medium components for high-molecular-weight hyaluronic acid production by *Streptococcus* sp. ID9102 via a statistical approach. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36: 1337-1344.
48. Chen S. J., Chen J. L., Huang W. C., Chen H. L. 2009. Fermentation process development for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. *Korean Journal of Chemical Engineering* 26(2): 428-432.
49. Pires A. M. B., Santana M. H. A. 2010. Metabolic effects of the initial glucose concentration on microbial production of hyaluronic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162: 1751-1761.
50. Pires A. M. B., Eguchi S. Y., Santana M. H. A. 2010. The influence of mineral ions on the microbial production and molecular weight of hyaluronic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162: 2125-2135.
51. Pires A. M. B., Macedo A. C., Eguchi S. Y., Santana M. H. A. 2010. Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives. *Bioresource Technology* 101: 6506-6509.
52. Badle S. S., Jayaraman G., Ramachandran K. B. 2014. Ratio of intracellular precursors concentration and their flux influences hyaluronic acid molecular weight in *Streptococcus zooepidemicus* and recombinant *Lactococcus lactis*. *Bioresource Technology* 163: 222-227.
53. Jagannath S., Ramachandran K. B. 2010. Influence of competing metabolic processes on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*. *Biochemical Engineering Journal* 48: 148-158.
54. Chen W. Y., Marcellin E., Hung J., Nielsen L. K. 2009. Hyaluronan molecular weight is controlled by UDP-N-acetylglucosamine concentration in *Streptococcus zooepidemicus*. *The Journal Of Biological Chemistry* 284(27): 18007-18014.
55. Armstrong D. C., Johns M. R. 1997. Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *Applied and Environmental Microbiology* 63(7): 2759-2764.
56. Zhou H., Ni J., Huang W., Zhang J. 2006. Separation of hyaluronic acid from fermentation broth by tangential flow microfiltration and ultrafiltration. *Separation and Purification Technology* 52: 29-38.
57. Ünlüer Ö. B., Ersöz A., Denizli A., Demirel R., Say R. 2013. Separation and purification of hyaluronic acid by embedded glucuronic acid imprinted polymers into cryogel. *Journal of Chromatography B* 934: 46-52.

## BAHARATIN MİKROBİYEL YÜKÜNÜ AZALTMADA KULLANILAN YENİ YÖNTEMLER

Esra Altıparmak Ergin<sup>1</sup>, N. Nilüfer Demirel Zorba<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği ABD, Çanakkale

<sup>2</sup>Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Çanakkale

Geliş tarihi / Received: 26.12.2014

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 25.02.2015

Kabul tarihi / Accepted: 01.04.2015

### Özet

Baharat yoğun olarak tüketilen doğal gıda katkı maddeleridir. Ancak baharatın mikrobiyel yükleri veya mikotoksin içeriği yasal sınırların üzerinde olabildiğinden tüketimi sakıncalı hale gelebilmektedir. Bu durumda ihracatı yapılan ürünler diğer ülkelerde de kabul edilmemekte ve ekonomik kayıplar artmaktadır. Bu nedenle baharatın mikrobiyel yükünü azaltmada farklı işleme yöntemleri denenerek bu sorunlar giderilmeye çalışılmaktadır. Geleneksel buhar sterilizasyonuna alternatif olarak kullanılan ışınlama, elektriksel ısıtma, ozonlama, soğuk plazma ve yüksek basınç yöntemleri çeşitli baharatla yapılan çalışmalara konu olmuş ve bazı uygulamaların sonrasında mikroorganizmalar üzerinde etkili sonuçlar alınmıştır. Değişik konsantrasyon ve dozlarda uygulanan söz konusu yöntemler mikroorganizma yükünü azaltmış, ancak baharatın besinsel ve duyuşsal özelliklerinde bir takım değişikliklere neden olmuştur. Bu nedenle baharatın mikrobiyel yükünü azaltmada kullanılacak, maliyet açısından uygun, duyuşsal özellikler üzerinde en az değişikliğe neden olacak yöntemlerin geliştirilmesi üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Bu makalede yeni yöntemlerin baharatın mikrobiyel yükü üzerine etkileri derlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Baharat, mikrobiyel yük, yeni teknolojiler

## APPLICATION OF NEW TECHNOLOGIES FOR DECONTAMINATION OF SPICES

### Abstract

Spices are natural food additives with high consumption. However, the microbial load or mycotoxin content of spices could be above the permitted limits and sometimes consumption of them becomes unsafe. In this case, exports of these products are not also accepted by other countries and this increase economic losses. Therefore, these problems are tried to overcome by using different processing methods. Irradiation, electrical heating, ozone, high pressure and cold plasma methods as alternative methods to steam sterilization have been the subject of studies with various spices. Effective inactivation of microorganisms was reported in some methods. However, application of some of these methods at high concentration or dosages causes decrease in the nutritional and sensory quality of spices. Therefore, the studies continue to develop methods those are cost- effective, causing least change on organoleptic characteristics and effective in inactivation of microorganisms. In this review, effects of these methods on spices's microbial loads were summarized.

**Keywords:** Spice, microbial load, novel technologies

\*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ dnukhet@comu.edu.tr, © (+90) 286 218 0018 – 2260, ☎ (+90) 286 218 0541

## GİRİŞ

Genellikle bitki yaprakları, çiçekleri, tohumlarından oluşan baharat, belirli koku ve lezzetleri olan, iştah açmak, sindirimi kolaylaştırmak, şifa bulmak ve koruyucu amaçlarla kullanılan gıda katkı maddeleridir. Baharat ve aromatik bitkiler ülkelerin ekonomi ve kültürlerinin gelişmesini etkilemiş ve savaşlara sebep olmuştur. Baharata 13. yüzyılda altın kadar kıymet verilmiş, para olarak kullanılmıştır. Ayrıca baharat, ülkeleri yeni ticaret yolları araştırmaya itmiş ve yeni kıtaların keşfedilmesini sağlamıştır (1).

Baharat sözcüğünün İngilizcesi olan "spices" kelimesinin, Latince "species" yani "dünya meyveleri" anlamına gelen kelimedenden türediği bildirilmiştir. Türkçede ise anlamını "baharlı bitkiler" den aldığı bildirilmektedir (1).

Baharat hem ülkemizde hem de dünyada tüketimi fazla olan doğal gıda katkı maddeleridir. Ancak mikrobiyel yükleri ve içerdikleri mikotoksinler nedeni ile gıda güvenliği açısından riskli ürünlerdir. Üretim şekillerine göre kök, yaprak veya bitkinin farklı bölgelerinden elde edilmelerine bağlı olarak değişik mikrobiyel floraya ve yüke sahiptir. Gıda üretiminde hammaddenin ve katkı maddelerinin mikrobiyel yükünün son ürüne yansıyor olması, baharatın mikrobiyel kalitesinin önemini arttırmıştır.

Baharat, su aktivitesi düşük olduğundan çabuk bozulan gıdalar değildir ancak su aktivitesi yüksek olan gıdalarla karıştırıldığında mikrobiyel risk de artmaktadır (2). Baharat kaynaklı besin zehirlenmelerinin artmasıyla çalışmalar baharatın mikrobiyel yükü ve dekontaminasyonu üzerinde yoğunlaşmıştır (3-5). Bu derlemede baharatın mikrobiyel yükleri hakkında yapılan çalışmalar incelenmiş ve baharatın mikrobiyel yükünü azaltmada uygulanan yöntemlerden bahsedilmiştir.

### BAHARATIN MİKROBİYEL YÜKÜ ÜZERİNE YAPILAN ÇALIŞMALAR

Ülkemizde ve farklı ülkelerde satışa sunulan baharatın mikrobiyolojik kalitesi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Tekirdağ ilinde yapılan bir çalışmada çeşitli baharatın toplam mezofilik aerobik sayısının  $10^2$ - $10^8$  KOB/g, koliform sayısının  $0$ - $10^4$  KOB/g, küf ve maya sayısının  $10^2$ - $10^6$  KOB/g ve sporlu bakteri sayısının  $10^4$  ile  $10^6$  KOB/g aralığında değiştiği belirlenmiştir (6). Özkızılçık ve ark. (7)

İzmir'de satışa sunulan kekik, kimyon ve benzeri baharatta toplam mezofilik aerobik sayısının  $10^2$  ile  $10^8$  KOB/g aralığında olduğunu bildirmişlerdir (7).

Diğer ülkelere baktığımızda ise Hindistan'daki çeşitli baharatta toplam mezofilik aerobik sayısının 4 ile 9 log KOB/g aralığında olduğu görülmektedir. Ayrıca örneklerin çoğunda *Bacillus cereus* pozitif, olarak belirlenmiştir (8, 9). Mandell (10), Bahreyn'de satılan çeşitli baharatı incelemiş ve küf-maya yükünün 258-1462 KOB/g aralığında değiştiğini belirtmiştir.

Mısır'da yapılan bir çalışmada ise baharatın toplam mezofilik aerobik sayısı  $10^6$ - $10^8$  KOB/g, koliform bakteri  $10^1$ - $10^3$  KOB/g düzeyinde gözlenmiştir (11). İngiltere'de 2965 baharat örneği incelenmiş ve örneklerde *B. cereus*  $1.0 \times 10^4$ - $2,3 \times 10^7$  KOB/g, *C. perfringens*  $> 10^3$  KOB/g, *E. coli*  $2.4 \times 10^3$ - $1.0 \times 10^7$  KOB/g olarak belirlenmiştir (12). Tahran'da ise baharat örneklerinin toplam mezofilik aerobik sayısının  $10^2$  ile  $10^9$  KOB/g, küf sayısının  $10^2$  ile  $10^6$  KOB/g aralığında değiştiği bildirilmiştir (13).

Çalışmalarda da görüldüğü gibi baharatın mikrobiyel yükü geniş bir aralıkta değişmektedir. Bunda baharat tipinin, yetiştirme ve üretim koşullarındaki hijyen şartlarının etkisi büyüktür.

### BAHARATIN MİKROBİYEL YÜKÜNÜN AZALTILMASINA YÖNELİK ÇALIŞMALAR

Gıda ürünlerinde mevcut olan mikroorganizmaların kontrolü için geçmişten günümüze kadar çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Bu yöntemler arasında en çok tercih edilen buhar sterilizasyonunun, baharatın mikrobiyel yükünü 2-5 log KOB/g düzeyinde azalttığı gözlenmiştir (14-18). Ancak, buhar ve ısı uygulaması baharatın görünümü ve aroması üzerinde olumsuz etki yapmakta ve küf bulaşma riskini arttırmaktadır (3). Diğer yandan etilen oksit uygulaması, baharatta kalıntı bıraktığı için yerini yeni yöntemlere bırakmaktadır (1). Bu nedenle araştırmacılar gelişen teknoloji ile birlikte, baharatın mikrobiyel yükünü azaltmada farklı yöntemler denemeye başlamıştır. Denenen yeni teknolojiler arasında ışınlama, elektriksel ısıtma yöntemleri, ozonlama, soğuk plazma ve yüksek basınç yöntemleri yer almış ve yapılan bazı uygulamaların sonrasında mikroorganizmalar üzerinde etkili sonuçlar alınmıştır. Söz konusu yöntemlerin baharatta uygulanmasına ilişkin çalışmalar sırasıyla açıklanmıştır.

### Gama ışın uygulamaları

Gama ışınları mikroorganizmalarda DNA hasarına yol açarak inaktivasyon sağlar. Baharatın ışınlanmasında mikrobiyel yükü elimine edecek maksimum seviye uygulanırken ışınlamanın olumsuz etkilerini en aza indirecek seviyede uygulama yapılmaya çalışılmaktadır. Çünkü ışınlama sonucunda serbest radikaller, radyolitik ürünler ve bazı istenmeyen bileşiklerin oluşabildiği bildirilmiştir. Bunun yanı sıra tarçın ve karabiber gibi bazı çeşitlerin aroma verici bileşenlerinde azalma meydana gelebilmektedir (3). Diğer yandan yapılan bazı çalışmalarda baharatın lezzet ve aromasının ışınlama sonrasında önemli düzeyde etkilenmediği, indirgen şeker miktarında hafif artış olduğu belirtilmiştir (1).

Gıdalarda uygulanan ışınlama dozlarına bakıldığında 10 kGy gama radyasyonun baharatta ticari steriliteyi sağlamada yeterli olduğu görülmüştür. Baharatın işlendiği ortamların hijyenik olması durumunda ise 7 kGy'lik dozunda yeterli olduğu belirtilmiştir (13).

Szabad ve Kiss'in, 1979, kırmızı biberlerde yaptıkları çalışmada 5 kGy radyasyon dozu uygulanarak mezofilik aerobik bakteri sayısında 2.5 log KOB/g azalma gözlenmiştir. 11 kGy'e kadar yapılan uygulamalarda ise koliform grubu bakteriye rastlanmadığı bildirilmiştir (1). Diğer bir çalışmada ise baharata uygulanan 4–10 kGy dozda ışınlama sonucunda, karabiber, beyaz biber, zerdeçal ve fesleğende koliform grubu bakterilerin tamamen yok edildiği belirlenmiştir. 10 kGy dozdaki ışınlama sonucunda spor oluşturan bakteri sayısı  $10^5$  KOB/g'ın altına, 12–15 kGy dozda ise toplam aerobik bakteri sayısı kabul edilebilir seviyeye çekilebilmiştir (19).

Waje ve ark. (16), ışınlama (10 kGy) uyguladıkları karabiber örneklerini 4 ve 20 °C' de 6 ay depolamışlardır. Araştırmacılar, 4 °C'deki depolanan örneklerde toplam aerobik bakteri sayısında 4 log KOB/g, koliform sayısında 5 log KOB/g, küf ve maya sayısında 3 log KOB/g azalma belirlemişlerdir. 20 °C'deki örneklerde ise toplam aerobik bakteri sayısında 3 log KOB/g, koliform sayısında 2 log KOB/g, küf ve maya sayısında 1 log KOB/g azalma olduğunu gözlemlemişlerdir.

Yapılan diğer bir çalışmada Sadecka (17), karabiber örneklerine gama ışını (5 kGy, 10 kGy ve 30 kGy) uygulamıştır. Uygulama sonrasında tüm dozlarda toplam canlı sayısında 6 log KOB/g, koliform sayısında ve küf -maya sayısında 1 log KOB/g azalma gözlemlemiştir.

Mikrobiyel yükteki azalmanın yansira uçucu bileşenlerde de azalma olduğu görülmüştür. Tarçın örnekleriyle yapılan bir çalışmada 0, 5, 10, 15, 20 ve 25 kGy ışın uygulanmıştır. Uygulama sonrasında örneklerdeki uçucu bileşiklerde yaklaşık % 56 – % 89.5 düzeyinde önemli bir azalma meydana geldiği belirlenmiştir (20).

### Mikrodalga Işın ve Radyo Frekans Uygulamaları

Gıdaların özellikle su moleküllerinin hareketine neden olan mikrodalga ışınları, ısı çeşidi değil, bir enerji biçimidir. Moleküllerin hareketi sonucunda oluşan sürtünmenin etkisiyle ısı açığa çıkar. Mikrodalga ışınları gıda endüstrisinde 915 – 2450 MHz frekans aralığında kullanılmaktadır (21). Radyo frekans ısıtma ise belirli frekanslardaki elektromanyetik dalgalardan faydalanarak, ısının gıda içerisinde oluşturulduğu, mikroorganizmaları sıcaklık prensibine dayanarak inhibe eden, 13.56 – 27.12 ve 40.68 MHz frekanslarda uygulanan teknolojidir (22).

Kim ve ark.(23), *Salmonella* Typhimurium ve *Escherichia coli* O157:H7 inoküle ettikleri karabiber ve kırmızıbiber örneklerine 27.12 MHz radyo frekans ısıtma uygulamışlardır. Mikrobiyel yükün karabiber örneklerinde 50 s sürede 2.80 – 4.29 log KOB/g, kırmızıbiber örneklerinde ise 40 s sürede 3.38 – 5.0 log KOB/g düzeyinde azaldığını bildirmişlerdir.

Yerel marketlerden temin edilen çeşitli baharata ev tipi mikrodalga prosesi uygulanmıştır. 16 adet örnekte yapılan çalışmada başlangıç ortalama yükü aerobik mezofil bakteri sayısı  $1.18 \times 10^5$ – $5.1 \times 10^5$  KOB/g, mezofil sporlu bakteri sayısı  $1.2 \times 10^2$  –  $1.2 \times 10^4$  KOB/g, küf ve maya sayısı ise  $1.0 \times 10^3$  –  $2.2 \times 10^4$  KOB/g olarak belirlenmiştir. Uygulama sonrasında küf ve maya sayısında 1– 3 log KOB/g arasında, aerobik mezofil bakteri sayısında 1–5 log KOB/g arasında düşüş olurken, spor oluşturan bakteri sayısında 1–2 log KOB/g azalma olmuştur (24).

Jeong ve Kang (25) farklı nem seviyelerine sahip kırmızı ve karabiberlere *E. coli* O157H7 ve *S. Typhimurium* inoküle ettikten sonra 27.12 MHz düzeyinde radyo frekans ısıtma uygulamışlardır. Mikroorganizmaların 7 log KOB/g düzeyinde inhibe olduğunu ve nem miktarları arttıkça inhibisyonun daha kısa sürede sağlandığını belirtmişlerdir.

### Kızılötesi (infrared) Işın Uygulamaları

Kızılötesi ışınları, dalga boyu mikrodalga ışınlardan daha kısa (750 nm ile 1 mikrometre) olan elektromanyetik ışınlardır. Kızılötesi radyasyonun

en çok hasar verdiği yapının proteinler olduğu, onları sırasıyla RNA, hücre duvarı ve DNA takip ettiği gözlenmektedir (26).

Kırmızıbiberlere 5 kW/m<sup>2</sup> orta dalga kızılötesi ve 11 kW/m<sup>2</sup> kısa dalga kızılötesi ışınları uygulandıktan sonra farklı su aktivitelerindeki örneklerin mikrobiyel yükündeki değişime bakılmıştır. *B. cereus* spor sayısında 0.96 su aktivitesinde 5 kW/m<sup>2</sup> orta dalga kızılötesi uygulama sonrasında 5 log KOB/g azalma gerçekleşmiş, 11 kW/m<sup>2</sup> kısa dalga kızılötesi ışın uygulaması sonrasında ise 6 log KOB/g azalma saptanmıştır (27).

Karabiber tanelerinde yapılan çalışmada uzun dalga kızılötesi ışın uygulamasının mikrobiyel yüke etkisi araştırılmıştır. Örneklerin toplam mezofilik aerobik bakteri sayısının 300°C'de 4.7 dakika uygulama sonrasında, 350°C'de ise 3.5 dakika uygulama sonrasında 4 log KOB/g düzeyinde azaldığı belirlenmiştir (28).

Diğer bir çalışmada ise 7 log spor/g *B. cereus* ile inoküle edilen kırmızıbiberlere kısa dalga kızılötesi ışın uygulandıktan sonra 0.76 ve 0.84 su aktivitesinde 7°C'de depolanmıştır. Depolanmanın 4 aylık test periyodu sonunda ise *B. cereus* seviyesinin 2–3 log spor/g aralığında seyrettiği belirlenmiştir (29).

Kekik yapraklarına (aw: 0.88) uygulanan kısa dalga kızılötesi ışınlarının *B. cereus* sporlarını 5.6 log KOB/g düzeyinde azalttığı bildirilmiştir (30).

### Ozon Uygulamaları

Ozon atmosferde doğal halde bulunan bir maddedir. Ozon uygulamalarının gıda endüstrisindeki kullanım avantajları düşük konsantrasyonda etkili olması, temas süresi ve yarılanma ömrünün nispeten kısıtlılığı, keskin kokusu nedeniyle çabuk fark edilebilmesi, çabuk parçalandığından çevreye zararsız olması, kanserojen veya mutajen olmamasıdır. Molekül halindeki ozon veya ozonun ayrılan hidroksil radikal gibi ürünleri kalıntı bırakmadan mikroorganizmaları hızlı bir şekilde inaktive edebilmektedir. Gıda endüstrisinde uygulanabilirliği açısından birçok avantajı vardır fakat yüksek dozda ozon kullanımı gıdaların kalite parametrelerinde istenmeyen sonuçlara neden olabilmektedir (31).

Zhao ve Cranston 1999'un tane karabiber örneklerine 6.7 mg/l ozonu 6 saat gaz şeklinde uyguladıktan sonra örneklerde toplam canlı sayısında 6 log KOB/g azalma saptadıkları bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada ise *E. coli*,

*B. cereus* ve *B. cereus* sporları inoküle edilen kırmızıbiberler 20 °C ve % 70 nemde ozon gazı ile muamele edilmiştir. Örnekler 1.0 ppm ozon gazı 360 dakika süre ile uygulandığında *B. cereus* ve *E. coli* sayısı 1.5 ve 2 log KOB/g azalırken, 7.0 mg/l ozon gazı 360 dakika uygulandığında ise *B. cereus* sporlarında 1.5 log KOB/g azalma tespit edilmiştir (32).

Asill ve arkadaşları (33), kekik, nane, kedi otu, sater otu gibi tıbbi bitkilere farklı konsantrasyon ve sürede ozon gazı uygulamışlardır. Bu çalışma sonucunda ozon gazı uygulama süresi ve konsantrasyonu arttıkça mikroorganizma sayılarında daha fazla düşüş olduğu saptanmıştır. Ayrıca ozon gazının küf ve mayalar üzerinde diğer mikroorganizma grupları göre daha etkili olduğu görülmüştür.

Yapılan diğer bir çalışmada ise kurutulmuş keklik otuna 2.8 ve 5.3 mg/l ozon gazı 30, 60, 90 ve 120 dakika uygulanmıştır. 120 dakika 2,8 mg/l ozon gazı uygulaması aerobik toplam canlı sayısında 2.7 log KOB/g, küf ve maya sayısında ise 1.8 log KOB/g azalma sağlamıştır. 90 dakika 5.3 mg/g ozon gazı uygulaması ise aerobik toplam canlı sayısını 3.2 log KOB/g düşürmüştür. Örnekler 5.8 log KOB/g düzeyinde *Salmonella* inoküle edilmiş, 2.8 mg/l ve 5.3 mg/l ozon gazının 120 dakika boyunca uygulanmasının *Salmonella* sayısında sırasıyla 2.8 ve 3.7 log KOB/g azalma sağladığı tespit edilmiştir (34). Bununla birlikte 0–20 mg/l düzeyindeki ozon gazının doğrudan veya suya verilerek 5–60 dakika boyunca uygulanmasının mikrobiyel yükte belirgin bir azalma sağlamadığını belirten çalışmalar da bulunmaktadır (35, 36).

### Soğuk Plazma Uygulamaları

Plazma, maddenin uyarılmış atom ve moleküller, iyonize gazlar, serbest radikaller gibi kimyasal bileşikler ve elektronlardan tamamını ya da bir kısmını içeren yüksek enerji verilmiş dördüncü halidir. Atom ve moleküllerin elektriksel yapısını yeniden düzenlemek ve uyarılmış türler ve iyonlar üretmek için bir gaz enerji uygulanarak oluşturulmaktadır. Ortam sıcaklığında ya da öldürücü dozun altındaki sıcaklıklarda mikroorganizmaların atomik olarak aşınması ve genetik materyalinin yıkımıyla mikroorganizmaları yok edebilmektedir (37).

Karabiberlerle yapılan bir çalışmada sterilizasyon için mikrodalga ile oluşturulan plazmanın etkinliği araştırılmıştır. 10<sup>6</sup> ve 10<sup>7</sup> spor/g seviyesinde

*B. subtilis* sporları içeren karabiberlere düşük basınçlı hava plazması uygulanmıştır. Uygulama sonucunda sporların DNA'sının yıkıma uğradığı ve mikrobiyel yükün sıfırlandığı saptanmıştır (38).

Diğer bir çalışmada *Aspergillus flavus* ve *B. cereus* sporları ile inoküle edilmiş kırmızıbiber tozu örneklerine mikrodalga destekli soğuk plazma (CPT) uygulaması yapılmıştır. CPT uygulaması 900 W, 667 Pa azot ile birlikte 20 dakika yapıldığında *A. flavus* sporlarında  $2.5 \pm 0.3$  log spor/g, toplam aerobik bakteri sayısında 1 log KOB/g azalma sağlamıştır. Kırmızı biber tozu inoküle edildikten sonra 900 W'da helyum-oksijen gaz karışımı ve 90 °C'de 30 dakika sıcaklık uygulaması ile soğuk plazma uygulandığında  $3.4 \pm 0.7$  log spor/g inhibe edilmiştir (39).

Sun ve ark.(40), *Salmonella* spp. inoküle etikleri tane karabiberlere atmosferik basınç plazma (APP) uygulamışlardır. Araştırmacılar, *Salmonella* sayısındaki azalmanın işlem süresine bağlı olduğunu, 60–80 s uygulama sonunda 4.5–5.5 log KOB/g azalma olduğunu bildirmişlerdir.

#### **Yüksek Basınç Uygulamaları**

Yüksek basınç, gıdanın raf ömrünü arttırmak için yapılan katı ve sıvı gıdalara ambalajlı ya da ambalajsız olarak 100–1000 MPa basınç uygulanmasıdır. Bu oranlardaki basınç mikroorganizmaların hücre zarına zarar verir, devamında protein ve enzim denatürasyonu ile mikroorganizmaları inaktive eder (41).

Karabiberlerin mikrobiyel yükünü azaltmak için karabiberlere farklı sıcaklıklarda (60–80–100–140°C), 30 dakika 1000 MPa basınç uygulanmıştır. Tüm uygulamalar sonucunda vejetatif mikroorganizmaların tamamı inaktive edilmiştir. 1000 MPa basınç uygulamasında 60 °C'de küf sporlarının % 84.3'ü öldürülmüştür. Bakteri sporlarının ise 1000 MPa 140°C'de % 99.9'u inaktive edilmiştir (42).

#### **Darbeleri Işık Uygulamaları**

Darbeleri ışık, ultraviyole ışınca zengin, geniş spektrumlu kısa darbeleri kullanarak mikroorganizmaları öldüren, yüzey dezenfeksiyonunu sağlayan bir yöntemdir (41).

Yapılan bir çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* inoküle edilen buğday unu ve karabiber örneklerine 58 J/cm<sup>2</sup> darbeleri ışık uygulaması yapılmış ve örneklerdeki mikrobiyel yükte 1 log KOB/g azalma olduğu belirtilmiştir (43).

Nicorescu ve ark. (44), *B. subtilis* ile inoküle ettikleri kimyon, karabiber ve kırmızıbiber örneklerine, 3000 V'da 1 Hz'lik 10 darbeleri ışık uygulamışlardır. Karabiber ve kimyon örneklerinde 0.8 log KOB/g azalma olurken, kırmızıbiber örneklerinde 1 log KOB/g azalma tespit etmişlerdir.

#### **Darbeleri Elektrik Alan Uygulamaları**

Vurgulu elektrik alan, 2 – 300 ms gibi kısa sürelerde ve yüksek elektriksel alan ile yapılan bir uygulamadır. Uygulama iki elektrot arasında konulan gıdaya 20 – 80 kV/cm<sup>2</sup> arası yüksek voltaj verilerek yapılmaktadır. Uygulama mikroorganizmaların hücre membranının geçirgenliğini artırarak koruyucu özelliğini yitirmesine sebep olur (45).

Keith ve ark. (46), darbeleri elektrik alanın soğan tozu, dereotu ve fesleğen örneklerindeki mikrobiyel yük üzerine etkinliğini araştırmışlardır. Soğan tozu örneklerinde 25 kV/cm, 5 µs, 200 ms süre, dereotu örneklerinde 12 kV/cm, 10 µs, 320 ms süre, fesleğen örneklerinde ise 10 kV/cm, 5 µs, 320 ms süre uygulandığında toplam aerobik canlı sayılarında yaklaşık 1 log KOB/g azalma olduğunu bildirmişlerdir.

#### **Kombine Yöntemler**

Yapılan araştırmalar mikrobiyel yükü yüksek olan baharata uygulanan yöntemlerin tek başına yeterli olmadığını göstermiştir. Bu nedenle farklı yöntemlerin birlikte kullanımı üzerine araştırmalar yapılmıştır.

Kurutulmuş kırmızıbiberler buhar ile ısı işlem gördükten sonra 10 kGy gama ışınına maruz bırakılmıştır. Bu işlemler sonucunda başlangıç yükü 10<sup>6</sup> KOB/g olan mikroorganizma sayısında 1–2 log KOB/g azalma saptanmıştır. Işınlanmış örneklerde kapsantin miktarında azalma gözlenmiştir. Bunun dışında bileşenlerinde bir değişiklik gözlenmemiştir (47).

Kimyon tohumlarına uzun dalga kızılötesi (Far Infrared – FIR) ve ultraviyole (UVC) ışınları iki farklı şekilde uygulanmış ve toplam mezofilik aerobik canlı sayısına etkisi incelenmiştir. 200°C 5.5 dakika, 250°C 4.5 dakika ve 300°C'de 3 dakika FIR uygulaması sonrasında sırasıyla 2 log KOB/g, 3 log KOB/g ve 2 log KOB/g azalma olduğu saptanmıştır. 200°C 5.5 dakika, 250°C 4.5 dakika ve 300°C'de 3 dakika FIR, ardından UVC uygulaması sonrasında ise sırasıyla ilave 1 log KOB/g azalma olduğu belirlenmiştir (48).

Çeşitli baharata gama ışını ve etilen oksit kombinasyonu uygulanmış ve örneklerin toplam bakteri sayısındaki değişim gözlenmiştir. Ortalama başlangıç yükü  $4.0 \times 10^6$  KOB/g olan karabiber örneklerinde 16 kGy ışınlama sonrasında 6 log KOB/g ve başlangıç yükü ortalama  $9.9 \times 10^6$  KOB/g olan kırmızıbiberlerde ise 10 kGy ışınlama sonucunda 6 log KOB/g azalma tespit edilmiştir (49). Kirkin ve ark. (50), gama ışını (7 kGy, 12 kGy ve 17 kGy) uygulayıp ve modifiye atmosferle (%100 N<sub>2</sub>) paketledikleri kekik, biberiye, karabiber ve kimyon örneklerinin toplam canlı, küf ve maya içeriği üzerine etkinliğini incelemişlerdir. Toplam canlı sayısı başlangıç yükü 4.5–5.5 log KOB/g olan kekik, biberiye ve kimyon örneklerine 7 kGy ve üzerindeki dozlar uygulandığında mikrobiyel yük tespit edilemeyecek miktarlara düşmüştür. Başlangıç yükü 7 log KOB/g olan karabiber örneğinde ise 7 kGy dozdaki ışın uygulama sonrasında toplam canlı sayısında 3.3–3.8 log KOB/g azalma tespit edilmiş, 12 kGy ve üzeri gama ışını uygulanan tüm örneklerde mikrobiyel yük saptanamamıştır.

Cheon ve ark. (51) orta dereceli ısı uygulaması (65 °C) ve UVC (20.4kJ/m<sup>2</sup>) uygulamasını kombine ederek 10 dk süre ile *E. coli* O157:H7 ve *S. Typhimurium* inokule ettikleri kırmızıbiberlere uygulamışlar ve bu mikroorganizmaların sayılarında sırasıyla 2.88 ve 3.06 log KOB/g azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer şekilde, Ha ve Kang (52) toz kırmızıbiberine inokule ettikleri *E. coli* O157:H7 ve *S. Typhimurium* üzerine yakın kızılötesi ve UV uygulamalarını kombine ederek uyguladıklarında sırasıyla 2.78 ve 3.34 log KOB/g azalma sağladıklarını belirtmişlerdir.

### SONUÇ ve ÖNERİLER

Geleneksel yöntemlerin mikrobiyel yükü azaltmadaki rolü etkin olmakla birlikte, ısıl işleme dayalı sterilizasyon baharatın organoleptik özelliklerinde istenemeyen değişimlere neden olabilmektedir. Diğer taraftan alternatif yöntemler gerek tek başına gerek kombine şekilde uygulandığında aynı etki sağlanabilmekte ve kalite özellikleri daha iyi korunabilmektedir. Bu yöntemler kullanıldığında hammadde kaybı azalacağından üretimde verimliliğin artacağı düşünülmektedir. Uzun vadede düşünüldüğünde, hammadde kaybı minimum olacağından karlılık artacak ve bu yöntemlerin ilk kurulum maliyetini karşılayacaktır.

Yeni yöntemlerin çeşitli kombinasyonlarının denenmesine ilişkin araştırmalar devam etmektedir. Böylelikle sanayiye yeni yöntemler adapte edilerek kalitesi yüksek son ürünler elde edilebilir.

### KAYNAKLAR

1. Abbas SMN, Halkman, K. 2003. Baharat mikroflorası üzerine ışınlamanın etkisi, *Orlab On-Line Mikrobiyol Derg*, 1(3): 43-65.
2. Schweiggert U, Schieber R, Schieber, A. 2007. Conventional and alternative processes for spice production – a review, *Trends Food Sci Technol* 18(15): 260-268.
3. Yılmaz H, Şanlıer N 2014. Baharat ışınlama, *Gıda*, 39(2): 111-118.
4. Zweifel C, Stephan R. 2012. Spices and herbs as source of *Salmonella*- related foodborne diseases, *Food Res Int*, 45: 765-769.
5. Atungulu GG, Pan Z, Dermirci A, Ngadi MO. 2012. Microbial decontamination of nuts and spices. *Microbial Decontamination in the Food Industry: novel methods and applications*, A Demirci and MO Ngadi (eds.), Woodhead Publishing, Philadelphia, USA. pp 125-162.
6. Coşkun F. 2010. Tekirdağ piyasasında satılan bazı baharatların mikrobiyolojik özellikleri, *Tekirdağ Ziraat Fak Derg*, 7(1): 85-93.
7. Özkızılçık A, Ateş M, Çerçi B. 2012. Comparison of real-time PCR and conventional cultural methods to detect *Escherichia coli* O157:H7 in spices in Turkey, *IUFS J Biol*, 71(2): 113-120.
8. Banerjee M, Sarkar, PK. 2003. Microbiological quality of some retail spices in India, *Food Res Int*, 36: 469-474.
9. Banerjee M, Sarkar PK. 2004. Growth and enterotoxin production by sporeforming bacterial pathogens from spices, *Food Control*, 15: 491-496.
10. Mandeel AQ. 2005. Fungal contamination of some important spices, *Mycopathologia*, 159: 291-298.
11. Donia MAA. 2008. Microbiological quality and aflatoxinogenesis of Egyptian spices and medicinal plants, *Global Vet*, 2 (4): 175-18.
12. Sagoo SK, Little CL, Greenwood M, Mithani V, Grant, KA, McLauchlin J, de Pinna E, Threlfall EJ. 2009. Assessment of the microbiological safety of dried spices and herbs from production and retail premises in the UK, *Food Microbiol*, 26(1): 39-43



13. Dehkordy PKK, Nikoopour H, Siavoshi F, Koushki M, Abadi A. 2013. Microbiological quality of retail spices in Tehran, Iran, *J Food Prot*, 76(5): 843-848.
14. Almela L, Nieto-Sandoval JM, Lopez JAF. 2002. Microbial inactivation of paprika by a high-temperature short-time treatment influence on color properties, *J Agric Food Chem*, 50: 1435-1440.
15. Lilie M, Hein S, Wilhelm P, Mueller U. 2007. Decontamination of spices by combining mechanical and thermal effects; an alternative approach for quality retention, *Int J Food Sci Technol*, 42: 190-193.
16. Waje CK, Kim HK, Kim KS, Todoriki S, Kwon JH. 2008. Physicochemical and microbiological qualities of steamed and irradiated ground black pepper (*Piper nigrum* L.), *J Agric Food Chem*, 56: 4592-4596.
17. Sadecka, J. 2010. Influence of two sterilisation ways, gamma-irradiation and heat treatment, on the volatiles of black pepper, *Czech J Food Sci*, 28 (1): 44-52.
18. Chusri S, Subhadhirasakul S, Tahyoh N, Billateh C, Chaowuttikul C, Chorachoo J, Voravuthikunchai SP. 2012. Effect of different decontamination methods on microbiological aspects, bioactive constituent and antibacterial activity of turmeric (*Curcuma longa* Linn.) Powder, *Eur J Med Plants*, 2(4): 276-289.
19. Anon. 2007. The sterilization of spices, herbs and vegetable seasonings, [http://www.sterigenics.com/services/food\\_safety/global\\_food\\_safety\\_brochure.pdf](http://www.sterigenics.com/services/food_safety/global_food_safety_brochure.pdf) (Accessed 23.02.2014)
20. Salum DC, Araujo MM, Fanaro GB, Purgatto E, Villavicencio ALCH. 2009. Determination of volatiles produced during radiation processing in *Laurus cinnamomum*, *Radiation Phys Chem*, 78: 635-637.
21. Yıldırım İ. 2013. Radyasyonla gıdaların korunması 14. Bölüm, Gıda Mikrobiyolojisi 4. Baskı, Erkmen O (Ed.), Efil Yayınevi, Ankara, Türkiye, s. 283-292,.
22. Marra, F, Zhang L, Lyng, JG. 2009. Radio frequency treatment of foods: review of recent advances, *J Food Eng*, 91: 497-508
23. Kim SY, Sagong HG, Choi SH, Ryu S, Kang DH. 2012. Radio-frequency heating to inactivate *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* O157:H7 on black and red pepper spice, *Int J Food Microbiol*, 153: 171-175.
24. Dababneh BF. 2013. An innovative microwave process for microbial decontamination of spices and herbs, *African J Microbiol Res*, 7(18): 636-645.
25. Jeong SG, Kang DH. 2014. Influence of moisture content on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in powdered red and black pepper spices by radio - frequency heating, *Int J Food Microbiol*, 176: 15-22.
26. Baysal T(ed), İçier F, Baysal AH. 2011. Kızılötesi ısıtma, Güncel Elektriksel Isıtma Yöntemleri, Sidas Medya Ltd. Sti., İzmir, Türkiye, s 310-348.
27. Staack N, Ahrne L, Borch E, Knorr D. 2008. Effect of infrared heating on quality and microbial decontamination in paprika powder, *J Food Eng*, 86: 17-24.
28. Erdoğan SB, Ekiz HI. 2013. Far infrared an ultraviolet radiation as a combined method for surface pasteurization of black pepper seeds, *J Food Eng*, 116: 310-314.
29. Staack N. 2013. Potential of infrared heating as a method for decontaminating food powder, [http://www.sik.se/archive/dokument/Abstract\\_NormanStaack.pdf](http://www.sik.se/archive/dokument/Abstract_NormanStaack.pdf) (Accessed: 23.02.2014)
30. Eliasson L, Libander P, Lövenklev M, Isaksson S and Ahrné L. 2014. Infrared decontamination of oregano: effects on *Bacillus cereus* spores, water activity, color, and volatile compounds, *J Food Sci*, 79: 2447-2455.
31. Çatal H, İbanoğlu Ş. 2010. Gıdaların ozonlanması, *Gıda Teknolojileri Elektronik Derg*, 5(3): 47-55.
32. Akbaş MY, Özdemir M. 2008. Effect of gaseous ozone on microbial inactivation and sensory of flaked red peppers, *Int J Food Sci Technol*, 43: 1657-1662.
33. Asill VR, Azizi M, Bahreini M, Arouiee H. 2013. The investigation of decontamination effects of ozone gas on microbial load and essential oil of several medicinal plants, *Not Sci Biol*, 5(1): 34-38.
34. Torlak E, Sert D, Ulca P. 2013. Efficacy of gaseous ozone against *Salmonella* and microbial population on dried oregano, *Int J Food Microbiol*, 165: 276-280.
35. Özlük Çılak G, Halkman AK. 2014. The effect of ozone on microbial load of black pepper corn. *Abstract Book*, 2nd International Congress on Food Technology; November 05-07, 2014 Kuşadası, Turkey, p 92

36. Altıparmak E, Temizkan R, Demirel Zorba, NN. 2014. The effect of ozone application on microbial load of black pepper. *Abstract Book*, 2nd International Congress on Food Technology; November 05-07, 2014 Kuşadası, Turkey, p 261
37. Kayar G, Yıldız H. 2013. Gıda sanayiinde soğuk plazma tekniği uygulamaları, 8. Gıda Mühendisliği Kongresi, <http://www.gidamuhendisligikongresi.org/storage/catalogs/gizem-kayar.pdf>. (Erişim tarihi: 23.02.2014)
38. Argyropoulos D, Janzen O, Krause N, Romano G, Heindi A, Heberle B, Leins M, Schulz A, Voegen W, Aucrich S, Stroth U, Müller J. 2011. Decontamination of black peppercorn (*Piper nigrum* L.) using microwave – generated low pressure air plazma, [http://opus.ub.uni-hohenheim.de/volltexte/2013/814/pdf/Argyropoulos\\_2011\\_d.pdf](http://opus.ub.uni-hohenheim.de/volltexte/2013/814/pdf/Argyropoulos_2011_d.pdf) (Accessed: 23.02.2014)
39. Kim JE, Lee D, Min SC. 2014. Microbial decontamination of red pepper powder by cold plasma, *Food Microbiol*, 38: 128-136.
40. Sun S, Anderson NM, Keller S. 2014. Atmospheric pressure plasma treatment of black peppercorns inoculated with *Salmonella* and held under controlled storage, *J Food Sci*, 79:2441-2446.
41. Baysal T, İçier F. 2012. Gıda Mühendisliğinde Isıl Olmayan Teknolojiler, Nobel Yayınevi, Ankara, 434s.
42. Skapska S, Windyga B, Kostrzewa E, Jendrzeczak Z, Karlowski K, Fonberg-Broczek M, Scieczynska H, Grochowska A, Gorecka K, Porowski S, Morawski A, Arabas J, Szczepek S. 2003. Effect of ultra-high pressure under argon and temperature on the volatiles and piperine content and microbiological quality of black pepper (*Piper Nigrum* L.), *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II: proceedings of the 2nd International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology*, Dortmund, September 16 - 19, 2002. Winter R (Eds), Springer Verlag, Berlin, Germany. pp 431- 436.
43. Gomez-Lopez VM, Ragaert P, Debevere J, Devlieghere F. 2007. Pulsed light for food decontamination: a review, *Trends Food Sci Technol*, 18: 464-473.
44. Nicorescu I, Nguyen B, Moreau-Ferret M, Agoulon Chevalier S, Orange N. 2013. Pulsed light inactivation of *Bacillus subtilis* vegetative cells in suspensions and spices, *Food Control*, 31: 151-157.
45. Açu M, Yerlikaya O, Kınık Ö. 2014. Gıdalarda ısı olmayan yeni teknikler ve mikroorganizmalar üzerine etkileri, *Gıda Yem Bilimi ve Teknolojisi Derg*, 14: 23-35.
46. Keith DW, Harris LJ, Hudson L, Griffiths MW. 1997. Pulsed electric fields as a processing alternative for microbial reduction in spice, *Food Res Int*, 30: 185-191.
47. Rico CW, Kim G, Ahn J, Furuto M, Kwon J. 2010. The comparative effect of steaming and irradiation on the physicochemical and microbiological properties of dried red pepper (*Capsicum annum* L.), *Food Chem*, 119(3): 1012-1016.
48. Erdoğan SB, Ekiz HI. 2011. Effect of ultraviolet and far infrared radiation on microbial decontamination and quality of cumin seeds, *J Food Sci*, 76(5): 284-292.
49. Anon. 2013. <https://canteach.candu.org/ContentLibrary/20052729.pdf> (Accessed: 23.02.2014)
50. Kirkin C, Mitrevski B, Güneş G, Marriot PJ. 2014. Combined effects of gamma irradiation and modified atmosphere packaging on quality of some spices, *Food Chem*, 154: 255-261.
51. Cheon HL, Shin JY, Park KH, Chung MS, Kang DH. 2015. Inactivation of foodborne pathogens in powdered red pepper (*Capsicum annum* L.) using combined UV-C irradiation and mild heat treatment, *Food Control*, 50: 441-445.
52. Ha JW, Kang DH. 2013. Simultaneous near-infrared radiant heating and UV radiation for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in powdered red pepper (*Capsicum annum* L.), *Appl Environ Microbiol*, 79: 6568-6575.

## Author Instructions

GIDA (2009) 34 (1): 59-63

[www.gidadernegi.org](http://www.gidadernegi.org) / English / The Journal of FOOD /Author Instructions

## Manuscript Submission and Copyright Release Form

GIDA (2009) 34 (1): 67

[www.gidadernegi.org](http://www.gidadernegi.org) / English / The Journal of FOOD /Manuscript Submission and Copyright Release Form

## Final Check List

GIDA (2009) 34 (1): 68

[www.gidadernegi.org](http://www.gidadernegi.org) / English / The Journal of FOOD /Final Check List

can be reached from those addresses. Authors must read carefully the author instructions and prepare the manuscript accordingly.